



T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ

ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**DeneySEL Testis Torsiyonu Modelinde Hidrojen Sülfürün Etkinliğinin
Araştırılması**

Uzmanlık Tezi

Dr. Seçil Yüksel

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Erbuğ Keskin

İstanbul-2018

TEŞEKKÜR

Çocuk cerrahisi uzmanlığı eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini paylaşarak teorik ve pratik anlamda bana yol gösteren Anabilim Başkanımız ve tez danışmanım Prof. Dr. Erbuğ Keskin' e

Uzmanlık eğitimim süresince tecrübelerini ve bilgi birikimlerini benimle paylaşan değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Alaaddin Çelik, Prof. Dr.Tansu Salman, Prof. Dr. Hüseyin Özbey ve Prof. Dr. Feryal Gün Soysal'a

Ayrıca uzmanlık eğitimim süresince bilgi, deneyim ve mesleki becerilerini benimle paylasan ve tez oluşturma süresince yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Başak Erginel'e

Tez çalışmam süresince bana yol gösteren ve yardımlarını esirgemeyen Patoloji Anabilimdalı öğretim üyeleri Prof.Dr Işın Kılıçaslan, Doç. Dr. Yasemin Özlük ve Dr. Hüseyin Karatay'a Biyokimya Anabilimdalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Mehmet Müjdat Uysal, Doç.Dr.Fatih Aydın ve Dr.İlknur Bingül'e İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel tik kurulu üyeleri ve İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü çalışanlarına

Asistanlığım süresince beraber çalıştığım birsürü acı ve tatlı anılarımızın olduğu ve emeği geçen tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma, hemşirelerime, sekreterlerime ve personellerime,

Tüm eğitim hayatım süresince ve bugünlere gelmemde büyük emekleri olan sevgi ve sabırla güç veren, özveri ile her zaman yanımda olan ve her daim destekleyen sevgili Babam Kenan Yüksel, Annem Neriman Yüksel ve Kardesim Murat Erdem Yüksel'e

En içten teşekkürlerimi sunarım...

Dr. Seçil Yüksel

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	IV
TABLolar DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
RESİMLER DİZİNİ	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT	XIII
I-GİRİŞ VE AMAÇ	1
II- GENEL BİLGİLER.....	3
II. A. Testis Embriyolojisi	3
II. A. 1. Testiküler İniş	6
II. B. Testis Anatomisi ve Histolojisi	7
II. B. 1. Testisin Histofizyolojisi.....	12
II. B. 2 Testis Vaskülarizasyonu	12
II. B. 3. Testisin İnnervasyonu.....	14
II. C. Testis Torsiyonu	15
II. C. 1. Epidemiyoloji ve Etyolojisi	15
II. C. 2. Patogeneze.....	15
II. C. 3. Tipleri	16
II. C. 4. Klinik.....	17
II. C. 5. Tanısal Testler ve Görüntüleme Yöntemleri	18
II. C. 6. Ayırıcı Tanı.....	19
II. C. 7. Tedavi	19
II. C. 8 Komplikasyonlar ve Prognoz	20
II. D. İskemi-Reperfüzyon Hasarı	20
II. D. 1. I/R Hasarının Patofizyolojisi ve Etkenleri.....	22
II. D. 2. Antioksidan Savunma Sistemleri	25
II. E. Hidrojen Sülfür (H ₂ S)	26
II. E.1. Hidrojen Sülfür'ün Genel Özellikleri	26
II. E. 2. Hidrojen Sülfür Sentezlenmesi	27

II. E. 3. Hidrojen Sülfür Yıkımı	28
II. E. 4. Hidrojen Sülfür'ün Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri.....	28
II. E. 5. Hidrojen Sülfür'ün Santral Sinir Sistemi Üzerine Etkileri	29
II. E. 6. Hidrojen Sülfür'ün Diabet Üzerine Etkileri.....	29
II. E. 7. Hidrojen Sülfür'ün Üriner Sistem Üzerine Etkileri	30
II. E. 8. Hidrojen Sülfür'ün İntestinal Sistem Üzerine Etkileri	30
III- GEREÇ VE YÖNTEM	32
III. A. Çalışmada Kullanılan Deney Hayvanları	32
III. B. Deney Protokolü	32
III. C. Deney Grupları.....	34
III. D. Deneyin Tamamlanması ve Örneklerin Muhafaza Edilmesi.....	36
III. E. Histopatolojik İnceleme	36
III. F. Biyokimyasal İnceleme	37
III. G. İstatistiksel Değerlendirme	44
IV-BULGULAR	45
IV. A. Serum ve Testis Dokusunda TNF- α Düzeyleri	45
IV. B. Testis Dokusunda MDA, AOPP, MPO Düzeyleri.....	45
IV. C. Testis Dokusunda Antioksidan Göstergeler	45
IV. D. Histopatolojik Bulgular	52
V-TARTIŞMA	56
VI-SONUÇ	63
KAYNAKLAR.....	65

KISALTMALAR VE SİMGELER

H₂S	: Hidrojen sülfür
İ/R	: İskemi-Reperfüzyon
SRY	: Seks belirleyici bölge
SOX9	: SRY box 9
FGF-9	: Fibroblast büyüme faktörü 9
CSL	: Gonadal süspansör ligaman
MİF	: Mülleryan inhibe edici faktör
INSL-3	: İnsulin-like peptide 3
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
OH⁻	: Hidroksil radikali
HOCl	: Hipoklorik asid
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
SNR	: Serbest nitrojen radikalleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
TNF-α	:Tümör nekroz faktörü alfa
IL	: İnterlökin
MDA	: Malondialdehit
MPO	: Myeloperoksidaz
AOPP	: İleri oksidasyon protein ürünü
FRAP	: Demir azaltıcı antioksidan güç
GSH	: Glutasyon
GSSG	: Yükseltgenmiş glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
PHGPx	: Fosfolipid hidroperoksit GPx
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOD-Ex	: Ekstrasellüler SOD
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
CO	: Karbonmonoksit
HS⁻	: Hidrosülfit
S⁻²	: Sülfür iyonu
CBS	: Sistasyonin β sentetaz
CSE	: Sistasyonin gama liyaz
CAT	: Sistein amino transferaz
3- MST	: 3-Merkaptopirüvat sülfürtransferaz
CL	: Sistein liyaz
PLP	: Kofaktörü pridoksal 5'-fosfat
NaHS	: Sodyum hidrosülfit
Na₂S	: Sodyum sülfid
TSMT	: Sitozolik tiyol S-metiltransferaz
GFR	: Glomerüler filtrasyon hızını
HADYЕК	: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
DEHAM	: İstanbul Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi
ELISA	: Enzim bağlı immünosorbent deneyi
SD	: Standart sapma

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Modifiye Johnsen testiküler biyopsi skorlaması.....	37
Tablo 2: Deneysel testis torsiyonu (I/R) modelinde sodyum hidrojen sülfürün serum ve testis dokusu TNF-alfa düzeyleri üzerine etkisi (İnflamasyon) (ortalama±SD).....	45
Tablo 3: Deneysel testis torsiyonu (I/R) modelinde sodyum hidrojen sülfürün (NaHS) , (MDA), (AOPP), (MPO) düzeylerine etkisi.(Oksidan etki) (ortalama±SD)	47
Tablo 4: Deneysel testis torsiyonu (I/R) modelinde sodyum hidrojen sülfürün (NaHS) (GSH),(FRAP),(SOD),(GSH-PX) düzeylerine etkisi.(Antioksidan etki)	49
Tablo 5: Deneysel testis torsiyonu (I/R) modelinde tüm grupların Johnsen'ın ortalama testiküler biyopsi skoru (ortalama±SD)	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Gruplara göre serum TNF-alfa değerlerinin karşılaştırılması.....	46
Şekil 2: Gruplara göre testis dokusu TNF-alfa değerlerinin karşılaştırılması.....	46
Şekil 3: Gruplara göre testis dokusu MDA değerlerinin karşılaştırılması	48
Şekil 4: Gruplara göre testis dokusu AOPP değerlerinin karşılaştırılması	48
Şekil 5: Gruplara göre testis dokusu MPO değerlerinin karşılaştırılması	49
Şekil 6: Gruplara göre testis dokusu GSH değerlerinin karşılaştırılması.....	50
Şekil 7: Gruplara göre testis dokusu FRAP değerlerinin karşılaştırılması.....	50
Şekil 8: Gruplara göre testis dokusu SOD değerlerinin karşılaştırılması.....	51
Şekil 9: Gruplara göre testis dokusu GSH-Px değerlerinin karşılaştırılması	51
Şekil 10: Gruplara göre testis Johnsen skor değerlerinin karşılaştırılması	55

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Testisin embriyolojik gelişimi	5
Resim 2: Testis anatomisi	10
Resim 3: Testis anatomisi ve histolojisi	11
Resim 4: Testis anatomisi	11
Resim 5: Deneysel torsiyon modeli operasyon öncesi hazırlık aşaması	33
Resim 6: Skrotal explorasyon sonrası testislerin insizyon dışına alınması	35
Resim 7: Testis tosiyonu oluşturulması	35
Resim 8: İntraperitoneal hidrojen sülfür uygulanması	35
Resim 9: Bilateral orşiektomi sonrası testis dokuları	36
Resim 10: Patoloji incelemesinde spermatozoa düzeyinde matürasyon içeren normal spermatogenez gösteren seminifer tubulusların gösterilmesi	53
Resim 11: Patoloji incelemesinde seminifer tubuluslarda nekroz, apoptotik cisimcikler ve dev hücrelerin gösterilmesi	53
Resim 12: Patoloji incelemesinde spermatosit ve spermatid düzeyinde matürasyon gösteren seminifer tubulusların gösterilmesi	54
Resim 13: Seminifer tubuluslarda spermatosit ve spermatozoa düzeyine ulaşan matürasyon gösteren germ hücrelerinin gösterilmesi	54

ÖZET

Amaç: Testis torsiyonu spermatik kordun vertikal ekseninde dönmesi ile testis ve yapılarının kanlanması bozulmasına bağlı olarak testiste kalıcı iskemik hasara sebep olabilen akut seyirli, her yaşta görülebilen ve hızlı tanı ve tedavi gerektiren ürolojik acil bir durumdur. Doğru teşhis konulamaz, uygun ve erken tedavi yapılmazsa geri dönüşümsüz testis kaybı ile sonuçlanabilmektedir. Testis hasarının oluşmasında iskeminin etkisi ile birlikte testisin detorsiyonu sonrasında gelişen reperfüzyonun da etkisi vardır. Testis torsiyonunda bu iskemi/reperfüzyon hasarını azaltmak için birçok tedavi yöntemi denenmekte ve araştırılmaktadır

Hidrojen sülfür (H_2S) renksiz, yanıcı, uçucu ve karakteristik çürümüş yumurta kokusuna sahip suda çözünebilen bir gazdır. Uzun yıllar toksik bir gaz olduğu bilinen H_2S ' in daha sonra Kimura ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda organizmada endojen olarak sentezlendiği ve birçok fizyolojik ve patolojik süreci etkilediği saptanmıştır. Wang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalar sonrası karbon monoksit (CO) ve nitrik oksit (NO)'ten sonra üçüncü gazotransmitter olarak kabul edilmiştir. H_2S ' in kardiyovasküler sistemin düzenlenmesinde, hücre proliferasyonu ve apoptozunda, glukoz metabolizmasında, nörotransmisyonunda, inflamasyonda ve damar yataklarında gevşetici etki gösterdiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda H_2S tedavisinin oksidatif stresin neden olduğu doku hasarını iyileştirdiği ve iskemi /reperfüzyon hasarının önlenmesinde rolü olduğu gösterilmiştir. Özellikle enflamasyonun düzenlenmesi konusunda önemli bir rol oynadığı ve doğru oranda kullanılan hidrojen sülfidinin iskemi / reperfüzyon hasarına karşı inhibitör-enflamatuvar sitokinlerin salınmasını sağlayarak antiinflamatuvar, antioksidan ve ayrıca antifibrotik aktiviteye katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Bu özelliği ile hidrojen sülfür iskemi /reperfüzyon , şok, sepsis tedavisinde de kullanılabilir.

Testis torsiyonuna bağlı iskemi / reperfüzyon hasarı sonrası testislerde meydana gelen histolojik ve fonksiyonel değişiklikleri ve farklı tedavi metodlarını inceleyen çok sayıda yayın bulunmaktadır.

İskemi/reperfüzyon hasarını azaltmak için, serbest radikal kurtarıcıları da içeren birçok farmakolojik ajan kullanılmıştır. H_2S tedavisi de testisteki iskemi/reperfüzyon hasarında, hasarı

sınırlamak ve geri çevirmekte kullanılabilecek bir serbest radikal kurtarıcısıdır. Hidrojen sülfür tedavisiyle ilgili birçok yeni çalışma olmasına karşın literatür verileri incelendiğinde testis torsiyonu ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasında amacımız testis torsiyon-detorsiyonu modeli oluşturduğumuz sıçanlarda testistin iskemi ve reperfüzyonuna bağlı oluşan hasarın önlenmesinde hidrojen sülfür (H_2S) tedavisinin iskemi/reperfüzyon hasarına etkisini biyokimyasal ve histopatolojik parametreler kullanarak araştırılmasıdır.

Materyal ve Metod: Deneysel çalışmada 18 adet erkek, erişkin, ortalama ağırlığı 300-400 gr olan Wistar albino cinsi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar sıcaklığı 21 ± 2 °C, %40-60 bağıl nem altında ve ışık 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde bir odadaki ayrı kafeslere yerleştirildi. Tüm sıçan deneylerinde, İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanan protokole uygun hareket edildi. Sıçanlar her grupta 6 adet olacak şekilde rastgele seçilerek 3 gruba ayrıldı. 1. Grup cerrahi stres uygulanan sham grubuydu. 2. Grup testis torsiyonu yapıp 1 saat sonrasında detorsiyon yapılan iskemi reperfüzyon grubuydu. 3. Grup ise testis torsiyonu yapılması sonrasında detorsiyondan 30 dk önce iskemi evresinde Hidrojen sülfür kaynağı olarak NaHS (Sodium hydrosulfide monohydrate, Sigma-Aldrich) kullanılarak normal salinle çözündürülmesi sonrası oluşan çözeltinin (1ml salin de 10 mg/kg/gün doz NaHS) intraperitoneal olarak uygulandığı I/R+NaHS tedavi grubuydu. Tüm cerrahi işlemler intraperitoneal ketamin (50 mg/ kg) ve ksilazin (10 mg/ kg) anestezisi altında yapıldı. Operasyonlarda midskrotal vertikal insizyon sonrası bilateral testisler serbestlendi ve insizyon dışına alındı. Sham grubuna torsiyon uygulanmadan tekrar scrotuma yerleştirildi. Diğer tüm gruplarda bilateral testislerin serbestlenmesinin ardından 720° torsiyone edilerek nontravmatik sütürler ile tespit edildi. 1 saat sonrasında detorsiyon yapıldı. Yalnızca tedavi grubu olan I/R+ NaHS grubuna torsiyon süresinin 30dk sında intraperitoneal olarak NaHS çözeltisi enjeksiyonu uygulandı. Testis torsiyonu toplam süresi bir saat olunca testisin dartosa sabitleme sütürü kesilerek testisler manuel olarak saat yönünün tersi yönünde detorsiyone edilerek reperfüzyon sağlandı. Ardından testisler skrotuma yerleştirilerek anatomik katlar nontravmatik sütür ile kapatıldı. Postoperatif ilk günden itibaren 1 hafta boyunca I/R +NaHS grubuna intraperitoneal olarak günde 1 kez olmak üzere NaHS çözeltisi enjeksiyonu uygulandı. Tüm grupların detorsiyonun 7. gününde skrotum eski insizyon yerinden açılarak bilateral orşiektomi yapılarak doku ve aynı zamanda kan örnekleri alındı. Deney bitiminde bilateral orşiektomi sonrası alınan testis dokuları sol testis ve sağ testis olmak üzere ayrıldı. Sol testislerin tümü histopatolojik inceleme için Bouin solüsyonunda fikse edilerek Patoloji Anabilim Dalına gönderildi. Sağ testislerinde tümü serum fizyolojik ile yıkandıktan ve steril

şekilde kurulandıktan biyokimyasal işlemler için ölçüm yapılacağı güne kadar – 80°C’de derin dondurucuya kaldırıldı. Sıçanlardan biyokimyasal işlemler için intrakardiyak kan alındıktan sonra yüksek doz anestezi altında sakrifiye edilerek deneyin cerrahi kısmı sonlandırıldı.

Bulgular: Grupların intraoperatif ve postoperatif cerrahi değerlendirmesinde 1. grup olan sham grubuna göre makroskopik görünümü baz alındığında, 2. Grup olan ve torsiyon uygulanan I/R grubunda doku canlılığının kötüleştiği, hidrojen sülfür uygulanan 3. Grup olan I/R+NaHS grubunda ise I/R grubuna göre daha iyi doku canlılığının olduğu saptandı. Bir saatlik torsiyon süresinin sonunda testiste mor renk değişikliği ve ödem artışının olduğu görüldü. Testislerin detorsiyone edilmesi sonrasında testislerin rengine kısmi düzelme olmasına rağmen minimal ödemin devam ettiği gözlemlendi. 1 hafta sonra yapılan orşiektomi sonrasında özellikle I/R grubunda testislerdeki mor rengin minimal olduğu ve 1 tanesinde atrofi geliştiği, sham grubuyla I/R +NaHS grubu testisleri arasında morfolojik olarak belirgin fark saptanmadı.

Yapılan mikroskopik incelemede sham grubunda normal spermatogenez gösteren seminifer tubulusların olduğu I/R grubunda seminifer tübül yapılarının ve spermatogenik hücrelerin düzeninin bozulduğu, tübül içerisinde çok çekirdekli granülasyon hücrelerinin gözlemlendiği, bazı seminifer tübülüslerde spermatogenik hücrelerin bulunmadığı, I/R +NaHS grubunda ise seminifer tubuluslarda spermatosit ve spermatozoa düzeyine ulaşan maturasyon gösteren germ hücreleri saptandı. Histopatolojik incelemede modifiye Johnsen skorlaması kullanılarak bu skora göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p<0.05$). Farklılığın tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; sham grubunun değerleri ile I/R grubu arasında yapılan değerlendirme sonrasında sham grubunun değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptandı. ($p<0.05$). I/R grubunun değerleri ile I/R+NaHS grubunun değerlerinin karşılaştırılması sonrasında I/R grubu değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu saptandı ($p<0.05$). Sham grubu ve I/R+NaHS grubu arasında ise Johnsen skoru değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı. ($p>0.05$)

Serum ve testis dokusu TNF- α düzeylerine bakıldığında gruplar arasında anlamlı bir değişiklik göstermediği saptandı. ($p>0,05$). Miyelperoksidaz (MPO) aktivitesinin I / R grubundaki sıçanların testis dokusunda sham grubuna göre anlamlı artışlar gösterdiği ve I/R+NaHS grubunda H₂S uygulaması ile artmış olan MPO aktivitesi düzeylerinde anlamlı bir azalma olduğu saptandı. ($p<0,05$). Yine aynı şekilde ileri oksidasyon protein ürünü (AOPP) aktivitesinin I / R grubundaki sıçanların testis dokusunda sham grubuna göre anlamlı artışlar

gösterdiği ve I/R+NaHS grubunda H₂S uygulaması ile artmış olan AOPP aktivitesi düzeylerinde anlamlı bir azalma olduğu saptandı. ($p<0,05$) Malondialdehit(MDA) düzeylerine bakıldığında gruplar arasında anlamlı bir değişiklik göstermediği saptandı. ($p>0,05$) .

Glutasyon (GSH) düzeylerinin I/ R grubundaki sıçanların testis dokusunda sham grubuna göre anlamlı bir azalma gösterdiği ve I/R+NaHS grubunda ise H₂S uygulaması ile GSH düzeylerinde anlamlı bir artış gösterdiği saptandı. ($p<0,05$) Buna karşılık Süperoksit dismutaz (SOD) , Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve Demir azaltıcı antioksidan güç (FRAP) aktivitelerinde herhangi bir değişiklik görülmedi.

Sonuç: Testis torsiyonunda hidrojen sülfürün detorsiyon sonucu oluşan iskemi/reperfüzyon hasarını önlemede etkili olduğunu saptadık. Fakat literatürde bu konuyla ilgili ilk çalışma olduğundan saptadığımız bulguların daha geniş kapsamlı deneysel çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Testis torsiyonu, Hidrojen sülfür, İskemi, Reperfüzyon hasarı, Oksidatif stres

ABSTRACT

Objective: Testicular torsion is an acute urological emergency in all ages requiring rapid diagnosis to prevent the permanent ischaemic damage of the testicles due to the vertical rotation of spermatic cord cutting off the blood supply to testicles. Irreversible testicular loss may occur if the disease diagnosed not correctly and not treated properly. The reperfusion has also an effect on the testicular loss. Several approaches have been tried to reduce the damage of ischemia reperfusion in testicular torsion

Hydrogen Sulfide (H_2S) is a colorless, flammable and volatile water-soluble gas with a characteristic odor of rotten egg. H_2S which has been known to be a toxic gas for many years, was later identified that it is synthesised as an endogenous in the organism and effect many physiological and pathological processes in studies performed by Kimura and his colleagues. H_2S was accepted as the third gasotransmitter after Carbon Monoxide (CO) and Nitric Oxide (NO) by Wang and his colleagues. Relaxing effect of the H_2S on regulation of cardiovascular system, cell proliferation and its apoptosis, glucose metabolism, neurotransmission, inflammation and vascular beds has been shown in several studies.

Recent studies have shown that H_2S treatment cure tissue damage which is caused by oxidative stress and has a role in the prevention of I / R damage. It has been shown that, the correct use of H_2S which is play an important role, especially in regulation of inflammation, contribute to antiinflammatory, antioxidant and antifibrotic activity by releasing inhibitory-inflammatory cytokines against I / R damage. With this feature, H_2S can be used in the treatment of ischemia / reperfusion, shock, sepsis.

There are numerous studies examining histological and functional changes in the testicles and different treatment modalities after ischemia /reperfusion injury due to testicular torsion. In order to reduce ischemia / reperfusion damage, many pharmacological agents including free radical scavenger have been used. H_2S is also a free radical scavenger that can be used to limit and reverse in the ischemia / reperfusion damage in the testicles. There are many recent studies on the treatment of H_2S and no available studies have been found in terms of the treatment of testicular torsion. In this thesis, we aimed to investigate the effect of H_2S treatment on ischemia / reperfusion injury by using biochemical and histopathological

parameters to prevent damage caused by ischemia / reperfusion in testis torsion-detorsion model.

Materials and Method: In the experimental study, 18 ea, male, adult, Wistar albino rats with an average weight of 300-400 gr were used. The rats were placed in separate cages in a 12 hours illuminated, 12 hours darkened room with temperature of 21 ± 2 °C, %40-60 relative humidity. All the rat experiments has been performed according to protocol which is approved by Istanbul University Animal Experiments Local Ethics Committee. The rats were randomly divided into 3 group with 6 number in each group. 1st group was the sham group which is applied surgical stress. 2nd group was the ischemia /reperfusion group which detorsion performed 1 hour later than testicular torsion application. 3rd group was the I / R + NaHS treatment group which is applied intraperitoneally during the ischemia phase with normal saline solutionized NaHS (Sodium hydrosulfide monohydrate, Sigma-Aldrich) solution (10 mg / kg / day dose NaHS in 1ml Saline) as a source of Hydrogen Sulfide after the testicular torsion was performed 30 minutes before the detorsion. All surgical procedures have been performed under anesthesia with intraperitoneal ketamine (50 mg / kg) and xylazine (10 mg / kg). Bilateral testicles released and then taken out of incision after midscrotal incision. It was placed in the scrotum before torsion was applied to the sham group. Bilateral testicles were determined by nontraumatic sutures with 720° torsion after releasing of bilateral testicles in all other groups. Detorsion has been performed after 1 hour. Only the I / R + NaHS treatment group received intraperitoneal injection of NaHS solution at 30th minute of the torsion time period. Reperfusion has been conducted by cutting the dartos fixation suture of testicles and manually counterclockwise when the total duration of the testicular torsion was over 1 hour. Then the testicles were placed in to the scrotum and the anatomic layers were closed with non-traumatic sutures. NaHS solution was injected intraperitoneally once once a day for 1 week from the first postoperative day to the I/ R+ NaHS group. The scrotum was opened from old incision location and bilateral orchiectomy has been performed due to receive testis tissue and blood samples on the 7th day of the detorsion of all groups. Testicular tissues which were taken after bilateral orchiectomy separated into two as right and left testis at the end of the experiment. All left testes were fixed in Bouin solution and sent to Pathology Department for histopathological examination. All right testes were washed with normal saline, dried in a sterile way and stored in – 80°C deepfreeze up to the date of biochemical processes. Intracardiac blood has been received from rats for the biochemical procedures. After the procedure, rats were

sacrificed under high dose anesthesia and the surgical phase of the experiment has been completed.

Results: The intraoperative and postoperative surgical evaluation of the groups based on the macroscopic appearance according to the sham group. Tissue viality worsened in the torsion applied I / R group. Better tissue viality has been found in the Hydrogen Sulfide applied I / R + NaHS group according to I / R group. Purple discoloration and increase in edema have been observed at the end of one hour torsion period. It was observed that minimal edema continued despite partial improvement in the color of the testes after detorsion of the testes. After the orchiectomy which was performed 1 week later, it was observed that the purple color in the testis was minimal and atrophy developed in one especially I / R group. No significant morphological difference has been found between sham group and I / R + NaHS group.

According to microscopic examination; it was observed the existence of seminiferous tubules that shows normal spermatogenesis in sham group. It was also observed that there is no spermatogenic cells observation in some seminiferous tubules, there is multi-core granulation cells in tubule, distortion of spermatogenic cells and seminiferous tubule structures in I / R group. Mature showing germ cells reaching spermatocytes and spermatozoa have been observed in seminiferous tubules in I / R + NaHS group. According to Johnsen scoring, it was found that there is significant statistical differences between groups ($p < 0.05$). As a result of the paired comparisons to determine the differences; sham group values were found statistically and significantly higher according to comparison between sham and I / R groups ($p < 0.05$). I / R group values were found statistically and significantly lower according to comparison between I / R and I / R + NaHS groups ($p < 0.05$). No significant and statistical difference has been found according to comparison between sham and I / R + NaHS groups based on Johnsen scoring ($p < 0.05$).

When serum and testis tissue $\text{TNF-}\alpha$ levels were examined; it was found that examination results not showed any significant difference between groups ($p < 0.05$). It was also found that Myeloperoxidase (MPO) activity of the rats placed in I / R group showed significant increases in testicular tissue compared to sham group and MPO activity levels which was increase due to application of H_2S showed significant decrease in I / R + NaHS group ($p < 0.05$). Likewise; it was found that advanced oxidation protein product (AOPP) activity of the rats placed in I / R group showed significant increase in testicular tissue compared to sham

group and AOOP activity levels which was increase due to application of H₂S showed significant decrease in I / R +NaHS group (P<0.05).

When the malondialdehyde (MDA) levels were examined, it was found that there was no difference between groups (p<0.05).

It was found that Glutathione (GSH) levels of the rats placed in I / R group showed significant decrease in testical tissue compared to sham group and GSH levels of I / R + NaSH group showed significant increase with H₂S application (p<0.05). On the contrary, any change has not been observed in Superoxide dismutase (SOD), Glutathione peroxidase (GSH-Px) and and Ferric reducing antioxidant power (FRAP) activities.

Conclusion: We found that Hydrogen Sulfide is effective on preventing ischemia / reperfusion which is caused by detorsion in testicular torsion. The findings of our study should be supported with more extensive experimental studies because our study is the first study on this subject in the literature.

Key Words: Testicular torsion, Hydrogen sulfide, Ischemia, Reperfusion damage, Oxidative stress

I-GİRİŞ VE AMAÇ

Testis torsiyonu spermatik kordun vertikal ekseninde dönmesi ile testis ve yapılarının kanlanmasının bozulmasına bağlı olarak testiste kalıcı iskemik hasara sebep olabilen akut seyirli, her yaşta görülebilen ve hızlı tanı ve tedavi gerektiren ürolojik acil bir durumdur. Doğru teşhis konulamaz, uygun ve erken tedavi yapılmazsa geri dönüşümsüz testis kaybı ile sonuçlanabilmektedir. (1, 2, 3)

Testis torsiyonunda venöz dönüşün bozulmasına bağlı olarak ödem ve hemoraji meydana gelmesi sonrasında ilerleyen süreçte venöz konjesyon arteryel dolaşımında bozarak arteryel obstrüksiyon bulgularının da meydana gelmesine neden olur. Bu süreçte kan akımı azalması sonucu testiste hipoksi ve devamında iskemi meydana gelir. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda testis dokusunda iskemiye en duyarlı hücrelerin başlıca germ hücreleri olduğu saptanmıştır. (4) Testis torsiyonu sırasında oluşan iskemik hasar reaktif oksijen radikallerine (ROS) bağlı olarak oksidatif stres ve inflamasyon sonucu meydana gelmektedir. İskemik hasar döneminde testiküler hasarın primer nedeni oksijen desteğinin azalması ile ilişkilidir. (5) İskemi meydana gelmiş dokuların canlılığını koruyabilmek için en kısa sürede doku reperfüzyonun sağlanması gerekmektedir. Testisin detorsiyone edilmesi sonrasında reperfüzyonun da hücresel hasara neden olduğu bu hasarın ROS üretiminde artış ve nötrofil infiltrasyonu ile bağlantılı olduğu bilinmektedir. Bu süreçte meydana gelen radikaller hücre membranında bulunan lipidlerin peroksidasyonuna, proteinlerin denaturasyonuna ve DNA hasarına neden olur. (6)

Hidrojen sülfür (H_2S) renksiz, yanıcı, uçucu ve karakteristik çürümüş yumurta kokusuna sahip suda çözünebilen bir gazdır. Uzun yıllar toksik bir gaz olduğu bilinen hidrojen sülfürün daha sonra Kımura ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda organizmada endojen olarak sentezlendiği ve birçok fizyolojik ve patolojik süreci etkilediği saptanmıştır. Özellikle H_2S in beyin, kardiyovasküler sistem, karaciğer ve böbrekte en yüksek düzeyde üretildiği tespit edilmiştir. (7) Wang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalar sonrası karbon monoksit (CO) ve nitrik oksit (NO)'ten sonra üçüncü gazotransmitter olarak kabul edilmiştir. Yapılan çalışmalarda H_2S nin vasküler tonusun regülasyonunda, myokardiyal kontraktiletiyi düzenlemede, nörotransmisyonunda ve insülin sekresyonu gibi pek çok fizyolojik fonksiyonda rol aldığı gösterilmiştir. (8,9) Son zamanlarda yapılan çalışmalarda H_2S tedavisinin oksidatif

stresin neden olduğu doku hasarını iyileştirdiği ve iskemi / reperfüzyon hasarının önlenmesinde rolü olduğu gösterilmiştir. Özellikle enflamasyonun düzenlenmesi konusunda önemli bir rol oynadığı ve doğru oranda kullanılan hidrojen sülfürün iskemi / reperfüzyon hasarına karşı inhibitör-enflamatuvar sitokinlerin salınmasını sağlayarak antiinflamatuvar, antioksidan ve ayrıca antifibrotik aktiviteye katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Bu özelliği ile hidrojen sülfür iskemi / reperfüzyon , şok , sepsis tedavisinde de kullanılabilir. (10,11,12)

Testis torsiyonuna bağlı iskemi / reperfüzyon hasarı sonrası testislerde meydana gelen histolojik , fonksiyonel değişiklikleri ve farklı tedavi metodlarını inceleyen çok sayıda yayın bulunmaktadır.

İskemi / reperfüzyon hasarını azaltmak için serbest radikal kurtarıcıları da içeren birçok farmakolojik ajan kullanılmıştır. H₂S tedavisi de testisteki iskemi / reperfüzyon hasarını sınırlamak ve geri çevirmekte kullanılabilecek bir serbest radikal kurtarıcısıdır. H₂S tedavisiyle ilgili birçok yeni çalışma olup testis torsiyonu tedavisi açısından mevcut veriler incelendiğinde herhangi bir çalışmaya rastlanmamış olup bu çalışma ilk defa yapılmıştır. Bu tez çalışmasında amacımız testis torsiyon-detorsiyonu modeli oluşturduğumuz sıçanlarda iskemi / reperfüzyon hasarının önlenmesinde H₂S tedavisinin etkisinin biyokimyasal ve histopatolojik parametreler kullanarak araştırılmasıdır.

II- GENEL BİLGİLER

II. A. Testis Embriyolojisi

Embriyonun cinsiyeti genetik ve kromozomal olarak sekonder oositi dölleyen spermin türüne göre fertilizasyon sonucunda ortaya çıkar fakat her iki cinsiyetin gonadları gebeliğin 7. haftasına kadar erkek veya dişi morfolojik özelliklerine sahip değildir ve farklılaşmamış gonadlar olarak adlandırılırlar. Gonadların farklılaşmaları XX, XY kromozom kompleksine bağlıdır. (13,14)

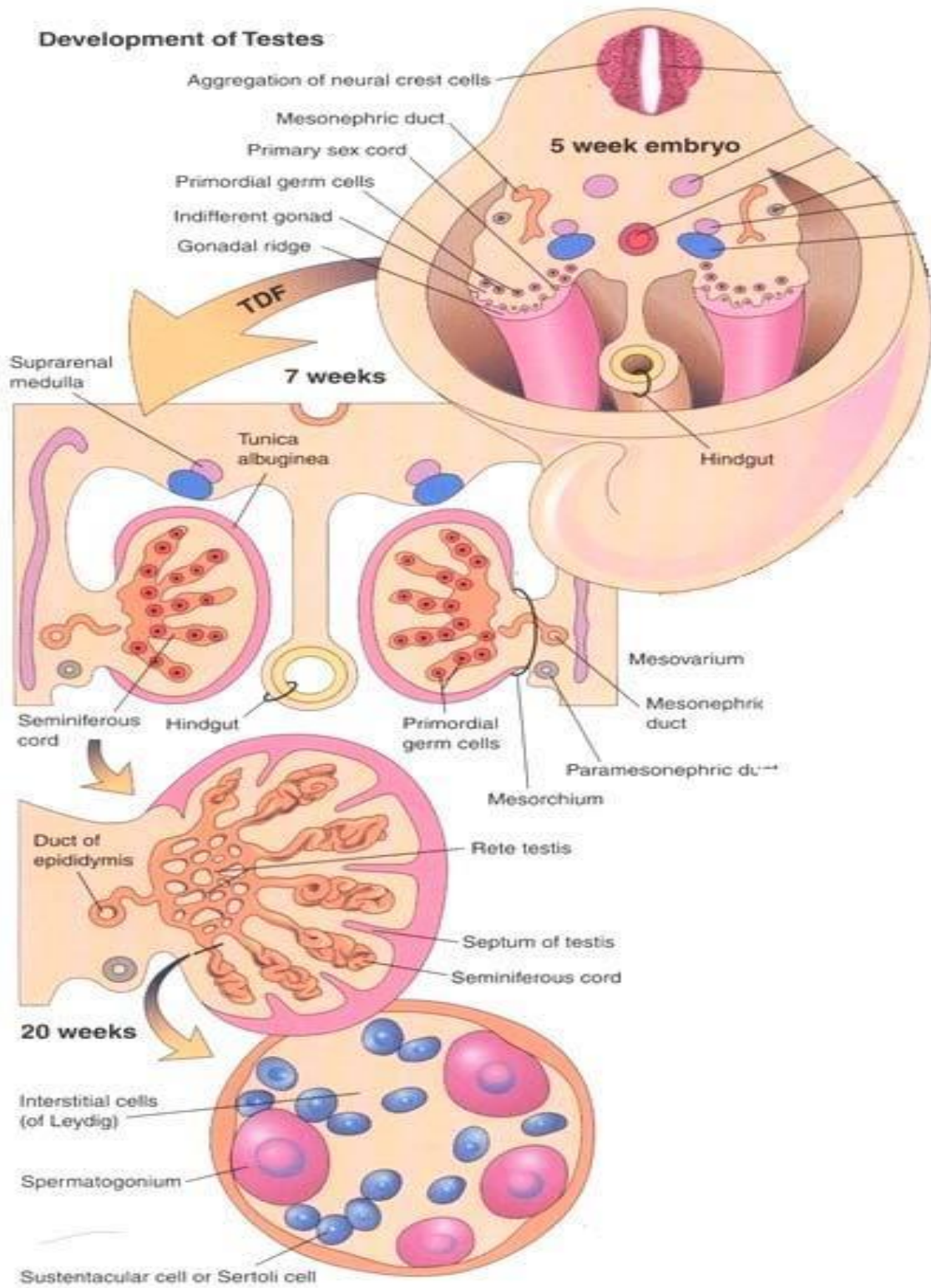
Gonadlar; mezotelyum (posterior abdominal duvarı döşeyen mezodermal epitelyum), mezenşim (mezotelyum altındaki embriyonik bağ dokusu) ve primordiyal germ hücreleri olmak üzere üç embriyonel kaynaktan köken alırlar. Gonadlar başlangıçta bir çift halinde, çöломik epitelin proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşması sonucunda oluşmuş genital veya gonadal kabartı halinde belirirler. Gelişimin 6. haftasına kadar geçen sürede bu genital kabartılar içinde germ hücreleri bulunmamaktadır. Primordial germ hücreleri, embriyonik gelişimin erken evrelerinde yolk kesesinin allantoise yakın duvarında, endoderm hücreleri arasında ortaya çıkar. Primordial germ hücreleri ameboid hareketlerle son barsak mezenterinin dorsali boyunca ilerleyerek 5. haftanın başında primitif gonadlara ulaşır ve epitelyum hücrelerinin altındaki mezenşimin içine gömülürler. Genital kabartı içinde germ hücrelerinin görülmesi 6. gestasyonel haftada olur. Bu dönemde erkek veya dişi gonadal yapıların birbirinden ayırt edilmesi mümkün değildir ve bu dönem farklılaşmamış gonad olarak adlandırılır. Böylece gelişimin 5. haftasının sonunda korteks ve medullaya sahip bipotansiyel gonad oluşturulmuştur. (13,15)

Bipotansiyel gonadların testis veya over dokusuna dönüşümü genetik yapı ile belirlenir. Primordial germ hücrelerinin sahip olduğu kromozomlar XY ise embriyo genetik olarak erkektir. Altıncı haftada Y kromozomunun kısa kolundaki SRY (seks belirleyici bölge) geni ve SOX9, FGF9 gibi diğer testis belirleyici genlerin birlikte gerçekleşen aktivasyonu sonucunda gonadın korteks dokusu gerileyerek testis veya medullar kordonları oluşturulur. Bu kordonlar gonadın hilusunda ince ve daha küçük kordonlara parçalanıp ağ şekline dönüşerek “rete testis”i oluştururlar. (16) Bu safhada testis kordonları primordial germ hücreleri ve sertoli destek hücrelerinden oluşur. Testiste primordial germ hücrelerinden spermatogoniumlar , plika genitalis mezotelinden sertoli hücreleri oluşur. Sertoli hücreleri 6. haftada ortaya çıkar ve

8. haftadan sonra müllerian inhibitör faktör (MIF) salgılanır. Gonadal sırtın kendi mezenşiminden gelişen intertisyel leyding hücreleri testis kordonlarının arasında yer alır ve bu kordonların farklılaşmaya başlamasından sonra gelişmeye başlarlar. Leydig hücreleri 8. haftada ortaya çıkmaktadır ve bu hücreleri 10. haftadan itibaren testosteron ve androstenedion salgılamaya başlar. Testisler artık genital kanal ve dış genital organların cinsiyetini belirleyebilecek duruma gelmiştir. (13,16) Gonadal sekse göre gelişen internal ve eksternal genital organlar, diferansiye olan gonadın hormonal fonksiyonuna göre belirlenmektedir. Bu kritik hormon mekanizmasında bir aksama olduğunda dişi yönde farklılaşma veya anormal erkek yönde farklılaşma gelişebilmektedir. Erkek dış genital organlarının gelişimi için bu dokularda testosteronun dihidrotestosterona dönüşümünü sağlayan 5-Alfa redüktaz enzimine gerek vardır. (13)

Testis gelişiminde temel rol oynayan SRY geni testisin, mezonefrik kanal tubüllerinin gonadal sırtta penetre olabilmesini ve testislerin gelişimini sağlayan kemotaktik ajan salgılamasını uyarmaktadır. Bunun yanında SRY geni sertoli ve leydig hücrelerinin farklılaşabilmesi için gerekli olan ve etkisini bir başka transkripsiyon faktörü olan SOX9 geni üzerinden gösteren steroidogenezis faktörü 1' in salgılanmasını düzenlemektedir. Sertoli hücrelerinin salgıladığı müllerian inhibe edici faktör (MIF) müllerian (paramezonefrik) kanalların regresyonunu neden olur. Testis kordonları arasında yer alan interstisyel leydig hücrelerinden salgılanan testosteron, 5-alfa redüktaz enzimi yardımıyla dihidrotestosterona dönüştürülür. Reseptörü ile kompleks oluşturan testosteron wolfian (mezonefrik) kanalların virilize olmasından sorumluyken, Reseptörü ile kompleks oluşturan dihidrotestosteron ise erkek dış genital yapılarının diferansiyasyonuna yardımcı olur. (13)

Pübertal gelişime kadar solid yapıda olan ve kapalı olan testis kordonları pübertal gelişim ile birlikte lümen yapısı oluşarak seminifer tübülleri meydana getirir. Rete testis tübülleri ve seminifer tübüllerin bir araya gelmesiyle duktuli efferentesler meydana gelir. Epididim, duktuli efferenteslerden sonra gelen, kendi üzerine kıvrılmış tüp şeklinde, spermlerin depolandıkları ve olgunlaştıkları bir yapıdır. Wolfian kanallar kıvrımlar yaparak epididimisi (ductus) meydana getirir. (13,15) Mezonefrik kanal epididimin kuyruk kısmından seminal vezikül tomurcuğuna ulaşınca kadar kalın bir kas kılıfı ile sarılıdır ve bu kısma duktus deferens adı verilir. Seminal veziküllerden sonra devamlılık gösteren duktus deferens kısmı ise duktus ejakulatoryus adını alır. Erkekte paramezonefrik kanalın kranial ucu dışında tümü dejenere olmaktadır. Dejenere olmayarak devamlılık gösteren kısımdan ise apendiks testis oluşur. (17)



Resim 1 - Testisin embriyolojik gelişimi

Dept. of Anatomy, Histology & Embryology Peking Union Medical College

II. A. 1. Testiküler İniş

Testis ve mezonefroz 2. ayın sonunda ürogenital mezenter aracılığıyla karın arka duvarına bağlı şekilde bulunur. Testisin karın duvarına bağlı kalmasını sağlayan iki ligaman bulunmaktadır. İlki testisi kranial bölgeye doğru çeken kranial gonadal süspansör ligaman (CSL). İkincisi ise testisin kaudal kısmından başlayarak uzanım gösteren mezenşimal yapı gubernakulumdur. (kaudal genital ligaman). Başlangıçta lomber bölgede bulunan testisler, üçüncü fetal aydan itibaren skrotuma doğru inişe başlarlar. Hipotezlere göre testislerin skrotuma inişi transabdominal ve inguinokrotal olmak üzere iki fazda gerçekleşir.(18, 19, 20, 21)

1- Transabdominal Faz

İlk faz transabdominal evredir ve testis bu evrede karın arka duvarı boyunca inişe geçer; gebeliğin 17. Haftasında iç inguinal halka hizasına gelir ve gebeliğin 28. haftasına kadar burada kalır. Testisin inguinal bölgeye kadar indiği transabdominal fazda mekanik etki, gubernakulum veya genitoinguinal ligamandır. Testisin skrotuma inişinin tamamlamasından önce gubernakulum inguinal bölgede eksternal ve internal oblik kaslar arasında uzanım gösterir. Gubernakulumun transabdominal fazda erkeklerde leyding hücrelerinden salgılanan insulin-like peptide 3 (INSL-3) etkisi ile yapısında meydana gelen kalınlaşma sayesinde inguinal kanalı genişlettiği düşünülmektedir. Testisin skrotuma iniş dönemi müllerian inhibe edici faktör (MIF) ve androjen hormonların etkisi altında gerçekleşmektedir. MIF in testisin iniş yolu üzerindeki müllerian yapıların kaybolmasını sağlayarak mekanik engelleri ortadan kaldırdığı düşünülmektedir. Erkeklerde androjenlerin etkisi ile regrese olan CSL testisin kaudal yönde mobilizasyonuna olanak sağlar. (17, 18, 19, 20, 21, 23, 24).

2- Inguinokrotal Faz

2. evre olan inguinokrotal fazın gerçekleşmesi 28-35. gestasyonel haftalar arasında olur. Bu evre gubernakulumun skrotuma migrasyonunun olduğu dönemdir. Testis bu evrede inguinal kanal yoluyla karın ön duvarını geçerek skrotuma iner. Testis gebeliğin yedinci ayından sonra inguinal kanalı geçmiş ve doğumdan hemen önce de gelişimini tamamlamış halde skrotumdaki yerini alır. Androjenler, inguinokrotal migrasyonu başlatmaktan sorumlu tutulmaktadırlar. (21,22) Testisin skrotum içine inmeye başlaması ile birlikte gubernakulumun ekstraabdominal kısmı oluşur ve inguinal bölgeden başlayarak skrotuma doğru ilerler. Testis inguinal kanalı terk ederken gubernakulumun ekstraabdominal bölümü skrotuma

tutunmaktadır. (17) Çölemik boşluktan oluşan periton, karın ön duvarının her iki yanında vaginal proses adı verilen peritoneal bir cep oluşturur. Musküler ve fasiyal yapılarla birlikte skrotuma doğru ilerleyen prosesus vaginalis inguinal kanalı meydana getirir. Testisler vajinal proses kökenli peritoneal tabaka ile birlikte içinden geçtiği karın ön duvarına ait tabakalar ile örtülüdürler. Transversalis fasyası internal spermatik fasyayı; internal oblik kas ise kremaster adalesini ve fasyasını oluşturur. Eksternal oblik kasda eksternal spermatik fasyayı oluşturur. Transversus abdominis kası bu bölgenin üzerinde arkus yaptığı ve göç yolu üzerinde bulunmadığı için testis ve testise ait yapıların çevresinde bu kasa ait tabaka bulunmaz. (13) Büyüyen organlarla beraber karın içi basıncın artması ve gubernakulumda meydana gelen değişiklikler ile beraber processus vaginalis oluşuktan sonra gubernakulum rehberliğinde önce epididim, ardından da testis processus vaginalis içine girer. (25) Gubernakulumun kısaltmaya devam etmesi ile testis skrotumun alt bölümüne kadar iner ve ardından processus vaginalis kapanır. (26)

II. B. Testis Anatomisi ve Histolojisi

Testisler skrotum içerisinde yer alan ovoid şekilli olup gonadlar olup erişkin erkekte yaklaşık 4x3,5x3 cm boyutlarındadır ve her bir testisin hacmi ortalama olarak 30 ml kadardır. Testisin 2/3 olan anterolateral bölümü serbest iken, posterolateral yüzü epididim, bağ dokusu ve damarlarla örtülüdür. Testis dıştan içe doğru en dışta tunika vaginalis, ortada kollajen ve düz kas elamanlarını içeren tunika albuginea ve en içte vasküler yapıların yoğun şekilde bulunduğu tunika vaskulosa adları verilen 3 yapı oluşturduğu sert bir kapsül ile sarılıdır. Tunika vaginalisin üzerinde ise sırası ile internal spermatik fasya, kremaster kası ve eksternal spermatik fasya, dartos fasyası ve cilt yer alır. Tunika vaginalis; viseral ve pariyetal tabaka olmak üzere 2 tabakalıdır. Testisin ön yüzünde ve her iki yanında viseral tabaka, testisin alt kısmından üst kısmına doğru pariyetal tabaka uzanır. Bu iki tabaka arasındaki potansiyel boşlukta testisin etrafını saran az miktarda seröz sıvı bulunur ve bu sıvının artışı ile hidrosel meydana gelir. Ekstravaginal testis torsiyonu bu boşlukta oluşur. (27) Tunika albuginea kalın, sert fibröz bir tabaka olup testis iç kısmını sarar. Tunika albuginea testisin arkasında kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Tunika albuginea yapısında esas olarak kollajen doku içine dağılmış çok sayıda, dallanmış, düz kas hücreleri vardır ve bu lifler otonomik innervasyon sonrasında ejakülasyon sırasında kasılarak efferent duktuslara doğru sperm hücrelerinin hareket etmesinde yardımcı olur. Tunika albuginea iç yüzünden çıkan fibröz septalar testisteki seminifer tübüleri yaklaşık 250-300 adet piramit biçimli lobüllere ayırır. (28) Her bir lobülün içinde, bir ile dört arasında değişen sayıda kıvrımlı seminifer tübül bulunur. Seminifer tübüller

ise rete testis olarak isimlendirilen kanal ağına açılmaktadır. Seminifer tübüller erkek üreme hücreleri olarak adlandırılan spermatozoaları üretirler. Rete testis 6-12 efferent duktusun birleşmesi ile oluşarak ve epididimisin baş kısmına bağlanarak, testiküler sıvı ve spermatazoanın epididime aktarılmasını sağlar.

Tunica vaskulosa testisin septumlarının iç yüzeyini örten yapıdır ve tunica albugineanın hemen altında yer alır. Testisin septumlarının iç yüzünü örttüğünden dolayı kapsül aracılığıyla septalarla 250 kadar kompartmana bölünen testis kompartmanları etrafında uzanmaktadır. Her bir septum, interstisyel doku ve gelişmekte olan germ hücreleri içeren seminifer tübül ve en az bir sentrifugal arter içerir. İnterstisyel dokuda, leydig hücreleri, mast hücreleri makrofajlar, sinir, kan ve lenfatik damarları bulunur. (29)

Epididim baş, gövde ve kuyruk olmak üzere üç bölümden oluşur. Epididim başı, testisin superiorunda, gövde ve kuyruk bölümü ise posterolateral kısmında yer alır. Epididimin gövde ve kuyruğu kıvrımlı tek bir kanaldan oluşmuştur. Rete testisten çıkan 8- 20 adet duktuli efferentes epididim baş kısmına girerek epididim lobüllerini oluştururlar. Her lobül 15-20 cm boyunda, kıvrımlı tek bir tubulusdan oluşur. Bu tubuluslar birleşerek, kıvrımlı bir epididim kanalı meydana getirirler. Bu kanaldan kuyruğa doğru ilerledikçe kanalın çapı ve kalınlığı artarak duktus deferens meydana gelir. Epididim sperm depolanması, taşınması ve olgunlaşması için gerekli bir organdır. (30)

Spermatik kord; duktus deferens, duktus deferensin arter ve veni, testisküler arter, ‘plexus pampiniformis’, ‘processus vaginalis peritonei’, ‘musculus cremaster’, ‘arteria cremasterica’, ‘vena cremasterica’, lenf damarları, ilioinguinal sinir ve genitofemoral sinirin genital dallarından oluşur. Tüm bu oluşumlar birbirine gevşek bir bağ dokusu ile bağlanmıştır. (31)

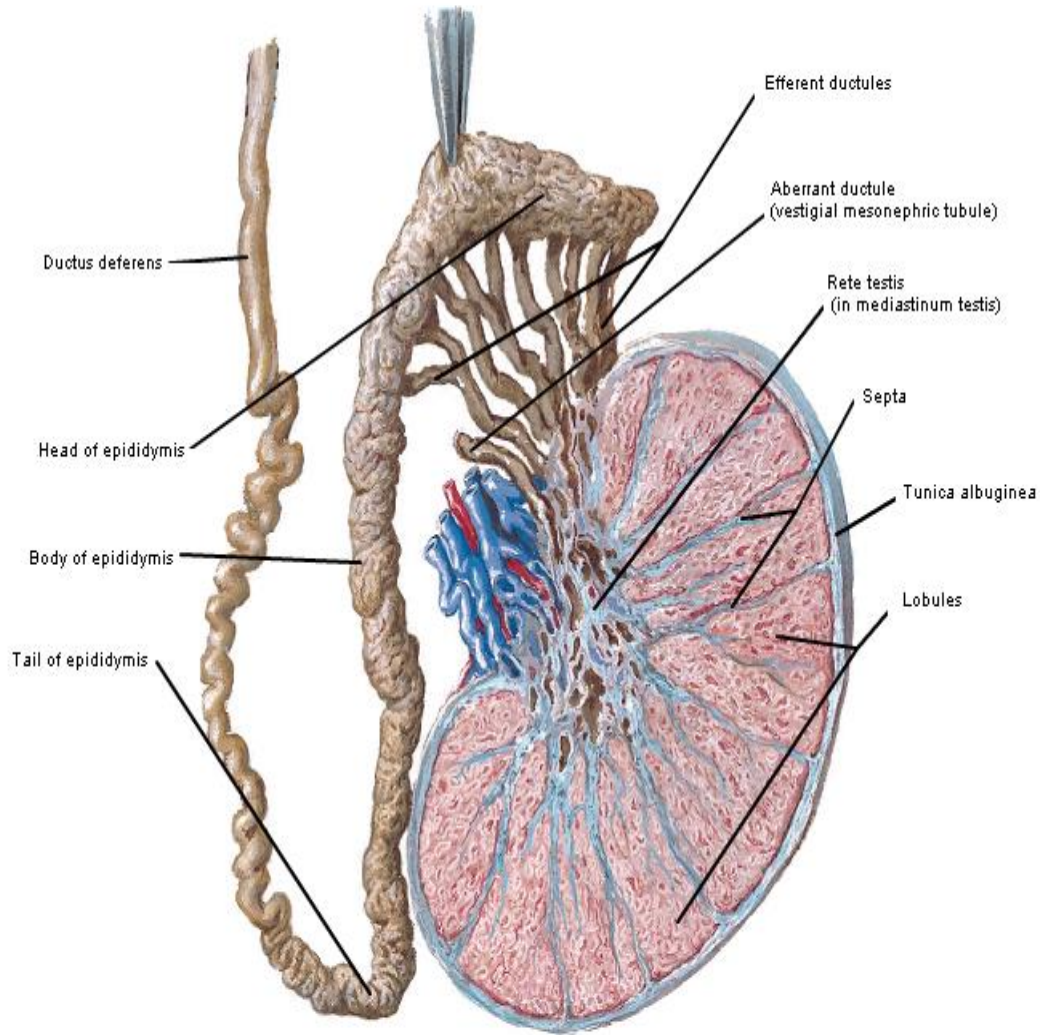
Testisler; seksüel maturasyonla birlikte embriyolojik gelişimi ve üreme yeteneğini etkileyen; ekzokrin ve endokrin fonksiyonlara sahip bir çift organdır. Testislerde leydig hücreleri tarafından üretilen testosteron puberte döneminde sperm üretiminin başlamasını ve sekonder seks karakterlerinin oluşumunu etkiler. (32)

Testisin %30’unu intersitisyel doku oluşturur ve bu dokunun intertübüler bölgesinde leydig hücreleri, lenfatikler, kan damarları, sinirler, makrofajlar bulunur. Santral yerleşimli ve tek çekirdeği bulunan leydig hücreleri, testosteron üretimini sağlar. Lüteinizan hormonun uyarısıyla kolesterolden sentezlenen testosteronun; dolaşımda %98’i proteinlere bağlı, % 2’si

ise serbest halde bulunur. Folikül stimulan hormon ve lüteinizan hormon hipofizden salgılanarak testiste spermatogenezi başlatır. Folikül stimulan hormon aracılığıyla sertoli hücrelerinde üretilen androjen bağlayıcı protein; lüteinizan hormon etkisiyle leydig hücrelerinde üretilen testosteronu bağlayarak seminifer tübüle getirir. (13, 32, 33) Seminifer tubuli, testis kitlesinin % 85-90 ını oluşturan yapıdır. Seminifer tübüller erkek üreme hücreleri olarak adlandırılan spermatozoaları üretirler. Seminifer tübüller fibröz bağ dokusu kılıfı ile belirgin bir bazal lamina ve seminifer epitelden meydana gelir. Tunika propria seminifer tübülü çevreleyen fibroblast katmanlarından meydana gelmiştir. Bazal laminaya birleşik olarak bulunan en içteki katman düz kas özellikleri sergileyen yassılaştırmış miyoid hücrelerden oluşur. Seminifer tübülün epiteli; germ hücrelerine destek olan ve beslenmelerini sağlayan sertoli hücrelerinden ve germ hücreleri olan spermatogenetik hücrelerden meydana gelmiştir. Sertoli hücreleri germ hücrelerini besleyen, bozulanları fagosite eden, bazal membrandan tübül yüzeyine kadar uzanan, sabit sayıda olan ve çoğalmayan prizmatik hücrelerdir. Sertoli hücreleri androjen bağlayıcı protein (ABP) ve inhibin üretir, androjen ve östrojenlerin katabolizmasını sağlar ve FSH reseptörleri taşır. Bazal membranına oturmuş seminifer tubuli sıkı eklemlerle birbirine bağlanmış olup lümene sitoplazmik uzantılar verirler ve peritübüler kontraktıl hücrelerin (myoid hücreler) katılmasıyla kan-testis bariyerini oluştururlar. Spermatogenetik hücreler, bazal lamina ve tübül lümeni arasını dolduran 4–8 tabaka halinde oluşmuşlardır. Bu hücre tipleri, belirli sayıda bölünmelerden sonra farklılaşarak spermatozoayı oluştururlar. Bunlar erkek germ hücrelerinin devamlı farklılaşma sürecindeki farklı evrelerini temsil ederler. (34) . Bu hücreler bazal membrandan lümene doğru uzanım gösteren bir yapıya sahiptir. Spermatogenetik hücreler sertoli hücrelerinin lateral kısmındaki bölmelerde bulunmaktadır. Kan-testis bariyerini oluşturan yapı bu iki hücre grubu arasındaki sıkı bağlantı kompleksleridir. (30, 35)

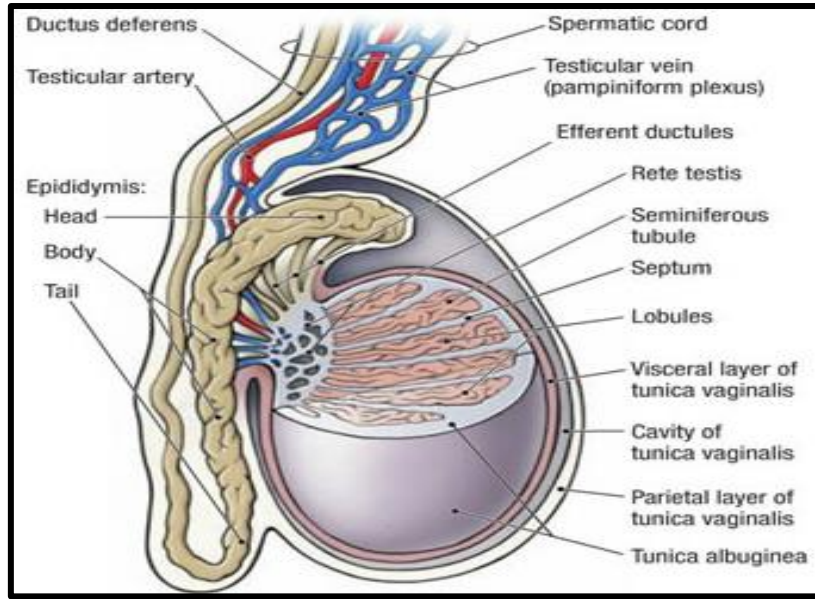
Seminifer tübüllerin karbonhidrat, iyon, aminoasit ve protein içeriği; kan ve lenf dolaşımından oldukça farklıdır. Kan-testis bariyeri ile oluşan bu fark germ hücrelerinin dolaşım yolu ile gelen zararlı maddelere karşı korunmasını sağlamaktadır. Kan testis bariyeri spermatogenetik hücrelerin immün sistemle karşılaşmasını, akabinde immünolojik bir infertiliteyi önlemiş olur. Spermatogenetik hücreler farklı gelişim safhalarından geçerler. Bazal membrana yakın yerleşimli olanlar spermatogonyumlardır. Lümen yakınında yerleşim gösteren spermatid hücreleri, daha olgun yapıdadır. Lümente bulunan hücreler ise spermiyumlardır. Seminifer tübüllerin enine alınan kesitinde spermatogenetik hücreler bazı özellikleri ile birbirlerinden ayırt edilebilirler. (33)

Testis, Epididymis and Ductus Deferens Frontal Section



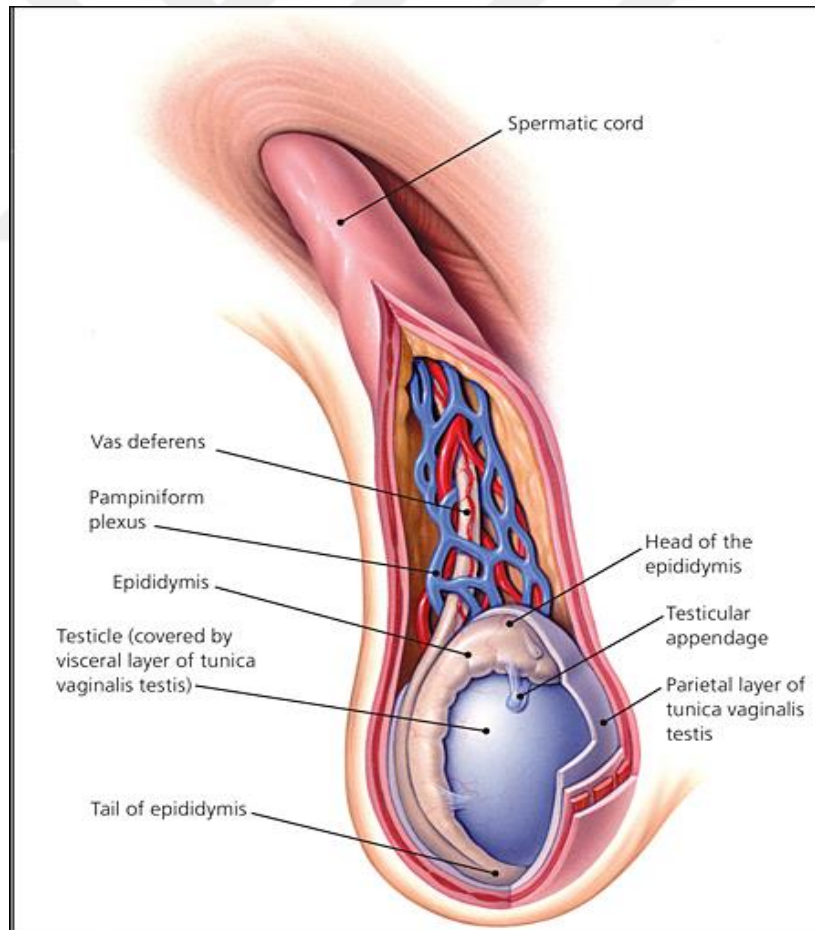
F. Netter M.D.
© I.B.N.

Resim 2 - Testis anatomisi



Resim 3- Testis anatomisi ve histolojisi

web.duke.edu/anatomy



Resim 4- Testis anatomisi

www.aafp.org

II. B. 1. Testisin Histofizyolojisi

Testisler; embriyolojik gelişimi, seksüel farklılaşma ve olgunlaşmayı, üreme fonksiyonlarını belirlemede rolü olan endokrin ve ekzokrin fonksiyonlu bir çift organdır. Burada üretilen androjenler, erkek fetüs gelişimi için önemlidir. Pubertede testislerden salgılanan testesteron, spermatogenezi ve seconder seks karakterlerinin gelişimini sağlamaktadır. Erişkinde ise testesteron, spermatogenezin devamı ve seconder seks karakterlerinin korunmasında rol almaktadır.(36) Spermatogenez bir gelişim süreci olup, farklılaşmamış spermatogonyumların ileri derecede farklılaşmış spermiumlara dönüşmesidir. Spermatogenez vücut sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda oluşur ve spermatogenezin düzenlenmesinde ısı çok önemlidir. Testiküler ısı birkaç mekanizma ile kontrol edilir. Pampiniform plexus her bir testiküler arterin etrafını sarar ve testiküler ısının devam ettirilebilmesi için bir karşı ısı akımı sağlar. Diğer faktörler ise skrotumdaki terin buharlaşması sonucunda ısı kaybı ve spermatik kordondaki kremaster kaslarının kasılmasıyla birlikte testislerin daha yüksek ısıda kalabileceği inguinal kanallara çekilmesidir. Spermatogenezde en önemli etkiyi endokrin faktörler meydana getirirler. Spermatogenez, hipofizın FSH ve LH'nın testiküler hücreler üzerindeki etkilerine bağlıdır. LH interstisyel hücrelere etki ederek spermatogonik hücrelerin normal gelişimi için gerekli olan testosteron yapımını stimüle eder. FSH ise sertoli hücrelerini etkileyerek adenilat siklaz yapımını stimüle eder ve sonucunda cAMP'nin artmasına sebep olur ve aynı zamanda androjen bağlayıcı protein'in (ABP) sentez ve salgılanmasını sağlar. Androjen bağlayıcı protein testosteron ile bağlanır ve testosteronu seminifer tübüllerin lümenine kadar taşır. Spermatogenez testosteron ile uyarılır, östrojen ve progesteronlarla inhibe edilir. Spermatozoonlar, uygun bir ortam olan testiküler sıvı içerisinde epididimise kadar taşınırlar. Bu testiküler sıvı Sertoli hücreleri ve rete testis tarafından üretilir ve bu sıvı steroidler, proteinler, iyonlar ve testosteron ile birleşmiş ABP içermektedir. (34)

II. B. 2 Testis Vaskülarizasyonu

İnsan testiküler parankimi için kan akımı 100 mg doku için yaklaşık 9 ml/dk'dır. (37) Testisler, başlıca üç arteriyel sistem tarafından kanlanmaktadır ve bu üç sistem de birbirleriyle anastomozlar yapar. (38)

1. İnternal spermatik (Testiküler) arter
2. Eksternal spermatik (Kremasterik) arter
3. Deferensiyel (Vazal) arter

Testiküler arter (internal spermatic) abdominal aortadan renal arterin hemen altında anterolateral yüzeyden çıkar. Ana testiküler arter olup testis kan akımının yaklaşık 2/3'sini sağlar. Retroperitoneal olarak ilerler, üreter ve eksternal iliak arterin alt kısmını çaprazlayarak inguinal kanal iç halkasında spermatic korda katılır. Kordda internal spermatic fasya içinde seyreder. Orta pol posteriorda, epididimisin altında tunikayı oblik olarak geçerek testise girer. Internal spermatic arter alt polde deferensiyel ve kremasterik arterlerle, üst polde deferensiyel arterlerle anastomoz yapar.(39)

Kremasterik (eksternal spermatic) arter testis kan akımının 1/6'sını sağlar, esas olarak tunika vaginalisi besler. Arteria iliaca eksternanın dalı olan arteria epigastrika inferiordan çıkar. Testiküler mediastinumda internal spermatic ve deferensiyel arterler ile anastomoz yapar. Tunika vaginalis üzerinde ağ yaparak sonlanır.

Deferensiyel arterler (vazal) a.iliaca interna'nın son dalı olan a.vezikalis inferior ya da superior'dan ayrılır. Testisin kan akımının 1/6'sını sağlar. Vas deferens ve epididimin globus minör'ünü besler, testise yakın yerde internal spermatic arterle anastomoz yapar.

Üç arter de testiküler mediastinumda anastomoz oluşturarak testisin kanlanmasına katkıda bulunur.

Testiküler venöz drenaj sistemi ise dört ayrı ven ile birlikte olmaktadır.

1. Internal spermatic (Testiküler) ven
2. Eksternal spermatic (Kremasterik) ven
3. Deferensiyel (Vazal) ven
4. Gubernakuler ven

Internal spermatic (Testiküler) ven internal spermatic artere eşlik ederek, solda renal vene dik olarak, sağda ise v.cava inferiora oblik olarak açılır. Sol internal spermatic ven daha yüksek konumu ve sol testisin daha aşağı pozisyonu nedeniyle sağdakinden 8-10 cm daha uzundur. (40)

Eksternal spermatic (Kremasterik) ven spermatic kordun posteriorunda yer alarak eksternal inguinal ring bölgesinde yüzeyel ve derin inferior epigastrik venlere ve eksternal iliak vene açılır.

Deferensiyel (Vazal) ven: Vas deferens'e eşlik ederek süperior-inferior vezikal venler yoluyla internal iliak ven'e dökülür.

Gubernakular ven: Eksternal pudental ven, safen ven yoluyla eksternal iliak vene drene olur.

İntratestiküler küçük venler, testis yüzeysel venlerine ve rete testis'te hiler venlere açıldıktan sonra, testis ve epididimden kaynaklanan venler, mediasitinumdan çıkar ve duktus deferens önünde ve testiküler arter çevresinde 8-12 venden oluşan bir şebeke halinde serbest anastomoz yapar ve panpiniform pleksusu oluştururlar. (41) Pleksus pampiniformis ile skrotum ve epididimin venöz dönüşünü sağlayan kremasterik pleksus ve vazal ven sistemi, inguinal ring hizasında birbirleriyle anastomoz oluştururlar. Pleksuslar daha yukarıda gonadal veni meydana getirirler. Böylece deferansiyel ve kremasterik venöz yapılar, testiküler venin ligasyonu sonrasında kollateral dolaşım ağı oluşumunu sağlar. (27, 42)

Testis lenfatikleri, seminifer tübüller etrafında görülmeyen lenfatik kapillerlerle interlobüler septadan başlar. Daha sonra spermatik kordu takip ederek paraaortik, intraaortokaval ve perikaval lenf düğümlerine açılırlar. (31, 43)

II. B. 3. Testisin İnnervasyonu

Testisin innervasyonu, süperior mezenterik ve renal arter bölgesindeki aortik pleksuslar, kollateral ganglionlar ile ilişkili sempatik lifler, genel visseral duyu lifleri ile sağlanır(44) Bu lifler testise testiküler arterleri takip ederek ulaşır ve sempatik ve duyuşal innervasyonu taşırlar. Ağrı iletimiyle ilgili spinal kord seviyeleri, torasik ve splanknik sinirlerin çıktıkları T5-T12 seviyesidir. Kremaster kasını innerve eden genitofemoral sinirin genital dalı, (L1-L2) inguinal kanala internal inguinal halkadan girer. İlioinguinal sinir ise (L1) krsta iliaka anterior süperior yakınında eksternal ve internal oblik kaslar arasından çıkar, kanala girer ve sonrasında dış inguinal halkadan çıkar. İlioinguinal sinir penis kökünün derisini, skrotum'un üst kısmını, uyluğun üst medial bölümünü innerve eder. (45)

II. C. Testis Torsiyonu

II. C. 1. Epidemiyoloji ve Etyolojisi

Testis torsiyonu spermatik kordun vertikal ekseninde dönmesi ile testis ve yapılarının kanlanmasının bozulmasına bağlı olarak testiste kalıcı iskemik hasara sebep olabilen acil bir durumdur. Tanı geciktiği zaman ve bazende cerrahi müdahaleye rağmen testiste fonksiyon kaybı ve infertilite gelişmektedir. Testis torsiyonu ilk defa 1800' lü yıllarda Hunter tarafından tanımlanmıştır. (46, 47) Testis torsiyonu çocukluk çağıının en önemli akut skrotum nedeni olarak bilinir ve pediyatrik akut skrotal hastalıkların %25-35'ini oluşturur. Testis ve yapılarında 25 yaşına kadar torsiyon görülme sıklığı 1 / 160 iken sadece testis değerlendirmeye alındığında bu oran 1/4000'dir.(48,49) Testis torsiyonu puberte ve yenidoğan dönemi olmak üzere iki yaş aralığında pik yapar. Olguların %65'i pubertal dönemde ve yaş ortalaması ise 13'tür. (50, 51, 52) Yenidoğan döneminde tertis torsiyonun sık görülmesi yenidoğanlardaki testosteron düzeylerinin puberte dönemi hariç, diğer dönemlere göre daha yüksek düzeylerde olmasından kaynaklanır. Neonatal torsiyon vakalarının %12-21'i bilateralidir. Puberte döneminde daha sık görülmesinin nedeni ise; artan testosteron düzeyine bağlı olarak oluşan testis elevasyonu ve rotasyonudur. (53)

II. C. 2. Patogenezi

Testis torsiyonda ana patoloji testiste ödeme ve ağrıya yol açan venöz tıkanıklıktır. Ancak bu venöz tıkanıklık testisin tunikası elastik olmadığından arteriyel dolaşımı bozarak tıpkı diğer dokularda olduğu gibi testiste de hipoksiye neden olur. Venöz, arteriyel ve kapiller düzeyde oluşan trombüsler testiküler iske mi ve devamında nekroza neden olur. Oluşan doku hasarı torsiyonun süresi ve rotasyon derecesi ile yakından ilişkilidir. Torsiyon süresi 6 saatten kısa süren hastaların büyük çoğunluğunda testis morfolojik olarak normal tespit edilmiş ancak sürenin uzaması halinde testiste kalıcı hasarlanma saptanmıştır. Hellner' in testis torsiyonu ile meydana gelen 6 saatlik iske mi süresinin testisin kaderini belirleyen ana faktör olduğu düşüncesi günümüzde de kabul görmektedir. (54,72) Yapılan deneysel çalışmalarda testis dokusunda iske miye en hassas hücrelerin başlıca germ hücreleri olduğu daha dirençli hücrelerin ise Leyding hücreleri olduğu bildirilmiştir. Dört saatlik iskemiden sonra ağır sertoli hücre hasarı görülürken, leydig hücre hasarı 10-12 saatlik iskemiden sonra ortaya çıkar. (55,56) Yapılan çalışmalarda tam iske mi oluşturmak için 720°'lik bir torsiyona gerek olduğu literatürde belirtilmiştir. (73)

Testis torsiyonunda meydana gelen iskemik hasarın temelinde fazla miktarda üretilen reaktif oksijen metabolitlerine bağlı oksidatif stres ve inflamasyon süreci yer almaktadır. İskemik hasar dönemi olarak adlandırılan bu süreçte testiste meydana gelen hasar öncelikli olarak oksijen desteğinin azalması sonucunda gelişen hipoksiye bağlıdır. Reaktif oksijen ve nitrojen ürünlerinin oluşması sonrasında torsiyonun ortadan kaldırılması ile reperfüzyon hasarı süreci başlamış olur. (57)

II. C. 3. Tipleri

Üç tip torsiyon tanımlanmıştır. Ekstravaginal testis torsiyonu tunica vaginalisin skrotum içinde fiksasyonundan önde daha çok perinatal dönemde görülürken, İntravaginal testis torsiyonunda ise testisler tunica vaginalis içinde döndüğünde meydana gelir. Üçüncü ise appendiks testis ve epididim torsiyonu gibi testis eklerinin torsiyonudur.

1-Ekstravajinal Torsiyon:

Prenatal dönemde görülen ve testisin inişi sırasında fiksasyon tamamlanmadan testis ve eklerinin spermatik kordun üst seviyelerinde, tunika vajinalislerin spermatik korda bağlantı yaptıkları noktaların proksimalinden torsiyone olması nedeniyle oluşur. Küçük yasta görülen torsiyonların en önde gelen sebebidir. (52) Extravajinal torsiyon; doğum öncesi veya doğum sonrası ilk bir ayda gelişebilir, fakat tanının doğum sonrasında konulabilmesinden dolayı intrauterin torsiyonlarda testisin kurtarılabilmesi çok zordur İntrauterin torsiyonlar monoorsidizmin en önemli nedenlerindendir. Genelde tek taraflı gelişmekte olup çift taraflı olgularda vanishing testis sendromuna yol açabilir. Ekstravajinal torsiyon tedavisi cerrahidir. (58) Torsiyone testisin karşı taraftaki testiste torsiyon gelişme riskine karşı kontralateral fiksasyon uygulanması önerilmektedir. (59)

2-İntravajinal Torsiyon:

Spermatik kordun tunika vaginalise yapıştığı noktanın distalinde torsiyon gelişmesidir. İntravajinal torsiyona neden olan predispozan faktörler arasında tunika vajinalislerin normale göre spermatik kord üzerinde daha proksimal bir noktaya yapışmasının önemli bir faktör olduğu bilinmektedir. Konjenital anormallikler olarak inmemiş testis, gevşek epididimal birleşme, testisin horizontal uzanımı, testisin gubernakular yapısının anormal uzun veya kısa olması ve yaşam içinde gelişen travmalar da torsiyona sebep olabilmektedir. (58) Tunika vajinalisin spermatik kordonun anormal olarak üst kısımlarında sonlandığı durumlarda, testis tunica vajinalis içinde serbest bir şekilde asılı durmaktadır. Bu varyasyon “Çan tokmağı deformitesi”

olarak adlandırılır. Çocukluk ve adolesan döneminde gerçekleşen testis torsiyonunun en sık görülen nedenlerindendir ve sıklıkla bilateral tutulum görülür. (60) Ayrıca “Clapper-bell”deformitesi adı verilen bu durum intravajinal torsiyonlarda en önemli neden kabul edilir ve spermatik kordun hareketlerle veya kremasterik kontraksiyonlarla rahatça dönmesine neden olur. (61)

3-Testis Eklerinin Torsiyonu:

Appendiks testis ve epididimislerin üst kısımlarında bulunan embriyolojik kalıntıların torsiyonu ile gelişen patolojilerdir. Genelde 16 yaş öncesi erkeklerde gözlenir. Ani başlangıçlı şiddetli bir ağrının ardından testisin veya epididimisin üst bölümünde kitle ele gelmesi patognomoniktir. (62) Appendiks testis torsiyonunda apendiks yerleşimi ile uyumlu olarak skrotum cildinde testisin üst kutbunda mavi-nokta bulgusu (blue-dot sign) gözlenir, fizik muayenede appendiks testis ödemli ve şiş, geri kalan testis dokusu ise normal palpe edilir. Tedavide ağrı kesici ve skrotal elevasyon önerilir. Tedavi edilmeyen olgularda ağrı ve skrotal ödem genellikle 5-7 günde geriler ve kaybolur. (63) Eğer testis torsiyonu ile ayırıcı tanısı yapılamazsa hasta operasyona alınabilir.

II. C. 4. Klinik

Testis torsiyonunda ilk semptom olarak çoğunlukla ani başlayan şiddetli skrotal ağrı olmakla birlikte ağrı inguinal bölgeye ve karın alt kadranslarına yayılabilir. Fizik muayenede testisler oldukça hassastır, büyük ve üst skrotal yerleşimlidir. (64) Torsiyon gelişen testis genelde retrakte, kordun orantılı kısalmasına bağlı olarak skrotumda yüksek yerleşimli ve horizontal pozisyonudadır. (65) Bu bulgular ile birlikte epididimin ön tarafta bulunması, kremaster refleksinin alınamaması, kalınlaşmış hassas kordun palpe edilmesi testis torsiyonu tanısında yol göstercidir. (66) Klinik çalışmalarda testis torsiyonu olgularında kremasterik refleks kaybının %90- %100 sıklığında görüldüğü belirtilmiş, diğer akut skrotum vakalarında ise kremasterik refleksin % 80'lere varan oranda devam ettiği gösterilmiştir. (67, 68) Torsiyona uğrayan testisin elevasyonu ile birlikte vasküler oklüzyonda ve ağrıda artış olurken, epididimit ve orşitte hastanın ağrısı elevasyon ile geriler. Klinikte bu muayene de saptanan bulgular prehn bulgusu olarak adlandırılır ve orşit ve testis torsiyonu ayırıcı tanısında önemli bir yere sahiptir. (68) Testis torsiyonunda sol testis genelde daha sık etkilenir, ayrıca inmemiş testislerde de torsiyon solda daha sık saptanır. Bunun nedeni olarak sol testisin daha uzun bir spermatik korda sahip olmasından dolayı, torsiyon olasılığının sağ testise oranla iki kat fazla görüldüğü, inmemiş ve retraktıl testislerde torsiyon olasılığının arttığı saptanmıştır. (69) Hastalardan alınan

klirik hikayelerde hastaların yaklaşık %50 sinde geçirilmiş ve tedavi almadan gerilemiş skrotal ağrı öyküsü mevcuttur. (70, 71) Testis torsiyonu, genellikle egzersiz, aktivite ve travmayı takiben yada uyku esnasında gerçekleşebilir. (72) Testis torsiyonunda oluşan doku hasarı torsiyonun süresi ve derecesi ile yakından ilişkilidir. Tanı geciktiği zaman testiste fonksiyon kaybı ve infertilite gelişebilir. Acil tanı konularak zaman kaybedilmeden testisin cerrahi eksplorasyonla detorsiyone edilmesi gereklidir. Eğer hasta 4-6 saat içinde opere edilir ve kontralateral testis fiksasyonu yapılırsa prognoz iyidir. (74) Testis torsiyonu geliştiği dönemde bazı proteinlerin sistemik sirkülasyona katıldığı, bunun da kontralateral normal testis dokusuna zarar veren anti-testiküler antikorların gelişimine neden olabileceği düşünülmektedir. (75)

II. C. 5. Tanısal Testler ve Görüntüleme Yöntemleri

Akut skrotum bulguları olan bir hastada testis torsiyonunun ilk önce diğer tanılardan ekarte edilmelidir. Dopler ultrasonografi son yıllarda testis torsiyonunun değerlendirilmesinde ekonomik, hızlı ve noninvazif olması nedeniyle en sık başvurulmuş tanı yöntemi haline gelmiştir. (76) Testis torsiyonunda, doppler görüntülemeye kan akımı tamamen kaybolmuş ya da torsiyon derecesine göre kan akımı azalmış olarak görülebilir durumdadır. Usg görüntüsünde etkilenen testisin boyutlarının artmış olduğu ve hipoekojen heterojen bir görünüm aldığı saptanır. (77) Usg de testiküler arteriyel akımın artışı daha çok epididimit, orşit gibi inflamatuvar hadiseleri düşündürür. Akut skrotum bulguları olan ve kesin tanıları konulmamış olgularda renkli doppler ultrasonografinin % 88.9 sensitivitesi ve % 98.8 spesifitesi olduğu, bunun yanında %1 yanlış pozitif sonuç verdiği gösterilmiştir. (78)

Manyetik rezonans (MR) görüntülmesi testis torsiyonunda kullanılabilir ancak klinik uygulamada pediatrik dönemde anestezi gerekliliğinden dolayı rutin olarak kullanılmamaktadır ve ileri tetkik amacıyla kullanılabilir. (79)

Torsiyonda kullanılan başka bir görüntüleme yöntemi ise Teknesyum-99m ile yapılan radyonüklid sintigrafidir. Torsiyon tanısında torsiyone testisin radyonüklid izotop tutulumunun zayıf olması tanıda yardımcı olur. Radyonüklid sintigrafinin dezavantajı intravenöz girişim gerektirmesi, işlemin uzun sürmesi ve daha yüksek maliyetli olmasıdır. Yapılan bazı çalışmalarda radyonüklid görüntüleme ile renkli doppler USG karşılaştırıldığında tanı koyma sensitivite oranlarının birbirine yakın değerlerde olduğu bildirilmiştir. (80)

II. C. 6. Ayırıcı Tanı

Testis torsiyonunun ayırıcı tanısında apendiks testis torsiyonu, inkarsere-strangüle herni, orşit, epididimit gibi akut skrotal ağrı yapan diğer hastalıklardan ayrımının yapılması uygulanacak tedaviyi belirleme açısından önemlidir. Henoch-Schönlein purpurası (HSP), idiyopatik skrotal ödem, hidrosel, skrotal yağ nekrozu, poliarteritis nodosa, testisin lösemik infiltrasyonu, ve akut travma öyküsü bulunan hastalarda testis rüptürü ve travmatik hematoma ayırıcı tanıda nadir akut scrotum nedenleri olsada akla gelmelidir. (67, 81) Çocukluk döneminde akut skrotal ağrının % 35-67'sinden apendiks testis torsiyonu sorumludur ve testis ve epididim ekleri arasında en çok apendiks testis torsiyonu görülür. Apendiks testis torsiyonu testis torsiyonuna göre daha yavaş ve ağrısı daha hafiftir ve kremaster refleksi korunmuştur. Apendiks testisin infarktına bağlı olarak testisin üst polunde mavi nokta şeklinde hassas olmayan bir kitle palpe edilebilir ve “mavi nokta”bulgusu olarak adlandırılır. (67)

II. C. 7. Tedavi

Testis torsiyonu acil müdahale gerektiren bir durumdur. Testis torsiyonun tedavisi cerrahi eksplorasyondur. Manuel detorsiyon cerrahiye alternatif değildir, fakat ilk 6 saat içinde cerrahi hazırlığın devam ettiği dönemde uygulanabilir. Fakat testis çok ağrılı ve hassas olduğu için uygulanması zor ve ağrılı bir işlem olduğundan sedasyon altında ve spermatik kord anestezisi yapılması gerekmektedir. (82) Manuel redüksiyonda testis kaudalden kraniale ve medialden laterale doğru döndürülerek detorsiyone edilir. Başarılı bir manuel redüksiyonda uygulamasında detorsiyone olan testiste kısa sürede ağrı geçer. Başarısının kesin göstergesi ise doppler ultrasonografide kan akımının düzeldiğinin görülmesidir. (83) Manuel detorsiyonun başarılı olduğu durumlarda da cerrahi müdahale ile testiküler fiksasyon uygulanması gereklidir. Altı saatten sonra kalıcı iskemi sürecinin başladığı unutulmamalıdır. (84) Eksplorasyonda testis torsiyonu tanısı doğrulandıktan sonra testis ve spermatik kord detorsiyone edilir ve testisin reperfüzyonu değerlendirilir. Testise sıcak serum fizyolojik ile gazlı bezlerle kompres yapılır. Eğer detorsiyone testiste belirgin olarak nekroz gelişmiş, cansız ve reperfüzyon bulgusu yoksa orşiektomi yapılır. Testisin canlılığını değerlendirmek için tunika albuginea üzerine insizyon yapılarak kanama olup olmadığına bakılabilir. Detorsiyon uygulandıktan sonra testis reperfüzyonu iyiye ve doğal rengine döndüyse bilateral testis fiksasyonu uygulanır. Torsiyon gelişimi sonrasında uygulanan testis fiksasyonunda testis dartos poşuna fikse edilir. (84, 85) Fiksasyon yapılırken ince, absorbe olabilen ve non-reaktif sütürlerin kullanılmasına dikkat edilmelidir. Operasyon esnasında karşı scrotumda değerlendirilmelidir. Çünkü ‘Bell clapper’

deformitesi sıklıkla bilateral görüldüğü için sonrasında da karşı testiste de torsiyon olma ihtimali olduğundan fiksasyon bilateral yapılmalıdır. (86)

Testiste oluşan iskemi sonucunda iskeminin kan-testis bariyerinde hasara neden olduğu ve çocuk yaş grubunda kendi spermatogoniasına karşı potansiyel otoimmünizasyon riski oluşturduğuna dair önemli kanıtlar bulunmuştur. Adölesan dönemde iskemik testisin fiks edilmesi sonrasında erişkin dönemde spermatogenesis ile ilgili sorunlar ortaya çıktığı saptanmıştır. On yaşından küçük çocuklarda, spermatogenesis henüz tam oluşmadığından ve kan-testis bariyeri olmadığından şüpheli testisle eksize edilmeyebilir. On yaşından büyük iskemik testis saptanan çocuklarda ise orşiektomi yapılması önerilir.(85)

II. C. 8 Komplikasyonlar ve Prognoz

Testis torsiyonunda semptomların başlaması sonrasında ilk 6 saat e kadar yapılacak detorsiyon girişimi sonrası testis fonksiyonlarının yüksek oranda korunabildiği saptanmıştır. Torsiyonun ilk 12 saatlik döneminden sonra uygulanan tedavilerde testis fonksiyonlarının ancak % 20' sinin korunabildiği, 24 saatten daha uzun süre geçmiş olgularda testiste irreversibl değişikliklerin belirginleştiği bildirilmiştir.(58) Testisler, serbest oksijen radikallerinin hasarına karşı oldukça duyarlıdır ve oksidatif stres varlığında germ hücreleri hasar görürler. Torsiyon sonrası gelişen oksidatif stres, germinal hücrelerde nekroza yol açıp spermatogenezisin belirgin olarak bozulmasına neden olur ve infertiliteye neden olur. İnfertilite testis torsiyonu sonrası uzun dönemde istenmeyen yan etkilerin en önemlisidir. Bu hastalarda ortaya çıkan fertilitte bozukluğu oluşan iskemi derecesine ve kontralateral testiste oluşan hasara bağlıdır. Yaşanan torsiyon süresine bakmaksızın hastaların yaklaşık %36' sında sperm sayısı 15 milyon/ml' nin altında saptanmıştır. (87,88)

Testis torsiyonu tedavisinde altın standart cerrahi müdahale olmasına rağmen, iskemi süresinin 6 saatten daha uzun olması durumunda germ hücrelerinde irreversibl değişikliklerin meydana gelmesi ve tedavi sonrası gelişen reperfüzyon hasarının da germ hücrelerine zarar vermesi, cerrahi tedaviye ek olarak hasarın oluşumunu engellemeyi amaçlayan farklı medikal tedavilerin de kullanım gerekliliğini düşündürmektedir.(49)

II. D. İskemi-Reperfüzyon Hasarı

Testis torsiyonu sonrası testiküler hasarın gelişmesinde iskemi ve bunu takiben reperfüzyon sırasında ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri sorumludur. (89) İskemi, dokudaki kan akımının, hücresel fonksiyonları karşılamak için gerekli olan düzeyin altına

düşmesi durumudur. (90) İskemik hasarlanmada oksijen yetersizliği sonucu oksidatif fosforilasyon bozularak adenosin trifosfat (ATP), fosfokreatin gibi enerjiden zengin fosfat depolarında yetersizlik meydana gelir. İskemi sonucunda gereken enerjinin sağlanamaması, hücre membranında bulunan adenosin Trifosfat (ATP) bağımlı sodyum-potasyum (Na^+/K^+) pompasının inhibe olmasına neden olur. Bunun sonucunda oluşan iyon dengesizliği, hücre içinde izo-ozmotik vasıfta su birikimine ve akut hücrel şişmeye sebep olur. Anaerobik glikoliz sonucunda meydana gelen asidoz, karbondioksit (CO_2) birikimi sonucunda oluşan karbonik asit (H_2CO_3) ile daha da derinleşir. (79) ATP bağımlı çalışan, hücre membranında bulunan diğer bir pompa ise kalsiyum (Ca^{++})' un dengelenmesini sağlamaktadır. Hücre içinde (Ca^{++})' un artması sonucunda proteolitik enzimler, fosfolipazlar aktive olur ve sitotoksik etki yaparak, proinflamatuvar sitokinlerin ve lökosit adhezyon moleküllerinin yapımı artar. Fosfolipazların aktivasyonu sonucunda oluşan araşidonik asit direkt etki ile mitokondriyal enzimleri inhibe ederek serbest radikal oluşumunu hızlandırır ve bunların sonucunda hücre lizise uğrar. (91, 92 ,93)

İskemi sürecinde ATP seviyesi azalmış olsa da ATP kullanımı devam ettiğinden dolayı hipoksantin'den ATP elde edilmektedir. Bu indirgenme olayında ilk ATP'den AMP ve adenosin meydana gelmektedir. Adenosin hücre içinden hücre dışına doğru difüze olur ve bu olayın sonucunda inozine ve hipoksantine ayrışır. Normal şartlarda hipoksantin, ksantin dehidrogenaz ile ksantine oksitlenir. İskemi sırasında hücrelerde artan Ca^{+2} proteazları aktifleştirir ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşümüne neden olur ve hipoksantin ksantine oksitlenmesi gerçekleştirilemez ve dokularda aşırı hipoksantin birikimi meydana gelir. Reperfüzyon sırasında dokuya yeniden giren oksijen ve ksantin oksidaz, hipoksantin ile reaksiyona girerek serbest oksijen radikallerini oluşturur. Reaktif oksijen radikalleri, hücre membranlarında oluşturduğu lipid peroksidasyonu sonucunda protein denatürasyonuna ve hücre hasarına yol açar. (94 ,95, 96)

Reperfüzyonda iskemiye sebep olan etkenin ortadan kaldırılması sonucu iskemik organa kan akımının tekrar sağlanması ile geri dönüşümsüz hasarın önüne geçilip, kaybolan fonksiyonlar geri kazanılabilir. Ancak oluşan serbest oksijen radikallerine ve kandaki aktive edilmiş kan hücrelerine bağlı olarak “reperfüzyon hasarı” oluşur. İskemi sonrasında meydana gelen reperfüzyon, dokuyu iskemi hasarından daha fazla zarara uğratar. (97,98) İskemik dokunun reperfüzyonunun hücre hasarını arttırmasında birkaç mekanizma vardır. Ortamda bulunan nötrofiller, postkapiller endotele yapışarak vasküler yapılara ve interstisyuma zarar verirler. Ayrıca mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif fosforilasyonun başarısızlığı sonucu

mitokondriyal ROS'un üretimi artar, toksit metabolitlerde artış olur. Hücrenin antioksidan savunma sistemleri de iskemiden olumsuz etkilenmiş olabileceğinden, serbest radikallerin birikimi kolaylaşır. (99, 100, 102) Meydana gelen SOR oluşumu ile mitokondri ve hücre membranında gelişen peroksidasyon sonucunda membran bütünlüğünde ve geçirgenliğinde bozulma, ilerleyen süreçte protein yıkımı ve sonuçta nükleik asit hasarı meydana gelir. (75)

Son yıllarda yapılan çalışmalarda iskemi / reperfüzyon sürecinde gelişen DNA hasarında en son basamak olarak poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) ya da diğer adıyla poli (ADP-riboz) sentaz (PARS) adlı enzimin rol oynadığı gösterilmiştir. (102) Dokularda DNA'nın onarılmasına yardımcı olan PARP, oksijen radikallerinin oluşturduğu hasarda fazla ATP kullanarak oluşturduğu enerji tükenmesi neticesinde hücre ölüme sebep olmaktadır. Farklı doku ve organ modellerinde PARP enzim inhibitörlerinin iskemi / reperfüzyon hasarını önlediği gösterilmiştir. (102,103)

İskemi / reperfüzyon döneminde oksijen radikallerinin artışı, inflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-6, IL-1 β) üretilmesi, nötrofil infiltrasyonu, membran lipidlerinin serbest radikallerle peroksidasyonu ile oluşan lipid peroksidin hücresel yapılarda hasar oluşturduğu gösterilmiştir. (104,105)

II. D. 1. I/R Hasarının Patofizyolojisi ve Etkenleri

1-Serbest Oksijen Radikalleri:

Serbest oksijen radikalleri en dış yörüngelerinde bir veya birden fazla eşlenmemiş elektron bulunduran atom ya da atom gruplarıdır. Vücut enerjisinin büyük kısmı O₂'nin suya indirgenmesi olarak bilinen oksidatif fosforilasyon ile üretilmekte olup serbest oksijen radikalleri bu sırada ortaya çıkmaktadır. (94) Oksijenin tek elektronunun indirgenmesi sonucunda meydana gelen serbest oksijen radikallerinin yol açtığı oksidan yıkım; iskemi, hiperoksijenizasyon ve doku inflamasyonu gibi birçok olayda yer alarak sonuçta oluşan hastalıkların patogeneğinde rol almaktadır. (94)

Serbest radikallerin en önemlileri oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında en önemli rolü oynayan maddeler: oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikalidir. İlk dördünün çeşitli reaksiyonlara girmesi ile sonucunda hidroksil radikali meydana gelir. (107)

Reaktif oksijen bileşiklerinden ilki moleküler oksijenin (O_2) bir elektron (e^-) alarak indirgenmesi sonucu oluşan süperoksit radikalıdır (O_2^-) ve serbest radikal olarak değerlendirilir. Belirgin toksik etkisi gösterilmemiştir. Sitoplazmadaki P450 sistemi tarafından üretilmektedir.(108)

Moleküler oksijenin(O_2) bulunduğu ortamdan iki elektron ($2e^-$) alarak indirgenmesi sonucunda peroksit oluşur. Peroksit de iki hidrojen ($2H^+$) molekülü ile birleşerek hidrojen peroksiti (H_2O_2) meydana getirir. Eşlenmemiş elektronu bulunmadığı için hidrojen peroksit serbest radikal olarak değerlendirilmez fakat reaktif oksijen türleri içine girer. Hidrojen peroksit biyolojik sistemlerde asıl olarak süperoksitin dismutasyonu sonucunda oluşur. Bu reaksiyon spontan veya süperoksit dismutaz (SOD) ile enzimatik olarak gerçekleşir. (109)

Hidrojen peroksit ile süperoksitin metal iyonlarının(Fe veya Cu)varlığında tepkimeye girmesi ile (Fenton reaksiyonu) ve Haber-Weiss reaksiyonu ile en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil (OH^-) oluşur. Kısa ömürlüdür ve protein tiyollerini oksitleme ve DNA'da zincir kırılmaları oluşturarak hasar meydana getirir.(110)

Singlet oksijen eşlenmemiş elektronu olmadığı için radikal değildir ancak çok reaktif olması, üretimi sırasında bazı radikal tepkimeleri oluşturması nedeni ile serbest radikal olarak sayılır. Oksijen molekülünün daha reaktif bir türü olup, moleküler oksijenin enerji alması sonucunda oluşur. Kısa ömürlü olup ,DNA hasarı oluşturduğu ve mutajenik etkilerinin olduğu gösterilmiştir. (109)

Hipoklorik asid (HOCl) hidrojen peroksitin hidrojen ve Cl ile reaksiyona girerek miyeloperoksidaz enzimi ile katalize edilmesi sonrasında oluşur. Bakterilerin fagositik hücreleri öldürmesinde önemli rol oynar. Enzimatik olarak nötrofil ve makrofajlar tarafından üretilirler.(109)

2-Serbest Radikallerin Etkileri:

İskemi / reperfüzyon döneminde oksijen radikallerinin artışı, inflamatuvar sitokinlerin üretilmesi, ilgili dokuya nötrofillerin göç etmesi, böylece lipit peroksit ürünlerinin artışı sonucunda hücresel yapılarda hasar olduğu gösterilmiştir. (104,105) Lipid peroksidasyonu sonucu membranların transport sistemi bozulmakta, membrana bağlı enzimler azalmakta ve protein sentezi inhibe olmaktadır. Lipid peroksidasyonu sonucu yeni oksijen radikallerinin de oluşumuna yol açmaktadır. Hücre içi organellerde lizozom ve mitokondri gibi oluşan membran hasarı sonucu ve litik enzimlerin salgılanmasına bağlı hücre hasarı gelişir . İskemi / reperfüzyon

hasarının en önemli belirtecinin doku lipid peroksit içeriğinin olduğu ve bunun da lipid peroksidasyonunun son ürünü olarak bilinen MDA seviyesinin belirlenmesi ile gösterilebileceği belirtilmiştir. (111)

Torsiyonun testiküler hasar üzerine yapılan bazı çalışmalarda iNOS ve NO üretimindeki artışın ratlarda nekroz veya apoptozisi indükleyerek hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir. (105) Nitrit oksit (NO); kısa yarı ömürlü, su ve yağda çözünebilen moleküler oksijen ve L-argininden nitrik oksit sentaz (NOS) ile oluşan serbest radikaldir. NOS (Nitrik oksit sentaz) damar endotelinde, nöronal dokuda, trombositlerde ve vücutta farklı dokularda bulunur. Nitrik oksit sentazın endoteliyal, nöronal ve indüklenebilir olmak üzere üç farklı izoenziminin olduğu bilinmektedir. Testis dokusu içerisinde eNOS; Leyding, Sertoli, spermatosit ve spermatid hücreleri tarafından sentezlenirken nNOS; Leyding hücrelerinde bulunmakta ve vazodilatasyonda rol oynamaktadır. eNOS, çeşitli sitokinlerin indüklenmesiyle beraber transkripsiyonel bir aktivasyon sonucu oluşmaktadır. Yapılan çalışmalarda eNOS, testis torsiyonundan artmakta ve bu durum geç dönemde oluşan geri dönüşümsüz hasarda eNOS aktivitesiyle yüksek miktarda sentezlenen NO'nun önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır. (113,114)

Reperfüzyon döneminde NO düzeyinin arttığı dönemde, inflamatuvar sitokinlerden TNF- α ve IL-1 β 'deki artışın buna eşlik ettiği tespit edilmiştir. (103) Reperfüzyon sürecinde NO etkisiyle makrofajlar tarafından üretilen inflamatuvar sitokinler tarafından inflamasyonun başlatıldığını ve aktive olan nötrofiller ile oluşturulan ROS'un reperfüzyon ile meydana gelen hasarda önemli rol aldığı gösterilmiştir.(112)

Reperfüzyon sonrasında oluşan serbest oksijen molekülleri lökositleri aktive ederek damar endoteline yapışmasına neden olmaktadır. Bu olay sonucunda kapiller yatakta tıkaçlar oluşması sonrasında dolaşım bozulmaktadır. Bu yüzden reperfüzyon sonrası kapillerin bir kısmı perfüze olamamaktadır. İskemi / reperfüzyon sonrası kapillerin bir kısmında perfüzyon geri dönmemesi “no-reflow fenomeni” olarak adlandırılmaktadır. Aktive olan nötrofiller, salgıladıkları proteaz, elastaz, jelatinaz gibi enzimler ile endotel hücrelerin parçalanmasına, endotel devamlılığının bozulmasına neden olmaktadır. Bu da trombositler ve nötrofillerin kapiller yatağa kemotaksisine yol açarak ve embolizasyona neden olur.(115, 116)

İskemi / reperfüzyon sonucunda birçok proinflamatuvar mediatör oluşarak kompleman sistemini aktive ederler. Kompleman sistemi, lökositlerin endotelial yapışmasını arttırarak ve vasküler hemostazı bozarak iskemik organa kan akımını düşürür. (117, 118)

II. D. 2. Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest oksijen radikallerinin üretimi ile antioksidan defans sisteminin arasındaki denge bozulduğunda oksidatif stres meydana gelerek hücre hasarı oluşur. Serbest radikallerin meydana getirdiği hasardan korumak için çeşitli savunma mekanizmaları antioksidanlar tarafından yönetilir. (119) Antioksidanların başlıca etkileri; hücre zarı yapısındaki yapıların özellikler lipidlerin peroksidasyona karşı korunması, serbest oksijen radikallerini zayıf bir moleküle çevirerek etkisiz hale getirmek, metal iyonları bağlayarak radikal oluşumunun engellenmesi serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması ve hasarlı hücrelerin ortamdan temizlenmesi şeklindedir.(120)

Antioksidanlar çeşitli kriterlere göre sınıflandırılırlar. Öncelikle endojen ve eksojen olarak ayrılabilirler. Endojen olanlar da enzim yapısında olanlar ve enzim yapısında olmayan protein veya daha küçük moleküler yapıda olanlar diye ikiye ayrılır.

1- Enzim yapısında endojen antioksidanlar:

- a-** Sitokrom Oksidaz: Mitokondride bulunan ve bakır içeren bir enzimdir. Solunum zincirinde yer almasının yanı sıra süperoksit radikalının suya dönüştürülmesinde etkilidir.(121)
- b-** Süperoksit Dismutaz (SOD): Hücre içindeki süperoksitin radikalının moleküler oksijen ve hidrojen peroksite dönüştürülmesini sağlayarak süperoksit miktarını azaltır. SOD aktivitesi artarak radikallerinin oluşturduğu peroksidasyona karşı hücre membranlarını korur. Süperoksit dismutaz enziminin testislerdeki koruyucu özelliği ile ilgili olarak sertoli ve germ hücrelerinden üretilen SOD formu olan ekstrasellüler SOD (SOD-Ex) sorumludur.(122)
- c-** Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px): Testis, prostat, vas deferens, epididimis ve spermatozoaların tümünde lokalize olan selenyum bağımlı bir enzimdir.(123) Hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerin parçalanmasını katalize ederek membran lipidi ve hemoglobini peroksitlerin oksidasyonuna karşı korur. Glutasyon hidrojen verici olarak kullanılır. Hidrojen peroksit ile glutasyon (GSH) reaksiyona girerek yükseltgenmiş glutasyon (GSSG) oluşur. Oluşan yükseltgenmiş glutasyon glutasyon redüktaz enzimi ile tekrar indirgenmiş glutasyona çevrilir.(120)
- d-** Glutasyon Transferaz: Çeşitli endojen ve eksojen bileşiklerinin glutasyon ile konjugasyonunu katalizler. (109)

e- Katalaz: Peroksizomlarda bulunan ve yapısında dört tane hem grubu içeren bir enzimdir. Katalaz enzimi yardımıyla hidrojen peroksitin su ve oksijene dönüşümü sağlanır.(109)

2- Enzim yapısında olmayan endojen antioksidanlar:

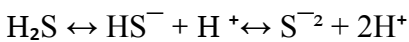
Alfa-tokoferol, beta-karoten membranöz lipid fazda bulunurken , albumin, askorbit asit, bilirubin, ferritin, glutatyon, laktoferrin, melatonin, ürat, sistein nonmembranöz sıvı fazda bulunmaktadır.(109)

Eksojen antioksidanlar ise vitaminlerden , vitamin A, vitamin E, vitamin C, folik asit gibi ve ilaçlardan, ksantin oksidaz inhibitörleri, NADPH oksidaz inhibitörleri, rekombinant süperoksit dismutaz,, barbütratlar, demir şelatörleri, nötrofil adezyon inhibitörleri oluşur.(109)

II. E. Hidrojen Sülfür (H₂S)

II. E.1. Hidrojen Sülfür'ün Genel Özellikleri

Hidrojen sülfür (H₂S) renksiz, yanıcı, uçucu, karakteristik çürük yumurta kokusuna sahip suda çözünebilir toksik bir gazdır. Geçmişte tamamen toksik özellikleri nedeniyle bilinen hidrojen sülfürün özellikle kardiyovasküler sistemde vazodilatasyon yapıcı özelliğinin keşfinden sonra, diğer sistemlerde de etkileri incelenmeye başlanmıştır. H₂S memelilerde endojen enzim aracılı ve enzim aracılı olmayan yollar (tiyollerin ve tiyol içeren bileşiklerin indirgenmesi) üzerinden sentezlenir. Hidrojen sülfürün fizyolojik önemi 1996 yılında Abe ve Kimura tarafından yeni bir nöromodülatör olarak adlandırılmasıyla ortaya konmuştur. Hidrojen sülfür, eski dönemlerde tamamen toksik yönden incelenirken, günümüzde fizyolojik etkileri ve terapötik potansiyeli ortaya konulmuştur. H₂S, nitrit oksit (NO) ve karbonmonoksit (CO) gibi endojen gazotransmitterlerden biridir. Gazotransmitterler; biyolojik membranlardan kolayca difüze olabilen, endojen olarak üretilen, fizyolojik konsantrasyonlarında biyolojik yolları/fonksiyonları etkileyebilen, spesifik hedef moleküllerinin varlığı ile karakterize gazlardır.(124) H₂S, suda ve plazmada çözünebilir bir zayıf asittir. H₂S çözeltiinde aşağıdaki tepkime ile sırasıyla hidrosülfid (HS⁻) ve sülfür iyonlarına (S⁻²) ayrışır. (125)



Memeli vücudunda, fizyolojik pH'da (7.4) H₂S'in üçte biri ayrışmamış olarak, üçte ikisi ise hidrosülfid anyonu (HS⁻) şeklinde bulunur. H₂S'in lipofilik çözücülerdeki çözünürlüğü sudan yaklaşık 5 kat büyük olduğu için NO ve CO'ya benzer şekilde hücre membranlarından

serbestçe difüze olabilmektedir. (126) Endojen olarak sentezlenen H_2S 'in hızlıca sülfat'a okside olduğu ya da proteinlere bağlanarak depolandığı saptanmıştır. (127) H_2S 'in yapılan çalışmalar sonrasında reaktif oksijen türevlerini süpüren bir antioksidan olarak görev yaptığı saptanmıştır.

II. E. 2. Hidrojen Sülfür Sentezlenmesi

Hidrojen sülfür memeli hücrelerinde hem enzimatik hem de nonenzimatik yollar üzerinden sentez edilir. Enzimatik olarak H_2S , L-sisteinden, Sistasyonin β sentetaz (CBS), Sistasyonin gama liyaz (CSE), Sistein amino transferaz (CAT), 3-Merkaptopirüvat sülfürtransferaz (3- MST) ve Sistein liyaz (CL) gibi enzimler aracılığı ile dört ayrı yolda sentezlenir. CBS, CSE, CAT, CL enzimlerinin kofaktörü pridoksal 5'-fosfat (PLP) iken 3-MST enziminin kofaktörü ise çinkodur. (128) Nonenzimatik olarak ise elementel sülfür, glukoz oksidasyonu ile oluşan metabolitlerle (NADH, NADPH, GSH) H_2S 'e indirgenir. H_2S 'in nonenzimatik olarak sentezlenen miktarı enzimatik olarak sentezlenen miktarına kıyasla oldukça düşüktür. (129) CBS ve CSE hücre sitozolünde bulunurken, CAT ve MPST ise hem mitokondri hem de sitozolde bulunmaktadır. H_2S 'in ana kaynağı L-sistein olup L-metiyonin de senteze aracılık eden diğer bir prekürsördür. (130) Shibuya , Kimura ve arkadaşları ile yapılan son çalışmalarda D-sistein'den D-amino asit oksidaz (DAO) enzimi aracılığıyla H_2S 'in sentezlendiği gösterilmiştir . D-sistein'den H_2S sentezi pH 7.4'te optimum iken, L-sistein'den H_2S sentezi alkali koşullarda en yüksek seviye saptanır. Ayrıca D-sistein'den H_2S sentezi PLP'den bağımsız iken, L-sistein aracılı sentez PLP bağımlı olarak saptanmıştır .(131) CBS ve CSE enzimlerinin karaciğer, böbrek, kalp, damar, beyin hücreleri ve lenfositler gibi pek çok hücrede eksprese olduğu saptanmıştır. CBS sinir sisteminde, karaciğerde ve böbreklerde etkili H_2S üretim kaynağı iken, vasküler sistemde ve çoğunlukla periferel dokularda CSE en çok H_2S üretim kaynağıdır. (132) CAT ve MPST ile birlikte beyin ve vasküler endotel tabakasında H_2S üretimine katkı sağlamaktadır. L-sistein yolağından farklı olarak, D-sistein'den H_2S sentezi başlıca beyincik ve böbreklerde gerçekleşmektedir. DAO beyincikte astrositlerde, Bergmann glia ve Purkinje hücrelerinde eksprese edilmekteyken, DAO ve MPST böbrekte CBS ve CSE'ye benzer şekilde proksimal tübüllerin korteksinde eksprese edilmektedir. (133). H_2S 'in dokularda ve biyolojik sıvılardaki konsantrasyonunu belirlemek için araştırmacılar tarafından kullanılan en yaygın iki yöntem spektrofotometrik yöntem olan metilen mavisi ile ölçüm ve sülfür duyarlı elektrotlar ile ölçümdür. H_2S 'in biyolojik olarak kullanılabilen az sayıda H_2S donörü bulunmaktadır. Bu donörlerden ikisi genellikle H_2S

         hazırlamak için kullanılan sodyum s       (Na₂S) ve sodyum hidros         (NaHS) (135).

II. E. 3. Hidrojen S       Yıkımı

Oksidasyonun gerçekleştiğı ana organ karaciğ er olmakla birlikte, v  c  t  ki tüm hücreler H₂S'i oksitleyebilme kapasitesine sahiptir. H₂S sentez edildikten sonra mitokondride oksidasyon, sitozolik metilasyon ve hemoglobinle bağ lanma gibi birçok yolla metabolize olur. Mitokondride H₂S oksidasyonu ile oluşan tiyos      , s    rtransferaz ile katalize edilerek s      e dönüşür. Sonrasında s      , s       oksidaz enzimi vasıtasıyla s      e d  n      mektedir. Son   r  n olan s        lar serbest veya konjuge s          lar halinde idrarla atılmaktadır. (132,133) H₂S metabolizmasının bir başka yolu ise H₂S'in sitozolik tiyol S-metiltransferaz (TSMT) enzimi aracılığ ıyla metilasyonu sonucu metantiyol ve dimetils      r oluşmasıdır. Ayrıca H₂S kanda methemoglobin ile bağ lanarak sulfhemoglobin oluşturabilmektedir. Yakın zamanda yapılan   alı  malar  da H₂S biyoyararlanımının sabit bir düzenleyicisi olarak rol alan s    eroksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri (ROS) ile endotelial H₂S arasında önemli bir etkileşimin varlığ ı gösterilmiştir. Özellikle endotel hücrelerden ROS oluşumu, dolaşım   okları ve diyabetik komplikasyonlarda damarsal işlev bozukluğ unun anahtar bir mekanizmasıdır. (134).

II. E. 4. Hidrojen S      '  n Kardiyovasküler Sistem   zerine Etkileri

H₂S kardiyovasküler sistemde ki birçok hücre ve dokuda endojen olarak üretilmekte ve kardiyak fonksiyonların düzenlenmesinde rol almaktadır. Yapılan çalışmaların sonuçlarında H₂S'in kardiyovasküler sistemde homeostazın sağ lanması ve endojen vazodilatatör olarak önemli bir rolü olduğ u bulunmuştur. Yapılan birçok çalışmada da ayrıca   nden kastırılmış vasküler dokularda özelikle arter ve venlerde H₂S tarafından konsantrasyona bağılı ge    meler olduğ u gösterilmiştir. H₂S'in vasküler etkisinin türlere, damar yatağ ına, endotel tabakasının durumuna, kastırıcı ajana, konsantrasyona, uygulama yöntemi ve süresine bağılı olarak değ i  tiğ i gözlenmektedir. (135,136) H₂S'in etki mekanizmasını anlamaya yönelik yapılan ilk   alı  malar  da H₂S'in olu  turduğ u ge    me cevabına, ATP-duyarlı potasyum kanallarının (KATP) eşlik ettiğ i saptanmıştır.(137)   zole sıçan aorta ve mezenterik düz kas hücrelerinde yapılan çeşitli çalışmalarında H₂S'in KATP kanalları aracılığ ı ile damar düz kasındaki KATP kanallarını a  arak K⁺ akımlarını arttırdığ ı ve düz kas hücrelerinde hiperpolarizasyona neden olduğ u saptanmıştır. Böylelikle hiperpolarizasyonun voltaj bağ ımlı Ca²⁺ kanallarının

kapanmasına, intrasellüler Ca^{2+} konsantrasyonunun azalmasına ve sonuç olarak dokuda gevşeme cevabının oluşmasına neden olduğu saptanmıştır. (137,138) Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör (EDHF) vasküler düz kas hücrelerinde hiperpolarizasyon meydana getirerek vazodilatasyona neden olmaktadır. Bu etki özellikle küçük rezistans arterlerde daha belirgin olup yapılan son çalışmalar, H_2S 'in majör bir EDHF olduğunu öne sürülmüştür.(139) İskemi / reperfüzyonun erken döneminde H_2S 'in biyosentezinde anlamlı bir artışa yol açmaktadır. İskemi / reperfüzyon epizodlarına tabi tutulan sıçan kalbinde reperfüzyon periyodu esnasında NaHS uygulaması kalpte iskemi sonrası fonksiyonel performansı arttırdığı saptanmıştır.(140).

II. E. 5. Hidrojen Sülfür'ün Santral Sinir Sistemi Üzerine Etkileri

Hidrojen sülfürün özellikle serebrovasküler sistemde yapılan çalışmalar sonucunda serebral arterlerde fizyolojik ve patolojik olaylarda rol oynadığı gösterilmiştir. Nöromodulator etkinliğe ek olarak, H_2S 'in nöronları hücre içi ve hücre dışında oksidatif stresten koruduğu gösterilmiştir. (141) Redükte glutatyonun beyinde önemli bir antioksidatif savunma olduğu bilinmektedir. Ayrıca H_2S in vitro ortamda birçok hücrede H_2O_2 'yi de etkisiz hale getirir. (142) H_2S redükte glutatyon üretimini arttırmaktadır. H_2S 'in GSH üzerine etkisiyle ilgili bir başka önemli mekanizma da glutamat alımının güçlendirilmesidir. H_2S 'in hidrojen peroksitle indüklenen hücresel hasarları geri döndürdüğü ve bu etkinin glutamat alım inhibitörlerince zayıflatıldığı gösterilmiştir. (143) Hu ve ark, H_2S 'in lipopolisakkaridle indüklenen nitrik oksid ve $\text{TNF-}\alpha$ salınımını zayıflatarak, mikroglia ve astrositleri inflamasyondan koruduğunu göstermişlerdir. (144) Zhang ve ark. 2009 yılında geçici serebral iskemi /reperfüzyonunda H_2S 'in apoptozu önleyerek nöronal korunma sağladığını tespit etmişlerdir. (145) Retina yüksek miktarda oksijene ve ışığa maruz kalması nedeniyle oksidatif strese karşı daha hassastır. Aşırı miktarda ışığa maruziyet reaktif oksijen türevlerini ve intraselüler Ca^{2+} konsantrasyonunu arttırarak fotoreseptörlerde irreversibl bir dejenerasyona neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda H_2S 'in intraselüler Ca^{2+} artışını baskılamak suretiyle fotoreseptör hücrelerini ışıkla indüklenen dejenerasyona karşı koruduğu gösterilmiştir. (146)

II. E. 6. Hidrojen Sülfür'ün Diabet Üzerine Etkileri

Yapılan çalışmalarda CBS ve CSE enzimlerinin pankreasta yüksek miktarda gösterilmesi üzerine H_2S 'in insülin sekresyonunun kontrolünde rol oynayabileceği düşünülmektedir. Yang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada CSE inhibitörü uygulanması

sonrasında sıçan insülinoma hücrelerinde (INS-1E) insülin salınımını arttırdığı H_2S 'in eksojen olarak uygulanmasının ise INS-1E hücrelerinde ve izole fare pankreas adacıklarında glukozla indüklenen insülin salınımını azalttığı gözlenmiştir. (147) Tang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda ise H_2S donörü olan NaHS uygulanması sonrasında ile insülin salınımının düzenlenmesinde kritik rol oynayan bir diğer kanal olan L-tipi voltaj duyarlı Ca^{+2} kanallarının akımlarında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak eksojen ve endojen H_2S 'in L-tipi Ca^{+2} kanal aktivitesini ve pankreastan insülin salınımını inhibe ettiği gösterilmiştir. (148) Kaneko ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise yüksek konsantrasyondaki glukozun pankreatik β -hücrelerinde CSE ekspresyonunu ve H_2S oluşumunu arttırdığı, eksojen H_2S 'in yüksek glukozla indüklenen β -hücre apoptozunu inhibe ettiği ve bu yolla β hücrelerini glukotoksisiteye karşı koruduğu gösterilmiştir. (149)

II. E. 7. Hidrojen Sülfür'ün Üriner Sistem Üzerine Etkileri

H_2S inin böbrekte birçok önemli fizyolojik ve patolojik rolü olduğu gösterilmiştir. (150) H_2S 'in böbrekteki etkilerini çoğunlukla vasküler ve tübüler fonksiyonlar üzerinde değişikliklere neden olarak gösterir. Tübüler fonksiyonları arasında glomerüler filtrasyon hızını (GFR) arttırmak ve idrarda sodyum atılımını arttırmak olduğu saptanmıştır. (151) H_2S 'nin renal iskemi ve perfüzyon hasarını antioksidan, antiapoptotik ve antienflamatuar etkilerle iyileştirme etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur. (152) Simon ve arkadaşlarının domuzlar üzerinde oluşturulan renal iskemi / reperfüzyon hasarında hidrojen sülfür doneri Na_2S kullanılması sonucunda kreatinin kan seviyelerindeki yükselmeyi azalttığını, IL-6, IL-1 β ve nitrit + nitrat konsantrasyonlarını da düşürdüğünü ve glomerüler histolojik hasarı ve doku zedelenmesi azalttığını, organ disfonksiyonunda ön tedavi olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. (153) Jiang ve arkadaşlarının sıçanlar üzerindeki yaptığı çalışmada böbrek hasarına karşı sülfür donörü olarak intraperitoneal yoldan NaHS tedavisi uygulanması sonucunda makrofajların infiltrasyonunun ve TNF- α 'nın ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı MDA düzeyinde ve intersitisyel fibrozisde anlamlı azalma ve SOD aktivitesinde artış olduğu gözlenmiştir. Bu çalışma sonucunda NaHS in dokuları oksidatif stres, lipid peroksidasyonu ve inflamasyona karşı koruduğu gösterilmiştir. (11)

II. E. 8. Hidrojen Sülfür'ün İntestinal Sistem Üzerine Etkileri

İntestinal iskemi / reperfüzyon hasarı intestinal mekanik obstrüksiyon, abdominal aort anevrizması cerrahisi, kardiyopulmoner baypas, strangüle herni, karaciğer ve bağırsak

transplantasyonu, mezenterik arter tıkanıklığı, şok ve şiddetli travma gibi birçok klinik durumda majör ve sık görülen bir problem olarak kabul edilir. (154) Bu hasar sistemik inflamatuvar yanıt sendromuna ve çoklu organ yetmezliğinin gelişmesine yol açabilir. (155) Liu ve arkadaşlarının sıçanlar üzerindeki yaptığı çalışmada hidrojen sülfür kaynağı olarak NaHS kullanılarak intestinal iskemi / reperfüzyon hasarını önemli derecede azalttığını yapılan histopatolojik incelemelerde ise serum ve bağırsak MDA aktivitesini önemli ölçüde azaltarak serum ve bağırsak SOD ve GSH-Px aktivitesinin düzeylerini önemli ölçüde artırdığını göstermiştir. Bu çalışma sonucunda hidrojen sülfürün intestinal hasara karşı antioksidan enzim aktivitesi gösterdiği ve H₂S'nin bir terapötik ajan olarak potansiyel kullanımını düşündürmüştür. (156)

Lİ ve arkadaşlarının neonatal fareler üzerindeki yapılan maternal ayırma sonucunda meydana gelen oksidatif stres, inflamasyona ve epitel hasara karşı hidrojen sülfidin kolonu koruduğu gösterilmiştir. (10)

III- GEREÇ VE YÖNTEM

Deneyisel testis torsiyonu modelinde hidrojen sülfürün etkilerini değerlendirmek için yapılan bu çalışma İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan 2018 / 21 karar numarası ile onay alındıktan sonra İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı ve İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsünde yapılmıştır. Deney sonrasında yapılan histopatolojik incelemeler İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında, biyokimsal incelemeler ise İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

III. A. Çalışmada Kullanılan Deney Hayvanları

İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsünden ortalama ağırlıkları 300-400 gr olan 18 adet Wistar albino cinsi erkek sıçan temin edildi. Bu çalışma süresince denek hayvanları uygun standart kafeslerde, her kafeste bir hayvan olacak şekilde barındırıldı. Barınma ortamının sıcaklığı 21 ± 2 °C %40-60 bağıl nem altında ve ışık 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlandı. Hayvanların kafesleri devamlı olarak suya ve yeme ulaşabilmelerine olanak sağlayacak şekilde planlandı. Hayvanlara anesteziye alınacakları günün öncesinde saat 24:00'dan itibaren yem kısıtlaması yapıldı. Çalışma HADYEK tarafından onaylanan protokol ve DEHAM prensiplerine uygun olarak yapıldı.

III. B. Deney Protokolü

Çalışmada kullanılan sıçanlar her grupta 6 tane sıçan olacak şekilde rastgele seçilerek 3 gruba ayrıldı. Hayvanlara uygulanan cerrahi işlemler steril şartlarda ve intramüsküler olarak uygulanan 50 mg/kg ketamin (Ketalar, Pfizer) ve 10 mg/kg ksilazin (Rompun, Bayer,) anestezisi altında gerçekleştirildi. Sıçanlara anestezi uygulanıp supin pozisyon verilerek stabilizasyon sağlandıktan sonra skrotal bölge cildi traş edilerek cerrahi saha %10'luk povidon iyot (İsol, Merkez Lab) ile temizlenilerek geleneksel asepsi ve antisepsi kurallarına uyuldu. Ardından tüm gruplardaki sıçanlara midhemiskrotal insizyon yapılarak bilateral testisler ve spermatik kord serbestleştirilerek insizyon dışına alındı. Torsiyon modeli planlanan gruptaki sıçanlarda önce sol testis, kord elemanları ile birlikte sonrasında hemen sağ testis ve kord elemanlarının longitudinal aksı boyunca saat yönünde olacak şekilde 720 derece döndürülerek deneyisel testis torsiyonu modeli oluşturuldu. Testisin tekrar detorsiyone olmaması için 4/0 nontravmatik absorbable sütür ile dartos ve testis tunika albugineasından geçilerek testisler

skrotum iç yüzeyine sabitlendi. Takiben skrotum cildi 4. 0 ipek ile tek tek suture edilerek kapatıldı. Torsiyon süresinin 30dk sında testis torsiyonu + NaHS grubundaki 6 sıçana intraperitoneal olarak NaHS çözeltisi enjeksiyonu uygulandı. Testis torsiyonu toplam süresi 1 saat dolunca testisin dartosa sabitleme suture kesilerek testisler manuel olarak saat yönünün tersi yönünde detorsiyone edilerek referperfüzyon sağlandı. Ardından testisler skrotuma yerleştirilerek anatomik katlar 4/0 ipek suture ile kapatıldı. Postoperatif ilk günden itibaren 1 hafta boyunca iskemi/reperfüzyon +NaHS grubuna intraperitoneal olarak günde 1 kez olmak üzere NaHS çözeltisi enjeksiyonu uygulandı. Tüm grupların detorsiyonun 7. gününde skrotum eski insizyon yerinden açılıp bilateral orşiektomi yapılarak doku ve aynı zamanda kan örnekleri alındı. Deney protokolünün tamamlanmasının ardından ratlar yüksek doz anestezi altında sakrifiye edildi.

Hidrojen sülfür kaynağı olarak NaHS (Sodium hydrosulfide monohydrate, Sigma-Aldrich) kullanılarak normal salinle çözündürülerek 1ml salin de 10 mg/kg/gün doz NaHS olacak şekilde intraperitoneal olarak günde 1 kez olmak üzere torsiyon günü ve sonrasındaki 7 gün boyunca iskemi / reperfüzyon + NaHS grubuna (n:6) uygulanıldı. (10,11)



Resim 5- Operasyon öncesi hazırlık aşaması

III. C. Deney Grupları

1. Sham Grubu (n=6): Grupta yer alan 6 adet sıçana midskrotal kesi yapılarak spermatik kord ve testisler disseke edilerek serbestleştirilip scrotum dışına çıkarıldıktan sonra torsiyon modeli uygulanmadan testis anatomik pozisyonuna uygun şekilde skrotuma yerleştirilerek scrotumdaki insizyon primer olarak kapatıldı. Postoperatif 7. günde sıçanlar sakrifiye edilerek bilateral orşiektomi yapılarak doku ve aynı zamanda kan örnekleri alındı.

2. İskemi / Reperfüzyon Grubu(n=6): Grupta yer alan 6 adet sıçana midskrotal kesi yapılarak spermatik kord ve testisler disseke edilerek serbestleştirildikten sonra testisler kord elemanları ile birlikte saat yönünde 720 derece döndürülerek deneysel testis torsiyonu modeli oluşturuldu ve testisler skrotum iç yüzeyine fiks edildi. 1 saatlik iskeminin sonrasında testis detorsiyone edilip dokuda reperfüzyon sağlandı. Testisler anatomik pozisyonuna uygun şekilde skrotuma yerleştirilerek scrotumdaki insizyon primer olarak kapatıldı. Postoperatif 7. günde sıçanlar sakrifiye edilerek bilateral orşiektomi yapılarak doku ve aynı zamanda kan örnekleri alındı.

3. İskemi / Reperfüzyon + NaHS Grubu (n=6): Grupta yer alan 6 adet sıçana midskrotal kesi yapılarak spermatik kord ve testisler disseke edilerek serbestleştirildikten sonra testisler kord elemanları ile birlikte saat yönünde 720 derece döndürülerek deneysel testis torsiyonu modeli oluşturuldu ve testisler skrotum iç yüzeyine fiks edildi. Torsiyonun 30. dakasında hidrojen sülfid kaynağı olarak kullanılan NaHS intraperitoneal olarak sıçanlara enjekte edildi. 1. Saatlik torsiyon sonrasında testisler detorsiyone edilerek dokuda reperfüzyon sağlandı. Testisler anatomik pozisyonuna uygun şekilde skrotuma yerleştirilerek scrotumdaki insizyon primer olarak kapatıldı. Postoperatif ilk günden itibaren 7 gün boyunca intraperitoneal olarak NaHS sıçanlara enjekte edildi. Postoperatif 7. Günde sıçanlar sakrifiye edilerek bilateral orşiektomi yapılarak doku ve aynı zamanda kan örnekleri alındı.



Resim 6- Skrotal explorasyon sonrası testislerin insizyon dışına alınması



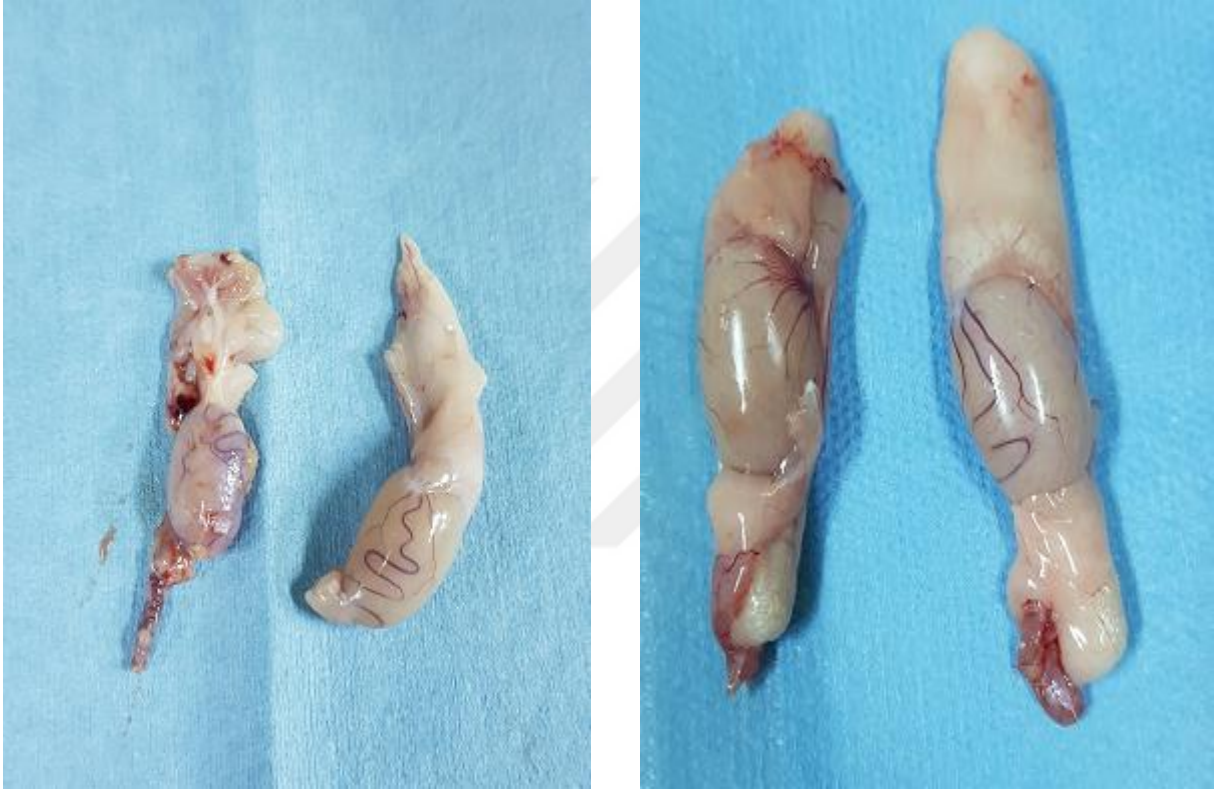
Resim 7- Testis tosiyonu oluşturulması



Resim 8-İntraperitoneal hidrojen sülfür (NaHS) uygulanması

III. D. Deneyin Tamamlanması ve Örneklerin Muhafaza Edilmesi

Deney bitiminde bilateral orşiektomi sonrası alınan testis dokuları sol testis ve sağ testis olmak üzere ayrıldı. Sol testislerin tümü histopatolojik inceleme için Bouin solüsyonunda fiksasyon edilerek patoloji anabilim dalına gönderildi. Sağ testislerinde tümü sf ile yıkandıktan ve steril şekilde kurulandıktan biyokimyasal işlemler için ölçüm yapılacağı güne kadar -80°C 'de derin dondurucuya kaldırıldı. Sıçanlardan biyokimyasal işlemler için intrakardiyak kan alınarak ve sonrasında sıçanlar sakrifiye edilerek deneyin cerrahi kısmı sonlandırıldı.



Resim 9- Bilateral orşiektomi sonrası testis dokuları

III. E. Histopatolojik İnceleme

Her bir sıçana ait olan ve histopatoloji için ayrılan sol testis dokularının bouin solüsyonunda fiksasyonu ardından standart parafin doku takip prosedürleri uygulandı. Parafin bloklardan mikrotom cihazında (thermo scientific) yaklaşık 4 mikron kesitler alınarak genel değerlendirme amacıyla hemotoksilen-eozin (H&E) boyama yöntemi ile boyandı. Boyanmış tüm preparatlar patoloji öğretim üyesi tarafından Olympus BX-40 ışık mikroskopunda uygun olarak değerlendirildikten sonra semi- kantitatif modifiye Johnsen testisküler biyopsi skorlaması kullanılarak morfolojik hasar ve testisküler hasar durumu değerlendirildi. (157,158)

Johnsen skoru için her bir sıçandan alınan testis dokusu örneklerinin H&E ile boyanmış kesitlerinde, seminifer tübüllerde yer alan spermatogenik hücrelerin görünimleri değerlendirilerek her bir seminifer tübül için her bir tübüle 1 ile 10 arasında bir skor verildi. Sonuçlar elde edildikten sonra grup ortalamaları alındı ve istatistiksel olarak gruplar arasında karşılaştırma yapıldı.

Skor 10	Komplet spermatogenez, lümende çok sayıda sperm varlığı, normal ve düzgün yükseklikte germinal epitel, normal çaplı seminifer tübül lümeni
Skor 9	Çok sayıda sperm, disorganize germinal epitel, oblitere tübüller lümen
Skor 8	Germinal epitelin çok tabakalı olması ancak lümende 10'dan az sayıda spermatozoon bulunması
Skor 7	Çok sayıda spermatid olması ve hiç spermatozoon olmaması
Skor 6	Spermatozoon olmaması ve 10'dan az sayıda spermatid olması
Skor 5	Sadece spermatositlerin olması, spermatozoon ya da spermatidlerin hiç olmaması
Skor 4	Hiç spermatozoon ve spermatid olmaması ve 5'den az sayıda spermatosit varlığı
Skor 3	Germ hücreleri olarak sadece spermatogonyum varlığı
Skor 2	Sadece sertoli hücreleri olması ve hiç germ hücreleri olmaması
Skor 1	Seminifer tübül lümeninde hiç hücre olmaması

Tablo 1. Modifiye Johnsen Testiküler biyopsi skorlaması

III. F. Biyokimyasal İnceleme

Deney sonunda biyokimya analizleri için her bir sıçandan kan örnekleri alındı. Kan örnekleri antikoagülan içermeyen jelli biyokimya tüplerine alınarak +4°C 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serum örnekleri polipropilen tüpler içine ayrılarak -80°C'de saklandı. Biyokimyasal işlemler için ayrılan sağ testis dokuları derhal sıvı nitrojen ile işlem edilerek donduruldu ve biyokimyasal incelemeler yapılana kadar -80°'de saklandı.

1-Serumda Yapılan İncelemeler

a- Serum TNF- α Düzeylerinin Ölçümü

Serum TNF- α (Rat TNF-alpha, Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, China) düzeyleri ELISA yöntemiyle ölçüldü. Sonuçlar pg/mL olarak verildi.

2-Testis Dokusunda Yapılan İncelemeler

a- Doku Homojenatlarının Hazırlanması ve Postmitokondri Fraksiyonunun Eldesi

İşlem: Testis dokuları tartıldı ve doku homojenizatörü ile soğuk 0.15 M KCl çözeltisi içinde homojenize edilerek %10'luk homojenatlar (w/v) hazırlandı. Doku homojenatları +4 °C ayarlanmış soğuk santrifüjde 600 $\times g$ 'de 10 dakika santrifüj edildi, nükleus ve parçalanmamış doku parçaları uzaklaştırıldı. Malondialdehit (MDA), ileri oksidasyon protein ürünleri (advanced oxidation protein product: AOPP), antioksidan aktivite (ferric reducing antioxidant power: FRAP) ve GSH düzeyleri bu süpernatanda (postnükleer fraksiyon) çalışıldı. Süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri ise bu supernatanın ependorf santrifüjünde 10000 $\times g$ 'de 20 dakika santrifüj edilmesi ile elde edilen postmitokondri fraksiyonunda tayin edildi. Tüm örnekler deneyler yapılana kadar -80°C'de saklandı.

b- TNF- α Düzeylerinin Ölçümü

Tümör Nekroz Faktörü alfa (TNF alfa) akut inflamasyon sırasında makrofajlar /monositler tarafından üretilen inflamatuvar sitokindir. Nekroz veya apoptoza yol açan hücrelerdeki çeşitli sinyal olaylarından sorumludur. Enflamasyon gelişiminde ve diğer sitokinlerin uyarımında birçok fonksiyona sahiptir.(169) Testis dokusunda TNF- α (Rat TNF-alpha, Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, China) düzeyleri ELISA yöntemiyle ölçüldü. Sonuçlar pg/mg protein olarak verildi.

c- MDA Düzeyleri Tayini: Lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden olan MDA'nın tiyobarbitürik (TBA) asit ile sıcak ve asit ortamda reaksiyona girmesi sonucu oluşan renk spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Ayıracılar:

- Buege-Aust ayıracı: 375 mg TBA bir miktar distile suda eritildi. Üzerine 15 mL %100'lük triklorasetik asit ve 2.1 mL derişik hidroklorik asit (HCl) eklendi, karıştırıldı ve hafifçe ısıtılarak çözüldükten sonra distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
- 1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP) standardı: 22 mg TEP 10 mL distile suda çözünerek 10 mM'lık ana standart hazırlandı. Daha sonra bu ana standart 1000 kez sulandırılarak 10 μ M'lık çalışma standardı hazırlandı.

İşlem: 0.2 mL postnükleer fraksiyon üzerine 0.2 mL PBS ve 0.8 mL Buege-Aus ayıracı eklendi. Kaynar su banyosunda 15 dakika tutuldu. Soğuduktan sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek elde edilen süpernatanın absorbansı kör karşı okundu. Ayrıca kör ve standart tüpler hazırlandı. Sonuçlar ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon=1,56 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ve standardın absorbansı değerlendirilerek hesaplandı. (159)

d- AOPP Düzeyleri Tayini: Başlıca ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olan AOPP tayini için serum örneklerinin sitrik asit içeren asit ortamda verdiği absorbanslar 340 nm.'de okundu. Sonuçlar kloramin-T ile potasyum iyodürün (KI) oksidasyonu ile oluşan triiyodid ile standardize edilerek karşılaştırıldı.

Ayıracılar:

- 0.2 M sitrikasit
- 1.16 M KI
- Kloramin-T stok standardı (100 mM): 227.6 mg kloramin-T 10 mL'de çözüldü ve sulandırılarak 25, 50 ve 100 μ M'lık çalışma standartları hazırlandı.

İşlem: Mikroplaka kuyucuklarına 0.04 mL postnükleer fraksiyon ve 0.16 mL 0.2 M sitrik asit konuldu (deney). Ayrıca 0.190 mL 0.2 M sitrik asit ve 0.01 mL 1.16 M potasyum iyodür içeren (kör) ve 0.190 μ L kloramin-T (25, 50 ve 100 μ M; 0.2 M sitrik asitte hazırlandı) ve 0.01 mL 1.16 M KI içeren (standart) kuyucuklar hazırlandı ve 2 dakika sonra kör tüpe karşı deney ve standardın absorbansları 340 nm'de μ Quant mikroplaka okuyucuda belirlendi. Sonuçlar nmol/Lkloramin-T eşdeğeri olarak verildi.(160)

e- GSH Düzeylerinin Ölçümü: Ellman ayıracının (5,5'- ditiobis-2 nitro benzoik asit; DTNB) dokulardaki serbest sülfidril (-SH) grupları tarafından indirgenmesi sonucunda, 1 mol

-SH grubu başına 1 mol 2-nitro-5 tiyobenzoik asit oluşmaktadır. Oluşan sarı renk spektrofotometrik olarak 412 nm’de absorbans vermektedir.

Ayırıcılar:

- Proteinsizleştirme çözeltisi: 1.67 g glasiyal metafosforik asit, 200 mg Na-EDTA ve 30 g NaCl 100 mL distile suda çözüldü.
- 0.3 M Na₂HPO₄: 4.26 g Na₂HPO₄ 100 mL distile suda çözüldü.
- Ellman Renk Ayırıcı: 4 mg DTNB 10 mL %1’lik sodyum sitrat çözeltisinde çözüldü.
- GSH standardı: (0.1 mg/mL)

İşlem: Ependorf tüplere 0.2 mL postnükleer fraksiyon, 0.6 mL 0.15 M KCl ve 1.2 mL proteinsizleştirme çözeltisi kondu, karıştırıldı, 13000 xg’de +4 °C’de 5 dakika santrifüj edildi. Ayırıcı körü ve standart tüplere de aynı işlemler uygulandı. Daha sonra elde edilen bu supernatanlardan mikrolaka kuyucuklarına 0.05 mL pipetlendi ve üzerine 0.2 mL 0.3 M Na₂HPO₄ ve 0.05 mL Ellman ayırıcı kondu ve oluşan renkler 412 nm’de ayırıcı körüne karşı okundu. GSH düzeyleri ekstinksiyon katsayısı 13.6x10³ M⁻¹ cm⁻¹ ve standart kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar nmol/mg protein olarak tanımlandı.(161)

f- FRAP Düzeylerinin Ölçümü : +3 değerlikli demir (Fe⁺³) iyonlarını +2 değerlikli demir (Fe⁺²) iyonlarına indirgeyen antioksidan gücün ölçülmesi esasına dayanır.

Ayırıcılar:

- 40 mM HCl
- 300 mM Asetat tamponu (pH 3.6): 3.1 g Na-asetat.3H₂O ile 16 mL asetik asit karıştırıldı ve 100 mL’ye distile su ile tamamlandı. pH 3.6’ya ayarlandı ve 10 kat sulandırıldı.
- 10 mM 2,4,6-tripridil-s-triazin (TPTZ): 312.33 mg TPTZ tartıldı ve 100 mL 40 mM HCl’de eritildi.
- 20 mM FeCl₃.6H₂O: 540 mg FeCl₃.6H₂O tartıldı. Distile su ile 100 mL’ye tamamlandı.
- FRAP ayırıcı: Sırası ile asetat tamponu, TPTZ ve FeCl₃ ayırıcıları 10:1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı.
- Askorbik asit standartları: 500 ve 1000 µM (sudaki çözeltileri)

İşlem: Mikroplaka kuyucuklarına 0.01 mL postnükleer fraksiyon ve 0.2 mL FRAP çalışma ayıracı konuldu, 37 °C’de 4 dakika inkübe edildikten sonra mikrolaka okuyucuda 593 nm’de absorbanslar okundu. Ayrıca 0.01 mL askorbik asit (500 ve 1000 µM) ve 0.2 mL FRAP çalışma ayıracı içeren standartlar hazırlandı. 1 mM askorbik asidin FRAP değeri 2000 olarak kabul edilerek sonuçlar nmol/mg protein olarak verildi.(162)

g- SOD Aktivitesinin Ölçümü: SOD aktivitesi, riboflavin ile duyarlandırılmış o-dianisidinin fotooksidasyon hızını artırma yeteneği spektrofotometrik olarak ölçülür. Riboflavinin floresans ışığı etkisiyle oluşturduğu süperoksit radikali, ortamdaki SOD’un etkisiyle hidrojen peroksite indirgenir. Hidrojen peroksit ise o-dianisidin ile reaksiyona girerek renkli ürün oluşturur. SOD aktivitesi ne kadar çok ise renkli ürün oluşumu o kadar fazla olur. Oluşan renkli ürün 460 nm’de spektrofotometrik olarak saptanır.

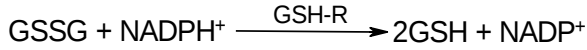
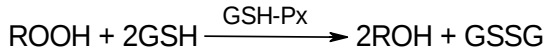
Ayırıcılar:

- 0.1 mM EDTA içeren 50 mM Potasyum fosfat tamponu (pH 7.8)
- 0.2 mM riboflavin: 7.3 mg riboflavin 100 ml 10 mM potasyum fosfat tamponunda (pH 7.5)’ de çözündü.
- 6 mM o-dianisidin: 19 mg o-dianisidin 10 mL distile suda çözündü.
- SOD (100 IU/mL) standardı: Sigma firmasından sağlanan SOD standardı 100 IU/mL olacak şekilde soğuk distile su ile sulandırıldı. Daha sonra bu ana standarttan 0.1 ve 0.05 mL alınarak deney ortamında 10 ve 5 IU SOD standardının bulunması sağlandı.

İşlem: Kör, standart ve deney tüplerine sırası ile 2.6 mL 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH:7.8), 0.1 mL o-dianisidin ilave edilir. Kör tüpüne 0.1 mL distile su; standart tüpüne 0.1 mL standart; deney tüpüne 0.05- 0.1 mL postmitokondri fraksiyonu eklendi ve her tüpe 30 saniye ara ile 0.2 mL riboflavin konuldu, karıştırıldı ve 460 nm’deki absorbans değerleri okundu. Tüpler 20W floresans lamba içeren 37 °C’ye ayarlanmış özel bir kutuya yerleştirildi ve tam 8 dakika süre ile floresans ışığa maruz bırakıldı. Sürenin bitiminde tüplerin absorbansı tekrar 460 nm’de okundu ve iki absorbans arasındaki fark alındı. Ayrıca deney körü ve standart için de aynı işlemler yapıldı. Sonuçlar U/mg protein olarak verildi.(163)

h- GSH-Px Aktivitesinin Ölçülmesi: GSH-Px aktivite tayini birbirini izleyen iki reaksiyona dayanır. Birinci reaksiyonda H₂O₂ veya organik hidroperoksitler (ROOH), GSH-Px etkisi ile indirgenirken, ortamdaki GSH oksitlenmiş GSH’a (GSSG) dönüşür. İkinci

reaksiyonda GSSG, GSH- redüktaz (GSH-R) etkisi ile tekrar GSH'a, NADPH ise NADP^{+} 'ye oksitlenmektedir. Bu dönüşüm 340 nm'de absorbansda azalma olarak izlenir, NADPH 340 nm'de bir absorbans verdiği halde, NADP^{+} bu dalga boyunda absorbans vermemektedir.



GSH-Px aktivitesi, 1 mL'lik hacimde son konsantrasyonlar 50 mM potasyumfosfat tamponu (pH 7.0), 1 mM EDTA, 1 mM sodyumazid, 0.2 mM NADPH, 1 mM GSH, 0.5 IU/mL glutatyon redüktaz (GSH-R), 1.2 mM kumen hidroperoksit ve değişik oranlarda sulandırılmış postmitokondri fraksiyonu içerecek şekilde hazırlanmış ortamda 37°C'de tayin edilmektedir.

Ayırıcılar:

- 20 mL potasyum fosfattamponu (125 mM, pH 7.0), 2.5 mL sodyum azid (130 mg/dL), 2.5 mL $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (744 mg/dl), 5 mL NADPH (8.3 mg/5 mL) ve GSH (15.3 mg/5 mL) içeren havuz
- Glutatyon redüktaz (0.5 IU/mL)
- 12 mM kümen hidroperoksit

İşlem: 0.7 mL havuz alınarak spektrofotometre küvetlerine kondu. Üzerine 0.1 mL GSH-Redüktaz (0.5 IU) ve 0.1 mL 40 kez sulu karaciğer post mitokondri fraksiyonu eklendi. Daha sonra 0.1 mL 12 mM kümen hidroperoksit ilavesi ile reaksiyon başlatıldı ve spektrofotometrede absorbans azalması 340 nm'de izlendi. Sonuçlar NADPH'in ekstinksiyon katsayısı olan $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 'den yararlanılarak hesaplandı sonuçlar nmol/dk/mg protein olarak verildi.(164)

I- Miyeloperoksidaz Tayini(MPO) : Miyeloperoksidaz başlıca nötrofil granüllerinde bulunan bir enzimdir. Reaksiyon peroksidaz içeren bir solüsyonla oksitlenen orto-dianisidin dihidroklorür ve hidrojen peroksit varlığında gerçekleşir. Peroksidaz enzimi hidrojen peroksit varlığında orto-dianisidini oksitler.

Ayırıcılar:

- 0.1 M Potasyumfosfat tamponu (pH 6.0): 0.1 M KH_2PO_4 (1.36 g/ 100 mL) ve 0.1 M K_2HPO_4 (1.74 g/100 mL) çözeltilerinden pH 6.0 olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.

- 50 mM potasyumfosfat tamponu (pH 6.0): 0.1 M potasyumfosfat tamponu eşit hacim distile su ile karıştırıldı.
- %1 HTAB (Heksadesil trimetil amonyum bromür): 1 mL HTAB, 0.1 M potasyumfosfat tamponunda çözünerek 100 mL'ye tamamlandı.
- HTAB çalışma ayıracı: %1 HTAB eşit hacim 50 mM potasyumfosfat tamponu ile sulandırıldı.
- o-dianisidinihidroklorür: 16.7 mg o-dianisidin 50 mM potasyumfosfat tamponunda çözündü ve 100 mL'ye tamamlandı. Çalışmadan hemen önce 100 mL o-dianisidine 200 µL % 30'luk H₂O₂ eklendi.

Dokunun hazırlanması: 200 mg doku 3 mL soğuk HTAB çalışma ayıracı içinde homojenize edildi ve 30 sn süreyle sonikasyon uygulandı ve daha sonra üç kez tuz-buz işlemi yapıldı. 15 dakika ependorf santrifüjde 10000 rpm'de santrifüj edildi. MPO aktivitesi süpernatanda çalışıldı.

İşlem: 2.9 mL H₂O₂ içeren o-dianisidin üzerine 0.1 mL süpernatant eklendi. Cam küvette 37° C'de 460 nm'de absorbanst değişimi üç dakika boyunca izlendi. Absorbanst değişimi (ΔA/dak) saptandı ve sonuçlar nmol/dk/mg protein olarak ifade edildi.(165)

j- Protein Tayini :

Doku homojenizatları ve postmitokondri fraksiyonlarında protein miktarı bişikoninik asit metodu ile belirlendi.

Ayırıcılar:

- Bişikoninik asit
- %4 CuSO₄
- Protein renklendirme ayıracı: 10 mL bişikoninik asit çözeltisi üzerine 0.2 ml %4 Cu SO₄ ekleyerek hazırlandı.

İşlem: 0.200 mL protein renklendirici ayıracı üzerine sulandırılmış testis postnükleer veya postmitokondri fraksiyonlarından 0.01 mL ilave edildi. Karıştırıldıktan sonra 37 °C'de 30 dakika beklendi. Oda ısısında soğutuldu ve oluşan rengin absorbanstı 562 nm'de mikropilaka okuyucusunda okundu. Sonuçlar mg/mL olarak ifade edildi.(166)

III. G. İstatistiksel Değerlendirme

Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verildi. Grup dağılımları Levene's testi kullanılarak değerlendirildi. Normal dağılım gösteren parametreler için tek yönlü ANOVA (post hoc Tukey HSD), nonhomojen dağılım gösteren parametreler için ise Kruskal-Wallis (post hoc Mann-Whitney U) testi kullanıldı.



IV-BULGULAR

IV. A. Serum ve Testis Dokusunda TNF- α Düzeyleri

Serum ve doku TNF- α düzeyleri gruplar arasında bir değişiklik göstermedi. (Tablo 2).

IV. B. Testis Dokusunda MDA, AOPP, MPO Düzeyleri

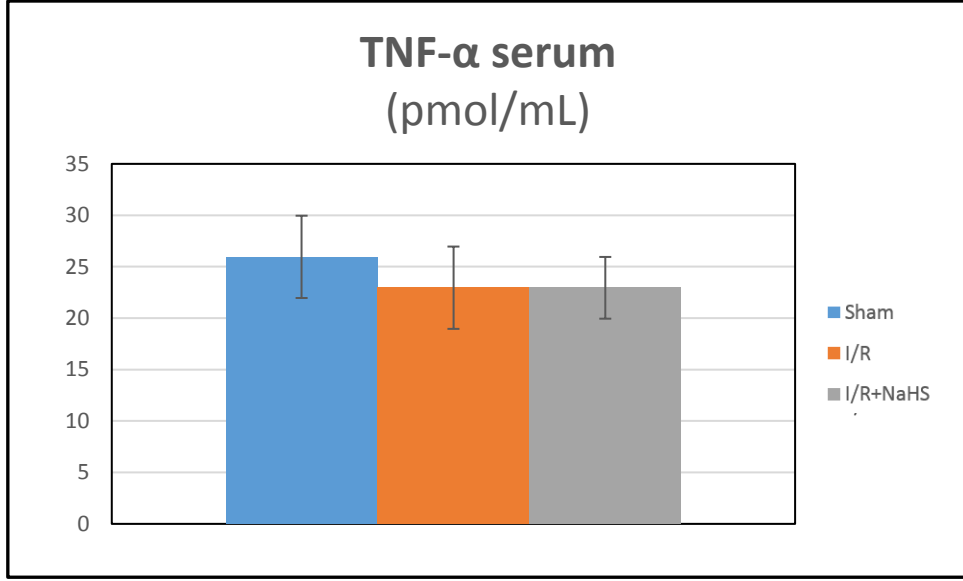
Torsiyon grubundaki sıçanların testis dokusunda MPO aktivitesi ve AOPP düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı artışlar saptandı. NaHS uygulaması ile artmış olan MPO aktivitesi ve AOPP düzeylerinde anlamlı bir azalma bulundu. MDA düzeylerinde ise gruplar arası bir farklılık bulunmadı. (Tablo 3).

IV. C. Testis Dokusunda Antioksidan Göstergeler

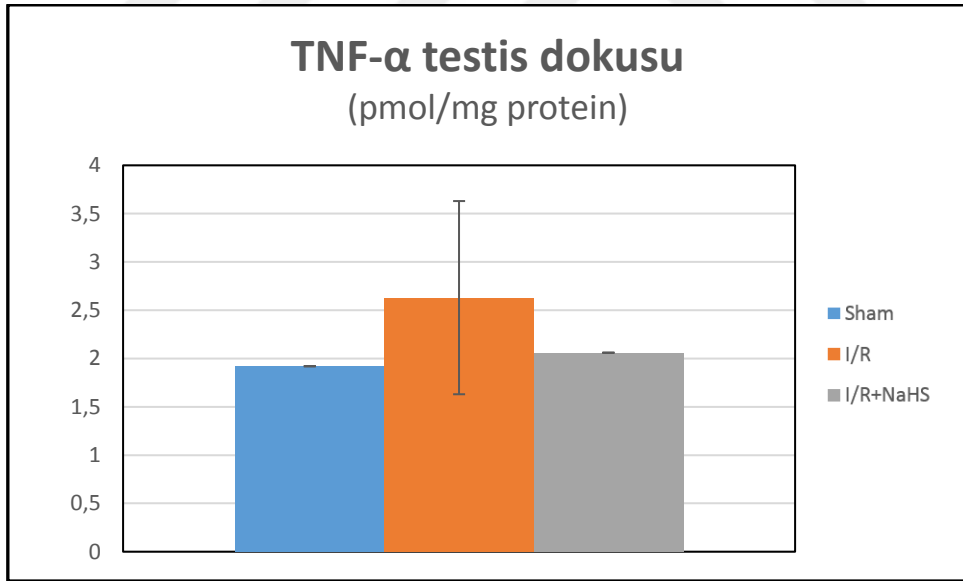
GSH düzeyleri torsiyon grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma gösterdi. H₂S grubunda ise azalmış olan GSH düzeylerinde anlamlı bir artış saptandı. Buna karşılık FRAP düzeyleri ile SOD ve GSH-Px aktivitelerinde değişiklik görülmedi. (Tablo 4).

	Sham	I/R	I/R+NaHS
TNF- α serum (pmol/mL)	25.96 $\pm$ 4.59	22.96 $\pm$ 4.72	22.95 $\pm$ 3.31
TNF- α testis dokusu (pmol/mg protein)	1.92 $\pm$ 0.46	2.63 $\pm$ 1.31	2.06 $\pm$ 0.62

Tablo 2. Deneysel testis torsiyonu (I/R) modelinde sodyum hidrojen sülfidin serum ve testis dokusu TNF-alfa düzeyleri üzerine etkisi (İnflamasyon) (ortalama $\pm$ SD) (şekil 1,şekil 2)



Şekil 1: Gruplara göre serum TNF-alfa değerlerinin karşılaştırılması



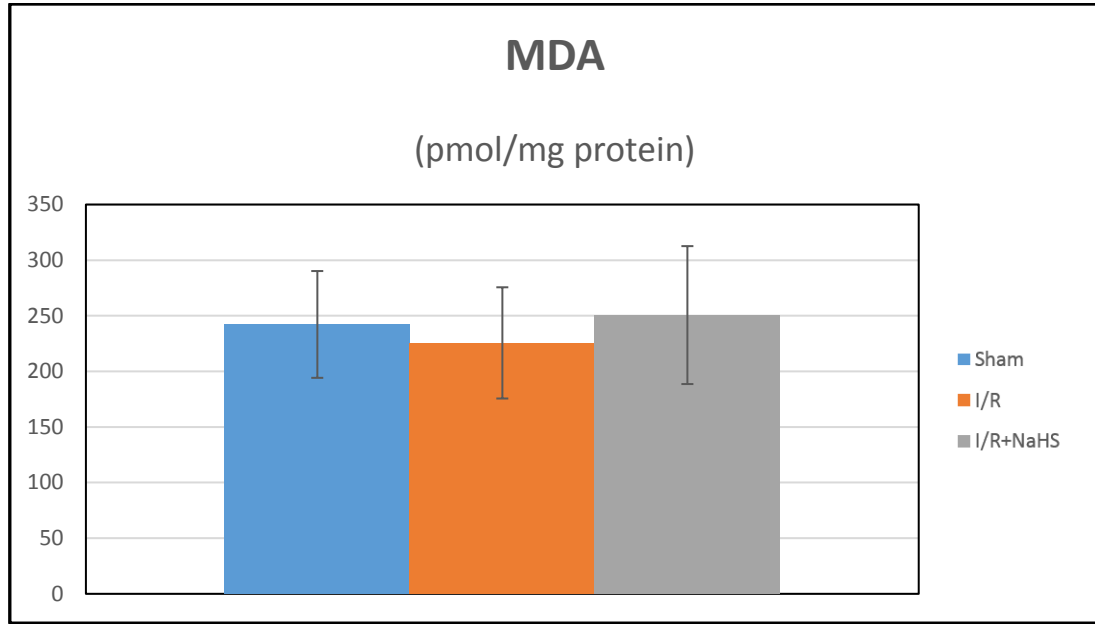
Şekil 2: Gruplara göre testis dokusu TNF-alfa değerlerinin karşılaştırılması

	Sham	I/R	I/R+NaHS
MDA (pmol/mg protein)	242,2±48,2	225,6±50,2	250,6±62,2
AOPP (nmol/mg protein)	36,3±1,79	43,85±5,76 ^a	32,90±2,79 ^b
MPO (nmol/mg protein)	11,59±0,51	18,38±4,61 ^a	13,52±1,69 ^b

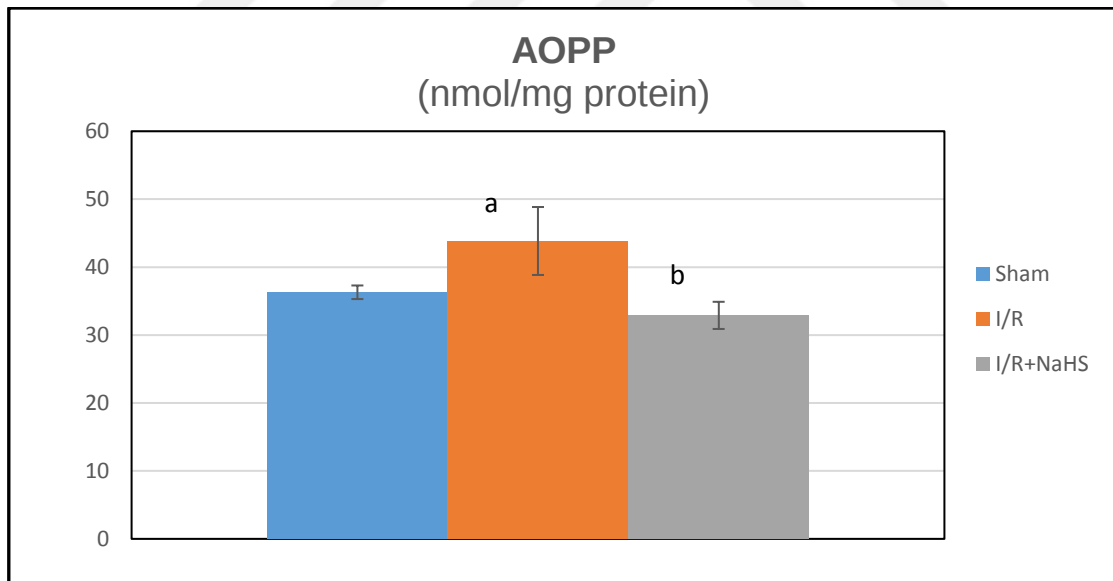
Tablo 3. Deneysel testis torsiyonu (I/R) modelinde sodyum hidrojen sülfidin (NaHS) , (MDA), (AOPP), (MPO) düzeylerine etkisi.(Oksidan etki) (ortalama±SD) (şekil 3,şekil 4,şekil 5)

^a p<0.05 tüm grupların kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı sonuç

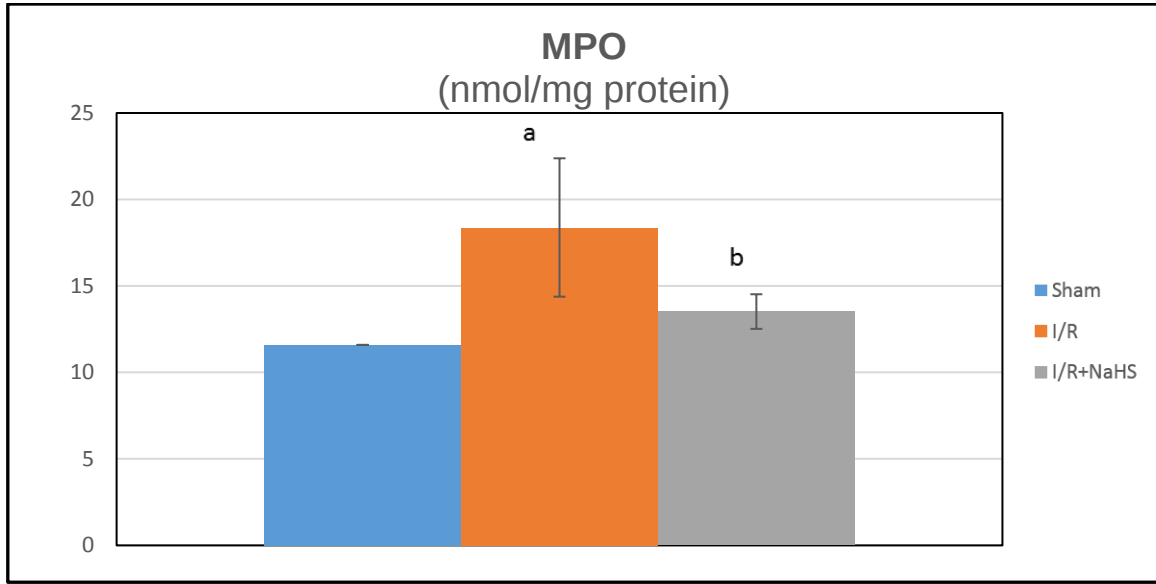
^b p<0.05 I/R+NaHS grubu,I/R grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı sonuç



Şekil 3: Gruplara göre testis dokusu MDA değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 4: Gruplara göre testis dokusu AOPP değerlerinin karşılaştırılması



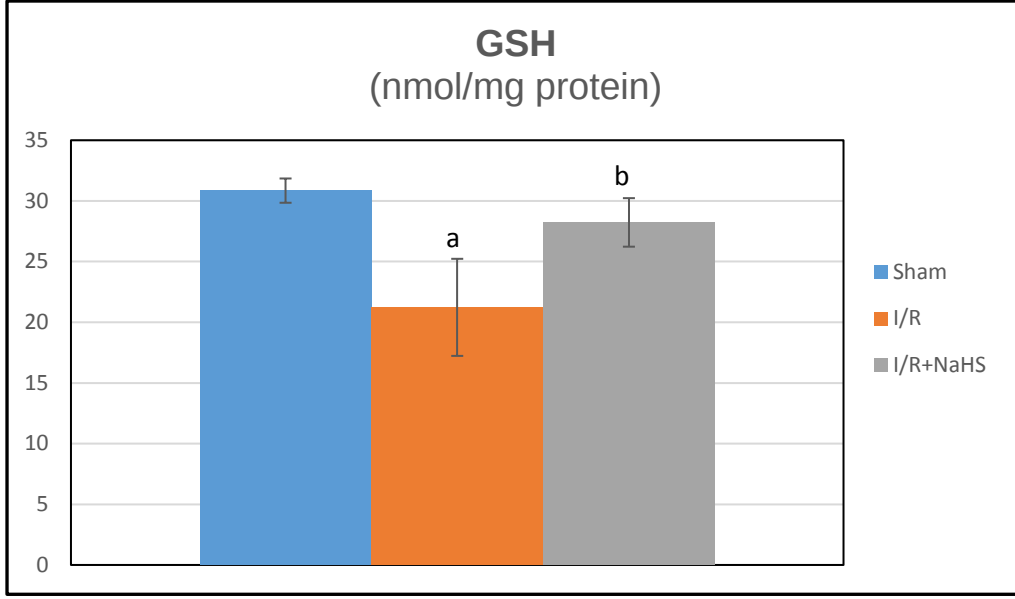
Şekil 5: Gruplara göre testis dokusu MPO değerlerinin karşılaştırılması

	Sham	I/R	I/R+NaHS
GSH (nmol/mg protein)	30,85±1,65	21,23±4,75 ^a	28,23±2,90 ^b
FRAP (nmol/mg protein)	66,15±7,28	70,40±8.04	79,66±6,24
SOD (U/mg protein)	6,74±0,95	7,66±1,30	6,56±0,95
GSH-Px (nmol/dk/mg protein)	90,10±24,73	92,64±9,25	82,68±9,68

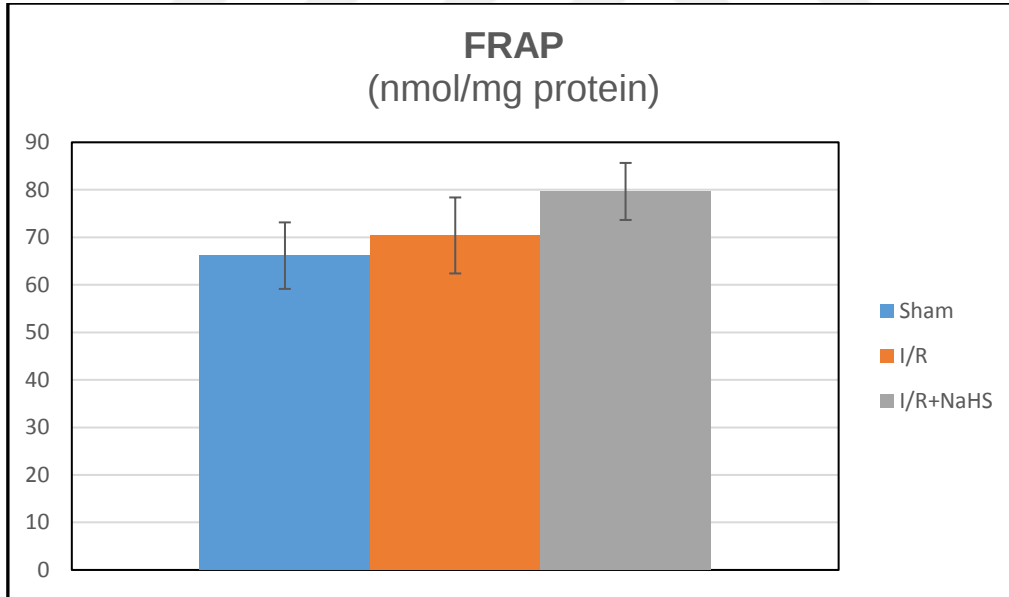
Tablo 4. Deneysel testis torsiyonu (I/R) modelinde sodyum hidrojen sülfürün (NaHS) (GSH),(FRAP),(SOD),(GSH-PX) düzeylerine etkisi.(Antioksidan etki) (ortalama±SD) (şekil 6,ş ekil 7, şekil 8, şekil 9)

^a p<0.05 tüm grupların kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı sonuç

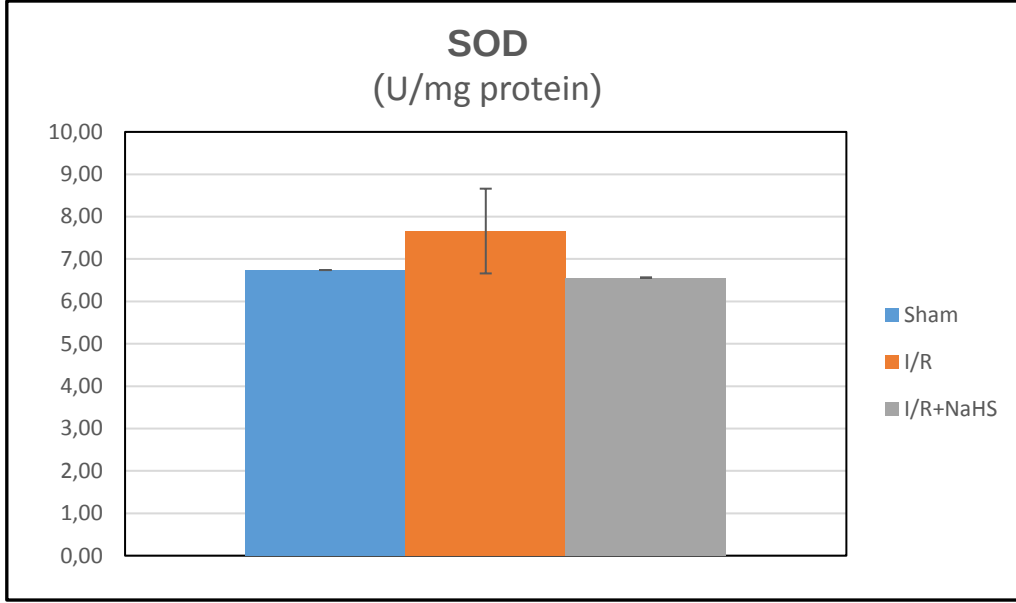
^b p<0.05 I/R+NaHS grubu,I / R grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı sonuç



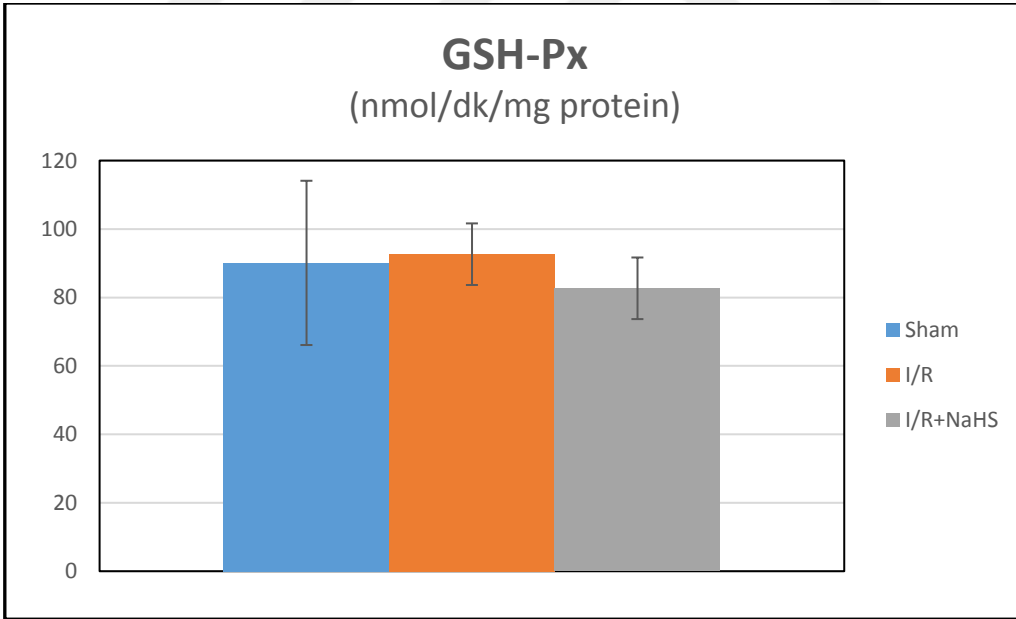
Şekil 6: Gruplara göre testis dokusu GSH değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 7: Gruplara göre testis dokusu FRAP değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 8: Gruplara göre testis dokusu SOD değerlerinin karşılaştırılması



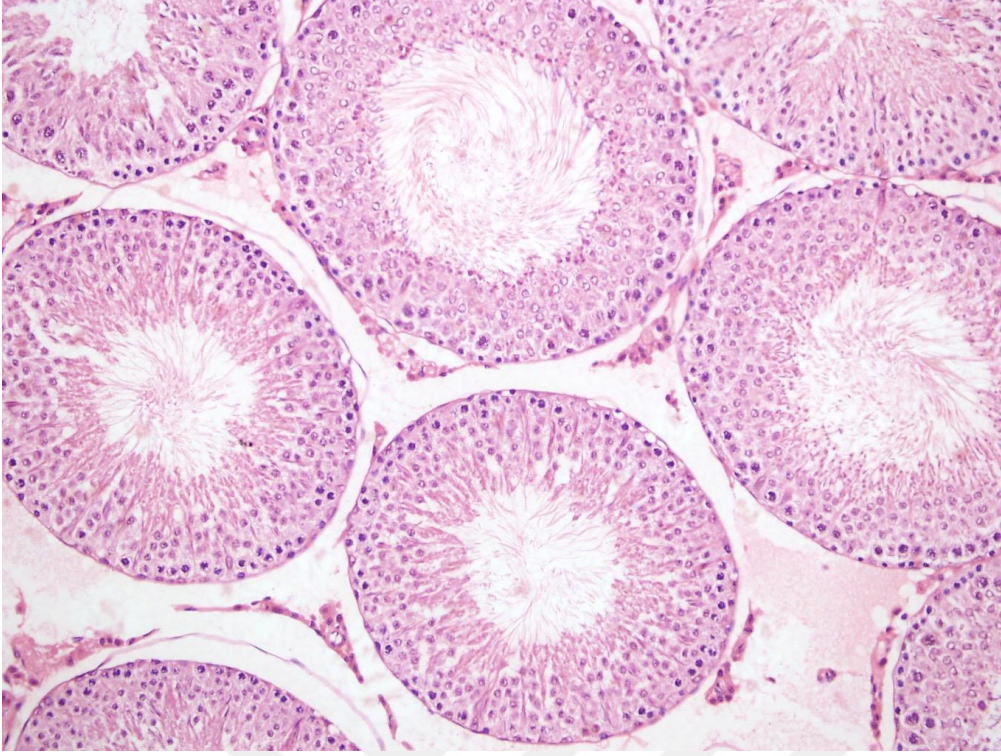
Şekil 9: Gruplara göre testis dokusu GSH-Px değerlerinin karşılaştırılması

IV. D. Histopatolojik Bulgular

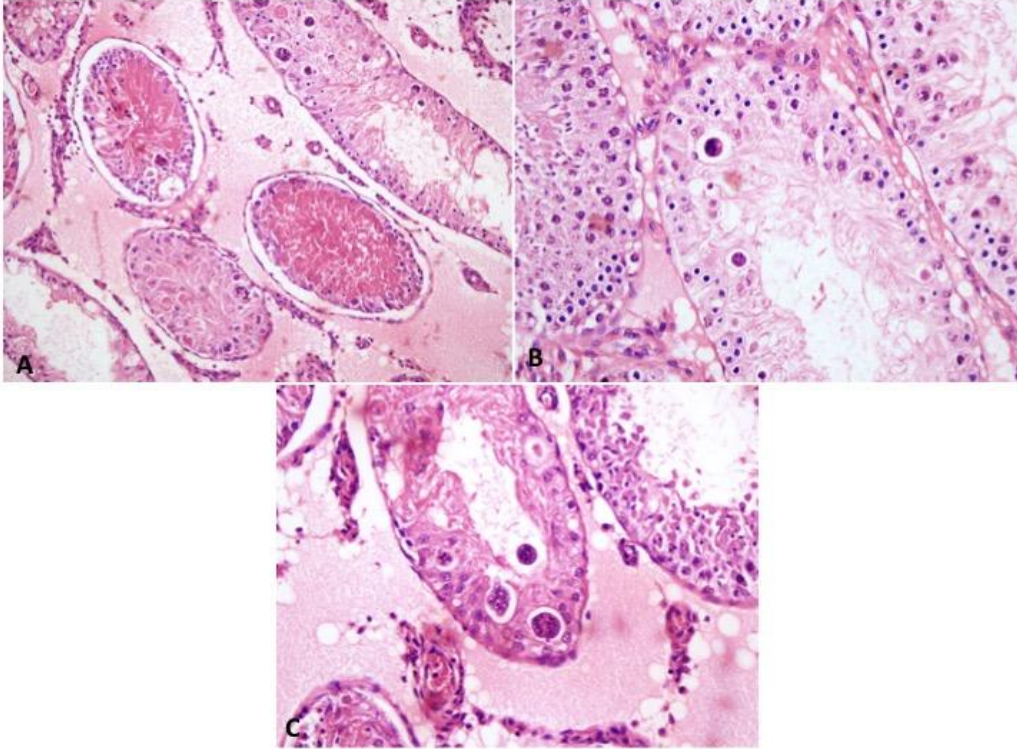
1-Operasyon Sırasında Makroskopik Gözleme Dayanan Bulgular

Testislerin insizyon dışına alındığındaki görüntüsü açık pembe renkliydi fakat torsiyone edildikten sonra testislerin renginin açık pembeden mora doğru koyulaştığı gözlemlendi. Sonrasında 1 saatlik torsiyon süresi sonucunda insizyon açıldığında testislerde mor renk değişikliği yanısıra ödem de geliştiği gözlemlendi. Testislerin detorsiyone edilmesi sonrasında testislerin renginde kısmi düzelme olmasına rağmen minimal ödemin devam ettiği gözlemlendi. 1 hafta sonra yapılan orşiektomi sonrasında özellikle iskemi/ reperfüzyon grubunda testislerdeki mor rengin minimal olduğu ve 1 tanesinde atrofi geliştiği, sham grubuyla iskemi / reperfüzyon +NaHS grubu testisleri arasında morfolojik olarak belirgin fark saptanmadı.

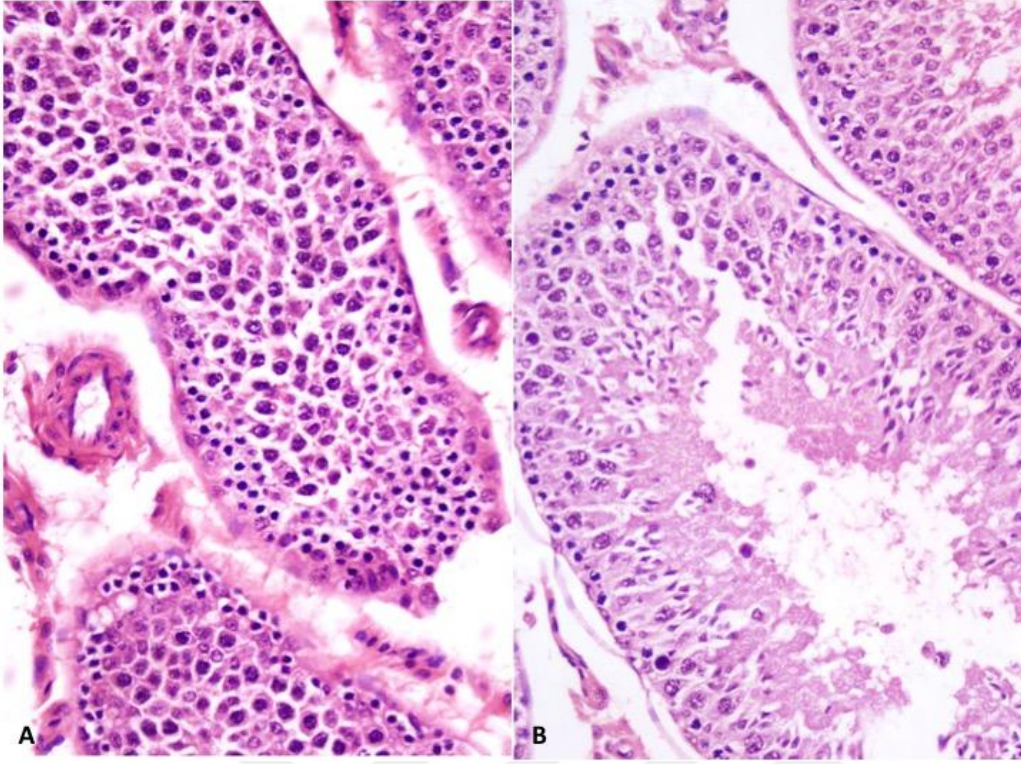
Yapılan mikroskopik incelemede sham grubunda normal spermatogenez gösteren seminifer tubulusların olduğu iskemi/reperfüzyon grubunda seminifer tübül yapılarının ve spermatogenik hücrelerin düzeninin bozulduğu, tübül içerisinde çok çekirdekli granülasyon hücrelerinin gözlemlendiği, bazı seminifer tübülüslerde spermatogenik hücrelerin bulunmadığı, iskemi / reperfüzyon +NaHS ise seminifer tubuluslarda spermatosit ve spermatozoa düzeyine ulaşan maturasyon gösteren germ hücreleri saptandı. Johnsen skorlamasına göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu .($p<0.05$) Farklılığın tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; sham grubunun değerleri ile iskemi / reperfüzyon grubu arasında yapılan değerlendirme sonrasında sham grubunun değerlerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptandı. ($p<0.05$) Iskemi / reperfüzyon grubunun değerleri ile I/R+NaHS grubunu değerlerinin karşılaştırılması sonrasında iskemi /reperfüzyon grubu değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu saptandı . ($p<0.05$) Sham grubu ve I/R+NaHS grubu arasında ise Johnsen skoru değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı. ($p>0.05$)



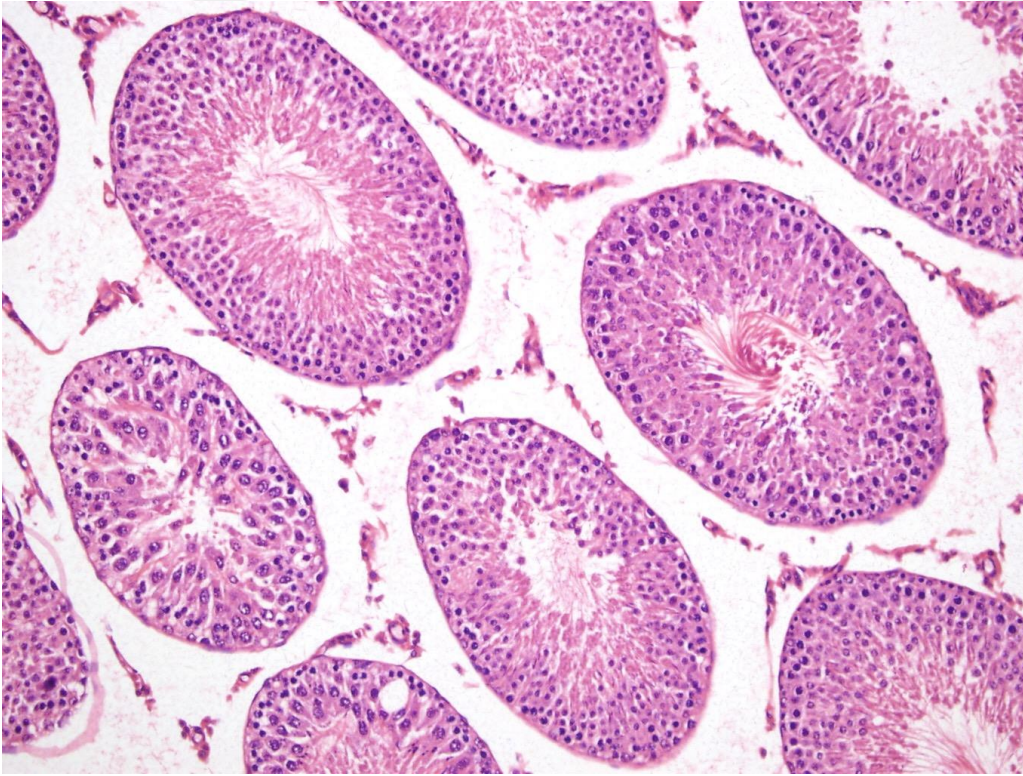
Resim 10- Spermatozoa düzeyinde matürasyon içeren normal spermatogenez gösteren seminifer tubuluslar (Hematoksilen eozin, 200x)



Resim 11- Seminifer tubuluslarda nekroz (A), apoptotik cisimcikler (B) ve dev hücreler (C) (Hematoksilen eozin, A 100x, B-C 200x)



Resim 12- Spermatosit (A) ve spermatid (B) düzeyinde matürasyon gösteren seminifer tubuluslar (Hematoksilen Eozin, 400x)



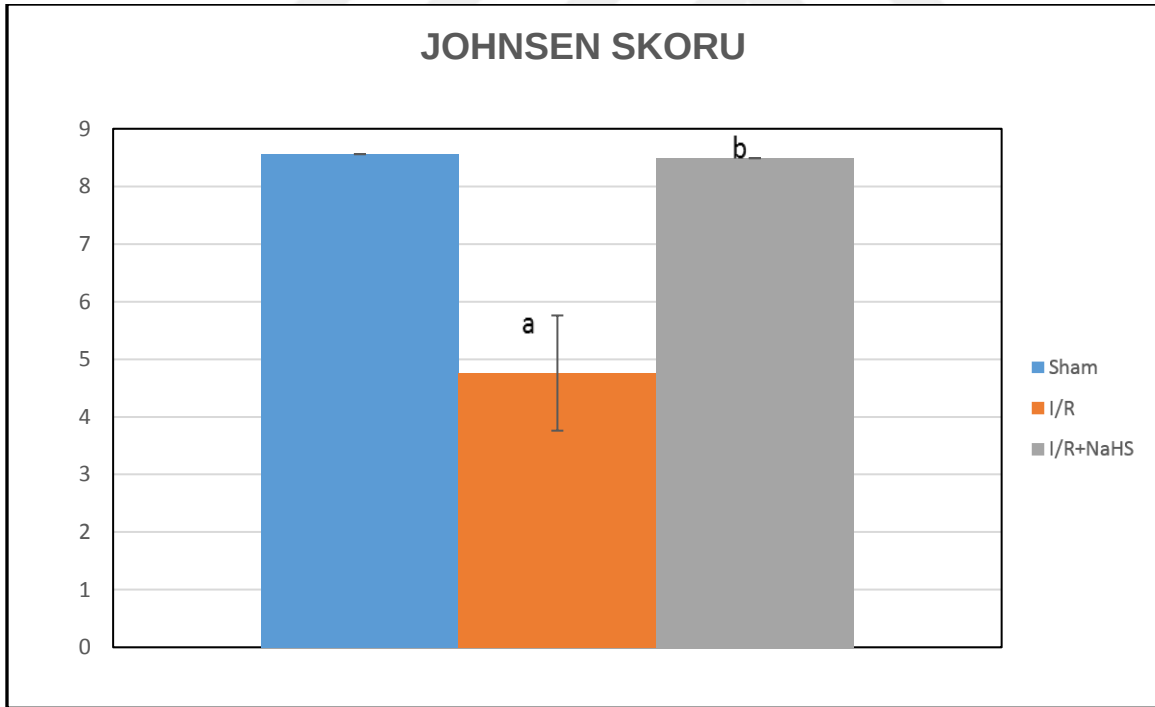
Resim 13- Seminifer tubuluslarda spermatosit (solda) ve spermatozoa düzeyine ulaşan matürasyon gösteren germ hücreleri (Hematoksilen eozin, 200x)

	Sham	I/R	I/R+NaHS
Johnsen skoru	8,56±0,45	6,76±1,51 ^a	8,49±0,68 ^b

Tablo 5- Deneysel testis torsiyonu (I/R) modelinde tüm grupların Johnsen'ın ortalama testiküler biyopsi skoru (ortalama±SD) (şekil 10)

^a p<0.05 tüm grupların kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı sonuç

^b p<0.05 I/R+NaHS grubu I / R grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı sonuç



Şekil 10: Gruplara göre testis Johnsen skor değerlerinin karşılaştırılması

V-TARTIŞMA

Testis torsiyonu özellikle çocukluk çağında sık görülmekle birlikte çocukluk çağının da en önemli akut scrotum nedeni olarak bilinir. Doğru teşhis konulamaz, uygun ve erken tedavi yapılmazsa geri dönüşümsüz testis kaybı meydana gelebilir. (3,57) Tanı geciktiği zaman ve bazende cerrahi müdahaleye rağmen testiste atrofi ve infertilite geliştiği bildirilmiştir. (46, 47) Testis torsiyonunda acil cerrahi girişim halen geçerliliğini koruyan ve en yaygın kullanılan tedavi şeklidir. (170) Testiküler dokunun hasarlanmasında torsiyon/detorsiyon sonucu oluşan iskemi/reperfüzyonun hasarının rol oynadığı gösterilmiştir. (105,167)

Testis torsiyonda ana patoloji testiste ödeme ve ağrıya yol açan venöz tıkanıklıktır. Ancak bu venöz tıkanıklık testisin tunikası elastik olmadığından arteriyel dolaşımı bozarak tıpkı diğer dokularda olduğu gibi testiste de hipoksiye neden olur. Venöz, arteriyel ve kapiller düzeyde oluşan trombüsler testiküler iskemi ve devamında nekroza neden olur. Oluşan doku hasarı torsiyonun süresi ve rotasyon derecesi ile yakından ilişkilidir. Torsiyon süresi 6 saatten kısa süren hastaların büyük çoğunluğunda testis morfolojik olarak normal tespit edilmiş ancak sürenin uzaması halinde testiste kalıcı hasarlanma saptanmıştır. (54,72).

Testis torsiyonunda meydana gelen iskemik hasarın temelinde fazla miktarda üretilen reaktif oksijen metabolitlerine bağlı oksidatif stres ve inflamasyon süreci yer almaktadır. İskemik hasar dönemi olarak adlandırılan bu süreçte testiste meydana gelen hasar öncelikli olarak oksijen desteğinin azalması sonucunda gelişen hipoksiye bağlıdır. İskemiye uğramış dokuların canlılığını koruyabilmesi için en kısa sürede doku reperfüzyonunun sağlanması gerekir. (57) Reperfüzyon gerçekleştiğinde ise nötrofil infiltrasyonu, reaktif oksijen ve nitrojen ürünlerinin oluşması sonucu doku hasarı meydana gelir. (112)

Testis torsiyonu sonrası testiküler hasarın gelişmesinde iskemi ve bunu takiben reperfüzyon sırasında ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri sorumludur. (89) İskemi, dokudaki kan akımının, hücresel fonksiyonları karşılamak için gerekli olan düzeyin altına düşmesi durumudur. (90) İskemik hasarlanmada oksijen yetersizliği sonucu oksidatif fosforilasyon bozularak adenozin trifosfat (ATP), yetersizlik meydana gelir. İskemi sonucunda gereken enerjinin sağlanamaması, hücre membranında bulunan (ATP) bağımlı sodyum/potasyum (Na^+/K^+) pompasının inhibe olmasına neden olur. Bunun sonucunda oluşan iyon dengesizliği akut hücresel şişmeye sebep olur. ATP bağımlı hücre membranında kalsiyum (Ca^{++}) pompasının çalışmaması sonrasında hücre içinde (Ca^{++})' un artması sonucunda

proteolitik enzimler, fosfolipazlar aktive olur ve sitotoksik etki yaparak, proinflamatuvar sitokinlerin ve lökosit adhezyon moleküllerinin yapımı artar. Fosfolipazların aktivasyonu sonucunda oluşan araşidonik asit direkt etki ile mitokondriyal enzimleri inhibe ederek serbest radikal oluşumunu hızlandırır ve bunların sonucunda hücre lizise uğrar. (91, 92, 93)

Reperfüzyonda iskekiye sebep olan etkenin ortadan kaldırılması sonucu iskemik organa kan akımının tekrar sağlanması ile geri dönüşümsüz hasarın önüne geçilip, kaybolan fonksiyonlar geri kazanılabilir. Ancak oluşan serbest oksijen radikallerine ve kandaki aktive edilmiş kan hücrelerine bağlı olarak “reperfüzyon hasarı” oluşur. İskemi sonrasında meydana gelen reperfüzyon, dokuyu iskekiye hasarından daha fazla zarara uğratar. (97,98) İskemik dokunun reperfüzyonunun hücre hasarını arttırmasında birkaç mekanizma vardır. Ortamda bulunan nötrofiller, postkapiller endotele yapışarak vasküler yapılara ve interstisyuma zarar verirler. Ayrıca mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif fosforilasyonun başarısızlığı sonucu mitokondriyal ROS’un üretimi artar, toksit metabolitlerde artış olur. Hücrenin antioksidan savunma sistemleri de iskemiden olumsuz etkilenmiş olabileceğinden, serbest radikallerin birikimi kolaylaşır. (99,100,102) Meydana gelen SOR oluşumu ile mitokondri ve hücre membranında gelişen peroksidasyon sonucunda membran bütünlüğünde ve geçirgenliğinde bozulma, ilerleyen süreçte protein yıkımı ve sonuçta nükleik asit hasarı meydana gelir. (75) İskemi ve sonrasındaki reperfüzyon döneminde oksijen radikallerinin artışı, inflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-6, IL-1 β) üretilmesi, nötrofil infiltrasyonu, membran lipidlerinin serbest radikallerle peroksidasyonu ile oluşan lipid peroksidin hücresel yapılarda hasar oluşturduğu gösterilmiştir. (104,105)

Testis torsiyonu üzerine yapılan deneysel çalışmalarda testisin 720° torsiyonunda kan akımının tam olarak kesildiği ve geri dönüşümsüz şekilde iskekiye meydana geldiği saptanmıştır. (85) Turner ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ratlarda testise 180°, 360°, 720° torsiyon uygulamış ve sonrasında torsiyone testisleri sırası ile 1, 2, 4 saat sonra detorsiyone etmiştir. Sonuç olarak 360° ve 1 saatlik torsiyonun yalnızca akut vasküler değişikliklere yol açtığını, 720° ve dört saatlik torsiyonun ise tam iskekiye ile sonuçlandığını saptamışlardır. Torsiyon sonucu oluşan hasar torsiyonun derecesi yanında süresine de bağlıdır. Yapılan çalışmalarda tam iskekiye süresi olarak 1 saatlik sürenin yeterli olduğu ve 4 saatlik reperfüzyon süresinde membran lipid peroksidasyon ürünlerinin arttığı tespit edilmiştir. (75) Turner ve ark. çalışmalarında testis torsiyonunda 720° torsiyonun bir saat süreyle ratlar üzerinde iskekiye oluşturmak için yeterli olduğunu göstermiştir. (167) Torsiyon ve detorsiyon sürelerinin, torsiyon derecesinin, iskekiye reperfüzyon hasarına etkilerinin araştırıldığı literatür

alışmalarından elde ettiğimiz bilgiler doğrultusunda, yaptığımız çalışmada testislere 1 saatlik 720° torsiyon uygulanmıştır.

Testis torsiyonunda erken müdahale edilerek testisin detorsiyone edilmesi sonrasında reperfüzyonun gelişimiyle oluşan ROS'ların testiste çeşitli hasarlara sebep olabileceği bilinmektedir (4,6). Yapılan çalışmalarda testis torsiyonunda başarılı bir cerrahi girişime rağmen iskemi reperfüzyon hasarında testiküler atrofi ve infertilite geliştiğini bildirilmiştir.(74) Bu yüzden ileride atrofi ve infertilite gibi sorunlara yol açabilecek olan testis torsiyonunda iskemi reperfüzyon hasarını önlemek amacı ile birçok çalışma yapılmıştır. İskemi / reperfüzyon hasarından başlıca prooksidan ve oksidan moleküller sorumlu tutulmuştur. Dokuda artan oksidan moleküller çevreye hızla zarar vermekte, geri dönüşü olmayan hasarlar meydana getirmektedir. Yapılan çalışmalarda iskemi / reperfüzyon hasarını önlemede kullanılmak üzere antioksidan etkileri olan birçok ajan (ozon, melatonin, hesperidin, quercetin, propofol, taurin, ellagic asid, hiperbarik oksijen, vb.) denenmiştir. (171,172) Yapılan çalışmaların uygulama yöntemleri ve tedavi sonrası takip süreleri değişkendir. Ekici ve ark. yaptıkları çalışmada testis iskemi / reperfüzyon hasarında ozonun etkinliği ile melatoninin koruyucu etkilerini kıyaslamıştır. (171) Chi ve ark. yaptıkları çalışmada intraperitoneal ve intraepididimal olarak querceptin molekülünü tedavide kullanmışlar ve reperfüzyon sonrası denekleri 24 saat takip etmişlerdir. (173) Yine Abbasoğlu ve ark yaptıkları çalışmada reperfüzyon öncesi intraperitoneal olarak taurin ve karnozin uygulayıp denekleri 2 saat reperfüzyon sonrası takip sonrasında etkilerini araştırmışlardır. (174) Ancak bu yöntemler içinde henüz rutin kullanıma giren olmamıştır.

Yaptığımız bu çalışmamızda sıçanlarda testis torsiyonu / detorsiyonu deneysel modelinde oluşan iskemi / reperfüzyon hasarının önlenmesinde hidrojen sülfürün koruyucu etkilerini araştırdık.

Hidrojen sülfür (H_2S) renksiz, yanıcı, uçucu, karakteristik çürük yumurta kokusuna sahip suda çözünebilir toksik bir gazdır. Geçmişte tamamen toksik özellikleri nedeniyle bilinen hidrojen sülfürün özellikle kardiyovasküler sistemde vazodilatasyon yapıcı özelliğinin keşfinden sonra, diğer sistemlerde de etkileri incelenmeye başlanmıştır. H_2S memelilerde endojen enzim aracılı ve enzim aracılı olmayan yollar (tiyollerin ve tiyol içeren bileşiklerin indirgenmesi) üzerinden sentezlenir. Hidrojen sülfürün fizyolojik önemi 1996 yılında Abe ve Kimura tarafından yeni bir nöromodülatör olarak adlandırılmasıyla ortaya konmuştur. Hidrojen sülfür, eski dönemlerde tamamen toksik yönden incelenirken, günümüzde fizyolojik etkileri ve

terapotik potansiyeli ortaya konulmuştur. H_2S , nitrit oksit (NO) ve karbonmonoksit (CO) gibi endojen gazotransmitterlerden biridir. Gazotransmitterler; biyolojik membranlardan kolayca difüze olabilen, endojen olarak üretilebilen, fizyolojik konsantrasyonlarında biyolojik yolakları/fonksiyonları etkileyebilen, spesifik hedef moleküllerinin varlığı ile karakterize gazlardır. (124) CO ve NO'ya benzer olarak H_2S de çeşitli enzimler ile endojen olarak sentezlenmekte, kardiyovasküler sistemin düzenlenmesi (Hosoki ve ark. 1997; Elrod ve ark. 2007; Kiss ve ark. 2008; Webb ve ark. 2008), hücre proliferasyonu ve apoptozu (Yang ve ark. 2004; Rinaldi ve ark. 2006; Pyriochou ve ark. 2007; Cai ve ark. 2007), glukoz metabolizması (Ali ve ark. 2007), nörotransmisyon (Abe ve Kimura 1996) ve inflamasyon (Li ve ark. 2006; Hu ve ark. 2007) gibi birçok fizyolojik ve patolojik süreci etkilemektedir. Minamishima ve ark. çalışmasında H_2S donörü NaHS'in kardiyak arrest/resüsitasyonla oluşturulan global iskemi modelinde, e-NOS aracılığıyla nörolojik fonksiyonları iyileştirdiği, nöronal ölüm ve apoptozu azalttığını göstermişlerdir. (175) Tay ve ark.'ın yaptığı vitro çalışmada fizyolojik konsantrasyonda H_2S 'in nöronları hipoksik hasardan koruduğunu göstermişlerdir. (176) Hu ve ark, H_2S 'in lipopolisakkaridle indüklenen nitrik oksid ve TNF α salınımını zayıflatarak, mikrogliya ve astrositleri inflamasyondan koruduğunu göstermişlerdir. (144) . Zhang ve ark. 2009 yılında geçici serebral iskemi reperfüzyonda H_2S 'in apoptozu önleyerek nöronal korunma sağladığını tespit etmişlerdir. (145) Yang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada CSE inhibitörü uygulanması sonrasında sıçan insülinoma hücrelerinde (INS-1E) insülin salınımını arttırdığı H_2S 'in eksojen olarak uygulanmasının ise INS-1E hücrelerinde ve izole fare pankreas adacıklarında glukozla indüklenen insülin salınımını azalttığı gözlenmiştir. (147) Tang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda ise H_2S donörü olan NaHS uygulanması sonrasında ile insülin salınımının düzenlenmesinde kritik rol oynayan bir diğer kanal olan L-tipi voltaj duyarlı Ca^{+2} kanallarının akımlarında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak eksojen ve endojen H_2S 'in L-tipi Ca^{+2} kanal aktivitesini ve pankreastan insülin salınımını inhibe ettiği gösterilmiştir. (148) Kaneko ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise yüksek konsantrasyondaki glukozun pankreatik β -hücrelerinde CSE ekspresyonunu ve H_2S oluşumunu arttırdığı, eksojen H_2S 'in yüksek glukozla indüklenen β -hücre apoptozunu inhibe ettiği ve bu yolla β hücrelerini glukotoksisiteye karşı koruduğu gösterilmiştir. (149) Jiang ve arkadaşlarının sıçanlar üzerindeki yaptığı çalışmada böbrek hasarına karşı sülfür donörü olarak intraperitoneal yoldan NaHS tedavisi uygulanması sonucunda makrofajların infiltrasyonunun ve TNF- α 'nın ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı MDA düzeyinde ve intersitisyel fibrozisde anlamlı azalma ve SOD aktivitesinde artış olduğu gözlenmiştir. Bu çalışma sonucunda NaHS in

dokuları oksidatif stres , lipid peroksidasyonu ve inflamasyona karşı koruduğu gösterilmiştir. (11) Liu ve arkadaşlarının sıçanlar üzerindeki yaptığı çalışmada hidrojen sülfür kaynağı olarak NaHS kullanılarak intestinal iskemi reperfüzyon hasarını önemli derecede azalttığını yapılan histopatolojik incelemelerde ise serum ve bağırsak MDA aktivitesini önemli ölçüde azaltarak serum ve bağırsak SOD ve GSH-Px aktivitesinin düzeylerini önemli ölçüde artırdığını göstermiştir. Bu çalışma sonucunda hidrojen sülfürün intestinal hasara karşı antioksidan enzim aktivitesi gösterdiği ve H₂S'nin bir terapötik ajan olarak potansiyel kullanımını düşündürmüştür. (156) Lİ ve arkadaşlarının neonatal fareler üzerindeki yapılan maternal ayırma sonucunda meydana gelen oksidatif stres , inflamasyona ve epitel hasara karşı hidrojen sülfidin kolonu koruduğu gösterilmiştir. (10) Hidrojen sülfür tedavisiyle ilgili birçok yeni çalışma olup testis torsiyonu tedavisi açısından mevcut literatür verileri incelendiğinde literatürde herhangi bir çalışmaya ve yayına rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasında amacımız testis torsiyon / detorsiyonu modeli oluşturduğumuz sıçanlarda testiste iskemi / reperfüzyonuna bağlı oluşan hasarın önlenmesinde hidrojen sülfür (H₂S) tedavisinin bu hasara etkisinin biyokimyasal ve histopatolojik parametreler kullanarak araştırılmasıdır.

Yapılan çalışmalardan yola çıkarak H₂S donörü olarak NaHS çözeltisi kullanılarak sadece I/R + NaHS tedavi grubundaki sıçanlara reperfüzyon öncesi 30 dk intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Testis torsiyon / detorsiyon sonucu oluşan iskemi / reperfüzyon hasarını önlemede H₂S'in etkilerini tespit edebilmek için biyokimyasal ve histopatolojik (hem doku hem de serumda) parametreleri birlikte değerlendirdik.

İskemi / reperfüzyon hasarını değerlendirmek için biyokimyasal olarak serumda ve testis dokusunda TNF- α , testis dokusunda oksidan göstergeler için Malondialdehit (MDA), ileri oksidasyon protein ürünleri (advanced oxidation protein product: AOPP), Miyelperoksidaz (MPO) düzeylerine, antioksidan göstergeler için ise Glutasyon(GSH) , (ferric reducing antioxidant power: FRAP) , Süperoksit dismutaz (SOD) ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitelerine bakıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak verildi. Grup dağılımları Levene's testi kullanılarak değerlendirildi. Normal dağılım gösteren parametreler için tek yönlü ANOVA (post hoc Tukey HSD), nonhomojen dağılım gösteren parametreler için ise Kruskal-Wallis (post hoc Mann-Whitney U) testi kullanıldı.

MDA, AOPP, ve MPO doku peroksidasyonunun önemli bir belirteçleri olup iskemi reperfüzyon hasarında meydana gelirler. (177) Miyelperoksidaz (MPO) aktivitesinin iskemi / reperfüzyon grubundaki sıçanların testis dokusunda sham grubuna göre istatistiksel olarak

anlamli artişlar gösterdiği ve I/R+NaHS grubunda intraperitoneal hidrojen sülfür uygulaması ile artmış olan MPO aktivitesi düzeylerinde anlamli bir azalma olduğu saptandı. ($p<0,05$).Yine aynı şekilde ileri oksidasyon protein ürünü (AOPP) aktivitesinin iskemi / reperfüzyon grubundaki sıçanların testis dokusunda sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamli artişlar gösterdiği ve I/R+NaHS grubunda hidrojen sülfür uygulaması ile artmış olan AOPP aktivitesi düzeylerinde ise anlamli bir azalma olduğu saptandı. ($p<0,05$) Malondialdehit(MDA) düzeylerine bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamli bir değişiklik göstermediği saptandı. ($p>0,05$) . Bu sonuçtan yola çıkarak başarılı bir iskemi/reperfüzyon modeli oluşturduğumuzu söyleyebiliriz.

Hücre içindeki O_2^- düzeylerini azaltmak amacıyla iskemi reperfüzyon hasarı sonucunda oluşan oksidan stres ile mücadele amacıyla oluşan GSH , FRAP ,SOD ve GSH-Px aktiviteleri artar. (178,179) Antioksidan kapasiteyi değerlendirmek amacı bakılan parametelerden Glutasyon (GSH) düzeylerinin iskemi/reperfüzyon grubundaki sıçanların testis dokusunda sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamli bir azalma gösterdiği ve I/R+NaHS grubunda ise hidrojen sülfür uygulaması ile GSH düzeylerinde anlamli bir artış gösterdiği saptandı. ($p<0,05$) Buna karşılık Süperoksit dismutaz (SOD) , Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve FRAP aktivitelerinde istatistiksel olarak herhangi bir değişiklik görülmedi.

Serum ve testis dokusunda inflamasyon göstergesi olan $TNF-\alpha$ düzeylerine bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamli bir değişiklik göstermediği saptandı. ($p>0,05$)

MPO ,AOPP düzeylerinin azalması, GHS değerlerine bakarak antioksidan aktivitenin artışının olmasının hidrojen sülfür tedavisinin etkili olduğunu söyleyebiliriz.

Değerlendirdiğimiz son kriter olan histopatolojik incelemede tüm gruplardaki testiküler dokular, stromal hücrelerin ve germinal hücrelerin mikroskopik olarak dizilişleri, tübül yapısı ve bütünlüğü dikkate alınarak yapıldı ve değerlendirme için ortalama Modifiye Johnsen Skorlaması kullanıldı. Johnsen testisküler biyopsi skorlaması kullanılarak morfolojik hasar ve testiküler hasar durumu değerlendirildi .(157,158,180) Johnsen skoru için her bir sıçandan alınan testis dokusu örneklerinin H&E ile boyanmış kesitlerinde, seminifer tübüllerde yer alan spermatogenik hücrelerin görünimleri değerlendirilerek her bir seminifer tübül için her bir her bir tübüle 1 ile 10 arasında bir skor verildi. Sonuçlar elde edildikten sonra grup ortalamaları alındı ve istatistiksel olarak gruplar arasında karşılaştırma yapıldı. Yapılan mikroskopik incelemede sham grubunda normal spermatogenez gösteren seminifer tubulusların olduğu

iskemi/reperfüzyon grubunda seminifer tübül yapılarının ve spermatogenik hücrelerin düzeninin bozulduğu, tübül içerisinde çok çekirdekli granülasyon hücrelerinin gözlemlendiği, bazı seminifer tübülüslerde spermatogenik hücrelerin bulunmadığı, iskemi/reperfüzyon +NaHS ise seminifer tubuluslarda spermatosit ve spermatozoa düzeyine ulaşan maturasyon gösteren germ hücreleri saptandı. Johnsen skorlamasına göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu .($p<0.05$) Farklılığın tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda sham grubunun değerleri ile iskemi reperfüzyon grubu arasında yapılan değerlendirme sonrasında sham grubunun değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptandı. ($p<0.05$) Iskemi/ reperfüzyon grubunun değerleri ile I/R+NaHS grubunu değerlerinin karşılaştırılması sonrasında iskemi /reperfüzyon grubu değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu saptandı .($p<0.05$). Sham grubu ve I/R+NaHS grubu arasında ise Johnsen skoru değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı. ($p>0.05$)

Bu değerlendirme sonucunda torsiyon sonrası bir saat sonrasında detorsiyon uygulanan testiste histopatolojik açıdan hasarlanmasının olduğunu söyleyebiliriz ve histopatolojik değerlendirme sonuçlarına göre torsiyon grubundaki değişikliklerin tedavi ve kontrol grubunda Johnsen skoruna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olduğu saptandı. Kontrol ve tedavi grubunda ise Johnsen skorunun tedavi grubunun minimal düşük olmasına rağmen yakın değerleri olduğu istatistiksel olarak saptandı.

Çalışmamız testis torsiyon/detorsiyon sürecinde iskemi/ reperfüzyon hasarının önemli rol oynadığını desteklemektedir ve bu hasarda H_2S 'in terapötik etki potansiyeli olabileceğini gösteren öncü çalışma niteliği taşımaktadır. Bu çalışmadan elde edilen bulguların daha geniş çalışmalarla, farklı zaman aralıkları kullanarak farklı dozda uygulamalarla ve deneylerle desteklenmesi gereklidir.

VI-SONUÇ

Bu tez çalışmasının amacı testis torsiyon/detorsiyonu modeli oluşturduğumuz sıçanlarda testisin iskemi/reperfüzyonuna bağlı oluşan hasarın önlenmesinde hidrojen sülfür (H_2S) etkisini biyokimyasal ve histopatolojik parametreler kullanarak araştırılmasıdır.

İskemi/reperfüzyon hasarını değerlendirmek için biyokimyasal olarak serumda ve testis dokusunda $TNF-\alpha$, testis dokusunda oksidan göstergeler için Malondialdehit (MDA), ileri oksidasyon protein ürünleri (advanced oxidation protein product: AOPP), Miyelperoksidaz (MPO) düzeylerine, antioksidan göstergeler için ise Glutasyon (GSH), (ferric reducing antioxidant power: FRAP), Süperoksit dismutaz (SOD) ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitelerine bakıldı.

Serum ve testis dokusu $TNF-\alpha$ düzeylerinin gruplar arasında anlamlı bir değişiklik göstermediği saptandı. ($p>0,05$) Miyelperoksidaz (MPO) aktivitesinin iskemi/reperfüzyon grubundaki sıçanların testis dokusunda sham grubuna göre anlamlı artışlar gösterdiği ve I/R+NaHS grubunda hidrojen sülfür uygulaması ile artmış olan MPO aktivitesi düzeylerinde anlamlı bir azalma olduğu saptandı. ($p<0,05$). Yine aynı şekilde ileri oksidasyon protein ürünü (AOPP) aktivitesinin iskemi/reperfüzyon grubundaki sıçanların testis dokusunda sham grubuna göre anlamlı artışlar gösterdiği ve I/R+NaHS grubunda hidrojen sülfür uygulaması ile artmış olan AOPP aktivitesi düzeylerinde anlamlı bir azalma olduğu saptandı. ($p<0,05$) Malondialdehit(MDA) düzeylerine bakıldığında gruplar arasında anlamlı bir değişiklik göstermediği görüldü. ($p>0,05$) Glutasyon (GSH) düzeylerinin iskemi/reperfüzyon grubundaki sıçanların testis dokusunda sham grubuna göre anlamlı bir azalma gösterdiği ve I/R+NaHS grubunda ise hidrojen sülfür uygulaması ile GSH düzeylerinde anlamlı bir artış gösterdiği saptandı. ($p<0,05$) Buna karşılık Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve FRAP aktivitelerinde herhangi bir değişiklik görülmedi.

Histopatolojik incelemede ise modifiye Johnsen skorlaması kullanılarak bu skora göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu. ($p<0,05$) Farklılığın tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; sham grubunun değerleri ile iskemi reperfüzyon grubu arasında yapılan değerlendirme sonrasında sham grubunun değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptandı. ($p<0,05$) Iskemi/ reperfüzyon grubunun değerleri ile I/R+NaHS grubunu değerlerinin karşılaştırılması sonrasında iskemi/ reperfüzyon grubu değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu saptandı. ($p<0,05$) Sham grubu

ve I/R+NaHS grubu arasında ise Johnsen skoru değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı. ($p>0.05$)

Deneysel alışmamızda biyokimyasal verileri elde ederken serum ve dokuda eř zamanlı olarak değerlendirilmeye çalışılmıştır. Çalışmamızın sonuçlarına göre hidrojen sülfür tedavisinin biyokimyasal ve histopatolojik olarak yararlı etkilerinin olduğu gösterilmiştir.

Testis torsiyonunda hidrojen sülfürün torsiyon/detorsiyon sonucu oluşan iskemi/reperfüzyon hasarını önlemede etkili olduğunu saptadık. Hidrojen sülfür tedavisiyle ilgili birçok yeni çalışma olup testis torsiyonu tedavisi açısından mevcut literatür verileri incelendiğinde literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamış olup, literatürde bu konuyla ilgili ilk çalışma olduğundan saptadığımız bulguların daha geniş kapsamlı deneysel çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Rowe, M. I., O'Neill, J. A., Grosfeld, J. L., Fonkalsrud, E. W., Coran, A. G. (1995). *Essentials Of Pediatric Surgery*. St. Louis. Mosbyyear Book. Inc. 1: 446-61.
2. Saba, M., Morales, C. R., De Lamirande, E., Gagnon, C. (1997). Morphological And Biochemical Changes Following Acute Unilateral Testicular Torsion İn Prepubertal Rats. *The Journal Of Urology*. 157(3): 1149- 1154.
3. Dorin, R. P. (2010). Glenn's Urologic Surgery. *Jama*. 303(21): 2192- 2196.
4. Becker, E. J., Turner, T. (1995). Endocrine And Exocrine Effects Of Testicular Torsion İn The Prepubertal And Adult Rat. *Journal Of Andrology*. 16(4): 342-351.
5. Turner, T. T., Lysiak, J. (2008). Oxidative Stress: A Common Factor İn Testicular Dysfunction. *Journal Of Andrology*. 29(5): 488-498
6. Cuzzocrea, S., Riley, D. P., Caputi, A. P., Salvemini, D. (2001). Antioxidant Therapy: A New Pharmacological Approach İn Shock, İnflammation, And İschemia/Reperfusion İnjury. *Pharmacological Reviews*. 53(1): 135-159.
7. Göral S, Ercan S, Sarioğlu Y, Öztürk S(2012). İzole Tavşan Mide Fundusunda Hidrojen Sülfürün Endojen Mediyatörlerle Etkileşiminin Araştırılması. Doktora Tezi . Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
8. Citi V, Piragine E, Testai L, Breschi Mc, Calderone V, Martelli A., (2018) The Role Of Hydrogen Sulfide And H₂S-Donors İn Myocardial Protection Against İschemia/Reperfusion İnjury. *Curr Med Chem*. 2018 Feb 12. Doi: 10.217
9. Nakayama Shin, Taguchi Noriko, And Tanaka Makoto (2018). The Role Of Cranial Temperature İn Neuroprotection By Sodium Hydrogen Sulfide After Cardiac Arrest İn Mice. *Ther Hypothermia Temp Manag*. 2018 Feb 12. Doi: 10.1089
10. Li, B, Lee, C., Martin, Z., Li, X., Koike, Y., Hock, A Pierro, A. (2017). Intestinal Epithelial İnjury İnduced By Maternal Separation İs Protected By Hydrogen Sulfide. *Journal Of Pediatric Surgery*, 52(1), 40–44. Doi:10.1016/J.jpedsurg.2016.10.013
11. Jiang, D., Zhang, Y., Yang, M., Wang, S., Jiang, Z., & Li, Z. (2013). Exogenous Hydrogen Sulfide Prevents Kidney Damage Following Unilateral Ureteral Obstruction. *Neurourology And Urodynamics*, 33(5), 538–543. Doi:10.1002/Nau.22450
12. Drucker Na, Jensen Ar, Ferkowicz M, Markel Ta. (2017) Hydrogen Sulfide Provides İntestinal Protection During A Murine Model Of Experimental Necrotizing Enterocolitis. *J Pediatr Surg*. 2017 Dec 24. Pii: S0022-3468(17)30827-8. Doi: 10.1016/J.jpedsurg.2017.12.003.
13. Sadler, T. W. (2005). *Langman Medikal Embriyoloji*, (Çev.: Başaklar, Ac), 9. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara.

14. Şeftalioğlu A. Genel Ve Özel İnsan Embriyolojisi. 3. Baskı. Ankara: Feryal Matbaası 1998: 346–50.
15. Moore, K.L., Dalley, A.F., 2002, Kliniğe Yönelik Anatomi, (Çev.:Şahinoğlu K), 6. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara.
16. Wilhelm, D., Koopman, P. (2006). The Makings Of Maleness: Towards An Integrated View Of Male Sexual Development. *Nature Reviews Genetics*. 7(8): 620-631.
17. Jones, R. E., Lopez, K. H. (2013). *Human Reproductive Biology*. Academic Press.
18. Hutson Jm, Baker Ml. A Hypothesis To Explain Abnormal Gonadal Descent İn Persistent Müllerian Duct Syndrome. *Pediatr Sugery Int* 1994;9:542-543.
19. Zimmermann S, Steding G, Emmen Jm, Brinkmann Ao, Nayernia K, Holstein Af, Engel W, Adham Im (1999). Targeted Disruption Of The Insl3 Gene Causes Bilateral Cryptorchidism. *Mol Endocrinol*. 13:681-691.
20. Hutson Jm. O’neill Ja Rm, Grosfeld, JI Fe, Coran Ag *Pediatric Surgery*. 5th Baskı. St. Louis, Mosby-Year Book Inc, 1998.
21. Hutson Jm, Chow Cw, Ng Wd. Persistent Müllerian Duct Syndrome With Transverse Testicular Extopia. An Experiment Of Nature With Clues For Understanding Testicular Descent. *Pediatr Surgery Int* 1987;2:191-193.
22. Hutson Jm. Testicular Feminization. A Model For Testicular Descent İn Mice And Man. *J Pediatr Surgery* 1986;21:195-198.
23. Hughes Ia, Acerini Cl (2008). Factors Controlling Testis Descent. *Eur J Endocrinol*. 159:75-82.
24. Van Der Schoot P, Elger W. (1992). Androgen-İnduced Prevention Of The Outgrowth Of Cranial Gonadal Suspensory Ligaments İn Fetal Rats. *J Androl*. 13:534-542
25. Fiegel Hc, Rolle U, Metzger R, Geyer C, Till H, Kluth D (2010). The Testicular Descent İn The Rat: A Scanning Electron Microscopic Study. *Pediatr Surg Int*. 26:643-647
26. Hutson Jm, Albano Fr, Paxton G, Sugita Y, Connor R, Clarnette Td, Gray Az, Watts Lm, Farmer Pj, Hasthorpe S (2000). In Vitro Fusion Of Human İnguinal Hernia With Associated Epithelial Transformation. *Cells Tissues Organs*. 166:249-258.
27. Brooks Jd. In Walsh Pc Ra, Vaughan Ed, Jr, Wein Aj (Eds). *Campbell’S Urology*. 8. Baskı. Philadelphia:, Wb Saunders, 2002.
28. Schlegel Pn Hmıwp, Retik Ab, Vaughan Ed, Jr, Wein Aj *Campbell’S Urology*. 8. Baskı. Philadelphia, Wb Saunders, 2002..
29. Lennox B, Ahmad Kn. Total Length Of Tubules İn Human Testis. *Journal Of Anatomy*, 1970, 107: 191.
30. Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N: Ürogenital Organların Anatomik Ve Histolojik Yapısı İçinde: Temel Üroloji (Eds Anafarta K), Ankara, Güneş Kitabevi, 2007; 16- 17

31. Kuran O (Editör) (1983). Sistematik Anatomi. 1.Baskı. İstanbul: Filiz Kitabevi; 512-514.
32. Junqueira, L. C., Carneiro, J. (2005). Basic Histology Text And Atlas. London: Mcgraw Hill.
33. Kierszenbaum, A. L., Demir, R. (2006). Histoloji Ve Hücrebiyolojisi: Patolojiye Giriş. Palme Yayıncılık.
34. Janqueria Lc, Carneiro J, Kelley Or. (1998). Temel Histoloji (Çev: Aytekin Y,Solakoğlu S, Ahışhalı B), Barış Kitabevi. 407–422.
35. . Schoenwolf, G. C., Bleyl, S. B., Brauer, P. R., Franciswest, P. H. (2014). Larsen's Human Embryology E-Book. Elsevier Health Sciences.
36. Neas J.F. The Cell, Embriyoloji Atlas 2010, Bölüm 2
37. Kayalı H. Özel Histoloji. İstanbul Üniversitesi Film Merkezi, 1989,218- 228.
38. Fowler R, Stephens Fd (1959). The Role Of Testicular Vascular Anatomy In The Salvage Of High Undescended Testes. Aust N Z J Surg. 29:92-106.
39. Jarow Jp: Intratesticular Arterial Anatomy. J Androl 1990; 11 (3): 255-259.
40. Shafik A, Moftah A, Olfat S, Et. Al: Testicular Veins: Anatomy And Role In Varicocelogenesis And Other Pathologic Conditions. Urology 1990; 35(2): 175-82.
41. Harrison Rg (1949). The Comparative Anatomy Of The Blood Supply Of The Mammalian Testis. Proc Zool Soc London. 119:325-344
42. Chehval, M. J., Purcell, M. H. (1992). Deterioration Of Semen Parameters Over Time In Men With Untreated Varicocele: Evidence Of Progressive Testicular Damage. Fertility And Sterility. 57(1): 174-177.
43. Snell Rs (Eds) (1986). Clinical Anatomy. 3rd Ed. Boston: Brown And Company. 168-175.
44. Rauchenwald M. Steers Wd, Desjardins C: Efferent İnervation Of The Rat Testis. Biol Reprod 1995;52:1136-1143.
45. Skandalakis, J. E., Skandalakis, L. J., Colborn, G. L. (1996). Testicular Atrophy And Neuropathy İn Herniorrhaphy. The American Surgeon, 62(9): 775-782.
46. Rowe, M. I., O'neill, J. A., Grosfeld, J. L., Fonkalsrud, E. W., Coran, A. G. (1995). Essentials Of Pediatric Surgery. St. Louis. Mosbyyear Book. Inc. 1: 446-61.
47. Saba, M., Morales, C. R., De Lamirande, E., Gagnon, C. (1997). Morphological And Biochemical Changes Following Acute Unilateral Testicular Torsion İn Prepubertal Rats. The Journal Of Urology. 157(3): 1149- 1154.
48. Williamson, R. C. N. (1976). Torsion Of The Testis And Allied Conditions. British Journal Of Surgery. 63(6): 465-476.

49. Barada, J. H., Weingarten, J. L., Cromie, W. J. (1989). Testicular Salvage And Age-Related Delay In The Presentation Of Testicular Torsion. *The Journal Of Urology*. 142(3):746-748.
50. Bartsch G, Frank S, Marberger H, Mikuz G. (1980). Testicular Torsion: Late Results With Special To Fertility And Endocrine Function. *J Urol*. 124: 375-378
51. Melekos M, Asbach H, Markou S. (1988). Etiology Of The Acute Scrotum With Regard Todistribution. *J Urol*. 139: 1023
52. Cuckov Pm And Frank Jd. (2000). Torsion Of The Testis. *Bju. International*. 86:349-353
53. Leape Ll: Testicular Torsion.: *Pediatric Urology* (Eds Ashcraft Kw). Philadelphia, W.B.Saunders, 1990; 1556-1558
54. Murphy Jp (Eds) (2003). *The Acute Scrotum*. 1st Ed. New York:Mcgraw-Hill Companies. 563-567
55. Tjioe, D. Y., Steinberger, E. (1970). A Quantitative Study Of The Effect Of İschæmia On The Germinal Epithelium Of Rat Testes. *Journal Of Reproduction And Fertility*. 21(3): 489-494.
56. Turner Tt, Brown Kj (1993). Spermatoc Cord Torsion: Loss Of Spermatogenesis Despite Return Of Blood Flow. *Biol Reprod*. 49:401–407.
57. Yagmurdu, H., Ayyildiz, A., Karaguzel, E., Ogus, E., Surer, H., Caydere, Germyanoglu, C. (2006). The Preventive Effects Of Thiopental And Propofol On Testicular İschæmia-Reperfusion İnjury. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. 50(10): 1238-1243.
58. Sevik, M., Danisman, A., Bircan, K., Şahin, H. (2007). Ürogenital Sistem Hastalıklarında Semptomatoloji Ve Klinik Muayene. İn: Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N Editör. *Temel Üroloji*. Üçüncü Baskı. Ankara: Öncü Basımevi. S:56.
59. Hutson Jm (Eds) (1998). Undescended Testis, Torsion And Varicocele, *Pediatric Surgery*. Vol 2, 5th Ed. St. Louis: Mosby-Year Book Inc. 1099-1101
60. Caesar, R. E., Kaplan, G. W. (1994). Incidence Of The Bell-Clapper Deformityin An Autopsy Series. *Urology*. 44(1): 114-116
61. Pentyala S, Lee J, Yalamanchili P, Et. Al: Testicular Torsion: A Review. *J Low Urin Tract Dis* 2001; 5(1): 38-47.
62. Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N: Ürogenital Sistemin Acil Yaklaşım Gerektiren Hastalıkları İçinde: *Temel Üroloji* (Eds Anafarta K), Ankara, Güneş Kitabevi, 2007; 960-961.
63. Baydınç, C. (1998). Ürogenital Organların Anatomik Ve Histolojik Yapısı; *Temel Üroloji*. Güneş Kitabevi Ltd Şti, Ankara.
64. Tanagho E, W.Mcaninch J (2000). In *The Disorders Of The Testes, Scrotum And Spermatoc Cord: Smith's General Urology*. (Eds Foltin J, Lebowitz H, Roche J). Usa, Lange Medical Books/Mcgraw-Hill Companies; 687

65. Ciftci, A. O., Şenocak, M. E., Tanyel, F. C., Büyükpamukçu, N. (2004). Clinical Predictors For Differential Diagnosis Of Acute Scrotum. *European Journal Of Pediatric Surgery*. 14(05): 333-338.
66. Noseworthy J. Testikular Torsion. In: Ashcraft Kw, Holder Tm (Eds). *Pediatric Surgery*. 2. Ed. W.B. Saunders, Philadelphia 1993, Pp 595-601
67. Rabinowitz, R. (1984). The Importance Of The Cremasteric Reflex İn Acute Scrotal Swelling İn Children. *The Journal Of Urology*. 132(1): 89-90.
68. Karmazyn, B., Steinberg, R., Kornreich, L., Freud, E., Grozovski, S., Schwarz, M., Livne, P. (2005). Clinical And Sonographic Criteria Of Acute Scrotum İn Children: A Retrospective Study Of 172 Boys. *Pediatric Radiology*. 35(3): 302-310.
69. Fonkalsrud Ew. Testicular Undescent And Torsion. *Pediatr Clin North Am*1987;34(5):1305-17
70. Bourne, H. H., Lee, R. E. (1975). Torsion Of Spermatic Cord And Testicular Appendages. *Urology*. 5(1): 73-75.
71. Stillwell, T. J., Kramer, S. A. (1986). Intermittent Testicular Torsion. *Pediatrics*. 77(6): 908-911.
72. Noske, H. D., Kraus, S. W., Altinkilic, B. M., Weidner, W. (1998). Historical Milestones Regarding Torsion Of The Scrotal Organs. *The Journal Of Urology*. 159(1): 13-16.
73. Williamson Rcn, Thomas We (1984). Sympathetic Orchidopathia . *Ann R Coll Surg Engl*. 66:264-266
74. Krarup, T. (1978). The Testes After Torsion. *Bju International*. 50(1): 43- 46.
75. Makgür, F., Kiliç, K., Tanyel, E. C., Büyükpamukcu, N. (1994). Ipsilateral And Contralateral Testicular Biochemical Acute Changes After Unilateral Testicular Torsion And Detorsion. *Urology*. 44(3): 413-418.
76. Melloul M, Paz A, Lask D: The Value Of Radionuclide Scrotal İmaging İn The Diagnosis Of Acute Testicular Torsion. *Br J Urol* 1995; 72: 628-631.
77. Mernagh, J. R., Caco, C., De Maria, J. (2004). Testicular Torsion Revisited. *Current Problems İn Diagnostic Radiology*. 33(2): 60-73.
78. Baker, L. A., Sigman, D., Mathews, R. I., Benson, J., Docimo, S. G. (2000). An Analysis Of Clinical Outcomes Using Color Doppler Testicular Ultrasound For Testicular Torsion. *Pediatrics*. 105(3): 604-607.
79. Wu Hc, Sun Ss, Kao A, Chuang Fj, Lin Cc, Lee Cc (2002). Comparison Of Radionuclide İmaging And Ultrasonography İn The Differentiation Of Acut Testicular Torsion And İnflammatory Testicular Disease. *Clin Nucl Med*. 27: 490–493.
80. Paltiel, H. J., Connolly, L. P., Atala, A., Paltiel, A. D., Zurakowski, D., Treves, S. T. (1998). Acute Scrotal Symptoms İn Boys With An İndeterminate Clinical Presentation:

- Comparison Of Color Doppler Sonography And Scintigraphy. *Radiology*. 207(1): 223-231.
81. Blask, A. R. N., Rushton, H. G. (2006). Sonographic Appearance Of The Epididymis In Pediatric Testicular Torsion. *American Journal Of Roentgenology*. 187(6): 1627-1635.
 82. Johnston B1, Wiener Js (2005). Intermittent Testicular Torsion. *Bju Int*. 95: 933– 934.
 83. Keislinger Vj, Schroder De, Paulijev P, Hull J: Spermatic Cord Bloc And Manual Reduction: Primary Treatment For Spermatic Cord Torsion. *J Urol* 1984; 132: 921- 923.
 84. Anderson, J. B., Williamson, R. C. N. (1988). Testicular Torsion In Bristol: A 25-Year Review. *British Journal Of Surgery*. 75(10): 988-992.
 85. Hutson Jm: Undescended Testis, Torsion, And Varicocele.(Eds O’neill Ja, Rowe M1, Grosfeld J1, Fonkalsrud Ew, Coran Ag). *Pediatric Surgery Volume Two*. 5th Ed, London, Mosby-Year Book Inc 1998; 1099-1101
 86. .Bellinger, M. F., Abromowitz, H., Brantley, S., Marshall, G. (1989). Orchiopexy: An Experimental Study Of The Effect Of Surgical Technique On Testicular Histology. *The Journal Of Urology*. 142(2): 553-555.
 87. Visser, A. J., Heyns, C. F. (2003). Testicular Function After Torsion Of The Spermatic Cord. *Bju International*. 92(3): 200-203
 88. Baker, L. A., Turner, T. T. (1995). Leydig Cell Function After Experimental Testicular Torsion Despite Loss Of Spermatogenesis. *Journal Of Andrology*. 16(1): 12-17.
 89. Prillaman Hm, Turner Tt. Rescue Of Testicular Function After Acute Experimental Torsion. *J Urol*. 1997; 157(1): 340–5
 90. Langer Jc, Sohal Ss, Blennerhasselt P. Mucosal Permeability After Subclinical Intestinal Ischemia/Reperfusion Injury: An Exploration Of Possible Mechanisms. *J Pediatr Surg*. 1995; 30(4): 568–72.
 91. Kumar, V., Abbas, A. K., Aster, J. C. (2013). *Robbins Basic Pathology*. St Louis: Elsevier.
 92. Moens Al, Claeys Mj, Timmermans Jp, Vrints Cj (2005). Myocardial Ischemia/Reperfusion-Injury, A Clinical View On A Complex Pathophysiological Process. *Int J Cardiol* 100: 179-190
 93. Flitter Wd (1993). Free Radicals And Myocardial Reperfusion Injury. *Free Radical In Medicine*: 545-555
 94. Reilly, P. M., Schiller, H. J., Bulkley, G. B. (1991). Pharmacologic Approach To Tissue Injury Mediated By Free Radicals And Other Reactive Oxygen Metabolites. *The American Journal Of Surgery*. 161(4): 488-503.
 95. Şener G, Yeğen Bç (2009). İskemi-Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi* 22: 5-13.

96. Granger Dn, Rutili G, Mc Cord Jm (1981). Superoxide Radicals In Feline İntestinal İschemia. *Gastroenterology*. 81:22-29.
97. Siemionow M, Arslan E (2004). Ischemia/Reperfusion Injury: A Review In Relation To Free Tissue Transfers. *Microsurgery* 24: 468-475.
98. Lysiak, J. J., Nguyen, Q. A. T., Turner, T. T. (2002). Peptide And Nonpeptide Reactive Oxygen Scavengers Provide Partial Rescue Of The Testis After Torsion. *Journal Of Andrology*. 23(3): 400-409.
99. Mitchell Rn Cr. Temel Patoloji 6. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi 2000
100. Zamboni, W. A., Roth, A. C., Russell, R. C., Graham, B., Suchy, H., Kucan, J. O. (1993). Morphologic Analysis Of The Microcirculation During Reperfusion Of İschemic Skeletal Muscle And The Effect Of Hyperbaric Oxygen. *Plastic And Reconstructive Surgery*. 91(6): 1110-1123
101. Villegas J, Schulz M, Soto L, Iglesias T, Miska W, Sanchez R (2005). Influence Of Reactive Oxygen Species Produced By Activated Leukocytes At The Level Of Apoptosis In Mature Human Spermatozoa. *Fertil Steril* 83: 808 – 810.
102. Tentori L, Portarena I, Graziani G. Potential Clinical Applications Of Poly (Adp-ribose) Polymerase (Parp) İnhibitors. *Pharmacol Res* 45: 73, 2002
103. Szabo C, Dawson Vl. Role Of Poly (Adp-Ribose) Synthetase İn Inflammation And İschemia-Reperfusion. *Trends Pharmacol Sci* 19: 287, 1998
104. Cuzzocrea S, Riley Dp, Caputi Ap, Salvemini D. Antioxidant Therapy: A New Pharmacological Approach İn Shock, İnflammation, And İschemia/Reperfusion Injury. *Pharmacol Rev* 2001;53: 135-59
105. Turner Tt, Bang Hj, Lysiak Jl. The Molecular Pathology of Experimental Testicular torsion Suggests Adjunct Therapy To Surgical Repair 2004 *J Urol* 172:2574–2578.
106. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin Mt, Mazur M, Telser J (2007). Free Radicals And Antioxidants İn Normal Physiological Functions And Human Disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44 – 84.
107. Akkuş İ (Editör) (1995). Serbest Radikaller Ve Fiziopatolojik Etkileri. 1. Baskı. Konya: Mimoza Yayınları; 3-24
108. Bachschmid, M., Schildknecht, S., Ullrich, V. (2005). Redox Regulation Of Vascular Prostanoid Synthesis By The Nitric Oxide-Superoxide System. *Biochemical And Biophysical Research Communications*. 338(1): 536-542.
109. Yu, B. P. (1994). Cellular Defenses Against Damage From Reactive Oxygen Species. *Physiological Reviews*. 74(1): 139-163
110. Kruszewski, M. (2003). Labile İron Pool: The Main Determinant Of Cellular Response To Oxidative Stress. *Mutation Research/Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis*. 531(1): 81-92

111. Filho Dw, Moacir A. Torres, Andre L.B. Bordin, Tania B. Crezcynskipasa,Alberto Boveris. Spermatic Cord Torsion, Reactive Oxygen And Nitrogen Species And Ischemia Reperfusion Injury. *Molecular Aspects Of Medicine* 25 (2004) 199–210.
112. Shiraishi K, Naito K, Yoshida K. (2001). Nitric Oxide Promotes Germ Cell Necrosis In The Delayed Phase After Experimental Testicular Torsion Of Rat. *Biology Of Reproduction*. 65(2): 514-521.
113. Dimmeler, S., Zeiher, A. M. (1999). Nitric Oxide—An Endothelial Cell Survival Factor. *Cell Death & Differentiation*. 6(10)
114. Okusa Md, Linden J, Macdonald T, Huang L. Selective A2a Adenosine Receptor Activation Reduces Ischemia-Reperfusion Injury In Rat Kidney. *The American Journal Of Physiology*, 1999, 277: F404-412
115. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra Lh, Lentsch Ab Et. Al: Ischemia/Reperfusion Injury. *J Surg Res* 2002; 105: 248-258.
116. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra Lh, Lentsch Ab Et. Al: Ischemia/Reperfusion Injury. *J Surg Res* 2002; 105: 248-258
117. Granger Dn, Korthuis Rj (1995). Physiologic Mechanisms Of Postischemic Tissue Injury. *Annu Rev Physiol*. 57: 311-332
118. Rangan U, Bulkley Gb (1993). Prospects For Treatment Of Free Radical-Mediated Tissue Injury. *Br Med Bull*. 49:700-718
119. Reiter Rj. Oxidative Processes And Antioxidative Defense Mechanisms In The Aging Brain. *Faseb Journal: Official Publication Of The Federation Of American Societiesfor Experimental Biology*, 1995, 9: 526-533.
120. Rangan, U., Bulkley, G. B. (1993). Prospects For Treatment Of Free Radical-Mediated Tissue Injury. *British Medical Bulletin*. 49(3): 700-718.
121. Mccord, J. M., Edeas, M. A. (2005). Sod, Oxidative Stress And Human Pathologies: A Brief History And A Future Vision. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 59(4): 139-142.
122. Aitken Rj, Roman Sd (2008). ,Antioxidant Systems And Oxidative Stress In The Testes. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity* 1: 15-24
123. Abe, K. Ve Kimura, H. (1996) The Possible Role Of Hydrogen Sulfide As An Endogenous Neuromodulator. *The Journal Of Neuroscience*, 16, 1066-1071
124. Wang, R. U. I. (2002). Two's Company, Three's A Crowd: Can H₂s Be The Third Endogenous Gaseous Transmitter?. *The Faseb Journal*, 16, 1792-1798.
125. Chen K, And Morris J. (1972). Kinetics Of Oxidation Of Aqueous Sulfide By Oxygen. . *Environmental Science & Technology* 6: 529–537
126. Liu, Y. H., Lu, M., Hu, L. F., Wong, P. T. H., Webb, G. D. Ve Bian, J. S. (2012). Hydrogen Sulfide In The Mammalian Cardiovascular System. *Antioxidants & Redox Signaling*, 17, 141-185.

127. Ishigami, M., Hiraki, K., Umemura, K., Ogasawara, Y., Ishii, K. Ve Kimura, H. (2009). A Source Of Hydrogen Sulfide And A Mechanism Of Its Release In The Brain. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11, 205-214.
128. Li, L., Rose, P., Moore, P.K. (2011) Hydrogen Sulfide And Cell Signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 51, 169-187.
129. Searcy Dg, And Lee Sh. (1998). Sulfur Reduction By Human Erythrocytes. *J Exp Zool* 282: 310-322
130. Skovgaard, N., Goulliaev, A., Aalling, M., Ve Simonsen, U. (2011). The Role Of Endogenous H₂s In Cardiovascular Physiology. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(9), 1385-1393.
131. Shibuya, N. Ve Kimura, H. (2013). Production Of Hydrogen Sulfide From Dcysteine And Its Therapeutic Potential. *Frontiers In Endocrinology*, 4.
132. Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, Meng Q, Mustafa Ak, Mu W, Zhang S, Snyder Sh, And Wang R. (2008). H₂s As A Physiologic Vasorelaxant: Hypertension In Mice With Deletion Of Cystathionine Gammalyase. *Science* 322: 587-590
133. Zottola Ma, Beigel K, Soni Sd, And Lawrence R. (2009). Disulfides As Cyanide Antidotes: Evidence For A New In Vivo Oxidative Pathway For Cyanide Detoxification. *Chem Res Toxicol* 22: 1948-1953
134. Suzuki K, Olah G, Modis K, Coletta C, Kulp G, Gero D, Szoleczky P, Chang T, Zhou Z, Wu L, Wang R, Papapetropoulos A, And Szabo C. (2011). Hydrogen Sulfide Replacement Therapy Protects The Vascular Endothelium In Hyperglycemia By Preserving Mitochondrial Function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 13829-13834
135. Koenitzer Jr, Isbell Ts, Patel Hd, Benavides Ga, Dickinson Da, Patel Rp, Darley-Usmar Vm, Lancaster Jr, Jr., Doeller Je, And Kraus Dw. (2007). Hydrogen Sulfide Mediates Vasoactivity In An O₂-Dependent Manner. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H1953-1960
136. Hosoki, R., Matsuki, N., Ve Kimura, H. (1997). The Possible Role Of Hydrogen Sulfide As An Endogenous Smooth Muscle Relaxant In Synergy With Nitric Oxide. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 237, 527-531.
137. Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y. Ve Wang, R. (2001). The Vasorelaxant Effect Of H₂s As A Novel Endogenous Gaseous Katp Channel Opener. *The Embo Journal*, 20, 6008- 6016.
138. Tang, G., Wu, L., Liang, W. Ve Wang, R. (2005). Direct Stimulation Of Katp Channels By Exogenous And Endogenous Hydrogen Sulfide In Vascular Smooth Muscle Cells. *Molecular Pharmacology*, 68, 1757-1764.
139. Mustafa, A. K., Sikka, G., Gazi, S. K., Steppan, J., Jung, S. M., Bhunia, A. K. Ve Ark. (2011). Hydrogen Sulfide As Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Sulphydrates Potassium Channels. *Circulation Research*, 109, 1259-1268.
140. Yong, Q. C., Lee, S. W., Foo, C. S., Neo, K. L., Chen, X. Ve Bian, J. S. (2008). Endogenous Hydrogen Sulphide Mediates The Cardioprotection Induced By Ischemic

- Postconditioning. *American Journal Of Physiology-Heart And Circulatory Physiology*, 295, 1330-1340.
141. Qu K, Lee Sw, Bian Js, Low Cm, Wong Pth: Hydrogen Sulfide: Neurochemistry And Neurobiology. *Neurochemistry International* 2008, 52:155-165
 142. Geng B, Chang L, Pan C, Qi Y, Zhao J, Pang Y, Du J, Tang C: Endogenous Hydrogen Sulphide Regulation Of Myocardial Injury Induced By Isoproterenol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 318:756-763
 143. Kimura Y, Kimura H: Hydrogen Sulfide Protects Neurons From Oxidative Stress. *Faseb J*, 2004, 18:1165-1167
 144. .Hu Lf, Wong Pth, Moore Pk, Bian Js: Hydrogen Sulfide Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Inflammation By Inhibition Of P38 Mapk In Microglia. *J Neurochem*, 2007, 100:1121-1128
 145. Zhang Lm, Jiang Cx, Liu Dw: Hydrogen Sulfide Attenuates Neuronal Injury Induced By Vascular Dementia Via Inhibiting Apoptosis In Rats. *Neurochem. Res.* 2009, 34:1984-1992
 146. Mikami, Y., Shibuya, N., Kimura, Y., Nagahara, N., Yamada, M. Ve Kimura, H. (2011). Hydrogen Sulfide Protects The Retina From Light-Induced Degeneration By The Modulation Of Ca²⁺ Influx. *Journal Of Biological Chemistry*, 286, 39379-39386.
 147. Yang, W., Yang, G., Jia, X., Wu, L. Ve Wang, R. (2005). Activation Of Katp Channels By H₂s In Rat Insulin-Secreting Cells And The Underlying Mechanisms. *The Journal Of Physiology*, 569, 519-531.
 148. Tang, G., Zhang, L., Yang, G., Wu, L., Ve Wang, R. (2013). Hydrogen Sulfideinduced Inhibition Of L-Type Ca²⁺ Channels And Insulin Secretion In Mouse Pancreatic Beta Cells. *Diabetologia*, 56(3), 533-541.
 149. Kaneko, Y., Kimura, T., Taniguchi, S., Souma, M., Kojima, Y., Kimura, Y., Ve Ark. (2009). Glucose-Induced Production Of Hydrogen Sulfide May Protect The Pancreatic Beta-Cells From Apoptotic Cell Death By High Glucose. *Febs Letters*, 583(2), 377-382
 150. K. Song, F. Wang, Q. Li Et Al., "Hydrogen Sulfide Inhibits The Renal Fibrosis Of Obstructive Nephropathy," *Kidney International*, Vol. 85, No. 6, Pp. 1318–1329, 2014
 151. J. Belkowski, "Hypoxia In The Renal Medulla: Implications For Hydrogen Sulfide Signaling," *Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, Vol. 334, No. 2, Pp. 358–363, 2010.
 152. E. M. Bos, R. Wang, P. M. Snijder Et Al., "Cystathionine Γ -Lyase Protects Against Renal Ischemia/Reperfusion By Modulating Oxidative Stress," *Journal Of The American Society Of Nephrology*, Vol. 24, No. 5, Pp. 759–770, 2013
 153. F. Simon, A. Scheuerle, M. Gröger Et Al., "Effects Of Intravenous Sulfide During Porcine Aortic Occlusion-Induced Kidney Ischemia/Reperfusion Injury," *Shock*, Vol. 35, No. 2, Pp. 156–163, 2011

154. X. Gan, G. Su, W. Zhao, P. Huang, G. Luo, And Z. Hei, "The Mechanism Of Sevoflurane Preconditioning-Induced Protections Against Small Intestinal Ischemia Reperfusion Injury Is Independent Of Mast Cell In Rats," *Mediators Of Inflammation*, Vol. 2013, Article Id 378703, 12 Pages, 2013
155. M. Kim, S. W. Park, V. D. D'agati, And H. T. Lee, "Isoflurane Post-Conditioning Protects Against Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury And Multiorgan Dysfunction Via Transforming Growth Factor-B1 Generation," *Annals Of Surgery*, Vol. 255, No. 3, Pp. 492–503, 2012.
156. H. Liu, X.-B. Bai, S. Shi, And Y.-X. Cao, "Hydrogen Sulfide Protects From Intestinal Ischaemia-Reperfusion Injury In Rats," *Journal Of Pharmacy And Pharmacology*, Vol. 61, No. 2, Pp. 207–212, 2009.
157. Johnsen Sg. Testicular Biopsy Score Countda Method For Registration Of Spermatogenesis In Human Testes: Normal Values And Results In 335 Hypogonadal Males. *Hormones* 1970;1:2-25.
158. Karaguzel, E., Sivrikaya, A., Mentese, A., Yulug, E., Turkmen, S., Kutlu, O., Kazaz, I. O. (2014). Investigation Of Tyrphostin Ag 556 For Testicular Torsion-Induced Ischemia Reperfusion Injury In Rat. *Journal Of Pediatric Urology*, 10(2), 223–229. Doi:10.1016/J.Jpurol.2013.08.007
159. Buege Ja, Aust Sd. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52: 302–310.
160. Hanasand M, Omdal R, Norheim Kb, Gøransson Lg, Brede C, Jonsson G. Improved Detection Of Advanced Oxidation Protein Products In Plasma. *Clinchimacta* 2012; 413: 901-906.
161. Beutler E, Duron O, Kelly Bm. Improved Method For The Determination Of Blood Glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 61: 882-888.
162. Benzie If, Strain Jj. The Ferric Reducing Ability Of Plasma (Frap) As A Measure Of "Antioxidant Power": The Frap Assay. *Anal Biochem* 1996; 239: 70-76.
163. Mylorie Aa, Collins H, Umbles C, Kyle J. Erythrocyte Superoxide Dismutase Activity And Other Parameters Of Copper Status In Rats Ingesting Lead Acetate. *Toxicolapplpharmacol* 1986; 82: 512–520.
164. Lawrence Ra, Burk Rf. Glutathione Peroxidase Activity In Selenium–Deficient Rat Liver. *Biochembiophys Res Commun* 1976; 71: 952–958.
165. Rachmilewitz D, Stamler Js, Karmeli F, Mullins Me, Singel Dj, Loscalzo J, Xavier Rj, Podolsky Dk. Peroxynitrite-Induced Rat Colitis—A New Model Of Colonic Inflammation. *Gastroenterology* 1993;105:1681-1688.
166. Smith Pk, Krohn R1, Hermanson Gt, Mallia Ak, Gartner Fh, Provenzano Md, Fujimoto Ek, Goeke Nm, Olson Bj, Klenk Dc. Measurement Of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem* 1985;150: 76-85

167. Turner Tt, Brown Kj (1993). Spermatic Cord Torsion: Loss Of Spermatogenesis Despite Return Of Blood Flow. *Biol Reprod.* 49:401–407.
168. Turner Tt. (1985). Acute Experimental Testicular Torsion: No Effect On The Contralateral Testis. *J Androl.* 6(1):65-72
169. Idriss, H. T., & Naismith, J. H. (2000). Tnf Alpha And The Tnf Receptor Superfamily: Structure-Function Relationship(S) *Microscopy Research And Technique*, 50(3), 184–195. Doi:10.1002/1097-0029(20000801)
170. Stehr M, Boehm R.(2003). Critical Validation Of Colour Doppler Ultrasound Indiagnostics Of Acute Scrotum İn Children. *Eur J Pediatr Surg.* 13:386–392.
171. Ekici S, Doan Ekici Aı, Öztürk G. (2012). Comparison Of Melatonin And Ozone İn The Prevention Of Reperfusion İnjury Following Unilateral Testicular Torsion İn Rats. *Urology.* 80(4): 899-906.
172. Koca, K., Yurttas, Y., Bilgic, S., Cayci, T., Topal, T., Durusu, M., Oguz, E. (2010). Effect Of Preconditioned Hyperbaric Oxygen And Ozone On İschemia-Reperfusion İnduced Tourniquet İn Skeletal Bone Of Rats. *Journal Of Surgical Research.* 164(1): E83-E89
173. Chi, K. K., Zhang, W. H., Wang, G. C., Chen, Z., He, W., Wang, S. G., Chen, H. (2017). Comparison Of İntraperitoneal And İntraepididymal Quercetin For The Prevention Of Testicular Torsion/Detorsioninduced İnjury. *Urology.* 99: 106-111.
174. Abbasoğlu, L., Kalaz, E. B., Soluk-Tekkeşin, M., Olgaç, V., Doğru-Abbasoğlu, S., & Uysal, M. (2012). Beneficial Effects Of Taurine And Carnosine İn Experimental İschemia/Reperfusion İnjury İn Testis. *Pediatric Surgery International*, 28(11), 1125–1131. Doi:10.1007/S00383-012-3168-5
175. Minamishima S, Bougaki M, Sips Py Ve Ark.: Hydrogen Sulfide İmproves Survival After Cardiac Arrest And Cardiopulmonary Resuscitation Via Nitric Oxide Synthase 3-Dependent Mechanism İn Mice. *Circulation* 2009, 120:888-896
176. Tay As, Hu Lf, Lu M, Wong Pt, Bian Js: Hydrogen Sulfide Protects Neurons Against Hypoxic İnjury Via Stimulation Of Atp Sensitive Potassium Channel/Protein Kinase C/Extracellular Signalregulated Kinase/Heat Shock Protein 90 Pathway. *Neuroscience* 2010, 167(2):277-286
177. Slater, T. F. (1988). Free Radical Mechanisms İn Tissue İnjury. In *Cell Function And Disease* (Pp. 209-218). Springer Us
178. Yu, B. P. (1994). Cellular Defenses Against Damage From Reactive Oxygen Species. *Physiological Reviews.* 74(1): 139-163.
179. Mccord, J. M., Edeas, M. A. (2005). Sod, Oxidative Stress And Human Pathologies: A Brief History And A Future Vision. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 59(4): 139-142.