

**T.C.**  
**FIRAT ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**TORSİYON-DETORSİYON OLUŞTURULAN SIÇAN**  
**TESTİS DOKUSUNDA APOPTOZİS VE TRPM2**  
**KATYON KANALLARININ EKSPRESYONU**  
**ÜZERİNE N-ASETİLSİSTEİN'İN ETKİLERİ**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ESRA AYDEMİR**

**2018**

## ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. İ. Enver OZAN

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı



Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi

olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İ. Enver OZAN

Danışman



Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. İ. Enver OZAN

Prof. Dr. Neriman ÇOKAKOĞU

Prof. Dr. Ergül DEVECİ





## ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Esra AYDEMİR

Tarih: 20.07.2018

İmza:

Prof. Dr. Enver OZAN

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

ELAZIĞ

## İTHAF SAYFASI



*Sevgili Aileme Ve Canım Eşime ...*

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince tecrübelerinden faydalandığım, değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. İ. Enver OZAN 'a, tezimin değerlendirme aşamasında ilgi, öneri ve yardımlarından dolayı tez projesi yardımcı yürütücü hocam sayın Doç. Dr. Gonca OZAN KOCAMÜFTÜOĞLU' na,

Eğitimim süresince beni yönlendiren, iyi niyetleriyle her zaman destek olan ve her an bilgi birikimlerinden faydalandığım Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri sayın Prof. Dr. Leyla CANPOLAT KOYUTÜRK'e, Prof. Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU 'na, Prof. Dr. Dürrin Özlem DABAK'a, Dr. Öğr. Üyesi Tuncay KULOĞLU'na ve Dr. Öğr. Üyesi Nevin KOCAMAN'a, ayrıca Dr. Öğr. Üyesi Elif ERDEM GÜZEL'e ve Dr. Öğr. Üyesi Ramazan Fazıl AKKOÇ'a

Tez çalışmamda yardımcı olarak katkıda bulunan değerli arkadaşım Arş. Gör. Nalan KAYA'ya, Öğretim Görevlisi Osman Fatih YILMAZ'a

Tezime sağladığı finansmandan ötürü Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (T.F 18.12) (FÜBAP) 'ne,

Son olarak yaşamım boyunca destekleri hiç esirgemeyen sevgili aileme ve canım eşime çok teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

|  |             |
|--|-------------|
| <b>ONAY SAYFASI</b>                                    | <b>ii</b>   |
| <b>ETİK BEYAN</b>                                      | <b>iii</b>  |
| <b>TEŞEKKÜR</b>  | <b>v</b>    |
| <b>İÇİNDEKİLER</b>                                     | <b>vi</b>   |
| <b>TABLO LİSTESİ</b>                                   | <b>ix</b>   |
| <b>ŞEKİL LİSTESİ</b>                                   | <b>x</b>    |
| <b>KISALTMALAR LİSTESİ</b>                             | <b>xiii</b> |
| <b>1. ÖZET</b>   | <b>1</b>    |
| <b>2. ABSTRACT</b>                                     | <b>4</b>    |
| <b>3. GİRİŞ</b>  | <b>7</b>    |
| 3.1. TESTİS  | 7           |
| 3.1.1. Testis Anatomisi                                | 7           |
| 3.1.2. Testis Embriyolojisi                            | 9           |
| 3.1.3. Testis Fizyolojisi                              | 11          |
| 3.1.4. Testis Histolojisi                              | 12          |
| 3.1.4.1. Testisler                                     | 12          |
| 3.1.4.2. Seminifer Tübüller                            | 13          |
| 3.1.4.3. Spermatogenez                                 | 13          |
| 3.1.4.4. Spermiyogenez                                 | 14          |
| 3.1.4.5. Sertoli Hücreleri                             | 15          |
| 3.1.4.6. Leydig Hücreleri                              | 17          |
| 3.2. Torsiyon  | 17          |
| 3.2.1. Testis Torsiyonunun Epidemiyoloji ve Etyolojisi | 17          |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.2.2. Klinik   | 18        |
| 3.2.3. Tanı   | 19        |
| 3.2.4. Tedavi   | 20        |
| 3.3. Serbest Radikaller                                   | 22        |
| 3.4. Apoptozis  | 24        |
| 3.5. TRPM İyon Kanalları                                  | 25        |
| 3.5.1. TRPM2 İyon Kanalı                                  | 26        |
| 3.5.1.1.Yapısı  | 26        |
| 3.5.1.2. Aktivasyonu ve Düzenlenmesi                      | 27        |
| 3.5.1.3. TRPM2 ve Hücre Ölümü                             | 29        |
| 3.6.Antioksidanlar  | 30        |
| 3.7. N-Asetil Sistein (NAS)                               | 31        |
| 3.8. Araştırmanın Amacı                                   | 33        |
| <b>4. GEREÇ-YÖNTEM</b>                                    | <b>34</b> |
| 4.1. Deney Hayvanlarının Beslenmeleri ve Barındırılmaları | 34        |
| 4.2. Deney Gruplarının Oluşturulması                      | 35        |
| 4.3. Doku Örneklerinin Alınması                           | 36        |
| 4.4. Histolojik Yöntemler                                 | 36        |
| 4.5. TUNEL Metodu   | 38        |
| 4.6. İmmunohistokimyasal Değerlendirme                    | 40        |
| 4.7. Biyokimyasal Analizler                               | 42        |
| 4.8. İstatistiksel Analiz                                 | 43        |
| <b>5. BULGULAR</b>  | <b>44</b> |
| 5.1. Histokimyasal Bulgular                               | 44        |

|  |           |
|--|-----------|
| 5.2. TUNEL Yöntemi Bulguları           | 52        |
| 5.3. TRPM2 İmmünreaktivitesi Bulguları | 56        |
| 5.4. Biyokimyasal Analizler            | 59        |
| <b>6.TARTIŞMA</b>                      | <b>61</b> |
| <b>7. KAYNAKLAR</b>                    | <b>70</b> |
| <b>8. ÖZGEÇMİŞ</b>                     | <b>80</b> |





## TABLO LİSTESİ

|  |    |
|--|----|
| <b>Tablo 1:</b> Serbest radikaller                             | 22 |
| <b>Tablo 2:</b> Antioksidanların sınıflandırılması             | 31 |
| <b>Tablo 3:</b> Deney hayvanlarına verilen rat yeminin içeriği | 35 |
| <b>Tablo 4:</b> Histolojik Takip İşlem Basamakları             | 37 |
| <b>Tablo 5:</b> TUNEL işlem basamakları boyaması.              | 39 |
| <b>Tablo 6:</b> İmmünohistokimyasal boyama prosedürü           | 40 |
| <b>Tablo 7:</b> Apoptotik indeks (%).                          | 55 |
| <b>Tablo 8:</b> TRPM2 immünreaktivitesi                        | 59 |
| <b>Tablo 9:</b> Grupların testis dokusu TAS ve TOS düzeyleri   | 59 |

## ŞEKİL LİSTESİ

|   |    |
|---|----|
| <b>Şekil 1:</b> Testisin anatomik görünümü  | 8  |
| <b>Şekil 2:</b> Gonadal gelişim   | 10 |
| <b>Şekil 3:</b> Spermatogenezin hormonal kontrolü   | 12 |
| <b>Şekil 4:</b> Testisin histolojik görünümü  | 15 |
| <b>Şekil 5:</b> Spermatogenez   | 17 |
| <b>Şekil 6:</b> Apoptozis oluşum yolağı   | 25 |
| <b>Şekil 7:</b> Kontrol grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli, interstisyel alan ve normal spermatogenez H&E x200.                   | 44 |
| <b>Şekil 8:</b> Kontrol grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli, interstisyel alan ve normal spermatogenez H&E x400.                   | 45 |
| <b>Şekil 9:</b> Kontrol grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli, bazal membranı ve interstisyel alan ve normal spermatogenez PAS x200. | 45 |
| <b>Şekil 10:</b> Sham grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli , interstisyel alan ve normal spermatogenez H&E x200.                    | 46 |
| <b>Şekil 11:</b> NAS grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli, interstisyel alan ve normal spermatogenez H&E x200.                      | 47 |
| <b>Şekil 12:</b> NAS grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli, interstisyel alan ve normal spermatogenez H&E x400.                      | 47 |
| <b>Şekil 13:</b> NAS grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli, bazal membranı ve interstisyel alan ve normal spermatogenez PAS x200.    | 48 |
| <b>Şekil 14:</b> Torsiyon-detorsiyon grubu. interstisyel alanda ödem(yıldız) ve seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon (ince ok) H&E x200.    | 48 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Şekil 15:</b> Torsiyon -detorsiyon grubu. interstisyel alanda ödem (kalın ok)<br>H&E x200.   | 49 |
| <b>Şekil 16:</b> Torsiyon-detorsiyon grubu. Seminifer tübül lümenine dökülmüş<br>immatür hücreler (çift taraflı ok)H&E x200.                    | 49 |
| <b>Şekil 17:</b> Torsiyon-detorsiyon grubu. Seminifer tübül bazal membranında<br>ayrılmalar ve interstisyel alanda ödem PAS x200.               | 50 |
| <b>Şekil 18:</b> Torsiyon-detorsiyon+ NAS grubu.Normal görünümlü interstiyel<br>alan(kalın ok )H&Ex200  | 51 |
| <b>Şekil 19:</b> Torsiyon-detorsiyon+ NAS grubu. Normal görünümlü seminifer<br>tübüller(çift taraflı ok ) H&Ex200                               | 51 |
| <b>Şekil 20:</b> Torsiyon-detorsiyon + NAS grubu. Normal görünümlü seminifer<br>tübül bazal membranı, seminifer tübül germinal epiteli PAS x200 | 52 |
| <b>Şekil 21:</b> Kontrol grubu. TUNEL pozitif hücre( ince ok) x400.   | 53 |
| <b>Şekil 22:</b> Sham grubu. TUNEL pozitif hücre( ince ok) x400.  | 53 |
| <b>Şekil 23:</b> NAS grubu. TUNEL pozitif hücre( ince ok) x400.   | 54 |
| <b>Şekil 24:</b> Torsiyon-detorsiyon grubu. TUNEL pozitif hücre (ince ok) x400.   | 54 |
| <b>Şekil 25:</b> Torsiyon-detorsiyon+ NAS grubu. TUNEL pozitif hücre (ince ok)<br>x400.   | 55 |
| <b>Şekil 26:</b> Kontrol grubu. İnterstisyel alanda TRPM2 immünreaktivitesi<br>( ince ok) x400.   | 56 |
| <b>Şekil 27:</b> Sham grubu. İnterstisyel alanda TRPM2 immünreaktivitesi ( ince<br>ok)x400.   | 57 |
| <b>Şekil 28:</b> NAS grubu. İnterstisyel alanda TRPM2 immünreaktivitesi ( ince ok)<br>x400.   | 57 |

**Şekil 29:**Torsiyon-detorsiyon grubu.İnterstisyel alanda TRPM2

immünreaktivitesi (ince ok)x400.

58

**Şekil 30:** Torsiyon-detorsiyon +NAS grubu. İnterstisyel alanda TRPM2

immünreaktivitesi (ince ok)x400.

58



## KISALTMALAR LİSTESİ

|                                   |                                   |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>ABP</b>                        | : Androjen bağlayıcı protein      |
| <b>AEC</b>                        | : 3-Amino-9-ethyl carbazole       |
| <b>AI</b>                         | : Apoptataik İndeks               |
| <b>AMH</b>                        | : Anti-Müllerian hormon           |
| <b>ATP</b>                        | : Adenozin trifosfat              |
| <b>BFP</b>                        | : Mavi Floresan Protein           |
| <b>Ca</b>                         | : Kalsiyum                        |
| <b>CAT</b>                        | : Katalaz                         |
| <b>CO</b>                         | : Karbon monoksit                 |
| <b>DAB</b>                        | : Diamino benzidin                |
| <b>DNA</b>                        | : Deoksiribonükleik asit          |
| <b>eNOS</b>                       | : Endotelyal nitrik oksit sentaz  |
| <b>FSH</b>                        | : Follikül stimüle edici hormon   |
| <b>GH</b>                         | : Büyüme Hormonu                  |
| <b>GHS-Rd</b>                     | : Glutasyon redüktaz              |
| <b>GnRH</b>                       | : Gonadotropin salgılayıcı hormon |
| <b>GSH</b>                        | : Glutasyon                       |
| <b>GSH-Px</b>                     | : Glutasyon peroksidaz            |
| <b>GSSG</b>                       | : Okside glutasyon                |
| <b>H&amp;E</b>                    | : Hematoksilen- Eozin             |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | : Hidrojen peroksit               |
| <b>HRP</b>                        | : Horse Radish Peroksidaz         |

|              |   |
|--------------|---|
| <b>IL-1a</b> | : İnterlökin-1a   |
| <b>IL-6</b>  | : İnterlökin-6  |
| <b>LH</b>    | : Luteinizan hormon   |
| <b>MİM</b>   | : Mülleriye İnhibitör Hormon  |
| <b>NAC</b>   | : N-Asetilensistein   |
| <b>NADPH</b> | : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat- hidrojen   |
| <b>nNOS</b>  | : Nöronal nitrik oksit sentaz   |
| <b>NO</b>    | : Nitrik oksit  |
| <b>NOS</b>   | : Nitrik oksit sentazlar  |
| <b>Nrf 2</b> | : Nükleer eritroit-2 bağlantılı faktör-2  |
| <b>PAS</b>   | : Periyodik Asit Schiff   |
| <b>PBS</b>   | : Phosphate buffered saline   |
| <b>RNS</b>   | : Reaktif nitrojen türleri  |
| <b>ROS</b>   | : Reaktif oksijen türleri   |
| <b>SOD</b>   | : Süperoksit dismutaz   |
| <b>TAS</b>   | : Total Antioksidan Seviyesi  |
| <b>TBA</b>   | : Tiobarbitürik asit  |
| <b>TBF</b>   | : Testis belirleyici faktörü  |
| <b>TNF-a</b> | : Tümör nekrosiz faktör a   |
| <b>TOS</b>   | : Total Oksidan Seviyesi  |
| <b>TUNEL</b> | : Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated<br>deoxyuridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end-labeling |

## 1. ÖZET

Testis torsiyonu, nadir görülen fakat tedavi edilemediği zaman fertilité açısından geriye dönüşümü olmayan hasarlara yol açan acil müdahale gerektiren ürolojik bir patolojidir.

Bu çalışmada testis torsiyonu detorsiyonu sonrası iskemik hasarı önlemede antioksidan bir madde olan N-Asetilsistein 'in etkinliği araştırıldı.

Çalışmada 35 adet Spraque –Dawley cinsi 8-10 haftalık erkek sıçan kullanılıp, her birinde 7 sıçan bulunan 5 gruba ayrıldı.

Grup I: Kontrol grubu (n:7); Bu grupta bulunan erkek sıçanlara deney boyunca herhangi bir işlem uygulanmadı.

Grup II: Sham grubu (n:7); Cerrahi olarak batın açılarak sol testis dışarı alınıp herhangi bir işlem yapılmadan 60 dakika bekletildikten sonra tekrar batın içerisine alınıp normal konumuna yerleştirilip kapatıldı.

Grup III: NAS grubu (n:7); Bu grupta bulunan erkek sıçanlara tek doz 100 mg/kg NAS intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı.

Grup IV: Torsiyon–detorsiyon grubu (n:7); Cerrahi olarak batın açılarak sol testis dışarı alınıp saat yönü tersine 720 ° döndürölüp torsiyon oluşturuldu. 60 dakikalık torsiyon süresi sonunda detorsiyon yapılan testis tekrar batın içerisine alınıp normal konumuna yerleştirilip kapatıldı.

Grup V: Torsiyon–detorsiyon + NAS grubu (n:7); Cerrahi olarak batın açılarak sol testis dışarı alınıp saat yönü tersine 720 ° döndürölüp torsiyon oluşturuldu. 60 dakikalık torsiyon süresi sonunda tek doz 100 mg/kg NAS intraperitoneal (i.p.) olarak uygulanıp, detorsiyon yapılan testis tekrar batın içerisine alınarak normal konumuna yerleştirilip kapatıldı.

48 saat sonra tüm gruplardaki sıçanlar anestezi altında dekapite edilerek cerrahi işlem sonlandırıldı.

Testis dokuları alınarak rutin histolojik takip serilerinden geçirildi. Elde edilen preparatlar H&E, PAS ve Masson'un üçlü boyası ile boyandı. Ayrıca TRPM2 immünohistokimyasal boyama ve apoptozis için TUNEL metodu uygulandı. Kan örnekleri alınarak biyokimyasal analiz yapıldı.

Işık mikroskobu altında yapılan histolojik değerlendirmelerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında torsiyon-detorsiyon yapılan gruba ait kesitlerde ; seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon, seminifer tübülün bazal membranlarında ayrılmalar, atrofik tübüller, interstisyel alanda ödem ve bazı tübüllerin lümenlerine dökülmüş immatür hücreler tespit edildi.

Torsiyon–detorsiyon + NAS uygulanan grupta ise; testis dokusunda germinal epitel dejenerasyonunda, vasküler konjesyonda, interstisyel ödemde belirgin iyileşme ve seminifer tübül bazal membranlarındaki ayrılmalarda azalma gözlemlendi.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında torsiyon-detorsiyon grubunda TUNEL pozitif hücrelerde anlamlı bir artış gözlemlendi.

Torsiyon–detorsiyon + NAS grubunda ise, TUNEL pozitif hücre sayısının kontrol grubu ile benzer olduğu belirlendi.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında torsiyon-detorsiyon grubunda TRPM2 immünreaktivitesi açısından anlamlı bir artış tespit edildi. Torsiyon–detorsiyon + NAS grubunda ise TRPM2 immünreaktivitesinde azalma tespit edildi.



Kontrol grubuna göre; torsiyon ve detorsiyon grubunda TOS değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı, TAS değerlerinin ise azaldığı; NAS uygulamasının ise TAS ve TOS değerlerini kontrole yakın bir düzeye getirdiği tespit edildi.

Sonuç olarak yapılan bu deneysel çalışma sonucunda torsiyon-detorsiyona maruz kalmanın erkek üreme sistemini etkileyerek hasar verdiği tespit edildi.

Torsiyon-detorsiyona karşı koruyucu amaçla kullanılan NAS'in; antioksidan özelliği sayesinde, torsiyon-detorsiyonun oluşturduğu olumsuz etkilerinin belirgin biçimde azaldığı belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Torsiyon, N-Asetilsistein, Sıçan, Testis, Tunel, İmmünohistokimyasal

## **2. ABSTRACT**

### **EFFECTS OF ACETYLCYSTEINE ON APOPTOSIS AND TRPM2 CATION CHANNELS EXPRESSION IN TORSION-DETORSION CREATED RAT TESTIS TISSUE**

Testis torsion is a rarely seen urgent urologic pathology, which gives rise to serious irremediable fertility problems if it is not treated on time.

In this work, the investigations made on the effect of a well-known antioxidant N-Acetylcysteine (NAC) compound on prevention of the ischemic destructions, which arises from testis torsion-detorsion steps.

In the study, 35 (Sprague-Dawley) male rats were prepared and chosen with the same species and ages (8-10 weeks old). Then all the rats were divided into 5 groups with the same number.

Group I: Control group (n:7); in the experiments, no process was performed on those 7 male rats in order to make comparison with the other groups.

Group II: Sham group (n:7); the abdomen was surgically cut, and the left sides of the testis were taken out and then kept waiting for 60 min. without performing any more process. After that, the left sides of the testis were replaced into the abdomen and kept in their initial positions.

Group III: NAC group (n:7); single dose (100 mg/kg) of NAC was applied as intraperitoneal (i.p.) to the 7 male rats.

Group IV: Torsion-detorsion group (n:7); the abdomen was surgically cut, and the left sides of the testis were taken out, then the torsion was performed by rotating it 720° towards the counter-clockwise. The torsion was completed in 60

min., after this time, detortion was performed and the left side of the testis was replaced to the abdomen and keep it initial position.

Group V: Tortion-Detortion + NAC group (n:7); the abdomen was surgically cut, and the left sides of the testis were taken out, then the torsion was performed by rotating it 720° towards the counter clock wise. The torsion has completed in 60 min., after this time, single dose (100 mg/kg) of NAC was applied as intraperitoneal (i.p.) to the 7 male rats. After that detortion was performed and the left sides of the testis were replaced to the abdomen and keep them initial positions.

After 48 hours, the surgical work has completed and the rats in all the groups were killed (headless method) under the anaesthesia.

Routine histological tissue preparation methods. Tissue sections were stained by using HE, PAS and Massons frichnome techniques. Moreover, tissue sections were stained by using Audun Brodin Peroxidase technique and TUNEL methods to determine TRPM2 immünereactivity and apoptosis respectively. The results of Group II – V (torsion-detortion applied groups) were compared with the control group (Group I) by using an optic microscope. According to the comparison, the following results obtained in torsion-detortion groups,

- degeneration was determined in seminiferous tubule germinal epithelium,
- separation was monitored in seminiferous tubule basal membrane,
- oedema was determined in atrophic tubules and interstitial area,
- and also, it was observed that immature cells decanted in some lumens of tubules.

As to torsion-detorsion + NAC applied group, an apparent recovery was observed in testis tissue, degenerated germinal epithelium, vascular congestion, and interstitial oedema. Also, a decrease was determined in the separation of seminiferous tubule basal membranes. When comparing the torsion-detorsion group with the control group, a meaningful increase was determined in TUNEL positive cells.

As to torsion-detorsion + NAC groups, it was determined that the number of TUNEL positive cells was almost similar with the control group. In terms of TRPM2 immunoreactivity, the torsion-detorsion group was compared with the control group and the results showed a meaningful increase. However, in torsion-detorsion+NAC group, a decrease was observed in terms of TRPM2 immunoreactivity.

According to the control group, the value of TOC was statistically getting increase, but, the value of TAC was getting decrease. So it can be say that the application of NAC put the value of TAC and TOC in a close approximate with the value of control group.

As a conclusion, it can be said that the application of torsion-detorsion has an detrimental effect on the male reproductive system. NAC was chosen for the purpose of preserver against the torsion-detorsion due to having antioxidant feature. The results supported our purpose with showing a significant decrease in unfavourable effects of torsion-detorsion.

**Key Words:** Torsion, N-Acetylcysteine, Rat, Testis, Tunel, İmmünohistokimyasal

### 3. GİRİŞ

#### 3.1. TESTİS

##### 3.1.1. Testis Anatomisi

Testisler, erkekte bir çift temel üreme organı (gonada) dır. Gövdenin dışında, perinede scrotumun içinde funiculus spermaticus'la asılı halde dururlar. Funiculus spermaticus herbir testis'e gelip-giden damar ve sinirler ile ductus deferens (vas deferens)'i taşıyan kordondur. Testisler, sitogenik fonksiyonları ile **spermatozoonları** (erkek üreme hücreleri), endokrin fonksiyonları ile testosteron ve **inhibin** hormonlarını üretmede görev alırlar. Sol testis, scrotum içinde sağ testis'ten yaklaşık 1 cm daha distalde bulunur. Her bir testis, oval şeklinde olup, yanlardan basık, 4-5 cm uzunlukta, 3 cm genişlikte, 2,5 cm kalınlıkta (5 x 3x2,5 cm boyutlarında) ve 10 -15 gr ağırlıktadır.

Her bir testisin üst ve alt iki ucu (**polus superior/inferior**), dış ve iç iki yüzü (facies **lateralis** / medialis) ve ön, arka iki kenarı (**margo anterior / posterior**) vardır. Her bir testis, arka kenarının iç yan bölümü hariç periton (epiorchium) ile sarılıdır. Peritonsuz bölümden damar, sinir ve kanallar geçerken epididim de tutunmuş şekildedir.(1)

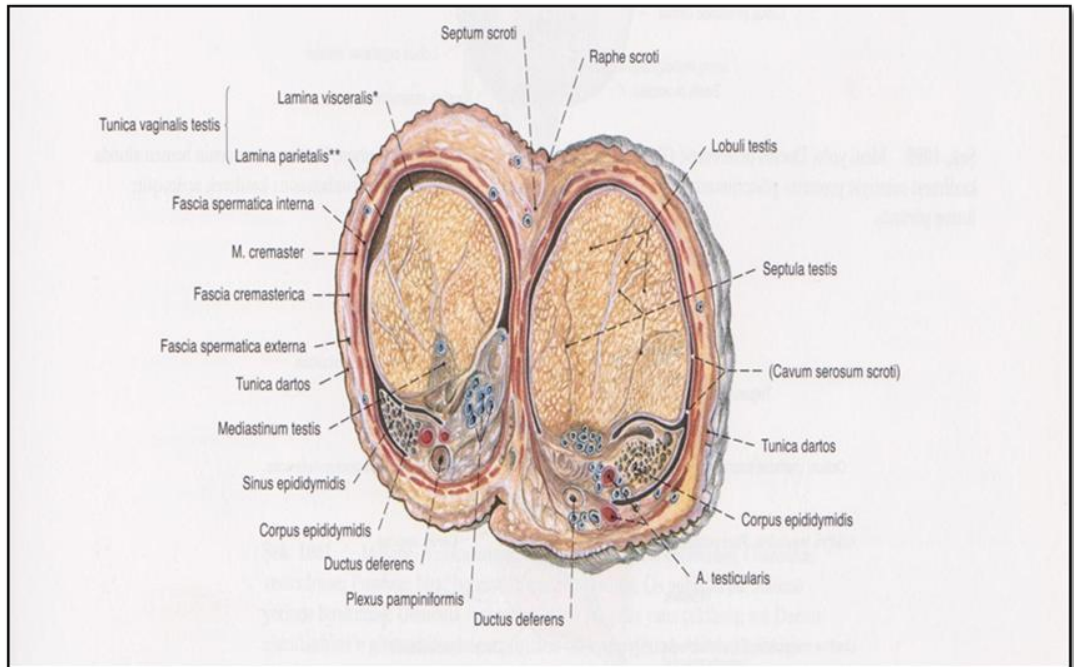
Testis, üç örtü ile sarılmıştır. Örtüler dıştan içe doğru;

**epiorchium (lamina visceralis ,tunica vaginalis), tunica albuginea** ve **tunica vasculosa** şeklinde sıralanmıştır.

**Epiorchium**, testisin inişi esnasında önüne katlanarak sürüklendiği parietal peritondan oluşan tunica vaginalis'in visseral yaprağıdır. Tunica vaginalis'in visseral ve parietal yaprağı arasında, potansiyel bir boşluk (**cavum vaginale**) bulunur. Epiorchium'un altında beyaz, kalın bir fibröz örtü olan **tunica**

**albuginea** bulunur. Tunica albuginea, testisin arka kenarından **Corpus Higmori** adı verilen hüzelere gönderir. Tunica albuginea'nın altındaki testis parenkimine temas eden örtüye, **tunica vasculosa** denir. Bu örtü kan damarları ve gevşek bağ dokudan yapılmış olup, tunica albuginea'nın iç yüzü ile septula testisleri sarar.

Testis parenkimi (**parenchyma testis**), her lobulus testis içerisinde 1-4 adet borular (**tubuli seminiferi-seminiferi kontorti**) bulunduran bez yapılarıdır. Interstitium testis adı verilen gevşek bağ dokusu içinde, sarı pigment granülleri bulunan endokrin hücreler (**Leydig hücreleri**) vardır. Erkek cinsiyet hormonları olan testosteron ve androstenedionu leydin hücreleri salgılamaktadır. Spermatogenezis, hipofiz bezinin ön lobundan salgılanıp gonadotropik hormonlarının uyarması sonucu 13 - 14 yaşlarında başlar. Spermatogenezin oluşması için testislerin scrotum içinde bulunması gerekir. Spermatogenezisin toplam süresi 65 - 70 gündür (1) (Şekil 1).



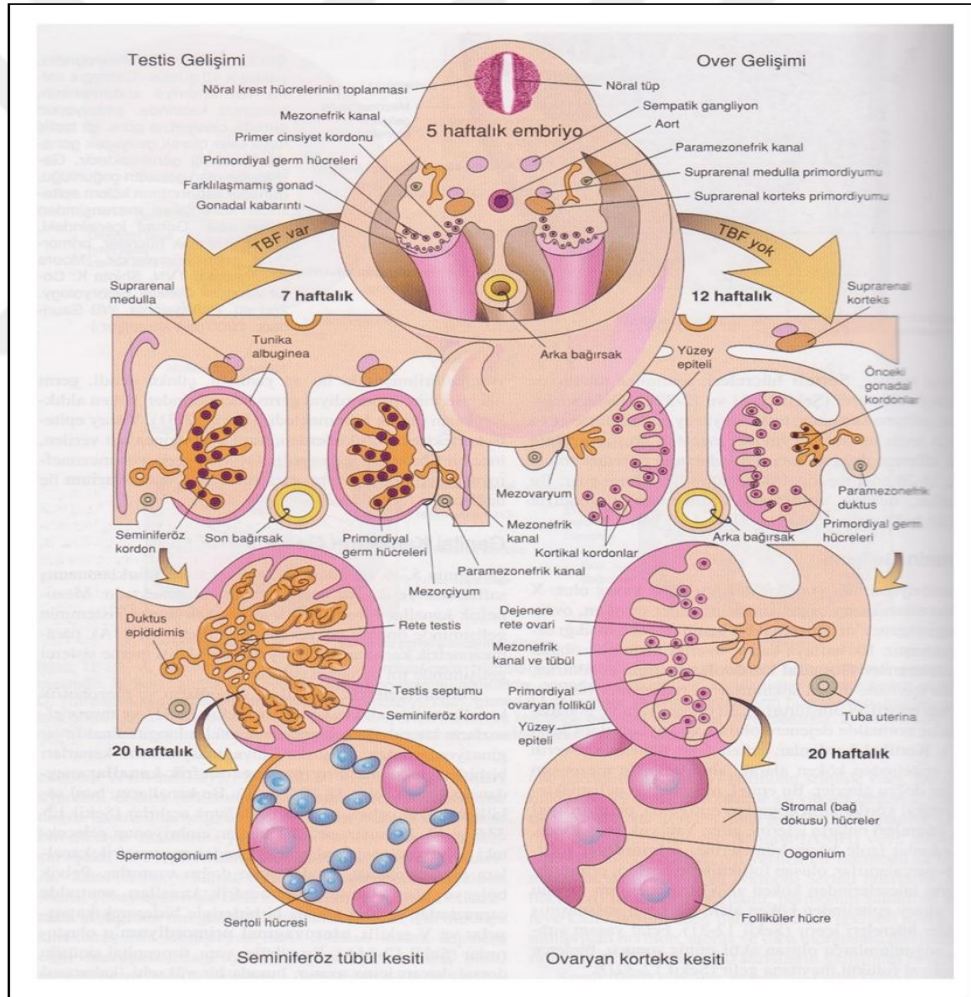
**Şekil 1:** Testisin anatomik görünümü (2).

### 3.1.2. Testis Embriyolojisi

Embriyonun kromozomal ve genetik cinsiyeti ovumu dölleyen spermle fertilizasyon sırasında belirlenir. Dişi ve erkek morfolojik karakteristik yapıları, embriyonun 7.hafta gelişimi başlamadan kadar oluşmazlar. Erken dönemde her iki cinste de genital sistem birbirine benzemektedir. Genital sistem gelişiminin başlangıcı seksüel gelişimin farklılanmamış safhası olarak bilinir. 5. Haftada Gonadal gelişimin ilk safhaları belirir. Mezonefrozun medialindeki mezotelde kalınlaşma olur. Bu epitel yapının ve altında bulunan mezenşimin proliferasyonu mezonefrozun medialinde kabarıklık (gonadal kabartı) oluşturmaktadır. Bu epitelyal kordonlar, gonadal kordonlar altında bulunan mezenşimin içine doğru büyümeye başlarlar. Farklanmamış gonad, dışta bulunan korteks ve içte bulunan medulladan meydana gelmektedir.

Embriyo XX kromozomuna sahip ise farklanmamış gonad'ın korteksi overe differansiye olarak, medullası gerilemeye başlar. Embriyo XY kromozomuna sahipse, medulla testise farklanır. Farklanmamış gonadın testis fonksiyonunu Y kromozomunun kısa kolu üzerinde bulunan testis belirleyici faktör (TBF) için SRY geni, gösterir. Transkripsiyon faktörü Sox9 da testiküler farklılaşma için rol alır. Testis belirleyici faktör (TBF), gonadal kordonları uyarak, farklanmamış gonadın medullaya doğru uzamasını sağlar. Kordonlar burada dallanarak anastomoz yapıp rete testisi oluşturur. Genişleyen testisler kademeli şekilde dejenere olan mezonefrozdan ayrılarak kendi mezenteri olan, mezorçiyum ile asılı biçime geçerler. Seminiferöz kordonlar, seminiferöz tübüllere rete testis ve tubuli rektive farklırlar. 8. Haftayla birlikte Leydig hücreleri, testosteron ve androstenedione'yi salgılamaya başlarlar. Üretilen

testosteron, insan konyonik gonadotropin (hCG) hormonunu uyarır. 8-12 haftalık dönemde hormonun miktarı en yüksek değerinde gözlenir. Testosterona ilaveten glikoprotein bir hormon olan antimüllerian hormon (AMH) veya müllerian inhibitör madde (MİM) olarak isimlendirilen hormonu da fetal testis salgılar. Antimüllerian hormon, uterus ve tuba uterinalara farklı paramezonefrik (müllerian) kanalların gelişimini baskılamaktadır. Puberteye kadar seminiferöz tübüller solid şekilde kalırlar yani, lümenleri yoktur. Pubertede lümen genişlemeye başlar(3) (Şekil 2).



Şekil 2: Gonadal gelişim (3).



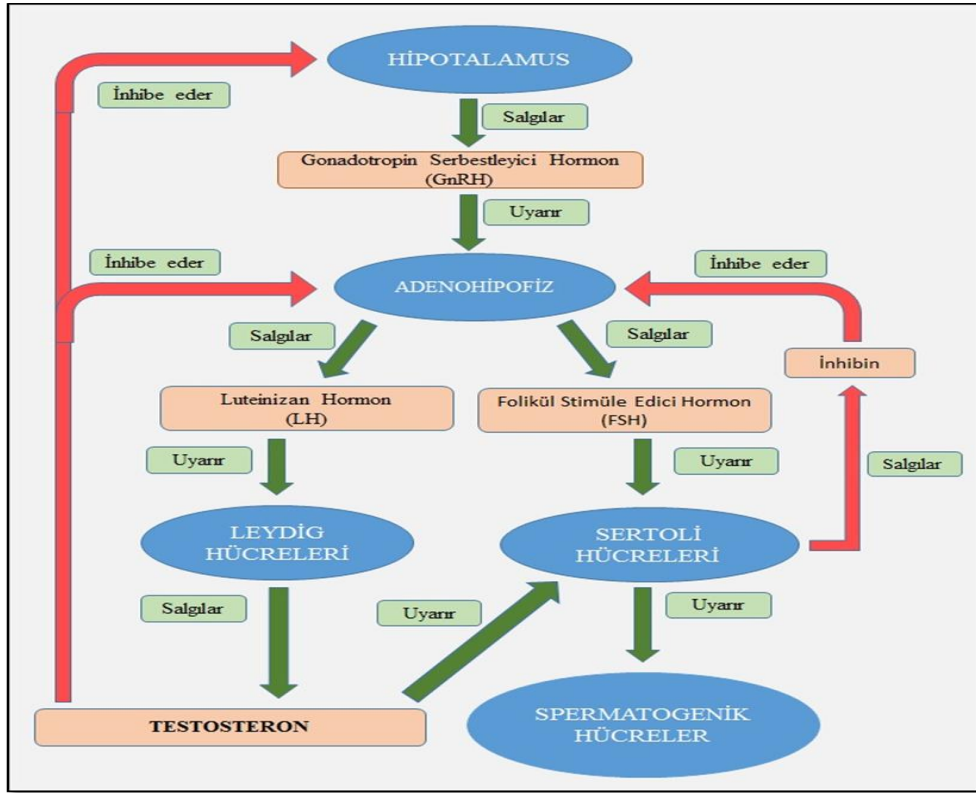
### 3.1.3. Testis Fizyolojisi

Testisler skrotum adı verilen torba biçimindeki yapının iç kısmında, vücut boşluğunun dışında bulunur. Testis yaklaşık olarak 40 gram ağırlığında, 4-5 santimetre uzunluğunda ve 20 mililitre hacindedir. Hacmi yaşla birlikte giderek azalır, yaşlı erkeklerin testislerinin daha küçük olduğunu söyleyebiliriz.

Embriyonal dönemde testisler karın içinde bulunur ve doğumdan önce (7-8. ayda) skrotuma göç ederler. Skrotumdaki sıcaklık vücut sıcaklığından yaklaşık 2 derece daha düşüktür. Testislerin vücut boşluğunun dışında bulunması, spermatogenez için gerekli olan düşük sıcaklığı sağlar (32-35°C). Bu düşük sıcaklık spermatik arterler ile venler arasındaki zıt akımlı ısı değişimiyle olmaktadır. Sperm üretimi için bu düşük sıcaklığın olması gereklidir. Çünkü testislerdeki sıcaklık artışı, spermatogonyumların yakınında bulunan seminifer tübül hücrelerinde hasara yol açarak spermatogenezinin oluşumunu engelleyebilir.

Testisler erkek cinsiyet hücreleri olan spermelerin yapımı, depolanması, salgılanması ve testosteron üretiminden sorumludurlar. Sperm yapımı seminifer tübüllerde, testosteron yapımı ise Leyding hücrelerinde olmaktadır. Testis parankiması seminifer tübüllerle oluşmaktadır. Seminifer tübüllerin duvarını germ hücreleri (spermatogonyum) ve sertoli hücreleri döşemektedir. Germ hücreleri sperm yapımından sorumludurlar. Sertoli hücreleri germ hücrelerinin etrafındaki destek dokusunu oluşturmaktadırlar. Seminifer tübüller bazal membran ve peritübüler hücre tabakası ile çevrilidirler. Peritübüler hücreler, peristaltik hareketten sorumlu hücrelerdir. Bu hücrelerin kasılması, spermelerin epididime doğru iletilmesini sağlar.

Spermatogenezi uyaran hormonlar testosteron, LH, FSH, östrojenler ve büyüme hormonlarıdır. Testosteron testiste, Leydig hücreleri tarafından salgılanmaktadır. Germinal hücrelerin büyümesi, bölünmesi ve sperm gelişimi için gereklidir. Ön hipofizden LH ve FSH salgılanır. FSH Sertoli hücrelerini uyarak spermatidlerin sperme dönüşümünü sağlayıp spermatidlerden sperm oluşmasını hızlandırmaktadır. Östrojenler spermin olgunlaşmasından görev alır. Büyüme hormonu (GH) ise testislerin metabolik fonksiyonlarından sorumludur(4)(Şekil 3).



Şekil 3: Spermatogenezin hormonal kontrolü(5).

### 3.1.4. Testis Histolojisi

#### 3.1.4.1. Testisler

Erkek üreme sistemi testisler, genital kanallar, yardımcı bezler ve penisten

oluşmaktadır. Testisin görevi hormon ve spermatozoon üretmektir. Spermatozoonlar, genital kanallar ve yardımcı bezlerin salgısı, penis yoluyla dışı üreme sistemine iletilen semeni oluşturmaktadır. Testisler, tunika albuginea denilen bağ dokusunca zengin kalın bir kapsülle çevrilmiştir.

#### **3.1.4.2. Seminifer Tübüller**

Spermatozoidler seminifer tubüllerde üretilmektedir. Her testiste 250-1000 seminifer tübül bulunmaktadır. Seminifer tübüller karmaşık yapıda olup çok katlı epitelle döşelidir. Tübüller kıvrımlı olup ve uçlarına doğru lümeni daralarak düz tübüller ve tubuli rekti olarak adlandırılan kısa segmentler olarak devam ederler.

Seminifer tübüller fibröz bir bağ dokusu kılıfı, bazal lamina ve karmaşık bir germinal yapıdan oluşmaktadır. Bazal laminaya yapışık olan içteki katmanda yassılaştırmış **miyoid** hücreler bulunur. Seminifer tübüllerin arasındaki boşluğun büyük bir kısmını da interstisyel (Leydig) hücreleri doldurmaktadır.

#### **3.1.4.3. Spermatogenez**

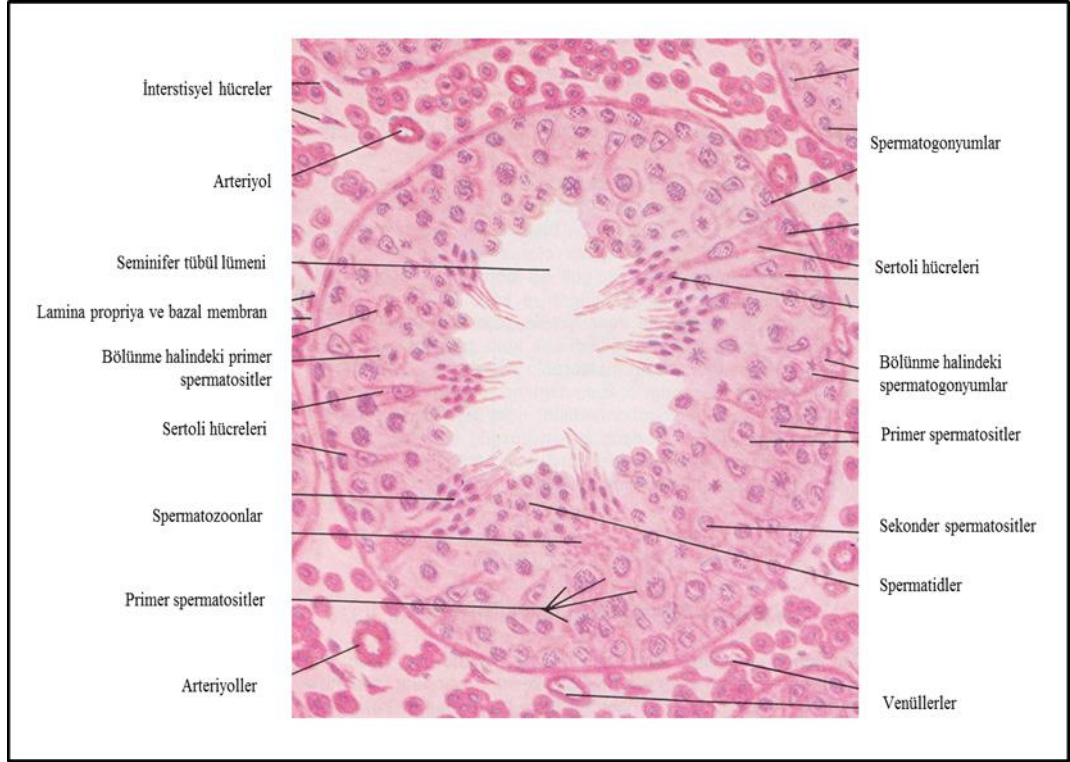
Spermatogenez, spermatozoon üretim sürecidir. Bu süreç üreme hücresi olan spermatogonyumla başlar. Spermatogonyum, yaklaşık 12 mm çapında, bazal laminanın hemen üstünde yer alan küçük bir hücredir. Cinsel olgunluk çağında spermatogonyum hücreleri mitoz bölünme ile çoğalmaya başlayarak yeni hücreler oluşur. Bu yeni oluşan hücreler iki yoldan birini izler. A tipi spermatogonyumlar olarak adlandırılan kök hücreler, bölünmeyi sürdürebilir ya da sürmekte olan mitoz döngüsünde farklılaşarak B tipi spermatogonyumları oluşturur. B tipi spermatogonyumlar primer spermatositlere farklılaşabilen öncül hücrelerdir. Primer spermatositler 46 kromozom (44+XY) içerir. Oluşumla birlikte bu hücreler birinci mayoz bölünmenin profazına girerler. Profaz aşaması yaklaşık olarak 22

gün sürdüğünden, kesitlerdeki spermatoisitlerin çoğu bu aşamada görülmektedir.

Birinci mayoz bölünmeden sonra sekonder spermatoisitler, 23 kromozom (22+X veya 22+Y) içeren daha küçük hücreler oluşur. Kromozomların sayısındaki azalmaya (46'dan 23'e) her hücredeki DNA miktarının eksilmeside eşlik etmektedir. Testis kesitlerinde sekonder spermatoisitlerin gözlenmesinin zor olmaktadır. Çünkü bu hücreler interfazda çok kısa süre kaldığından dolayı çabucak ikinci mayoz bölünmeye girerler. Sekonder spermatoisitlerin bölünmesi 23 kromozom içeren iki hücrenin, spermatidlerin oluşmasıyla sonuçlanmaktadır. (Şekil 4).

#### **3.1.4.4. Spermiyogenez**

Spermiyogenez spermatozoon üretiminin son aşaması ve spermatidlerin, erkek DNA'sını ovuma aktarmak için özelleşmiş hücreler olan spermatozoon dönüşmesidir. Bu süreçte hücre bölünmesi gerçekleşmez. Spermiyogenez, akrozom oluşumunu, çekirdek yoğunlaşmasını ve uzamasını, kamçı gelişmesini ve sitoplazmanın büyük bir bölümünün kaybolmasını sağlar. Üç evreye ayrılır. Golgi fazı, akrozomal evre ve olgunlaşma evresidir.(6)



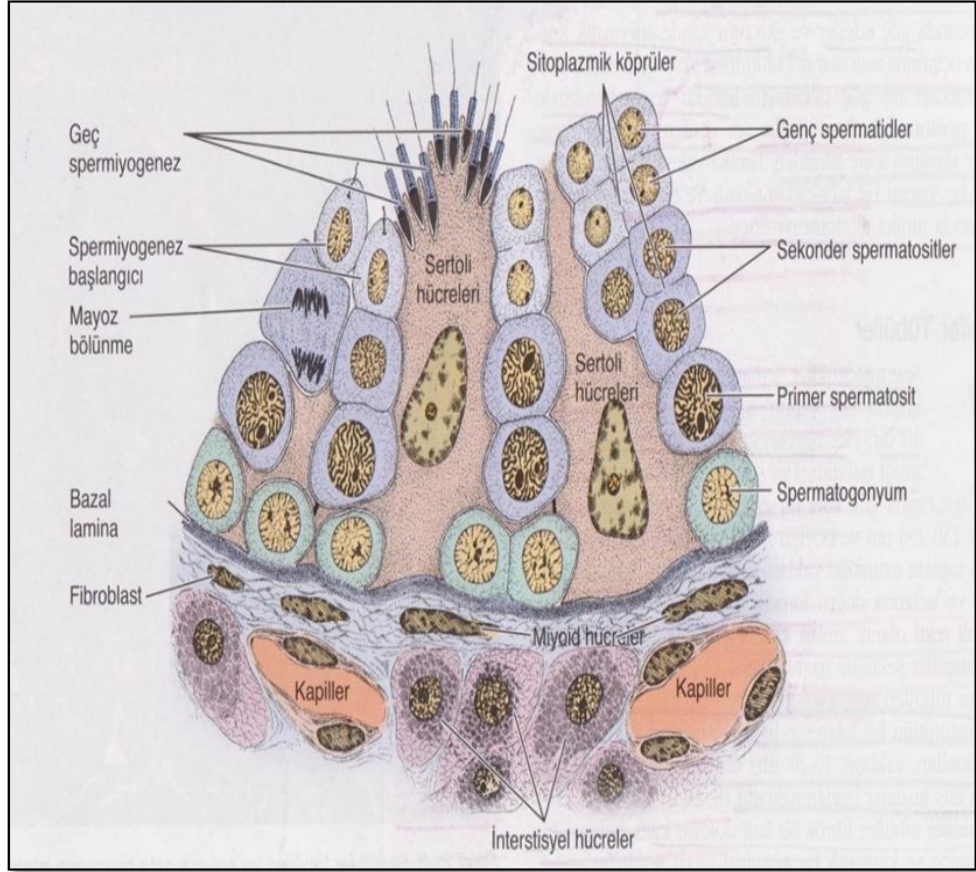
**Şekil 4:** Testisin histolojik görünümü(6)

### 3.1.4.5. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri testislerin işlevi açısından oldukça önemli olup spermatogenez serisindeki hücreleri saran uzun, piramidal hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin tabanları bazal laminaya tutunup, tepe kısımları ise seminifer tübülün lümenine uzanırlar. Yan yana bulunan Sertoli hücreleri, sıkı bağlantılarla birbirlerine tutunup kan-testis bariyerini oluşturur. Spermatogonyumlar, bu bariyerin altında yer alıp bazal bölme yerleşmişlerdir. Spermatogenez esnasında, spermatogonyumların bölünmesiyle oluşan bazı hücreler bağlantı noktalarından bir şekilde geçip, bariyerde yer alan adluminal bölme ulaşılır (Şekil 5). Bariyerin üzerinde sertoli hücrelerinin yan ve üst kenarlarındaki derin girintilerde yerleşmiş spermatositler ve spermatidler bulunur. Spermatidlerin kamçı kuyrukları gelişmeye başladıkça, Sertoli hücrelerinin üst uçlarından çıkan saçaklar halinde görülürler.

Sertoli hücrelerinin birkaç işlevi vardır.

- Gelişmekte olan spermatozoonların desteklenmesi, korunması ve beslenmesinin düzenlenmesini sağlarlar.
- Fagositoz: Spermiyogenezdeki fazla spermatid sitoplazması artık cisimcikler olarak atılır. Bu sitoplazmik parçacıklar Sertoli hücrelerindeki lizozomlar tarafından fagosite edilerek, sindirilir.
- Salgılama: Seminifer tübüllere genital kanallar yönünde sürekli akan ve spermlerin taşınmasında kullanılan bir sıvı salgılamaktadır. Seminifer tübül içindeki spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaştırılmasında görev alır.
- Anti-Müllerian hormon üretimi: Müller kanalını baskılayan hormon olarak da bilinen ve dönüştürücü büyüme faktöründen biri olan glikoprotein hormon embriyonal gelişim sırasında erkek fetusta Müller (paramezonefrik) kanallarının gerilemesini sağlamaktadır.
- Kan-testis bariyeri: Kan ve seminifer tübüllerin iç bölgesi arasında bir bariyerin bulunması, testis sıvısındaki kanda çok az madde bulunmasını sağlar.
- İnhibin B üretimi: İnhibin B hipofizdeki FSH üretimini engellemektedir.(6)



**Şekil 5: Spermatogenez (7).**

#### **3.1.4.6. Leydig Hücreleri**

Seminifer tübüllerin arasındaki bölgelerde bulunan leydig hücreleri testosteron salgılamaktadır. Hücre yüzeyleri mirovillus bakımından zengindir. Leydig hücrelerinde sentezlenen testosteron mikrovillüsler tarafından yüzey alanı artırarak hücre zarından difüzyon yoluyla geçip hızla dolaşımda yer alan steroid bağlayıcı proteinlere bağlanmış durumdadırlar.(8)

### **3.2. Torsiyon**

#### **3.2.1. Testis Torsiyonunun Epidemiyoloji ve Etiyolojisi**

Hunter, testis torsiyonunu kalıcı iskemik hasara neden olan ürolojik bir acil durum olduğunu ortaya koymuştur (9-10). Pediyatrik akut skrotal hastalıkların %25-35'ini oluşturur. 25 yaş altı erkeklerde görülme sıklığı yaklaşık

1/4000'dir. Her yaş grubunda görülebilmemesine karşılık neonatal dönemde ve 13 yaş civarında daha sık görünür. Testis torsiyonuna zamanında müdahale edilmediğinde nekroz gelişebileceğinden acil ürolojik cerrahi gerektirir. Tanı da gecikme olduğu zamanlar da testiste fonksiyon kaybı ve infertilite gibi sonuçlar doğurabilir (11, 12,13).Cerrahi işlemde başarılı olursa da bu hastaların %40-60'ında testiküler atrofi ve infertilite kaçınılmazdır (14). Akut skrotal ağrısı olan adölesanların torsiyon olma aralığı % 50-60 civarındadır (15). Genel olarak patolojinin çocuklarda görüldüğü düşünülse de torsiyonun tüm durumların % 40'ı erişkinlerde de görülmektedir (16). Hagan ve arkadaşları, tek taraflı testis torsiyon geçirmiş 55 hasta üzerinde inceleme yapmış ve bu hastaların 7'sinde spermiogram sonuçlarının normal olduğunu saptamışlardır (14). Yenidoğanlarda testis torsiyonun sık görülme nedeni yenidoğanlardaki testosteron düzeylerinin puberte dönemi hariç, diğer dönemlere göre oranla daha yüksek olmasıdır. Neonatal torsiyon vakalarının %12-21'i bilateraldir. Puberte döneminde daha sık görülmesinin nedeni, artan testosterona bağlı olarak oluşan testis elevasyonu ve rotasyonudur (17).

### **3.2.2. Klinik**

Testis torsiyonunda ilk semptom sıklıkla ani başlayan şiddetli scrotal ağrı ve klinik olarak bazen kademeli artan ağrı olarak da olabilir. Bununla birlikte testiste eritem ve ödem gelişir, vücut ısısı yükselir, bulantı ve kusma şikayetleri ortaya çıkar. Fizik muayenede testisler oldukça hassastır. Spermatik kordu kısa olduğu için testisin yüksek pozisyonda ve transvers yerleşimde olması, epididimin ön tarafta bulunması, kremaster refleksinin alınamaması, kalınlaşmış hassas kordun palpe edilmesi testis torsiyonu tanısında yol gösterici olabilir. Scrotumun



elevasyonu ile testisteki ağrının artması testis torsiyonunu, azalması ise epididimiti akla getirilebilir. Klinikte bu muayeneye Phren testi denir (18). Testis ve epididimde nekroz gelişmediği müddetçe ağrı devam eder. Testisin elevasyonu vasküler oklüzyonu ve ağrıyı arttırır. Torsiyon genellikle tek taraflıdır, fakat %2 bilateral de olabilir. Sol testis torsiyonu daha fazladır (19). İnmemiş testis torsiyonlarında da sol taraf daha fazla etkilenebilir. Sol testis daha uzun bir spermatik korda sahiptir, torsiyon olasılığının sağ testise oranla iki kat daha fazla olduğu, inmemiş ve retraktıl testislerde torsiyonun arttığı gözlemlenmiştir (20). Tanı geciktiği durumlarda testiste fonksiyon kaybı ve infertilite ortaya çıkabilir. Acil tanı konulup hiç zaman kaybetmeksizin testisin manual ya da bunun yetersiz geldiği durumlarda cerrahi eksplorasyonla detorsiyone edilmesi gerekmektedir.

### **3.2.3. Tanı**

Akut skrotum bulguları olan bir hastada ilk olarak testis torsiyonunun ekarte edilmesi gerekmektedir. Testisteki kan akımı sintigrafik veya Doppler ultrasonografi yöntemlerle tespit edilmelidir (21). Testiküler arteriyel akımın azalması torsiyon için tipik olmakla birlikte, artışı epididimit, orşit gibi inflamatuvarlarıda akla getirir (22). Doppler ultrasonografinin, testis torsiyonundaki kan akımını değerlendirmede olguların %30'unda yanıltıcı olabilir (23). Yine de puberte döneminde testis boyutlarından iyi bir sonuç almak için yeterli büyüklük de olduğundan radyoizotopik scan ve Doppler ultrasonografi gibi testler uygun bulunmuştur. Appendiks testis torsiyonunda ise testisin üst kutbunda yumuşak mavi noktanın(bludot sign) gösterilmesi ile de tanı konulabilir (24). Yeni tanı yöntemlerinin uygulanabilirliği konusunda araştırılmaya devam edilmektedir. Zhang ve arkadaşları yaptıkları testis torsiyonunda elastografi

USG'yi kullanmışlardır. Yapılan çalışmalarda testiküler doku katlıklarındaki değişikliklerin testiküler spermatogenezdeki değişikliklerle olduğunu gözlemlemişlerdir (25). Güncel olan çalışmalarda testis torsiyonunda elastografinin tanıda faydalı olduğu araştırmalarla devam etmektedir. (24,25).

#### **3.2.4. Tedavi**

Testis torsiyonu aciliyet gerektiren bir ürolojik vakadır. İlk manuel detorsiyon da denenebilir. Kieslinger ve arkadaşları (26) testisin kaudalden kraniyale ve medialden laterale doğru detorsiyone edildiğini söylemektedirler. Detorsiyone olan testiste ağrı durur, testis skrotum içine yerleşir ve kord gevşer ama yine de sonraki torsiyon ihtimaline karşı önlem olamayacağı için cerrahi ihtiyaç duyulur. Manuel detorsiyon genellikle ilk 2-6 saat arasında veya cerrahi hazırlığın devam ettiği esnada uygulanması gerekir. Manuel detorsiyon kronik intermitan torsiyonu olup da skrotal ağrısı geçmeyen hastalarda da denenebilir (27). Ağrılı bir prosedür olduğu için uygun spermatik kord anestezisi uygulanmalıdır (28). Testisler genellikle medialden laterale doğru detorsiyone olur. Başarılı bir detorsiyonda skrotal ağrı hemen geçer. Dopplerdeki kan akımının düzelmesi başarılı detorsiyonun kesin belirtisidir. Manuel detorsiyon başarısız olduğunda hiç zaman kaybetmeden cerrahi eksplorasyon yapılması gerekir (29). Eksplorasyonda orta hat skrotal insizyon ile testise ulaşılır ve testis kıvamına ve canlılığına, torsiyon adetine bakılarak tanı konulabilir. Torsiyon düzeltilip testise sıcak serum fizyolojik ile kompres yapılır. Eğer detorsiyon yapılan testis göze çarpan bir şekilde siyah, nekrotik ve cansız görünüyorsa çıkartılması gerekir. Genel olarak, detorsiyon sonrası doku canlılığını kaybettiği zaman yapılan orşiektominin, kontralateral orşiopeksi ile beraber uygulanması,

detorsiyon sonrası da testis canlılığı yeterli görülürse bilateral orşiopeksi yapılabilir. Akut skrotumu olan ve doppler ile tanı koyulan ve manuel detorsiyonun başarılı olmadığında hastalarda acil cerrahi gerektirir. Aksi halde 6 saat sonrasında kalıcı iskemi oluşmaya başlar (30). Explorasyonda appendiks testis torsiyonu olduğu durumda cerrahi tedavisinin hastanın ağrısını gidermede daha başarılı olunmuştur. Detorsiyon sonrası canlılığı şüpheli olan testislere yönelik alınan cerrahi işlemler subjektif işlemler olup gereksiz orşiektomilerin önüne geçilebilmesi için yeni yöntemlere de başvurulmalıdır. Bozkurter ve arkadaşları testiküler iskeminin asidozla sonuçlanmasından yola çıkarak testis torsiyonundaki pH değişikliklerini intraoperatif bir pH probu ile ölçmüşler ve pH'nın 6'ya düştüğü gruplarda doku canlılığının olmadığını ileri sürmüşler (31). Testiste oluşan iskeminin kan-testis bariyerini hasara uğrattığı ve çocukta kendi spermatogoniasına karşı potansiyel otoimmünizasyon riski oluşturduğuna ilişkin önemli kanıtlar vardır. Adölesan dönemde iskemik testis fikse edildiği zaman erişkin dönemde spermatogenezis ile ilgili sorunlar ortaya çıkmaktadır. On yaşı altı çocuklarda, spermatogenezis henüz oluşmadığından ve kan-testis bariyeri de olmadığından iskemiye bağlı otoimmünizasyon riski düşer. Bu nedenle on yaşı altı çocuklarda şüpheli testisler yerinde bırakılması gerekir. On yaşından büyük iskemik testisi olan çocuklarda ise orşiektomi gerektirir (32). Testis nekroze ise orşiektomi yapılabilir. Eğer testis nekroze olmamışsa ve korunacaksa, tespit sütürü konmadan oluşturulmuş olan dartos poşuna yerleştirilmelidir. Belingie ve arkadaşları (33) testis tunika albugineasına sütür koymanın oluşturabileceği lokal reaksiyonların testise zarar verebileceğini söylemişlerdir.

### 3.3. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, reaktif nitrojen türleri (RNS) ve reaktif oksijen türleri (ROS) olup ortaklanmamış elektronlara sahip, yarılanma ömürleri oldukça kısa olan yapılardır (34) (Tablo1).

**Tablo 1:** Serbest radikaller (35).

| Reaktif Türler                 |  | Yarılanma süresi (saniye) | Üretim şekli                                       | Etkileşimi   |
|--------------------------------|--|---------------------------|--|--|
| Reaktif Oksijen Türleri (ROS)  | Hidroksil radikali ( $\cdot\text{OH}$ )      | $10^{-9}$                 | Vücutta artmış demir konsantrasyonu                | Lipid, karbohidrat, protein ve nükleik asitler gibi hücrel bileşiklerle etkileşir. |
|                                | Süperoksit radikali ( $\text{O}_2\cdot$ )    | $10^{-6}$                 | Genellikle mitokondri ve kardiyovasküler sistem    | Demir- kükürt içeren enzimleri inaktive eder.                                      |
|                                | Hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) | Kararlı                   | Metabolik reaksiyonlar sürecinde                   | Lipid, protein ve nükleik asitlerle etkileşir.                                     |
|                                | Organik hidroperoksit ( $\text{ROOH}$ )      | Kararlı                   | Geçiş metal iyonları reaksiyonlarıyla              | PUFA daki lipid peroksidasyonu ile etkileşir.                                      |
|                                | Singlet oksijen ( $^1\text{O}_2$ )           | $10^{-6}$                 | Fotosentez ve kimyasal reaksiyonlar                | Hücrel protein ve lipitlerle etkileşir.  |
| Reaktif Nitrojen Türleri (RNS) | Nitrik oksit ( $\text{NO}\cdot$ )            | 5                         | Nörotransmitter ve kan basıncı düzenleyici         | Nükleik asitlerin yıkımı ve deaminasyonu.  |
|                                | Peroksinitrit ( $\text{ONOO}\cdot$ )         | $10^{-3}$                 | $\text{NO}\cdot$ Ve $\text{O}_2\cdot$ formlarından | Siklooksigenaz enziminin aktive edilmesi.  |
|                                | Peroksinitröz asit ( $\text{ONOOH}$ )        | Oldukça kararlı           | $\text{ONOO}\cdot$ ' nin Protonlanmış formu        | Nörotransmitterlerle etkileşir.  |

Yüksek konsantrasyondaki serbest radikaller; proteinler, lipidler ve DNA gibi biyomoleküller yapıda olanlarla genelde reaksiyona girerler. Ayrıca vücutta serbest radikallerin artması, oksidatif strese, hücrenin fizyolojik fonksiyonunda değişime ve birçok hastalık oluşturabilir (35). Memeli hücreleri, oksidanların ve antioksidanların oluşumu arasında denge kurulmasını sağlayan antioksidan koruma sistemine sahiptir. Bu iki sistem arasındaki dengede meydana gelen bozulmalar, oksidatif strese sebep olur. Oksidatif hasar; yaşam döngüsü boyunca birikir ve miyokardiyal infarktüs, ateroskleroz, nörodejeneratif bozukluklar, romatoid artrit, kanser gibi birçok farklı patolojik durumlara da neden olabilir (36).

Normal testiküler fonksiyon açısından serbest radikaller ile antioksidan sistem arasındaki dengenin sağlanması oldukça gereklidir(37). Testislerde redoks homeostazisini sağlanması ve spermleri oksidatif hasardan korunması için seminal plazmada çok sayıda enzimatik ve non-enzimatik antioksidan sistemleri bulunur. Seminal plazmada bulunan enzimatik antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD) (38, 39), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSH-Rd) ve katalaz (CAT) dır (40).

Non-enzimatik antioksidanlar; askorbat (41, 42),  $\alpha$ -tokoferol (43), pirüvat (44), glutatyon (GSH) (45, 46), taurin ve hipotaurindir (47). Seminal plazma antioksidan konsantrasyonunun, sağlıklı erkeklerde infertil erkeklere oranla daha fazla olduğu bildirilmiştir (42, 48, 49).

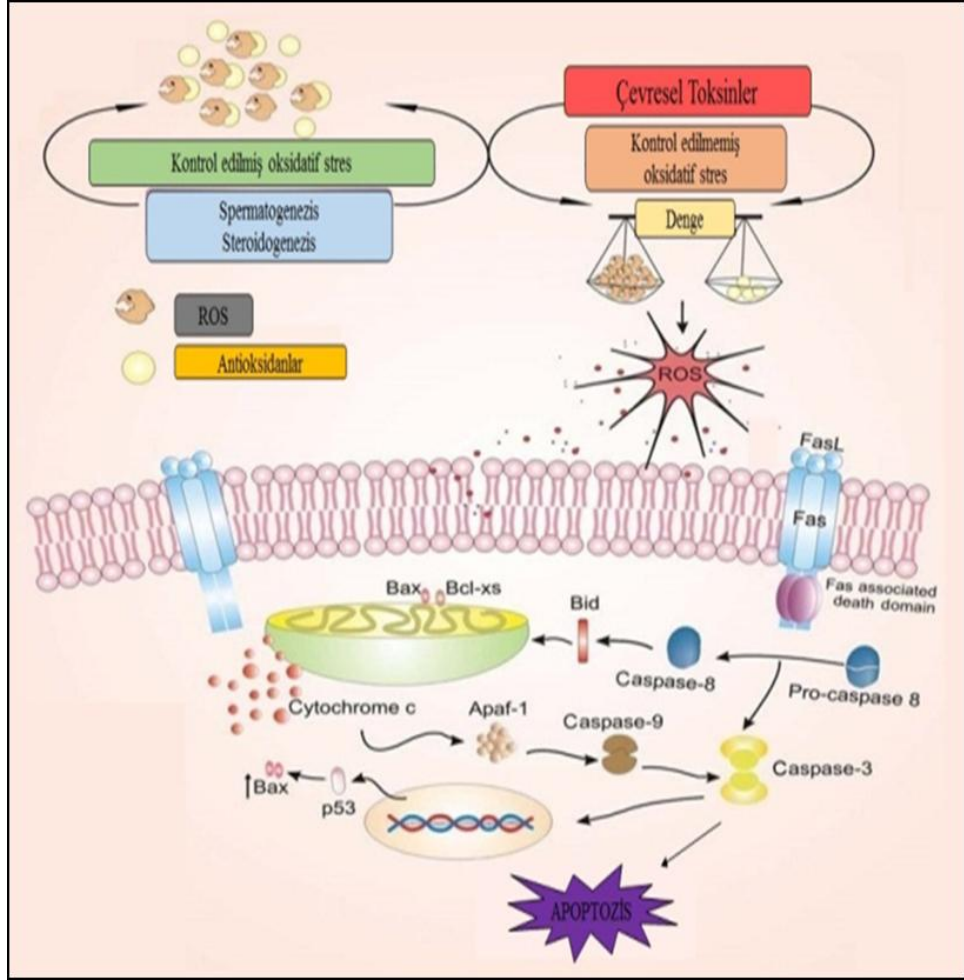
Memeli spermatozoa membranları, sperm akışkanlığına neden olan çoklu doymamış yağ asitlerinden zengindir. Fakat bu durum spermleri serbest radikal kaynaklı peroksidaz hasarlarına karşı duyarlı kılabilir(38). Fazla miktardaki ROS;

membran lipitleri, proteinleri, nüklear ve mitokondriyal DNA ile etkileşerek sperm üretimini ve kalitesini olumsuz bir şekilde etkileyebilir (50, 51). ROS kaynaklı DNA hasarı germ hücrelerindeki apoptozisi arttırdığı gözlemlenmiştir (52).

### **3.4. Apoptozis**

Programlanmış hücre ölümü ilk defa 1964 yılında ortaya çıkmış ve patolojik duruma göre, kontrollü ve sıralıdır(53). Gelişim süresince çok üretilen hücreler apoptozisle elenmektedir. Doku ve organın oluşumunda da apoptozisin rol oynamaktadır(54). Çevresel koşulların birçoğu testiküler hücrelerde oksidan antioksidan sistemleri arasındaki dengeyi bozarak apoptozis gibi birbirine bağlantılı diğer yolları aktive edip hasar oluşturmaktadır(55) (Şekil6).

Normal testiküler olaylarda meydana gelen ROS'lar testis fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir(56). Testislerdeki ROS'ların en önemli kaynağı semendeki fagositik lökositler olsa da, germ hücreleri de ROS üretiminde önemli potansiyele sahip oldukları bilinmektedir(57). Spermatogenez sırasında oluşan bu ROS'lar, testiküler apoptozisin düzenlenmesinde rol oynar(58). Testislerdeki apoptoziste intrinsik ve ekstrinsik apoptotik yollar kullanılmaktadır (59, 60).



Şekil 6: Apoptozis oluşum yolağı (56).

### 3.5. TRPM İyon Kanalları

TRPM ailesinde sekiz üye vardır. TRPC'lere benzer olarak TRPM proteinleri transmembran segmentler için TRP alanı C-terminaline bulunur. Aminoasit dizilerindeki benzerliğe dayalı bu proteinler TRPM1/3, TRPM4/5 ve TRPM6/7'den oluşan alt gruplara ayrılırlar. Birbirleriyle çok yakın ilişkileri olmasına karşın TRPM2 ve TRPM8 herhangi bir alt gruba yerleştirilmiyorlar. İlk tanımlanan TRPM1'dir ve buna başlangıçta melastanin denilmiştir. Kanalın ekspresyon düzeyleri melanomik hücre hatlarında metastatik potansiyeliyle ters orantı vardır. TRPM3, kültür hücrelerinde eksojen olarak eksprese edildiğinde

yapısal olarak aktif bir  $Ca^{+2}$  ve  $Mn^{+2}$  geçirgen kanalları bulunuyor. TRPM4 ve TRPM5 voltaj modülasyonlu,  $Ca^{+2}$  ile aktive olan, monovalent katyon seçici kanallar olmasından ötürü TRP süper ailesi arasında sıra dışı kanallardır. TRPM6 ve TRPM7 kanalları ise C terminallerindeki atipik protein kinaz alanları ile chanzyme'ler neden olur. TRPM8, normal sıcaklıkları (<23–28°C), mentol, ökapitol ve isilin gibi ferahlatıcı hissini veren bileşikler tarafından aktive olan, termal olarak düzenlenen kanaldır. TRPM2, intraselüler ADP-riboz, pirimidin nükleotidleri ve NAD tarafından aktive olan,  $Ca^{+2}$  geçirgen, spesifik olmayan bir katyon kanalına sahiptirler. (61).

### **3.5.1. TRPM2 İyon Kanalı**

#### **3.5.1.1.Yapısı**

TRPM2 (önceden LTRPC2 ya da TRPC7 olarak bilinen), tek bir Cterminal ADPR pirofosfataz alanına (Nudix-like domain ya da NUDT9 homology domain) sahip, seçici olmayan,  $Ca^{+2}$ una geçirgen, katyon kanalıdır (62). TRPM6/7 gibi, TRPM2; iyon kanalı ve C-terminal enzim alanı ikili fonksiyon yapısından dolayı “chanzyme” denilmektedir. Fare de TRPM2 geni; 34 ekzon içermekte ve yaklaşık 61 kb'lık bir alan kaplıyor (63). İnsan TRPM2 transkripti, ortalama 6,5 kb olup yaklaşık moleküler kütlesi 170 kDa olup 1503 aminoasitlik (fare ve ratlarda 1507 aminoasitlik) protein kodlarlar (64). TRPM2 proteini; intraselüler N ve C terminalleri tarafından sarılı 6 transmembran segment (S1-S6) ve S5 ile S6 arasında por oluşturan lob alanından oluşmaktadır (65). Buna karşın, TRPM2'nin N terminali 4 homolog alana ve kanal aktivasyonunun düzenmesine katılan kalmodulin (CaM) bağlayan IQ benzeri yapıda bulunur (66). TRPM2'nin işlevi TRPM Homoloji alanları (MHD)'nin önemi araştırılmaktadır. C terminali, bir



TRP kutusu ve TRPM2'nin homotetramerik düzeneği için bir bobin-bobin alanına sahiptir (67).

### 3.5.1.2. Aktivasyonu ve Düzenlenmesi

ADPR, TRPM2'nin birincil geçiş molekülüdür(68,69). ADPR, TRPM2'nin C ucundaki Nudix-like alanına yüksek oranda bağlanarak riboz 5-fosfat ve AMP'ye hidrolize olmaktadır(70). TRPM2 enzimatik aktivitesinin fizyolojik aktivitesi ortaya konulamaması, TRPM2'nin ADPR aracılı geçişini AMP'nin antagonize etmesi, TRPM2 aktivitesi için enzimatik aktivitenin negatif feedback inhibisyonu sağladığı düşünülmektedir(71). ADPR'nin bağlanmasıyla, TRPM2 kanalları açılıp ve sodyum ( $\text{Na}^+$ ), potasyum ( $\text{K}^+$ ) ve kalsiyum ( $\text{Ca}^{+2}$ ) iyonlarının PCa: PNa yaklaşık 0,3-0,9 arasında olarak geçirgenlik ile hücre içi geçişi sağlanmaktadır(61).TRPM2 akımları, bir lineer akım voltajının (IV)yaklaşık 0 mV ters bir potansiyel ile ilişkilidir. Tek bir kanalın iletkenliği sıradışı uzun süreli açık olma ile birkaç saniye aralığında yaklaşık 60 pS olarak bilinmektedir(72).ADPR aracılığıyla TRPM2'den geçiş inhibe edici, kolaylaştırıcı, düzenleyici mekanizmaya sahiptir. Negatif düzenleyiciler içerisinde AMP ve protonlar yer almasına karşın kolaylaştırma da ise  $\text{Ca}^{+2}$ , hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), sıklık ADPR (cADPR) ve nikotinic asit adenin dinükleotid fosfat (NAADP) olarak bilinmektedir. Düzenleyicilerin bi kısmının etkileri doğrudan kanal proteinine olur (67).Ekstraselüler  $\text{Ca}^{+2}$  ve intraselüler  $\text{Ca}^{+2}$  TRPM2 kanallarının tam aktivasyonunda da rol oynamaktadır. İntraselüler  $\text{Ca}^{+2}$ , kanalın ADPR'ye olan hassasiyetini arttırarak TRPM2 aktivasyonunu kolaylaştırır.

İşleyiş tam olarak bilinemese de CaM ile TRPM2'in IQ-like modelinin ya da diğer intraselüler bölgelerinin  $\text{Ca}^{+2}$ 'ye bağlı olup birleşmesiyle konformasyonel

değişiklikten çıkar(74).Ancak bazı araştırmalar  $Ca^{+2}$  indüklü aktivasyon gözlememişler ve yüksek konsantrasyonlardaki  $Ca^{+2}$ , ADPR üretimine ya da mitokondriden ADPR salınımına yol açarak aktivasyona neden olduğunu gözlemlemişlerdir (67).

TRPM2 kanallarının aktivasyon mekanizmaları bilinmese de,  $H_2O_2$  ve oksijen-nitrojen türlerini üreten bazı ajanlar tarafından da aktive edilebilir (75). Geçiş mekanizmasına takiben  $H_2O_2$ 'nin mitokondriden ADPR salınımı yapar (76).Yine,  $H_2O_2$  li TRPM2 akımlarının mitokondri içindeki ADPR konsantrasyonunun azaltılmasıyla baskılanabilir (77). Bu görüşlere karşıt olarak, Nudix alanından yoksun olan bir TRPM2 varyantı  $H_2O_2$ 'ye yine de yanıt verdiği söylenmektedir (78).

TRPM2'nin en fazla eksprese edildiği yer beyin olmakla birlikte kemik iliği, dalak, kalp, testis karaciğer ve akciğer gibi diğer dokularda ve pankreatik  $\beta$  hücreleri, endotelial hücreler, mikroglialar, nöronlar, kardiyomiyositler, immün hücreler vb. gibi hücre tiplerinde de tespit edildiği gözlemlenmiştir (67). Plazma membran kanalı da tanımlanmış olmasına karşın TRPM2'nin pankreatik  $\beta$  hücrelerinde bir lizozomal  $Ca^{+2}$  salınımı yapan kanal olarak işlev de gördüğü gözlemlenmiştir (79). Lizozomlarda olmasa da TRPV1, TRPC5, TRPC3, TRPM8, TRPML1-3 ve TRPM7 gibi TRP kanalların da intraselüler lokalizasyonlar bildirilmiştir. TRPM2 ve çeşitli TRP kanallarının hücresel lokalizasyonunu belirleyen faktörler ve bu hücresel lokalizasyonların özel bir hücresel işlev sağlayıp sağlamadığı hakkında çalışmalar yapılmaktadır(67).

### 3.5.1.3. TRPM2 ve Hücre Ölümü

TRPM2 insan beyni, lenfositleri ve monositlerinden klonlandığı bilinmektedir(72). TRPM2, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve reaktif oksijen türlerini üreten diğer ajanlar tarafından aktive edilmekle birlikte aktivasyonu intraselüler serbest kalsiyum (Ca<sup>2+</sup>) konsantrasyonunda artış ile sonuçlanır(80). TRPM2'nin HEK293 hücrelerindeki heterolog ekspresyonu, Ca<sup>2+</sup> yükselmesi ile ilişkili olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indüklü hücre ölümüne neden olmaktadır. Dahası, endojen TRPM2 ekspresyonunun rat insülinoma RIN-5F ve monosit U937 hücrelerinde baskılanmasıyla Ca<sup>2+</sup> akımında ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ya da tümör nekrozis faktör (TNF) tarafından indüklenen hücre ölümünde görülür derecede azalmaya neden olmaktadır(74). Bu veriler, oksidatif stresi takiben hücre ölümüne aracılık eden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından aktive edilen kalsiyuma geçirgen endojen bir kanal olarak TRPM2'nin fizyolojik olarak desteklerler. Zhang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (2003), insan hematopoietik hücrelerinde, tahmin edilen altı C-terminal transmembran alanın dört tanesinden ve kalsiyuma geçirgen putatif por bölgesinden yoksun olan TRPM2'nin kesik bir izoformunu gözlenlemiştir. TRPM2'nin bu kısa formunun (TRPM2-S) tam uzunluktaki (TRPM2-L) ile ilişkilidir. Dijital bir video görüntüleme sistemi kullanılarak, sadece transfekte edilmiş TRPM2-S eksprese eden 293T hücreleri yeşil flüoresan protein (GFP) varlığı ile ve transfekte edilmiş TRPM2-L eksprese eden hücreler mavi flüoresan proteinin (BFP)'nin saptanması ile tanımlanmıştır.

Çalışmalarda Ca<sup>2+</sup> eş zamanlı olarak Fura Red flüoresan ile ölçülerek, TRPM2-L aracılığıyla TRPM2-S'in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indüklü kalsiyum akışını baskılama yeteneği gösterilmiştir. Ayrıca TRPM2-S, TRPM2-L aracılı H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından

indüklenen hücre ölümüne olan hassasiyeti inhibe etmiştir. Bu veriler, TRPM2-S ile TRPM2-L arasındaki ilişkinin oksidatif strese hücrel yanıtın yanı sıra kanal aktivitesinin düzenlenmesi için de önemli bir mekanizma olduğunu söylenmektedir(77).

### **3.6.Antioksidanlar**

Antioksidanlar, hücrelerin serbest radikalleri olup stabil olmayan moleküllere karşı koruyan maddelerdir. Serbest radikallerle etkileşilerek stabilize hale getirip neden olacakları hasarları engellerler (81).

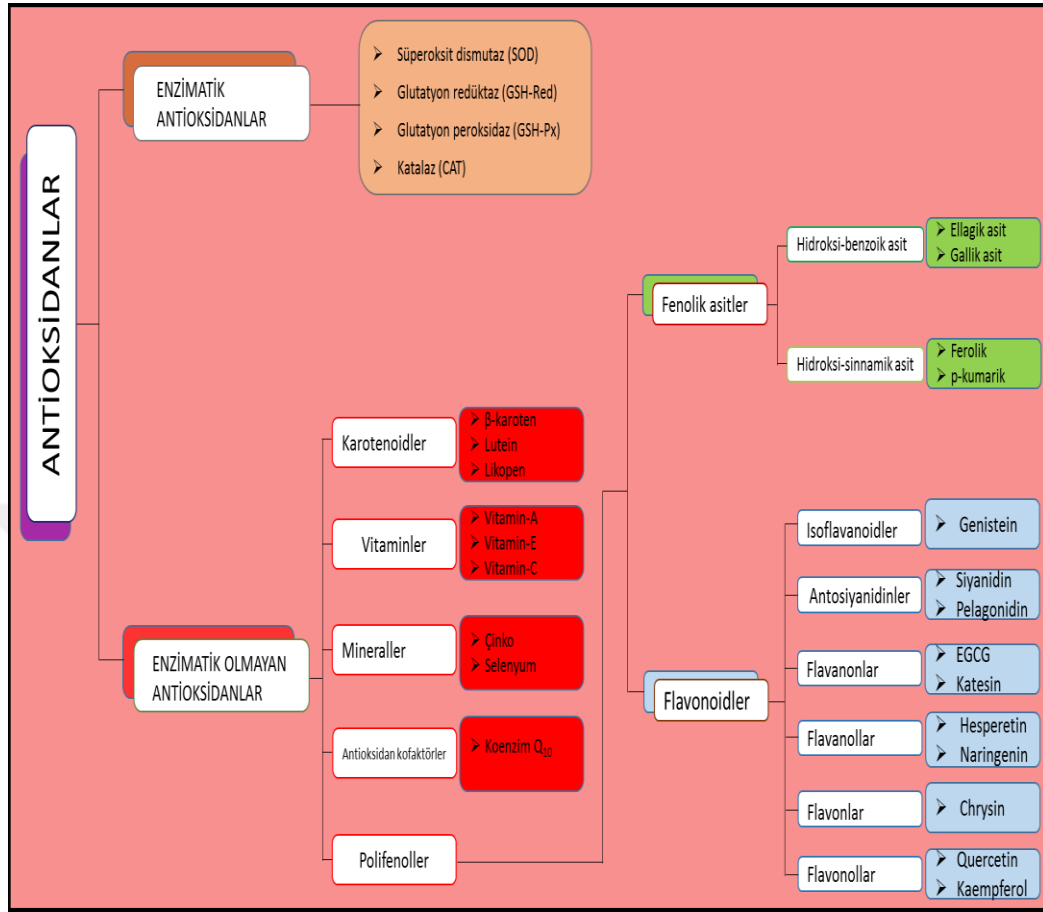
Oksidasyon tepkimeleri yaşam için elzem olmasına rağmen aynı zamanda da hücreler açısından oldukça tehlikeli sayılır. Bu yüzden canlılar farklı antioksidanlardan oluşup, kompleks antioksidan koruma sistemlerine de sahiptirler. Antioksidanların seviyelerindeki düşüş veya antioksidan enzimlerin aktivitesinin baskılanması hücrel hasarlara ve hücre ölümüne neden olan oksidatif stresi oluşturur (82).

Antioksidanlar Gutteridge ve Halliwellin'e göre 3 kategoriye ayrılır. Bunlar;

- 1-)Primer antioksidanlar,
- 2-) Sekonder antioksidanlar,
- 3-) Tersiyer antioksidanlardır (62).

Enzimatik antioksidanlar doğrudan veya dolaylı yollarla ROS'lara karşı savunmaya da katkıda bulunabilirler. CAT, SOD, GSH-Px ve GSH-Rd bunlara örnek verilebilir. Non-enzimatik antioksidanlardan GSH, vitamin E ve vitamin C, ROS ve RNS'leri süpürücü; ürik asit ise plazma, albumin, N-asetilsistein ve melatonindeki peroksinitritleri süpürücü işlem yapmaktadır(83) (Tablo 2).

**Tablo 2:** Antioksidanların sınıflandırılması(83).



### 3.7. N-Asetil Sistein (NAS)

N-asetilsistein (NAS), bir thiol bileşiği olup L-sistein ve glutasyon olarak bilinmektedir. Nasetilsistein deasetilasyona uğrayarak sisteini oluşturur. Sistein, glutasyon sentezinde kullanılır (84). Sisteine göre NAS daha az toksiktir, bu yüzden oksidasyona daha az duyarlı olması ve suda çözünebilir olması avantaj sağlar. Bu özelliği ile NAS organizmada sistein kaynağı olarak önemlidir. NAS direkt antioksidan etki gösterebilmesinin yanı sıra, organizmada glutasyon sentezi için sistein sağlayıp, karaciğerde glutatyona çevrilip dolaşıma katıldığı bilinmektedir (85).

NAS genellikle pratik uygulamalarda mukolitik olarak kullanılır. Piyasada intravenöz ve oral olarak bulunur. İlaç antioksidan etkinliğinin olması ve yan etkisi düşük olduğu için farklı alanlarda kullanılabilir. NAS genellikle pratik uygulamalarda mukolitik olarak kullanılır. Piyasada intravenöz ve oral olarak bulunur. İlaç antioksidan etkinliğinin olması ve yan etkisi düşük olduğu için farklı alanlarda kullanılabilir.

Antioksidan, antiinflamatuar ve hücre koruyucu etkilerinin olmasının yanında, mikrovasküler kan akımını da artırır ve endotelial koruma sağladığı bilinmektedir(86). Yapılan çalışmalar da NAS'in (ROS) kaynaklı apoptotik süreci ve redoks potansiyel dengesizliğini baskıladığı görülmüştür. NAS'in bu özelliği yapısındaki tiyolün nükleofilik ve antioksidan özelliklerine bağlıdır (87). NAS'in kullanıldığı diğer bir alan ise parasetamol intoksikasyonlarıdır. Asetaminofenin hemen hemen % 4'ü karaciğerde sitokrom p-450 tarafından toksik bir ürün olan N-asetil-pbenzokuinoneimine metabolize olup, aşırı GSH düşmesiyle kalıcı karaciğer hasarına neden olur. Asetaminofenin detoksifikasyonu yüksek konsantrasyon da GSH gerektirir (88).NAS bir glutatyon olarak yüksek dozlarda da klinik tabloda kullanılır.

Yapılan çalışmada NAS hipokloröz asit, OH ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi radikallere karşı temizleyici etki gösterip O<sub>2</sub> ile etkileşimi yoktur (89). Radikal toplayıcı etkisinin in vitro hızlı olmasına karşın in vivo hızlı bir şekilde parçalandığı için antioksidan etkisi indirektir (89). Literatürler de kontrast ilişkili nefropati önleyerek tedavisinde hücre içi GSH'yi ve NO sentezini artırıp etkisini gösterdiği gözlemlenmiştir. Yapılan bir çalışmada ise femoral arter bazlı bir ada flebinde oluşturulan iskemi reperfüzyonda NAS tedavisinin nükleer faktör B aktivitesini baskıladığı ve nekroz alanını azalttığı gösterilmiştir (90). Yine sıçanlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada, NAS'in yanıktaki staz bölgesi nekrozunu engelleyici etkisi araştırılıp; yanık alanı ve derinliği azaltılarak yanık hasarında koruyucu

etkisi olduğu gözlemlenmiştir (83). NAS'in sülfidril grupları içermesinden dolayı yeni oluşan kollajenin yapımın da peptit bağların da oluşan ve kollajen molekülüyle ekstrasellüler matriks bileşenleriyle arasındaki disülfid bağlarının oluşmasını engelleyip kollajenin bağ dokusundaki stabilazasyonunu bozduğu gözlemlenmiştir (91).

### **3.8. Araştırmanın Amacı**

Bu yapılan çalışmada torsiyon-detorsiyonla oluşturulan testis dokusundaki hasara karşı NAS'in koruyucu etkilerinin TUNEL metodu, histokimyasal, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle incelenmesi amaçlanmıştır.

#### 4. GEREÇ-YÖNTEM

Bu yapılan çalışma, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 22/11/2017 tarih ve 2017/21 sayılı 236 no'lu kararı gereğince etik yönden uygun olduğu görülerek, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM), Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarları ve Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında yapıldı.

Çalışma bütçesinin tamamı Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (FÜBAP)'nin TF. 18.12 proje no'lu kararı gereğince karşılandı.

##### 4.1. Deney Hayvanlarının Beslenmeleri ve Barındırılmaları

Çalışmamızda FÜDAM'dan temin edilen ortalama ağırlığı  $200 \pm 10$  gr olan 35 adet 8-10 haftalık erişkin Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Çalışmada kullanılan deney hayvanları FÜDAM hayvan laboratuvarında 12 saat (07:00-19:00) aydınlık - 12 saat (19:00- 07:00) karanlık periyodunda,  $21 \pm 1$  °C ortam sıcaklığında takip edildi. Özel olarak tasarlanmış kafeslerde barındırılan sıçanlar, Elazığ Yem Sanayi A.Ş. Yem Fabrikası'nda özel olarak hazırlanmış pelet yem şeklindeki sıçan yemleriyle beslenerek ad libitum su ve yiyecek alımları sağlandı. Pelet yemlerin içeriği tablo 3'de gösterilmiştir.

Yemler için çelik kaplar, su için ise paslanmaz çelik bilyeli cam biberonlar kullanıldı.



**Tablo 3:** Deney hayvanlarına verilen rat yeminin içeriği

| Madde adı (%)  | Miktarı |
|----------------|---------|
| Buğday         | 15      |
| Mısır          | 10      |
| Arpa           | 27      |
| Kepek          | 8       |
| Soya           | 29,4    |
| Balık unu      | 8       |
| Tuz            | 0,6     |
| Kavimix VM23-Z | 0,2     |
| Methionin*     | 0,2     |
| DCP**          | 1,6     |

#### 4.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

35 adet erkek sıçan deney başlangıcında ilk tartımları yapıldıktan sonra her grupta 7 adet erkek sıçan olacak şekilde rastgele 5 gruba ayrıldı.

**Grup I: Kontrol grubu (n:7);** Bu gruptaki erkek sıçanlara deney boyunca herhangi bir işlem uygulandı.

**Grup II: Sham grubu (n:7);** Cerrahi olarak batın açılarak sol testis dışarı alınıp herhangi bir işlem yapılmadan 60 dakika bekletildikten sonra tekrar batın içerisine alınıp normal konumuna yerleştirilip kapatıldı.

**Grup III: NAS grubu (n:7);** Bu gruptaki erkek sıçanlara tek doz 100 mg/kg NAS intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı.

**Grup IV: Torsiyon–detorsiyon grubu (n:7);** Cerrahi olarak batın açılarak sol testis dışarı alınıp saat yönü tersine 720 derece döndürülüp torsiyon oluşturuldu. 60 dakikalık torsiyon süresi sonunda detorsiyon yapılan testis tekrar batın içerisine alınıp normal konumuna yerleştirilip kapatıldı.

**Grup V: Torsiyon–detorsiyon + NAS grubu (n:7);** Cerrahi olarak batın açılarak sol testis dışarı alınıp saat yönü tersine 720 derece döndürülüp torsiyon oluşturuldu. 60 dakikalık torsiyon süresi sonunda tek doz 100 mg/kg NAS intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı, detorsiyon yapılan testis tekrar batın içerisine alınıp normal konumuna yerleştirilip kapatıldı. Torsiyon ve detorsiyon yapılacak gruptaki sıçanlara anestezi uygulandıktan sonra batın, orta hatta laparotomi insizyonu ile açıldı. Testisler karın içine alınarak sol testisler saat yönü tersine 720 derece döndürülüp torsiyon edildikten sonra alt ve üst kutuplarından karın duvarına tespit edildi. 60 dakika torsiyon süreleri tamamlandıktan sonra testisler detorsiyon edilerek normal konumlarına tekrar konuldu. 48 saat sonra tüm gruptaki erkek sıçanlar anestezi altında dekapite edilerek çalışma sonlandırıldı.

#### **4.3. Doku Örneklerinin Alınması**

48 saatlik deney süresi sonunda tüm gruptaki erkek sıçanlar intraperitoneal olarak uygulanan ketamin (75 mg/kg) + xylazine (10 mg/kg) anestezisi altında dekapite edildi. Ratların testis, seminal vezikül, prostat bezi ile epididimis dokuları hızla çıkarıldı histolojik analizler için bouin solüsyonuna alındı.

Biyokimyasal analizler için ratlardan kan örneği ile testis dokusu alındı. Doku örnekleri ve kandan elde edilen serum daha sonra çalışılmak üzere -80 °C’de saklandı.

#### **4.4. Histolojik Değerlendirmeler**

Testis dokuları bouin solüsyonunda yaklaşık 8 saat boyunca tespit edilip sırasıyla % 50’lik, % 60’lık ve % 70’lik etil alkol solüsyonlarında yıkama işlemi

yapıldı. Yıkanan dokular rutin histolojik takip serilerinden (Tablo 4) geçirilip dehidrate edildi. Dehidratasyondan sonra ksilolde parlatılarak parafine ( P3558-1kg Sigma-Aldrich Paraplast Embedding Media, U.S.A) gömüldü. Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında kesitler rodajlı ve polilizinli lamlara alındı. Hazırlanan preparatlar Hematoksilen- Eozin (H&E) boyası, Periyodik Asit Schiff (PAS) boyası ve Masson'un üçlü boyası ile boyandı. Işık mikroskopunda (Novel N-800M x20) incelenip fotoğraflandı.

**Tablo 4:** Histolojik Takip İşlem Basamakları

| SIRA | İŞLEM                          | SÜRE      |
|------|--------------------------------|-----------|
| 1    | % 70 Alkol                     | 2 saat    |
| 2    | % 80 Alkol                     | 1.5 saat  |
| 3    | % 96 Alkol                     | 30 dakika |
| 4    | % 96 Alkol                     | 30 dakika |
| 5    | % 100 Alkol                    | 30 dakika |
| 6    | % 100 Alkol                    | 30 dakika |
| 7    | Alkol + Ksilol                 | 15 dakika |
| 8    | Ksilol I                       | 10 dakika |
| 9    | Ksilol II                      | 20 dakika |
| 10   | Yumuşak parafin + Ksilol       | 45 dakika |
| 11   | Yumuşak parafin                | 1 saat    |
| 12   | Yumuşak parafin – Sert parafin | 1.5 saat  |
| 13   | Sert Parafin                   | 3 saat    |
| 14   | Gömme                          |           |

#### 4.5. TUNEL Metodu

Soğutulan parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında kesitler polilizinli lamlara alındı. Pozitif kontrol için meme dokusu kullanıldı. Negatif kontrol için doku üzerine Tdt enzimi yerine Reaction Buffer kullanılarak diğer basamaklarda herhangi bir değişiklik yapılmadı.

Kit içeriğinde belirtilen (Lot No: 2470976, ApopTag Plus Peroxidase InSitu Apoptosis Detection Kit, Millipore) ve Tablo 5’ de gösterilen terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end-labeling (TUNEL) boyama işlemleri uygulanarak apoptozise giden hücreler belirlendi.

Hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskobunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. Değerlendirmede Harris hematoksilen ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi çekirdek boyaması gösteren hücreler ise apoptotik hücreler olarak kabul edildi.

Kesitlerde 10'luk büyütmede rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik en az 500 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücelere oranlanması ile Apoptotik indeks (AI)'i hesaplanarak istatistiksel analizleri yapıldı.

**Tablo 5:** TUNEL işlem basamakları boyaması.

| SIRA | İŞLEM   | SÜRE           |
|------|---|----------------|
| 1    | 60°C etüv   | Bir gece       |
| 2    | Ksilol  | 3x15<br>dakika |
| 3    | % 100, % 96, % 80, % 70 etil alkol                              | 3'er dakika    |
| 4    | PBS ( phosphate buffered saline)                                | 5 dakika       |
| 5    | Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.             |                |
| 6    | 1:500 dilüsyondaki Protinaz K solüsyonu                         | 7 dakika       |
| 7    | PBS   | 3x5 dakika     |
| 8    | Endojen peroksit blokajı (%3 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )    | 5 dakika       |
| 9    | PBS   | 3x5 dakika     |
| 10   | Equilibration tampon solüsyonu                                  | 6 dakika       |
| 11   | Çalışma solüsyonu (% 70 µl Reaction Buffer + % 30 TdT Enzyme)   | 60 dakika      |
| 12   | Stop/Wash Buffer ( 2 ml ) + Distile su (68 ml) oda sıcaklığında | 10 dakika      |
| 13   | Anti-Digoxigenin-Peroxidase                                     | 30 dakika      |
| 14   | PBS   | 3x5 dakika     |
| 15   | DAB Dilution Buffer ( 600 µl ) + DAB Substrate (12 µl )         | 5-10<br>dakika |
| 16   | PBS   | 3x5 dakika     |
| 17   | Distile su  | 5 dakika       |
| 18   | Harris hematoksilin   | 1-5 dakika     |
| 19   | Distile su  | 5 dakika       |
| 20   | Uygun kapatma solüsyunu ile kapatma.                            |                |

#### 4.6. İmmunohistokimyasal Değerlendirme

**Tablo 6:** İmmünohistokimyasal boyama prosedürü

| SIRA | İŞLEM                            | SÜRE       |
|------|----------------------------------|------------|
| 1    | Ksilol I                         | 10 dakika  |
| 2    | Ksilol II                        | 10 dakika  |
| 3    | Ksilol III                       | 10 dakika  |
| 4    | % 100 Alkol                      | 10 dakika  |
| 5    | % 96 Alkol                       | 10 dakika  |
| 6    | % 80 Alkol                       | 10 dakika  |
| 7    | Distile su                       | 5 dakika   |
| 8    | Mikrodalga                       | 7+5 dakika |
| 9    | Oda ısısında soğutma             | 20 dakika  |
| 10   | PBS                              | 3x5 dakika |
| 11   | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>    | 10 dakika  |
| 12   | PBS                              | 3x5 dakika |
| 13   | UV blok                          | 5 dakika   |
| 14   | Primer antikor                   | 60 dakika  |
| 15   | PBS                              | 3x5 dakika |
| 16   | Sekonder antikor                 | 30 dakika  |
| 17   | PBS                              | 3x5 dakika |
| 18   | Streptavidin Peroksidaz          | 20 dakika  |
| 19   | PBS                              | 3x5 dakika |
| 20   | AEC                              | 5 dakika   |
| 21   | Distile su                       | 5 dakika   |
| 22   | Mayer's hematoksilen             | 10 saniye  |
| 23   | Çeşme suyu                       | 5 dakika   |
| 24   | Özel kapatma maddesi ile kapatma |            |

Testis dokusunda TRPM2 immünreaktivitesinin belirlenmesi için Avidin Biotin-Peroksidaz Kompleksi yöntemi uygulandı. (Tablo 6).

Polilizinli lamlara soğutulmuş parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında kesitler alındı. Ksilol ile deparafinizasyon ve şeffaflaştırma işleminden sonra dokular azalan dereceli alkol serilerinden geçirilip antigen retrieval için sitrat tampon solüsyonunda pH: 6'da mikrodalga fırında (750W) 12 dakika kaynatıldı.

Endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bloker (TA-125-HP Lot No: HP18180, Hydrogen Peroxide Block, Thermo Scientific ) ile muamele edildi.

Zemin boyasının olmaması için 5 dakika Ultra V Block (TA-125-UB, Ultra V Block, Thermo Scientific) solüsyonu uygulamasından sonra primer antikor (PA1712-1 Lot No: 01714jd011231, Polyclonal Anti-NOS3Antibody, Boster Immunoleader) damlatılan dokular 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra dokular, PBS (P4417-100TAB, Phosphate Buffered Saline, Sigma Aldrich) ile yıkandı. 30 dakika boyunca nemli ve karanlık ortamda oda ısısında sekonder antikor (TP-060-BN, Biotinylated Goat Anti-Poliyvalent (anti-mouse / rabbit IgG), Thermo Scientific) ile inkübe edildi. PBS ile yıkanan dokular Horse Radish Peroksidaz (HRP) (TS-060-HR, Streptavidin Peroxidase, Thermo Scientific,) enzimi ile 30 dakika boyunca nemli ortamda oda ısısında inkübe edildikten sonra PBS 'e alındı.

Testis dokularına AEC (3-Amino-9-ethyl carbazole) substrat solüsyonu (TA-060HA, AEC Substrate System, Thermo Scientific ) damlatıldı. Reaksiyon ışık mikroskobu altında görüntü sinyali alındıktan sonra bütün dokularda eş zamanlı olarak distile suyla sonlandırıldı. Mayer's hematoksilen ile zıt boyaması yapıldı.

Distile su ile yıkanan preparatlar kapatma solüsyonuyla (Large Volume Vision Mount, TA-125-UG, Lab Vision Corporation, USA) kapatıldı.

Negatif kontrol olarak kullanılan dokularda ise primer antikor yerine PBS kullanıldı, diğer basamaklarda herhangi bir değişiklik yapılmadı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda (Novel N-800M x20) incelenerek değerlendirilme işlemi yapıldıktan sonra fotoğraflandı.

İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde; immünreaktivitenin yaygınlığı (0.1: <%25, 0.4: %26-50, 0.6: %51-75, 0.9: %76 100) ve şiddeti (0: yok, +0.5: çok az, +1: az, +2: orta, +3: şiddetli) esas alınarak histoskor oluşturuldu (Histoskor= yaygınlık x şiddet).

#### **4.7. Biyokimyasal Analizler**

Dekapitasyondan hemen sonra eksize edilen testis dokuları serum fizyolojik ile yıkanıp -80 °C'de çalışma gününe kadar muhafaza edildi. Deney hayvanlarından alınan kanlar düz biyokimya ve aprotininli tüpler içine alındı. Kanlar 4000 rpm de 5 dakika santrifüj edilecek ve elde edilen serumlar ile alınacak doku örnekleri -80 de çalışılincaya kadar saklandı. Sıçanların doku ve serum örneklerinde PCR ve ELISA yöntemleri ile TRPM2,TAS ve TOS miktarlarına bakıldı.

Rat serum örnekleri ve testis doku süpernatantlarında TOS (Total oxidant status) düzeyleri, (Rat TOS Katalog no: YLA1392Ra YL Biotechnology Co., Ltd,Shanghai, CHINA ), Elisa yöntemiyle kit kataloglarında belirtilen çalışma prosedürlerine uygun olarak çalışıldı. Rat TOS elisa kitinin ölçüm aralığı: 0,02-60 U /mL, Intra-Assay: CV değeri <10%, Inter-Assay: CV değeri <12 %, Sensitivitesi 0,013 U /mL idi. Plate yıkamalarında otomatik yıkayıcı Bio-Tek



ELX50 (BioTek Instruments, USA), absorbans okumalarında ChroMate, Microplate Reader P4300 cihazları (AwarenessTechnology Instruments, USA) kullanıldı. Test sonuçları serum örnekleri için U/mL doku örnekleri için dilüsyon faktörü ile çarpılarak U/mg olarak belirtildi.

Rat serum örnekleri ve testis doku süpernatantlarında TAS (Total antioxidant status) düzeyleri, (Rat TAS Katalog no: YLA3389RA YL Biotechnology Co., Ltd,Shanghai, CHINA ), Elisa yöntemiyle kit kataloglarında belirtilen çalışma prosedürlerine uygun olarak çalışıldı. Rat TAS elisa kitinin ölçüm aralığı: 1-300 pg/mL, Intra-Assay: CV değeri <10%, Inter-Assay: CV değeri <12 %, Sensitivitesi 0,54 pg/mL idi. Plate yıkamalarında otomatik yıkayıcı Bio-Tek ELX50 (BioTek Instruments, USA), absorbans okumalarında ChroMate, Microplate Reader P4300 cihazları (AwarenessTechnology Instruments, USA) kullanıldı. Test sonuçları serum örnekleri için pg/mL doku örnekleri için dilüsyon faktörü ile çarpılarak pg /mg olarak belirtildi.

#### **4.8. İstatistiksel Analiz**

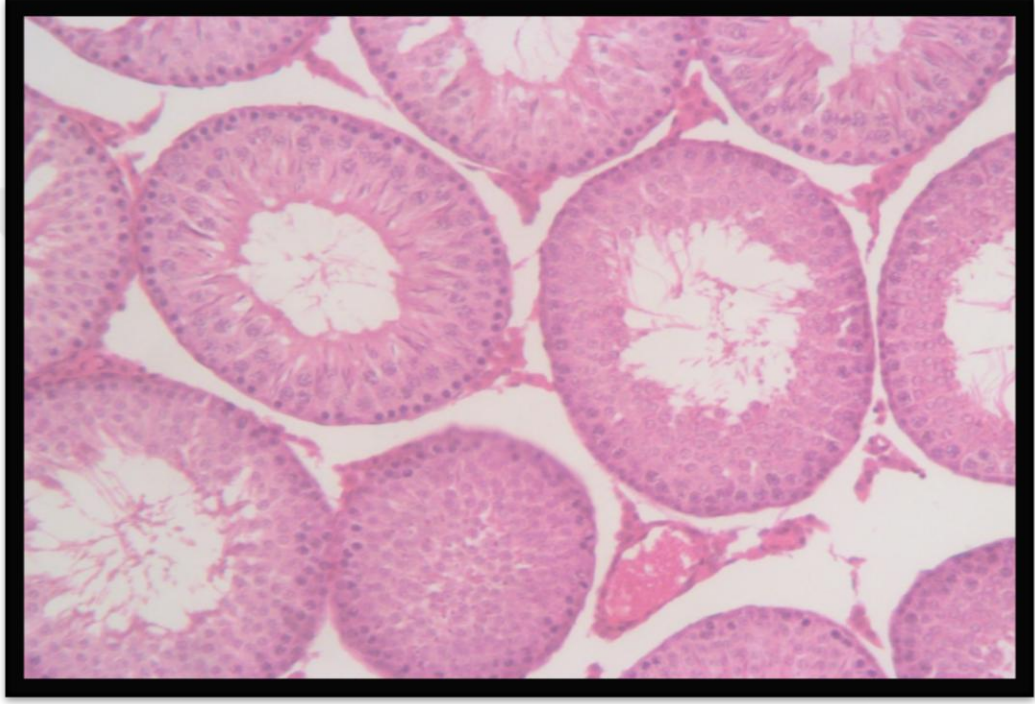
Tüm istatistiksel analizler için SPSS 22.0 (Statistical Package for Social Sciences) paket programını kullanıldı. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma değerleri olarak sunuldu.  $p < 0.05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi.

Normal dağılım gösteren çoklu grupların aralarındaki farklılıkları test etmek için ise Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) uygulandı. İkili karşılaştırmalar için ise Post-hoc Tukey testi kullanıldı.

## 5. BULGULAR

### 5.1. Histolojik Değerlendirmeler

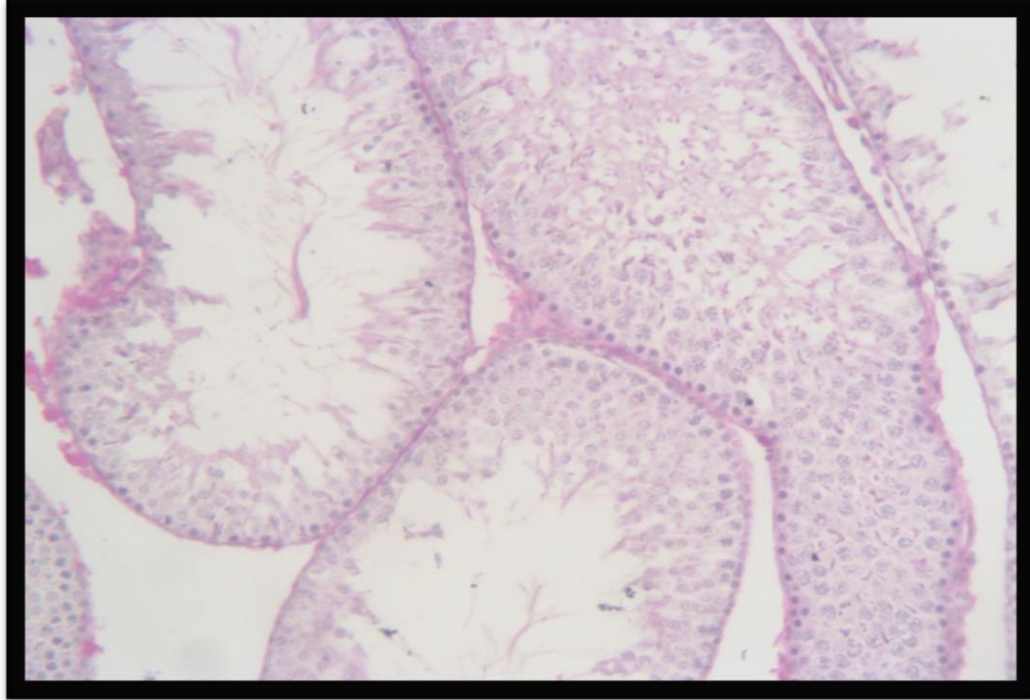
Kontrol grubundan (grup I) alınan kesitleri incelendiğimizde seminifer túbüllerin germinal epiteliyle bazal membranları ve interstisyel alanın normal yapıda olduğu gözlemlendi(Şekil7-9).



**Şekil 7:** Kontrol grubu. Normal görünümlü seminifer túbül germinal epiteli, interstisyel alan ve normal spermatogenez H&E x200.

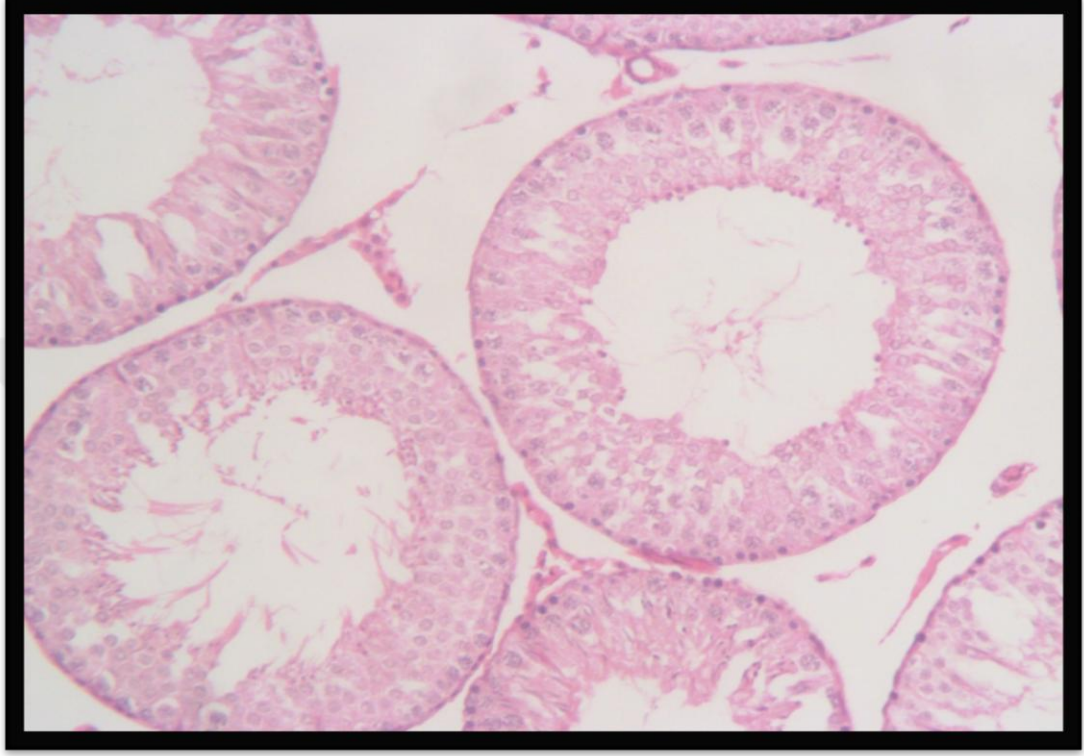


**Şekil 8:** Kontrol grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli, interstisyel alan ve normal spermatogenez H&E x400.



**Şekil 9:** Kontrol grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli, bazal membranı ve interstisyel alan ve normal spermatogenez PAS x400.

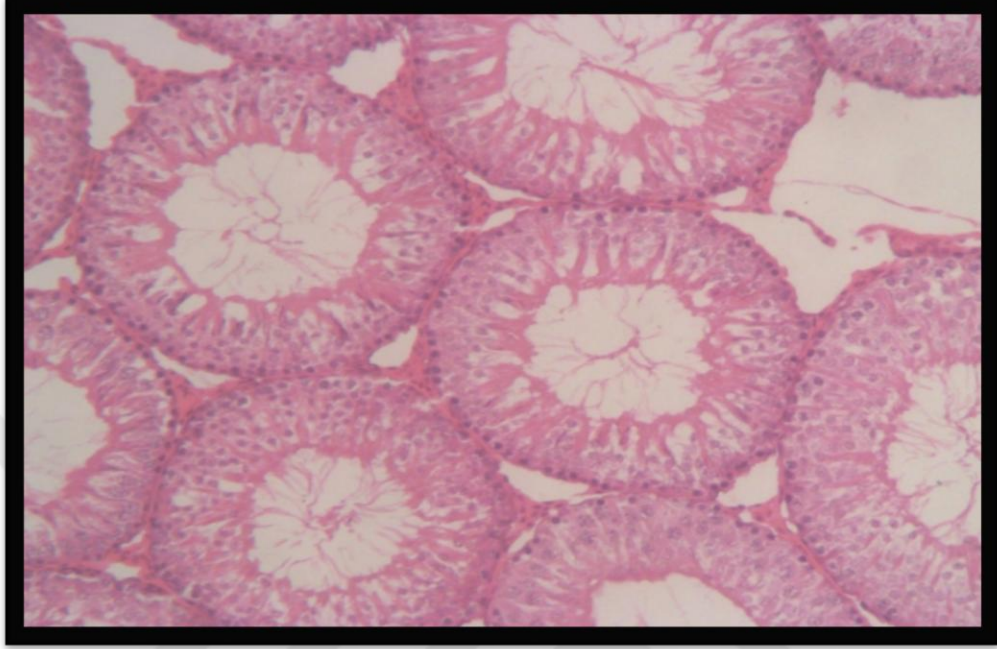
Sham grubundan (grup II) alınan kesitlerde ise kontrol grubuna benzer seminifer túbülleri, germinal epiteli ve Leydig hücreleri ile bazal membran normal olduğu gözlemlendi. (Şekil 10).



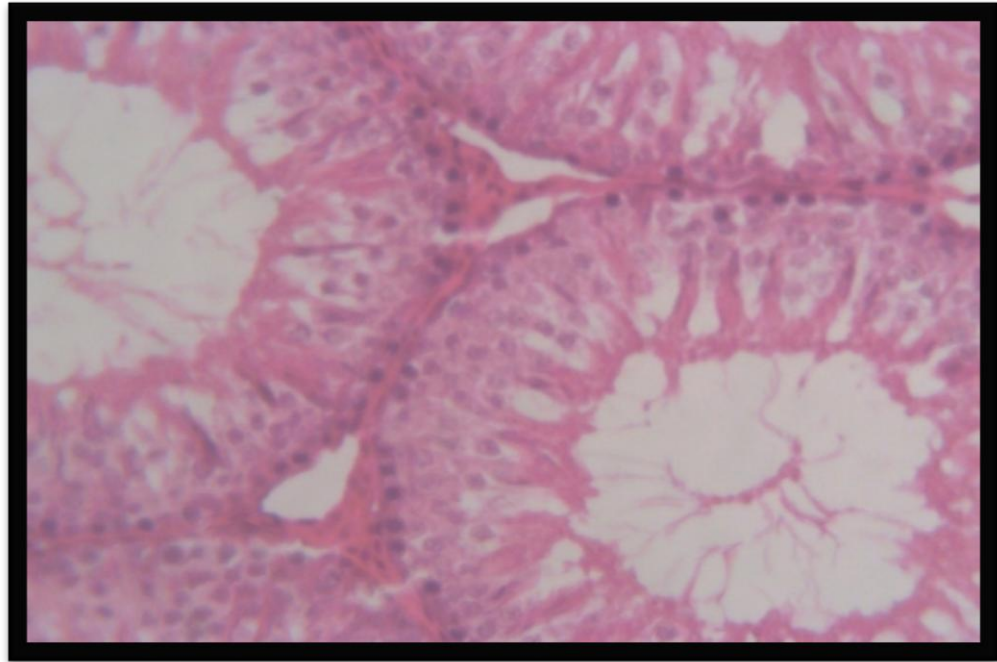
**Şekil 10:** Sham grubu. Normal görünömlü seminifer túbül germinal epiteli , interstisyel alan ve normal spermatogenez H&E x200.



NAS grubuna (grup III) ait testis dokusu normal yapıda gözlemlendi.  
(Şekil 11-13).



**Şekil 11:** NAS grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli, interstisyel alan ve normal spermatogenez H&E x200.

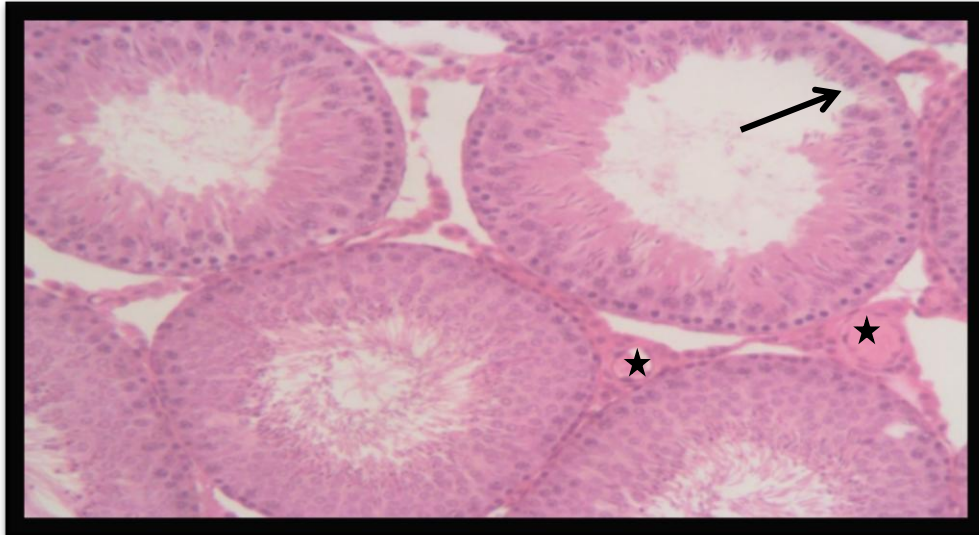


**Şekil 12:** NAS grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli, interstisyel alan ve normal spermatogenez H&E x400.



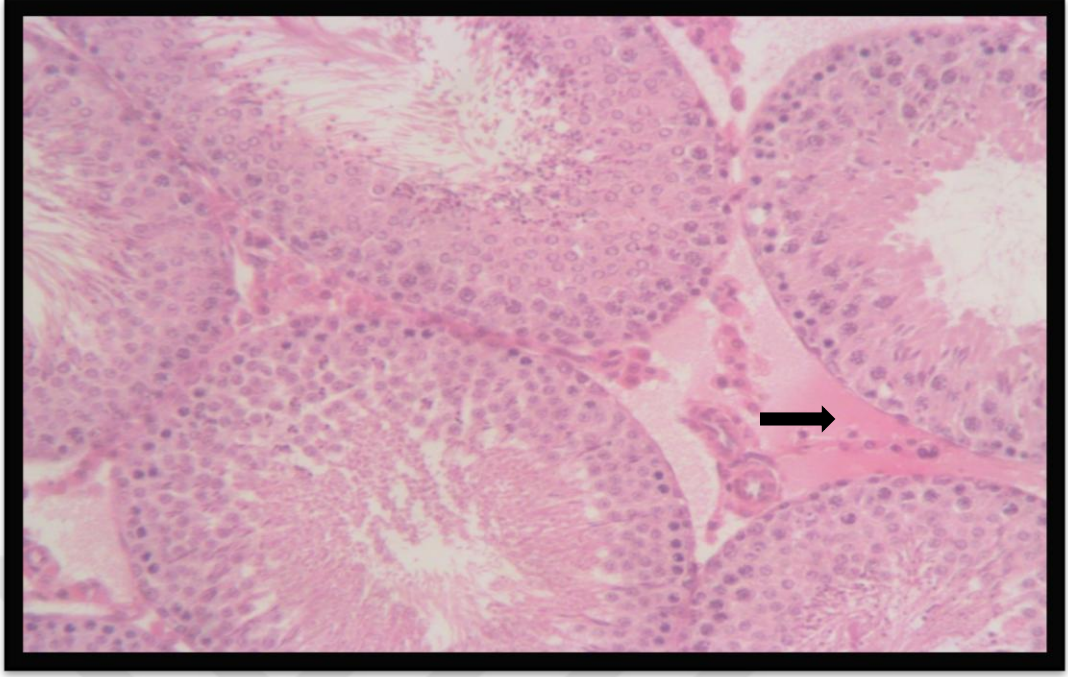
**Şekil 13:** NAS grubu. Normal görünümlü seminifer tübül germinal epiteli, bazal membranı ve interstisyel alan ve normal spermatogenez PAS x200.

Torsiyon-Detorsiyon uygulanan grupta (grup IV) testis dokularında damarlarda konjesyon, seminifer tübül germinal epitelinde ayrılmalar, seminifer tübül lümenine dökülmüş immatür hücreler, olduğu gözlemlendi (Şekil 14-17).

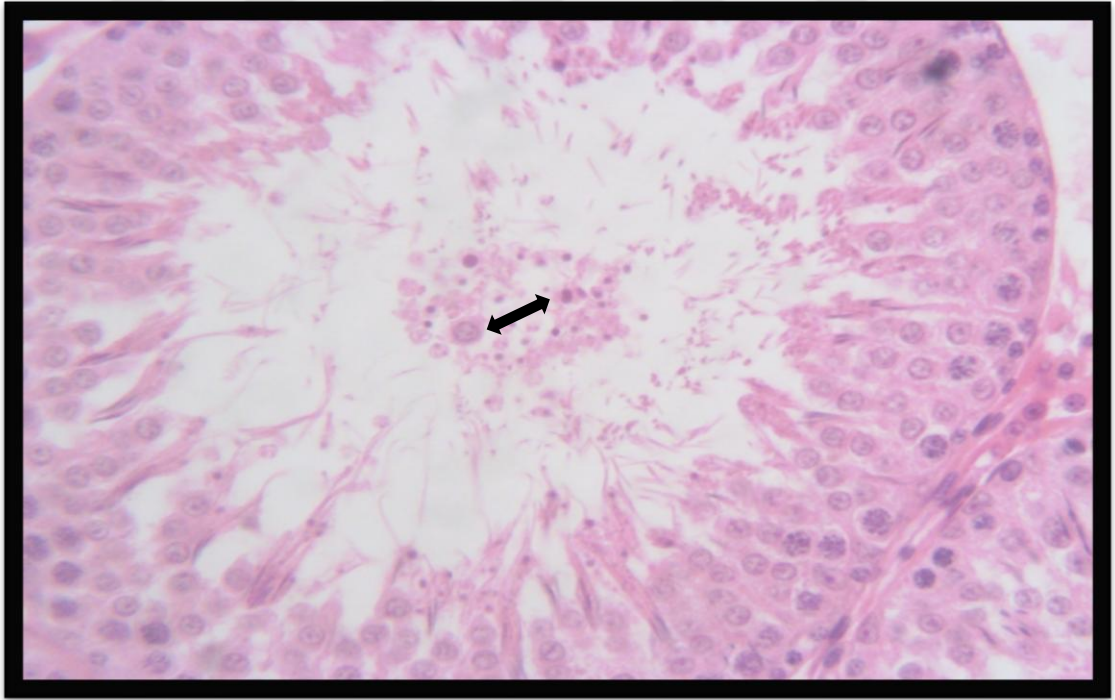


**Şekil 14:** Torsiyon-detorsiyon grubu. Konjesyon(yıldız) ve seminifer tübül germinal epitelinde dejenerasyon (ince ok) H&E x200.

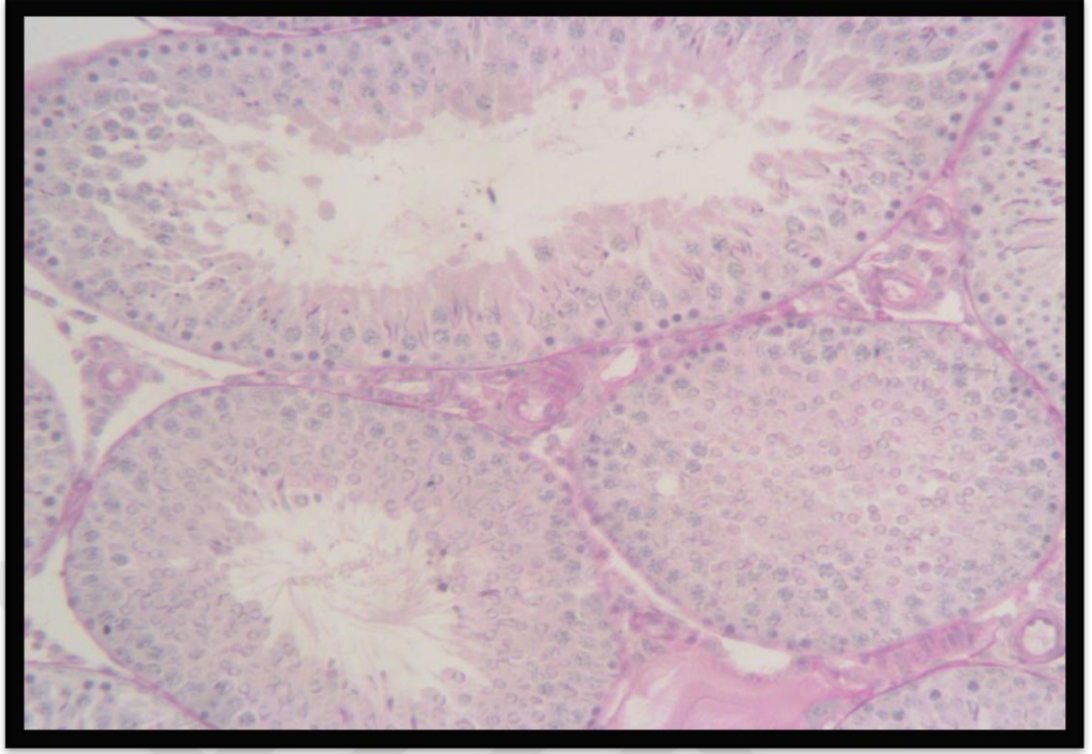




**Şekil 15:** Torsiyon -detorsiyon grubu. interstisyel alanda ödem (kalın ok) H&E x200.



**Şekil 16:** Torsiyon-detorsiyon grubu. Seminifer tübül lümenine dökülmüş immatür hücreler (çift taraflı ok)H&E x200.



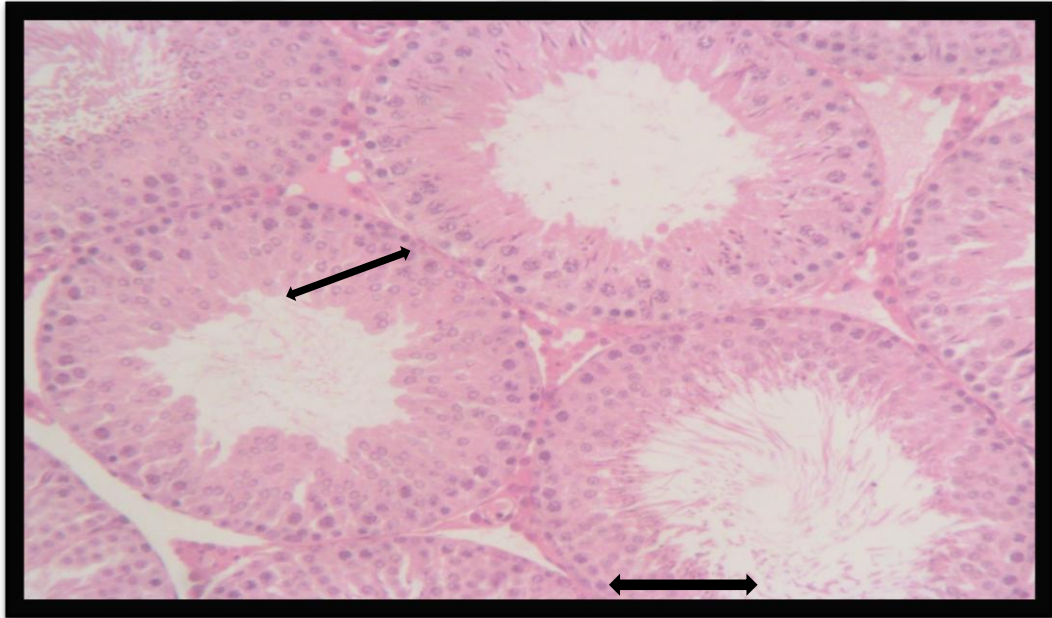
**Şekil 17:** Torsiyon-detorsiyon grubu. Seminifer tübül bazal membranında ayrılmalar ve interstisyel alanda ödem PAS x200.

Torsiyon-detorsiyon + NAS grubundan (grup IV) alınan kesitlerde ise testis dokularında damarlarda konjesyonun azaldığı, seminifer tübül germinal epitelinde ayrılmaların düzeldiğini gözlemlendi(18-21).

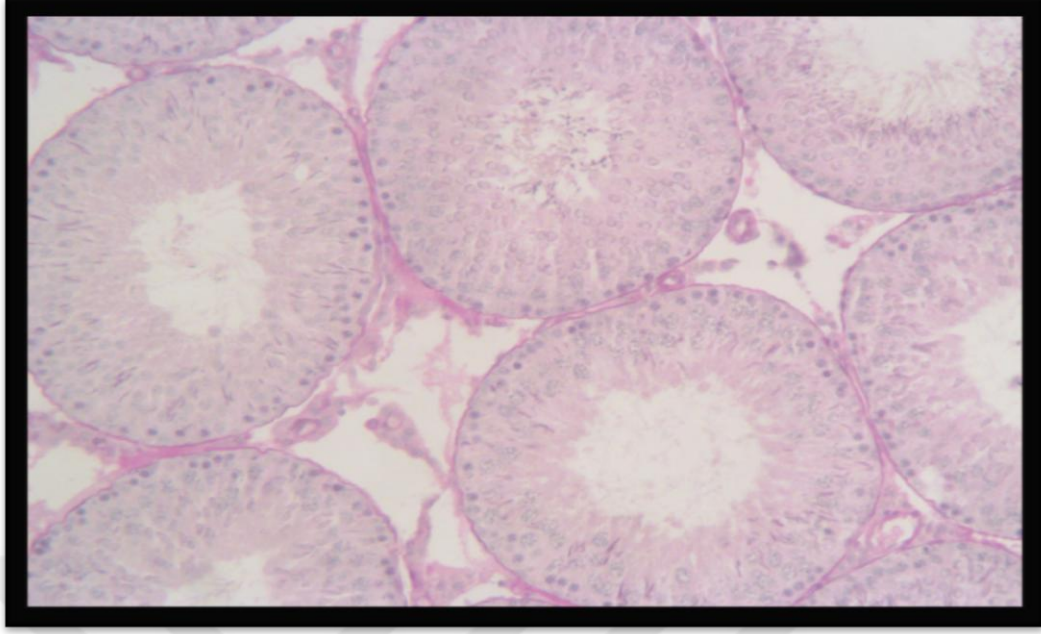




**Şekil 18:**Torsiyon-detorsiyon+ NAS grubu.Normal görümlü interstiyel alan(kalın ok )H&Ex200



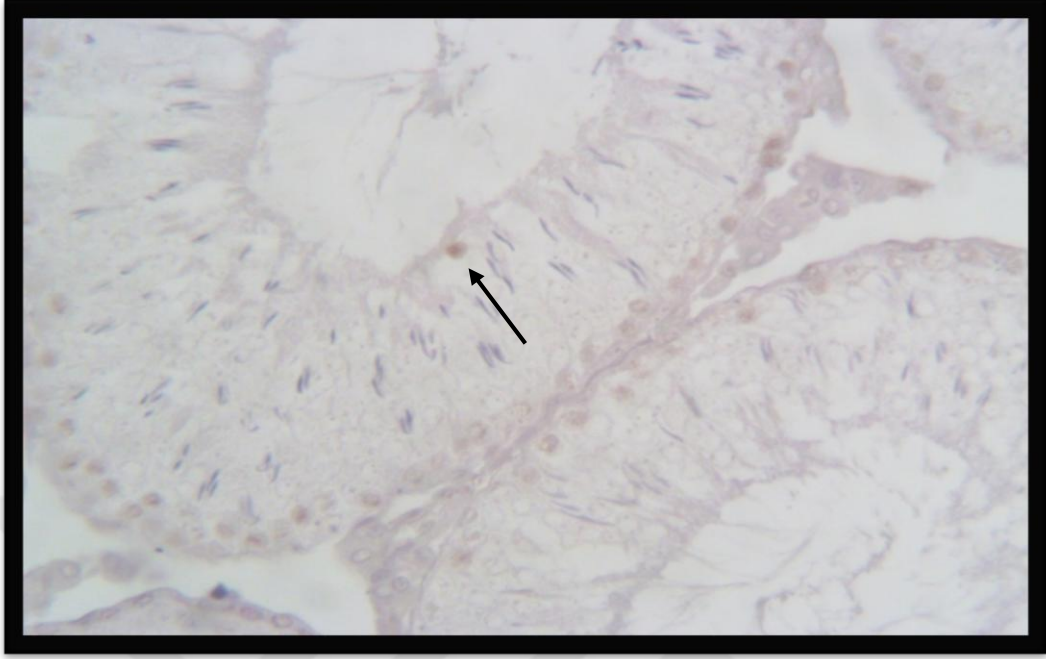
**Şekil 19:**Torsiyon-detorsiyon+ NAS grubu. Normal görümlü seminifer tübüller(çift taraflı ok ) H&Ex200



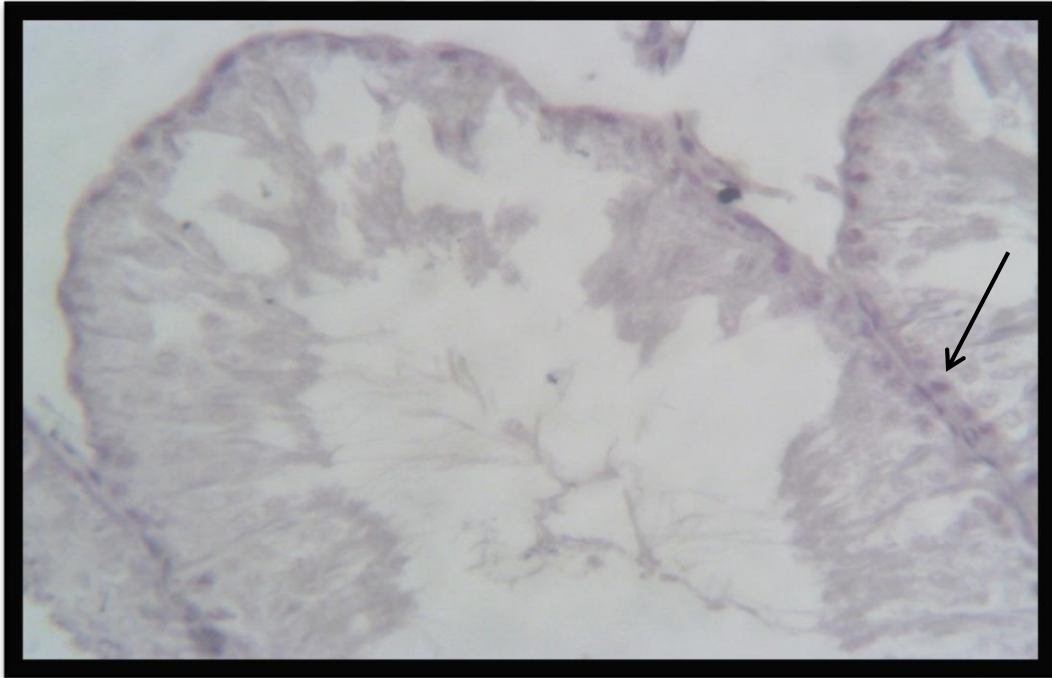
**Şekil 20:** Torsiyon-detorsiyon + NAS grubu. Normal görünümlü seminifer tübül bazal membranı, seminifer tübül germinal epiteli ( PAS x200).

## 5.2. TUNEL Bulguları

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği testis dokusunda spermatogenik seri hücrelerinde gözlemlendi. TUNEL pozitifliği; kontrol grubu (Şekil 21) ve Sham grubu(Şekil 22) ve NAS grubunda (Şekil 23) benzerdi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında torsiyon-detorsiyon grubunda anlamlı bir artış vardı ( $p<0.05$ ) (Şekil 24). Torsiyon-detorsiyon ile NAS grubu kıyaslandığında NAS grubunda ise anlamlı bir değişiklik gözlenmedi ( $p>0.05$ ) (Şekil 25)(Tablo 7).

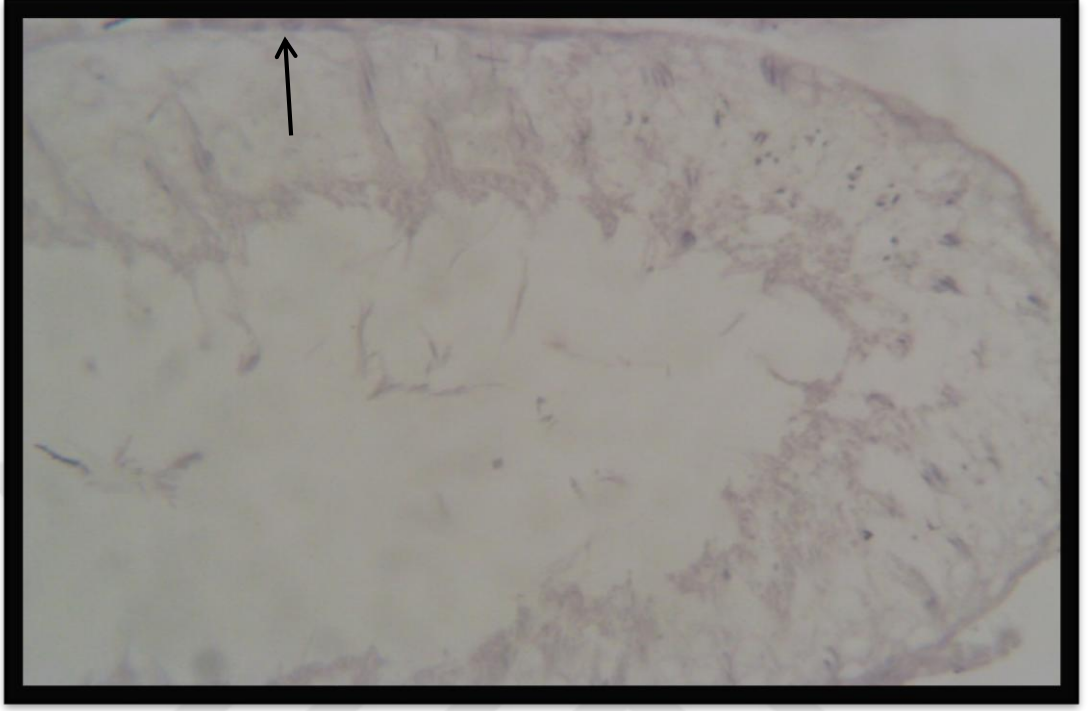


**Şekil 21:** Kontrol grubu. TUNEL pozitif hücre( ince ok) x400.

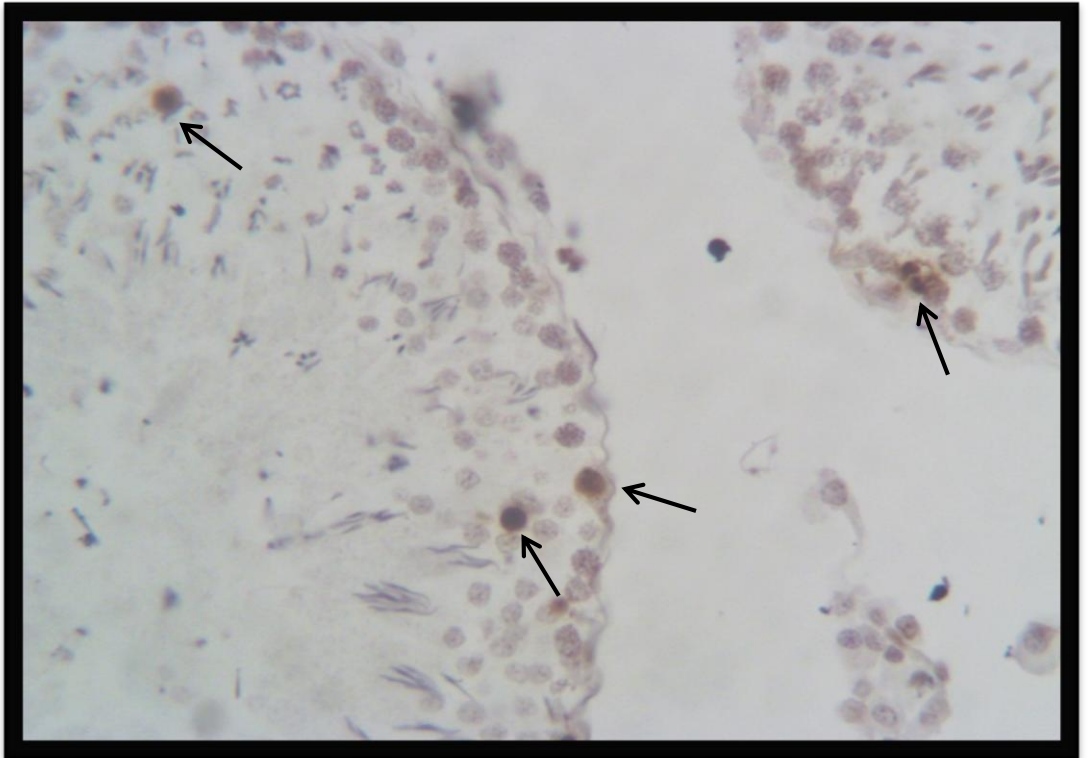


**Şekil 22:** Sham grubu. TUNEL pozitif hücre( ince ok) x400.

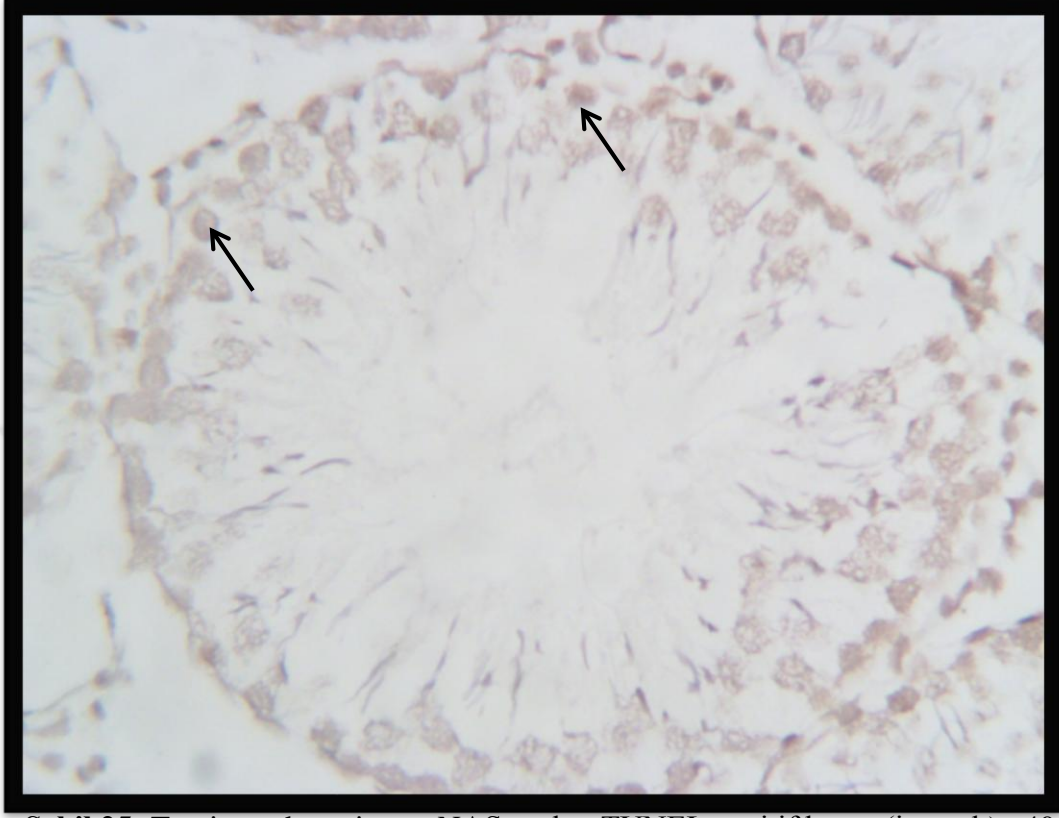




Şekil 23: NAS grubu. TUNEL pozitif hücre( ince ok) x400.



Şekil 24: Torsiyon-detorsiyon grubu. TUNEL pozitif hücre (ince ok) x400.



**Şekil 25:** Torsiyon-detorsiyon+ NAS grubu. TUNEL pozitif hücre (ince ok) x400.

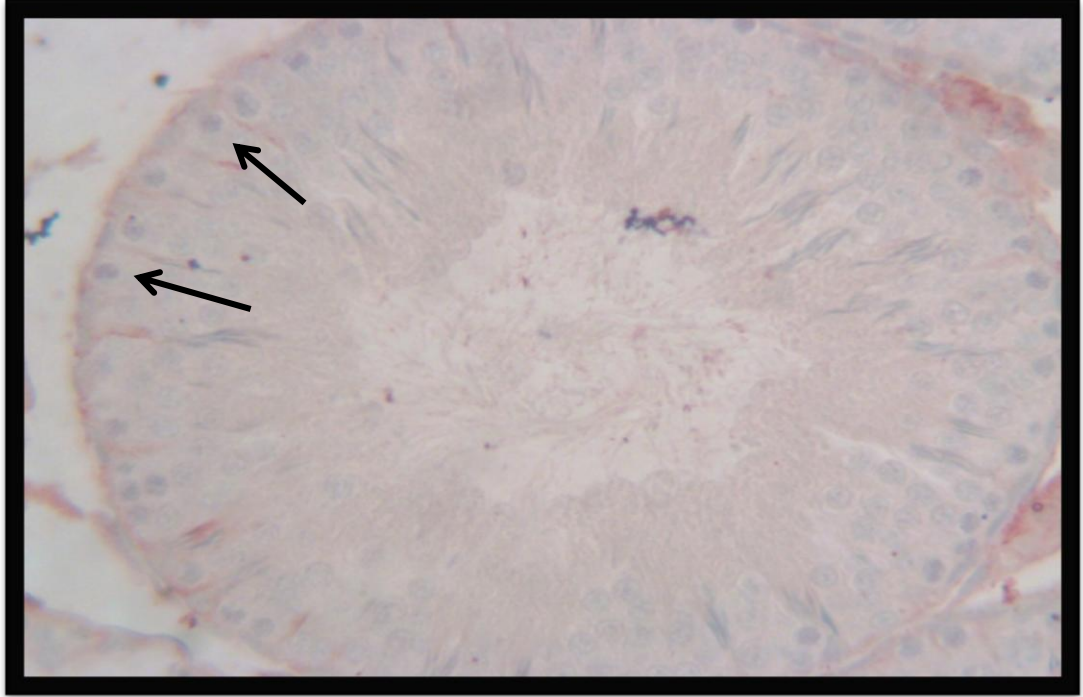
**Tablo 7:** Apoptotik indeks (%).

| <b>GRUPLAR</b>                       | <b>APOPTOTİK İNDEKS (%)</b> |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| <b>Kontrol grubu</b>                 | 3.83 ± 0.75                 |
| <b>Sham grubu</b>                    | 3.33 ± 1.03                 |
| <b>NAS grubu</b>                     | 3.66 ± 1.36                 |
| <b>Torsiyon-Detorsiyon grubu</b>     | 1.33 ± 3.77 <sup>a</sup>    |
| <b>Torsiyon-Detorsiyon+NAS grubu</b> | 0.76±2.65 <sup>b</sup>      |

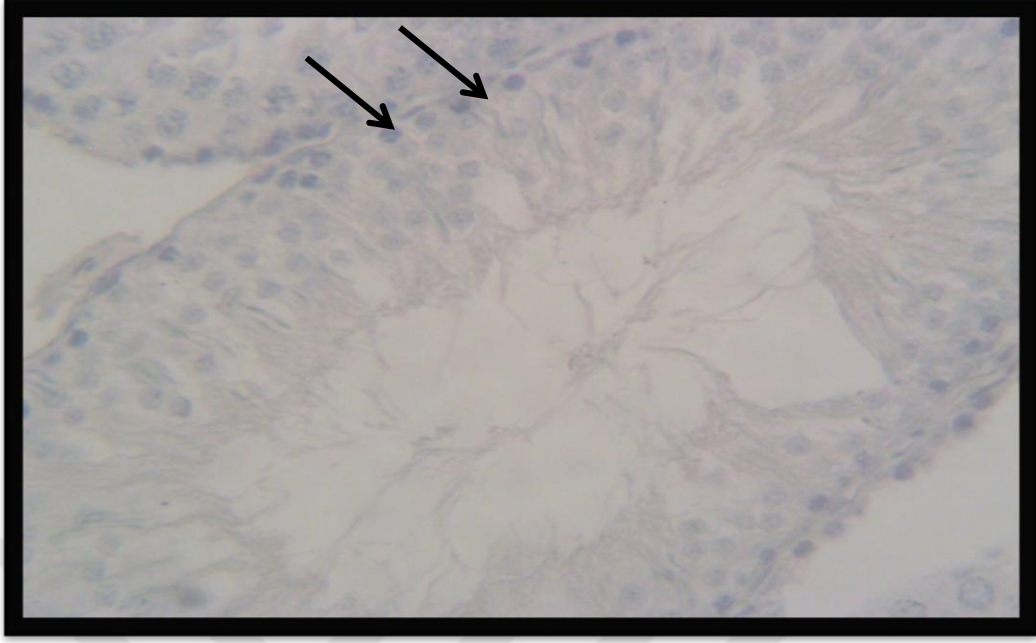
Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. a:Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, b:Torsiyon-detorsiyon grubuna göre karşılaştırıldığında, (p<0.05).

### 5.3. TRPM2 İmmünreaktivitesi

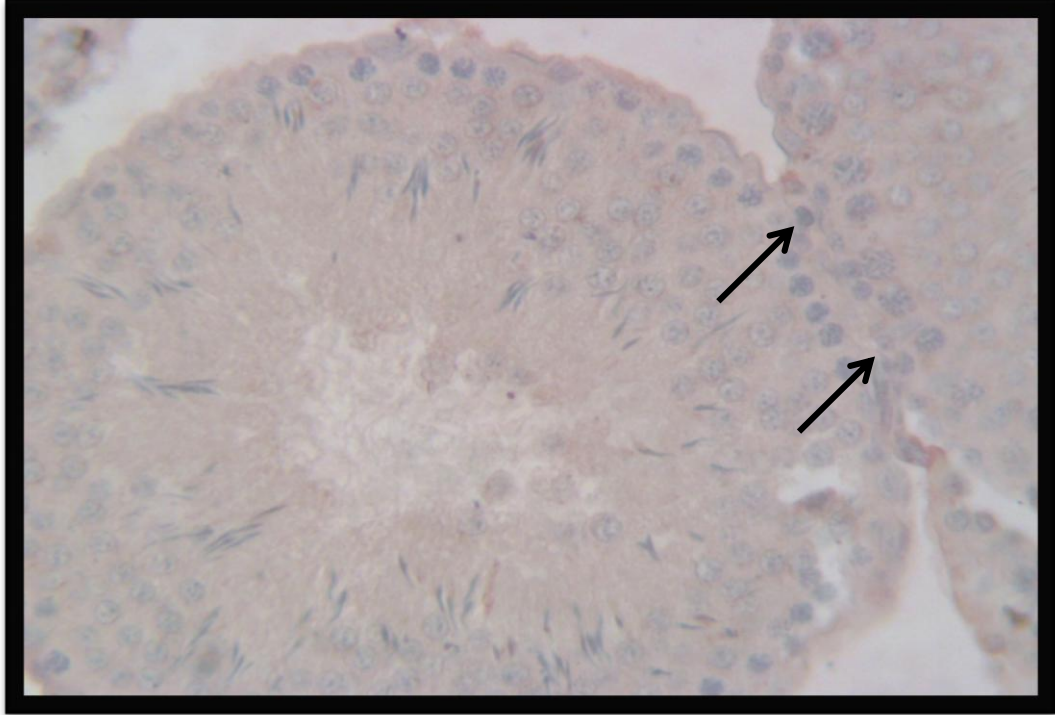
TRPM2 immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu; TRPM2 immünreaktivitesi testis dokusunda interstisyel alanda görüldü. TRPM2 immünreaktivitesi kontrol grubunda (Şekil 25) ve torsiyon-detorsiyon + NAS (Şekil 29) grubunda benzerdi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında torsiyon-detorsiyon grubunda anlamlı bir artış vardı ( $p < 0.05$ ) (Şekil 28). Torsiyon-detorsiyon grubu ile kıyaslandığında NAS grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p > 0.05$ ) (Şekil 27) (Tablo 8).



**Şekil 26:** Kontrol grubu. İnterstisyel alanda TRPM2 immünreaktivitesi ( ince ok)  
x400.

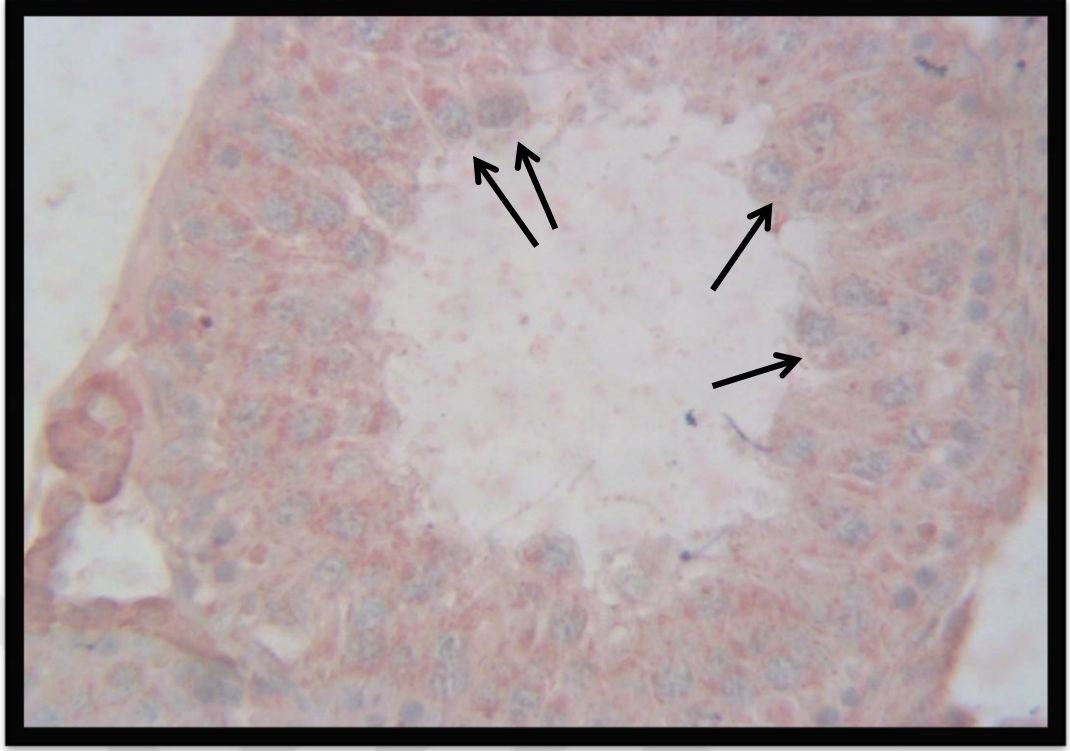


**Şekil 27:** Sham grubu. İnterstisyel alanda TRPM2 immünreaktivitesi ( ince ok)x400.

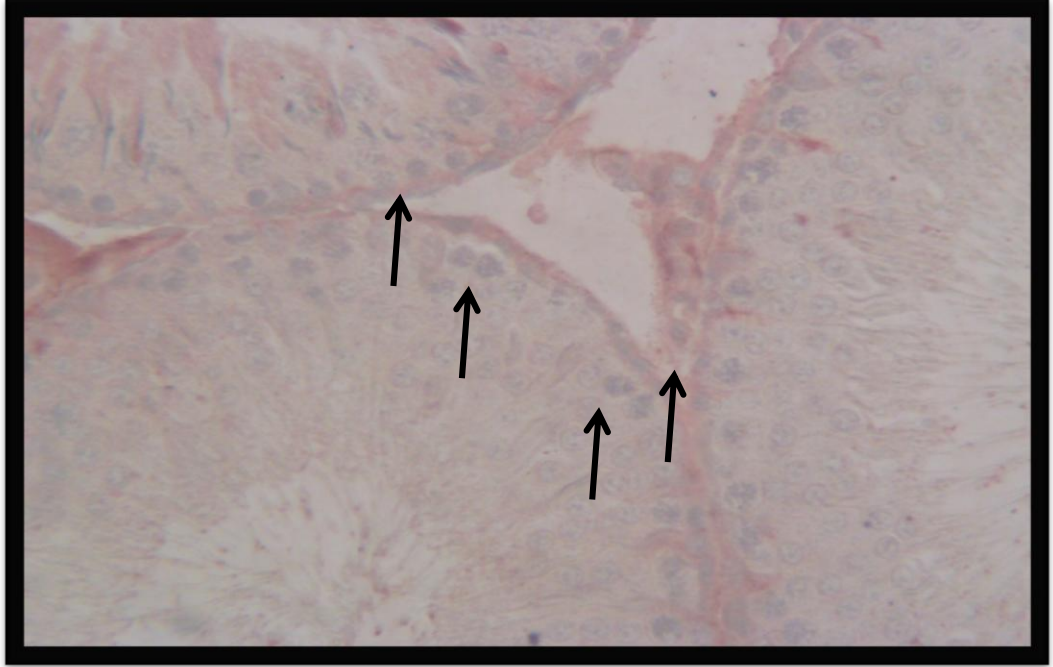


**Şekil 28:** NAS grubu. İnterstisyel alanda TRPM2 immünreaktivitesi ( ince ok) x400.





**Şekil 29:** Torsiyon-detorsiyon grubu. İnterstisyel alanda TRPM2 immünreaktivitesi (ince ok)x400.



**Şekil 30:** Torsiyon-detorsiyon +NAS grubu. İnterstisyel alanda TRPM2 immünreaktivitesi (ince ok)x400.



**Tablo 8:** TRPM2 immünreaktivitesi

| <b>GRUPLAR</b>                       | <b>HİSTOSKOR (yaygınlık x şiddet)</b> |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| <b>Kontrol grubu</b>                 | 3.83± 0.75                            |
| <b>Sham grubu</b>                    | 3.33±1.03                             |
| <b>NAS grubu</b>                     | 3.66± 1.36                            |
| <b>Torsiyon-Detorsiyon grubu</b>     | 1.33± 3.72 <sup>a</sup>               |
| <b>Torsiyon-Detorsiyon+NAS grubu</b> | 6.50± 2.07 <sup>b</sup>               |

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. a:Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, b:Torsiyon-Detorsiyon grubuna göre karşılaştırıldığında (p<0.05).

#### 5.4. Biyokimyasal Analizler

**Tablo 9:** Grupların testis dokusu TAS ve TOS düzeyleri

| <b>Gruplar</b>                        | <b>SERUM TAS</b>        | <b>SERUM TOS</b>        | <b>DOKU TAS</b>          | <b>DOKU TOS</b>         |
|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| <b>Kontrol grubu</b>                  | 65.39±4.46 <sup>b</sup> | 20.13±1.84 <sup>b</sup> | 45.72±10.68 <sup>a</sup> | 2,58±2.17 <sup>b</sup>  |
| <b>Sham grubu</b>                     | 58.38±4.82 <sup>b</sup> | 18.46±2.55 <sup>b</sup> | 35.91±15.87 <sup>a</sup> | 22,96±1.99 <sup>a</sup> |
| <b>NAS grubu</b>                      | 63.05±5.79 <sup>b</sup> | 9.17±0,93 <sup>a</sup>  | 13.84±4.27 <sup>a</sup>  | 28.94±1.26 <sup>b</sup> |
| <b>Torsiyon-Detorsiyon grubu</b>      | 17.27±3.70 <sup>a</sup> | 39.04±6.24 <sup>a</sup> | 0,75±0,50 <sup>a</sup>   | 2,50±0,57 <sup>b</sup>  |
| <b>Torsiyon-Detorsiyon+ NAS grubu</b> | 57.27±2.61 <sup>b</sup> | 25.00±1,19 <sup>b</sup> | 22.25±2.88 <sup>a</sup>  | 24.09±2.16 <sup>a</sup> |
| <b>p değeri</b>                       | p < 0.005               | p < 0.005               | p < 0.005                | p < 0.005               |

\*Veriler ortalama ± standart sapma olacak şekilde sunulmuştur.a=Kontrol grubuna göre, b=Torsiyon-Detorsiyon grubuna göre(p<0,005)

Grupların testis dokusu ELISA yöntemiyle TAS ve TOS aktiviteleri Tablo da verilmiştir. Yapılan değerlendirmelerde Kontrol grubuna göre; torsiyon ve detorsiyon grubunda TOS değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı, TAS değerlerinin ise azaldığı; NAS uygulamasının ise TAS ve TOS değerlerini kontrole yakın bir düzeye getirdiği tespit edildi(Tablo 9).



## 6.TARTIŞMA

Testis torsiyonu, genellikle puberte döneminde ortaya çıkan ve testiste kan akımının azalmasıyla beliren aciliyet getiren ürolojik vakadır (92). Testis torsiyonu olan hastaların %61'nin 21 yaş altında olduğu gözlemlenmiştir. Genellikle karşımıza neonatal dönem ve 12-18 yaş olmak üzere iki yaş grubunda fazla oranda rastlanır. Yaşlılarda genellikle testis torsiyonu görülme oranına az rastlanır (93). Testis torsiyonu iki türdür. Ekstravaginal torsiyonda, torsiyon tunika vaginalis dışında meydana gelip; intravaginal torsiyonda ise tunika vaginalis içirisinde oluşmaktadır İntravajinal tip daha fazla oranda karşılaşılan testis torsiyonu türüdür. (94). Deneysel olarak oluşturulan torsiyon tipi ekstravaginaldir.

Sıçanlarda deneysel ekstravaginal torsiyonunda, süreyle hasarlanma derecesinin birbirleriyle ilişkili olduğu gözlenmiştir. Hasar için en az 540° torsiyon yapılmalıdır. Heindel ve arkadaşları (95), 360° torsiyonun bir hasara yol açmadığını, 720° ve üzerinin ise fertilitede azalmaya neden olduğunu görüşünde bulunmuştur. Turner ve arkadaşları (96), yaptıkları deneysel çalışmalarında longitudinal aksı boyunca testise 180°, 360° ve 720° torsiyon uygulandığını belirtmiştir. Testis torsiyonu sırasıyla bir, iki ve dört saat sonra detorsiyone edilir. Sonuç olarak 360° ve bir saatlik testis torsiyonunda yalnızca akut vasküler değişimler gözlenir, 720° ve dört saatlik testis torsiyonunda ise tam iskemiyle sonuçlandığı gözlemlenmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda ise deneysel torsiyon model testisi saat yönünde ve 720° çevirerek yapılmaktadır (96-97). Torsiyon 180° üzerinde ise arteriyal akım da bozulmalar gözlemlenmiştir(95). Bizim yaptığımız deneysel modelinde amacımıza uygun bir torsiyon uyguladık.

Çalışmamızda kullandığımız deneklerin testislerini longitudinal ekseninde iki tam tur olacak şekilde saat yönünün tersi 720° çevirerek deneysel testis torsiyonu modelimizi oluşturduk.

Testis torsiyonunun oluşmasıyla testisin venöz dönüşümü engellendi ve testiste venöz konjesyon oluştu. Venöz konjesyon sonucunda testiste hemorajik infarkt alanları meydana geldiği gözlemlendi. Testiste, oluşan ödem sonucunda şişme meydana gelir ve bundan dolayı testiste ağrı oluşur. Tunika vaginalis elastik yapıda olmadığı için venöz konjesyonun oluşması ve testisin şişmesi, testiste basınç artışına sebebiyet verir. Sonuç olarak arteriyal dolaşım da bozularak testiste iskemik nekroz meydana gelmektedir (98). Tunika vaginalis içinde, erken devrede seröz bir sıvı veya geç devrede kan bulunur ve bir hidrosel gelişmektedir (99). Testis torsiyonuna neden olacak etyolojik faktörler arasında travma, aşırı hareketlilik, pubertedeki testiste meydana gelen değişiklikler, inguinal bölge ameliyatlarında iatrojenik torsiyon, hiperaktif kremasterik refleks ve inmemiş testisdir (100).

İnfertilite, testis torsiyonunun uzun süren en önemli yan etkilerinden biridir. Hastalarda görülen fertilitate bozukluğu testisteki hasara bağlı olduğunu söyleyebiliriz (101,102). Testis torsiyonu yapılan erkek sıçanlarda detorsiyon sonrasında Leydig ve Sertoli hücrelerinin fonksiyonlarında bozulmaların olmadığı ve kan akımının geri dönmesine karşın spermatogenezde bozukluk olduğunu söyleyebiliriz. Bu bozukluğun değişik sürelerde olması, testis torsiyonunun cerrahi tedavi sonrasında devam ederek spermatogenezde oluşan bozukluğu açıklar. Testis torsiyonunun cerrahi tedavisi sonrası iskemi ve reperfüzyon hasarı nötrofillerin infiltrasyonu ve ROS'ların ortama çıkmasına bağlıdır. Dominquez ve

arkadaşlarının (103), tek taraflı spermatik kordon torsiyonuyla alakalı klinik çalışmalarında karşı testiste oluşan hasarın subfertiliteye hatta infertiliteye yol açtığı gözlemlenmiştir.

Hadziselimovich ve arkadaşları (104), spermatik kordon torsiyonu tanısı olan 17 hastada diğer testisten biyopsi alınarak, germ hücrelerinde apoptosisi değerlendirmişlerdir. Bütün hastalarda karşı testislerde artan nekrotik değişiklikler ve apoptosiz gözlemlenmiştir. Karşı testiste hasarın oluşmasına yönelik çalışmalara karşılık tek taraflı testis torsiyonunda karşı testiste genellikle herhangi bir değişiklik gözlemlenmediği ve fertilitenin etkilenmediğini söylenmiştir (105).

Ryan ve arkadaşlarının (106), sıçanlarda yapılan çalışmalarda tek taraflı testis torsiyonu modelinde diğer testiste immunolojik ya da herhangi bir mekanizmaya bağlı bir hasar gözlemlenmemiştir.

Turner ve arkadaşları (107) da yaptıkları çalışmalarda tek taraflı spermatik kordon torsiyonunda karşı tarafta hasar gözlemlenmemiştir.

Bizim yaptığımız bu çalışmada kontrol grubuna(grup I) ait testis dokusunu normal yapıda gözlemledik. Sham grubuna(grup II) ait testislerde de kontrol grubuna benzer seminifer tübüleri, germinal epiteli ve Leydig hücreleri ile bazal membranın normal olduğu gözlemlendi.

NAS grubuna (grup III) ait testis dokusunu normal yapıda gözlemledik.

Torsiyon-Detorsiyon uygulanan grupta (grup IV) testis dokularında damarlarda konjesyon, seminifer tübül germinal epitelinde ayrılmalar, seminifer tübül lümenine dökülmüş immatür hücreler, primer spermatositlerin sitoplazmasında vaskülasyon, damarlarda çok fazla miktarda dilatasyon ve bazal membranda ayrılmaların olmadığı gözlemlendi. Gürdal ve arkadaşları (106),

yaptıkları çalışmada histopatolojik olarak incelemede tüm torsiyonlu testislerde primer spermatositlerde iskemik değişikliklerin olduğunu gözlemlemişlerdir. Si-Ming Wei ve arkadaşları (109), yaptıkları çalışmada testis ağırlıkları, seminifer tübül çapları, germ hücre tabakaları ve testis biyopsi skorunu deney gruplarında kontrol grubundan daha az olduğunu söylemiştir.

Yıldız ve arkadaşları (110), yaptıkları çalışmada, iki saat 720 ° tek taraflı testis torsiyonu yapılan deneklerin kontralateral testis dokusunda histolojik parametrelerde, antioksidan enzim düzeylerinde, lipid peroksidasyonunda önemli değişikliklerin olduğunu söylemiştir. Testisin yapısı histopatolojik olarak incelediğimizde, kontrol grubu testis dokularının histolojik görünümünün normal olduğu, ancak torsiyon uygulanan sıçanların kontralateral testislerinde germinal hücrelerde dejenerasyon, deskuamasyon, ödem, kapiller tıkanıklık, kanama gibi bir çok değişiklikleri gözlemlenmiştir.

Bizim yaptığımız bu çalışmadaki histopatolojik bulgular daha önce yapılan çalışmalara benzerlik göstermekle birlikte Torsiyon-Detorsiyon sonucu oluşan hasar gözlemlenmiştir. Kontrol ve Sham grupları arasında karşılaştırma yapıldığında, gruplar arasında anlamlı bir farklılığın oluşmaması, testiste oluşan hasarın yapılan cerrahi işlemlere bağlı olmadığını gösterir.

Serbest oksijen radikalleri enerji üretim süreçlerinin doğal bir yan ürünüdür. Yüksek düzeyde reaktif ve potansiyel olarak da zararlı maddelerdir (111). Serbest radikaller hücrelerimizde DNA'ya, proteinlere ve lipidlere saldırarak zarar vermektedir. Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı hücreler bunları nötralize eden antioksidanları üretirler. Serbest radikallerin oluşum hızı ve bunların antioksidanlar tarafından nötralize edilme hızı arasında bir denge

olmalıdır. Eğer denge sağlanırsa hücree serbest radikallerin olumsuz etkilerine karşı korunur, denge serbest radikaller lehine bozulma olursa hücredeki serbest radikallerde artma gözlenir. Serbest radikallerin hücrede artışıyla birlikte hücre fonksiyonları üzerinde yaptıkları olumsuz sonuca 'oksidatif stres' denilmektedir (112).

Serbest radikaller nötrale edilmediği zaman hücre membran proteinlerini yıkıp, membran lipit ve proteinlerini yok olur. Bu durum sonucunda hücre membranını sertleştirecek hücrenin fonksiyonunu engeller. Nükleer membranı geçerek nükleustaki genetik materyale etki edip DNA'yı, kırılma ve mutasyonlara açık hale getirir. Bağışıklık sistemindeki hücreleri yok ederek bağışıklık sistemini zorlayarak vücutta ciddi hasarlara neden olur (112,113).

Spermatogenez saniyede 1000 sperm üretebilmektedir. Aktif olarak bu sürekli tekrarlayabilmektedir. Doğal olarak gerçekleşen hücre bölünmesi, germinal epitel tarafından yüksek oranda mitokondriyel oksijen tüketir. Hem spermatogenez hem de Leydig hücresi steroidogenezi oksidatif stresle hasar görebildiği için bu dokudaki düşük oksijen miktarı, testisin kendini serbest radikallerin hasarından koruyabilir(114,115).

Testis bu korunmayı sağlayabilmesi için antioksidan enzimler ve serbest radikal temizleyiciler içerir. Peroksidatif hasar testis torsiyonundan diyabete ve ksenobiyotik maruziyeti gibi koşullarda patolojik sonuçları destekleyen bozuk testiküler fonksiyonun tek önemli sebebiymiş olarak gösteriliyor. Düşük oksijene karşın testis fazla miktarda doymamış yağ asitlerinin ve ROS oluşturan sistemlerin varlığı nedeniyle, oksidatif strese karşı hassaslaşır. Çeşitli hastalığın

oluşmasında rol oynayan oksidatif stres, ROS'nin üretimi ve vücudun antioksidan savunma sistemleri arasında bir denge olmadığını gösterir (116,117).

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar ve bu olayın gerçekleşmesine antioksidan savunma denir. Vücuttaki antioksidan savunma sistemleri, serbest radikalleri etkisiz hale getirmekle uğraşır. Ancak savunma sistemlerinin yetersiz olduğunda erkek infertilitesinde de kullanılan antioksidan tedavi devreye girmektedir. Oksidatif stresten dolayı rahatsızlığı bulunan hastalarda endojen kaynaklı antioksidanlar etkili olmadığından, oksidatif hasarı azaltabilecek diyet sadece dışarıdan alınacak antioksidanlardır (Örn: Vitamin E,C, Melatonin).Bu durumda uygulanan antioksidan terapi spermin kalitesini de geliştirir. Antioksidan terapi ile lipid peroksidasyon potansiyelinin azaltılması; fertilizasyon oranlarının gelişmesiyle ilgilidir(118,119).

Son zamanlarda bazı antioksidanların ve SOD, katalaz, allopurinol, kafeik asit, fenil ester, melatonin, selenyum, resveratrol ve N-asetilsistein gibi ROS toplayıcılarının uygulanmasının testislerdeki iskemi ve reperfüzyon yaralanmasını önlediğine yönelik çeşitli çalışmalar da bulunmaktadır. Ancak, bu maddeler klinik çalışmalarda test edilmemiş ve etkinlikleri onaylanmamıştır (120).

Kanter (121), melatonin uygulanmış torsiyon grubunda normal görünümlü seminifer tübüller gözlemlenmiştir. Torsiyon + melatonin grubunda seminifer tübül çapı ve Johnsen tübül skorunu, kontrol grubuna yakın olduğu söylenmiştir.

Wei ve arkadaşları (109), testis torsiyonunu curcumini tedavi etmek için kullanmışlar. Curcumin ile tedavi grubunda testis ağırlıkları, seminifer tübül



çapları, germ hücre tabakaları ve testis biyopsi skoru torsiyon grubuna göre daha yüksek olduğunu söylemişlerdir. Ancak bu parametrelerin hiçbirinin kontralateral testis dokusunda anlamlı olmadığını söyleyebiliriz.

Gürdal ve arkadaşları (108), testis torsiyonunda pentoksifilin detorsiyon sonrası testis dokusunda serbest oksijen radikalleri oluşumunun azalttığını ve reperfüzyon hasarından koruyucu etkisi olduğunu söyleyebiliriz.

Yıldız ve arkadaşları (110), 0.7 mg sildenafil sitrat uygulandığında torsiyon sonucunda oluşan histopatolojik değişikliklerin azaldığını söyleyebiliriz.

Testis torsiyonunun tedavisinde ki amaç iskemi ve reperfüzyonun bozucu etkilerini azaltıp veya yok etmek olduğunu söyleyebiliriz. Burada hücre membran bütünlüğünü korumada görevli ajanlardan birisi antioksidanlardır.

Kim ve arkadaşları (122), yaptığı çalışmada kontrol grubu sıçanların testis dokusunun normal görünümde olduğunu, seminifer tübüller ve germinal hücreleri normal görünümde olduğunu söylemiştir. Ancak, Torsiyon grubu sıçanlarda hücresel kargaşa, germinal hücrelerde düzensizlik ve dejeneratif değişiklikler ve seminifer tübüllerde belirgin hasara rastlanmıştır. Torsiyon + Korean red ginseng grubunda, germinal epitel tabakasının normal olarak görüldüğünü söylemişlerdir.

Glutatyon, major serbest radikal temizleyicisidir ve glutatyonun prekürsörü olan NAS; myokard, pulmoner, karaciğer ve böbreklerde iskemi ve reperfüzyon sonrası hasarın engelleyicisi olarak kullanılır (123- 124).

Sun ve arkadaşları (125), NAS ve indometazin intestinal reperfüzyon modeline olan etkilerini gösteren çalışmalarda NAS 'in endotelial ve epitelyal bariyer bütünlüğünü sağlamaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalarda NAS kullanımının proteaz inhibitörlerini ve retikuloendotelial sistem aktivasyonunu

azalttığını göstermektedir. Başka bir deneysel çalışmada NAS'in reperfüzyon zedelenmesini önlemek için adezyon molekül inhibisyonu yaptığı peroksinitriti inhibe ettiğini ve nötrofillerin azalmasını sağladığı gösterilmiştir.

Çay A. ve arkadaşları (126), testis torsiyonu nedeniyle gelişen iskemi ve reperfüzyon hasar üzerine yaptıkları çalışmada NAS etkinliği bulunmuştur. Karaciğer iskemi ve reperfüzyon hasar üzerine yapılan başka bir çalışmada NAS 'in dokuda trombosit agregasyonunu azaltıp, cAMP düzeylerini artırarak iskemi ve reperfüzyon hasarını azalttığı gösterilmiştir (127). Demir ve arkadaşları (128), iskemi ve reperfüzyon hasarında karaciğerde lipid peroksit düzeylerinin arttığını ve NAS uygulamasında doku lipid peroksit seviyelerinde azalmaya yol açtığı gözlemlemiştir. Yapılan diğer bir çalışmada koroner arter injurisine bağlı gelişen iskemi ve reperfüzyon hasarında NAS 'in olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir (129).

Kanter (121), yaptığı torsiyon sonucunda hasara NAS etkisini araştırdığında kontrol grubundaki testislerde normal ve düzenli seminifer tübül morfolojisi gözlemlemiştir. Spermatogenezde birincil ve ikincil spermatositlerde spermatid ve spermatozoalar görülmüştür. İskemi ve reperfüzyon sonrası seminifer tübül çapında şiddetli azalma, germ hücrelerinde dökülme görülmüştür.

TRPM2 inhibisyonunun hücreleri oksidatif stres indüklü hücre ölümünden koruduğu kabul edilmektedir (130). PC-3 hücreleri gibi insan prostat kanseri hücreleri oksidatif strese karşı duyarlıdır ve TRPM2 bu hücrelerde eksprese olmaktadır (131). TRPM2, oksidatif stres ile aktive olan ve hücre ölümüne yatkınlığı sağlayan  $Ca^{+2}$ 'na geçirgen bir kanaldır (132).

TRPM2 kanalları oksidatif stresle uyarılan  $Ca^{+2}$  girişi sinyalizasyonu  $Ca^{+2}$  bağımlı hücresel işlevlere katılabilir (133). TRPM2 kanalı  $Ca^{+2}$ 'na geçirgen bir hücre yüzeyi kanalı olmasının yanı sıra lizozomal bir  $Ca^{+2}$  salım kanalı olarak da faaliyet göstermekte ve her ikisi de ROT tarafından uyarılan hücre ölümüne katkıda bulunmaktadır. Jie Zou ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada makrofaj hücrelerinde  $H_2O_2$ 'in uygun konsantrasyonlarına erken yanıt da TRPM2'nin  $Ca^{+2}$  sinyalizasyonuna ve hücre ölümüne aracılık etmesindeki desteği ve mekanizmaların araştırılmasını amaçlamışlardır. TRPM2 kanalının hücre ölümü üzerindeki rollerini belirlemişlerdir (132). Bizim yaptığımız çalışmada, NAS uygulamasının, apoptotik süreçte ve torsiyon-detorsiyon da etkili olduğu düşünölen TRPM2 kanal immünreaktivitesini azaltarak testiste torsiyon-detorsiyon hasarına karşı koruyucu etki sağladığını gösterdi.

## 7. KAYNAKLAR

1. Yıldırım M. Resimli Sistemik Anatomi. 2. Baskı, İstanbul:Nobel Tıp Kitabevleri, 2013;581-584.
2. Putz R, Pabst R. Sobotta İnsan Anatomisi Atlası. 5. Baskı, İstanbul: Beta basım yayım dağıtım, 2001; 191.
3. Dalçık H. Yıldırım M. İnsan Embriyolojisi. 2. Baskı,İstanbul :Nobel Tıp Kitabevleri, 2008 ;262-266.
4. Köylü H. Tıbbi Fizyoloji. 1. Baskı, İstanbul : Nobel Tıp Kitabevleri, 2014 ;496-506.
5. Hall JE. Guyton ve Hall Tıbbi Fizyoloji. Yegen B (Çeviren). 12. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2013; 973-984.
6. Di Fiore MSH. Histoloji Atlası. Kayalı H (Çeviren). 5. Baskı, İstanbul: Güven Yayınları, 1981; 209.
7. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji. Solakoğlu S, Aytekin Y (Çevirenler). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2009; 418-427.
8. Solakoğlu S. Aytekin Y.Temel Histoloji İstanbul:Nobel Tıp Kitabevleri, 2009;418-429.
9. Nussbaum Blask AR, Bulas D, Shalaby-Rana E, Rushton G, ShaoC, Majd M. Color Doppler sonography and scintigraphy of the testis:a prospective, comparative analysis in children with acute scrotalpain. *Pediatr Emerg Care* 2002; 18: 67–71.
10. McAndrew HF, Pemberton R, Kikiros CS, Gollow I. The incidence and investigation of acute scrotal problems in children.*Pediatr Surg Int* 2002: 18:43-57.
11. Turner TT, Brown KJ. Spermatic cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow. *Biol Reprod* 1993; 49:401–407.
12. Casa AS, Cass BP, Veeraraghavan K, 1980. Immediate exploration of the unilateral acute scrotum in young male subjects. *J Urog.* 124: 829- 832.
13. Williamson, R.C.N., 1985. The continuing conundrum of testicular torsion. *Br. J. Surg.* 72,509-510.
14. Krarup T: The testes after torsion. *Br J Urol* 1978;50:43-6 Melekos M, Asbach H, Markou S. Etiology of the acute scrotum with regard todistribution. *J Urol* 139: 1023, 1988.
15. Melekos M, Asbach H, Markou S. Etiology of the acute scrotum with regard todistribution. *J Urol* 139: 1023, 1988
16. Cummings JM, Boullier JA, Sekhon D, Bose K: Adult testicular torsion. *J Urol*; 167: 2109-2110, 2002.

17. Leape LL: Testicular torsion.: Pediatric Urology (Eds Ashcraft KW). Philadelphia, W.B.Saunders, 1990; 1556-1558.
18. Noseworthy J. Testicular torsion. In: Ashcraft KW, Holder TM (eds). Pediatric Surgery. 2. Ed. W.B. Saunders, Philadelphia 1993, pp 595-601.
19. Mohan Marulaiah, Amardeep Gilhotra, Lynette Moore, Hilary Boucaut, Day Way Goh. Testicular and Paratesticular Pathology in Children: a 12-Year Histopathological Review. World J Surg 2010; 34:969–974.
20. Fonkalsrud EW. Testicular undescend and torsion. Pediatr Clin North Am 1987;34(5):1305-17.
21. Melloul M, Paz A, Lask D: The value of radionuclide scrotal imaging in the diagnosis of acute testicular torsion. Br J Urol 1995; 72: 628-631.
22. Tanagho E, W.McAninch J: In the disorders of the testes, scrotum and spermatic cord: Smith's General Urology (Eds Foltin J, Lebowitz H, Roche J). USA, Lange Medical Books/McGraw-Hill Companies 2000; 687.
23. Mevorach RA, Lerner RM, Greenspan BS, et. al: Color doppler ultrasound compared to a radionuclide scanning of spermatic cord torsion in a canine model. J Urol 1991; 14: 428-433.
24. Herek D, Herek O, Akbulut M, Ufuk F. Role of Strain Elastography in the Evaluation of Testicular Torsion: An Experimental Study. J Ultrasound Med. 2016 ;35(10):2149-58.
25. Zhang X, Lv F, Tang J: Shear wave elastography (SWE) is reliable method for testicular spermatogenesis evaluation after torsion.Int J Clin Exp Med. 2015;8(5):7089-97.
26. 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.
27. Johnston BI, Wiener JS. Intermittent testicular torsion. BJU Int 2005; 95: 933–4.
28. Viguera RM, Medina P, Reyes G et al. The effect of naloxone pretreatment before relieving testicular torsion. Proc West Pharmacol Soc 1998; 41: 41–2.
29. McAndrew HF, Pemberton R, Kikiros SC, et. al: The incidence and investigation of acute scrotal problems in children. Pediatric Surg Int 2002; 18:435-437.
30. Anderson JB, Williamson RC. Testicular torsion in Bristol: a 25- year review. Br J Surg 1988; 75: 988–92.
31. Bozkurter Cil AT, Bicakci U, Isildak I, Arıturk E. pH and antioxidant measurements in rats with testicular torsion and their correlation with viability. J Pediatr Surg. 2016;51(10):1716-20.

32. Hutson JM: Undescended testis, torsion, and varicocele.( Eds O'Neill JA, Rowe MI, Grosfeld JL, Fonkalsrud EW, Coran AG). *Pediatric Surgery Volume Two*. 5th ed, London, Mosby-Year Book Inc 1998; 1099-1101.
33. Bellinger MF, Abramovitz H, Brantley S, et. al: Orchiopexy: an experimental study of the effect of surgical technique on testicular histology. *J Urol* (1989); 142: 553-555.
34. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 1991; 43: 109–134.
35. Davis KL, Martin E, Turko IV, et al. Novel effects of nitric oxide. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 203–236.
36. Taneli F, Vatanserver S, Ulman C, et al. The effect of spermatic vessel ligation on testicular nitric oxide levels and germ cell-specific apoptosis in rat testis. *Acta Histochem* 2005; 106: 459–466.
37. Shiraishi K, Naito K, Yoshida K. Nitric oxide promotes germ cell necrosis in the delayed phase after experimental testicular torsion of rat. *Biol Reprod.* 2001; 65: 514–521.
38. Xie QW, Nathan C. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J. Leuk. Biol.* 1994; 56: 576–582.
39. Moon C, Ahn M, Kim S, et al. Increased expression of both constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in the delayed phase of acute experimental testicular torsion. *J Vet Med Sci* 2005; 67: 453–456.
40. Lockshin RA, Williams CM. Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol.* 1964; 10: 643-649.
41. Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature.* 2000; 407 (6805): 796-801.
42. Mathur PP, Saradha B, Vaithinathan S. Impact of environmental toxicants on testicular function. *Immun Endoc Metab Agents Med Chem.* 2008; 8: 79–90.
43. Mathur PP, D'Cruz SC. The effect of environmental contaminants on testicular function. *Asian J of Andrology.* 2011; 13: 585–591.
44. Fisher HM, Aitken RJ. Comparative analysis of the ability of precursor germ cells and epididymal spermatozoa to generate reactive oxygen metabolites. *J Exp Zool.* 1997; 277: 390–400.

45. Erkkila K, Pentikainen V, Wikstrom M, et al. Partial oxygen pressure and mitochondrial permeability transition affect germ cell apoptosis in the human testis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84: 4253–4259.
46. Tripathi R, Mishra DP, Shaha C. Male germ cell development: turning on the apoptotic pathways. *J Reprod Immunol.* 2009; 83: 31–35.
47. Moreno RD, Lizama C, Urzua N, et al. Caspase activation throughout the first wave of spermatogenesis in the rat. *Cell Tissue Res.* 2006; 325: 533–540.
48. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 1997; 82 (2): 291–295.
49. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, et al. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2007; 297 (8): 842–857.
50. Singh RP, Khanna R, Kaw JL, et al. Comparative effect of benzanthrone and 3-bromobenzanthrone on hepatic xenobiotic metabolism and anti-oxidative defense system in guinea pigs. *Arch Toxicol* 2003; 77: 94-99.
51. Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys.* 1993; 300: 535-543.
52. Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevent: mechanims of action, *J. Nutr* 2004; 134: 3479-3485.
53. Tapiero H, Tew KD, Ba GN. Polyphenols: Do they play a role in the prevention of human pathologies *Biomed. Pharmacother.* 2002; 56; 200–207.
54. Duthie GG, Gardner PT, Kyle JA. Plant polyphenols: Are they the new magic bullet? *Proc. Nutr. Soc.* 2003; 62: 599–603.
55. Malini P, Kanchana G, Rajadurai M. Antidiabetic efficacy of ellagic acid in streptozotocin induced diabetes mellitus in albino wistar rats, *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 2011; 4: 127–128.
56. García-Nino WR, Zazueta C. Ellagic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in liver protection. *Pharmacological Research.* 2015; 97: 84–103.
57. Marwan AG, Nagel CW. Characterization of cranberry benzoates and their antimicrobial properties. *J. Food Sci.* 1986; 51: 1069–1070.
58. Chen H, Zuo Y, Deng Y. Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by highperformance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2001; 13: 387–395.

59. Yılmaz B, Usta C. Nar'ın (*Punica granatum*) terapötik etkileri. *Türk Aile Hek Derg* 2010; 14: 146-153.
60. Zahin M, Ahmad I, Gupta RC, et al. Punicalagin and ellagic acid demonstrate antimutagenic activity and inhibition of benzo[a]pyrene induced DNA adducts, *Biomed Res Int*. 2014; <http://dx.doi.org/10.1155/2014/467465>.
61. Venkatachalam K, Montell C. TRP channels. *Annu Rev Biochem* 2007; 76: 387–417.
62. Sano Y, Inamura K, Miyake A, et al. Immunocyte Ca<sup>2+</sup> influx system mediated by LTRPC2. *Science* 2001; 293: 1327–1330.
63. Uemura T, Kudoh J, Noda S, Kanba S, Shimizu N. Characterization of human and mouse TRPM2 genes: identification of a novel N-terminal truncated protein specifically expressed in human striatum. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328(4): 1232–1243.
64. Jiang LH, Yang W, Zou J, Beech DJ. TRPM2 channel properties, functions and therapeutic potentials. *Expert Opin Ther Targets* 2010; 14: 973–988.
65. Nagamine K, Kudoh J, Minoshima S, et al. Molecular cloning of a novel putative Ca<sup>2+</sup> channel protein (TRPC7) highly expressed in brain. *Genomics* 1998; 54: 124–131.
66. Tong Q, Zhang W, Conrad K, et al. Regulation of the transient receptor potential channel TRPM2 by the Ca<sup>2+</sup> sensor calmodulin. *J Biol Chem* 2006; 281: 9076–9085.
67. Sumoza-Toledo A, Penner R. TRPM2: a multifunctional ion channel for calcium signalling. *J Physiol* 2011; 589: 1515-1525.
68. Fleig A, Penner R. Emerging roles of TRPM channels. *Novartis Found Symp* 2004a; 258: 248–258.
69. Fleig A, Penner R. The TRPM ion channel subfamily: molecular, biophysical and functional features. *Trends Pharmacol Sci* 2004b; 25: 633–639.
70. Bessman MJ, Frick DN, O'Handley SF et al. The MutT proteins or “Nudix” hydrolases, a family of versatile, widely distributed, “housecleaning” enzymes. *J Biol Chem* 1996; 271: 25059–25062.
71. Kolisek M, Beck A, Fleig A, Penner R. Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Mol Cell* 2005; 18: 61–69.



72. Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, et al. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* 2001; 411: 595–599.
73. Starkus J, Beck A, Fleig A, Penner R. Regulation of TRPM2 by extra- and intracellular calcium. *J Gen Physiol* 2007; 130: 427–440.
74. Du J, Xie J, Yue L. Intracellular calcium activates TRPM2 and its alternative spliced isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009a; 106: 7239–7244.
75. Hara Y, Wakamori M, Ishii M, et al. LTRPC2 Ca<sup>2+</sup>-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell* 2002; 9: 163–173.
76. Ayub K, Hallett MB. The mitochondrial ADPR link between Ca<sup>2+</sup> store release and Ca<sup>2+</sup> influx channel opening in immune cells. *FASEB J* 2004; 18: 1335–1338.
77. Perraud AL, Takanishi CL, Shen B, et al. Accumulation of free ADP-ribose from mitochondria mediates oxidative stress-induced gating of TRPM2 cation channels. *J Biol Chem* 2005; 280: 6138–6148.
78. Zhang W, Chu X, Tong Q, et al. A novel TRPM2 isoform inhibits calcium influx and susceptibility to cell death. *J Biol Chem* 2003; 278: 16222–16229.
79. Lange I, Yamamoto S, Partida-Sanchez S, et al. TRPM2 functions as a lysosomal Ca<sup>2+</sup>-release channel in beta cells. *Sci Signal* 2009; 2(71); 23–30
80. Wehage E, Eisfeld J, Heiner I, et al. Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. Aspllice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *J Biol Chem* 2002; 277(26): 23150–23156.
81. Abraham SK. Anti-genotoxic effects in mice after the interaction between coffee and dietary constituents, *Food Chem. Toxicol.* 1996; 34: 15–20.
82. Khanduja KL, Avti PK, Kumar S, et al. Anti-apoptotic activity of caffeic acid, ellagic acid and ferulic acid in normal human peripheral blood mononuclear cells: a Bcl-2 independent mechanism. *Biochim, Biophys, Acta* 2006; 1760: 283–289.
83. Turk G, Ceribasi AO, Sakin F, et al. Antiperoxidative and anti-apoptotic effects of lycopene and ellagic acid on cyclophosphamide-induced testicular lipid peroxidation and apoptosis, *Reprod. Fertil. Dev.* 2010; 22: 587–596.
84. Rodriguez I, Christiane O, Araki K, Garcia I, et al. An early and massive wave of germinal celi apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *Embo J* 1997; 24: 2262–2270.
85. Xie QW, Nathan C. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J. Leuk. Biol.* 1994; 56; 576–582.

86. Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 1997; 53: 451-465.
87. Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJW. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 643-650.
88. Hymowitz N. Tobacco. *Clinical Textbook of Addictive Disorders*. New York: The Guilford Press, 2005; 105-116.
89. Kay J, Tasman A. Substance Abuse: Nicotine Dependence. *Essentials of Psychiatry*, Wiley & Sons Ltd, 2006; 413-477.
90. Benowitz NL, Brunetta PG. Smoking hazards and cessation. In: Mason RJ, Broaddus C, Murray JF, Nadel JA (Editors). *Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine*. 4th Edition, Philadelphia: Elsevier Saunders 2005; 2453-2468.
91. The Tobacco Atlas © World Health Organization Brighton: 2002; 32-33. Krarup T. The testes after torsion. *Br J Urol*. 50: 43-46, 1978.
92. Kass EJ, Lundak B. The acute scrotum. *Pediatr Clin North Am*. 1997; 44: 1251-1267.
93. Hod N, Maizlin Z, Strauss S, et al. The relative merits of Doppler sonography in the evaluation of patients with clinically and scintigraphically suspected testicular torsion. *Isr Med Assoc J*. 2004; 6: 13-15.
94. Heindel RM, Pakyz RE, Reinking LN, et al. The effect of various degrees of unilateral spermatic cord torsion on fertility in the rat. *J Urol* 1990; 144: 366-9.
95. Turner TT. Acute experimental testicular torsion: no effect on the contralateral testis. *J Androl* 1985; 6: 65-72.
96. Janetschek G, SchreckenberG F, Grimm W, et al. Hemodynamic effects of experimental testicular torsion. *Urol Res* 1987; 15: 303-6.
97. Jhunjhunvala JS, Desai A, Kropp KA. Torsion of spermatic cord: an experimental study. *Invest Urol* 1976; 13: 318-20.
98. Gülmez İ, Karacagil M, Tatlışen A. Testis Torsiyonu. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 1988; 8: 435.
99. Başaklar AC. Testis torsiyonu. *Yenidoğanın Cerrahi Hastalıkları*. Palme yayıncılık, Ankara, 1994; 399-405. -438.
100. Baker LA, Turner TT. Leydig cell function after experimental testicular torsion despite loss of spermatogenesis. *J Androl* 1995; 16: 12-17.
101. Bartke A. Apoptosis in germ cells, a generalized or cell type-specific phenomenon. *Endocrinology*, 1995; 136: 3-4.

102. Dominquez C, Martinez M. Histological study in contralateral testis of prepubertal children following unilateral testicular torsion. *Eur Urol*, 1994; 26: 160-163.
103. Hadziselimović F, Geneto R, Emmons L.R. Increased apoptosis in contralateral testis of patients with testicular torsion as a factor for infertility. *J Urol*, 2005; 160: 1158-1160.
104. Tarhan F, Yıldız K, Kuyumcuoğlu U. An enigma: Contralateral effects of experimental unilateral testicular torsion. *Int Urol Nephrol*, 1996; 28: 359-366.
105. Ryan PC, Whelan CA, Gaffney EF, et al. The effect of unilateral experimental testicular torsion on spermatogenesis and fertility. *Br J Urol*, 1998; 62: 359-366.
106. Turner TT. On unilateral testicular and epididymal torsion: no effect on the contralateral testis. *J Urol* 1987; 138:1285-1290.
107. Gürdal M, Tekin A, Erol A ve ark. Torsiyone rat testisinde gelişen I/R hasarında pentoksifilin antioksidan etkisi. *Türk Üroloji Dergisi* 2002; 28: 260-263.
108. Wei SM, Yan ZZ, Zhou J. Curcumin attenuates ischemia reperfusion injury in rat testis. *Fertil Steril* 2009; 91: 271-7.
109. Yıldız H, Durmuş AS, Şimşek H, et al. Protective effect of sildenafil citrate on contralateral testis injury after unilateral testicular torsion/detorsion. *Clinics Sao Paulo*, 2011; 66: 137-42.
110. Janos Z, Krishnamurti D. Oxidative Stress and Disease on Nutrients and cell signaling. Taylor & Francis, 2005; Önsöz.
111. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi/Office Journal of the Turkish Nephrology Association* 1997; 3-4: 92-95.
112. Burçak G, Andican G. Oxidative DNA damage and aging. *Cerrahpaşa J Med* 2004; 35: 159-169.
113. Free MJ, Schluntz GA, Jaffe RA. Respiratory gas tensions in tissues and fluids of the male rat reproductive tract. *Biol Reprod* 1976; 14: 481-488.
114. Chen H, Liu J, Luo L et al. Vitamin E, aging and Leydig cell steroidogenesis. *Exp Gerontol* 2005; 40: 728-736.
115. Zangar RC, Davydov DR, Verma S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 199: 316-331.
116. Kaur P, Kaur G, Bansal MP. Tertiary-butyl hydroperoxide induced oxidative stress and male reproductive activity in mice: Role of transcription factor NF-kappaB and testicular antioxidant enzymes. *Reprod Toxicol* 2006; 22: 479-484.

117. El-Missiry MA, Shalaby F. Role of beta-carotene in ameliorating the cadmium induced oxidative stress in rat brain and testis. *J Biochem Mol Toxicol* 2000; 14: 238-243.
118. Orozco TJ, Wang JF, Keen CL. Chronic consumption of a flavanol and procyanidin rich diet is associated with reduced levels of 8-hydroxy- 2'-deoxyguanosine in rat testis. *J Nutr Biochem* 2003; 14: 104-110.
119. Altunoluk B, Söylemez H, Bakan V, et al. Protective effects of zofenopril on testicular torsion and detorsion injury in rats. *Urol J.* 2011; 8: 313-9.
120. Kanter M. Protective effects of melatonin on testicular torsion/detorsion induced ischemia-reperfusion injury in rats. *Exp Mol Pathol* 2010; 89: 14-20.
121. Kim YH, Kim GH, Shin JH, et al. Effect of korean red ginseng on testicular tissue injury after torsion and detorsion. *Korean J Urol.* 2010; 51: 79-49.
122. Stewart S, Ryan C, Poropat S. Managing patients with acute myocardial ischemia and reperfusion injury with N-acetylcysteine. *Dimens Crit Care Nurs.* 1997; 16: 122- 131.
123. Ferrer JV, Ariceta J, Guerrero D et al. Allopurinol and N-acetylcysteine avoid 60% of intestinal necrosis in an ischemia-reperfusion experimental model. *Transplant Proc.* 1998; 30: 26-72.
124. Sun Z, Lasson A, Olanders K, Deng X, Andersson R. Gut barrier permeability, reticuloendothelial system function and protease inhibitor levels following intestinal ischaemia and reperfusion effects of pretreatment with N-acetyl-L-cysteine and indomethacin. *Dig Liver Dis.* 2002; 34: 560 -569.
125. Çay A, Alver A, Küçük M, I k O, Emina ao lu MS, Karahan SC, De er O. The Effects of N-Aceyylcystein on Antioxidant Enzyme Activities in Experimental Testicular Torsion. *J Surg Res.* 2006;10.
126. Smyrniotis V, Arkadopoulos N, Kostapanagiotou G et al. Attenuation of İschemic injury by N-acetylcysteine preconditioning of the liver. *JSurRes.*2005;129:31-37.
127. Demir S, nal-Erden M. Pentoxifylline and N-acetylcysteine in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Clin Chim Acta.* 1998; 275: 127-135
128. Rodrigues AJ, Evora PRB, Schaff HV. Protective effect of N- acetylcysteine against oxygen radical-mediated coronary artery injury. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2004;37: 1215- 1224
129. Miller BA. Inhibition of TRPM2 function by PARP inhibitors protects cells from oxidative stress-induced death. *Br J Pharmacol* 2004; 143(5): 515-516.

130. Miller BA. Inhibition of TRPM2 function by PARP inhibitors protects cells from oxidative stress-induced death. *Br J Pharmacol* 2004; 143(5): 515-516.
131. Zeng X, Sikka SC, Huang L, et al. Novel Role for the Transient Receptor Potential Channel TRPM2 in Prostate Cancer Cell Proliferation. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2010; 13(2): 195-201
132. Zou J, Ainscough JF, Yang W, et al. A differential role of macrophage TRPM2 channels in Ca<sup>2+</sup> signaling and cell death in early responses to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013 Jul 1; 305(1): C61-9.
133. Du J, Xie J, Yue L. Intracellular calcium activates TRPM2 and its alternative spliced isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009a; 106: 7239–7244



## 8. ÖZGEÇMİŞ

13 Eylül 1993 tarihinde Elazığ'da doğdum. 2011 yılında Elazığ Cumhuriyet Lisesi'nden mezun olup aynı yıl Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nü kazandım. 2015 yılında lisans eğitimimi tamamladım. 15.09.2016 tarihinde Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım.

