

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

RATLARDA TESTİS TORSİYON-DETORSİYONUNA
MYRİCETİNİN ETKİSİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Esra EKŞİ

TRABZON - 2019

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

RATLARDA TESTİS TORSİYON-DETORSİYONUNA
MYRİCETİNİN ETKİSİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Esra EKŞİ

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Hatice Sonay YALÇIN CÖMERT

TRABZON – 2019

TEŐEKKÖRLER

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

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

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

Tez çalışmamın değerlendirmesinde yardımlarını esirgemeyen Patoloji Anabilim Dalı öğretim görevlisi Doç. Dr. Sevdegöl MUNGAN'a ve Biyokimya Anabilim Dalı öğretim görevlisi Prof. Dr. Ahmet ALVER'e ve Arş.Gör. Elif ŞAHİN'e çok teşekkür ederim.

Son olarak hayatımın her döneminde yanımda olan, bu günlere gelmemde büyük emek gösteren annem Hava EKŞİ, babam Osman EKŞİ'ye, ayrıca sevgi ve desteklerini esirgemeyen kardeşlerim Ali Fuat, Kübra ve Mahmut'a çok teşekkür ederim.

Esra EKŞİ

ÖZET

Ratlarda Testis Torsiyon-Detorsiyonuna Myricetin'in Etkisi

Testis torsiyonu; spermatik kordun kendi etrafında dönmesine bağlı olarak testis ve etrafındaki yapıların kan akımının kesilmesine neden olan acil bir durumdur. İlk 4-6 saat içerisinde tanı konulmadığı takdirde özellikle komplet torsiyonlarda testiste geri dönüşü olmayan iskemik hasar ve gonad kaybı meydana gelmektedir. Testis torsiyonunun İ/R patofizyolojisi; torsiyon sırasında oluşan iskemik hasara ek olarak cerrahi detorsiyon işlemi sonrası açığa çıkan serbest oksijen radikalleri hücre duvarında ve mitokondride lipit peroksidasyonuna yol açarak testis dokusunda reperfüzyon hasarına yol açmaktadır. Bu deneysel çalışmamızda; myricetin'in antioksidan özelliğinin yanı sıra sperm motilitesini ve viabilitesini artırıcı etkisinden dolayı testis torsiyonunda İ/R hasarına karşı koruyucu etkisini ve bir tedavi şekli olarak kullanılabilirliğinin araştırılmasını amaçladık.

Her grupta 6 adet rat olmak üzere 3 grup oluşturuldu. Torsiyon, sol testis dışarı alınarak saatin aksi yönünde 720 derece döndürülmesiyle oluşturuldu. Grup 1 sham grubuydu. Grup 2'ye testis torsiyonu yapıp 2 saat beklendi, detorsiyondan 2 saat sonra orşiektomi yapıldı. Grup 3'e torsiyon yapıp 2 saat beklendikten sonra detorsiyondan 30 dk önce 1mg/kg intraperitoneal myricetin verilip detorsiyondan 2 saat sonra orşiektomi yapıldı. Testis torsiyonunda reperfüzyon hasarının önlenmesinde myricetin etkisi biyokimyasal olarak, doku MDA, SOD, CAT düzeylerine bakıldı. Ayrıca histopatolojik etkisini göstermek içinde JTBS ile değerlendirildi.

Sonuçlar değerlendirildiğinde myricetin verilen grupta MDA değerlerinde grup 2'ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gösterilmiştir ($p < 0,017$). Ayrıca myricetin verilen grup ile 2. grup SOD ve CAT değerleri karşılaştırıldığında, bu değerlerin grup 2'ye göre yüksek olduğu görüldü. Ancak bu değerlerin istatistiksel olarak incelenmesinde anlamlı bir farklılık gösterilemedi ($p = 0,337$ ve $p = 0,025$). Bunun sebebinin hayvan hakları nedeniyle oluşturulan gruplardaki rat sayısının minimalde tutulmuş olmasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Histopatolojik incelemede ise myricetin verilen gruptaki testiste meydana gelen İ/R hasarında grup 1 ve grup 2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı

fark olduğu görülmüştür ($p<0,017$). Myricetin uygulamasının testis dokusundaki hasarı torsiyon grubuna göre histopatolojik açıdan anlamlı derecede azalttığı ancak kontrol grubuna yakın değerlere ulaşamadığı görüldü.

Sonuç olarak testis torsiyonunda detorsiyonundan yarım saat önce verilen düşük doz myricetin, reperfüzyon hasarını tam önlemediği ancak anlamlı derecede testis dokusunu koruduğunu gösterdik.

Anahtar Kelimeler: Testis torsiyonu, iskemi/reperfüzyon hasarı, myricetin



SUMMARY

Effects of Myricetin on Testicular Torsion-Detorsion Injury in Rats

Testicular torsion; It is an emergency that causes the blood flow of the testis and the surrounding structures to interrupt due to the rotation of the spermatic cord. If the diagnosis is not made within the first 4-6 hours, irreversible ischemic damage and gonad loss occur in the testicle, especially in complete torsions. I / R pathophysiology of testicular torsion; In addition to ischemic damage during torsion, free oxygen radicals released after surgical detorsion lead to lipid peroxidation in the cell wall and mitochondria, causing reperfusion damage in the testicular tissue. In this experimental study; We aimed to investigate myricetin's antioxidant properties as well as its protective effect against I / R damage in testicular torsion and its usability as a treatment modality due to its effect on increasing sperm motility and viability.

Three rats were formed in each group. Torsion was created by taking the left testis out and turning it counterclockwise 720 degrees. Group 1 was the sham group. In Group 2, testicular torsion was performed and waited for 2 hours, orchietomy was performed 2 hours after detorsion. Group 3 received torsion and waited for 2 hours, then 1 mg / kg intraperitoneal myricetin 30 minutes before detorsion and orchietomy was performed 2 hours after detorsion. The effects of myricetin on testicular torsion reperfusion injury were evaluated biochemical, tissue MDA, SOD, CAT levels. It was also evaluated with JTBS to show its histopathological effect.

When the results were evaluated, it was shown that there was a statistically significant decrease in MDA values in myricetin group compared to group 2 ($p < 0,017$). In addition, when SOD and CAT values were compared with myricetin group, it was found that these values were higher than group 2. However, there was no significant difference in statistical analysis of these values ($p = 0.337$ and $p = 0.025$). We think that the reason for this is related to the fact that the number of rats in the groups formed due to animal rights was kept to a minimum. In histopathological examination, there was a statistically significant difference in

testicular I / R damage in myricetin group compared to group 1 and group 2 ($p < 0,017$). Myricetin treatment significantly decreased testicular tissue damage compared to the torsion group but did not reach the values close to the control group.

As a result, we showed that low dose myricetine given half an hour before detorsion in testicular torsion did not completely prevent reperfusion injury but significantly protected testicular tissue.

Key Words: Testicular torsion, ischemia/reperfusion injury, myricetin



KISALTMALAR LİSTESİ

İ/R	: İskemi/reperfüzyon
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
MIF	: Mülleryan inhibe edici faktör
IGF-3	: İnsülin benzeri büyüme faktör-3
MR	: Manyetik rezonans
NO ⁻	: Nitrik oksit
O ₂ ⁻	: Süperoksit anyonları
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
OH ⁻	: Hidroksil radikali
ATP	: Adenozin Trifosfat
Na ⁺ /K	: Sodyum-Potasyum
CO ₂	: Karbondioksit
H ₂ CO ₃	: Karbonik asit
MDA	: Malondialdehit
SOD	: Superoksit dismutaz
CAT	: Katalaz
PDE	: Fosfodiesteraz
TBA	: Tiyobarbiturik asit
NBT	: Nitroblue tetrazolium
JTBS	: Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması
GSH	: Glutatyon

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	ii
SUMMARY	iv
KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLOLAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
RESİMLER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Testis Embriyolojisi	3
2.2. Testis Anatomisi.....	4
2.3. Testis Histolojisi.....	6
2.4. Testis Fizyolojisi	7
2.4.1. Spermatogenez.....	7
2.4.2. Testosteron ve Diğer Erkek Cinsiyet Hormonları	7
2.5. Testis Torsiyonu Epidemiyoloji Ve Etyolojisi.....	8
2.5.1. Extravajinal Torsiyon	9
2.5.2. İntravajinal Torsiyon.....	9
2.5.3. Testis Eklerinin Torsiyonu (Appendiks Testis ve Epididimis Torsiyonları)	10
2.5.4. Klinik ve Tanı	10
2.5.5. Tedavi	11
2.6. İskemi/Reperfüzyon Hasarı.....	12
2.6.1. Tanım.....	12
2.6.2. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller	13
2.6.3. Antioksidan Sistemler.....	14
2.7. Testiste İskemi/Reperfüzyon Hasarı	15
2.7.1. Testisin İskemik Hasarlanmalarında Antioksidan Tedavi.....	15
2.8. Myricetin	16

3. MATERYAL VE METOD.....	18
3.1. Biyokimyasal İnceleme	19
3.1.1. Testis Dokusunda MDA Düzeyinin Ölçülmesi	19
3.1.2. Testis Dokusunda Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini ..	21
3.1.3. Testis Dokusunda Katalaz (CAT) Aktivite Tayini	23
3.2. Histopatolojik İnceleme	25
3.3. İstatistiksel Analiz	26
4. BULGULAR.....	27
4.1. Testis Hasarının Biyokimyasal Olarak Değerlendirilmesi.....	27
4.2. Testis Hasarının Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi	28
4.2.1. Testisteki Histopatolojik Hasarın İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi.....	31
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	37
7. KAYNAKÇA.....	38

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Her Grupta 6 Adet Rat Olmak Üzere 3 Grup Oluşturuldu.....	18
Tablo 2. Doku MDA Seviyesi Ölçümü İçin Yapılan Reaksiyon Karışımı	20
Tablo 3. SOD Aktivitesi Ölçümü İçin Hazırlanan Reaksiyon Karışımı	22
Tablo 4. Katalaz Aktivite Tayini İçin Yapılan Reaksiyon Karışımı	23
Tablo 5. Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması	26
Tablo 6. Gruplara Göre Doku Parametrelerinin Ortalama Değerleri	27
Tablo 7. Grupların MDA Değerlerinin İkişerli Karışılaştırılması	27
Tablo 8. Grupların SOD Değerlerinin İkişerli Karışılaştırılması	28
Tablo 9. Grupların CAT Değerlerinin İkişerli Karışılaştırılması	28
Tablo 10. Gruplara Göre JTBS'larının Ortalama Değerleri	31
Tablo 11. Grupların JTBS Değerlerinin İkişerli Karışılaştırılması	32

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Myricetin'in Yapısı.	17
Şekil 2. Doku MDA Seviyesi Ölçümü İçin Standart Grafiği.....	20
Şekil 3. SOD Aktivitesi İçin Standart Konsantrasyonların Logaritmasınakarşı % İnhibisyon Grafiği.....	22
Şekil 4. CAT Aktivite Hesaplaması İçin Kullanılan Protein Standart Grafiği	25

RESİMLER LİSTESİ

- Resim 1.** Kontrol grubuna Ait Testisteki Spermatid (↑) ve Spermatozoonlar (▲) . 29
- Resim 2.** Torsiyon/Detorsiyon Grubuna Ait Sol Testis Tübül Lümeninde Az Sayıda Hayalet Germinal Epitel Hücreleri İzlendi (▲)..... 30
- Resim 3.** Grup 3'e Ait Testisteki Spermatid (↑) ve Spermatozoonlar (▲)..... 31

1. GİRİŞ

Testis torsiyonu; yenidoğanlar, çocuklar ve adölesanlarda spermatik kordun kendi etrafında dönmesine bağlı olarak testis ve etrafındaki yapıların kan akımının kesilmesine neden olan acil bir durumdur (1, 2). İnfertilite ve subfertiliteyi önlemek için erken tanı ve cerrahi müdahale gerekir (3). 25 yaş altı erkeklerde görülme sıklığı 1/4000'dir (4). Hastaların yaklaşık %61'i 21 yaş altında olup bimodal yaş dağılımı mevcuttur. Yenidoğan peryodunda ve 13 yaş civarında olmak üzere iki ayrı dönemde pik yapar (5, 6). İlginç olarak testis torsiyon sıklığı çevresel faktörlerle ilişkilendirilmiştir. Kış aylarında özellikle Aralık ayında testis torsiyon sıklığının arttığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (%14) (7). Testis torsiyonu tanısı ilk 4-6 saat içerisinde konulmalıdır. Özellikle komplet spermatik kord torsiyonu varsa, yani 720 derecelik dönme mevcutsa testiste geri dönüşü olmayan iskemik hasara ve gonad kaybına neden olur (8). Başarılı bir cerrahi müdahaleye rağmen testiküler atrofi ve sonraki yıllarda hastaların %40-60'ında infertilite gelişebilir (9).

Testis torsiyonunun primer patofizyolojisi; torsiyone olmuş spermatik kordun neden olduğu iskemik hasar sonrası cerrahi detorsiyon serbest oksijen radikallerine bağlı reperfüzyon hasarına neden olmaktadır (10). İskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarı; nötrofillerin, enflamatuvar sitokinlerin ve serbest oksijen radikallerinin (SOR) aktivasyonunu içeren hücre içi bir kaskadın uyarılması sonucu gerçekleşir. SOR, hücrel ve mitokondriyal membranlarda lipid peroksidasyonuna neden olur. Membranlardaki lipit peroksidasyonu, membran geçirgenliğini değiştirir veya membran bütünlüğünü bozar. Böylece hücrel organizma üzerinde önemli bir hasara neden olur ve esas olarak germ hücreye spesifik hücre ölümü yoluyla spermatogenez kaybına neden olur (11, 12). Endojen antioksidan savunma sistemi, testis dokusunu serbest oksijen radikallerine karşı korur. Ancak, SOR'nin aşırı üretimi nedeniyle savunma sistemleri bazen yetersiz olabilir (13). İ/R'una ek olarak, germ hücre ölümünün kriptorşidizm, testosteron çekilmesi ve toksinlere maruz kalma gibi çeşitli testiküler patolojik durumlarda rol oynadığı düşünülmektedir (14).

Son yıllarda, kapsamlı araştırma çabaları testis İ/R hasarını en aza indirmek veya hatta önlemek için etkili stratejiler ve ilaçlar bulmayı amaçlamıştır. Ancak, skrotumun soğutulmasından başka, klinik pratikte bugüne kadar başka hiçbir yöntem

başarıyla uygulanmadı (15). Yapılan deneysel çalışmalarda, detorsiyon sonrası ortaya çıkabilecek İ/R hasarını, sonuç olarak da infertilite gelişimini önlemek için Sildenafil, Nifedipin, Ozon, Darbepoetin ve Tadalafil gibi birçok madde kullanılmıştır (9, 13, 16, 17).

Myricetin (3,3',4',5,5',7-hexahydroxyflavone)doğal bir flavonoiddir; çay, çilek, fındık, meyveler ve sebzelerde bulunur (18, 19). Myricetin, antienflamatuar (20), antioksidan (21), analjezik, anti-tümör (22, 23) ve anti-bakteriyel etkiler (24) dahil olmak üzere çeşitli biyolojik etkilere sahiptir. Ayrıca yapılan bir çalışmada fertil erkeklerden alınan ejakülata, myricetin (10-100nM) inkübasyonunun sperm motilitesini %25-50 artırdığı gösterilmiş; benzer şekilde, 10-100nM'nin kontrole göre viabiliteyi %20-30 oranında artırdığı kaydedilmiştir(25). Bu pleiotropik etkiler, myricetini çalışmaya uygun bir aday yapmaktadır.

Myricetin tedavisinin İ/R hasarının yol açtığı doku tahribatlarında iyileştirici etkisini gösteren sınırlı sayıda çalışma mevcut olup (26-28), testis torsiyonuyla ilgili çalışma bulunmamaktadır.

Biz bu çalışmamızda myricetin antioksidan özelliğinin yanı sıra sperm motilitesini ve viabilitesini artırıcı etkisinden dolayı testis torsiyonunda İ/R hasarına karşı koruyucu etkisini ve bir tedavi şekli olarak kullanılabilirliğinin araştırılmasını amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Embriyolojisi

Embriyonun cinsiyeti, fertilizasyon esnasında belirlenmesine rağmen, gelişimin 7. haftasına kadar gonadlar erkek ya da dişi morfolojik özelliklerine sahip değildir (29).

Primordial germ hücreleri, gelişimin erken evrelerinde yolk kesesinin allontois tarafındaki duvarında endoderm hücreleri arasında belirler. 5. haftanın başında primitif gonadlara ulaşarak epitelyum hücreleri altındaki mezenşimin içine gömülürler. Gelişimin 5. haftasının sonuna doğru korteks ve medullaya sahip bipotansiyel yapıdaki gonad hücreleri oluşur (29). Primordial germ hücreleri XY kromozomlarına sahip ise embriyo erkek yönünde farklılaşır. 6. haftada Mülleryan inhibe edici faktör (MIF) üretiminden sorumlu Sertoli hücreleri; 8. haftada ise testosteron ve insülin benzeri büyüme faktör-3 (IGF-3) üreten Leydig hücreleri meydana gelir (30).

Testis gelişiminde temel rolü olan SRY geni testisin, mezonefrik kanal tübüllerinin gonadal sırtta penetre olabilmelerini ve testislerin gelişiminde etkili olan kemotaktik ajan salgılamasını uyarır. Sertoli hücrelerinden salgılanan mülleryan inhibe edici faktör (MIF) mülleryan (paramezonefrik) kanalların regresyonuna neden olur. İnterstisyel leydig hücrelerinin salgıladığı testosteron, 5-alfa redüktaz enzimi vasıtasıyla dihidrotestosterona dönüştürülür. Testosteron wolfian (mezonefrik) kanalların virilizasyonundan, dihidrotestosteron ise erkek dış genital yapılarının farklılaşmasından sorumludur (29).

Pubertal gelişime kadar solid yapıda olan testis kordonları pubertal gelişim ile lümenleri açılarak seminifer tübülleri oluştururlar. Rete testis ve seminifer tübüllerin bir araya gelmesi ile duktus efferentesler meydana gelir. Wolfian kanallar kıvrımlar yaparak duktus epididimisi oluşturur (29, 31). Mezonefrik kanal epididimin kuyruk bölgesinden seminal vezikül tomurcuğuna ulaşana kadar kalın bir kas kılıfı ile sarılı olup bu kısım duktus deferens olarak adlandırılır. Seminal veziküllerden sonraki duktus deferens kısmına da duktus ejakulatoryus denir. Erkekte paramezonefrik

kanalın kranial ucu hariç tamamı dejenere olur. Dejenere olmayan kısımdan ise apendiks testis meydana gelir (32).

Testis ve mezonefroz 2. ayın sonunda ürogenital mezenter vasıtasıyla karın arka duvarına bağlıdır. Testisin kaudal kısmından başlayarak uzanım gösteren mezenşimal yapı gubernakulum olarak adlandırılır. Bu yapı testisin skrotuma inişini tamamlamadan önce inguinal bölgede eksternal ve internal oblik kaslar arasında uzanım gösterir. Testisin skrotum içine inmeye başlamasıyla birlikte gubernakulumun ekstraabdominal kısmı meydana gelerek inguinal bölgeden skrotuma doğru ilerler. Testis inguinal kanalı terk ettiği esnada gubernakulumun ekstraabdominal kısmı skrotuma tutunur. Testisin skrotuma MIF ve androjen hormonların etkisi altında meydana gelmektedir (32).

Patolojik bir durum olmadığı takdirde gestasyonun yaklaşık 12. haftasında testisler inguinal bölgeye ulaşmakta, inguinal kanalı 28. haftada terk etmekte ve skrotuma yaklaşık olarak 33. haftada ulaşmaktadır. Çölemik boşluktan oluşan periton, karın ön duvarının her iki lateral kısmında vaginal proses adı verilen peritoneal bir cep meydana getirir. Musküler ve fasiyal yapılarla beraber skrotuma doğru ilerleyen prosesus vaginalis inguinal kanalı oluşturur. Testisler inguinal kanalı geçtikten sonra skrotuma inerek prosesus vaginalisin katlantısı ile sarılırlar. Testisi saran periton kaynaklı tunika vajinalisin iç kısmındaki parçası visseral yaprağını, dışındaki parçası da pariyetal yaprağını oluşturur. Fasya transversalis internal spermatik fasyayı, internal oblik kas kremaster liflerini ve eksternal oblik kas da eksternal spermatik fasyayı oluşturur (32).

2.2. Testis Anatomisi

Erişkin bir erkeğin testisi ovoid şekilli olup 4x3x2,5cm boyutlarındadır ve her bir testisin hacmi ortalama 30 ml kadardır. Genellikle sol testis, sağ testise oranla yaklaşık 1cm kadar aşağıda yer almaktadır (33). Testisin 2/3 anterolateral kısmı serbest iken, posterolateral yüzü epididim, bağ dokusu ve damarlarla örtülüdür. “Mediastinum testis” olarak adlandırılan kranioposterior kısmından ise seminal taşıyıcılar çıkar. Testis dıştan içe doğru, tunika vajinalis, tunika albuginea ve tunika vaskulosa olmak üzere 3 tabakadan oluşan sert bir kapsül ile çevrelenmiştir.

Peritondan kaynaklanan tunika vajinalis, visseral ve parietal olmak üzere 2 tabakadan oluşur (34). Bu tabakalar arasında potansiyel bir boşluk vardır. Bu boşlukta testisin etrafını saran az miktarda seröz sıvı bulunur ve bu sıvının artışı hidrosele neden olur. Ekstravaginal testis torsiyonunun olduğu kompartman burasıdır (35).

İnsan testis parankimi kan akımı 100 mg doku için dakikada yaklaşık 9 ml'dir. Testiküler arter (internal spermatik arter) abdominal aortadan renal arterin hemen altında anterolateral yüzeyden çıkarak retroperitoneal bölge boyunca internal inguinal ringe doğru ilerler. Ana testiküler arterdir ve testis kan akımının yaklaşık 2/3'sini sağlar. Kremasterik arter (eksternal spermatik arter), a. iliaka eksternanın dalı olan a.epigastrika inferiorundan ayrılır ve esas olarak tunika vajinalisi besler. Deferensial arterler (vazal arter), a. iliaka internanın son dalı olan a.vezikalis inferior veya superiorundan ayrılır, vaz deferens ve epididimisin globus minorunu besler. Bu üç arter testiküler mediastinumda anastomoz yaparak testisin kanlanmasına katkı sağlar (36-38).

Testisin venöz drenajı internal testiküler (spermatik) ven, kremasterik (eksternal spermatik) ven, vazal (deferensiyel) ven ve gubernakuler ven olmak üzere dört ayrı sistemle olmaktadır (37, 39). İnternal spermatik ven, internal spermatik artere eşlik ederek, solda renal vene dik açıyla, sağda V. cava inferiora oblik olarak açılır (40).

Testis ve epididimden kaynaklanan venler, mediastinumdan çıktıktan sonra duktus deferens önünde ve testiküler arter çevresinde 8-12 venden oluşan bir şebeke şeklinde serbest anastomoz yapan 3 ayrı ven grubu tarafından pampiniform pleksusu oluşturulur (41). Pleksus pampiniformis ile kremasterik pleksus ve vazal ven sistemi, inguinal ring hizasında birbirleriyle anastomoz yaparlar. Pleksuslar tekrar daha yukarıda birleşerek gonadal veni meydana getirirler. Böylece deferansiyel ve kremasterik venöz yapılar, internal spermatik venin ligasyonu sonrasında kollateral dolaşım sağlar (37, 42). Testosteron, konsantrasyon gradientine göre venden artere pasif difüzyon ile taşınır (43).

Spermatik kortta, karşılıklı akımla ısı değişimi, normal bireylerde rektal ısıdan 2-4 °C daha düşük ısıda olan testise kan sağlayarak ısı regülasyonuna katkıda bulunur (44).

Testisin innervasyonu, mezenterika süperior ve renal arterin olduğu yerdeki aortik pleksuslar ve kollateral ganglionlar ile ilişkili sempatik lifler ve genel visseral duyu lifleri ile sağlanır (45).

2.3. Testis Histolojisi

Testisler; embriyonik gelişimi, seksüel olgunlaşmayı ve üreme fonksiyonlarını etkileyen ekzokrin ve endokrin fonksiyonları olan bir çift organdır. Puberte döneminde testis leydig hücrelerinden salgılanan testosteron sperm üretiminin başlamasını ve sekonder seks karakterlerinin oluşumunu sağlar. Skrotumda yer alan testisler, dıştan içe doğru tunika vajinalis, tunika albuginea ve tunika vasküloza olmak üzere üç tabakalı kalın bir kapsül ile çevrilidir. Tek katlı mezotelyal hücrelerden oluşan tunika vajinalisin preparatlarda izlenmesi güçtür. Kapsülün en kalın ve belirgin tabakası olan, yoğun bir fibroelastik bağ dokusundan meydana gelen tunika albuginea testisin posteriorunda kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Tunika albuginea, kapsülden testisin içine uzanan ince bağ dokusu uzantıları sayesinde testisi insanda sayıları 250'ye varan lobüllere ayırır (46).

Testisin %30'unu oluşturan interstisyel dokuda leydig hücreleri, lenfatikler, kan damarları, sinirler ve makrofajlar bulunur. Santral yerleşimli ve tek çekirdeği bulunan leydig hücreleri, testosteron üretiminden sorumludur. Lüteinizan hormon uyarısıyla kolesterolden sentezlenen testosteronun; %98'i proteinlere bağlı olarak, %2'si ise serbest halde kan dolaşımında bulunur. Hipofizden salgılanan folikül stimülan hormon ve lüteinizan hormon testiste spermatogenezi uyarır. Folikül stimülan hormon vasıtasıyla sertoli hücrelerinde androjen bağlayıcı protein üretilir; leydig hücrelerinde lüteinizan hormon etkisiyle üretilen testosteronu bağlayarak seminifer tübüle getirir (29, 47, 48).

Tunica albuginea tarafından oluşturulan testis lobülleri kan damarlarını, sinirleri ve interstisyel hücrelerden meydana gelen seminifer tubülleri oluşturur. Seminifer tubüller mediastinumda rete testis olarak devam eder; rete testis, duktuli efferentes ile sonra da epididim ile devam eder ve lümenleri epitel ile kaplıdır (47).

Seminifer epitel; germ hücreleri olan spermatogenetik hücrelerdir ve germ hücrelerine destek olan, beslenmelerini sağlayan sertoli hücreler olmak üzere iki ayrı

hücre grubu içerir. Spermatogenetik hücreler sertoli hücrelerinin lateralinde bulunur. Kan-testis bariyerini bu iki hücre grubu arasındaki sıkı bağlantı kompleksi oluşturur (49).

Seminifer tübüllerin karbonhidrat, iyon, aminoasit ve protein içeriği; kan ve lenf dolaşımından farklılıklar gösterir. Kan-testis bariyeri nedeniyle oluşan bu fark germ hücrelerinin dolaşım yolu ile gelen zararlı maddelere karşı korunmasını sağlar. Spermatogenetik hücreler farklı gelişim safhalarından geçer. Bazal membrana yakın yerleşimli olanlar spermatogonyumlardır, lümen yakınında yerleşmiş olanlar daha olgun yapıdaki spermatid hücreleridir. Lümen içerisinde bulunan hücreler ise spermiyumlardır (48).

2.4. Testis Fizyolojisi

Testisler seminifer tübüllerden meydana gelir ve bu yapılar spermlerin üretildiği yerdir. Spermler seminifer tübüllerden epididime geçer. Epididim vaz deferense açılır ve prostat bezine girmeden önce genişler. Prostatın her iki tarafında yer alan seminal veziküller, ampüllanın prostat girişine açılır ve hem ampülle hem de seminal vezikül içerikleri ortak bir ejakülatör kanalla prostat gövdesinden geçerek internal üretraya boşalır (50).

2.4.1. Spermatogenez

Embriyonun gelişimi sırasında primordiyal germ hücreleri testise göç eder ve seminifer tübüllerin iç yüzeyinde spermatogonyum adı verilen olgunlaşmamış germ hücrelerine dönüşürler. Spermatogonyumlar, puberteden başlayarak mitoz bölünmeye uğrar ve sürekli olarak proliferasyon ve değişim göstererek sperm yapımı için tüm gelişim basamaklarından geçerler (50).

2.4.2. Testosteron ve Diğer Erkek Cinsiyet Hormonları

Testisler, testosteron, dihidrotestosteron, androstenedion gibi androjenler olarak tanımlanan pek çok seks hormonlarını salgılar. Testosteron diğer androjenlere

göre daha fazla miktarda bulunduğu için en önemli testis hormonu olarak kabul edilebilir fakat büyük bir kısmı hedef dokularda daha aktif olan dihidrotestosterona dönüşür. Testosteron, interstisyel Leydig hücreleri tarafından üretilir. Androjenler steroid yapıda bileşikler olup hem testislerde hem de adrenal bezlerde kolesterolden veya doğrudan asetil koenzim A'dan sentezlenir. Erkeklerde testosterona ek olarak az miktarda östrojen de sentezlenir. Östrojen oluşumu sertoli hücrelerinde testosteronun östradiole dönüştürülmesi sonucu gerçekleşir (50).

Testosteron genel olarak vücuttaki belirgin erkek özelliklerinin oluşumundan sorumludur. Testisler genellikle gebeliğin son 2-3 ayında yeterli düzeyde testosteron salgılanmasıyla skrotuma iner. Testosteron puberte sonrasında penis, skrotum ve testislerde büyümeye, kıllanma artışına, ses kalınlaşmasına, derinin kalınlaşmasına, sivilce oluşumuna, protein oluşumu ve kas gelişiminin artmasına, kemik büyümesi ve kalsiyum depolanmasının artışına, bazal metabolizmanın hızlanmasına neden olur (50).

2.5. Testis Torsiyonu Epidemiyoloji ve Etyolojisi

Testis torsiyonu ilk defa 1800'lü yıllarda Hunter tarafından tanımlanmıştır. Spermatik kordun vertikal ekseninde dönmesiyle testis ve eklerinin kanlanmasının bozulmasına bağlı olarak etkilenen testiste kalıcı iskemik yaralanmaya sebep olabilen acil bir durumdur (51-53). Yapılan deneysel çalışmalarda testiküler iskemiye en duyarlı hücrelerin başta spermatogonia ve spermatozoidler olmak üzere germ hücreleri olduğu gösterilmiştir. Testosteron üretiminden sorumlu Leydig hücreleri germ hücrelerine kıyasla iskemiye daha dirençlidir (54). Torsiyon sonucunda gelişen testiküler hasar, torsiyonun derecesi ve süresi ile yakından ilişkilidir (54, 55). Başarılı bir cerrahiye rağmen bu hastaların %40-60'ında testiküler atrofi ve infertilite gelişmektedir (56).

Testis torsiyonu yenidoğan ve puberte olmak üzere iki dönemde pik yapar. Yenidoğan döneminde sık görülmesinin nedeni psödopuberteye bağlı olarak testosteron düzeylerinin yüksek olmasıdır. Pubertede daha sık görülmesinin nedeni ise; bell-clapper deformitesi, artan testosteron düzeyine sonucu oluşan testis elevasyonu ve rotasyonudur (57, 58).

Testis torsiyonu; ekstravajinal torsiyon, intravajinal torsiyon ve testis eklerinin torsiyonu (Appendiks testis ve epididim torsiyonu) olmak üzere üç şekilde görülür.

2.5.1. Extravajinal Torsiyon

Torsiyonların yaklaşık % 10'u neonatal dönemde gelişmektedir. Bunların çoğu prenatal dönemde görülmekte beraber (59), torsiyonun nedeni olarak testisin skrotuma inişi sırasında yaşanan aksaklıklar ve gubernakulum'un skrotum duvarına fiksasyonunda bozukluklar sorumlu tutulmaktadır (60). Ekstravajinal torsiyonda; testis, epididim ve tunika vajinalis spermatik kordonun üst seviyesinde, vertikal aksta torsiyone olur. Ekstravajinal torsiyon küçük yasta görülen torsiyonların çoğundan sorumludur (61). Kesin torsiyon tanısı konulan olguların yaklaşık % 25'inde, önceden en az bir kez olan ve kendiliğinden geçen skrotal ağrı öyküsü vardır (62).

Torsiyon inguinal kanal düzeyinde olabileceği gibi daha distalde de oluşabilir. Ekstravajinal torsiyon, prenatal veya postnatal ilk bir ayda gelişir, tanı ancak doğum sonrası dönemde konabildiği için intrauterin torsiyonlarda testisin kurtarılabilmesi mümkün değildir (63).

2.5.2. İnvajinal Torsiyon

Testis torsiyonlarının yaklaşık %90'ı intravajinaldir. İnvajinal torsiyonda spermatik kordun tunika vajinalise yapıştığı yerin distal kısmında torsiyon vardır. Tunika vajinalisin spermatik korda olması gereken yerden daha proksimalden tutunması, testisin tunikavajinalis içinde çan tokmağı şeklinde asılı durmasına yol açar. "Bell-clapper deformitesi" olarak adlandırılan bu durum sıklıkla bilateral olup torsiyon için temel predispozan faktör olarak kabul edilir ve spermatik kordun hareketlerle veya kremasterik kontraksiyonlarla rahatça dönmesine neden olur. Pubertede testesteron seviyesinin artışı ile testiste meydana gelen hızlı büyüme de predispozan faktör olarak gösterilir (64, 65). Ayrıca pubertal dönemde kış ayları ve gece sabaha karşı testis torsiyon sıklığının arttığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (6). İnmemiş testis, epididimin gevşek birleşmesi, testisin horizontal uzanımı, testisin

gubernakular kısmının anormal uzun yada kısa olması ve travmalar da torsiyona neden olabilmektedir (66).

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

Appendiks testis ve epididimislerin üstünde bulunan embriyolojik kalıntıların torsiyonu sonucu gelişen patolojik durumdur. Sıklıkla 16 yaş sonrası dönemde görülür. Ani başlangıçlı şiddetli ağrı sonrası testisin veya epididimisin üst kısmında kitle ele gelmesi patognomoniktir (36, 67). Appendiks testis torsiyonunda, skrotum cildinde mavi-nokta bulgusu (blue-dot sign) gözlenir, fizik muayenede appendiks testis ödemli ve şiş iken, geri kalan testis dokusu ise normal olarak palpe edilir. Tedavisinde ağrı kesici ve skrotal elevasyon önerilmektedir. Eğer tedavi edilmezse ağrı ve skrotal ödem 5-7 gün içinde geriler ve kaybolur (36).

Testis torsiyonunda testis dokusunun zedelenmesinin başlangıç evresinde venöz tıkanıklık vardır. Bunun sonucu olarak testiste ödem ve ağrı meydana gelir. Testisin tunikası elastik olmadığı için, venöz konjesyon arteriel dolaşımın bozulmasına neden olur. Bir süre sonra venöz tromboz, daha sonrada arteriel tromboz ve testiküler infarkt meydana gelir. Testis torsiyonunda gonadın canlılığını iki parametre etkiler; torsiyonun derecesi ve süresi.

Torsiyonun başlangıcı ile testisin canlılığını kaybetmesi arasında geçen süre hastadan hastaya değişiklik gösterir. Hastaların bazısında testis iki saat içerisinde nekroz olabileceği gibi 24 saat sonunda da dolaşımı çok fazla bozulmamış olabilir (68, 69). Ancak genel olarak ilk 4-8 saat torsiyon açısından çok önemlidir (70).

2.5.4. Klinik ve Tanı

En sık klinik bulgular skrotal şişlik, ağrı, ödem ve kızarıklıktır, bazen bulantı ve kusma da eşlik edebilir (71). Akut yenidoğan torsiyonunda testis sert ve büyümüş durumdadır. Eşlik eden skrotal ödem ve inflamasyon bulguları mevcuttur, çocuk huzursuzdur (72). Puberte döneminde kış ayları ve gece sabaha karşı testis torsiyon sıklığı artmıştır (6). Torsiyon genellikle sol testiste görülür, ayrıca inmemiş

testislerde de torsiyon solda daha sıktır (73). Torsiyone testis genellikle retrakte, yüksek skrotal yerleşimli ve horizontal pozisyonundadır (74). Kremasterik refleks kaybı olabilir (75). Yapılan klinik çalışmalarda testis torsiyonu olgularında kremasterik refleksin %90-%100 oranında kaybolduğu, buna karşılık diğer akut skrotum vakalarında ise % 80 oranında devam ettiği gösterilmiştir (75, 76). Elevasyonla birlikte torsiyonda ağrı artışı olurken, epididimit ve orşitte ağrı elevasyonla birlikte geriler. Orşit ve testis torsiyonu ayırıcı tanısında bu bulgu (prehn bulgusu) önemlidir (75). Hasta 4-6 saat içerisinde opere edilir ve kontralateral testis fiksasyonu yapılır ise prognoz oldukça iyidir (56).

Tanıda renkli doppler ultrasonografi non-invazif olması ve sintigrafiyle neredeyse eşdeğer oranda testis torsiyonu tanısı koyabilmesi nedeniyle tercih edilmektedir. Renkli dopplerin en önemli özelliği skrotum duvarındaki ve testis içindeki kan akımını ayırt edebilmesidir. Başlangıçta normal testis dokusu değerlendirildikten sonra aynı ayarlar korunarak karşı taraftaki testis değerlendirildiğinde kan akımının azalmış yada kaybolmuş olması testis torsiyonunu gösterir. Epididimit-orşitte ise kan akımı aksine artmıştır (71, 77).

Testis torsiyonu tanısında manyetik rezonans (MR) da kullanılabilir, ancak klinik uygulamada özellikle pediatrik dönemde anestezi gerekliliği nedeniyle pek tercih edilmemektedir (78).

Küçük çocuklarda testisin boyutunun küçük olmasından dolayı hem renkli doppler hem de nükleer sintigrafinin güvenilirliği azdır. Görüntüleme yöntemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda hikaye ve fizik muayene bulgularına göre tanı ve tedavi amaçlı cerrahi müdahale yapılması doğru bir yaklaşım olacaktır (79).

2.5.5. Tedavi

Çocuklardaki akut skrotum nedeni olarak testis torsiyonu düşünülüyorsa acil cerrahi eksplorasyon yapılması önerilmektedir. Eksplorasyon intravajinal torsiyonlarda skrotal bölgeden, ekstravajinal torsiyonlarda ise inguinal bölgeden yapılır.

Sağ testis saatin tersi yönde, sol testis ise saat yönünde detorsiyone edilir. Detorsiyon sonrası testis üzerine sıcak kompres uygulanıp testis renginin düzelmesi

beklenir. Testis canlılığı tunika albuginea'ya yapılan küçük bir kesiden oksijene kan gelmesi ile değerlendirilir. Testis torsiyonunda en iyi sonuçlar ilk 6 saat içinde başvuran hastalarda alınır. Canlılığını koruyan testisin tespit edilmesi önerilirken; kuşku duyulan, semptomları yaklaşık 12-24 saat olan olgularda ise tedavi tartışmalıdır.

Postpubertal dönemde testiküler iskemi, kan-testis bariyerini bozarak hastanın kendi spermatogonilerine karşı otoimmünize olmasına yol açar. Bu nedenle kontralateral testisin de etkilendiğini savunan yazarlar postpubertal testis torsiyonlarında orşiektomi önermektedirler (65, 80-84). Detorsiyone edilen testislerin iki yıllık takiplerinde %60 oranında atrofi ve karşı taraftaki testis normal olmasına rağmen %80-95 oranında anormal sperm analizleri gösterilmiştir (80). Buna karşılık prepubertal dönemdeki çocuklarda kan-testis bariyeri ve spermatogenez henüz olgunlaşmadığı için otoimmünizasyon olamayacağı ve bu çocuklarda canlılığından şüphe edilen testisin yerinde bırakılıp tespit edilebileceğini belirten görüşler de vardır (85-87). Özellikle şikayetleri en az 24 saattir devam eden hastalarda orşiektomi yapılması konusunda fikir birliği vardır.

Torsiyone testis dokusu detorsiyone edilirken yada orşiektomi yapılırken karşı taraftaki testis de tespit edilmelidir. En az iki adet emilmeyen sütür ile testisin tunika vajinalise tespit edilmesi en çok tercih edilen yöntemdir. Torsiyone testis nekrotikse veya abse varsa karşı taraftaki testisin tespit edilmesi enfekte olmaması için aynı seansta önerilmez (79).

2.6. İskemi/Reperfüzyon Hasarı

2.6.1. Tanım

Bir organa gelen kan akımının çeşitli nedenler ile hücresel fonksiyonları karşılamada yetersiz kalmasına veya kan akımının duraklamasına iskemi denir. Reperfüzyon ise doku kanlanmasının tekrar başlamasıdır (54). İskemi esnasında oksijen değerinin metabolik ihtiyaçlara oranla düşük olması, hücresel enerji depolarının azalması ve toksik metabolitlerin birikmesi sonucunda hücre ölümü meydana gelebilir (11). Reperfüzyon safhasında nitrik oksit (NO^-), süperoksit

anyonları (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^-) gibi toksik serbest oksijen radikallerinde önemli oranda artış olur (88).

İskemi sonucu gerekli enerjinin sağlanamaması, hücre membranında bulunan Adenozin Trifosfat (ATP) bağımlı Sodyum-Potasyum (Na^+/K^+) pompasının görevini yerine getirememesine neden olur. Buna bağlı olarak oluşan iyon dengesizliği, hücre içinde izo-ozmotik vasıfta su birikmesine ve akut hücresel şişmeye sebep olur. Anaerobik glikolize bağlı olarak meydana gelen asidoz, karbondioksit (CO_2) birikimi ve sonuç olarak oluşan karbonik asit (H_2CO_3) ile daha da derinleşir (89).

Bu süreçte enerji ihtiyacının glikoza bağımlı hale gelmesi, glikojen depolarının hızla azalmasına neden olur. Asidozun devam etmesiyle birlikte granüllü endoplazmik retikulumdan ribozomlar ayrılır, protein sentezi azalır, membran geçirgenliği artar ve mitokondri fonksiyonlarında yavaşlama meydana gelir. Sonuçta organeller su alarak şişer ve hücresel şişme daha da belirginleşir. İskemi durumu devam ederse geri dönüşümsüz hücre zedelenmesi başlar (90).

İskemi döneminde az miktarda serbest radikal oluşmaktaysa da, reperfüzyon esnasında dokunun yeniden oksijenlenmesiyle birlikte çok daha büyük miktarlarda serbest radikal oluşmakta ve bunlar dokudaki hasarı daha da artırmaktadır (91).

Reperfüzyon dönemindeki hasarda, hücre içine giren moleküler oksijen neden olduğu SOR başta olmak üzere birçok mekanizma rol oynamaktadır. Reperfüzyon dönemindeki hasara en çok duyarlı olan hücresel yapılar zarlardaki lipitler, proteinler ve nükleik asitlerdir (92).

Serbest radikallerin biyolojik sistemlerdeki endojen kaynakları arasında; oksijen, nitrit oksit, uyarılmış nötrofil, mitokondrial elektron transport sistemleri, endoplazmik retikulum, peroksizom, plazma membranı sayılabilir. Reperfüzyon esnasında mikrovasküler permabilitedeki artışın başlıca nedeni olarak nötrofiller gösterilmiştir (93). İskemi reperfüzyon ile birlikte lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adezyonu meydana gelir (94).

2.6.2. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller

Fizyolojik ve patolojik reaksiyonlar durumunda başka moleküllerle kolayca elektron alışverişine girerek onların yapısını bozan moleküller serbest radikaller

olarak adlandırılır. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşanlar olup bunlara da serbest oksijen radikalleri adı verilir. Bunlar içerisinde en önemlileri süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleridir. Serbest radikaller hücrelerdeki protein, DNA, karbonhidrat, lipidler ve diğer moleküllerle reaksiyona girerek metabolizmalarını etkilerler (95, 96). SOR, lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehitin (MDA) artışına neden olur (28).

Oksijenin canlılar için hayati önemi vardır ve hücrede enerji üretim süreçlerinde kullanılır. Fizyolojik olarak SOR enerji üretim süreçlerinin doğal bir yan ürünü olmakla birlikte yüksek düzeyde reaktif ve potansiyel olarak zararlı maddelerdir (97). SOR'un oluşumunu ve bu radikallerin oluşturduğu hasarı önlemek amacıyla vücutta antioksidanlar olarak bilinen birçok savunma sistemi mevcuttur. SOR'un oluşum hızı ve bunların antioksidanlarla nötralize edilme hızı arasında bir denge olması beklenir. Böylece hücre serbest radikallerin olumsuz etkilerinden korunmuş olur. Eğer ki bu denge serbest radikaller lehine bozulursa, hücre içerisinde serbest radikaller artar. Artan serbest radikallerin hücrede ve fonksiyonları üzerinde yapmış olduğu olumsuz etkiye "oksidatif stres" adı verilir (95). Bu durum SOR oluşumu ile buna karşı oluşan antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki ciddi dengesizliğin sonucudur ve sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (95, 96).

2.6.3. Antioksidan Sistemler

Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve bunların oluşturduğu hasarı önlemek amacıyla vücutta antioksidan savunma sistemi bulunmaktadır. Antioksidanlar, oksijen radikallerinin yıkıcı etkilerini engelleyerek yada bu radikalleri toplayarak zararlı etkilerini ortadan kaldırırlar. Antioksidanlar endojen veya eksojen kaynaklı olmak üzere yada enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılabilirler. Enzimatik antioksidanlar arasında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz, glutatyon reduktaz ve glutatyon S-transferaz gibi enzimler sayılabilir. Non-enzimatik antioksidanlar olarak tokoferol, beta karoten, askorbik asit, ürat, sistein, seruloplasmin, transferin, albumin ve flavonoidler sayılabilir.

Antioksidanların etkilerini; serbest radikalleri tutarak veya daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek, serbest radikal ile etkileşime girip aktivitesini azaltarak, serbest radikalleri kendisine bağlayıp reaksiyon zincirini kırarak veya onarım yaparak gösterirler (98).

2.7. Testiste İskemi/Reperfüzyon Hasarı

Testis dokusu, serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hasara karşı oldukça duyarlıdır (99). Testis dokusunda torsiyon geliştiğinde venöz kan akışı azalarak ödem, hemoraji ve daha sonraki süreçte arteriyel tıkanıklığa neden olur. Sonuç olarak testis dokusunda iskemi süreci başlamış olur (56).

Testis dokusundaki torsiyon sürecinde gelişen iskemik hasardan sorumlu mediyatörler tam olarak bilinmemekle birlikte, çeşitli immünolojik ve biyokimyasal belirteçler belirlenmeye çalışılmıştır (100, 101). Testis dokusunda torsiyon sonrası hasar oluşmasında iskemi ve detorsiyon sonrası oluşan reperfüzyonla birlikte açığa çıkan serbest oksijen radikallerinin (SOR) belirleyici bir rol aldığı bildirilmiştir (99, 102, 103).

Reperfüzyon döneminde oluşan hasar nötrofil infiltrasyonu ve serbest oksijen radikallerinin artışı ile ilişkili bulunmuştur (104, 105).

İskeminin kritik süresi organa bağlı olarak değişiklik göstermekle birlikte bu süre böbrekte 15-20 dakika, iskelet kasında 2,5 saat iken testiste yaklaşık olarak 6 saattir (106).

Testis torsiyonu tipik bir İ/R hasarlanması modeli olduğu için, bu süreçte etkili olan mekanizmalara müdahale edilerek testisteki harabiyetin, sonuç olarak da infertilitenin önlenmesi mümkün görülmektedir (107, 108).

2.7.1. Testisin İskemik Hasarlanmalarında Antioksidan Tedavi

Antioksidanlar, “oksidatif stres” sonucunda ortaya çıkan serbest radikallerden dokuyu korumakla görevlidir. Canlı hücredeki protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi maddelerin oksidasyonuna engel olan ve/veya geciktirebilen maddelere antioksidan, bu olaya ise antioksidan savunma sistemi denir. Vücuttaki antioksidan

savunma sistemleri,serbest radikalleri etkisiz duruma getirmeye çalışırlar. Antioksidan tedavi ile lipid peroksidasyonunun azaltılması, fertilizasyon oranlarının gelişimiyle paraleldir (109-115).

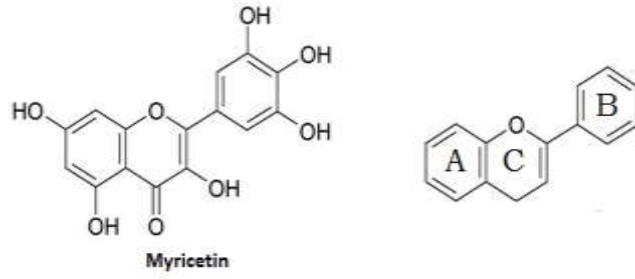
Testis dokusunun torsiyondan etkilenme düzeyinin iskemi süresi ve derecesiyle doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir (116). Bu nedenle testis torsiyonuna yönelik yapılan acil cerrahi müdahale, alternatif olarak medikal tedavi modellerinin araştırılmasına rağmen geçerliliğini koruyan ve en yaygın uygulanan tek tedavi yöntemidir(117-119).

Testis torsiyonunun cerrahi yöntemle düzeltilmesi yanında, iskemi/reperfüzyon hasarında etkili mediatörlere yönelik medikal tedavinin dokudaki hasarı azaltabileceği gösterilmiştir (120).

2.8. Myricetin

Myricetin (3,3',4',5,5',7-*heksahidroksiflavon*) doğal bir flavonoiddir; çay, çilek, fındık, meyveler ve sebzelerde bulunur(18, 19). Myricetin, antienflamatuar (20), antioksidan (21), analjezik, anti-tümör (22, 23) ve anti-bakteriyel etkiler (24) dahil olmak üzere çeşitli biyolojik etkilere sahiptir.

Myricetin, kimyasal olarak 3,3',4',5,5',7-*heksahidroksiflavon* olarak bilinir. B halkası üzerinde üç hidroksil grubuna sahip olması (bunlar, yan yana oldukları için katekol grupları oluşturur) ve çift bağlı oksijen grubunun iki hidroksil grubunun yanında olması nedeniyle diğer flavonoidlerden daha büyük bir antioksidan özelliğe sahip olduğu düşünülmektedir, bunların her biri in vitro mineral şelasyonuna yardımcı olabilir (121, 122). Katekol grupları oksidasyonu takiben semi-kinon radikalleri oluşturabilir, C halkası üzerindeki 4-hidroksil grubu (ketonun sağında) ve B halkası üzerindeki 4-hidroksil grubu (orta hidroksil) oksidasyonu takiben bir kinin methid oluşturabilir. Katekol gruplarının bu yapısı ile muhtemel bir prooksidatif ekisi vardır (121). Myricetin yapısı şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Myricetin'in Yapısı

Myricetin'in, beş ana fosfodiesteraz (PDE) enzimin PDE1, PDE2, PDE3, PDE4 olmak üzere dördüne karşı inhibisyon potansiyele sahip olduğu not edilmiştir. 100µM altındaki PDE5 üzerinde önemli inhibitör etkisi yoktur(123).

Myricetin'in ayrıca nörolojik (124), kardiyovasküler (125), glikoz metabolizması (126, 127), obezite (128), kemik ve eklem sağlığı (129), hormonal (130), antikanserojen (131, 132) ve sperm motilitesini ve viabilitesini artırıcı özelliği ile fertiliteye olumlu etkileri gösterilmiştir (25).

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma KTÜ Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı tarafından planlanıp 2018/24 protokol numaralı etik kurul izni alındıktan sonra Biyokimya ve Patoloji Anabilim Dallarının katkılarıyla yapılmıştır. Çalışmada KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi tarafından sağlanan ağırlıkları 250-300 gram arasında olan 18 adet Wistar Albino cinsi ratlar kullanıldı. Ameliyatlar KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Laboratuvarında yapıldı. Ratlar ameliyat öncesinde 24 saat süreyle aç bırakıldı ve bu süre içerisinde sadece su verildi. Her grupta 6 adet rat olmak üzere 3 grup oluşturuldu. Oluşturulan gruplar Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Her Grupta 6 Adet Rat Olmak Üzere 3 Grup Oluşturuldu

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

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

Cerrahi Teknik: Ameliyat bölgesi traş edilip daha sonra betadin solüsyonuyla temizlendi. Ameliyatlarda skrotal orta hattan yapılan insizyon kullanıldı. Torsiyon/detorsiyon modeli; sol testis dışarı alınarak, saatin aksi yönünde 720 derece döndürüldü. Daha sonra testis tekrar detorsiyone olmasını diye tunika albuginea 6/0 monoflaman ile suture edilip skrotuma tespit edildi. Skrotum 4/0 ipekle kapatılıp torsiyon işleminden 2 saat sonra testis detorsiyone edilerek beklendi. Detorsiyondan işleminden 2 saat sonra sol testise orşiektomi yapıldı.

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

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

Grup 3: Bu gruptaki ratlara torsiyon/detorsiyon modeli oluşturulup detorsiyondan 30 dakika önce 1mg/kg ip myricetin verildi. Detorsiyondan 2 saat sonra sol orşiektomi yapıldı.

Orşiektomi materyali 2 parçaya bölündü. Elde edilen testis dokusunun yarısı derhal sıvı nitrojen ile işlem edilerek donduruldu ve biyokimyasal incelemeler yapılana kadar -80 derecede saklandı. Diğer yarısı ise patolojik incelemeler için ayrıldı.

3.1. Biyokimyasal İnceleme

MDA, hücre membranlarında lipid peroksidasyonunun önemli bir belirteci olup İ/R hasarında meydana gelir.

3.1.1. Testis Dokusunda MDA Düzeyinin Ölçülmesi

Çıkarılan testislerden elde edilen dokuların yaklaşık 50-100 mg'lık kısmı MDA ölçümü için kullanıldı. MDA ölçümü için kullanılan dokular buz içinde 0.5 mL/L Triton X-100 içeren %1.15'lik KCl çözeltisinden 2 mL konularak homojenize edildi. Homojenatlar 3000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Süpernatanttan 1 mL alınıp üzerine 500 µL Tsuchihashi reaktifi ekledi (etanol:kloroform 3:2) ve 3000 rpm'de 15 dk santrifüjlendi (133). Süpernatanttan MDA ölçümü gerçekleştirildi.

MDA ölçümü Mihara ve Uchiyama yöntemine göre yapıldı (134). Bu metodun esası, MDA'nın asidik ortamda tiyobarbitürik asitle oluşturduğu rengin 532 nm'de absorbanasının ölçülmesine dayanmaktadır.

Kullanılan Çözeltiler

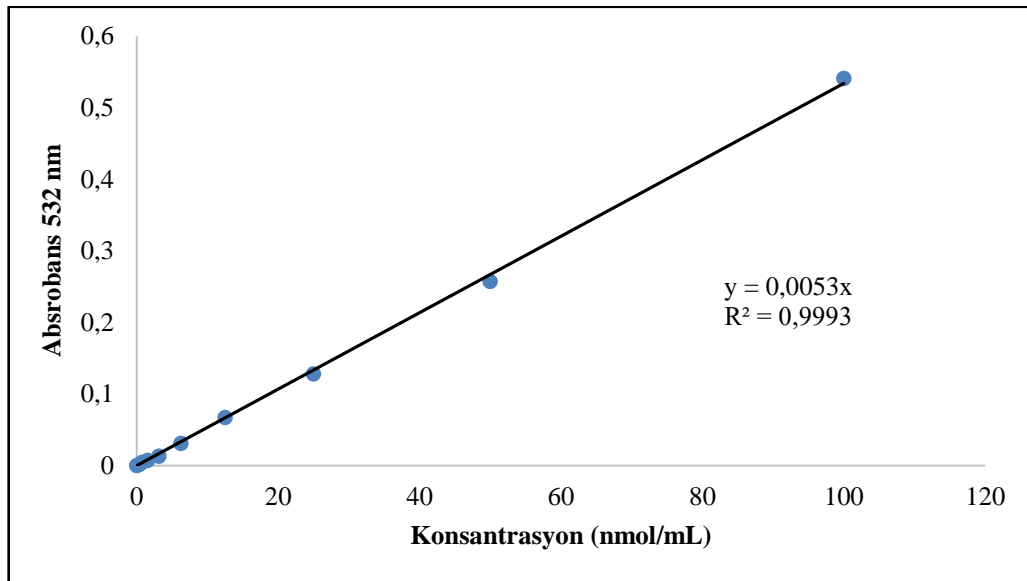
1. Doku homojenizasyon tamponu: 1.15 g KCl hassas terazide tartıldı ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı. Oluşan çözeltinin üzerine 0.5 mL Triton X-100 eklendi.
2. %1'lik H₃PO₄ çözeltisi: Bir miktar saf su üzerine 2.94 mL %85'lik H₃PO₄ alındı ve son hacim distile su ile 250 mL'ye tamamlandı.

3. Tiyobarbiturik asit (TBA) çözeltisi: 0.67 g TBA tartıldı ve 50 mL distile suda magnetik bar yardımıyla 10 dk karıştırıldı. Ardından üzerine 50 mL asetik asit ilave edilerek çözüldü.
4. Standart çözeltiler: 8.3 µL tetrametoksiopropan 0.01 M HCl çözeltisine eklendi ve 50 °C'de 1 saat inkübe edildi. Bu oluşan 10 µmol/mL'lik ara stok çözeltiden dilüsyonlar yapılarak 50, 40, 30, 20, 10 ve 5 nmol/mL'lik standart çözeltiler hazırlandı.

Tablo 2. Doku MDA Seviyesi Ölçümü İçin Yapılan Reaksiyon Karışımı

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

Tablo 2'de verilen karışım vortekslendi. Ardından 100 °C de etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 4000 rpm'de 10 dk santrifüj yapıldı. Süpernatantlar ELISA pleytinepipetlendikten sonra 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı. Şekil 2'deki standart grafik kullanılarak MDA konsantrasyonu hesaplandı. Sonuçlar ise nmol/g doku olarak hesaplandı.



Şekil 2. Doku MDA Seviyesi Ölçümü İçin Standart Grafiği

3.1.2. Testis Dokusunda Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini

SOD enzim aktivitesi Sun ve Oberley'in geliştirdiği yöntemin modifiye edilmesi sonucu yapıldı (135). Bu metod, ksantin-ksantin oksidaz ile oluşan süperoksitlerin SOD tarafından kullanılarak, nitroblue tetrazolium (NBT)'dan mor renkli formazan boyası oluşumunun engellenmesi esasına dayanır. Ortamdaki SOD aktivitesi ne kadar yüksek ise ortamdan o kadar çok O_2^- kullanacağı için reaksiyondan sonra oluşan rengin şiddetinde azalma gözlenir. Reaksiyon sonucu oluşan renkli bileşiğin absorbansı 560 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Kullanılan Çözeltiler

- 1. 0.3 mM Ksantin Çözeltisi:** 3.65 mg ksantin alındı ve 80 mL deiyonize sudaçözüldü.
- 2. 0.6 mM EDTA Çözeltisi:** 8.93 mg EDTA alındı ve 40 mL deiyonize sudaçözüldü.
- 3. 150 μ M NBT Çözeltisi:** 4.9 mg NBT alındı ve 40 mL deiyonize suda çözüldü. NBT çözeltisi SOD reaktif karışımına en son eklendi.
- 4. 400 mM Na_2CO_3 çözeltisi:** 1.01 g Na_2CO_3 alındı ve 24 mL deiyonize sudaçözüldü.
- 5. % 0.1'lik Bovin Serum Albumin (BSA) çözeltisi:** 12 mg BSA'dan alındı ve 12 mL deiyonize suda çözüldü.
- 6.** Yukarıdaki beşçözelti karıştırılarak SOD reaksiyon karışımı elde edildi.
- 7. 2 M Amonyum Sülfat Çözeltisi:** 2.64 g amonyum sülfat 10 mL deiyonize sudaçözüldü. Ksantin oksidaz enziminin dilüsyonunda kullanıldı.
- 8. 0,8 mM $CuCl_2$ Çözeltisi:** 5.37 g $CuCl_2$ alındı ve 50 mL deiyonize sudaçözüldü. Spektrofotometrik ölçümden hemen önce oluşan reaksiyonu durdurmak için kullanılır.
- 9. 167 U/L Ksantin Oksidaz Çözeltisi:** 3,3 U/mL'lik orijinal şişeden 101 μ L alınıp 2 mL'ye amonyum sülfat çözeltisi ile tamamlandı. Ksantin oksidaz çözeltisi günlük hazırlandı. 100, 50, 25, 12.5, 5, 4, 3, 2, 0.5, 0.25 U/mL'lik SOD standartları kullanıldı. SOD standartları pH'sı 7.4 olan 50 mM'lık Tris-HCl çözeltisi ile dilue edilerek hazırlandı. Standart ve

köreetanol/kloroform aşaması uygulanmadı. SOD aktivitesi ölçümü için hazırlanan reaksiyon karışımı Tablo 3'e göre hazırlandı.

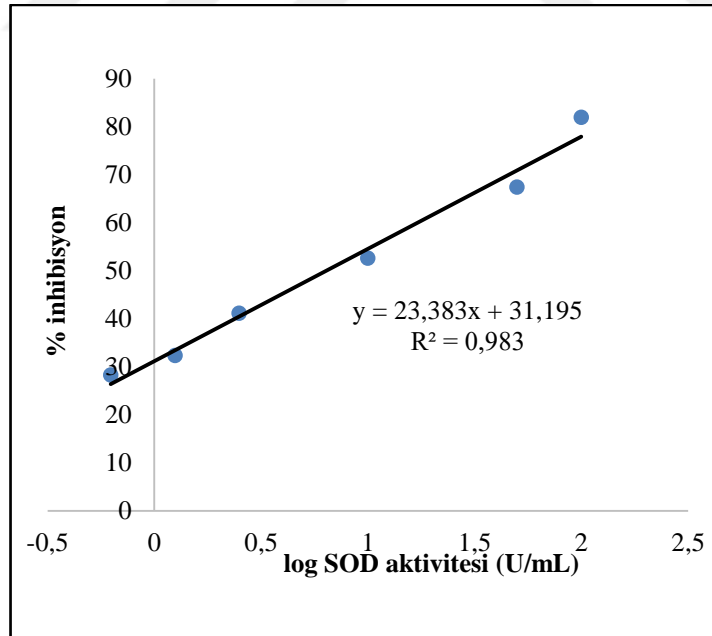
Tablo 3. SOD Aktivitesi Ölçümü İçin Hazırlanan Reaksiyon Karışımı

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

Hesaplamalar eşitlik 1'e göre % inhibisyon cinsinden yapıldı ve Şekil 3'deki standart grafik kullanılarak enzim aktiviteleri hesaplandı.Sonuçlar U/g proteinolarak hesaplandı.

Eşitlik 1:

$$\%inhibisyon = \frac{(A_{Kör} - A_{Numune})}{A_{Kör}} \times 100$$



Şekil 3. SOD Aktivitesi İçin Standart Konsantrasyonların Logaritmasına Karşı % İnhibisyon Grafiği

3.1.3. Testis Dokusunda Katalaz (CAT) Aktivite Tayini

CAT enzim aktivitesini belirlemede Aebi yöntemi kullanıldı (136). Bu yöntemin temeli H₂O₂'nin enzimatik bozulması sonucu 240 nm'de absorbanstaki düşüşün takip edilmesine dayanır.

Kullanılan Çözeltiler

1. Fosfat Tamponu (pH=7.0; 50 mM): 6.81 g KH₂PO₄deiyonize suda çözülerek son hacmi 1 L'ye tamamlandı. 8.9 g Na₂HPO₄.2H₂O deiyonize suda çözülerek son hacmi 1 L'ye tamamlandı. Bu çözeltiler sırasıyla 1:1,5 oranında karıştırıldı ve gerektiğinde asit veya baz ilavesi yapılarak pH=7,0'ye ayarlandı.

2. Hidrojen Peroksit: 240 µL %30'luk H₂O₂'den alınarak son hacim fosfat tamponu ile 50 mL'ye tamamlandı (günlük hazırlandı). Doku homojenatları fosfat tamponu ile 25 kat seyreltilerek ölçüm yapılacak numuneler oluşturuldu. Kuartz küvetlere Tablo 4'e göre pipetlemeler kör ve numune karışımları için ayrı ayrı yapıldı.

Tablo 4. Katalaz Aktivite Tayini İçin Yapılan Reaksiyon Karışımı

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

H₂O₂ eklenir eklenmez kuartz küvetler altüst edildi ve 240 nm'de 30 s süreyle her 10 s'de bir absorbanslar kaydedilerek meydana gelen düşüşler izlendi. Absorbanslardaki düşüşün dakikada 0.015 ile 0.100 arasında olmasına dikkat edildi. Eğer bu aralıkta düşüş olmazsa numune dilüsyonları yeniden ayarlanmalıdır. CAT aktivite tayininde birinci mertebede reaksiyon hız sabiti (k) kullanıldı. Absorbanslardaki 60 s'lik düşüş için aşağıdaki formüle göre hesaplamalar yapıldı.

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

Burada;

A1= Başlangıç absorbansı

A₂= 60 s sonraki absorbanstır.

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

Protein Tayini

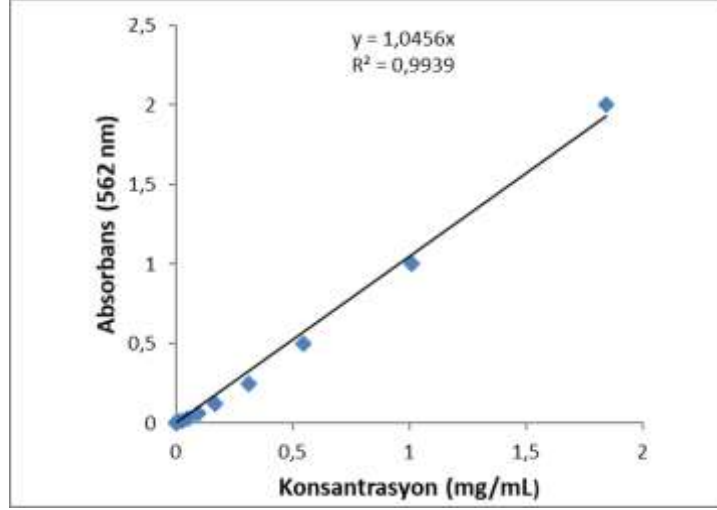
Protein ölçümleri 72285-3 katalog numaralı Merck Millipore (ABD) Bikinkoninik Asit (BCA) protein assay kit kullanılarak yapıldı. Protein ölçümü BCA yöntemine göre yapıldı. Yöntemin esası biüret reaksiyonudur. Cu⁺² iyonları peptid azotlarına bağlanır ve Cu⁺¹ iyonunu indirgenirler. İkinci bir reaksiyonda ise bu indirgenmiş Cu⁺¹ iyonları BCA ile renkli bir kompleks oluştururlar ve bu rengin şiddeti protein yoğunluğu ile orantılıdır. Oluşan bu renk kompleksi 562 nm'de maksimum absorban gösterir.

Protein Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

1. BCA workingreagent: Her bir numune için 200 µL BCA çözeltisi ve 4 µL %4'lük bakır (II) sülfat karıştırıldı ve BCA workingreagent oluşturuldu.

2. Standartların hazırlanması: 2mg/mL'lik BSA stok çözeltisinden seri dilüsyon yapılarak 1000- 500-250- 125- 62,5- 31,25-15,63-7,81- 3,90- 1,95 µg/mL'lik standartlar ve kör hazırlandı hazırlandı.

CAT aktivitesinin hesap edilmesinde kullanılan numunelerin protein konsantrasyonlarını belirlemek için, 25 µL standart ve numune pleyte yüklendi. Üzerine 200 µLBCA workingreagent ilave edilip 30 sn çalkalayıcıda karıştırıldı üzeri kapatıldı. 37⁰ C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra oda sıcaklığına gelmesi beklendi ve 562 nm'de ölçüm yapıldı. Sonuçlar mg/mL cinsinden hesaplandı. Dilisyon katsayısı ile çarpılıp konsantrasyonlar belirlendi. CAT aktivite hesaplaması için kullanılan protein standart grafiği Şekil 4'de gösterilmiştir.



Şekil 4. CAT Aktivite Hesaplaması İçin Kullanılan Protein Standart Grafiği

3.2. Histopatolojik İnceleme

Testis dokuları histopatolojik olarak değerlendirmek üzere takibe alındı. Takibe alınan dokular Bovin solüsyonu içinde 72 saat fikse edildi. Fikse edilen doku parçaları %70, %90, %96 ve %100 lük dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Daha sonra ksilen solüsyonundan geçirilerek şeffaflaştırıldı. Dokuların parafin blokları hazırlandıktan sonra tam otomatik mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler deparafinizasyon işleminden sonra hematoksil-eozin (H&E) ile boyandı.

Hazırlanan preparatlar Işık mikroskopik (Olympus BX 51; Olympus Optical Co, Ltd,Tokyo, Japan) olarak değerlendirildi. Histopatolojik değerlendirme çalışma gruplarından habersiz bu konuda deneyimli bir patolog tarafından yapıldı.

Testis dokularındaki hasar Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması (JTBS) ile derecelendirildi (137). Bu skorlamada ışık mikroskopisinde yüksek büyütmede (200X) 5 farklı alanda testis dokuları yarı kantitatif olarak değerlendirildi. Tablo 5'te JTBS verilmiştir.

Tablo 5. Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması

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

3.3. İstatistiksel Analiz

Verilerin analiz aşamasında SPSS 23,0 istatistik paket programı kullanıldı. Değerlendirme sonuçlarının tanımlayıcı istatistikleri ortalama, standart sapma olarak verildi. Elde edilen veriler ölçümsel ve normal dağılıma uymadığı için istatistiksel analizinde iki farklı yöntem kullanıldı. 3 grubun karşılaştırılmasında, Kruskal Wallis varyans analizi; grupların ikişerli karşılaştırılmasında ise Mann Whitney-U testi kullanıldı. İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyi Kruskal Wallis testinde $p < 0.05$ olarak alındı. Mann Whitney-U testinde Bonferroni düzeltmesi kullanılarak $p < 0.05$ /karşılaştırılan grup sayısı ($p < 0.017$) olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Testis Hasarının Biyokimyasal Olarak Değerlendirilmesi

Yapılan deneysel çalışmada oluşturulan 3 grubun doku MDA, SOD ve CAT değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Değerler Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Gruplara Göre Doku Parametrelerinin Ortalama Değerleri

	GRUP 1	GRUP 2	GRUP 3	p
Ortalama MDA kons/ağırlık (nmol/g doku)	27,2±11,7	70,2±15,5	31,8±13,5	0,003*
Ortalama SOD (U/mg protein doku)	51,5±15,8	29,4±8,8	35,3±11,7	0,018*
Ortalama CAT (k/g protein doku)	4,1±0,7	2,2±0,8	3,9±0,9	0,010*

*p< 0.05

Grupların ikişerli MDA değerleri karşılaştırıldığında Grup1-Grup2, Grup2-Grup3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p< 0.017). Grup1-Grup3 arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Doku MDA değerlerinin ikişerli karşılaştırılması Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. Grupların MDA Değerlerinin İkişerli Karşılaştırılması

	Ortalama MDA kons/ağırlık (nmol/g doku)	p
GRUP 1-GRUP 2	27,2±11,7-70,2±15,5	0,004*
GRUP 1- GRUP 3	27,2±11,7 - 31,8±13,5	0,522
GRUP 2- GRUP 3	70,2±15,5 - 31,8±13,5	0,004*

*p< 0.017

Grupların ikişerli SOD değerleri karşılaştırıldığında Grup1-Grup2 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p< 0.017). Grup1-Grup3 ve Grup2-Grup3 arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Doku SOD değerlerinin ikişerli karşılaştırılması Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8. Grupların SOD Değerlerinin İkişerli Karşılaştırılması

	SOD(U/mg protein doku)	p
GRUP 1-GRUP 2	51,5±15,8 - 29,4±8,8	0,004*
GRUP 1- GRUP 3	51,5±15,8 - 35,3±11,7	0,109
GRUP 2- GRUP 3	29,4±8,8 - 35,3±11,7	0,337

*p< 0.017

Grupların ikişerli CAT değerleri karşılaştırıldığında Grup1-Grup2 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p< 0.017). Grup1-Grup3 ve Grup2-Grup3 arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Doku CAT değerlerinin ikişerli karşılaştırılması Tablo 9’da verilmiştir.

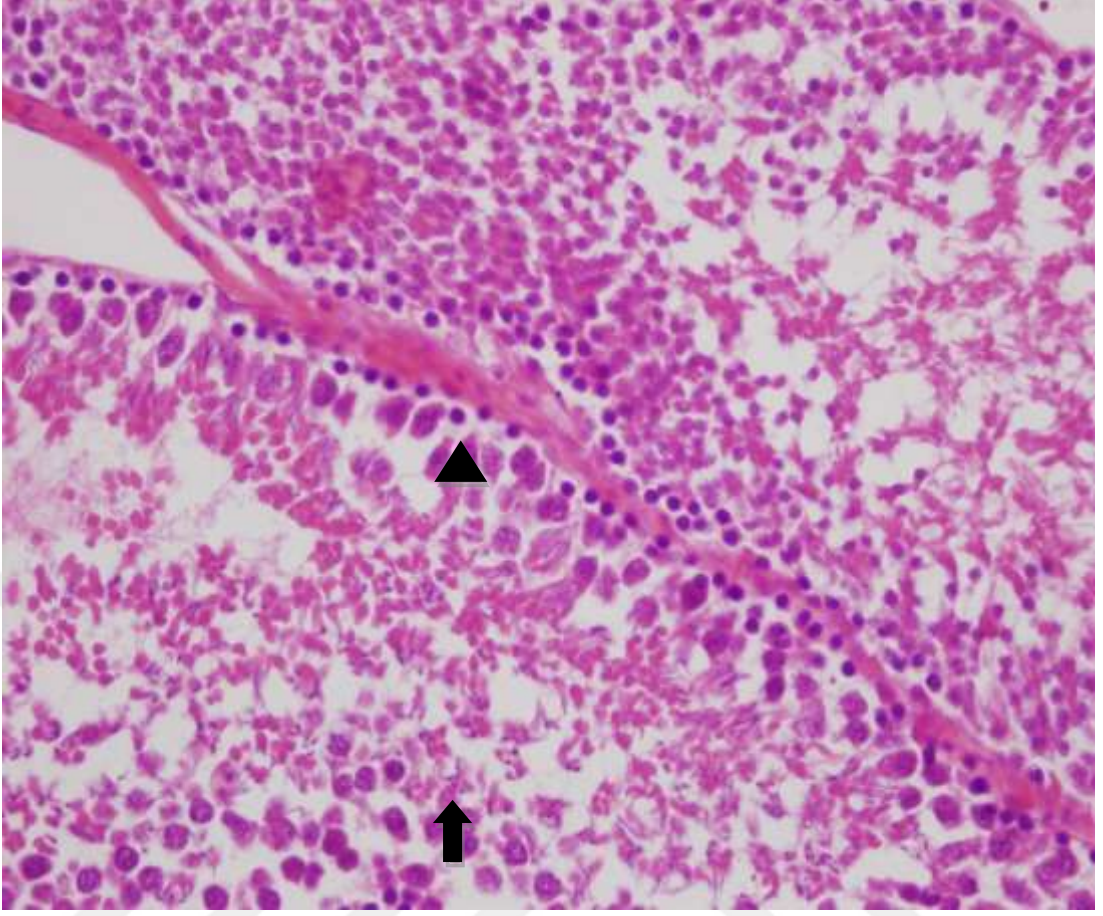
Tablo 9. Grupların CAT Değerlerinin İkişerli Karşılaştırılması

	CAT (k/g protein doku)	p
GRUP 1-GRUP 2	4,1±0,7 - 2,2±0,8	0,004*
GRUP 1- GRUP 3	4,1±0,7 - 3,9±0,9	0,749
GRUP 2- GRUP 3	2,2±0,8 - 3,9±0,9	0,025

*p< 0.017

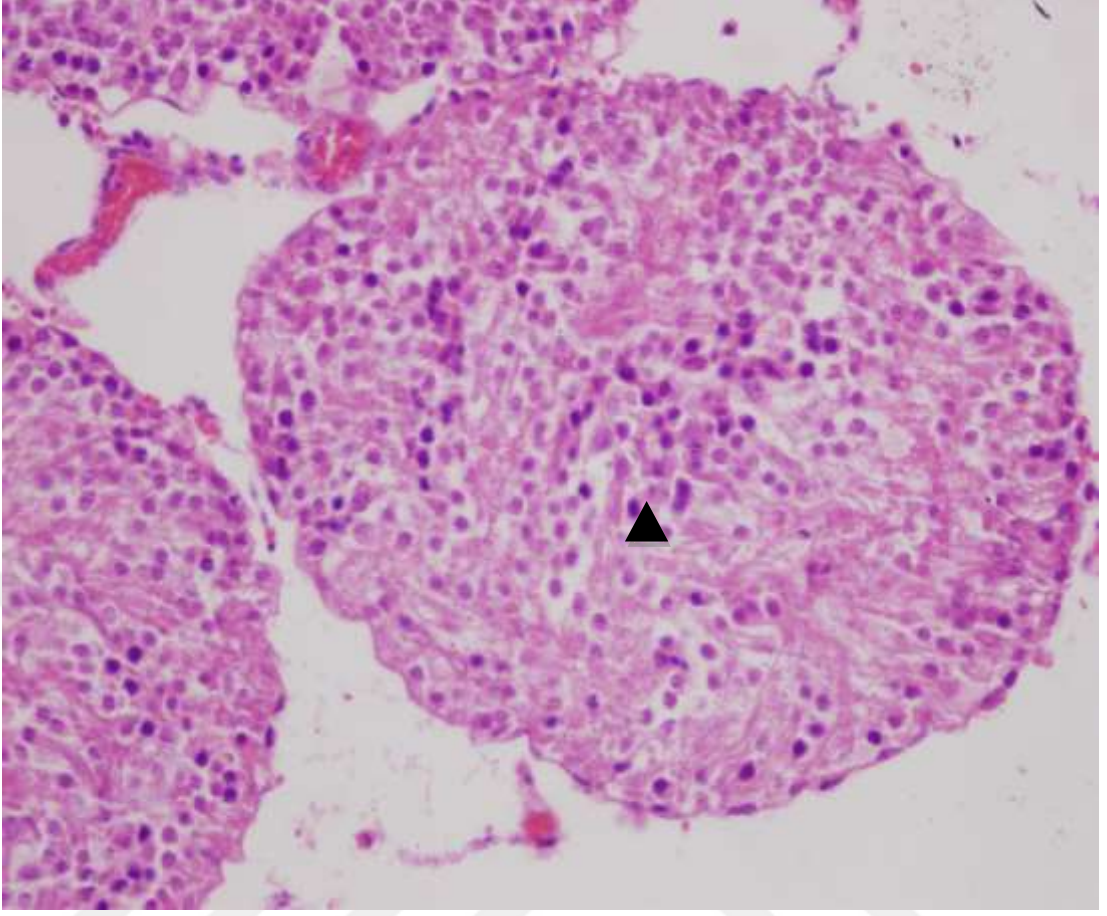
4.2. Testis Hasarının Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi

Deney gruplarının ışık mikroskopik değerlendirilmesinde, kontrol grubundaki ratların testislerinde normal histolojik yapı izlendi (Resim1).



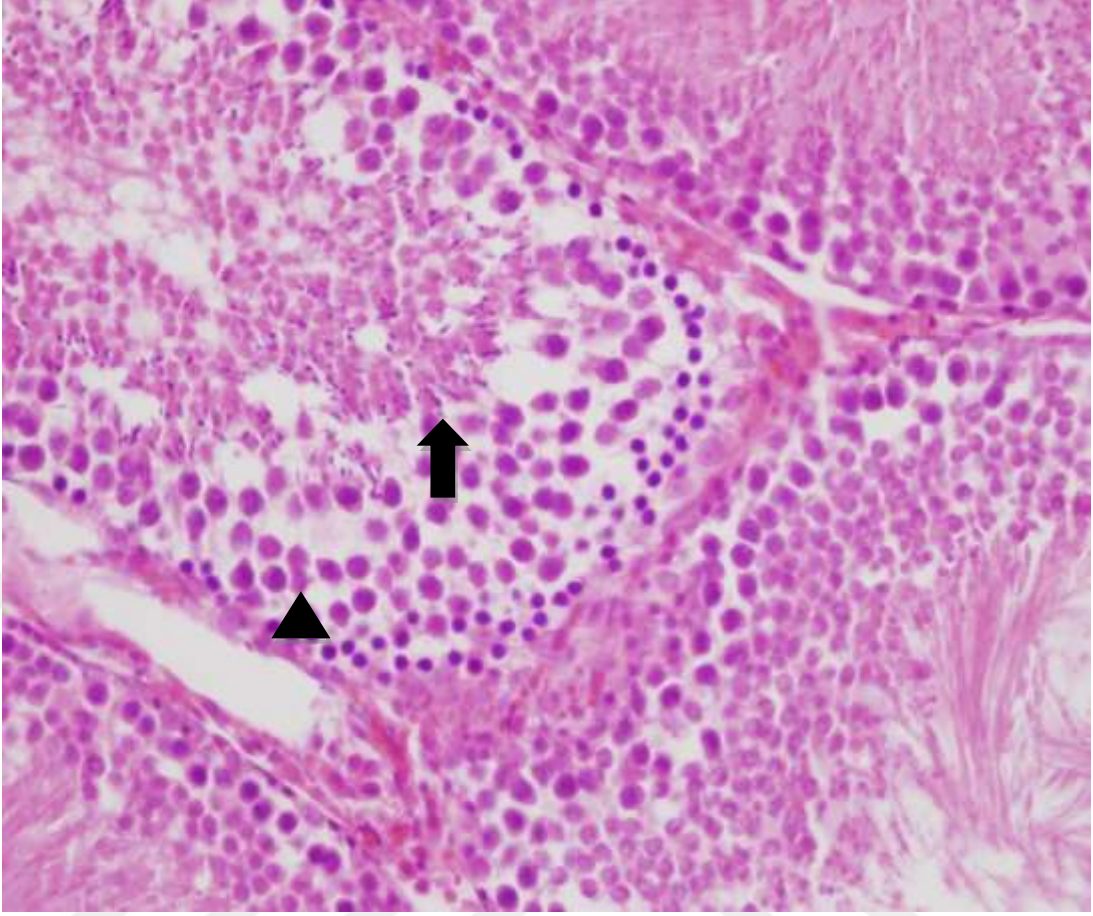
Resim 1. Kontrol Grubuna Ait Testisteki Spermatid (↑) ve Spermatozoonlar (▲)

Grup 2'ye ait testis seminifer tübül epitellerinde yaygın denüasyon, deskuamasyon, fokal nekroz görünümü mevcut. Tübül lümeninde az sayıda hayalet germinal epitel hücreleri izlendi (Resim 2).



Resim 2. Torsiyon/Detorsiyon Grubuna Ait Sol Testis Tübül Lümeninde Az Sayıda Hayalet Germinal Epitel Hücreleri İzlendi (▲).

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



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

4.2.1. Testisteki Histopatolojik Hasarın İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Gruplara ait sol testis preparatlarının histopatolojik incelenmesi sonucu elde edilen JTBS'ları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Değerler Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. Gruplara Göre JTBS'larının Ortalama Değerleri

	JTBS ortalama değerleri
Grup 1	9,3±0,52
Grup 2	4,3±0,82
Grup 3	6,3±0,82
p	0,001*

*p< 0.05

Grupların JTBS değerlerinin ikişerli karşılaştırılmasında Grup1-Grup2, Grup1-Grup3 ve Grup2-Grup3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.017$). Değerler Tablo 11’de verilmiştir.

Tablo 11: Grupların JTBS değerlerinin ikişerli karşılaştırılması

	JTBS ortalama değerleri	p
Grup1-Grup2	9,3±0,52-4,3±0,82	0,003*
Grup1- Grup3	9,3±0,52-6,3±0,82	0,003*
Grup2- Grup3	4,3±0,82-6,3±0,82	0,007*

* $p < 0.017$

5. TARTIŞMA

Testis torsiyonu; çoğunlukla yenidoğan ve adölesanları etkileyen acil bir durumdur (138). 25 yaşın altındaki erkeklerde görülme sıklığı yılda 1/4000'dir (4). Spermatik kord torsiyonu, doku hipoksisi ve bunun sonucunda germinal hücre nekrozu ile karakterize olup yapılan bir deneysel hayvan çalışmasında 90 derecelik testis torsiyonunun testis dolaşımını etkilemediği, 180 derecelik torsiyonun 3-4. günlerde; 360 derece torsiyonun 12-24 saat içerisinde ve 720 derece torsiyonun ise 2 saat içerisinde testisin canlılığını kalıcı olarak kaybetmesine neden olduğu gösterilmiştir. Torsiyone testis opere edilmesine rağmen torsiyon olayından 12 yıl sonra dahi infertilite ve subfertiliteye neden olduğu için acil cerrahi müdahale gerektirmektedir (99, 139).

Torsiyon, ödem ve hemorajiye sekonder ilk olarak spermatik kord venöz kan akışının tıkanmasına neden olur. Daha sonra artan ödem arteriyel obstrüksiyon, iskemi ve gonadal nekroz ile sonuçlanır. Torsiyon ve detorsiyon nedeniyle oluşan testis hasarı, diğer dokularda gözlenen İ/R hasarı fenomeniyle benzerlik göstermektedir (1).

Acil tanı ve cerrahi müdahale, testiste iskemik hasarı ve ardından germ hücrelerinin kaybını önlemek için önemlidir. Testis torsiyonunu düzeltmek için yapılan cerrahi müdahale, torsiyone testisin detorsiyonunu ve testis kan akımının yeniden sağlanmasını içerir. Ancak detorsiyon da testiküler reperfüzyon hasarına neden olabilmektedir. Bu nedenle, testiküler torsiyon-detorsiyonun patofizyolojisi, torsiyon peryodunda testislerin akut iskemik yaralanması etrafında yoğunlaşırken, detorsiyon döneminde ise daha çok infertilite olasılığı ile sonuçlanan reperfüzyon hasarı üzerine yoğunlaşmıştır. İ/R hasarının başlamasından sonra, aerobik metabolizmanın bozulması sonucu, metabolik asidoz, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, hücre içi kalsiyumun aşırı yükü ve reperfüzyonun başlangıcında oksijenden türetilmiş serbest radikallerin oluşumu büyük ölçüde fizyolojik ortamı değiştirmektedir (138).

Testis torsiyonu tedavisine yönelik alternatif medikal tedavi yöntemleri araştırılmasına rağmen acil cerrahi halen geçerliliğini koruyan ve yaygın olarak uygulanan tedavi şeklidir. Testis dokusunun torsiyondan etkilenmesi torsiyonun

süresi, derecesiyle ilişkili olmasına rağmen, asıl önlenebilir doku hasarı detorsiyon sonrası reperfüzyon döneminde meydana geldiği için yapılan hayvan modellerinde testis reperfüzyon hasarını önlemek amaçlı sayısız farmakolojik ajan ve tedavinin etkinliği değerlendirilmiştir(138).Bu nedenle yapılan deneysel çalışmalarda allopürinol, katalaz, heparin, verapamil, anti-inflamatuar ilaçlar, asetilsistein, ozon ve hiperbarik oksijen gibi ajanlar kullanılmış. Bu ajanların bazılarının etkisinin yetersizliği, bazılarının kullanım güvenilirliği ve dozajı hakkında yeterli bilgi olmaması ve yan etkilerinin belirsizliği yüzünden rutin klinik kullanıma girememiştir (17).

Myricetin, doğal bir flavonoid olup antiinflamatuvar (20), antioksidan (21), analjezik, anti-tümör (22, 23) ve anti-bakteriyel etkiler (24) dahil olmak üzere çeşitli biyolojik etkilere sahiptir. Myricetin İ/R hasarının yol açtığı doku tahribatlarında iyileştirici etkisini gösteren sınırlı sayıda deneysel çalışmalar mevcuttur (26-28). Scarabelli, T. M. ve arkadaşları ile Qui, Y. ve arkadaşları tarafından yapılan iki ayrı çalışmada düşük doz myricetin miyokard hücreleri üzerindeki İ/R hasarına karşı koruyucu etkisini araştırmışlar. Myricetin MDA konsantrasyonunu kontrol seviyelerine yakın şekilde düşürdüğü, SOD seviyesini artırıcı antioksidan özelliklere sahip olduğu ayrıca, hem nekrotik hem de apoptotik hücre ölümünü azalttığı gösterilmiştir (26, 28).

Sun, Y. ve arkadaşları ise intestinal İ/R hasarı üzerinde düşük doz myricetin koruyucu etkisini araştırmış. myricetin, rat intestinal İ/R kaynaklı enflamasyon, oksidatif stres, intestinal bariyer fonksiyonu ve apoptozis hasarını önemli ölçüde iyileştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca myricetin artmış MDA seviyesini anlamlı derecede düşürdüğü ve azalmış SOD ve glutatyon (GSH) seviyesini önemli ölçüde arttırdığı, bu da oksidatif stresin baskılanmasının intestinal İ/R hasarına karşı myricetin koruyucu etkisinin olduğunu ortaya koymuşlardır (27).

Aquila, S. ve arkadaşları myricetin farklı konsantrasyonlarının insan erkek gamet fonksiyonu üzerine etkilerini araştırmışlar. Sperm motilitesi, viabilitesi ve kapasitasyonu ile ilişkili biyokimyasal değişikliklerin, akrosin aktivitesinin, ayrıca glukoz kullanımı ve yağ asidi oksidasyonunun, düşük myricetin dozları ile önemli ölçüde arttırıldığı; ancak yüksek konsantrasyonların daha az etkili olma eğiliminde olduğu gösterilmiştir (25).

Myricetin'in yukarıda sayılan reperfüzyon hasarındaki koruyucu etkileri, ayrıca sperm motilitesi ve viabilitesi üzerindeki olumlu etkilerinden dolayı testis torsiyonunda İ/R hasarına karşı etkisini araştırmak için düşük doz (1mg/kg) myricetin kullandık.

720 derecelik dönmeye komplet spermatik kord torsiyonu olarak adlandırılmaktadır ve yapılan bir deneysel hayvan çalışmasında bu torsiyon derecesinin 2 saat içinde testiste geri dönüşü olmayan iskemik hasara ve gonad kaybına neden olduğu gösterilmiştir(8, 139). Bazı serilerde sol taraftaki testis torsiyonlarının sağa oranla daha sık görüldüğü kaydedilmiştir (140). Biz de bu çalışmamızda sol testise 2 saat süren 720 derece torsiyon ve 2 saatlik reperfüzyon uygulanmasını tercih ettik.

Yapmış olduğumuz deneysel çalışmada, 2.gruptaki MDA değerlerinin 1.gruptakilere göre yüksek olduğu görüldü. İstatistiksel olarak bu iki grup karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık olduğu gösterildi ($p<0,017$). Grup 1 ile grup 2 arasındaki SOD ve CAT değerleri karşılaştırıldığında grup 1'deki SOD ve CAT değerlerinin grup 2'ye göre düşük olduğu görüldü. Bu iki grup arasındaki SOD ve CAT değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılmasında anlamlı bir fark olduğu gösterildi ($p<0,017$). Elde ettiğimiz bu sonuçlar bize testiste İ/R hasarının meydana geldiğini, testis dokusunda nekrozun oluştuğunu göstermektedir. Yani oluşturulan bu modelin uygun olduğunu kanıtlamış olduk.

Deneysel çalışmamızda MDA değerlerine bakıldığında; grup 2 ile grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu tespit ettik. Grup 3'ün MDA değerlerinin belirgin olarak düşüktü ($p<0,017$). Düşük doz myricetin'in, doku hasarını azaltıcı etkisinden dolayı MDA değerinin yükselmediğini düşünmekteyiz. Ayrıca grup 1 ve grup 3'ün MDA değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p=0,522$).

Deneysel çalışmamızda Grup 2 ile grup 3'ün SOD ve CAT değerleri karşılaştırıldığında; grup 3'te SOD ve CAT değerlerinin grup 2'ye göre yüksek olduğu görüldü. Ancak bu değerlerin istatistiksel olarak incelenmesinde anlamlı bir farklılık gösterilemedi (p değeri sırasıyla $p=0,337$ ve $p=0,025$). Bunun sebebinin hayvan hakları nedeniyle oluşturulan gruplardaki rat sayısının minimalde tutulmuş olmasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca grup 1 ve grup 3'ün SOD ve CAT

değerlerinin karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p değeri sırasıyla $p=0,109$ ve $p=0,749$). Bu da bize antioksidan enzimlerin grup 3'te daha az tüketildiği ve bunun yerine myricetin antioksidan olarak kullanıldığını düşündürmektedir.

Bu verilerin sonucunda 1mg/kg myricetin MDA değerlerinin anlamlı şekilde farklı olması, SOD ve CAT değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmamış olmasına rağmen grup 2'ye oranla yüksek olması nedeniyle İ/R hasarında biyokimyasal olarak etkili olduğunu düşünmekteyiz.

JTBS'na göre tüm gruplar birbirleri ile histopatolojik olarak karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

Histopatolojik açıdan grup 2 ile grup 1 karşılaştırıldığında, grup 1'in testisinde normale yakın histoloji izlenirken grup 2'nin İ/R hasarına bağlı olarak ağır hasar bulgusu gösteren histopatolojiye sahip olduğu görüldü. İstatistiksel olarak bu iki grup incelendiğinde aralarında anlamlı bir fark olduğu ($p<0,017$), yani İ/R hasarının olduğu gösterildi.

Grup 2 ile grup 3 karşılaştırıldığında grup 3'e ait testislerde grup 2'ye göre daha az hasarlanma belirtileri olduğu gösterildi ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,017$). Grup 1 ile grup 3 karşılaştırıldığında da aralarında anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0,017$). Myricetin uygulamasının testis dokusundaki reperfüzyon hasarını torsiyon grubuna göre histopatolojik açıdan anlamlı derecede azalttığı ancak kontrol grubuna yakın değerlere ulaşamadığı görüldü. Her ne kadar hasar düzeyi istatistiksel olarak anlamlı çıkmış olsa da myricetin verilen grupta spermatid ve spermatozoaların normali kadar olmasa da korunduğu; grup 2'ye oranla anlamlı derecede fark olduğu gösterilmiştir.

Myricetin doğal bir flavonoiddir, henüz insanlarda klinik olarak kullanımı bulunmamaktadır. Düşük doz kısa süreli testisteki İ/R hasarına tam olarak önleyici etkisi olmamasına rağmen torsiyon grubuna göre anlamlı ölçüde testis dokusunu ve germ hücrelerini koruduğunu çalışmamızda gösterdik. Bu etkisinin kalıcı olup olmadığını anlamak için uzun süreli farklı dozlarda yeni bir deneysel çalışmaya gerek vardır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- Çalışmamızda oluşturduğumuz testis torsiyonu modelinde İ/R hasarı meydana gelmiştir.
- Düşük doz verilen myricetinin, reperfüzyon hasarı sonucu testis dokusunda artan MDA düzeyini azalttığını tespit ettik. Ayrıca histopatolojik olarak da düşük doz myricetinin torsiyon grubuna göre dokuda daha az hasar oluşturduğunu gösterdik.
- Spermatid ve spermatozoaların korunmuş olması mevcut testisin myricetin sonrası sperm canlılığının korunduğunu düşündürmektedir.
- Sonuç olarak bu deneysel çalışmamızda testis torsiyonundaki İ/R hasarını önlemede düşük doz myricetinin olumlu etkisini gösterdik. Bu etkisinin uzun süreli kalıcı olup olmadığını araştırmak için yeni çalışmalar önermekteyiz.
- Henüz myricetinin insanda güvenli olarak klinik kullanım alanı bulunmamaktadır. Bunun için de faz çalışmalarına ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKÇA

1. Yilmaz E, Hizli F, Afsarlar CE, Demirtas C, Apaydin S, Karaman I, et al. Early Diagnosis of Testicular Torsion in Rats by Measuring Plasma D-Dimer Levels: Comparative Study with Epididymitis. *J Pediatr Surg.* 2015;50(4):651-4.
2. Lee JW, Kim JI, Lee YA, Lee DH, Song CS, Cho YJ, et al. Inhaled Hydrogen Gas Therapy for Prevention of Testicular Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *J Pediatr Surg.* 2012;47(4):736-42.
3. Akgur FM, Kilinc K, Aktug T. Reperfusion Injury After Detorsion of Unilateral Testicular Torsion. *Urological research.* 1993;21(6):395-9.
4. Mansour M, Degheili J, Khalifeh I, Tamim H, Jaafar RF, El-Hout Y. Remote Ischemic Conditioning in a Rat Model of Testicular Torsion: Does it Offer Testicular Protection? *J Pediatr Urol.* 2019;15(1):43 e1- e7.
5. Kapoor S. Testicular Torsion: A Race Against Time. *International journal of clinical practice.* 2008;62(5):821-7.
6. Gomes Dde O, Vidal RR, Foeppe BF, Faria DF, Saito M. Cold Weather is a Predisposing Factor for Testicular Torsion in a Tropical Country. A Retrospective Study. *Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina.* 2015;133(3):187-90.
7. Lyronis ID, Ploumis N, Vlahakis I, Charissis G. Acute Scrotum -Etiology, Clinical Presentation and Seasonal Variation. *Indian journal of pediatrics.* 2009;76(4):407-10.
8. Asgari SA, Mokhtari G, Falahatkar S, Mansour-Ghanaei M, Roshani A, Zare A, et al. Diagnostic Accuracy of C-Reactive Protein and Erythrocyte Sedimentation Rate in Patients With Acute Scrotum. *Urology journal.* 2006;3(2):104-8.
9. Yildirim C, Yuksel OH, Urkmez A, Sahin A, Somay A, Verit A. Protective Effects of Tadalafil and Darbepoetin Against Ischemia - Reperfusion Injury in a Rat Testicular Torsion Model. *Int Braz J Urol.* 2018;44(5):1005-13.
10. Anim JT, Kehinde EO, Prasad A, Varghese R. Morphological Responses of the Rabbit Testis to Ischemic/Reperfusion Injury due to Torsion. *Urologia internationalis.* 2005;75(3):258-63.
11. Lysiak JJ, Nguyen QA, Turner TT. Peptide and Nonpeptide Reactive Oxygen Scavengers Provide Partial Rescue of the Testis After Torsion. *Journal of andrology.* 2002;23(3):400-9.

12. Lysiak JJ, Turner SD, Nguyen QA, Singbartl K, Ley K, Turner TT. Essential Role of Neutrophils in Germ Cell-Specific Apoptosis Following Ischemia/Reperfusion Injury of the Mouse Testis. *Biology of reproduction*. 2001;65(3):718-25.
13. Mestrovic J, Drmic-Hofman I, Pogorelic Z, Vilovic K, Supe-Domic D, Seselja-Perisin A, et al. Beneficial Effect of Nifedipine on Testicular Torsion-Detorsion Injury in Rats. *Urology*. 2014;84(5):1194-8.
14. Turner TT, Tung KS, Tomomasa H, Wilson LW. Acute Testicular Ischemia Results in Germ Cell-Specific Apoptosis in the Rat. *Biology of reproduction*. 1997;57(6):1267-74.
15. Visser AJ, Heyns CF. Testicular Function After Torsion of the Spermatic Cord. *BJU International*. 2003;92(3):200-3.
16. Beheshtian A, Salmasi AH, Payabvash S, Kiumehr S, Ghazinezami B, Rahimpour S, et al. Protective Effects of Sildenafil Administration on Testicular Torsion/Detorsion Damage in Rats. *World J Urol*. 2008;26(2):197-202.
17. Tusat M, Mentese A, Demir S, Alver A, Imamoglu M. Medical Ozone Therapy Reduces Oxidative Stress and Testicular Damage in an Experimental Model of Testicular Torsion in Rats. *Int Braz J Urol*. 2017;43(6):1160-6.
18. Ross JA, Kasum CM. Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annual review of nutrition*. 2002;22:19-34.
19. Jung HY, Lee D, Ryu HG, Choi BH, Go Y, Lee N, et al. Myricetin Improves Endurance Capacity and Mitochondrial Density by Activating Sirt1 and Pgc-1alpha. *Scientific reports*. 2017;7(1):6237.
20. Wang SJ, Tong Y, Lu S, Yang R, Liao X, Xu YF, et al. Anti-Inflammatory Activity of Myricetin Isolated from *Myrica Rubra* Sieb. Et Zucc. Leaves. *Planta medica*. 2010;76(14):1492-6.
21. Wang B, Zhong Y, Gao C, Li J. Myricetin Ameliorates Scopolamine-Induced Memory Impairment in Mice Via Inhibiting Acetylcholinesterase and Down-Regulating Brain Iron. *Biochemical and biophysical research communications*. 2017;490(2):336-42.
22. Godse S, Mohan M, Kasture V, Kasture S. Effect of Myricetin on Blood Pressure and Metabolic Alterations in Fructose Hypertensive Rats. *Pharm Biol*. 2010;48(5):494-8.
23. Ma Z, Wang G, Cui L, Wang Q. Myricetin Attenuates Depressant-Like Behavior in Mice Subjected to Repeated Restraint Stress. *Int J Mol Sci*. 2015;16(12):28377-85.

24. Silva LN, Da Hora GCA, Soares TA, Bojer MS, Ingmer H, Macedo AJ, et al. Myricetin Protects Galleria Mellonella Against Staphylococcus Aureus Infection and Inhibits Multiple Virulence Factors. *Scientific reports*. 2017;7(1):2823.
25. Aquila S, Santoro M, De Amicis F, Guido C, Bonofiglio D, Lanzino M, et al. Red Wine Consumption May Affect Sperm Biology: The Effects of Different Concentrations of the Phytoestrogen Myricetin on Human Male Gamete Function. *Mol Reprod Dev*. 2013;80(2):155-65.
26. Qiu Y, Cong N, Liang M, Wang Y, Wang J. Systems Pharmacology Dissection of the Protective Effect of Myricetin Against Acute Ischemia/Reperfusion-Induced Myocardial Injury in Isolated Rat Heart. *Cardiovasc Toxicol*. 2017;17(3):277-86.
27. Sun Y, Lian M, Lin Y, Xu B, Li Y, Wen J, et al. Role of p-MKK7 in Myricetin-Induced Protection Against Intestinal Ischemia/Reperfusion Injury. *Pharmacol Res*. 2018;129:432-42.
28. Scarabelli TM, Mariotto S, Abdel-Azeim S, Shoji K, Darra E, Stephanou A, et al. Targeting STAT1 by Myricetin and Delphinidin Provides Efficient Protection of the Heart from Ischemia/Reperfusion-Induced Injury. *FEBS Lett*. 2009;583(3):531-41.
29. Sadler, T. W. (2005). *Langman Medikal Embriyoloji*,(Çev.: Başaklar, AC), 9. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara.
30. Wilhelm D, Koopman P. The Makings of Maleness: Towards an Integrated View of Male Sexual Development. *Nature reviews Genetics*. 2006;7(8):620-31.
31. Moore, K. L., Persaud, T. V. N. (2004). *Clinically Oriented Embryology. The Developing Human*: 10.
32. Jones, R. E., Lopez, K. H. (2013). *Human Reproductive Biology*. Academic Press.
33. Tanagho EA, Mcaninch JW. *Smith's General Urology*. New York , The McGraw - Hill Companies,2000:750-787.
34. Brooks JD. *Campbell's Urology*. 8. Baskı. Philadelphia:, WB saunders, 2002. Walsh PCRA, Vaughan ED, Jr, Wein AJ, editors.
35. Schlegel PNHMIWP, Retik AB, Vaughan ED, Jr, Wein AJ. *Campbell's Urology*. 8. Baskı. Philadelphia, WB Saunders.2002.
36. Baydinc, C. (1998). *Ürogenital Organların Anatomik ve Histolojik Yapısı; Temel Üroloji*. Güneş Kitabevi Ltd Şti, Ankara.

37. Brooks, J. D. (2007). *Anatomy of the Lower Urinary Tract and Male Genitalia. Campbell-Walsh Urology. 9th ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier.*
38. Jarow, J. P. (1990). Intratesticular Arterial Anatomy. *Journal of Andrology. 11(3): 255-259.*
39. Shafik, A., Moftah, A., Olfat, S., Moi-El-Din, M., El-Sayed, A. (1990). Testicular Veins: Anatomy and Role in Varicocele Genesis and other Pathologic Conditions. *Urology. 35(2): 175-182.*
40. Pabst, R., Putz, R. (2006). *Sobotta İnsan Anatomisi Atlası (Gövde, Organlar, Alt Ekstremité) 2. Cilt.*
41. Harrison RG: The Comparative Anatomy of the Blood Supply of Themammalian Testis. *Proc Zool Soc London 1949a;119:325-344.*
42. Chehval, M. J., Purcell, M. H. (1992). Deterioration of Semen Parameters Over Time in Men with Untreated Varicocele: Evidence of Progressive Testicular Damage. *Fertility and Sterility. 57(1): 174-177.*
43. Bayard F, Boulard PY, Huc A, Pontonnier F. Arterio-Venous Transfer of Testosterone in the Spermatic Cord of Man. *J Clin Endocrinol Metab. 1975;40(2):345-6.*
44. Agger P. Scrotal and Testicular Temperature:Its Relation to Sperm Count Before and After Operation for Varicocele. *Fertil Steril. 1971;22(5):286-97.*
45. Rauchenwald M. Steers WD, Desjardins C: Efferent Inervation of the Rat Testis. *Biol Reprod 1995;52:1136-1143.*
46. Esrefoglu M.(2009). *Özel Histoloji. Malatya. Medipres Yayıncılık, s:253-264.*
47. Junqueira, L. C., Carneiro, J. (2005). *Basic Histology Text and Atlas. London: McGraw Hill.*
48. Kierszenbaum, A. L., Demir, R. (2006). *Histoloji ve Hücrebiyolojisi: Patolojiye Giriş. Palme Yayıncılık.*
49. Schoenwolf, G. C., Bleyl, S. B., Brauer, P. R., Franciswest, P. H. (2014). *Larsen's Human Embryology E-Book. Elsevier Health Sciences.*
50. Guyton AC, Hall JE. Erkekde Üreme İşlevleri ve Hormonal İşlevler. In: Çavuşoğlu H, Çağlayan-Yeğen B, editors. *Tıbbi Fizyoloji. 11. ed2007. p. 996-1010.*
51. Krieger, J. N., Tanagho, E. A., Mcaninch, J. W. (2004). *Sexually Transmitted Diseases Smith's General Urology.*

52. Rowe, M. I., O'Neill, J. A., Grosfeld, J. L., Fonkalsrud, E. W., Coran, A. G. (1995). *Essentials of Pediatric Surgery*. St. Louis. Mosby-Year Book. Inc. 1: 446-61.
53. Saba M, Morales CR, De Lamirande E, Gagnon C. Morphological and Biochemical Changes Following Acute Unilateral Testicular Torsion in Prepubertal Rats. *J Urol*. 1997;157(3):1149-54.
54. Tjioe DY, Steinberger E. A Quantitative Study of the Effect of Ischaemia on the Germinal Epithelium of Rat Testes. *Journal of reproduction and fertility*. 1970;21(3):489-94.
55. Turner TT, Brown KJ. Spermatic Cord Torsion: Loss of Spermatogenesis Despite Return of Blood Flow. *Biology of reproduction*. 1993;49(2):401-7.
56. Krarup T. The Testes After Torsion. *British journal of urology*. 1978;50(1):43-6.
57. Leape LL: Testicular Torsion.: *Pediatric Urology*. Philadelphia, W.B.Saunders, 1990; 1556-1558.
58. Caesar RE, Kaplan GW. Incidence of the Bell-Clapper Deformity in an Autopsy Series. *Urology*. 1994;44(1):114-6.
59. Callewaert PR, Kerrebroeck PV. New Insights into Perinatal Testicular Torsion. *European journal of pediatrics*. 2010;169(6):705-12.
60. Backhouse KM. Embryology of Testicular Descent and Maldescent. *The Urologic clinics of North America*. 1982;9(3):315-25.
61. Cuckow PM, Frank JD. Torsion of the Testis. *BJU Int*. 2000;86(3):349-53.
62. Knight PJ, Vassy LE. The Diagnosis and Treatment of the Acute Scrotum in Children and Adolescents. *Annals of surgery*. 1984;200(5):664-73.
63. Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N. (2007). *Temel Üroloji (3.baskı)*.Ankara. Güneş Tıp Yayınevi, s:17.
64. *The Acute Scrotum*. Ziegler MM, Azizkhan RG, Weber TR (ed): *Operative Pediatric Surgery*, McGraw-Hill Companies, New York, 2003, pp.563-568.
65. Hutson JM: Undescended Testis, Torsion and Varicocele. In O'Neill JA, Rowe MI, Grosfeld JL et al (eds): *Pediatric Surgery*, Mosby, St. Louis, 1998, pp.1087-1109.
66. Sevük, M., Danışman, A., Bircan, K., Şain, H. (2007). Ürogenital Sistem Hastalıklarında Semptomatoloji ve Klinik Muayene. İn: Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N Editör. *Temel Üroloji. Üçüncü Baskı*. Ankara: Öncü Basımevi. S:56.

67. Dresner ML. Torsed Appendage. Diagnosis and Management: Blue Dot Sign. *Urology*. 1973;1(1):63-6.
68. Rabinowitz R, Hulbert WC, Jr. Acute Scrotal Swelling. *The Urologic clinics of North America*. 1995;22(1):101-5.
69. Brown JM, Hammers LW, Barton JW, Holland CK, Scoutt LM, Pellerito JS, et al. Quantitative Doppler Assessment of Acute Scrotal Inflammation. *Radiology*. 1995;197(2):427-31.
70. Emil A. Tanagho, Jack W. McAninch. *Smith Genel Üroloji*, Bölüm 45, Sayfa 741-742.
71. Başaklar AC. Akut Skrotum. Başaklar AC, editör. *Bebek ve Çocukların Cerrahi ve Ürolojik Hastalıkları*. 1. Baskı. Ankara: Palme,2006. S.1753-64.
72. Gross BR, Cohen HL, Schlessel JS. Perinatal Diagnosis of Bilateral Testicular Torsion: Beware of Torsions Simulating Hydroceles. *Journal of ultrasound in medicine : official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine*. 1993;12(8):479-81.
73. Zilberman D, Inbar Y, Heyman Z, Shinhar D, Bilik R, Avigad I, et al. Torsion of the Cryptorchid Testis--Can it be Salvaged? *J Urol*. 2006;175(6):2287-9; discussion 9.
74. Ciftci AO, Senocak ME, Tanyel FC, Buyukpamukcu N. Clinical Predictors for Differential Diagnosis of Acute Scrotum. *Eur J Pediatr Surg*. 2004;14(5):333-8.
75. Rabinowitz R. The Importance of the Cremasteric Reflex in Acute Scrotal Swelling in Children. *J Urol*. 1984;132(1):89-90.
76. Karmazyn B, Steinberg R, Kornreich L, Freud E, Grozovski S, Schwarz M, et al. Clinical and Sonographic Criteria of Acute Scrotum in Children: A Retrospective Study of 172 Boys. *Pediatric radiology*. 2005;35(3):302-10.
77. Bartsch G, Frank S, Marberger H, Mikuz G. Testicular Torsion: Late Results with Special Regard to Fertility and Endocrine Function. *J Urol*. 1980;124(3):375-8.
78. Kaipia A, Ryymin P, Makela E, Aaltonen M, Kahara V, Kangasniemi M. Magnetic Resonance Imaging of Experimental Testicular Torsion. *International journal of andrology*. 2005;28(6):355-9.
79. Puri P, Barton D, O'Donnell B. Prepubertal Testicular Torsion: Subsequent Fertility. *J Pediatr Surg*. 1985;20(6):598-601.
80. Pakyz RE, Heindel RM, Kallish M, Cosentino MJ. Spermatic Cord Torsion: Effects of Cyclosporine and Prednisone on Fertility and the Contralateral Testis in the Rat. *Journal of andrology*. 1990;11(5):401-8.

81. Harrison RG, Lewis-Jones DI, Moreno de Marval MJ, Connolly RC. Mechanism of Damage to the Contralateral Testis in Rats with an Ischaemic Testis. *Lancet* (London, England). 1981;2(8249):723-5.
82. Kearney SE, Lewis-Jones DI. Effect of ACTH on Contralateral Testicular Damage and Cytotoxic Antisperm Antibodies after Unilateral Testicular Ischaemia in the Rat. *Journal of reproduction and fertility*. 1985;75(2):531-5.
83. Gordon JL. Extracellular ATP: Effects, Sources and Fate. *The Biochemical journal*. 1986;233(2):309-19.
84. Mininberg DT, Chen ME, Witkin SS. Antisperm Antibodies in Cryptorchid Boys. *European journal of pediatrics*. 1993;152 Suppl 2:S23-4.
85. Urry RL, Carrell DT, Starr NT, Snow BW, Middleton RG. The Incidence of Antisperm Antibodies in Infertility Patients with a History of Cryptorchidism. *J Urol*. 1994;151(2):381-3.
86. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Temel Patoloji*. Çevikbaş U (Çeviren) 5. Baskı. İstanbul: Nobel ve Yüce, 1995.
87. Nath KA, Norby SM. Reactive Oxygen Species and Acute Renal Failure. *The American journal of medicine*. 2000;109(8):665-78.
88. Clark IA. Tissue Damage Caused by Free Oxygen Radicals. *Pathology*. 1986;18(2):181-6.
89. Kumar, V., Abbas, A. K., Aster, J. C. (2013). *Robbins Basic Pathology*. St Louis: Elsevier.
90. Türkyılmaz Z. Karaciğer İskemi-Reperfüzyon Zedelenmesinde Pentoksifilin, Dimetilsülfoksit ve Eksojen Melatoninin Koruyucu Etkilerinin Karşılaştırılması (tez). Edirne: TÜ Tıp Fak; 2003.
91. Orrenius S, Burkitt MJ, Kass GE, Dypbukt JM, Nicotera P. Calcium Ions and Oxidative Cell Injury. *Annals of neurology*. 1992;32 Suppl:S33-42.
92. Lopez-Neblina F, Paez-Rollys AJ, Toledo-Pereyra LH. Mechanism of Protection of Verapamil by Preventing Neutrophil Infiltration in the Ischemic Rat Kidney. *J Surg Res*. 1996;61(2):469-72.
93. Frangogiannis NG. Chemokines in Ischemia and Reperfusion. *Thrombosis and haemostasis*. 2007;97(5):738-47.
94. Eltzhig HK, Collard CD. Vascular Ischaemia and Reperfusion Injury. *British medical bulletin*. 2004;70:71-86.
95. Burçak G, Andican G. Oksidatif DNA Hasarı ve Yaşlanma. *Cerrahpafla Tıp Dergisi Cilt (Sayı) 35 (4)*.

96. Janos Z, Krishnamurti D. Oxidative Stress and Disease 10: Nutrients and Cell Signaling. Taylor & Francis, 2005: Önsöz.
97. Dobashi K, Ghosh B, Orak JK, Singh I, Singh AK. Kidney Ischemia-Reperfusion: Modulation of Antioxidant Defenses. *Molecular and cellular biochemistry*. 2000;205(1-2):1-11.
98. Somuncu S, Cakmak M, Dikmen G, Akman H, Kaya M. Ischemia-Reperfusion Injury of Rabbit Ovary and Protective Effect of Trepidil: An Experimental Study. *Pediatr Surg Int*. 2008;24(3):315-8.
99. Filho DW, Torres MA, Bordin AL, Crezcynski-Pasa TB, Boveris A. Spermatic Cord Torsion, Reactive Oxygen and Nitrogen Species and Ischemia-Reperfusion Injury. *Mol Aspects Med*. 2004;25(1-2):199-210.
100. Palmer JS, Cromie WJ, Plzak LF, Leff AR. A Platelet Activating Factor Antagonist Attenuates the Effects of Testicular Ischemia. *J Urol*. 1997;158(3 Pt 2):1186-90.
101. Plante GE, Sirois P, Braquet P. Platelet Activating Factor Antagonism with Bn52021 Protects the Kidney Against Acute Ischemic Injury. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids. 1988;34(1):53-60.
102. Ozturk H, Buyukbayram H, Ozdemir E, Ketani A, Gurel A, Onen A, et al. The Effects of Nitric Oxide on the Expression of Cell Adhesion Molecules (ICAM-1, UEA-1, and Tenascin) in Rats with Unilateral Testicular Torsion. *J Pediatr Surg*. 2003;38(11):1621-7.
103. Prillaman HM, Turner TT. Rescue of Testicular Function after Acute Experimental Torsion. *J Urol*. 1997;157(1):340-5.
104. Becker EJ, Jr., Turner TT. Endocrine and Exocrine Effects of Testicular Torsion in the Prepubertal and Adult Rat. *Journal of andrology*. 1995;16(4):342-51.
105. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant Therapy: a New Pharmacological Approach in Shock, Inflammation, and Ischemia/Reperfusion Injury. *Pharmacological reviews*. 2001;53(1):135-59.
106. Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, Abu Amara M, Seifalian AM, Davidson BR. Remote Ischemic Preconditioning: A Novel Protective Method from Ischemia Reperfusion Injury--A Review. *J Surg Res*. 2008;150(2):304-30.
107. Leibovitch I, Buttyan R. Sulfated Glycoprotein-2 Induced Endogenous Resistance to Ischemia and Reperfusion Injury in the Seminiferous Tubules. *American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989)*. 1991;26(3):114-7.

108. Oner-Iyidogan Y, Gurdol F, Oner P. The Effects of Acute Melatonin and Ethanol Treatment on Antioxidant Enzyme Activities in Rat Testes. *Pharmacol Res.* 2001;44(2):89-93.
109. Othman AI, El-Missiry MA, Amer MA. The Protective Action of Melatonin on Indomethacin-Induced Gastric and Testicular Oxidative Stress in Rats. *Redox Rep.* 2001;6(3):173-7.
110. Hussein MR, Abu-Dief EE, Abou El-Ghait AT, Adly MA, Abdelraheem MH. Melatonin and Roentgen Irradiation of the Testis. *Fertil Steril.* 2006;86(3):750-2.
111. Gavazza M, Catala A. Melatonin Preserves Arachidonic and Docosapentaenoic Acids During Ascorbate-Fe²⁺ Peroxidation of Rat Testis Microsomes and Mitochondria. *The international journal of biochemistry & cell biology.* 2003;35(3):359-66.
112. Gavazza MB, Catala A. Protective Effect of N-Acetyl-Serotonin on the Nonenzymatic Lipid Peroxidation in Rat Testicular Microsomes and Mitochondria. *Journal of pineal research.* 2004;37(3):153-60.
113. Juan ME, Gonzalez-Pons E, Munuera T, Ballester J, Rodriguez-Gil JE, Planas JM. Trans-Resveratrol, a Natural Antioxidant from Grapes, Increases Sperm Output in Healthy Rats. *The Journal of nutrition.* 2005;135(4):757-60.
114. 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 Testes. *The Journal of nutritional biochemistry.* 2003;14(2):104-10.
115. Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R, Cockett AT. Histopathology of Prepubertal Rat Testes Subjected to Various Durations of Spermatic Cord Torsion. *Journal of andrology.* 1986;7(1):23-31.
116. Barlas M, Hatiboglu C. The Effect of Nitric Oxide in Testicular Ischemia-Reperfusion Injury. *International urology and nephrology.* 2002;34(1):81-6.
117. Greenstein A, Smith-Harrison LI, Wakely PE, Kololgi S, Salzberg AD, Koontz WW, Jr. The Effect of Polyethylene Glycol-Superoxide Dismutase Administration on Histological Damage Following Spermatic Cord Torsion. *J Urol.* 1992;148(2 Pt 2):639-41; discussion 42-4.
118. Cerasaro TS, Nachtsheim DA, Otero F, Parsons CL. The Effect of Testicular Torsion on Contralateral Testis and the Production of Antisperm Antibodies in Rabbits. *J Urol.* 1984;132(3):577-9.
119. Nagler HM, White RD. The Effect of Testicular Torsion on the Contralateral Testis. *J Urol.* 1982;128(6):1343-8.

120. Abes M, Sarihan H, Deger O, Uydu HA. The Effect of ATP-MgCl₂ on Prevention of Reperfusion Injury after Unilateral Testicular Torsion. *Eur J Pediatr Surg.* 2001;11(4):255-8.
121. Chobot V, Hadacek F. Exploration of Pro-Oxidant and Antioxidant Activities of the Flavonoid Myricetin. *Redox Rep.* 2011;16(6):242-7.
122. Buchter C, Ackermann D, Havermann S, Honnen S, Chovolou Y, Fritz G, et al. Myricetin-Mediated Lifespan Extension in *Caenorhabditis Elegans* is Modulated by DAF-16. *Int J Mol Sci.* 2013;14(6):11895-914.
123. Ko WC, Shih CM, Lai YH, Chen JH, Huang HL. Inhibitory Effects of Flavonoids on Phosphodiesterase Isozymes from Guinea Pig and their Structure-Activity Relationships. *Biochem Pharmacol.* 2004;68(10):2087-94.
124. Shin JC, Jung HY, Harikishore A, Kwon OD, Yoon HS, Kim KT, et al. The Flavonoid Myricetin Reduces Nocturnal Melatonin Levels in the Blood Through the Inhibition of Serotonin N-Acetyltransferase. *Biochemical and biophysical research communications.* 2013;440(2):312-6.
125. Vinson JA, Dabbagh YA, Serry MM, Jang J. Plant Flavonoids, Especially Tea Flavonols, are Powerful Antioxidants using an in Vitro Oxidation Model for Heart Disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1995;43(11):2800-2.
126. Liu IM, Tzeng TF, Liou SS, Lan TW. Improvement of Insulin Sensitivity in Obese Zucker Rats by Myricetin Extracted from *Abelmoschus Moschatus*. *Planta medica.* 2007;73(10):1054-60.
127. Liu IM, Tzeng TF, Liou SS, Lan TW. Myricetin, a Naturally Occurring Flavonol, Ameliorates Insulin Resistance Induced by a High-Fructose Diet in Rats. *Life Sci.* 2007;81(21-22):1479-88.
128. Strobel P, Allard C, Perez-Acle T, Calderon R, Aldunate R, Leighton F. Myricetin, Quercetin and Catechin-Gallate Inhibit Glucose Uptake in Isolated Rat Adipocytes. *The Biochemical journal.* 2005;386(Pt 3):471-8.
129. Lee KH, Choi EM. Myricetin, a Naturally Occurring Flavonoid, Prevents 2-Deoxy-D-Ribose Induced Dysfunction and Oxidative Damage in Osteoblastic MC3T3-E1 Cells. *Eur J Pharmacol.* 2008;591(1-3):1-6.
130. Maggiolini M, Recchia AG, Bonofiglio D, Catalano S, Vivacqua A, Carpino A, et al. The Red Wine Phenolics Piceatannol and Myricetin Act as Agonists for Estrogen Receptor Alpha in Human Breast Cancer Cells. *Journal of molecular endocrinology.* 2005;35(2):269-81.
131. Nothlings U, Murphy SP, Wilkens LR, Henderson BE, Kolonel LN. Flavonols and Pancreatic Cancer Risk: The Multiethnic Cohort Study. *American journal of epidemiology.* 2007;166(8):924-31.

132. Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, et al. Flavonoid Intake and Risk of Chronic Diseases. *The American journal of clinical nutrition*. 2002;76(3):560-8.
133. Shin MS, Angel MF, Im MJ, Manson PN. Effects of 21-Aminosteroid U74389F on Skin-Flap Survival after Secondary Ischemia. *Plastic and reconstructive surgery*. 1994;94(5):661-6.
134. Mihara M, Uchiyama M. Determination of Malonaldehyde Precursor in Tissues by Thiobarbituric Acid Test. *Analytical biochemistry*. 1978;86(1):271-8.
135. Sun Y, Oberley LW, Li Y (1988). A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase. *Clin Chem* 34: 497.
136. Aebi HE (1987). Catalase. In Bergmeyer HU, *Methods of Enzymatic Analysis* 3: 273-285.
137. Johnsen SG. Testicular Biopsy Score Count--a Method for Registration of Spermatogenesis in Human Testes: Normal Values and Results in 335 Hypogonadal Males. *Hormones*. 1970;1(1):2-25.
138. Shimizu S, Tsounapi P, Dimitriadis F, Higashi Y, Shimizu T, Saito M. Testicular Torsion-Detorsion and Potential Therapeutic Treatments: A Possible Role for Ischemic Postconditioning. *Int J Urol*. 2016;23(6):454-63.
139. Sonda LP, Jr., Lapidus J. Experimental Torsion of the Spermatic Cord. *Surgical forum*. 1961;12:502-4.
140. Ta A, D'Arcy FT, Hoag N, D'Arcy JP, Lawrentschuk N. Testicular Torsion and the Acute Scrotum: Current Emergency Management. *European journal of emergency medicine : official journal of the European Society for Emergency Medicine*. 2016;23(3):160-5.