

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ



ACİL TIP ANABİLİM DALI

**TESTİS TORSİYONU VE ORŞİT OLUŞTURULMUŞ RAT
MODELİNDE BİYOKİMYASAL VE HİSTOPATOLOJİK
SONUÇLARIN ANALİZİ**

DR. OSMAN SERCAN SARI

UZMANLIK TEZİ

KIRIKKALE

2022

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ



ACİL TIP ANABİLİM DALI

**TESTİS TORSİYONU VE ORŞİT OLUŞTURULMUŞ RAT
MODELİNDE BİYOKİMYASAL VE HİSTOPATOLOJİK
SONUÇLARIN ANALİZİ**

DR. OSMAN SERCAN SARI

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. OĞUZ EROĞLU

KIRIKKALE

2022

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalışmamın tüm aşamalarında, emeğini ve yardımlarını hiç esirgemeyen, bilgi ve deneyimleri ile bana daima yol gösteren değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Oğuz EROĞLU'na, bilgi ve klinik deneyimlerini büyük bir özveri ile bizimle paylaşan Acil Tıp Anabilim Dalı Başkanı, sayın Prof. Dr. Turgut DENİZ'e ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ertan CÖMERTPAY'a;

Acil tıp kliniğinde asistanlık sürecinde keyifle çalışmaktan gurur duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma, tüm hemşire ve personel arkadaşlarıma;

Tüm hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve varlıkları ile bana güç veren, bu kutsal mesleğe baş koyduğumdan beri her zaman benimle olan annem Nuray ve babam Erkan'a;

Bu zorlu yolda ailem kadar yakın olan sevdiğim akrabalarıma ve çok sevdiğim dostlarıma;

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

DR. OSMAN SERCAN SARI

KIRIKKALE/2022

İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IV
KISALTMALAR	V
ÖZET.....	VII
ABSTRACT.....	IX
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1.AKUT SKROTUM	4
2.1.1. Testis Torsiyonu.....	4
2.1.1.1. Testis Torsiyonu Epidemiyolojisi	4
2.1.1.2. Testis Torsiyonu Etiyolojisi	5
2.1.1.3. Testis Torsiyonu Patofizyolojisi	5
2.1.1.4. Testis Torsiyonu Tipleri.....	6
2.1.1.4.1. İntravajinal Testis Torsiyonu	6
2.1.1.4.2. Ekstravajinal Testis Torsiyonu.....	7
2.1.1.5. Testis Eklerinin Torsiyonu	7
2.1.1.6. Testis Torsiyonunda Klinik.....	8
2.1.1.7. Testis Torsiyonunda Laboratuvar ve Görüntüleme.....	8
2.1.1.8. Testis Torsiyonunun Tedavisi	9
2.1.2. Epididimoorşit.....	10
2.1.2.1. Orşit Etiyolojisi	10
2.1.2.2. Orşit Epidemiyolojisi	10
2.1.2.3. Orşit Patofizyolojisi	10
2.1.2.4. Orşitte Klinik.....	11
2.1.2.5. Orşitin Tanısı.....	12
2.1.2.6. Orşitin Tedavisi.....	12
2.2. İSKEMİ VE REPERFÜZYON HASARI.....	13
2.2.1. Hücre Ölümü.....	14
2.2.1.1. Kaspazlar.....	14
2.2.1.2. Apoptoz	15
2.2.1.2.1. Ekstrinsik Yol	15
2.2.1.2.2. İntrinsik Yol	16
2.2.1.3. Nekroz (Nekroptoz)	17
2.2.1.4. Kalpainler.....	18
2.2.1.5. Piroptoz	18
2.3. İNFLAMASYON VE İNTERLÖKİNLER	19
2.4. OKSİDATİF STRESS.....	20
2.4.1. Nitrik Oksit	21
2.4.2. Malondialdehit	21

3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. ÇALIŞMANIN DİZAYNI	22
3.1.1. Deney Modeli.....	22
3.2. HİSTOPATOLOJİK VE BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİN DEĞERLENDİRİLMESİ	24
3.2.1. Biyokimyasal Değerlendirme.....	24
3.2.2. Histopatolojik Değerlendirme.....	27
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	28
4. BULGULAR.....	28
4.1. BİYOKİMYASAL SONUÇLARIN ANALİZİ	28
4.2. HİSTOPATOLOJİK BULGULARIN ANALİZİ.....	34
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇ	42
7. KAYNAKLAR	44

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1: Akut skrotum nedenleri	4
Tablo 2: Serbest radikaller	20
Tablo 3: Çalışma gruplarının Kalpain-1 sonuçlarının karşılaştırılması	28
Tablo 4: Çalışma gruplarının Kaspaz-1 sonuçlarının karşılaştırılması	29
Tablo 5: Çalışma gruplarının Kaspaz-8 sonuçlarının karşılaştırılması	30
Tablo 6: Çalışma gruplarının IL-1 β sonuçlarının karşılaştırılması	31
Tablo 7: Çalışma gruplarının NO sonuçlarının karşılaştırılması	32
Tablo 8: Çalışma gruplarının MDA sonuçlarının karşılaştırılması	33
Tablo 9: Grupların histopatolojik bulguları	35

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Testis Torsiyonunun Anatomik Tipleri	6
Şekil 2: Resimde sağ skrotum üzerinde “Blue-dot” işareti	7
Şekil 3: Kaspazların sınıflaması	15
Şekil 4: İntrensek ve ekstresek apoptoz mekanizmaları	16
Şekil 5: Nekroptozun mekanizması	17
Şekil 6: Piroptozun mekanizması	19
Şekil 7: Çalışma prosedürünün fotoğrafları.....	24
Şekil 8: Testis dokusunda orşit oluşturulması	24
Şekil 9: Deney gruplarındaki rat testislerinin makroskopik görüntüleri	27
Şekil 10: Gruplardaki Kalpain-1 sonuçlarının grafiksel karşılaştırılması	29
Şekil 11: Gruplardaki Kaspaz-1 sonuçlarının grafiksel karşılaştırılması	30
Şekil 12: Gruplardaki Kaspaz-8 sonuçlarının grafiksel karşılaştırılması	31
Şekil 13: Gruplardaki IL-1 β sonuçlarının grafiksel karşılaştırılması	32
Şekil 14: Gruplardaki NO sonuçlarının grafiksel karşılaştırılması.....	33
Şekil 15: Gruplardaki MDA sonuçlarının grafiksel karşılaştırılması	34
Şekil 16: Testis dokularının histopatolojik görünümü	36

KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
APAF	: The Apoptotic Protease Activating Factor
ASC	: Apoptosis-Associated Speck-Like Protein
ATP	: Adenozin Trifosfat
BAK	: Bcl-2 Homologous Antagonist/Killer
BAX	: Bcl-2-Associated X Protein
BID	: BH ₃ Interacting Domain
C. Trachomatis	: Chlamydia trachomatis
Ca⁺⁺	: Kalsiyum İyonu
CRP	: C-Reaktif Protein
DIABLO	: Diablo Homolog
DISC	: Death Inducing Signaling Complex
DNA	: Deoksiribonükleik asit
E. Coli	: Escherichia Coli
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ER	: Endoplazmik Retikulum
EO	: Epididimoorşit
GSDMD	: Gasdermin-D
H&E	: Hematoksilen-Eozin
H⁺	: Hidrojen İyonu
H₂O⁻	: Hidroksil radikali
H₂O₂	: Hidrojenperoksit
HRP	: Horseradish Peroxidase
I/R	: İskemi/Reperfüzyon
IL	: İnterlökin
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
K⁺	: Potasyum İyonu
LOOH	: Lipid hidroperoksit
MDA	: Malondialdehit

MLKL	: Mixed Lineage Kinase Domain Like Protein
MPT	: Mitochondrial Permeability Transition
N. Gonorrhoeae	: Neisseria Gonorrhoeae
Na⁺	: Sodyum İyonu
NADPH	: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NO	: Nitrik Oksit
ONOO⁻	: Peroksinitrit
PARP	: Poly ADP-ribose polymerase
pH	: Power of Hydrogen
PRR	: Pattern Recognition Receptors
RDU	: Renkli dopler ultrasonografi
RIP	: Receptor Interacting Protein
RIPK	: Receptor-Interacting Serine/Threonine-Protein Kinase
RNS	: Reactive Nitrogen Species (Reaktif Azot Türleri)
ROS	: Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
Sitokrom-C	: Cytochrome Complex (Sitokrom Kompleksi)
Smac	: Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase
SOR	: Serbest Oksijen Radikali
TMB	: Tetramethyl Benzidine
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü Alfa
TT	: Testis Torsiyonu
UPEC	: Üropatojenik Escherichia Coli
WBC	: White Blood Cell

ÖZET

Sarı OS. Testis Torsiyonu Ve Orşit Oluşturulmuş Rat Modelinde Biyokimyasal Ve Histopatolojik Sonuçların Analizi. Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Tıp Anabilim Dalı (Uzmanlık Tezi). Kırıkkale, 2022.

Giriş ve Amaç: Akut skrotum, skrotumdaki yapılarda yeni başlayan şiddetli ağrı, şişlik ve kızarıklık gelişimidir. Akut skrotum durumunda en sık izlenen iki klinik neden Testis Torsiyonu (TT) ve Orşit olup, hızla birbirinden ayırt edilmeleri gerekir. Ayırt etmede en önemli tetkik olan Skrotal Doppler ultrasonografi her zaman ulaşılabilir bir tetkik olmayıp, bazen yanlış sonuç verebilir. Bu çalışmanın amacı, TT ve Orşitin tanı ve ayırıcı tanısında biyokimyasal parametrelerin histopatolojik bulgular ile birlikte değerini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Toplam 40 adet Albino-wistar erkek rat, her grupta 8'er tane olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. Grup 1: 2 saatlik TT, Grup 2: 6 saatlik TT, Grup 3: 24 saatlik TT, Grup 4: Orşit grubu ve Grup 5: Kontrol grubu olarak tanımlandı. Tüm ratlar deney sonunda sakrifiye edilerek kan ve testis dokusu örnekleri alındı. Kan örneklerinden Kalpain-1, Kaspaz-1 ve 8, IL-1 β , Nitrik oksit (NO) ve Malondialdehit (MDA) çalışıldı. Histopatolojik bulgular şiddet skoruna göre (0=yok, 1=hafif, 2=orta, 3=şiddetli) derecelendirildi ve spermatogenez varlığı (0=yok, 1=var) değerlendirildi. Grupların karşılaştırılmasında ANOVA, ikili karşılaştırmalarda Student-t testi, histopatolojik bulguların analizinde ise Mann-Whitney U testi ve Chi-square testi kullanıldı. $p<0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

Bulgular: Akut skrotum oluşturulan gruptaki serum Kalpain-1, Kaspaz-1 ve 8, IL-1 β düzeyi kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksekti. Kalpain-1 düzeyi, 6 ve 24 saatlik TT oluşturulan grupta Orşit grubuna (Grup-4) göre anlamlı olarak daha yüksekti (sırasıyla $p<0.001$; 0.019). Orşit grubundaki IL-1 β düzeyi, 2 ve 6 saatlik TT oluşturulan gruptan anlamlı olarak daha yüksekti (sırasıyla $p=0.020$; 0.048). Orşit grubundaki Kaspaz-1 düzeyi, 2 saatlik TT oluşturulan gruptan anlamlı olarak daha yüksekti ($p=0.034$). Kaspaz-8 düzeyi bakımından Orşit ile TT grupları arasında farklılık saptanmadı. NO ve MDA düzeyi Orşit ve 24 saatlik TT oluşturulan grupta en yüksekti. Orşit ve TT olan grupta inflamasyon, konjesyon, ödem ve hemoraji mevcut olup, bu bulguların şiddeti zaman ilerledikçe artmaktaydı. Fibrozis sadece Orşit grubunda mevcuttu. Spermatogenez, 6 ve 24 saatlik TT'nu oluşturulan

gruplarda bozulmuş olup, özellikle IL-1 β 'nın en yüksek olduğu Grup-3'teki ratların %62.5'inde spermatogenez izlenmedi.

Sonuç: Serum Kalpain-1, Kaspaz-1 ve 8, IL-1 β düzeyi ölçümü akut skrotum (TT ve Orşit) tanısının konulmasında gelecek vadede biyomarkerlar olarak görünmektedir. Akut skrotum kliniği ile başvuran hastalarda IL-1 β 'nın ilk 6 saatteki, Kaspaz-1'in ise ilk 2 saatteki yüksekliği Orşit lehine yorumlanabilir iken; Kalpain-1'in 6. saat ve sonrasındaki yüksekliği ise TT'nun göstergesi olarak kabul edilebilir. Bu biyobelirteçler “zaman” faktörü göz önünde bulundurularak akut skrotumun en önemli iki nedeni olan TT ile Orşit'in ayırıcı tanısında kullanılabilir. Kaspaz-8 düzeyi Orşit ile TT'nu ayırmasını yapmada yetersizdir. Akut skrotum tanı ve ayırıcı tanısında biyomarker kullanımı ile ilgili ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Testis Torsiyonu, Epididimoorşit, Orşit, Kaspazlar, Kalpain-1, Interlökin-1 β , Histopatoloji

ABSTRACT

Sarı OS. Testis Torsiyonu ve Orşit Oluşturulmuş Rat Modelinde Biyokimyasal Ve Histopatolojik Sonuçların Analizi. Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Tıp Anabilim Dalı (Uzmanlık Tezi). Kırıkkale, 2022.

Sarı OS. An Analysis of Biochemical and Histopathological Results in a Rat Model of Testicular Torsion and Orchitis. Kırıkkale University Medical Faculty Emergency Medicine Department (Specialization Thesis). Kırıkkale, 2022.

Introduction and Aim: Acute scrotum is the development of new-onset pain, swelling, and erythema in the intrascrotal structures. The most common clinical causes of acute scrotum are testicular torsion (TT) and orchitis, which require rapid differentiation from one another. Scrotal Doppler ultrasonography may not always be available and can sometimes give false results. The aim of this study is to investigate the value of biochemical parameters and histopathological findings in the diagnosis and differential diagnosis of TT and orchitis.

Materials and Methods: Forty male Albino-Wistar rats were divided into five groups of eight animals each. Group 1 represented the 2-hour TT group, Group 2 the 6-hour TT group, Group 3 the 24-hour TT group, Group 4 the Orchitis group, and Group 5 the Control group. All rats were sacrificed at the end of the experiment, and blood and testis tissue specimens were collected. Calpain-1, Caspase-1 and -8, Interleukin (IL)-1 β , Nitric oxide (NO), and Malondialdehyde (MDA) were studied from the blood specimens. Histopathological findings were graded according to severity scores (0=none, 1=mild, 2=moderate, 3=severe), and the presence of spermatogenesis was evaluated (0=absent, 1=present). ANOVA was employed in group comparisons, Student's t test in two-way comparisons, and the Mann-Whitney U test in the analysis of histopathological findings. *p* values <0.05 were regarded as significant.

Results: Serum Calpain-1, Caspase-1 and -8, and IL-1 β levels were significantly higher in the groups with induced acute scrotum than in the Control group. Calpain-1 levels in the Orchitis group (Group 4) were significantly lower than in the 6- and 24-h TT groups (*p*<0.001 and 0.019, respectively). IL-1 β levels in the Orchitis group were significantly higher than in the 2- and 6-hour TT groups (*p*=0.020 and 0.048,

respectively). Caspase-1 levels were significantly higher in the Orchitis group than in the 2-hour TT group ($p=0.034$). No difference was determined in Caspase-8 levels between the orchitis and TT groups. NO and MDA levels were highest in the orchitis and 24-hour TT groups. Inflammation, congestion, edema, and hemorrhage were present in the Orchitis and TT groups, the severity of these findings increasing in a time-dependent manner. Fibrosis was only present in the Orchitis group. Spermatogenesis was impaired in the 6- and 24-hour TT groups, with no spermatogenesis being observed in 62.5% of the rats in Group 3, in which IL-1 β levels were highest.

Conclusion: Serum Calpain-1, Caspase-1 and -8, and IL-1 β levels appear to represent promising markers in the diagnosis of acute scrotum (TT and Orchitis). IL-1 β elevation in the first 6 hours and Caspase-1 elevation in the first 2 hours may be interpreted in favor of Orchitis in patients presenting with a clinical manifestation of acute scrotum, while Calpain-1 elevation at 6 hours and subsequently may be regarded as indicating TT. These two biomarkers can be employed in the differential diagnosis of TT and orchitis by considering the ‘time’ factor. Caspase-8 levels are not useful in differentiating orchitis and TT. Further more advanced studies are now needed regarding biomarker use in the diagnosis and differential diagnosis of acute scrotum.

Keywords: Testicular Torsion, Epididymoorchitis, Orchitis, Caspases, Calpain-1, Interleukin-1 β , Histopathology

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Testis torsiyonu (TT), testisin spermatik kord etrafında dönmesi sonucu kan akımının bozulması ve buna bağlı artan iskemi sonucu ortaya çıkan klinik tablo iken, Orşit (veya Epididimoorşit) ise önce epididimden başlayan, daha sonra tek taraflı testisin inflamasyonu ile karakterize olan tablodur (1,2). Her iki klinik durum, akut skrotal acillerin veya başka bir deyişle “akut skrotum” durumunun acil serviste en sık karşılaşılan nedenidir ve erkek hastaların %0.5-2.5'i aralarında Orşit ve TT'nun bulunduğu akut skrotum nedenleriyle acil servise başvurur (3). TT hastalarında testisin prognozu iskeminin süresi ve testisin spermatik kord etrafında dönme derecesi ile yakından ilişkilidir, eğer zamanında müdahale edilmezse kalıcı testis hasarına ve infertiliteye yol açar (1). TT olan hastalarda, testisin kurtulma şansı iskemi süresi 6 saati aştığında %90 iken, bu oran 12 saatten sonra %50'ye, 24 saatten sonra ise %10'a düşer (4). Orşit hastasında ise TT'na göre klinik tablonun gidişatı daha yavaş olsa da uygun antibiyotik tedavisine rağmen, tedavinin yetersiz kalabileceği ve tıpkı TT'da olduğu gibi klinik durumun kötüleşerek testisin kaybedilebileceği unutulmamalıdır (2).

Klinik olarak TT, ani başlangıçlı tek taraflı skrotal ağrı ve ağrıyla birlikte seyreden bulantı-kusma şikayeti ile karakterizedir (5). Tanıda, Kremaster refleksinin kaybolması değerli bir bulgu olsa da bu durum her zaman geçerli değildir (6). Orşit ise TT'a göre kısmen daha yavaş ve kademeli başlasa da, birçok hastada ağrının karakteristik özellikleri, başlangıç süresi ve tarifi ile ilgili ifadeler çelişkili olduğundan; bu durumun testisler için daha yıkıcı bir sonuca neden olan TT'dan ayrılması gerekir (7). Bu nedenle, her iki skrotal acili birbirinden ayırmaya yönelik kan ve idrar tahlili istemi yapmak ve Skrotal Doppler ultrasonografi incelemesinin sonucunu görmek gereklidir (6). Bu nedenle acile başvuran akut skrotum hastalarında akut skrotumun en sık görülen nedeni olan epididimoorşit ve gerçek bir ürolojik acil olan TT'nun hızlıca ayırt edilmesi gerekir. Skrotal Doppler Ultrasonografi her ne kadar TT'nu belirleme bakımından yapılacak en önemli tetkik olsa da, değerlendirme operatör bağımlı olup küçük çocuklarda ve yenidoğanda tanı atlanabilir ve hatta hastalardaki TT tablosu yanlışlıkla Orşit olarak rapor edilebilir (8,9).

Kaspazlar , apoptozun çeşitli aşamalarında yer alan ve farklı farklı görevleri olan sistein proteaz ailesi enzimleridir (10). Kaspazlar, başlangıçta inaktif protein olarak sentezlenir ve daha sonra çeşitli mekanizmalarla aktive edilerek aktif fonksiyon gösteren hallerine dönüşür (11). Kaspaz ailesi kendi içinde “Başlatıcı” (2,8,9,10), “Efektör” (3,6,7) ve “İnflamatuvar” Kaspazlar (1,4,5,11,12,13,14) olmak üzere 3 farklı grupta sınıflandırılır (12). Kaspaz-1, inflamatuvar özellikli bir kaspaz olup, hücre içinden gelen sinyaller sonrası önce inflamasyonu ve daha sonra pro-inflamatuvar sitokinler olan IL-1 β ve IL-18’i aktivasyonu ile birlikte piroptozu başlatır (13). Piroptoz, apoptoz benzeri programlanmış bir hücre ölüm mekanizması olup, hücre içi ve hücre dışı patojenlerin etkileri sonucu gerçekleşir ve Kaspaz-1 bilinen pek çok hücre ölümü mekanizmasından yalnızca birisi olan piroptozu başlatan ana enzimdir (12–14). Kaspaz-8 hücre ölüm mekanizmalarında görevli bir başka Kaspaz üyesi olup, ekstrinsik yol üzerinden apoptoz ve nekroptoz olarak da bilinen farklı hücre ölümü mekanizmalarında görev alan kaspaz enzimlerinden biridir. Ayrıca, iskemi-reperfüzyon hasarının gerçekleşmesinde ve buna bağlı nekroptoz oluşumunda da rol almaktadır (15).

Kalpainler, apoptoz sırasında artan hücre içi kalsiyum (Ca^{++}) seviyesi sonucu aktive olan kalsiyum bağımlı bir proteaz ailesidir. Bu ailenin üyeleri apoptoz, nekroptoz veya otolitik orijinli bilinen tüm hücre ölüm mekanizmalarında görev almaktadır. Ayrıca, Kalpainlerin de tıpkı Kaspazlar gibi iskemi-reperfüzyon hasarında çok önemli görevler aldığı bilinmektedir. Kalpain-1 ise bu proteaz ailesi içinde yönetici konumdaki üyelerden biridir. (16).

IL-1 β çok güçlü bir pro-inflamatuvar sitokin olup, inflamasyon veya enfeksiyon durumunda aktive olur. Konağın inflamasyon veya enfeksiyonu söz konusu olduğunda, bir multiprotein kompleksi olan inflamazomlar öncelikle Kaspaz-1’i aktif hale getirir. Aktive olan Kaspaz-1 daha sonra IL-1 β ve IL-18’nin salınımını arttırarak piroptozun gerçekleşmesine neden olur (17,18).

Normal koşullarda biyoorganizmada oksidan ve antioksidan mekanizmalar arasında bir denge söz konusudur. Ancak, vücutta aşırı strese yol açan travma, enfeksiyon, toksinler, aşırı egzersiz ve iskemi gibi oksidan mekanizmaların arttığı durumlarda oksidatif stres gelişir ve ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri sonucu

hücrelerin lipid, protein ve nükleik asit gibi yapıları hasar görür (19). Oluşan bu hasar lipid peroksidasyonunun göstergesi olan Malondialdehit (MDA) veya nörotransmitter, vazodilatasyon, düz kasta relaksasyon ve immün yanıt gibi türlü fizyolojik görevleri olan Nitrik oksit (NO) düzeyi ölçümü ile gösterilebilir (20–23).

Bu çalışmanın amacı, akut skrotum en sık nedeni olan TT ve Orşit'in tanı ve ayırıcı tanısında biyokimyasal parametrelerin (Kaspaz-1, Kaspaz-8, Kalpain-1, IL-1 β , MDA ve NO) histopatolojik bulgular ile birlikte değerini araştırmaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. AKUT SKROTUM

Akut skrotum, skrotumdaki yapılarda yeni başlayan şiddetli ağrı, şişlik ve kızarıklık gelişimi olarak tanımlanmaktadır (24). Akut skrotumun erişkinlerdeki en sık iki nedeni TT ve akut Epididimoorşittir (25). Diğer nedenler Tablo 1’de sıralanmıştır (26).

Tablo 1: Akut skrotum nedenleri

- Testis torsiyonu
- Epididimit (veya Epididimoorşit)
- Apendiks testis/epididim torsiyonu
- Skrotal Travma/Hematom
- Strangüle inguinal herni
- Sistemik hastalıklar (Henoch-Schönlein Purpurası)
- Skrotal yağ nekrozu
- Fournier gangreni
- Varikosel (Akut gelişen ve tromboze olan)

2.1.1. Testis Torsiyonu

TT, testisin spermatik kord etrafında dönmesi sonucu kan akımının bozulması ve buna bağlı artan iskemi sonucu ortaya çıkan ve zamanında müdahale edilmezse geri dönüşsüz testis hasarı ve infertiliteye yol açan acil bir durumdur (1).

2.1.1.1. Testis Torsiyonu Epidemiyolojisi

Akut skrotum vakalarının yaklaşık %25’ini TT’nu oluşturmaktadır. Genç erkek hastalarda izlenme oranı yıllık yaklaşık olarak 1/4000’dir (27,28). TT’nu izlenme sıklığı neonatal dönem ve erken adolesan dönemde (özellikle 13-16 yaş arasında pik yapar) artmaktadır (29). Yaşlılarda ise TT insidansı oldukça düşük olup, bildirilen en yaşlı vaka 68 yaşındaki bir hastadır (30,31).

2.1.1.2. Testis Torsiyonu Etiyolojisi

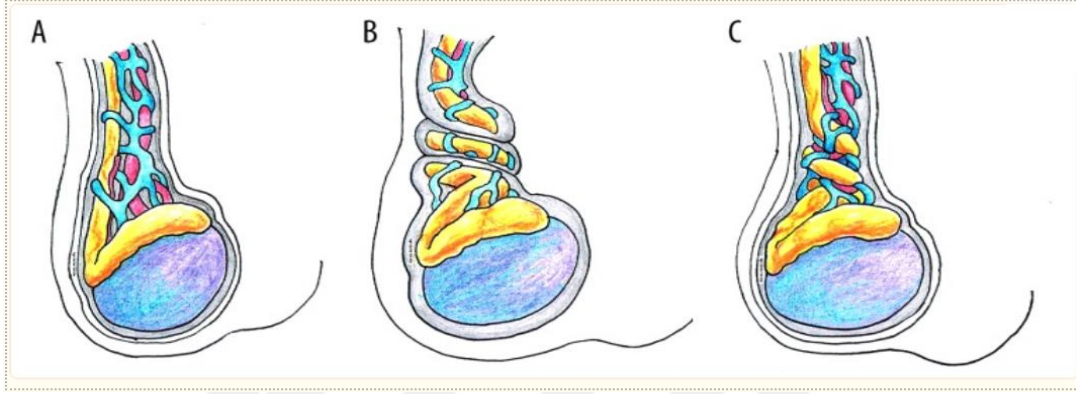
TT'nun sebebi genellikle bilinmemekle birlikte, çeşitli hazırlayıcı faktörlerden söz edilebilir. Yenidoğan döneminde skrotum ve içindeki yapılarda oluşan bazı konjenital ve gelişimsel anomaliler TT'na neden olurken, puberte döneminde ise testis volümünün artması nedeniyle TT görülme ihtimali yükselir (24,32). Ayrıca travma, aşırı egzersiz, kremaster veya dartos kaslarının aşırı kasılması ve çevre sıcaklığının 2°C'nin altında olması da TT gelişimi için hazırlayıcıdır (33).

2.1.1.3. Testis Torsiyonu Patofizyolojisi

TT'nun ana sebebi testiste ödeme ve ağrıya yol açan venöz tıkanıklıktır. Tıkanıklığın neden olduğu süreçte, venöz ve arteriyel basınçlarının eşitlenmesi nedeniyle arteriyel kan akımı azalır ve bozulan kan dolaşımı sonucu testiste iskemi başlar (34). İskeminin derecesi torsiyonun süresi ve spermatik korttaki rotasyonun derecesine bağlı olarak değişir. TT sırasında rotasyonun derecesi 180° ile 720° arasında olabilir (1). Yapılan çalışmalarda, 360° TT'da 24 saat geçmesine rağmen kurtulma şansının %90 civarında olduğu; ancak 720° ve üstündeki torsiyonlarda ise 24 saatte kurtulma ihtimalinin olmadığı gösterilmiştir. Bu nedenle, 360°'nin üzerindeki torsiyonların daha agresif seyrettiği söylenebilir (35). Testiste torsiyon başladıktan sıklıkla 4 saat sonra doku iskemi ortaya çıkarken, 24. saatte ise bulgular çok daha belirgin hale gelir (36). Torsiyon sırasında oluşan doku hasarı, İskemi/Reperfüzyon (I/R) hasarıyla da yakından ilişkilidir. Hatta bazı otörlerce TT'nunda asıl hasar verici mekanizmanın I/R hasarı olduğu düşünülmektedir (37). TT'nun neden olduğu iskemi, en fazla iskemiye en duyarlı hücreler olan germ hücrelerini (Spermatogonia ve spermatositler) etkiler (38).

2.1.1.4. Testis Torsiyonu Tipleri

TT'nun iki ana anatomik tipi bulunmaktadır. Bunların ilki, özellikle yenidoğan döneminde izlenen ve tunika vajinalis dışındaki yapıların dönmesi ile oluşan “ekstravajinal” torsiyon, ikincisi ise “intravajinal” torsiyondur. Ayrıca, bazı otörler appendiks testis ve epididim gibi testis eklerinin torsiyonunu üçüncü tip olarak kabul etmektedirler (39,40).



A) Normal testis anatomisi B) Ekstravajinal Testis Torsiyonu C) İnvajinal Testis Torsiyonu

Şekil 1: Testis Torsiyonunun Anatomik Tipleri (41).

2.1.1.4.1. İnvajinal Testis Torsiyonu

İnvajinal torsiyon, ergenlik yaş grubunda ve yetişkinlerde en sık görülen TT'ni tipidir (42). İnvajinal torsiyon, spermatik kordun tunika vajinalise yapıştığı yerin distal kesiminde torsiyon gelişmesi olarak tanımlanır. Bu durum, sıklıkla tunika vajinalisin normal anatomik yerleşiminden farklı olarak, spermatik kord üzerinde daha proksimal bir noktaya yapışması sonucu gerçekleşir (43). Konjenital anomaliler, inmemiş testis, gevşek epididimal birleşme, testisin horizontal uzanımı, testisin gubernakular yapısının anormal uzun veya kısa olması gibi durumlar invajinal tip torsiyon oluşumuna yol açan diğer nedenlerdir (43). Ayrıca testis travması her yaş grubunda invajinal torsiyona neden olabilir (44). “Çan tokmağı” deformitesi, çocuklarda ve adölesan dönemde gerçekleşen özel bir invajinal testis torsiyonu tipi olup, bu durum tunika vajinalisin spermatik kordonun üst kısımlarında sonlanması sonucu, testis vajinal kavite içinde serbestçe hareket etmesi sonucu gerçekleşir ve sıklıkla bilateralidir (45).

2.1.1.4.2. Ekstravajinal Testis Torsiyon

Ekstravajinal torsiyon çok nadir görülmekte olup, insidansı yüz binde 6 civarındır (46). Bu torsiyon tipi fetal dönem ya da neonatal dönemde oluşabilir. Çünkü, tunika vajinalisin etraf dokulara adhezyonunun tamamlanması doğumdan itibaren ilk 6 haftayı bulur ve testis skrotuma indiği dönemde henüz tunika vajinalisin gelişimi tamamlanmadığından ekstravajinal torsiyon oluşumu izlenebilir. Ayrıca, bu dönemde gubernakulum skrotal duvara tamamen fikse olmadığından, testis, spermatik kord ve tunika vajinalis etrafında dönerek torsiyona neden olabilir. Bu sebeple inmemiş testis bu tip torsiyonlarda bir risk faktörü sayılır ve prognoz genellikle kötüdür (24,32).

2.1.1.5. Testis Eklerinin Torsiyonu

Appendiks testis ve epididimislerin üstünde bulunan embriyolojik kalıntıların torsiyonu sonucu gelişen patolojik durumdur. Sıklıkla 16 yaşından sonra izlenir. Bu tipte, ani başlangıçlı şiddetli ağrı sonrası testisin veya epididimisin üst kısmında kitle ele gelmesi patognomoniktir. Hastalarda, appendiks testis torsiyonunun inspeksiyonu sırasında skrotum cildinde “Blue-dot (mavi nokta)” işareti izlenebilir (47,48).



Şekil 2: Resimde sağ skrotum üzerinde “Blue-dot” işareti (49)

2.1.1.6. Testis Torsiyonunda Klinik

Hastalar genellikle testiste, inguinal bölgede ve karın alt kadranslarda hissedilen akut şiddetli ağrıdan yakınmaktadır. Ağrı, sabit veya aralıklı olabildiği gibi genellikle pozisyonla karakter değişikliği göstermez. TT, sadece testis dokusunda izlenen iskemik bir olay olmayıp, aynı zamanda inflamatuvar karakterde taşır. Bu nedenle, skrotal ağrı ile birlikte kusma varlığı olan hastalarda TT’u izlenme ihtimali daha fazladır (50). TT olan hastaların anamnezinde daha önceden spontan olarak düzelen ve önceki iskemik ataklarla ilişkili olabilecek skrotal ağrı öyküsü alınabilir (5).

Fizik muayenede palpasyonda testisler oldukça hassastır ve spermatik kord kısaldığı için testis yüksek pozisyonda ve transvers yerleşimdedir. Epididimin ön tarafa doğru kayması ve spermatik kordun da kalınlaşarak hassas ve palpe edilebilir hale gelmesi TT düşündürür (51). Hastalarda spermatik kordun kısalması nedeniyle yükselmiş testis izlenebilir ve bu durum TT için ayırt edici bir bulgudur (51). Ayrıca, kremaster refleksinin yokluğu da TT için başka bir tanı kriteri olarak sayılır. Normalde kremaster refleksi, iç uyluğun iç yüzüne yapılan hafif bir vuruş sonrası aynı taraftaki testisin yükselmesi şeklindedir ve TT’nun da bu refleks alınamayabilir (51). Skrotal muayene sırasında, skrotumun elevasyonu ile testisteki ağrının artması TT, azalması ise epididimit için tanısız olabilir. TT olan hastalarda bu muayene bulgusu “Phren bulgusu” olarak adlandırılır (51). Testis apendiksinin torsiyonu (apendiks testis veya apendiks epididim) olan hastalarda ise TT’nun aksine, nadiren sistemik şikayetler ortaya çıkar ve tipik olarak daha az yoğunlukta, testisin üst kutbuna lokalize olan ve kademeli olarak artan tek taraflı skrotal ağrı izlenir (52).

2.1.1.7. Testis Torsiyonunda Laboratuvar ve Görüntüleme

İdrar tetkikleri, TT tanısından ziyade ayırıcı tanısı için faydalıdır. İdrarda hematüri veya lökositöz varlığı, daha çok epididimoorşit lehine olsa da TT’nunda da izlenebilir (6,8). TT tanısında en çok kullanılan yöntem Renkli Doppler Ultrasonografidir (RDU). RDU sayesinde testis boyutu, şekli, ekojenitesi ve kanlanması değerlendirilebilir. Akut skrotum tablosundaki hastalarda RDU

kullanımı, cerrahi eksplorasyon insidansını azaltır. RDU'nun akut skrotum tanısındaki duyarlılığı %63.6-100, özgüllüğü %97-100, pozitif prediktif değeri %100 ve negatif prediktif değeri ise %97.5 olarak belirtilmiştir (53,54). Bununla birlikte, RDU'nun bazı dezavantajları da mevcuttur. Bunlar kullanıcı (operatör) bağımlı olması ve özellikle küçük çocuklarda veya küçük damarları olan yenidoğanlarda göz ardı edilemeyecek kadar yüksek oranda yanlış yorumlara (Sıkça Orşit olarak yorumlanmaktadır) neden olabilmesi şeklinde sayılabilir (6,8,9).

Görüntüleme yöntemleri ile elde edilecek bulgular, anamnez ve fizik muayeneye ilave olarak kullanılmalı, klinik değerlendirmede anamnez ve fizik muayene esas alınmalıdır. Anamnez ve fizik muayene sonrası TT'ye yönelik kuvvetli bir şüphe olan hastalarda ultrasonografi vb. tetkiklerle zaman kaybedilmemeli, acilen cerrahi skrotal eksplorasyon yapılmalıdır. Böylece, yanlış (negatif) tanı ihtimali olan hastaların atlanması önlenabilir. (53,55,56).

2.1.1.8. Testis Torsiyonunun Tedavisi

Akut skrotumun nedenleri arasında olan TT'nun tedavisinin gecikmesi geri dönüşü olmayan testis nekrozuna sebep olduğu için tanı ve tedavi hızlı bir şekilde yapılmalıdır (57). İskemi süresinin 6 saati aştığı durumlarda testisin kurtulma şansı %90 iken, bu oran 12 saatten sonra %50, 24 saatten sonra ise %10'a düşer (4). Bu nedenle TT'de daha iyi bir kurtarma oranı elde etmek için, semptomların başlamasından sonraki 6 saat içinde cerrahi eksplorasyon yapılması önerilmektedir (58).

TT'de tedavinin esası detorsiyona dayanmaktadır. Manuel detorsiyon ilk 2-6 saat arasında veya cerrahi hazırlığın devam ettiği esnada uygulanmalıdır (28,59). Ancak, bir hastada başarılı bir manuel detorsiyon sonrası testiste ağrı geçmesine, kordun gevşemesine ve testisin skrotum içindeki normal pozisyonunun sağlanmasına rağmen, daha sonra gelişebilecek TT ihtimalini önlemek için cerrahi tedavi ihtiyacı devam etmektedir. Başarılı detorsiyonun varlığı, Doppler USG'deki kan akımının düzelmesi ile gösterilebilir. Eğer, manuel detorsiyon başarısız olursa vakit kaybedilmeden cerrahi eksplorasyona geçilmelidir (59). Ancak, TT olan hastalarda cerrahi girişim başarılı olsa da, hastaların %40-60'ında testiküler atrofi ve infertilite gelişebilmektedir (60).

2.1.2. Epididimoorşit

Epididimoorşit (veya Orşit) öncelikle epididimin iltihabı, sonrasında ise tek taraflı testis tutulumu sonucu ortaya çıkan akut skrotal bir acildir. Akut skrotumun nedenleri arasında birçok hastalık bulunmasına rağmen, özellikle yetişkinlerde en yaygın nedeni orşittir (2).

2.1.2.1. Orşit Etiyolojisi

Epididimitin ortaya çıkışı ile ilgili geleneksel görüş, bu durumun idrar reflüsünden kaynaklandığını vurguluyor olsa da 1979 yılında Berger ve ark.'nın yaptığı çalışma çoğu vakadan bakterilerin sorumlu olduğu gösterilmiştir (61). Enfeksiyonun yanı sıra travma, otoimmün hastalıklar ve bazı risk faktörleri de (Doğumsal anomalliler, cinsel aktivite, mesane çıkışı obstrüksiyonu, idrar reflüsü ürogenital malformasyon, yorucu fiziksel aktivite ve bisiklet veya motosiklet sürme gibi) orşite neden olabilir (9,62,63).

2.1.2.2. Orşit Epidemiyolojisi

Akut epididimitin insidansı tam olarak bilinmese de, ABD'de yapılan bir çalışmada 18 yaşından büyük erkeklerde epididimit izlenme oranı %0.29 olarak bildirilmiştir (64). Bununla birlikte 18-50 yaş arası erkeklerde izlenen genitoüriner sistem enfeksiyonları arasında epididimitin sırası; prostatit, üriner sistem enfeksiyonu, üriner sistem taşına sekonder enfeksiyonlar ve komplike olmayan cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlardan sonra 5. sırada gelmektedir (64).

2.1.2.3. Orşit Patofizyolojisi

Epididimoorşit; genellikle organizmaların vas deferens yoluyla testis ve epididime ulaşması sonucu oluşur (65). Akut epididimoorşitte izole edilen en yaygın patojen, üropatojenik *E. Coli* (UPEC)'dir (66). Çocuklarda ve yaşlı erkeklerde *E. coli*'nin yanı sıra *Pseudomonas* ve *Proteus* türlerine rastlanırken, bazı çocuklarda nadirde olsa *Mycoplasma pneumoniae*, *Enterovirüs* ve *Adenovirüs* gibi virüslerin de epididimoorşit nedeni olabildiği bilinmektedir. Otuzbeş yaş altı erkeklerde ise cinsel yolla bulaşan epididimoorşit vakaları sıklıkla ve bunların %50'sinde sorumlu organizmalar *N. gonorrhoeae* ve *C. Trachomatis*'dir (62).

2.1.2.4. Orşitte Klinik

Hastalarda ağrının ortaya çıkışı TT'ye göre daha yavaş ve kademelidir (67). Ağrı sıklıkla testisin arkasına lokalizedir ve zamanla ağrı spermatik kord tutulumu nedeniyle kasık bölgesine veya karın alt kadrana doğru yayılabilir. Ayrıca, bazı hastalarda tek taraflı tutulumun aksine, enfeksiyonun diğer tarafa da yayılmasına bağlı olarak her iki testiste de ağrı izlenebilir (68). Virüslerle enfekte olan orşit vakalarında klinik bulgular daha hızlı ortaya çıkar ve sıklıkla tek taraflı ani başlayan skrotal ağrı ve skrotumda şişlik izlenir (9).

İdrar yapma semptomları (Sık idrara çıkma, hematüri ve dizüri gibi) ile birlikte yüksek ateş olan hastaların epididimit olma ihtimali daha yüksektir. Ayrıca, bazı hastalarda üretrit ve prostatit bulguları da (Üretral akıntı, işeme semptomları) izlenebilir (68). Bu hastalarda, idrar kültürü sonucu sıklıkla negatif (-) olsa da idrar kültürü alınması, üretral sürüntü ve idrar analizi gibi tetkiklerin yapılması önerilmektedir (67). Hastalarda testiküler inflamasyon nedeniyle epididim aşırı derecede duyarlı ve ödemli olabilir. Ödem, sıklıkla epididime lokalize olup, bazen testise doğru da ilerler ve yaklaşık 3-4 saat içinde testisler normal boyutlarının 2-3 katına ulaşabilir (68). Bulantı-kusmanın varlığı veya yokluğu, Epididimoorşit ile TT arasında ayırım yapılmasına yardımcı değildir. Çünkü bu semptomlar herhangi bir koşulda izlenebilir (9).

Fizik muayenede skrotum ciddi kızarıklık, ödemli ve lokal olarak ısı artışı mevcuttur. Ayrıca, palpasyonda spermatik kord ve skrotumda hassasiyet saptanabilir. İleri evre olguların %58'inde epididim ile testis tek bir kitle şeklinde palpe edilebilir. Eğer apse gelişimi varsa bu hastalarda fistülizasyonla da karşılaşılabilir (36,68). Prehn belirtisi; testisin yükselmesiyle ağrının azalması durumudur. Epididimitli hastalarda güvenilir bir bulgu olmasa da (Aynı bulgu TT'de de oluşabilir) ortaya çıkabilir (69).

2.1.2.5. Orşitin Tanısı

Akut skrotumun en sık nedenleri olan TT ve EO arasında, yalnızca klinik muayene ile ayırım yapmak zordur. Bu nedenle, ek tetkiklere ihtiyaç duyulmaktadır. C-reaktif protein (CRP) seviyeleri ve eritrosit sedimentasyon hızı gibi parametrelerin ölçülmesi, Epididimoorşiti testis torsiyonundan ayırt etmede faydalı olabilir (70). Bazı hastalarda, üretrit ve gonokokal enfeksiyonu saptamak için gram boyama ve üretral akıntı kültürü önerilmektedir. Bu hastalarda, Lökosit esteraz ve beyaz küre (WBC) yüksekliği üretriti ve buna bağlı epididimite düşündürebilir (9). Tanı veya ayırıcı tanının şüpheli olduğu durumlarda skrotal muayeneye ek olarak RDU yapılmalıdır (71,72). RDU'da belirgin olarak azalmış Doppler dalga nabızı (azalmış kan akımı) TT düşündürürken, artmış Doppler dalga nabızı (artan kan akışı) ile büyümüş, kalınlaşmış bir epididim varlığı ise Epididimite düşündürür (73).

2.1.2.6. Orşitin Tedavisi

Epididimitin ampirik tedavisi, laboratuvar testleri tamamlanmadan önce olası patojenlere yönelik başlatılmalıdır. Amaç, enfeksiyonu tedavi etmeye, semptomları iyileştirmeye, bulaşmayı önlemeye ve gelecekteki komplikasyonları azaltmaya yöneliktir. Daha sonrasında spesifik etkene yönelik antibiyotikle tedaviye devam edilmelidir (74). Ayrıca, antibiyotik tedavisine ek olarak analjezikler, skrotal elevasyon, fiziksel aktivite kısıtlılığı, yatak istirahati ve soğuk uygulama fayda sağlar. Hastalar sepsis, apse, infertilite ve enfeksiyonun yayılması gibi olası komplikasyonlar konusunda bilgilendirilmelidir. Epididimit ve orşit genellikle yakın takip ile ayaktan tedavi edilebilir. İnatçı ağrı, kusma (Oral antibiyotik alamama nedeniyle), apse şüphesi, ayaktan tedavi başarısızlığı veya sepsis belirtileri var hasta için yatarak tedavi edilmesi önerilir (75–77). Viral orşit tedavisinde ise semptomatik tedavi uygulanmaktadır. Kabakulağa sekonder oluşan orşit vakalarının birçoğu 3-10 gün içinde kendiliğinden düzelmektedir (9).

2.2. İSKEMİ VE REPERFÜZYON HASARI

İskemi-reperfüzyon (I/R) hasarı, iskemik dokulara veya organlara kan akışının yeniden sağlanmasının neden olduğu hasar olarak tanımlanmaktadır. Bu durum, bir dizi karmaşık patofizyolojik mekanizmalarla ilişkili olup, I/R hasarı nedeniyle hücre disfonksiyonu, apoptoz, nekroptoz ve hatta ferroptoz gibi farklı hücre ölüm şekilleri gerçekleşebilmektedir (78). Hücre disfonksiyonunun veya ölümünün derecesi, iskeminin hem büyüklüğünden hem de süresinden etkilenmektedir. Ayrıca, her organın iskemiye duyarlılığı farklıdır. Bununla birlikte, iskemi sonrasında reperfüzyon yani hücreye oksijen ve besin yeniden gönderimi sonrası birikmiş hücresel metabolizmanın ürünlerinin neden olduğu bazı patojenik süreçler meydana gelmektedir (79).

İskemi sırasında anaerobik metabolizma hakimdir ve bu metabolizma sonucunda hücrede hidrojen iyonları birikmeye başlar ve bu durum hücre pH'ında düşüşe neden olur. Biriken hidrojen iyonlarını tamponlamak için Na^+/H^+ değiştirici mekanizmalarla fazla hidrojen iyonları hücre dışına atılır (80). İskemi ayrıca Na^+/K^+ ATPase gibi enerji metabolizmasını katalize eden enzimleri de inhibe ederek hücrelerdeki ATP'yi tüketir. Daha sonra hücreden Ca^{++} iyonu dışarı çıkar ve hücredeki aktif Ca^{++} iyonu miktarını azaltır ve endoplazmik retikulum (ER) tarafından kalsiyumun geri alımını sınırlar, böylece hücrede aşırı kalsiyum yüklenmesine neden olur. Bu durum mitokondrideki (MPT) gözeneklerinin açılmasına da sebep olur, mitokondriyal membran potansiyelini dağıtımını da ATP üretimini de daha fazla bozar ve bu durum hücre içi proteazların (örn. kalpainler) aktivasyonuna neden olur. Bu değişiklikler doku hasarının derecesine, kan akışındaki azalmanın büyüklüğüne ve iskemik dönemin süresine göre değişir (81). İskemi sırasında, iskemik hasara katkıda bulunmayan diğer biyokimyasal olaylar meydana gelir. Ancak perfüzyon yeniden sağlandığında kandaki oksijen ve oluşan metabolitlerin kana verilmesiyle doku hasarını alevlendiren bir dizi olayı tetiklerler. Reperfüzyon, oksijenin ve aerobik ATP üretimi için gerekli substratların verilmesi yeniden sağlansa da, aerobik metabolizma ile hücre dışı pH'ı normalleştirse de reperfüzyonun kendisinin zararlı sonuçları var olduğu gözlenmiştir (79). I/R hasarının altında yatan mekanizmalar karmaşık ve çok faktörlüdür, genel

olarak; Kan akışı yeniden sağlandığında, oksijenin yeniden verilmesiyle metabolizma sonucu reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu, kalsiyum aşırı yüklenmesi, mitokondriyal disfonksiyon, endotelial disfonksiyon, koagülan sistem disfonksiyonu, apoptoz ve inflamatuvar yanıtlar gibi çok sayıda patofizyolojik süreçleri içermektedir (82,83). Reperfüzyon fazının çok dinamik olduğu ve hücre ölümünün reperfüzyon başlangıcından sonra 3 güne kadar devam edebildiği bilinse de kritik bir iskemi süresi aşıldığında, hücre tipine ve organa göre değişen hücre hasarı ve/veya ölüm meydana gelir (84). Bu nedenle, etkilenen organa kan akışının mümkün olan en erken zamanda yeniden sağlanması, açıkça birincil öneme sahiptir.

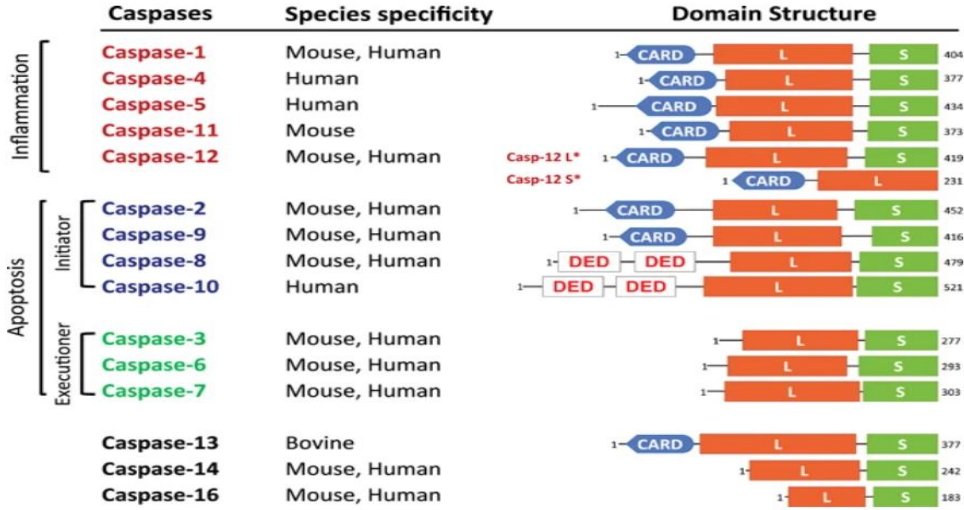
2.2.1. Hücre Ölümü

Vücutta homeostaziye sağlamak için yeni hücrelerin oluşması ile var olan hücrelerin ölümü arasında bir denge vardır. Ölüm, apoptoz gibi programlanmış ve temiz bir şekilde yürütülebilir veya birçok nekroz türünün örneklediği gibi travmatik veya inflamatuvar olabilir. Bununla birlikte, homeostaziye desteklemede veya bozmada çok sayıda role hizmet eden, bazıları apoptoz ve/veya nekroza benzerlik gösteren ve birçoğu birbirinden farklı olan birkaç hücre ölüm tipi vardır. Bunlar ise apoptoz, nekroz, nekroptoz, entoz, piroptoz, piron nekroz, ferroptoz, partanatoz, otofaji ve lizozoma bağlı hücre ölümüdür (85). Uzun yıllar boyunca, I/R ile hücre ölümünün yani nekrozun; inflamatuvar mediatörlerin ve toksik moleküller ile katabolik süreç ve mekanik hasar gibi dış faktörler tarafından meydana geldiği düşünülmüştür, fakat bu düşüncenin doğru olmasıyla birlikte hücrelerin apoptoz ve benzeri yollarla hücre sel sinyal mekanizmaları tarafından ölmek üzere programlanabileceği de artık kabul edilmektedir (86).

2.2.1.1. Kaspazlar

Kaspazlar, apoptoz da çeşitli görevlerde yer alan sistein proteaz ailesi enzimleridir (10). Kaspazlar, inaktif protein olarak sentezlenip çeşitli yollarla aktive edilir ve apoptoz veya apoptoz benzeri farklı hücre ölüm mekanizmalarında (örneğin piroptoz, nekroptoz, vb.) görev alır (11). Kaspazlar 3 grupta sınıflandırılır:

- Başlatıcı (Kaspaz-2,8,9,10) kaspazlar,
- Efektör (Kaspaz-3,6,7) kaspazlar,
- İnflamatuvar (Kaspaz-1,4,5,11,12,13,14) kaspazlar (12).



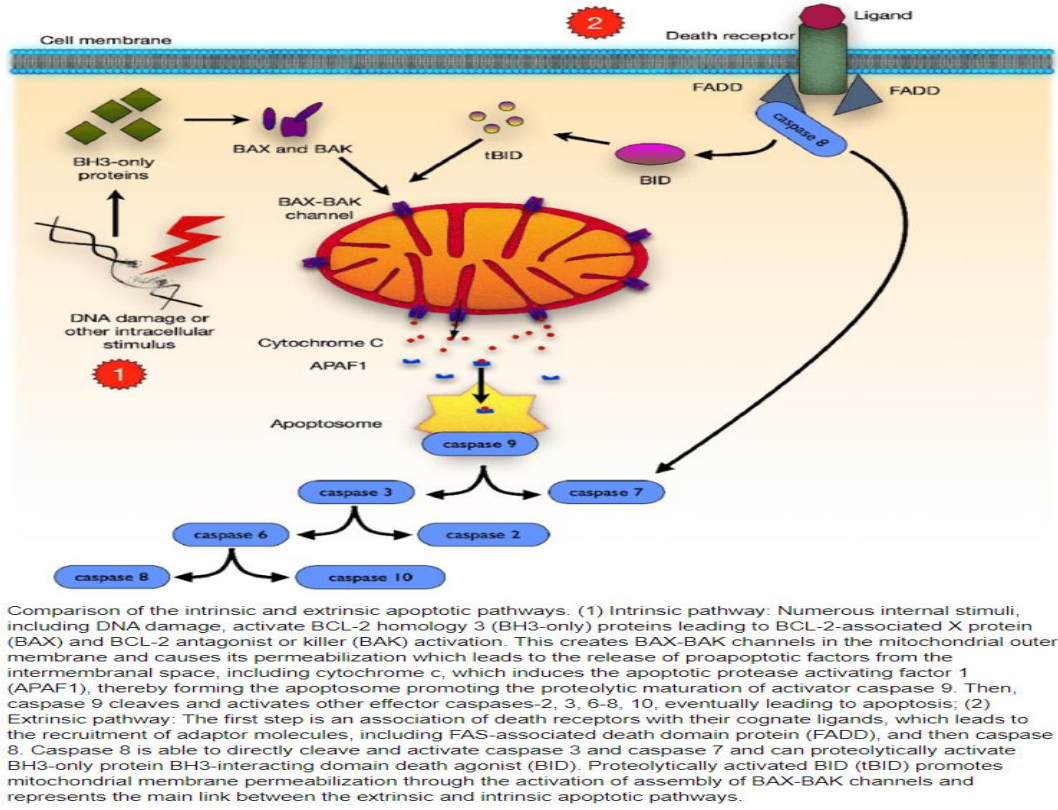
Şekil 3: Kaspazların sınıflaması (87)

2.2.1.2. Apoptoz

Apoptoz, hücre dışı veya hücre içi sinyaller yoluyla, hücrelerin düzenli bir şekilde yaşamının sonlandırılmasına neden olan karmaşık bir sinyalleşme kaskadı içeren programlanmış hücre ölümüdür (88). Apoptotik mekanizmalar “ekstrinsik” ve “intrinsik” olmak üzere iki farklı yolla kontrol edilir.

2.2.1.2.1. Ekstrinsik Yol

Ekstrinsik yol, Fas, TNFa ve TRAIL gibi ölüm sinyallerinin, ölüm reseptörlerine bağlanması ile aktive olur. Ortaya çıkan trimerik yapı, FADD ve TRADD gibi proteinlerin reseptörlerinin alt kısmına bağlanarak prokaspaz-8 ve prokaspaz-10 gibi kaspaz ailesi üyelerinin aktivasyonunu sağlar. Ölüm-indükleyici sinyal kompleksi (DISC)(Death-inducing signaling complex) sayesinde Kaspaz-8’in aktivasyonu sağlanır (89). Aktif Kaspaz-8, BID proteini üzerinden hücreyi intrinsek apoptoz’a yönlendirir (86,90).



Şekil 4: İntrensek ve ekstrinsek apoptoz mekanizmaları (91)

2.2.1.2.2. İntrensik Yol

İntrensik yol, I/R, ultraviyole ışınlar, toksik bileşikler veya oksidatif stres birikimi gibi sitotoksik uyaranlar sonucu, Bcl-2 protein ailesinden BAX ve BAK'ı indükler ve sonrasında dış mitokondriyal membrana bir mekanizma ile dış zarın geçirgenliğini artırır. Böylece membranlar arası boşluktan proapoptotik proteinlerin, özellikle de Sitokrom-C, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 ve Endonükleaz-G'nin (EndoG) salınmasını sağlar. Sitokrom-c, sitozolik protein olan APAF1'e bağlanır ve ortaya çıkan "Apoptozom", Kaspaz-9 ve Kaspaz-3 proteaz sistemini aktive eder. Smac/DIABLO ve Omi/HtrA2, sırasıyla kaspaz inhibe edici proteinleri ayırarak veya sindirerek kaspazları aktive ederken, EndoG DNA parçalanmasına aracılık eder (86,90).

2.2.1.3. Nekroz (Nekroptoz)

Nekroz veya nekroptoz, morfolojik olarak hücrelerin ve onları oluşturan organellerin şişmesi, daha sonra mitokondriyal disfonksiyon, hücre çekirdeğinin ve plazma zarının yırtılması ile karakterize durumdur (79). Daha önce nekroptozun, apoptozun (programlanmış hücre ölümü) aksine, aşırı strese tepki olarak hücrenin “kazayla” ölümüne yol açan rastgele, kontrolsüz bir süreç olarak meydana geldiğine inanılmaktaydı. Ancak, bugün nekroptozun I/R gibi koşullar altında gelişen programlanmış nekroz kavramı olduğu kabul görmektedir. Bu durum özellikle reseptör etkileşimli proteinler (RIP) (Receptor Interacting Protein) , RIP1 ve RIP3 aracılığıyla gerçekleşmektedir (89-91). RIP-1 ve 3’ün aktivasyonu, NADPH oksidazların aktivasyonuna ve artan mitokondriyal oksidan üretimine ve hücre içi Reaktif Oksijen Substratlarının (ROS) birikimine yol açmaktadır (94). Ayrıca, DNA onarım enzimi poli-ADP-riboz polimeraz-1 (PARP1) aktivasyonu ile bir sistein proteaz olan Kalpain aktivasyonu da gerçekleşmektedir. Her iki durumda da nekroptoz ile sonuçlanmaktadır (95,96).

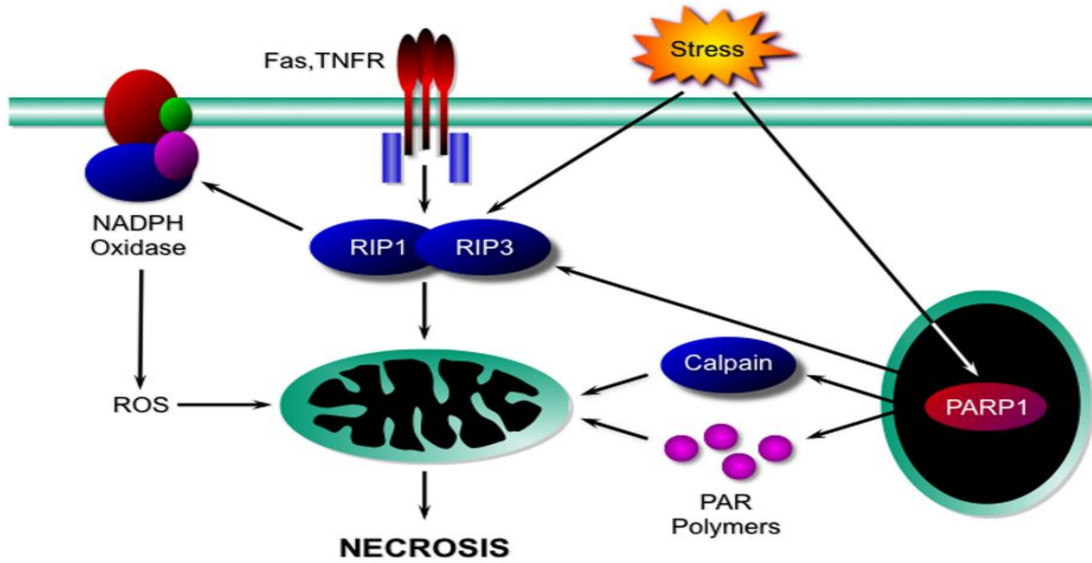


FIGURE 1 | Signaling components of the necrotic programme. Activation of death receptors such as Fas and TNFR, or cellular stresses, induces the interaction and activation of the kinases RIP1 and RIP3. These in turn affect mitochondria either directly, or indirectly through NADPH oxidase-derived ROS to induce necrosis. Necrotic death stimuli can also activate PARP1,

which can potentially induce necrosis either through activation of the RIP kinases, activation of calpains, or through the production of PAR polymers. TNFR, TNF α receptor; RIP, receptor interacting protein; ROS, reactive oxygen species; PAR, poly(ADP-ribose); PARP1, poly(ADP-ribose) polymerase-1.

Şekil 5: Nekroptozun mekanizması (97)

2.2.1.4. Kalpainler

Kalpainler, I/R hasarı ile indüklenen başka bir hedef proteinlerdir. Kalpain aktivitesi Kalpastatin olarak adlandırılan bir spesifik endojen inhibitör protein ve hücre içi Ca^{++} yükselmesiyle gerçekleşir. Prokalpain olarak bulunan formu, aktive olarak hücre iskeleti ve hücre içi organellerin parçalanmasına neden olur. Kalpain ailesinin en yaygın bilinen iki formu Kalpain-1 (μ -kalpain) ve Kalpain-2 (m-kalpain)'dir (94, 95).

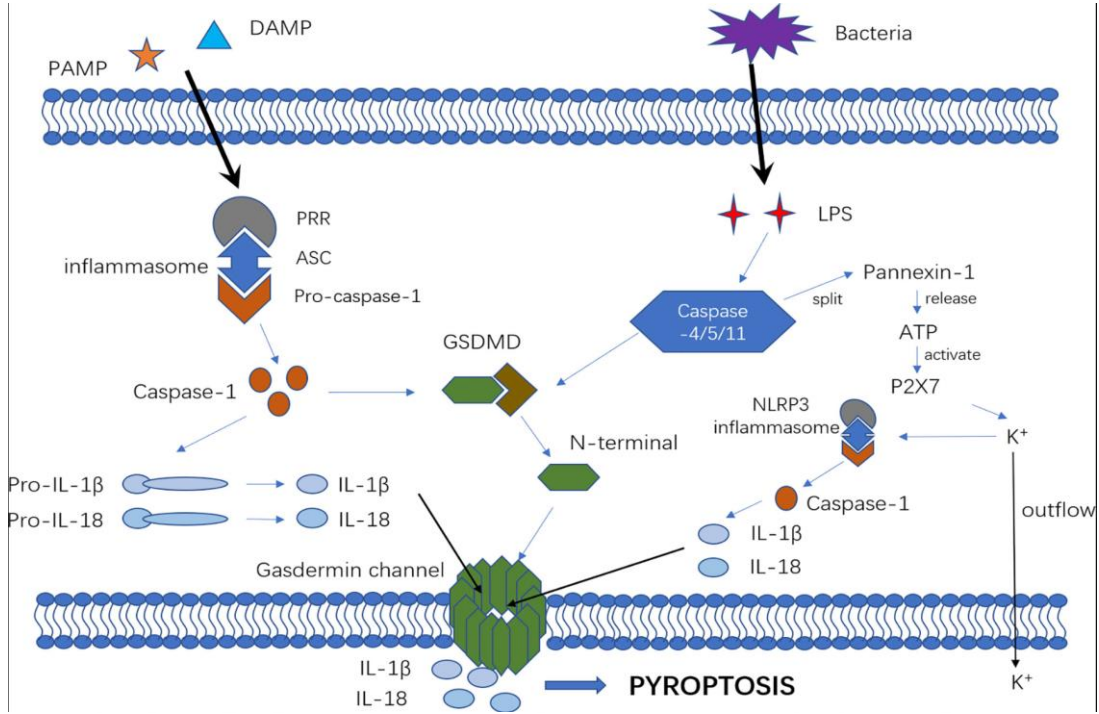
Kalpainlerin beyin, karaciğer, kalp ve proksimal renal tübülde hipoksik/iskemik hasarın mediyatörleri olduğu gösterilmiş olup, Alzheimer hastalığı, nörodejeneratif hastalıklar, kas distrofileri, trombosit fonksiyon bozuklukları gibi patolojik durumlarda da rol oynadığı bilinmektedir (95,96).

2.2.1.5. Piroptoz

Piroptoz, patojenik etkenin yaratmış olduğu etkilerle hücre içi ve hücre dışı dengenin bozulmasıyla oluşan düzenlenmiş bir hücre ölüm mekanizmalarından birisidir. Piroptoz geçiren hücreler, DNA hasarına, zarda ölü hücre boyamasına neden olan gözenek oluşumuna, hücre şişmesine, hücrede parçalanmaya ve hücre dışı boşluğa pro-inflamatuvar içeriğin salınmasına neden olur (100). Piroptoz oluşum mekanizmaları apoptoz mekanizmaları ile benzer özellikler taşısa da, Kaspaz-1 ve Gasdermin-D'ye (GSDMD) bağımlı mekanizmalarca yürütülmektedir (101). Ayrıca, piroptoz Kaspaz-3 ve Kaspaz-8 gibi klasik apoptotik kaspazları içermemektedir. Bunun yerine, aktive Kaspaz-1, nükleer bütünlük bozulmadan DNA bölünmesini ve nükleer yoğunlaşmayı indükleyen nükleazı aktive ederek görev yapar (102).

Piroptozda ki ölüm şekli, apoptozdan farklı olarak inflamatuvarıdır. Bu ölüm süreci güçlü inflamatuvar sitokin olan IL-1 ailesinin (özellikle IL-1 β) tetiklediği yüksek derecede inflamatuvar sitokinler sayesinde gerçekleşir. Piroptotik süreç Kaspaz-3 ile GSDMD'nin yanı sıra diğer Kaspaz (Örneğin insanda kaspaz-1,-4,-5) ve Gasdermin ailesinin diğer üyelerinin de dahil olduğu karmaşık bir olaylar zincirini içerir (103). Patojenler ve toksinlerinin neden olduğu ölüm sinyalleri, sitozolik model

tanıma reseptörleri (PRR) (Pattern Recognition Receptors) tarafından algılanır ve apoptozdakine benzer multimerik yüksek moleküler ağırlıklı kompleks “inflammasomlar” sayesinde Pro-kaspaz-1 aktive edilerek Piroptoz gerçekleştirilir (103,104).



Şekil 6: Piroptozun mekanizması (105)

2.3. İNFLAMASYON VE İNTERLÖKİNLER

Doğal bağışıklığın ve adaptif bağışıklığın önemli bir modülatörü olan İnterlökin-1 (IL-1) sitokin ailesi, konağın enfeksiyon ve inflamatuvar hasara karşı cevabında önemli bir rol oynamaktadır. IL-1 ailesi, IL-1 α , 1 β , 1R, 18 ve 33 ayrıca hem IL-1 β 'nın hem de IL-18'in inflamatuvar yanıtı aracılık ettiği IL-36 ve 37'yi içermektedir (106). IL-1 β , bilinen en güçlü proinflamatuvar sitokinlerden birisidir. Başta doku makrofajları olmak üzere dentritik hücreler, kandaki mononükleer hücreler, nötrofiller, B-lenfositler ve Natural Killer hücreleri tarafından üretilir (107). Nötrofillerin inflamatuvar bölgelere hızlı göçü, endotelial adezyon moleküllerinin aktivasyonu, sitokinlerin ve kemokinlerin indüksiyonu ve Th17 yanıtı gibi spesifik immün yanıtların uyarılması dahil olmak üzere akut enfeksiyonda açıkça koruyucu bir etkiye sahiptir (108).

Gram negatif bakterilere ait olan lipopolisakkaritler (LPS), pro-IL-1 β ve pro-IL-18 üretimini uyarmaktadır. IL-1 β 'nin öncüsü olan pro-IL-1 β 'nin IL-1 β 'ye dönüşümü Kaspaz-1 tarafından gerçekleştirilir. Kaspaz-1 bu görevinin yanı sıra IL-18'inde aktivasyonunu da sağlar (109). Enfeksiyon durumunda, piroptozun gerçekleşmesi aktive olmuş IL-1 β ve IL-18 sayesinde olur. Bu bakımdan, Piroptozun ve/veya inflamasyonun kaspaz ve IL ailesi ile yakından ilişkili olduğu görülmektedir (110,111).

2.4. OKSİDATİF STRESS

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren ve bağımsız olarak var olma yeteneğine sahip, oldukça reaktif atom ve/veya moleküller olarak tanımlanabilir (112). Bu radikaller, tek bir elektronu kaybederek veya kabul ederek oksidan veya indirgeyici olarak hareket eden oksijen (ROS) ve azotun (RNS) reaktif radikal ve radikal olmayan türevlerini içerir (Tablo 2) (113).

Tablo 2: Serbest radikaller

Oksijen Kaynaklı Serbest Radikaller		Oksijen Kaynaklı Olmayan Serbest Radikaller
Radikaller	Radikal Olmayanlar	
Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$)	Singlet oksijen (1O_2)	1.Karbon kaynaklı serbest radikaller: Triklor metil (CCl)
Hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)	2.Sülfür kaynaklı serbest radikaller : Thiyl ($RS^{\bullet}$) radikali
Peroksil radikali ($ROO^{\bullet}$)	Peroksinitrit ($OCCO^{\bullet}$)	3.Nitrojen kaynaklı serbest radikaller: Fenildiazin ($C_6H_2N:N$)
Nitrik oksit radikali ($NO^{\bullet}$)		4.Geçiş metal kompleksleri: Fe^{+3}/Fe^{+2} , Cu^{+3}/Cu^{+2}
Alkoksi radikali ($RO^{\bullet}$)		

Normalde organizmada oksidan ve antioksidan mekanizmalar arasında bir denge bulunmaktadır (114). Oksidatif stres, hücrel oksidan ürünlerinin arttığı duruma denmektedir. I/R, inflamasyon gibi durumlarda ortaya çıkmaktadır. Özellikle reperfüzyon sırasında, hücrel oksijenin aniden geri kazanılması nedeniyle aşırı

miktarda ROS üretimi gerçekleşir ve biriken ROS ürünleri hücrenin protein, lipid ve DNA içeren yapılarına ciddi hasar vererek hücrelerde apoptoza ve nekroza yol açar (115).

2.4.1. Nitrik Oksit

Nitrik Oksit (NO), hücrel redoks dengesindeki bir diğer önemli fonksiyonu olan bir radikaldir. Bunun yanı sıra nörotransmitter (sinyal iletimi), vazodilatasyon ve düz kas relaksasyonu gibi başka görevleri de vardır (116). Memelilerde NO sentezi, Nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından L-arginin üzerinden gerçekleştirilir. NO sentezi sırasında moleküler oksijen ve indirgenmiş Nikotinamid-Adenin-Dinükleotit fosfat (NADPH) kullanılmaktadır. NO'nın süperoksit radikali ile reaksiyonu (O_2^-) sonucu güçlü bir oksidan olan Peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşmaktadır. Bu bileşik hücrede oksidatif hasara; proteinler, lipidler ve DNA dahil olmak üzere tüm hücrel yapılarda yıkıma neden olmaktadır (117).

2.4.2. Malondialdehit

Lipid peroksidasyonunu etkileyen en yaygın iki ROS türü vardır. Bunlar, Hidroksil radikali (H_2O^-) ve Hidroperoksildir (H_2O_2). Hidroksil radikali, kimyasal olarak en reaktif aktif oksijen türü olarak bilinmektedir (118). Lipid peroksidasyonu sırasında çok çeşitli primer ve sekonder oksidasyon ürünü ortaya çıkar. Bu ürünler içinde en çok bilinen primer ürün Lipid hidroperoksit (LOOH) iken, sekonder ürünler ise Malondialdehit (MDA), Propanal ve Heksanaldır. MDA, lipid peroksidasyonunun en mutajenik ürünü olup, özellikle oksidatif stresi gösteren en önemli biyobelirteçlerden birisidir (119).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMANIN DİZAYNI

Bu çalışma, Kırıkkale Üniversitesi Hüseyin Aytemiz Deneysel Hayvan Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Etik onam, Kırıkkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan (Tarih: 08.10.2021, Proje no: 2021/093) alındı. Çalışma sırasında Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Kılavuzuna sıkıca bağlı kalındı. Çalışmaya ağırlıkları 250-350 gr arasında değişen 40 adet erkek cinsiyette Albino-Wistar rat dahil edildi. Ratlar, rastgele seçimle her bir grupta 8'er rat olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. Gruplar şu şekilde tanımlandı:

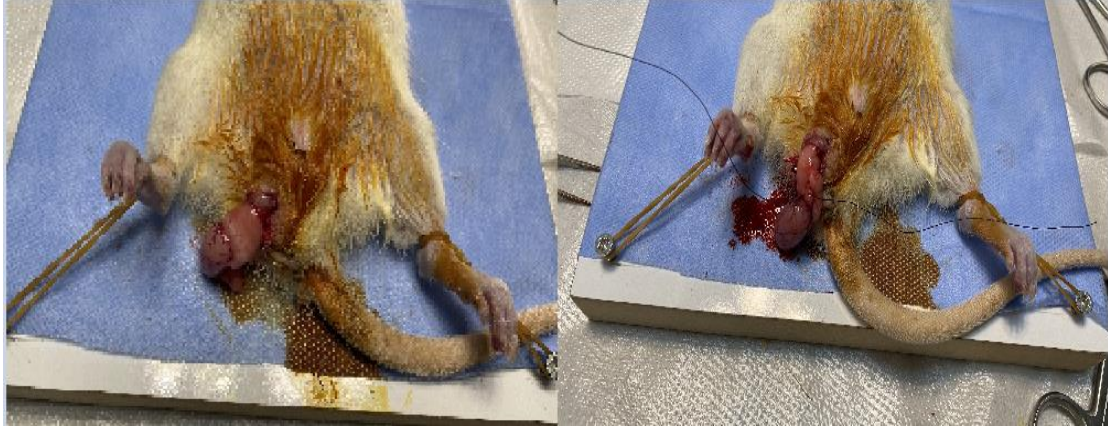
- **Grup-1:** 2 saatlik testis torsiyonu oluşturulan grup,
- **Grup-2:** 6 saatlik testis torsiyonu oluşturulan grup,
- **Grup-3:** 24 saatlik testis torsiyonu oluşturulan grup,
- **Grup-4:** Orşit oluşturulan grup,
- **Grup-5:** Kontrol grubu (sham).

3.1.1. Deney Modeli

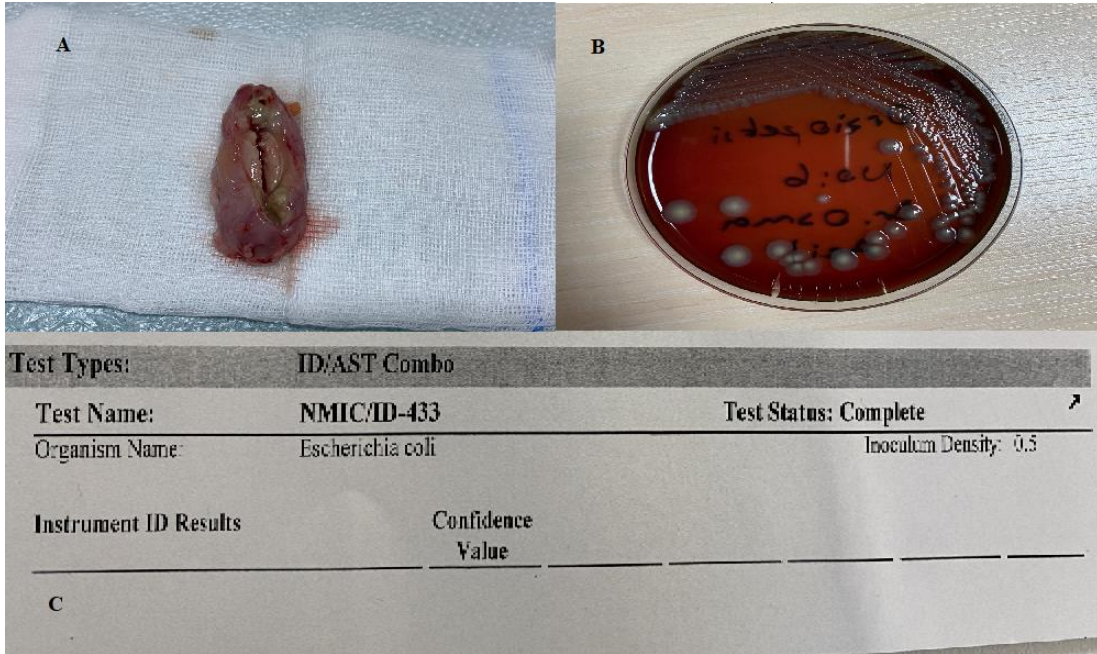
Ratlar temin edildikten sonra, 22-24°C oda sıcaklığında 15 günlük oryantasyon sürecinde kafeslerinde bekletildi. Bu süreç boyunca ratların su ve gıda alımlarına izin verilip, 12 saatlik gündüz ve gece siklusları ile %50-60 oranında nemlendirilen bir ortamda çevre şartlarına uyumları sağlandı. Cerrahi prosedürden 8 saat önce, gıdaya erişimleri kısıtlandı ve sadece sıvı ihtiyaçlarını karşılayacak kadar su almalarına izin verildi.

Grup 1'deki ratlar 8 saatlik açlığın ardından kişisel kafeslerinden çıkarıldı, deneklere cerrahi girişim öncesi 10 mg/kg dozunda Xylazin (Rompun, Bayer, Türkiye) ve 90 mg/kg dozunda Ketamin (Ketalar, Eczacıbaşı Lambert, İstanbul, Türkiye), intraperitoneal uygulanarak genel anestezi sağlandı. Daha sonra Abdomen duvarı orta hatta ve genital bölge %10'luk povidon iyot çözeltisi ile temizlendi.

Deneklere skrotumdan, 2 cm uzunluğunda cilt ve cilt altı kesisi uygulanarak, spermatik kord ve testise ulaşıldı. Daha sonra spermatik kord ekleriyle birlikte 720° çevirilerek torsiyone edildi ve 2 saat boyunca klemplendi. İki saatlik sürenin tamamlanmasından sonra ratların kan ve doku (Testis) örneği, alındı. Grup 2'deki ratlara da aynı deney ve sedasyon prosedürü uygulandı ve spermatik kord ekleriyle birlikte 720° çevirilerek torsiyone edilip, 6 saat boyunca klemplenerek takip edildi. Altı saatlik sürenin tamamlanmasından sonra ratların kan ve doku (Testis) örneği, alındı. Grup-3'deki ratlara aynı deney ve sedasyon prosedürü uygulanarak spermatik kord ekleriyle birlikte 720° çevirilerek torsiyone edildi ve 24 saat boyunca klemplendi. Bu gruptaki ratların cildi, torsiyon işlemi sonrası 3.0 vicryl ile kapatıldı ve ratlar kişisel kafesinde takibe alındı. Yirmidört saatlik sürenin tamamlanmasından sonra kan ve doku örnekleri alındı. Grup-4'deki ratlara aynı deney ve sedasyon prosedürü uygulandı. Skrotumdan 2 cm uzunluğunda cilt ve cilt altı kesisi uygulanarak spermatik kord ve testise ulaşıldı. Daha önceden laboratuvar şartlarında üretilen 0.1 ml 10⁶ cfu/ml'lik üropatojenik *E.Coli* ratların sol testisine enjekte edildi. Bu prosedürdeki *E.Coli* suşunun miktarı Demir ve ark. tarafından tariflenen metoda göre yapıldı (120). İşlem sonrası cilt 3.0 vicryl ile kapatılarak, ratlar kişisel kafeslerine kondu. Ratların günlük testis muayenesi yapıldı ve Orşit bulguları (Eritem, şişlik ve ısı artışı) takip edildi. Ortalama 3. gün ile 10. gün arasında orşit olduğu gözlenen çalışmaları kriter olarak alındı (121–123). Orşit oluşumu sonrası yukarıda tarif edilen anestezi, sterilizasyon ve işlem prosedürü tekrarlandı ve ratların kan ve testis doku örneği alındı. Grup-5'deki ratlara aynı deney ve sedasyon prosedürü uygulandı. Bu grup kontrol grubu olacağından, deneklere skrotumdan, 2 cm uzunluğunda cilt ve cilt altı kesisi uygulandı ve daha sonra hiçbir işlem uygulanmadan cilt 3.0 vicryl ile kapatıldı. Tüm gruptaki ratlar, deney modeli tamamlandıktan sonra genel anestezi altında sakrifiye edildi. Alınan kan ve doku örnekleri uygun koşullarda saklanarak Biyokimya ve Patoloji laboratuvarına teslim edildi.



Şekil 7: Çalışma prosedürünün fotoğrafları



Şekil 8: Testis dokusunda orşit oluşturulması 8A: Enfekte testis dokusunun makroskopik görünümü 8B: Besiyerinde üreyen *E.Coli* görüntüsü 8C: Kültür sonucu

3.2. HİSTOPATOLOJİK VE BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

3.2.1. Biyokimyasal Değerlendirme

Alınan kan örnekleri 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek, serum kısmı ayrıştırıldı. Alınan serum örnekleri -80°C'de muhafaza edildi. Deneyin yapılacağı günde tüm örnekler aynı anda çözöldü ve serum örneklerinden Kalpain-1, Kaspaz-1,

IL-1 β (Shanghai Sunred Biological Technology Co. LOT: 202112) Kaspaz-8 (Cloud-Clone Corp. LOT: L211220048) düzeyi double-antibody sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELİSA) testi ile çalışıldı.

Kalpain-1 analizi: Numunelerdeki Kalpain-1 seviyesini test etmek için double-antibody sandwich ELİSA testi kullanıldı. Rat Kalpain-1 monoklonal antikoru ile önceden kaplanmış monoklonal antikor enzim kuyusuna numuneler eklenmiştir. Daha sonra biyotin ile etiketlenmiş Kalpain-1 antikoru ve immunkompleks oluşturmak için Streptavidin-HRP eklenip 60 dakika 37 °C’de inkübe edildi. Sonra kromojen solüsyon A ve kromojen solüsyon B eklenip 37 °C’de 10 dakika inkübe edildi. 15 dakika içinde stop solüsyonu eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Renk değişikliği, 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Standart grafiğinden faydalanılarak örneklerdeki Kalpain-1 konsantrasyonu belirlendi. Elde edilen sonuçlarda Kalpain-1 düzeyi “ng/ml” birimi olarak verildi.

Kaspaz-1 analizi: Numunelerdeki Kaspaz-1 seviyesini test etmek için double-antibody sandwich ELİSA testi kullanıldı. Rat Kaspaz-1 monoklonal antikoru ile önceden kaplanmış monoklonal antikor enzim kuyusuna numuneler eklenmiştir. Daha sonra biyotin ile etiketlenmiş Kaspaz-1 antikoru ve immunkompleks oluşturmak için Streptavidin-HRP eklenip 60 dakika 37 °C’de inkübe edildi. Sonra kromojen solüsyon A ve kromojen solüsyon B eklenip 37 °C’de 10 dakika inkübe edildi. 15 dakika içinde stop solüsyonu eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Renk değişikliği, 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Standart grafiğinden faydalanılarak örneklerdeki Kaspaz-1 konsantrasyonu belirlendi. Elde edilen sonuçlarda Kaspaz-1 düzeyi “ng/ml” birimi olarak verildi.

Kaspaz-8 analizi: Numunelerdeki Kaspaz-8 seviyesini test etmek için double-antibody sandwich ELİSA testi kullanıldı. Rat Kaspaz-8 monoklonal antikoru ile önceden kaplanmış monoklonal antikor enzim kuyusuna numuneler eklenmiştir. Daha sonra biyotin ile etiketlenmiş Kaspaz-8 antikoru ve sonrasında Horseradish Peroxidase (HRP) ile konjuge Avidin eklenerek 37 °C’de 30 dakika inkübe edildi. Sonra TMB substrat solüsyonu eklenip 37 °C’de 10-20 dakika inkübe edildi. 15 dakika içinde stop solüsyonu eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Renk değişikliği, 450

nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Standart grafiğinden faydalanılarak örneklerdeki Kaspaz-8 konsantrasyonu belirlendi. Elde edilen sonuçlarda Kaspaz-8 düzeyi “ng/ml” birimi olarak verildi.

IL-1 β analizi: Numunelerdeki IL-1 β seviyesini test etmek için double-antibody sandwich ELİSA testi kullanıldı. Rat IL-1 β monoklonal antikoruna ile önceden kaplanmış monoklonal antikor enzim kuyusuna numuneler eklendi. Daha sonra biyotin ile etiketlenmiş IL-1 β antikoruna ve immunkompleks oluşturmak için Streptavidin-HRP eklenip 60 dakika 37 °C’de inkübe edildi. Sonra kromojen solüsyon A ve kromojen solüsyon B eklenip 37 °C’de 10 dakika inkübe edildi. 15 dakika içinde stop solüsyonu eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Renk değişikliği, 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Standart grafiğinden faydalanılarak örneklerdeki IL-1 β konsantrasyonu belirlendi. Elde edilen sonuçlarda IL-1 β düzeyi “pg/L” birimi olarak verildi.

Nitrik oksit ve Malondialdehit analizi: Tüm doku örnekleri normal %0.9’luk salin ile yıkandı ve -80°C’de saklandı. Sonrasında dokular 1 mL normal salin ile homojenize edildi. Homojenize dokular 1500 rpm ve 4°C’de 10 dakika süreyle santrifüje edildi ve süpernatantlar MDA, total nitrit/nitrat düzeylerini belirlemek için kullanıldı. Bu prosedürdeki protein tayinleri Lowry ve ark. tarafından tariflenen metoda göre yapıldı (124). Dokulardaki oksidatif hasara bağlı gelişen lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA seviyeleri Armstrong ve Al-Awadi tarafından tanımlanan yöntemle ölçüldü (125). Kalibrasyon eğrisi 1-25 nmol/L dilüsyonunun 1,1,3,3 tetraetoksipropan standartları kullanılarak hazırlandı. Sonuçlar “ μ M/mg” protein cinsinden ifade edildi. Akut oksidatif hasarın göstergesi olarak ayrıca NO da kullanıldı. NO seviyeleri Miranda ve ark. tarafından tarif edilen spektrofotometrik yöntemle göre ölçüldü (126). Nitrat, vanadium ile nitrite indirgendi ve nitrit seviyeleri Griess reaktifleri kullanılarak ölçüldü. Bu sonuç örneklerde bulunan toplam nitrat ve nitrit miktarını yansıttı. Standart olarak sodyumnitratlı seri dilüsyonları kullanıldı. Sonuçlar “ μ M/mg” cinsinden ifade edildi.

3.2.2. Histopatolojik Değerlendirme

Doku histopatolojisini değerlendirmek amacıyla sağlam testis, torsiyone testis ve orşit oluşturulmuş testis dokuları alındı. Histopatolojik numuneler %10'luk formaldehit solüsyonu içinde sabitlenerek, patoloji bölümüne teslim edildi. Histopatolojik inceleme için, parafine gömülen bloklar 4 mikron kalınlığında kesilerek Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyandı. Boyanan preparatların patolojik değerlendirmesi, uzman patolog tarafından Nikon-Eclipse Ni ışık mikroskobu kullanılarak gerçekleştirildi. Histopatolojik değerlendirmede testis dokularında inflamasyon, ödem, konjesyon, hemoraji ve fibrozis varlığına dayalı skorlamaya (0=yok, 1=hafif, 2=orta, 3=şiddetli) ve spermatogenez varlığına (0=yok, 1=var) göre yapıldı.



Şekil 9: Deney gruplarındaki rat testislerinin makroskobik görüntüleri 9A. Kontrol grubu 9B. Testis torsiyonu 2 saatlik 9C. Testis torsiyonu 6 saatlik 9D. Testis torsiyonu 24 saatlik 9E. Orşit grubu

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Elde edilen verilerin, istatistiksel analizi SPSS for Windows 21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) ile yapıldı. Verilerin normallik analizinde Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Biyokimyasal veriler Ortalama (Ort) ve Standart sapma ($\pm$ SS) şeklinde ifade edildi. Gruplar arası biyokimyasal verilerin karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Student-t testi kullanıldı. Histopatolojik bulgular Mann-Whitney U testi ile spermatogenez varlığı ise Chi-square testi kullanılarak karşılaştırıldı. Sonuçlar %95’lik güven aralığında verildi ve $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

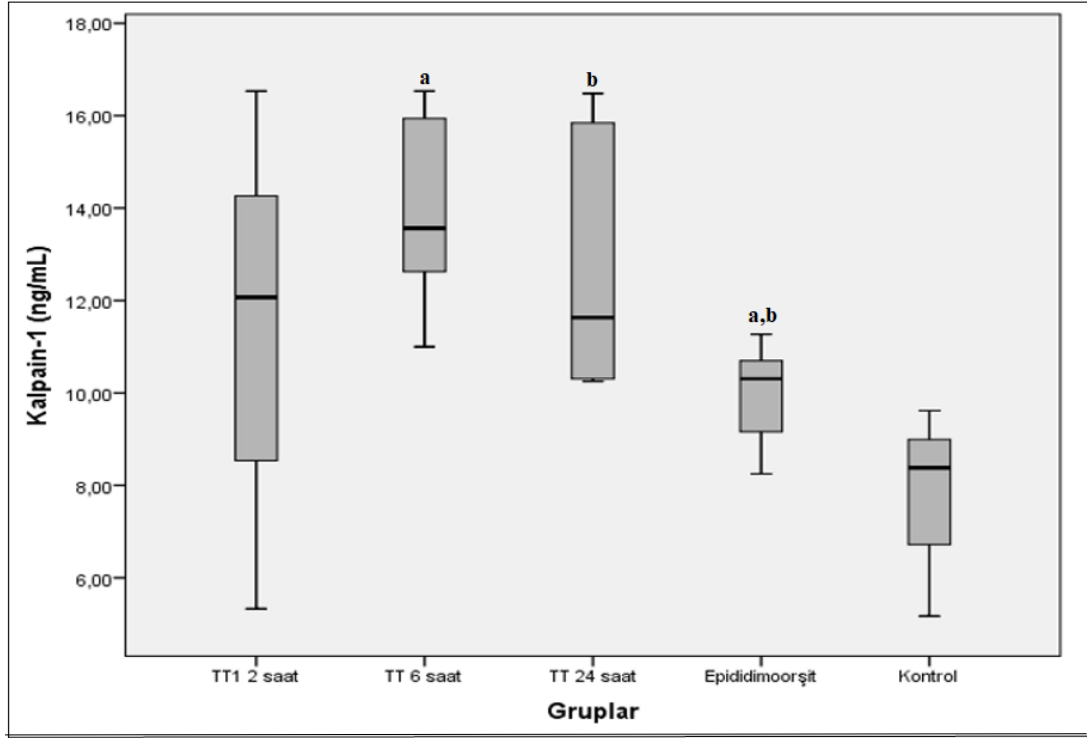
4.1. BİYOKİMYASAL SONUÇLARIN ANALİZİ

Kalpain-1 sonuçlarının değerlendirilmesi: Gruplar arasında en yüksek Kalpain-1 düzeyi Grup-2’de (13.97 ± 2.01) tespit edildi. Kalpain-1 düzeyi bakımından gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu saptandı ($p<0.001$, ANOVA). Deney gruplarının (TT ve Orşit) Kalpain-1 düzeyi, Kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksekti (Sırasıyla Grup-1 vs Grup-5, $p=0.030$; Grup-2 vs Grup-5, $p<0.001$; Grup-3 vs Grup-5, $p=0.001$; Grup-4 vs Grup-5, $p=0.006$). 6 saatlik ve 24 saatlik TT oluşturulan gruplardaki Kalpain-1 düzeyi, Orşit oluşturulan Grup-4’teki Kalpain-1 düzeyinden anlamlı olarak daha yüksekti (Sırasıyla Grup-2 vs Grup-4, $^ap<0.001$; Grup-3 vs Grup-4, $^bp=0.019$) (Tablo 3 Şekil 10).

Tablo 3: Çalışma gruplarının Kalpain-1 sonuçlarının karşılaştırılması

	Grup-1 (TT ₂) n=8	Grup-2 (TT ₆) n=8	Grup-3 (TT ₂₄) n=8	Grup-4 (EO) n=8	Grup-5 (K) n=8
	Ort $\pm$ SS (min- maks)	Ort $\pm$ SS (min-maks)	Ort $\pm$ SS (min-maks)	Ort $\pm$ SS (min-maks)	Ort $\pm$ SS (min-maks)
Kalpain-1	11.45 $\pm$ 3.90 (5.33- 16.53)	13.97$\pm$2.01^a (11.0-16.53)	12.78 $\pm$ 2.82 ^b (10.25-16.48)	9.98 $\pm$ 1.04 ^{a,b} (8.25-11.27)	7.87 $\pm$ 1.52 (5.17- 9.62)

TT₂, 2 saatlik testis torsiyonu; TT₆, 6 saatlik testis torsiyonu; TT₂₄, 24 saatlik testis torsiyonu; EO, Epididimoorşit, K, Kontrol (^a $p<0.001$; ^b $p=0.019$).



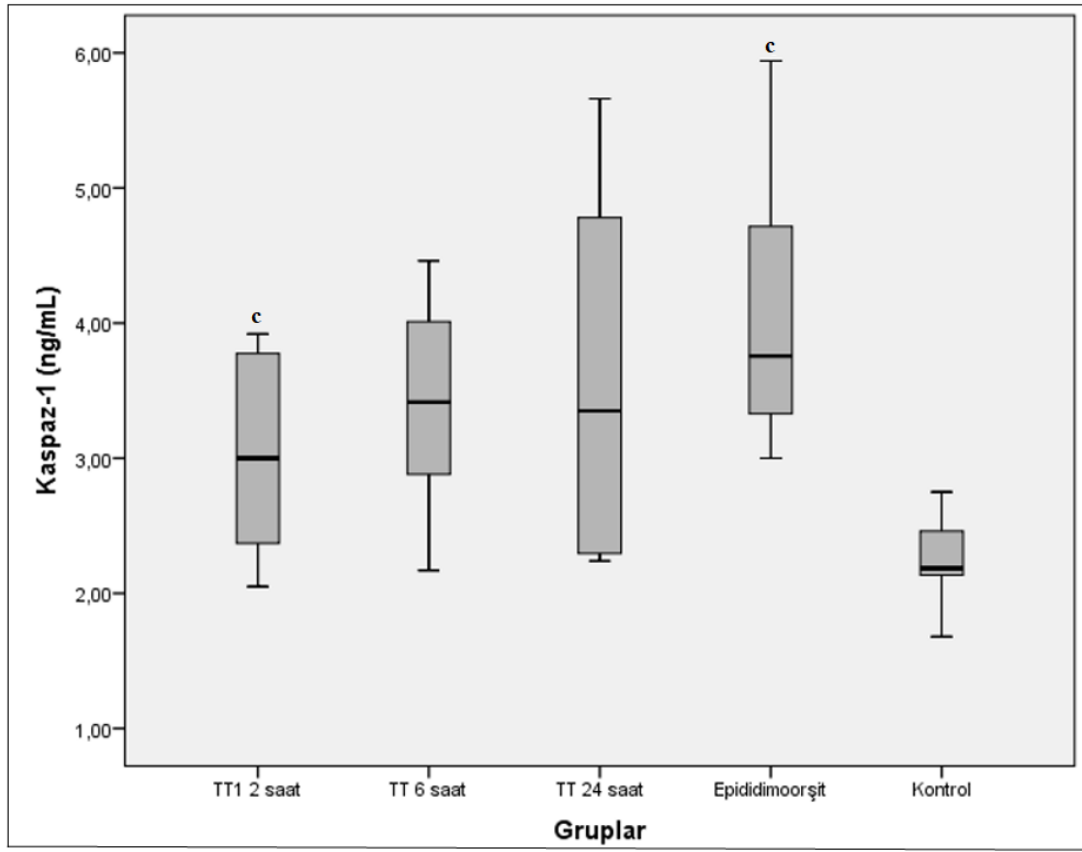
Şekil 10: Gruplardaki Kalpain-1 sonuçlarının grafiksel karşılaştırılması

Kaspaz-1 sonuçlarının değerlendirilmesi: Gruplar arasında en yüksek Kaspaz-1 düzeyi Grup-4'te (4.07 ± 0.99) tespit edildi. Kaspaz-1 düzeyi bakımından gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu saptandı ($p=0.005$, ANOVA). Deney gruplarının (TT ve Orşit), Kaspaz-1 düzeyi Kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksekti (Sırasıyla Grup-1 vs Grup-5, $p=0.016$; Grup-2 vs Grup-5, $p=0.001$; Grup-3 vs Grup-5, $p=0.018$; Grup-4 vs Grup-5, $p<0.001$). Orşit oluşturulan Grup-4'teki Kaspaz-1 düzeyi, 2 saatlik TT oluşturulan gruptaki Kaspaz-1 düzeyinden anlamlı olarak daha yüksekti (Grup-1 vs Grup-4, $p=0.034$) (Tablo 4, Şekil 11).

Tablo 4: Çalışma gruplarının Kaspaz-1 sonuçlarının karşılaştırılması

	Grup-1 (TT ₂) n=8	Grup-2 (TT ₆) n=8	Grup-3 (TT ₂₄) n=8	Grup-4 (EO) n=8	Grup-5 (K) n=8
	Ort ± SS (min-maks)	Ort ± SS (min-maks)	Ort ± SS (min-maks)	Ort ± SS (min-maks)	Ort ± SS (min-maks)
Kaspaz-1	3.03 ± 0.74^c (2.05-3.92)	3.40 ± 0.77 (2.17-4.46)	3.59 ± 1.38 (2.24-5.66)	4.07 ± 0.99^c (3.00-5.94)	2.24 ± 0.31 (1.68-2.75)

TT₂, 2 saatlik testis torsiyonu; TT₆, 6 saatlik testis torsiyonu; TT₂₄, 24 saatlik testis torsiyonu; EO, Epididimoorşit, K, Kontrol ($p=0.034$).



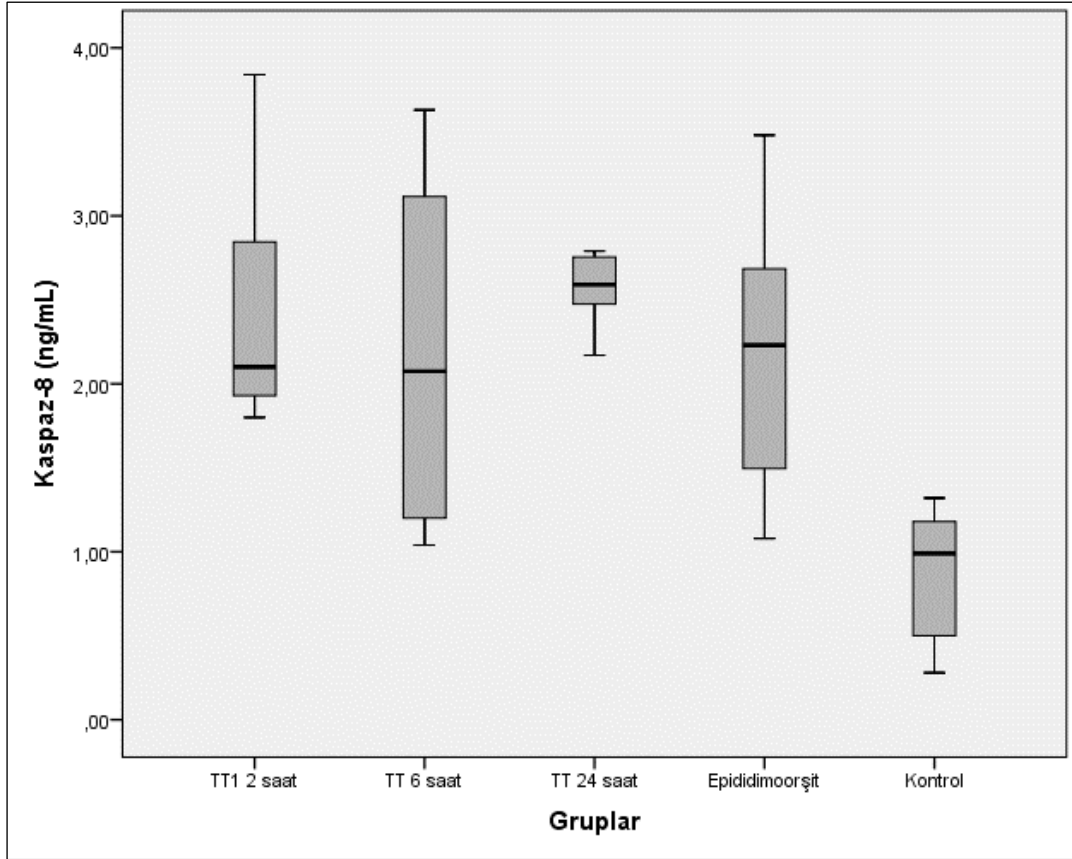
Şekil 11: Gruplardaki Kaspaz-1 sonuçlarının grafiksel karşılaştırılması

Kaspaz-8 sonuçlarının değerlendirilmesi: Gruplar arasında en yüksek Kaspaz-8 düzeyi Grup-3'te (2.57 ± 0.88) tespit edildi. Kaspaz-8 düzeyi bakımından gruplar arasında anlamlı farklılık yoktu ($p=0.532$, ANOVA). Tüm deney gruplarının (TT ve Orşit) Kaspaz-8 düzeyi, Kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksekti (Sırasıyla Grup-1 vs Grup-5, $p<0.001$; Grup-2 vs Grup-5, $p=0.005$; Grup-3 vs Grup-5, $p<0.001$; Grup-4 vs Grup-5, $p=0.001$). TT ve Orşit grupları arasında Kaspaz-8 düzeyi bakımından farklılık saptanmadı (Tablo 5, Şekil 12).

Tablo 5: Çalışma gruplarının Kaspaz-8 sonuçlarının karşılaştırılması

	Grup-1 (TT ₂) n=8	Grup-2 (TT ₆) n=8	Grup-3 (TT ₂₄) n=8	Grup-4 (EO) n=8	Grup-5 (K) n=8
	Ort ± SS (min-maks)	Ort ± SS (min-maks)	Ort ± SS (min-maks)	Ort ± SS (min-maks)	Ort ± SS (min-maks)
Kaspaz-8	2.42 ± 0.72 (1.80-3.84)	2.18 ± 1.03 (1.04-3.63)	2.57 ± 0.88 (1.83-4.59)	2.17 ± 0.82 (1.08-3.48)	0.87 ± 0.39 (0.28-1.32)

TT₂, 2 saatlik testis torsiyonu; TT₆, 6 saatlik testis torsiyonu; TT₂₄, 24 saatlik testis torsiyonu; EO, Epididimoorşit, K, Kontrol.



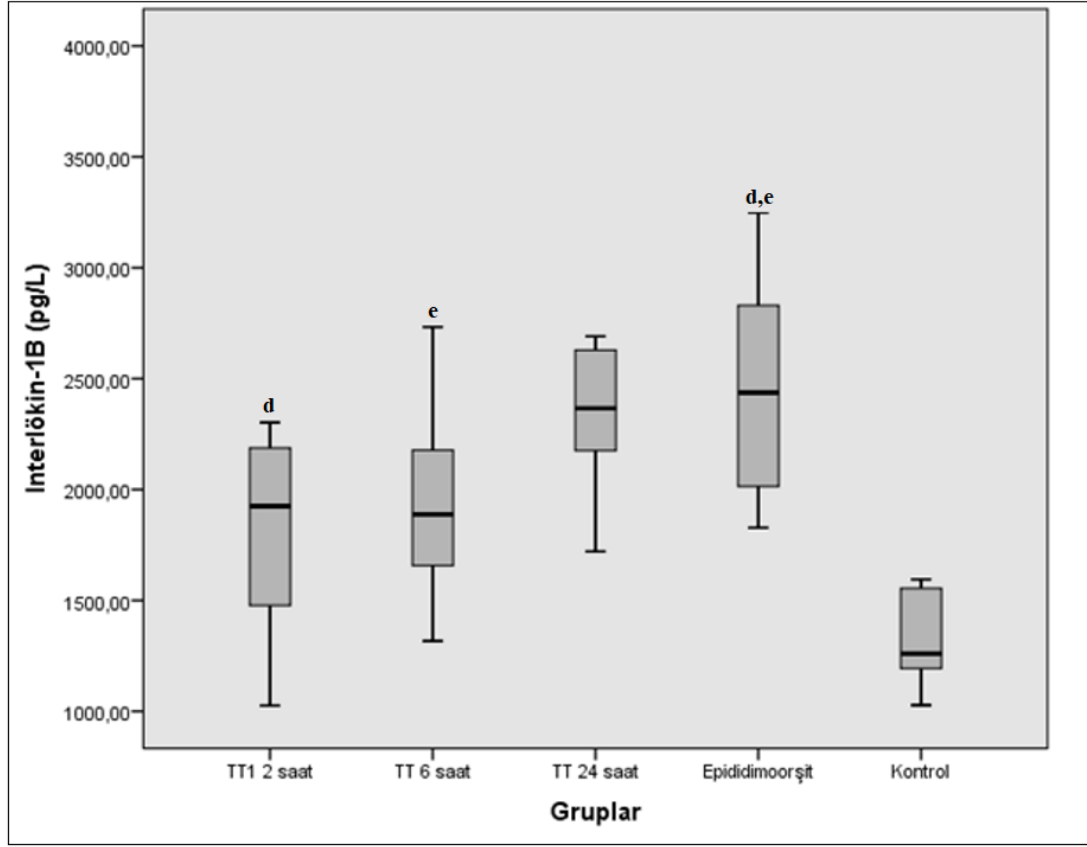
Şekil 12: Gruplardaki Kaspaz-8 sonuçlarının grafiksel karşılaştırılması

IL-1 β sonuçlarının değerlendirilmesi: Gruplar arasında en yüksek IL-1 β düzeyi, Grup-3'te (2480.63 ± 605.82) tespit edildi. IL-1 β düzeyi bakımından gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu saptandı ($p < 0.001$, ANOVA). Deney gruplarının (TT ve Orşit) IL-1 β düzeyi Kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksekti (Sırasıyla Grup-1 vs Grup-5, $p = 0.018$; Grup-2 vs Grup-5, $p = 0.003$; Grup-3 vs Grup-5, $p < 0.001$; Grup-4 vs Grup-5, $p < 0.001$). Orşit oluşturulan Grup-4'teki IL-1 β düzeyi, 2 saatlik ve 6 saatlik TT oluşturulan gruplardaki IL-1 β düzeyinden anlamlı olarak daha yüksekti (Sırasıyla Grup-1 vs Grup-4, $p = 0.020^d$; Grup-2 vs Grup-4, $p = 0.048^e$) (Tablo 6, Şekil 13).

Tablo 6: Çalışma gruplarının IL-1 β sonuçlarının karşılaştırılması

	Grup-1 (TT ₂) n=8	Grup-2 (TT ₆) n=8	Grup-3 (TT ₂₄) n=8	Grup-4 (EO) n=8	Grup-5 (K) n=8
	Ort $\pm$ SS (min-maks)	Ort $\pm$ SS (min-maks)	Ort $\pm$ SS (min-maks)	Ort $\pm$ SS (min-maks)	Ort $\pm$ SS (min-maks)
IL-1β	1813.38 ± 464.30^d (1026-2302)	1937.0 ± 440.88^e (1317-2733)	2480.63 ± 605.82 (1721-3784)	$2454.63 \pm 511.88^{d,e}$ (1828-3246)	1330.0 ± 210.92 (1028-1595)

IL-1 β , İnterlökin-1Beta, TT₂, 2 saatlik testis torsiyonu; TT₆, 6 saatlik testis torsiyonu; TT₂₄, 24 saatlik testis torsiyonu; EO, Epididimoorşit, K, Kontrol (^dp=0.020; ^ep=0.048).



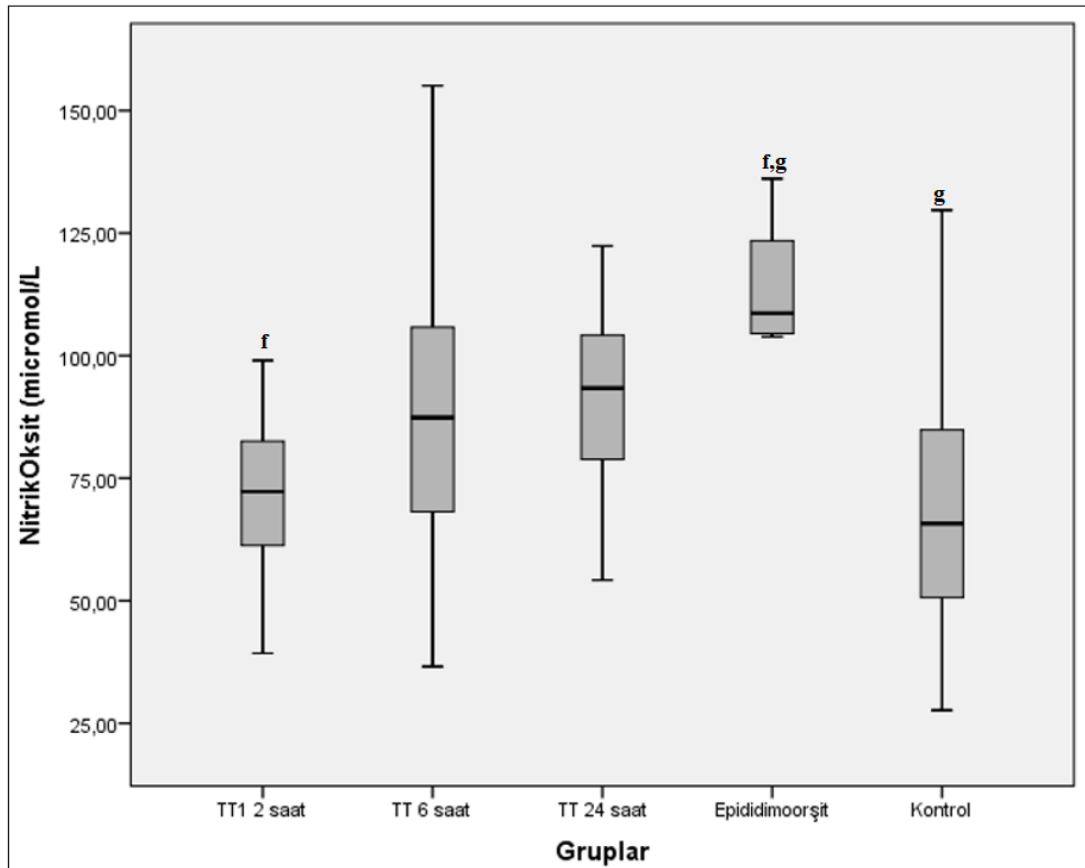
Şekil 13: Gruplardaki IL-1 β sonuçlarının grafiksel karşılaştırılması

NO sonuçlarının değerlendirilmesi: Gruplar arasında en yüksek NO düzeyi (110.54 $\pm$ 18.25) Grup-4'te idi. NO düzeyi bakımından gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu saptandı (p=0.021, ANOVA). Orşit oluşturulan Grup-4'teki NO düzeyi hem 2 saat TT olan Grup-1'den hem de Kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksekti (Sırasıyla Grup-1 vs Grup-4, p^f=0.001; Grup-4 vs Grup-5, p^g=0.007) (Tablo 7, Şekil 14).

Tablo 7: Çalışma gruplarının NO sonuçlarının karşılaştırılması

	Grup-1 (TT ₂) n=8	Grup-2 (TT ₆) n=8	Grup-3 (TT ₂₄) n=8	Grup-4 (EO) n=8	Grup-5 (K) n=8
	Ort $\pm$ SS (min-maks)	Ort $\pm$ SS (min-maks)	Ort $\pm$ SS (min-maks)	Ort $\pm$ SS (min-maks)	Ort $\pm$ SS (min-maks)
NO	71.32 $\pm$ 18.46 ^f (39.31-99.03)	89.28 $\pm$ 35.32 (36.56-155.10)	91.18 $\pm$ 21.47 (54.23-122.37)	110.54$\pm$18.25^{f,g} (75.01-136.10)	69.98 $\pm$ 31.38 ^g (27.64-129.70)

NO, Nitrik oksit; TT₂, 2 saatlik testis torsiyonu; TT₆, 6 saatlik testis torsiyonu; TT₂₄, 24 saatlik testis torsiyonu; EO, Epididimoorşit, K, Kontrol (^fp=0.001; ^gp=0.007).



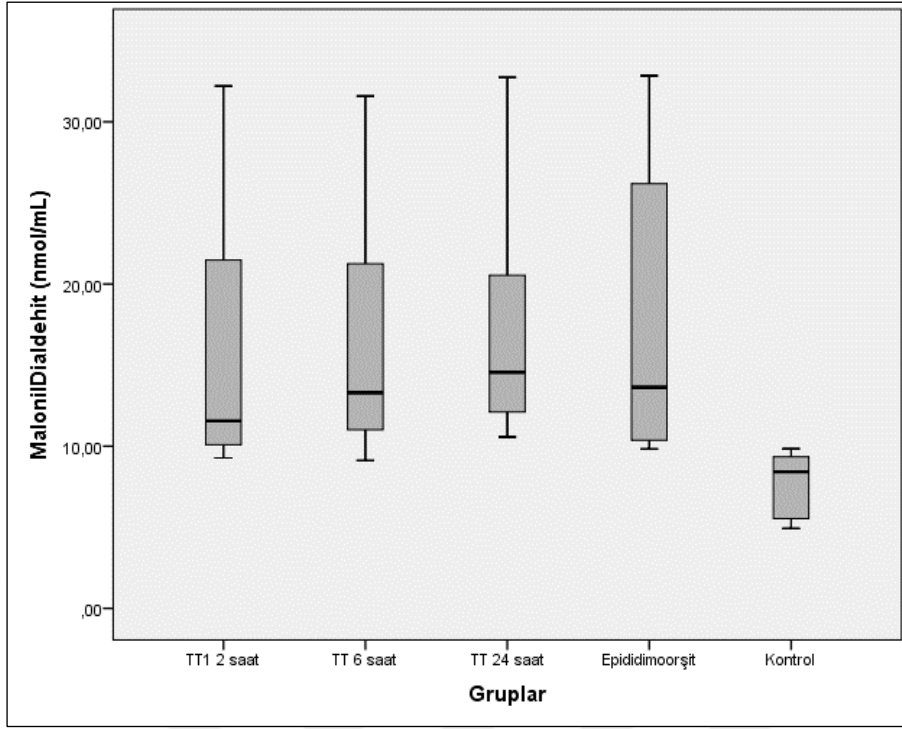
Şekil 14: Gruplardaki NO sonuçlarının grafiksel karşılaştırılması

MDA sonuçlarının değerlendirilmesi: Gruplar arasında en yüksek MDA düzeyi (17.88 ± 9.20) Grup4'te idi. MDA düzeyi bakımından gruplar arasında anlamlı farklılık yoktu ($p=0.069$, ANOVA). Deney gruplarının (TT ve Orşit) MDA düzeyi Kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksekti (Sırasıyla Grup-1 vs. Grup-5, $p=0.008$; Grup-2 vs. Grup-5, $p=0.003$; Grup-3 vs. Grup-5, $p=0.028$; Grup-4 vs. Grup-5, $p=0.008$). TT ve Orşit grupları arasında MDA düzeyi bakımından farklılık saptanmadı (Tablo 8, Şekil 15).

Tablo 8: Çalışma gruplarının MDA sonuçlarının karşılaştırılması

	Grup-1 (TT ₂) n=8	Grup-2 (TT ₆) n=8	Grup-3 (TT ₂₄) n=8	Grup-4 (EO) n=8	Grup-5 (K) n=8
	Ort ± SS (min-maks)	Ort ± SS (min-maks)	Ort ± SS (min-maks)	Ort ± SS (min-maks)	Ort ± SS (min-maks)
MDA	15.96±9.40 (9.28-32.21)	16.48±7.75 (9.12-31.59)	17.22±7.43 (10.57-32.75)	17.88±9.20 (9.83-32.85)	7.67±2.03 (4.93-9.84)

MDA, Malondialdehit. TT₂, 2 saatlik testis torsiyonu; TT₆, 6 saatlik testis torsiyonu; TT₂₄, 24 saatlik testis torsiyonu; EO, Epididimoorşit, K, Kontrol.



Şekil 15: Gruplardaki MDA sonuçlarının grafiksel karşılaştırılması

4.2. HİSTOPATOLOJİK BULGULARIN ANALİZİ

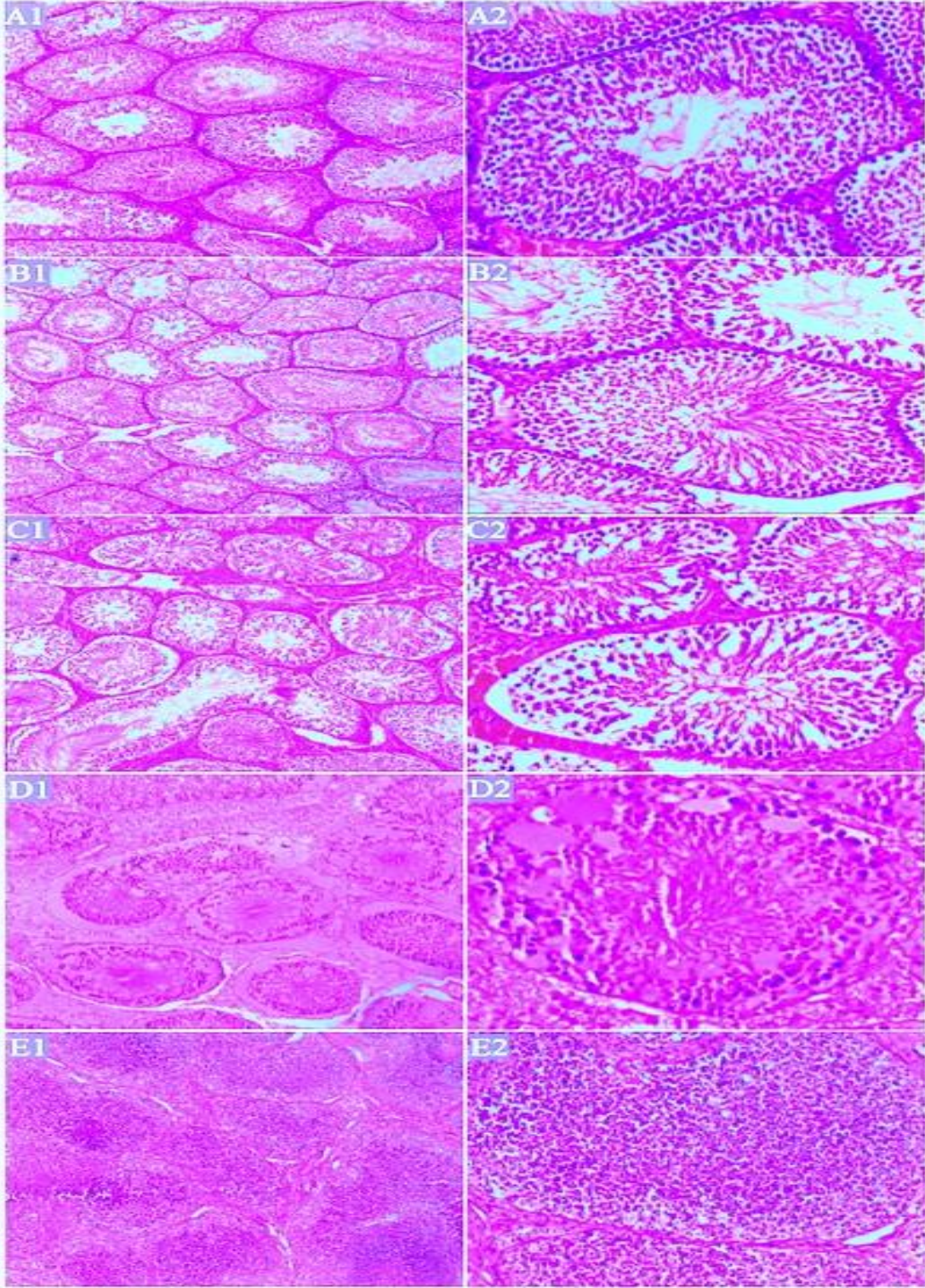
TT oluşturulan gruplarda, 2. saatten 24. saate doğru iskemi (torsiyon) süresi uzadıkça inflamasyon, konjesyon, ödem ve hemoraji şiddetinin arttığı saptandı. Bu durum özellikle Grup-3'te daha belirgindi. Benzer bulgular Orşit oluşturulan Grup-4'te de izlenmekte olup, histopatolojik sınıflamaya göre bulguların şiddeti sıklıkla "hafif" düzeyde idi. Histopatolojik bulgularının şiddet skorunun gruplar arası karşılaştırılmasında: Grup-4'teki inflamasyonun şiddet skoru Grup-1 ve Grup-2'den anlamlı olarak daha yüksek (sırasıyla G_1 vs G_4 , $p=0.001$; G_2 vs G_4 , $p=0.015$) iken, Grup-4'te izlenen konjesyon ve hemorajinin şiddet skoru Grup-3'ten anlamlı olarak daha yüksekti (sırasıyla $p=0.026$; 0.012). Diğer histopatoloji bulguları bakımından gruplar arasında farklılık saptanmadı. Fibrozis sadece Grup-4'te izlenmekte olup, fibrozis bakımından gruplar arası farklılık saptanmadı. Spermatogenez özellikle 6. saat (Grup-2) ve 24. saat (Grup-3) TT olan gruplarda bozulmuştu. 24 saat TT olan Grup3 ile Orşit oluşturulan Grup-4 ile arasında spermatogenez varlığı bakımından anlamlı farklılık saptanırken, Grup-2 ile Grup-4 arasında farklılık yoktu (sırasıyla G_3 vs G_4 , $p=0.026$; G_2 vs G_4 , $p=0.467$) (Tablo 9).

Tablo 9: Grupların histopatolojik bulguları

	Grup-1 (n=8)				Grup-2 (n=8)				Grup-3 (n=8)				Grup-4 (n=8)				Grup-5 (n=8)			
Histopatoloji skoru	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
İnflamasyon*	7	1	-	-	4	4	-	-	2	5	1	-	-	6	1	1	8	-	-	-
Ödem*	6	2	-	-	6	2	-	-	-	3	4	1	1	5	2	-	8	-	-	-
Konjesyon*	-	6	2	-	-	7	1	-	-	3	4	1	2	5	1	-	8	-	-	-
Hemoraji*	6	2	-	-	-	6	2	-	-	2	4	2	1	6	1	-	8	-	-	-
Fibrozis*	8	-	-	-	8	-	-	-	8	-	-	-	5	3	-	-	8	-	-	-
Spermatogenez (Var/Yok)[†]	8/0				6/2				3/5				8/0				8/0			

Histopatoloji skoru: 0=yok, 1=hafif, 2=orta, 3=şiddetli; *Mann-Whitney U-test; [†]Chi-square test

Şekil 16: Testis dokularının histopatolojik görünümü (H&E).



A1(x20)-A2(x200): Kontrol grubunda normal görüntü izlenmektedir B1(x20)-B2(x200): Grup-1'in testis dokusunda hafif şiddette inflamasyon, konjesyon, ödem ve hemoraji izlenmektedir. C1(x20)-C2(x200): Grup-2'nin testis dokusunda orta şiddette inflamasyon, konjesyon, ödem ve hemoraji izlenmektedir. D1(x20)-D2(x200): Grup-3'ün testis dokusunda orta şiddette inflamasyon, ağır şiddette konjesyon, ödem ve hemoraji izlenmektedir. Spermatogeneizde bozukluk mevcuttur. E1(x20)-E2(x200): Grup-4'ün testis dokusunda hafif şiddette inflamasyon, konjesyon, ödem ve hemoraji izlenmektedir. Fibrozis mevcuttur. Spermatogeneizde bozukluk izlenmemiştir.

5. TARTIŞMA

Acil servise şiddetli skrotal ağrı, bir başka deyişle akut skrotum nedeniyle başvuran hastalarda en sık izlenen iki tablo Orşit ve TT'nu olup, bu iki durum hızlıca birbirinden ayırt edilmelidir. Bu çalışmada, bu iki klinik durumun ayrımını yapmada görüntüleme yöntemi (Doppler USG) kullanılmadan, yalnızca serum biyomarker (Kalpain-1, Kaspaz 1, Kaspaz-8, IL-1 β) düzeyi ölçümü sayesinde tanı ve/veya ayırıcı tanı yapıp yapılamayacağı araştırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, serum Kalpain-1 düzeyi, özellikle TT'nun 6. saatinden sonra ölçüldüğünde TT'nun Orşitten ayrımında faydalı iken, erken dönemde ise (ilk 2 saat) yetersizdir. Serum Kaspaz-1 düzeyi özellikle ilk 2 saatte Orşit'in TT'dan ayrımında faydalı olabilir iken, zaman ilerledikçe bu etkinliği kaybolmaktadır. Serum Kaspaz-8 düzeyi ölçümünün TT'nu Orşit'ten ayırmada yararlılığı gösterilememiştir. Serum IL-1 β düzeyi ilk 6 saat içinde ölçüldüğünde Orşit'in TT'dan ayrımında faydalı olabilir iken; zaman ilerledikçe (Özellikle 24. saat ve sonrası) bu özelliğini kaybetmektedir. TT'nu ve Orşit oluşturulan gruplarda oksidatif stres belirteçleri olan NO ve MDA'nın serum düzeyinde oluşan yükselmeler ve bu gruplarda oluşan hücresel hasarın histopatolojik bulgularında elde edilen sonuçlarımızı desteklemektedir.

Klinik önceliği olan iki akut skrotal durumun testis dokusu üzerinde oluşturduğu hasarın mekanizması birbirinden farklıdır. TT'da kan akımının kesilmesine bağlı iskemik süreç, Orşitte ise enfeksiyon ve/veya inflamasyon ön plandadır (2,34); ancak, her iki durumda da zaman ilerledikçe iskemi ve inflamasyon süreçleri iç içe geçebilir (127,128). Kalpain-1, iskemiye bağlı ortaya çıkan nekroptoz oluşumunda görev alan bir biyobelirteçtir ve bu nedenle iskemi göstergesi olarak kabul edilir (95,129,130). Karaciğer iskemisi oluşturulan bir rat çalışmasında, iskemi süresi uzadıkça kalpain-1 düzeyinin arttığı; Kalpain-1 inhibitörü verilen ratlarda ise apoptoz ve nekroptoz yollarının inhibe edilmesi nedeniyle hücrelerin hayatta kalma kabiliyetinin arttığı gösterilmiştir (131). Shiraishi ve ark.'nın TT oluşturulan ratlar üzerindeki çalışmasında, Kalpain düzeyinin reperfüzyon süreci olsun ya da olmasın iskemiye bağlı arttığı gösterilmiş ve TT'nu başlangıcından sonraki ilk 6 saat içinde ya da detorsiyon prosedüründen önce verilen Kalpain inhibitörü tedavisinin hücre ölümünü önlemede faydalı olacağı vurgulanmıştır (132). Kalpain-1 iskeminin

yanı sıra inflamasyon süreciyle de ilişkili olabilir. Cuzzocrea ve ark.'nın yaptığı deneysel bir çalışmada Kalpain-1 inhibitörü verilen ratlarda lökosit göçünün azaldığı gösterilmiştir. Bu çalışmada plörezi olan ratlarda, Kalpain-1 inhibitörü verildikten sonra inflamasyon, akciğer hasarı ve MDA seviyesinin azaldığı saptanırken; plörezi için tedavi verilemeyen ratlarda ise NO ve MDA seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (133). Çalışmamızda, Kalpain-1'in düzeyi hem iskemi oluşturulan TT gruplarında hem de inflamasyon/enfeksiyon oluşturulan Orşit grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Bu yükseklik, özellikle 6 saatlik TT oluşturulan Grup-2'de daha barizdi. Bununla birlikte, 6 saatlik ve 24 saatlik TT'nu olan Grup-2 ve Grup-3'teki Kalpain-1 düzeyi, Orşit oluşturulan Grup-4'e göre anlamlı olarak daha yüksekti. Bu sonuçlar, Kalpain-1'in Orşit ve TT tanısında kullanılabileceğini düşündürmektedir. Ancak, Kalpain-1'deki bu anlamlı yüksekliğin TT'da saatler içerisinde, Orşitte ise günler içinde olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Ayırıcı tanı bakımından incelendiğinde ise Kalpain-1'in özellikle klinik başlangıcının üzerinden 6 saat ve daha fazla süre geçen akut skrotum tablosundaki hastalarda TT lehine yorumlanabileceğini düşünmekteyiz.

Kaspaz ailesi, apoptoz sürecinin işleyişi sırasında birbirinden farklı görevlere sahip enzimlerden oluşmaktadır (10). Kaspaz-1, bu aile içinde inflamasyona bağlı hücre ölümünün, yani piroptozun belirteci olarak kabul edilmektedir (101). Kaspaz-1 aynı zamanda iskemi sürecinin uzamasıyla indükte olan inflamatuvar süreçlerde de yükselebilir (127). Serebral iskemi oluşturulan ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada, beyin dokusundaki inflamatuvar mediatörlerin iskemi süreci uzadıkça serum düzeyinin arttığı gösterilmiştir (134). Akut pankreatit oluşturulan ratlarla ilgili bir çalışmada, pankreatit süreci ilerledikçe Kaspaz-1 ve IL-1 β düzeylerinin arttığı; ayrıca Kaspaz-1 inhibisyonu yapılan ratlarda ise akut pankreatite sekonder gelişen akut böbrek yetmezliğini düzelttiği gösterilmiştir (135). Bir başka rat çalışmasında, Lysiak ve ark.'ı aralıklı reperfüzyon oluşturulan TT'nu modelinde, zaman ilerledikçe Kaspaz-1 değerinin ortalama %60-80 oranında arttığını ve en yüksek düzeyine reperfüzyonun 2. ve 4. saatte ulaşıldığını göstermiştir (136). Liang ve ark.'ı Kaspaz-1 inhibisyonu sayesinde beyin dokusunda iskemiye bağlı oluşan hasarın azaldığını bildirmiştir (137). Tüm bu çalışmalar, Kaspaz-1'in inflamatuvar süreçte

oynadığı anahtar rolü ve iskemi ile olan bağlantısına örnek olarak gösterilebilir. Çalışmamızda, en yüksek Kaspaz-1 düzeyi Orşit grubunda (Grup-4) tespit edildi. Bununla birlikte tüm gruplardaki Kaspaz-1 düzeyi, Kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. Bu durum, Kaspaz-1'in TT ve Orşit tanısında kullanabilecek bir biyomarker olabileceğini düşündürmüştür. Ayırıcı tanı bakımından baktığımızda ise yalnızca Orşit modeli oluşturulan Grup 4'teki Kaspaz-1 düzeyinin 2 saatlik TT oluşturulan gruptaki Kaspaz-1 düzeyinden anlamlı olarak daha yüksek olduğunu saptadık. Bunun sebebi, TT'nun mekanizmasının temelini oluşturan iskeminin; zaman ilerledikçe bir yandan da inflamatuvar süreci indüklemesi olabilir. Bununla birlikte, akut skrotal acillerin ilk 2 saatinde Kaspaz-1 düzeyindeki yükseklik Orşit lehine yorumlanabilirken; iskemi sürecinin uzadıkça (özellikle 6. saatten sonra) Kaspaz-1'in ayırıcı tanıdaki etkinliğinin kaybolduğunu düşünmekteyiz.

Kaspaz-8, apoptozun ekstrinsik yolağının başlatıcısı olarak görev yapmaktadır. Bu görev sırasında, bir yandan da RIPK3 ve MLKL'nin aracılık ettiği nekroptozu inhibe eder (138). Ancak, Fritsch ve ark.'ı ise bu görüşün aksine bir sonuç elde etmiş ve Kaspaz-8'in ASC (Apoptosis-associated speck-like) protein üzerinden Kaspaz-1 aktivasyonuna neden olduğunu; bu sayede hem inflamasyonu aktive ettiğini hem de nekroptozun ve piroptozun indüksiyonunda anahtar rol oynadığını göstermiştir (139). Bir başka çalışmada, Kaspaz-8'in SARS-CoV-2 ile enfekte ratlarda inflamatuvar sitokinlerin ortaya çıkışı ile birlikte nekroptozu ve piroptozu tetiklediği gösterilmiştir (140). Lu ve ark.'ı Üropatojenik *E. Coli* enjekte ederek Epididimoorşit oluşturdukları ratlardaki, Kaspaz-1, 3, 6 ve 8 düzeyini kontrol grubu ile karşılaştırmış; ancak her iki grup arasında anlamlı bir istatistiksel farklılık saptanmamıştır (122). Bu nedenle, bu çalışmada geçen diğer kaspaz üyeleri bir kenara konulduğunda; başlatıcı bir kaspaz olan Kaspaz-8'in iskemi ve inflamasyon süreçlerinin her ikisinde de görev aldığını ve buna bağlı olarak her iki mekanizmada da düzeyinin artabileceğini söylemek yanlış olmayacaktır. Çalışmamızda, deney gruplarındaki Kaspaz-8 düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. Bununla birlikte TT ile Orşit oluşturulan ratlar arasında herhangi bir istatistiksel farklılık saptanmadı. Bu durum, Kaspaz-8'in hem iskemiye bağlı nekroptoz hem de inflamasyona bağlı piroptozda rol oynadığını gösteren diğer çalışmaların sonuçlarını

desteklemektedir. Bununla birlikte, klinik olarak akut skrotum durumunda tanısında faydalı olabilecek iken, ayırıcı tanıda ise yetersizdir.

Piroptoz süreci, yalnızca Kaspaz ailesi ile ilişkili olmayıp, birbirini indükleyen başka inflamatuvar süreçleri de ilgilendirmektedir (110,111,141). Yamis ve ark.'nın akut skrotum modeli oluşturduğu bir çalışmada, Prokalsitonin düzeyinin Epididimoorşit oluşturulan grupta anlamlı olarak yükseldiği saptanmış olup, bu durum EO'in inflamatuvar bir süreçle meydana geldiğinin göstergesi olarak görülmüştür (142). Bununla birlikte, Piroptoz sırasında indüklenen anahtar sitokinlerden biri IL-1 β 'dir. IL-1 β , bu süreç sırasında Kaspaz-1 ile birlikte çalışır (143,144). Yapılan bir çalışmada, intratestiküler IL-1 β enjekte edilen ratlarda vasküler inflamasyon oluşmuş ve IL-1 β 'nin güçlü bir inflamatuvar yanıt oluşturduğu gösterilmiştir (145). Li ve ark.'nın çalışmasında SARS-CoV-2 ile enfekte edilen ratlarda, piroptoz yolağında birlikte çalışan Kaspaz-1 ve IL-1 β düzeyinin arttığı gösterilmiştir (140). Bir başka çalışmada, Kadmiyum enjeksiyonu ile testis inflamasyonu oluşturulan ratlarda Kaspaz-1 ve IL-1 β düzeyinin arttığı rapor edilmiştir. Bu çalışmada aynı zamanda, ağır metalin neden olduğu testiküler inflamasyona bağlı oksidatif stres nedeniyle MDA ve NO düzeyinin de arttığı bildirilmiştir (146). Huang ve ark.'nın yaptığı yine benzer bir çalışmada ise Metan'ın neden olduğu testiküler inflamasyon ve oksidatif strese bağlı olarak Orşit tablosunun oluşturulduğu ve bu ratlardaki IL-1 β ve MDA düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükseldiği gösterilmiştir (147). Çalışmamızda, en yüksek IL-1 β düzeyinin Grup-3 (24 saatlik TT)'te olduğu tespit edildi. Bununla birlikte, TT ve Orşit oluşturulan tüm gruplardaki IL-1 β düzeyi, Kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksekti. Bu durum, IL-1 β 'nin tanı amaçlı kullanımda faydalı olabileceğini düşündürmektedir. Ayırıcı tanı yönünden bakıldığında ise Orşit modeli oluşturulan Grup-4'teki IL-1 β düzeyinin 2 ve 6 saatlik TT'nu grubundan anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptandı. Bu durum, ilk 6 saatte başvuran skrotal acillerde IL-1 β düzeyi yüksekliğinin Orşit, 6. saatten sonraki başvurularda ise TT'nu lehine yorumlanabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, çalışmamız sırasında iskemi ve inflamasyonun neden olduğu oksidatif stres, NO ve MDA gibi oksidatif stres belirteçleriyle de gösterilmiş ve bu belirteçlerin düzeyi TT ve Orşit oluşturulan

ratlarda kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar da diğer biyobelirteçlerden elde ettiğimiz verileri desteklemektedir.

İskemi ve inflamasyon sonucu testiküler dokuda birçok makroskobik ve mikroskobik değişiklik olmaktadır. Mikroskobik değişiklikler konjesyondan hücre parçalanmasına kadar ilerleyebilir. Söz konusu testis dokusu olduğundan iskemi ve inflamasyonun spermatogenez üzerindeki etkisi de histopatolojik bulgular arasında değerlendirilmelidir (148,149). Ufuk ve ark.'nın farklı torsiyon dereceleri uygulayarak TT'nu oluşturdıkları çalışmada, 720° ve üzerindeki rotasyonlarla yapılan torsiyonlardan 24 saat sonra testis dokusunun makroskobik olarak siyah renkte izlenmiştir. Aynı çalışmada, mikroskobik görüntülemeye yaygın inflamasyon, konjesyon, ödem ve hemoraji izlendiği de belirtilmiştir (35). Bir başka çalışmada Epididimoorşit oluşturulan ratların 1 hafta sonraki mikroskobik incelemesinde inflamasyon daha baskın iken, konjesyon, ödem ve hemorajinin ise daha hafif derecelerde izlendiği bildirilmiştir (122). TT ve Orşitin spermatogenezini azalttığı gösterilmiş olup, bu durum özellikle TT'da daha belirgindir (65, 145-149). Bununla birlikte, intratestiküler IL-1 β düzeyi artışının spermatogenezini bozduğuna dair kanıtlarda mevcuttur (150,151). Çalışmamızda şiddet skorları birbirinden farklı olmakla birlikte inflamasyon, konjesyon, ödem ve hemoraji tüm çalışma gruplarında mevcuttu. Bununla birlikte, bu bulgular inflamasyonda Orşit grubunda, konjesyon, ödem ve hemorajide ise 24 saatlik TT grubunda daha baskındı. Spermatogenez ise 6 ve 24 saatlik TT'nu oluşturulan Grup-2 ve 3'te bozulmuş olup, özellikle IL-1 β 'nin en yüksek olduğu Grup-3'teki ratların %62.5 (5/8)'inde spermatogonia izlenmedi. Bu sonuçlar, beklenildiği şekilde TT'nunda süreç ilerledikçe inflamasyon, konjesyon, ödem ve hemoraji gibi histopatolojik bulguların daha da şiddetleneyeceği düşüncesinin kanıtıdır. Benzer şekilde bu bulgular Orşit grubunda da fazlasıyla izlenmiş olup, Orşit gelişim sürecinin uzunluğu nedeniyle fibrozis yalnızca bu grupta gerçekleşmiştir. TT'nun istenmeyen bir klinik sonucu olan infertilite ya da başka bir deyişle spermatogenezin bozulması süreç ilerledikçe artmış ve özellikle 24 saatlik TT'nu olan grupta belirgin hale gelmiştir. Bu gruptaki, IL-1 β yüksekliği de göz önünde bulundurulduğunda, elde ettiğimiz sonuçların hem biyobelirteç sonuçlarıyla hem de bilimsel literatürdeki daha önceki çalışmalarla uyumlu olduğu söylenebilir.

6. SONUÇ

▪ Serum Kalpain-1, Kaspaz-1, Kaspaz-8 ve IL-1 β düzeyi TT ve Orşit modeli oluşturulan ratlarda Kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Bu nedenle, bu biyomarkerlar TT'nu tanısı ve Orşit tanısının konulması hususunda gelecek vadetmektedir.

▪ Kalpain-1 düzeyi, 6 ve 24 saatlik TT'nu oluşturulan grupta Orşit grubundan anlamlı olarak daha yüksekti. Bu nedenle, akut skrotum kliniği ile başvuran ve klinik süreci 6 saati aşan hastaların ayırıcı tanısında Kalpain-1 düzeyi yüksekliği TT'nu lehine yorumlanabilir.

▪ Kaspaz-1 düzeyi Orşit grubunda, 2 saatlik TT'nu oluşturulan gruptan anlamlı olarak daha yüksekti. Bu nedenle, akut skrotum kliniği ile başvuran hastalarda ayırıcı tanı bakımından ilk 2 saatte Kaspaz-1 düzeyinin yüksekliği Orşit lehine olabilir.

▪ Kaspaz-8 düzeyi Orşit ile TT'nu ayırımında yararlı değildir.

▪ IL-1 β düzeyi Orşit grubunda, 2 ve 6 saatlik TT'nu oluşturulan gruptan anlamlı olarak daha yüksekti. Bu nedenle, akut skrotum kliniği ile başvuran hastalarda ayırıcı tanı bakımından ilk 6 saatte IL-1 β düzeyinin yüksekliği Orşit lehine olabilir.

▪ Serum Kalpain-1, Kaspaz-1 ve IL-1 β düzeyi “zaman” faktörü göz önünde bulundurulduğunda; akut skrotumun en önemli iki nedeni olan TT ile Orşit'in ayırıcı tanısında faydalı olabilir.

▪ NO ve MDA düzeyi, Orşit ve 24 saatlik TT'nu olan gruplarda en yüksektir. Bu biyobelirteçlerin yüksekliği, iskemi ve/veya inflamasyon sonucu oluşan oksidatif stresin varlığını gösterdiği gibi ölçümünü yaptığımız diğer biyomarkerlardan elde ettiğimiz sonuçları destekler niteliktedir.

▪ Histopatoloji skorları birbirinden farklı olmakla birlikte inflamasyon, konjesyon, ödem ve hemoraji tüm çalışma gruplarında izlenmiştir. Bu bulgular, Orşit grubunda “hafif” ve 24 saatlik TT'nu grubunda “şiddetli” daha düzeydedir.

- Spermatogenez ise 6 ve 24 saatlik TT'nu oluşturulan Grup-2 ve Grup-3'te bozulmuş olup, özellikle IL-1 β 'nın en yüksek olduğu Grup-3'teki ratların %62.5 (5/8)'inde spermatogonia izlenmemiştir.



7. KAYNAKLAR

1. Laher A, Ragavan S, Mehta P, Adam A. Testicular torsion in the emergency room: A review of detection and management strategies. Vol. 12, Open Access Emergency Medicine. 2020. p. 237–46.
2. Banyra O, Nikitin O, Ventskivska I. Acute epididymo-orchitis: Relevance of local classification and partner's follow-up. Cent Eur J Urol. 2019;72(3):324–9.
3. Velasquez J, Boniface MP, Mohseni M. Acute Scrotum Pain. StatPearls. 2020;
4. Wang JH. Testicular torsion. Urol Sci. 2012;23(3):85–6.
5. Marcozzi D, Suner S. The nontraumatic, acute scrotum. Emerg Med Clin North Am. 2001;19(3):547–68.
6. Gordhan CG, Sadeghi-Nejad H. Scrotal pain: Evaluation and management. Korean J Urol. 2015;56(1):3–11.
7. Wampler SM, Llanes M. Common Scrotal and Testicular Problems. Prim Care - Clin Off Pract. 2010;37(3):613–26.
8. Herbener TE. Ultrasound in the assessment of the acute scrotum. In: Journal of Clinical Ultrasound. J Clin Ultrasound; 1996. p. 405–21.
9. Trojian TH, Lishnak TS, Heiman D. Epididymitis and orchitis: An overview. Vol. 79, American Family Physician. 2009 Apr.
10. Cohen GM. Kaspaz: The executioners of apoptosis. Vol. 326, Biochemical Journal. Portland Press Ltd; 1997. p. 1–16.
11. Nicholson DW. Kaspaz structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. Vol. 6, Cell Death and Differentiation. Nature Publishing Group; 1999. p. 1028–42.
12. Ramirez MLG, Salvesen GS. A primer on kaspaz mechanisms. Vol. 82,

- Seminars in Cell and Developmental Biology. Elsevier Ltd; 2018. p. 79–85.
13. Jorgensen I, Miao EA. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. Vol. 265, Immunological Reviews. 2015. p. 130–42.
 14. Boise LH, Collins CM. Salmonella-induced cell death: Apoptosis, necrosis or programmed cell death? Vol. 9, Trends in Microbiology. Elsevier Current Trends; 2001. p. 64–7.
 15. Tummers B, Green DR, Douglas Green CR. Kaspaz-8: regulating life and death. Immunol Rev. 2017;277:76–89.
 16. Cheng S, Wang S, Lei M, Wang Z, Xiong K. Regulatory role of kalpain in neuronal death. Neural Regen Res. 2018;13(3):556.
 17. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. Vol. 22, Cytokine and Growth Factor Reviews. Elsevier; 2011. p. 189–95.
 18. He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. Vol. 41, Trends in Biochemical Sciences. Elsevier Ltd; 2016. p. 1012–21.
 19. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Vol. 4, Pharmacognosy Reviews. Wolters Kluwer -- Medknow Publications; 2010. p. 118–26.
 20. Giera M, Lingeman H, Niessen WMA. Recent advancements in the LC- and GC-based analysis of malondialdehyde (MDA): A brief overview. Vol. 75, Chromatographia. Friedr. Vieweg und Sohn Verlags GmbH; 2012. p. 433–40.
 21. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Vol. 11, Free Radical Biology and Medicine. Free Radic Biol Med; 1991. p. 81–128.
 22. Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. Vol. 15, Inflammopharmacology. Inflammopharmacology; 2007. p. 252–9.

23. Kone BC, Kuncewicz T, Zhang W, Yu ZY. Protein interactions with nitric oxide synthases: Controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. Vol. 285, *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. American Physiological Society; 2003.
24. Gatti JM, Murphy JP. Current management of the acute scrotum. In: *Seminars in pediatric surgery*. Elsevier; 2007. p. 58–63.
25. Lewis AG, Bukowski TP, Jarvis PD, Wacksman J, Sheldon CA. Evaluation of acute scrotum in the emergency department. *J Pediatr Surg*. 1995;30(2):277–82.
26. Kass EJ, Lundak B. The acute scrotum. *Pediatr Clin North Am*. 1997 Oct;44(5):1251–66.
27. Günther P, Rübben I. The acute scrotum in childhood and adolescence. *Dtsch Arztebl Int*. 2012 Jun;109(25):449–57; quiz 458.
28. Barada JH, Weingarten JL, Cromie WJ. Testicular salvage and age-related delay in the presentation of testicular torsion. *J Urol*. 1989 Sep 1;142(3):746–8.
29. Mushtaq I, Fung M, Glasson MJ. Retrospective review of paediatric patients with acute scrotum. *ANZ J Surg* [Internet]. 2003 Feb 1 [cited 2021 Nov 9];73(1–2):55–55.
30. Srinivasan AK, Freyle J, Gitlin JS, Palmer LS. Climatic Conditions and the Risk of Testicular Torsion in Adolescent Males. *J Urol*. 2007 Dec;178(6):2585–8.
31. Davol P, Simmons J. Testicular torsion in a 68-year-old man. *Urology*. 2005 Jul 1;66(1):195.
32. Hohenfellner M, Santucci RA. *Emergencies in urology*. Springer Science & Business Media; 2007.
33. Shukla RB, Kelly DG, Daly L, Guiney EJ. Association of cold weather with testicular torsion. *Br Med J (Clin Res Ed)* [Internet]. 1982 Nov 20 [cited 2021

Nov 8];285(6353):1459–60.

34. Ringdahl EN, Teague L. Testicular torsion. *Am Fam Physician*. 2006;74(10):1739–43.
35. Ufuk F, Herek D, Herek Ö, Akbulut M. Role of diffusion weighted magnetic resonance imaging in a rat model of testicular torsion. *Br J Radiol*. 2016 Dec;89(1068):20160585.
36. Ringdahl EN, Teague L. Testicular Torsion. *Am Fam Physician* [Internet]. 2006 Nov 15 [cited 2021 Nov 9];74(10):1739–43.
37. Madarikan BA. Testicular salvage following spermatic cord torsion. *J Pediatr Surg*. 1987 Mar 1;22(3):231–4.
38. Tjioe DY, Steinberger E. A QUANTITATIVE STUDY OF THE EFFECT OF ISCHAEMIA ON THE GERMINAL EPITHELIUM OF RAT TESTES. *Reproduction* [Internet]. 1970 Apr 1 [cited 2021 Nov 8];21(3):489–94.
39. Seevagan T, Hulligan S, Phull J, Aboumarzouk OM. Testes Structure and Function. *Blandy's Urol* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2021 Nov 9];729–39.
40. Lin EP, Bhatt S, Rubens DJ, Dogra VS. Testicular torsion: twists and turns. In: *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*. Elsevier; 2007. p. 317–28.
41. Bombiński P, Warchoń S, Brzewski M, Majkowska Z, Dudek-Warchoń T, Żerańska M, et al. Ultrasonography of Extravaginal Testicular Torsion in Neonates. *Polish J Radiol*. 2016;81:469–72.
42. ÖZAYDIN S, ÇAVUŞOĞLU YH. Akut Skrotum. *İstanbul Kanuni Sultan Süleyman Tıp Derg* [Internet]. 2019 [cited 2021 Nov 9];11(2):102–9.
43. Sevük M, Danışman A, Bircan K, Şahin H. Ürogenital Sistem Hastalıklarında Semptomatoloji ve Klinik Muayene. In: Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N Ed *Temel Üroloji Üçüncü Baskı* Ankara Öncü Basımevi S. 2007;56.
44. Seng YJ, Moissinac K. Trauma induced testicular torsion: a reminder for the unwary. *Emerg Med J*. 2000;17(5):381–2.
45. Caesar RE, Kaplan GW. Incidence of the bell-clapper deformity in an autopsy

- series. *Urology*. 1994 Jul 1;44(1):114–6.
46. Nandi B, Murphy FL. Neonatal testicular torsion: a systematic literature review. *Pediatr Surg Int*. 2011;27(10):1037–40.
 47. Dresner ML. Torsed appendage diagnosis and management: blue dot sign. *Urology*. 1973;1(1):63–6.
 48. Anafarta K, Baykara M, Baydınç C. Ürogenital organların anatomik ve histolojik yapısı. K Anafarta va, ed Temel Üroloji Ankara Güneş Kitapevi. 1998;1–28.
 49. <http://cai.md.chula.ac.th/lesson/atlas/G/ImgBig/IMG0030.jpg>.
 50. Boettcher M, Bergholz R, Krebs TF, Wenke K, Aronson DC. Clinical predictors of testicular torsion in children. *Urology*. 2012;79(3):670–4.
 51. Noseworthy J. Testikular torsion. In: Ashcraft KW, Holder TM (eds). *Pediatric Surgery*. 2. Ed. W.B. Saunders, Philadelphia 1993, pp 595-601. *Pediatr Surgery* 2 Ed WB Saunders, Philadelphia 1993, pp 595-601. 1993;595–601.
 52. Burgher SW. Acute scrotal pain. *Emerg Med Clin North Am*. 1998 Nov;16(4):781–809, vi.
 53. Baker LA, Sigman D, Mathews RI, Benson J, Docimo SG. An analysis of clinical outcomes using color Doppler testicular ultrasound for testicular torsion. *Pediatrics*. 2000;105(3):604–7.
 54. Bader TR, Kammerhuber F, Herneth AM. Testicular blood flow in boys as assessed at color Doppler and power Doppler sonography. *Radiology*. 1997 Feb;202(2):559–64.
 55. Watkin NA, Reiger NA, Moisey CU. Is the conservative management of the acute scrotum justified on clinical grounds? *Br J Urol*. 1996;78(4):623–7.
 56. Davis JE, Silverman M. Scrotal emergencies. *Emerg Med Clin*. 2011;29(3):469–84.
 57. Bertolotto M, Campo I, Derchi LE. Imaging of Acute Scrotum. In: Pain

Imaging. Springer; 2019. p. 487–98.

58. Arap MA, Vicentini FC, Cocuzza M, Hallak J, Athayde K, Lucon AM, et al. Late hormonal levels, semen parameters, and presence of antisperm antibodies in patients treated for testicular torsion. *J Androl*. 2007;28(4):528–32.
59. McAndrew H, Pemberton R, Kikiros C, Gollow I. The incidence and investigation of acute scrotal problems in children. *Pediatr Surg Int*. 2002;18(5–6):435–7.
60. KRARUP T. The testes after torsion. *Br J Urol*. 1978;50(1):43–6.
61. Berger RE, Alexander ER, Harnisch JP, Paulsen CA, Monda GD, Ansell J, et al. Etiology, manifestations and therapy of acute epididymitis: prospective study of 50 cases. *J Urol*. 1979;121(6):750–4.
62. Raveenthiran V, Sam CJ. Epididymo-orchitis complicating anorectal malformations: collective review of 41 cases. *J Urol*. 2011;186(4):1467–72.
63. Tracy CR, Steers WD, Costabile R. Diagnosis and management of epididymitis. *Urol Clin North Am*. 2008 Feb;35(1):101–8; vii.
64. Collins MM, Stafford RS, O’leary MP. How common is prostatitis? A national survey of physician visits. *J urol*. 1998;159(4):1.
65. Beger RE LJ. Beger RE, Lee JC. Epididymitis. In : PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ eds, *Campbell’s Urology*. 8th edition. Philadelphia: WB Saunders, 2002: 678-80. *Campbell’s Urol 8th Ed*. 2002;
66. Schuppe H-C, Pilatz A, Hossain H, Diemer T, Wagenlehner F, Weidner W. Urogenital infection as a risk factor for male infertility. *Dtsch Arztebl Int*. 2017;114(19):339.
67. Workowski KA. Centers for Disease Control and Prevention sexually transmitted diseases treatment guidelines. *Clin Infect Dis*. 2015;61(suppl_8):S759–62.
68. Luzzi GA, O’Brien TS. Acute epididymitis. *BJU Int*. 2001;87(8):747–55.
69. Sarm BJ, Dmochowski RR. Urologic emergencies. *Trauma injuries and*

- conditions affecting the penis, scrotum, and testicles. *Postgrad Med.* 1996;100(4):187–90.
70. Doehn C, Fornara P, Kausch I, Büttner H, Friedrich H-J, Jocham D. Value of Acute-Phase Proteins in the Differential Diagnosis of Acute Scrotum. *Eur Urol.* 2001;39(2):215–21.
 71. Beni-Israel T, Goldman M, Chaim SB, Kozer E. Clinical predictors for testicular torsion as seen in the pediatric ED. *Am J Emerg Med.* 2010;28(7):786–9.
 72. Ludwig M. Diagnosis and therapy of acute prostatitis, epididymitis and orchitis. *Andrologia.* 2008;40(2):76–80.
 73. Stehr M, Boehm R. Critical validation of colour Doppler ultrasound in diagnostics of acute scrotum in children. *Eur J Pediatr Surg.* 2003;13(06):386–92.
 74. Manavi K, Turner K, Scott GR, Stewart LH. Audit on the management of epididymo-orchitis by the Department of Urology in Edinburgh. *Int J STD AIDS.* 2005;16(5):386–7.
 75. Mittenmeyer BT, Lennox KW, Borski AA. Epididymitis: a review of 610 cases. *J Urol.* 1966;95(3):390–2.
 76. Kadish HA, Bolte RG. A retrospective review of pediatric patients with epididymitis, testicular torsion, and torsion of testicular appendages. *Pediatrics.* 1998;102(1):73–6.
 77. Kaver I, Matzkin H, Braf ZF. Epididymo-orchitis: a retrospective study of 121 patients. *J Fam Pract.* 1990;30(5):548–52.
 78. Trujillo-Rangel WÁ, García-Valdés L, Méndez-Del Villar M, Castañeda-Arellano R, Totsuka-Sutto SE, García-Benavides L. Therapeutic Targets for Regulating Oxidative Damage Induced by Ischemia-Reperfusion Injury: A Study from a Pharmacological Perspective. *Oxid Med Cell Longev.* 2022;2022:8624318.

79. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2012;298:229–317.
80. Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011 Nov;301(5):H1723-41.
81. Bulkley GB. Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. *Br J Cancer Suppl*. 1987 Jun;8:66–73.
82. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007 Sep;357(11):1121–35.
83. Lejay A, Fang F, John R, Van JAD, Barr M, Thaveau F, et al. Ischemia reperfusion injury, ischemic conditioning and diabetes mellitus. *J Mol Cell Cardiol*. 2016 Feb;91:11–22.
84. Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, Velez DA, Hewan-Lowe KO, Guyton RA, et al. Dynamic progression of contractile and endothelial dysfunction and infarct extension in the late phase of reperfusion. *J Surg Res*. 2000 Dec;94(2):133–44.
85. Nirmala JG, Lopus M. Cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell Biol Toxicol*. 2020 Apr;36(2):145–64.
86. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*. 2009 Jan;16(1):3–11.
87. Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of kaspazs. *Cell Death Differ*. 2015;22(4):526–39.
88. Suzanne M, Steller H. Shaping organisms with apoptosis. *Cell Death Differ*. 2013 May;20(5):669–75.
89. Dickens LS, Powley IR, Hughes MA, MacFarlane M. The “complexities” of life and death: death receptor signalling platforms. *Exp Cell Res*. 2012

- Jul;318(11):1269–77.
90. Broughton BRS, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*. 2009 May;40(5):e331-9.
 91. Glowacki S, Synowiec E, Blasiak J. The role of mitochondrial DNA damage and repair in the resistance of BCR/ABL-expressing cells to tyrosine kinase inhibitors. *Int J Mol Sci*. 2013;14(8):16348–64.
 92. Moquin D, Chan FK-M. The molecular regulation of programmed necrotic cell injury. *Trends Biochem Sci*. 2010 Aug;35(8):434–41.
 93. Vandenabeele P, Declercq W, Van Herreweghe F, Vanden Berghe T. The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis. *Sci Signal*. 2010 Mar;3(115):re4.
 94. Smith CCT, Yellon DM. Necroptosis, necrostatins and tissue injury. *J Cell Mol Med*. 2011 Sep;15(9):1797–806.
 95. Boujrad H, Gubkina O, Robert N, Krantic S, Susin SA. AIF-mediated programmed necrosis: a highly regulated way to die. *Cell Cycle*. 2007 Nov;6(21):2612–9.
 96. Wang Y, Dawson VL, Dawson TM. Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Exp Neurol*. 2009 Aug;218(2):193–202.
 97. Baines CP. Role of the mitochondrion in programmed necrosis. *Front Physiol*. 2010;1:156.
 98. Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. Structure and physiological function of kalpains. *Biochem J*. 1997;328(3):721–32.
 99. Shinkai-Ouchi F, Shindo M, Doi N, Hata S, Ono Y. Kalpain-2 participates in the process of kalpain-1 inactivation. *Biosci Rep [Internet]*. 2020 Nov 27;40(11):BSR20200552.
 100. Chang W, Lin J, Dong J, Li D. Pyroptosis: an inflammatory cell death implicates in atherosclerosis. *Med Hypotheses*. 2013;81(3):484–6.

101. Murphy JM, Silke J. Ars Moriendi; the art of dying well - new insights into the molecular pathways of necroptotic cell death. *EMBO Rep.* 2014 Feb;15(2):155–64.
102. Molofsky AB, Byrne BG, Whitfield NN, Madigan CA, Fuse ET, Tateda K, et al. Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts *Legionella pneumophila* infection. *J Exp Med.* 2006 Apr;203(4):1093–104.
103. Wang Y, Gao W, Shi X, Ding J, Liu W, He H, et al. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through kaspaz-3 cleavage of a gasdermin. *Nature.* 2017 Jul;547(7661):99–103.
104. Robinson N, Ganesan R, Hegedűs C, Kovács K, Kufer TA, Virág L. Programmed necrotic cell death of macrophages: Focus on pyroptosis, necroptosis, and parthanatos. *Redox Biol.* 2019 Sep;26:101239.
105. Zheng X, Chen W, Gong F, Chen Y, Chen E. The role and mechanism of pyroptosis and potential therapeutic targets in sepsis: a review. *Front Immunol.* 2021;12:711939.
106. Krumm B, Xiang Y, Deng J. Structural biology of the IL-1 superfamily: key cytokines in the regulation of immune and inflammatory responses. *Protein Sci.* 2014 May;23(5):526–38.
107. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:519–50.
108. van de Veerdonk FL, Netea MG, Dinarello CA, Joosten LAB. Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection. *Trends Immunol.* 2011 Mar;32(3):110–6.
109. Evavold CL, Ruan J, Tan Y, Xia S, Wu H, Kagan JC. The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. *Immunity.* 2018 Jan;48(1):35-44.e6.
110. Chen KW, Groß CJ, Sotomayor FV, Stacey KJ, Tschopp J, Sweet MJ, et al. The neutrophil NLRC4 inflammasome selectively promotes IL-1 β maturation without pyroptosis during acute *Salmonella* challenge. *Cell Rep.* 2014

Jul;8(2):570–82.

111. Karmakar M, Katsnelson M, Malak HA, Greene NG, Howell SJ, Hise AG, et al. Neutrophil IL-1 β processing induced by pneumolysin is mediated by the NLRP3/ASC inflammasome and kaspaz-1 activation and is dependent on K⁺ efflux. *J Immunol*. 2015 Feb;194(4):1763–75.
112. Chandrasekaran A, Idelchik MDPS, Melendez JA. Redox control of senescence and age-related disease. *Redox Biol*. 2017 Apr;11:91–102.
113. Powers SK, Ji LL, Kavazis AN, Jackson MJ. Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Compr Physiol*. 2011 Apr;1(2):941–69.
114. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*. 1997 Mar;82(2):291–5.
115. Xia Z, Chen Y, Fan Q, Xue M. Oxidative stress-mediated reperfusion injury: mechanism and therapies. Vol. 2014, *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2014. p. 373081.
116. Adams L, Franco MC, Estevez AG. Reactive nitrogen species in cellular signaling. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2015 Jun;240(6):711–7.
117. Mikkelsen RB, Wardman P. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene*. 2003 Sep;22(37):5734–54.
118. Lane N. *Oxygen: the molecule that made the world*. Oxford University Press, USA; 2002.
119. Esterbauer H, Eckl P, Ortner A. Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutat Res*. 1990 May;238(3):223–33.
120. Demir A, Türker P, Önel FF, Sirvanci S, Findik A, Tarcan T. Effect of experimentally induced *Escherichia coli* epididymo-orchitis and ciprofloxacin treatment on rat spermatogenesis.
121. Li Y, Su Y, Zhou T, Hu Z, Wei J, Wang W, et al. Activation of the NLRP3 Inflammasome Pathway by Prokineticin 2 in Testicular Macrophages of

- Uropathogenic *Escherichia coli*- Induced Orchitis. *Front Immunol*. 2019;10:1872.
122. Lu Y, Bhushan S, Tchatalbachev S, Marconi M, Bergmann M, Weidner W, et al. Necrosis is the dominant cell death pathway in uropathogenic *Escherichia coli* elicited epididymo-orchitis and is responsible for damage of rat testis. *PLoS One*. 2013;8(1):e52919.
 123. Klein B, Bhushan S, Günther S, Middendorff R, Loveland KL, Hedger MP, et al. Differential tissue-specific damage caused by bacterial epididymo-orchitis in the mouse. *Mol Hum Reprod*. 2020 Apr;26(4):215–27.
 124. Classics Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265–75.
 125. Armstrong D, Al-Awadi F. Lipid peroxidation and retinopathy in streptozotocin-induced diabetes. *Free Radic Biol Med*. 1991;11(4):433–6.
 126. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric oxide*. 2001;5(1):62–71.
 127. Lysiak JJ. The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in the mammalian testis and their involvement in testicular torsion and autoimmune orchitis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004;2:1–10.
 128. Minutoli L, Puzzolo D, Rinaldi M, Irrera N, Marini H, Arcoraci V, et al. ROS-mediated NLRP3 inflammasome activation in brain, heart, kidney, and testis ischemia/reperfusion injury. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016.
 129. Wang KKW, Yuen P. Development and therapeutic potential of kalpain inhibitors. *Adv Pharmacol*. 1996;37:117–52.
 130. Wang Y, Lopez D, Davey PG, Cameron DJ, Nguyen K, Tran J, et al. Kalpain-1 and kalpain-2 play opposite roles in retinal ganglion cell degeneration induced by retinal ischemia/reperfusion injury. *Neurobiol Dis*. 2016;93:121–8.
 131. Kohli V, Madden JF, Bentley RC, Clavien P-A. Kalpain mediates ischemic

- injury of the liver through modulation of apoptosis and necrosis. *Gastroenterology*. 1999;116(1):168–78.
132. Shiraishi K, Naito K, Yoshida K. Inhibition of kalpain but not kaspaz protects the testis against injury after experimental testicular torsion of rat. *Biol Reprod*. 2000;63(5):1538–48.
 133. Cuzzocrea S, McDonald MC, Mazzon E, Siriwardena D, Serraino I, Dugo L, et al. Kalpain inhibitor I reduces the development of acute and chronic inflammation. *Am J Pathol*. 2000;157(6):2065–79.
 134. Jin R, Yang G, Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2010 May 1 [cited 2022 Apr 30];87(5):779–89.
 135. Zhang X-H, Li M-L, Wang B, Guo M-X, Zhu R-M. Kaspaz-1 inhibition alleviates acute renal injury in rats with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2014 Aug;20(30):10457–63.
 136. Lysiak JJ, Turner SD, Turner TT. Molecular pathway of germ cell apoptosis following ischemia/reperfusion of the rat testis. *Biol Reprod*. 2000;63(5):1465–72.
 137. Liang Y, Song P, Chen W, Xie X, Luo R, Su J, et al. Inhibition of kaspaz-1 ameliorates ischemia-associated blood-brain barrier dysfunction and integrity by suppressing pyroptosis activation. *Front Cell Neurosci*. 2021;14:540669.
 138. Murphy JM, Vince JE. Post-translational control of RIPK3 and MLKL mediated necroptotic cell death. *F1000Research*. 2015;4.
 139. Fritsch M, Günther SD, Schwarzer R, Albert M-C, Schorn F, Werthenbach JP, et al. Kaspaz-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis. *Nature*. 2019;575(7784):683–7.
 140. Li S, Zhang Y, Guan Z, Li H, Ye M, Chen X, et al. SARS-CoV-2 triggers inflammatory responses and cell death through kaspaz-8 activation. *Signal Transduct Target Ther*. 2020 Oct;5(1):235.

141. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*. 2010 Mar;140(6):821–32.
142. Yamis S, Gedik A, Sahin H, Batun S, Nergiz Y, Bircan K. Is procalcitonin valuable in the differential diagnosis of testicular torsion and epididymo-orchitis. *Saudi Med J*. 2010;31(2):170–4.
143. Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory kaspazs determines pyroptotic cell death. *Nature*. 2015 Oct;526(7575):660–5.
144. Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, O'Rourke K, Anderson K, Warming S, et al. Kaspaz-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature*. 2015 Oct;526(7575):666–71.
145. Bergh A, Söder O. Interleukin-1 β , but not interleukin-1 α , induces acute inflammation-like changes in the testicular microcirculation of adult rats. *J Reprod Immunol*. 1990;17(2):155–65.
146. Fouad AA, Abdel-Aziz AM, Hamouda AAH. Diacerein downregulates NLRP3/Kaspaz-1/IL-1 β and IL-6/STAT3 pathways of inflammation and apoptosis in a rat model of cadmium testicular toxicity. *Biol Trace Elem Res*. 2020;195(2):499–505.
147. Huang C, Zhang W, Sun A, Zhang X, Guo J, Ji R, et al. Methane Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Acute Orchitis by Anti-inflammatory, Antioxidative, and Antiapoptotic Effects via Regulation of the PK2/PKR1 Pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:7075836.
148. Turner TT, Bang HJ, Lysiak JL. The molecular pathology of experimental testicular torsion suggests adjunct therapy to surgical repair. *J Urol*. 2004 Dec;172(6 Pt 2):2574–8.
149. Pilatz A, Fijak M, Wagenlehner F, Schuppe H-C. [Orchitis]. *Urologe A*. 2019 Jun;58(6):697–710.
150. Wu H, Wang D, Shu Z, Zhou H, Zuo H, Wang S, et al. Cytokines produced by microwave-radiated Sertoli cells interfere with spermatogenesis in rat testis. *Andrologia*. 2012;44:590–9.

151. Theas MS, Jacobo PV, Pérez CV, Guazzone VA, Lustig L. Inflammation and spermatogenesis. In: Spermatogenesis. CRC Press; 2018. p. 63–72.

Finansal Destek: Bu çalışma, Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: 2021/093).

