

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TESTİKÜLER TORSİYON DETORSİYON UYGULANAN RATLARDA
SULODEKSİDİN NLRP3 ARACILI PİROPTOZİS YOLAĞI
ÜZERİNDEN REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ
DR. ÇAĞLA KÖSA

TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi ZEYNEP YIĞMAN

ANKARA
HAZİRAN 2025

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TESTİKÜLER TORSİYON DETORSİYON UYGULANAN RATLARDA
SULODEKSİDİN NLRP3 ARACILI PİROPTOZİS YOLAĞI
ÜZERİNDEN REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ
DR. ÇAĞLA KÖSA

TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi ZEYNEP YIĞMAN

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından
TTU-2024-9553 proje numarasıyla desteklenmiştir.

ANKARA
HAZİRAN 2025

TEŞEKKÜR

Bize çağdaşlığın yolunu açan, düşünceleriyle bir ulusun kaderini değiştiren, özgürlüğün ve ilerlemenin simgesi olan Cumhuriyetimizin kurucusu Gazi Mustafa Kemal Atatürk'e, bıraktığı eşsiz miras ve ışığımız olan ilkeleri için sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

Uzmanlık eğitimim ve tez sürecimde, bilgi ve deneyimleriyle bana rehberlik eden, her zaman yanımda olduklarını hissettiren, birlikte göğüs gerdiğimiz tüm zorluklara rağmen, inançlarını hiç kaybetmeden bana yol gösteren hem akademik hem de kişisel gelişimimde unutulmaz bir iz bırakan kıymetli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Yığman'a ve Prof. Dr. Suna Ömeroğlu'na gönülden teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimime katkı sağlayan Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalının değerli hocaları, Sayın Prof. Dr. Gülnur Take Kaplanoğlu'na, Sayın Prof. Dr. Çiğdem Elmas'a, Sayın Doç. Dr. Cemile Merve Seymen'e, Sayın Dr. Öğretim Üyesi Süheyla Esra Savari Özkoçer'e, Sayın Dr. Öğretim Üyesi Duygu Dayanır'a teşekkür ederim.

Bilgi ve tecrübesi ile tez çalışmamdaki emek ve katkılarından dolayı Doç. Dr. Metin Yığman'a, Dr. Öğr. Üyesi Kerem Atalar'a Prof. Dr. Mustafa Arslan'a ve Prof. Dr. Ayşegül Küçük'e teşekkürlerimi sunarım. Tez sürecim boyunca her soruma hiç yorulmadan cevap veren, desteğini hiç eksik etmeyen Arş. Gör. Dr. Müşerref Şeyma Ceyhan'a gönülden teşekkür ederim. Laboratuvar tecrübelerime olan değerli katkılarından dolayı Sayın Dr. Öğretim Üyesi Ayşe Meltem Sevgili'ye ve Dr. Hale Gökdağdır'a derin şükranlarımı sunarım. Tez sürecindeki değerli katkı ve desteği için sevgili arkadaşım Elnara Madadzada'ya gönülden teşekkür ederim. Sağladıkları bilimsel araştırma ortamı ve kaynak erişimi için başta Prof. Dr. Meltem Bahçelioğlu ve Prof. Dr. Hayrunnisa Bolay Belen olmak üzere tüm NÖROM ailesine teşekkür ederim. Tez süresince hep yanımda olan, desteğini ve inancını hiç eksik etmeyen, zorlayıcı anlarda gösterdiği anlayış, sabır ve moral verici desteği için geleceğin en iyi akademisyen ve anatomistlerinden biri olacağına inandığım,

çok sevgili arkadaşım Araş. Gör. Dr. Burcu Gözükara Eriş'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Beni bugünlere getiren, hep arkamda olduklarını hissettiğim çok sevgili annem Ayşe Ayvaz Kösa ve babam Yusuf Kösa'ya tüm emekleri için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Çağla KÖSA

Haziran-2025





Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

TEZ SINAV TUTANAĞI

Adı ve Soyadı	Çağla Kösa
Baba Adı	Yusuf Kösa
Doğum Yeri/Tarihi	İstanbul / 02.09.1996
Diploma Tarihi / Diploma No	30.06.2021 / 13/2021/0287
Mezun Olduğu Fakülte	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
İhtisas Yaptığı Anabilim Dalı/Bilim Dalı	Histoloji ve Embriyoloji
İhtisas Süresi	Yıl: 3
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
Sınav Tarihi	03.06.2025

UZMANLIK TEZİNİN ADI: Testiküler torsiyon detorsiyon uygulanan ratlarda sulodeksidin NLRP3 aracılı piroptosis yolağı üzerinden reperfüzyon hasarı üzerine etkisinin araştırılması

JÜRİ KARARI:

JÜRİ ÜYELERİ

BAŞKAN

Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU

ÜYE

Dr. Öğr. Üyesi Zeynep YIĞMAN

ÜYE

Dr. Öğr. Üyesi Hilal NAKKAŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
4-HNE	4-hydroxynoneal
AMH	Anti-müllerian hormon
ASC	Kaspaz alım domaini içeren adaptör apoptozisle ilişkili tanecik benzeri protein
AT III	Antitrombin III
CARD	Kaspaz aktivasyon ve alım domaini
CAT	Katalaz
CS	Cosentino skoru
DAMP	Hasar ilişkili moleküler desenler
dk	Dakika
FGF 9	Fibroblast büyüme faktörü 9
gr	Gram
GSDMD	Gasdermin-D
GSDMD-N	N-terminal dizisine sahip gasdermin-D
HC II	Heparin kofaktör II
HE	Hematoksilen-eozin
IFN-γ	İnterferon gama
IL-18	İnterlökin 18
IL-1β	İnterlökin 1 β
IU	İnternasyonal ünite
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit
JSBS	Johnsen skoru benzeri skor
Kaspaz 1	Sisteinil aspartat spesifik proteinaz 1
kg	Kilogram
MCP-1	Monosit kemotaktik protein-1
MDA	Malondialdehit

mg	Miligram
ml	Mililitre
MMP-9	Matriks metalloproteinaz-9
NLR	Nod benzeri reseptör
NLRP-3	NOD benzeri reseptör termal protein birimi ilişkili protein 3
nm	Nanometre
OSTÇ	Ortalama seminifer tübül çapı
PAMP	Patojen ilişkili moleküler desenler
PAS	Periyodik asit Schiff
PBS	Fosfat tamponlu salin
PRR	Patern tanıma reseptörleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
sE-selektin	Serum endotelial selektin
sICAM-1	Serum intracellular adhesion molecule 1
sP-selektin	Serum platelet seketin
TGF-β1	Dönüştürücü büyüme faktörü beta 1
TLR	Toll benzeri reseptör
TNF-α	Tümör nekrozis faktör alfa
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü
XO	Ksantin oksidaz
α	Alfa
β	Beta
μm	Mikrometre

İÇİNDEKİLER

Teşekkür	i
Tez sınav Tutanağı	iii
Simgeler ve Kısaltmalar	iv
İçindekiler	vi
Tablolar Listesi	viii
Şekiller Listesi	ix
Resimler Listesi	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Testis Anatomisi	4
2.2. Testis Histofizyolojisi	13
2.3. Testis Embriyolojisi	27
2.4. Testis Torsiyon-Detorsiyonu	34
2.5. Malondialdehit (MDA) ve Katalaz	38
2.6. Piroptosis	40
2.7. Sulodeksid	42
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	47
3.1. Hayvanlarda Torsiyon-Detorsiyon Modelinin Oluşturulması ve Etken Maddenin Uygulanması	47
3.2. Testis Doku Örneklerinde Biyokimyasal Analizler	50
3.3. Testis Doku Örneklerinde Histolojik Analizler	51
3.3.1. Testis doku örneklerinin hematoksil-eozin boyanması ve boyalı preparatların incelenmesi	52
3.3.1.1. Hematoksil-eozin boyalı örneklerde torsiyon detorsiyonun neden olduğu iskemi reperfüzyon hasarının histopatolojik bulgularının değerlendirilmesi	53
3.3.1.2. Hematoksil-eozin boyalı örneklerde johnsen skoru benzeri skorlama	54

3.3.1.3. Hematoksilen-eozin boyalı örneklerde cosentino skorlaması	55
3.3.1.4. Hematoksilen-eozin boyalı örneklerde seminifer tübül çapı ölçümleri	56
3.3.2. Testis doku örneklerinde immunohistokimyasal boyamalar ve boyalı kesitlerde immunoreaktivitenin değerlendirilmesi	56
3.4. İstatistiksel Analizler	59
4. BULGULAR	60
4.1. Biyokimyasal Bulgular	60
4.2. Hematoksilen Eozin Boyalı Kesitlerin Değerlendirme Sonuçları	60
4.2.1. Torsiyon detorsiyonun neden olduğu iskemi reperfüzyon hasarının histopatolojik bulgularının değerlendirme sonuçları	61
4.2.2. Johnsen skoru benzeri skorlama ve cosentino skorlaması sonuçları	67
4.2.3. Seminifer tübül çapı ölçümleri sonuçları	69
4.3. İmmunohistokimyasal Değerlendirme Sonuçları	71
5. TARTIŞMA	77
6. SONUÇLAR	91
7. KAYNAKÇA	93
8. ÖZET	101
9. SUMMARY	103
10. EKLER	105
Ek-1. Deney Hayvanları Etik Kurul Onay Belgesi	105
Ek-2. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu Sertifikası	107
11. ÖZGEÇMİŞ	108

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Johnsen skoru benzeri skor	55
Tablo 2. Cosentino skoru	56
Tablo 3. Testis doku örneklerinde MDA düzeyi ve CAT enzim aktivitesi bulguları	60
Tablo 4. Testis dokusunda torsiyon detorsiyonun neden olduğu iskemi reperfüzyon doku hasarının histopatolojik bulguları	61
Tablo 5. Testis doku örneklerinde Johnsen skoru benzeri skorlama ve Cosentino skorlaması bulguları	68
Tablo 6. Testis doku örneklerinde seminifer tübül çapı ölçümlerine ait bulgular	70
Tablo 7. Testis doku örneklerinde IL-1 β , GSDMN, IL-18, NLRP3 ve aktif kaspaz-1 immün boyanma yoğunluğu değerlendirme bulguları	71

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Spermatik kordun karın ön duvarı ile ilişkisini gösteren şematik çizim	5
Şekil 2. Sağ testisin fascia cremasterica ve tunica vaginalis parietal yaprağı açılmış şekilde şematik gösterimi	7
Şekil 3. Ductuli efferenteslerin düzenlenimini, ductus epididimis ve ductus deferens yapısını gösteren şematik çizim	10
Şekil 4. Spermatik kord içinden geçen yapıların şematik gösterimi	12
Şekil 5. Testisin sagittal planda gösterimi	15
Şekil 6. Sertoli hücreleri, spermatogonia ve spermatidlerin farklı evrelerdeki görünümelerini içeren testis enine kesiti	17
Şekil 7. Birkaç seminifer tübülü gösteren kesit	18
Şekil 8. Sertoli hücreleri, spermatogonia ve farklı evrelerdeki spermatidleri gösteren seminifer tübül enine kesiti	19
Şekil 9. Spermatogenik hücre jenerasyonlarını gösteren şematik diyagram	20
Şekil 10. Seminifer tübül, tubuli recti, rete testis ve ductuli efferentes	24
Şekil 11. Ductus deferens enine kesiti	26
Şekil 12. 3 haftalık bir embriyoda allantoisin bağlandığı bölgeye yakın, yolk kesesi duvarında bulunan primordial germ hücreleri	27
Şekil 13. 6 haftalık bir embriyonun lomber bölgesinden alınan transvers kesit	29

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. Sham grubundan hayvanların HE boyalı testis kesitlerine ait mikrograflar	62
Resim 2. SUL grubundan hayvanların HE boyalı testis kesitlerine ait mikrograflar	63
Resim 3. T/D grubundan hayvanların HE boyalı testis kesitlerine ait mikrograflar	64
Resim 4. T/D grubundan hayvanların HE boyalı testis kesitlerine ait mikrograflar	65
Resim 5. T/D-SUL grubundan hayvanların HE boyalı testis kesitlerine ait mikrograflar	67
Resim 6. Sham (A), SUL (B), T/D (C) ve T/D-SUL (D) grubundan sıçanların testis dokusu HE boyalı preparasyonlarına ait mikrograflar	69
Resim 7. Sham (A), SUL (B), T/D (C) ve T/D-SUL (D) grubundan sıçanların testis dokusu HE boyalı preparasyonlarına ait mikrograflar	70
Resim 8. Sham (A), SUL (B), T/D (C) ve T/D-SUL (D) grubundan sıçanların NLRP3 antikoruyla immün boyanan testis kesitlerine ait mikrograflar	72
Resim 9. Sham (A), SUL (B), T/D (C) ve T/D-SUL (D) grubundan sıçanların aktif kaspaz-1 antikoruyla immün boyanan testis kesitlerine ait mikrograflar	73
Resim 10. Sham (A), SUL (B), T/D (C) ve T/D-SUL (D) grubundan sıçanların GSDMN antikoruyla immün boyanan testis kesitlerine ait mikrograflar.	74
Resim 11. Sham (A), SUL (B), T/D (C) ve T/D-SUL (D) grubundan sıçanların IL-1 β antikoruyla immün boyanan testis kesitlerine ait mikrograflar	75

Resim 12. Sham (A), SUL (B), T/D (C) ve T/D-SUL (D) grubundan sıçanların IL-18 antikoruyla immün boyanan testis kesitlerine ait mikrograflar

76



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Testis torsiyonu, spermatik kordun bükülmesi sonucu testis kan akımının kaybıyla karakterize ürolojik bir acil durumdur(1,2). Çoğunlukla adolesan dönemdeki erkeklerde görülen bu durum, germ hücre kaybına, sperm üretiminde azalmaya, Leydig hücre fonksiyonlarında azalmaya ve tüm bu hasarlar sonucunda infertiliteye neden olmaktadır (1,3).Hasarın şiddetini belirleyen en önemli parametreler torsiyonun süresi ve kordun dönme derecesi olup, iskemik hasarı ve dolayısıyla germ hücre kaybını önlemek ya da azaltmak için torsiyon hızlı bir şekilde düzeltilmeli ve testiküler kan akımı yeniden sağlanmalıdır (2,3). Testiküler kan akımının yeniden sağlanması için yapılan detorsiyon ise torsiyonun neden olduğu iskemik hasara, reperfüzyon hasarı sürecini de eklemektedir. Torsiyon sonucu oluşan iskemi ATP'nin azalmasıyla ksantin ve hipoksantin üretiminin artmasına neden olurken bir yandan da hücre içi kalsiyum artışı ve ksantin oksidaz aktivitesinde artış olmaktadır (4). İskemi ile testiküler dokuda reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesindeki muhtemel nedenlerden biri hipoksantin-ksantin oksidaz enzim etkinliğidir (2).Torsiyon sonrası serbest oksijen radikallerini üreten bu gibi enzim etkinliği ile oluşan oksidatif stres bir yandan DNA hasarına yol açarken diğer taraftan da hem mitokondri hem de plazma membran lipidlerinde peroksidasyona neden olmaktadır ki bu durum endotel hasarı ve germinal hücrelerin apoptozunu tetiklerken, hücre hasarı da proinflamatuvar sitokinlerin salınımına da neden olmaktadır (1–3). Torsiyon ayrıca testiküler venöz endotel hücrelerinde sICAM-1, sP-selektin, sE-selektin ve tenaskin gibi hücre adezyon

moleküllerinin ekspresyonunu da uyarmaktadır (2). Reperfüzyon ile dokuya kan akımının artması ve dokunun tekrar oksijenasyonu sonucu reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu daha da artarken, kan akımıyla bölgeye yoğun bir şekilde göç eden nötrofiller ekspresyonu artan adezyon molekülleri sayesinde mikrovasküler endoteline bağlanarak dokuya geçer ve miyeloperoksidaz enzim etkinliği ile ROS üretimine katkıda bulunur ve dolayısıyla vasküler ve doku hasarını şiddetlendirir (2,3,5). Sadece germ hücre apoptozu değil, testisteki tüm hücre popülasyonları göz önünde bulundurulduğunda Leydig hücreleri ve bu hücrelerden salınan ve spermatogenezi destekleyen testosteron üretimi de iskemi-reperfüzyon sonrası olumsuz etkilenmektedir (3). Bu da testiküler atrofi ile subfertilite ve infertilite gibi durumlara neden olmaktadır (2,5).

Programlı hücre ölümlerinden biri olan piroptozis, sisteinil aspartat spesifik proteinaz 1 (kaspaz 1)'in NLRP-3 (NOD benzeri reseptör termal protein birimi ilişkili protein-3) inflamazomu tarafından aktive edilmesi ile başlar. Aktif kaspaz 1, GSDMD (gasdermin-D)'yi aktive ederek N-terminal dizisine sahip GSDMD-N oluşumunu sağlar. GSDMD-N hücre zarına bağlanarak membran porlarının oluşumunu sağlar. Bu durum ise IL-18 ve IL-1 β gibi pro-inflamatuar sitokin salınımı ve piroptozisin başlaması ile sonuçlanır (6).

Piroptozis morfolojisi ve düzenleyici mekanizmaları, nekroz ve apoptoz gibi diğer hücre ölüm şekillerinden farklılık gösterir. NLRP-3, çeşitli patojen ilişkili moleküler desenler (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) ya da hasar ilişkili moleküler desenler (damage-associated molecular patterns, DAMP) ile aktive olur ve piroptozisde rol oynar (6). İnflamazomlar, konak enfeksiyona direnç

gösterdiğinde aktive olan ve ayrıca adaptif immun yanıtın gelişmesini kolaylaştıran multimoleküler komplekslerdir (7). Piroptosis özellikle enfeksiyöz hastalıkların gelişiminde rol almaktadır. Bununla birlikte inflamazomlar mikrobik olmayan hastalıklarla da ilişkili olduğundan piropitozis nörolojik ve aterosklerotik hastalıkların gelişiminde de rol almakta ve hatta son çalışmalar, çeşitli organların iskemi reperfüzyon hasarında piropotik ölümün meydana geldiğini ve testiküler iskemi reperfüzyon dahil birtakım testiküler hastalıklarda da NLRP-3 ekspresyonunun arttığını bildirmektedir (6,7). Sano ve arkadaşları lipopolisakkaritle indüklenen sistemik infalamasyonun testiste NLRP-3 üzerinden etkisini incelenmiş ve testisin NLRP-3 inflamazomuna dayalı IL-1 β eksprese ettiğini göstermişlerdir (8).

Domuz bağırsak mukozasından elde edilen sulodeksid, %80 iduronilglukozaminoglikan sülfat (elektroforezde hızlı hareket eden heparin) ve %20 dermatan sülfat olmak üzere iki farklı fraksiyondan oluşan bir glukozaminoglikandır (9). Endotel koruyucu, antitrombotik, antioksidan, anti-inflamatuvar, anti-apoptotik özelliklere ve yara iyileştirici etkilere sahiptir (10,11). Tip 2 diyabette bozulan glukokaliksin ve artan damar geçirgenliğinin sulodeksid uygulamasını takiben düzeldiği görülmüştür (12). Biz de bu araştırmamızda testis torsiyon-detorsiyon modelinde, iskemi-reperfüzyon hasarının önemli bileşenlerinden olan oksidatif stres, inflamasyon, endotel hasarı ve mikrovasküler trombozu azaltmaya yönelik, anti-trombotik, antioksidan ve anti-inflamatuvar özelliklere sahip olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konuşmuş olan sulodeksidin etkinliğini araştırmayı hedefledik.

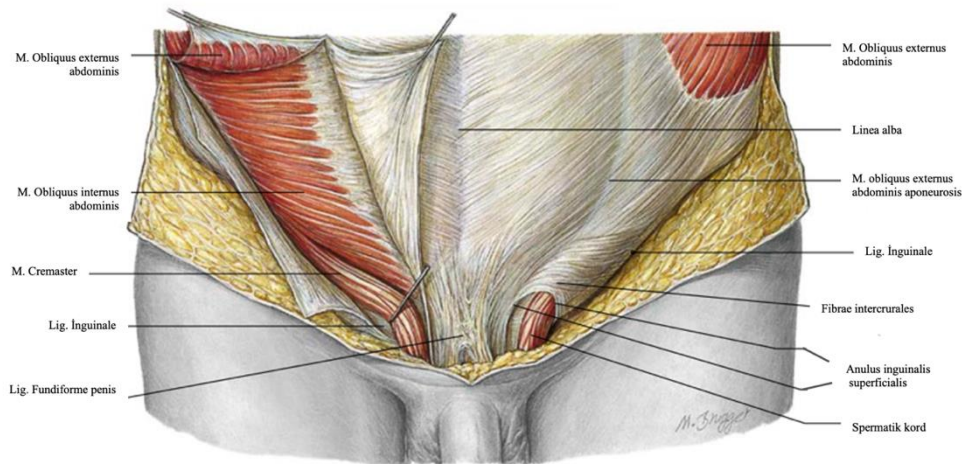
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Anatomisi

Erkek iç genital organlar testis, ductus epididimis, ductus deferens, vesicula seminalis, ductus ejaculatorius, glandula (gl) prostatica ve gl. bulbourethralis'den oluşmaktadır (13). Bu bölgenin anatomisini anlamak için inguinal kanal anatomisinden bahsetmek gerekir. Canalis inguinalis fetal dönemde testisin yetişkindeki anatomik konumuna gelebilmesini sağlayan, 4 cm uzunluğunda, anterolateral karın duvarının inferior parçasından inferomediale doğru oblik biçimde uzanan, ligamentum inguinalenin medial yarısının üzerinde ve ona paralel uzanan testisle yakın ilişkide olan bir kanaldır (13). İçerisinden spermatik kord, kan ve lenf damarları, nervus ilioinguinalis ve nervus genitofemoralisin genital dalı geçmektedir. Kanalin girişi, ligamentum inguinale'nin superiorunda ve arteria epigastrica inferior'un lateralinde yerleşen derin inguinal halka olan fascia transversalis'in evajinasyonu ile oluşur. Kanalin çıkışı tuberculum pubicum'un superolateralinde bulunan, musculus obliquus externus abdominis'in aponeurosis lifleri tarafından oluşturulan anulus inguinalis superficialis'tir. Anulus inguinalis superficialis'in lateral ve medialinde uzanan ve sınırlarını oluşturan liflere crura ismi verilir (13).

Testis, posterior abdominal duvarın superior lumbal bölgesinde extraperitoneal bağ dokusu içerisinde gelişir. Gubernaculum, primordial testisi anterolateral abdominal duvara bağlayan fibröz bir yapıdır. Peritoneal bir divertikül olan processus vaginalis ise gelişmekte olan canalis inguinalis'ten geçerek,

anterolateral abdominal duvarın kas ve fascia tabakalarını önünde taşıyıp scrotum'a inerek testise rehberlik eden rehber yapıdır (13). Canalis inguinalis'in anterior duvarı, aponeurosis musculi obliqui externi abdominis tarafından oluşturulur, internal parçası fibrae musculi obliqui interni abdominis tarafından güçlendirilir (Şekil 1). Posterior duvarı, fascia transversalis tarafından oluşturulur ve pars medialisi musculus obliquus internus abdominis ve musculus transversus abdominis kasları tarafından güçlendirilir ve bu kasların tendonlarının birlikte oluşturduğu yapıya falx inguinalis adı verilir (Şekil 1) (14). Çatısı lateralde fascia transversalis, merkezde arcus musculoaponeuroticus musculi obliqui interni abdominis, medialde crus mediale musculi obliqui externi abdominis tarafından oluşturulurken; tabanı lateralde tractus iliopubicus, ortada katlanmış ligamentum inguinale'nin oluşturduğu oluk ve medialde ligamentum lacunare tarafından oluşturulur (14).

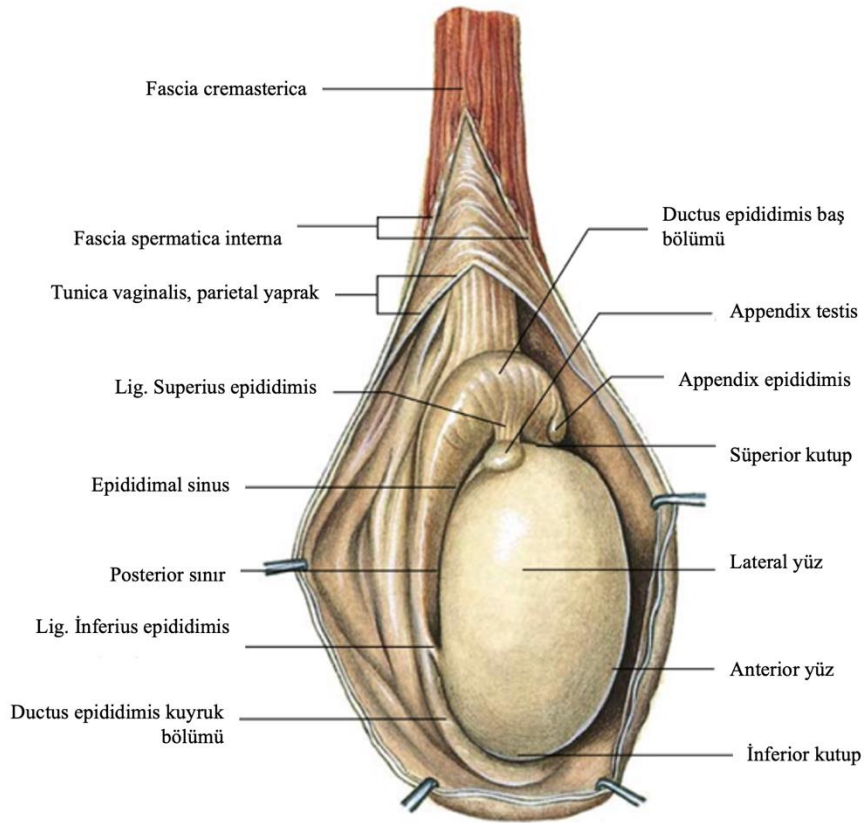


Şekil 1. Spermatik kordun karın ön duvarı ile ilişkisini gösteren şematik çizim (15) (Türkçe'ye çevrilmiştir)

Gelişimin 12. haftasında testis pelviste konumlanmışken, 28. haftada derin inguinal halkaya yakın bir konumda yerleşmiştir. Testis canalis inguinalis içinden geçmeye gelişimin 28. haftası civarında başlar ve bu yaklaşık 3 gün sürer ve bundan yaklaşık 4 hafta sonra ise testis skrotuma inmiş olur. Testisle beraber, ductus deferens, damar ve sinir yapıları da yer değiştirir ve anterolateral abdominal duvarın muskulofasyal uzantısı ile kaplanır. Bu yapılar yetişkin skrotumda fascia spermatica interna, musculus cremaster ve fascia spermatica externa olarak karşımıza çıkacaktır. Prosesus vaginalis, en alt kısmı hariç gelişimin 6. ayından itibaren obliterasyona uğrar; bu en alt kısım, testisi saran seröz bir kese olan tunica vaginalis'i oluşturur (14). Testisler sperm üretiminden, testosteron başta olmak üzere hormon üretiminden sorumlu spermatik kordlar ile skrotuma asılmış çift taraflı organlardır. Sol testis anatomik olarak sağdan daha inferiorda yer alır (14). Testisler, yerleşimleri ve plexus pampiniformis sayesinde vücut sıcaklığından 3-4°C daha düşük sıcaklıkta bulunurlar (15).

Her testisin yüzeyi içten dışa doğru 3 tabaka kapsül ile çevrilidir: 1-Tunica vasculosa, kan damarı pleksusları ve gevşek bağ dokusundan oluşur, 2-Tunica albuginea, primer olarak kollajen liflerinden oluşan tabakadır, 3-Tunica vaginalis, processus vaginalisin distal kalıntısıdır (Şekil 2) (15). Tunica vaginalisin üzerini fascia spermatica interna örter. Tunica vaginalisin parietal tabakası visseral tabakaya göre daha geniştir ve spermatik kordun süperioruna uzanır.. Visseral ve parietal tabakalar arasında yer alan sıvı testisin skrotum içinde serbest bir şekilde hareket etmesini sağlar (14). Tunica albuginea fibröz bağ dokusundan oluşan bir kılıftır. Bu yapı, testisin iç kısmında, arka yüzeyde bir sırt oluşturarak rete testisin

bulunduğu mediastinum testis'i oluşturur ve mediastinumdan çıkan fibröz septalar testisi içinde sperm üretiminin gerçekleştiği seminifer tübüllerin bulunduğu lobüllere ayırır. Seminifer tübüller, rete testis'e tubuli recti ile bağlanır (14).



Şekil 2. Sağ testisin fascia cremasterica ve tunica vaginalis parietal yaprağı açılmış şekilde şematik gösterimi (15) (Türkçe'ye çevrilmiştir)

Testis ve epididimisin arterial beslenmesi 3 kaynaktan gerçekleşir: arteria testicularis, arteria ductus deferentis ve arteria cremasterica (15). Arteria testicularis, aorta abdominalis'ten, arteria renalis'in hemen altından çıkar. Retroperitoneal olarak oblik şekilde ilerler, üreter ve arteria iliaca eksternayı çaprazlayarak derin inguinal halkaya ulaşır ve canalis inguinalis'ten geçerek yüzeysel inguinal halkadan çıkıp spermatik korda katılır. Testis ve epididimisten

köken alan venler ise plexus pampiniformis'i oluşturur. Bu pleksus 8-12 adet venden oluşur ve spermatik kord içerisinde arteria testicularisin etrafını çevreler (15).

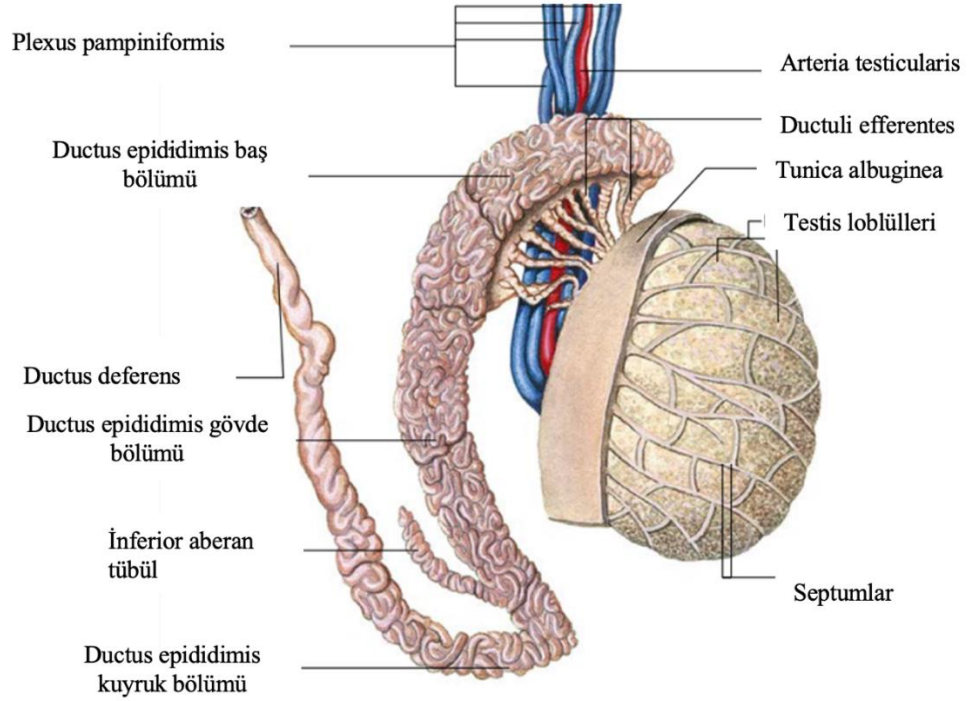
Plexus pampiniformis, musculus cremaster ve tunica dartos ile testisin termoregülasyonunu da sağlar. Her iki testisten gelen plexus pampiniformis'ler sağ ve sol vena testicularis'i oluşturur. Sağ vena testicularis, vena cava inferior'a; sol vena testicularis, vena renalis sinistra'ya açılır (14). Lenfatik drenaj ise arteria testicularisi takip ederek sağ ve sol lomber ve pre-aortik lenf nodlarına gerçekleşir. Testisin otonomik sinirleri ise arteria testicularis üzerinde plexus testicularis olarak başlar ve T10-11 sempatik lifleri, visseral afferent lifleri ve parasempatik vagal lifleri içerir (14).

Epididimis testisin arka yüzeyinde bulunur ve sıkıca katlanmış kanallardan oluşur. Yeni üretilen spermier ductuli efferentesler ile rete testisten epididimise iletilir. Epididimis kanal yapısı baş kısmından testisin süperioruna, kuyruk kısmına doğru ilerledikçe küçülür. Epididimis süperiorda yer alan genişlemiş, 12-14 tane ductuli efferentesin kıvrılmasıyla meydana gelmiş olan baş, sıkıca kıvrılmış kanallardan oluşan ve esas kısım olan gövde ve spermierin ductus deferens ardından da ductuli ejaculatoriusa aktarıldığı kuyruk kısımlarından meydana gelir (13,14). Epididimis boyunca spermier depolanır ve olgunlaşmaya devam eder (14).

Ductus deferens, epididimisin devamı olan kanal yapısıdır (Şekil 3). Daha kalın bir kas tabakası ve daha ince bir lümene sahiptir. Testisin inferior kutbundan, epididimisin kuyruğundan başlar ve testisin posterioru ve epididimisin medialinden yukarı devam eder. Spermatik kordun ana komponentini oluşturur. Eksternal iliak damarları çaprazlayarak pelvise girer ve vesicula seminalisin kanalına katılarak

ductus ejaculatoriusu oluşturur (14). Arterial beslenmesi genellikle arteria vesicalis superior, bazen arteria vesicalis inferior tarafından sağlanır. Venleri ise vena testicularise boşalır, uç kısmı ise plexus venosus vesicalis ve prostaticusa boşalır (13,14).

Ductuli ejaculatorius, vesicula seminalisin kanalı ve ductus deferensin birleşmesi ile oluşan kanaldır. Mesane boynuna yakın bir bۆlgeden başlar ve prostatik utrikۆlۆn yakın komşuluğunda ilerler. Bu kanallar birleşerek utriculus prostaticus ağıklığı ۆzerinde ya da hemen içinde bulunan kۆۆk, yarık şeklindeki deliklerle colliculus seminalis ۆzerine açılırlar. Ductus ejaculatorius prostat dokusunun içinden geçse de prostat salgılarının seminal sıvıya karışması ancak ductus ejaculatorius urethra prostaticaya açıldıktan sonra gerçekleşir (14). Arterial beslenmesi arteriae ductus deferentis tarafından sağlanır, venۆz drenajı ise plexus venosus prostaticus ve plexus venosus vesicalise olur (15).



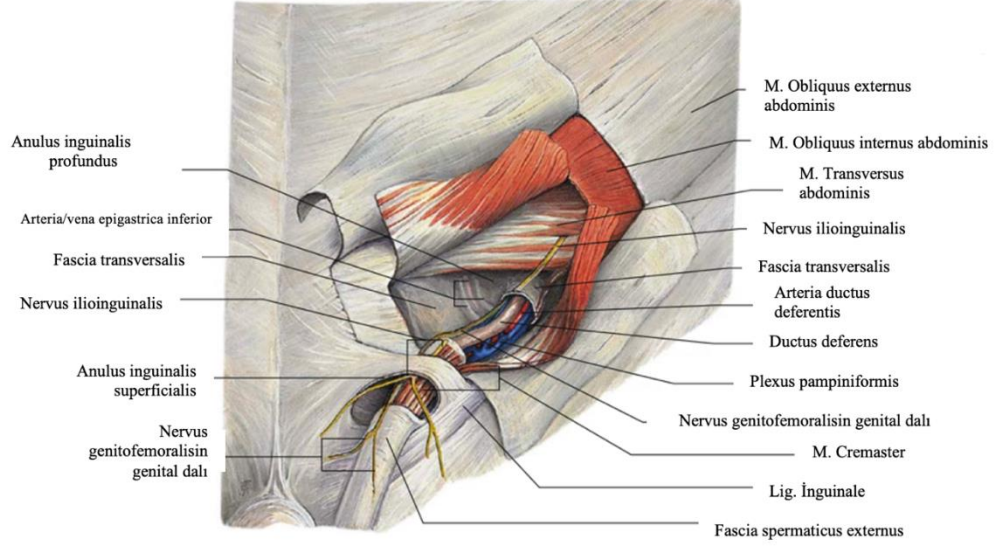
Şekil 3. Ductuli efferenteslerin düzenlenimini, ductus epididimis ve ductus deferens yapısını gösteren şematik çizim (15) (Türkçe'ye çevrilmiştir)

Spermatik kordlar testisi skrotuma asmakla beraber skrotuma giren ve çıkan arter, ven, lenf damarı ve sinir gibi yapıları içerir. Spermatik kordlar derin inguinal halkadan başlar, canalis inguinalis boyunca devam eder ve yüzeysel inguinal halkadan kanalı terk eder ve skrotuma girerek testisin posterior sınırında sonlanır. Fasiyal örtü ise anterolateral abdominal duvardan köken alarak spermatik kordu çevreler (13,14)

Spermatik kordu saran fascialar köken aldıkları yapılarla birlikte içten dışa doğru şu şekildedir:

- 1- Fascia spermatica interna: fascia transversalisten köken alır.
- 2- Fascia cremasterica: musculus obliquus internus abdominis yüzeyel ve derin yüzeylerini saran fasciadan gelişir.
- 3- Fascia spermatica externa: musculus obliquus externus abdominis aponeurosis ve fascialarından gelişir (14).

Fascia cremasterica, musculus obliquus internus abdominis alt liflerinin oluşturduğu musculus cremasteri içerir (Şekil 4). Musculus cremaster, özellikle soğuğa tepki olarak, testisi refleks olarak skrotum içinde yukarı çeker. Sıcak bir ortamda, musculus cremaster gevşer ve testis skrotum içinde aşağı iner. Her iki yanıt da spermatogenezis için yaklaşık olarak vücut sıcaklığından bir derece daha serin bir sıcaklık gerektiren testis sıcaklığını düzenleme amacı taşır veya cinsel aktivite sırasında koruyucu bir tepki olarak ortaya çıkar (14). Somatik innervasyon da alan çizgili kas özelliğindeki musculus cremaster, otonomik innervasyonla uyarılan, genellikle skrotumun yağsız subkutan dokusunun (fascia dartos) düz kası olan musculus dartos ile eşzamanlı olarak hareket eder. Musculus dartos, aynı uyarıcılara tepki olarak skrotum derisinde kasılmaya neden olarak testislerin yükselmesine yardımcı olur (15).



Şekil 4. Spermatik kord içinden geçen yapıların şematik gösterimi (15) (Türkçe'ye çevrilmiştir)

Spermatik kordlar aşağıdaki yapıları içerir:

- 1- Ductus deferens: Spermeleri epididimisten ductus ejaculatoriusa taşır.
- 2- Arteria testicularis: Aortadan köken alarak testis ve epididimisi besler.
- 3- Arteria ductus deferentis: Arteria vesicalis inferiordan köken alır.
- 4- Arteria cremasterica: Arteria epigastrica inferiordan köken alır.
- 5- Plexus pampiniformis: Süperiorda sağ veya sol vena testicularis olarak birleşen 12 adete kadar venden oluşabilen venöz ağ
- 6- Sempatik sinir lifleri
- 7- Nervus genitofemorailsin genital dalı
- 8- Lenf damarları: testis ve etrafındaki yapıların lenfatik drenajını lumbar lenf nodlarına taşır.
- 9- Processus vaginalis kalıntısı: Abdominal periton ile tunica vaginalis arasında uzanır, spermatik kordun ön kısmında fibröz bir iplikçik olarak görülebilir.

Skrotum pigmente bir deri ve fascia dartostan oluşan, labioskrotal şişliklerden gelişen kütanöz bir kesedir ve fascia dartosun devamı (septum) ile içerden ikiye bölünür. Yüzeyel dartos fasyası önde abdomenin subkutanöz dokusunun membranöz tabakası (scarpa) ile devam ederken, arkada perineumun subkutanöz dokusunun membranöz tabakası (colles) ile devam eder (14).

Skrotumun arterial beslenmesi arteria pudenda internanın dalı olan arteria perinealis posteriorun skrotal dalı, arteria femoralisten dallanan derin arteria pudenda eksternanın anterior skrotral dalı ve arteria epigastrica inferiorun bir dalı olan arteria cremasterica tarafından sağlanırken skrotal venler arterlere eşlik eder ve lenfatik drenajı yüzeyel inguinal lenf nodlarına olur (14). Skrotuma ait nöronlar lomber pleksusa ve sakral pleksusa ait dallardan köken alır: nervus genitofemoralisin genital dalı anterolateral yüzeyi; nervus ilio-inguinalisin dalı olan nervus skrotalis anterior, anterior yüzeyi; nervus pudendusun dalı olan nervus skrotalis posterior ise posterior yüzeyini besler, posterior kutanöz sinirin perineal dalı ise postero-inferior yüzeyi besler (14).

2.2. Testis Histofizyolojisi

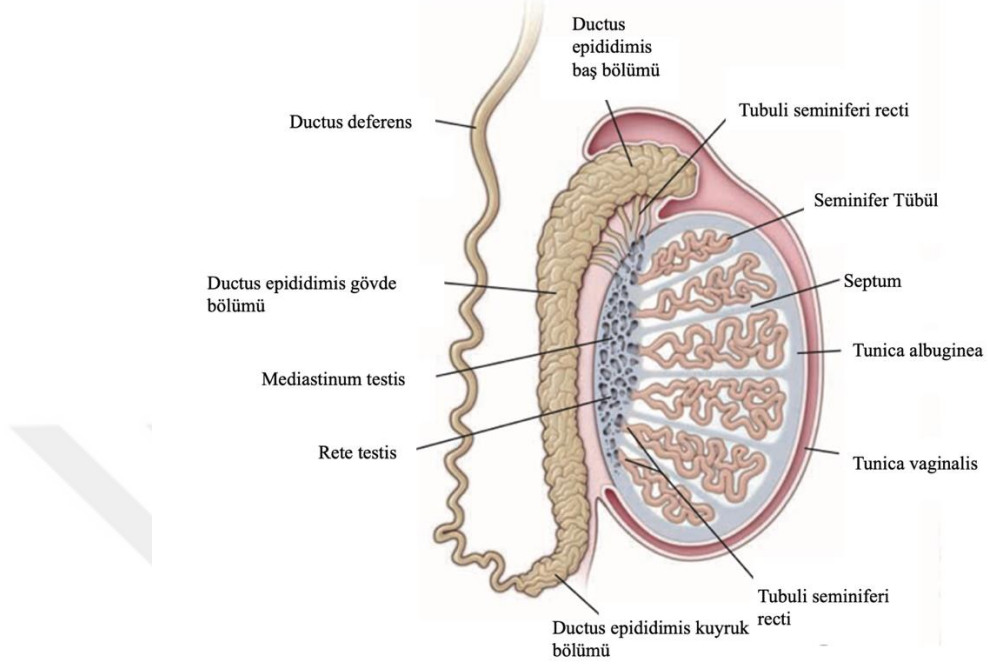
Erkek üreme sistemi testisler, genital boşaltım kanalları, yardımcı cinsiyet bezleri ve penisten oluşmaktadır. Testis spermatogenezis ve steroidogenezis olmak üzere 2 fonksiyona sahiptir. Yetişkinde testisler vücut boşluğunun dışında yer alan, skrotumun içerisinde uzanan oval şekilli organlar olup anterior abdominal duvarın tabakalarıyla devamlılık gösteren, skrotum dediğimiz muskulofasiyal bir kesenin

içerisinde asılıdır ve spermatik kordlar tarafından abdominal duvara bağlanırken gubernakulumun kalıntısı olan skrotal ligamentlerle skrotuma bağlıdırlar (16).

Testisi oluşturan hücreler 3 farklı kaynaktan köken alır:

- Ara mezoderm → ürogenital kabartıları yapar ve Leydig hücreleri ve miyoid hücrelerin kaynağıdır.
- Mezodermal epitel → ürogenital kabartıları döşer ve Sertoli hücrelerinin kaynağıdır.
- Primordiyal germ hücreleri → vitellus kesesinden gelişmekte olan gonadlara göç eder ve burada spermatogoniumlara farklılaşırlar.

Sıkı bağ dokusu yapısındaki tunica albuginea testisin dışını sarar ve hemen altındaki gevşek bağ dokusu yapısındaki tunica vaskulosa kan ve lenf damarlarını içerir. Bu iki yapının oluşturduğu kapsülden gelen bağ dokusu içeriye doğru septumlar göndererek testisi yaklaşık 250 lobüle ayırır ve tunica albuginea testisin posterior yüzeyi boyunca kalınlaşarak içeri doğru mediastinum testis olarak uzanır böylece damar ve sinir paketleri testise giriş yapar (17). Her lobülün içinde spermin üretildiği 1 ile 4 adet, oldukça uzun ve kıvrıntılı seminifer tübüller ve Leydig hücrelerini içeren stroma vardır. Seminifer tübüllerin uçları testisin mediastinumuna yakındır ve burada kısa ve düz bir hal alarak tübülüs rektus (Şekil 5) olarak isimlendirilir ve rete testis ile devam eder. Yaklaşık 10-20 adet ductuli efferentes ile epididimis başına bağlanırlar (17).



Şekil 5. Testisin sagittal planda gösterimi (17) (Türkçe 'ye çevrilmiştir)

Seminifer tübüller, myoid hücreler içeren fibröz bağ dokusundan oluşan bazal membran ve germinal ya da spermatogenik epitel olarak bilinen, Sertoli hücreleri ve spermatogenik seri hücrelerinden oluşan bir epitle sarılıdır (18).

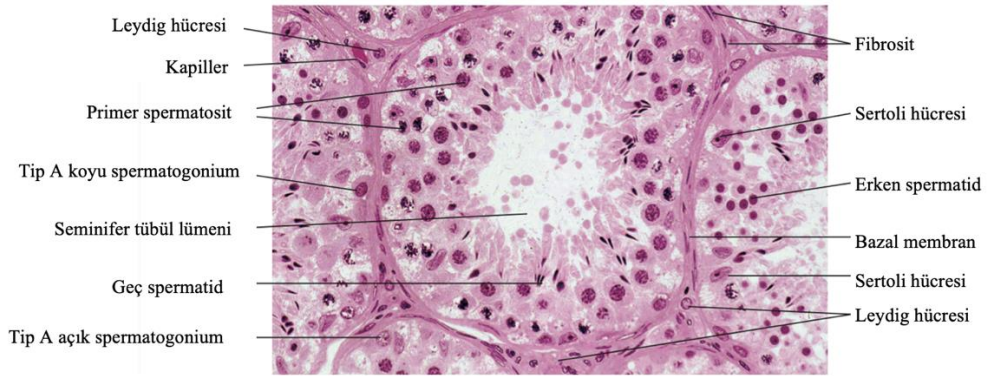
Sertoli hücreleri spermatogenik seri hücrelerine fiziksel ve mekanik destek sağlayan, spermatogenik seri hücrelerini çevreleyen çok sayıda apikal ve lateral uzantıya sahip, tübüllerin tüm kalınlığı boyunca uzanan ve tübüllere yapısal düzen veren, puberteden sonra çoğalma özelliklerini kaybeden hücrelerdir (Şekil 6) (17,19). Sertoli hücreleri, geniş bir düz endoplazma retikulumu, iyi gelişmiş bir granüllü endoplazma retikulumu ve anüler lamel yığınları içerir. Ayrıca, çok sayıda küresel ve uzun mitokondriyon, iyi gelişmiş bir Golgi bileşiği ve değişen sayıda lizozom, lipid damlacıkları, veziküller ve glikojen granülleri bulundurmanın yanı sıra hücrenin uzun eksenine paralel yerleşmiş, mikrotübüllere sahiptir. Bu

mikrotübüller spermatidlerin yerleşiminin düzenlenmesinden sorumludur (17). Sertoli hücreleri aralarındaki bağlantı kompleksleri ile kan–testis bariyerini oluşturur ve iyonlar, amino asitler, karbonhidrat ve proteinlerin kontrollü geçişini sağlar ve genetik olarak farklı olan ve dolayısıyla antijenik olan haploid germ hücrelerini (ikinci spermatositler, spermatidler ve sperm) bağışıklık sisteminden izole olmasını aynı zamanda spermier tarafından üretilen veya onlara özgü antijenlerin, sistemik dolaşıma ulaşmasını engeller böylece sperm hücreleri bağışıklık sisteminden korunmuş olur (16). Bunun yanı sıra Sertoli hücrelerinde FSH etkisi ile üretilen androjen bağlayıcı protein seminfer tübül lümeninde çok yüksek konsantrasyonda testosteron ve DHT'nin birikimini sağlayarak gelişmekte olan sperm hücreleri için uygun mikroçevreyi oluşturur (17,20). Sertoli hücreleri hem FSH hem de tetosteron reseptörü bulundurduğu için fonksiyonları bu iki horomon tarafından kontrol edilirken negatif geri bildirim oluşmasını sağlayan inhibin, serüloplazmin, plazminojen aktivatörü ve AMH (anti-müllerian hormone), da bu hücrelerden salgılanır (16).

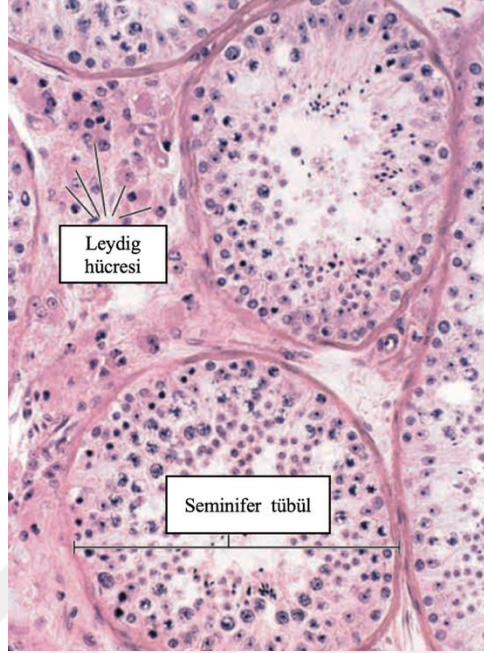
Spermatogenik seri hücreleri ise primordial germ hücrelerinden köken alan spermatagonyum olarak bazal laminanın hemen üzerinden başlayıp, Sertoli hücrelerine tutunarak lümene en yakın konumda bulunan olgun spermatidlere kadar çoğalıp farklılaşan hücre serisidir (Şekil 6) (17,19).

Leydig hücreleri, eozinofilik sitoplazmalı, büyük merkezi yerleşimli nükleusları olan, sitoplazmasında lipid damlacıkları, lipofuksin pigmenti ve Reinke kristalleri bulunduran, steroid hormon (testosteron) salgıladığı için bol miktarda düz endoplazma retikulumu içeren poligonal şekilli interstisyel hücrelerdir (Şekil

7) (19). Diğer steroid salgılayan hücrelerde olduğu gibi tubuloveziküler kristalli mitokondriyon içerirler (17). Erken fetal dönemde LH hormonu etkisi ile salgıladıkları testosteron embriyonun cinsiyet gelişimi ve olgunlaşması için; pubertede sperm üretiminin başlaması, yardımcı cinsiyet bezlerinin salgıları ve sekonder cinsiyet karakterlerinin gelişimi için; yetişkinde ise spermatogenezisin ve sekonder cinsiyet karakterlerinin, genital boşaltım kanallarının ve aksesuar cinsiyet bezlerinin devamlılığın sağlanması için gereklidir (16,18). Bu hücreler intrauterin 5.aydan puberteye kadar (gonadotropik stimülasyona maruz kalana kadar) inaktif bir periyoda girerler ve bu dönemde fibroblastlardan ayırt edilemezler (16).



Şekil 6. Sertoli hücreleri, spermatogonia ve spermatidlerin farklı evrelerdeki görünümünü içeren testis enine kesiti (21) (Türkçe'ye çevrilmiştir)



Şekil 7. Birkaç seminifer tübülü hösteren kesit(17) (Türkçe'ye çevrilmiştir)

Spermatogenezis

Spermatogenezis, pubertede gonadotropik hormon düzeyinin artması ile spermatogonialardan sperm üretilmesi sürecidir. Ergenlik döneminde başlar ve hayat boyu devam eder. Spermatogenez üç farklı evreye ayrılır:

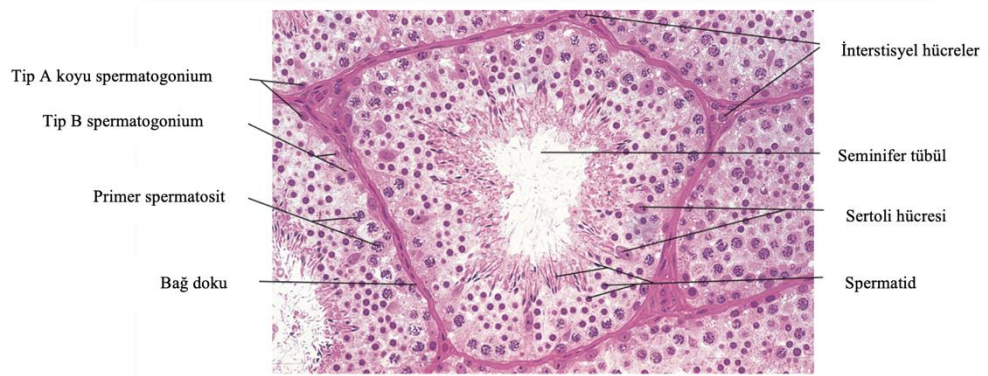
a. Spermatogonial Evre

Spermatogonial kök hücreler mitoz ile çoğalarak hem kök hücre popülasyonunu korur hem de primer spermatositi oluşturacak olan 3 farklı hücre tipi meydana getirirler:

- Tip-A koyu spermatogonialar: Oval şekilli, eksantrik yerleşimli nükleusları ve yoğun, bazofilik ince granüllü kromatinleri olan hücrelerdir (Şekil 8) ve bölünerek ya tip-A koyu ya da tip-A açık spermatogoniaları oluştururlar (16,18).

- Tip-A açık spermatogonialar: Oval şekilli nükleusları ve açık renkte boyanan ince granüllü kromatinleri olan, mitoz ile bölünerek sperm diferansiyasyon sürecine girecek olan hücrelerdir (16,18).

- Tip-B spermatogonialar: Yuvarlak şekilli, merkezi yerleşimli nükleuslu bu hücrelerde, kromatin materyali merkezi bir çekirdekçik etrafında ve nükleus zarı boyunca büyük kümeler halinde yoğunlaşmıştır. Bu spermatogoniaların oluşması spermatogonial evrenin sonunu gösterir (Şekil 8) (16,18).



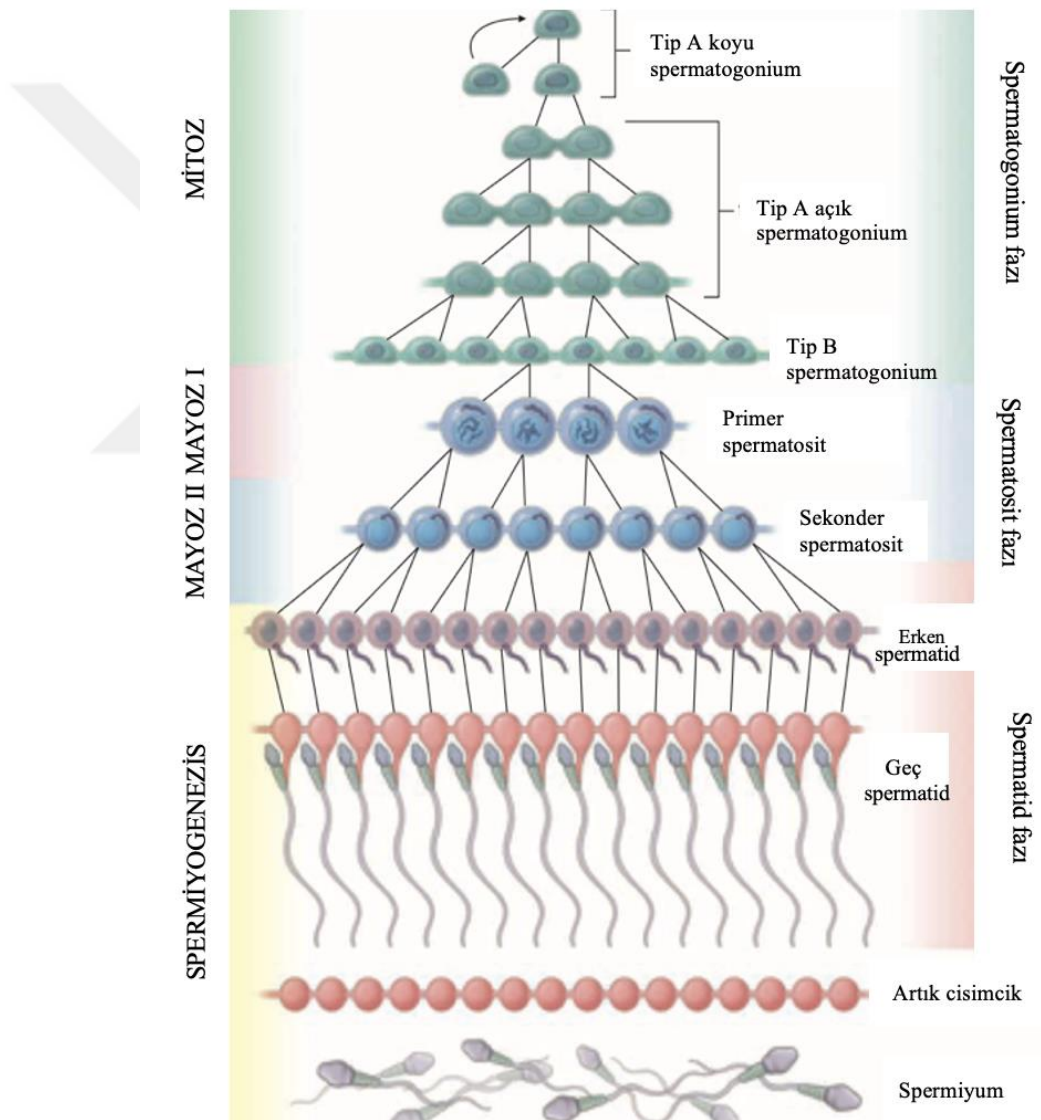
Şekil 8. Sertoli hücreleri, spermatogonia ve farklı evrelerdeki spermatozoidleri gösteren seminifer tübül enine kesiti (21) (Türkçe'ye çevrilmiştir)

b. Spermatozoid Evresi (Mayoz)

Tip B spermatogoniaların mitozla bölünmesi ile mayoz 1'e girecek olan primer spermatozoidler oluşur (16). Primer spermatozoidler mayoz 1'e girerek hem DNA miktarı hem kromozom sayısı yarıya düşerek ssekonder spermatozoidler oluşur (16,18).

Sekonder spermatozoidler, mayoz 2'ye girer ve haploid kromozomlu spermatozoidleri oluşturur (22 adet otozomal ve 1 adet cinsiyet kromozomu) (18). Mayoz 1'in profazı insanda yaklaşık 22 gün sürmektedir, mayoz 2 ise yalnızca

birkaç saat sürer (16). Metafaz 1’ de gerçekleşen crossing-over ve sonrasında homolog kromozom çiftlerinin metafaz plağında rastgele sıralanmaları ve kutuplara rastgele çekilmeleri genetik çeşitliliği sağlamaktadır (16). Morfolojik olarak 2 farklı tip spermatid vardır: Erken spermatid ve geç spermatid (Şekil 9) (18).



Şekil 9. Spermatogenik hücre jenerasyonlarını gösteren şematik diyagram (17) (Türkçe’ye çevrilmiştir)

c. Spermatid Evresi (Spermiyogenezis)

Spermatidlerin olgun spermatozoalara farklılaştığı ısıya duyarlı, hücre bölünmesinin gerçekleşmediği ve mayoz sonucu oluşan spermatidlerin Sertoli hücreleriyle bağlantıda kalmaya devam ettikleri evredir ve 4 aşaması vardır:

- **Golgi Fazı:** Sitoplazmasında PAS (periyodik asit Schiff) pozitif granüllerin varlığı ile belirgin Golgi bileşiği, mitokondriyon, bir çift sentriyol ve serbest ribozomları bulunan spermatidler ile karakterize evredir (16) Golgi bileşiği kaynaklı proakrozomal granüller nükleer zarfın önüne doğru yer değiştirir ve akrozomal vezikülü oluşturur . Akrozomal vezikülün konumu, gelişmekte olan spermin ön kutbunu belirler. Bu faz sırasında spermatidin arka kutbuna göç eden sentriyoller sperm kuyruğunun aksonemini oluşturacak olan dokuz çevresel mikrotübül çifti ve iki merkezi mikrotübülü meydana getirir (16,18).

- **Kep Fazı:** Bu fazda, aslında özelleşmiş bir lizozom olan ve içinde hyaluronidaz, tripsin benzeri protein ya da akrozin olarak isimlendirilen hidrolitik enzimleri bulunduran akrozomal vezikül, çekirdeğin ön yarısı üzerinde yayılır ve akrozomal başlık adını alır (16,18). Akrozomal başlık içeriğindeki enzimler sperm oositle karşılaştığında korona radiatayı ve zona pellusidayı geçmek için kullanılır. Akrozomal başlığının nükleer zarla komşu olan kısmı gözeneklerini kaybeder ve kalınlaşır. Nükleus içeriği yoğunlaşır ve histon proteinlerinin yerini protaminlerin almasıyla DNA yoğunlaşır (16).

- **Akrozom Fazı:** Bu fazda spermatidlerin, uzayan ve daha da yoğun bir durum alan nükleusları ve baş kısımları Sertoli hücrelerine gömülecek şekilde ve büyüyen aksonem lümene uzanacak şekilde yeniden konumlanır (17). Sentriyoller

ise geri dönerek nükleusa bağlanır ve aksonem mikrotübüllerinin çevresinde yer alan ve kuyruk boyunca uzanan dış yoğun lifleri oluşturur ve flagellanın boyun bölgesini oluşturur. Mitokondriyonlar flagella hareketi için gerekli enerjiyi sağlamak üzere orta parçaya göç eder (17,19). Esas parça orta parçanın distalinde, fibröz bir kılıf ile sarılı kısmıdır. Fibröz kılıfın distalinde kalan kısa segmentine uç parça adı verilir (17).

- **Olgunlaşma Fazı:** Flagellanın çevresindeki fazla sitoplazma uzaklaştırılır, Sertoli hücreleri artık sitoplazmayı (artık cisimciği) fagosite eder ve olgun spermatozoon oluşurken, pre-spermatosit evrelerindeki interselüler bağlantılar rezidüel cisimciklerle fagosite edildiği için spermatidler artık birbirlerine ve Sertoli hücrelerine bağlı değildir. Bu sürece spermiyasyon adı verilir (16,18).

İnsanlarda, spermatogonial kök hücrenin spermatogenezis sürecini tamamlaması için yaklaşık 74 gün gereklidir. Daha sonra spermatozoonun epididimisten geçmesi için yaklaşık 12 gün gereklidir (17). Olgun sperm yaklaşık 60 µm uzunluğunda, yassılaştırmış, sivri ve 4.5 µm × 3 µm × 1 µm boyutlarında bir başa sahip, akrozomal başlığında hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve akrozin gibi hidrolitik enzimler bulunduran bir forma sahiptir (16). Kuyruğu ise boyun, orta parça, ana parça ve uç parça olarak 4 bölüme ayrılır.

Kısaca bu parçalardan bahsedilecek olursa;

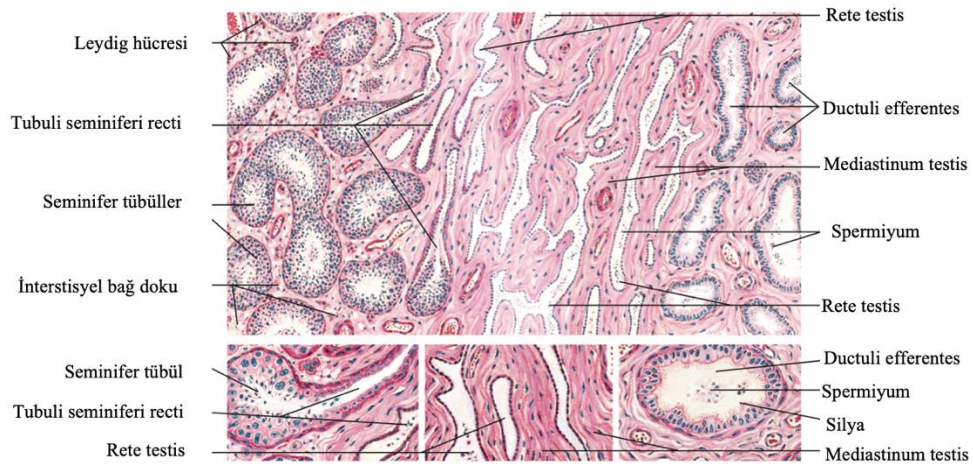
- Boyun; sentrioller ve kaba liflerin başlangıcını içerir.
- Orta parça; 7 µm uzunluğunda kaba liflerin etrafını saran mitokondriyonlar ve aksonemal kompleksten oluşur.

- Ana parça; 40 µm uzunluğunda kaba liflerin dışındaki fibröz kılıf ve aksonemal komolekten oluşur.
- Uç parça; flagellumun son 5 µm'lik kısmıdır ve sadece aksonemal kompleksi içerir (16).

Seminifer tübülde ilk oluşan sperm hücreleri hareketsizdir, hareketliliklerini epididimiste kazanırlar (19). Peritübüler kontraktıl hücreler sayesinde Sertoli hücrelerinden salgılanan sıvı ve sperm hücreleri seminifer tübüllerden, duvarı sadece Sertoli hücrelerinden oluşan düz tübüllere ve oradan da mediastinum testiste bulunan, duvarı tek katlı kübik epitelle döşeli olan rete testise ve buradan da boşaltım kanal sisteminin başlangıcı olan ductuli efferenteslere ve olgunlaşarak hareket yeteneği kazanacakları epididimise iletilir (17).

İntratestiküler Kanallar:

Seminifer tübüller, sertoli hücreleriyle döşeli tubuli recti'lere (Şekil 10) dökülür (17,18). Tübüli recti, silyumlu ya da mikrovilluslu basit kübik ya da alçak prizmatik epitelle döşeli rete testis'e (Şekil 10) dökülür (17,18). Rete testis apikalde tek siliumu ya da mikrovillusları olan tek katlı kübik ya da alçak prizmatik epitelle döşelidir (17,18).



Şekil 10. Seminifer tübül, tubuli recti, rete testis ve ductuli efferentes (21)
(Türkçe'ye çevrilmiştir)

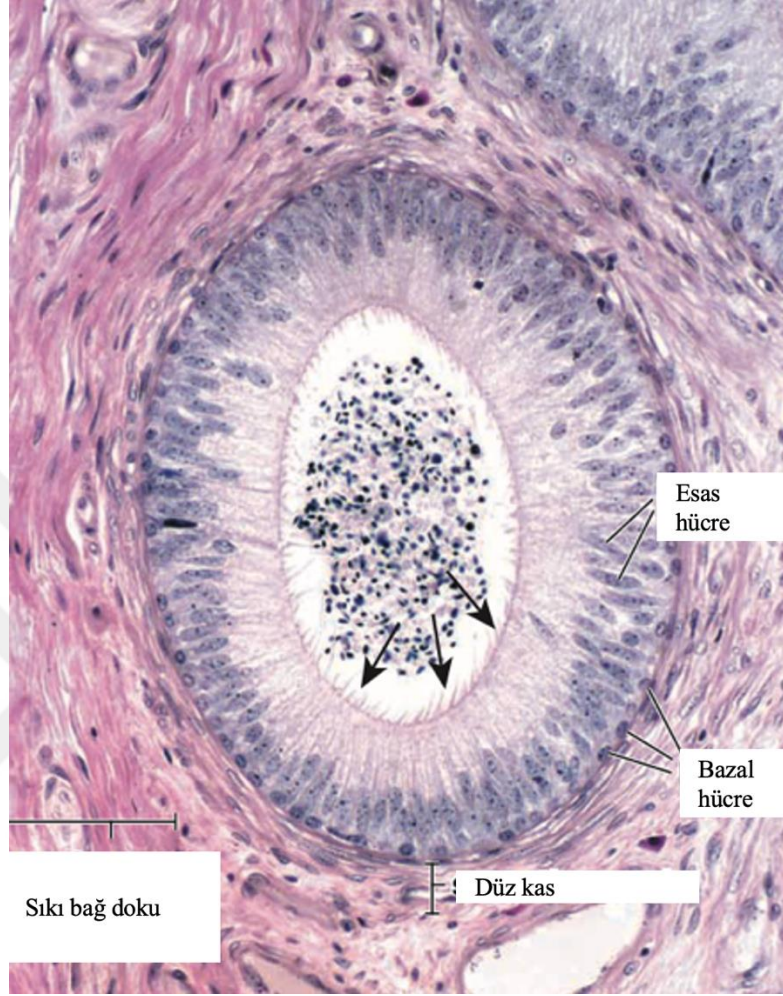
Ekzokrin Kanal Sistemi: Epididimis, ductuli efferentes, ductus deferens, ductus ejaculatorius ve vesikula seminalislerden oluşan ekzokrin kanal sistemi, mezonefrik kanal ve tübüllerden gelişir. Leydig hücrelerinin gelişimi ve testosteron salınımının başlatılması, mezonefrik (Wolffian) kanalın gelişmekte olan testis için ekzokrin kanal sistemine dönüşmesini aktive eder (22).

- Mezonefrik tübüller → ductuli efferentes
- Mezonefrik kanalın testise yakın kısmı → epididimis
- Mezonefrik kanalın distal kısmı → ductus deferens
- Mezonefrik kanalın en distal ucu → ductus ejaculatorius ve vesikula seminalis

Ductuli efferentesler, yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşeli olan bu kanal sistemi testisten çıkarken çok fazla kıvrım yapar ve koni vaskulozi denen kitleler oluşturularak rete testis ductus epididimise bağlar. Epitel hücrelerinin arasında kök hücre özelliğindeki bazal hücreler yer alır. Epitelde yer alan uzun

prizmatik hücreler siliya içerirken, kısa silindirik hücreler siliya içermez. Hücrelerin apikal yüzeyinde çok sayıda mikrovillus ve endositoz ile ilişkilendirilmiş çok sayıda pinositotik vezikül, membrana bağlı yoğun cisimcikler, lizozom içermenin yanı sıra işlevsel olarak seminifer tübülerden gelen sıvının geri emiliminden sorumludur (17).

Epididimis, testisin üst ve arka yüzeylerine paralel yerleşmiş, uzunluğu 4–6 m olan, spermin hareketliliğini kazandığı, baş, gövde ve kuyruk olmak üzere üç bölümden oluşan oldukça kıvrımlı bir tüptür (17). Spermin epididimisi kat etmesi 2-4 hafta kadar sürer. Bazal ve esas hücre olmak üzere 2 farklı hücre tipi içeren epididimis epiteli stereosilyalı yalancı çok katlı prizmatik epiteldir. Epididimal hücreler hem emilim hem de salgılama işlevi görürler ve Sertoli hücreleri tarafından fagosit edilmemiş artık cisimcikleri ve dejenere spermleri fagosit ederler. Ayrıca, halo hücreleri olarak adlandırılan ve migrasyon yapan lenfositler de gözlenir (17,18).



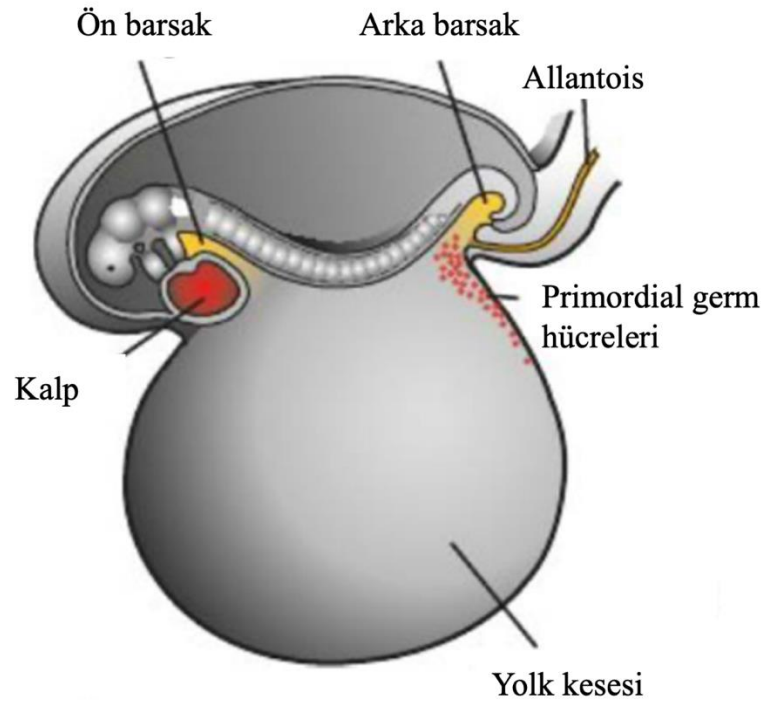
Şekil 11. Ductus deferens enine kesiti (17) (Türkçe'ye çevrilmiştir)

Ductus deferensin epiteli stereosilyalı yalancı çok katlı yassı epitelden oluşan epitel hücreleri esas hücreler ve bazal lamina üzerine yerleşmiş yuvarlak bazal hücrelerden oluşur (Şekil 11) (19).

Epitelin altında çok sayıda elastik lif içeren lamina propria ve lamina proprianın altında içte ve dışta longitudinal, ortada ise sirküler uzanım gösteren kalın bir kas tabakası yer alır ve en dışta ise gevşek bağ dokusu ile sarıdır (17,18).

2.3. Testis Embriyolojisi

Gonadlar mezotel, mezenşim ve primordial germ hücreleri olmak üzere 3 farklı kaynaktan köken alırlar. Epiblasttan köken alan primordial germ hücreleri, önce primitif çizgiye buradan da 3. hafta civarında vitellus kesesi duvarına (Şekil 12), 4. haftada arka bağırsağın dorsal mezenterine ve 5. haftanın başında primitif gonadlara göç ederler, 6. haftada ise genital çıkıntılara yerleşirler (17). Primordial germ hücrelerinin bu göçü, Stella geni, fragilis ve BMP-4 ile kontrol edilir (13).



Şekil 12. 3 haftalık bir embriyoda allantoisin bağlandığı bölgeye yakın, yolk kesesi duvarında bulunan primordial germ hücreleri (22) (Türkçe'ye çevrilmiştir)

Primordial germ hücrelerinin primitif gonadlar üzerinde cinsiyet farklılaşması için indüktif etkisi vardır. Bu hücreler primitif gonadlara ulaştıkları

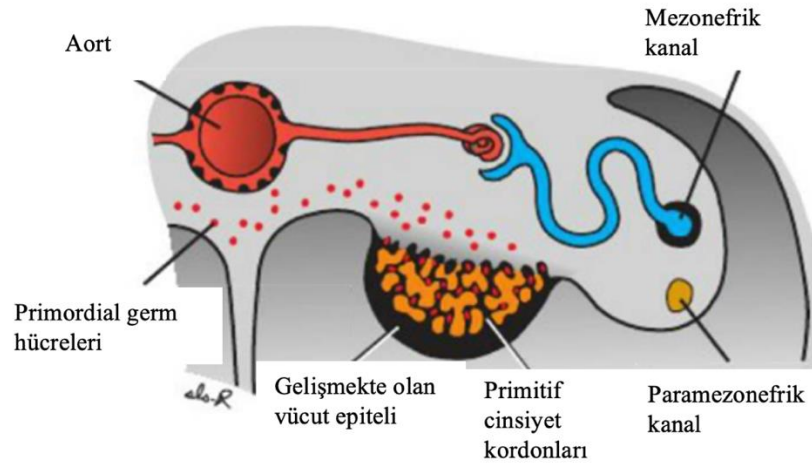
sırada bir çift çıkıntı olarak uzanan gonadların ya da genital çıkıntının epiteli çoğalmaya ve altındaki mezenşime penetre olmaya başlar, böylece primitif cinsiyet kordları oluşmaya başlar (22). Fakat bu dönemde gonadların erkek ya da dişi yönünde farklılaşacağı ayırt edilemediği için bu döneme farklılaşmamış dönem denmektedir (16). Bu dönemde oluşan primitif cinsiyet kordları seminifer tübüller ve rete testisi oluşturacaktır (13). Genetik olarak cinsiyet, Y kromozomu varlığı, fertilizasyon sırasında zaten belirlenmiştir. Fakat testis gelişimi intrauterin Gelişimin 7.haftasındada gerçekleşmeye başlar. Gonadal cinsiyet ise Y kromozomunun kısa kolundaki cinsiyet belirleyici bölge olan SRY gen bölgesinin varlığına göre belirlenir. Bu gen bölgesinin varlığında gelişim erkek yönünde olacaktır (13,16).

Y kromozomunda bulunan SRY geni, otozomal 9,11,17,19 ve X kromozomundaki bazı genlerin aktivasyonu embriyonun erkek yönünde farklılaşmasında önemli rol oynar (22). SRY geninin etkisi ile testis belirleyici faktör (TDF) üretilir bu sayede primitif cinsiyet kordonları prolifer olmaya devam eder ve medullanın derinlerine doğru penetre olarak testisi (medullar kordonları) meydana getirir. Hiluma doğru ince hücre dizileri şeklinde uzayan kordonlar ise rete testisi oluşturur. Fibröz bağ dokusundan kalın bir kılıf olan tunica albuginea ise testis kordonlarını yüzey epitelinden ayırır (16).

Testis kordonları ya da seminifer tübüller 4.ayda primitif germ hücreleri ve yüzey epitelinden köken alan Sertoli destek hücrelerinden meydana gelir. Leydig hücreleri ise, testis kordonlarının oluşumunun başlamasının hemen ardından, gonadal çıkıntının mezenşiminden gelişmeye başlar (16). Seminifer tübüller

arasındaki interstisyel dokuda konumlanan bu hücreler gestasyonun 8.haftasında testosteron üretimine başlarlar (16). Testosteron üretimi gebeliğin 8-12.haftaları arasında pik düzeye ulaşan β -hCG ile uyarılmaktadır (22). Testosteron üretimiyle birlikte artık testisler genital kanallara ve dış genital gelişimine etki gösterebilmektedir (16).

Seminifer tübüller puberteye kadar içleri dolu solid tüpler şeklindedir ve puberte ile kanalize olup, mezonefrik tübüllerin kalıntısı olan ductuli eferenteslerle, sonrasında rete testisle ve ardından mezonefrik kanaldan meydana gelen epididimisle devam edecektir(22). Gelişimin 5.ve 6. haftalarında seksüel olarak diferansiye olmamış gonadda 2 adet kanal sistemi vardır: Wolf kanalı (mezonefrik kanal) ve Müller kanalı (paramezonefrik kanal) (Şekil 13) (22).



Şekil 13. 6 haftalık bir embriyonun lomber bölgesinden alınan transvers kesit (22)
(Türkçe 'ye çevrilmiştir)

Epitelin, ürogenital çıkıntının anterolateraline doğru yaptığı invajinasyonlarla oluşan Müller kanalı kranialde huni şeklinde bir yapı ile abdominal kaviteye açılırken kaudalde önce mezonefrik kanalın lateralinde seyreder sonra onu çaprazlar ve orta hatta, karşı taraf paramezonefrik kanal ile yakın komşulukta devam eder ve birleşerek kaudalde ürogenital sinüsün posterior duvarına açıldığı yerde sinüs tüberkülü denilen küçük bir kabartı oluşturur (22). Mezonefrik kanal ise ürogenital tüberküllere açılır (22).

Genital kanalların gelişimi için mezonefrik kanalın testosteron tarafından uyarılması gerekir. Altıncı haftanın sonunda epitelden genital çıkıntılara doğru göç eden Sertoli hücre prekürsörleri, primitif germ hücrelerinin etrafını sararak hücre kümeleri oluşturmaya başlar ve oluşan bu hücre kümeleri primitif cinsiyet kordonlarını meydana getirir (23). Gelişimin 7.haftasının sonlarında primitif cinsiyet kordonlarını büyümüş ve iyi ayırt edilebilir hale gelmiştir ve artık testis oluşmaya başlamıştır (23). Primitif cinsiyet kordonları büyüdükçe yüzey epiteli ile bağlantısını kaybeder ve daha sonra germinal epiteli oluşturacak olan yüzey epitelinden tunica albuginea ile ayrılır. Cinsiyet kordonlarının derin kısmı mezonefrik tübülerlerle temas halindedir, dış kısmı seminifer tübülleri ve iç kısmı rete testisi meydana getirir ve mezonefrik tübülerden köken alacak ductuli efferenteslere bağlanır (23).

Mezonefrik kanalın kranialinde orijinal boşaltım kanallarının bazıları, epigenital tübüller, rete testis ile epididimis arasındaki bağlantıyı sağlayan ductuli efferentesleri oluşturur. Testisin kaudal kutbundaki boşaltım kanalları, paragenital tübüller ise rete testis kordonlarına katılmaz ve kalıntıları paradidimis olarak bilinir.

Mezonefrik kanal en kranial kısım hariç varlığını sürdürür ve ana genital kanalı oluşturur. En kranial kısım ise appendiks epididimisi oluşturur (22). Ductuli efferenteslerden hemen sonra mezonefrik kanal uzar ve ileri derecede kıvrılarak ductus epididimisi oluşturur. Epididimis kuyruğundan itibaren mezonefrik kanal kalın bir kas tabakası kazanmaya başlar ve vesikula seminalisin tomurcuklandığı yere kadar, ductus deferens ya da vas deferens dediğimiz kanal yapısını meydana getirir. Seminal vezikül sonrasındaki bölge ise ductus ejaculatorius olarak isimlendirilir (22). Erkekte Müller kanalı, Sertoli hücreleri tarafından sentezlenen anti-Müllerian hormon (AMH) sebebiyle kranial ucundaki appendix testis olarak adlandırılacak küçük bir parça dışında dejenere olur (22).

Testis gelişimindeki ana transkripsiyon faktörü Y kromozomunun kısa kolunda bulunan SRY genidir. Bu gen bir transkripsiyon faktörü olan testis belirleyici faktörü (TDF) kodlar ve bu faktör DNA'nın belirli bölgelerine bağlanarak yapısını değiştirir. Etkilenen DNA bölgesi, diğer transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını sağlayan bir yanıt oluşturur (16). Erkek genital sisteminin gelişimini tetikleyen bu yanıtta rol oynayan diğer genlerden bazıları şu şekildedir;

- Ürogenital sistemin gelişimi ve SRY transkripsiyonunun düzenlenmesi için gerekli olan WT-1 geni (Wilms tümörü 1 geni),
- AMH (anti-müllerian hormone) sentezinden sorumlu olan AMH genini aktive eden ve SRY geni

- Testis farklılaşmasının devam edebilmesi için gelişmekte olan kanalların mezonefrik kanaldan gonadal çıkıntıya doğru penetre olmasını sağlayan, FGF 9 (fibroblast büyüme faktörü 9) üretimini indükleyen SOX9 geni,
- Sertoli ve Leydig hücrelerinin farklılaşmasını uyaran, SOX9 ile çalışarak AMH sentezini arttıran ve Müller kanalının regresyonundan sorumlu olan SF-1 geni,
- X kromozomunda bulunan ve SRY geninin baskılanmasından sorumlu olan DAX-1 genidir (16).

Bunlara ek olarak SF-1 geni Leydig hücrelerinden testosteron salınımını indüklemesi testosteronun hedef hücrelere gitmesini ya da 5 alfa redüktaz enzimi aracılığı ile dihidrotestosterona dönüştürülerek aktivasyonunu göstermesini sağlar (16). Testosteron mezonefrik kanaldan ductus deferens, vesikula seminalis, ductuli efferentes ve epididimisin gelişmesini düzenlerken dihidrotestosteron dış genital organların farklılaşması üzerinde etkilidir (22).

İntrauterin 3. haftada primitif çizgi etrafından köken alan mezenşim hücreleri kloakal membran çevresine göç ederek çift taraflı kloakal katlantıları oluşturur. Oluşan bu kloakal katlantılar kranialde birleşip genital tüberkülü, kaudalde ise ikiye bölünerek anteriorda üretral, posteriorda anal katlantıyı oluşturur. Üretral katlantının her iki yanındaysa skrotumu oluşturacak olan genital kabarıklıklar oluşur. Fakat 6.haftanın sonunda hala cinsiyet ayrımı yapılabilmesi mümkün değildir (22). Embriyonun erkek yönünde farklılaşmasında temel faktörler özellikle Sertoli hücrelerinden eksprese edilen AMH ve Leydig hücrelerinden sentezlenen testosterondur (17). Genital tüberkül uzayarak penisi, genital kabartılar

uzayarak skrotal keseyi oluşturur (15). Genital tüberkülün hızla uzamasıyla fallus oluşur ve fallus da uzayıp üretral katlantıları öne doğru iterek üretral oluğun lateral duvarlarının oluşmasını sağlar. Endoderm kökenli üretral oluğun epiteli ise üretral plağı oluşturur (22). Üretral oluk fallusun ventralinde genişler, fakat distale ulaşmaz ve glans penisi oluşturur (22). Üçüncü ayın sonunda, üretral katlantılar üretral plak üzerinde kapanır ve penil üretrayı oluşturur fakat penil üretra fallusun ucuna kadar uzanmaz ve en distaldeki kısmı 4.ayda, ektodermal hücrelerin glansın ucundan içeri doğru penetre olması ile eksternal üretral meatusu oluşturur (22). Embriyoda testosteron, DHT (dihidrotestosteron), AMH'nın ortaya çıkması embriyonun hormonal cinsiyetinin belirteçleridir (15,18).

Testisin inişi bifazik olarak açıklanabilir: transabdominal faz ve inguinoskrotal faz. Transabdominal fazda testis abdominal bölgede retroperitoneal olarak gelişmekte olup kaudale doğru ilerleyip inguinal kanaldan skrotuma ulaşır. İkinci ayın sonuna kadar ürogenital mezenter, testis ve mezonefrozu posterior abdominal duvara bağlamış durumdadır ve mezonefrozun dejenerasyonu ile bu bağlantı gonadlar için mezenter görevi görür. Bu dönemde testis hareketi androjenlerden bağımsız olarak gerçekleşir (22,24). Testisin kaudal kutbundan, mezenkimal bir yoğunlaşma olan, testis inişinden önce iç ve dış oblik kaslar arasında inguinal bölgede sonlanmış olan gubernakulum uzanır. İnguinoskrotal faz 26.hafta civarında başlar ve androjen bağımlı olarak gerçekleşir. Kanala girişi derin inguinal halkadan, çıkış ise süperfisiyal inguinal halkadan olur (24). Testis derin inguinal halkaya doğru inmeye başladığında, gubernakulumun ekstra-abdominal

kısmı inguinal bölgeden skrotal şişliklere doğru ilerler ve testis inguinal kanaldan geçerken, bu ekstra-abdominal kısım skrotal tabanla temas eder (24).

Testisin inmesini kontrol eden faktörler tamamen net olmamakla birlikte gubernakulumun büyümesinin intra-abdominal göçü tetiklediği, organ büyümesi nedeniyle intra-abdominal basıncın artmasının inguinal kanaldan geçişi sağladığı ve gubernakulumun ekstra-abdominal kısmının regresyonunu ile testisin skrotuma hareketini tamamladığı görülmektedir (24). Normalde, testisler yaklaşık 12. gebelik haftasında inguinal bölgeye ulaşır, 28. haftada inguinal kanaldan geçer ve 33. haftada skrotuma ulaşır. İnış sırasında, testise aorttan gelen kan akışı korunur (24). Testisin inişinden bağımsız olarak, periton ise her iki tarafta orta hat boyunca ventral karın duvarına doğru processus vaginalis olarak isimlendirilen ve gubernakulumun izlediği yolu takip edip skrotal şişliklere inecek olan bir evajinasyon oluşturur (24). Processus vaginalis testisin dışını örtecek olan tunica vaginalisin visseral ve parietal katmanlarını oluşturur. Bunun yanı sıra testis, seyri sırasında abdominal duvardan köken alan birtakım fascialarla daha örtülür (24). Bunlar fascialar: fascia transversalisten köken alan fascia spermatica interna, internal oblik kastan köken alan fascia cremastericus ve musculus cremaster, eksternal oblik kastan köken alan fascia spermatica externa (24).

2.4. Testis Torsiyon-Detorsiyonu

Testis torsiyonu, spermatik kordun bükülmesi sonucu testis kan akımının kaybıyla karakterize ürolojik acil bir durumdur (1,2). Torsiyon süresinin hasarın

şiddetini belirleyici faktörlerden biri olduğu, erken tanı ve tedavinin testiküler kaybı engelleyebildiği bu ürolojik acil durumun ideal tanı yöntemi ultrasonografidir (25).

Testis torsiyonunda klinik yansıma, 24 saatten kısa süredir var olan ani başlangıçlı, şiddetli, tek taraflı ağrı şeklindedir ve ek olarak kusma, bulantı, skrotal ödem, testiküler hassasiyet, eritem, yüksek yerleşimli testis (Brenzel bulgusu) ve skrotal deri retraksiyonu (Ger bulgusu) gibi bulgular da eşlik edebilir (26). Yapılan son çalışmalar testiküler ağrının 24 saatten uzun olmasının tanıyı dışlamadığını göstermiş olup, ağrı intermittan karakterde olabilir ve genellikle elevasyonla ağrı azalmaz (Phren bulgusu) (26). Fizyopatolojik süreci bakımından ele alındığında testis torsiyonu, tunica vaginalisin içinde gerçekleşip gerçekleşmemesine göre intravaginal ve ekstravaginal torsiyon olmak üzere iki farklı şekilde oluşur (27). Ekstravaginal testis torsiyonu, tunica vaginalis dahil tüm kordun döndüğü torsiyon tipidir, intravaginal torsiyon ise tunica vaginalisin spermatik korda normalden yukarıda tutunması durumunda (Bell Clapper deformitesi) spermatik kord ve testisin tunica vaginalis içinde dönmesi sonucu meydana gelir (27). Vakaların çoğu adolesan yaşta (<25) görülse de testis torsiyonu pre ve perinatal periyot dahil her yaşta karşılaşılabilecek bir durumdur (25). Ekstravaginal testis torsiyonu tüm testis torsiyonu vakalarının %12'sini oluşturur ve tipik olarak yeni doğan dönemini etkilemektedir fakat vakaların çoğunluğunu oluşturan intravaginal testis torsiyonunun ortalama yaş grubu 15'tir (27). Olguların büyük çoğunluğu 25 yaşın altında görülen testis torsiyonu etiyolojisinde processus vaginalisin konjenital anomalileri, tramva ve Bell clapper deformitesi ya da tunica vaginalisin fiksasyon

yetersizliği gibi durumlar yer alır (25). Esas predispozan faktörün ne olduğu ise bilinmemektedir.

Testis torsiyonunun belirgin sonucu ise rotasyon derecesi ve süresine bağlı olarak düzeyi farklılık gösteren testiküler iskemidir (27). İskeminin düzeyine bağlı olarak morfolojik bulgular vasküler konjesyondan, hemorajik nekroza kadar değişiklik gösterebilmektedir (27). Makroskobik olarak ödem, renkte solma, turgorda artış ve testis ağırlığının artması gibi bulgular görülebilir (28). Hasarın şiddetini belirleyen en önemli parametreler torsiyonun süresi ve spermatik kordun dönme derecesi olup, iskemik hasarı ve dolayısıyla germ hücre kaybını önlemek ya da azaltmak için torsiyon hızlı bir şekilde düzeltilmeli ve testiküler kan akımı yeniden sağlanmalıdır (2,3). Klinik tanı için testis sertliğini ve ödemi, kremasterik refleks varlığını, yüksek yerleşimini ve kusma/bulantıyı değerlendiren TWIST skorlama sistemi kullanılmakla birlikte primer tanı aracı ultrasonografidir (25). Tedavide ise ideal ve primer olarak kullanılan yöntem ağrı başladıktan itibaren en geç 6 saat içerisinde uygulanacak cerrahi detorsiyon işlemidir, fakat cerrahi müdahalenin gecikmesi durumunda manuel detorsiyon da uygulanabilir (25). Tedavinin gecikmesi durumunda testiküler doku kaybı, nekroz ve infertilite kaçınılmazdır.

Histomorfolojik olarak testiküler hasar 2 fazda meydana gelir: iskemik faz ve reperfüzyon fazı (28). Torsiyon esnasında testiküler kan akımının azalması, venöz aşırı yüklenme, arterial blokaj, iskemi ve tedavi geciktiği durumlarda nekroz ile sonuçlanır (28). İskemi nedeniyle oluşan hipoksik ortam, anaerobik glikoliz ve ATP üretiminin azalması, laktik asit birikimi ve asidozise neden olarak hücrede

ATP-bağımlı pompaların bozulması ve hücre içi potasyumun hücre dışına sızmasına sebep olur (28). ATP üretiminin azalması, potasyumun hücre dışına atılmasının yanı sıra hücre içerisinde kalsiyum birikimine de sebep olur ki bu durum testiküler metabolizmanın bozulmasında, hücre lizisinin başlamasında ve hücre sel şişmede temel faktördür (28). Artan prostaglandin E1 düzeyi, TGF β 1 (dönüştürücü büyüme faktörü beta 1) miktarını arttırarak dokuda kollajen birikimini ve vasküler disfonksiyonu artırır ve hipoksi aynı zamanda VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü) düzeyini arttırarak germ hücre proliferasyonunun inhibisyonuna ve spermatogenik arreste sebep olur (28). Bunların yanı sıra, hipoksi çeşitli yollar ile ROS üretimine neden olur ve bu durum mitokondriyal hasara, daha fazla ROS, ksantin oksidaz (XO) ve indüklenabilir nitrik oksit (iNOS) üretimine; testiküler hücrelerde lipid peroksidasyonuna, DNA hasarına ve apoptozise sebep olur (28). Torsiyon ayrıca testiküler venöz endotel hücrelerinde sICAM-1, sP-selektin, sE-selektin ve tenaskin gibi hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonunu da uyarmaktadır (2).

Testiküler kan akımının yeniden sağlanması için yapılan detorsiyon ise torsiyonun neden olduğu iskemik hasara, reperfüzyon hasarı sürecini de eklemektedir. Hipoksik parankima ve endotel hücreleri tarafından iskemik fazda artan sitokin üretimi ve adezyon moleküllerinin ekspresyonu, ileri düzeydeki reperfüzyon hasarı için zemin hazırlar (28). Reperfüzyon, nötrofil, platelet, CD4⁺ T lenfositlerin ortama gelmesine ve daha fazla ROS üretimine, TNF- α (tümör nekrozis faktör alfa) ve lokal inflamatuvar mediyatörlerin üretimine sebep olur. CD4⁺ T lenfositlerden salınan makrofaj stimüle edici faktör, TNF- β ve IFN- γ

(interferon gama) lokal makrofaj infiltrasyonuna ve sitokin salınımına sebep olur ve daha fazla hücre infiltrasyonu, daha fazla ROS ve sitokin üretimi meydana getiren bir kaskad oluşur (28). Histopatolojik olarak bu durum, germ hücre kaybına, sperm üretiminde azalmaya, Leydig hücre fonksiyonlarında azalmaya ve tüm bu hasarlar sonucunda infertiliteye neden olmaktadır (1,3).

Tüm bu patolojik süreçlerin erken öncülleri endotel hücre hasarı, nötrofil infiltrasyonu ve ROS oluşumudur ve iskemi-reperfüzyon hasarını azaltma noktasında bu hasar bileşenlerinin her biri tedavi hedefleri olarak ele alınmaktadır (2,29). Bu amaçla birçok araştırmada başta antioksidan özellikte maddeler olmak üzere, kalsiyum kanal blokörleri, nötrofil adezyonunu ve etkinliğini inhibe eden ajanlar, inflamasyonu düzenleyen ajanlar, kan basıncını ve volümünü düzenleyen maddeler, vazodilatör ajanlar ve platelet inhibitörleri gibi çok sayıda tedavî ajanının denendiği görülmektedir (2,29).

2.5. Malondialdehit (MDA) ve Katalaz

İskemi reperfüzyon, lipid peroksidasyonunu başlatıp çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna sebep olan olaylar zincirinin tetiğini çekip biyolojik membran hasarı ve ayrıca malondialdehit gibi metabolit oluşumuna sebep olmaktadır (30). Oksidatif hasar sırasında ROS üretiminin temel kaynağı hasarlı dokudaki mitokondri, plazma membranı endoplazmik retikulum ve peroksizomlardır (31). Reperfüzyon sırasında hasarlı dokuya nötrofil kemotaksisinin artarak devam etmesi, daha fazla ROS üretimine sebep olur. Lipid peroksidasyonu sonucunda MDA, propanal ve 4-hydroxynoneal (4-HNE) gibi pek çok ürün oluşur (31). Lipid

peroksidasyonunun en önemli belirteçlerinden olan MDA düzeyinin nötrofillerin biriktiği bölgelerde daha yüksek olması, MDA'nın nötrofillerin ürettiği ROS'lara bağlı gerçekleşen lipid peroksidasyonu sonucu oluştuğunu düşündürmektedir (32).

Katalaz, peroksizomda bulunan, hidrojen peroksidin su ve oksijene dönüşümünü sağlayan hem proteininden oluşmuş antioksidan sistemin parçası olan bir enzimdir (32). Katalaz, süperoksit dismutaz (SOD) enziminin süperoksit radikalini hidrojen perokside dönüştürmesinin ardından oluşan hidrojen peroksidi hedef almaktadır (32). İskemi sırasında, hücrelerde yeterli miktarda ATP sentezi gerçekleşemez, mevcut ATP parçalanarak adenozin, inozin ve hipoksantin birikmeye başlar ve artan anaerobik solunum sebebiyle hücre içi pH düşer. Oluşan asidik ortam ve azalmış ATP üretimi sebebiyle hücre içi enzimler, proteinler ve membran pompaları işlevlerini yitirir. Bu sebeple hücre içi sodyum, klor ve kalsiyum birikimi olur ve hücrel şişmeyle birlikte, apoptotik ve nekrotik yollar tetiklenir. Normal koşullarda aktif bir enzim olan ksantin dehidrogenaz biriken hipoksantini ksantine ve ürik aside çevirmektedir fakat artan kalsiyum ksantin oksidazın baskın hale gelmesine sebep olduğu için hücrede hipoksantin birikimi meydana gelir (32). Reperfüzyon ile oksijen ksantin oksidaz ve su ile birleşerek hipoksantin ve süperoksid oluştur ve oluşan süperoksid reperfüzyon sırasında oluşan hidrojen peroksidin ana kaynağıdır. Katalaz enzimi oluşan hidrojen peroksidi su ve oksijene dönüştürmeye çalışsa da bu aşamada hücrenin oksidan kapasitesi aşılar ve dokuya esas hasarı veren hidroksil radikalleri meydana gelir (31–33).

2.6. Piroptozis

Piroptozis, por oluşturan bir protein olan GSDMD (gasdermin-D) aracılı, programlı litik hücre ölümü çeşitlerinden biridir (34). Piroptozis, kaspaz 1 (sisteinil aspartat spesifik proteinaz 1)'in NLRP-3 (NOD benzeri reseptör termal protein birimi ilişkili protein 3) inflamazomu tarafından aktive edilmesi ile başlar. Aktif kaspaz 1, GSDMD'yi aktive ederek N-terminal dizisine sahip GSDMD-N oluşumunu sağlar. GSDMD-N hücre zarına bağlanarak membran porlarının oluşumunu sağlar. Bu durum ise IL-18 ve IL-1 β gibi pro-inflamatuar sitokin salınımı ve piroptozisin başlaması ile sonuçlanır (6).

Piroptozise ışık tutan ilk çalışmalar 1986 yılında Friedlander'ın primer fare makrofajlarını şarbon öldürücü toksin ile tedavi etmesi sonrası hücre ölümü rapor etmesine dayanmaktadır (35). Hemen ardından 1989 yılında Cerretti ve Thornberry tarafından ICE (IL-1 β dönüştürücü enzim) yani kaspaz-1 tanımlanmıştır (35). 1992 yılında Zychlinky ilk kez Shigella flexneri ile enfekte makrofajlarda gerçekleşen hücre ölümünün piroptozis olduğunu ortaya koymuştur (35). Kaspaz bağımlı oluşu, DNA hasarı, nükleer kondensasyon gibi özelliklerinden dolayı apoptozise benzese de, 2001 yılında D'Souza, pro-inflamatuar programlı hücre ölümünü, Grek kökenli pyro (ateş) ve ptosis (to-sis, düşme) kelimelerinden türeyen piroptozis olarak tanımlamış ve apoptozis ile farklılığını ortaya koymuştur (35). Daha sonra infalamazom kompleksinin keşfi ile ve yapılan ileri çalışmalarla kaspaz-1, kaspaz-11/4/5, aktive gasdermin-D (N-terminal) ve NLRP-3'ün sürece dahil olduğu bulunmuştur (35).

Piroptozis, hücrenin patojen ilişkili moleküler desenler (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) ya da hasar ilişkili moleküller desenler (Damage-associated molecular patterns, DAMPs) ile etkileşmesiyle başlar ve takibinde kanonik ya da nonkanonik 2 farklı inflamazom kompleksi oluşumu ve kaspaz 1 ya da kaspaz 11 aktivasyonu ile devam eder (36).

Kanonik yolak, mikrobiyal ya da non mikrobiyal olarak inflamazom kompleksi oluşumu, gasdermin-D ayrılması ve IL-1 β ve IL-18'in salınımı ile gerçekleşmektedir. İnflamazom kompleksi oluşumu PAMP ve DAMP'ların sitozolik desen tanıma reseptörleri (Pattern recognition receptors, PRR) tarafından tanınması ve kaspaz-1 ve ASC'lerin bir araya gelmesi ile meydana gelir. PRR'ler aynı zamanda tip -1 interferon ve pro-inflamatuar sitokin salınımına da sebep olmaktadır. Kanonik inflamazom kompleksleri:

- NOD-benzeri reseptör (NLR),
- ASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing a C-terminal caspase-recruitment domain, C-terminal kaspaz alım alanı içeren apoptozla ilişkili benek benzeri protein) ve
- pro-kaspaz 1 içerir (35).

NLR'ler ise N terminal ucunda nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon bölgesi ya da pirin içermesine göre NLRC ya da NLRP olarak sınıflandırılabilir. ASC, pirin alanı (pyrin domain, PYD) ve bir kaspaz aktivasyon ve alım alanı (caspase activation and recruitment domain, CARD) içerir (35). CARD, pro-kaspaz-1'in inflamazom kompleksinin yapısına katılması için gereklidir. İnflamazom kompleksi oluşuktan sonra kaspaz-1 aktive olarak aktif kaspaz-1'i oluşturur ve bu

gasdermin-D'den N terminal ve C terminal gasdermin-D oluşumunu sağlar (35). Gasdermin-D N terminal proteini hücre membranında seçici olmayan por oluşumuna, hücre şişmesine ve piroptozise sebep olur. Bunun yanı sıra, aktif kaspaz-1, IL-1 β VE IL18'in ayrılması ve gasderminin oluşturduğu porlardan hücre dışına salınımından da sorumludur (35).

Non-kanonik yolak; kaspaz 4/5' in hücre içi lipopolisakkaritlere ASC aracılığı ile doğrudan bağlanması ile başlar., oligomerize olarak membranda por oluşturacak olan gasdermini, N terminal olarak parçalar fakat aktif kaspaz 4/5/11, pro-IL-1 β ve IL-18'in aktive olmasını sağlayamaz, bu sitokinlerin sadece maturasyon ve sekresyonunu sağlayabilir (35). GSDMD, kaspaz-4/5/11 tarafından aktive olduktan sonra K⁺ iyonlarının hücre dışına çıkışına neden olur ve bu durum NLRP3 inflamazomunun birleşmesine ve piroptozise yol açar (35).

2.7. Sulodeksid

Sulodeksid elektroforezde hızlı hareket eden heparin ve dermatan sülfattan oluşan, domuz bağırsak mukozasından elde edilen bir glikozaminoglikandır (9). Antitrombin ve heparin kofaktör II üzerinden antikoagülan ve antitrombotik etki gösterdiği ve fibrinolitik sistem, plateletler, endotel hücreleri inflamasyon ve yakın zamanda metalloproteinazlar üzerinde etkileri olduğu kanıtlanmıştır (37). ATIII ve HCII üzerinden gösterdiği antikoagülan etki haricinde, doku plazminojen aktivatörü salınımını da indükleyerek, plazminojen aktivatör inhibitör aktivitesini inhibe eder ve bu sayede parsiyel tromboplastin zamanını değiştirmeden fibrinolitik etkisini gösterir (38). Periferik arteriyel ve venöz tromboz üzerine etkinliği

kanıtlanmıştır ve venöz bacak ülseri, kladikasyo intermittant ve arteriovenöz tromboz için klinik uygulamada kullanılmaktadır (37,39). Oral olarak verildiğinde sulodeksid klasik koagulasyon profiline minimal etki etmekte, ancak endotel hücrelerinin yapısı, işlevi ve ayrıca hücreler arası matriks üzerinde önemli etki göstermektedir (9).

Endotel, mikrosirkülasyonun düzenlenmesinde prostosiklin, doku plazminojen aktivatörü, NO, doku faktörü, heparin kofaktör II, trombomodulin, protein C ve S gibi pek çok parakrin ve otokrin madde sentezlediği için merkezi bir role sahiptir. Mikrosirkülasyonun düzenlenmesinde endotel hücrelerinin yanı sıra dolaşımdaki hücrelerin salgıladığı inflamatuvar sitokin, integrin ve lökotrienlerin de etkisi büyüktür (40). Kronik venöz hastalıkların başlangıcında endotel, artan kesme gerilimine (shear stress) karşı mikrosirkülasyonu koruyabilmek için antitrombotik ve fibrinolitik etkiyi artırıcı birtakım faktörler salgılar ancak, kesme geriliminin normalden fazla ya da az olması durumlarında (kronik venöz hipertansiyon ya da staz) endotelin reaktif kapasitesi aşılar ve inflamatuvar mediyatör sentezi başlar (40).

İnflamatuvar sürecin tetiği salınan pro-inflamatuvar mediatörler ile ortama çekilen lökositlerin aktive olmasıdır. Bu sayede daha fazla lökosit adezyon molekülü salgılanır ve inflamatuvar sitokin ve büyüme faktörü salınımı gerçekleşir. Sonuç olarak mikro damarlarda tromboza yatkınlık, apoptotik ya da apoptotik olmayan hücre ölümleri, cilt değişiklikleri ve venöz ülserler meydana gelir (40).

İnsan hücre kültürü çalışmalarında reaktif oksijen radikallerinin, monosit kemoatraktan protein-1'in ve IL-6 üretiminin sulodeksid uygulaması ile azaldığı gösterilmiştir (41). Bunun yanı sıra, sıçanlarda endotoksine bağlı peritonitin

sulodeksid uygulaması ile azaldığının gösterilmiş olması sulodeksidin anti-inflamatuar etkinliğini ortaya koymaktadır (40).

Elektroforezde hızlı hareket eden heparin içeren sulodeksid, düşük molekül ağırlıklı heparin (low-molecular-weight heparin, LMWH)'den daha avantajlı olmasını sağlayan önemli özelliklere sahiptir (39). Sulodeksid, hem antitrombotik hem antiinflamatuar etkiye sahip olması, pik plazma hacmine 15 dakikada ulaşabilmesi ve LMWH'ye göre 14 kat yüksek dağılım hacmine sahip olması, endotel afinitesinin LMWH'ye göre daha yüksek olması, trombolitik ve fibrinolitik özelliklere sahip olması, inflammatuar sitokin, kemokin ve koloni uyarıcı faktör sekresyonunu NF- κ B üzerinden inhibe edebilmesi ve bu sayede oksidatif stresi azaltabilmesi açısından LMWH'den üstündür (39).

Sulodeksidin klinik uygulamalarda diyabetik retinopati progresyonunu yavaşlattığı, periferik arter hastalığı olan bireylerde ağrısız maksimum yürüme mesafesini arttırdığı, diyabete bağlı trofik ülser iyileşmesini sağladığı ve nefropatili hastalarda albümin atım oranını azalttığı gösterilmiştir (42). Yine bir meta analizde sulodeksidin venöz tromboemboli rekürrensini azalttığı görülmüştür (43). Sulodeksid, endotel koruyucu, antitrombotik, antioksidan, anti-inflamatuar, anti-apoptotik özelliklere ve yara iyileştirici etkilere sahiptir (10,44). Tip 2 diyabette bozulan glikokaliksin ve artan damar geçirgenliğinin sulodeksid uygulamasını takiben düzeldiği görülmüştür (45). Kritik ekstremite iskemisi (KEİ) olan tip 2 diyabetli hastalarda perkutan transluminal anjiyoplasti (PTA) ve antiplatelet/antikoagulan tedaviye ek, destekleyici medikal tedavide sulodeksid uygulanmış ve hastalar komplikasyonlar, transkütanöz oksijen basıncı (TcPO₂),

ayak bileği-kol basınç indeksi, ağrı, ülser boyutu ve ülser iyileşmesi, amputasyon oranları ve kardiyovasküler risk profilleri açısından karşılaştırılmış (46). Ek tedavi olarak sulodeksid uygulanan hastalarda sadece PTA ve antiplatelet/antikoagulan uygulanan hastalara göre TcPO₂ düzeylerinde artış olduğu, fibrinojen ve serum kreatinin konsantrasyonlarının azaldığı bulunmuş (46). PTA'dan sonra antiplatelet/antikoagulan tedavinin yanında sulodeksid uygulamasının, mikro dolaşımı iyileştirerek KEİ'li diyabet hastalarında PTA sonrası klinik profili iyileştirebileceği gösterilmiştir (46). Tüm bunların yanı sıra COVID-19 sonrası endotel fonksiyonlarının normalize edilebilmesi ve COVID-19 sonrası koagülopatinin önüne geçilebilmesi için de umut vadettiği öngörülmektedir (47).

Sıçanlarda yapılan ekstremité iskemî reperfüzyonu sonrası oluşan renal uzak organ hasarında, iskemî sonrası sulodeksid uygulanan grubun böbrek örneklerinin histolojik incelemesinde değerlendirilen ödem, nefron yapısal bütünlüğünde bozulma, inflamatuvar hücre infiltrasyonu gibi parametrelerin, iskemî reperfüzyon grubundan anlamlı biçimde düşük düzeyde olduğu görülmüş ve TUNEL yöntemi ile sayılan apoptotik hücre yoğunluğunun iskemî reperfüzyon grubundan anlamlı ölçüde az olduğu değerlendirilmiş (11). Aynı çalışmada iskemî-reperfüzyon sonrası serum düzeyleri artan MMP-9 (matriks metalloproteinaz-9), IL-1 β , TNF- α ve IFN- γ gibi inflamatuvar belirteçlerin sulodeksid uygulaması ile azaldığını göstermişler (11). Benzer biçimde böbrek doku örneklerinde kas iskemî-reperfüzyonunu takiben artan MDA düzeyleri ve miyeloperoksidaz aktivitesi ile azalan glutatyon düzeyinin, sulodeksid uygulandığı durumda sulodeksidin

antioksidan etkinliği ile belirgin olarak iyileştirildiği ve ayrıca renal hücrelerde apoptozisin azaldığı görülmüş (11).

Yin ve ark.'nın (2017), renal iskemi-reperfüzyon sıçan modelinde sulodeksidin koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, iskemi-reperfüzyon ile azalan SOD aktivitesi ve artan MDA düzeyleri, sulodeksid  n uygulaması ile olumlu yönde değişmiş ve iskemi-reperfüzyon kontrollerine göre SOD aktivitesi düzelirken MDA düzeyleri düşük bulunmuş (10). Ayrıca yine renal iskemi-reperfüzyon etkisiyle düzeyleri artan TNF- , MCP-1 (monosit kemotaktik protein-1) ve ICAM-1 doku düzeylerinin sulodeksid  n uygulamasıyla baskılandığı ve apoptozisin da azaldığı gözlenmiş (10). Başka bir çalışmada sulodeksid uygulamasının, miyokard iskemi reperfüzyonu oluşturulmuş farelerde miyokard hasarını ve kardiyomiyosit apoptozisini azalttığı, serum SOD düzeyini arttırırken MDA düzeyini azalttığı görülmüş (48).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu deneysel çalışma için Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 30.04.2024 tarih ve G.Ü.ET-24.035 kod numarasıyla onay alındı. Çalışmanın *in vivo* aşamasında kullanılan canlı hayvan temini ve deneyler sırasında kullanılan sarf maddelerin temini için gerekli bütçe desteği Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin TTU-2024-9553 kodu projesiyle sağlandı. Çalışmanın, canlı hayvanlar üzerinde testiküler torsiyon-detorsiyon modelinin gerçekleştirildiği ve etken madde uygulamasının yapıldığı *in vivo* deney aşamaları Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (GÜDAM) gerçekleştirildi. Deney sonunda sakrifikasyonu takiben çıkarılan dokularla ilgili çalışmalar Nörobilim ve Nöroteknoloji Mükemmeliyet Ortak Uygulama ve Araştırma Merkezi (NÖROM) Hücresel Nörobilim Laboratuvarı'nda yürütüldü.

3.1. Hayvanlarda Torsiyon-Detorsiyon Modelinin Oluşturulması ve Etken

Maddenin Uygulanması

Bu çalışmada 200-250 gr ağırlığında 28 adet Sprague Dawley türü erkek sıçanlar kullanıldı. On iki saat aydınlık/karanlık döngüsünde, sabit 22°C sıcaklık ve nem kontrollü hayvan barınma yerlerinde, standart sıçan yemi ve su ile beslenen hayvanlar her grupta 7 adet sıçan olacak şekilde randomize edilerek 4 gruba ayrıldı:

- Grup 1: Sham+serum fizyolojik (Grup S). Bu gruptaki sıçanlarda skrotal insizyon sonrası sol testis serbestleştirildi, kuyruk veninden 0.10 ml serum fizyolojik uygulandı. Sonrasında testis skrotuma yerleştirilerek skrotum kapatıldı.

- Grup 2: Sham+sulodeksid (Grup SUL). Bu gruptaki sıçanlarda skrotal insizyon sonrası sol testis serbestleştirildi, kuyruk veninden 10 mg/kg sulodeksid uygulandı. Sonrasında testis skrotuma yerleştirilerek skrotum kapatıldı.

- Grup 3: Torsiyon-detorsiyon + serum fizyolojik (Grup T/D). Bu gruptaki sıçanlarda skrotal insizyonla sol testis serbestleştirilerek torsiyone edildi. Kuyruk veninden 0.10 ml serum fizyolojik uygulamasından 30 dakika sonra sol testis detorsiyone edildi ve skrotuma yerleştirilerek skrotum kapatıldı.

- Grup 4: Torsiyon-detorsiyon + sulodeksid (Grup T/D-SUL). Bu gruptaki sıçanlarda skrotal insizyon sonrası sol testis serbestleştirilerek torsiyone edildi. Kuyruk veninden 10 mg/kg sulodeksid uygulamasından 30 dakika sonra sol testis detorsiyone edildi ve skrotuma yerleştirilerek skrotum kapatıldı.

Tüm gruplardan hayvanlara cerrahi işlem öncesi 5 mg/kg/i.m. ksilazin (IPM Ksilazin %2, IPM İlaç, Türkiye) ve 45 mg/kg/i.m. ketamin (Ketalar® flakon, Parke-Davis, Pfizer, Birleşik Devletler) ile genel anestezi uygulandı. Sham grubundan hayvanların sol skrotumuna yapılan vertikal paramedian insizyon sonrası sol testis serbestleştirildi ve tekrar anatomik lokasyonuna yerleştirilip insizyon yeri geçici olarak kapatıldı. Bu uygulamayı takip eden 90. dakikada kuyruk veninden 0.10 ml serum fizyolojik uygulandı ve serum fizyolojik uygulamasından 30 dakika sonra insizyon sütür ile nihai olarak kapatıldı. Detorsiyondan önceki 120 dakikalık bekleme süresince yara yerinin zarar görmemesi için serum fizyolojik ile ıslatılmış gazlı bez ile üzeri örtüldü. SUL grubundan hayvanların sol skrotumuna yapılan vertikal paramedian insizyon sonrası sol testis serbestleştirildi ve tekrar anatomik lokasyonuna yerleştirilip insizyon yeri geçici olarak kapatıldı. Bu uygulamayı takip

eden 90. dakikada kuyruk veninden 10 mg/kg sulodeksid (Trepurin® 600 L.R.U./2ml, Omikron, İtalya) uygulandı ve sulodeksid uygulamasından 30 dakika sonra insizyon suture ile nihai olarak kapatıldı. Detorsiyon öncesi 120 dakikalık bekleme süresince yara yerinin zarar görmemesi için serum fizyolojik ile ıslatılmış gazlı bez ile üzeri örtüldü. T/D grubundan sıçanların sol skrotumuna yapılan vertikal paramedian insizyon sonrası sol testis serbestleştirildi. Ardından serbestleştirilen testis saat yönünde 720° döndürülerek torsiyone edildi. Bu sırada kendiliğinden detorsiyone olmaması için suture ile internal spermatik fasyaya fikse edilen testis yerine yerleştirilerek skrotal insizyon hattı suture ile geçici olarak kapatıldı. Torsiyonun 90. dakikasında kuyruk veninden 0.10 ml serum fizyolojik uygulanıp, uygulamadan 30 dakika sonra suture açılarak sol testis detorsiyone edildi ve anatomik pozisyonuna geri yerleştirilerek skrotal insizyon nihai olarak kapatıldı. Detorsiyon işleminden önceki 120 dakikalık bekleme süresince insizyon bölgesinin zarar görmemesi için serum fizyolojik ile ıslatılmış gazlı bez ile üzeri örtüldü. T/D-SUL grubundan sıçanların sol skrotumuna yapılan vertikal paramedian insizyon sonrası sol testis serbestleştirildi. Serbestleştirilen testis saat yönünde 720° döndürülerek torsiyone edildi. Torsiyonda iken kendiliğinden detorsiyone olmaması için suture ile internal spermatik fasyaya fikse edilen testis yerine yerleştirilerek skrotal insizyon hattı suture ile geçici olarak kapatıldı. Torsiyonun 90. dakikasında kuyruk veninden 10 mg/kg sulodeksid uygulandı ve uygulamadan 30 dakika sonra suture açılarak sol testis detorsiyone edildi. Detorsiyone edilen testis anatomik lokasyonuna geri yerleştirilip skrotal insizyon nihai olarak kapatıldı. Detorsiyon öncesinde 120 dakikalık bekleme süresince insizyon yerinin zarar

görmemesi için serum fizyolojik ile ıslatılmış gazlı bez ile üzeri örtüldü. Detorsiyondan 24 saat sonra tüm hayvanlar feda edilerek dokuları toplandı.

3.2. Testis Doku Örneklerinde Biyokimyasal Analizler

Sakrifikasyon işlemi sırasında çıkarılan sol testis tartılarak ikiye bölündü. Sol testisin bir yarısı MDA analizi ve katalaz enzim aktivitesi tayini için sıvı nitrojen içerisine alındı ve deney gününe kadar -80 °C’de saklandı. Deney gününde doku örnekleri tartılarak homojenize edildikten sonra homojenatlar santrifüj edildi. Süpernatantlar ayrılarak MDA ve katalaz (CAT) enzim aktivitesi tayini için kullanıldı. Homojenat ve süpernatantlardaki protein miktarı Lowry metoduna göre yapıldı (49). Protein standartı olarak BSA (Sigma) kullanıldı. 0.02-0.2 mg/ml konsantrasyon aralığında standartlar kullanılarak standart grafiği çizildi ve eğimden numunelerdeki protein miktarları hesaplandı.

MDA tayini Van Ye TM ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı (50). Numune tüplerine fosfat tamponu, etanol, TBA, TCA ve numune eklendi. Numune körü ve standart körü tüplerine ise TBA hariç diğer reaktifler eklendi. Standart tüpüne fosfat tamponu, TBA, TCA ve etanol eklenerek 30 dakika kaynar su banyosunda (85-100 °C) inkübe edilmesini takiben çeşme suyu altında soğutularak 5000 g’ de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantları ayrıldı. Daha sonra numune, standart kör tüplerine ve standart tüpüne TBA eklendi ve iyice karıştırılarak spektrofotometrede 532 nm’de her bir tüpün absorbansı kendi körüne karşı okundu. Sonuçlar MDA standartı olarak kullanılan 1,1,3,3-Tetraetoksi propanla çizilen standart grafiğin eğiminden yararlanılarak µmol MDA/mg protein olarak verildi.

Testis numunelerindeki CAT enzim aktivitesi tayini Aebi metoduna göre yapıldı (51). Spektrofotometre küvetine tamponlanmış H_2O_2 çözeltisi konuldu. 240nm’de absorbans değişimi bir süre takip edildi. Absorbans değişimi durduktan sonra numune ilave edilerek karıştırıldı. Absorbans değişimi 0. ve 5. dakikalar arasında takip edildi. İlk okunan (0. dakika) absorbans kör olarak değerlendirildi. Katalaz tayini sonucu elde edilen sonuçlar protein miktarlarına bölünerek spesifik aktivite (IU/mg protein) olarak verildi.

3.3. Testis Doku Örneklerinde Histolojik Analizler

Sakrifikasyon işlemi sırasında çıkarılan sol testisin diğer yarısı histolojik incelemeler için %10’luk tamponlu nötral formalin (pH 7.4) içine alındı. Nötral formalin içerisinde 72 saat fiksasyon sonrası doku örneklerine rutin doku takip prosedürü uygulanarak parafin bloklar haline getirilmiştir. Bunun için fiksasyonu takiben akar su altında yıkanarak fiksatif uzaklaştırılan dokular 2 değişim %75’lik etanolde birer saat, 2 değişim %96’lık etanolde sırasıyla 1 saat ve gece boyunca ve ertesi gün 2 değişim %100 etanol içerisinde birer saat bekletilerek dehidrate edildi. Dehidratasyonun ardından ksilen içerisinde şeffaflaştırılan dokular 60 °C’ye ayarlanmış etüv içerisinde sıvı parafin içerisine alınarak 4 saat parafin infiltrasyonuna bırakıldı. Sıvı parafinde infiltrasyonun tamamlanmasının ardından dokular parafine gömülerek parafin bloklar elde edildi.

Parafin bloklardan döner mikrotom (HistoCore MULTICUT, Leica, Almanya) ile 4 µm kalınlığında kesitler adezivli lamalar üzerine alındı. Dokular lama alındıktan sonra oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı ve ardından 1 gece boyunca

60 °C’lik etüvde bekletilerek HE boyaması ve immünohistokimyasal boyamalar için hazır hale getirildi.

3.3.1. Testis doku örneklerinin hematoksilen-eozin boyanması ve boyalı preparatların incelenmesi

Torsiyon-detorsiyon nedeniyle oluşan iskemi reperfüzyon hasarının, testis doku örneklerinde fertilizasyon potansiyelini etkileyecek şekilde spermatogenezi ve spermatozoon kalitesini azalttığı ve ayrıca testis morfolojisini önemli düzeyde hasara uğrattığı daha önceki çalışmalarla ortaya konulmuş olup bu çalışmada torsiyon-detorsiyonun neden olduğu iskemi reperfüzyon hasarının ve detorsiyon öncesi sulodeksid uygulamasının fertilizasyon potansiyeli ve testis morfolojisi üzerine etkisini değerlendirmek için HE ile boyadığımız kesitlerde Johnsen Skoru Benzeri Skorlama, Cosentino skorlaması ve seminifer tübül çapı ölçümleri yapıldı (52–55). Bunu yanı sıra HE boyalı aynı kesitlerde, torsiyon-detorsiyonun etkisiyle gonadlarda ortaya çıkan iskemi-reperfüzyon hasarının temel bileşenleri olan vasküler konjesyon, hemoraji, nötrofil infiltrasyonu ve ayrıca gonadal hücrelerde dejeneratif değişikliklerin değerlendirildiği bir iskemi reperfüzyon hasarı skorlaması da yapıldı (54,56). Bu amaçla testis parafin bloklarından 4 µm kalınlığında alınan kesitler aşağıdaki prosedüre göre HE ile boyandı.

HE boyama prosedürü:

- Parafin doku kesitleri öncelikle deparafinizasyon için ksilende bekletildi.
- Ksilen aşamasından sonra dokular rehidrasyon için azalan alkol serisinden (%100, %96, %75) geçirildi ve ardından distile suda yıkandı.

- Daha sonra dokular 13 dakika Harris hematoksilen (Bio-Optica, 05-06004, İtalya) solüsyonunda bekletilerek boyandı.

- Boyama işlemi ardından mordanlama amacı ile kesitler akar su altında yıkandı.

- Yıkama sonrası kesitler 12 dakika eozin solüsyonunda (Bio-Optica, 05-10003, İtalya) tutuldu.

- Eozin aşaması sonrası kesitler akar su altında yıkandı.

- Dehidrasyon için kesitler %75, %96 ve %100'lük alkollerden geçirildi.

- Ksilende bekletildikten sonra kesitler entellan ile kapatıldı.

HE boyalı tüm örnekler ışık mikroskopunda (Leica DM 4000B, Almanya) 100×, 200× ve 400× büyültmelerde incelenerek Johnsen skoru benzeri skarlama, Cosentino skarlama ve ayrıca iskemi-reperfüzyon hasarının temel histopatolojik değişikliklerinin değerlendirildiği skarlamlar yapıldı. Değerlendirmeler sırasında ve ayrıca seminifer tübül çap ölçümleri için, Leica LAS V4.12 programı (Leica, Almanya) kullanılarak kesitlere ait görüntüler elde edildi.

3.3.1.1. Hematoksilan-eozin boyalı örneklerde torsiyon detorsiyonun neden olduğu

iskemi reperfüzyon hasarının histopatolojik bulgularının değerlendirmesi

HE boyalı testis kesitlerinde, torsiyon-detorsiyonun neden olduğu akut iskemi-reperfüzyon hasarının histopatolojik değişikliklerini ve sulodeksid uygulamasının etkinliğini değerlendirmek için tüm kesit alanında vasküler konjesyon, hemoraji, nötrofil infiltrasyonu ve germ hücre hasarı değişkenleri

modifiye, yarı-kantitatif bir yöntemle değerlendirildi (54,56). Her bir değişkenin 0-3 arasında puanlandığı bu skorlamaya göre:

- Tüm kesit alanının $\leq 5\%$ 'inin etkilendiği histopatolojik değişiklik durumunda skor 0,
- Tüm kesit alanının $6-30\%$ 'unun etkilendiği histopatolojik değişiklik durumunda skor 1,
- Tüm kesit alanının $31-60\%$ 'ının etkilendiği histopatolojik değişiklik durumunda skor 2,
- Tüm kesit alanının $\geq 61\%$ 'inin etkilendiği histopatolojik değişiklik durumunda skor 3 olarak atandı.

Her bir değişkenin skorlanması sonucu elde edilen veriler ayrı ayrı karşılaştırıldı. Yanı sıra tüm değişkenlere ait skorların toplanması ile her bir testis doku örneği için elde edilen toplam hasar skoru da gruplar arasında karşılaştırıldı.

3.3.1.2. Hematoksilen-eozin boyalı örneklerde johnsen skoru benzeri skorlama

Testis torsiyon-detorsiyonu nedeniyle oluşan iskemi reperfüzyon hasarının ve detorsiyon öncesinde uygulanan sulodeksidin germ hücre maturasyonu ve fertilizasyon potansiyeli üzerine etkisini değerlendirmek için HE boyalı testis preparasyonlarında uygulanan Johnsen skoru benzeri skorlama, Tablo 1'de belirtilen tanımlamalara göre yapıldı (55). Bu amaçla her hayvandan alınan testis dokusu kesitlerinde 100 adet seminifer tübül taranarak, her bir tübüle Tablo 1'de belirtilen tanımlamalara uygun olan bir skor atandı. Ardından değerlendirilen bu

100 tübülün ortalama skoru hesaplanarak her bir hayvan için ortalama bir Johnsen skoru benzeri skor (JSBS) belirlendi. Elde edilen veriler gruplar arası karşılaştırıldı.

Tablo 1. Johnsen skoru benzeri skor (55)

Skor	Tanımlama
10	Olgun spermatozoon hücrelerinin mevcut olduğu tamamlanmış spermatogenez
9	Olgun spermatozoon var fakat seminifer tübül epiteli disorganize
8	Birkaç adet spermatozoon (<5-10) var
7	Spermatozoon yok, spermatid var
6	Spermatozoon yok, birkaç adet spermatid (<5-10) var
5	Spermatozoon ya da spermatid yok, spermatosit var
4	Spermatozoon ya da spermatid yok, birkaç adet spermatosit (<5) var
3	Sadece spermatogonia var
2	Sadece Sertoli hücresi var
1	Seminifer tübül kesitinde hiçbir hücre görülmüyor

3.3.1.3. Hematoksilen-eozin boyalı örneklerde cosentino skorlaması

Testis torsiyon-detorsiyonu nedeniyle oluşan iskemi reperfüzyon hasarının ve detorsiyon öncesinde uygulanan sulodeksidin seminifer tübül morfolojisi üzerine etkisini değerlendirmek için HE boyalı testis örneklerinde Cosentino skorlaması (CS), Tablo 2’de belirtilen tanımlamalara göre uygulandı (54). Cosentino skorlaması için her hayvanın testis örneklerine ait HE boyalı kesitlerin tüm alanı mikroskop altında taranarak her kesit için Tablo 2’de belirtilen tanımlamalara uygun bir skor belirlendi. Elde edilen skorlar gruplar arası karşılaştırıldı.

Tablo 2. Cosentino skoru (54)

Düzye	Tanımlama
Düzye 1	Germinal hücrelerin düzenli organize olduğu normal testis yapısı
Düzye 2	Daha az düzenli, birbirine bağı olmayan germinal hücrelerin ve sıkıca bir araya gelmiş seminifer tübüllerin görüldüğü hasar
Düzye 3	Piknozis nedeniyle boyutları küçülmüş nükleuslarıyla, düzensiz, dökülmüş germinal hücreler ve sınırlarının daha az belirgin olduğu seminifer tübül yapılarının izlendiğı hasar
Düzye 4	Germinal hücrelerin koagülatif nekrozu ile belirgin, sıkıca bir araya gelmiş seminifer tübüllerin görüldüğü hasar

3.3.1.4. Hematoksilen-eozin boyalı örneklerde seminifer tübül çapı ölçümleri

Testis torsiyon-detorsiyonu durumunda oluşan iskemi reperfüzyon hasarının ve detorsiyon öncesinde uygulanan sulodeksidin seminifer tübül morfolojisi üzerine etkisini değerlendirmek için HE boyalı testis örneklerinde Cosentino skorunun yanı sıra seminifer tübül çapı ölçümü yapılarak her testis doku örneğine ait ortalama seminifer tübül çapı ve (OSTÇ) değeri belirlendi (52). Bu amaçla her HE boyalı testis örneğinde en yuvarlak olan 10 seminifer tübül ışık mikroskopunda (Leica DM 4000B, Almanya) 100× büyültmede Leica LAS V4.12 programı (Leica, Almanya) kullanılarak görüntülendi. Elde edilen görüntülerde tübül çapı ImageJ2 (2.16.0/1.54p; National Institutes of Health, Birleşik Devletler) programı kullanılarak ölçüldü. Ölçümlerin sonucunda her bir örnek için ortalama seminifer tübül çapı belirlenerek gruplar arasında karşılaştırıldı.

3.3.2. Testis doku örneklerinde immunohistokimyasal boyamalar ve boyalı

kesitlerde immunoreaktivitenin değerlendirilmesi

Testis torsiyon-detorsiyonu nedeniyle oluşan iskemi reperfüzyon hasarında, detorsiyon öncesinde uygulanan sulodeksidin piroptosis yolağı üzerinden reperfüzyon hasarını önleyici etkisini araştırmak üzere, piroptosis yolağının önemli

belirteçleri olan NLRP3, aktif kaspaz-1, GSDMN, IL-1 β ve IL-18 ekspresyonları immünohistokimyasal olarak incelendi.

İmmünohistokimyasal yöntem:

- Testis örneklerine ait parafin kesitler deparafinizasyon için ksilende bekletildi.
- Deparafinizasyondan sonra dokular rehidratasyon için azalan alkol serisinden (%100, %96, %75) geçirildi ve ardından distile suda bekletildi.
- Tamponlanmış sitrat solüsyonu (pH 6.0) (PatoLab, PL-1000-CTB, Türkiye) içerisine alınan doku kesitlerine ısı ile indüklenen antijen dönüştürme işlemi uygulandı.
- Dokular oda ısısına geldikten sonra fosfat tamponlu salin (phosphate-buffered saline, PBS) (pH 7.4) (BioShop, PBS404, Kanada) ile yıkandı.
- PBS ile yıkama sonrası endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için kesitler %3'lük hidrojen peroksit ile inkübe edildi.
- Tekrar PBS ile yıkama işleminden sonra spesifik olmayan antijen antikor bağlanmasını engellemek amacıyla doku kesitlerine protein bloklama solüsyonu (PatoLab, PL-125-PBQ, Türkiye) uygulandı.
- Protein bloklama solüsyonu uzaklaştırılarak kesitler yıkanmadan, primer antikorlar eklendi ve kesitler +4°C'de gece boyunca primer antikor inkübasyonuna bırakıldı. Kullanılan antikorlar ve PBS içerisindeki dilüsyon oranları aşağıdaki şekilde belirlendi:
 - NLRP3 primer antikoru (Bioss, BS-10021R), 1:200 dilüsyon

○ Aktif kaspaz-1 primer antikoru (Proteintech, 22915-1-AP), 1:100 dilüsyon

○ GSDMN primer antikoru (Affinity, DF13758), 1:100 dilüsyon

○ IL-1 β primer antikoru (Elabscience, E-AB-66749), 1:100 dilüsyon

○ IL-18 primer antikoru (Elabscience, E-AB-93262), 1:100 dilüsyon

• Primer antikorla inkübasyonu takiben kesitler PBS ile yıkandı ve ardından biyotin ile konjuge sekonder antikor (PatoLab, PL-125-BN, Türkiye) ile inkübe edildi.

• Sekonder antikorla inkübasyonu takiben kesitler PBS ile yıkandı ve ardından streptavidin-peroksidaz enzim kompleksine (PatoLab, PL-125-HR, Türkiye) etkin bırakıldı.

• Sonrasında tekrar PBS ile yıkanan kesitlere, immün reaksiyonun gözle görülür hale gelmesi için diaminobenzidin (DAB) kromojen-substrat kompleksi (PatoLab, PL-125-HD, Türkiye) uygulandı

• Kesitler zemin boyası için Mayer'in hematoksilen solüsyonu (BioOptica, 05-06002, İtalya) ile boyandı.

• Ardından akarsu altında yıkanan kesitler artan dereceli alkol serisinden (%75, %96, %100) geçirildi.

• Kesitler ksilende bekletildikten sonra entellan ile kapama işlemi yapıldı.

İmmünohistokimyasal boyama işlemi sonrası, doku kesitlerinde immünoreaktivitenin değerlendirilmesi için kesitler ışık mikroskopunda (Leica DM 4000B, Almanya) 200 $\times$ büyültmede incelendi ve Leica LAS V4.12 programı (Leica, Almanya) kullanılarak her kesitten çıkışma göstermeyen 8 alanın görüntüsü

alındı. Elde edilen görüntülerde NLRP3, aktif kaspaz-1, GSDMN, IL-1 β ve IL-18 immün boyanma yoğunluğu ImageJ2 (2.16.0/1.54p; National Institutes of Health, Birleşik Devletler) programı kullanılarak değerlendirildi ve sonuçlar “% alan” olarak ifade edildi. Ortalama immün boyanma yoğunlukları gruplar arasında karşılaştırıldı.

3.4. İstatistiksel Analizler

Çalışma verileri SPSS (Statistic Program for Social and Science) istatistik programı kullanılarak analiz edildi. İstatistiksel değerlendirme SPSS 26.0 bilgisayar programında aşağıda sıralanan testler kullanılarak gerçekleştirildi ve $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analiz: veriler [ortalama $\pm$ standart sapma] ve [ortanca, (%25- %75)] olarak sunuldu.

Ölçülebilen parametrelere Kolmogorov-Smirnov testi uygulanarak dağılımın normal ya da anormal olup olmadığı belirlendi. Normal dağılım gösteren veriler ortalama $\pm$ standart sapma, diğerleri ise ortanca (%25- %75) olarak belirtildi. Normal dağılım gösteren veriler; gruplar arasında fark olup olmadığını belirlemede bağımsız gruplarda ANOVA testi ile değerlendirildi. Farklılık olması durumunda gruplar arası Bonferroni testi ile karşılaştırma yapıldı. Normal dağılım göstermeyen veriler; gruplar arasında fark olup olmadığını belirlemede bağımsız gruplarda Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. Farklılık olması durumunda gruplar arası Mann-Whitney U testi ile karşılaştırma yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

Testis doku örneklerinde MDA düzeyi ve CAT enzim aktivitesi değerlendirme bulguları Tablo 3’de özetlendi. MDA düzeyi gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulundu ($p=0.041$). T/D grubunda MDA düzeyi sham ve SUL gruplarına göre anlamlı olarak artmış bulundu (sırasıyla, $p=0.020$ ve $p=0.010$). MDA düzeyi T/D-SUL grubunda T/D grubuna göre anlamlı olarak azalmış bulundu ($p=0.045$), (Tablo 3). CAT enzim aktivitesi gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulundu ($p=0.049$). T/D grubunda CAT enzim aktivitesi sham ve SUL gruplarına göre anlamlı olarak azalmış bulundu (sırasıyla, $p=0.042$ ve $p=0.013$), (Tablo 3).

Tablo 3. Testis doku örneklerinde MDA düzeyi ve CAT enzim aktivitesi bulguları
[Ort $\pm$ SS]

	Grup S (n=7)	Grup SUL (n=7)	Grup T/D (n=7)	Grup T/D-SUL (n=7)	P**
MDA ($\mu\text{mol/mg}$ protein)	590.28 $\pm$ 137.10	562.61 $\pm$ 117.13	796.92 $\pm$ 105.41*,&	620.51 $\pm$ 230.77+	0.041
CAT (IU/mg protein)	366.33 $\pm$ 135.14	400.90 $\pm$ 114.59	231.38 $\pm$ 115.69*,&	283.23 $\pm$ 102.01	0.049

p**: ANOVA testi ile anlamlılık düzeyi $p < 0.05$

* $p < 0.05$: Grup S ile karşılaştırıldığında; & $p < 0.05$: Grup SUL ile karşılaştırıldığında; + $p < 0.05$: Grup T/D ile karşılaştırıldığında

4.2. Hematoksilen Eozin Boyalı Kesitlerin Değerlendirme Sonuçları

Testis doku örneklerinde, torsiyon detorsiyonun neden olduğu histopatolojik değişiklikleri ve detorsiyon öncesi uyguladığımız sulodeksidin etkinliğini gruplar arası karşılaştırmalı olarak değerlendirmek için HE boyaması yapıldı. Germinal epitel hücrelerinde maturasyon sürecini değerlendirmek amacıyla

Johnsen benzeri skor kullanılırken, testis kesitlerinde seminifer tübül morfolojisini değerlendirmek amacıyla Cosentino skoru ve ortalama seminifer tübül çapı ölçümleri yapıldı. Bu skorlamalara ek olarak akut iskemi reperfüzyonun neden olduğu doku hasarının temel histopatolojik bileşenleri olan vasküler konjesyon, hemoraji, nötrofil infiltrasyonu ve germ hücre hasarı değişkenleri de değerlendirilerek gruplar arası karşılaştırma yapıldı.

4.2.1. Torsiyon detorsiyonun neden olduğu iskemi reperfüzyon hasarının histopatolojik bulgularının değerlendirme sonuçları

HE boyalı testis preparatlarında torsiyon detorsiyonun neden olduğu iskemi reperfüzyon doku hasarının değerlendirilmesi ile elde edilen sonuçlar Tablo 4’de özetlendi.

Tablo 4. Testis dokusunda torsiyon detorsiyonun neden olduğu iskemi reperfüzyon doku hasarının histopatolojik bulguları [Ortanca (%25-%75)]

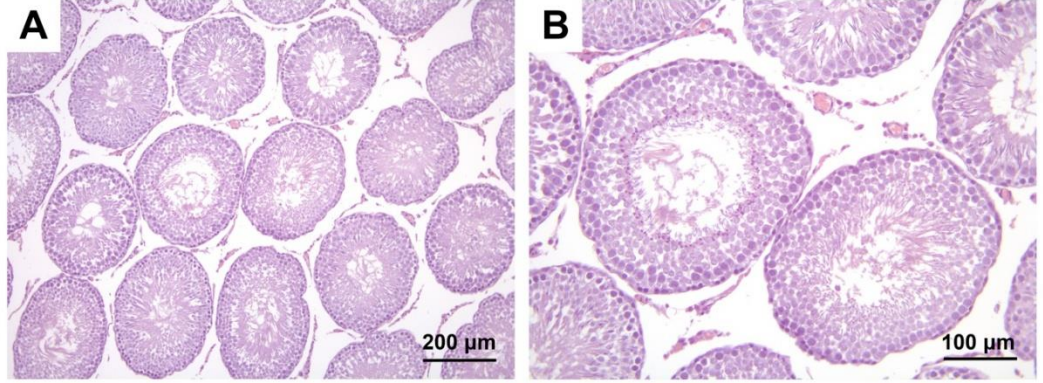
	Grup S (n=7)	Grup SUL (n=7)	Grup T/D (n=7)	Grup T/D- SUL (n=7)	P**
Hemoraji	0.00 (0-0)	0.00 (0-0)	1.00 (0-2)*,&	0.00 (0-1)	0.011#
Nötrofil infiltrasyonu	0.00 (0-0.5)	0.00 (0-0)	2.00 (1-3)*,&	1.00 (1-3)*,&	<0.001#
Germinal epitel hasarı	1.00 (1-2)	1.00 (1-1.5)	3.00 (3-3)*,&	2.00 (2-3)*,&	<0.001#
Vasküler konjesyon	0.00 (0-0.5)	0.00 (0-1)	3.00 (1-3)*,&	1.00 (1-3)*,&	0.004#
Toplam hasar skoru	2.00 (1-3)	1.50 (1-2)	9.00 (5-11)*,&	5.50 (4-8)*,&	<0.001#

p**: ANOVA testi ile anlamlılık düzeyi $p < 0.05$; # Kruskal Wallis testi ile karşılaştırıldığında

* $p < 0.05$: Grup S ile karşılaştırıldığında; & $p < 0.05$: Grup SUL ile karşılaştırıldığında; + $p < 0.05$: Grup T/D ile karşılaştırıldığında.

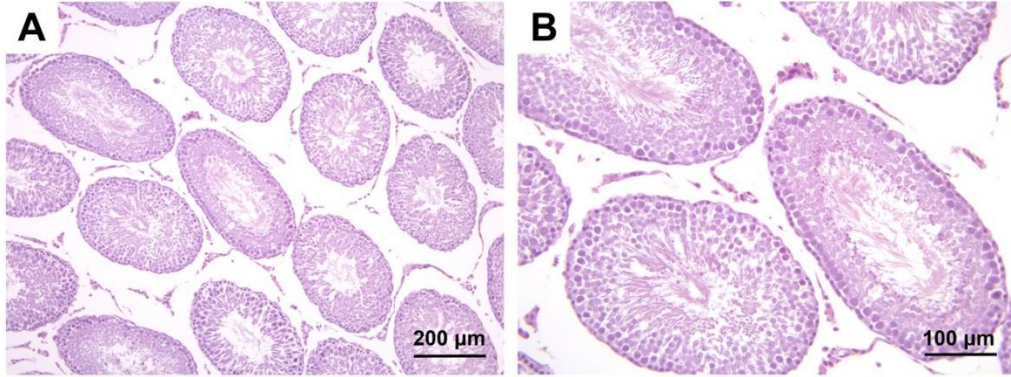
Sham grubuna ait HE ile boyanmış kesitlerin küçük ve büyük büyültmelerinin incelenmesinde testisin genel yapısının korunmuş olduğu, lümenlerinde olgun spermatozoaların ve çok katlı epitel özelliği gösteren germinal

epitelde normal hücre organizasyonunun izlendiği seminifer tübüllerin olağan yapılarını koruduğu görüldü (Resim 1).



Resim 1. Sham grubundan hayvanların HE boyalı testis kesitlerine ait mikrograflar. Seminifer tübüllerde olağan germinal epitel düzenlenimi ve lümende olgun spermatozoalar görülmektedir. Boya: HE. A mikrografi için büyültme 100×, B mikrografi için büyültme 200×.

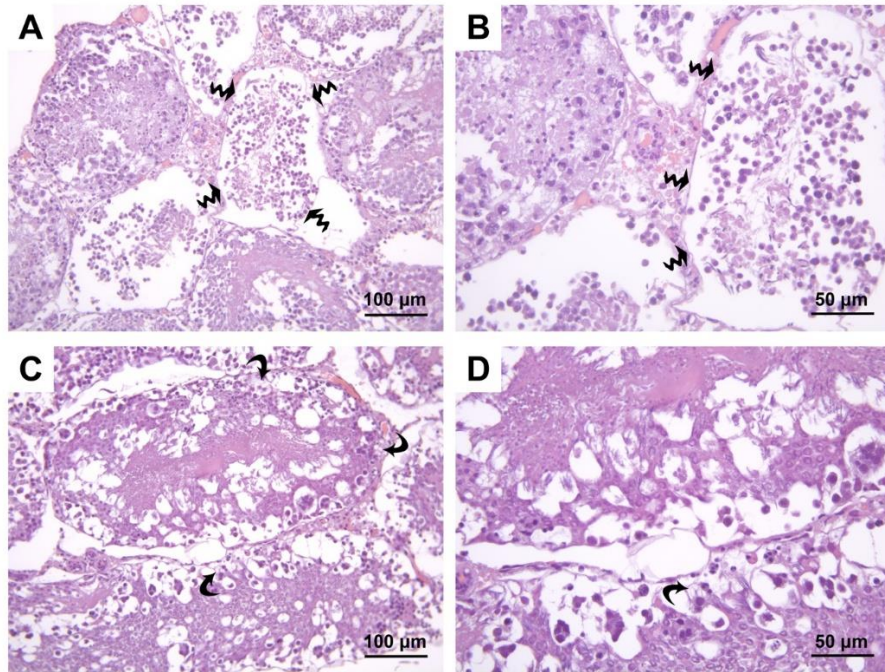
SUL rubuna ait HE ile boyanmış kesitlerin küçük ve büyük büyültmelerinin incelenmesinde, sham grubuna benzer şekilde testis genel yapısının ve seminifer tübül morfolojisinin korunduğu, iskemi reperfüzyon hasarının histopatolojik kriterleri açısından değerlendirildiğinde de iki grup arasında bir farklılık olmadığı gözlemlendi (Tablo 4; Resim 2).



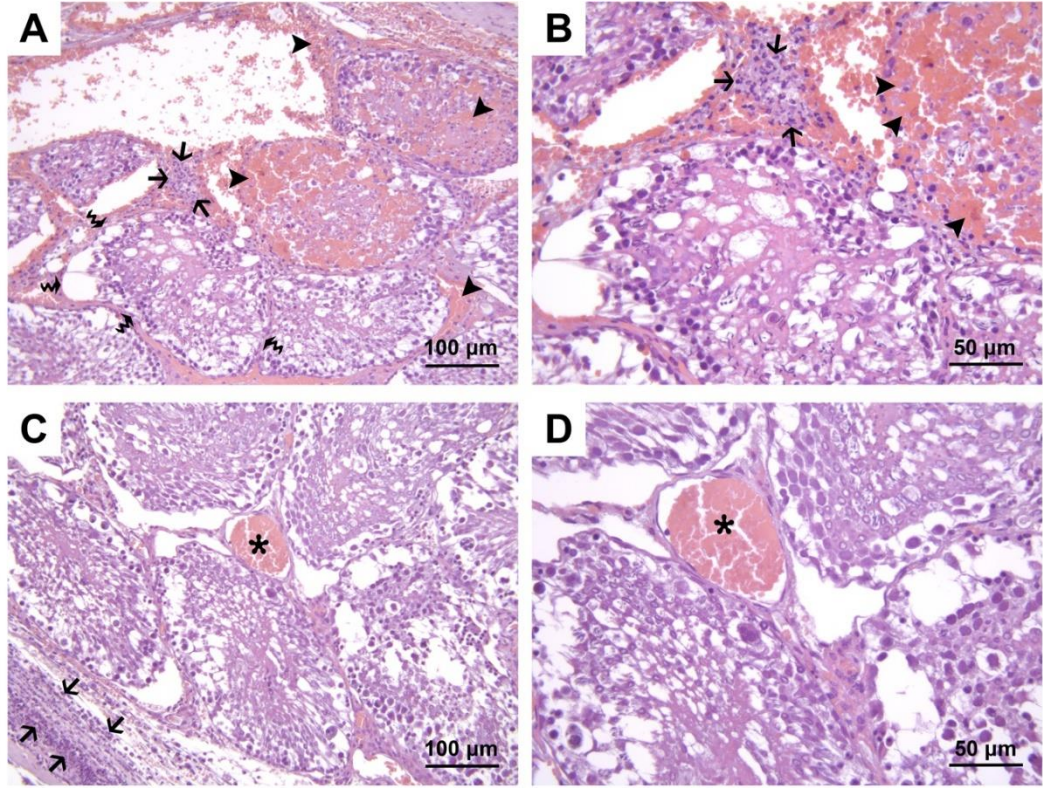
Resim 2. SUL grubundan hayvanların HE boyalı testis kesitlerine ait mikrograflar. Normal görünümde germinal epitelleriyle ve lümenlerinde olgun spermatozoalarıyla seminifer tübüllerin morfolojik açıdan sham grubundakilere benzer özellikler sergilediği görülmektedir. Boya: HE. A mikrografi için büyültme 100×, B mikrografi için büyültme 200×.

T/D grubuna ait HE ile boyanmış kesitlerin küçük ve büyük büyültmelerinin incelenmesinde; seminifer tübüllerde normal yapının ve şeklin korunmadığı, çok katlı epitel özelliği gösteren germinal epitelde, özellikle bazal membranın hemen üzerinde yer alan spermatogoniumlarda belirgin olmak üzere birbiri üzerine sıralanmış farklı gelişim aşamalarındaki spermatogenetik hücre serilerinde bozulma ve hücre kaybının olduğu, tübül lümeninde spermatozoaların azaldığı, seminifer tübül çaplarının diğer gruplara göre azaldığı dikkati çekti (Resim 3). Ayrıca bu grupta nötrofil infiltrasyonu, hemoraji ve seminifer tübüller arasındaki interstisyel bağ dokusunda bulunan kan damarlarında konjesyonun diğer gruplara göre belirgin olduğu izlendi (Resim 4). Gözlemlenen bu histopatolojik parametrelerden germinal epitel hasarı skorlanarak karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı farklılık bulundu ($p<0.001$). T/D grubunda germinal epitel hasarının, sham ve SUL gruplarıyla karşılaştırıldığında belirgin olarak artmış olduğu görüldü (sırasıyla, $p=0.002$ ve $p=0.001$). Kesitlerde değerlendirilen vasküler

konjesyon, hemoraji ve nötrofil infiltrasyonu düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında yine anlamlı farklılık olduğu görüldü (sırasıyla, $p=0.004$, $p=0.011$ ve $p<0.001$). T/D grubunda sham ve SUL gruplarına göre hemorajinin anlamlı olarak daha fazla olduğu (sırasıyla, $p=0.019$ ve $p=0.009$); vasküler konjesyonun T/D grubunda sham ve SUL gruplarına göre belirgin olarak artmış olduğu (sırasıyla, $p=0.009$ ve $p=0.004$); nötrofil infiltrasyonunun da T/D grubunda sham ve SUL gruplarına göre daha şiddetli olduğu (sırasıyla, $p=0.002$ ve $p<0.001$) belirlendi (Tablo 4).



Resim 3. T/D grubundan hayvanların HE boyalı testis kesitlerine ait mikrograflar. Mikrograf alanındaki tüm seminifer tübüllerde germinal epitel hasarlı olmakla birlikte hasarın en şiddetli olduğu ve germinal epitel hücrelerinin tamamen disorganize olarak döküldüğü tübüllerden bir tanesi ondüle ok ile gösterilmektedir (A ve B). Belirgin dejenerasyonun izlendiği bazı seminifer tübüllerde spermatogenetik seri hücrelerinde değişen düzeylerde vakuolizasyon (kıvrık oklar, C ve D) sonucu germinal epitel bütünlüğünün şiddetli bir biçimde bozulduğu görülüyor. Boya: HE. A ve C mikrografları için büyültme $200\times$, B ve D mikrografları için büyültme $400\times$.

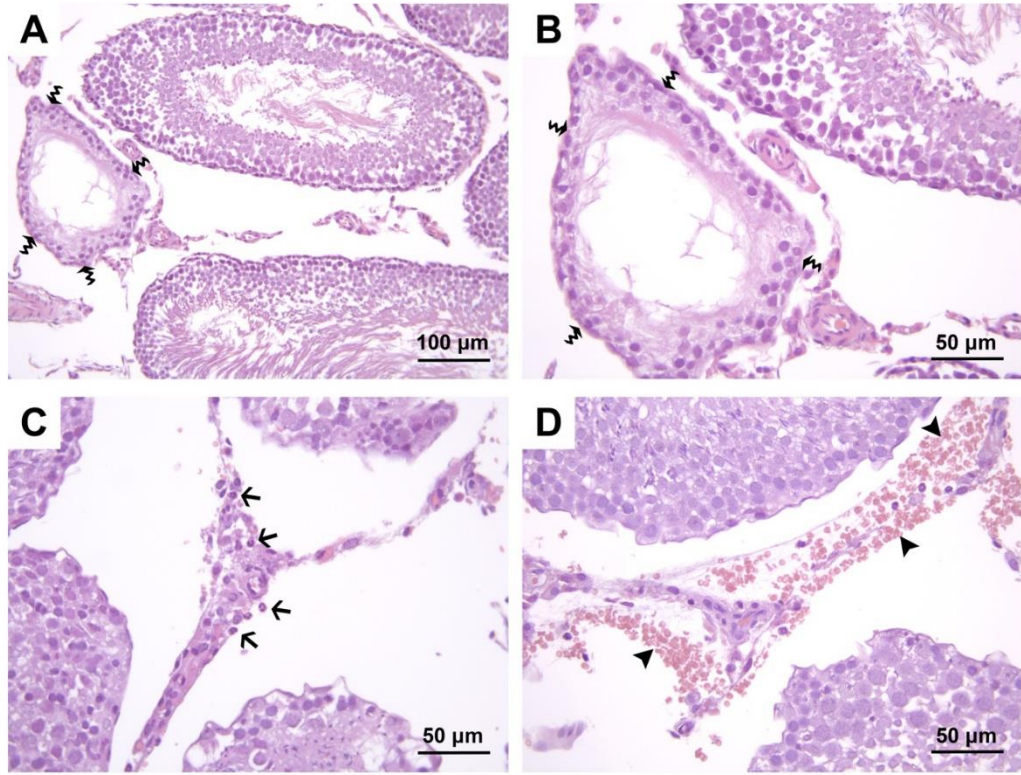


Resim 4. T/D grubundan hayvanların HE boyalı testis kesitlerine ait mikrograflar. Belirgin germinal epitel hasarının izlendiği seminifer tübülleri (bir tanesi ondüle oklarla gösterilmektedir, A), bazı kesit alanlarında seminifer tübüllerin içlerine kadar ilerleyen şiddetli hemoraji (ok başları, A ve B) ve nötrofil infiltrasyonu (oklar, A, B ve C) görülmektedir. Hemorajinin nispeten daha az izlendiği alanlarda, eritrosit ekstravazasyonuna belirgin vasküler konjesyonun eşlik ettiği görülmektedir (asteriskler, C ve D). Boya: HE. A ve C mikrografları için büyültme 200×, B ve D mikrografları için büyültme 400×.

T/D-SUL grubuna ait HE ile boyalı kesitlerin küçük ve büyük büyültmelerinin incelenmesinde; T/D grubu ile karşılaştırıldığında bazı seminifer tübüllerde yapı ve şekil bozuklukları ile germinal epitel hasarının devam etmekte olduğu ancak bazı tübüllerde normal yapı ve şeklin izlendiği, germinal epitel hasarının azaldığı ve seminifer tübül lümenindeki spermatozoa yoğunluğunun T/D grubuna göre artmış olduğu görüldü (Resim 5). Ayrıca bu grupta hemoraji, nötrofil infiltrasyonu ve interstisyel bağ dokudaki kan damarlarında konjesyonun T/D

grubuna göre azaldığı dikkati çekti (Resim 5). Histopatolojik değerlendirme sonucu yapılan istatistiksel karşılaştırmalar ele alındığında, T/D-SUL grubunda sham ve SUL gruplarına göre nötrofil infiltrasyonu anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla, $p=0.011$ ve $p=0.003$). Benzer şekilde, T/D-SUL grubunda sham ve SUL gruplarına göre vasküler konjesyon anlamlı olarak fazlaydı (sırasıyla, $p=0.044$ ve $p=0.020$). Germinal epitel hasarı değerlendirildiğinde, T/D-SUL grubunda sham ve SUL gruplarına göre germinal epitel hasarının daha şiddetli olduğu görüldü (sırasıyla, $p=0.021$ ve $p=0.003$) (Tablo 4).

Toplam hasar skoru değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı farklılık görüldü ($p<0.001$). T/D grubunda sham ve SUL gruplarına göre toplam hasar skoru anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla, $p=0.002$ ve $p<0.001$). Benzer şekilde, T/D-SUL grubunda sham ve SUL gruplarına göre toplam hasar skoru anlamlı olarak artmış bulundu (sırasıyla, $p=0.006$ ve $p=0.002$) (Tablo 4).



Resim 5. T/D-SUL grubundan hayvanların HE boyalı testis kesitlerine ait mikrograflar. Germinal epitel hasarı ile normal morfolojisini kaybetmiş dejenere tübüllerin (ondüle oklar, A ve B) yanı sıra lümeninde olgun spermatozoaların izlendiği, normal germinal epitel organizasyonu sergileyen seminifer tübüller görülmektedir (A). İnterstisyel alanda, T/D grubuna göre daha hafif düzeyde bir nötrofil infiltrasyonu (oklar, C) ve çok daha hafif düzeyde hemoraji (ok başları, D) dikkati çekmektedir. Boya: HE. A mikrografı için büyültme 200×, B, C ve D mikrografları için büyültme 400×.

4.2.2. Johnsen skoru benzeri skorlama ve cosentino skorlaması sonuçları

Torsiyon-detorsiyon hasarı sonrası testis dokusuna ait HE boyalı preparatlarda Cosentino skoru ve Johnsen skoru benzeri skor değerlendirmesi ile elde edilen bulgular Tablo 5’de özetlendi. Johnsen skoru benzeri skor grupları arasında anlamlı olarak farklı bulundu ($p < 0.001$). T/D grubunda sham ve SUL gruplarına göre Johnsen skoru anlamlı olarak düşük bulundu (her ikisi, $p < 0.001$). Benzer şekilde, T/D-SUL grubunda sham ve SUL gruplarına göre Johnsen skoru

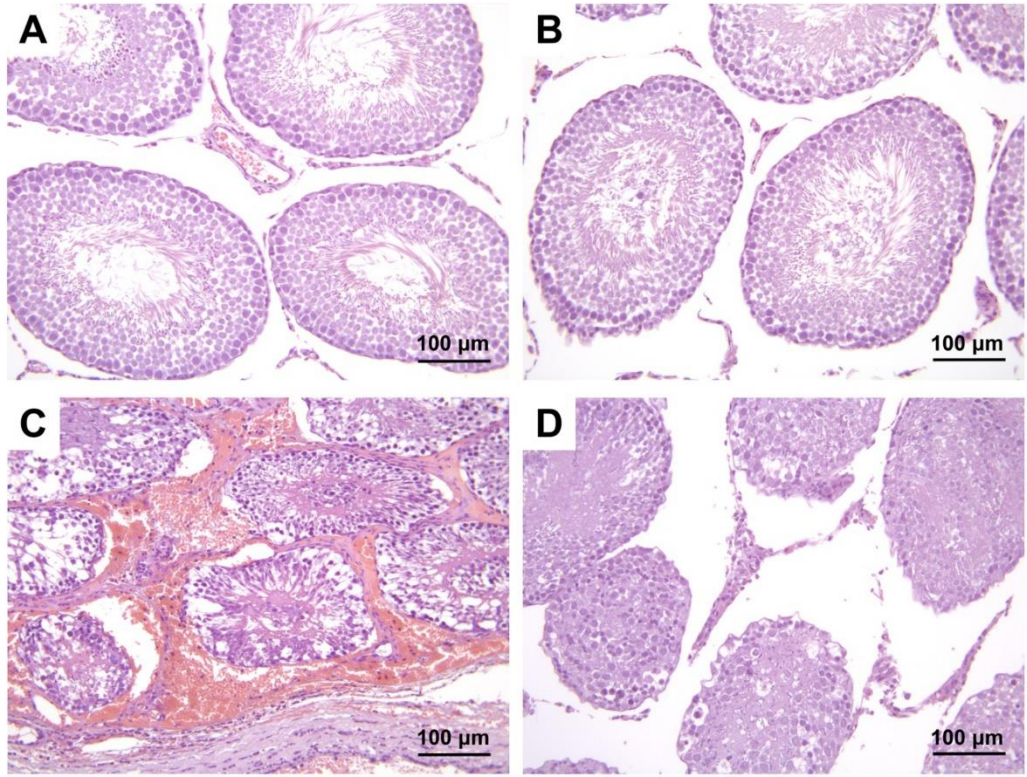
anlamli olarak dükük bulundu (sirasıyla, $p=0.007$ ve $p<0.001$). T/D grubuyla karşılaştırıldığında ise T/D-SUL grubunda Johnsen skoru belirgin olarak yüksek bulundu ($p=0.049$) (Tablo 5; Resim 6). Cosentino skoru gruplar arasında anlamli olarak farklı bulundu ($p<0.001$). T/D grubunda sham ve SUL gruplarına göre Cosentino skoru anlamli olarak yüksek bulundu (sirasıyla, $p<0.001$ ve $p=0.005$). Benzer şekilde, T/D-SUL grubunda sham ve SUL gruplarına göre Cosentino skoru anlamli olarak yüksek bulundu (sirasıyla, $p<0.001$ ve $p=0.012$). T/D grubuyla karşılaştırıldığında T/D-SUL grubunda Cosentino skoru belirgin olarak dükük bulundu ($p=0.031$) (Tablo 5; Resim 6).

Tablo 5. Testis doku örneklerinde Johnsen skoru benzeri skorlama ve Cosentino skorlaması bulguları [Ort $\pm$ SS, Ortanca (%25-%75)]

	Grup S (n=7)	Grup SUL (n=7)	Grup T/D (n=7)	Grup T/D- SUL (n=7)	P**
Johnsen skoru benzeri skor	8.39 $\pm$ 0.06	8.53 $\pm$ 0.54	7.58 $\pm$ 0.19*,&	7.92 $\pm$ 0.17*,&,+	<0.001
Cosentino skoru	1.00 (1-1)	1.00 (1-1)	3.00 (2-4)*,&	2.00 (2-2)*,&,+	<0.001#

p**: ANOVA testi ile anlamlılık düzeyi $p<0.05$; # Kruskal Wallis testi ile karşılaştırıldığında

* $p<0.05$: Grup S ile karşılaştırıldığında; & $p<0.05$: Grup SUL ile karşılaştırıldığında; + $p<0.05$: Grup T/D ile karşılaştırıldığında.



Resim 6. Sham (A), SUL (B), T/D (C) ve T/D-SUL (D) grubundan sıçanların testis dokusu HE boyalı preparasyonlarına ait mikrograflar. Sham (A) ve SUL (B) grubuna ait görüntülerde seminifer tübüllerin germinal epitelinin düzenli organizasyon sergilediği ve tübül lümeninde olgun spermatozoalar içerdiği görülmektedir. Yoğun hemorajinin izlendiği T/D grubuna ait görüntüde (C) çapları küçülmüş olan seminifer tübüllerde germinal epitelin belirgin hasara uğradığı izlenmektedir. T/D-SUL grubuna ait kesitte (D) seminifer tübül çaplarının ve germinal epitel bütünlüğünün daha iyi korunduğu dikkati çekmektedir. Boya: HE. Tüm mikrograflar için büyültme 200×.

4.2.3. Seminifer tübül çapı ölçümleri sonuçları

Torsiyon-detorsiyon ile oluşan hasarın ve detorsiyon öncesinde uygulanan sulodeksidin seminifer tübül morfolojisi üzerine etkisini değerlendirmek için HE boyalı testis örneklerinde seminifer tübül çapı ölçümü ile elde edilen bulgular Tablo 6’da özetlendi. Ortalama seminifer tübül çapları gruplar arasında anlamlı olarak farklılık gösterdi ($p=0.026$). T/D grubunda sham ve SUL gruplarına göre ortalama seminifer tübül çapı anlamlı olarak düşük bulundu (sırasıyla, $p=0.004$ ve $p=0.027$).

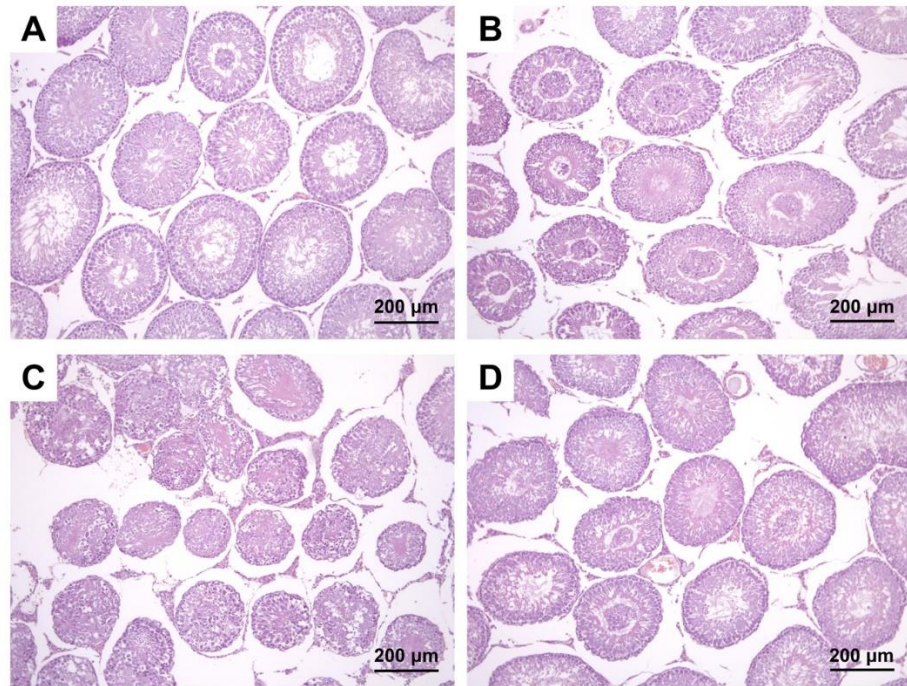
T/D grubuyla karşılaştırıldığında T/D-SUL grubunda ortalama seminifer tübül çapı anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.029$), (Tablo 6; Resim 7).

Tablo 6. Testis doku örneklerinde seminifer tübül çapı ölçümlerine ait bulgular [Ort $\pm$ SS]

	Grup S (n=7)	Grup SUL (n=7)	Grup T/D (n=7)	Grup T/D-SUL (n=7)	P**
Ortalama seminifer tübül çapı (μ m)	276.00 $\pm$ 29.19	260.46 $\pm$ 38.62	215.17 $\pm$ 23.36*,&	258.08 $\pm$ 37.37+	0.026

p**: ANOVA testi ile anlamlılık düzeyi $p < 0.05$

* $p < 0.05$: Grup S ile karşılaştırıldığında; & $p < 0.05$: Grup SUL ile karşılaştırıldığında; + $p < 0.05$: Grup T/D ile karşılaştırıldığında.



Resim 7. Sham (A), SUL (B), T/D (C) ve T/D-SUL (D) grubundan sıçanların testis dokusu HE boyalı preparasyonlarına ait mikroyraflar. T/D grubunda (C) seminifer tübül çaplarının diğer gruplara göre daha düşük olduğu görülmektedir. T/D grubunda olduğu gibi torsiyon detorsiyon hasarı yapılan ancak farklı olarak detorsiyon öncesi sulodeksid uygulanan T/D-SUL grubuna ait mikroyrafta (D) tübül çaplarının T/D grubuna göre daha fazla olduğu izlenmektedir. Boya: HE. Tüm mikroyraflar için büyültme 100 $\times$.

4.3. İmmunohistokimyasal Değerlendirme Sonuçları

Testis doku örneklerinde NLRP3, aktif kaspaz-1, GSDMN, IL-1 β ve IL-18 immün boyanma yoğunluklarının değerlendirme bulguları Tablo 7’de özetlendi.

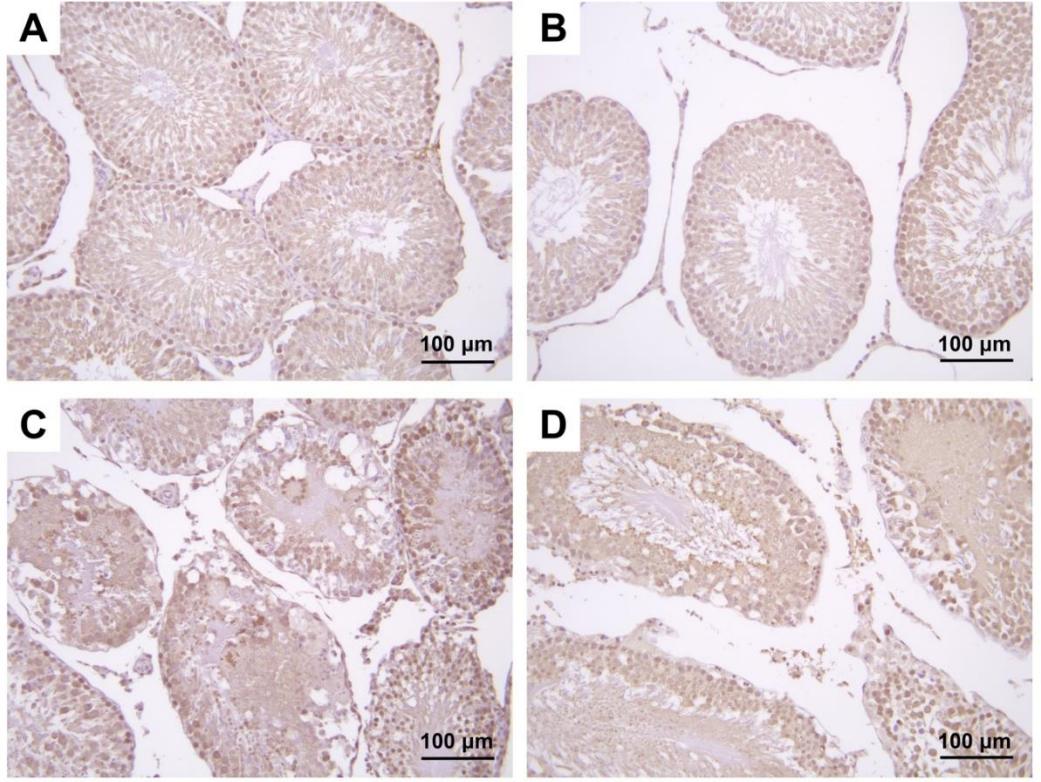
Tablo 7. Testis doku örneklerinde IL-1 β , GSDMN, IL-18, NLRP3 ve aktif kaspaz-1 immün boyanma yoğunluğu değerlendirme bulguları [Ort $\pm$ SS]

	Grup S (n=7)	Grup SUL (n=7)	Grup T/D (n=7)	Grup T/D-SUL (n=7)	P**
NLRP3 immün boyanma yoğunluğu (% alan)	6.78 $\pm$ 2.30	6.36 $\pm$ 4.17	16.21 $\pm$ 8.58*,&	9.60 $\pm$ 5.41+	0.011
Aktif kaspaz-1 immün boyanma yoğunluğu (% alan)	35.15 $\pm$ 5.87	36.46 $\pm$ 4.44	44.85 $\pm$ 3.96*,&	36.11 $\pm$ 6.36+	0.007
GSDMN immün boyanma yoğunluğu (% alan)	38.48 $\pm$ 4.48	34.46 $\pm$ 9.56	45.24 $\pm$ 4.30*,&	36.95 $\pm$ 5.23+	0.023
IL-1β immün boyanma yoğunluğu (% alan)	26.49 $\pm$ 7.97	29.70 $\pm$ 7.98	37.15 $\pm$ 7.26*,&	27.04 $\pm$ 4.19+	0.033
IL-18 immün boyanma yoğunluğu (% alan)	29.45 $\pm$ 5.12	31.11 $\pm$ 7.54	39.89 $\pm$ 6.72*,&	33.86 $\pm$ 7.01	0.037

p**: ANOVA testi ile anlamlılık düzeyi p< 0.05

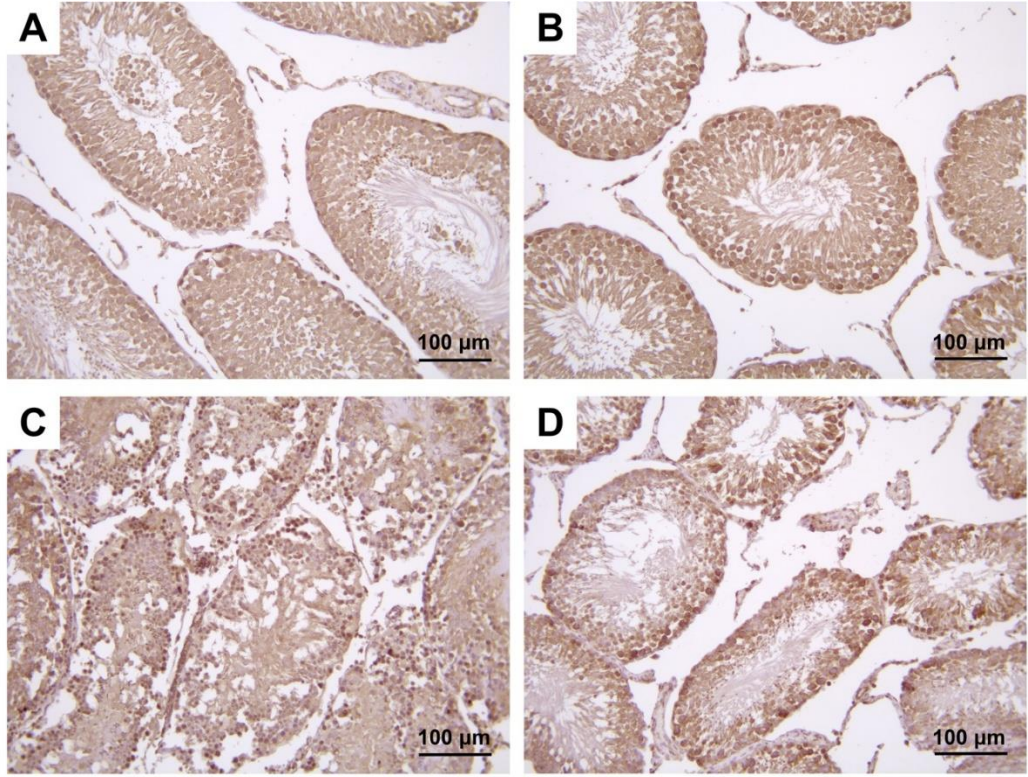
*p<0.05: Grup S ile karşılaştırıldığında; &p<0.05: Grup SUL ile karşılaştırıldığında; +p<0.05: Grup T/D ile karşılaştırıldığında

Testis doku kesitlerinde NLRP3 immün boyanma yoğunluğu gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulundu (p=0.011). T/D grubunda sham ve SUL gruplarına göre NLRP3 immün boyanma yoğunluğu anlamlı olarak artmış bulundu (sırasıyla, p=0.005 ve p=0.003, sırasıyla). NLRP3 immün boyanma yoğunluğu T/D-SUL grubunda T/D grubuna göre anlamlı olarak azalmış bulundu (p=0.038), (Tablo 7, Resim 8).



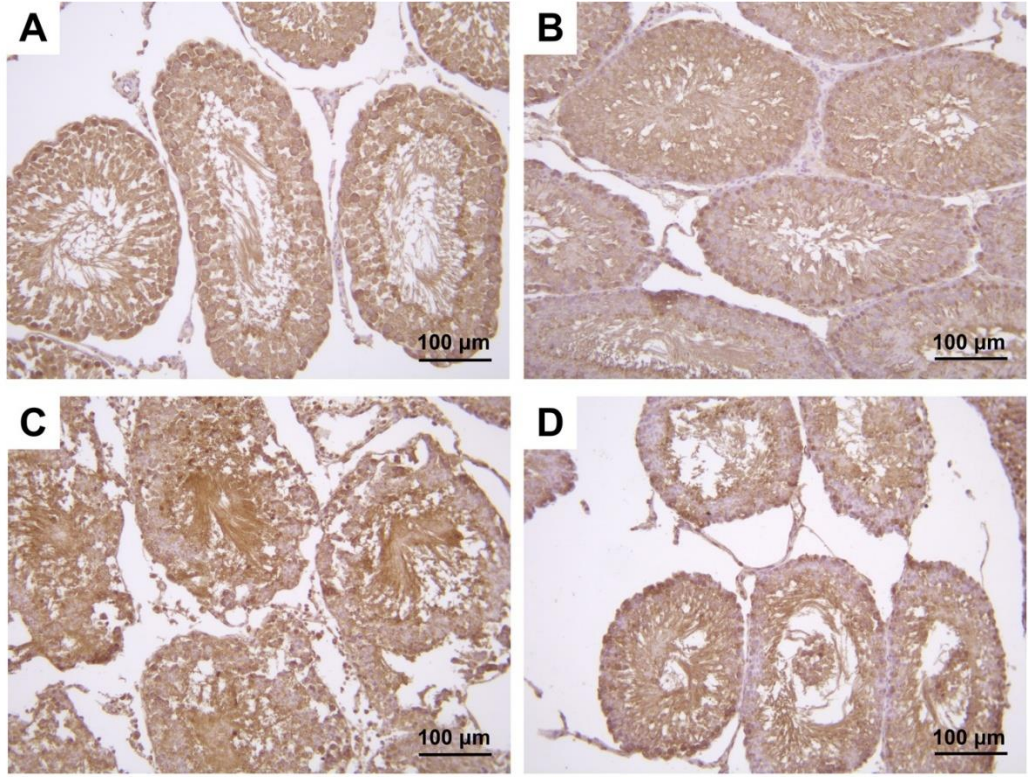
Resim 8. Sham (A), SUL (B), T/D (C) ve T/D-SUL (D) grubundan sıçanların NLRP3 antikoruyla immün boyanan testis kesitlerine ait mikrograflar. T/D grubuna ait görüntüde (C) diğer gruplara göre immünoreaktivitenin daha yoğun olduğu görülmektedir. Tüm mikrograflar için büyültme 200×.

Testis doku kesitlerinde aktif kaspaz-1 immün boyanma yoğunluğu gruplar arasında anlamlı düzeyde farklılık gösterdi ($p=0.007$). T/D grubunda aktif kaspaz-1 immün boyanma yoğunluğu sham ve SUL gruplarıyla karşılaştırıldığında belirgin düzeyde artmış bulundu (sırasıyla, $p=0.002$ ve $p=0.006$). Aktif kaspaz-1 immün boyanma yoğunluğu T/D-SUL grubunda T/D grubuna göre belirgin olarak azalmış bulundu ($p=0.005$) (Tablo 7, Resim 9).



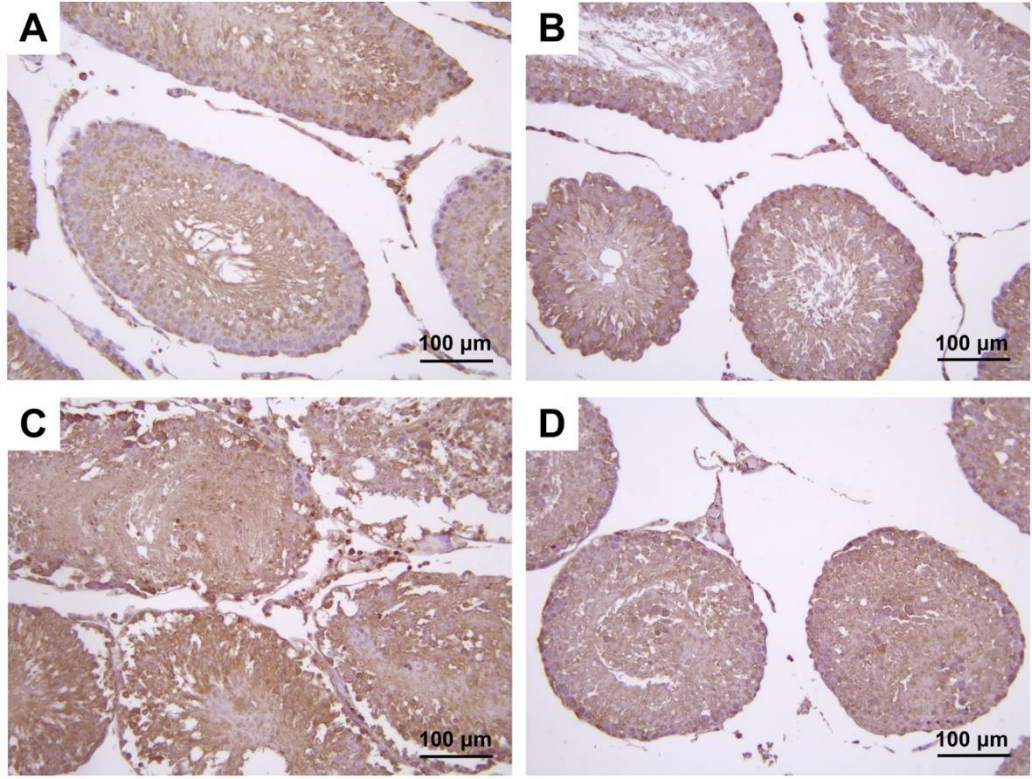
Resim 9. Sham (A), SUL (B), T/D (C) ve T/D-SUL (D) grubundan sıçanların aktif kaspaz-1 antikoruyla immün boyanan testis kesitlerine ait mikrograflar. T/D grubunda (C) diğer gruplara göre daha belirgin bir immünoreaktivite görülmektedir. Tüm mikrograflar için büyültme 200×.

Testis kesitlerinde GSDMN immün boyanma yoğunluğu gruplar arasında anlamlı farklılık gösterdi ($p=0.023$). T/D grubunda GSDMN immün boyanma yoğunluğu sham ve SUL gruplarına göre anlamlı düzeyde artmış bulundu (sırasıyla, $p=0.045$ ve $p=0.004$). T/D-SUL grubunda ise GSDMN immün boyanma yoğunluğu T/D grubuna göre anlamlı düzeyde azalmış bulundu ($p=0.021$), (Tablo 7, Resim 10).



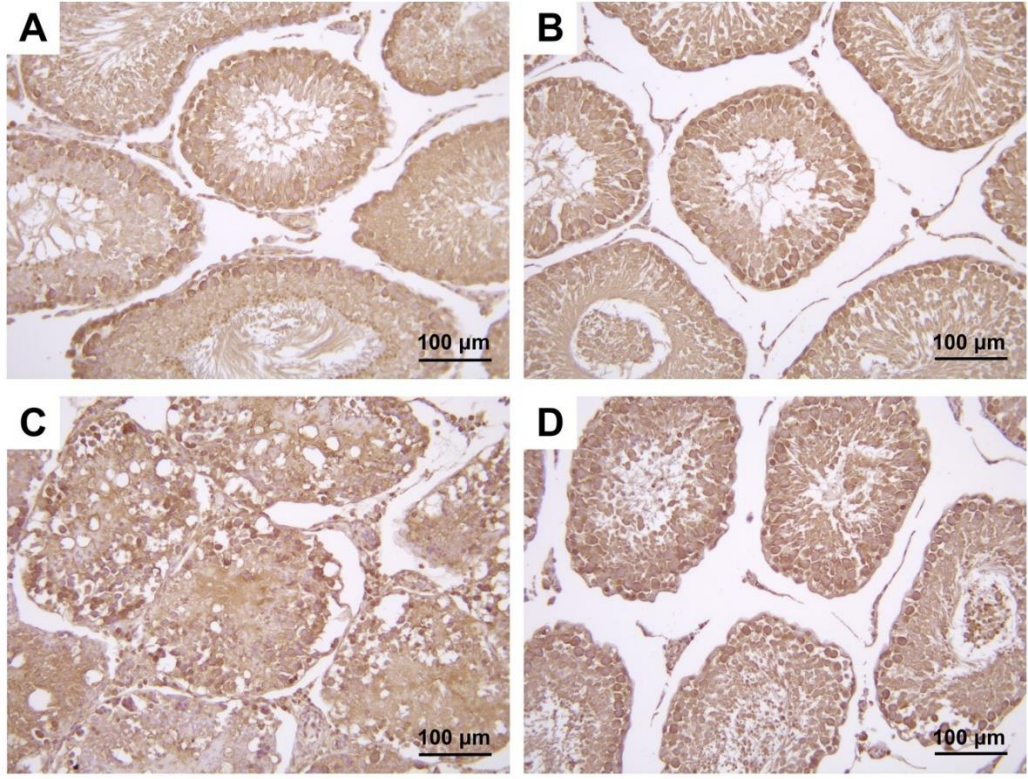
Resim 10. Sham (A), SUL (B), T/D (C) ve T/D-SUL (D) grubundan sıçanların GSDMN antikoruyla immün boyanan testis kesitlerine ait mikrograflar. T/D grubuna ait mikrografta (C) GSDMN immünoreaktivitesinin diğer gruplara göre daha fazla olduğu görülmektedir. Tüm mikrograflar için büyültme 200×.

IL-1 β ile işaretlenen testis kesitlerinde IL-1 β immün boyanma yoğunluğu gruplar arasında anlamlı düzeyde farklılık gösterdi ($p=0.033$). T/D grubunda IL-1 β immün boyanma yoğunluğu sham ve SUL gruplarına göre anlamlı olarak artmış bulundu (sırasıyla, $p=0.009$ ve $p=0.049$). T/D-SUL grubunda IL-1 β immün boyanma yoğunluğu T/D grubuna göre belirgin olarak azalmış bulundu ($p=0.013$), (Tablo 7, Resim 11).



Resim 11. Sham (A), SUL (B), T/D (C) ve T/D-SUL (D) grubundan sıçanların IL-1 β antikoruyla immün boyanan testis kesitlerine ait mikrograflar. Gruplar karşılaştırıldığından IL-1 β immünoaktivitesinin T/D grubuna ait kesitte (C) daha fazla olduğu görülmektedir. Tüm mikrograflar için büyültme 200 $\times$.

Testis kesitlerinde IL-18 immün boyanma yoğunluğu bakımından gruplar arasında anlamlı farklılık bulundu ($p=0.037$). Sham ve SUL gruplarıyla karşılaştırıldığında T/D grubunda IL-18 immün boyanma yoğunluğunun anlamlı olarak artmış olduğu görüldü (sırasıyla, $p=0.007$ ve $p=0.021$) (Tablo 7, Resim 12).



Resim 12. Sham (A), SUL (B), T/D (C) ve T/D-SUL (D) grubundan sıçanların IL-18 antikoruyla immün boyanan testis kesitlerine ait mikrograflar. T/D grubuna ait kesitte (C) IL-1 β immünoreaktivitesinin sham (A) ve SUL (B) gruplarına göre daha belirgin olduğu görülmektedir. Tüm mikrograflar için büyültme 200 $\times$.

5. TARTIŞMA

Testis torsiyonu, genellikle 20 yaş altındaki genç erkekleri etkileyen, testis dokusunu nekroza kadar götürüp infertiliteye sebep olabilen ürolojik acil durumlardan biridir (25,26). Ağrı-cerrahi penceresi 6 saat olan bu durumun kesin tedavisi detorsiyon cerrahisi olmakla birlikte geçmişten günümüze antioksidan ve antiinflamatuvar birçok medikal tedavi uzun dönemde oluşabilecek fertilité problemlerini ve doku hasarını azaltmak amacıyla denenmiştir (25,26). İlk 6 saat içerisinde yapılan cerrahi müdahalenin başarı oranı %90 üzerindeyken, ilk 12-24 saat içinde yapılan cerrahi müdahalede başarı oranı %50'ye ve 24 saat sonrasında %10'un altına düşmektedir (25,26). Araştırmacılar yıllardır oksidatif stresi, inflamatuvar yanıtı azaltarak, nekroz, apoptozis ve piroptozis gibi süreçlerin önüne geçip testis yapısını ve özellikle germ hücrelerini korumak için crocin, sulforafan, milrinon gibi çok çeşitli medikal tedaviler denemiş fakat bu konuda hala kesin bir sonuca ulaşamamış olup, rutin klinikte kullanılan medikal bir tedavi bulunmamaktadır (53,57,58). Bu duruma çözüm geliştirilebilmesi için hastalığın patofizyolojisinin ve bu patolojik durumun doku üzerinde yarattığı hasarın hangi yollar üzerinden oluştuğunun anlaşılması ve olası yeni mekanizmaların araştırılması gerekmektedir.

Testiste iskemi-reperfüzyon hasarında Sertoli ve Leydig hücre hasarından bağımsız olarak, germ hücre hasarının apoptozun intrinsik ve ekstrinsik yoldan uyarılması, iskemik hasarın lipid peroksidasyon ürünleri, nitrik oksit oluşumu ve myeloperoksidaz seviyelerine bağlı olduğu bilinmektedir (1,4). Yapılan farklı

Çalışmalarda testiküler iskemik hasara bağlı olarak testis yapısının bozulduğu, seminifer túbül çapının, germinal epitel kalınlığının ve spermatozoal maturasyonun azaldığı incelenmiştir (59).

Klasik olarak testiküler torsiyon-detorsiyon hasarında azalan kan akımı sebebiyle dokuda biriken laktik asit, hipoksantin ve lipid peroksidazların artması ve buna bağlı olarak hücre içi asidite artışı, mitokondrial fonksiyon bozukluğu ve ATP üretiminde azalmaya sebep olur (60). Bu durum da hücrede hipoksantin – ksantin ve Ca^{+2} artışına ve dolayısıyla süperoksit üretiminde artış sonucu hücrenin indirgeyemeyeceği miktarda reaktif oksijen radikali oluşumuna yol açar (60). ROS'un diğer bir kaynağı ise iskeminin neden olduğu inflamasyon sırasında vasküler endotele tutunan granülositlerdir (60). Sonuç olarak artan ROS üretimi anti oksidan sistem tarafından karşılanamaz ve DNA ve protein hasarına sebep olur ve hücreyi apoptozise sürükler (60).

Testiküler torsiyonun aynı zamanda kan testis bariyerine zarar verdiği ve dolaşımdan dokuya anti sperm antikorlarının geçerek infertiliteye sebep olduğu da bilinmektedir. Tüm bu inflamatuvar ve apoptotik sürecin yanında iskemik hasar testiste aynı zamanda piroptozisi de tetikler (35,61,62). Piroptozis özellikle enfeksiyöz hastalıkların gelişiminde rol almaktadır. Bununla birlikte inflamazomlar mikrobik olmayan hastalıklarla da ilişkili olduğundan piroptozis nörolojik ve aterosklerotik hastalıkların gelişiminde de rol almakta ve hatta son çalışmalar, çeşitli organların IR hasarında piroptotik ölümün meydana geldiğini ve testiküler IR dahil birtakım testiküler hastalıklarda da NLRP-3 ekspresyonunun arttığını bildirmektedir (6,35). He ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, kaspaz-1, NLRP-3,

GSDMD-N gibi proteinlerin temel olarak görev aldığı, programlı hücre ölümü çeşitlerinden biri olan piroptozisin testiküler iskemi-reperfüzyon hasarında da rol oynadığı görülmektedir (6) .

Hayvan modelleri açısından literatür tarandığında genellikle sıçan ve farelerin, insanda gerçekleşen testis torsiyonunu en iyi taklit edebilen hayvan modelleri olduğu görülmektedir (59). Bu çalışmada cerrahi manipülasyon kolaylığı, dolaşım toleransının daha yüksek olması, testis boyutunun daha büyük olması sebebiyle Sprague-Dawley tipi sıçanlar kullanılmıştır.

Sıçanlarda testiküler torsiyon-detorsiyon modeli oluşturulurken, iskemi süresinin kritik olduğu ve dokuda yeterli iskemik ortamı yaratabilmek için minimum 1 saatlik 720° cerrahi torsiyon uygulamasının gerektiği fakat bu sürenin 4 saati aşması durumunda dokuda nekroz ve geri dönüşümsüz hasar oluşacağı bildirilmiştir (59). Bu çalışmada tasarlanan testiküler torsiyon modelinde Chen ve arkadaşları ile Kostakis ve arkadaşlarının deney modeli dikkate alınarak torsiyon 120 dakika süreyle ve saat yönünde 720° olarak uygulanmıştır (1,54). Detorsiyon cerrahisi ise 120 dakikalık torsiyon süresinin bitiminde uyulanmış ve hayvanlar 24 saatlik detorsiyon süresi sonrası sakrifiye edilmiştir (54).

Domuz bağırsak mukozasından elde edilen sulodeksid, %80 iduronilglikozaminoglikan sülfat (elektroforezde hızlı hareket eden heparin) ve %20 dermatan sülfat olmak üzere iki farklı bileşenden oluşan bir glikozaminoglikandır (9). Endotel koruyucu, antitrombotik, antioksidan, anti-inflamatuar, anti-apoptotik özelliklere ve yara iyileştirici etkilere sahiptir (10,44). Tip 2 diyabette bozulan glikokaliks yapısının ve artan damar geçirgenliğinin

sulodeksid uygulamasını takiben düzeldiği bildirilmiştir (12). Sulodeksid ile ilgili yapılan literatür taramasında, tip 2 diyabetli hastaların kritik ekstremite iskemisinde klinik profili iyileştirmenin yanında mikrodolaşımda da iyileşmelere sebep olduğu, kronik venöz hastalığı olan hastalarda semptomları hafiflettiği, diyabetik nefropatili hastalarda kan ve idrar testlerine yansıyan iyileşmelerin olduğu görülmüştür (12) .

Deney hayvanlarında sulodeksid uygulama yöntem ve dozlarına bakıldığında ise farklılıklar görülmektedir. Uygulama yöntemleri genellikle intraperitoneal ve intravenöz olmakla birlikte uygulanan doz güncel çalışmalarda 5mg/kg ile 40 mg/kg arasında değişmektedir (63,64). Bu çalışmamızda, Yuan ve arkadaşlarının, sıçan ekstremite iskemi reperfüzyon modelinde sulodeksidin etkinliğini araştırdığı çalışmalarında uyguladığı 10 mg/kg intravenöz sulodeksid dozunu ve uygulama yolunu dikkate aldık (11). Testiküler torsiyon-detorsiyon sıçan modellerinde, farklı ajanların etkinliğinin araştırıldığı çalışmalarda torsiyon-detorsiyon süreleri ve etken uygulama zamanlaması açısından literatürdeki örnekler doğrultusunda, bu çalışmamızda sulodeksidi detorsiyondan 30 dakika öncesinde uyguladık (1,54).

Sulodeksid anti-koagülan etkisinin yanında anti-oksidan, anti-inflamatuar ve anti-iskemik etkileri kanıtlanmış bir ilaçtır (10). Yapılan bir böbrek iskemi reperfüzyon çalışmasında iskemik sıçan böbreğinde tipik olarak görülen tübüler epitelde ayrılma, fırçamsı kenar kaybı, tübüler nekroz ve intratübüler döküntü düzeylerinin sulodeksid uygulanan sıçanlarda anlamlı oranda düşük olduğu, PAS boyama yöntemiyle ve tübüler hasar skoruyla gösterilmiş. Aynı çalışmada sulodeksidin oksidatif stres üzerine etkisi ise, iskemik dokudaki süperoksit

dismutaz (SOD) aktivitesindeki düşüşün, malondialdehit (MDA) düzeylerindeki artışın sulodeksid uygulamasıyla anlamlı düzelme göstermesi ve pro-inflamatuar (TNF- α , MCP-1 ve ICAM-1) sitokinlerin RNA ekspresyonlarının sulodeksid uygulanan grupta, iskemi grubuna göre daha az olması ile gösterilmiştir (10). Yapılan başka bir çalışmada ekstremitte iskemi reperfüzyonu uygulanan farelerde böbrekte uzak organ hasarı incelenmiş ve sulodeksid uygulanan farelerde hem renal morfolojik hasarın azaldığı hem de serumda MMP-9, IL-1, TNF- α ve IFN- γ düzeylerinin iskemi reperfüzyon grubuna göre anlamlı oranda daha düşük olduğu görülmüş ve bunun yanı sıra yapılan TUNEL çalışmasında anti-apoptotik BCL-2 ve BCL-xL immün reaktivitesinin sulodeksid tedavisi uygulanan grupta daha fazla olduğu, proapoptotik BAX ve BAD ekspresyonunun ise daha az olduğu gösterilmiştir (11). Bir başka çalışmada ise miyokardial iskemi reperfüzyon modeli uygulanan sıçanlarda infarktüs alanının sulodeksid ön tedavisi yapılan grupta büyük ölçüde daha az olduğu, plazma MDA ve SOD düzeylerinin iskemi grubuna göre sulodeksid uygulanan grupta anlamlı ölçüde azaldığı gözlenmiştir (48). İnsan umbilikal veni hücreleri ile yapılmış bir çalışmada, iskemik ortamda bırakılıp sulodeksid uygulanan hücre grubunda ROS inaktive edici enzim (SOD1, CAT VE GPx1) düzeylerinin artması, rt-PCR da bu enzimlerin ekspresyonunun sulodeksid tedavi grubunda yükselmesi, apoptotik hücre miktarının sulodeksid grubunda daha düşük olması, ROS üretimi ve lipid peroksidasyonun ise daha az olması nedeniyle sulodeksidin endotel koruyucu etkisi olduğu da düşünülmektedir (65). Bu çalışma örneklerinde olduğu gibi, sulodeksidin özellikle renal ve kardiyak iskemi reperfüzyon hasarını azaltıcı etkisi olduğunu gösteren çalışmalar olmakla birlikte

(10,11,47,48,66), testiküler iskemi reperfüzyon hasarı üzerine etkisi konusunda yeterli çalışmaya rastlanmamıştır. Biz bu çalışmada literatürdeki bilgilerin ışığında sulodeksidin iskemi reperfüzyon hasarı üzerindeki etkisini özellikle piroptosis yolağı üzerinden göstermeyi amaçladık.

Sıçanlar üzerinde yapılan bir testiküler torsiyon detorsiyon çalışmasında torsiyon grubundan hayvanların doku MDA seviyelerinin kontrol grubuna oranla yüksek olduğu görülmüş (33). Yine sıçanlar üzerinde yapılan başka bir testis torsiyon detorsiyon modeli çalışmasında MDA düzeylerinin torsiyon uygulanan grupta daha yüksek olduğu görülmüş (67). Sıçanlarda yapılan testiküler torsiyon detorsiyon çalışmalarında torsiyon detorsiyon sonucunda MDA seviyelerinde artış olurken katalaz ve SOD düzeylerinde azalma meydana geldiği gösterilmiş (68,69) Biz ise bu çalışmamızda, sadece torsiyon detorsiyon yapılan grupla karşılaştırıldığında, sulodeksid uygulanan torsiyon detorsiyon grubu hayvanların testis doku örneklerinde MDA düzeyinin belirgin biçimde düşük olduğunu; CAT enzim aktivitesinin ise, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da daha yüksek düzeyde olduğunu gördük.

Johnsen skoru spermatogenik seri hücrelerinin değerlendirilmesini sağlayan bir skarlama sistemidir (70). İskemi-reperfüzyon hasarına maruz kalan testis dokusunda germ hücre hasarını değerlendirmedeki en kıymetli skarlama sistemlerinden biri Johnsen skarlama sistemidir (70). Mikrodisseksiyon ile testiküler sperm ekstraksiyonunun kontralateral testiste spermatogenez üzerine etkisini araştıran tavşanlar üzerinde yapılmış bir çalışmada, Johnsen skorunun insan spermatogenik seri hücrelerini değerlendirmek için daha uygun olduğu ve tavşan

spermatogenik seri hücrelerini değerlendirmek için Johnsen skoru benzeri skorlama sistemi geliştirildiği ifade edilmiştir (55). Biz de bu çalışmada, spermatogenik seri hücrelerini değerlendirmek için deney hayvanları için daha uygun olduğu gösterilmiş olan Johnsen skoru benzeri skor kullandık. Elde ettiğimiz veriler sonucunda sulodeksid uygulanan grupta sadece torsiyon detorsiyon yapılan gruba göre Johnsen skoru benzeri skorun anlamlı olarak daha yüksek olduğu dikkat çekti. Sulodeksidin testis torsiyon-detorsiyonunun yarattığı iskemi reperfüzyon hasarında germ hücrelerini hasardan koruyucu etkisi olduğu düşünüldü.

Johnsen skoru benzeri skor, akut iskeminin dokuya verdiği hasardan ziyade germ hücre matürasyonunun bir göstergesi olup, tek başına değerlendirilmesi testiküler torsiyon-detorsiyonun dokuda yarattığı harabiyeti gösterebilmek adına yeterli değildir ve ek değerlendirmelere ihtiyaç duyulduğu daha önceki çalışmalarda da görülmektedir (53,54). Biz de bu çalışmada Johnsen skoru benzeri skora ek olarak Cosentino skorlaması, ortalama tübül çapı ölçümü ve akut iskemi reperfüzyon hasarının temel doku değişikliklerini gösteren parametreleri (hemoraji, konjesyon, nötrofil infiltrasyonu, germ hücre hasarı) değerlendirdik (52–54,56)

Kosentino ve arkadaşlarının sıçanlar üzerinde yaptığı testis torsiyon detorsiyon çalışmasında torsiyon detorsiyon grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında Johnsen skoru en düşük, Cosentino skoru ise en yüksek olarak gözlenmiştir (54) İlaç gruplarında ise Johnsen skoru torsiyon detorsiyon grubuna göre daha yüksek ve Cosentino skoru ise daha düşük bulunmuştur (54). Çalışmamızda testis torsiyonu-detorsiyonu modelinde sulodeksid uygulamasıyla

Cosentino skorunun anlamlı olarak düşük bulunması, sulodeksidin testis dokusunu iskemi reperfüzyon hasarından koruduğunu düşündürmektedir.

Alimoğulları ve arkadaşlarının sıçanlar üzerinde yaptığı testiküler torsiyon-detorsiyon çalışmasında ise her bir sıçana ait testis kesitinden 10 adet en yuvarlak seminifer tübül seçilip tübül çapları ölçülerek her sıçan için ortalama bir tübül çapı hesaplanmış ve ortalama tübül çaplarının histopatolojik bulgular ve Johnsen skoru ile uyumlu olarak torsiyon-detorsiyon grubunda anlamlı ölçüde küçük olduğu görülmüştür(52). Biz de çalışmamızda aynı yöntemle her hayvan için ortalama seminifer tübül çapı ölçümü yaptığımızda, sulodeksid uyguladığımız torsiyon-detorsiyon grubunda tübül çaplarının torsiyon-detorsiyon grubundan daha büyük olduğunu gördük. Johnsen skoru benzeri skor ve Cosentino skoru sonuçları ile uyumlu bu veri, sulodeksidin testis torsiyonunda iskemi reperfüzyon hasarının histolojik bir göstergesi olan seminifer tübül çaplarındaki küçülmeyi azaltabileceğini düşündürmektedir.

Kölükçü ve arkadaşlarının sıçanlar üzerinde yaptığı testiküler torsiyon-detorsiyon çalışmasında, inflamasyon, hemoraji, ödem ve konjesyon parametreleri kullanılarak iskemi-reperfüzyon hasarı değerlendirilmiş ve sonuçların yine aynı çalışmada germ hücre morfolojisi ve seminifer tübül hasarının değerlendirildiği Johnsen ve Cosentino skorlarıyla uyumlu olduğu görülmüş (53). Biz de bu çalışmamızda hemoraji, konjesyon, nötrofil infiltrasyonu ve germ hücre hasarını değerlendirdik. Sulodeksid uyguladığımız torsiyon-detorsiyon grubunda, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da her bir parametreye ait skorların ve toplam hasar skorunun torsiyon-detorsiyon grubuna göre iyileşmiş olduğu görüldü.

Doğal immünite, PRR'lerin DAMP ve PAMP'ları algılamasına dayanan bir immünite olup, bu patojenler TLR (Toll benzeri reseptör), NLR (Nod benzeri reseptör) gibi pek çok türü olan patern tanıma reseptörleri tarafından tanındığında sinyal yolları aktive olur ve bir çok proinflamatuvar sitokin ve kemokin salgılanarak adaptif immün sistem aktive edilir (71). Patern tanıma partiküllerinden en iyi tanımlanmış olanı NOD benzeri reseptör ailesidir ve bu reseptör iskemik hasarda hem NF- κ B tarafından transkripsiyonel düzeyde arttırılır hem de iskemik hasar sebebiyle artan ROS'lar tarafından post transkripsiyonel olarak uyarılır. Sonuç olarak ASC ve prokaspaz-1 ile birleşen NLRP-3, NLRP-3 inflamazomunu oluşturur (7,62). Beyin, kalp, böbrek ve testis dokularının iskemi reperfüzyon hasarında NLRP-3 üzerinden piroptozise gidiş pek çok çalışmada gösterilmiş olup (6,66,72,73); BAY-11-7082 ve Brilliant Blue G gibi bazı NLRP-3 inhibitörleri ile yapılan, iskemi reperfüzyon hasarının önüne geçmeye yönelik olan çalışmalarda kaspaz-1, IL-1 β ve IL-18 ekspresyonlarının anlamlı şekilde azaldığı, spermatogenetik seri hücrelerinin korunduğu gösterilmiştir (71). Fakat yapılan çalışmalar NLRP-3 inflamazom kompleksinin oluşmasını tetikleyen faktörlerin aydınlatılması konusunda hala yetersiz olup, hem tetikleyici faktörlerin daha fazla araştırılmasına hem de NLRP-3 inflamazom kompleksini belki de spesifik olarak inhibe edebilecek yeni ajanların bulunmasına ihtiyaç vardır.

He ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptıkları testiküler torsiyon-detorsiyon çalışmasında, immünhistokimyasal olarak incelendiğinde NLRP-3 ve GSDMD ekspresyonlarının iskemi reperfüzyon durumunda anlamlı bir artış gösterdiği ve ELISA yöntemiyle değerlendirilen IL-1 β ile IL-18 seviyelerinin de

iskemi reperfüzyon durumunda yüksek olduğu görülmüş (6). Sıçanalar üzerinde yapılan başka bir testiküler torsiyon-detorsiyon çalışmasında ise NLRP-3 ve IL-1 β ekspresyonu mRNA düzeyinde değerlendirilmiş ve iskemi reperfüzyon gruplarında anlamlı artış olduğu ortaya konulmuş (74). Biz bu çalışmada, immünohistokimyasal olarak değerlendirdiğimizde, sulodeksid uygulanan torsiyon detorsiyon grubunda, sadece torsiyon detorsiyon uygulanan gruba göre NLRP-3 immunoreaktivitesinin anlamlı düzeyde azaldığını gördük.

Kaspaz-1 hücre ölümü, rejenerasyon ve farklılaşma gibi olaylarda önemli rol oynayan, enfeksiyon ve doku hasarına karşı doğal immün yanıtın oluşmasını sağlayan ve gasdermin, pro-IL-1 β ve pro-IL-18 gibi substratları kesen sistein proteaz ailesinin bir üyesidir (75). Piroptosis açısından değerlendirildiğinde ise NLRP-3 inflamazom kompleksini oluşturan parçalardan biri ve kompleksin oligomerizasyonundan sonra aktive olup piroptosis olaylar zincirini başlatmak üzere gasdermin D, pro-IL-1 β ve pro-IL-18'i kesip inflamatuvar yanıt oluşmasını sağlayan anahtar parçadır. Kaspaz-1 piroptosisin kanonik yolağında görev almaktadır (71). Aktive olan kaspaz 1'in temel görevi, gasdermini N terminal (GSDMD-N) olarak kesmek, pro-IL-1 β ve pro-IL-18'i keserek aktive forma dönüşmelerini sağlamaktır (71). Yang ve arkadaşlarının renal iskemi reperfüzyon çalışması incelendiğinde, akut böbrek hasarı sonrasında IL-1 β , pro-kaspaz-1 ve kaspaz-1 düzeylerinin artışı Western Blot yöntemiyle gösterilmiştir (73). Fareler üzerinde yapılan bir kardiyak iskemi reperfüzyon çalışmasında yine aktif kaspaz-1 düzeyleri Western Blot yöntemi ile analiz edilmiş ve iskemi reperfüzyon durumunda aktif kaspaz-1 seviyelerinin yükseldiği görülmüş (76). Bu

çalışmamızda testiküler iskemi-reperfüzyon hasarı sonrası dokuda piroptozis yolağının aktivasyonunu ve sulodeksidin bu yolak üzerinden hasara etkisini incelemek amacıyla, yolağın önemli bileşenlerinden biri olan aktif kaspaz-1 ekspresyonunu immünohistokimyasal olarak değerlendirdik. Sulodeksidin uygulandığı torsiyon detorsiyon durumunda aktif kaspaz 1 immünoreaktivitesinin, sadece torsiyon detorsiyon durumuna göre daha düşük düzeylerde olması, testiküler iskemi reperfüzyon hasarının piroptozisin kanonik yolağı üzerinden de ilerlediğini ve sulodeksid uygulamasının piroptozise bağlı inflamatuvar hasarı azaltabileceğini düşündürmektedir.

N-terminal ve C-terminal olmak üzere 2 parçadan oluşan ve sitoplazmada inaktif halde bulunan gasdermin D (GSDMD), NLRP-3 inflamazomu oluşumunun ardından aktive olan kaspaz-1 ile bölünür ve N-terminal parçası membrana doğru yer değiştirerek membranda por oluşumunu sağlar (61,75). Oluşan bu porlar daha sonra üretilen IL-1 β ve IL-18'in hücre dışına çıkabilmesini sağlar (75). Bu porlardan hücre içi içeriğinin de dışarı çıkması inflamatuvar yanıtı şiddetlendirir ve piroptozisin, inflamatuvar yanıt uyandırmayan apoptozisten ayrılmasını sağlayan anahtar da gasdermindir. (7,75). Wang ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptığı testiküler torsiyon-detorsiyon çalışmasında, GSDMD, kaspaz-1, IL-1 β ve IL-18 düzeylerinin iskemi reperfüzyon sonrası arttığı ortaya konulmuştur (61). Fareler üzerinde yapılan bir kardiyak iskemi reperfüzyon çalışmasında, gasdermin-D N terminal, total gasdermin-D ve aktif kaspaz-1 düzeylerinin iskemi reperfüzyon ile yükseldiği görülmüş (76). He ve arkadaşlarının testiküler torsiyon-detorsiyon modeli oluşturdukları çalışmalarında ise yine iskemi sonrasında total gasdermin-D

artışı hem immünohistokimyasal hem de western blot yöntemi ile gösterilmiştir (6). Biz de bu çalışmada testiküler dokuda iskemi reperfüzyon hasarı sonrası gasdermin-D N terminal protein düzeyinde nasıl bir değişiklik olduğunu görmek ve sulodeksidin piroptozisin anahtar proteinlerinden biri olan gasdermin ekspresyonunda bir değişikliğe sebep olup olmadığını araştırmak amacıyla gasdermin-D N terminal ekspresyonunu immünohistokimyasal olarak inceledik. Torsiyon detorsiyon durumunda sulodeksid uygulamasının gasdermin-D N terminal immünoreaktivitesini belirgin düzeyde azalttığı görüldü.

İskemi-reperfüzyon hasarında iskemiye bağlı inflamatuvar belirteçlerin salınımı reperfüzyonla birlikte şiddetlenmektedir. IL-1 β , IL-1 β dönüştürücü enzim olarak da bilinen kaspaz 1 aracılığıyla aktive edilir (77). Sıçanlarda yapılan serebral iskemi reperfüzyon hasarında, 2 saatlik iskemi ve ardından uygulanan 1 saatlik reperfüzyon sonrası doku düzeyinde IL-1 β seviyesinde anlamlı bir artış gösterilmiştir (78). Farelerle yapılan renal iskemi reperfüzyon modelinde ise dokuda IL-1 β , 24 saatlik reperfüzyon sonrası anlamlı şekilde yükselmiş bulunmuştur (79). Testiküler torsiyon detorsiyon deneysel hayvan modellerinde ise IL-1 β ekspresyonu serumda yapılan ELISA analizinde anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (53). Sıçanlarda renal iskemi reperfüzyon modelinin oluşturulduğu başka bir çalışmada IL-1 β immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiş ve iskemi reperfüzyon durumunda IL-1 β düzeyinin tedavi grubuna göre önemli ölçüde yüksek olduğu gözlenmiştir (80). Benzer şekilde testiküler iskemi reperfüzyon hasarında testis dokusunda yüksek düzeyde IL-1 β immünoreaktivitesi olduğu görülmüş (81). Çalışmamızda piroptozis yolağının bir ürünü olan IL-1 β testis doku

örneklerinde immünohistokimyasal olarak değerlendirildi ve piroptosis yolağının aktive olduğunu gösteren NLRP-3, kaspaz-1 ve GSDMD-N belirteçlerinden elde ettiğimiz verilerle uyumlu bir biçimde, sulodeksidin uygulandığı torsiyon detorsiyon durumunda IL-1 β immünoreaktivitesinin anlamlı düzeyde düşük olduğu gözlemlendi.

IL-18 makrofaj, epitel hücreleri, T hücreleri, nötrofiller, NK ve B hücreleri tarafından salgılanan proapoptotik bir belirteç olmanın yanı sıra aktive olan piroptoz yolağında kaspaz-1 tarafından hücre dışına salınması tetiklenen ve inflamasyonu şiddetlendiren proinflamatuvar bir sitokindir (82). Sıçanlarda yapılan elektroakupunktur uygulamasının serebral iskemi reperfüzyon hasarını piroptoz yolağı üzerinden inhibe ederken IL-18 ve IL-1 β seviyelerinde azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (1). Piroptosis yolağını araştırmak amacıyla yapılmış pek çok çalışmada IL-18'in bir belirteç olarak kullanıldığı ve hücrede inflamatuvar yanıt oluşturacak hasar durumlarında arttığı görülmektedir (1,6,82). Çalışmamızda testis doku örneklerinde immünohistokimyasal olarak incelediğimiz IL-18 düzeyi, sulodeksid uygulaması yapılan torsiyon detorsiyon grubunda, her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamışsa da tedavisiz torsiyon detorsiyon grubuna göre bir azalma gösterdi.

Bu çalışmada elde ettiğimiz biyokimyasal ve histolojik veriler bir arada değerlendirildiğinde, literatürdekine benzer biçimde, testiküler iskemi reperfüzyon hasarının tetiğini çektiği, dokuyu apoptozis ve nekroza götüren olayların başlangıcında meydana gelen lipid peroksidasyonunun ve ardından aşılacak oksidatif kapasitenin torsiyon detorsiyon modelimizde başarılı bir şekilde oluşturulduğu

gözlenmektedir. Bu bulgular, sulodeksid uygulamasının, iskemi reperfüzyon hasarını piroptozisin yanı sıra lipid peroksidasyonu ve oksidan kapasite bileşenleri üzerinden de etki ederek hafiflettiğini düşündürmektedir. İmmünohistokimyasal analizler göz önüne alındığında testiküler iskemi reperfüzyon hasarının piroptozis yolağı üzerinden de ilerlediğini ve sulodeksid uygulamasının piroptozise bağlı inflamatuvar hasarı azaltabileceğini düşünmekteyiz.



6. SONUÇLAR

Testis torsiyonu iskemik hasara bağılı germ hücre hasarına ve kaybına yol açan ve günümüzde geçerli tedavisi detorsiyon cerrahisi olan ürolojik acil bir durumdur. Detorsiyon cerrahisi yapılsa da iskemik hasarın üzerine reperfüzyon hasarı eklenmekte ve testiküler doku hasarı artmaktadır. Medikal tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi bakımından çalışmalar hala devam etmekte olup, klinik uygulamaya geçmiş etkili bir medikal tedavi olmadığı görülmektedir. Bu tez çalışmasında sıçanlarda testiküler torsiyon detorsiyon modeli oluşturuldu ve iskemi reperfüzyonun piroptosis üzerinden dokuda yarattığı hasarı önlemek amacıyla detorsiyon öncesinde sulodeksid uygulandı. HE boyalı testis kesitlerinde germ hücre ve doku hasarı Johnsen skoru benzeri skor, Cosentino skoru ve iskemi reperfüzyon hasarının temel histopatolojik bulguları bakımından değerlendirildi. İskemi reperfüzyona bağılı piroptosis yolağının aktivasyonu ve sulodeksidin yolak üzerindeki etkinliğini değerlendirmek amacıyla NLRP-3, aktif kaspaz-1, GSDM-N, IL-1 β ve IL-18 belirteçlerinin immünoreaktivitesi değerlendirildi. Sulodeksid uygulamasının sıçan testis doku örneklerinde iskemi reperfüzyon hasarını azaltılabileceği yapılan biyokimyasal, histokimyasal ve immünohistokimyasal çalışmalar ile gösterildi:

1. Testis doku örneklerinde MDA düzeyi ve CAT enzim aktivitesi bulguları bir arada değerlendirildiğinde akut testiküler torsiyon detorsiyon modelinin başarılı bir şekilde oluştuğunu ve sulodeksid uygulamasıyla oksidatif stresin azaltılabileceğini düşünmekteyiz.

2. Torsiyon detorsiyon durumunda sulodeksid uygulaması yapılan hayvanların testis dokularında testis yapısının, seminifer tübül boyutlarının ve germ hücre serisinin korunduğu gösterildi.

3. Sulodeksidin testiküler torsiyon detorsiyon modelinde piroptosis yolağı üzerinden etkileri NLRP-3, GSDMD-N, aktif kaspaz-1, IL-1 β ve IL-18 immünoreaktiviteleri değerlendirilerek gösterildi.

Bu veriler ışığında testiküler torsiyon detorsiyonda iskemi reperfüzyon hasarının piroptosis yolağını aktive ettiğini ve detorsiyon cerrahisi öncesi sulodeksid uygulanmasının piroptosis yolağı üzerinden etki ederek hasarı hafıflettiğı ve testiküler yapıyı koruyabildiğini gördük. Sulodeksidin detorsiyon cerrahisini destekleyecek bir medikal tedavi ajanı adayı olarak, faydalı etkilerinin daha ileri düzeyde ortaya konulabilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKÇA

1. Chen S, Liao Z, Zheng T, Zhu Y, Ye L. Protective effect of ligustrazine on oxidative stress and apoptosis following testicular torsion in rats. *Sci Rep*. 2023 Nov 21;13(1):20395.
2. Shimizu S, Tsounapi P, Dimitriadis F, Higashi Y, Shimizu T, Saito M. Testicular torsion-detorsion and potential therapeutic treatments: A possible role for ischemic postconditioning. *Int J Urol Off J Jpn Urol Assoc*. 2016 Jun;23(6):454–63.
3. Chi A, Yang B, Cao X, Wang Z, Liu H, Dai H, et al. ICA II Alleviates Testicular Torsion Injury by Dampening the Oxidative and Inflammatory Stress. *Front Endocrinol [Internet]*. 2022 May 12 [cited 2025 Jul 6];13. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/endocrinology/articles/10.3389/fendo.2022.871548/full>
4. Afolabi O, Alabi B, Omobowale T, Oluranti O, Iwalewa O. Cysteamine mitigates torsion/detorsion-induced reperfusion injury via inhibition of apoptosis, oxidative stress and inflammatory responses in experimental rat model. *Andrologia*. 2022 Feb;54(1):e14243.
5. Arena S, Iacona R, Antonuccio P, Russo T, Salvo V, Gitto E, et al. Medical perspective in testicular ischemia-reperfusion injury. *Exp Ther Med*. 2017 May;13(5):2115–22.
6. He KX, Ning JZ, Li W, Cheng F. Emodin alleviates testicular ischemia-reperfusion injury through the inhibition of NLRP3-mediated pyroptosis. *Tissue Cell*. 2023 Jun;82:102069.
7. Yu P, Zhang X, Liu N, Tang L, Peng C, Chen X. Pyroptosis: mechanisms and diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 Mar 29;6(1):128.
8. Sano M, Komiyama H, Shinoda R, Ozawa R, Watanabe H, Karasawa T, et al. NLRP3 inflammasome is involved in testicular inflammation induced by lipopolysaccharide in mice. *Am J Reprod Immunol N Y N* 1989. 2022 Apr;87(4):e13527.
9. Coccheri S, Mannello F. Development and use of sulodexide in vascular diseases: implications for treatment. *Drug Des Devel Ther*. 2013 Dec 24;8:49–65.
10. Yin J, Chen W, Ma F, Lu Z, Wu R, Zhang G, et al. Sulodexide pretreatment attenuates renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Oncotarget*. 2017 Feb 7;8(6):9986–95.

11. Yuan T, Yang N, Bi W, Zhang J, Li X, Shi L, et al. Protective Role of Sulodexide on Renal Injury Induced by Limb Ischemia-Reperfusion. *Evid-Based Complement Altern Med ECAM*. 2021 Jan 30;2021:6629718.
12. Broekhuizen LN, Lemkes BA, Mooij HL, Meuwese MC, Verberne H, Holleman F, et al. Effect of sulodexide on endothelial glycocalyx and vascular permeability in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2010 Dec;53(12):2646–55.
13. Moore, K. L., Persaud, T. V. N., & Torchia, M. G. (2015). *The developing human clinically oriented embryology* (10th rev. ed). Elsevier.
14. Moore, K. L., Agur, A. M. R., & Dalley, A. F. (2019). *Clinically oriented anatomy* (Eighth edition). Wolters Kluwer Health.
15. Gray, H. (2021). *Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice* (S. Standring, N. Anand, & R. Tunstall, Eds.; Forty-second edition). Elsevier.
16. Pawlina, W. (2024). *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology* (Ninth edition). Wolters Kluwer.
17. Ross, M. H., & Pawlina, W. (2015). *Histology: a text and atlas; with correlated cell and molecular biology* (7. ed). Lippincott Williams & Wilkins.
18. Kierszenbaum, A. L., & Tres, L. (2015). *Histology and Cell Biology* (4th ed). Elsevier Health Sciences.
19. Mescher, A. (2018). *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*, Fifteenth Edition. McGraw Hill LLC.
20. Barrett, K. E., Barman, S. M., Brooks, H. L., Yuan, J. X.-J., & Barrett, K. E. ., (2025). *Ganong's review of medical physiology* (Twenty-seventh edition). McGraw-Hill Education.
21. Eroschenko, V. P. (2013). *Atlas of histology with functional correlations* (Twelfth edition). Wolters Kluwer.
22. T.W. Sadler. *Langman's Medical Embryology*. 13th ed. Wolters Kluwer; 2015.
23. Carlson, B. M., & Kantaputra, P. N. (2024). *Human embryology and developmental biology* (Seventh edition). Elsevier.
24. Titi-Lartey OA, Khan YS. Embryology, Testicle. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [cited 2025 Jul 9]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557763/>

25. Schick MA, Sternard BT. Testicular Torsion. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [cited 2025 Jul 6]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448199/>
26. Laher A, Ragavan S, Mehta P, Adam A. Testicular Torsion in the Emergency Room: A Review of Detection and Management Strategies. *Open Access Emerg Med OAEM*. 2020;12:237–46.
27. Monteilh C, Calixte R, Burjonrappa S. Controversies in the management of neonatal testicular torsion: A meta-analysis. *J Pediatr Surg*. 2019 Apr;54(4):815–9.
28. Akhigbe RE, Odetayo AF, Akhigbe TM, Hamed MA, Ashonibare PJ. Pathophysiology and management of testicular ischemia/reperfusion injury: Lessons from animal models. *Heliyon*. 2024 May 15;10(9):e27760.
29. Arena S, Iacona R, Antonuccio P, Russo T, Salvo V, Gitto E, et al. Medical perspective in testicular ischemia-reperfusion injury. *Exp Ther Med*. 2017 May;13(5):2115–22.
30. Valenzuela A. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sci*. 1991 Jan 1;48(4):301–9.
31. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:360438.
32. Ischemia–reperfusion injury pathophysiology, part I - McMichael - 2004 - *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2025 Jul 6]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1476-4431.2004.04004.x>
33. Bayatli F, Akkuş D, Kilic E, Saraymen R, Sönmez MF. The protective effects of grape seed extract on MDA, AOPP, apoptosis and eNOS expression in testicular torsion: an experimental study. *World J Urol*. 2013 Jun;31(3):615–22.
34. Vasudevan SO, Behl B, Rathinam VA. Pyroptosis-induced inflammation and tissue damage. *Semin Immunol*. 2023 Sep;69:101781.
35. Yu P, Zhang X, Liu N, Tang L, Peng C, Chen X. Pyroptosis: mechanisms and diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 Mar 29;6(1):128.
36. Sasaki M, Nakanuma Y. Stress-induced cellular responses and cell death mechanisms during inflammatory cholangiopathies. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2017 Mar 1;41(2):129–38.

37. Hoppensteadt DA, Fareed J. Pharmacological profile of sulodexide. *Int Angiol J Int Union Angiol*. 2014 Jun;33(3):229–35.
38. Andreozzi GM. Sulodexide in the treatment of chronic venous disease. *Am J Cardiovasc Drugs Drugs Devices Interv*. 2012 Apr 1;12(2):73–81.
39. Liu Z, Zhang L, Peng W, Chen Q, Hou Y, Zhan L, et al. Advances in sulodexide-based long-term anticoagulation for a myasthenia gravis patient with giant thymoma. *Front Pharmacol*. 2025;16:1543612.
40. Andreozzi GM. Sulodexide in the treatment of chronic venous disease. *Am J Cardiovasc Drugs Drugs Devices Interv*. 2012 Apr 1;12(2):73–81.
41. Urbanek T, Krasinski Z, Sumińska-Jasińska K, Baum E, Borej-Nowicka G, Begier-Krasińska B, et al. Sulodexide reduces the inflammatory reaction and senescence of endothelial cells in conditions involving chronic venous disease. *Int Angiol J Int Union Angiol*. 2016 Apr;35(2):140–7.
42. Bignamini AA, Chebil A, Gambaro G, Matuška J. Sulodexide for Diabetic-Induced Disabilities: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Adv Ther*. 2021 Mar;38(3):1483–513.
43. Jiang QJ, Bai J, Jin J, Shi J, Qu L. Sulodexide for Secondary Prevention of Recurrent Venous Thromboembolism: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Pharmacol*. 2018;9:876.
44. Yuan T, Yang N, Bi W, Zhang J, Li X, Shi L, et al. Protective Role of Sulodexide on Renal Injury Induced by Limb Ischemia-Reperfusion. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2021;2021(1):6629718.
45. Broekhuizen LN, Lemkes BA, Mooij HL, Meuwese MC, Verberne H, Holleman F, et al. Effect of sulodexide on endothelial glycocalyx and vascular permeability in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2010 Dec;53(12):2646–55.
46. Piaggese A, Abbruzzese L, Mattaliano C, Bargellini I, Cicorelli A, Iacopi E, et al. Sulodexide as Adjunctive Therapy in Diabetic Foot Patients With Critical Limb Ischemia Treated With Percutaneous Transluminal Angioplasty. *Int J Low Extrem Wounds*. 2014 Jun;13(2):103–9.
47. Szolnoky G, González-Ochoa AJ. Sulodexide: A Benefit for Cardiovascular Sequelae of Long COVID Patients? *Clin Appl Thromb Off J Int Acad Clin Appl Thromb*. 2022;28:10760296221084300.
48. Shen D, Chen R, Zhang L, Rao Z, Ruan Y, Li L, et al. Sulodexide attenuates endoplasmic reticulum stress induced by myocardial ischaemia/reperfusion by activating the PI3K/Akt pathway. *J Cell Mol Med*. 2019 Aug;23(8):5063–75.

49. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265–75.
50. Van Ye TM, Roza AM, Pieper GM, Henderson J, Johnson CP, Adams MB. Inhibition of intestinal lipid peroxidation does not minimize morphologic damage. *J Surg Res.* 1993 Nov;55(5):553–8.
51. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of Enzymatic Analysis (Second Edition)* [Internet]. Academic Press; 1974 [cited 2025 Jul 10]. p. 673–84. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780120913022500323>
52. Alimogullari E, Kartal B, Demir H, Elci MP. Protective effects of adipose-derived stem cells against testicular injury induced after ischemia-reperfusion by regulating autophagy. *Histochem Cell Biol.* 2024 Dec 21;163(1):18.
53. Kölükçü E, Atılgan D, Uluocak N, Deresoy FA, Katar M, Unsal V. Milrinone ameliorates ischaemia-reperfusion injury in experimental testicular torsion/detorsion rat model. *Andrologia* [Internet]. 2021 Sep [cited 2025 Jun 13];53(8). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/and.14128>
54. Kostakis ID, Zavras N, Damaskos C, Sakellariou S, Korkolopoulou P, Misiakos EP, et al. Erythropoietin and sildenafil protect against ischemia/reperfusion injury following testicular torsion in adult rats. *Exp Ther Med.* 2017 Jun;13(6):3341–7.
55. Oliveira Filho AB, Souza RS, Azeredo-Oliveira MTV, Peruquetti RL, Cedenho AP. Microdissection testicular sperm extraction causes spermatogenic alterations in the contralateral testis. *Genet Mol Res GMR.* 2010;9(3):1405–13.
56. Osmanlioğlu Ş, Arslan M, Dağ RO, Yığman Z, Ceyhan MŞ, Er F, et al. Artemisinin reduces acute ovarian ischemia-reperfusion injury in rats. *Reprod Toxicol.* 2023 Aug 1;119:108417.
57. Wei SM, Huang YM. Effect of sulforaphane on testicular ischemia-reperfusion injury induced by testicular torsion-detorsion in rats. *Sci Rep.* 2024 Oct 8;14(1):23420.
58. Ganjiani V, Ahmadi N, Divar MR, Sharifiyazdi H, Meimandi-Parizi A. Protective effects of crocin on testicular torsion/detorsion in rats. *Theriogenology.* 2021 Oct 1;173:241–8.
59. Minas A, Mahmoudabadi S, Gamchi NS, Antoniassi MP, Alizadeh A, Bertolla RP. Testicular torsion in vivo models: Mechanisms and treatments. *Andrology.* 2023 Oct;11(7):1267–85.

60. Shimizu S, Tsounapi P, Dimitriadis F, Higashi Y, Shimizu T, Saito M. Testicular torsion-detorsion and potential therapeutic treatments: A possible role for ischemic postconditioning. *Int J Urol Off J Jpn Urol Assoc.* 2016 Jun;23(6):454–63.
61. Wang J, Ning J, Zhou Z, Li H. Inhibition of BRD4 alleviates pyroptosis induced by testicular ischemia/reperfusion injury through the NLRP3 pathway. *Tissue Cell.* 2025 Aug;95:102919.
62. Wei Y, Yang L, Pandeya A, Cui J, Zhang Y, Li Z. Pyroptosis-Induced Inflammation and Tissue Damage. *J Mol Biol.* 2022 Feb 28;434(4):167301.
63. Zhao Q, Yin J, Lu Z, Kong Y, Zhang G, Zhao B, et al. Sulodexide Protects Contrast-Induced Nephropathy in Sprague-Dawley Rats. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 2016;40(3–4):621–32.
64. Song JW, Zullo JA, Liveris D, Dragovich M, Zhang XF, Goligorsky MS. Therapeutic Restoration of Endothelial Glycocalyx in Sepsis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2017 Apr;361(1):115–21.
65. Gabryel B, Jarząbek K, Machnik G, Adamczyk J, Belowski D, Obuchowicz E, et al. Superoxide dismutase 1 and glutathione peroxidase 1 are involved in the protective effect of sulodexide on vascular endothelial cells exposed to oxygen-glucose deprivation. *Microvasc Res.* 2016 Jan;103:26–35.
66. Liu Y, Zhang J, Zhang D, Yu P, Zhang J, Yu S. Research Progress on the Role of Pyroptosis in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Cells.* 2022 Jan;11(20):3271.
67. Zhou XL, Yang QS, Ni SZ, Tu XP, Zhao Y, Xu B, et al. Protective Effects of Lipoxin A4 in Testis Injury following Testicular Torsion and Detorsion in Rats. *Mediators Inflamm.* 2014;2014(1):898056.
68. Aksoy H, Yapanoglu T, Aksoy Y, Özbey I, Turhan H, Gursan N. Dehydroepiandrosterone treatment attenuates reperfusion injury after testicular torsion and detorsion in rats. *J Pediatr Surg.* 2007 Oct 1;42(10):1740–4.
69. Jafari A, Ghasemnejad-Berenji H, Nemati M, Ghasemnejad-Berenji M. Topiramate: A novel protective agent against ischemia reperfusion-induced oxidative injury after testicular torsion/detorsion. *Am J Emerg Med.* 2021 Jun;44:257–61.
70. Akkuş, E., Uygun, N., Özkara, H., Alıcı, B., Toksöz, T., & Hattat, H. (1997). Testis biyopsilerinin Johnsen skorlaması ile değerlendirilmesinin önemi. *Türk Üroloji Dergisi*, 23, 213–217.

71. 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;2016:2183026.
72. Dong Z, Pan K, Pan J, Peng Q, Wang Y. The Possibility and Molecular Mechanisms of Cell Pyroptosis After Cerebral Ischemia. *Neurosci Bull*. 2018 Dec 1;34(6):1131–6.
73. Yang JR, Yao FH, Zhang JG, Ji ZY, Li KL, Zhan J, et al. Ischemia-reperfusion induces renal tubule pyroptosis via the CHOP-caspase-11 pathway. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014 Jan 1;306(1):F75-84.
74. Celik M, Aydin P, Civelek MS, Akgun N, Karakoy Z, Ozcelik C, et al. Avanafil Mitigates Testicular Ischemia/Reperfusion Injury via NLRP3 Pathway Modulation in Rats. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif*. 2024 Nov;31(11):3391–9.
75. Liu Z, Wang C, Yang J, Chen Y, Zhou B, Abbott DW, et al. Caspase-1 Engages Full-Length Gasdermin D through Two Distinct Interfaces That Mediate Caspase Recruitment and Substrate Cleavage. *Immunity*. 2020 Jul 14;53(1):106-114.e5.
76. Ye X, Zhang P, Zhang Y, Luan J, Xu C, Wu Z, et al. GSDMD contributes to myocardial reperfusion injury by regulating pyroptosis. *Front Immunol*. 2022;13:893914.
77. 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 RBE*. 2004 Mar 10;2:9.
78. Amantea D, Certo M, Russo R, Bagetta G, Corasaniti MT, Tassorelli C. Early reperfusion injury is associated to MMP2 and IL-1 β elevation in cortical neurons of rats subjected to middle cerebral artery occlusion. *Neuroscience*. 2014 Sep 26;277:755–63.
79. Barrera-Chimal J, Estrela GR, Lechner SM, Giraud S, Moghrabi SE, Kaaki S, et al. The myeloid mineralocorticoid receptor controls inflammatory and fibrotic responses after renal injury via macrophage interleukin-4 receptor signaling. *Kidney Int*. 2018 Jun 1;93(6):1344–55.
80. Mozaffari Godarzi S, Valizade Gorji A, Gholizadeh B, Mard SA, Mansouri E. Antioxidant effect of p-coumaric acid on *interleukin 1- β* and *tumor necrosis factor- α* in rats with renal ischemic reperfusion. *Nefrología*. 2020 May 1;40(3):311–9.
81. Abdel-Gaber SA, Mohammed RK, Refaie MMM. Mechanism mediating the protective effect of diacerein in ischemia-reperfusion-induced testicular injury in rats. *Life Sci*. 2018 Sep 15;209:57–62.

82. Gu H, Xie M, Xu L, Zheng X, Yang Y, Lv X. The protective role of interleukin-18 binding protein in a murine model of cardiac ischemia/reperfusion injury. *Transpl Int*. 2015;28(12):1436–44.



8. ÖZET

Testis torsiyonu, ürolojik acil bir durumdur. İlk 6 saat içerisinde detorsiyone edilmemesi durumunda infertilite ve testiküler nekroz gibi durumlarla sonuçlanır. Torsiyon-detorsiyon hasarına yönelik bir ajan fertilitenin korunması açısından önem taşısa da uygulamada olan bir tedavi ajanı bulunmamaktadır. NLRP-3 aracılı piroptozisin testis iskemi-reperfüzyon hasarında rol oynadığı çalışmalarla gösterilmiştir. Heparin ve dermatan sülfat içeren sulodeksid, endotel koruyucu, yara iyileştirici ve anti-trombotik özellikleriyle bilinmektedir. Çalışmamızda sıçanlarda oluşturduğumuz torsiyon-detorsiyon hasarında, sulodeksidin piroptozis aracılı reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisini NLRP-3, aktif kaspaz-1, GSDMD-N, IL-1 β ve IL-18 immunoreaktivitesi, MDA ve Cat analizleri üzerinden araştırmayı amaçladık. Çalışmamızda 28 adet Sprague Dawley sıçan 4 gruba ayrıldı. S ve SUL gruplarında sol testis serbestleştirilip deneyin 90.dakikasında S grubuna 0.10 ml SF, SUL grubuna 10 mg/kg sulodeksid uygulandı. T/D ve T/D-SUL gruplarında sol testis serbestleştirilip saat yönünde, 720° torsiyon uygulandıktan sonra torsiyonun 90.dakikasında T/D grubuna 0.10 ml ml SF, T/D-SUL grubuna 10 mg/kg sulodeksid uygulandı. İki saat sonunda tüm hayvanlara detorsiyon uygulandı ve detorsiyondan 24 saat sonra tüm hayvanlar sakrifiye edildi. MDA düzeyi T/D grubunda S ve SUL gruplarına göre anlamlı olarak artmış ($p=0.020$ ve $p=0.010$); T/D-SUL grubunda T/D grubuna göre anlamlı olarak azalmış bulundu ($p=0.045$). CAT enzim aktivitesi T/D grubunda S ve SUL gruplarına göre anlamlı olarak azalmış bulundu ($p=0.042$ ve $p=0.013$). HE boyalı testis kesitlerinde JSBS, CS ve

OSTÇ parametreleri değerlendirildi. İskemi-reperfüzyon hasarının temel patolojik bulguları olan konjesyon, hemoraji, nötrofil infiltrasyonu ve germinal epitel hasarı da değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre NLRP-3, aktif kaspaz-1, GSDMD-N, IL-1 β ve IL-18 immunoreaktivitelerinin T/D grubunda, S grubuna göre (sırasıyla p=0.005, p=0.002, p=0.045, p=0.009 ve p=0.007) ve SUL grubuna göre anlamlı olarak arttığı (sırasıyla, p=0.003, p=0.006, p=0.004, p=0.049 ve p=0.021) görüldü. T/D-SUL grubunda, T/D grubuna göre NLRP-3, aktif kaspaz-1, GSDMD-N ve IL-1 β immunoreaktivitelerinin anlamlı olarak azaldığı (sırasıyla, p=0.038, p=0.005, p=0.021 ve p=0.013) görüldü. T/D grubunda JSBS ve OSTÇ, S (p<0.001 ve p=0.004) ve SUL (p<0.001 ve p=0.027) grubuna göre anlamlı olarak azalmış; T/D-SUL grubunda ise T/D grubuna göre anlamlı olarak artmış (p=0.049 ve p=0.029) bulundu. CS ve toplam hasar skorunun T/D grubunda, S grubuna göre anlamlı olarak arttığı (p<0.001 ve p=0.002); T/D-SUL grubunda T/D grubuna göre CS'nin anlamlı olarak azaldığı görüldü (p=0.031).

Anahtar Kelimeler: Testis torsiyon-detorsiyonu, sulodeksid, piroptozis

9. SUMMARY

Testicular torsion is an acute urological condition, which may result in infertility even necrosis unless leaved treated within 6 hours. Although an agent that reduce the damage caused by torsion-detorsion would be important for the preservation of fertility, there isn't a current therapeutic agent in clinical practice. NLRP-3-mediated pyroptosis has been shown to play a role in testicular ischemia-reperfusion injury. Sulodexide, a combination of heparin and dermatan sulfate, is known for its endothelial protective, wound-healing, and anti-thrombotic properties. Our study aimed to investigate the protective effect of sulodexide against pyroptosis-mediated ischemia-reperfusion injury in a torsion-detorsion rat model, by evaluating NLRP-3, active caspase-1, GSDMD-N, IL-1 β and IL-18 expressions immunohistochemically, as well as MDA and CAT analysis. In this regard, 28 Sprague Dawley rats were divided into 4 groups. The left testis was exposed, and at the 90th minute of experiment, S and SUL groups were administered with 0.10 ml saline and 10 mg/kg sulodexide, respectively. After the left testis was exposed a 720° clockwise torsion was applied, and at the 90th minute of torsion, T/D and T/D-SUL groups were administered with 0.10 ml saline and 10 mg/kg sulodexide, respectively. At the end of torsion, animals underwent detorsion surgery, and 24 hours later, all animals were sacrificed. MDA levels were increased in the T/D group compared to the S and SUL groups ($p=0.020$ and $p=0.010$). In the T/D-SUL group, MDA levels were decreased compared to the T/D group ($p=0.045$). CAT enzyme activity was decreased in the T/D group compared to the S and SUL groups ($p=0.042$ and $p=0.013$). Testicular tissue sections, stained with HE, were evaluated in terms of JSLS, CS, and MSTD. Also, congestion, hemorrhage, neutrophil infiltration, and germinal epithelium damage were evaluated in these sections. According to the results, NLRP-3, cleaved caspase-1, GSDMD-N, IL-1 β , and IL-18

immunoreactivities were significantly increased in the T/D group compared to the S (p=0.005, p=0.002, p=0.045, p=0.009 and p=0.007, respectively) and SUL groups (p=0.003, p=0.006, p=0.004, p=0.049 and p=0.021, respectively). NLRP-3, cleaved caspase-1, GSDMD-N and IL-1 β immunoreactivities were lower in T/D-SUL group compared to T/D group (p=0.038, p=0.005, p=0.021 and p=0.013, respectively). JSLS and MSTD were decreased in the T/D group compared to the S (p<0.001 and p=0.004) and SUL groups (p<0.001 ve p=0.027), while they were increased in the T/D-SUL group compared to the T/D group (p=0.049 and p=0.029). CS and total injury scores were increased in the T/D group compared to the S group (p<0.001 ve p=0.002); whereas CS was decreased in the T/D-SUL group compared to the T/D group (p=0.031).

Key words: Testicular torsion-detorsion, sulodexide, pyroptosis

10. EKLER

Ek-1. Deney Hayvanları Etik Kurul Onay Belgesi

Evrak Tarih ve Sayısı: 30.04.2024-E.935510



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : E-66332047-604.01-935510
Konu : Değerlendirme ve Onay

30.04.2024

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Zeynep YİĞMAN
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Zeynep YİĞMAN, Çağla KÖSA, Metin YİĞMAN, Kerem ATALAR, Müşerref Şeyma CEYHAN, Elnara MADADZADA, Mustafa ARSLAN, Ayşegül KÜÇÜK ve Suna ÖMEROĞLU'ndan oluşan, G.Ü.ET-24.035 kod numaralı ve "*Testiküler Torsiyon Detorsiyon Uygulanan Ratlarda Sulodeksidin NLRP3 Aracılı Piroptosis Yolağı Üzerinden Reperfüzyon Hasarı Üzerine Etkisinin Araştırılması*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-24.035 and entitled "*Investigating the Effect of Sulodexide on Reperfusion Injury Through NLRP3 Mediated Pyroptosis in Rats Subjected to Testicular Torsion Detorsion*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards,

Hayvan Türü : Sıçan Sprague Dawley
Hayvan Sayısı : 28

Prof. Dr. Mustafa ARSLAN
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste

Belge Doğrulama Kodu :BS5R79CDE2

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/gazi-universitesi-ebys>

Emniyet Mahallesi Bandırma Caddesi No :6/1 06560 Yenimahalle/ANKARA
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
e-Posta : ibadyek@gazi.edu.tr - İnternet Adresi : <http://ibadyek.gazi.edu.tr/>
Kep Adresi : gaziuniversitesi@hs01.kep.tr

Bilgi için :Nursel Güner
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No 202 20 57



Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

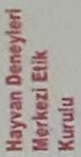
Evrak Tarih ve Sayısı: 30.04.2024-E.935510

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM
LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ : 26/04/2024		TOPLANTI SAYISI : 04
ADI-SOYADI		İMZA
Prof.Dr.Mustafa ARSLAN (Başkan)		
Prof.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)		
Prof.Dr.Mustafa KAVUTÇU		KATILAMADI
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK		KATILAMADI
Prof.Dr.İpek SÜNTAR		
Prof.Dr.Serkan YAVUZ		
Prof.Dr.Şule COŞKUN CEVHER		
Prof.Dr.Fatma Gökçe APAYDIN		
Prof.Dr.Elvan ANADOL		KATILAMADI
Doç.Dr.Yeliz KILINÇ		
Doç.Dr.Zeliha Aycan ÖZDEMİRKAN		
Doç.Dr. Duygu AĞAGÜNDÜZ		
Doç.Dr. Abdullah ÖZER		
Doç.Dr. Sühan GÜRBÜZ		
Dr.Öğr.Üyesi Şevki Mustafa DEMİRÖZ		KATILAMADI
Dr.Öğr.Üyesi Zeynep YIGMAN		KATILAMADI
Dr.Öğr.Üyesi Nur Banu BAL		YURTUŞINDA (GİZLİ)
Öğr.Gör.Dr.Burcu EKİM		
Öğr.Gör.Dr. Beyza AYDOĞAN		
Vet.Hek.Burcu AVCI		
Osman İÇ		

Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Ek-2. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu Sertifikası

			
GAZİ ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU			
DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI			
Sayın ÇAĞLA KÖSA			
23/05/2022 - 31/05/2022 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi HADYEK tarafından Ankara İlinde düzenlenen “Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası” eğitimini başarı ile tamamlayarak A kategorisi sertifikası almaya hak kazanmıştır.			
Prof. Dr. MUSTAFA KAYA HADYEMERİ REKTÖR	Prof. Dr. MUSA YILDIZ REKTÖR		
			

11. ÖZGEÇMİŞ

Arş. Gör. Dr. ÇAĞLA KÖSA

Kişisel Bilgiler

E-posta:

Web: <https://avesis.gazi.edu.tr/caglakosa>

Eğitim Bilgileri

Tıpta Uzmanlık, Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri, Türkiye 2021 - Devam Ediyor

Sertifika, Kurs ve Eğitimler

Mesleki Kurs, Sağlık bilimlerinde TUBİTAK projesi hazırlama uygulamalı eğitimi, Acting to customize technology, 2022

Mesleki Kurs, Ex-ovo tavuk embriyosu kültürü uygulamalı eğitimi, Ankara yıldırım beyazıt üniversitesi, 2022

Mesleki Kurs, Deneu hayvanları kullanım sertifikası, Gazi üniversitesi , 2022

Araştırma Alanları

Sağlık Bilimleri

Akademik Unvanlar / Görevler

Araştırma Görevlisi Dr., Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri, 2021 - Devam Ediyor

Diğer Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. In-vivo antioxidant and therapeutic effects of ellagic acid on ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle

DEMİRTAŞ H., ÖZER A., YİÇİT D., Dursun A. D., YIĞMAN Z., KÖSA Ç., KÜÇÜK A., ŞİMŞEK E., ARSLAN M.

Turkish Journal of Vascular Surgery, cilt.34, sa.1, ss.52-60, 2025 (Scopus)

Metrikler

Yayın: 1