

T. C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı

**ADİPOZAL KÖK HÜCREDEN ELDE EDİLEN EKSOZOMLAR,
SIÇAN TESTİSLERİNDE TORSİYON-DETORSİYON SONRASI
GELİŞEN İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINI ÖNLER Mİ?**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Fatma Bilgecan Şimşek

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Aydın ŞENCAN



MANİSA - 2023

ÖNSÖZ

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Çocuk Cerrahisi Ana Bilim Dalı'nda geçirmiş olduğum uzmanlık eğitimim boyunca bana bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, cerrahi becerilerimi geliştiren ana bilim dalı başkanımız Prof. Dr. Cüneyt Günşar'a, saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Can Taneli'ye, Prof. Dr. Abdulkadir Genç'e, Prof. Dr. Ömer Yılmaz'a, Doç. Dr. Halil İbrahim Tanrıverdi'ye ve bununla birlikte tezim boyunca yardımlarını esirgemeyen ve bana her konuda destek olan sayın tez danışmanım Prof. Dr. Aydın Şencan'a,

Her zaman sonsuz sabır ve sevgiyle yanımda olan, her zorlukta elimden tutan değerli eşim M. Kürşat Şimşek'e, mutluluk ve huzurla beni ayakta tutup yola devam etmemi sağlayan balım Aylin Şimşek'e

Tez çalışmamın yürütülmesinde katkılarından dolayı Prof. Dr. H. Seda Vatansever'e, her aşamasında yorulmadan çalışan Hilal Kabadayı'ya, verileri istatistiki olarak değerlendirmemde destek olan Funda Özalp Ateş'e

Ayrıca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum saygıdeğer araştırma görevlisi arkadaşlarıma, klinik hemşirelerimize, sekreterimize, personelimize ve ameliyathane hemşerilerimiz ile personelimize

Hayatımın her döneminde yanımda ve bu günlere gelmemde büyük emeği olan değerlilerim İsmail Özdemir'e, Kıymet Özdemir'e, Bilgen Özdemir Urgan'a, Bilgehan Özdemir'e; desteklerini ve sevgilerini hiç esirgemeyen Mükerrerem Şimşek, Hakkı Şimşek (Rahmetli), Tuğba Şimşek, Selcen Şimşek, Gökçenur Şimşek ile Erdal Urgan, Can Urgan ve Doğa Urgan'a;

Tez çalışmasının gerçekleşmesini sağlayan Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na ve Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi personeline teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Fatma Bilgecan Şimşek

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER	II
SİMGELER VE KISALTMALAR	IV
TABLolar	V
ÖZET.....	VII
ABSTRACT	VIII
I. GİRİŞ.....	1
II. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Testisin Embriyolojisi	3
2.1.1 Testislerin Gelişimi.....	3
2.1.2 Testisin İnişi.....	4
2.1.2.1 Transabdominal Göç evresi.....	4
2.1.2.2 İnguinoskrotal evre.....	4
2.2 Testisin Anatomisi.....	5
2.3 Testis Histolojisi.....	7
2.3.1 Seminifer Tübüller	8
2.3.1 Sertoli Hücreleri.....	9
2.3.2 Spermatogenez.....	10
2.4 Eksozom	10
2.4.1 Eksozom Biyogenezi	11
2.4.2 Eksozomların Tanı Amacıyla Kullanımları	11
2.4.3 Eksozomların Tedavi Amacıyla Kullanımları	12
2.4.4 Eksozomların Saflaştırılması, Üretimi ve Karakterizasyonu.....	14
2.4.5 Eksozom İzolasyon Teknikleri	14
2.4.5.1 Ultrasantrifüj (UC)	15
2.4.5.2 Ultrafiltrasyon (UF).....	15
2.4.5.3 Boyut dışlama Kromatografisi (SEC)	16
2.4.5.4 Polimer Bazlı Presipitasyon (PBP).....	16
2.4.5.5 İmmünolojik İzolasyon.....	17
2.4.6 Eksozom Karakterizasyon Teknikleri.....	17
2.5 Testis Torsiyonu	17
2.5.1 İntravaginal Testis Torsiyon	18
2.5.2 Ekstravaginal Testis Torsiyonu	19
2.5.3 Testis Eklerinin Torsiyonu.....	20
2.5.4 Klinik	20
2.5.5 Tanı	21

2.5.6	Ayırıcı Tanı.....	22
2.5.7	Tedavi	23
2.6	İskemi/Reperfüzyon Hasarı	25
2.7	Apoptozis.....	25
III.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1	Gereç	28
3.2	Yöntem	29
3.2.1	Hücre Kültürü ve Hücrelerin Karakterizasyonu	29
3.2.2	Eksozom İzolasyonu	30
3.2.3	Deney Modeli	31
3.2.3.1	Deney Hayvanları.....	31
3.2.3.2	Deney Grupları	31
3.2.3.3	Cerrahi İşlemler.....	32
3.2.4	Testis Dokularının Takibi	35
3.2.5	Hematoksilen Eozin (H&E) Boyaması.....	35
3.2.6	Johnsen Skorlaması.....	36
3.2.7	TUNEL Yöntemi	37
3.2.8	İstatistik.....	38
IV.	BULGULAR.....	39
4.1	Sıçan AMKH kültürü	39
4.2	Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	39
4.3	Testiste verilen sıvıların dağılımı	40
4.4	Hematoksilen Eozin Boyaması.....	41
4.4.1	Johnsen Skorlaması.....	45
4.5	TUNEL Yöntemi.....	49
V.	TARTIŞMA.....	57
VI.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	64
VII.	KAYNAKLAR	65

SİMGELER VE KISALTMALAR

µl	mikrolitre
µm	mikrometre
a.	Arteria
ABP	Androjen Bağlayıcı Protein
AMH	Anti Mülleriyan Hormon
AMKH	Adipozal Mezenşimal Kök Hücre
ASA	Anti-sperm antikorları
ATP	Adenozin trifosfat
ECV	Ekstrasellüler Vezikül
FADD	Fas associated death domain
FSH	Folikül Stimulan Hormon
GnRH	Gonadotropin releasing hormon
H&E	Hematoksilen Eozin
hCG	human koryonik gonadotropin
INSL3	İnsülin benzeri faktör 3
i.p.	intraperitoneal
İ/R	İskemi / Reperfüzyon
m.	Muskulus
MKH	Mezenşimal Kök Hücreler
MVC	Multiveziküler cisimcikler
PBS	Fosfat tampon solüsyonu
ROS	Reaktive Oxygen Species
rpm	Return per minute
SEC	Size Exclusion Chromatography / Boyut Dışlama Kromatografisi
TBF	Testis Belirleyici Faktör
TNF	Tumor nekrozis faktör
TRADD	TNF receptor associated death domain
TUNEL	Terminal transferaz aracılı dUTP-biotin nick end-labeling
UC	Ultrasantrifüj
USG	Ultrasonografi
v.	Ven

TABLÖLAR

Tablo 1: Testis doku takip protokolü	35
Tablo 2: Hematoksilen- Eozin boyaması	36
Tablo 3: Johnsen Skorlaması	37
Tablo 4: Tüm deney gruplarının Power analizi.....	38
Tablo 5: Sham grubu Johnsen skorları.....	46
Tablo 6: Kontrol grubu Johnsen skorları	47
Tablo 7: Tedavi grubu Johnsen skorları.....	48
Tablo 8: Johnsen skoru tanımlayıcı istatistik verileri	49
Tablo 9: Sham grubu TUNEL değerleri.....	53
Tablo 10: Kontrol Grubu TUNEL değerleri.	54
Tablo 11: Tedavi grubu TUNEL değerleri.....	55
Tablo 12: TUNEL tanımlayıcı istatistik verileri	56

ŞEKİLLER

Şekil 1: Testisin etrafındaki tabakalar (24)	6
Şekil 2: İnsan testisinin sagittal kesiti (28)	8
Şekil 3: İntravaginal testis torsiyonu.....	19
Şekil 4: Ekstravaginal testis torsiyonu	19
Şekil 5: Appendiks testis torsiyonu.....	20
Şekil 6: Adipozal mezenşimal kök hücre kaynaklı eksozomların eldesi ve resuspanasyonu.....	30
Şekil 7: Deney hayvanlarında testisin eksplorasyonu için uygulanan skrotal vertikal orta hat insizyon.....	32
Şekil 8: Deney hayvanlarında sol testisin 720 derece torsiyonu.....	33
Şekil 9: 4 saat torsiyon sonrası, detorsiyondan hemen önce testislerin makroskopik görünümü	33
Şekil 10: 100µl hücre kültür vasatının 4 ayrı noktadan testis parankimine uygulaması	34
Şekil 11: 100µl eksozomun 4 ayrı noktadan testis parankimine uygulanması	34
Şekil 12: Sıçan AMKH ait hücre kültürü görüntüleri..	39
Şekil 13: AMKH'lerin indirek immünohistokimya boyama ile hücre karakterizasyonu	40
Şekil 14: Testis parankimine 4 noktadan metilen mavisi + eksozom karışımının uygulanması sonucu metilen mavisinin testis parankiminde dağılımı	40
Şekil 15: Sham grubu sıçanlarına ait hematoksilen eozin boyama görüntüleri..	42
Şekil 16: Kontrol grubu sıçanlarına ait hematoksilen eozin boyama görüntüleri.....	43
Şekil 17: Tedavi grubu sıçanlarına ait hematoksilen eozin boyama görüntüleri.....	44
Şekil 18: Sham grubu sıçanlarına ait TUNEL boyama görüntüleri	50
Şekil 19: Kontrol grubu sıçanlarına ait TUNEL boyama görüntüleri.....	51
Şekil 20: Tedavi grubu sıçanlarına ait TUNEL boyama görüntüleri	51
Şekil 21: Grupların TUNEL değerlerinin Kruskal - Wallis testi ile istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	56

ÖZET

ADİPOZAL KÖK HÜCREDEN ELDE EDİLEN EKSOZOMLAR, SIÇAN TESTİSLERİNDE TORSİYON-DETORSİYON SONRASI GELİŞEN İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINI ÖNLER Mİ?

Amaç: Testis torsiyonu, organ kaybı ile sonuçlanabilen acil ürolojik bir durumdur. Erken tanı ve tedavi yapılsa bile detorsiyon sonrası reperfüzyona bağlı oksidatif stresin testiste germ hücre apoptozisini artırdığı ve değişik derecelerde spermatogenik fonksiyonların kaybına neden olduğu bilinmektedir. Reperfüzyon hasarını önlemede pek çok farmakolojik ajan denense de henüz klinik uygulamaya yansımamıştır. Son zamanlarda farklı deneysel modellerde eksozomların iskemi-reperfüzyon hasarını önlemede etkili olduğu bildirilmektedir. Ancak eksozomların etkileri, elde edildiği kaynağa göre de farklılıklar gösterebilmektedir. Çalışmamızın amacı, sıçan adipoz kök hücrelerden elde edilen eksozomların deneysel torsiyon-detorsiyon sonrası gelişen iskemi-reperfüzyon hasarını önlemede bir etkisi olup olmadığını araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada sıçan adipojenik mezenkimal kök hücreleri kullanıldı. Hücreler kültürize edilip karakterizasyonu belirlendi (CD44, CD90 pozitif; CD34, CD45 negatif). Eksozom eldesi MiRCURY Exosome Kiti (Qiagen,76743) ile sağlandı. 21 adet prepubertal wistar albino cinsi erkek sıçan, 7'şerli 3 gruba ayrıldı. İskemi/Reperfüzyon modeli; sol testisin 4 saat süreyle 720 derece torsiyonu ardından detorsiyon sonrası 4 saat süreyle reperfüzyona bırakılması ile oluşturuldu. Sham grubunda testis parankimine yönelik işlem yapılmadan sol orşiektomi uygulandı. Detorsiyondan hemen sonra testis parankiminin 4 ayrı noktasından kontrol grubunda 100µL hücre kültür vasatı; tedavi grubunda 100µL eksozom uygulandı. 4 saatlik reperfüzyon sonrası sol orşiektomi uygulandı. Testisler histolojik olarak değerlendirildi. TUNEL yöntemi ile apoptotik hücrelerin yüzdesi saptandı. Johnsen skoru ile spermatogenez değerlendirildi. Gruplar arasındaki fark Kruskal-wallis testi ile değerlendirilip $p<0,05$ anlamlı kabul edildi.

Bulgular: Tüm örneklerde testislerin tunika albugineası korunmuştu. Seminifer tubül yapılarının, kontrol grubunda yer yer bozulduğu; sham ve tedavi grubunda normal histolojik görünümde olduğu gözlemlendi. Johnsen skoru sham, kontrol ve tedavi grubunda sırasıyla 8,64; 7,71 ve 8,57 saptandı. Kontrol grubuyla diğer gruplar arasındaki fark anlamlıydı. Apoptotik aktivite sham, kontrol ve tedavi grubunda sırasıyla %11,28; %60,85 ve %17,71 saptandı. Kontrol grubuyla diğer gruplar arasındaki fark anlamlıydı.

Sonuç: Çalışmamız, adipoz kök hücrelerden elde edilen eksozomların, testis torsiyon-detorsiyon sonrası oluşan iskemi-reperfüzyon hasarını önlemede etkili olduğunu göstermiştir. Bir sonraki çalışmada, oluşan bu etkinin hangi yollar üzerinden gerçekleştiğinin araştırılması planlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Testis, torsiyon, detorsiyon, reperfüzyon, eksozom

ABSTRACT

DO EXOSOMES DERIVED FROM ADIPOSE MESENCHYMAL STEM CELLS PREVENT ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY AFTER TORSION-DETORSION IN RAT TESTES?

Aim: Testicular torsion is an urological emergency. Even with early treatment, oxidative stress due to reperfusion after detorsion increases germ cell apoptosis in testis and causes loss of spermatogenetic functions to varying degrees. Although many pharmacological agents have been tried to prevent reperfusion injury, they have not been reflected in clinical practice. Recently, it has been reported that exosomes are effective in preventing ischemia-reperfusion injury in different experimental models. However, the effects of exosomes may differ according to the source. The aim of our study is to investigate whether exosomes obtained from rat adipose stem cells have an effect on preventing ischemia-reperfusion injury after experimental testicular torsion-detorsion.

Material and Methods: In the study, rat adipogenic mesenchymal stem cells were used. Cells were cultured and characterized (CD44-CD90 positive; CD34-CD45 negative). Exosome was obtained with the MiRCURY Exosome Kit (Qiagen,76743). 21 prepubertal wistar albino male rats were divided equally into 3 groups. Ischemia-Reperfusion model was formed by 720 degrees torsion of the left testis for 4 hours then reperfusion for 4 hours after detorsion. In the sham group, only left orchiectomy was performed. After detorsion, in the control group 100 μ L of cell culture medium, in the treatment group 100 μ L of exosome was administered from 4 points of the testicular parenchyma. After reperfusion left orchiectomy was performed. Testes were evaluated histologically. The percentage of apoptotic cells was determined by the TUNEL method. Johnsen score used in the evaluation of spermatogenesis. The difference between the groups was evaluated with the Kruskal-Wallis test and $p < 0,05$ was considered significant.

Results: Tunica albuginea was preserved in all specimens. Seminiferous tubule structures were deteriorated in the control group. Sham and treatment group had normal histological appearance. The Johnsen scores of sham, control, treatment groups were 8.64, 7.71, 8.57 respectively. Apoptotic activities of sham, control, treatment groups were 11.28%, 60.85% and 17.71% respectively. In both evaluations, the difference between the control group and the other groups was significant.

Conclusion: Our study has shown that exosomes obtained from adipose stem cells are effective in preventing ischemia-reperfusion injury that occurs in testicular torsion-detorsion. In the next study, it is planned to investigate through which pathways this effect occurs.

Key words: Testis, torsion, detorsion, reperfusion, exosome

I. GİRİŞ

Testis torsiyonu, spermatik kordun kendi etrafında dönmesi sonucu testisin kanlanması bozulması ile karakterize ürolojik bir acildir. Torsiyon ile önce venöz damarlar tıkanır. Gelişen venöz konjesyon ve ödem, arteriyel dolaşımın etkilenmesine, ardından testiste iskemiye neden olur (1). Her yaş grubunda görülebilen testis torsiyonu, yenidoğan ve 12-18 yaşta iki pik dönemi olmakla birlikte 25 yaş altı erkeklerde insidansı 1/4000'dir (1). Torsiyon, iskemik hasara; detorsiyon ise reperfüzyon hasarına neden olmaktadır. Hasarların şiddeti, torsiyonun derecesine ve süresine bağlı olarak değişmektedir (1,2). Testis torsiyonu tanısı sonrası hastaya olabilecek en hızlı şekilde acil cerrahi eksplorasyon yapılmalıdır. Detorsiyon ilk 4-6 saat içerisinde gerçekleştirildiğinde %90 oranında, torsiyondan 12 saat sonra reperfüzyon başladığında %50 oranında testis kurtarılabilirken 24 saat sonra başlayan reperfüzyon ile bu oran %10'a kadar düşmektedir (1). Erken tanı ve tedaviye rağmen detorsiyon sonrası reperfüzyona bağlı oksidatif stresin testiste germ hücre apoptozisini artırdığı ve değişik derecelerde spermatogenetik fonksiyonların kaybına neden olduğu bilinmektedir (3). Başarılı cerrahi müdahale sonrasında testis atrofisi ve infertilite oranının % 40-60 olduğu bildirilmektedir (4).

Adipozal mezenşimal kök hücreler (AMKH), anti-enflamatuvar, antioksidan ve anti-apoptotik etkileri bulunan, diğer kök hücrelere göre güçlü bir immün modülatör olarak bilinen ve en uygun terapötik hücreye sahip mezenşimal kök hücre türüdür (5,6).

Eksozomlar ise bilinen tüm hücreler tarafından ortama salınan; plazma, idrar, beyin omurilik sıvısı, epididim sıvısı, amniyotik sıvı, plevral sıvı, anne sütü gibi biyolojik sıvılarda büyük ölçüde bulunan en küçük ekstrasellüler vezikül (ECV)'dür (7-9). 30 ile 100 nm arasında değişen çapa sahip biyoaktif nano keseciklerdir (9,10). Eksozomlar çift lipit tabaka ile çevrili; protein, lipid ve nükleik asit gibi zengin hücresel özelliklere sahiptirler (11,12). Eksozomlar, tüm bariyerleri geçebilirler (13,14). Çalışmalar, eksozomların anti-enflamatuvar, immünmodülatör, anti-koagülan, pro-anjiyogenik ve pro-tümorigenik gibi birçok aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (10).

Reperfüzyon hasarını önlemede pek çok farmakolojik ajan denense de henüz klinik uygulamaya yansımamıştır. Son zamanlarda farklı deneysel modellerde eksozomların iskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarını önlemede etkili olduğu bildirilmektedir. Eksozomların elde edildiği kaynağa göre farklılıklar olabilmektedir (15).

Çalışmamızın amacı, sıçan adipozal mezenşimal kök hücrelerden elde edilen eksozomların deneysel torsiyon-detorsiyon sonrası gelişen iskemi-reperfüzyon hasarını önlemede bir etkisi olup olmadığını araştırmaktır.



II. GENEL BİLGİLER

2.1 Testisin Embriyolojisi

2.1.1 Testislerin Gelişimi

Gonadlar; posterior abdominal duvarı döşeyen mezotel, altındaki mezenşim ve primordiyal germ hücreleri olmak üzere üç kaynaktan köken alır.

Gonadal gelişim ilk olarak 5. hafta civarında mezotel ve mezenşimin proliferasyonu ile mezonefrozun medialinde gonadal kabarıklık oluşumu ile başlar (19). Prolifere olan epitel hücreleri mezenşim içerisine doğru gonadal kordonları oluşturarak yüzey epiteline bağlanırlar (18). 7. haftadan önce dışta korteks ve içte medulla bulunan, morfolojisi her iki cinse benzeyen bipotansiyel farklanmamış gonad oluşur (20). Bu gelişimden Wilms tümörü geni (WT1) ve Steriodogenik faktör 1 (SF-1) gibi genlerin aktivasyonu sorumludur (17,19).

Antimüllerian hormon (AMH) üreten sertoli hücreleri 6. haftada, testosteron ve insülin benzeri faktör 3 (INSL3) üreten leydig hücreleri ise 8. Haftada oluşmaktadır (20). İç ve dış genital yapıların erkek fenotipinde gelişebilmesi için bu hormonların doğru zaman, yer ve miktarda salgılanması gerekir (20).

Seminiferöz tübüller, puberteye kadar solid ve lümensizdir (19). Puberte ile lümen gelişir (19). Seminiferöz tübül duvarında testis yüzey epitelinden gelişen destek sertoli hücreleri ve primordiyal germ hücrelerinden farklanan primordiyal sperm hücresi spermatogonyum bulunur (19).

2.1.2 Testisin İnişı

Normal spermatogenezin gerçekleşmesi için testislerin vcut sıcaklığından 2-3 derece daha soğuk olan skrotuma inmesi gerekir (20). Testisin embriyolojik inişı 2 aşıamada gerçekleşir.

2.1.2.1 Transabdominal G evresi

Testis ve mezonefroz, ürogenital mezenter ile karın posterior duvarına bağlıdır (18). Gestasyonun 7-8. haftalarında mezonefrozun dejenerasyonuyla gonada bağlı mezenter, ligament haline gelerek kaudal genital ligament (gubernakulum) adını alır (18). 8. haftada gubernakulum, inguinal kanaldan skrotuma doğru gelişen kaudal epididime eklenir (18). Testisin inişinden önce gubernakulumun distali inguinal bölgede, abdominal eksternal ve internal oblik kasların arasında sonlanır (18).

Gestasyonun 10-15. haftalarında testisler inguinal kanala yaklaşıır. INSL3'in stimülasyonu; mezenşimal proliferasyon ve gubernakular şişme reaksiyonuna neden olur (17,20). Şişme reaksiyonu sonucu gubernakulum kısalarak testisi inguinal kanal yakınında fetal abdominal gelişimini sürdüreceği lokalizasyonda sabitler (17). Bu sırada periton, karın anterior duvar orta hattın her iki yanına doğru invajine olarak prosessus vaginalis olarak adlandırılan periton cepleri oluşturur (19).

Transabdominal faz tamamlandıktan sonra testisler insanlarda 25. haftaya kadar internal halka seviyesinde kalır (17). Bu sürede gubernakulum ve prosessus vaginalis inguinal kanaldan skrotuma doğru ilerleyerek testisin inişine yol hazırlar (20).

2.1.2.2 İnguinoskrotal evre

Gestasyonun 25-35. haftalarında gerçekleşir (17). Androjen bağımlı bu evrede, parakrin mediatörler ve androjenler inguinal kanalı dilate eder (17). Gubernakulum aniden genişler ve prosessus vaginalis skrotum içine uzar (18). Testosteron, gubernakulumun viskoelastik özelliklerini azaltarak kısaltır (20). Gubernakular dejenerasyonu epididimin inişı takip eder ve testisler skrotumun içine yerleşir (18).

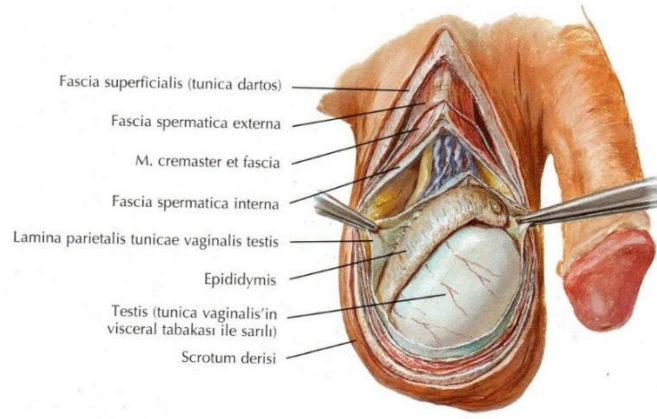
Testis, prosessus vaginalisin katlantısı olan tunika vaginalis ve içinden geçtiği karın ön duvarına ait tabakalarla örtülüdür (18).

İnguinoskrotal evre, rodentlerde çoğunlukla insanlara benzer şekilde gerçekleşse de gubernakulum remodelizasyonu, göçü ve skrotuma doğru uzanması sırasında bazı önemli farklılıklar gözlenir (17). Rodentlerde gubernakulum inguinokrotal fazdan önce ters dönerken, insan ve domuzlarda belirgin bir ters dönme olayı gerçekleşmez (17).

2.2 Testisin Anatomisi

Testis; elips şeklinde, skrotum içinde funikulus spermatikus aracılığıyla asılı duran, spermlerin üretildiği, bir çift organdır (21). Bebeklerde testisin boyutları ortalama 16x14mm iken 16 yaşında uzun eksenini yaklaşık 6 cm'e ulaşabilir (22). Skrotum içinde üst kutbu öne ve dışa; alt kutbu arka ve içe doğru olmak üzere oblik pozisyonda durur (21). Sağ testis sola göre yaklaşık 1 cm daha yukarıdadır (21). Testisin facies medialis ve facies lateralis olarak iki yüzü, margo anterior ve margo posterior olarak iki kenarı, ekstremitas superior ve ekstremitas inferior olarak iki kutbu vardır (21). Üst kutbunda appendiks testis bulunur. Kaput, korpus ve kauda bölümlerinden oluşan epididimis margo posteriorda yerleşir. Kauda epididim ekstremitas inferiorda duktus deferens olarak devam eder (23). Medialinde funikulus spermatikus bulunur (21).

Prosessus vaginalisin karın ön duvarından skrotuma sürüklediği tabakalar dıştan içe doğru; musculus (m.) obliquus eksternus abdominis'in devamı fascia spermatica eksterna, m. obliquus internus fasyasının devamı fascia cremasterica, m. obliquus internus abdominis'in devamı m. cremasterica ve fascia transversalis'in devamı fascia spermatica interna olarak sıralanır (Şekil 1) (21).



Şekil 1: Testisin etrafındaki tabakalar (24)

Testisin üç tabakası vardır. Dıştan içe doğru; tunika vaginalis testis, tunika albuginea, tunika vaskulosa (23).

Tunica albuginea, kalın, fibröz, genişlemeyen bir tabakadır (21). Medialde testisin içine doğru mediastinum testis olarak adlandırılan vertikal bölme oluşturur (21). Mediastinum testise septula testisler uzanarak testisi koni şeklinde lobüllere ayırır (23). Lobuli testis içindeki testis parankimini tubuli seminiferi contorti adı verilen kanalcıklar oluşturur. Bu kanalcıklar mediastinum testis yakınında tubuli seminiferi rectilere uzanıp mediastinuma girerek rete testisi oluşturur. Lobuli testislerde üretilen spermler ductuli efferentes ile epididimise gelir (21).

Testislerin kanlanması, abdominal aortanın testiküler arter dalı ile sağlanır (25). İnguinal kanaldan geçerek testise ulaşır. Testiküler arterler varyasyonel olarak renal arterden dallanabilir (25). Kollateral olarak arteria (a.) duktus deferentis, a. kremasterika, a. pudenda eksterna'dan da kanlanabilir (23).

Testis posteriorunda mediastinum testisten çıkan venler, plexus pampiniformis olarak inguinal kanaldan geçerek abdomene ulaşır (25). Abdomende venler birleşerek testiküler veni oluşturur ve vena (v.) testicularis dextra, v. cava inferiora; v. testicularis sinistra ise v. renalis sinistra'ya dökülür (21). Bu venöz ağ ters yönde çalışarak testis ısının vücut ısından daha düşük olmasını düzenleyen sistemdir.

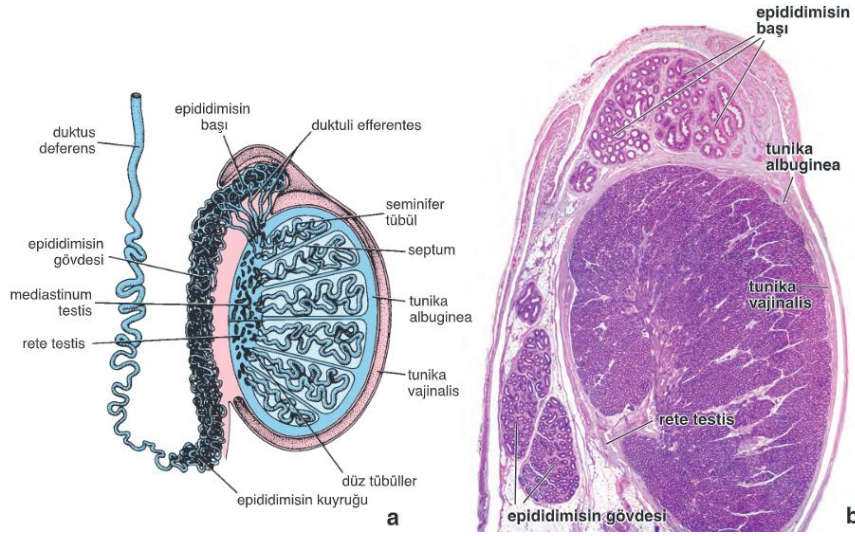
Yüzeyel lenf damarları tunica vaginalis testisin altında, derin lenf damarları ise testis ve epididimisin içinde yer alır (21). Funiculus spermaticus ile birlikte abdomene ulaşır nodi aortici laterale ve nodi preaorticiye açılır (21)

Testislerin innervasyonu medulla spinalisin 10-12. torakal segmentlerden sağlanır (21). Afferent lifler plexus aorticorenalis ile medulla spinalise ulaşır (23). Testis kökenli ağrı duyusu, aynı segmentlerden gelen sinirlerin dermatom alanlarına uygun olarak karın ön duvarının orta ve alt kısımlarında hissedilir (23).

2.3 Testis Histolojisi

Erkek üreme sistemi testis, epididimis, genital kanallar, yardımcı üreme bezleri (seminal veziküller, prostat ve bulbouretral bez ya da Cowper bezleri) ve penisten oluşur (26).

Testislerin son yerleşim yeri skrotumdur. Skrotum, testislerin daha düşük ısıda tutulmalarında ve spermatogenezin korunmasında önemli rol oynar. Tunika vaginalis, seröz kavite şeklinde testislerin anterolateral kısmını sararak skrotum içinde hafif mobilize olmalarını sağlar (26). Testis, düzensiz kollajen yapıda yoğun bağ dokudan oluşan kalın bir kapsül olan tunika albuginea ile sarıdır (26,27). Altında testisin vasküler kapsülünü oluşturan gevşek bağ dokusu, tunika vasküloza bulunur (26). Tunika albuginea medialde kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur (26,27). Buradan fibröz yapıda septalar testis dokusu içine girerek her testisi yaklaşık 250 adet piramidal testiküler lobüle ayırır (Şekil 2) (26,27). Bu septalar tam değildir ve bölmeler genellikle birbiriyle ilişkilidir (27). Lobüllerde; sinirler, pencereci kapillerler, lenf damarları ve fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajları içeren gevşek bağ dokusu ile sarı 1-4 adet seminifer tübül ile yuvarlak, nükleuslu, küçük, lipitten zengin eozinofilik sitoplazması bulunan interstisyel hücreler (Leydig hücreleri) bulunur (26,27).



Şekil 2: İnsan testisinin sagittal kesiti (28)

2.3.1 Seminifer Tübüller

Erkek üreme hücreleri olan spermatozoonlar burada üretilir. Her testiste yaklaşık 250-1000 adet seminifer tübül bulunur (27). Tübüller kıvrımlı ve adölesan döneme kadar lümenleri kapalıdır. Sonlanırken lümen daralır ve düz tübüller (tübüli rekti) olarak devam eder. Tübüli rektler, seminifer tübüllerin mediastinum testiste bulunan silindirik epitel ile döşeli anastomoz içeren kanallar ağı olan rete testise bağlanmasını sağlar. Bu kanallar yaklaşık 10-20 duktuli efferentes ile epididimise bağlanır (27). Duktuli efferentesler silyalı ve lümendeki sıvının geri emilmesinde rol oynayan stereosilyalı hücreleri içeren prizmatik epitel ile döşelidir (26).

Seminifer tübüller, fibröz bağ dokusu kılıfı tunika propria, bazal membran, düz kas özelliğinde yassılaştırmış hücre içeren myoid tabaka ile çevrilidir (27,29). Myoid hücreler, hareketsiz spermleri rete testise ileten ritmik kasılmadan sorumludur (26). Spermler epididimal kanaldan geçtikten sonra motilite özelliklerini kazanırlar (26). Seminiferöz epitel, 4-8 kat yerleşen spermatogonik (spermatogonyum, spermatosit ve spermatid) hücreler ve nonprolifere Sertoli hücrelerini içeren kompleks tabakalı epiteldir(29).

Seminifer tübülde, germ hücreleri spermatogenezin çeşitli aşamalarında bulunabilir (29). Sferik çekirdekli, bazal membrana en yakın hücreler spermatogonyum; sferik

çekirdekli ve belirgin spagetti benzeri kromatinli daha büyük hücreler birincil spermatositlerdir. Haploid sekonder spermatositler nadiren görülür ve oluştukları anda bölünerek spermatidleri oluştururlar. Spermatidler, uzun ve sütun benzeri Sertoli hücresine bağlanır. Sertoli hücrelerinin tabanları bazal membran üzerinde, serbest uçları ise radyal olarak uzanarak lümene ulaşır. Erken ve geç spermatidler bölünmez, olgunlaşarak lümene salınan ve efferent kanallara taşınan spermatozoalara dönüşürler (29)

2.3.1 Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri puberteye kadar seminifer epitelin dominant hücre tipidir (29). Hücre gövdeleri ile seminifer tübül lümeni arasında köprü hücreler olarak görev yaparlar (26). Elektron mikroskopunda, çok sayıda düz endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş Golgi kompleksi, çok sayıda mitokondri ve lizozomlar içerdiği gösterilmiştir (27). Üçgen biçiminde uzamış nukleusunda çok sayıda girintiler, belirgin nukleolus ve az miktarda heterokromatin bulunur (27).

Bazal ve adluminal tübül kompartmanı ayıran sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar kan-testis bariyerini oluşturur (30). Bariyer, antikor dahil proteinlerin spermatogenik hücrelere ulaşmasını ve spermatogenik hücrelerden de dolaşıma protein sızarak immün cevabı tetiklemesini engeller (26). Spermatogonyumlar, bariyerin altındaki bazal kompartmanda bulunur. Spermatogenez sırasında spermatogonyumların bölünmesi sonucu oluşan hücreler bağlantı noktalarından geçerek adluminal kompartmana ulaşırlar. Spermatidlerin flagellar kuyrukları gelişir. Sertoli hücreleri gap junctionlarla hücrelerin iyonik ve kimyasal alışverişi ile gelişen spermatozoonların desteklenmesi, korunması ve beslenmesinin düzenlenmesini sağlar (26).

Seminifer tübüllere genital kanallar yönünde spermilerin taşınması için bir sıvı salgılar. Folikül stimulan hormon (FSH) uyarımı ile androjen bağlayıcı protein (ABP) sentezini ve sekresyonunu düzenler (26). ABP, seminifer tübül içinde spermatogenez için gerekli testosteronun yoğunlaştırılmasını sağlar. Sertoli hücreleri testosteronu östradiole çevirebilir. Ayrıca hipotalamus ve ön hipofizden, GnRH (Gonadotropin releasing hormon) ve FSH üzerine negatif feedback etki gösteren inhibin ile FSH üzerine pozitif feedback etki gösteren aktivini salgılar (26).

Sertoli hücreleri bölünmezler ve enfeksiyon, radyoterapi, kemoterapi gibi olumsuz koşullara dirençlidir (26).

2.3.2 Spermatogenez

Spermatogenez, insanda yaklaşık 64 gün süren germ hücrelerden olgun sperm üretim sürecidir. Süreç, spermatogonyum ile başlar (27). Spermatogonyumlar, yaklaşık 12µm çapında diploid kök hücrelerdir (26). Adölesan dönemde spermatogonyumlar mitoz bölünmeyle çoğalır (27). Yeni oluşan hücrelerden A tipi spermatogonyumlar, kök hücreler olarak bölünür ya da devam eden mitotik sikluslarla farklılaşarak B tipi spermatogonyumları oluşturur. B tipi spermatogonyumlar, primer spermatositlere farklılaşan öncü hücrelerdir. Spermatogenik hücrelerin en büyüğü olan primer spermatositler oluşuktan hemen sonra birinci mayoz bölünmenin profazına girerler. Kesitlerde spermatositlerin çoğu 22 gün süren bu aşamada görülür. Birinci mayoz bölünme ile sekonder spermatositler oluşup ikinci mayoz bölünmeye girer ve spermatidler oluşur (27). Spermatogonyumlar bazal kompartmanda, spermatositler ve spermatidler adluminal kompartmanda yerleşir (30).

2.4 Eksozom

Hücreler arası haberleşme, hücrenin homeostazisi için önemli olup uzak bölgelerin iletişimde DNA, RNA ve proteinler gibi hücreye özgü maddeleri taşıyan ECV görev alır (13,31). ECV'ler boyutlarına ve oluşumlarına göre apoptozom, mikrovezikül ve eksozom olmak üzere 3 gruba ayrılır (31).

Eksozomlar bilinen tüm hücreler tarafından ortama salınan; plazma, idrar, beyin omurilik sıvısı, epididim sıvısı, amniyotik sıvı, plevral sıvı, anne sütü gibi biyolojik sıvılarda büyük ölçüde bulunan en küçük ECV'dir (7-9). 30 ile 100 nm arasında değişen çapa sahip biyoaktif nano keseciklerdir (9,10). Eksozomlar çift lipid tabaka ile çevrili; protein, lipid ve nükleik asit gibi zengin hücresel özelliklere sahiptirler (11,12). Endozomal kökenli olduklarından tetraspanin transmembran proteinleri (CD9, CD37, CD53, CD63, CD81 ve CD82) (8), Annexin ve Rab proteinleri gibi çeşitli zar proteinlerine sahiptirler (13). Ayrıca multiveziküler cisimcik oluşumunda rol alan

Alix, TSG101 (tumor susceptibility gene 101), Rab11, HSP70 (heat shock proteins 70) ve 90, Annexin 1 ve 2 ile ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) proteinlerini de ifade etmektedir (9,10,32). Yine hücre zarının yapısında yer alan kolesterol, fosfatidilkolin, fosfatidilserin ve digliseritler bütün eksozomlarda bulunan ortak lipid moleküllerdir(13).

Köken aldıkları hücre tipi ve mevcut durumuna (transforme, diferansiye, stimüle, stresli) göre taşıdıkları kargoların içerikleri açısından birbirinden farklı olduğu kabul edilir(15). Ayrıca mRNA ve miRNA (micro-ribonükleik asit) moleküllerini taşıyarak hedef hücrenin transkriptomunu da değiştirebilmektedir (31).

2.4.1 Eksozom Biyogenezi

İlk olarak seramid tarafından kontrol edilen hücre zarının içeri doğru invaginasyonu ile erken endozom oluşmaktadır (31). Erken endozom içe doğru tomurcuklanıp girintiler yaparak geç endozoma dönüşürken multiveziküler cisimcikler (MVC) meydana gelmektedir (15,31). Oluşan MVC, lizozom ile parçalanmakta ya da plazma membranı ile kaynaşarak eksozomlar halinde hücre dışına salınmaktadırlar (33,34). Eksozomlar ortama salındıktan sonra hedef hücre tarafından ligandlar aracılığıyla, füzyon yoluyla veya fagositoz ile hücre içine alınmaktadır (31,35).

1980'li yıllarda eksozomların hücredeki istenmeyen molekülleri hücre dışına taşımaktan sorumlu olduğu düşünülse de (10) de yaklaşık son 20 yılda yapılan çalışmalar bu keseciklerin önemli görevleri olduğunu ortaya koymuştur. Eksozomlar, köken aldıkları hücrelere ve sahip oldukları içeriklere göre antijen sunumu, RNA taşınması, doku onarımı, tümör metabolizması gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik mekanizmalarda yer alırlar (10,36). Böylece hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanılabilirler.

2.4.2 Eksozomların Tanı Amacıyla Kullanımları

Eksozomların, hedef hücreyi programlama ve hücresel yapıyı düzenleme yoluyla birçok hastalıkta rol aldığı kanıtlanmıştır (31). Hastalık patolojilerinde önemli rolünün anlaşılmasıyla birlikte moleküler içeriği oldukça spesifik olan eksozomların vücut

sıvılarına salgılanması ve bu sıvılardan elde edilebilmeleri, spesifik ve non-invaziv tanı yöntemlerinin geliştirilmesine de olanak sağlamaktadır (36).

Tümörlerin, mikroçevrelerindeki eksozomların oluşturduğu iletişim ağını kullanarak, tümörün proliferasyonuna, invazyonuna ve metastazına neden olduğu bildirilmiştir (37). Ayrıca tümör kökenli eksozomlar immün cevap inhibisyonu, anjiogenez artışı ve ilaç direncine de neden olmaktadır (10,13). Bu rolleriyle eksozomlar tümör mikroçevresinde taşıyıcılar ve klinik tanılarda biyobelirteçler olarak işlev görebilme potansiyeline sahiptir (38)

Eksozomların, prostat kanseri (39), glioblastoma (40), akciğer yassı hücreli karsinomu (41), hepatoselüler karsinom (42), melanom (43) gibi kanser tiplerinin tanısında kullanılabileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır. Alzheimer hastalarının beyin plaklarında eksozomal amiloid peptitlerin biriktiği ve biyobelirteci olan Thr-181'de fosforile taunun BOS'tan elde edilen eksozomlarda yüksek düzeyde izlendiği; Parkinson hastalığında in vitro modelde α -sinükleinin eksozomlardan salındığı, bulaşıcı spongios prion proteinlerinin enfekte nöronal hücrelerden salınan eksozomlarda bulunduğu ve hastalığın yayılmasında etkili olduğu bildirilmiştir (43). Eksozomal proteinler tanıda büyük potansiyele sahip olabilir ve daha fazla araştırılmalıdır.

2.4.3 Eksozomların Tedavi Amacıyla Kullanımları

Eksozom temelli tedaviler, kök hücre gibi hücre temelli muadillerine ve yapay taşıyıcılara göre birçok avantaja sahiptir. Eksozomlar; daha güvenli, doğal olması nedeniyle toksik olmaması, stabilitesinin yüksek ve depolanabilir olması, anöploidi riski olmaması, bağışıklık sistemi tarafından ret olasılığının düşük olması ve hasarlı bölgelere ulaşmasının kolaylığı nedeniyle tercih sebebi olmaktadır (44,45). Ayrıca eksozomlar, potansiyel olarak toksik kriyoprezervatif ajanlar uygulanmadan doğrudan -20°C'de 6 aya kadar saklanabilmektedir (44). Bu özellikleri değerlendirildiğinde eksozomların tedavi amaçlı kullanımları yaygınlaşmaktadır. Eksozomların tedavi edici uygulamalarını ikiye ayırmak mümkündür; eksozomları kendi başlarına kullanmak ya da ekzojenik bir molekülün taşıyıcısı olarak kullanmak.

Eksozomların, özellikle lipid içinde çözünen ilaçlar ve genetik materyaller için taşıyıcı kesecik ve antijen ile adjuvanın birlikte taşınabildiği aşı taşıyıcıları olarak kullanımı tedavi edici uygulamalarının en önemlileridir (10).

Eksozomların kan-beyin bariyerini geçebilmesi nedeniyle, tümör oluşumunu ve yayılımını tedavi edebilmek amacıyla ilaç, mikroRNA ve antijen gibi bileşenlerin eksozomlara yüklenerek hedef bölgeye iletilmesi ümit verici gibi gözükmemektedir (13). Bunun yanında eksozom üretiminin engellenmesi ile hücreler arası iletişim ağı bozularak tümör hücrelerinin gelişimi de durdurulabilmektedir (46). Bu keşif, dendritik hücrelerden salgılanan eksozomların, anti-tümör immün yanıtı indükleyebileceğini gösteren Faz I klinik denemelerine olanak sağlamıştır. Kanseri aşı olarak peptit yüklü dendritik hücreden türetilmiş eksozomlar kullanılarak çalışma genişletilmiştir (46). Bu sayede toksisite oranı daha az olan eksozomların, tümör türevli antijen uygulamalarında etkili olabileceği öngörülmüştür (46). Bir başka çalışmada eksozomların hidrofobik kurkuminin taşıyıcısı olarak kullanılmasıyla vücutta ve kan-beyin bariyerini aşabildiği için beyinde endotoksin ile tetiklenmiş enflamasyonu engelleyebildiği gösterilmiştir (10). Meme, over ve beyin kanserlerinin tedavisinde de ilaç yüklü eksozomların toksisite yaratmadan anti tümör tedavide kullanılabileceği gösterilmiştir (47,48).

Yapılan çalışmalarda eksozomların köken aldığı hücreye göre immün modülatör etki gösterdikleri saptanmıştır (10). Bazı yerlerde taşıdıkları kargo içeriğiyle immün supresyon yanıtı neden olurken bazı yerlerde immün stimulan etki göstermektedir (10,13). Eksozomların uygun bir şekilde seçilmesi ile enflamasyon, otoimmün hastalıklar ve immün yetersizlik durumlarında tedavi amacıyla ve daha etkin aşılarda geliştirilmesinde kullanılabilir (10).

Alıcıya uygulanan eksozomlar, hücrelerde subsellüler ve moleküler seviyelerde biyolojik fonksiyonları değiştirebilir (49,50). Doku onarımı ve rejenerasyonunda immün sistem hücrelerinden salınan (monosit, lökosit, granülosit ve lenfosit) eksozomlar ve MKH'lerden elde edilen eksozomlar enflamatuar hücrelerin organizasyonu, neovaskülarizasyon ve koagülasyon gibi biyolojik süreçte rol alırlar

(49). Yara iyileşmesi, kutanöz rejenerasyon, anti-aging işlemler, alopesi ve dermatit tedavileri gibi rejeneratif tıp alanında eksozom klinik olarak kullanılmaktadır (51,52).

Epitel kökenli eksozomların alerjene karşı tolerans yanıtında etkili olduğu gösterilmiştir. Alerjene maruz bırakılmış farelerin akciğer epitelinden salınan ve bronkoalveolar lavaj sıvısından izole edilen eksozomların allojenik aktarımı alıcı farede de aynı alerjene karşı tolerans gelişmesini sağlamış (10).

Ancak günümüzde eksozomların klinikte kullanımlarının önünde vücut sıvılarından heterojen bir popülasyon olarak eldesi, eksozomlarda protein ve RNA sınıflandırmasına dair mekanizmaların yeterince anlaşılamaması ve yeterli duyarlılıkta tekniklerin mevcut olmaması gibi bazı engeller bulunmaktadır (10).

2.4.4 Eksozomların Saflaştırılması, Üretimi ve Karakterizasyonu

Eksozomlar memeli hücrelerinde daha yaygın bulunmasına rağmen son zamanlarda yapılan çalışmalar ile greyfurt, üzüm, havuç gibi meyvelerden de eksozomlar elde edilmiştir (31). Sığır sütünden elde edilen eksozomlar kullanılarak ilaç ve biyoaktif bileşiklerin taşınması ile ilgili çalışmalarda umut verici sonuçlar elde edilmiştir (31). Eksozomların vücut sıvılarından veya hücrelerden saflaştırılmasına yönelik olarak ECV'lerin izolasyonu için birçok protokol mevcuttur.

Her bir yöntemin uygulamaya bağlı olarak avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Farklı yöntemlerin kombinasyonu kullanılarak avantajlar artırılabilir (13,53).

2.4.5 Eksozom İzolasyon Teknikleri

Eksozomların izolasyonuna yönelik birçok farklı protokol mevcuttur. Protokol seçimi; numune kaynağına (idrara, plazma, hücre kültürü veya başka biyolojik sıvı), miktarına ve kullanım amacına göre yapılır.

2.4.5.1 Ultrasantrifüj (UC)

UC, eksozom izolasyonunda altın standart olarak kabul edilen en sık kullanılan ve 1.000.000g'ye kadar yüksek santrifüj hızları kullanılan bir yöntemdir (54,55). Analitik ve preparatif tip olarak ayrılan UC'nin eksozom izolasyonu amacıyla preparatifin 2 alt tipi diferansiyel ve yoğunluk gradientli santrifüj kullanılabilir (54).

Diferansiyel UC ile 100.000-120.000g arasında değişen farklı kuvvet ve sürede seri santrifüj ile eksozomlar diğer bileşenlerden yoğunluk ve boyut farkına göre izole edilir. İzole edilen eksozomlar en son re-suspanse edilerek -80°C'de saklanır (54).

Yoğunluk gradiyentli UC yönteminde ise eksozomlar santrifüj tüpü içerisinde yoğunluğu aşağıya doğru artan yoğunluk gradyan ortamında 100,000g devir hızında 16 saat boyunca santrifüjlenerek büyüklüklerine, kütlelerine ve yoğunluklarına göre fraksiyonlara ayrılmasıyla gerçekleştirilir (54). İşlem sonunda eksozom pelletleri yoğunluğu 1.10-1.18 g/ mL aralığında olan bölgede toplanır (54). Ayrılan eksozomlar daha sonra basit fraksiyon toplama ile elde edilir (54). Preoperatif amaçlar için bu yöntem daha uygun olmakla birlikte kapasitesi dansite bölgesi ile sınırlı olması dezavantajıdır (54).

UC zaman alır, düşük hacimli klinik numunelere uygun değildir ve UC cihazına ihtiyaç vardır (56). Son çalışmalar, bu yöntemle izole edilen eksozomların, diğer izolasyon yöntemlerine göre daha fazla hücresel debris içerebileceği ve işlem sırasında vezikül rüptürüne neden olabileceğini göstermektedir (56,57). Boyut dışlama kromatografisiyle (Size Exclusion Chromatography – SEC) birlikte kullanılabilir.

2.4.5.2 Ultrafiltrasyon (UF)

Eksozomlar, moleküler ağırlıklarına veya boyutlarına uygun nano-membran filtreler kullanılarak izole edilir (54,56). Aynı anda birçok numune kullanılabilir (55). UF, UC'den daha hızlıdır ve özel ekipman gerektirmez (54,55). Dezavantajları, protein kontaminasyonu, düşük biyolojik aktivite ve eksozomların membrandan zor ayrılması ya da bu sırada eksozomun hasarlanması olarak sayılabilir (54–56). SEC ile birlikte kullanılabilir.

2.4.5.3 Boyut dışlama Kromatografisi (SEC)

SEC, makromolekülleri ve partikül maddeleri boyutlarına göre ayırmak için gözenekli sabit bir faz kullanılan yöntemdir (56,58). SEC'de, küçük hidrodinamik bir numunedeki bileşenler gözeneklerden geçebilirken, eksozomlar da dahil olmak üzere büyük hidrodinamik bileşenlerin gözeneklere girmesi engellenir (56). Daha önce MKH ile koşullandırılmış ortamdaki eksozomlar, SEC ile izole edilerek miyokardiyal iskemi/reperfüzyon hasarı sırasında kalbi korumak amacıyla kullanıldı ve başarılı oldu (59). Ve Transmisyon Elektron Mikroskobu ile incelendiğinde, izole edilmiş eksozomların yapısal olarak sağlam olduğu gözlemlendi (56,60).

SEC, diğer tekniklerle kombinasyon halinde de kullanılabilir. UC veya UF sonrası SEC yapılması yalnızca UC veya UF yapılmasına göre eksozom eldesindeki verimi artırır (56).

2.4.5.4 Polimer Bazlı Presipitasyon (PBP)

Eksozomları izole etmenin yaygın ve kullanımı kolay bir yolu presipitasyondur. Yüksek verim elde edilir, herhangi bir vücut sıvısından eksozom eldesinde kullanılabilir, aynı anda birkaç numune ile çalışılabilir ve kolaylıkla RNA elde profillemesi yapılabilir (55,56). Presipitasyon, zaman alan UC yöntemine etkili ve kanıtlanmış bir alternatiftir (58,61). Presipitasyon reaksiyonunun gerçekleşmesi için polietilen glikol (PEG) gibi polimerler ya da sodyum asetat gibi tuz çözeltileri kullanılmaktadır (58). Eksozom elde edilecek numune önce presipitan madde ile inkübe edilir. İnkübasyon sırasında, polimerler eksozomların çözünürlüğünü azaltarak çökelmelerine yol açar (58). Çökeltelen eksozomlar, düşük hızlı santrifüj veya filtrasyon kullanılarak izole edilebilir (57).

Eksozom presipitasyon kitleri ticari olarak mevcuttur ve serum, plazma, asit, idrar, beyin omurilik sıvısı, kültür ortamı dahil olmak üzere vücut sıvılarıyla uyumludur. Presipitasyondan önce, numunelerin hücrelerden ve hücre kalıntılardan santrifüj ile temizlenmesi gerekir (54).

Özellikle plazma ile çalışırken PBP'nin dezavantajı, eksozom dışı diğer bileşenlerin birlikte çökmesidir. Plazma numunelerinde, fibrinojeni pıhtılaştırmak için önce plazmanın rekombinant trombin ile ön işleme tabi tutulması önerilir(56).

2.4.5.5 İmmünolojik İzolasyon

İmmünolojik izolasyon için çeşitli teknikler geliştirilmiştir. İmmüno-çip yöntemi ile eksozomlar yüzey reseptörleri kullanılarak izole edilirler ve DNA / RNA izolasyonu için doğrudan kullanılabilirler (62). Ayrıca eksozomal hücre içi proteinler, eksozomların izolasyonu için spesifik belirteçler olarak kullanılabilir. Antijen sunan hücrelerden elde edilen eksozomların izolasyonu bu yöntem ile antikor bağlı manyetik boncuklar kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Eksozom kaplı manyetik boncukların analizi flow sitometri, Western boyama ya da elektron mikroskobu ile yapılmaktadır (62)

2.4.6 Eksozom Karakterizasyon Teknikleri

Eksozomun biyofiziksel ve biyokimyasal karakterizasyon teknikleri genel olarak akış sitometrisi, Dinamik Işık Saçılımı (Dynamic Light Scattering - DLS), Geçirimli Elektron Mikroskobu (Transmission Electron Microscopy - TEM), Western boyama, Bradford protein testi, Nanopartikül İzleme Analizlerini (Nanoparticle Tracking Analysis - NTA), Dirençli Darbe Algılama-Resistive Pulse Sensing (RPS) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu-Atomic Force Microscopy (AFM)'nu kapsamaktadır (13,63). İzolasyon sonrası gerçekleştirilen bu teknikler eksozomların boyut, miktar, içerik, oluşum mekanizması, türetildiği kaynak ve işlevsel özellikleri ile ilgili önemli bilgiler vermektedir (63).

2.5 Testis Torsiyonu

İlk defa 1810'da Hunter tarafından tarif edilen testis torsiyonu, akut skrotumun ciddi sonuçları bulunan acil cerrahi müdahale gerektiren nedenidir (64). Testisin hareketi, normal anatomik yerleşiminde posteriordan yapışık olduğu epididimin skrotum duvarına fikse olması ve anteriordan tunika vaginalis ile postero-inferiorundan da gubernakulum ile çevrilmesi nedeniyle kısıtlanır. Bu bağlantıların

eksikliğinde, spermatik kord kendi etrafında dönerek testis torsiyone olur ve testisin kanlanması bozulur. Torsiyon ile önce venler tıkanır. Testis tunikası elastik olmadığından venöz konjesyon ve ödem arteriyel tıkanmaya neden olur ve testis iskemisi gelişir (1). Torsiyon, iskemik hasara; detorsiyon ise reperfüzyon hasarına neden olmaktadır. Hasarların şiddeti, torsiyonun derecesine ve süresine bağlı olarak değişmektedir (1,2). Erken tanı ve tedaviye rağmen detorsiyon sonrası reperfüzyona bağlı oksidatif stresin testiste germ hücre apoptozisini artırdığı ve değişik derecelerde spermatogenetik fonksiyonların kaybına neden olduğu bilinmektedir (3). Başarılı cerrahi müdahale sonrasında bile testis atrofisi ve infertilite oranının % 40-60 olduğu bildirilmektedir (4). Her yaş grubunda görülebilen testis torsiyonunun 25 yaş altı erkeklerde insidansı 1/4000 olmakla birlikte yenidoğan ve 12-18 yaşta pik yapmaktadır (1). Adölesan dönemde insidansın artması, pubertede spermatik kordun genişlemesi ve testis ağırlığının artması ile ilişkilendirilebilir (65). Testis torsiyonu etiyolojisinde ayrıca travma, soğuk hava, aşırı aktivite, kremaster kontraksiyonları, inguinal bölge ameliyatlarında iyatrojenik torsiyon ve inmemiş testis varlığı sayılabilir (65,66). Gonadın çevre dokuları tutunması, skrotuma inişi sırasında meydana geldiğinden inmemiş testislerde torsiyon riski daha yüksektir (66).

Testis torsiyonu; intravaginal, ektravaginal ve testis eklerinin torsiyonu olarak 3 alt başlıkta incelenebilir.

2.5.1 İntravaginal Testis Torsiyon

Mevcut tüm testis torsiyonu vakalarının %90'ında görülür. Testisin tunika vaginalise gubernakulum aracılığı ile yetersiz fiksasyonu sonucunda gelişir (65). Tunika vaginalis içerisinde testis ve epididimin anatomik lokalizasyonunda serbest olmasına “*bell-clapper (çan dili) deformitesi*” denir. %60-80 oranında görülen bu deformite genellikle bilateraldir (Şekil 3) (2,66). Testis fıkse olmadığı için torsiyon olma riski fazladır (65). Adölesan dönemde daha sık görülen intravaginal torsiyon varyantıdır (65).



Şekil 3: İnvaginal testis torsiyonu (Manisa Celal Bayar Üniversitesi Çocuk Cerrahisi AD arşivinden)

2.5.2 Ekstravaginal Testis Torsiyonu

Spermatik kord ve tunika vaginalis birlikte torsiyone olur. Ekstravaginal torsiyon, testisin skrotuma inişi sırasında olur (2). Bu nedenle antenatal ve erken postnatal dönemde testiküler fiksasyona kadar olan süreç ile inmemiş testisi olan hastalarda daha sık görülür (67). Testis torsiyonlarının %10'u yenidoğanlarda görülür ve %92'si ekstravaginaldir (66). Antenatal torsiyonu (yenidoğan testis torsiyonlarının %70'i) olan hastalar, skrotumda renk değişikliği ve kasık veya skrotumda ağrısız, sert kitle ile başvururlar (67). Doğumda tespit edildiğinde testisin kurtarılabilme oranı %8,6 – 21,7 arasında değişmektedir (68,69). Postnatal testis torsiyonunda ise testisin kurtarılabilme oranı %33-50'dir (68). Ultrasonografide (USG) parankimde mikst ekojenite ve kalsifikasyon görülür (66). “*Vanishing testis*” sendromunun en sık nedeninin intrauterin torsiyon olduğu düşünülmektedir (66,67).



Şekil 4: Ekstravaginal testis torsiyonu (Manisa Celal Bayar Üniversitesi Çocuk Cerrahisi AD arşivinden)

2.5.3 Testis Eklerinin Torsiyonu

Testisin embriyolojik kalıntılarının (appendiks epididimis ve appendiks testis) torsiyonu sıklıkla 16 yaş sonrasında gözlenir. Akut skrotum kliniği ile başvuran hastalarda testisin veya epididimisin üst kısmında ödemli kitle palpe edilirken testis dokusunun dokusunun normal olması tanıda patognomoniktir (Şekil 5) (66). Testis normal olarak palpe edilirken ekler ödemli ve şiştir. Enflame ve ödemli appendiks testis ciltte mavi nokta (blue dot sign) olarak görülür. Gri skala USG'de hiperekojen nodül olarak görülür (66).



Şekil 5: Appendiks testis torsiyonu (Manisa Celal Bayar Üniversitesi Çocuk Cerrahisi AD arşivinden)

2.5.4 Klinik

Testis torsiyonunda en sık başvuru nedeni testis dokusunun perfüzyonunun bozulmasına bağlı ani başlayan ve giderek artan şiddetli skrotal ağrıdır (65). Sıklıkla bulantı / kusma, ipsilateral karın alt kadranda ağrısı ve nadiren dizüri gibi üriner semptomlar eşlik edebilir (70). Genellikle tek taraflı olmakla beraber % 2 bilateralidir ve genellikle sol taraftadır.

Fizik muayenede skrotum ödemli, kızarık ve gecikmiş olgularda ekimotiktir (65). Testis retrakte ve yatay pozisyonda; palpasyonla hassas, ödemli, serttir (66). Buna bağlı olarak epididimin normal posterolateral yerleşimi de yer değiştirir (65). Bazı olgularda reaktif hidrosel de eşlik edebilir (66). Kremasterik refleksin torsiyone tarafta

kaybının tanıda sensitivitesi % 100 ve spesifitesi % 66 olmakla birlikte çocuklarda güvenilir değildir (71). Kremasterik refleksin normal olması tanıyı dışlamaz (70).

2.5.5 Tanı

Anamnez ve fizik muayene sonucunda testis torsiyonu düşünülen olgularda yardımcı tanı yöntemlere ulaşamadığında ya da sonuçlar torsiyon lehine olmasa bile organ kaybını önlemek amacıyla acil cerrahi eksplorasyon yapılmalıdır (72,73). Tanıda şüphe mevcut ise gereksiz cerrahiyi önlemek amacıyla görüntüleme yöntemlerine başvurulmalıdır (73,74). Tanıya yardımcı olmak amacıyla mevcut klinik bulgulara dayalı klinik skarlama sistemi geliştirilmiştir (65). Skarlama sisteminde; testiste şişlik 2 puan, testis sertlik 2 puan, kremaster refleksin olmaması 1 puan, mide bulantısı/kusma 1 puan ve retrakte testis 1 puan olmak üzere ≤ 2 puan saptanır ise düşük risk, ≥ 5 puan saptanır ise yüksek risk olarak değerlendirilmektedir (75). Bu skarlama sisteminde sadece 2-5 arası puan saptanan orta risk grubu için USG kullanılmaktadır (75). Çalışmaya göre negatif ve pozitif prediktif değerler 2 ve 5 sınırları için %100 (özgünlük %81-97, duyarlılık %54-76) saptanmıştır. Vakaların %80'inde de potansiyel olarak testis torsiyonunu teşhis veya ekarte edebilmektedir. Ancak henüz rutin olarak kullanılmamaktadır (75).

Testis torsiyonu şüphesinde en hızlı ve non-invaziv tetkik; skrotal renkli Doppler USG'dir (73). USG'de spermatik kordda dönme, intratestiküler kan akımının azalması / olmaması ya da testis parankiminin periferinde kanlanma görülürken merkezinde kanlanma olmaması torsiyonu düşündürür (65,66). Ancak büyük hidrosel, apse, hematoma ya da skrotal herni durumlarında da testis kanlanması azalabilir (65). Nadir de olsa spontan detorsiyon ve kısmi ya da aralıklı torsiyonda testis kanlanması normal ya da artmış olabilir (65,69). Testis torsiyonu tanısında Doppler USG'nin duyarlılığı %69-95, spesifitesi %98-100, pozitif prediktif değeri %100, negatif prediktif değeri %97,5 arasında değişmektedir (73). Kaye JD ve ark. yaptıkları çalışmada USG'de testisin heterojen görülmesinin nonviabl testise işaret ettiğini, çalışmaya dahil olan hastalardan heterojenite saptananların %100'ünde, homojen görülenlerden de sadece bir kişide cerrahi sırasında testisin canlılığını kaybettiğini saptamışlar ve parankimal değerlendirmenin %96.4 doğrulukla organ kaybını öngördüğünü bildirmişler (76).

Kan akımının düşük olduğu küçük prepubertal testislerde USG'nin kullanımı sınırlıdır (77).

Testiküler kan akımını değerlendirmek için kullanılabilen bir diğer yöntem Teknesyum 99m perteknetat sintigrafisidir (duyarlılık %66,7-95, spesifitesi %82,2-99) ve sensitivitesi testis torsiyonu tanısında renkli doppler USG ile benzerdir (72,77). Bu tetkikte ölçülen dolaşımdaki radyoizotoplar torsiyone testise kan akımı olmadığı için ya çok az sayıda ulaşır ya da hiç ulaşamaz ve iskemi süresine bağlı olarak değişen görüntüler elde edilebilir (77). Tetkik süresinin uzunluğu, küçük çocuklarda testis boyutları küçük olduğundan güvenilirliğinin azalması, her merkezde çekim imkanı olmaması, nöbet şartlarında uygulama zorluğu nedeniyle rutin olarak kullanılamamaktadır.

Bir diğer görüntüleme yöntemi olan Power Doppler USG'de akım hızına karşılık kırmızı hücre sayısını saptayarak kan akımı ölçülür (78). Power doppler USG, renkli doppler USG'nin aksine akım hızı ve yönü yerine geniş bir kan akışı aralığını gösterebilir ve çok düşük akımları ölçmek için kullanılabilir. Bu yöntemin küçük çocuklarda, renkli Doppler USG'ye üstün olduğu savunulmaktadır (78)

Akut skrotumlu hastalarda laboratuvar testlerinin özel bir yeri olmayıp lökositoz, c-reaktif protein, prokalsitonin, eritrosit sedimentasyon hızı yüksekliği gibi belirteçler, akut skrotumun enflamatuvar nedenlerini, enflamatuvar olmayan nedenlerinden ayırmada yardımcı olabilir (79).

2.5.6 Ayırıcı Tanı

Ayırıcı tanıda epidimo-orşit, appendiks testis torsiyonu, strangüle inguinal herni, idiyoPATİK skrotal ödem, akut hidrosel, travmatik hematom, Henoch schönlein purpurası, lösemik testiküler infiltrasyonlar gibi hastalıklar akılda tutulmalıdır (66). Daha yavaş başlayan ağrı epididimo-orşit ve mavi nokta bulgusu appendiks testis torsiyonu düşündürür. Epididimo-orşit ile ayırıcı tanısında Prehn bulgusu, testisin elevasyonu ile torsiyonda ağrı artarken, epididimo-orşitte ağrı azalır, (72) ve USG'de kan akımının artmış olduğu görülür (66). Ayrıca pollakuri, dizüri ve tam idrar tetkikinde enfeksiyon bulgusu olması ayırıcı tanıda yardımcıdır (69).

2.5.7 Tedavi

Testis torsiyonu tanısı sonrası hastaya olabilecek en hızlı şekilde acil cerrahi eksplorasyon yapılmalıdır. Testisin canlılığı torsiyonun süresine ve derecesine bağlıdır (2,76). Detorsiyon ilk 4-6 saat içerisinde gerçekleştirildiğinde %90 oranında, torsiyondan 12 saat sonra reperfüzyon başladığında %50 oranında testis kurtarılabilirken 24 saat sonra reperfüzyon gerçekleştiğinde bu oran %10'a kadar düşmektedir (1). Ancak tahmini torsiyon süresine bakarak cerrahi tedavi kesinlikle geciktirilmemelidir (65). Cerrahi eksplorasyonda torsiyon saptanırsa detorsiyon sonrası testis sıcak kompresle sarılıp 15-20 dakika kadar dolaşımın geri dönmesi beklenir. Gerekirse tunika albugineaya ufak bir kesi ile hem testisteki bası azaltılmaya çalışılır hem de testisin canlılığı kontrol edilir. Eğer yapılan kesiden kanama varsa testisin canlı olduğunu, kanama olmaması nekrotik olduğunu gösterir. Testis canlı ise orşiopeksi, tamamen nekrotik ise orşiektomi düşünülür. Diğer testisi korumak amacıyla kontralateral orşiopeksi yapılır (69). Çünkü Bell-clapper deformitesi varlığında karşı testiste de torsiyon olma ihtimali yaklaşık olarak %80'dir (66). Orşiopeksi için günümüzde, testisin tunika vaginalise tek tek sutürlerle tespiti ya da tunika vaginalis eversiyonu ile veya tunika vaginalise bir pencere açılarak testisin skrotum duvarına teması ve fibrozisle yapışması sağlanarak gerçekleştirilir (66).

Acil cerrahi eksplorasyon imkanı yoksa lokal buz uygulama ve manuel detorsiyon zaman kazandırabilecek manevralardır (80). Uygun sedasyon ve analjezi sonrası testis skrotum içinde medialden laterale (sol testis saat yönünde, sağ testis ise saatin tersi yönünde) döndürülür (72). Ağrıda ani gerileme, testisin normal pozisyona dönmesi ve Doppler USG'de arteriyel kan akımının görülmesi detorsiyonun başarılı olduğunu gösterir (65,72). Ağrı artar ya da gerilemez ise 1/3 olguda torsiyon laterale doğru olabildiğinden testis lateralden mediale doğru döndürülür (72). Manuel detorsiyon başarılı olsa dahi orşiopeksi için yine de cerrahi eksplorasyon gerekebilir (72). Manuel detorsiyon çocukluk çağında, erişkinden farklı olarak pratikte nadiren uygulanmaktadır.

Yenidoğan torsiyonlarında orşiektomi yapıldığında düşük de olsa malignansi açısından testis mutlaka patolojik incelemeye gönderilmelidir (66,68).

Testis torsiyonunun sıklığı puberteden önce artar ve testis torsiyonuna bağlı orşiektomi için tanımlanabilir tek risk faktörü artan yaştır (74). Cosentino ve ark.ları testis torsiyonunun kontralateral testis üzerine etkilerini araştırdıkları hayvan deneyinde tek taraflı spermatik kord torsiyonuna maruz kalan prepubertal bir hayvanın fertilitasını en iyi şekilde korumak için, etkilenen testisin çıkarılması sonucuna varmışlardır (81). Azalmış fertilitenin gerçek patogenezi kanıtlanmamış olmasına rağmen, deneysel veriler kontralateral sağlam testisin sempatik uyarıya bağlı refleks vazokonstriksiyon nedeniyle hipoksik kalması, kan-testis bariyerinde hasarın tetiklediği otoimmünolojik reaksiyonlar ASA (antisperm antikörleri) veya konjenital testiküler displazi gibi mekanizmalarla bilateral etkilenme açıklanmaya çalışılmıştır (2,74,76). ASA'nın infertilite üzerindeki etkisi tartışılmaktadır. Antisperm antikör (ASA) oluşumu, testis travması ve vazektomi sonrası da olduğu gösterilmiş (2). Spermatik kordun torsiyonu ile kan-testis bariyerinin zarar görmesi, immün sistem aktivasyonu ile ASA oluşumuyla sonuçlandığı varsayılmaktadır (83). Ancak bu konu tartışmalıdır. Cui ve ark.ları tarafından 8 çalışmaya dayanan derlemede, ASA'nın spermin konsantrasyonunu ve motilitesini azaltırken semen hacmi, sperm morfolojisi, spermin ilerleyici hareketliliği ve sperm canlılığı üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır (84). Diğer yandan bazı çalışmalara göre testis torsiyonu testiküler endokrin fonksiyonu etkilememektedir (2). Son yıllarda atrofik testislerin hormonal fonksiyonlarını devam ettirebileceği görüşü ile orşiektomi uygulaması giderek azalmaya başlamıştır (82).

Günümüzde ICG/NIR (Indocyanine green / Near infrared) görüntüleme ile yapılan floresan kılavuzlu cerrahi işlemler giderek yaygınlaşmaktadır. Bu yöntem klinik pratikte doku iskemisi, perfüzyonu, tümör ve organların vasküler yapıları ve anatomik sınırlarının belirlenmesi gibi pek çok cerrahi işlemde kolaylık sağlamaktadır. Son zamanlarda testisin iskemi-reperfüzyon modelinde, testisin viabilitesini intraoperatif ICG/NIR ile değerlendirmenin cerraha orşiopeksi ya da orşiektomi kararını vermede faydalı olacağı bildirilmiştir (65).

Deneysel pek çok çalışmada reperfüzyon hasarını önlemek amacıyla hiperbarik oksijen (85), sürfaktan (86), tadalafil & verapamil (1), ibuprofen (87), sildenafil, trapidil, dipridamol, dopamin ve vitamin C kombinasyonu, vitamin E, pantotenik asit,

selenyum; karanfil (88), luteolin, apigenin, galangin, kateşin, kuersetin, ternatin gibi bitki özlerinin lipid peroksidasyon inhibisyonuna yol açarak antienflamatuvar etki gösterdiği ve testis torsiyonunun tedavisinde etkili oldukları raporlanmıştır (89).

2.6 İskemi/Reperfüzyon Hasarı

Torsiyona bağlı iskemi ve detorsiyon sonrası reperfüzyona bağlı ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri testiste DNA hasarı, endotel yıkımı ve germ hücre apoptozisine neden olur (2,3,88). İskemik dokuda oksijen yetersizliği nedeniyle oksidatif fosforilasyon bozularak adenosin trifosfat (ATP) gibi fosfat depolarında yetersizlik meydana gelir ve enerji sağlanamaz (90). Hücre membranındaki ATP bağımlı sodyum-potasyum (Na^+/K^+) pompası inhibisyonuyla iyon dengesizliğine bağlı hücreler şişer. Hücre içi kalsiyum (Ca^{+2}) artarak proteolitik enzimler, fosfolipazlar aktive eder ve sitotoksik etki gösterir (91). Fosfolipazların aktivasyonu ile oluşan araşidonik asit, mitokondriyal enzimleri inhibe ederek serbest radikallerin oluşumunu hızlandırır ve hücre lizise uğrar (92). Anaerobik glikoliz ile ortaya çıkan asidoz, karbondioksit birikimiyle oluşan karbonik asit ile daha da artar. Proteaz aktivasyonu ile hipoksantin ve ksantin oksidaz artar; reperfüzyon ile dokuya giren oksijenle reaksiyona girerek serbest oksijen radikallerini oluşturur (90). Reaktif oksijen radikalleri, hücre membranlarında lipid peroksidasyonu sonucunda protein denatürasyonuna ve nükleik asit hasarına yol açar (89)

2.7 Apoptozis

Apoptozis, programlı hücre ölüm mekanizması olarak adlandırılır ve normal hücre döngüsünün önemli bir parçasıdır. Ayrıca iskemik hasar, toksinler, kanser, dejeneratif veya otoimmün hastalıklar gibi pek çok nedenle de tetiklenebilir (93). Apoptozis, kaspaz aktivasyonunun merkezi bir rol oynadığı spesifik morfolojik ve biyokimyasal özellikler ile karakterize, dikkatle düzenlenmiş ve enerji bağımlı bir süreçtir (94). Apoptozisi düzenleyen Bcl-2 ailesine ait tek geçişli transmembran proteinleri iki gruba ayrılır (95):

- Anti-apoptotik düzenleyiciler: Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, CED-9, Mcl-1, c-Abl, Rb,
- Pro- apoptotik düzenleyiciler: Bax, Bad, Bak, Bcl-xS, p 53, c-Fos, c-Jun, ...

Apoptotik hücre ölümü ekstrinsik ve intrinsik yollar aracılığıyla gerçekleşir (96). Ekstrinsik veya ölüm reseptör yolu, T lenfositlerden sentezlenen hücre yüzey proteini olan Fas ligandı ve makrofajlardan salınan Tümör Nekroz Faktör (TNF) ölüm sinyalleri ile uyarılır (95). Ligandların reseptörlere bağlanması ile FADD (Fas associated death domain) ve TRADD (TNF receptor associated death domain) sinyal iletim kompleksleri aktive olur. Kaspaz-8 FADD tarafından aktifleşerek mitokondride sitokrom C'de proenzim halindeki kaspazların aktive eder (95,96). Bunun sonucunda kaspaz-3 birçok hücrel proteini hidrolize ederek hücreyi ölüme götürür (95,96).

Oksidatif stres gibi sitotoksik uyarılara yanıt olarak, intrinsik veya mitokondriyal yol aktive olur (96). Sağlıklı hücrelerde mitokondrinin zarları arasındaki sitokrom C'nin sitozole geçmesi apoptozisi başlatır (95). Anti-apoptotik düzenleyici olan Bcl-2, sitokrom C'nin sitozole geçişini engellerken pro-apoptotik düzenleyici olan Bax, sitokrom C'nin sitozole geçişine katkıda bulunur (97). Pro-apoptik bir protein olan Bad, mitokondri dış zarında yer alan Bcl-2/Bcl-xl'ye bağlanarak Bax'a bağlanmasını engeller (95). Bax homodimeri, mitokondri dış zarında bir kanal oluşturup buradan pro-apoptotik proteinler, sitokrom c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 ve endonükleaz-G'lerin sitozole geçmesine neden olur (95,96). Sitokrom c, sitozolik protein APAF-1 (apoptosis protease activating factor)'e bağlanarak proteozom birleşmesini uyarıp kaspaz 9 ve kaspaz 3 proteaz sistemini aktive eder (95,96). Kaspaz aktivasyonu aynı zamanda Smac/DIABLO ve Omi/HtrA2'ye bağlı mekanizmalar tarafından da meydana gelir (96). Sonuç olarak apoptozis gerçekleşir. Bu apoptozis formunun DNA fragmentasyonuna endonükleaz-G aracılık etmektedir (98).

Testiküler iskemi-reperfüzyon hasarı, inflamasyon ve ROS'u içeren mekanizmaları indükleyerek germ hücrelerine özgü apoptoza yol açar (89). Çalışmalarla, germ hücre apoptozisinin daha çok Bax, Bcl-Xs ve sitoplazmik sitokrom c'deki artışlarla mitokondrinin dahil olduğu intrinsik yol ile indüklendiği gösterilmiştir. Bu yolun yanında Fas/FasL veya ekstrinsik yol stimülasyonunun da germ hücre apoptozunu başlatabileceği gösterilmiştir (3). Testiste Leydig veya Sertoli hücrelerinin aksine spermatogonyum hücreleri, iskemi/reperfüzyon hasarına oldukça hassastır. Spermatogonyum hücreleri iskemi/reperfüzyon hasarından sonra apoptoz geçiren birincil hücre tipidir (3).

III. GEREÇ VE YÖNTEM

Proje, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı Akademik Kurulu'nda kabul edildikten sonra, Manisa Celal Bayar üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nda 2021/194 protokol numarası ile onaylanmıştır. Proje Uzmanlık tezi olarak Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından (BAP proje no: 2021/072) desteklenmiştir.

Tüm deneysel aşamalar Manisa Celal Bayar Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarı ve Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.



3.1 Gereç

	Katalog No
Alfa-MEM medium	MEMA-RXA
Fetal Bovine Serum	FBS-11B
Penicillin-Streptomycin Solution 100X - 100ml	PS-B
L-Glutamine 100X, 200mM - 100ml	GLN-B
ApopTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Kit	S7101
Trypsin EDTA	BI03-052-1B
DMSO, cell culture grade sigma	D2650-5X5ML
5 mL Serological Pipette, Individually Wrapped, Sterile, 200/pk,	326001
10 mL Serological Pipette, Individually Wrapped, Sterile, 200/pk	327001
Hidrofovik Kalem PAP Pen Mini	PEN01
Eosin Alcoholic [1L]	BO 05-10003/L
Sekonder kit ,300 test	TP-060-HL
DAB chromogen,300-600 slides	TA-125-HD
Formaldehit % 10	TK.060161.01001
miRCURY Exosome Cell/Urine/CSF Kit	Qiagen 76743
Filtreli pipet ucu, 2-200 µl, neutral, Sterile ,10x96 rack	Sarstedt 760213
CD90 Purified Mouse Anti-Human antibody	BD-Pharmingen 550402
CD 45 Polyclonal antibody	Proteintech 20103-1-AP
CD 44 Polyclonal antibody	Proteintech 15675-1-AP
CD 34 Antibody	SC-74499

3.2 Yöntem

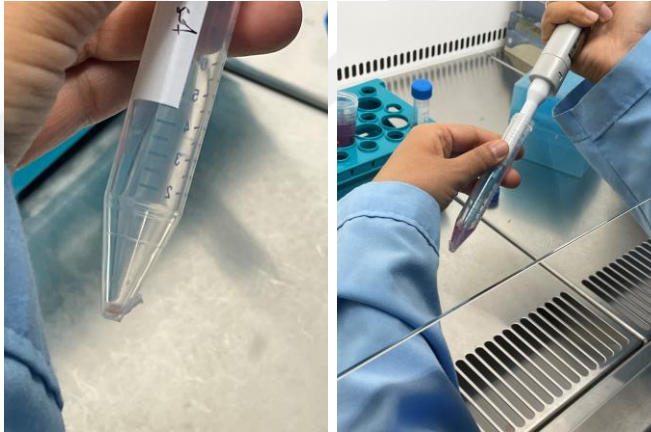
3.2.1 Hücre Kültürü ve Hücrelerin Karakterizasyonu

Çalışmada, daha önce Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda sıçan subkutan yağ dokudan elde edilmiş primer sıçan AMKH'leri kullanıldı. AMKH; %15 fetal sığır serumu, %1 Penisilin-Streptomisin ve %1 L-Glutamin içeren alfa-MEM medyumunda içerisinde kültüre edilip hücrelerin bir kısmı stok amacıyla FBS: DMSO (Fetal Bovine Serum: DiMetil SulfOksit) (9:1 oranında) içerisinde dondurulup -80°C'de saklandı. Diğer hücreler çalışma kapsamında kültür vasatları iki günde bir değiştirilerek çoğaltıldı. %70-80 konfluent olduktan sonra hücrelerin bir kısmı karakterizasyon amacıyla CD34, CD44, CD45, CD90 yüzey belirteçleri kullanılarak immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. Bunun için %4 paraformaldehit ile 30 dakika tespit edildi ve indirekt immünohistokimya protokolü uygulandı. Fiksasyon işlemi sonrasında 3 defa 15'er dakika fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkandı. Permeabilizasyon işlemi için örnekler %0,1'lik Triton-X 100 solüsyonu içinde buz üstünde 10 dakika tutuldu. PBS ile yıkanan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük H₂O₂ uygulandı. Daha sonra 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkanan kesitler, 10 dakika bloklama solüsyonu ile muamele edildi. Bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra pozitif ve negatif yüzey belirteçlerine ait antikolar (CD35, CD44, CD45, CD90) +4°C'de bir gece enkübe edildi. Ertesi gün PBS ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse, anti-rabbit biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikoru ile 30'ar dakika enkübe edildi. Yine 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkanan kesitler, oluşturulan immünohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidine (DAB) ile 5 dk boyandı. Mayer's hematoksilen ile artalan boyaması sağlandıktan sonra PBS ile 10 dakika yıkanan kesitler, kapatma medyumuna ile kapatıldı.

3.2.2 Eksozom İzolasyonu

Karakterizasyon sonrası geriye kalan sıçan AMKH kültür vasatları toplanıp ticari olarak satın alınan miRCURY™ Exosome Cell/Urine/CSF Isolation Kiti (Qiagen,76743) kullanılarak polimer bazlı presipitasyon yöntemiyle eksozom eldesi yapıldı.

Toplanan kültür vasatları 2000RPM’de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant 0,22 µm’lik filtreden geçirilerek başka bir tüpe alındı. Çalışmada toplam 6 ml kültür vasatı kullanıldı. Bu sebeple 2400 µl kit içerisinde yer alan Presipitasyon buffer B solüsyonu kültür vasatı üzerine ilave edildi ve +4°C’de 60 dakika inkübasyon sağlandı. Ardından 3200 rpm’de 30 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Süpernatant atıldıktan sonra pellete 600 µl resüpsansiyon solüsyonu eklenip 15 saniye respin yapıldıktan sonra tedavi grubu hayvanlarına verilmek üzere hazırlandı (Şekil 6).



Şekil 6: Adipozal mezenşimal kök hücre kaynaklı eksozomların eldesi ve resüpsansiyonu (Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kök Hücre Laboratuvarı)

3.2.3 Deney Modeli

3.2.3.1 Deney Hayvanları

Deneyisel testis torsiyon-detorsiyon modeli için deney hayvanları, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Deney grupları için 21 adet, 5 haftalık (prepubertal), 111 – 183 gram ağırlığında, Wistar Albino tipi erkek sıçanlar kullanıldı.

Bütün deney hayvanları, standart laboratuvar şartlarına uygun kafeslerde, 12 saatlik gece/gündüz döngüsünde, 21°C oda sıcaklığında ve %50-60 nemli ortamda tutuldu. Sıçanlara, standart yem ve şehir suyu ile ad libitum beslenme uygulandı.

3.2.3.2 Deney Grupları

Deneye başlamadan önce, gerek kontrol gerekse de tedavi gruplarına uygulanacak kültür vasatı-eksozom karışımının testis parankimine dağılımını gözlemlemek için bir ön çalışma gerçekleştirildi. Sıçan testis parankimine 4 ayrı noktadan metilen mavisi ile karıştırılan eksozom - kültür vasatı karışımı, insülin enjektörü yardımıyla intraparakimal verilerek karışımın tüm testis parankimi içinde yayılabildiği makroskopik olarak gösterildi.

Çalışmada kullanılan 21 sıçan rastgele seçilerek 7'şerli 3 gruba ayrıldı:

Grup I (Sham Grubu): Sadece skrotal insizyon uygulanan grup.

Grup II (Kontrol – Torsiyon Grubu): Testis torsiyon-detorsiyon-reperfüzyon modeli oluşturulup, detorsiyon sonrası testis parankimine hücre kültür vasatı uygulanan grup.

Grup III (Tedavi – Eksozom Grubu): Testis torsiyon-detorsiyon-reperfüzyon modeli oluşturulup, detorsiyon sonrası testis parankimine eksozom uygulanan grup.

3.2.3.3 Cerrahi İşlemler

Tüm cerrahi işlemler anestezi altında, steril koşullarda gerçekleştirildi. Anestezi amacıyla intraperitoneal (i.p.) 10mg/kg Xylasin (Alfazyne %2, Ege Vet Hayvancılık San. Ve Tic. Ltd. Şti, Türkiye) ve 75 mg/kg Ketamin (Ketasol %10, İnterhas Tıbbi ve Kimyevi Ürünler San. ve Tic. A.Ş, Türkiye) uygulandı.

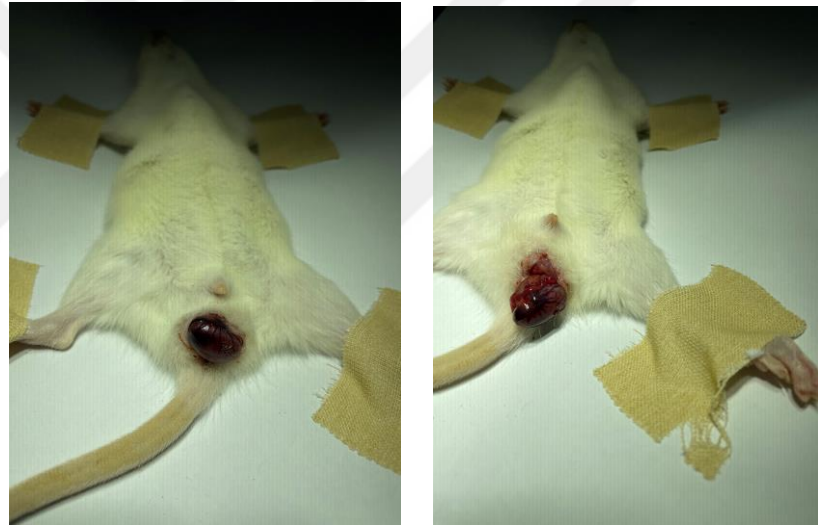
Deney hazırlık sürecinde tüm sıçanlara aynı işlemler uygulandı. İ.p. anestezi sonrası yeterli derinlik sağlandıktan sonra sıçanlar supin pozisyonda dört ekstremiteden tespit edildi. Gerekli alan temizliği yapıldıktan sonra skrotal orta hat vertikal insizyon ile testise ulaşıldı (Şekil 7). Torsiyon / detorsiyon ile oluşturulan İ/R modelinde sol testis, epididim, spermatik kord ve elemanları dışarı alındı. Saat yönünün tersine 720° döndürülerek torsiyon oluşturuldu (Şekil 8). Ardından testis parankiminden geçilmeden testis üst kutbundan skrotuma 6/0 prolene ile tespit edildi. Skrotal insizyon 5/0 rapid vicryl ile kapatılarak 4 saat torsiyone halde bekletildi. Bekleme süresi boyunca tüm sıçanlarda, i.p. ek doz anestezi ile anestezi derinliğinin devamı sağlandı, insizyon hattı spanç ile korundu ve ısıtıcıyla hipotermiden korundu. 4 saatlik torsiyon sonrası eski insizyondaki suturler açılarak testise ulaşıldı (Şekil 9). Testisi tespit eden suture alınarak testis detorsiyone edildi.



Şekil 7: Deney hayvanlarında testisin eksplorasyonu için uygulanan skrotal vertikal orta hat insizyon



Şekil 8: Deney hayvanlarında sol testisin 720 derece torsiyonu

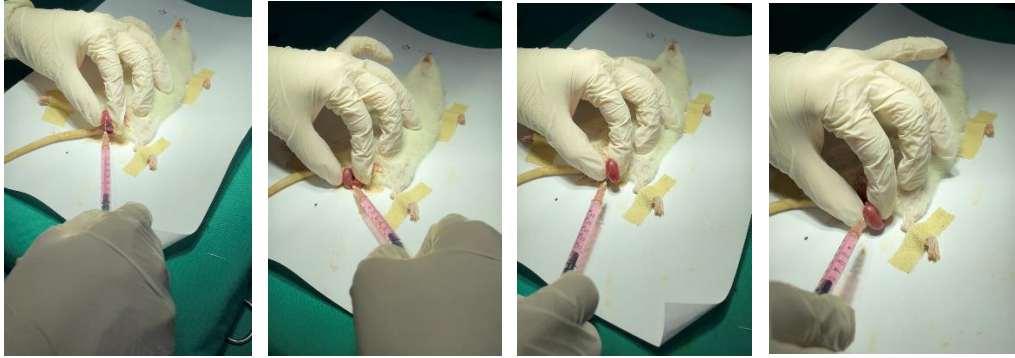


Şekil 9: 4 saat torsiyon sonrası, detorsiyondan hemen önce testislerin makroskopik görünümü

Sham grubundaki (Grup I) 7 prepubertal sıçanda insizyon sonrası testis parankimine yönelik herhangi bir işlem yapılmadan sol orşiektomi uygulandı.

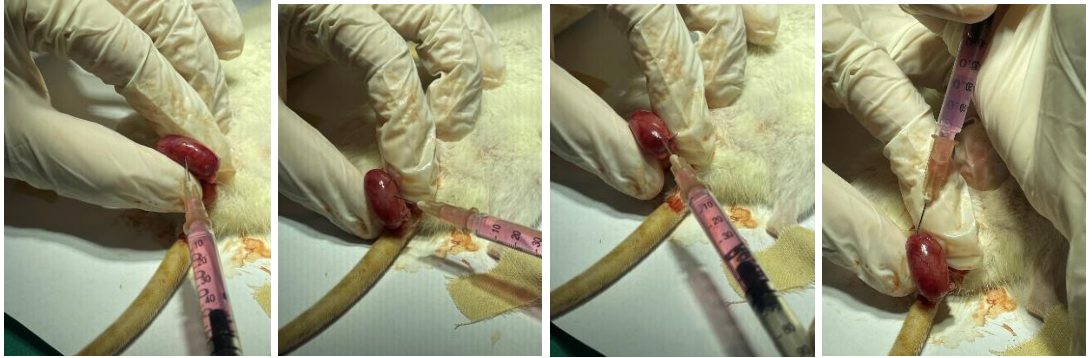
Torsiyon grubundaki (Grup II) 7 prepubertal sıçanda İ/R modeli oluşturuldu. Detorsiyondan hemen sonra 100µl hücre kültür vasatı 4 ayrı noktadan (üst-alt kutup ve sağ ve sol lateral alan) testis parankimine uygulandı (Şekil 10). Testisler anatomik

pozisyona yerleştirilip skrotum cildi 5/0 rapid vicryl ile tek tek suture edildi. 4 saat reperfüzyon sağlandıktan sonra eski insizyon açılarak sol orşiektomi uygulandı.



Şekil 10: 100µl hücre kültür vasatının 4 ayrı noktadan testis parankimine uygulaması

Eksozom grubundaki (Grup III) 7 prepubertal sıçanda İ/R modeli oluşturuldu. Detorsiyondan hemen sonra 100µl eksozom 4 ayrı noktadan (üst-alt kutup ve sağ ve sol lateral alan) testis parankimine uygulandı (Şekil 11). Testisler anatomik pozisyona yerleştirilip skrotum cildi 5/0 rapid vicryl ile tek tek suture edildi. 4 saat reperfüzyon sağlandıktan sonra eski insizyon açılarak sol orşiektomi uygulandı.



Şekil 11: 100µl eksozomun 4 ayrı noktadan testis parankimine uygulanması

Sol orşiektomi sonrası testisler bovine solüsyonuna alındı. Bütün sıçanlar anestezi altında dekapitasyon ile sakrifiye edildi.

3.2.4 Testis Dokularının Takibi

Sıçanlardan alınan testis örneklerinin Bovine solüsyonunda 48 saat fiksasyonunun ardından dokuların takibi Tablo 1’deki gibi gerçekleştirildi.

Tablo 1: Testis doku takip protokolü

%70 Alkol	1 gece
%70 Alkol	1 saat
%70 Alkol	1 saat
%70 Alkol	1 saat
%80 Alkol	30 dakika
%95 Alkol	30 dakika
%95 Alkol	30 dakika
Ksilen-Alkol	2 saat
Ksilen	1 gece
Ksilen	1 saat
Ksilen-Parafin	1 saat
Parafin	3 saat
Parafin	1 gece
Bloklama	

3.2.5 Hematoksilen Eozin (H&E) Boyaması

Rutin parafin takip işlemi sonrasında parafin bloklardan alınan 5 µm kesitler rutin H&E boyaması ile boyandı ve ışık mikroskobu ile değerlendirmeler gerçekleştirildi. H&E boyaması için Tablo 2’de yer alan protokol izlendi.

Tablo 2: Hematoksilen- Eozin boyaması

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60° C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	%70 alkol	2 dakika
	%60 alkol	2 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Boyama	Hematoksilen	3 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Diferansiyasyon	Asit alkol	2-3 saniye
Boyama	Eosin	1 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Dehidratasyon	% 80 alkol	1 dakika
Dehidratasyon	% 95 alkol	1 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	1 saat
Kapama	Entellan	

3.2.6 Johnsen Skoruması

Testislerde spermatogenezin etkilenme derecesi, Johnsen kantitatif histolojik skoruması sistemi ile değeriendirildi (100). Johnsen skor hesaplaması H&E boyama sonrası elde edilen 3 preparattan her bir kesitinde en az 15 seminifer tübülde sperm olgunlaşma hızı tübüldeki en gelişmiş germ hücrelerine göre 1 ile 10 arasında değeriendirildi. Daha sonra Johnsen skoru, toplam puanın değeriendirilen tübül sayısına bölünmesiyle belirlendi. Değeriendirmede ışık mikroskobu (Olympus X-40) kullanıldı. Johnsen skoruması kriterleri (100) Tablo 3'te özetlenmiştir.

Tablo 3: Johnsen Skorlaması

Skor	Kriter
10	Tübüllerde tam spermatogenezis ile çok sayıda spermatozoon vardır Tübül epitel düzenli bir kalınlıkta organize olmuştur ve tübül lümeni açıktır
9	Çok sayıda spermatozoon vardır; ancak tübüler epitel iyi organize olmamış ve lümende tıkanıklık vardır
8	Kesitlerde az sayıda spermatozoon (< 5-10) vardır.
7	Kesitlerde hiç spermatozoon yoktur ama çok sayıda spermatid gözlenir.
6	Kesitlerde hiç spermatozoon yoktur ve az sayıda (< 5-10) spermatid gözlenir.
5	Kesitlerde hiç spermatozoon ve spermatid yoktur ancak çok sayıda spermatosit vardır.
4	Kesitlerde hiç spermatozoon ve spermatid yoktur ve az sayıda spermatosit (<5) vardır.
3	Görülebilir tek germ hücresi spermatogoniumlardır
2	Tübüllerde hiç germ hücresi yoktur, yalnızca Sertoli hücreleri görülebilir
1	Tübüllerde hiç hücre görülmez

3.2.7 TUNEL Yöntemi

Çalışmada apoptotik hücreleri tanımlamak için DNA iplik kopmalarının saptanmasına dayanan apoptotik hücre yüzdesinin değerlendirildiği TUNEL yöntemi kullanıldı (99).

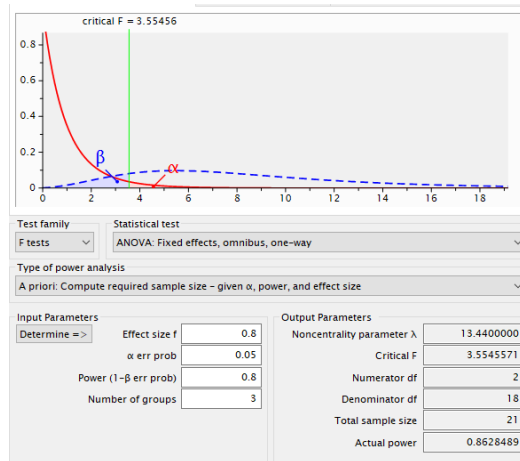
Üreticinin talimatlarını takiben bir in situ hücre ölümü saptama POD kiti (RocheDiagnostics, Mannheim, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilen terminal transferaz aracılı dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) testi ile DNA hasarı seviyesi tespit edildi. Kısaca, kesitler seri ksilen ve etanol uygulamaları ile parafinden arındırıldı ve ardından 15 dakika süreyle Proteinaz K (20 mg / l) (Sigma-Aldrich,

SaintLouis, MI, ABD) ile muamele edildi. Kesitler daha sonra TdT ve biyotinlenmiş 16-dUTP içeren reaksiyon karışımı ile 37 ° C'de 1 saat enkübe edildi. Etiketlenmiş DNA, kromojen olarak 3.30-diaminobenzidin kullanılarak peroksidaz-konjuge anti-digoksinin antikoru ile görünür hale getirildi. Her bir testisten rastgele seçilen üç mikroskopik alan kullanılarak dairesel kesitler DNA hasarı açısından değerlendirildi. Her kesitten 3 tübül değerlendirildi. Tübül başına TUNEL pozitif ve negatif hücreler sayılarak her bir testis için ortalama TUNEL pozitif hücre yüzdesi hesaplandı.

3.2.8 İstatistik

Çalışmanın planlanması sırasında power-analiz (G-power 3.1.9.4) hesaplaması yapıldı (Tablo 4). Buna göre çalışma verilerinin anlamlı olabilmesi için grupta en az 7 hayvan bulunması gerektiği sonucu elde edildi. Çalışmada elde verilerden gruplar arasındaki fark Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. $p < 0,05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

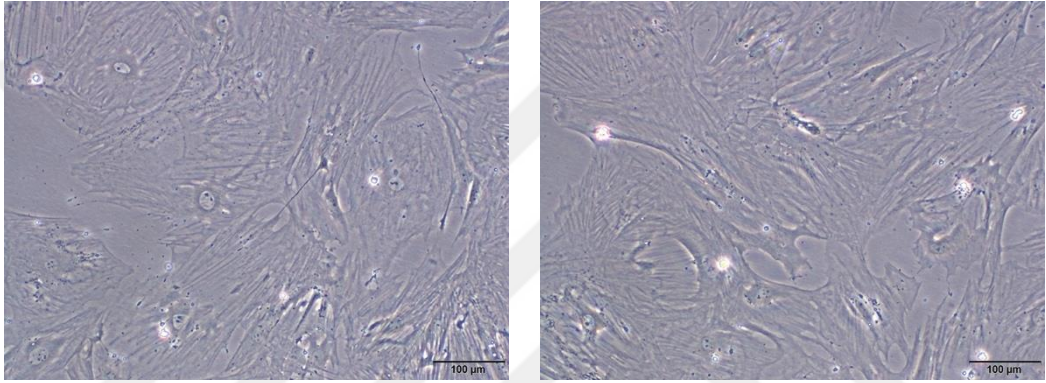
Tablo 4: Tüm deney gruplarının Power analizi



IV. BULGULAR

4.1 Sıçan AMKH kültürü

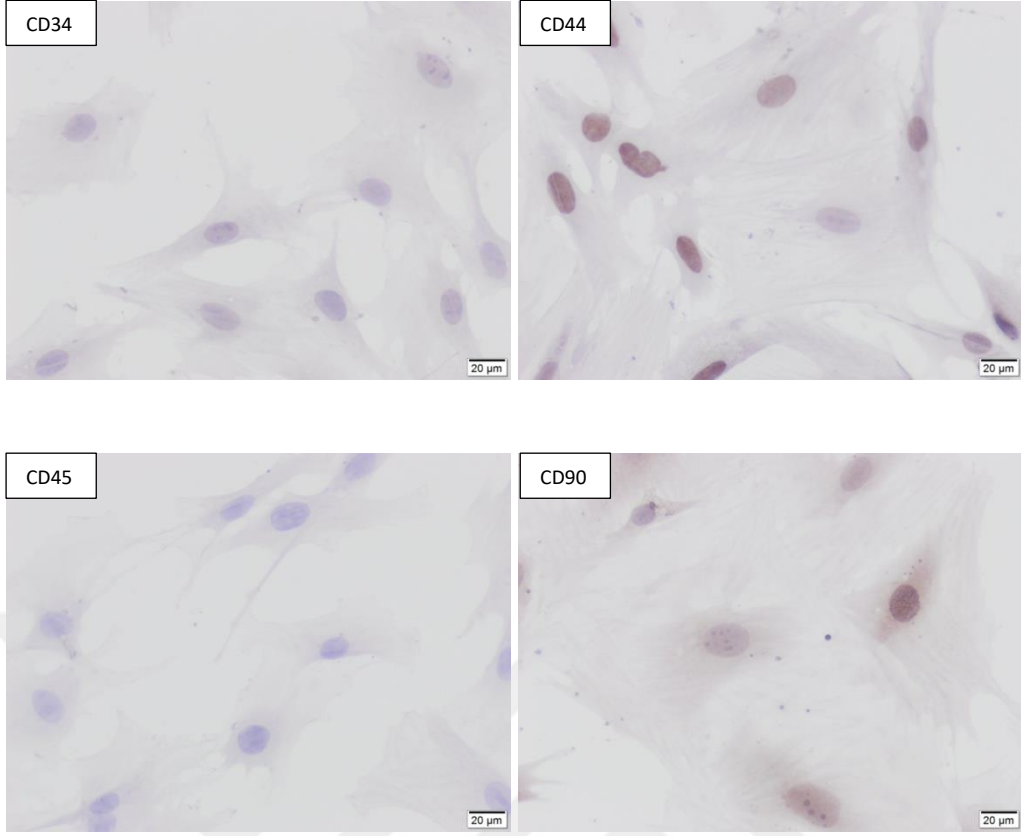
Çalışmada kullanılan Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı kök hücre laboratuvarında elde edilmiş primer sıçan AMKH'lerin kültürünün ilk gününde hücrelerin yer yer yapışmaya başladıkları gözlemlendi. Kültüre devam edildiğinde hücrelerin mezenşimal hücre özelliğinde oldukları izlendi (Şekil 12).



Şekil 12: Sıçan AMKH ait hücre kültürü görüntüleri. Ölçek: 100 µm.

4.2 Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Kök hücreler %80 konfluent olduktan sonra indirek immünohistokimya protokolü ile yapılan karakterizasyonda CD34, CD45 yüzey belirteçleri negatif; CD44, CD90 yüzey belirteçleri pozitif olarak bulundu (Şekil 13). Sonuçlar AMKH ile uyumluydu.



Şekil 13: AMKH'lerin indirek immünohistokimya boyama ile hücre karakterizasyonu

4.3 Testiste verilen sıvıların dağılımı

Ön çalışma olarak, testis parankimine eksozom-hücre kültür vasatı- metilen mavisi karışımının 4 ayrı noktadan uygulandığında testis parankiminin bütününe yayıldığı makroskopik olarak gözlemlendi (Şekil 14).

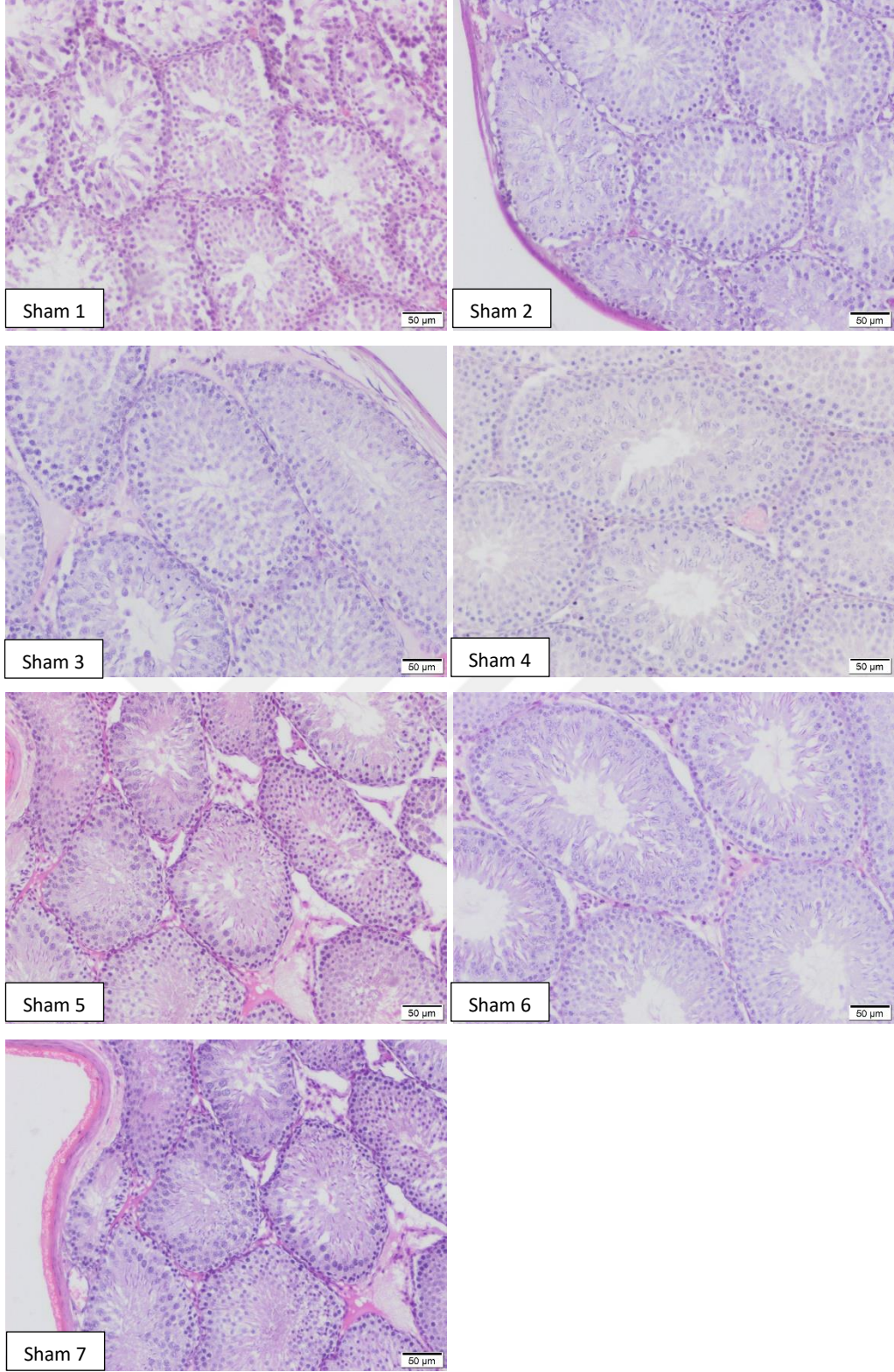


Şekil 14: Testis parankimine 4 noktadan metilen mavisi + eksozom karışımının uygulanması sonucu metilen mavisinin testis parankiminde dağılımı

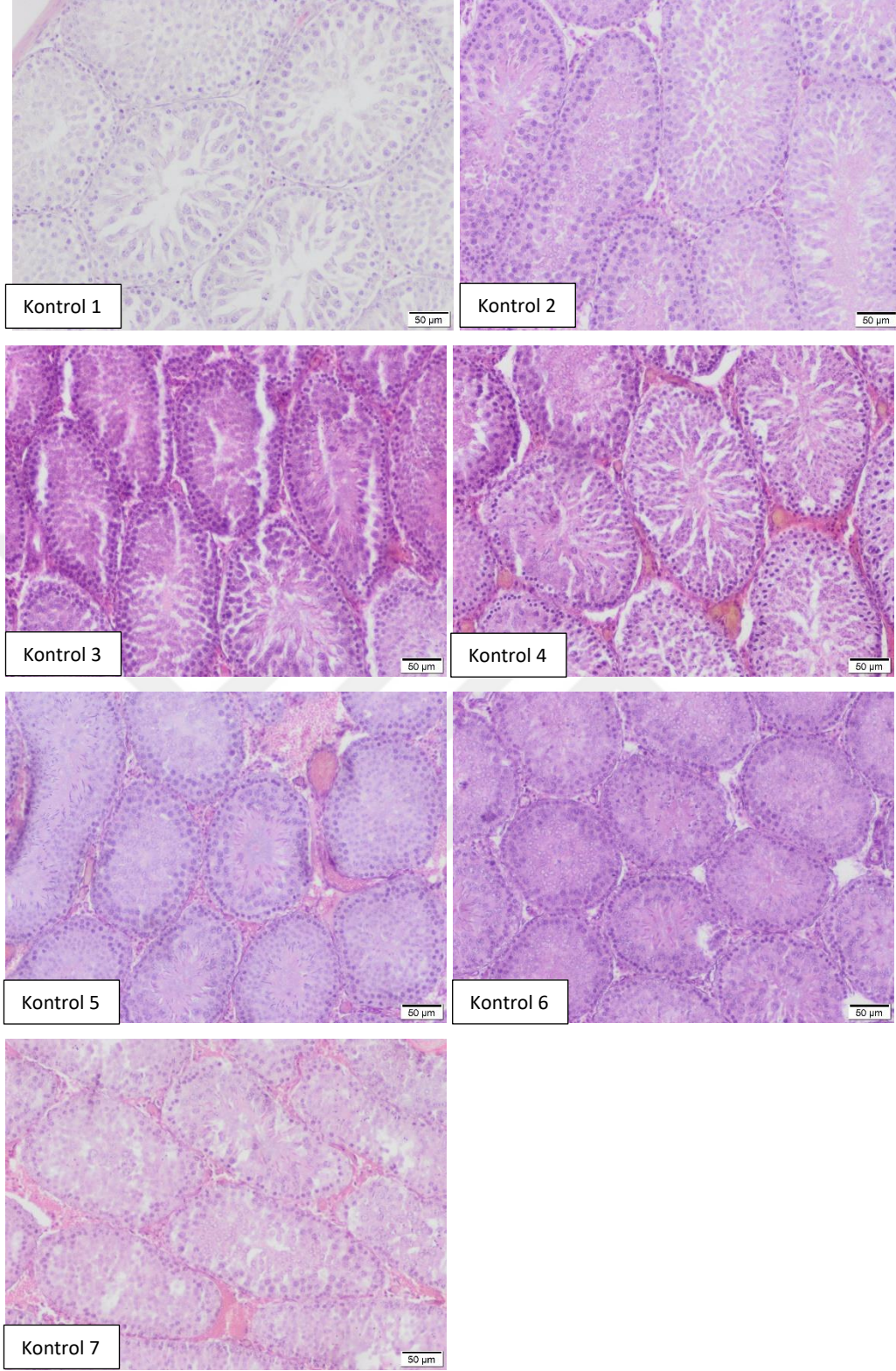
4.4 Hematoksilen Eozin Boyaması

İncelenen tüm örneklerde testis dokusuna ait bağ dokusu yapısı olan tunika albuginea izlenmiş olup normal görünümdeydi. Sham grubunda (***Şekil 15***) seminifer tübül yapılarının normal histolojik görünümde olduğu gözlemlendi. Bunun yanında, kontrol grubuna (***Şekil 16***) ait testis dokularında ise seminifer tübül yapılarında yer yer bozulma olduğu izlendi. Tedavi grubunda (***Şekil 17***) da Sham grubu ile benzer olarak seminifer tübül yapılarının normal histolojik görünümde olduğu gözlemlendi.

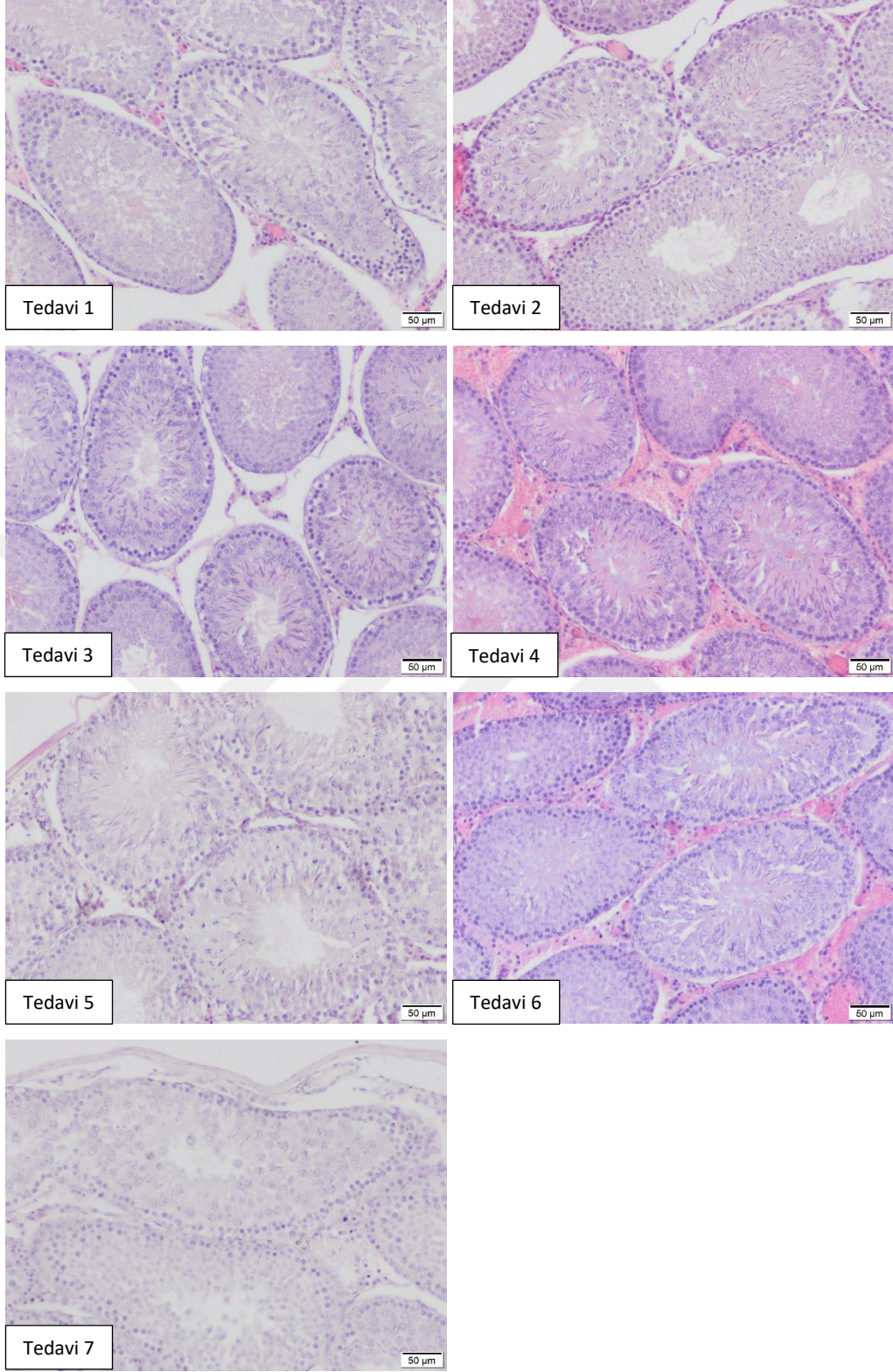




Şekil 15: Sham grubu sıçanlarına ait hematoksilen eozin boyama görüntüleri.
Ölçek: 50 um.



Şekil 16: Kontrol grubu sıçanlarına ait hematoksilen eozin boyama görüntüleri. Ölçek: 50 µm.



Şekil 17: Tedavi grubu sıçanlarına ait hematoksilen eozin boyama görüntüleri. Ölçek: 50 um.

4.4.1 Johnsen Skoruması

Johnsen skoru hesaplamaları Sham grubu Tablo 5'te, Kontrol grubu Tablo 6'da ve Tedavi grubu Tablo 7'de özetlenmiştir. Gruplara ait median değerleri, ortalama Johnsen skorları ve standart sapma değerleri Tablo 8'de görölmektedir. Spermatogenezis değeriendirilmesi sonucunda en düşük Johnsen skoru kontrol grubunda saptanmış olup sham-kontrol ve tedavi-kontrol grupları arasındaki fark anlamlıydı ($p<0.05$). Sham ve tedavi gruplarının Johnsen skoru benzer olup aralarındaki fark anlamsızdı ($p>0.05$) (Tablo 8, Şekil 18).



Tablo 5: Sham grubu Johnsen skorları. Her deneğe ait 3 kesitten 15'er tübül değerlendirildi. Toplam skorların ortalaması alınarak deneğe ait Johnsen skoru elde edildi.

GRUP	KESİT	DEĞERLENDİRİLEN SEMİNİFER TÜBÜLLER															ORTALAMA	GRUP ORTALAMASI
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
SHAM 1	1. Kesit	5	10	7	5	7	10	9	7	7	7	10	10	9	10	7	8	7,8
	2. Kesit	9	7	5	6	10	7	10	7	5	7	9	7	10	10	7	7,73	
	3. Kesit	10	8	9	10	5	7	6	5	7	7	9	7	10	7	8	7,67	
SHAM 2	1. Kesit	10	7	6	7	10	10	9	9	7	9	10	10	10	9	8	8,73	8,68
	2. Kesit	10	6	7	10	7	10	10	9	10	9	8	9	7	8	9	8,6	
	3. Kesit	8	10	10	10	9	5	9	7	7	9	10	9	8	10	9	8,67	
SHAM 3	1. Kesit	8	9	10	9	10	10	9	10	7	8	9	8	10	5	9	8,73	8,60
	2. Kesit	10	9	10	7	10	8	5	7	10	7	9	10	9	10	8	8,6	
	3. Kesit	7	7	10	5	9	9	7	9	10	9	10	10	7	8	10	8,47	
SHAM 4	1. Kesit	10	10	9	10	9	9	5	7	9	8	9	8	10	9	8	8,67	8,90
	2. Kesit	9	9	10	9	10	9	9	10	7	9	9	10	8	9	10	9,13	
	3. Kesit	7	10	10	8	9	10	8	9	10	9	8	9	7	10	10	8,93	
SHAM 5	1. Kesit	9	10	10	9	9	9	10	7	8	10	9	8	10	10	6	8,93	8,90
	2. Kesit	10	9	7	9	5	9	9	10	10	9	9	10	9	8	10	8,87	
	3. Kesit	10	10	10	9	9	10	7	9	10	9	7	9	8	7	10	8,93	
SHAM 6	1. Kesit	7	6	10	9	9	10	10	9	10	9	9	8	7	8	10	8,73	8,70
	2. Kesit	7	8	6	10	10	9	10	10	10	7	9	10	9	10	7	8,8	
	3. Kesit	9	9	7	10	7	9	9	9	8	9	10	6	9	8	10	8,6	
SHAM 7	1. Kesit	10	7	7	10	9	10	8	8	10	9	10	10	10	9	10	9,13	8,90
	2. Kesit	10	10	7	10	9	7	8	8	8	7	10	9	10	10	9	8,80	
	3. Kesit	8	10	10	9	10	8	8	9	7	7	10	8	9	9	10	8,80	

Tablo 6: Kontrol grubu Johnsen skorları. Her deneğe ait 3 kesitten 15'er tübül değerlendirildi. Toplam skorların ortalaması alınarak deneğe ait Johnsen skoru elde edildi.

GRUP	KESİT	DEĞERLENDİRİLEN SEMİNİFER TÜBÜLLER															ORTALAMA	GRUP ORTALAMASI
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
KONTROL 1	1. Kesit	6	8	9	7	7	5	6	5	7	5	5	7	7	7	8	6,6	6,71
	2. Kesit	7	5	8	8	6	7	5	5	7	7	6	5	7	6	7	6,4	
	3. Kesit	7	7	7	9	9	5	7	8	6	6	5	7	9	7	8	7,13	
KONTROL 2	1. Kesit	8	9	10	7	7	5	5	6	7	7	8	7	5	5	7	6,87	7,04
	2. Kesit	10	7	7	7	8	7	5	5	7	7	6	8	6	7	9	7,07	
	3. Kesit	5	7	7	7	8	9	7	8	7	5	7	9	7	7	8	7,2	
KONTROL 3	1. Kesit	9	7	7	6	9	8	7	9	5	6	10	8	7	5	9	7,47	7,49
	2. Kesit	9	5	8	9	7	9	8	5	7	7	9	6	5	9	8	7,4	
	3. Kesit	7	7	7	7	10	8	9	7	7	7	6	8	7	8	9	7,6	
KONTROL 4	1. Kesit	9	7	7	5	8	7	8	6	7	6	9	7	8	7	7	7,2	7,22
	2. Kesit	10	9	7	7	8	7	5	5	6	9	7	6	7	8	6	7,13	
	3. Kesit	9	5	9	7	6	8	5	5	9	9	8	9	7	7	7	7,33	
KONTROL 5	1. Kesit	10	9	7	5	9	7	5	8	9	7	7	6	5	8	8	7,33	7,49
	2. Kesit	9	8	8	6	9	8	7	9	5	6	9	7	5	8	10	7,6	
	3. Kesit	9	10	7	7	5	8	7	10	7	8	6	5	8	7	9	7,53	
KONTROL 6	1. Kesit	8	5	5	7	10	9	7	8	5	7	9	6	7	8	7	7,2	7,36
	2. Kesit	5	5	7	10	9	5	7	8	9	7	9	7	8	8	5	7,27	
	3. Kesit	10	9	7	7	9	9	7	7	8	9	6	5	7	8	6	7,6	
KONTROL 7	1. Kesit	8	6	5	7	10	8	8	9	9	7	7	5	9	9	6	7,53	7,42
	2. Kesit	10	5	7	8	7	7	6	8	9	7	9	7	8	9	5	7,47	
	3. Kesit	9	10	10	5	6	5	7	8	7	8	8	7	5	8	6	7,27	

Tablo 7: Tedavi grubu Johnsen skorları. Her deneğe ait 3 kesitten 15'er tübül değerlendirildi. Toplam skorların ortalaması alınarak deneğe ait Johnsen skoru elde edildi.

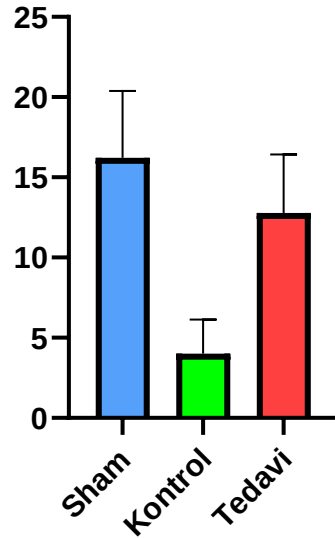
GRUP	KESİT	DEĞERLENDİRİLEN SEMİNİFER TÜBÜLLER															ORTALAMA	GRUP ORTALAMASI
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
TEDAVİ 1	1. Kesit	9	10	7	10	8	7	9	9	9	8	10	6	9	6	8	8,33	8,47
	2. Kesit	10	9	7	9	10	9	8	6	10	9	7	8	7	10	8	8,47	
	3. Kesit	10	8	10	7	10	8	7	10	8	9	8	9	10	7	8	8,60	
TEDAVİ 2	1. Kesit	9	10	10	9	8	9	7	8	8	8	7	9	10	7	8	8,47	8,51
	2. Kesit	8	8	6	9	8	7	9	10	10	8	7	10	8	9	8	8,33	
	3. Kesit	10	7	9	8	8	10	9	10	10	10	9	8	8	7	8	8,73	
TEDAVİ 3	1. Kesit	10	10	10	7	10	6	7	10	6	7	9	9	8	10	7	8,40	8,60
	2. Kesit	10	8	9	8	7	10	9	9	7	8	9	9	7	8	10	8,53	
	3. Kesit	10	10	8	9	7	9	9	7	8	10	10	7	10	9	10	8,87	
TEDAVİ 4	1. Kesit	8	8	7	9	10	7	8	10	8	9	10	7	10	6	9	8,40	8,58
	2. Kesit	10	9	7	9	10	10	9	8	6	9	8	7	9	10	8	8,60	
	3. Kesit	9	9	8	9	7	10	9	7	9	9	8	9	9	10	9	8,73	
TEDAVİ 5	1. Kesit	10	9	9	8	10	7	9	8	9	10	9	8	7	10	9	8,80	8,76
	2. Kesit	9	8	10	10	9	9	7	9	9	10	9	7	10	8	10	8,93	
	3. Kesit	9	10	9	6	10	8	7	10	9	8	9	8	8	7	10	8,53	
TEDAVİ 6	1. Kesit	10	7	9	10	10	8	7	10	9	9	10	9	6	7	8	8,60	8,71
	2. Kesit	8	10	10	9	6	10	10	9	8	7	8	9	9	10	9	8,80	
	3. Kesit	10	5	9	8	9	7	10	10	9	8	9	8	10	10	9	8,73	
TEDAVİ 7	1. Kesit	10	5	7	10	9	8	7	6	8	7	7	9	6	5	10	7,60	7,73
	2. Kesit	9	7	5	9	9	7	8	7	6	7	8	7	6	10	9	7,60	
	3. Kesit	7	9	6	7	8	10	6	8	7	10	9	7	9	9	8	8,00	

Tablo 8: Johnsen skoru tanımlayıcı istatistik verileri

Gruplar	Median	Ortalama	Standart Sapma
*Sham	8,7	8,64	0,39
**Kontrol	7,36	7,24	0,28
***Tedavi	8,58	8,48	0,34

(*Sham-**Kontrol grubu $p=0,0007$, *Sham-***Tedavi grubu $p=0,9009$, **Kontrol-***Tedavi grubu $p=0,0239$)

Ranks plot: Kruskal-Wallis test of Col: One-way ANOVA



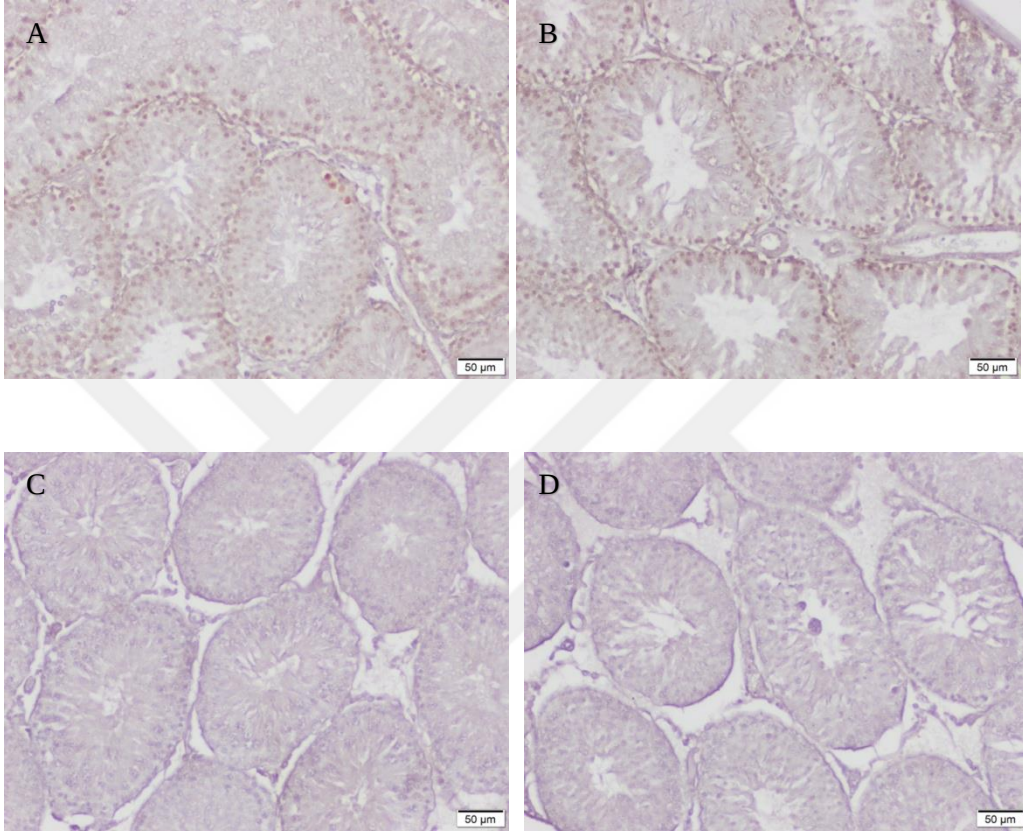
(Sham-Kontrol grubu: $p<0.05$; Kontrol-Tedavi grubu: $p<0.05$; Sham-Tedavi grubu $p>0.05$)

Şekil 18: Grupların Johnsen skorlarının ortalamaları görülmektedir $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edildi

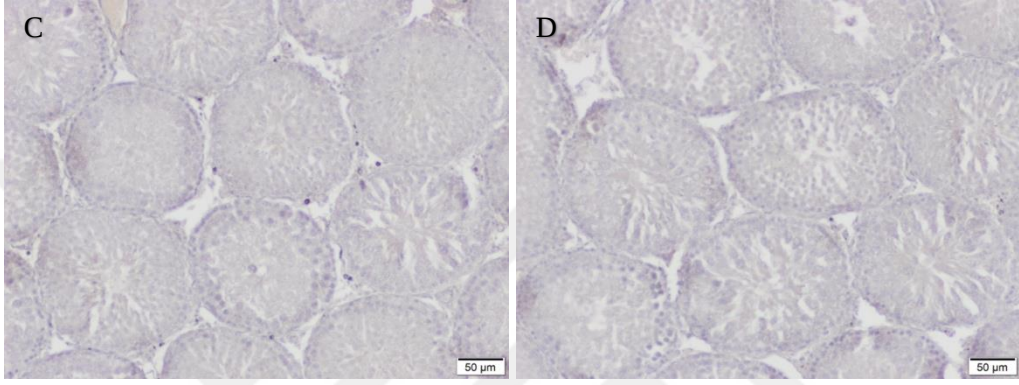
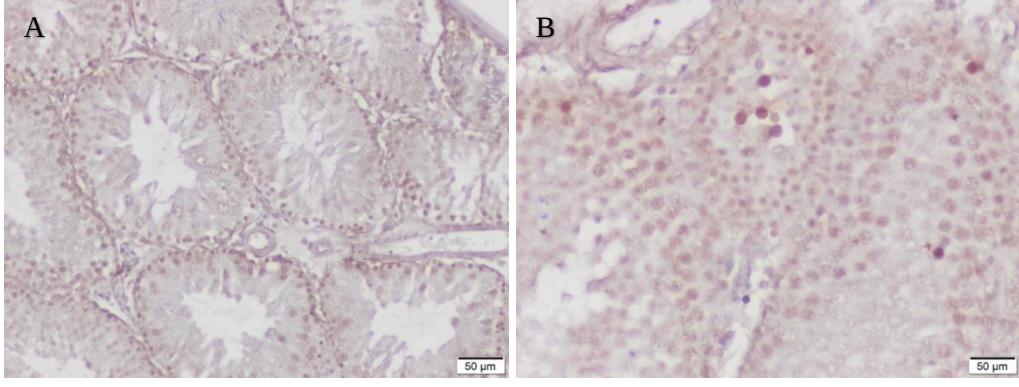
4.5 TUNEL Yöntemi

Çalışmada apoptotik hücre yüzdesinin değerlendirildiği TUNEL sonuçlarına göre en az apoptotik hücre Sham (Şekil 19) grubunda gözlemlendi. Kontrol grubunda (Şekil 20) TUNEL pozitif hücre sayısı Sham ve Tedavi (Şekil 21) gruplarına göre oldukça yüksek izlendi. Spermatogonyum, iskemi/reperfüzyon hasarından sonra

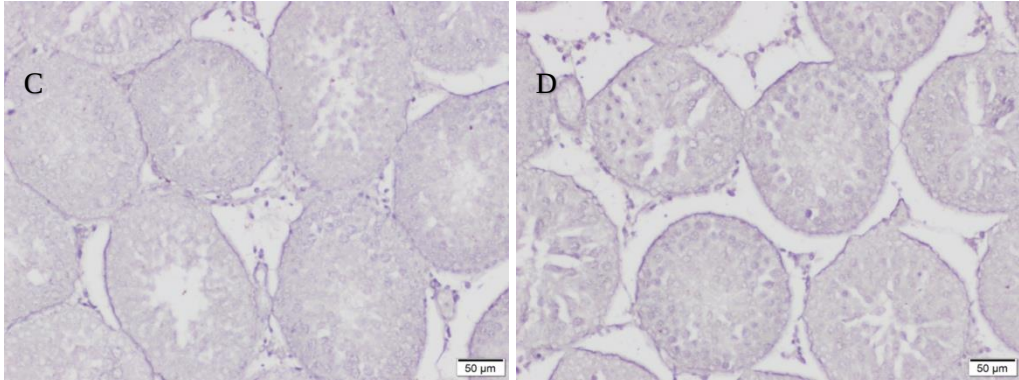
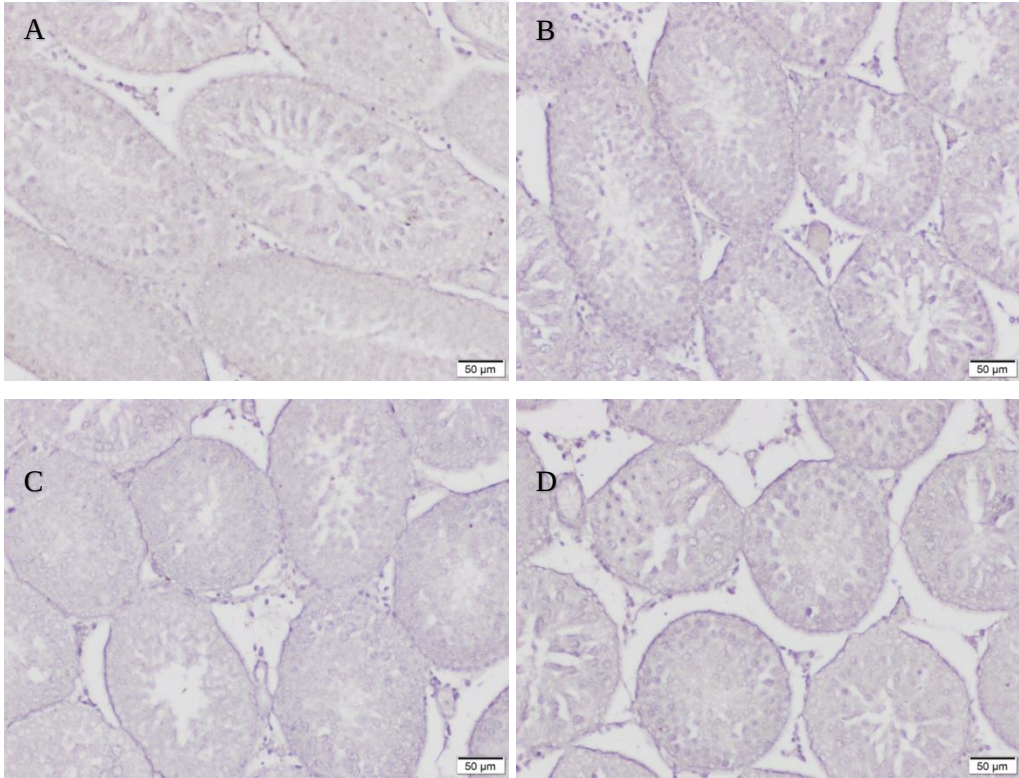
apoptoz geçiren primer hücre tipidir. Leydig veya Sertoli hücrelerinde apoptoz gözlenmemiştir. Apoptozis, en periferde yoğun izlenirken merkezdeki hücreler TUNEL negatifti. Tedavi grubunda ise dış sırada yer yer apoptozis mevcut olup bariz DNA fragmentasyonu ve tam sıra tutulum izlenmedi. Sham ve Tedavi grubundaki apoptozis yüzdeleri benzer izlendi.



Şekil 19: Sham grubu sıçanlarına ait TUNEL boyama görüntüleri (A, B). TUNEL kontrol boyaması (C, D). Ölçek: 50 µm.



Şekil 20: Kontrol grubu sıçanlarına ait TUNEL boyama görüntüleri (A, B). TUNEL kontrol boyaması (C, D). Ölçek: 50 µm.



Şekil 21: Tedavi grubu sıçanlarına ait TUNEL boyama görüntüleri (A, B). TUNEL kontrol boyaması (C, D). Ölçek: 50 µm.

Apoptotik hücre hesaplamaları Sham grubu Tablo 9’da, Kontrol grubu Tablo 10’da ve Tedavi grubu Tablo 11’de verilmiştir. Apoptotik hücre yüzdelerinin ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 12’te görülmektedir. Kontrol grubu ile diğer gruplar arasında fark istatistiksel olarak anlamlıyken ($p<0.05$) Sham ve Tedavi grubu arasındaki fark anlamsızdı ($p>0.05$) (Tablo 12, Şekil 22).



Tablo 9: Sham grubu TUNEL değerleri. Her deneğe ait 3 kesitte 3'er seminifer tübüle ait pozitif ve negatif apoptotik hücreler sayıldı. Ardından pozitif apoptotik hücre yüzdesi hesaplandı. Elde edilen verilerin ortalaması alınarak her deneğe ait apoptotik hücre yüzdesi elde edildi.

GRUP	TUNEL	KESİTLER									ORTALAMA POZİTİFLİK (%)
		1			2			3			
		a	b	c	a	b	c	a	b	c	
SHAM 1	POZİTİF	20	3	4	16	8	10	17	0	0	13
	NEGATİF	63	56	54	52	33	43	56	100	100	
	YÜZDE (%)	24	5	7	24	20	19	23	0	0	
SHAM 2	POZİTİF	1	5	1	2	34	24	40	40	53	19
	NEGATİF	99	93	99	98	94	98	61	63	82	
	YÜZDE (%)	1	5	1	2	27	20	40	39	39	
SHAM 3	POZİTİF	7	9	1	3	1	2	5	1	10	5
	NEGATİF	66	94	99	91	99	98	83	99	90	
	YÜZDE (%)	10	9	1	3	1	2	6	1	10	
SHAM 4	POZİTİF	8	10	0	16	16	28	17	7	5	15
	NEGATİF	97	92	91	88	87	91	92	70	68	
	YÜZDE (%)	3	8	9	12	13	7	8	30	41	
SHAM 5	POZİTİF	4	37	10	14	24	40	2	0	7	11
	NEGATİF	96	73	90	129	180	160	98	100	93	
	YÜZDE (%)	4	34	10	10	12	20	2	0	7	
SHAM 6	POZİTİF	3	2	5	4	5	2	4	2	6	4
	NEGATİF	97	98	95	96	95	98	96	98	94	
	YÜZDE (%)	3	2	5	4	5	2	4	2	6	
SHAM 7	POZİTİF	18	15	48	4	12	0	12	6	34	14
	NEGATİF	90	98	86	96	83	100	88	94	80	
	YÜZDE (%)	17	13	36	4	13	0	12	6	30	

Tablo 10: Kontrol Grubu TUNEL değerleri. Her deneğe ait 3 kesitte 3'er seminfer túbüle ait pozitif ve negatif apoptotik hücreler sayıldı. Ardından pozitif apoptotik hücre yüzdesi hesaplandı. Elde edilen verilerin ortalaması alınarak her deneğe ait apoptotik hücre yüzdesi elde edildi.

GRUP	TUNEL	KESİTLER									ORTALAMA POZİTİFLİK (%)
		1			2			3			
		a	b	c	a	b	c	a	b	c	
KONTROL 1	POZİTİF	54	32	78	68	80	57	50	35	66	54
	NEGATİF	44	68	23	49	33	59	50	63	48	
	YÜZDE (%)	55	32	77	58	71	49	50	36	58	
KONTROL 2	POZİTİF	133	60	73	85	97	88	68	77	83	71
	NEGATİF	62	40	20	47	30	26	29	49	17	
	YÜZDE (%)	68	60	78	64	76	77	70	61	83	
KONTROL 3	POZİTİF	48	29	56	36	24	12	15	10	28	29
	NEGATİF	52	56	60	80	80	78	45	72	68	
	YÜZDE (%)	48	34	18	31	23	13	25	12	29	
KONTROL 4	POZİTİF	60	42	70	62	76	54	52	54	47	60
	NEGATİF	30	44	40	50	50	40	34	44	22	
	YÜZDE (%)	67	49	64	55	60	57	60	55	68	
KONTROL 5	POZİTİF	90	80	78	90	85	82	90	30	70	79
	NEGATİF	10	20	22	10	15	18	10	40	30	
	YÜZDE (%)	90	80	78	90	85	82	90	43	70	
KONTROL 6	POZİTİF	65	85	70	78	84	90	62	93	83	74
	NEGATİF	50	15	30	17	16	10	40	13	80	
	YÜZDE (%)	57	85	70	82	84	90	61	88	51	
KONTROL 7	POZİTİF	67	91	74	70	72	60	59	70	46	59
	NEGATİF	60	50	76	70	65	44	20	18	42	
	YÜZDE (%)	53	65	49	50	53	58	75	80	52	

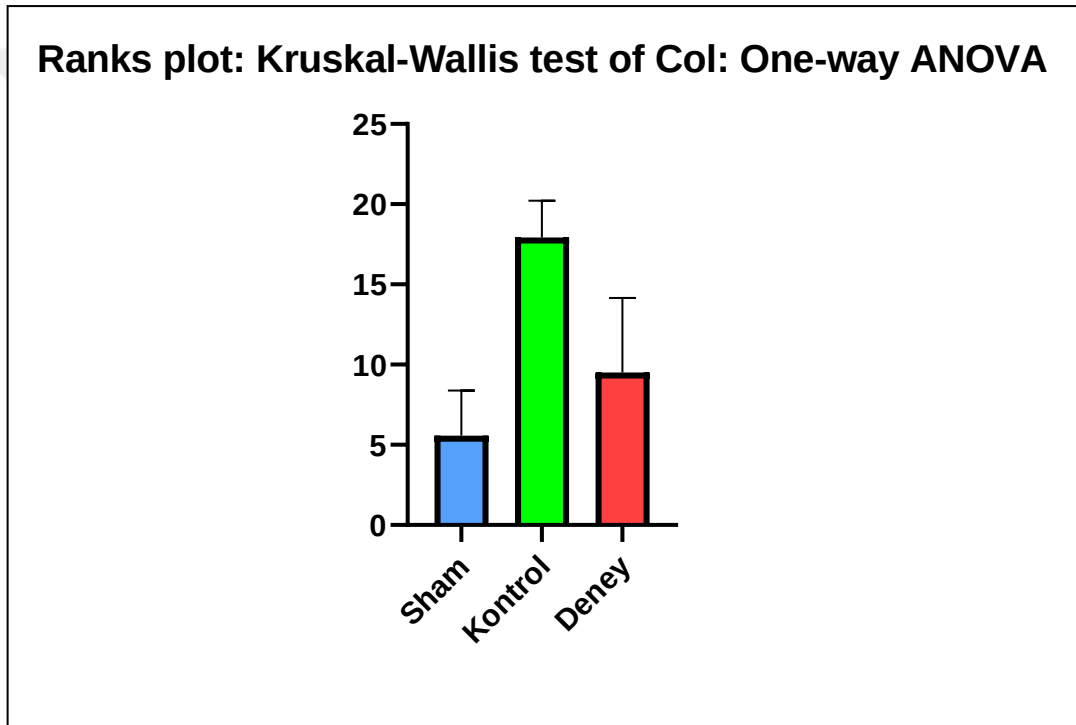
Tablo 11: Tedavi grubu TUNEL değerleri. Her deneğe ait 3 kesitte 3'er seminfer tübüle ait pozitif ve negatif apoptotik hücreler sayıldı. Ardından pozitif apoptotik hücre yüzdesi hesaplandı. Elde edilen verilerin ortalaması alınarak her deneğe ait apoptotik hücre yüzdesi elde edildi.

GRUP	TUNEL	KESİTLER									ORTALAMA POZİTİFLİK (%)
		1			2			3			
		a	b	c	a	b	c	a	b	c	
TEDAVİ 1	POZİTİF	15	14	13	18	32	22	35	20	29	20
	NEGATİF	85	86	87	82	84	78	100	91	71	
	YÜZDE (%)	15	14	13	18	28	22	26	18	29	
TEDAVİ 2	POZİTİF	55	25	60	25	25	50	10	15	40	29
	NEGATİF	54	52	80	75	125	150	90	85	60	
	YÜZDE (%)	50	32	43	25	17	25	10	15	40	
TEDAVİ 3	POZİTİF	5	3	1	4	5	4	1	0	0	3
	NEGATİF	95	97	99	96	95	96	99	100	100	
	YÜZDE (%)	5	3	1	4	5	4	1	0	0	
TEDAVİ 4	POZİTİF	3	8	9	12	13	7	8	30	48	15
	NEGATİF	97	92	91	88	87	91	92	70	68	
	YÜZDE (%)	3	8	9	12	13	7	8	30	41	
TEDAVİ 5	POZİTİF	57	60	5	40	31	10	20	2	4	21
	NEGATİF	9	8	10	10	9	9	7	9	9	
	YÜZDE (%)	9	10	9	6	10	8	7	10	9	
TEDAVİ 6	POZİTİF	18	24	33	18	26	45	20	58	54	23
	NEGATİF	87	76	125	82	90	129	80	111	140	
	YÜZDE (%)	17	24	21	18	22	26	20	34	28	
TEDAVİ 7	POZİTİF	10	18	5	0	30	1	5	10	5	13
	NEGATİF	25	40	36	100	75	99	95	90	95	
	YÜZDE (%)	29	31	12	0	29	1	5	10	5	

Tablo 12: TUNEL tanımlayıcı istatistik verileri

Gruplar	Median	Ortalama	Standart Sapma
*Sham	13	11,29	5,25
**Kontrol	60	60,86	16,69
***Tedavi	20	17,71	8,34

(*Sham-**Kontrol grubu $p=0,0006$, *Sham-***Tedavi grubu $p=0,7063$, **Kontrol-***Tedavi grubu $p=0,0327$)



(Sham-Kontrol grubu: $p<0,05$; Kontrol-Tedavi grubu: $p<0,05$; Sham-Tedavi grubu $p>0,05$)

Şekil 22: Grupların TUNEL değerlerinin Kruskal - Wallis testi ile istatistiksel olarak karşılaştırılması. $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

V. TARTIŞMA

Testis torsiyonu, organ kaybı ile sonuçlanabilen acil ürolojik bir problemdir ve temel patoloji İ/R hasarıdır. Organ kaybı, genel olarak torsiyonun derecesi ve süresi ile ilişkilidir (1,2). Neredeyse hipoksik olan spermatogenik hücrelerin fizyolojik özellikleri, onları kan akışındaki değişikliklere duyarlı hale getirir (101). Bazı olgularda, testis detorsiyon sonrası intraoperatif olarak viabl olarak değerlendirilse de geç dönemde atrofiye gidebilmekte ya da atrofi gelişmese bile spermatogenik fonksiyonları bozulabilmektedir (4,102). Özellikle reperfüzyon sırasında ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri ve nitrik oksit, testis dokusu üzerinde toksik etki göstermekte ve apoptozis tetiklenmektedir (2,3,88).

Çalışmamızın amacı, sıçan adipozal mezenşimal kök hücrelerden elde edilen eksozomların deneysel testis torsiyon-detorsiyon sonrası gelişen iskemi-reperfüzyon hasarını önlemede bir etkisi olup olmadığını araştırmaktır. Testisin İ/R hasarında, AMKH kaynaklı eksozomların etkisi, testisteki spermatogenik ve apoptotik aktivite sonuçlarına bakılarak değerlendirilmiştir.

Mezenşimal kök hücrelerin pluripotent özellikleri, kolay izolasyon ve kültürünün yapılabilmesi ile yüksek rejenerasyon potansiyeline sahip olması pek çok deneysel çalışmada tercih sebebi olmaktadır. Ayrıca mezenşimal kök hücreler hem hücre hem de gen terapi stratejileri açısından çeşitli klinik uygulamalarda terapötik araç olarak kullanılabilmektedir (114,115). Çalışmalar mezenşimal kök hücre transplantasyonunun deneysel olarak böbrek, kalp, bağırsak ve akciğer dokularının İ/R modellerinde antienflamatuvar etki gösterdiğini bu etkiyi de dokudaki reaktif oksijen türlerini ve apoptozisi baskılayarak gerçekleştirdiğini göstermektedir (12,106). Ayrıca testisin İ/R hasarı sonucu oluşan germ hücre hasarına karşı spermatogenezisi koruyan testosteron salgılanmasını da uyarmaktadır (105,106). Özellikle mezenşimal kök hücre tarafından salgılanan kök hücre faktörü, Leydig hücrelerini çevreleyerek spermatogenezisi desteklerken bazıları da potansiyel olarak Leydig hücrelerine farklılaşır. Testosteronun uyarılması bu farklılaşan leydig hücreleri ile ilişkili olabilir (105,106). AMKH'ler, perivasküler yağ dokusunda bulunan mezenşimal stromal hücrelerdir. Diğer kök hücrelere göre güçlü bir immün modülatör olarak bilinen ve en uygun terapötik etkiye sahip mezenşimal kök hücre türüdür (5,6). AMKH tedavisi,

testise uygulandığında vasküler yapıların duvarları ile interstisyel ve seminifer tübül hücrelerine entegre olarak büyüme faktörleri salgılayabilir, oksidatif stresi azaltabilir, hormon seviyelerini düzenleyebilir, Ayrıca Leydig hücre rejenerasyonu ile hem spermatogenezi hem de sperm motilitesi başta olmak üzere sperm kalitesinin iyileşmesine yardımcı olduğu da raporlanmıştır (105,116). Siregar ve ark.ları, sıçan testislerinde oluşturdukları iskemi-reperfüzyon modelinde insandan elde edilen adipoz kaynaklı mezenşimal kök hücreleri, testis parankimine transplante etmişler ve uygulamanın testiste oksidatif stresi azalttığını doku MDA (MalonDiAldehit) düzeylerindeki azalmayı göstererek kanıtlamışlardır. Yazarlar 4 hafta sonra spermatogenik hücrelerde de anlamlı bir artış gözlendiğini ve adipozal kaynaklı mezenşimal kök hücre transplantının testisi İ/R hasarına karşı koruduğunu göstermişlerdir (6). Zhou ve ark.ları da AMKH'lerden zengin, kültüre edilmemiş adipoz kaynaklı stromal vasküler fraksiyonların transplante edilmesinin de, testis torsiyonundan sonra I/R hasarına bağlı apoptozisi önlediği, oksidatif stres seviyelerini azaltırken spermatogenezi teşvik edebileceğini raporlamışlardır (117). Hsiao ve ark.ları testiküler torsiyon-detorsiyon hasarlanmasının tedavisinde AMKH'lerin etkili olduğunu ve bu etkininde antienflamatuvar, antioksidan ve antiapoptotik etki ile ilişkili olduğunu göstermiştir (105,106). Bir başka çalışmada da testis torsiyon modelinde, oftalmik kaynaklı AMKH'lerin lokal oksidatif stresi azaltarak ve apoptozisi baskılayarak İ/R hasarını önlediği, mezenşimal kök hücrelerin antienflamatuvar özelliğinin baskın mekanizma olmadığı ileri sürülmüştür.(106). Eksozomların pek çok hücre, doku ve vücut sıvılarından elde edilebilmesine karşın mezenşimal kök hücreler ile ilgili çalışmaların sonuçları göz önüne alındığında, eksozom eldesi için, mezenşimal kök hücrelerin kullanılması uygun bir seçenek gibi görünmektedir. Biz de çalışmamızda gerek mezenşimal kök hücrelerin özelliklerini gerekse de elde edilmesinin kolaylığı dikkate alınarak testisin İ/R hasarı sonucu oluşan oksidatif stresin ve tetiklenen apoptozisin baskılanmasında adipozal mezenşimal kök hücrelerden elde edilen eksozomların, daha uygun bir seçenek olduğunu düşündük.

Öncelikle çalışmamızda sıçan adipozal dokudan elde ettiğimiz dokunun kültüründen sonra dokunun AMKH karakterizasyonunu taşıyıp taşımadığını immunohistokimyasal olarak değerlendirdik. Bu konuda literatürde çok çeşitli yüzey belirteçleri kullanılsa da biz çalışmamızda CD34, CD44, CD45 ve CD 90 belirteçlerini kullandık. Hücre kültür örneğinde immunohistokimyasal olarak CD34 ve CD45'in

negatif; CD44 ve CD90 pozitif boyanması literatür ile de uyumlu olarak hücrelerimizin adipozal mezenşimal kök hücre karakterizasyonunu taşıdığını gösterdi (118,119).

Eksozomlar bilinen tüm hücreler tarafından ortama salınan; plazma, idrar, beyin omurilik, epididim, amniyotik ve plevral sıvılarda ve anne sütünde büyük ölçüde bulunan biyoaktif nano keseciklerdir (9,10). Bu nano kesecikler vücuttaki tüm bariyerleri geçebilirler (13,14). Çalışmalar, eksozomların anti-enflamatuar, immünmodülatör, anti-koagülan, pro-anjiyogenik ve pro-tümorigenik gibi birçok aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (10). Eksozom tedavisi hücresiz bir prosedür olarak; yüksek stabilitesi, depolanabilmesi, daha düşük immün ret cevabı oluşturması, toksik olmaması, anöploidi özelliğinin olmaması ve hasarlı bölgelere ulaşmasının kolay olması nedeniyle hücre temelli tedavilere göre daha üstün olduğu düşünülür (44,45). Elde edildikleri kaynaklara ve veriliş yoluna bağlı olarak, etkileri de farklı olabilmektedir. Örneğin mezenşimal kök hücre kaynaklı eksozomların, hedef hücrelere proteinleri, lipidleri, mRNA ve miRNA'ları taşıyarak hücre aktivitesini ve parakrin etkiyi düzenlediği bilinmektedir (120,121). Mezenşimal kök hücre kaynaklı eksozomların graft-versus-host hastalığı olan hastalarda klinik olarak uygulandığı iyi tolere edildiği, semptomlarda iyileşme sağladığı ve ihtiyaç duyulan steroid dozunun azaltılmasına yardımcı olduğu bildirilmiştir (122). Eksozomların kanıtlanmış tüm bu etkileri, testisin İ/R hasarını azaltmada ve spermatogenik fonksiyonların korunmasında kullanılma düşüncesini kuvvetle desteklemektedir.

Eksozomlar testisin İ/R hasarında, subkutan, intravenöz veya intraparakimal, detorsiyon öncesi veya sonrasında uygulanabilir. Literatürde eksozomların iskemik ortamda bile içerikleri sayesinde uygun trofik çevreyi yaratabildiklerinden dolayı detorsiyon öncesinde de etkili olabileceği belirtilmiş ise de (44) biz testis İ/R modelinde eksozomların detorsiyondan hemen sonra intraparakimal enjeksiyonun daha uygulanabilir olduğunu düşünüyoruz. Liu ve ark.ları (4) çalışmasında skrotal eksplorasyona kadar geçen sürede, vakit kaybetmemek amacıyla, eksozomu detorsiyondan 30 dakika önce intratestiküler olarak uygulamışlardır. Ancak özellikle çocuk hastalar için düşünüldüğünde bu uygulama klinik pratikte zorluk yaratabilir. Testis torsiyonunda testisin palpasyonla çok hassas olması; özellikle çocuklarda fizik muayene ve USG uygulamasının bile zorluğu dikkate alındığında sedasyonsuz

intratestiküler eksozom uygulaması mümkün olmayabilir ya da hastanın cerrahiye alınmasını geciktirebilir. Ayrıca ödemlenen torsiyone testiste parankimin genişlemesi tunika albuginea ile sınırlanmışken detorsiyon öncesi intraparankimal sıvı verilerek doku basıncının daha da arttırılması olumsuz bir etki yapabilir. Keivan ve ark.larının deneysel çalışmasında (109) eksozomu skrotal olarak uygulamıştır; ancak torsiyona bağlı gelişen orşitle birlikte skrotum cildi hiperemik, ödemli ve hassas olduğundan yine uygulamada zorluk yaşanabilir. Ayrıca akut skrotum tablosu ile başvuran hastalarda cerrahi eksplorasyon öncesi eksozom uygulandığında eğer hasta testis torsiyonu değilse gereksiz bir tedavi yapılmış olur. Bu nedenlerden dolayı biz, eksozomun skrotal eksplorasyonu takiben testise detorsiyon işlemi yapıldıktan sonra uygulanmasını mantıklı buluyoruz.

Eksozomun testise tek bir nokta yerine birden fazla noktaya uygulanmasının da daha iyi sonuç vereceğini düşünüyoruz. Çünkü deney öncesi metilen mavisi ve eksozom karışımının testis parankimine tek noktadan enjekte edildiğinde metilen mavisinin testisin tüm yüzeyinde yeterli dağılım göstermediğini saptadık (makroskobik değerlendirme). Ancak aynı işlemi 4 ayrı noktadan uygulandığında hem testisin dış yüzeyinde hem de iç yüzeyinde metilen mavisinin homojen dağıldığını gördük. Bu nedenle çalışmamızda da eksozom uygulaması testisin 4 ayrı kutbuna enjekte edilerek gerçekleştirilmiştir.

Eksozomun hedef organa direkt uygulanması (intraparankimal) da önemli olabilir. İntravenöz uygulamada, eksozomlar sistemik dolaşıma karışmaktadır. Bu nedenle uygulanan dozun ne kadarının hedef organa ulaştığı, ya da sistemik dolaşıma karışan eksozomların diğer organlar üzerindeki etkisi tam olarak bilinmemektedir (44). Biz eksozomların torsiyon sonrası intraparankimal uygulanmasının hedef organa daha etkin dozda ve hızlı ulaşabileceğini düşünerek intraparankimal uygulamayı tercih ettik.

Bizim çalışmamız da literatürdeki sonuçlara benzer şekilde AMKH'lerden elde edilen eksozomların testisin İ/R modelinde testis hasarını önlemede, AMKH transplantasyonu kadar etkili olduğunu göstermiştir. İmmunohistokimyasal değerlendirmede tedavi grubunda TUNEL pozitif hücrelerin daha az saptanması, eksozom uygulanan grupta apoptozisin daha az tetiklendiğini düşündürmektedir. Bu

da bize oksidatif stresin eksozom uygulanan grupta daha az olduğunu göstermektedir. Benzer etki Johnson skorlarına da yansımıştır. Eksozom tedavisi uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek skorlar saptanmıştır. Bu da AMKH kaynaklı eksozomların spermatogenik fonksiyonları da koruduğunu göstermektedir.

Literatürde sıçan testis torsiyon modelinde AMKH'dan elde edilen eksozomların intratestiküler uygulamasının değerlendirildiği yakın zamanlı Lui ve ark.larının bir çalışmada (Bu çalışma bizim çalışmamızın tamamlanmasından sonra yayınlanmıştır) testislerde İ/R modeli oluşturulmuş, 3 ve 7 günlük reperfüzyon süresi sonunda testisler histolojik ve immunohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir (4). Bu çalışmada detorsiyon sonrası 3. gün sakrifiye edilen deney hayvanlarının histolojik bulguları, bizim çalışmamızın sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Çalışmamızda tedavi grubunda seminifer tübül yapıları normal histolojik görünümde saptanmış; ancak torsiyon grubunda seminifer tübül yapılarının yer yer bozulduğu izlenmiştir. Reperfüzyonun 4. saatinde ise eksozomların iskemi-reperfüzyon hasarını neredeyse normale yakın şekilde onardığı görülmüştür. Liu ve ark.larının çalışmasında Johnson skoru değerlendirilmesinde spermatogenik fonksiyonlarda eksozom uygulamasına bağlı iyileşme 3. ve 7. günde saptanırken (4), çalışmamızda reperfüzyonun 4. saatin sonunda düzeldiği ve spermatogenik hücre sayılarının artmaya başladığı görülmüştür. Lui ve ark.larının ve bizim çalışmamız, testisin İ/R modelinde eksozomların intraparakimal verilmesinin kısa ve orta dönem sonuçlarını göstermesi açısından birbirini tamamlayan çalışmalar olmuştur.

Keivan ve ark.larının çalışmasında, testis torsiyonu 2 saat süreyle 270⁰ lik bir torsiyon oluşturulmuş, testis detorsiyone edildikten 2 saat sonra sıçan plazmasından elde edilen 10 IU. eksozom subkutan olarak skrotuma enjekte edilmiş ve 1 hafta sonra orşiektomi yapılmıştır. Yazarlar, subkutan eksozom uygulamasının torsiyona bağlı gelişen testopatiyi hafiflettiğini, apoptozisin ve enflamasyonun baskılandığını ileri sürmüşlerdir. (109). Yazarların bu çalışmasında torsiyonun derecesi, süresi, eksozomun elde edildiği kaynak ve uygulama yeri bizim çalışmamızdan farklı da olsa benzer sonuçlar elde edilmiştir. Keivan ve ark.larının çalışmasında torsiyon 270⁰ oluşturulmuştur. Bizim çalışmamızda ise torsiyonun derecesi ve süresi (720 derece - 4 saat) daha uzundur ve eksozom direkt testis dokusu içine verilmiştir. Sonuç olarak

AKMH'lerden elde edilen eksozomların intratestiküler verilmesi testisin yüksek dereceli ve uzun süreli iskemik-reperfüzyon hasarlanmasında bile etkili gibi görünmektedir.

Testiküler torsiyon-detorsiyon sonrası iskemi reperfüzyon hasarında ROS üretimi ile apoptotik yolların aktivasyonu etkilidir (130). Testiküler iskemi – reperfüzyon hasarında primer spermatositlerin apoptozisi, fertilitenin azalmasının esas nedenidir (131). Çalışmamızda, TUNEL boyamasında torsiyon grubunda testisin İ/R hasarından sonra apoptozis pozitiflikleri en yoğun periferde, bazal germ hücrelerde izlenmiştir. Bazal germ hücre hasarı, spermatogenezde azalmaya neden olarak infertilite ile sonuçlanabilir. Diğer taraftan eksozom ile tedavi grubunda ise apoptozis yine periferde daha fazla izlenirken tam sıra tutulum ya da belirgin DNA fragmentasyonu izlenmemiştir. Çalışmamızda apoptotik hücre yüzdesi, reperfüzyonun 4. saatinde tedavi grubunda torsiyon grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Liu ve ark.larının çalışmasının TUNEL sonucu da bizim verilerimizi desteklemektedir (4). Gerek bizim gerekse de Lui ve ark.larının çalışması, testiste İ/R hasarının apoptozis ile sonuçlandığı; AMKH'den elde edilen eksozomların apoptozisi baskılayarak İ/R hasarını azalttığı ve spermatogenik hücrelerin korunduğunu göstermektedir (4). Liu ve ark.ları eksozomların PI3K/AKT ve MAPK/ERK1/2 yollarının aktive ederek apoptozu inhibe ettiğini, spermatogenik hücrelerin de çoğalması ve göçünü teşvik ettiğini belirtmiştir (4). Tendon iyileşmesi üzerine yapılan başka bir çalışmada da eksozomların SMAD2/3 ve SMAD1/5/9 yollarını aktive ederek kök hücrelerin çoğalmasını, göçünü ve farklılaşmasını desteklediği ve erken enflamatuvar reaksiyonun inhibe edildiği belirtmektedir (134). Bizim çalışmamızda apoptozisin periferde daha fazla görülmesi ise bazal germ hücrelerin iskemiye daha duyarlı olduğunu ya da iskemi-reperfüzyona bağlı etkilerin periferden başladığı ve en son santral bölgenin etkilendiğini düşündürmektedir. Eksozomlar intraparakimal verilirken enjeksiyon derinliği de santral ve periferdeki bu farklılıkların bir nedeni olabilir.

Ekzojen verilen eksozomlar, hedef gen veya protein ekspresyonunu etkileyerek duyarlı hücrelerin fonksiyonunu da düzenlemektedirler (132,133). Ayrıca eksozomların, hasarlı bölgelerde kök hücre benzeri prorejeneratif etkiyi de uyardıkları raporlanmıştır (44). Benzer mekanizmalar bizim çalışmamız için de geçerli olabilir.

AMKH kaynaklı eksozomlar, testisin İ/R hasarını önlemede apoptotik aktiviteyi, hasarlı hücrelerin onarımına yönelik hedef gen ya da proteinlerin ekspresyonunu artırarak gerçekleştirmiş olabilir ya da parankim içine uyguladığımız eksozomların hasarlanmış hücrelerin iyileşmesi için gerekli çevresel ortamı (proteinlerin, lipidlerin, miRNA'nın taşınması gibi) düzenlemiş olması da muhtemeldir. Sonuç olarak AMKH'den elde edilen eksozomlar hem apoptozisi inhibe edip hem de spermatogenik hücre proliferasyonunu arttırmaktadır. Eksozomlarla ilgili pek çok çalışma olmasına karşın etki mekanizmaları tam olarak ortaya konulmamıştır.

Testis torsiyonunda, eksozom tedavisi ile ilgili çalışmalar yakın zamanda yapılmaya başlandığından henüz güvenli doz aralığını gösteren çalışmalar yoktur. Çalışmamızda mevcut kök hücre ve eksozom çalışmalarında daha sıklıkla kullanılan 100 µl doz tercih edilmiştir (4,109).

Çalışmamızın bazı sınırlılıkları vardır. İlk olarak, eksozomun yalnızca testisin İ/R hasarında erken sonuçları değerlendirilmiştir. İntratestiküler eksozom uygulamasının fertilité gibi uzun dönem etkileri ve dolaşıma katıldıktan sonra diğer organlardaki olası yan etkileri araştırılmamıştır. Ayrıca eksozomun güvenli doz aralığının belirlenmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. İkinci olarak, çalışmamızda elektron mikroskopi veya western blot analizi yapılmadığı için uyguladığımız eksozomların karakterizasyonu yapılamamıştır. 100µl eksozom sıvısı içerisindeki kesin eksozom miktarı ölçülememiştir. Üçüncü olarak, deneyler sadece sıçan modelinde yapılmış olup insan testis torsiyonundaki sonuçları bilinmemektedir. Bu nedenle eksozomun insandaki testis torsiyon hasarına terapötik etkilerini değerlendirmek için daha ileri klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, çalışmamız, deneysel testisin İ/R hasarında, AMKH kaynaklı eksozomların kullanılması ile testisteki apoptozisin baskılandığını ve spermatogenik hücrelerin korunduğunu göstermiştir.

VI. SONUÇ VE ÖNERİLER

- 1- Çalışmamız sıçan adipoz dokusundan adipozal mezenşimal kök hücrelerin elde edilebildiğini ve bu hücrelerin kültüre edildikten sonra adipozal kök hücre kaynaklı eksozomların elde edilebildiğini göstermiştir.
- 2- Testisin 720 derece 4 saatlik torsiyonu ve sonrasında 4 saatlik reperfüzyonu, testiste iskemi reperfüzyon hasarı ve apoptozis ile sonuçlanmıştır.
- 3- AMKH'lerden elde edilen eksozomların apoptozisi baskılayarak İ/R hasarını azaltmıştır.
- 4- AMKH'lerden elde edilen eksozomlar, testiste İ/R hasarının neden olduğu Johnsen skorlarında yükselmeye neden olmuştur. Bu da eksozomların spermatogenik hücrelerin korunmasını ve proliferasyonu artırdığını düşündürmektedir. Eksozom uygulaması gerek apoptozis gerekse de Johnsen skorları açısından reperfüzyonun 4. saatinde iskemi-reperfüzyon hasarını normale yakın bir düzeyde onarmıştır.
- 5- Testisin İ/R hasarı modelinde apoptozis testisin periferinde daha fazla görülmüştür. Bu bazal germ hücrelerin iskemiye daha duyarlı olduğunu ya da iskemi-reperfüzyona bağlı etkilerin periferden başladığı ve en son santralin etkilendiğini düşündürmektedir.
- 6- Sonuç olarak, AMKH'den elde edilen eksozomların, sıçan testislerinde torsiyon-detorsiyon sonrası gelişen İ/R hasarını önlemede detorsiyondan hemen sonra testis parankiminin 4 ayrı noktasına uygulanması etkilidir

Eksozomların etki mekanizmalarını daha iyi anlayabilmek, eksozomun fertilite gibi uzun dönem etkileri ile dolaşıma katıldıktan sonra diğer organlardaki etkilerini değerlendirebilmek ve insan testis torsiyon hasarına terapötik etkilerini değerlendirmek için daha ileri deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca İ/R'nin neden olduğu hücresel ve doku hasarında eksozom kullanımının terapötik etkisini optimize edebilmek için en uygun kök hücre kaynağı, eksozomun uygulanış şekline göre güvenli doz aralığını saptayan karşılaştırmalı çalışmalara da ihtiyaç olduğu ortadadır. Biz eksozomların testis torsiyonu olan olgularda klinik pratikte kullanılabileceğini ve İ/R hasarını önlemede olumlu etki göstereceğine inanıyoruz. Elbette öncelikle eksozomun hazır ilaç formunda temin edebilme ve saklanma süresindeki kısıtlılıklar ile ilgili çözümlere ihtiyaç vardır.

VII. KAYNAKLAR

1. Ameli M, Hashemi MS, Moghimian M, Shokoohi M. Protective effect of tadalafil and verapamil on testicular function and oxidative stress after torsion/detorsion in adult male rat. *Andrologia*. 2018 Oct;50(8):e13068.
2. Jacobsen FM, Rudlang TM, Fode M, Østergren PB, Sønksen J, Ohl DA, et al. The Impact of Testicular Torsion on Testicular Function. *World J Mens Health*. 2020;38(3):298.
3. Lysiak JJ, Turner SD, Nguyen QAT, Singbartl K, Ley K, Turner TT. Essential Role of Neutrophils in Germ Cell-Specific Apoptosis Following Ischemia/Reperfusion Injury of the Mouse Testis. *Biol Reprod*. 2001 Sep 1;65(3):718–25.
4. Liu H, Shi M, Li X, Lu W, Zhang M, Zhang T, et al. Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Derived Exosomes Prevent Testicular Torsion Injury via Activating PI3K/AKT and MAPK/ERK1/2 Pathways. *Oxid Med Cell Longev*. 2022 Jun 16;2022:1–17.
5. Volarevic V, Nurkovic J, Arsenijevic N, Stojkovic M. Concise Review: Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Acute Liver Failure and Cirrhosis. *Stem Cells*. 2014 Nov 1;32(11):2818–23.
6. Siregar S, Sasongko Noegroho B, Adriansjah R, Mustafa A, Wijayanti Z. Intratesticular Human Adipose-Derived Stem Cell (hADSC) Transplantation Decreased Oxidative Stress in Testicular Torsion Model of Wistar Rat. *Res Rep Urol*. 2021 Jan;Volume 13:1–8.
7. Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*. 2002 Aug;2(8):569–79.
8. Simpson RJ, Jensen SS, Lim JWE. Proteomic profiling of exosomes: Current perspectives. *Proteomics*. 2008 Oct;8(19):4083–99.
9. van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles. *Pharmacol Rev*. 2012 Jul;64(3):676–705.
10. Kahraman T. Exosomes: Natural Nanovesicle Candidates Used in the Diagnosis and Treatment. *Turkish Journal of Immunology*. 2014 Sep 19;2(2):34–40.
11. Beach A, Zhang HG, Ratajczak MZ, Kakar SS. Exosomes: an overview of biogenesis, composition and role in ovarian cancer. *J Ovarian Res*. 2014 Dec 25;7(1):14.
12. Du Y, Li D, Han C, Wu H, Xu L, Zhang M, et al. Exosomes from Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stromal Cells (hiPSC-MSCs) Protect Liver against Hepatic Ischemia/ Reperfusion Injury via Activating Sphingosine Kinase and Sphingosine-1-Phosphate Signaling Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;43(2):611–25.
13. Aygan B, Kaya M, Cansever Mutlu E, Küçük İ. Eksozomların Hastalıklardaki Rolü, Tanı Ve Tedavi Amaçlı Kullanımı. *Beykent Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*. 2021 Aug 16;14(1):15–26.
14. Elliott RO, He M. Unlocking the Power of Exosomes for Crossing Biological Barriers in Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2021 Jan 19;13(1):122.
15. Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci*. 2019 Dec 15;9(1):19.

16. Başaklar C. Ürogenital Sistem. In: Sadlar TW, çev. Başaklar C, editors. Langman Medikal Embriyoloji. 13th ed. Ankara: Palme Yayıncılık; 2017. p. 250–77.
17. Coşkun G. Testis İnişinin Moleküler Mekanizması. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi. 2021 Mar 31;30(1):22–30.
18. İrkılata HC, Dayanç M. İnmemiş Testis. In: Dayanç M, editor. Güncel Çocuk Ürolojisi. 1st ed. Ankara: Atlas Kitapçılık; 2004. p. 323–57.
19. Polat S. Ürogenital Sistem. In: Moore KL, Persaud TVN, çev. Dalçık H, Yıldırım M, editors. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. 8th ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2008. p. 243–84.
20. Burgu B, Telli O. Embryology of Testis and Theories of Testicular Descent. Türk Üroloji Seminerleri/Turkish Urology Seminars. 2010 Jul 1;1(3):47–51.
21. Sancak B, Cumhur M. Erkek Genital Organları. In: Sancak B, Cumhur M, editors. Fonksiyonel Anatomi Baş - Boyun ve İç Organlar. 4th ed. Ankara: ODTÜ Yayıncılık; 2008. p. 286–97.
22. Başaklar C. İnmemiş Testis. In: Başaklar C, editor. Bebek ve Çocukların Cerrahi ve Ürolojik Hastalıkları Cilt II. 2nd ed. Ankara: Palme Yayıncılık; 2006. p. 1717–52.
23. Kırıcı Y, Yıldız S. Erkek Üreme Sistemi Anatomisi. In: Aşçı R, Çayan S, Erdermir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, et al., editors. Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. 1st ed. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık; 2013. p. 21–8.
24. Netter FH. İnsan Anatomisi Atlası. 4th ed. Cumhur M, editor. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2008. 387–390 p.
25. Tunalı S, Başar R. Testisin Vasküler Anatomisi. Türkiye Klinikleri Journal of Urology - Special Topics. 2012 Jul 13;5(3):1–5.
26. Öktem G. Erkek Üreme Sistemi Histolojisi. In: Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. 1st ed. İstanbul: Medikal Yayıncılık; 2013.
27. Junqueira LC, Carneiro J. Erkek Üreme Sistemi. In: Aytekin Y, Solakoğlu S, editors. Temel Histoloji. 10th ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2006. p. 431–49.
28. Demir N. Erkek Üreme Sistemi. In: Ross MH, çev. Baykal B, editors. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. 6th ed. Ankara: Palme Yayınları; 2014. p. 790.
29. Ovalle WK, Nahirney PC. Male Reproductive System. In: Netter's Essential Histology: with Correlated Histopathology. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier; 2020. p. 407–29.
30. La HM, Hobbs RM. Mechanisms regulating mammalian spermatogenesis and fertility recovery following germ cell depletion. Cellular and Molecular Life Sciences. 2019 Oct 28;76(20):4071–102.
31. İnanır C, Ekici L. Eksozomlar: Kompozisyonları, Biyolojik Fonksiyonları ve Biyoaktif Bileşiklerin Taşınmasındaki Potansiyelleri. Akademik Gıda. 2020 Dec 31;421–32.
32. Bobrie A, Colombo M, Raposo G, Théry C. Exosome Secretion: Molecular Mechanisms and Roles in Immune Responses. Traffic. 2011 Dec;12(12):1659–68.
33. Farooqi AA, Desai NN, Qureshi MZ, Librelotto DRN, Gasparri ML, Bishayee A, et al. Exosome biogenesis, bioactivities and functions as new delivery systems of natural compounds. Biotechnol Adv. 2018 Jan;36(1):328–34.

34. Wang J, Sun X, Zhao J, Yang Y, Cai X, Xu J, et al. Exosomes: A Novel Strategy for Treatment and Prevention of Diseases. *Front Pharmacol*. 2017 Jun 13;8.
35. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009 Aug 5;9(8):581–93.
36. Properzi F, Logozzi M, Fais S. Exosomes: the future of biomarkers in medicine. *Biomark Med*. 2013 Oct;7(5):769–78.
37. Kok VC, Yu CC. Cancer-Derived Exosomes: Their Role in Cancer Biology and Biomarker Development. *Int J Nanomedicine*. 2020 Oct;Volume 15:8019–36.
38. Hu C, Chen M, Jiang R, Guo Y, Wu M, Zhang X. Exosome-related tumor microenvironment. *J Cancer*. 2018;9(17):3084–92.
39. Hessvik NP, Sandvig K, Llorente A. Exosomal miRNAs as Biomarkers for Prostate Cancer. *Front Genet*. 2013;4.
40. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Curry WT, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*. 2008 Dec 16;10(12):1470–6.
41. Aushev VN, Zborovskaya IB, Laktionov KK, Girard N, Cros MP, Herceg Z, et al. Comparisons of microRNA Patterns in Plasma before and after Tumor Removal Reveal New Biomarkers of Lung Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One*. 2013 Oct 9;8(10):e78649.
42. Wang H, Hou L, Li A, Duan Y, Gao H, Song X. Expression of Serum Exosomal MicroRNA-21 in Human Hepatocellular Carcinoma. *Biomed Res Int*. 2014;2014:1–5.
43. Lin J, Li J, Huang B, Liu J, Chen X, Chen XM, et al. Exosomes: Novel Biomarkers for Clinical Diagnosis. *The Scientific World Journal*. 2015;2015:1–8.
44. Basu J, Ludlow JW. Exosomes for repair, regeneration and rejuvenation. *Expert Opin Biol Ther*. 2016 Apr 2;16(4):489–506.
45. Yu B, Zhang X, Li X. Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2014 Mar 7;15(3):4142–57.
46. Tickner JA, Urquhart AJ, Stephenson SA, Richard DJ, Byrne KJ. Functions and Therapeutic Roles of Exosomes in Cancer. *Front Oncol*. 2014 May 27;4.
47. Tian Y, Li S, Song J, Ji T, Zhu M, Anderson GJ, et al. A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials*. 2014 Feb;35(7):2383–90.
48. Croft PK de, Sharma S, Godbole N, Rice GE, Salomon C. Ovarian-Cancer-Associated Extracellular Vesicles: Microenvironmental Regulation and Potential Clinical Applications. *Cells*. 2021 Sep 1;10(9).
49. Jing H, He X, Zheng J. Exosomes and regenerative medicine: state of the art and perspectives. *Translational Research*. 2018 Jun;196:1–16.
50. Rahmati S, Shojaei F, Shojaeian A, Rezakhani L, Dehkordi MB. An overview of current knowledge in biological functions and potential therapeutic applications of exosomes. *Chem Phys Lipids*. 2020 Jan;226:104836.
51. Ha DH, Kim H keun, Lee J, Kwon HH, Park GH, Yang SH, et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Exosomes for Immunomodulatory Therapeutics and Skin Regeneration. *Cells*. 2020 May 7;9(5):1157.

52. Hu P, Yang Q, Wang Q, Shi C, Wang D, Armato U, et al. Mesenchymal stromal cells-exosomes: a promising cell-free therapeutic tool for wound healing and cutaneous regeneration. *Burns Trauma*. 2019 Dec 1;7.
53. Song H, Liu B, Dong B, Xu J, Zhou H, Na S, et al. Exosome-Based Delivery of Natural Products in Cancer Therapy. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Mar 2;9.
54. Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics*. 2017;7(3):789–804.
55. Niu Z, Pang RTK, Liu W, Li Q, Cheng R, Yeung WSB. Polymer-based precipitation preserves biological activities of extracellular vesicles from an endometrial cell line. *PLoS One*. 2017 Oct 12;12(10):e0186534.
56. Peterson MF, Otoc N, Sethi JK, Gupta A, Antes TJ. Integrated systems for exosome investigation. *Methods*. 2015 Oct;87:31–45.
57. Pethő A, Chen Y, George A. Exosomes in Extracellular Matrix Bone Biology. *Curr Osteoporos Rep*. 2018 Feb 25;16(1):58–64.
58. Kotmakçı M, Akbaba GE. Exosome Isolation: Is There an Optimal Method with Regard to Diagnosis or Treatment? In: *Novel Implications of Exosomes in Diagnosis and Treatment of Cancer and Infectious Diseases*. InTech; 2017.
59. Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NSK, Choo A, Chen TS, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res*. 2010 May;4(3):214–22.
60. Yu LL, Zhu J, Liu JX, Jiang F, Ni WK, Qu LS, et al. A Comparison of Traditional and Novel Methods for the Separation of Exosomes from Human Samples. *Biomed Res Int*. 2018 Jul 26;2018:1–9.
61. Alvarez ML, Khosroheidari M, Kanchi Ravi R, DiStefano JK. Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. *Kidney Int*. 2012 Nov;82(9):1024–32.
62. Yakimchuk K. Exosomes: isolation methods and specific markers. *Materials and Methods*. 2015 Aug 15;5.
63. Momen-Heravi F, Balaj L, Alian S, Tigges J, Toxavidis V, Ericsson M, et al. Alternative Methods for Characterization of Extracellular Vesicles. *Front Physiol*. 2012;3.
64. Noske HD, Kraus SW, Altinkilic BM, Weidner W. Historical Milestones Regarding Torsion Of The Scrotal Organs. *Journal of Urology*. 1998 Jan;159(1):13–6.
65. Şencan A, Şencan A. Akut Skrotum. In: Önen A, Günşar C, Alkan M, Karaman A, editors. *Çocuk Ürolojisi*. 1st ed. İzmir: Us Akademi; 2021. p. 397–406.
66. Başaklar C. Akut Skrotum. In: Başaklar C, editor. *Bebek ve Çocukların Cerrahi ve Ürolojik Hastalıkları Cilt II*. Ankara: Palme Yayıncılık; 2006. p. 1753–64.
67. Das S, Singer A. Controversies of Perinatal Torsion of the Spermatoc Cord: A Review, Survey and Recommendations. *Journal of Urology*. 1990 Feb;143(2):231–3.
68. Nandi B, Murphy FL. Neonatal testicular torsion: a systematic literature review. *Pediatr Surg Int*. 2011 Oct 8;27(10):1037–40.
69. Günther P, Rübber I. The Acute Scrotum in Childhood and Adolescence. *Dtsch Arztebl Int*. 2012 Jun 22;

70. Beni-Israel T, Goldman M, Bar Chaim S, Kozer E. Clinical predictors for testicular torsion as seen in the pediatric ED. *Am J Emerg Med*. 2010 Sep;28(7):786–9.
71. Nelson CP, Williams JF, Bloom DA. The cremasteric reflex: a useful but imperfect sign in testicular torsion. *J Pediatr Surg*. 2003 Aug;38(8):1248–9.
72. Davis JE, Silverman M. Scrotal Emergencies. *Emerg Med Clin North Am*. 2011 Aug;29(3):469–84.
73. Lam WWC, Yap TL, Jacobsen AS, Teo HJEL. Colour Doppler ultrasonography replacing surgical exploration for acute scrotum: myth or reality? *Pediatr Radiol*. 2005 Jun 11;35(6):597–600.
74. Mansbach JM, Forbes P, Peters C. Testicular Torsion and Risk Factors for Orchiectomy. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2005 Dec 1;159(12):1167.
75. Barbosa JA, Tiseo BC, Barayan GA, Rosman BM, Torricelli FCM, Passerotti CC, et al. Development and Initial Validation of a Scoring System to Diagnose Testicular Torsion in Children. *Journal of Urology*. 2013 May;189(5):1859–64.
76. Kaye JD, Shapiro EY, Levitt SB, Friedman SC, Gitlin J, Freyle J, et al. Parenchymal Echo Texture Predicts Testicular Salvage After Torsion: Potential Impact on the Need for Emergent Exploration. *Journal of Urology*. 2008 Oct;180(4S):1733–6.
77. Nussbaum Blask AR, Bulas D, Shalaby-Rana E, Rushton G, Shao C, Majd M. Color Doppler sonography and scintigraphy of the testis: A prospective, comparative analysis in children with acute scrotal pain. *Pediatr Emerg Care*. 2002 Apr;18(2):67–71.
78. Bader TR, Kammerhuber F, Herneth AM. Testicular blood flow in boys as assessed at color Doppler and power Doppler sonography. *Radiology*. 1997 Feb;202(2):559–64.
79. Meštrović J, Biočić M, Pogorelić Z, Furlan D, Družijanić N, Todorčić D, et al. Differentiation of inflammatory from non-inflammatory causes of acute scrotum using relatively simple laboratory tests: Prospective study. *J Pediatr Urol*. 2013 Jun;9(3):313–7.
80. Lewis AG, Bukowski TP, Jarvis PD, Wacksman J, Sheldon CA. Evaluation of acute scrotum in the emergency department. *J Pediatr Surg*. 1995 Feb;30(2):277–82.
81. Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R, Cockett ATK. Histological Changes Occurring in the Contralateral Testes of Prepubertal Rats Subjected to Various Durations of Unilateral Spermatogenic Cord Torsion. *Journal of Urology*. 1985 May;133(5):906–11.
82. Baker LA, Turner TT. Leydig Cell Function after Experimental Testicular Torsion Despite Loss of Spermatogenesis. *J Androl*. 1995;16:12–7.
83. Arora P, Sudhan MD, Sharma R. Incidence of Anti-Sperm Antibodies in Infertile Male Population. *Med J Armed Forces India*. 1999 Jul;55(3):206–8.
84. Cui D, Han G, Shang Y, Liu C, Xia L, Li L, et al. Antisperm antibodies in infertile men and their effect on semen parameters: A systematic review and meta-analysis. *Clinica Chimica Acta*. 2015 Apr;444:29–36.
85. Kolski JM, Mazolewski PJ, Stephenson LL, Texter J, Grigoriev VE, Zamboni WA. Effect of hyperbaric oxygen therapy on testicular ischemia-reperfusion injury. *J Urol*. 1998 Aug;160(2):601–4.
86. Palmer JS, Cromie WJ, Lee RC. Surfactant Administration Reduces Testicular Ischemia-Reperfusion Injury. *Journal of Urology*. 1998 Jun;159(6):2136–9.

87. Dokmeci D, Kanter M, Inan M, Aydogdu N, Basaran UN, Yalcin O, et al. Protective effects of ibuprofen on testicular torsion/detorsion-induced ischemia/reperfusion injury in rats. *Arch Toxicol.* 2007 Aug 3;81(9):655–63.
88. Halimi M, Poursak T, Kalarestaghi H, Barghi B, Moghimian M, Niazkar HR, et al. Effects of *Syzygium aromaticum* (Clove) Extract on Male Fertility Factors and Oxidative Stress After Torsion/ Detorsion in Adult Male Rats Using Intrauterine Insemination Method. *International Journal of Women's Health and Reproduction Sciences.* 2020 Mar 17;10(3):135–40.
89. Karaguzel E, Kadihasanoglu M, Kutlu O. Mechanisms of testicular torsion and potential protective agents. *Nat Rev Urol.* 2014 Aug 17;11(7):391–9.
90. Şener G, Yeğen BÇ. İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim.* 2009;22:5–13.
91. Orrenius S, Burkitt MJ, Kass GEN, Dypbukt JM, Nicotera P. Calcium ions and oxidative cell injury. *Ann Neurol.* 1992;32(S1):S33–42.
92. Suleyman H, Ozcicek A. Molecular Mechanism of Ischemia Reperfusion Injury. *Archives of Basic and Clinical Research.* 2019 Dec 23;2(1):25–7.
93. Norbury CJ, Hickson ID. Cellular Responses to DNA Damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001 Apr;41(1):367–401.
94. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007 Jun 25;35(4):495–516.
95. Kaya C, Çalışkan Y, Yönden Z. Apoptozis. *The Medical Journal of Mustafa Kemal University.* 2015;3(11):26–37.
96. Bozok ÜG, Küçük A, Arslan M. İskemi Reperfüzyon Hasarında Stres ve Hücre Ölümü. *Hitit Medical Journal.* 2021 Dec 19;
97. Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes to Cells.* 1998 Nov;3(11):697–707.
98. Broughton BRS, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic Mechanisms After Cerebral Ischemia. *Stroke.* 2009 May;40(5).
99. Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.* 2008;19(2):73–8.
100. Johnsen SG. Testicular Biopsy Score Count – A Method for Registration of Spermatogenesis in Human Testes: Normal Values and Results in 335 Hypogonadal Males. *Horm Res Paediatr.* 1970;1(1):2–25.
101. Creasy DM. Pathogenesis of Male Reproductive Toxicity. *Toxicol Pathol.* 2001 Jan 2;29(1):64–76.
102. KRARUP T. The Testes After Torsion. *Br J Urol.* 1978 Feb;50(1):43–6.
103. Romero FR, Gomes RPX, Lorenzini F, Erdmann TR, Tambara Filho R. Ipsilateral testicular necrosis and atrophy after 1,080-degree torsion of the spermatic cord in rats. *Acta Cir Bras.* 2009 Apr;24(2):118–23.
104. Mikuz G. Testicular torsion: simple grading for histological evaluation of tissue damage. *Appl Pathol.* 1985;3(3):134–9.
105. Hsiao CH, Ji ATQ, Chang CC, Chien MH, Lee LM, Ho JHC. Mesenchymal stem cells restore the sperm motility from testicular torsion-detorsion injury by regulation of glucose metabolism in sperm. *Stem Cell Res Ther.* 2019 Dec 24;10(1):270.
106. Hsiao CH, Ji ATQ, Chang CC, Cheng CJ, Lee LM, Ho JHC. Local injection of mesenchymal stem cells protects testicular torsion-induced germ cell injury. *Stem Cell Res Ther.* 2015 Dec 30;6(1):113.

107. Saba M, Morales CR, de Lamirande E, Gagnon C. Morphological and biochemical changes following acute unilateral testicular torsion in prepubertal rats. *J Urol.* 1997 Mar;157(3):1149–54.
108. Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R, Cockett ATK. Histopathology of Prepubertal Rat Testes Subjected to Various Durations of Spermatic Cord Torsion. *J Androl.* 1986 Jan 2;7(1):23–31.
109. Keivan M, Mansouri Torghabeh F, Davoodi S, Moradi Maryamneghari S, Dadfar R. Single intratesticular injection of blood-serum-derived exosomes can potentially alleviate testopathy following testicular torsion. *Animal Model Exp Med.* 2022 Aug 20;5(4):362–8.
110. Şencan A, Tanrıverdi Hİ, Şimşek FB, Usta İB, O M, Özbilgin K. Intraoperative evaluation of testicular vascularization and perfusion in rat testicles with indocyanine green (ICG)/near-infrared (NIR) fluorescent imaging after torsion–detorsion and reperfusion. *Pediatr Surg Int.* 2022 Sep 10;38(11):1625–33.
111. Turner TT, Brown KJ. Spermatic Cord Torsion: Loss of Spermatogenesis Despite Return of Blood Flow¹. *Biol Reprod.* 1993 Aug 1;49(2):401–7.
112. Frush DP, Babcock DS, Lewis AG, Paltiel HJ, Rupich R, Bove KE, et al. Comparison of color doppler sonography and radionuclide imaging in different degrees of torsion in rabbit testes. *Acad Radiol.* 1995 Nov;2(11):945–51.
113. Turner TT. Acute Experimental Testicular Torsion: No Effect on the Contralateral Testis. *J Androl.* 1985 Jan 2;6(1):65–72.
114. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal Stem Cells. *Exp Biol Med.* 2001 Jun 29;226(6):507–20.
115. Bai Y, Han Y di, Yan X long, Ren J, Zeng Q, Li X dong, et al. Adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulated by hydrogen peroxide enhanced skin flap recovery in ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Jun;500(2):310–7.
116. Haahr MK, Jensen CH, Toyserkani NM, Andersen DC, Damkier P, Sørensen JA, et al. Safety and Potential Effect of a Single Intracavernous Injection of Autologous Adipose-Derived Regenerative Cells in Patients with Erectile Dysfunction Following Radical Prostatectomy: An Open-Label Phase I Clinical Trial. *EBioMedicine.* 2016 Mar;5:204–10.
117. Zhou L, Song K, Xu L, Zhao F, Tian H, Zhou C, et al. Protective Effects of Uncultured Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction on Testicular Injury Induced by Torsion-Detorsion in Rats. *Stem Cells Transl Med.* 2019 Apr 1;8(4):383–91.
118. Mildmay-White A, Khan W. Cell Surface Markers on Adipose-Derived Stem Cells: A Systematic Review. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2017 Jul 30;12(6).
119. Baer PC, Geiger H. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Tissue Localization, Characterization, and Heterogeneity. *Stem Cells Int.* 2012;2012:1–11.
120. Ibrahim A, Marbán E. Exosomes: Fundamental Biology and Roles in Cardiovascular Physiology. *Annu Rev Physiol.* 2016 Feb 10;78(1):67–83.
121. Jiang N, Xiang L, He L, Yang G, Zheng J, Wang C, et al. Exosomes Mediate Epithelium–Mesenchyme Crosstalk in Organ Development. *ACS Nano.* 2017 Aug 22;11(8):7736–46.

122. Kordelas L, Rebmann V, Ludwig AK, Radtke S, Ruesing J, Doeppner TR, et al. MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *Leukemia*. 2014 Apr 9;28(4):970–3.
123. Li M, Wang T, Tian H, Wei G, Zhao L, Shi Y. Macrophage-derived exosomes accelerate wound healing through their anti-inflammation effects in a diabetic rat model. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2019 Dec 4;47(1):3793–803.
124. Cui X, He Z, Liang Z, Chen Z, Wang H, Zhang J. Exosomes From Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells Protect the Myocardium Against Ischemia/Reperfusion Injury Through Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2017 Oct;70(4):225–31.
125. Lai TC, Lee TL, Chang YC, Chen YC, Lin SR, Lin SW, et al. MicroRNA-221/222 Mediates ADSC-Exosome-Induced Cardioprotection Against Ischemia/Reperfusion by Targeting PUMA and ETS-1. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Dec 3;8.
126. Zhang Y, Li Y, Wang Q, Zheng D, Feng X, Zhao W, et al. Attenuation of hepatic ischemia-reperfusion injury by adipose stem cell-derived exosome treatment via ERK1/2 and GSK-3 β signaling pathways. *Int J Mol Med*. 2021 Dec 3;49(2):13.
127. Zhu F, Chong Lee Shin OLS, Pei G, Hu Z, Yang J, Zhu H, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells employed exosomes to attenuate AKI-CKD transition through tubular epithelial cell dependent Sox9 activation. *Oncotarget*. 2017 Sep 19;8(41):70707–26.
128. Perocheau D, Touramanidou L, Gurung S, Gissen P, Baruteau J. Clinical applications for exosomes: Are we there yet? *Br J Pharmacol*. 2021 Jun 3;178(12):2375–92.
129. Velot É, Madry H, Venkatesan JK, Bianchi A, Cucchiari M. Is Extracellular Vesicle-Based Therapy the Next Answer for Cartilage Regeneration? *Front Bioeng Biotechnol*. 2021 Apr 23;9.
130. Lysiak JJ, Nguyen QAT, Kirby JL, Turner TT. Ischemia-Reperfusion of the Murine Testis Stimulates the Expression of Proinflammatory Cytokines and Activation of c-jun N-Terminal Kinase in a Pathway to E-Selectin Expression1. *Biol Reprod*. 2003 Jul 1;69(1):202–10.
131. Arabaci Tamer S, Yildirim A, K  ro  lu MK,   evik   , Ercan F, Ye  en B  . Nesfatin-1 ameliorates testicular injury and supports gonadal function in rats induced with testis torsion. *Peptides (NY)*. 2018 Sep;107:1–9.
132. Zhankina R, Baghban N, Askarov M, Saipiyeva D, Ibragimov A, Kadirova B, et al. Mesenchymal stromal/stem cells and their exosomes for restoration of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia: a systemic review. *Stem Cell Res Ther*. 2021 Dec 6;12(1):229.
133. Au Yeung CL, Co NN, Tsuruga T, Yeung TL, Kwan SY, Leung CS, et al. Exosomal transfer of stroma-derived miR21 confers paclitaxel resistance in ovarian cancer cells through targeting APAF1. *Nat Commun*. 2016 Sep 29;7(1):11150.
134. Liu H, Zhang M, Shi M, Zhang T, Lu W, Yang S, et al. Adipose-derived mesenchymal stromal cell-derived exosomes promote tendon healing by activating both SMAD1/5/9 and SMAD2/3. *Stem Cell Res Ther*. 2021 Dec 10;12(1):338.