TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

TEK TARAFLI TESTİS TORSİYONU DENEYSEL MODELİNDE IGF-I, GH VE FGF GİBİ BÜYÜME FAKTÖRLERİNİN UYGULANMASININ FERTİLİTE VE FEKUNDİTE ÜZERİNE ETKİLERİ (SIÇANLARDA DENEYSEL ÇALIŞMA)

Dr. Gökhan Berktuğ BAHADIR

ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Meltem BİNGÖL KOLOĞLU

ANKARA
2009

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı

Tıpta Uzmalık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan

Tek Taraflı Testis Torsiyonu Modelinde IGF-I, ve GH Gibi Büyüme Faktörlerinin Uygulanmasının Fertilite ve Fekundilite Üzerine Etkileri (sıçanlarda deneysel çalışma) Dr.Gökhan Berktuğ BAHADIR'a ait, çalışma aşağıdaki jüri tarafından **Tıpta Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20/ 05/ 2009

Prof.Dr.Hüseyin DİNDAR
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı
Jüri Başkanı

Prof.Dr.Tanju AKTUĞ
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı
Üye

Doç.Dr.Meltem KOLOĞLU
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı
(Tez Danışmanı)

ÖNSÖZ

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından 2003-0809-137 proje numarası ile desteklenmiştir.

Bu çalışmada her aşamasında gösterdikleri yardım ve destek için danışmanım Doç. Dr. Meltem BİNGÖL- KOLOĞLU ve Prof. Dr. Hüseyin DİNDAR'a, yardımlarını ve deneyimlerini esirgemeyen Doç. Dr. E. Aydın YAĞMURLU ve Prof. Dr. Tanju AKTUĞ'a, tez kapsamındaki cerrahi işlemlerin uygulanmasında verdikleri destek için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Labaratuvarı sorumlusu Veteriner Hekim Atilla İŞGÖREN ve ekibine, parçaların incelenmesi, seminifer tübül çapı ve testiküler biyopsi skoru değerlendirilmesi incelemelerini gerçekleştiren Ankara Üniversitesi Tıp fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD'dan Prof. Dr. Cengiz GÜVEN ve Dr.Hande İLKAY'a, DNA flow sitometrik analiz incelemelerindeki katkılarından dolayı Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Bölümünden Doç. Dr. E. Umit BAĞRIAÇIK ve Dr. Sultan YOLBAKAN'a, Jelatinlerin hazırlanması ve büyüme hormonlarının eklenerek ilaç taşıyıcı sistemleri oluşturma işlemlerini gerçekleştiren Prof. Dr.Nesrin HASIRCI ve Dr. Tuğba ENDOĞAN'a, Tezimin her aşamasında desteklerini esirgemeyen Çocuk Cerrahisi AD'ndan Dr. Esra TEMELTAŞ, Dr Ufuk ATEŞ, Dr Coşkun KÖSE, Dr Ayhan S. YAMAN ve Uzm Dr. Gülnur GÖLLÜ, Uzm Dr. Rahşan VARGÜN YILDIZ'a, ayrıca eğitim hayatım boyunca desteğini benden esirgemeyen aileme çok teşekkür ederim.

Dr. Gökhan Berktuğ BAHADIR

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL ONAY i

ÖNSÖZ ii

İÇİNDEKİLER iii

SİMGELER ve KISALTMALAR v

ŞEKİLLER DİZİNİ vii

GRAFİKLER VE TABLOLAR DİZİNİ viii

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 4

2.1. KLİNİK BULGULAR 5

2.2. TANI 6

2.3. TEDAVİ 8

2.4. PROGNOZ 10

2.5. İSKEMİK TESTİS DOKUSUNDAKİ HİSTOPATOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER VE HASARLANMA MEKANİZMALARI 11

2.5.1. TESTİS TORSİYONUNDA KARŞI TESTİSTE ZEDELENME 13

2.5.2. TESTİS TORSİYONU SONRASI KARŞI TESTİS HASARLANMASINI ÖNLEMEYE YÖNELİK DAHA ÖNCE YAPILAN ÇALIŞMALAR 19

2.6. BÜYÜME FAKTÖRLERİ 20

2.6.1. İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRÜ (IGF) 20

2.6.2. BÜYÜME HORMONU (GH) 22

2.6.3. FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRÜ (FGF) 23

2.7. İLAÇ VE BÜYÜME FAKTÖRLERİNİN KONTROLLÜ SALIMI 24

2.7.1. İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN FAYDALARI 25

2.7.2. İLAÇ TAŞIYICI SİSTEM OLARAK JELATİN 25

2.7.3. JELATİNİN YAPISI 26

2.8. GERM HÜCRE HASARLANMASININ DEĞERLENDİRİLMESİ 26
2.8.1. DNA FLOW SİTOMETRİ 27
3. MATERYAL METOD 30
3.1. CERRAHİ İŞLEM 30
3.2. FGF-IGF-GH UYGULAMA SİSTEMLERİNİN HAZIRLANMASI 32
3.3. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME 33
3.4. DNA FLOWSTOMETRİ 34
3.5. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME 35
4. BULGULAR 36
4.1. ORTALAMA SEMİNİFER TUBÜL ÇAPI (OSTÇ) 36
4.2. ORTALAMA TESTİKÜLER BİYOPSİ SKORLARI (OTBS) 40
4.3. HAPLOİD HÜCRE YÜZDESİ 41
4.4. DENEK BAŞINA DÜŞEN YAVRU SAYISI 43
5. TARTIŞMA 44
6. SONUÇLAR 50
ÖZET 52
SUMMARY 54
KAYNAKÇA 56

SİMGELER ve KISALTMALAR

%:	Yüzde
°C:	Derece santigrad
2n:	Diploid
4n:	Tetraploid
Ca:	Kalsiyum
cm^2:	Santimetre kare
CO_2:	Karbondioksit
dk:	Dakika
DNA:	Deoksiribonükleik asit
EVAc:	Etilen-vinil asetat kopolimer
Fe:	Demir
FGF:	Fibroblast büyüme faktörü
FSH:	Folikül stimüle edici hormon
G0:	Non-proliferatif dinlenme fazı
G1:	Post mitotik faz
G2:	Premitotik faz
GH:	Büyüme hormonu
GHRH:	Büyüme hormonu salgılatıcı hormon
HE:	Hemotoksilen Eozin
IGFBP:	IGF-I bağlayıcı proteinler
IGF-I:	İnsülin benzeri büyüme faktörü I
İM:	İntramusküler
kD:	Kilodalton
kg:	Kilogram
LH:	Lüteinize edici hormon
LS:	Leydig hücre skoru
m RNA:	Haberci RNA

M:	Kısa mitotik faz
mg:	Miligram
n:	Haploid
ngr:	Nanogram
O_2:	Oksijen
OH:	Hidroksil
OSTÇ:	Ortalama seminifer tübül çapları
OTBS:	Ortalama testiküler biyopsi skorları
pH:	"Power of Hydrogen" Hidrojenin gücü
PI:	Propidium Iodide
PO_2:	Parsiyel Oksijen basıncı
RDUSG:	Renkli Doppler Ultrason Görüntüleme
RNA:	Ribonükleik asit
S:	DNA sentez fazı
TGF:	Tümoral büyüme faktörü
Xe:	Xenon
Zn:	Çinko
µgr:	Mikrogram
µlt:	Mikrolitre
µm:	Mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Resim 1-2: Detorsiyon işleminden sonra büyüme hormonu yüklü ya da yüksüz jelatinin testise tespit edilmesi ve skrotuma yerleştirlmesi 31
Resim 3: Grup 1 Sağ testis (HEx 20) 37
Resim 4: Grup 1 Sağ (HEx 40).....37
Resim 5: Grup 2 Sağ (HEx20).....37
Resim 6: Grup 3 Sağ (HEx20).....37
Resim 7: Grup 4 Sağ (HEx10).....38
Resim 8: Grup 1 Sol (HEx 20) 38
Resim 9: Grup 1 Sol (HEx40) 38
Resim 10: Grup 2 Sol (HEx40) 38
Resim 11: Grup 3 Sol (HEx10) 39
Resim12: Grup 3 Sol (HEx20) 39
Resim 13: Grup 4 Sol (HEx20) 39
Resim 14: Grup 5 Sol (HEx10) 39
Resim 15: Grup 5 Sol (HEx40) 40
Resim 16: Grup 6 Sol (HEx40) 40
Resim 17: Grup 7 Sol (HEx20) 40
Resim 18: Grup 7 Sol (HEx40) 40

GRAFİKLER VE TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Grafik 1: Tüm grupların aynı taraf (sağ) ve karşı taraf (sol) ortalama seminifer tübül çapları ve standart sapmaları.....36

Grafik 2: Tüm grupların aynı taraf (sağ) ve karşı taraf (sol) ortalama testiküler biyopsi skorları ve standart sapmaları.....41

Grafik 3: Gruplara göre sağ ve sol testis için Haploid hücre yüzdeleri ve standart sapmaları.....42

Grafik 4: Torsiyon ve detorsiyon işlemleri sonrasında her gruptaki sıçanların fekondasyon sonrası yavru sayıları.....43

Tablo 1: Johnsen Testiküler biyopsi skorlaması 33

Tablo 2: Gruplara göre ortalama seminifer tübül çapı, ortalama testiküler biyopsi skoru ve haploid hücre yüzdesi bakımından karşılaştırmalı tablo.....43

1. GİRİŞ

Testis torsiyonu çocuklardaki en önemli acil cerrahi sorunlardan birisidir ve hastaların %33-68'sinde tek taraflı testis atrofisi ile sonuçlanmaktadır.[1-3] Aynı taraf testiste torsiyon ve detorsiyon sonrası gelişen iskemi reperfüzyon hasarı germ hücre hasarlanması ve azalmış spermatogeneze yol açmaktadır.[4-10] Bunun yanı sıra tek taraflı torsiyon sonrası aynı taraf testis ile birlikte karşı taraf testisin de etkilendiği, seminifer tübül morfolojisinin bozulduğu, germ hücrelerinin hasarlandığı, germ hücre olgunlaşmasında ve spermatogenezde azalma olduğu birçok deneysel çalışmada[4,10-17], sperm yoğunluğunda ve motilitesinde azalma ve fertilite oranlarında düşme ise bazı klinik çalışmalarda gösterilmiştir.[3,18-26] Karşı testisteki zedelenmeden hasarlanan testisten salınan akrozomal enzimlerin karşı testisi hasarlandırması, kan testis bariyerinin bozulması sonrasında ortaya çıkan antisperm antikorları, reperfüzyon hasarı sonrasında oluşan testiküler oksidatif stress nedeniyle gelişen germ hücre apopitozu, refleks olarak karşı testis kan akımındaki azalma sonucu oluşan hipoksik ürünler ve spermatogenezdeki primer bozukluk sorumlu tutulmuştur.[4,5,7,19,27-45] Tek taraflı testis torsiyonu sonrasında karşı testisi ve fertiliteyi korumak amacıyla birçok deneysel çalışmada reperfüzyon hasarını önleyen, apopitozu azaltan ajanlar, kimyasal sempatektomi yapan ilaçlar ya da vazodilatatör tedaviler kullanılmıştır.[4,45-70] Bu çalışmaların çoğunda koruyucu tedaviler tek taraflı testiküler olay oluşturulmadan hemen önce uygulanmıştır. Oysaki klinikte hastalar testiküler hasarlanma oluştuktan sonra genelde geç dönemde başvurmaktadırlar. Bu nedenle oluşan etkilenme sonrasında sağ kalan germ hücre populasyonunun fonksiyonunu ve azalan spermatogenezi artırmaya yönelik tedavilerin fertilite üzerine etkilerinin olabileceği düşünülmüştür.

Testislerin normal gelişimi ve fonksiyonlarının hormonlar, büyüme faktörleri ve sitokinleri içeren endokrin ve parakrin yolların aracılığıyla olduğu bilinmektedir.[20,24,37,39,47] IGF (İnsülin benzeri büyüme faktörü), GH (büyüme

hormonu) ve FGF(fibroblast büyüme faktörü), postnatal ve erişkin memelilerin testiküler hücrelerinde reseptörleri gösterilmiş faktörlerdir. Bu faktörler testiküler kord morfogezesisi, testiküler hormon sekresyonunun düzenlenmesi ve spermatogenezin kontrolünü içeren önemli testiküler aktivitelerin gerçekleştirilmesinde rol almaktadırlar.[20,24,37,39,47] IGF esas olarak karaciğerde büyüme hormonu uyarısıyla üretilen anabolik bir hormondur.[20,24,37] Daha önceki çalışmalarda IGF'nin testiküler fonksiyonların önemli bir düzenleyicisi olduğu ortaya konmuştur.[20,24,37,39,47] Büyüme hormonunun gonadal steroidogenez ve gametogenezi hem gonadı direkt etkileyerek hem de IGF-1 düzeyini arttırarak düzenlediği bilinmektedir.[20,37,48] FGF birçok hücre serisinde çoğalmayı ve farklılaşmayı uyaran çok güçlü bir anjiojenik büyüme faktörüdür. [20,49] Deneysel olarak spermatik arter ve ven ligasyonu yapılan sıçanlarda testiküler kan akımını arttırdığını ve testis morfolojisini iyileştirdiği gösterilmiştir.[50] Yakın zamanda yapılan yayınlarda FGF'nin testiküler hormon sekresyonunu düzenlenmesinde ve spermatogenezin kontrolünde de rolü olduğu ileri sürülmüştür.[50] Başka bir çalışmada deneysel inmemiş testis modelinde lokal ve kontollü salınan IGF, GH ve FGF'nin aynı taraf ve karşı taraf testiste haploid hücre populasyonunu artırarak spermatogenezi iyileştirdiği gösterilmiştir.[70] Yukarıda belirtilen nedenlerden dolayı IGF, GH ve FGF'nin testis torsiyonu deneysel modelinde sağ kalan germ hücre fonksiyonunu ve fertiliteyi artırabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmada prepubertal sıçanlarda tek taraflı testiküler hasarlanmaya yol açan testis torsiyonu deneysel modeli oluşturulduktan sonra sonra lokal ve kontrollü salınan IGF-I, GH ve FGF gibi büyüme faktörlerinin uygulanmasının ve sistemik olarak verilen GH tedavisinin aynı taraf ve karşı taraf testis germ hücre morfolojisi, fonksiyonu ve fertilite üzerine olan etkilerini araştırmak amaçlanmıştır. Büyüme faktörlerinin germ hücreler ve fertilite üzerine olan etkilerinin değerlendirilmesinde ortalama testiküler biyopsi skoru, ortalama semifer tübül çapı gibi histopatolojik değerlendirme ölçütleri, DNA flow sitometrik yöntemle haploid hücre yüzdesinin saptanması ve denekler dişi sıçanlarla katıldıktan sonra denek başına düşen yavru sayısının hesaplanması parametreleri kullanılmıştır.

Bu çalışma ile olumlu sonuçlar elde edilirse testis torsiyonu sonrası germ hücre hasarlanması olan hastalarda sağ kalan germ hücre fonksiyonlarını artırarak fertiliteyi güçlendirecek bir tedavi yöntemini geliştirmek mümkün olabilir.

2. GENEL BİLGİLER

Testis torsiyonu ilk defa 1840'da Delasiauve tarafından tanımlanmıştır. 25 yaş altındaki 4000 erkekten birinde testis torsiyonu görülmektedir.[1,19] Testis torsiyonu; akut skrotum bulguları ile başvuran çocukların 1/3-1/4'ünde akut skrotum klinik tablosunun nedenidir.[75] Testisin vasküler pedinkül ekseninde dönüş yapması nedeniyle gelişen, testisin dolaşımının bozulması ve acil detorsiyon yapılmaz ise testis nekrozu ve kaybı ile sonuçlanan bir durumdur.[1,2] Bu nedenle testis torsiyonu çocuklarda, akut skrotumun en sık nedeni olmasa da sonuçları itibari ile en önemli nedenidir.[75]

Tunika vajinalis ile ilişkisine göre intravajinal ve ekstravajinal olmak üzere iki türlü torsiyon görülmektedir.

Ekstravajinal torsiyon: Ekstravajinal torsiyon; spermatik kord torsiyonu olarak da adlandırılır. Dönme tunika vajinalisin daha kraniyalindedir. Bu tür torsiyon intravajinale göre daha ender olup testis torsiyonlarının %6'sını oluşturur. Her iki tarafta da görülme sıklıkları eşittir. Testisin inişi sırasında tüm testis ve spermatik kord gevşek gözeli doku içerisinde torsiyona uğrayabilir[1,2,18] ya da testisin skrotumla olan bağlantısı zayıf olduğundan testis skrotum içinde de dönebilir. Yenidoğan testisi ve inmemiş testisler skrotuma fikse olmadıkları için spermatik kord kolaylıkla dönebilmekte ve ekstravajinal torsiyona gelişebilmektedir. Ekstravajinal torsiyonların %72'si prenatal dönemde %28'i postnatal dönemde oluşmaktadır. Prenatal torsiyonda, torsiyon süresi genellikle geri dönüşsüz testis hasarına neden olabilecek kadar uzundur. Asemptomatik skrotal şişme en sık başvuru nedenidir. Prenatal torsiyonda cerrahinin yeri, çoğunlukla tanı koymak ve oluşabilecek karşı testis hasarlanmasını önlemek ile sınırlıdır. Eğer ekstravajinal torsiyon postnatal dönemde olursa erken tanı ve acil cerrahi tedavi ile testisin kurtarılması mümkün olmaktadır.[1,2]

İntravajinal torsiyon: Epididim ve testisin posteriyor kısmının epidimin hemen üzerine kadar tunika vajinalis ile örtülmesi testise yeterli hareketliliği sağlarken testisi skrotumda posteriyora doğruda sabitleştirmektedir. Tunika vajinalisin spermatik kordu normalden daha yukarıdan sarması "*bell-clapper deformitesi (çan tokmağı)"* olarak adlandırılmaktadır. Bu deformitede testis fikse olmayarak intravajinal kısımda daha mobil olmaktadır ve daha fazla yatay durmaktadır. Bu durumda tunika vajinalis içinde spermatik kord torsiyonuna eğilim artmaktadır. Bu bölgede gelişen torsiyonlar intravajinal testis torsiyonu olarak adlandırılmaktadır. İntravajinal torsiyonların daha ender bir formunda testis ve epididim arasında anatomik olarak ayrılma vardır ve sadece testis kendi etrafında dönebilmektedir.[1,2] İntravajinal testis torsiyonu 3-30 yaşlar arasında daha sık görülmekte olup, sol taraf sağa göre daha sık torsiyone olmaktadır.

Testis torsiyonunun gelişiminde rol aldığı düşünülen etyolojik faktörler arasında; travma, fiziksel aktivite, aşırı hareketlilik, kremaster kası kontraksiyonları, testisteki pubertal değişiklikler ve alta yatan inmemiş testis yer almaktadır.[1,2] Travma testis torsiyonu riskini arttırmaktadır. Testis torsiyonu olgularının %25'nde travma öyküsü vardır.[1,2] Soğuk havada spermatik kord torsiyonunun daha sık görülmesi ve anestezi uygulandıktan sonra torsiyonun redükte olması kremaster kasının ya da dartosun kontraksiyonun testis torsiyonunun başlamasında önemli rol oynadığını düşündürmektedir. Pubertede testis torsiyonu daha sık görülmektedir. Artan testesteron seviyesinin; testisin ani büyümesine yol açarak ya da nokturnal seks yanıtı döngüsü sırasında testisde elevasyon ve rotasyon hareketlerinin daha sık oluşmasına neden olarak testis torsiyonu gelişmesinde etkili olabileceği ileri sürülmektedir [1-3].

2.1. KLİNİK BULGULAR

Testis torsiyonu adolesan dönemde daha sık olarak görülür. Genel olarak testis torsiyonunun görüldüğü dönemler ise erken yenidoğan dönemi ve 13 ile 16 yaş arasındaki puberte dönemidir. Testis torsiyonu genellikle testiste, karnın alt kadranlarında, ya da kasıkta ani ağrı ile birlikte, bulantı ve kusma ile başlar. Testis

torsiyonu görülen adolesanların yaklaşık 1/3'ünde intermittan ağrı öyküsü vardır. Kısa süreli ağrılar ise kendiliğinden düzelen inkomplet torsiyonu düşündürür. Testis ve epididimde nekroz gelişmedikçe, palpasyon anında ağrı vardır. Fizik incelemede o taraf skrotumda kızarıklık, ödem ve ileri derecede hassasiyet tespit edilir. Testisin yukarı doğru kaldırılması vasküler oklüzyonu ve ağrıyı arttırır. Buna "*Prehn*" bulgusu denir. Tedavi edilmez ise testiste infarktla birlikte skrotumda mavimsi bir renk değişimi ortaya çıkar. Tunikadaki ödem sıvısının effüzyonundan kaynaklanan reaktif bir hidrosel, fizik inceleme bulgularını maskeleyebilir. [1,2] Ani karın ağrısı ile birlikte kasıkta kitlesi ve boş skrotumu olan olgularda, inmemiş testise bağlı testis torsiyonu düşünülmelidir. Bu olgularda, ağrı alt kadranlarda lokalize ise, akut karın tablosu ile karıştırılabilir. Bazılarında travma öyküsü bildirilmekle beraber çoğunda neden saptanamaz.[34]

2. 2. TANI

Klinik olarak bu hastalarda hastaneye baş vurmadan önceki ağrı süresi, bulantı kusmanın eşlik etmesi ve daha önceden intermitant torsiyon atakları öyküsü torsiyon tanısının konmasına kesin olmasada kısmen yardımcı olur. Ağrı süresi tanı için önemli bir faktördür. Ağrı süresinin 6 saatten az olması tanıyı testis torsiyonuna yaklaştırsa da kesin olarak tanı koydurmaz .[31]

Fizik incelemede önemli noktalardan biri kremaster refleksinin olmamasıdır. Birçok çalışmada kremaster refleksi yokluğunun testis torsiyonu tanısında en önemli ölçüt olduğu belirtilmiştir. Rabinowitz bu bulgunun testis torsiyonu ile %100 uyumlu olduğunu göstermiştir.[34] Karamazyn ve arkadaşlarının çalışmalarında kremaster refleksinin kaybolmasının testis torsiyonu ile birlikteliği %90 olarak verilirken, diğer akut skrotum tablolarında ise kremaster refleksinin %75 oranında devam ettiği belirtilmiştir.[34] Bu önemli bulgu ışığında testisin yukarıda olması ve yer değiştirmesi, skrotal eritemin eşlik etmemesi ve kıvamının yumuşak olması testis torsiyonu lehine önemli fizik inceleme bulguları olarak gösterilmiştir.

Tanı aracı olarak; renkli Doppler ultrasonografi (RDUSG), birçok merkezin akut skrotumun değerlendirilmesinde benimsediği temel radyolojik tetkiklerden biridir. Testis torsiyonu tanısında en önemli ölçüt testise gelen kan akımında azalma olması ya da kan akımının saptanmamasıdır. Testis torsiyonunu düşündürecek diğer bulgular ise skrotal duvarda ödem olmaması, nonhomojen kanlanan testis, normal epididim saptanmasıdır. Baker ve arkadaşları, akut skrotumlu hastalarda yapılan RDUSG sonucunda sensitiviteyi %88, spesiviteyi ise %98 olarak bulmuşlardır.[77] Baud [27] ve Acre [28] ise spermatik kordun RDUSG ile direkt olarak görüntülenmesinin testiküler torsiyon tanısında güvenilir olduğunu göstermişler ve spermatik kordun, dönmüş burgu şeklindeki görüntüsünün testiküler torsiyon tanısını koyduracağını söylemişlerdir.

Sonuçta; RDUSG, bazı izole vakalarda da yanlış tanı koyulmasına neden olup testis torsiyonu tanısını atlasada, kolay ulaşlabilirliği ve ucuz olması nedeniyle halen birçok merkez tarafından ilk tanısal test olarak kullanılmaktadır. Diğer taraftan bazı merkezlerde ise yanlış negatif sonuçlar doğuracak, hatalı tanıya neden olacak radyolojik çalışmalar yerine, acil cerrahi eksplorasyon önerilmektedir .[35]

Radyonüklid görüntüleme, testis torsiyonu tanısında kullanılan diğer bir tanı yöntemidir. '99m Technetium pertechnetate radyoizotop sintigrafisi testiküler kan akımın belirlemede kullanılmaktadır. İzotop, testis dokusuna özgü değildir. Bu teknik, çevre dokularda izotop ölçülebilirken, torsiyon durumunda testiste azalmış ya da durmuş kan akımına bağlı ölçüm yapılamaması esasına dayanır. Testis torsiyonu gelişen hastalarda radyoizotop tutulumu ya hiç olmaz ya da çok az tutulum olur, orşit, epididimit ya da appendiks testis torsiyonunda ise normal ya da artmış tutulum görülür. Radyonüklid görüntüleme yaklaşık 20-30 dakika sürer ve doğruluk oranı yaklaşık %95'ler civarındadır. Bununla birlikte birçok merkezde sistemin ve radyoizotopun hazırlanmasındaki ya da elde edilmesindeki güçlükler ve gece koşullarında bu tetkikin yapılamaması nedeniyle tanıda gecikmeler olabilmektedir. İskemik periyodun mümkün olan en kısa sürede tutulması amaçlandığından, kısa süreli başlangıcı olan akut skrotum olgularında bu tetkik daha az optimal gibi görülmektedir. Sintigrafik görüntüleme ayrıca testis parankimi, tunika bütünlüğü, travma, fıtık, hidrosel varlığı gibi gerekli anatomik detaylar da ortaya

koyamamaktadır.[40] Ayrıca Palitel ve arkadaşlarının[29] çalışmasında radyonüklid görüntüleme ile RDUSG'nin tanı koyma ve sensivite oranlarının birbirine yakın olduğu gösterilmiştir.

Epiditimit, orşit, apendiks testis ve epididim torsiyonları, inkarsere kasık fıtığı, akut hidrosel, idiopatik skrotal ödem, travmatik hematom, Henoch-Schönlein purpurasında testis tutulumu, skrotal yağ dokusu nekrozu, piyosel, testis tümörleri ve testisin lösemik infiitrasyonu testis torsiyonu ayırıcı tanısında yer alan ve akut skrotuma yol açan diğer durumlardır.[78] Bununla birlikte akut skrotum bulguları ile başvuran tüm çocuklar testis torsiyonu elimine edilinceye kadar, testis torsiyonu varmış gibi tedavi edilmelidir.[1,2] Tanı da şüphe varsa acil inguinal yada skrotal explorasyon yapılmalıdır.

2.3. TEDAVİ

Testis torsiyonunda tedavinin başarısı ağrının süresi ve tanının gecikmesi ile ters orantılıdır. Öykü ve fizik incelemede testis torsiyonundan şüphe edilirse vakit kaybedilmeden cerrahi eksplorasyon yapılması önerilmektedir.[35,36,79] Torsiyon tedavisinde, ilk olarak manuel detorsiyon denenebilir. Kieslinger ve arkadaşları testisin kaudalden kraniale ve medialden laterale doğru detorsiyone edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir.[41] Detorsiyone olan testiste ağrı geçer, testis skrotum içine gelir ve kord gevşer. Ama yinede sonraki torsiyon ihtimalini önlemek için cerrahiye ihtiyaç duyulabilir. Manuel detorsiyon başarısız olursa cerrahiye baş vurulmalıdır. Önce etkilenen taraf incelenir. Testise kan akımının başlaması için testis detorsiyone edilir. Prepubertal dönemdeki bir çocukta, bu manevra genellikle kolaydır ve dolaşım birkaç dakika içinde normale döner. Postpubertal dönemdeki bir çocukta, özellikle testiste hemoraji var ise, canlılığı belirlemek zordur. Testisin kan akımı hakkında, Doppler ultrasonografi ile ameliyat anında bilgi edinilebilir.[1,2] Testis nekroze ise orşiyektomi yapılır. Eğer testis nekroze değil ve korunacaksa birinci yöntem; testisin tunika vajinalise birkaç adet uzun sürede emilen ya da naylon gibi emilmeyen dikiş materyali ile tutturulmasıdır. Emilebilen dikiş materyali ile yapılan tespitlerde nüks ihtimali vardır. İkinci seçenek tunika vajinalis ters yüz edilerek ya da bir pencere

açılarak testisin skrotum duvarına geniş bir alanda temas ederek fibrozis ile yapışmasının sağlanmasıdır.[2]

Canlılığı şüpheli olan testislerin eksize edilip edilmemesi tartışmalıdır. Detorsiyon yapıp aynı testisi yerinde bırakmak ya da orşiyektomi yapıp karşı testis fertilitesini korumak çelişkisi konusunda birbirine tamamen karşıt görüşler bildiren yayınlar vardır. Erken detorsiyon cerrahisinin fertiliteyi koruduğu ancak uzun süreli torsiyondan sonra detorsiyon yapılmasının fertiliteyi etkilediği düşünülmektedir. Bu düşünceyi savunanların dayanak noktalarından birisi deneysel testis iskemi-reperfüzyon hasarlanmasında 4-6 saaten daha uzun süren iskeminin kalıcı doku hasarlanmasına yol açtığı konusunda kesin fikir birliği olmasıdır.[4,80] İnsanlarda ise 12 saaten uzun süreli iskemi sonrası reperfüzyonun karşı testiste kalıcı hasarlanma oluştuğu saptanmıştır.[4,81] Uzun süreli iskemi sonrası karşı testis kan akımının azalmasına bağlı aşırı miktarlarda oluşan reaktif oksijen radikalleri uzun süre sonra reperfüzyon oluşturulduğunda daha fazla artarak karşı testiste kalıcı hasarlanmaya neden olacak düzeylere ulaşabilmektedir.[4,80] Bu nedenle 12 saatten az iskemi süresi olan şüpheli testislerin yerinde bırakılması önerilmektedir.

Diğer bir görüşe göre ise aynı taraf testiste oluşan iskeminin kan-testis bariyerini hasara uğrattığı ve çocukta kendi spermatogoniasına karşı potansiyel otoimmunizasyon riski oluşturduğuna ilişkin önemli kanıtlar vardır. Adolesan dönemde iskemik testis fikse edilirse erişkin dönemde spermatogenezis ile ilgili sorunlar ortaya çıkabilmektedir. On yaşından küçük çocuklarda, spermatogenezis henüz oluşmadığından ve kan-testis bariyerinin olmaması nedeniyle iskemiye bağlı otoimmunizasyon riski düşüktür. Bu nedenle 10 yaşından küçük çocuklarda şüpheli testislerin yerinde bırakılmasını öneren yayınlar vardır.[1] On yaşından büyük iskemik testisi olan çocuklarda ise orşiyektomi önerilir.[1] Arap ve arkadaşlarının testis torsiyonu geliştikten sonra canlılığı şüpheli testisi yerinde bırakılan ve orşiyektomi yapılan iki grup hastayı karşılaştırdıkları çalışmalarında ortalama sperm sayısı açısında fark bulunamamış ancak orşiyektomi yapılan grupta sperm morfolojisinin ve motilitesinin belirgin olarak daha iyi olduğu gösterilmiştir.[19] Aynı çalışmada her iki grupta kontrol grubundan farklı olarak daha yüksek düzeyde anti-sperm antikorlarının varlığı gösterilmiş ancak anti-sperm antikorlarının yoğunluğu

açısından orşiyektomi yapılan ve yapılmayan gruplar arasında bir farklılık bulunmamıştır.[19] Ancak benzer bir çalışmada Anderson ve arkadaşları sperm morfolojisi ve motilitesi açısından orşiyektomi yapılan ve yapılmayan iki grup arasında belirgin farklılık gösterememişlerdir.[81]

Perinatal torsiyon nedeniyle atrofik testisi olan yenidoğanlarda, karşı taraf testiste fiksasyon yapılmasının gerekip gerekmediği diğer bir tartışma konusudur. Perinatal torsiyon, testisin inişi sırasında spermatik kordun torsiyonuna bağlı olarak meydana gelir ve karşı taraf torsiyon riski düşüktür. Bu konuda kesin karar vermek zordur, fakat adolesanlardaki torsiyonda mutlaka önerildiği gibi karşı taraf testisin eksplorasyonu ve fiksasyonu yapılabilir.[1,2] Testis torsiyonu olan adolesanların yaklaşık 1/3'ünde daha önceden aralıklı olarak gelen ağrı hikayesi vardır. Bu nedenle tekrarlayan aralıklı testiküler ağrı ile başvuran adolesanlarda, fizik incelemede testis özellikle horizontal planda ise bilateral orşiopeksi yapılabilir.[1,2]

Sonuç olarak testis torsiyonunun tedavisi acil eksplorasyon olup, testis dokusu canlı ise fiksasyon yapılmalıdır. Orşiyektomi yapılanlarda karşı testis mutlaka fiske edilmelidir. Semptomların başlangıcından itibaren 6 saat içerisinde ameliyat edilen olgulardan iyi sonuçlar alınmıştır. Şüpheli durumlarda da eksplorasyon en uygun yaklaşımdır.[2] Böylece testisin canlılığını sağlama oranının %80-90'lara kadar yükseldiği ileri sürülmüştür.[2,78]

2. 4. PROGNOZ

Testis torsiyonu hastaların %33-68'sinde tek taraflı testis atrofisi ile sonuçlanmaktadır. Testis torsiyonunda torsiyon süresi ve derecesi çok önemlidir. Köpeklerde yapılan çalışmalarda 2 saat süren 4 tam dönmenin geri dönüşsüz değişikliklere yol açtığı ancak 12 saate kadar devam eden 360 derece dönmenin hiçbir değişikliğe yol açmadığı gösterilmiştir.[2] İnsanlarda 4 saat süren torsiyonun daha sonra testiste atrofiye yol açabildiği ve 12 saat düzeltilmeyen torsiyonun mutlak atrofiye neden olduğu klinik olarak kanıtlanmıştır. Ancak genellikle torsiyondan sonraki ilk 4-8 saat çok önemlidir. Çeşitli klinik çalışmalarda testis torsiyonları, detorsiyon ile tedavi edilmiş çocukların uzun süreli takiplerinde semptomların 6 saatten az olan hastaların testislerinin %92'sinin 6-12 saat arasında olanların

%62'sinin, 12-24 saat arasında olanların %38'inin, 24-48 saat olanlarda ise %11'nin morfolojik olarak normal olduğu bildirilmiştir.[2,83-86] Yine başka bir çalışmada testisin 180 derecelik torsiyonu 3-4. günlerde, 360 derecelik torsiyonu 12-24 saat içinde,720 derecelik bir torsiyonda iki saat içinde testisin canlılığını bozduğu görülmüştür.[2,87] Testis torsiyonu nedeniyle opere edilen ve testisi korunan hastaların %60'ında korunan testisin iki yıl içinde atrofiye uğradığı gösterilmiştir. Torsiyon süresi ile histopatolojik değişikliklerin derecesinin, testisin korunma oranının ve ortaya çıkan atrofinin ilişkili olduğu yapılan klinik çalışmalarda kanıtlanmıştır. [88]

Aynı taraf testiste torsiyon ve detorsiyon sonrası gelişen iskemi reperfüzyon hasarı germ hücre hasarlanması ve azalmış spermatogeneze yol açmaktadır. Bunun yanı sıra tek taraflı torsiyon sonrası aynı taraf testis ile birlikte karşı taraf testisin de etkilendiği, seminifer tubul morfolojisinin bozulduğu, germ hücrelerinin hasarlandığı, germ hücre olgunlaşmasında ve spermatogenezde azalma olduğu birçok deneysel çalışmada, sperm yoğunluğunda ve motilitesinde azalma ve fertilite oranlarında düşme ise karşıt görüşler olsada birçok klinik çalışmada gösterilmiştir.[6,19-21,23,25,26,89] Bazı çalışmalarda testis torsiyonu sonrasında sperm konsantrasyonu, morfolojisi ve motilitesinde azalma saptanmıştır.[19,21,23,90] Bir çalışmada testis torsiyonu sonrası tek taraflı testis kaybı gelişen hastaların %57'sinde 5 yıl sonra sperm sayısı normalden düşük bulunmuştur.[18]

2.5. İSKEMİK TESTİS DOKUSUNDAKİ HİSTOPATOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER VE HASARLANMA MEKANİZMALARI

Testis torsiyonunda, önce venöz tıkanıklık oluşur, venöz dönüş engellenerek testiste konjesyon ve ödem gelişir. Bu durum testiste şişme ve ağrıya yol açar. Testisin tunikası elastik olmadığından venöz konjesyon arteriyel dolaşımı bozar. Bir süre sonra venöz tromboz daha sonra arteriyel tromboz ve testiküler infarkt gelişir. Süre uzadıkça testis nekroza gider.[1,2]

İskemi sonrası iki saat içinde dokuda kanama, ödem ve germinatif hücrelerde dejenerasyon oluşur. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada 45 dakikalık sıcak iskemi

sonrası spermatogenik epitelde belirgin hasarlanma olduğu ve bu hasarlanmanın olaydan 2 ay sonra da devam ettiği gösterilmiştir.[125,132] Sıçanlarda 1 saatlik 720 derecelik testis torsiyonu sonrası spermatogenezde kalıcı azalma gösterilmiştir.[2] İlerleyen saatlerde ödem ve kanamanın daha fazla artmadığı ancak dejenerasyonun arttığı bildirilmiştir.[7,9,10] Dört saatlik iskemiden sonra ağır Sertoli hücre hasarı görülürken, Leydig hücre hasarı 10-12 saatlik iskemiden sonra ortaya çıkar. İskemi süresi 24 saati bulunca, sperm ve spermatid sayısı oldukça azalarak nekroz ortaya çıkar.[6] Karşı taraf testislerde ise en sık gözlenen histopatolojik değişiklikler, fokal organizasyon yetersizliği ve lümende immatür germ hücrelerinin görülmesidir.

Memeli testisi oksidatif serbest radikal hasarlanmasına çok yüksek oranda duyarlıdır. Germ hücreleri, artmış oksijen basıncı, radyasyon ve ısı değişiklikleri sonucunda ya ileri derecede hasarlanmakta ya da ölmektedirler.[4,95] İskemi, reperfüzyon hasarının testis torsiyonu ve detorsiyonu sonrasında aynı taraf testis üzerine etkileri ile ilgili tartışmalı çalışmalar vardır. Bazı yayınlarda torsiyon sonrası detorsiyonun her hangi bir etkisi olmadığı öne sürülürken,[4,5,12,96] diğerlerinde belirgin biyokimyasal ve histopatolojik değişikliklerin oluştuğu gösterilmiştir.[4,12-14,97-99] İskemik dokular reperfüze edildiğinde iki basamakta hasarlanma oluşmaktadır.[4,100] İlk basamak reperfüzyondan hemen sonra oluşup, birkaç saat sürmekte ve bu dönemde geri dönüşlü hücresel hasarlanma oluşmaktadır.[4,100] Kısaca mitokondrilerde aşırı serbest oksijen radikali üretimi nedeniyle mitokondri fonsiyonu ve oksidatif fosforilizasyon bozulmaktadır. Dokular bu aşamada glutatyon peroksidaz sistemi gibi antioksidan savunma mekanizmalarını kullanarak oksidatif stresi nötralize edebilmektedirler.[4,100] İkinci basamak hasarlanma ise aylar ve günler boyunca sürüp, oksidatif stresin devam etmesi nedeniyle gelişerek, inflamasyon, nötrofil infiltrasyonu ve makrofaj aktivasyonu sonucu gelişen geri dönüşsüz doku hasarı ile karekterizedir.[4,101] Uzun süreli iskemi sonrası torsiyone testis kan akımının azalmasına bağlı oluşan reaktif oksijen radikalleri, geç reperfüzyon oluşturulduğunda daha fazla artarak karşı testiste kalıcı hasarlanmaya neden olacak düzeylere ulaşabilmektedir.[4,21,22,102] Uzun süreli testis torsiyonu sonrası karşı testisten alınan biyopsilerde ciddi hipoksik ve iskemik olaylara yol açabilecek ve vasküler hasarlanma bulguları, mikrovasküler trombüsler saptanmıştır. Hipoksi ve iskemi ile karşılaşan dokularda artmış damar geçirgenliği, hücre içi ve dışı ödem ve hücre

apopitozu ve nekrozu görülmektedir. Nitrik oksit iskemi reperfüzyon hasarı sonrası serbest oksijen radikalleri ile hızla reaksiyona girip hücre apopitozunu başlatabilen bir moleküldür. 3 saatlik testis torsiyonu sonrasında düzeylerinin apopitoz oluşturabilecek derecelerde arttığı gösterilmiştir.[4,103]

Son yıllarda yapılan çalışmalarda testis torsiyonu ve torsiyon onarımı sonrasında aynı taraf testiste klasik iskemi reperfüzyon hasarının gerçekleştiğini polimorfonükleer lökositlerden salınan reaktif oksijen radikallerinin germ hücre apopitozundan sorumlu olduğunu ve bunun spermatogenezdeki azalmaya neden olduğu gösterilmiştir.[8,92-94] Bu bulgular germ hücre hasarlanmasının Leydig ve Sertoli hücrelerindeki birincil zedelenme sonucunda ya da kan akımının kalıcı azalması sonucunda oluşmadığını göstermiştir .[8,92-94]

2.5.1. TESTİS TORSİYONUNDA KARŞI TESTİSTE ZEDELENME

Tek taraflı testis torsiyonun sadece etkilenmiş testiste değil, karşı taraftaki testistede hasarlanma ile sonuçlandığı yargısı da diğer tartışmalı konulardan biridir.[4,12,104] İlk kez 1978 yılında Krarup, tek taraflı testis torsiyonu nedeni ile tedavi edilmiş 18 erkek yetişkin hastanın sadece birinin fertil olduğunu rapor ederek,tek taraflı testis torsiyonunun karşı testisi de zedeleyeceğine dikkati çekmiştir.[26] Ancak daha sonra yayınlanan bazı çalışmalar tek taraflı testis torsiyonu sonrasında karşı testisin etkilendiğini belirterek Krarup'un bulgularını desteklerken[4,12-17,89,106] diğerleri karşı testisin etkilenmediği yönünde karşıt görüş belirtmişlerdir.[4,92-94,97-99] Bu farklılıklar çalışmalarda değişik hayvan modelleri kullanılmasından ya da testiküler iskemi reperfüzyon durumunun deneysel model olarak tam olarak oluşturulamamasından kaynaklanmış olabilir. Bazı çalışmalarda deneysel testis torsiyonu oluşturulan sıçanlarda, karşı testiste biyokimyasal göstergelerde artış, DNA değişiklikleri ve apopitoz gösterilmiştir[4,89,91,107] Sıçanlarda yapılan diğer çalışmalarda ise uzun iskemi süreleri sonrasında bile karşı testisde histopatolojik hasarlanma, sperm sayısında azalma ya da morfolojisinde bozulma gösterilememiştir. Saba ve arkadaşları doku hasarlanmasının göstergesi olarak kabul edilen histopatolojik değişikliklerin iskemi ve reperfüzyon zamanlarına bağlı olarak değişebildiğine, ancak biyokimyasal

değişikliklerin testis torsiyonunda testis hasarlanmasını saptamada daha duyarlı olduğuna ve morfolojik değişiklikler gelişmeden erken hücresel değişiklikleri gösterebileceklerine dikkat çekmiştir.[4,108] Klinik yayınların bazıları da tek taraflı testis torsiyonu sonrasında karşı testisin etkilendiği görüşünü desteklemişlerdir. Sperm sayısının azalmasının yanı sıra canlılığı ve morfolojisinin de önemli ölçüde etkilendiği görülmüştür.[109] Yine klinik çalışmalarda torsiyon süresi 24 saati geçen ve orşiyektomi yapılan az sayıda hastada karşı taraf testiste spermatogenez normal görülürken, detorsiyon ve fiksasyon yapılan hastalarda karşı taraf testiste patolojik spermatogenez gözlenmiştir.[88] Karşı taraf testisteki morfolojik değişikliklerin torsiyone testisteki değişikliklerin şiddeti ve torsiyon süresinin uzunluğu ile ilgili olduğu ve torsiyone testisin skrotumda bırakılmasının karşı taraf testisdeki dejeneratif değişikliklere neden olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca testis torsiyonu nedeni ile ameliyat olmuş hastalarda ileriye dönük yapılan, çalışmalarda hastaların çoğunluğunda karşı taraf testisin endokrin fonksiyonu normal bulunurken, torsiyon süresi 8 saati geçmiş olanların FSH ve LH seviyeleri yüksek bulunmuştur.[110]

Tek taraflı testis torsiyonunda karşı testisinde hasarlandığı görüşü genel olarak kabul görmesine rağmen, bu zedelenmenin hangi mekanizma ile olduğu tartışma konusudur. Karşı testiste bu hasarlanmayı açıklamak için altta yatan doğumsal testis defekti, birlikte olabilecek ek bir anomali varlığı, karşı testiste geçirilmiş subklinik torsiyon atağı, etkilenmiş testisten salınan, akrozomal enzimlerin karşı testisi hasarlandırması, kan testis bariyerinin bozulması sonrasında oluşan antisperm antikorları, reperfüzyon hasarı sonrasında oluşan testiküler oksidatif stres nedeniyle gelişen germ hücre apopitozu, refleks olarak karşı testis kan akımındaki azalma sonucu oluşan hipoksik ürünler ve spermatogenezde primer bozukluk gibi hipotezler ileri sürülmüştür.

Tek taraflı testis torsiyonu sonrası görülen karşı testisdeki morfolojik değişiklikleri ve azalmış fertiliteyi açıklamaya çalışan bir görüş her iki testiste de spermatogenezde altta yatan bir patolojinin varolduğudur. Bu görüşü araştırmak için yapılan bazı klinik ve deneysel çalışmalarda torsiyone testisin karşı taraf testis üzerindeki etkisinin minimal olduğu ve torsiyondan önce her iki testiste var olan bir patolojinin spermatogenezi etkilediği öne sürülmüştür.[111] Torsiyon sonrası fertilitenin

azalmasına yol açan faktörün germinal epitelde konjenital displazi ya da süspansiyon sisteminde ya da parankimdeki defekt olduğu belirtilmiştir.[112]

Bunun yanında, tek taraflı testis torsiyonu sırasında karşı taraf testiste hasarlanmaya yol açan diğer faktörler arasında, zedelenmiş taraftan çıkan akrozomal enzimler ve subklinik karşı testis spermatik kord torsiyon epizotları[113] ve varikosel gibi bazı raslantısal durumların testis torsiyonu ile birlikte görülmesi öne sürülmüştür.[33]

Tek taraflı testis torsiyonunda karşı testisteki hasarlanmayı, spermatogenezin bozulmasını ve morfolojik değişiklikleri açıklamaya çalışan ve üzerinde oldukça fazla durulan bir mekanizmada immünolojik mekanizmadır. 24 saatlik testis torsiyonu sonrası orşiyektomi yapılan hastalarda sperm analizinin normal, detorsiyon yapılan hastalarda ise anormal bulunması karşı taraf testisin torsiyone testisin varlığından etkilendiğini düşündürmektedir. Bunu araştırmak için yapılan deneysel çalışmalarda çeşitli sonuçlara varılmıştır. Orşiyektomi ile antijenik stimulusun ortadan kaldırıldığı ve antilenfosit globulin verip splenektomi yaparak immünsüpresyon sağlayıp karşı taraf testisteki değişikliklerin önlenebildiği öne sürülmüştür.[114] İskemik testisten çıkan otoantijenlere karşı oluşan antisperm antikorların karşı testiste immünolojik yanıt başlatığı ve hemen yapılan orşiyektomi[115,116] ya da kortikosteroid tedavisiyle[1] bu cevabın engellenebileceği bildirilmiştir. Torsiyon sonrasında karşı taraf testiste olan değişikliklerin immün cevaba bağlı olduğunu ileri süren değişik yazarlar karşı testisin korunması için farklı tedavi yolları üzerinde durmuşlardır. Madarikan ve arkadaşları, deneysel bir çalışmada detorsiyon ve hidrokortizon tedavisi ile beraber karşı testisin fiksasyonunun testisi koruduğunu gösterirken[117] Cosentina ve arkadaşları,[14] sıçanlarda yaptıkları çalışmalarda detorsiyon yapılsa bile aynı taraf testiste rejenerasyon olmadığını ve torsiyone olmuş testisin fertiliteyi ve fekunditeyi azalttığını ve fertiliteyi korumak için orşiyektomi yapılması gerektiğini belirtmiştir.[118]

Otoimmünizasyonun karşı taraf zedelenmeye yol açtığı görüşünün oldukça kabul görmesine rağmen bazı çalışmalarda insanda testis torsiyonu sonrası otoimmünizasyonu destekleyecek antisperm antikorları gösterilirken,[104,118]

bazılarında ise bu bulgu desteklenmemiştir.[124] Mastrogiacocomo ve arkadaşları ilk defa testis torsiyonu geçiren erkeklerin menilerinde antisperm antikorlarının varlığını göstermiş ve bu antikorların düzeylerinin infertilite ve sperm motilite değişiklikleri ile korelasyon gösterdiğini belirtmişlerdir.[90] Arap ve arkadaşlarının testis torsiyonu geliştikten sonra canlılığı şüpheli testisi yerinde bırakılan ve orşiyektomi yapılan iki grup hastayı karşılaştırdıkları çalışmalarında her iki grupta kontrol grubundan farklı olarak daha yüksek düzeyde anti-sperm antikorlarının varlığını göstermiş ancak anti-sperm antikorlarının yoğunluğu açısından orşiyektomi yapılan ve yapılmayan gruplar arasında bir farklılık bulamamışlardır.[19,117] Ayrıca direkt immünfloresan histokimyasal çalışmalar ile spermatozoal otoantikorların karşı testiste depolanması gösterilememiştir.[45] Başka bir çalışmada ise spermatik kordun torsiyonu modelinde aynı taraf testisin varlığının karşı taraf testis hasarlanması için gerekli olmadığı saptanmıştır[126] ve bu otoimmünizasyon teorisinin karşı taraf testis hasarlanmasına yeterli açıklama getirmediğini düşündürmüştür.

Normal spermatogenetik fonksiyonun devam etmesi için düzenli kan akımının en önemli faktör olduğu bilinmektedir. Tanyel ve arkadaşları çalışmalarında testis torsiyonunda karşı testisteki zedelenme ve fertilitedeki azalmayı açıklamak için torsiyon ve detorsiyon sırasında ve detorsiyonu takip eden sürede her iki testisin kan akımı elektromagnetik flowmetre kullanılarak ölçülmüşlerdir.[17,121] Karşı testis kan akım hızının torsiyon sırasında kademeli olarak azaldığı ve detorsiyondan sonra ise yine kademeli olarak arttığı saptanmıştır. Torsiyon sırasında torsiyone testisten çıkan afferent uyarının bir refleks ark başlatarak kontrolateral testis kan akımında da azalmaya yol açtığı ve kan akımının kritik bir süre içinde sürekli olarak azalmasının spermatogenezde bozukluğa yol açabileceğini ileri sürülmüşlerdir.[121] Yine aynı amaçla yapılan başka bir deneysel çalışmada 133Xe klirens tekniği ile testis torsiyonu sırasında bilateral kan akımı ölçülmüştür.[122] Testis torsiyonunun aynı taraf ile beraber karşı taraf testis kan akımı azalmasına neden olduğu ve kan akımı azalmasının iskemiye neden olarak karşı taraf testisteki histopatolojik değişikliklerin görülmesinden ve spermatogenezin bozulmasından sorumlu olduğu ileri sürülmüştür. Bu teoriyi destekleyen diğer çalışmalarda karşı testiste kan akımının azalmasının hipoksik ürünlerin artmasına neden olduğu gösterilerek, 6-OH Dopamin ve guanitidin monofosfat gibi kimyasal sempatektomi yapan ajanların uygulanması

sonrasında karşı taraf testisteki hipoksik parametrelerde kontrol grubuna göre azalma olduğu görülmüştür.[12,46,123,127,128] Bu da karşı taraf testisteki zedelenme ve kan akımındaki azalmada sempatik sistemin refleks uyarılmasının rol oynadığını, kimyasal sempatektominin fertilite ve fekunditeyi koruduğunu düşündürmüştür.[46] Ancak bu bulguların tam tersine, testis torsiyonu sonrasında karşı testis doku oksijen konsantrasyonunu ve parsiyel oksijen basıncını ölçen tek bir çalışmada karşı testiste hipoksi oluşturacak kadar kan akımında azalma olmadığı gösterilmiştir.[4,131] Testiküler damarların tam bağlanmasının karşı testiste hasara yol açmaması, aynı taraf kan akımının torsiyon sırasında bir miktar devam etmesinin karşı taraf hasarlanma için gerekli olduğu düşüncesine neden olmuştur.[119] Yine testis kan akımı üzerinde duran diğer bir çalışmada, kan akımı *"radiolabeled mikrosfer distrübisyon"* tekniği ile ölçülerek; testis kan akımının kontrol aynı taraf ve karşı taraf testis kan akımlarına göre torsiyone testiste anlamlı oranda azaldığı, karşı taraf testiste ise azalma saptanmakla beraber deney ve kontrol grupları arasında kan akımı değerlerine göre istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı anlaşılmıştır. Torsiyonun düzeltilmesinden sonra ise nekroza gitmeyen aynı taraf ve karşı taraf testisin kan akımı kontrol değerlerine dönmüştür. Bu çalışmalardan sonra torsiyonu düzeltilen testiste ve karşı testisde ortaya çıkan şiddetli değişiklik ve hasarlanmanın, reperfüzyon hasarına mı yoksa iskemiye mi bağlı olduğu sorusu gündeme gelmiştir.

Son zamanlarda en çok tartışılan konulardan birisi de testis torsiyonu sonrasında aynı taraf ve karşı taraf testis üzerine iskemi reperfüzyon hasarının etkileridir. Tek taraflı testis torsiyonu sonrası aynı taraf kan akımının azalmasının reaktif oksijen radikallerinin aşırı oluşumuna ve doku hasarlanmasına neden olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir.[4] Reperfüzyon zamanının karşı testis hasarlanmasının derecesi açısından belirleyici olduğu ve iskemi sonrası oluşan oksidatif hasarın değişik düzeylerde zaman bağımlı olarak reaktif oksijen radikallerinin artmasına yol açtığı ortaya konulmuştur.[4] Ancak iskemi-reperfüzyon hasarına maruz kalan karşı testiste geç dönemde oluşan hasarlanmadan sorumlu olan fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmalar ve reaktif oksijen radikallerinin rolü henüz açıklığa kavuşmamıştır.[4,45] Spermatik kord torsiyonu sonrasında sistemik antioksidan düzeylerinde artış olmadığının gösterilmesi, sistemik oksidatif durumun testis torsiyonundan etkilenmediğini ortaya koymuştur.[4,10,99,108]Ayrıca Akgür ve arkadaşları aynı taraf

testisin kontralateral hasarlanmadan sorumlu olmadığı, nöral ya da vasküler mekanizmaların etkili olabileceği sonucuna varmışlardır.[4,10,99] Biyokimyasal bir bakış açısıyla kontralateral testiküler hasarlanmanın serbest oksijen radikalleri ile oluşan ve klasik demir ile katalize edilen hidroksil radikalinin oluşumu ya da kalsiyum bağımlı yolaklarla oluşan hücre hasarlanmasından bağımsız bir mekanizmayla oluştuğu sonucuna varılmıştır.[4,45]

Turner ve arkadaşlarının sıçanlarda 1 saatlik 720 derecelik testis torsiyonu sonrası spermatogenezde kalıcı azalmayla beraber germ hücrelerine spesifik apopitozun oluşturduğunu insitu TUNEL ve DNA basamaklama yöntemleri ile ortaya koymalarından sonra testis torsiyonu sonrasında apopitozun etkileri gündeme gelmiştir.[93,94] Bu çalışmada ve destekleyici diğer çalışmalarda spermatogenezdeki azalamanın Leydig ve Sertoli hücrelerindeki birincil zedelenme sonucunda ya da kan akımının kalıcı azalması sonucunda oluşmadığı, ancak germ hücrelerine spesifik apopitozun bu durumdan sorumlu olduğu gösterilmiştir.[8] Apopitozdaki artış ilk defa torsiyondan dört saat sonra görülmüştür. Polimorfonükleer hücrelerin subtunikal venüllere olan artmış adezyonu ve lipit peroksidasyonu ile karakterize reaktif oksijen radikallerinde artış, bir saatlik torsiyon ve detorsiyon sonrasında gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise torsiyonun düzeltilmesinden önce sıçanlara serbest oksijen radikal inhibitörlerinin verilmesinin otuz gün sonra incelendiğinde günlük sperm oluşturma kapasitesini ve testis ağırlığını arttırdığı saptanmıştır.[8] Bu çalışmaların sonuçları testis torsiyonu ve torsiyon onarımı sonrasında klasik iskemi reperfüzyon hasarının gerçekleştiğini, bunun sonucunda nötrofil ve makrofajlardan salınan artmış reaktif oksijen radikallerinin ve nitrik oksidin özellikle seminifer epitelin bazal tabakasında yer alan spermatogenik hücrelere spesifik germ hücre apopitozundan sorumlu olduğunu göstermiştir.[8,134-137] İskemi ve reperfüzyon hasarı nötrofillerin, makrofajların, inflamatuvar sitokinlerin ve adezyon moleküllerinin ileri derecede aktivasyonu, tromboza eğilimin artması ve aşırı hücre içi kalsiyum salınımı ve serbest oksijen radikallerinin oluşturulması ile karekterizedir.[138] Serbest oksijen radikalleri hücre ve mitokondri zarında lipid peroksidasyonuna ve DNA hasarlanmasına yol açmaktadırlar.[4] Sıçan testisinde iskemi reperfüzyon hasarı sonrasında gelişen germ hücre apopitozun mitokondri bağlantılı bir molekül olan Bax ve Fas-Fasl bağlantılarını ve yollarının kullanılması ile gerçekleştiği ortaya

konmuştur.[8] İskemi reperfüzyon hasarından sonra Sertoli ve Leydig hücrelerinde apopitoz gelişmemektedir, sadece etkilenmiş Leydig hücrelerinde geçici olarak hormon sentezi durmaktadır.[133,138,139]

2.5.2. TESTİS TORSİYONU SONRASI KARŞI TESTİS HASARLANMASINI ÖNLEMEYE YÖNELİK DAHA ÖNCE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Testis torsiyonu sonrası karşı testis hasarlanmasını önlemeye ve fertiliteyi korumaya yönelik ilaçların ve ajanların kullanıldığı birçok deneysel çalışma yapılmıştır. Ancak bu çalışmaların büyük çoğunluğunda ajanlar testis torsiyonu oluşturulmadan hemen önce uygulanmıştırki, bu durumun klinik uygulamaya yansıtılması mümkün değildir. Ayrıca bu tedavi yöntemlerinin hiçbiri insanlar üzerinde kullanılmamıştır.

Deneysel çalışmalarda testis torsiyonu oluşturulmadan önce superoksid dismutaz, katalaz, Zn aspartat, melatonin, etil pürivat, taurin, trimetozin, dekspantenol, L-karnitin gibi antioksidan ajanların uygulanmasının reperfüzyon ve serbest oksijen radikallerine bağlı karşı testis hasarını önlediği gösterilmiştir.[51-57,99] Antioksidan başka bir ajan olan allopurinolün bazı çalışmalarda etkili olduğu gösterilirken diğerlerinde bu bulgu desteklenmemiştir.[58] Yine antioksidan etkisi olan Vitamin E'nin karşı testisi koruyucu etkisi gösterilememiştir.[59] Diğer bir çalışmada reperfüzyon öncesi vasküler endotelyal büyüme faktörü uygulanmasının altmış gün sonra iskemi ve reperfüzyona bağlı apopitozu aynı taraf testiste önleyebildiği ortaya konmuştur .[60]

Apopitozu önlemeye yönelik calpain inhibitörlerinin iskemi oluşturulmadan 10 dk önce uygulanmasının koruyucu etkisi gösterilmiştir.[61] Eritrosit apopitozunu önlemeye yönelik etkisi olan ve diğer organlarda iskemi reperfüzyon hasarını önlediği gösterilen eritropoetinin reperfüzyondan hemen önce uygulanmasının koruyucu etkisi olduğu saptanmıştır.[62,63] Başka bir çalışmada iskemi ve perfüzyonda apopitozu önlemeye yönelik olarak iskemi reperfüzyon oluşturulduktan sonra antiinflamatuvar bir ilaç olan intraperitoneal sülfosalazin uygulamasının apopitozu

önlediği gösterilmiştir.[64] Bunun yanı sıra apopitozu önlemeye yönelik fosfodiesteraz 5 inhibitörleri, dihidroandrosteron, propofol, diklofenak, resveratrol, insulin benzeri büyüme faktörü 1, capsaisin gibi ajanların kullanılmasının testis hasarlanmasını karşı koruyucu olduğu çeşitli yayınlarda bildirilmiştir.[65-70,151]

2.6. BÜYÜME FAKTÖRLERİ

Testislerin normal gelişimi, farklılaşması ve fonksiyonlarının genetik faktörlerin yanı sıra hormonlar, büyüme faktörleri ve sitokinlerin fonksiyonlarını içeren endokrin ve parakrin yolların aracılığıyla gerçekleştiği bilinmektedir. [20,24,37,39,47] İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF), büyüme hormonu (GH), Epidermal büyüme faktörü(EGF), Tümoral büyüme faktörü (TGF) ve FGF (fibroblast büyüme faktörü), postnatal ve erişkin memelilerin testiküler hücrelerinde reseptörleri gösterilmiş faktörlerdir. Bu faktörler testiküler kord morfogenezisi, testiküler hormon sekresyonunun düzenlenmesi ve spermatogenezin kontrolünü içeren önemli testiküler aktivitelerin gerçekleştirilmesinde, testis gelişimi, ve farklılaşmasında rol almaktadırlar.[20,24,37,39,47]

2.6.1. İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRÜ (IGF)

IGF'ler insülinle yapısal olarak ilişkili çoklu metabolik ve anabolik fonksiyonları olan polipeptid hormon ailesinde yer almaktadırlar. IGF'lerin çok çeşitli dokularda sentezlenerek, otokrin ve parakrin metabolizmalarla etki gösterdikleri ileri sürülmüştür.[24] IGF'ler esas olarak karaciğerde büyüme hormonu uyarısıyla sentezlenirler ve sentezlenmeleri büyüme hormonu tarafından kontrol edilir. Karaciğerde sentezlenen IGF-I dolaşıma verilir ve IGF-I bağlayıcı proteinler (IGFBP) tarafından dolaşımda taşınarak hedef dokulara ulaştırılırlar.[20,24,37,39,47] IGF-I'in karaciğer dışında da sentezlendiği ve hücresel büyümeyi ve farklılaşmayı artıran parakrin bir faktör olarak da fonksiyon gördüğü bilinmektedir.[24] IGF-I'lerin hücre çoğalmasının pozitif düzenleyicileri olarak etki gösteren mitojenik peptitler oldukları ve hücreleri çok sayıda apopitotik uyarandan korudukları.[24]

IGF'lerin biyolojik etkileri insülin reseptörü ve tip 1 ile tip 2 IGF reseptörlerini içeren hücre yüzey reseptör ailesi aracılığıyla düzenlenmektedir. IGF–I reseptörü bir membran tirozin kinazıdır, fetal ve postnatal dokulardaki çok sayıda hücre tipinde yaygın şekilde eksprese edilmektedir. IGF–I etkilerini esas olarak IGF–I reseptörüne bağlanarak ve kısmende insülin reseptörüne bağlanarak göstermektedir.[24,142]

IGF'ler üreme organları üzerine çok önemli etkiye sahiptirler.[24] IGF-I'in santral olarak etki gösterip lüteinize edici hormon (LH) salınımını artırdığı ve dişi pubertesinin başlamasını uyardığı gösterilmiştir. Ayrıca hipotalamusun somatik büyüme ve üreme üzerindeki fonksiyonlarını koordine ettikleri öne sürülmüştür[27,169]. Daha önceki çalışmalarda IGF'nin testiküler fonksiyonların önemli bir parakrin düzenleyicisi olduğu ortaya konmuştur.[20,24,37,39,47] Ayrıca IGF-I'in germ hücrelerinin gelişiminde önemli role sahip olduğu saptanmıştır. Boğalarda IGF-I uygulanmasının fertiliteyi ve fekunditeyi artırdığı gösterilmiştir. Matür ve immatür hipofizektomi yapılmış, GH eksikliği olan mutant erkek fareler ve sıçanları kullanan in vivo çalışmalar IGF-I'in testiküler steroidogenez ve spermatogenezin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını öne sürmüştür.[24] IGF-I'in sıçan ve insan testisinde ve oositlerde yoğun olarak bulunduğu gösterilmiştir.[24,144,145] IGF-I'in seminal plazma konsantrasyonlarının fertil ve infertil erkeklerde sperm sayısı ile doğrudan orantılı olduğu ortaya konulmuştur. IGF-I ve IGF-II reseptör haberci RNA'larının (mRNA) en fazla olarak erkeklerin germinal epitelinde bulunduğu saptanmıştır. Memelilerde IGF-I reseptörü Sertoli hücrelerinde, Leydig hücrelerinde, spermatogonya ve spermatositlerde bulunmuştur. Bazı araştırmacılar sıçan testislerindeki IGF-I immün reaktivitesinin gelişme sırasında değişkenlik sergilediğini bildirmişlerdir. Henson ve arkadaşları doğumda tüm hücre tiplerinde IGF-I immün reaktivitesinin olduğunu ancak sıçan Sertoli ve Leydig hücrelerinde yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda IGF-I immün reaktivitesinin ilk postnatal ayda hızla azaldığını, ancak puberte ve erişkin dönemde hızla artığını bildirmişlerdir. Yağcı ve arkadaşları prepubertal ve pubertal dönemde sıçan germ hücrelerinin aktif IGF-I reseptörlerine sahip olduklarını göstermişlerdir. Bu da IGF-I'in germ hücrelerinin proliferasyonlarını uyardığını düşündürmektedir.[24] Bu hipotez rekombinant IGF-I'in sıçan seminifer hücre kültürlerinde mitotik DNA sentezini uyardığının gösterilmesiyle de desteklenmiştir.[24,146] Bunun yanı sıra Leydig hücrelerinde IGF-I

reseptörlerinin varlığı gösterilmiş ve bunların hem in vivo hem de in vitro olarak gonadotropinler tarafından düzenlendiği ortaya konmuştur. Leydig hücreleri IGF-I salgılamaktadırlar ve IGF-I androjen ve östrojen oluşumu için gerekli steroidogenezin erken basamaklarında görev almaktadır. IGF-I ayrıca Leydig hücre prekürsörlerinin ve immatür Leydig hücre proliferasyonunu genç sıçanlarda artırmaktadır.[24]

IGF salınımının gonadotropinlerle düzenlenmesi yaş bağımlı olarak gerçekleşmekte ve IGF-I konsantrasyonu pubertede, gonadal ve sürrenal androjen salınımına paralel olarak artmaktadır.[24,147,148] IGF-I düzeylerinin erkek çocuklarda düşük olduğu, pubertede artığı ve puberteden sonra tekrar düştüğü gösterilmiştir.[24,149]

Özet olarak Spermatogonya, primer spermatositler ve Leydig hücrelerde IGF-I reseptörlerinin yakın zamanda gösterilmesi IGF-I'in spermatogenezde önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir.[24] IGF'lerin testis fonksiyonlarındaki düzenleyici etkileri Sertoli ve Leydig hücreleri arasındaki hücresel bağlantılarda anahtar rol oynamaları ve steroidogenezi uyarmaları ile ilişkilendirilmiştir.[24] Ayrıca postnatal dönemde sıçan Leydig hücrelerinde IGF-I'in anti apopitotik özellikleri de yakın zamanda gösterilmiştir.[110]

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada IGF-I'in reaktif oksijen radikalleri nedeni ile ortaya çıkan lipit peroksidasyonunu engelleyerek oksidatif hasarı önlediği gösterilmiştir.[150] Başka bir çalışmada ise testis torsiyonu deneysel modelinde reperfüzyon öncesi intraperitoneal IGF-I enjeksiyonunun 24 saat sonra bakıldığında germ hücrelerine spesifik apopitozu önlediği gösterilmiştir.[151]

2.6.2. BÜYÜME HORMONU (GH)

Büyüme hormonu ön hipofizden salınan somatik büyüme, hücresel farklılaşma ve birçok metabolik olayda etkili bir polipeptittir. GH'nun somatik, büyüme ve farklaşma üzerine olan iyi bilinen etkileri dışında gonadal steroid sentezini ve gametogenezi düzenleyerek ve spermatogenezi arttırarak testis fonksiyonunu

etkilediği gösterilmiştir.[152]. Bu etkileri direk olarak yapabildiği gibi Karaciğer ve Leydig hücrelerinde IGF-I salınımını düzenleyerekte oluşturabilmektedir.[152]

GH'nun klinik olarak gonadal büyümeyi artırdığı bilinmektedir. Konjenital büyüme hormonu eksikliği olan erkeklerde pubertede gecikme, testis boyutlarında, sperm sayısında ve sperm hareketliliğinde azalma olduğu bilinmektedir. Ayrıca büyüme hormonu salgılatıcı hormona (GHRH) karşı immünize edilmiş sıçanlarda testiküler büyümede azalma ve germ hücre farklılaşmasında gecikme olduğu gösterilmiştir. Büyüme hormonu hipofizektomi yapılan sıçanlarda Leydig hücrelerinin, LH'a duyarlılığını arttırmaktadır.[153] Ayrıca GH tedavisinin izole prepubertal sıçan Leydig hücrelerinde testesteron salınımını artırdığı gösterilmiştir.[153] Bunun yanı sıra gonadal fonksiyonları gonadotropin salıcı hormon anologları ile baskılanan sıçanlarda spermatosid ve spermatozoa sayısını artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca GH tedavisinin subfertil GH eksikliği olan cüce sıçanlarda index spermatozoa motilitesini artırıdığı gösterilmiştir.[153] Farklı çalışmalarda GH'nun öncü, immatür ve erişkin sıçan Leydig hücrelerinde önemli proteinleri kodlayan mRNA düzeylerini arttırarak bu hücre grubunun farklılaşmasında etkili olduğu gösterilmiştir.[37,154] Büyüme hormonunun spermatogenezi artırıcı ve gonadal fonksiyonu düzenleyici etkilerini LH benzeri Leydig hücre uyarıcı ve testisteki spermatogenic hücreleri doğrudan aktive edici etkileri yolluyla gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada GH'nun siklofosfamid uygulanan sıçanlarda testis fonksiyonunu koruduğu gösterilmiştir.[153] Ayrıca büyüme hormonun ve IGF-I'in reaktif oksijen radikalleri nedeni ile ortaya çıkan lipit peroksidasyonunu engelleyerek oksidatif hasarı önlediği sıçan karaciğer, beyin, böbrek ve testis dokularında gösterilmiştir.[150]

2.6.3. FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRÜ (FGF)

FGF birçok hücre serisinde hücre çoğalmasını, hücre göçünü ve farklılaşmasını uyaran çok güçlü bir anjiogenetik büyüme faktörüdür.[20,49] FGF'ler epitel ve mezenkimal hücreleri arasındaki karmaşık bağlantı ve etkileşimlerini düzenleyerek hücre çoğalması ve farklılaşmasında önemli rol oynarlar.[49] Heparin bağlayıcı proteinler ailesinin bir üyesidirler ve etkilerini dört değişik ve yüksek duyarlılıkta,

hücre yüzeyinde bulunan, tirozin kinaz aktivitesine sahip reseptörleri aracılığıyla gösterirler.[49] Anjiyogenez; embriyonal gelişim, ovulasyon ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik durumlarda esansiyeldirler. Deneysel araştırmalarda FGF verilmesinin yara iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir. Mezodermal kökenli hücreler, damar düz kas hücreleri ve endotelyal hücreleri uyararak proliferasyon, migrasyon, diferansiasyon ve ekstrasellüler matriks proteinlerinin oluşumuna katkıda bulunurlar. Ayrıca günlük FGF enjeksiyonunun iskemik dokularda kollateral damar oluşumunu artırdığı gösterilmiştir.

Yakın zamanda yapılan yayınlarda FGF'nün testis gelişiminde testiküler hormon sekresyonunu düzenlenmesinde ve spermatogenezin kontrolünde de rolü olduğu ileri sürülmüştür.[49] Bu etkilerin Sertoli ve Leydig hücreleri arasındaki önemli morfolojik yapının korunmasını sağlayarak ve epitel ve mezenkimal hücreler arasındaki önemli bağlantıları oluşturarak gerçekleştirdikleri düşünülmektedir. Germ hücreleri için önemli yapısal ve besinsel kaynak olan Sertoli hücrelerinin fonksiyonunu düzenleyerek germ hücre fonksiyonu etkiledikleri varsayılmaktadır. Yapılan ayrıntılı çalışmalarda FGF'lerin sıçan testisinde mitojenik etkide bulunduğu, normal testis kord morfogenezinin oluşmasında çok önemli etkileri olduğu gösterilmiştir.[49]

Ayrıca deneysel olarak spermatik arter ve ven ligasyonu yapılan sıçanlarda testiküler kan akımını arttırdığı ve testis morfolojisi iyileştirdiği gösterilmiştir.[50] Başka bir çalışmada deneysel inmemiş testis modelinde lokal ve kontollü salınan FGF'nin aynı taraf ve karşı taraf testiste haploid hücre populasyonunu artırarak spermatogenezi iyileştirdiği gösterilmiştir.

2.7. İLAÇ VE BÜYÜME FAKTÖRLERİNİN KONTROLLÜ SALIMI

Bazı ilaçlar büyük moleküler yapıları nedeniyle sindirim dizgesinden emilememekte, proteolitik enzimlerce kolayca parçalanmaları ya da biyolojik yarı ömürlerinin kısa olması nedeniyle optimum yarar sağlayamamaktadır. Kontrollü ilaç salımının gündeme gelmesi bu tür zorlukların aşılmasında bir çığır açmıştır. İlaç taşıyıcı

sistemlerin geliştirilmesi bir ilaç ya da sitokinin istenilen konsantrasyon ve sürede lokal ve sistemik olarak salınmasına olanak vermiştir.[156]

2.7.1. İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN FAYDALARI

- İlaç ya da sitokinlerin gerektiğinden yüksek dozda alınmasına bağlı istenmeyen etkileri önlenmiştir.
- Devamlı ya da istenilen aralıkta sağaltım olanağı sağlanmıştır.
- İlacın aktivite ve stabilite süresi uzatılmıştır.
- Daha az ilaç kullanılarak ekonomik yük azaltılmıştır.
- Hastaya özgü uygunsuz durumlar ortadan kaldırılarak geliştirilmiş ilaç sağaltımının herkese ulaşması mümkün olmuştur.[156]

2.7.2. İLAÇ TAŞIYICI SİSTEM OLARAK JELATİN

Günümüzde ilaç taşıyıcı sistem olarak çekici bir hale gelen jelatin hayvan ve insanda deri, kemik, bağ dokuda bulunan kollajenin parsiyel hidrolizi sonucu elde edilen bir proteindir. Parsiyel hidrolizle elde edildiği için doğada bulunmaz. İn-vivo şartlarda biyolojik olarak yıkılabilir. Yıkım süresi çapraz bağların tip ve miktarına göre değişir. Jelatin, sitotoksik olmaması sıvılara viskozite kazandırması, soğuk suda değişmez iken sıcak suda tamamen çözünmesi gibi özellikleri nedeniyle besin, ilaç, tekstil, kozmetik, fotoğraf sanayiinde etkin olarak kullanılmaktadır. Jelatin yapıdaki ilaç taşıyıcı sistemler, toksik etkilerinin az olması, biyolojik olarak yıkılabilmeleri ve ucuz olmaları nedeniyle tıp dünyasında ilgi çekmiştir. Son zamanlarda mikrobiyolojik kültür ortamları, yara örtüleri, bukkal filmler, küresel partiküller ve sağlamlaştırılmış mikroküreler içine de konmaktadırlar.[156]

2.7.3. JELATİNİN YAPISI

Jelatin oluşturulduğu ana kollajenle aynı amino asitleri içeren kompleks bir polipeptit zincirinden oluşur. Bu zincir çubuk ya da üçlü heliks gibi çeşitli şekillerde olabilir. Parçalı olarak kırılmış olan bu zincirler 2kD-250kD arasında değişen moleküler ağırlığa sahiptir. İçerdiği temel aminoasitler prolin, hidroksiprolin, glutamik asid ve alanindir. Sıvı çözeltileri mikrobik ve proteolitik aktiviteye dayanıksız iken kuru jelatinin stabilitesi ortamın pH'sına ve elektrolitlere bağlıdır. Oda ısısında yıllarca sağlam kalabilir. Tam olarak bozulma ancak 100°C üzerinde meydana gelir. Hidrolizle birlikte artan sıcaklık stabilitenin azalmasına neden olur.

2.8. GERM HÜCRE HASARLANMASININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Testis torsiyonu sonrasında germ hücre hasarlanmasını değerlendirmede değişik yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemlerden en eski olanı ve en sık kullanılanı ışık mikroskobu altında testis dokularında germ hücre morfolojisinin değerlendirilmesidir. Seminifer tubul çapının ölçülmesi ve germ hücre maturasyonunun değerlendirilmesi de en sık kullanılan histopatolojik parametrelerdir. Seminifer tubül çaplarının ölçülmesinde çesitli kesitlerde tam olarak değerlendirilebilen 100 seminifer tübül çapının ortalaması alınarak her testis için ortalama seminifer tübül çapı (OSTÇ) değeri bulunur. Sıçanlarda 220-300 mikron arasındaki OSTÇ değerleri normal kabul edilirken, 180 mikronun altındaki değerlerin tübüler hasarı göstermektedir.[50,72-74] Germinal epitelin matüritesi modifiye Johnsen testiküler biyopsi skoru kullanılarak değerlendirilir (Tablo 1).[105] Johnsen skoru spermatogenezin iyi bilinen histolojik indeksidir ve testiküler hasarla birlikte germinal epitelde progresif dejenerasyonu gösterek en matür hücre tipinin yok olması gözlemine dayanmaktadır.[105] Normal testisin Johnsen testiküler biyopsi scoru 8 ile 10 arasında değişmekte iken, daha düşük değerler azalmış germ hücre maturasyonu ve spermatogenez ile birlikte germinal epitel hasarını göstermektedir.[50,72-74]

Diğer bir yöntem germ hücrelerine özgün apopitozun insitu TUNEL ve DNA basamaklama yöntemleri ile değerlendirilmesidir.[93,94] Bu yöntemin dezavantajı germ hücrelerine özgün apopitozun testisi hasarlandıran olaylardan sonra ancak erken dönemde değerlendirilebilmesidir.

Germ hücre hasarlanmasının en önemli etkilerinden biride testisdeki haploid hücre topluluğunda testiküler dejenerasyonun artması ile orantılı olarak oluşan azalmadır. Haploid hücre oranını spermatogenezin kantitatif incelenmesi için geçerli bir gösterge olduğu ortaya konulmuştur.[23] Haploid hücre oranı dokuların DNA içeriğini belirleyen bir yöntem olan DNA flow sitometri ile belirlenebilir.[127]

2.8.1. DNA FLOW SİTOMETRİ

Flow sitometri hücrelerin DNA içeriğini ölçmek için kullanılan bir tekniktir. Bu ölçüm uygun boyama koşullarında, belli floresan boyaların DNA'ya bağlanabilme kapasiteleri üzerine kurulmuştur. Bu tür boyalarla boyanan hücreler kendi DNA içerikleri ile orantılı olarak floresan yaymaktadırlar. Boyanan hücreler sıvı bir ortamda lazer ile etkileşim gösterirken flow sitometri bu hücrelerden çıkan floresanı ölçmektedir. Flow sitometri hücrelerin belli özelliklerini, onlar yüksek bir hızla orifisten geçerken inceleyen bir tekniktir. İncelenen özellikler fiziksel özellikler yani, büyüklük, hacim, refraktif indeks ve hız; ya da kimyasal özellikler yani DNA ya da RNA içeriği, protein ya da enzimler olabilmektedir. Bu özellikler ışık saçma, floresan gibi ölçümlerle saptanmakta ve elektronik ve bilgisayar sistemleri ile birleştirilmektedir. Flow sitometri yöntemi ile bir hücre süspansiyonu birçok özelliği açısından aynı anda 5000 hücre/saniye hızında incelenebilmektedir.[82,109]

Lazer ışınları, boyanan hücrelerin seçici emisyon dalga hızını analiz etmektedir. DNA'ya özel flokrom boyalarla boyanmış hücrelerin histogramlarının analizi hücre siklusunun değişik fazlardaki hücrelerin birbirine göre frekansını vermektedir. Propidium Iodide (PI) çift sarmal DNA'ya bağlanan florokrom boyalardan biridir. Flow sitometre, PI'ya bağlanan DNA miktarı ile direkt orantılı olacak şekilde kırmızı floresan şiddetini ölçmektedir.[82,109]

Tüm memelilerde hücreler bir çift kromozom içermektedir. Bu hücreler haploid(n) hücrelerdeki DNA içeriğinin 2 katını kapsayan diploid(2n) hücrelerdir. Memeli hücrelerin bölünmesi çeşitli fazlarda oluşmaktadır.[82,109]

1. DNA sentez fazı(S): Kromozom duplikasyonudur. Hücreler aktif olarak DNA sentezi yaparlar. DNA içeriği 2n den 4n e çıkmaktadır.
2. Premitotik faz(G2): DNA replikasyonundan mitotik faza kadar devam etmektedir. Bu fazda hücreler en fazla DNA içeriğine sahiptir.
3. Kısa mitotik faz(M): Mitoz sırasında ökaryotik hücrelerde hücre bölünmesi ile birlikte kromozomlarda eşit olarak ikiye bölünmektedir. Hücre bölünmesi nükleer bölünmeden sonra gerçekleşmektedir.
4. Post mitotik faz(G1): Çoğunlukla G0 fazı G1 fazının içinde sayılmaktadır. G0/G1 fazındaki hücreler diploid (2n) DNA içeriğine sahiptir ve DNA saentezi G0/G1 fazının bitiminde başlamaktadır.
5. Non-proliferatif dinlenme fazı(G0): Hiç DNA sentezi yapılmamaktadır.[82,109]

Testis dokusundaki germinal epiteldeki heterojen hücre topluluğu özel boyamalardan sonra içerdikleri DNA miktarına göre flow sitometrik DNA analizi için çok uygun bir dokudur.[82] Bu nedenle flow sitometrik DNA analizi histolojik değerlendirmeye alternatif olabilecek uygun bir tekniktir. DNA analizi sırasında elde edilen histogramlardaki tepeler spesifik DNA içeriği ya da ploidiyi temsil eden bir hücre alt gurubunu göstermektedir. Bu tepeler altındaki alanın bilgisayar analizi ile değerlendirilmesi toplam hücre topluluğuna göre bu hücre gurubunun oranını vermektedir.

Periferik kan lenfositlerinin PI ile boyanması ile alınan floresan sinyalleri ile karşılaştırıldığında ilk ortaya çıkan tepenin lenfositlerin yarı şiddetinde floresan yaydığı görülmektedir.[82,109] Buna göre bu tepelerin altında kalan alanlar sırası ile haploid(N), diploid(2n), tetraploid(4n) miktarda DNA kapsayan hücrelerin, toplam sayılan hücre topluluğuna göre oranını vermektedir. Kontrol histogramlarda hücrelerin %5-10'unun 1n'den daha az DNA ya sahip olduğu ve bunların hazırlanış sırasında hasara uğrayan hücre topluluğu olduğu saptanmıştır. Hücrelerin %3-5'i ise 2n ile 4n arası DNA miktarına sahiptir ve bunlar DNA sentezindeki (S fazı) gonadal

hücreleri temsiletmektedir.[109] Konvansiyonel patoloji tetkiklerinin sadece tanımlayıcı ve yoruma açık olduğu düşünülürse flow sitometrik DNA analizinin objektif, hızlı ve kantitatif olması yönünden testis biyopsilerinin değerlendirilmesi için önemtaşıdığı görülmektedir.[82]

Seminifer epitel DNA içeriği açısından 3 ayrı hücre topluluğu barındırmaktadır. Testisteki hücreler arasında interstsyel hücreler olmakla beraber bunların hücre topluluğunun %2'sini oluşturduğu düşünülürse sonuçların germ hücre topluluğundaki değişiklikleri yeterli ve doğru olarak yansıttığı kabul edilmektedir.[123] Yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda flow sitometrik DNA analizi ile elde edilen sonuçlarla histolojik çalışmaların testisdeki spermatogenezi değerlendirme yönünden uyumlu olduğu görülmektedir.[127]

DNA flow sitometrik haploid hücre analizi germ hücre differansiyasyonunu değerlendirmede güvenilir ve kullanışlı bir yöntemdir.[61,91] Normal testis DNA histogramlarına göre hücre topluluklarının yaklaşık %70'ı haploid(n) hücrelerden oluşmaktadır; bunlar matür spermatozoa ve spermatidlerdir.[61,91] Spermatozoaların histogramdaki tepesi spermatidlerden daha önce belirmektedir. Bunun nedeni spermatozoalardaki kromatin materyalin daha yoğun olması ve boyamaya daha aza duyarlı olmasıdır.[82] Diploid grup(2n) total hücre topluluğunun %12-20'sini oluşturmaktadır. Sertoli hücreleri, Leydig hücreleri, sekonder spermatositler ve G1 fazındaki spermatogenetik hücreler bu hücre gurubundandır. Tetraploid hücreler %12'yi oluşturmaktadır ve primer spermatositlerin çeşitli gelişim fazlarını ve G2 fazındaki spermatogoniaları içermektedir.[82]

Flow sitometrik olarak normal spermatogenez 1n>2n>4n olarak gösterilebilmektedir. Histopatolojik olarak maturasyon arresti, piloidi yüzdesi olarak 2n>1n>4n ile gösterilmektedir. [119]

3. MATERYAL METOD

Deney; Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyi Lokal Etik Kurulunun onayı alındıktan sonra, Laboratuar hayvanlarının bakım ve kullanımına dahil kılavuz ilkelerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında denek olarak, ağırlıkları 70±30 olan 56 adet 21 günlük erkek Vistar Albino cinsi sıçan kullanıldı. Denekler sekizer sıçandan oluşan yedi gruba ayrıldı.

Gruplar: Tek taraflı (sağ) testis torsiyonu + detorsiyon

Grup 1: Sham (testis fiksasyonu)

Grup 2: Kontrol (tek taraflı torsiyon + 6 saat sonra detorsiyon)

Grup 3: Jelatin (tek taraflı torsiyon + 6 saat sonra detorsiyon + jelatin)

Grup 4: Tek taraflı torsiyon + 6 saat sonra detorsiyon + IGF-I içeren jelatin

Grup 5: Tek taraflı torsiyon + 6 saat sonra detorsiyon + FGF içeren jelatin

Grup 6: Tek taraflı torsiyon + 6 saat sonra detorsiyon + GH içeren jelatin

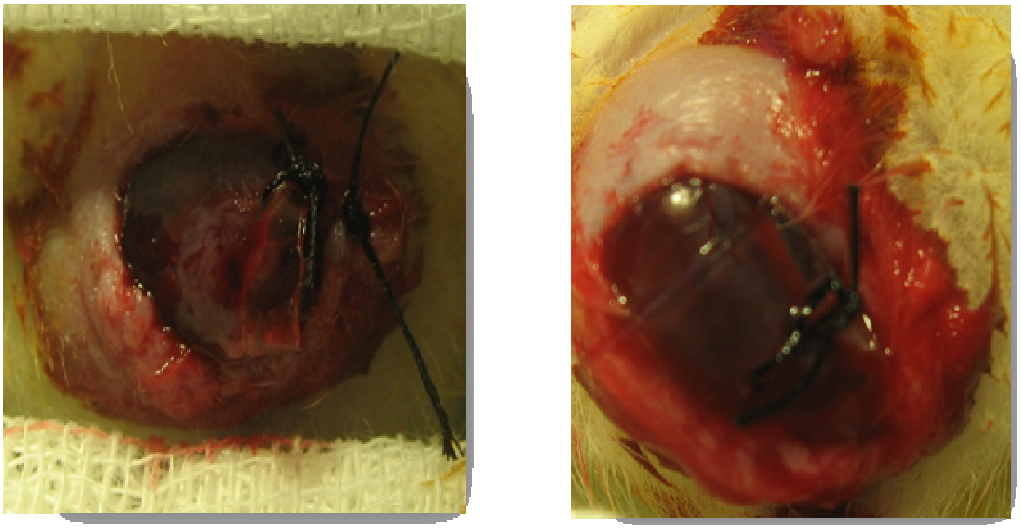
Grup 7: Tek taraflı torsiyon + 6 saat sonra detorsiyon + GH sistemik

3.1. CERRAHİ İŞLEM

Sıçanlar çalışma süresince ısı kontrollü kafeslerde standart sıçan yemi ve yeterli su ile beslenerek takip edildi. Anestezi kas içi olarak uygulanan ketamin hidroklorür (Ketasol, richter pharma ag, Austria) (5-10 mg/kg) ile sağlandı. Ameliyat sahası iyot-

alkol solüsyonu ile temizlenerek ve ameliyatlar sterilite koşullarına uygun şekilde yürütüldü.

Grup 1(Sham) grubunda sham operasyonu sırasında sağ skrotal kesi ile testis ortaya konulup torsiyon yapılmadan 5/0 yuvarlak iğneli atravmatik ipek dikiş materyali ile tunika albuginasından dikiş geçilerek skrotuma tespit edildi. Diğer gruplarda (Grup 2,3,4,5,6 ve 7'de) sağ testise saat yönünde 720 derecelik torsiyon uygulanarak sağ skrotuma 5/0 yuvarlak iğneli atravmatik ipek dikiş materyali ile tunika albuginasından dikiş geçilerek tespit edildi. 6 saat sonra detorsiyon işlemi uygulandı. Grup 2 (kontrol) de sadece detorsiyon uygulandı. Grup 3 (jelatin) de jelatin, Grup 4'de 5 µgr IGF içeren jelatin, Grup 5'de 2.5 µgr FGF içeren jelatin, Grup 6'da 5 µgr GH içeren jelatin detorsiyon işlemi sonrasında 5/0 ipek ile sağ testise tespit edildi. Grup 7'de detorsiyon sonrası 7 gün boyunca 0.2 IU/100gr/gün dozunda GH subkutiküler olarak sistemik uygulandı.



Resim 1-2: Detorsiyon işleminden sonra büyüme hormonu yüklü ya da yüksüz jelatinin testise tespit edilmesi ve skrotuma yerleştirlmesi

Tüm gruplarda ki deneklerin her biri işlem ve tedaviden bir ay sonrasında iki dişi sıçan ile onbeş gün boyunca katıldıktan sonra her iki taraftaki testisleri çıkarılıp iki eşit parçaya bölündü. Parçaların birisi histopatolojik değerlendirme için Bouin

solusyonuna konularak diğeri ise DNA flow sitometrik analiz için serum fizyolojik ile ıslatılarak – 20 derecede dondurularak saklandı.

3.2. FGF-IGF-GH UYGULAMA SİSTEMLERİNİN HAZIRLANMASI

FGF, IGF ve GH sigma kimya şirketi (St Louis, ABD) den temin edilmiştir. Yakın zamanda geliştirilen FGF ile işlenmiş asidik jelatin içeren ve biyolojik olarak çözünebilen hidrojel etkili bir ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmaya başlanmıştır.[128] Bu sistem FGF'nin değişken sürelerle etki alanına kontrollü salınmasına olanak sağlar. Hidrojelin su içeriğini değiştirerek ilaç salınma süresini belirlemek mümkündür.[128] Bu sistem FGF'nin parçalanmasını önlemekte iyileşme sırasında uzamış salınım sağlamakta ve doku onarımında b-FGF'nin kullanımını arttırmaktadır. Bu çalışmada benzer bir ilaç taşıma sistemi, kontrollü ve uzamış FGF, IGF ve GH salınımının sağlanması için tasarlandı. Jelatin ilaç taşıma sistemi olarak toksik olmaması, biyolojik olarak tamamen parçalanabilir ve yok edilebilir özellikte olması ve ucuz olmasından dolayı tercih edildi.[120,129] FGF (315ngr/100gr/gün), IGF (725 ngr/100gr/gün) ve GH (725 ngr/100gr/gün)'nin en etkili dozları, daha önceki deneylerde tanımlandığı şekliyle kullanıldı.[50,71] 2.5 μgr/cm^2 FGF, 5 μgr/cm^2 IGF ve 5 μgr/cm^2 GH içeren jelatin filmler petri kutularında sıvı jelatin solüsyonda hazırlandı. Bu amaçla %5lik jelatin solusyonu fosfat tamponunda (0,01M, pH 7,4) çözülerek ve 7 günde çözülmesini sağlayan hidrojel eklenerek hazırlandı. Solusyon gluteraldehit (%0,05) ve heparin (50 μlt) eklenmesinin ardından plastik petri kutularına aktarılarak ve oda sıcaklığında kurutuldu ve 1cm^2 boyutunda kesildi. Sıvı jelatin gluteraldehit solusyonlarına FGF, IGF ya da GH eklenmeden önce bu maddeler ilk olarak 50 μlt heparin solusyonunda eritildi ve ardından gerekli konsantrasyonlar içerecek şekilde fosfat tamponu ile dilüe edildi. Yukarıda anlatılan işlem kullanılarak 1cm^2 jelatin filmler FGF 315ngr/100gr/gün, IGF 725 ngr/100gr/gün ve GH 725 ngr/100gr/gün olacak şekilde hesaplanan salınım oranları ile oluşturuldu.

3.3. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Aynı taraf ve karşı taraf testisler Bouine solusyonunda fikse edildikten sonra parafin bloklara gömüldü. Mikrotomla 0,6 mikron kalınlığında kesilen doku parçaları, Hematoxylin-Eosin ile boyandı. Testiküler biyopsiler iki patolog tarafından kör ve rastlantısal olarak incelendi. Ortalama seminifer tübül çapları (OSTÇ) ve ortalama testiküler biyopsi skorları (OTBS) 'yi içeren iki ölçüt histopatolojik değerlendirmede kullanıldı. OSTÇ'nı belirlemek için en sirküler tübüllerin 100 tanesi belirlenerek ve x100 büyütme kullanılarak oküler mikrometre ile ölçüldü. 100 seminifer tübül çapının ortalaması alınarak her testis için OSTÇ değeri bulundu. 220-300 mikron arasındaki OSTÇ değerleri normal kabul edildi. 180 mikronun altındaki değerler tübüler hasarı göstermektedir. [50,72-74]

Tablo 1: Johnsen Testiküler biyopsi skorlaması

SKOR 10	Germinal epitelin santral lümen çevresinde çok katlı yapıda olması, lümenin açık ve çok sayıda spermatozoa içeriyor olması
SKOR 9	Germinal epitel görülmekle birlikte lümeni tıkayabilecek önemsiz miktarda döküntü, tıkalı lümende spermatozoa ve döküntü epitel görülmesi
SKOR 8	Germinal epitel çok tabakalı fakat lümende 10'dan az sayıda spermatozoa varsa
SKOR 7	Çok sayıda spermatid varsa ve hiç spermatozoa olmaması
SKOR 6	Spermatozoa yoksa ve 10'dan az spermatid olması
SKOR 5	Sadece spermatosidler varsa veya spermatozoa ya da spermatid hiç olmaması
SKOR 4	Hiç spermatozoa ve spermatid yoksa ve 5'den az sayıda spermatosit varlığı
SKOR 3	Germ hücresi olarak sadece spermatogonia varlığı
SKOR 2	Sadece Sertoli hücreleri varsa ve hiç germ hücresi yokluğu
SKOR 1	Seminifer tübül lümeninde hiç hücre olmaması

Germinal epitelin matüritesi modifiye Johnsen testiküler biyopsi skoru kullanılarak evrelendirildi (Tablo 1).[105] Johnsen skoru spermatogenezin iyi bilinen histolojik indeksidir ve testiküler hasarla birlikte germinal epitelde progresif dejenerasyonu gösteren en matür hücre tipinin yok olması gözlemine dayanmaktadır.[105] 40 büyütme kullanılarak 100 tübül her bir biyopsi kesitinde değerlendirilerek, her bir tübüle 1 ile

10 arasında bir skor verildi, 10 değeri çok sayıda spermatazoa ile birlikte tam spermatogenezi gösterirken, skor 1 tübüler kesitlerde hiçbir belirlenebilir hücrenin olmadığını göstermektedir. 100 tübülün ortalama skoru OTBS olarak kaydedilmiştir. Normal testisin OTBS 'si 8 ile 10 arasında değişmekte iken daha düşük değerler azalmış germ hücre maturasyonu ve spermatogenez ile birlikte germinal epitel hasarını göstermektedir. [50,72-74]

3.4. DNA FLOW SİTOMETRİ

DNA flow sitometri için testiküler örneklerin hazırlanması, bazı modifikasyonlarla daha önceden yayınlanmış protokollere göre gerçekleştirildi.[91] Kısaca her bir gruptan elde edilen testiküler doku küçük parçalara ayrılarak %10 fetal sığır serumu (Gibco-invitrogen, ABD) ve %0,1 kollejenaz (Sigma - Aldrich, ABD) eklenerek, RPMİ 1640 besiyerine konuldu ve 30 dakika 37 derece inkübe edildi. Örnekler fosfat tamponlu serum fizyolojik ile iki defa yıkandıktan sonra tripsinlerek ve ribonükleaz A ile solüsyonu 1 (0,5 mM tris, 3,4mM trisodyum sitrat ve %0,1 NP-40, pH 7,6) ile işleme tabi tutuldular. Tripsinizasyon tripsin inhibitörünün eklenmesiyle durduruldu. Nükleuslar hücre boyayıcıları yoluyla filtre edildi (BD - falcon, ABD). Filtratlar 300 g ile 3 dk santrüfüj edilerek ve -20 derecede soğuk %80 lik ETOH da fikse edildi. Tüm örnekler ardından oda sıcaklığında karanlıkta solüsyon 2 (solüsyon 1 + 0,4 mg/ ml propidyum iyodin) 'de inkübe edildi. Tüm reaktifler sigma aldrichten elde edildi. Flow sitometrik inceleme FC 500 Model flow sitometri cihazı ile yapıldı(Backman-Coulter, ABD). Matür ve immatür haploid (1n), diploid (2n), S faz ve tetraploid (4n) hücrelerin göreceli oranları hesaplandı

Herbiri farklı DNA içeriğine sahip seminifer tübüller 3 farklı hücre populasyonu barındırmaktadır. Spermatogonia G2 hücreleri ve primer spermatositler tetraploid, sekonder spermatositler ve spermatogonial G1 hücreleri diploid, ve spermatidler ile spermatozoalar haploiddir.[74,91] Spermatogenez ilerledikçe haploid hücre populasyonu artışı meydana gelmektedir. Matür ve normal bir testiste hücrelerin %70'ı spermatid ve spermatozoaları oluşturan haploid hücrelerden meydana gelmektedir. [61,74,141]

3.5. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

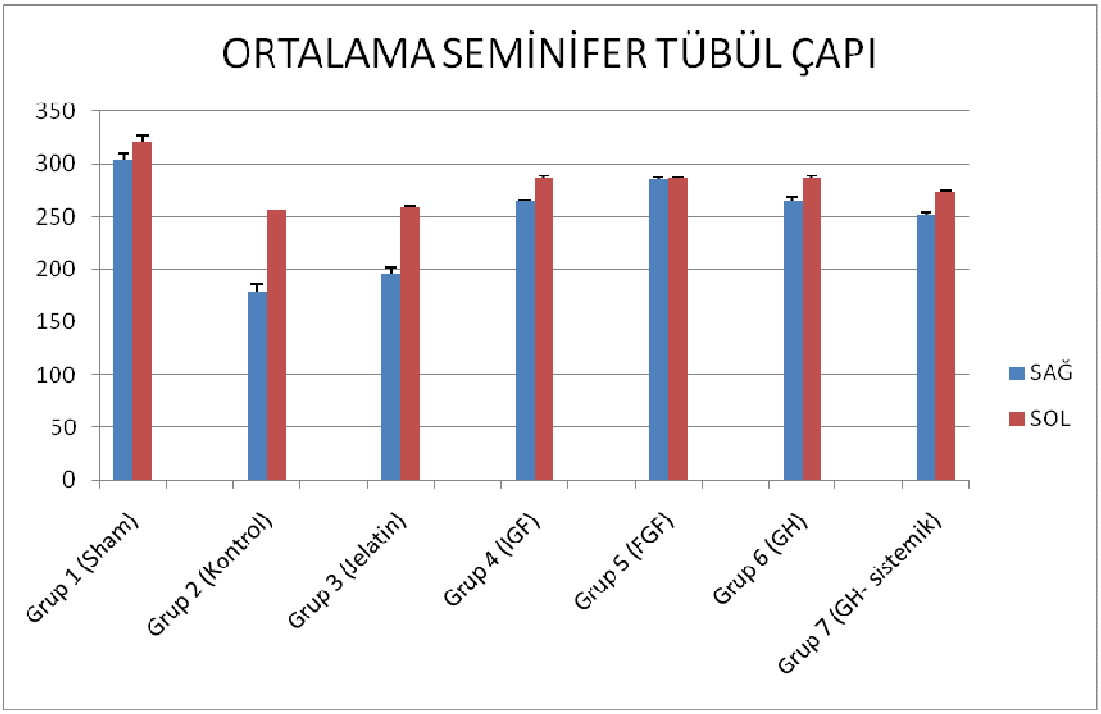
Veriler ortalama +/- standart hata olarak ifade edildi. İstatistik analizler Microsoft Windows için SPSS 16,0 kullanılarak gerçekleştirildi (SPSS, Chicago ABD). Ölçümle elde edilen veriler açısından gruplar arasındaki istatistiksel farkı analiz etmek için Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı. Varyans analizi ile istatistiksel anlamlı bir fark olan veriler için, hangi grubun hangisinden farklı olduğunu belirlemek için, grupların ortalama değerleri ayrı ayrı Tukey-Kramer çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırıldı. 0,05'den düşük p değerleri istatistiksel olarak anlamlılık şeklinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

Çalışma sonrasında Grup 2, 4 ve 7 den birer sıçan olmak üzere 3 sıçan kaybedildiği için değerlendirmeye alınmadı.

4.1. ORTALAMA SEMİNİFER TUBÜL ÇAPI (OSTÇ)

Aynı taraf (Sağ testis) ortalama seminifer tubül çapları açısından gruplar arasında anlamlı farklılık gözlendi (Tablo: 4, Resim 3-7 Grafik 1, $p<0.0001$). Gruplar Tukey – Krammer testi ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında kontrol ve jelatin gruplarında OSTÇ değeri sham, IGF, FGF, GH lokal, gruplarına göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p <0.05$, Grafik 1). Sham grubu ile tedavi grupları olan IGF, FGF, GH lokal ve GH sistemik grupları arasında anlamlı fark gözlenmedi (Grafik 1).



Grafik 1: Tüm grupların aynı taraf(sağ) ve karşı taraf (sol) ortalama seminifer tübül çapları ve standart sapmaları



Resim 3: Grup 1, sham grubundan alınan Sağ testis kesiti (HEx 20), normal görünümlü ve çapa sahip seminifer tübüller



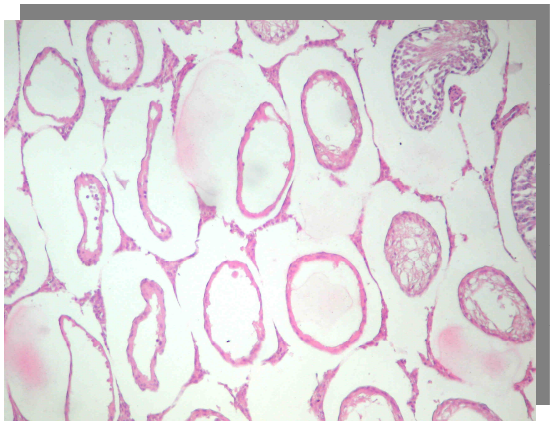
Resim 4: Grup 1 sham grubundan alınan Sağ testis kesiti (HEx 40) Germinal epitelin santral lümen çevresinde çok katlı yapıda olduğu ve lümenin açık olarak çok sayıda spermatozoa içerdiği gözleniyor



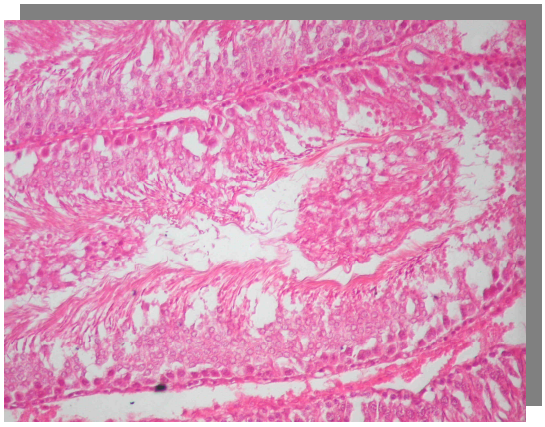
Resim 5: Grup 1, sham grubundan alınan Sol testis kesiti (HEx 40) Germinal epitelin santral lümen çevresinde çok katlı yapıda olduğu ve lümenin açık olarak çok sayıda spermatozoa içerdiği gözleniyor



Resim 6: Grup 2 kontrol grubundan alınan Sol testis kesiti (HEx 40), Germinal epitel çok tabakalı fakat lümende çok sayıda spermatozoa var fakat hiç spermatid yok

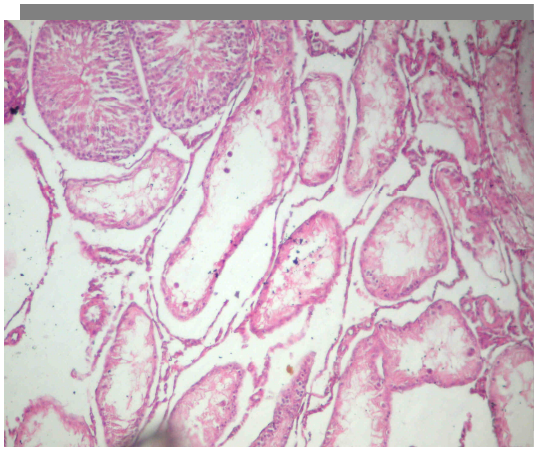


Resim 7: Grup 2 kontrol grubundan alınan Sağ testis kesiti (HEx 20), dejenere ve çapı küçülmüş seminifer tubüller görülüyor

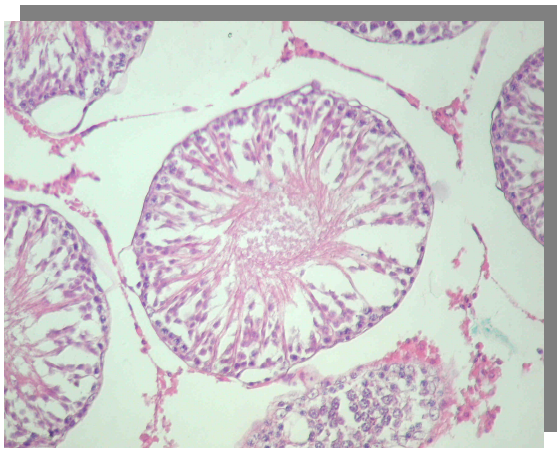


Resim 8: Grup 2 kontrol grubundan alınan Sağ testis kesiti (HEx 40), dejenere ve çapı küçülmüş seminifer tubüller görülüyor Sadece spermatosidler var ve spermatozoa ya da spermatidler gözlenmiyor

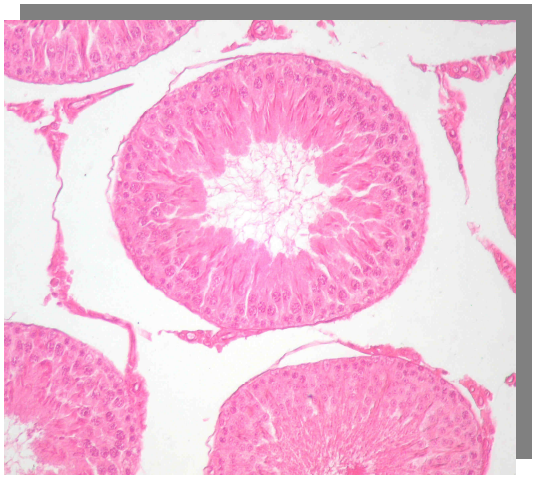
Karşı taraf (Sol testis) ortalama seminifer tubül çapları açısından gruplar arasında anlamlı farklılık gözlendi (Tablo: 4, Resim 8-18 Grafik 1, $p<0.0001$). Gruplar Tukey –Krammer testi ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında kontrol, jelatin ve GH sistemik gruplarında OSTÇ değeri sham grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p <0.05$, Grafik 1). Sham grubu ile diğer tedavi grupları olan IGF, FGF, GH lokal arasında anlamlı fark gözlenmedi (Tablo 2, Grafik 1).



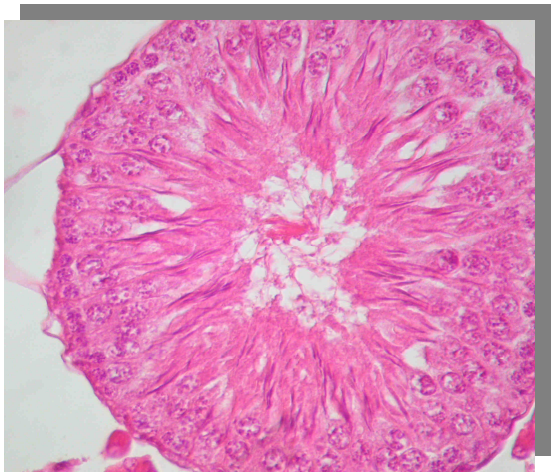
Resim 9: Grup 3 jelatin grubundan alınan Sağ testis kesiti (HEx 10), dejenere ve çapı küçülmüş seminifer tubüller görülüyor



Resim 10: Grup 3 jelatin grubundan alınan Sağ testis kesiti (HEx 20), germinatif epitel tek katlı ve sadece spermatositler var



Resim 11: Grup 4 IGF-I grubundan alınan Sağ testis kesiti (HEx 20), normal görünümlü veçapa sahip seminifer tübüller)



Resim 12: Grup 4 IGF grubundan alınan Sağ testis kesiti (HEx 40) Germinal epitelin santral lümen çevresinde çok katlı yapıda olduğu ve lümenin açık olarak çok sayıda spermatozoa içerdiği gözleniyor



Resim 13: Grup 5 FGF grubundan alınan Sağ testis kesiti (HEx 20), hafif dejenere ve çapları hafif azalmış tübüller



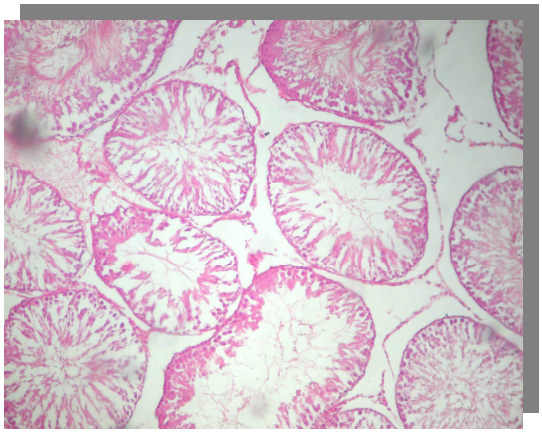
Resim 14: Grup 5 FGF grubundan alınan Sağ testis kesiti (HEx 40) Germinal epitelin santral lümen çevresinde çok katlı yapıda olduğu ve lümenin açık olarak çok sayıda spermatozoa içerdiği gözleniyor



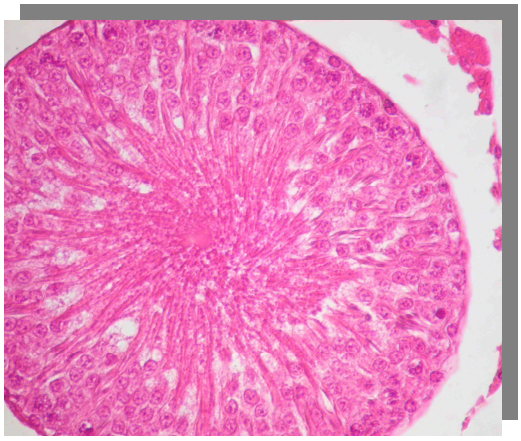
Resim 15: Grup 6 GH lokal grubundan alınan Sağ testis kesiti (HEx 20), normal görünümlü ve normal çapa sahip tübüller



Resim 16: Grup 6 GH lokal grubundan alınan Sağ testis kesiti (HEx 40) Germinal epitelin santral lümen çevresinde çok katlı yapıda olduğu ve lümende hafif debris olsada olarak çok sayıda spermatozoa içerdiği gözleniyor



Resim 17: Grup 7 GH-sistemik grubundan alınan Sağ testis kesiti (HEx 10), dejenere ve çapları azalmış tübüller görülüyor



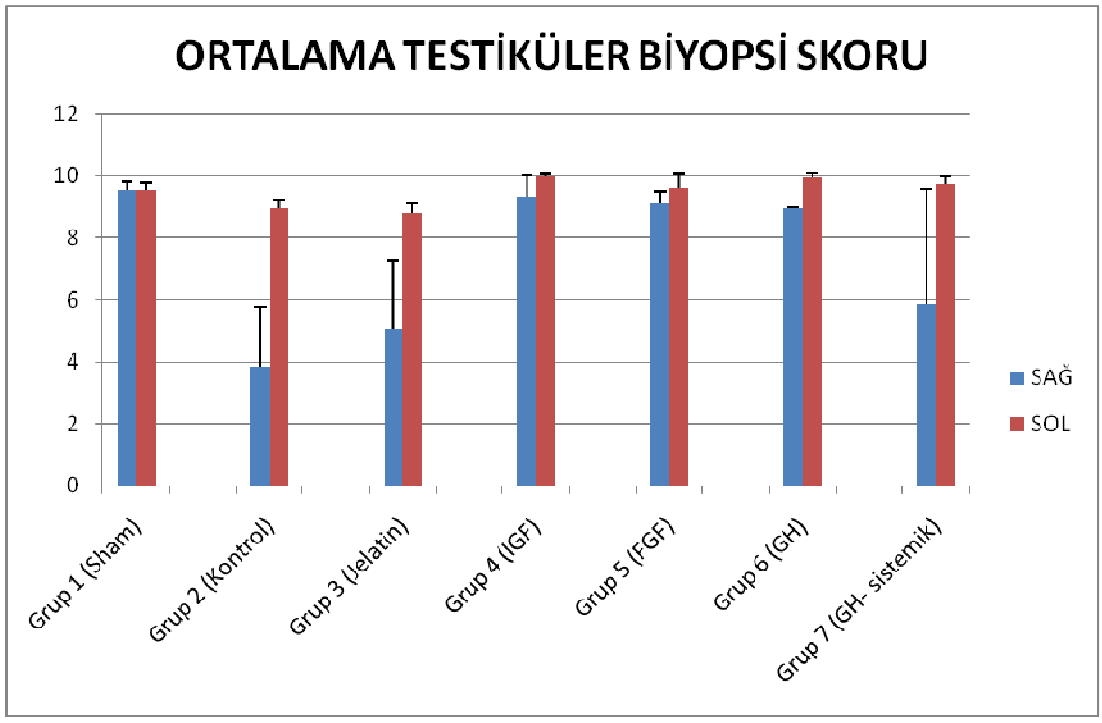
Resim 18: Grup 7 GH lokal grubundan alınan Sağ testis kesiti (HEx 40) Germinal epitelin santral lümen çevresinde çok katlı yapıda olduğu ve lümeninde belirgin döküntü ve debris olsada olarak çok sayıda spermatozoa içerdiği gözleniyor

4.2. ORTALAMA TESTİKÜLER BİYOPSİ SKORLARI (OTBS)

Aynı taraf (Sağ testis) ortalama testiküler biyopsi skorları açısından gruplar arasında anlamlı farklılık gözlendi. (Tablo: 4, Resim - Grafik 2, $p<0.0001$). Gruplar Tukey – Krammer testi ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında kontrol, jelatin ve GH sistemik

gruplarında OTBS değeri sham, IGF, FGF, GH lokal, gruplarına göre anlamlı olarak düşük bulundu (p <0.05, Grafik 2). Sham grubu ile diğer tedavi grupları olan IGF, FGF, GH lokal grupları arasında anlamlı fark gözlenmedi. (Tablo 2, Grafik 2). GH sistemik grubunda OTBS GH lokal grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu (Tablo 2, Grafik 2).

Karşı taraf (Sol testis) ortalama testiküler biyopsi skorları açısından gruplar arasında anlamlı farklılık gözlendi. (Tablo: 4, Resim - Grafik 2, p<0.0001). Gruplar Tukey – Krammer testi ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında kontrol ve jelatin gruplarında OTBS değeri sham, IGF, FGF, GH lokal, ve GH sistemik gruplarına göre anlamlı olarak düşük bulundu (p <0.05, Grafik 2). Sham grubu ile diğer tedavi grupları olan IGF, FGF, GH lokal ve sistemik grupları arasında anlamlı fark gözlenmedi, (Tablo 2, Grafik 2).



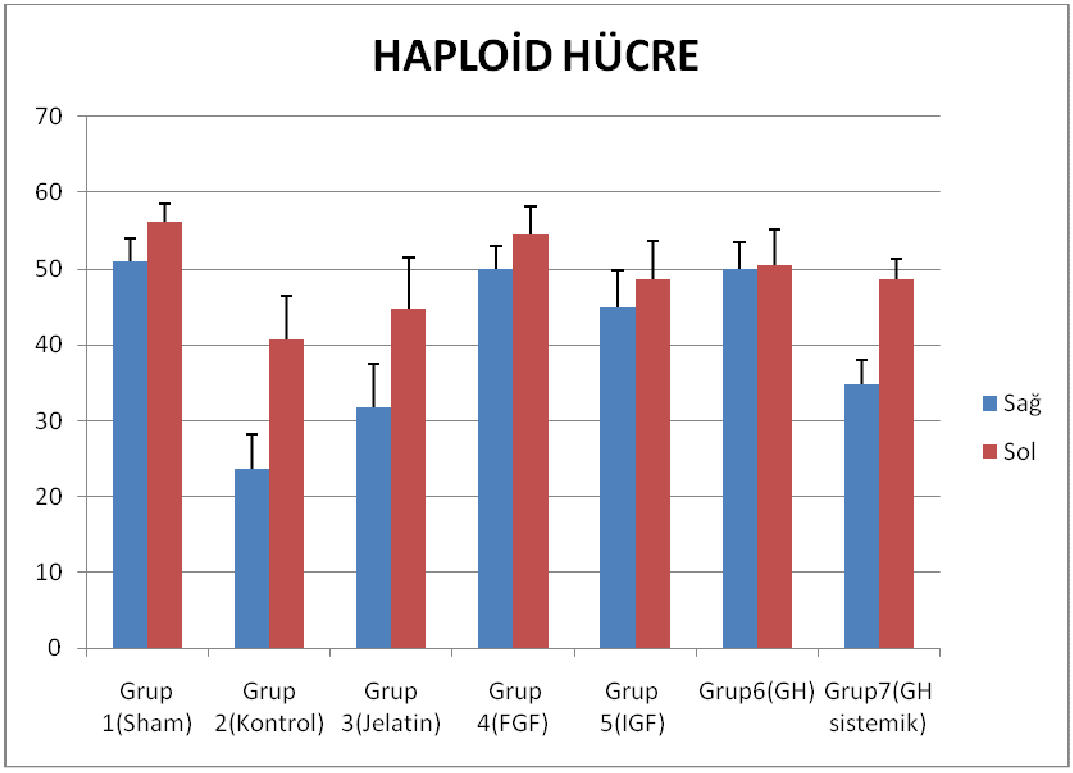
Grafik 2: Tüm grupların aynı taraf (sağ) ve karşı taraf (sol) ortalama testiküler biyopsi skorları ve standart sapmaları

4.3. HAPLOİD HÜCRE YÜZDESİ

Aynı taraf (Sağ testis) ortalama haploid hücre yüzdesi açısından gruplar arasında anlamlı farklılık gözlendi. (Tablo: 4, Grafik 3, p<0.0001). Gruplar Tukey –Krammer

testi ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında kontrol, jelatin ve GH sistemik gruplarında haploid hücre yüzdesi sham, IGF, FGF, GH lokal, gruplarına göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.05$, Grafik 3). Sham grubu ile diğer tedavi grupları olan IGF, FGF, GH lokal grupları arasında anlamlı fark gözlenmedi. (Tablo 2, Grafik 3). GH sistemik grubunda ise haploid hücre yüzdesi GH lokal grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu,(Tablo 2, Grafik 3).

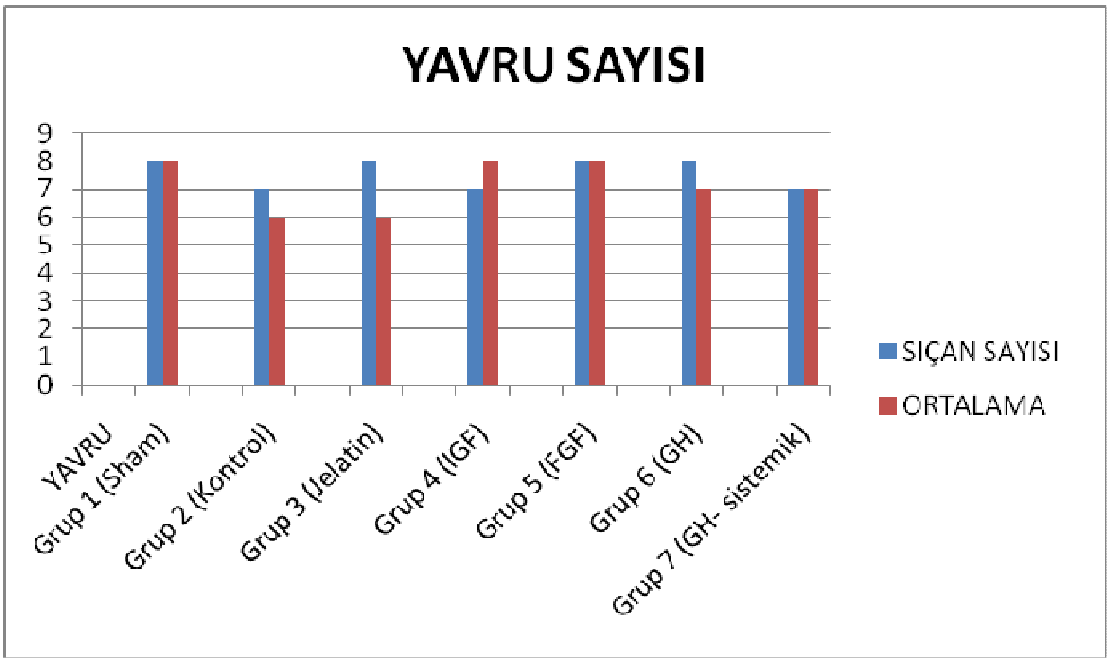
Karşı taraf (Sol testis) ortalama haploid hücre yüzdesi açısından gruplar arasında anlamlı farklılık gözlendi. (Tablo: 4, Grafik 3, $p<0.0001$). Gruplar Tukey –Krammer testi ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında kontrol ve jelatin gruplarında haploid hücre yüzdesi sham, IGF, FGF, GH lokal, ve GH sistemik gruplarına göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0.05$, Grafik 3). Sham grubu ile diğer tedavi grupları olan IGF, FGF, GH lokal, GH sistemik grupları arasında anlamlı fark gözlenmedi. GH sistemik grubunda haploid hücre yüzdesi GH lokal grubuna göre anlamlı yüksek bulundu($P<0.05$,Tablo 2, Grafik 3).



Grafik 3: Gruplara göre sağ ve sol testis için Haploid hücre yüzdeleri ve standart sapmaları

4.4. DENEK BAŞINA DÜŞEN YAVRU SAYISI

Çalışmada kullanılan deneklerin dişi sıçanlarla katılmasından sonra her denekten en az 4 adet en fazla 8 adet yavru elde edildi. Grup başına düşen ortalama yavru sayısı (Grup 1: 8 yavru, Grup 2: 6 yavru, Grup 3: 6 yavru, Grup 4: 8 yavru, Grup 5: 8 yavru, Grup 6: 7 yavru, Grup 7: 7 yavru) açısından gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmedi (Grafik 4).



Grafik 4: Torsiyon ve detorsiyon işlemleri sonrasında her gruptaki sıçanların fekondasyon sonrası yavru sayıları

Tablo 2: Gruplara göre ortalama seminifer tübül çapı, ortalama testiküler biyopsi skoru ve haploid hücre yüzdesi bakımından karşılaştırmalı tablo

		Grup 1 (Sham)	**Grup 2** (Kontrol)	**Grup 3** (Jelatin)	**Grup 4** (IGF)	**Grup 5** (FGF)	**Grup 6** (GH)	**Grup 7** (GH-sistemik)	**p değeri**
Ortalama seminifer tübül çapı (µm)	Sağ	304±49	178±67	195±61	263±13	284±29	265±37	251±18	0,001
	Sol	321±50	255±6	258 ±15	285±25	285±11	286±18	273±11	0,001
Ortalama testiküler biyopsi skoru	Sağ	9,5±0,3	3,8±1,9	5±2,2	9,3±0,6	9,1±0.4	8,9±0,1	5,8±3,7	0,001
	Sol	9,5±0,2	8,9±0,3	8,8±0,3	9,9±0,1	9,6±0,4	9,9±0,1	9,7±0,2	0,001
Haploid hücre yüzdesi (%)	Sağ	51±3,1	23,7±4,5	31,8±5,8	50,1±2,9	45±4,8	50±3,5	34,8±3,3	0,001
	Sol	56,3±2,2	40,7±5,8	44,7±6,9	54,5±3,7	48,6±5,2	50,6±4,7	48,6±2,7	0,001

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada da sıçanlarda tek taraflı 6 saat süreyle testis torsiyonu ve detorsiyonu oluşturulduktan sonra aynı taraf testiste daha belirgin olmak üzere hem aynı taraf hemde karşı taraf testiste OSTÇ ve OTBS parmetreleri ile değerlendirildiğinde histopatolojik olarak belirgin germ hücre hasarlanması saptanmıştır. Ayrıca DNA flow sitometri yöntemiyle değerlendirildiğinde haploid hücre populasyonun benzer olarak aynı testiste daha belirgin olmak üzere hem aynı taraf hemde karşı taraf testiste azaldığı gözlenmiştir. Bu bulgular tek taraflı torsiyon sonrası aynı taraf testis ile birlikte karşı taraf testisin de etkilendiği, seminifer tübül morfolojisinin bozulduğu, germ hücrelerinin hasarlandığı, germ hücre olgunlaşmasında ve spermatogenezde azalma olduğunu öne süren birçok deneysel çalışma ile paralelik göstermektedir.[2,4,10]

Testis torsiyonu hastaların %33-68'sinde tek taraflı testis atrofisi ile sonuçlanmaktadır.[1-3,33] Aynı taraf testiste torsiyon ve detorsiyon sonrası gelişen iskemi reperfüzyon hasarı germ hücre apopitozu ve hasarlanması ile sonuçlanarak ve azalmış spermatogeneze yol açtığı kesin olarak kabul edilmektedir.[4-10] Tek taraflı testis torsiyonun sadece etkilenmiş testiste değil, karşı taraftaki testistede zedelenme ile sonuçlandığı yargısıda diğer tartışmalı konulardan biridir.[4,12,104] İlk kez 1978 yılında Krarup, tek taraflı testis torsiyonu nedeni ile tedavi edilmiş 18 erkek yetişkin hastanın sadece birinin fertil olduğunu rapor ederek,tek taraflı testis torsiyonunun karşı testisi de zedeleyeceğine dikkati çekmiştir. [26] Daha sonra birçok klinik çalışmada tek taraflı testis torsiyonu sonrasında, sperm yoğunluğunda ve motilitesinde azalma ve fertilite oranlarında düşme gösterilerek, bu bulgular desteklenmiştir.[3,18-26,33] Ancak bazı deneysel çalışmalarda bizim çalışmamızda olduğu gibi tek taraflı testis torsiyonu sonrasında karşı testisin etkilendiği gösterilirken [4,12-17,89,106] diğer çalışmalarda tam karşıt bulgular saptanarak, karşı testisin etkilenmediği belirtilmiştir.[4,92-94,97-99] Bu farklılıklar çalışmalarda değişik hayvan modelleri kullanılmasından ya da testiküler iskemi reperfüzyon durumunun deneysel model olarak tam olarak oluşturulamamasından kaynaklanmış olabilir. Bazı

çalışmalarda deneysel testis torsiyonu oluşturulan sıçanlarda, karşı testiste biyokimyasal göstergelerde artış, DNA değişiklikleri ve apopitoz gösterilmiştir.[4,89,91,107] Sıçanlarda yapılan diğer çalışmalarda ise uzun iskemi süreleri sonrasında bile karşı testisde histolojik zedelenme, sperm sayısında azalma ya da morfolojisinde bozulma gösterilememiştir. Saba ve arkadaşları doku hasarlanmasının göstergesi olarak kabul edilen histolojik değişikliklerin iskemi ve reperfüzyon zamanlarına bağlı olarak değişebildiğine, ancak biyokimyasal değişikliklerin testis torsiyonunda testis hasarlanmasını göstermede daha duyarlı olduğuna ve morfolojik değişiklikler gelişmeden erken hücresel değişiklikleri saptayabildiklerine dikkat çekmiştir.[4,108] Bu durum aslında karşı testisin belli derecelerde etkilendiği ancak bu etkilenmenin kalıcı olmayabileceği görüşünü gündeme getirmiştir. Bu görüşü destekler şekilde çalışmamızda rat başına düşen ortalama yavru sayısı açısından gruplar arasında anlamlı farklılık bulamadık. Kontrol ve jelatin gruplarındaki her deneğin yavru sahibi olması sıçanlarda 6 saatlik tek taraflı deneysel testis torsiyonu sonrasında aynı taraf testiste daha belirgin olmak üzere her iki testislerde histopatolojik olarak germ hücre hasarlanması, spermatogenezde gecikme ve flow sitometrik olarak haploid hücre yüzdesinde azalma görülse de bu durumun fertiliteyi belirgin olarak etkilemediğini düşündürmektedir. DNA flow sitometrik haploid hücre analizi germ hücre differansiyasyonunu değerlendirmede güvenilir ve kullanışlı bir yöntemdir.[61,91] Normal testis DNA histogramlarına göre hücre topluluklarının yaklaşık %70'ı haploid(n) hücrelerden oluşmaktadır; bunlar matür spermatozoa ve spermatidlerdir.[61,91] Literatürde daha önce yapılan çalışmalarda bizim bulgularımızı destekler şekilde 1,5,6 ve 12 saatlik deneysel testis torsiyonu sonrasında DNA flow sitometri ile incelendiğinde aynı taraf testiste daha belirgin olmak üzere karşı taraf testistede haploid hücre topluluğunda azalma saptanmıştır.[61,91,157-158] Ancak bu çalışmaların hiçbirinde DNA flow sitometri bulguları yavru sayısı ile korrele edilmemiştir.

Denek başına düşen yavru sayısı acısından gruplar arasında farklılık olmamasının diğer bir nedeni 6 saatlik iskemi ve reperfüzyon hasarının infertiliteye yol açacak kadar germ hücre hasarı oluşturmaması olabilir. Testis torsiyonunda torsiyon süresi ve derecesi çok önemlidir. Köpeklerde yapılan çalışmalarda 2 saat süren 4 tam dönmenin geri dönüşsüz değişikliklere yol açtığı ancak 12 saate kadar devam eden

360 derece dönmenin hiçbir değişikliğe yol açmadığı gösterilmiştir. İnsanlarda 4 saat süren torsiyonun daha sonra testiste atrofiye yol açabildiği ve 12 saat düzeltilmeyen torsiyonun mutlak atrofiye neden olduğu klinik olarak kanıtlanmıştır. Daha önceki çalışmalarda sıçanlarda 1 saatlik 720 derecelik testis torsiyonu sonrası spermatogenezde kalıcı azalma gösterilmiştir.[93,94] Ayrıca ve deneysel testis iskemi-reperfüzyon hasarlanmasında 4-6 saaten daha uzun süren iskeminin kalıcı doku hasarlanmasına yol açtığı konusunda genel olarak kesin fikir birliği bulunmaktadır.[4,80,93,94] Ancak bizim çalışmamızdaki bulgular testis torsiyonu sonrasında özellikle aynı taraf testiste belirgin ve kalıcı doku hasarı oluşsada, karşı testisin yeterince etkilenmediği deneklerde bu durumun infertilite ile sonuçlanmadığını göstermektedir.

Tek taraflı testis torsiyonu sonrasında karşı testisi ve fertiliteyi korumaya amacıyla birçok deneysel çalışmada reperfüzyon hasarını önleyen, apopitozu azaltan ajanlar, kimyasal sempatektomi yapan ilaçlar veya vazodilatatör tedaviler kullanılmıştır.[4,45-59] Bu çalışmaların çoğunda koruyucu tedaviler tek taraflı testiküler olay oluşturulmadan hemen önce uygulanmıştır. Oysaki klinikte hastalar testiküler hasarlanma oluştuktan sonra genelde geç dönemde başvurmaktadırlar. Bu nedenle oluşan etkilenme sonrasında sağ kalan germ hücre populasyonunun fonksiyonunu ve azalan spermatogenezi artırmaya yönelik tedavilerin fertilite üzerine olumlu etkilerinin olabileceği düşünülerek bu çalışmada hasarlanma sonrası sağ kalan germ hücre fonksiyonunu güçlendirmeye ve artırmaya yönelik tedavi yöntemlerinin tek taraflı testis torsiyonu sonrası uygulanmasının sonuçlarını araştırmak amaçlandı.

Testislerin normal gelişimi ve fonksiyonlarının hormonlar, büyüme faktörleri ve sitokinleri içeren endokrin ve parakrin yolların aracılığıyla olduğu bilinmektedir.[20,24,37,39,47] IGF (İnsülin benzeri büyüme faktörü), GH (büyüme hormonu) ve FGF(fibroblast büyüme faktörü), postnatal ve erişkin memelilerin testiküler hücrelerinde reseptörleri gösterilmiş faktörlerdir. Bu faktörler testiküler kord morfogezesisi, testiküler hormon sekresyonunun düzenlenmesi ve spermatogenezin kontrolünü içeren önemli testiküler aktivitelerin gerçekleştirilmesinde rol almaktadırlar.[20,24,37,39,47] Yakınlarda yapılan bir çalışmada deneysel inmemiş testis modelinde lokal ve kontollü salınan IGF, GH ve FGF'nin

aynı taraf ve karşı taraf testiste haploid hücre populasyonunu artırarak spermatogenezi iyileştirdiği gösterilmiştir.[70] Bu özellikleri nedeniyle IGF, GH ve FGF'nin testis torsiyonu deneysel modelinde sağ kalan germ hücre fonksiyonunu ve fertiliteyi artırabileceği düşünülmüştür

Bu çalışmadan elde edilen veriler Prepubertal sıçanlarda 6 saatlik testis torsiyonu ve detorsiyonu işlemi sonrasında lokal ve kontrollü salınan IGF ve FGF tedavisi uygulandığında aynı taraf ve karşı taraf testiste ortalama seminifer tubul çaplarının artığı, testiküler biyopsi skoru ve haploid hücre yüzdesinin yükseldiği göstermiştir. Bu bulgular 6 saatlik testis torsiyonu ve detorsiyonu sonrasında IGF ve FGF'nin germ hücre fonksiyonunun ve maturasyonunu belirgin olarak artırdığını göstermektedir.

Spermatogonya, primer spermatositler ve Leydig hücrelerde IGF-I reseptörlerinin yakın zamanda gösterilmesi IGF-I'in spermatogenezde önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir.[24] IGF'lerin testis fonksiyonlarındaki düzenleyici etkileri Sertoli ve Leydig hücreleri arasındaki hücresel bağlantılarda anahtar rol oynamaları ve steroidogenezi uyarmaları ile ilişkilendirilmiştir.[24] Ayrıca postnatal dönemde sıçan Leydig hücrelerinde IGF-I'in anti apopitotik özellikleri de yakın zamanda gösterilmiştir.[110] Son zamanlarda yapılan bir çalışmada IGF-I'in reaktif oksijen radikalleri nedeni ile ortaya çıkan lipit peroksidasyonunu engelleyerek oksidatif hasarı önlediği gösterilmiştir.[150] Başka bir çalışmada ise testis torsiyonu deneysel modelinde reperfüzyon öncesi intraperitoneal IGF-I enjeksiyonunun 24 saat sonra bakıldığında germ hücrelerine spesifik apopitozu önlediği gösterilmiştir.[151] Bu çalışmada lokal ve kontrollü salınan IGF tedavisinin germ hücre morfolojisi ve fonksiyonu üzerine olan olumlu etkileri yukarıda sayılan özellikleri ile ilişkilendirilebilir.

Yakın zamanda yapılan yayınlarda FGF'nün testis gelişiminde testiküler hormon sekresyonunu düzenlenmesinde ve spermatogenezin kontrolünde de rolü olduğu ileri sürülmüştür.[49] Bu etkilerin Sertoli ve Leydig hücreleri arasındaki önemli morfolojik yapının korunmasını epitel ve mezenkimal hücreler arasındaki önemli bağlantıları sağlayarak gerçekleştirdikleri düşünülmektedir. Germ hücreleri için önemli yapısal

ve besinsel kaynak olan Sertoli hücrelerinin fonksiyonunu düzenleyerek germ hücre fonksiyonu etkiledikleri varsayılmaktadır. Yapılan ayrıntılı çalışmalarda FGF'lerin sıçan testisinde mitojenik etkide bulunduğu, normal testis kord morfogenezinin oluşmasında çok önemli etkileri olduğu gösterilmiştir.[49] Ayrıca deneysel olarak spermatik arter ve ven ligasyonu yapılan sıçanlarda testiküler kan akımını arttırdığı ve testis morfolojisi iyileştirdiği gösterilmiştir.[50] Başka bir çalışmada deneysel inmemiş testis modelinde lokal ve kontollü salınan FGF'nin aynı taraf ve karşı taraf testiste haploid hücre populasyonunu artırarak spermatogenezi iyileştirdiği gösterilmiştir. Bizim çalışmamızdan elde edilen sonuçlar da FGF'nin spermatogenez üzerine daha önce gösterilen olumlu etkilerini destekler niteliktedir.

Bu çalışmadan elde edilen verilere göre Prepubertal sıçanlarda 6 saatlik testis torsiyonu ve detorsiyon işlemi sonrasında lokal ve kontrollü salınan GH tedavisi uygulandığında aynı taraf ve karşı taraf testiste ortalama seminifer tubul çapı artmakta, testiküler biyopsi skoru ve haploid hücre yüzdesi yükselmektedir. Bu bulgular GH tedavisinin germ hücre morfolojisini ve fonksiyonunu olumlu yönde etkilediğini düşündürmektedir. Konjenital büyüme hormonu eksikliği olan erkeklerde pubertede gecikme, testis boyutlarında azalma, azalmış sperm sayısı ve sperm hareketliliğinde azalma olduğu bilinmektedir. Ayrıca büyüme hormonu salgılatıcı hormona (GHRH) karşı immünize edilmiş sıçanlarda testiküler büyüme ve germ hücre farklılaşmasında gecikme olduğu gösterilmiştir. Büyüme hormonu hipofizektomi yapılan sıçanlarda Leydig hücrelerinin, LH'a duyarlılığını arttırmaktadır.[153] Ayrıca GH tedavisinin izole prepubertal sıçan Leydig hücrelerinde testesteron salınımını artırdığı gösterilmiştir.[153] Bunun yanı sıra gonadal fonksiyonları gonadotropin salıcı hormon anologları ile baskılanan sıçanlarda spermatosid ve spermatozoa sayısını artırdığı gösterilmiştir.[153] Ayrıca GH tedavisinin subfertil GH eksikliği olan cüce sıçanlarda index spermatozoa motilitesini artırıdığı gösterilmiştir.[153] Farklı çalışmalarda Büyüme hormonunun öncü, immatür ve erişkin sıçan Leydig hücrelerinde önemli proteinleri kodlayan mRNA düzeylerini arttırarak bu hücre grubunun farklılaşmasında etkili olduğu gösterilmiştir.[37,154] Büyüme hormonunun spermatogenezi artırıcı ve gonadal fonksiyonu düzenleyici etkilerini LH benzeri Leydig hücre uyarıcı ve testisteki spermatogenic hücreleri doğrudan aktive edici etkileri yolluyla gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Son zamanlarda yapılan bir

çalışmada GH'nun siklofosfamid uygulanan sıçanlarda testis fonksiyonunu koruduğu gösterilmiştir.[153] Ayrıca büyüme hormonun ve IGF-I'in reaktif oksijen radikalleri nedeni ile ortaya çıkan lipit peroksidasyonunu engelleyerek oksidatif hasarı önlediği sıçan karaciğer, beyin, böbrek ve testis dokularında gösterilmiştir.[150] Büyüme hormonunun bu çalışmada testis torsiyonu sonrası gözlenen olumlu etkileri hem direkt testis üzerine olan spermatogenezi artıran ve gonadal fonksiyonu düzenleyen hemde oksidatif hasarı önleyici etkilerine bağlı olarak oluşmuş olabilir.

Bu çalışmada GH'nun lokal kullanımı aynı taraf testis üzerinde daha fazla etkili iken, sistemik kullanım karşı taraf üzerinde daha fazla etkili olduğu görülmüştür. Bu bulgu ilaç taşıyıcı sistemlerin lokal olarak daha fazla etkili olması ile açıklanabilir. Ancak sistemik kullanım ve lokal kullanım açısından karşı testis parametrelerinde farklılık olmaması, lokal kullanımın da karşı testis üzerine belirgin sistemik etki de bulunduğunu düşündürmektedir.

Prepubertal sıçanlarda tek taraflı testis torsiyonunun ardından FGF, IGF ve GH'ın lokal salınımı aynı taraf testislerde germ hücre histolojisinin onarımı ve hem aynı taraf hem de karşı taraf haploid germ hücre popülasyonunda artış ile sonuçlanmaktadır. Bizim bulgularımız bu büyüme faktörlerinin uygulanmasının unilateral testis torsiyonunun sonra azalan germ hücre fonksiyonunu olumlu yönde etkileyerek, fertiliteyi artırabileceğini düşündürmektedir. Sıçanlarda 6 saatlik tek taraflı deneysel testis torsiyonu sonrasında histopatolojik olarak germ hücre hasarlanması ve flow sitometrik olarak haploid hücre yüzdesinde azalma görülse de bu durum fertiliteyi etkilememektedir.

6. SONUÇLAR

1. Prepubertal sıçanlarda altı saatlik testis torsiyonu ve detorsiyon işlemi sonrasında aynı taraf ve karşı taraf testiste ortalama seminifer tübül çapında azalma, testiküler biyopsi skorunda düşme ve haploid hücre populasyonında azalma ile karekterize germ hücre hasarlanması ve germ hücre olgunlaşmasında geçikme oluşmaktadır.
2. Prepubertal sıçanlarda altı saatlik testis torsiyonu ve detorsiyon işlemi sonrasında lokal ve kontrollü salınan IGF tedavisi uygulandığında aynı taraf ve karşı taraf testiste ortalama seminifer tubul çapı artmakta, testiküler biyopsi skoru ve haploid hücre yüzdesi yükselmektedir.
3. Prepubertal sıçanlarda altı saatlik testis torsiyonu ve detorsiyon işlemi sonrasında lokal ve kontrollü salınan FGF tedavisi uygulandığında aynı taraf ve karşı taraf testiste ortalama seminifer tubul çapı artmakta, testiküler biyopsi skoru ve haploid hücre yüzdesi yükselmektedir.
4. Prepubertal sıçanlarda altı saatlik testis torsiyonu ve detorsiyon işlemi sonrasında lokal ve kontrollü salınan GH tedavisi uygulandığında aynı taraf ve karşı taraf testiste ortalama seminifer tubul çapı artmakta, testiküler biyopsi skoru ve haploid hücre yüzdesi yükselmektedir
5. Prepubertal sıçanlarda altı saatlik testis torsiyonu ve detorsiyon işlemi sonrasında sistemik GH tedavisi uygulandığında aynı taraf testiste ortalama seminifer tubul çapı artmakta, testiküler biyopsi skoru etkilenmemekte ve haploid hücre yüzdesi artmaktadır. Karşı taraf testiste ise seminifer tubul çapı artmakta testiküler biyopsi skoru ve haploid hücre oranı yükselmektedir.
6. GH'nun lokal kullanımı aynı taraf testis üzerinde daha fazla etkili iken, sistemik kullanım karşı taraf üzerinde daha fazla etkilidir.
7. Fertilite üzerinde tedavi grupları ve kontrol grupları arasında belirgin bir fark saptanmamıştır.

8. Sıçanlarda altı saatlik tek taraflı deneysel testis torsiyonu sonrasında karşı testislerde histopatolojik olarak germ hücre hasarlanması ve flow sitometrik olarak haploid hücre yüzdesinde azalma görülse de bu durum fertiliteyi etkilememektedir.

ÖZET

TEK TARAFLI TESTİS TORSİYONU DENEYSEL MODELİNDE IGF-I, GH VE FGF GİBİ BÜYÜME FAKTÖRLERİNİN UYGULANMASININ FERTİLİTE VE FEKUNDİTE ÜZERİNE ETKİLERİ (SIÇANLARDA DENEYSEL ÇALIŞMA)

Çalışmanın Amacı: Tek taraflı testis torsiyonu yapılmış sıçanların aynı taraf ve karşı taraf testislerindeki germ hücre popülasyonunda fibroblast büyüme faktörü (FGF), insulin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve büyüme hormonunun (GH) etkilerini değerlendirmek.

Gereç ve Yöntem: Üç haftalık 48 erkek Wistar Albino fareler 7 gruba ayrıldı: Grup 1, Sham, grup 2 kontrol, grup 3 jelatin, grup 4 FGF, grup 5 IGF, grup 6 lokal GH ve grup 7 sistemik GH. Sham grubunda sağ testis ortaya konularak, 5/0 ipekle tespit edildi. Gruplar 2-7'de sağ testis 720 derece döndürülerek, altı saat sonra detorsiyone edildi. Detorsiyon sonrası grup 3-6'da yüksüz (Grup 3) ya da 2.5µg FGF(Grup 4), 5µg IGF(Grup 5), ve 5µg GH(Grup 6) yüklü 1cm^2 jelatin filmler sağ testise dikildi. Grup 7'de 0.2 IU/100gr/gün dozunda GH subkutiküler olarak yedi gün boyunca sistemik uygulandı. 30 gün sonra her bir erkek 15 gün boyunca iki dişi ile birlikte tutuldu. Ardından her iki testis histopatolojik araştırma ve DNA flow sitometri için çıkarıldı. Her bir dişinin gebelik seyri izlenerek, her bir denek başına oluşan yavru sayısı kaydedildi. Histopatolojik değerlendirmede her bir sıçan için ortalama seminifer tübül çapları (OSTÇ) ve ortalama testiküler biyopsi skorları (OTBS) hesaplandı. DNA flow sitometrik yöntem kullanılarak Haploid (1n) hücrelerin yüzdesi saptandı.

Ana sonuçlar: Ortalama dişi yavruları açısından gruplar arasında farklılık yoktu ($p>0.05$). Hem aynı taraf hem de karşı taraf OSTÇ ve OTBS sham, FGF IGF, GH ve GH sistemik grupları ile karşılaştırıldığında kontrol ve jelatin gruplarında belirgin olarak düşük idi ($p<0.001$). Aynı taraf OTBS GH sistemik grubu ile karşılaştırıldığında GH lokal grubunda daha yüksek iken, karşı taraf açısından anlamlı farklılık gözlenmedi.Haploid hücre yüzdesi sham, FGF IGF, GH ve GH

sistemik grupları ile karşılaştırıldığında kontrol ve jelatin gruplarının hem aynı taraf hem de karşı taraf testislerinde belirgin düşmüştü, ($p<0.001$). Aynı taraf haploid hücre yüzdesi GH sistemik grubunda GH lokal grubuna göre belirgin düşük bulunurken, karşı taraf haploid hücre yüzdesi belirgin yüksek bulundu, $p<0.001$).

Sonuç: Sıçanlarda 6 saatlik tek taraflı deneysel testis torsiyonu ve detorsiyon sonrasında histopatolojik olarak germ hücre hasarlanması ve flow sitometrik olarak haploid hücre yüzdesinde azalma görülse de bu durum fertiliteyi etkilememektedir. Tek taraflı testis torsiyonu ve detorsiyonu sonrasında FGF, IGF ve GH tedavisi aynı taraf ve karşı taraf testislerde germ hücre histolojisinin onarımı ve haploid germ hücre popülasyonunda artış ile sonuçlanmaktadır. GH'nun sistemik uygulanması aynı tarafta lokal uygulanım kadar etkili değildir. Elde edilen bulgular bu büyüme faktörlerinin uygulanmasının unilateral testis torsiyonunun sonrasında fertilite potansiyelini artırabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: *testis, torsiyon, , FGF, IGF, GH*

SUMMARY

THE EFFECTS OF IGF-I, FGF AND GH TREATMENT, ON FERTILITY IN EXPERIMENTAL UNILATERAL TESTICULAR TORSION MODEL .

Aim of the study: To evaluate the effects of fibroblast growth factor(FGF), insulin like growth factor(IGF) and growth hormone(GH) on germ cell population of the ipsilateral and contralateral testes of rats subjected to unilateral testicular torsion.

Methods: Forty eight male Wistar Albino rats at age of 3 weeks were divided into 7 groups as follows: Group 1: Sham, Group 2: Control, Group 3: Gelatin, Group 4: FGF, Group 5: IGF, Group 6: GH local and Group 7 GH systemic. In the sham group, the right testis was exposed and sutured with 5/0 silk. In Groups 2-6, right testes were rotated 720 degrees and detorsed 6 hours later. In Groups 3-6, 1cm^2 gelatin films were sutured to the right testes, either unloaded(Group 3), or containing 2.5µg FGF(Group 4), 5µg IGF(Group 5), and 5µg GH(Group 6). In group 7 GH was administered 0.2 IU/100gr/d for 7 days following detorsion. After 30 days each male was cohabited with two unexposed female for a maximum of 7 days. Then both testes were removed for histopathological investigation and DNA flow cytometry. Pregnancy outcomes of each female were recorded. Mean seminiferous tubular diameters (MSTD), and mean testicular biopsy scores (MTBS), of each rat were recorded. The percentage of haploid(1n) cells were calculated.

Main Results: There were no differences between groups regarding mean female offspring numbers. Both ipsilateral and contralateral MSTD and MTBS were significantly decreased in control and gelatin groups compared with sham, FGF IGF, GH and GH systemic groups. Although ipsilateral MTBS was significantly increased in GH local group compared with GH systemic group, contralateral MTBS did not differ between groups.Haploid cell percentage was significantly decreased in both ipsilateral and contralateral testes of the control and gelatin groups compared with sham, FGF, IGF and GH groups. Although ipsilateral haploid cell percentage was significantly increased in GH local group

compared with GH systemic group, contralateral haploid cell percentage was significantly decreased in GH local group, ($P<0.05$)

Conclusions: Although unilateral 6 hours duration of testicular torsion and detorsion resulted in impaired germ cell histology and decrease in haploid cell population of both ipsilateral and contralateral testes, in prepubertal rats, fertility was not effected. Application of FGF,IGF and GH after unilateral testicular torsion-detorsion model in prepubertal rats resulted in preservation of germ cell histology and increase in haploid germ cell population of both ipsilateral and contralateral testes after unilateral testicular torsion. Our findings suggest that application of these growth factors may improve fertility after unilateral testicular torsion

Key words: *testis, torsion, FGF, IGF, GH*

KAYNAKÇA

1. Grosfeld JL, O'neil JA. Fonkalsrud EW Undescended testis, Torsion, and Varicocele. *Pediatric Surgery*. USA.Mosby Inc. 2003:1193-1215.
2. Başaklar C. Akut skrotum*Bebek ve Çocukların Cerrahi ve Ürolojik Hastalıkları*. Ankara: Palme yayıncılık, 2006:1753-1764.
3. Noseworthy J, Testicular Torsion. Ashcraft, Murphy, Sharp, Sigalet, Snyder. editors. *Pediatric Surgery*. 3rd Ed. United States of America: W.B. SAUNDERS COMPANY, 2000: 674-680.
4. Filho DW, Torres MA, Bordin ALB. Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. *Molecular Aspects of Medicine*. 2004 ;25:199-210.
5. Turner TT, Brown KJ. Spermatic cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow. *Biol. Reprod*. 1993;49, 401–407.
6. Choi H, Choo MS, Kim KM, Kim WH, Song Lee Y, Chung MH. The alterations of cellular metabolism in the contralateral testis followving spermatic cord torsion in rats. *J Urol*. 1993; 150: 577-580.
7. Cosentino MJ, Nishida M, Rabinovvitz R, Cockett ATK. Histological changes occurring in the contralateral testes of prepubertal rats subjected to various durations of unilateral spermatic cord torsion. *J Urol*. 1985; 133: 906-11.
8. Lysiak JJ, Turner SD, Turner TT. Molecular Pathway of Germ Cell Apoptosis Following Ischemia/Reperfusion of the Rat Testis. *Biol reprod* . 2000; 63: 1465-1472.
9. Chakraborty J, Sinha Hikim AP, Jhunjhunwala JS. Stagnation of blood in the microvasculature of the affected and contralateral testes of men with short-term torsion of the spermatic cord. *J Androl.* 1985; 6: 291-294.
10. Jhunjhunvvala JS, Sinha Hikim AP, Budd CA, Chakraborty J. Germ cell degeneration in the contralateral testis of the guinea pig with unilateral torsion of the spermatic cord. *J Androl* .1986; 7: 9-17.

11. Chakraborty J, Hikim APS, Jhunjhunwala J. Quantitative evaluation of testicular biopsies from men with unilateral torsion of spermatic cord. *Urology*. 1985; 25:145-150.
12. Nagler HM, deVere White R, The effect of testicular torsion on the contralateral testis. *J. Urol*. 1982;128, 1343–1348.
13. Cerasaro TS, Nachtsheim DA, Otero F, Parsons CL, The effect of testicular torsion on the contralateral testis and the production of antisperm bodies in rabbits. *J. Urol*. 1984;132, 577–579.
14. Cosentino MJ, Rabinowitz R, Valvo JR, Cockett AT, The effect of prepubertal spermatic cord torsion on subsequent fertility in rats. *J. Androl*. 1984;5, 93–98.
15. Thomas WEG, Cooper MJ, Crane GA, Lee G, Williamson R.N, Testicular exocrine malfunction after torsion. *Lancet 2*, 1984; 1357–1360.
16. Sade M, Amato S, Buyuksu C, Mertan S, Canda MS, Kaplanoglu N.. The effect of testicular torsion on the contralateral testis and the value of various types of treatment. *Br. J. Urol*. 1988;62, 69–71.
17. Tanyel FC, Buyukpamukcu N, Hicsonmez A. Contralateral testicular blood flow during unilateral testicular torsion. *Br. J. Urol*. 1989;63,.522–524.
18. Ferreira U, Netto Junior NR, Esteves SC, Rivero MA, Schirren C. Comparative study of the fertility potential of men with only one testis. *Scand J Urol Nephrol*. 1991;25:255-259.
19. Arap MA, Vicentini FC, Cocuzza M. Late Hormonal Levels, Semen Parameters, and Presence of Antisperm Antibodies in Patients Treated for Testicular Torsion. *J. Androl* .2007 ;28: 528-532.
20. Abd-Elmaksoud A, Sinowatz F. Expression and localization of growth factors and their receptors in the mammalian testis. Part I: Fibroblast growth factors and insulin-like growth factors. *Anat Histol Embryol* .2005;34:319-334.
21. Anderson JB, Williamson RCN. Fertility after torsion of the spermatic cord. Br. *J. Urol*. 1990;65, 225–230.

22. Anderson MJ, Dunn JK, Lipschultz LI. Coburn M. Semen quality and endocrine parameters after acute testicular torsion. *J. Urol.* 1982;147, 1545–1550.
23. Bartsch G, Frank S, Marberger H, Mikuz G. Testicular torsion: late results with special regard to fertility and endocrine function. *J Urol*. 1980;124:375–378.
24. Yagci A, Zik B. Immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) in the developing and mature rat testes. *Anat Histol Embryol* . 2006;35:305-309.
25. Lievano G, Nguyen L, Radhakrishnan J, Fornell L, John E. New animal model to evaluate testicular blood flow during testicular torsion. *J Pediatr Surg*. 1999;34:1004–1006.
26. Krarup, T. The testes after torsion. *Br. J. Urol*. 1978;50, 43–46.
27. Baud C, Veryac C, Couture A, Ferran JL. Spiral twist of the spermatic cordon: areliable sign of testicular torsion. *Paediatric Radiology*. 1998;28:950-953.
28. Acre JD, Cortes M, Vargas JC. Sonographic diagnosis of spermatic cord torsion .Rotation of the cord: a key to diagnosis. *Pediatric Radiol* .2002;32: 485-491.
29. Palitel HJ, Connoly LP, Atala A, Paltiel AD, Zurakowski D, Treves ST. Acute scrotal symptoms in boys with indtermined clinical presentation: comparision of color dop-ler sonography and scynthigraphy. *Radiology*.1998; 207: 223-231.
30. Lysiak JJ, Nguyen QA, Turner TT. Peptide and nonpeptide reactive oxygen scavengers provide partial rescue of the testis after torsion. *J Andro* .2002;23: 400-409.
31. Rabinowitz R. The importance of the cremasteric reflex in acute scrotal swelling in children. *J. Urol.* 1984;32, 89-90.
32. Siegl A, Synder H, Duckett JW. Epididymitis in infants and boys: underlying urogenital anomalies and efficacy of imaging nodalities. *J. Urol*. 1987;173, 1100-1103.

33. Hess MF, Roser JF. The effects of age, season and fertility status on plasma and intratesticular insulin-like growth factor I concentration in stallions. *Theriogenology*. 2001; Sep 15;56(5):723-733.
34. Karamazyn B, Steinberg R, Kornreich L. Clinical and sonographic criteria of acute scrotum in children: a retrospective study of 172 boys, *Pediatric Radiol* 2005;35, 302-310.
35. McAndrew HF, Pemberton R, Kikiros CS, Gollow I. The incidence and investigation of acute scrotal problems in children. *Pediatric Surg.* 2002;18: 435- 37.
36. Kadish HA, Bolte RG. A retrospective of paediatric patients with epididymtits, testicular torsion and torsion of testicular appendages. *Paediatrics*. 1998;102:73-76.
37. Colon E, Svechnikov KV, Carlsson-Skwirut C, Bang P, Soder O. Stimulation of steroidogenesis in immature rat Leydig cells evoked by interleukin-1 alpha is potentiated by growth hormone and insulin-like growth factors. *Endocrinology.* 2005;146:221-230.
38. Elekos M, Asbach H, Markou S. Etiology of the acute scrotum with regard to distribution. *J Urol* .1988;139: 1023.
39. Froment P, Vigier M, Nègre D, Fontaine I, Beghelli J, Cosset FL, Holzenberger M, Durand P. Inactivation of the IGF-I receptor gene in primary Sertoli cells highlights the autocrine effects of IGF-I. *J Endocrinol* .2007;194:557-568.
40. Middleton WD, Siegel BA, Melson GL, Yates CK, Andriole GL. Acute scrotal disorders: prospective comparison of color Doppler US and testicular scintigraphy. *Radiology* .1990; 177: 17781.
41. Keislinger VJ, Schroder DE, Paulijev P, Hull J. Spermatic cord bloc and manual reduction: primary treatment for spermatic cord torsion . *J.Urol* .1984 ; 132: 921-923.
42. Bellinger MF, Abramovitz H, Brantley S,Marshall G. Orchiopexy: an experimental study of the effect of surgical technique on testicular histology, *J.Urol* .1989;142 :553-555.
43. Ferrari R. *L-Carnitine*, London :Academic Press Limited, 1992; 5-17.

44. Rebouche CT, Paulson DT. Carnitine Metabolism and Function in Humans. *Ann Rev Nutr* .1986;6: 41-66.
45. Blank ML, O'Neill PJ, Steigman CK, Cobb LM, Wilde RA, Havenstein PJ, Chaudry LH, Reperfusion injury following testicular torsion and detorsion in prepubertal rats. *Urol. Res*. 1993;21, 389–393.
46. Karagüzel G, Tanyel FC, Kılınç K. The preventive role of chemical sympathectomy on contrlateral testicular hypoxic parameters encountered during unilateral testicular torsion. *British J Urol*.1994; 507-510
47. Colón E, Zaman F, Axelson M, Larsson O, Carlsson-Skwirut C, Svechnikov KV, Söder O. Insulin-like growth factor-I is an important antiapoptotic factor for rat leydig cells during postnatal development. *Endocrinology* .2007;148:128-139.
48. Castilla-Cortazar I, Garcia M, Quiroga J, Diez N, Diez-Caballero F, Calvo A, Diaz M, Prieto J. Insuline-like growth factor-I reverts testicular atrophy in rats with advanced cirrhosis. *Hepatology*. 2000;32:592-600.
49. Par G, Erik S, Claesson-Welsh L. Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. *Crit Rew Oncol/Hematol. 2*000;34:185-194.
50. Güler F, Bingöl-Kologlu M, Yagmurlu A, Guven C, Hasirci N, Kuçuk O, Aytac S, Dindar H. The effects of local and sustained release of fibroblast growth factor on testicular blood flow and morphology in spermatic artery-and vein-ligated rats. *J Ped Surg* .2004;39:709-716.
51. Orozco TJ, Wang JF, Keen CL. Chronic consumption of a flavonol- and procyanidin-rich diet is associated with reduced levels of 8-hydroxy-20-deoxyguanosine in rat. *J. Nutr. Biochem.* 2003;14, 104–110.
52. Ozkan KU, Boran C, Kilinc M, Garipardic M, Kurutas EB. The effect of zinc aspartate pretreatment on ischemia–reperfusion injury and early changes of blood and tissue antioxidant enzyme activities after unilateral testicular torsion–detorsion. *J. Ped. Surg*. 2004; 39, 91–95.
53. Yurtçu M, Abasiyanik A, Avunduk MC, Muhtaroğlu S. Effects of melatonin on spermatogenesis and testicular ischemia-reperfusion injury after unilateral testicular torsion-detorsion. *J Pediatr Surg*. 2008; Oct;43(10):1873-1878.

54. Wei SM, Yan ZZ, Zhou Beneficial effect of taurine on testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *Urology*. 2007 Dec;70(6):1237-42,
55. Pekcetin C, Ergur BU, Kiray M, Bagriyanik A, Tugyan K, Erbil G, Ozogul C.The protective effects of trimetazidine on testicular ischemia and reperfusion injury in rats. *J, Pediatr Surg Int.* 2007; Nov;23(11):1113-1118.
56. Etensel B, Ozkisacik S, Ozkara E, Serbest YA, Oztan O, Yazici M, Gürsoy H.The protective effect of dexpanthenol on testicular atrophy at 60th day following experimental testicular torsion. *Pediatr Surg Int.* 2007; Mar;23(3):271-5.
57. Dokmeci D, Inan M, Basaran UN, Yalcin O, Aydogdu N, Turan FN, Uz YH. Protective effect of L-carnitine on testicular ischaemia-reperfusion injury in rats. *Cell Biochem Funct*. 2007 Nov-Dec;25(6):611-618.
58. Prillaman HM, Turner TT, Rescue of testicular function after acute experimental torsion. *J. Urol*. 1997;157, 340–345.
59. Turan C, Kucukaydin N, Bekerecioglu A, Kazez A, Dogan P, Kucukaydin M, The effect of vitamin E on ipsilateral and contralateral testis following unilateral testicular torsion in rats. *Res. Exp. Med*. 1996; 194, 243–246.
60. Tunçkıran A, Çayan S, Bozlu M. Protective effect of vascular endothelial growth factor on histologic changes in testicular ischemia- reperfusion injury. *Fertil steril*. 2005;84:468-473.
61. Shiraishi K, Naito K, Yoshida K. Inhibition of Calpain but no Caspase protects the testis against injury after experimental testicular torsion of rat. *Biol Reprod* .2000;63:1538-1548.
62. Ergur BU, Kiray M, Pekçetin C. Protective effect of erythropoietin pretreatment in testicular ischemia- reperfusion injury in rats. *J Ped Surg* .2008:43;722-728
63. Yazihan N, Ataoglu H, Koku N. Protective role of erythropoietin during testicular torsion of the rats. *World J Urol* .2007:25;531-536.
64. Zhao Y, Zheng X, Zhou J. Sulfasalazine prevents apopitosis in spermatogenetic cells after experimental testicular torsion / detorsion. *Acta Pharmacologica Sinica* 2006;27; 603-608.

65. Ustün H, Akgül KT, Ayyildiz A, Yağmurdur H, Nuhoğlu B, Karagüzel E, Oğüş E, Germiyanoğlu C.Effect of phospodiesterase 5 inhibitors on apoptosis and nitric oxide synthases in testis torsion: an experimental study. *Pediatr Surg Int*. 2008 ;Feb;24(2):205-211.
66. Yapanoglu T, Aksoy Y, Gursan N, Ozbey I, Ziypak T, Calik M.Antiapoptotic effects of dehydroepiandrosterone on testicular torsion/detorsion in rats. . *Andrologia*. 2008; Feb;40(1):38-43.
67. Yagmurdur H, Ayyildiz A, Karaguzel E, Akgul T, Ustun H, Germiyanoglu C.Propofol reduces nitric oxide-induced apoptosis in testicular ischemia-reperfusion injury by downregulating the expression of inducible nitric oxide synthase. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2008; Mar;52(3):350-357.
68. Mogilner JG, Lurie M, Coran AG, Nativ O, Shiloni E, Sukhotnik I. Effect of diclofenac on germ cell apoptosis following testicular ischemia-reperfusion injury in a rat. *Pediatr Surg Int*. 2006; Jan;22(1):99-105.
69. Uguralp S, Usta U, Mizrak B. Resveratrol may reduce apoptosis of rat testicular germ cells after experimental testicular torsion. *Eur J Pediatr Surg*. 2005. Oct;15(5):333-336.
70. Sarioglu-Buke A, Erdem S, Gedikoglu G, Bingol-Kologlu M, Tanyel FC. Capsaicin effectively prevents apoptosis in the contralateral testis after ipsilateral testicular torsion. *BJU Int*. 2001; Nov;88(7):787-789.
71. Cotton LM, O'Bryan MK, Hinton BT. Cellular Signaling by Fibroblast Growth Factors (FGFs) and Their Receptors (FGFRs) in Male Reproduction. *Endocr Rev*. 2008; 23:193-216.
72. Quinn FM, Crockard AD, Brown S. Secondary changes in the scrotal testis in experimental unilateral cryptorchidism. *J Pediatr Surg*. 1990; 25:402-405.
73. Udagawa K, Takeda M, Hosaka M, Kubota Y, Ogawa T. Recovery of spermatogenesis by high dose gonadotropin-releasing hormone analogue treatment in rat cryptorchid testis after orchiopexy. *J Urol*..2002:168:1279-83.
74. Giwercman A, Clausen OP, Bruun E, Frimodt-Moller C, Skakkebaek NE. The value of quantitative DNA flow cytometry of testicular fine-needle

aspirates in assessment of spermatogenesis: a study of 137 previously maldescended human testes. *Int J Androl*.1994;17:35-42.

75. Mansbach JM, Forbes P, Peters C. Testicular Torsion and Risk Factors for Orchiectomy. *Arch Pediatr Adolesc Med* .2005;159:1167-1171.
76. Cass AS. Elective orchiopexy for recurrent testicular torsion. *J Urol* .1982; 127: 253-258.
77. Baker LA, Sigman D, Mathews RI, Benson J, Docimo SG. An analysis of clinical outc mesusing color dopler testicular ultrasound for testicular torsion. *Pediatric*s. 2000; 105:604-607.
78. Leape LL. Torsion of the testis. *JAMA* 1967; 200: 93-97.
79. Glaebeke EV, Khairouini A, Larroquet M, Audry G, Gruner M. Acute Scrotal pain in children: results of 543 surgical exploration s. *Pediatric. Surg*. 1999;15: 353-57.
80. Rhee HW, Yoon MS, The effect of testicular torsion on the contralateral testis in rats. *J. Cathol. Med. Coll*. 1988;41, 957–968.
81. Anderson JB, Williamson RCN, Testicular torsion in Bristol: a 25 year review. *Br. J. Surg*. 1988;75, 988–992.
82. Kerr JB, Risbridger GB, Murray PJ, Knell CM. Effect of unilateral cryporchidism on the intertubular tissue of the adult rat testis: evidence for intracellular changes within the Leydig cells. *Int J Androl* .1988;11:209-223.
83. Cass AS, Cass BP, Veerarghan K. Immediate exploration of the unilateral acute scrotum in young male subjects. *J Urol* .1980;124: 829-831
84. Clift VL, Hutson JM. The acute scrotum in childhood. *Pediatr Surg Int* . 1989; 4: 185.
85. Colondry AH. Acute urologic conditions. *Pediatr Ann* . 1994; 23: 207-210.
86. Cos LR Rabinowitz R. Trauma induced testicular torsion in children. *J trauma* . 1982; 22: 244.
87. SondraLP, Lapidies J. Experimental torsion of the spermatic cord. *Surg Forum* .1961; 12: 502.
88. Loomis P, Cadario ME, Miller CD, Brinsko SP, Rigby S, Blanchard TL. Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-

2and -5 in equine seminal plasma: association with sperm characteristics and fertility. *Biol Reprod.* 2002 Aug;67(2):648-54.

89. Kosar A, Kupeli B, Alcigir G. Immunologic aspect of testicular torsion: detection of antisperm antibodies in contralateral testicle. *Eur Urol*. 1999;36:640–644.

90. Mastrogiacomo I, Zanchetta R, Graziotti P, Betterle C, Scrufari P, Lembo A. Immunological and clinical study of patients after spermatic cord torsion. *Andrologia*. 1982;14:25–30.

91. Carroll TA, Regan MC, Alyusuf R, Greene D, Curran B, Kay E, Leader M, Fitzpatrick JM, Determination of testicular function after torsion by DNA flow cytometry of serial fine-needle aspirates. *Br. J. Urol*. 1997;79: 449–454.

92. Baker LA, Turner TT. Leydig cell function after experimental testicular torsion despite loss of spermatogenesis. *J Androl* .1995; 16:12–16.

93. Turner TT. Acute experimental testicular torsion: no effect on the contralateral testis. *J Androl.* 1985; 6:52–72.

94. Turner TT, Miller DW. On the synthesis and secretion of rat seminiferous tubule proteins in vivo after ischemia and germ cell loss. *Biol Reprod*. 1997; 57:1275–1284.

95. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian tissues. *Physiol. Rev*. 1979; 59,:527–605.

96. Becker EJ, Turner TT. Endocrine and exocrine effects of testicular torsion in the prepubertal and adult rat. *J. Androl*. 1995;16: 342–351.

97. Akgur FM, Kilinc K, Aktug T. Reperfusion injury after detorsion of unilateral testicular torsion. *Urol. Res*.1993; 21: 395–399.

98. Akgur FM, Kilinc K, Aktug T, Mustafa O.. The effect of allopurinol pretreatment before distorting testicular torsion. *J. Urol*. 1994;151: 1715–1717.

99. Akgur FM, Kilinc K, Aktug T. Is ipsilateral testis mandatory for the occurrence of contralateral intratesticular biochemical changes indicative of hypoxia after unilateral spermatic cord torsion? *Eur. Urol*. 1995;8: 143–148.

100. Gonzalez-Flecha BS, Cutrin J, Boveris A. Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia–reperfusion. *J. Clin. Invest*.1993;91: 456–464.

101. Cutrin JC, Boveris A, Zingaro B, Corvetti G, Poli G. In situ determination by surface chemiluminescence of temporal relationships between evolving warm ischemia–reperfusion injury in rat liver and phagocyte activation and recruitment. *Hepatology* . 2000;31: 622–632.

102. Williamson RCN, Death in the scrotum: testicular torsion. *N. Engl. J. Med*. 1977; 296: 333–338.

103. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3 ed. London: Oxford Univ. Press. 1999: 693-702

104. Kaler LW, Neaves WB. Attrition of human Leydig cell population with advancing age. *Anat Rec*.1978; 192:513.

105. Johnsen SG. Testicular biopsy score count- A new method for registration of spermatogenesis in human testes: Normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*. 1970;1:2-25.

106. Ozkan KU, Boran C, Kilinc M, Garipardic M, Kurutas EB. The effect of zinc aspartate pretreatment on ischemia–reperfusion injury and early changes of blood and tissue antioxidant enzyme activities after unilateral testicular torsion–detorsion. *J. Ped. Surg*. 2004;39: 91–95.

107. Hadziselimovic F, Geneto R, Emmons LR. Increased apoptosis in the contralateral testis in patients with testicular torsion. *Lancet*. 1997;350: 118–121.

108. Saba M, Morales CR, Lamirande E, Gagnon C. Morphological and biochemical changes following acute unilateral testicular torsion in prepubertal rats. *J. Urol.* 1997;157: 1149–1154.

109. Roser JF. Endocrine and paracrine control of sperm production in stallions. *Anim Reprod Sci.* 2001; Dec 3;68(3-4):139-51.

110. Höckel M, Schlenger K, Dactrow S, Kissel T, Vaupel P: Therapeutic Angiogenesis. *Arch Surg* .1993;128: 423-439.

111. Folkman J, Szabo S, Stovroff M, McNeil P, Li W, Shing Y. Duodenal ulcer: Discovery of a new mechanism and development of angiogenic therapy that accelerates healing. *Ann Surg* . 1991;214(4):414-427.

.

112. . Passaniti A, Taylor RM, Pili R, Guo Y, Long PV, Haney JA, Pauly RR, Grant DS, Martin GR; A simple, quantitative method for assessing anjiogenesis and

antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Laboratory Investigation* .1992;67(4): 519-528.

113. Hirai M, Boersma A, Hoeflich A, Wolf E, Foll J, Aumüller TR, Braun J Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (Susscrofa): relation to fertility and seminal plasma growth factors. *J Androl*. 2001;22(1):104-10.

114. Benson DC, Lotfi MW. The pouch technique in the surgical correction of cryptorchidism in infants and children. *Surgery* .1967;62: 967-970.

115. Colombo JB, Naz RK. Modulation of insulin-like growth factor-1 in the seminal plasma of infertile men. *J Androl*. 1999; Jan-Feb;20(1):118-25.

116. Huang H, Rajkumar K, Murphy LJ. Reduced fecundity in insulin-like growth factor-binding protein-1 transgenic mice. *Biol Reprod*. 1997 Jan;56(1):284-9.

117. Jarow JP. Intratesticular arterial anatomy. *J Androl*.1990; 11:(3) 255-259.

118. Murakami T, Uno Y, Ohtsuka A, Taguchi T. The blood vascular architecture of the rat testis: a scanning electron microscopic study of corrosion casts followed by light microscopy of tissue sections. *Arch Histol Cytol*.1989; 52: (2) 151-172.

119. Karagüzel G, Gedikoğlu G, Tanyel FC, Büyükpamukçu N, Hiçsönmez A. Is ipsilateral testis mandatory for contralateral testicular deterioration encountered following spermatic cord torsion. *Urol Res* .1994;22:115-117. .

120. Ulubayram K, Nur Cakar A, Korkusuz P, Ertan C, Hasirci N; EGF containing gelatin based wound dressings. *Biomaterials*. 2001;22**:**1345–1356.

121. Glander HJ, Kratzsch J, Weisbrich C, Birkenmeier G. Insulin-like growth factor-I and alpha 2-macroglobulin in seminal plasma correlate with semen quality. *Hum Reprod*. 1996; Nov;11(11):2454-60.

122. Breier BH, Vickers MH, Gravance CG, Casey PJ. Growth hormone (GH) therapy markedly increases the motility of spermatozoa and the concentration of insulin-like growth factor-I in seminal vesicle fluid in the male GH-deficient dwarf rat. *Endocrinology*. 1996; Sep;137(9):4061-4.

123. Mendis-Handamaga SMLC, Kerr JB, De Kretser DM. Exprimental cryptochidism in the adult mouse I. Qualitative and Quantitative light microscopic morphology. *J Androl* .1990;11;539-547.

124. Anderson JB, Cooper MJ, Thomas WE, Williamson RC. Impaired spermatogenesis in testes at risk of torsion. *Br J Surg*.1986;73:847–849.

125. Stern JA, Lui RC, Laregina MC. Long-Term Outcome Following Testicular Ischemia in the Rat. *J Androl* .1990;11:390-395.

126. Burge DM. Neonatal testicular torsion and infarction: aetiology and management. *Br. J. Urol*. 1987; 59, 70–73.

127. Mendis-Handamaga SMLC, Kerr JB, De Kretser DM. Exprimental cryptochidism in the adult mouse III. Qualitative and Quantitative electron microscopic morphology of Leydig cells. *J Androl* .1991; 12;335-343.

128. Liu Y, Cai S, Shu XZ, Shelby J, Prestwich GD. Release of basic fibroblast growth factor from a crosslinked glycosaminoglycan hydrogel promotes wound healing. *Wound Repair Regen* .2007;15:245-251.

129. Edelman ER, Mathiowitz E, Langer R Klagsbrun M . Controlled and modulated release of FGF-b. *Biomaterials*. 1991;12:619–629.

130. Biogviovanni AM. Diagnosis and treatment: The undescended testicle. *Pediatrics*.1965; 36:781-785.

131. Klotz T, Vorreuther R, Heindenreich A, Zumbe J, Engelman U. Testicular tissue oxygen pressure. *J. Urol*. 1996;155, 1488–1491.

132. Lui RCLaregina MC, Herbold DR. Tolerance of rat testis to graded periods of total circularotory isolation. *J Surg Oncol* .1988;39:264.

133. Moon C, Kim J, Jang H. Activation of Akt/Protein Kinase B and Extracellular Signal-regulated Kinase in Rats with Acute Experimental Testicular Torsion. J Vet Med sci 2008 Apr;70(4):337-41

134. Moon C, Ahn M, Yasuzumi F, Shin T. Increased expression of both constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in the delayed phase of acute experimental testicular torsion. *J. Vet. Med. Sci.* 2005; 67: 453–456.

135. Moon C, Shin T. Involvement of macrophages in germ cell death in the rat testis with acute experimental testicular torsion. *Korean J. Vet. Res.* 2004; 44: 329–334.

136. Moon C, Yasuzumi F, Okura N, Kim H, Ahn M, Shin, T. Enhanced expression of tyrosine kinase receptor A in germ cells of rat testis with acute experimental testicular torsion. *Urol. Int.* 2005, 74: 79–85.

137. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* .1985; 312:159–163.

138. Jeong CW, Kim H, Kim S, Kim S H, Moon C, Shin T. Immunohistochemical study of flotillin-1 in rat testis with ischemia/reperfusion injury. *Cell Biol. Int.* 2007; 31: 609–614.

139. Turner TT, Lysiak JJ, Shannon J D, Nguyen Q A, Bazemore-Walker CR . Testicular torsion alters the presence of specific proteins in the mouse testis as well as the phosphorylation status of specific proteins. *J. Androl.* 2006;27: 285–293.

140. Cordeiro PG, Seckel BR, Lipton SA, D'Amore PA, Wagner J, Madison R. Asidic FGF enhances peripheral nerve regeneration in vivo. *Plast Reconstr Surg* . 1989; 83:1013-1019.

141. Chan LS, Lipshultz LI, Schwartzendruber D. Deoxyribonucleic acid flow cytometry: a new modality for quantative analysis of testicular biopsies. *Fertil Steril.* 1984;41:485-487.

142. Bassas L, Lesniak MA, Serrano J, Roth J, de Pablo F. Developmental regulation of insulin and type I insulin-like growth factor receptors and absence of type II receptors in chicken embryo tissues. *Diabetes*. 1988;37: 637–644.

143. Hiney JK, Srivastava V, Lara T, Dees WL. Ethanol blocks the central action of IGF-1 to induce luteinizing hormone secretion in the prepubertal female rat. *Life Sci*. 1998;62: 301–308.

144. Handelsman DJ, Spaliviero JA, Cott CD, Baxter RC. Identification of insulin-like growth factor-I and its receptor in the rat testis. *Acta Endocrinol*. 1985;109:543–549.

145. Zhou J, Bondy C,. Anatomy of insulin-like growth factor system in the human testis. *Fertil. Steril*. 1993;60, 897–904.

146. Soder O, Bang P, Wahab A, Parvinen M. Insulin-like growth factors selectively stimulate spermatogonial, but not meiotic, deoxyribonucleic acid synthesis during rat spermatogenesis. *Endocrinology*. 1992;131, 2344–2350.

147. Closset J,Gothot A, Sente B, Scippo M, Igout A, Vandenbroeck M,. Dombrowicz D, Hennen G. Pituitary hormone dependent expression of insulin-like growth factors I and II in the immature hypophysectomized rat testis. *Mol. Endocrinol.1*989; 89: 1125–1131.

148. Lın Tu, Regulation of Leydig cell function by insulin-like growth factor-I and binding proteins. *J. Androl*. 1995;16, 193–196.

149. Salardi S, Cacciari E, Ballardini D, Righetti F, Capello M, Cicognani A, Zucchini S, Natali G, Tassinari D. Relationships between growth factors (somatomedin-c and growth hormone) and body development, metabolic control, and retinal changes in children and adolescent with IDDM. *Diabetes* 1986; 35:832– 842.

150. Kokozsko A, Dabrowski j, Lewinski A. Protective effects of GH and IGF-I against iron – induced lipid peroxidation in vivo. *Exp Toxicol Patol.* 2008; 453-458.

151. Ozkurkcugıl C, Yardımoglu M, Dalcık H. Effect of insulin-like growth factor-1 on apoptosis of rat testicular germ cells induced by testicular torsion. *Bju Int* .2004:93;1094-1097.

152. Ohyama K, Ohta M, Nakagomi Y. Effects of GH and IGF-I on testosterone secration in premature male rats. *Endocr J* . 1995 42: 817-820.

153. Satoh K, Ohyama K, Nakagomi Y. Effects of growth hormone on testicular dysfuntion induced be cyclophosphamide in GH deficient rats. *Endocrine journal* . 2002;49 (6):611-619.

154. Kansaki M, Morris P. Growth hormone regulates steroidogenic acute regulatory protein expression and steroidogenesis in Leydig cell progenitors. *Endocrinology*. 1999;140:1681–1686.

155. Kologlu M, Bahadır B,Vargun R,Ilkay H,Bagriacık EU, Yolbakan S, Guven C, Endogan T, Hasırcı N, Dindar H. The Effects Of Local And Sustained Release Of Fibroblast Growth Factor, Insulin Like Growth Factor And Growth Hormone On Germ Cell Population In An Experimental Rat Model Of Unilateral Undescended Testis. *Urology.* 2009 yayına kabul edildi.

156. Sakkallıoğlu E. Lokal epidermal büyüme faktörünün kolondaki yara iyileşmesindeki etkileri. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi AD Uzmanlık tezi, 2001.

157. Salman AB, Okur DH, Tanyel FC. DNA flow cytometry reveals depressedspermatogenetic activity in the contralateral testis within 24 h of ipsilateralspermatic cord torsion independently of the presence of the testis andepididymis. *Eur Urol*. 1998; Oct;34(4):377-81.

158. Oguzkurt P, Okur DH, Tanyel FC, Büyükpamukçu N, Hiçsönmez A. The effects of vasodilatation and chemical sympathectomy on spermatogenesis after unilateral testicular torsion: a flow cytometric DNA analysis. *Br J Urol*. 1998 Jul;82(1):104-8.

159. Kamada K, Takihara H, Shirataki S, Ishizu K, Baba Y, Naito K. Flow cytometric DNA analysis demonstrates contralateral testicular deterioration in experimental unilateral testicular torsion of prepubertal rats. *Andrologia*. 1993; Sep-Oct;25(5):239-44