



Özgün Araştırma / Original Article

Deneysel Testis Torsiyon-Detorsiyonunda Agmatine'nin Etkisinin Tc-99m Perteknetat Sintigrafisi İle Değerlendirilmesi

Turgay Solak ¹, Yavuz Sami Salihoğlu ², Rabiye Uslu Erdemir ³

1 Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim Araştırma Hastanesi, Nükleer Tıp Bölümü, İstanbul, Türkiye

2 Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı Çanakkale, Türkiye

3 Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı Zonguldak, Türkiye

Geliş: 28.05.2019; Revizyon: 26.04.2020; Kabul Tarihi: 04.05.2020

Öz

Amaç: Bu çalışmanın amacı, sıçan modelinde tek taraflı testis torsiyon-detorsiyona bağlı oluşan testis hasarı üzerinde Agmatine uygulamasının koruyucu etkisini, Tc-99m perteknetat testis sintigrafi tetkikiyle göstermektir.

Yöntemler: Otuz erkek Winstar Albino sıçanı, her biri on sıçan içeren üç gruba ayrıldı. Grup 1'de (kontrol) sahte bir işlem yapıldı. Grup 2'de sol testis torsiyonu ile 3 saat sonra detorsiyon yapıldı. Grup 3'te grup 2'deki ile aynı cerrahi işlemler uygulandı; detorsiyondan 15 dakika önce intraperitoneal Agmatine verildi. Tüm sıçanlarda Tc-99m perteknetat ile testis sintigrafisi yapıldı. Tüm deney hayvanlarında histolojik inceleme ve malondialdehit (MDA) doku seviyelerinin ölçülmesi için orşiektomiler yapıldı.

Bulgular: MDA düzeyi torsiyon-detorsiyon yapılan gruplarda (grup 1 ve 2) kontrol grubuna göre yüksek bulundu; grup 3'te ise grup 2'ye göre azalmıştı. Histolojik hasar skoru Agmatine verilen grupta (grup 3) verilmeyen gruba (grup 2) göre düşük bulundu. İkinci grupta çoğunlukla 1 ve 2. derece testis yaralanması izlenmişken, grup 3'teki yaralanmalar 2-3 derece arasında değişmekteydi. Testis sintigrafisindeki testislerin alım oranında bütün gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı.

Sonuç: Deneysel sıçan modelinde testiküler iskemi-reperfüzyon hasarını değerlendirmek için testis sintigrafisinin uygun bir tetkik olmadığı düşünüldü. Agmatine testis torsiyonundaki iskemi-reperfüzyon hasarını azaltmada etkin rol oynayabilir.

Anahtar kelimeler: Testis torsiyonu, Agmatine, testis sintigrafisi

DOI: 10.5798/dicletip.7000000

Correspondence / Yazışma Adresi: Yavuz Sami Salihoğlu, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı Çanakkale, Turkey e-mail: yssalihoglu@hotmail.com

Evaluation of the Effect of Agmatine with Tc-99m Pertechnetate Scintigraphy in Experimental Testicular Torsion-Detorsion

Abstract

Objective: The aim of this study is to demonstrate the protective effect of Agmatine application on testicular damage caused by unilateral testicular torsion-detorsion in the rat model by Tc-99m pertechnetate testis scintigraphy.

Method: Thirty male Wistar Albino rats were divided into three groups, each containing ten rats. A sham operation was performed in group 1 (control). In group 2, torsion-detorsion procedures were performed on the left testicle. In group 3, the same surgical procedures were performed as in group 2; intraperitoneally Agmatine was given 15 minutes before detorsion. Testis scintigraphy was performed with Tc-99m pertechnetate in all rats. Orchiectomies were performed for histological examination and measurement of malondialdehyde (MDA) tissue levels in all experimental animals.

Results: MDA levels were higher in torsion-detorsion groups (groups 1 and 2) than in the control group; in group 3, it decreased compared to group 2. Histological damage score was lower in the group given to Agmatine (group 3) compared to the group not given (group 2). In the second group, mostly 1 and 2 degree testicular injury signs were observed, however, the injuries in group 3 vary between 2-3 degrees. No significant difference was found between the groups in the uptake ratio of the testicle in testicular scintigraphy.

Conclusion: In the experimental rat model, it was considered that testicular scintigraphy was not an appropriate test to evaluate the testicular ischemia-reperfusion injury. Agmatine may play an effective role in reducing ischemia-reperfusion injury in testicular torsion.

Keywords: Testis torsion, Agmatine, testis scintigraphy

GİRİŞ

Testis torsiyonu, testisin rotasyonu ve spermatik kordun bükülmesi sonucu testis kanlanmasında belirgin azalmayla sonuçlanan önemli bir klinik tablodur. Ergenlik döneminde sık görülen ürolojik bir acil durum olup erken tedavi edilmezse gonadal hasar ve testiküler atrofi ile sonuçlanabilir¹. Testis torsiyonuna bağlı gelişen iskemi-reperfüzyon (İ-R) hasarının patofizyolojisinde birçok hücrel ve moleküler mekanizma rol oynar². Oluşan bu İ-R hasarını azaltmak amaçlı çok sayıda kimyasal ve ilacın etkinliği ile ilgili çeşitli deneysel çalışmalar bulunmakla birlikte hiçbirinin klinik etkinliği tam olarak kanıtlanamamıştır.

Testis torsiyonunun klinik tanısında testis sintigrafisi, ultrasonografi ile birlikte uygulanması tavsiye edilen bir tetkiktir⁴. Testis sintigrafisinin ergenlerde ve erişkinlerde ultrasonografi ile benzer duyarlılığa sahip olduğu gösterilmiş^{5,6}; ancak prepubertal dönemde testis boyutlarının küçüklüğünden dolayı faydasının sınırlı olduğu ifade edilmiştir¹. Diğer taraftan testis torsiyonunun testis

sintigrafisi ile değerlendirildiği hayvan çalışmalarının hem sayısı azdır hem de faydası net olarak ortaya konabilmiş değildir^{7,8}.

Agmatine, merkezi sinir sisteminin birçok fizyolojik sürecine katılan bir nöromodülatördür ve nitrik oksit (NO) üretimi azaltarak antioksidan etki oluşturduğu düşünülmektedir³.

Çalışmamızda Agmatine'nin deneysel olarak oluşturacağımız testis torsiyonuna bağlı İ-R hasarını azaltmadaki etkinliğini histolojik ve MDA ölçümleri ile değerlendirmeyi ve oluşan değişiklikleri göstermede testis sintigrafisinin rolünü ortaya koymayı amaçladık.

YÖNTEMLER

Bu çalışmada 30 sağlıklı Wistar Albino erkek sıçan (270 ± 20 g) kullanıldı. Tüm hayvanların bakımı ve beslenmesi ulusal kılavuzda belirtilen kurallara uygun yapıldı. Çalışmamız yerel etik kurulu tarafından onaylanmış (izin no: 2012/05) ve çalışmamız sırasında etik kurallara uyulmuştur.

Deney hayvanları her biri 10 sıçandan oluşan üç gruba ayrıldı. Grup 1'de (Kontrol) sahte bir işlem yapıldı. Grup 2'de sol testiste torsiyon-detorsiyon yapıldı. Grup 3'te sol testiste torsiyon-detorsiyon yapıldı; detorsiyondan 15 dakika önce Agmatine (10mg/kg, intraperitoneal) verildi. Cerrahi işlemlerden 24 saat sonra testis sintigrafisi yapıldı. Bu işlemten sonra tüm hayvanlarda orşiektomi yapılarak çıkarılan testis örneklerinde histolojik inceleme ve MDA ölçümü yapıldı.

Cerrahi işlemler

Tüm cerrahi işlemler steril koşullarda 90 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin (intraperitoneal) anestezi altında gerçekleştirildi. Kontrol grubunda sadece skrotumda orta hat insizyonu yapıldı. Grup 2 ve 3'teki hayvanlarda sol testiste torsiyon/detorsiyon işlemi yapıldı. Skrotuma orta hat insizyonu ile girilerek sol testis serbestleştirildi, saat yönünde 720° döndürüldü ve bu pozisyonda sabitlendi. Üç saatlik torsiyondan sonra detorsiyon yapıldı.

Testis sintigrafisi

37 MBq Tc-99m perteknetat kuyruk veninden enjekte edildikten 15 dakika sonra düzlemsel görüntüleme yapıldı. Görüntüleme düşük enerjili, yüksek çözünürlüklü paralel delikli kolimatör ile çift dedektörlü bir gama kamera (Siemens, Symbia S) ile yapıldı. 256x256 matriks, +2 büyütme ile 5 dakikalık görüntüler elde edildi. Kantitatif analiz için her iki testis üzerine ve testis dışında serbest ilgi alanları çizildi. Testislerden elde edilen ortalama sayımlar geri plandan elde edilen ortalama sayıma bölünerek bir tutulum oranı hesaplandı.

Histopatolojik değerlendirme

Testis doku örnekleri formol ile fikse edildikten sonra parafin bloklarına gömüldü. 5 µm kalınlığında kesitler hematoksilin-eozin ile boyandıktan sonra ışık mikroskopu ile incelendi. Histopatolojik değişiklikler Cosentino ve ark.'nın tanımladığı kriterlere göre skorlandı⁹.

Biyokimyasal inceleme

Testis dokusunda MDA düzeyleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemiyle çalışan bir cihazla (Agilent 1200, HPLC, Münih, Almanya) ve ticari bir kit (Immundiagnostik, Bensheim, Almanya) kullanılarak yapıldı. Sonuçlar gram testis dokusu başına nanomol (nmol/g) olarak ifade edildi.

İstatistik inceleme

Veri analizleri için bir istatistik yazılım paketi (SPSS 13.0) kullanıldı. Tüm veriler ortalama ± standart sapma (SD) şeklinde sunuldu. Üç grup arasında ölçülen parametrelerdeki farklılıklar Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi. Anlamlı değerler sergileyen gruplar arasındaki ikili karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Olasılık (P) 0.05'ten düşük olduğunda bu farklılıklar anlamlı kabul edildi.

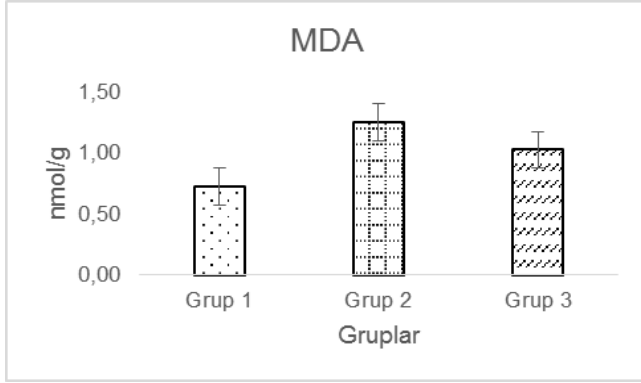
BULGULAR

Testis sintigrafisi sonuçları

Tc-99m perteknetat sintigrafisinde sol testiste hesaplanan tutulum oranları grup 1, 2 ve 3'te sırasıyla 3.69 ± 0.23 , 3.45 ± 0.30 ve 3.65 ± 0.30 bulundu. Torsiyon-detorsiyon işlemi yapılan 2 ve 3. gruplardaki tutulum oranları kontrol grubundan hafif düşük bulunmasına rağmen, aradaki fark anlamlı değildi ($P > 0.05$, $P > 0.05$). Sol testis tutulum oranı grup 2 ve 3 arasında da anlamlı bir fark göstermedi ($P > 0.05$).

Biyokimyasal inceleme sonuçları

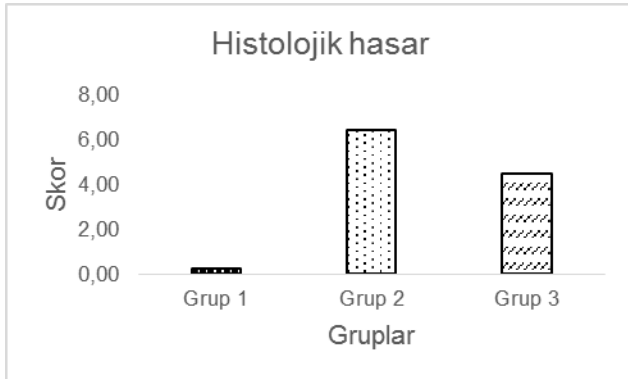
Testis dokusunda MDA düzeyi torsiyon-detorsiyon işlemine bağlı artmış, Agmatine uygulaması ile bir miktar azalmış görüldü. Farklı gruplar için testis dokusunda ölçülen MDA değerleri Şekil 1'de sunulmuştur. Grup 2'de ölçülen MDA değerleri grup 1 ve 3'e göre anlamlı olarak artmıştı ($P < 0.001$, $P < 0.001$). Grup 3'deki hayvanlarda ölçülen MDA değeri grup 2'den düşük bulundu ($P < 0.05$).



Şekil 1. Doku MDA sonuçları. Grup2'de grup 1 ve 3'ten yüksek ($P < 0.001$, $P < 0.001$). Grup 2'de grup 3'ten yüksek ($P < 0.05$).

Histolojik inceleme sonuçları

Testis yaralanma skoru grup 2 ve 3 sıçanlarda grup 1'e göre anlamlı olarak artmış bulundu ($P < 0.001$, $P < 0.001$). Grup 2 ve 3 arasında değerlendirme skoru için belirgin fark vardı ($P < 0,001$) (Şekil 2).



Şekil 2. Histolojik hasar skoru. Grup 2'de grup 1 ve 3'ten yüksek ($P < 0.001$, $P < 0.001$)

Grup 2 sıçanlarda lezyonlar 1 ve 3 derece arasında değişmiştir. Buna karşılık Agmatine verilen grup 3'teki örneklerin çoğu derece 1 ve 2 hasar gösterdi (Tablo I). 2. ve 3. gruplar arasında en belirgin fark hemoraji bulgusunda izlenmişti ($P < 0.001$). Sağ testis (karşı taraf) intersitisyumda hafif ödem ve hemoraji ile birlikte seminifer tübül epitelinde çok belirgin olmayan düzensizlikler gözlemlendi.

Tablo 1: Torsiyon-detorsiyon işlemine bağlı testislerdeki histolojik skorların deneklere göre dağılımı.

Gruplar	Histolojik Skor				
	Evre 0	Evre 1	Evre 2	Evre 3	Evre 4
1 (K)	10	-	-	-	-
2 (İ-R)	-	4	5	1	-
3 (İR+A)	-	7	3	-	-

K, kontrol; İ-R, iskemi-reperfüzyon; İR, iskemi-reperfüzyon + Agmatine

TARTIŞMA

Testis torsiyonunun sebep olduğu doku hasarında birçok hüresel ve moleküler mekanizma rol oynar. Testis torsiyonu, iskemik hasar yoluyla testiste bir takım yapısal değişikliklerin ortaya çıkmasına sebep olurken, detorsiyon da reperfüzyon hasarı ile benzer değişikliklere yol açabilir². Serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerinin artmasının bu değişikliklerin oluşmasında önemli bir yeri vardır.

Bu çalışmada, deneysel testis torsiyon-detorsiyon işleminin sonucunda oluşan İ-R hasarına ait birçok histopatolojik değişiklik gördük. Önceki diğer çalışmalara benzer şekilde, testiste interstisyel yapıda, seminifer tübüllerde ve spermatojenik hücrelerde hasarla ilgili bulgular gözledik^{10,11}. Tek taraflı testis torsiyon-detorsiyon işleminden sonra karşı taraf testiste hasar oluştuğunu gösteren çalışmalar vardır. Bu hasarın sebepleri, tek taraflı torsiyonun tetiklediği apoptotik aktivitenin diğer testisi etkilemesi ve detorsiyonun diğer testiste kan akışını artırması olarak ifade edilmiştir^{12,13}. Çalışmamızda torsiyon yapılmayan testiste de hafif düzeyde histopatolojik değişiklikler saptadık.

Testis dokusundaki hasarın oluşmasında oksidatif stresin rolünü test etmek için doku MDA ölçümünü kullandık. Diğer çalışmalara benzer şekilde, testis dokusunda MDA seviyesinin torsiyon-detorsiyon işlemi sonucunda arttığını bulduk^{14,15}.

Testis torsiyonundaki İ-R hasarını azaltmak amacıyla hayvan modellerinde bir dizi kimyasal ve ilaç başarıyla test edilmiştir^{2,16}. Çalışmamızın bulguları, Agmatine'nin testiste İ-R hasarını azaltma etkinliğine sahip olduğunu göstermektedir. Agmatine merkezi sinir sisteminin birçok fizyolojik sürecine katılan bir nöromodülatördür. Ayrıca Agmatine'nin NO üretimini azalttığı gösterilmiştir³. Yüksek seviyelerde NO, hücrel biyomeleküllere zarar veren peroksinitrit üretmek için süperoksit ile reaksiyona girer. Sıçanlarda torsiyon/detorsiyon uygulamasından sonra NO düzeylerini yükselten indüklenebilir NO sentaz ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir¹⁷. Agmatine'nin İ-R hasarında rol alan NO sentezini azaltarak ve antioksidan enzim aktivitelerini artırarak koruma sağladığını düşünmekteyiz.

Testis sintigrafisi için yaygın kullanılan radyonüklid olan Tc-99m perteknetat dokularda kan akımı ve hücre canlılığı ile orantılı olarak tutulur. Klinik uygulamada testis sintigrafisi görsel olarak değerlendirilir ve testis torsiyonu bulguları zamana göre değişir. Erken evrede perfüzyon hafif azalır; daha sonraki dönemde testiste tutulum belirgin azalmış etrafındaki skrotumda artmış görülür; geç dönemde ise testiste tutulum izlenmez¹⁸.

Testis (veya skrotal) sintigrafinin deneysel hayvan modellerinde testis torsiyonundaki etkinliği konusu net değildir. Bazı çalışmalarda testis sintigrafinin testis torsiyonunu ve tedavi etkinliğinin belirlenmesinde etkili bir şekilde kullanılabileceği belirtilmiştir^{19,20,7}. Bununla birlikte, deneysel testis torsiyonu çalışmaları için testis sintigrafisin güvenilir olmadığını gösteren çalışmalarda vardır. Fischman ark.⁸ ratlarda skrotal sintigrafinin testisleri değerlendirmek için güvenilir olmadığını bildirmişler. Bunun sebepleri arasında normal testisler arasında radyonüklid tutulumun farklılığı, skrotumdaki tutulumunun testisi değerlendirmeyi güçleştirmesi ve testisin

ebatlarının küçük olmasının getirdiği teknik yetersizlikler sayılmıştır. Başka bir çalışmada, testis torsiyonundaki azalmış perfüzyonu tespit etmede doppler ultrason radyonüklid taramadan daha üstün bulunmuş²¹.

Tc-99m perteknetat ile yaptığımız sintigrafiden elde ettiğimiz sonuçlar iyi bir değerlendirme yapacak nitelikte değildi. Torsiyon-detorsiyon işlemi yapılan hayvanlardaki tutulum oranı kontrol grubundan hafif düzeyde düşük bulunmasına rağmen aradaki fark anlamlı değildi. Agmatine verilen ve verilmeyen gruplar arasında da anlamlı bir fark görülmedi. Hâlbuki bu grupların histolojik hasar bulguları belirgin farklılık göstermekteydi. Bu sonucun en önemli sebebi olarak klinikte kullanılan gama kameranın küçük sıçan testisini incelemek için uygun olmadığını düşünmekteyiz. Zira deneysel hayvan çalışmaları için özel gama kameralar geliştirilmiştir. Testis sintigrafisi için kullandığımız Tc-99m perteknetat'ın testisteki tutulumu esas olarak kan akışı ile ilişkilidir. Skrotumda cerrahi işlemlere bağlı değişen tutulumların engelleyici etkisini ortadan kaldırmak için erken arteriyel faz görüntüleme faydalı olabilir.

SONUÇ

Deneysel hayvan çalışmasında testis torsiyon/detorsiyon işlemine bağlı İ-R hasarı histolojik ve kimyasal incelemeler ile belirlenebilir.

Testiste İ-R hasarında oksidatif stresin rolü oldukça fazla olduğundan Agmatine olası antioksidan etkinliği ile testiküler İ-R hasarını azaltmada önemli bir role sahip olabilir.

Testis sintigrafisi, muhtemelen görüntüleme rezolüsyon limitleri nedeniyle deneysel sıçan modelinde İ-R hasarını ortaya koymak için duyarlı bir yöntem gibi görünmemektedir.

Bu çalışma Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Etik Kurul Kararı: Bu çalışma Helsinki Bildirgesine uygun olup Bülent Ecevit Üniversitesi Etik Komitesi (İzin no: 2012/05) tarafından onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması Beyanı: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma her hangi bir fon tarafından desteklenmemiştir.

Declaration of Conflicting Interests: The authors declare that they have no conflict of interest.

Financial Disclosure: No financial support was received.

KAYNAKLAR

1. Drlik M, Kocvara R. Torsion of spermatic cord in children: a review. *J Pediatr Urol* 2013; 9: 259-66.
2. Karaguzel E, Kadihasanoglu M, Kutlu O. Mechanisms of testicular torsion and potential protective agents. *Nat Rev Urol* 2014; 11: 391-9.
3. Bergin DH, Jing Y, Williams G, et al. Safety and neurochemical profiles of acute and sub-chronic oral treatment with agmatine sulfate. *Sci Rep* 2019; 9 (1): 12669.
4. Sharp VJ, Kieran K, Arlen AM. Testicular torsion: diagnosis, evaluation, and management. *Am Fam Physician* 2013; 88: 835-40.
5. Nussbaum Blask AR, Bulas D, Shalaby Rana E, et al. Color Doppler sonography and scintigraphy of the testis: a prospective, comparative analysis in children with acute scrotal pain. *Pediatr Emerg Care* 2002; 18: 67-71.
6. Wu HC, Sun SS, Kao A, et al. Comparison of radionuclide imaging and ultrasonography in the differentiation of acute testicular torsion and inflammatory testicular disease. *Clin Nucl Med* 2002; 27: 490-3.
7. Coley BD, Frush DP, Babcock DS, et al. Acute testicular torsion: comparison of unenhanced and contrast-enhanced power Doppler US, color Doppler US, and radionuclide imaging. *Radiology* 1996; 199: 441-6.
8. Fischman AJ, Ahmad M, Chheda H, et al. Reliability of radionuclide scintigraphy for detection of testicular torsion: an animal study. *Eur J Nucl Med* 1990; 16: 657-61.
9. Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R, et al. Histopathology of prepubertal rat testes subjected to various durations of spermatic cord torsion. *J Androl* 1986; 7: 23-31.
10. Minutoli L, Irrera N, Squadrito F, et al. Effects of ischaemic post-conditioning on the early and late testicular damage after experimental testis ischaemia-reperfusion. *Andrology* 2014; 2: 76-82.
11. Aktas C, Erboga M, Fidanol Erboga Z, et al. Protective effects of *Urtica dioica* L. on experimental testicular ischaemia reperfusion injury in rats. *Andrologia* 2017; 49 (4): 1-8.
12. Nguyen L, Lievano G, Ghosh L, et al. Effect of unilateral testicular torsion on blood flow and histology of contralateral testes. *J Pediatr Surg* 1999; 34: 680-3.
13. Hadziselimovic F, Geneto R, Emmons LR. Increased apoptosis in the contralateral testes of patients with testicular torsion as a factor for infertility. *J Urol* 1998; 160: 1158-60.
14. Erboga M, Aktas C, Kurt O, et al. Protective effects of thymoquinone on experimental testicular ischaemia-reperfusion injury: an apoptotic, proliferative and biochemical study. *Andrologia* 2016; 48: 222-30.
15. Kurt O, Yazici CM, Erboga M, et al. Mannitol has a protective effect on testicular torsion: An experimental rat model. *J Pediatr Urol* 2016; 12 (3): 167.e1-8.

16. Wei SM, Yan ZZ, Zhou J. Beneficial effect of taurine on testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *Urology* 2007; 70: 1237-42.
17. Shiraishi K, Naito K, Yoshida K. Nitric oxide promotes germ cell necrosis in the delayed phase after experimental testicular torsion of rat. *Biol Reprod* 2001; 65: 514-21.
18. Lutzker LG, Zuckier LS. Testicular scanning and other applications of radionuclide imaging of the genital tract. *Semin Nucl Med* 1990; 20: 159-88.
19. Gul SS, Gurgul S, Uysal M, et al. The Protective Effects of Pulsed Magnetic Field and Melatonin on Testis Torsion and Detorsion Induced Rats Indicated by Scintigraphy, Positron Emission Tomography/Computed Tomography and Histopathological Methods. *Urol J* 2018; 15: 387-396.
20. Gezici A, Ozturk H, Buyukbayram H, et al. Effects of gabexate mesilate on ischemia-reperfusion-induced testicular injury in rats. *Pediatr Surg Int* 2006; 22: 435-41.
21. Mevorach RA, Lerner RM, Greenspan BS, et al. Color Doppler ultrasound compared to a radionuclide scanning of spermatic cord torsion in a canine model. *J Urol* 1991; 145: 428-33.