

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

TESTİS OTOTRANSPLANTASYON MODELİNDE HİPOTERMINİN İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINA ETKİSİ



DR.GÜRSU KIYAN
UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL
1995

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KISALTMALAR	1
GİRİŞ	2
GENEL BİLGİLER	
İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI	4
BİYOKİMYASAL PARAMETRELER	17
TESTİS OTOTRANSPLANTASYONU	19
GEREÇ VE YÖNTEM	
CERRAHİ İŞLEM	22
BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER	28
İSTATİSTİK ÇALIŞMASI	31
BULGULAR	32
TARTIŞMA	
ÇALIŞMA PROTOKOLÜ	37
CERRAHİ TEKNİK	38
BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER	39
BULGULAR	39
SONUÇ	44
ÖZET	45
KAYNAKLAR	46

KISALTMALAR

DTNB	5,5'-ditiyo-bis dinitrobenzoik asit
IL-1	İnterlökkin 1
IL-6	İnterlökkin 6
LOOH	Lipid hidroperoksidleri
LP	Lipid peroksidasyonu
LTB ₄	Lökotrien B ₄
MDA	Malondialdehid
NO	Nitrikoksid
PAF	Trombosit aktive edici faktör
PGI ₂	Prostosiklin
PO	Protein oksidasyonu
PDSH	Protein dışı sülfidril
PSH	Protein sülfidril
PUFA	Fosfolipid doymamış yağ asitleri
SH	Sülfidril grubu
SOD	Süperoksid dismutaz
TBA	Tiobarbitürik asit
TBARS	Tiobarbitürik asite reaksiyon veren maddeler
TCA	Trikloro asetik asit
TNF α	Tümör nekroz faktörü α
TxA ₂	Tromboksan A ₂

GİRİŞ

Testis iskemisiyle çocuklarda en sık mikrovasküler testis ototransplantasyonunda ve testis torsiyonunda karşılaşılmaktadır.

Batı literatürüne göre intraabdominal yerleşimli testisler inmemiş testislerin %20'sini oluşturmaktadır¹. İntraabdominal yerleşimli testislerin skrotuma indirilebilmesi, damarlarının kısa olmasından dolayı, klasik orşiopeksi tekniği ile mümkün olamamaktadır. Bu nedenle intraabdominal testisler için birçok farklı cerrahi teknik önerilmiştir^{2,3}. Önerilen cerrahi tekniklerden birisi de mikrovasküler testis ototransplantasyonudur⁴. Bu teknikte testiküler arter ve ven kesilmekte ve inferior epigastrik arter ve ven ile anastomoz uygulanmaktadır⁵. Bu işlem sırasında testis 28 dakika⁴ ile iki saat⁵ arasında iskemik kalmaktadır.

Testis torsiyonunda ise önce testiküler ven obstrüksiyona uğramakta ve daha sonra oluşan konjesyona bağlı olarak intratestiküler basınç artmakta ve arterioller dolaşım da bozulmaktadır.

Dokular iskemik kaldıklarında, hücre en önemli besini olan oksijenden yoksun kalmakta ve anaerobik metabolizma başlamaktadır. Anaerobik metabolizma sonucu dokuda laktik asit birikmekte ve hücre içi hemostaz bozulmaktadır. Hücre enzim kinetiğinin ve hücre membran ion gradientinin bozulması ile hücre ölümü gerçekleşmektedir. İskeminin hücrede belli bir hasar yaptığı bilinmekte iken yapılan çalışmalar reperfüzyonun paradoksal olarak iskemiden çok daha fazla hasara yol açtığını göstermiştir⁶. Bu durum reperfüzyon hasarı olarak adlandırılmıştır. Reperfüzyon ile dokuya gelen oksijen normal metabolizmasından farklı olarak ve iskemik dönemde gelişmiş bazı değişikliklerden dolayı serbest oksijen radikallerine dönüşmektedir. Oluşan serbest oksijen radikalleri de zincirleme bir reaksiyon ile dokuda iskemi reperfüzyon hasarının gelişimine neden olmaktadır⁷.

İskemi reperfüzyon hasarını azaltmak için bu çok kompleks reaksiyon birçok farklı aşamasında farmakolojik olarak durdurulmaya çalışılmıştır (Tablo 1.). Bir önlem de dokunun ısısının düşürülmesidir. Hipotermiden amaç metabolizmanın azaltılıp, sitotoksik maddelerin oluşumu ve salınımının önlenmesidir. Dokuların belli bir süre iskemik kalması gereken birçok ameliyatta ve organ transplantasyonunda organın saklanması sırasında organ soğutulmuş hem iskemi süresi uzatılabilmekte hem de hasar azaltılabilmektedir.

Testis iskemi ve reperfüzyonunda hipotermi uygulanması ile ilgili çok az çalışma yapılmıştır. Miller ve arkadaşları testis iskemisinde uyguladıkları hipotermi, dört ve altı saatlik iskemide germinal epitelin korunmasında rolünün olduğunu göstermişlerdir⁸. Kallerhof ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada hipotermi testis iskemisinde doku asidozunu ve histolojik hasarı azalttığını göstermişlerdir⁹. Bu iki çalışma hipotermi iskemi reperfüzyon hasarında koruyucu etkisi olduğunu düşündürmektedir. Buna karşın Lui ve arkadaşları testiste 60 dakikalık hipotermik iskeminin normotermik iskemiye göre histolojik olarak daha fazla hasar verdiğini bulmuşlardır¹⁰. Testiste yapılan tüm bu çalışmalarda hipotermi sadece iskemi süresinde uygulanarak araştırılmıştır. Hipotermi reperfüzyon sırasında da uygulandığı herhangi bir çalışma yoktur. Ayrıca sözkonusu çalışmalarda hasarlar biyokimyasal olarak değerlendirilmemiştir.

Bu tez çalışmasında hipotermi uygulamasının testis iskemi reperfüzyon hasarına olan etkisi araştırılmıştır. Diğer çalışmalardan farklı olarak bu çalışmada hipotermi, iskemi süresinin dışında reperfüzyon sırasında da uygulanmış ve hipotermi reperfüzyon sırasındaki olası etkisi de araştırılmıştır. İskemi reperfüzyon hasarı irdelenirken, testis ototransplantasyonu modeli oluşturulmuş hipotermi rolü biyokimyasal parametrelerle değerlendirilmiştir.

GENEL BİLGİLER

İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI

Karmaşık bir olay olan hücre ölümü iki yolla başlatılabilir. Apoptosis veya programlanmış hücre ölümü (hücre intiharı); canlılığı bozulmuş hücreleri etkileyen ve hasar görmüş, anormal, hücreleri uzaklaştıran fizyolojik bir mekanizmadır¹¹. Apoptotik hücreler proteolitik enzimler veya toksik oksijen türleri salınmaksızın makrofajlar tarafından yok edilirler ve bu olayda inflamasyon gelişmez. Diğer taraftan nekroz (hücre ölümü); hücre topluluklarını etkileyen patolojik bir olaydır ve fokal doku destrüksiyonuna, inflamasyona ve sıklıkla ciddi sistemik sonuçlara neden olur.

Nekroza yol açan iskemi batı dünyasında (iskemik kalp hastalığı) en sık ölüm nedenidir. Cerrahide iskemiye özellikle vasküler prosedürlerde ve transplantasyonda karşılaşılır. Paradoksik olarak iskemik dokunun reperfüzyonu daha ileri hasar ile sonuçlanmaktadır.

İSKEMİ

Bir dokunun kanlanması engellendiğinde; hücresel disfonksiyon, hücresel ve interstisiyel ödem ve sonuçta hücresel kaos ve ölüme yol açan bir dizi kimyasal olaylar gelişir. Oksijen, hücrenin ana besini olarak hücre fonksiyonu için zorunludur. Aerobik metabolizma, normal hücre fonksiyonu için gereken yüksek enerji fosfat bağlarını etkili bir şekilde sağlar. Oksijen eksikliğinde ise anaerobik metabolizma devreye girer, laktik asit konsantrasyonu artar ve hücre içi normal enzim kinetiği değişir. Daha az sayıda yüksek enerji bağları üretilir ve hücre, hemostazını korumak için gereken enerjiden yoksun kalır.

Hücre ölümünde; hücre membranının önemi ve hücre iskeleti ve ion regülasyonunun yeri yıllardır bilinmektedir. İskemiye bağlı hücre ölümüne neden olan tek bir belirleyici faktör yoktur. Hücrenin enerji stoklarının azalması (özellikle adenozin 5' trifosfat-ATP) hücrenin hemostazının bozulması ile sonuçlanır. Hücrenin hemostazının bozulması ise hücre membranının ion gradientinin kaybı ile karakterizedir.

İskemik nekroz günümüzde oldukça iyi dökümente edilmiştir. Plazma membranındaki değişiklikler Na^+ ve Ca^{++} ionlarının dengesinin bozulmasına yol açar. Bu bozulmayı takiben hücrede asidoz, ozmotik şok, kromatin artışı ve nükleer piknosis gelişir. Sodyum ionları hücre içine girerler ve bu arada suyu da kendileri ile birlikte çekerek interstisiyel alandaki osmotik dengeyi korurlar. Sodyum ionları hücre içine girerken potasyum ionları ise hücre içinden interstisyuma kaçarlar¹². Sekonder otoliz (lizozimlerde şişme, endoplazmik retikulumda dilatasyon ve vesikülasyon, enzim ve protein kaçağı, hücresel kompartmanlaşmanın kaybı) gelişir, membran bütünlüğü korunamaz ve hücre ölür.

REPERFÜZYON

Kan akımının yeniden sağlanmasının iskemik doku için iki yararı vardır. Enerji tekrar sağlanmaya başlar ve toksik metabolitler uzaklaştırılır . Bu nedenle reperfüzyon iskemik hasarın düzelmesi için gerekli olan birşeydir. Bununla birlikte toksik metabolitlerin sistemik sirkülasyona geçmesi ciddi metabolik sonuçlara yol açabilir ve reperfüzyon daha ileri doku hasarına yol açabilir⁶.

Reperfüzyonun sistemik sonuçları

İskemik dokunun, özellikle iskemik ekstremitelerin revaskülarizasyonu; metabolik asidoz, hiperkalemi, miyoglobinemi, miyoglobinuri ve miyonefropatik

metabolik sendrom adı verilen renal yetersizlik gibi birçok sistemik problemle sonuçlanır.

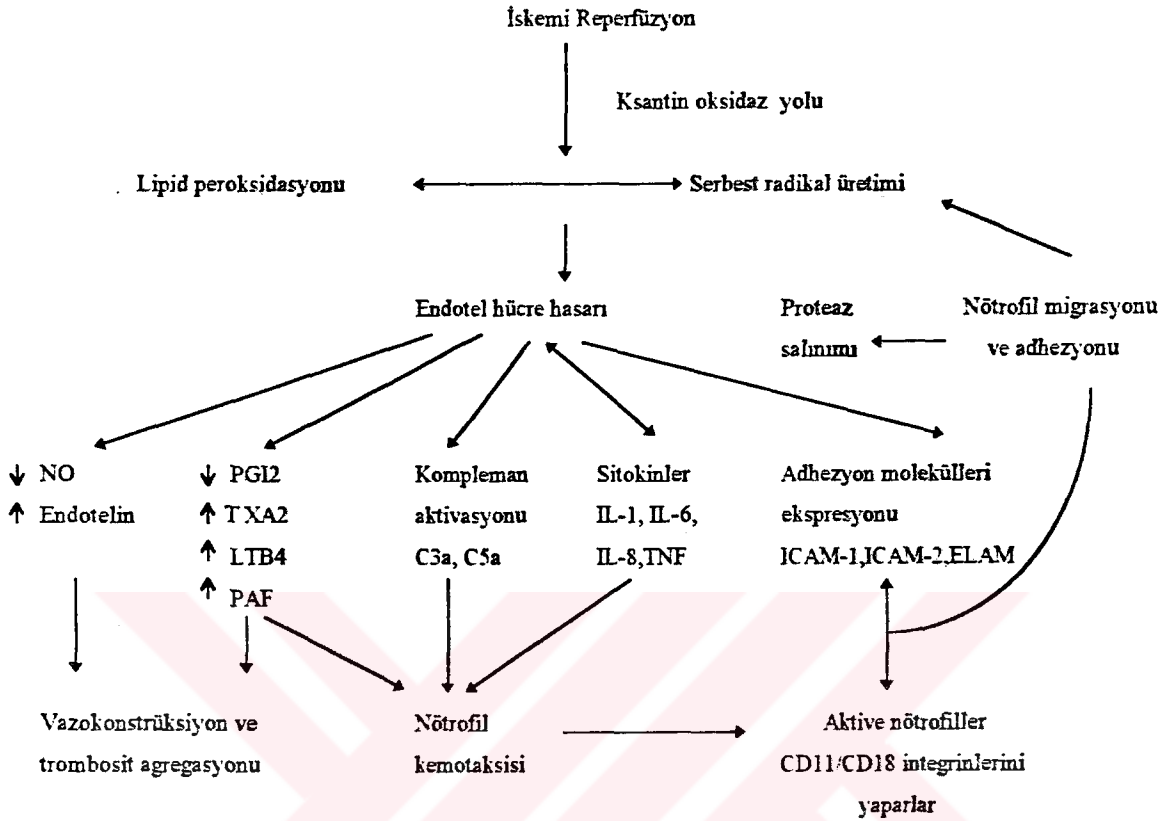
Reperfüzyon hasarı

Paradoksal bir şekilde iskemik dokunun reperfüzyonu daha da ileri hasara yol açar. Parks ve Grenger intestinal iskemi modelinde tek başına dört saatlik iskeminin, üç saatlik iskemi ve bir saatlik reperfüzyona göre daha az hasarla sonuçlandığını göstermişlerdir⁶. Korthuis ve arkadaşları ise yapmış oldukları çalışmada tavşan grasilis kasının dört saatlik iskemi periodu ardından PaO₂'si 3-5 mmHg düzeyine düşürülmüş kan ile reperfüze edildiğinde mikrovasküler hasarın daha az olduğunu göstermişlerdir¹³.

Çeşitli çalışmalar serbest oksijen radikallerinin, iskemi reperfüzyon hasarındaki reperfüzyon komponentinin mediatörü olduklarını göstermiştir.

Yeniden akım olmaması ("No-reflow" fenomeni)

İlerleyici mikrosirkülatur obstrüksiyon nedeni ile reperfüzyon her zaman başarılı olmaz. Bu olaya yeniden akım olmaması (no-reflow fenomeni) denir ve iskemik dönemin uzunluğuna bağlıdır. Bir ila üç saat iskemik kalan kaslar kolaylıkla reperfüze olur. Fakat beş saatlik iskemi sonrası "no-reflow" fenomeni vakaların % 40 -50'sinde görülür. Bu fenomenin gerçek nedeni tam olarak anlaşılamamıştır. Bu olay reperfüzyonun erken döneminde fibrinolitik ajanların eklenmesi ile azaltılabilir. Hücrel ödeme aynı zamanda reperfüzyon esnasında kapiller tıkanmaya neden olabilir ve böylece no-reflow fenomeni gelişebilir. Mannitol gibi hiperozmotik ajan kullanımı bu etkiye karşı koymada yardımcı olabilir. Fasyatomi de ekstremitelereki fasial kompartmanlar içindeki kas şişmesinden kaynaklanan yüksek basıncı yoketmekte yararlıdır.

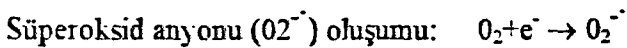


Şekil 1. Ksantin oksidaz yoluyla serbest radikal üretimi lipid peroksidasyonuna ve endotel hücre hasarına neden olur. Endotel hücre hasarı da vazokonstrüksiyon, trombosit agregasyonu, endotel hücresi nötrofil kemotaksisi ve adhezyonu gibi birçok cevabı başlatır. Bunu takiben nötrofillerin dokuya migrasyonu ile serbest radikaller ve proteaz salınımı dokuya daha da fazla zarar verir.

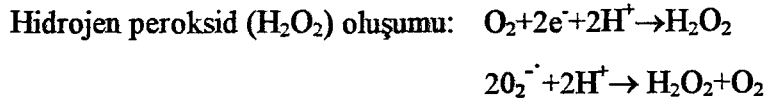
NO: nitrik oksid, PGI₂: Prostosiklin, TxA₂: tromboksan A₂, LTB₄: Lökotrien B₄, PAF: Trombosit aktifleyen faktör, IL: İnterlökin, TNF: Tömür nekroz faktörü, ICAM: İnterselüler adhezyon molekülü, ELAM: Endotelial lökosit adhezyon molekülü.

SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ

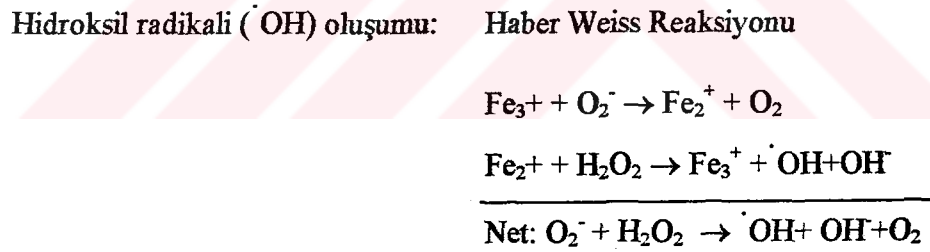
Serbest radikal bir veya daha fazla tek elektron içeren nonstabil bir moleküldür. Çeşitli oksijen serbest radikalleri moleküler oksijenin eksitasyonu veya redüksiyonu ile oluşur. Süperoksid normal hücrel metabolizmanın bir ürünüdür.



Süperoksit spesifik enzimleri inaktive edebilir, ancak daha önemlisi hidrojen peroksidin ve yüksek reaktiviteye sahip hidroksil radikalinin prekürsörüdür. Süperoksit in vivo oluşumu her zaman için hidrojen peroksid üretimi ile beraberdir. Hidrojen peroksid DNA'yı inaktive edebilen kuvvetli bir oksidandır fakat dokularda peroksidazların etkisi ile baskılanmıştır.



Hidroksil radikali demir katalize Haber-Weiss (Fenton) reaksiyonu ile oluşur. Hidroksil radikali biyolojik sistemdeki serbest radikallerinin en güçlü olanıdır ve muhtemelen serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarının çoğundan sorumludur. Hidroksil radikali lipid peroksidasyonuna neden olur, sulfidril gruplarını okside eder, sitokrom enzimlerini inaktive eder ve membran transport proteinlerini bozar.



Oksijenden üretilen diğer iki radikal de süperoksitten daha kuvvetli bir oksidan olan ve sitotoksik olan perhidroksil radikali ve singlet oksijendir.

Biyolojik sistemde serbest radikal oluşumunun çeşitli mekanizmaları tanımlanmıştır. Serbest radikaller fizyolojik olarak az bir miktarda mitokondrial elektron transport zincirindeki kaçak bölgelerinde üretilirler. Patolojik durumlarda serbest radikaller ksanthin oksidaz metabolizmasından, aktive nötrofillerden, katekolamin oksidasyonundan, endotel hücreleri ve prostoglandinlerden sağlanır.

İskemi reperfüzyon hasarında serbest oksijen radikalleri

İskemi reperfüzyon esnasında superoksid oluşumunun mekanizması Welbourn ve arkadaşları tarafından son zamanlarda geniş bir şekilde gözden geçirilmiştir¹⁴. Ksanthin oksidaz enzimi postiskemik dokuda serbest radikallerin önemli bir kaynağıdır. İskemi esnasında ksanthin dehidrogenazın değişmesi ile oluşan ksanthin oksidaz (D-O dönüşümü) dokuda birikir.

İskemi esnasında adenozin 5' monofosfattan (AMP) üretilen hipoksantin ve ksantin oksidazın doku düzeyleri artar. Dokunun reperfüzyonu ile enzimin ikinci substratı olan moleküler oksijen de sağlanır ve ksanthin oksidaz oksijeni kullanarak hipoksantini ksanthine çevirir ve bu reaksiyonda superoksid salınır.

İskemi sırasında dokuya demir de salınır. Reperfüzyonda ise superoksid ve hidrojen peroksid oluşur. Bu şekilde Haber-Weiss reaksiyonu ile hidrojen peroksidden hidroksil radikalleri oluşur. Bu teoriyi destekleyen kanıt demir bağlayıcı ajan desferrioksaminin iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisinin saptanmış olmasıdır¹⁵.

Lipid peroksidasyonu

Serbest radikallerin en zarar verici etkisi lipid peroksidasyonudur. Hücre membranları doymamış yağ asitleri ve fosfolipidlerden oluşur. Serbest oksijen radikalleri lipid peroksidasyonuna neden olarak fonksiyonel ve strüktürel hücre hasarına yolaçarlar. Lipid hidroperoksidazın daha da parçalanması kısmen stabil ürün olan malonyldialdehidi oluşturur. Bu da lipid peroksidasyonunu göstermede bir parametre olarak kullanılabilir. Çeşitli antioksidanlar peroksidasyonu engellemek ve hücre hasarını sınırlamak için kullanılmıştır.

Serbest radikallerden zarar görme riskine sahip diğer hücresel komponentler proteinler (özellikle doymamış olanlar ve sülfür içeren moleküller) ve nükleik asitlerdir. İyonizan radyasyon ekspozisyonunu takiben hücre ölümü ve mutasyonlar primer olarak serbest radikallerin DNA ile reaksiyonu yüzünden olmaktadır. İnflammatuar hücre kaynaklı serbest radikal

hasarı için risk altındaki ekstraselüler doku komponentleri ise kollajen ve hiyalunorik asittir.

POLİMORFONÜKLEER LÖKOSİTLER (NÖTROFİLLER)

Geniş bir iskemik dokunun reperfüzyonu; nütropeni, lokal olarak artmış permeabilite ve nonkardiogenik pulmoner ödemle karakterize akciğer hasarı ile sonuçlanır. Hem lokal hem de sistemik hasar mikrovaskülatürde nütrofil toplanması ile beraberdir. Nütrofillerin hasardan sorumlu olduğuna dair çok kanıt vardır¹⁶. Dolaşımdaki nütrofillerin tutulması etkin olarak permeabilite artışını ve gelişen ödemi engeller¹⁷. İskemi esnasında postkapiller venlerde nütrofillerin endotele adhezyonunda artış vardır ve reperfüzyonu takiben bu yanıt daha da belirginleşir. Trombosit aktive edici faktör (PAF), lökotrien B₄ (LTB₄) ve oksijen serbest radikalleri bu yanıtın en olası kimyasal mediatörleridir¹⁸.

Suzuki ve arkadaşları yaptıkları çalışmada superoksid dismutaz kullanarak reperfüzyon sonrası nütrofil adhezyonunu önlemiş ve bunu lökosit adhezyon molekülü CD18'in antagonistinin etkisi ile karşılaştırarak SOD'un sadece adhezyonu önlemediğini, ayrıca eritrositlerle karşılaştırıldığında lökositlerin akışkanlık hızlarını da azalttığını göstermiştir¹⁹. Yani nütrofillerin endotel hücrelerine yapışmasını, endotel hücreleri ile nütrofil yüzeyi arasındaki adhesif kuvvetler ve nütrofil damar duvarından disloke etmek için kullanılan kuvvetler düzenler.

Aktive nütrofillerin akciğerde ve diğer organlarda yıkılması multi sistem organ yetmezliğinin gelişmesinde önemli bir basamaktır²⁰.

ENDOTELİYAL FAKTÖRLER

Vasküler endotelial örtü çeşitli lokal hormonların ve otakoidlerin salınımı ile vasküler düz kas tonusunu modüle eder. Bunlar araşidonik asit metabolitleri olan prostosiklin (PGI₂), tromboksan A₂ (TxA₂) ve Lökotren B₄

(LTB₄), endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) ve endotelindir⁷. İskemi reperfüzyon hasarında rol oynayan diğer faktörler ise PAF, kompleman ve sitokinlerdir.

Araşidonik asit metabolitleri

Prostosiklin (PGI₂): Endotel hücrelerinden identifiye edilen ilk vazoaaktif ajan PGI₂'dir. PGI₂ trombosit agregasyonunu engeller ve kuvvetli bir vazodilatatördür. Steroidler fosfolipaz A₂'yi inhibe ederek prostosiklin üretilmesini engellerken, aspirin benzeri ilaçlar da siklooksijenaz aktivitesini geri dönüşümsüz olarak inhibe ederek etkiler. Prostosiklinin kendisi stabil olmadığı için stabil analogu iloprost periferik damar hastalıklarında başarı ile kullanılmaktadır²¹.

Tromboksan A₂ (TxA₂): Siklooksijenaz yoluyla oluşan ikinci bir araşidonik asit metaboliti ise tromboksan A₂'dir. TxA₂ de PGI₂ gibi mikrosirkülasyonu etkilemektedir. TxA₂ prostosiklinin aksine trombosit agregasyonunu stimüle eder ve vazokonstriksiyona neden olur. TxA₂ trombositlerde endojen araşidonik asitten yapılır ve trombosit agregasyonu ile salınır. Fizyolojik koşullarda trombosit agregasyonu ve vazokonstriksiyon derecesi TxA₂ ve PGI₂'nin göreceli miktarlarına bağlıdır. TxA₂ iskemi reperfüzyon sırasında nötrofil adhezyonunu başlatan güçlü bir kemotaktik maddedir.

Lökotrien B₄ (LTB₄): Lipooksijenaz yoluyla oluşan bir araşidonik asit metaboliti olan lökotrienler iskemi reperfüzyon hasarındaki endotelial disfonksiyonda önemli rol oynarlar. LTB₄ nötrofillerin yüzeylerindeki spesifik reseptörlere bağlanırlar ve adhezyon moleküllerinin aktivasyonu, endotel hücrelerine adhezyonu, serbest oksijen radikallerinin ve proteazların oluşması

gibi birçok cevabın oluşumunu uyarır. Ayrıca iskemi reperfüzyondan sonra venöz kanda LTB₄ yüksek olarak bulunmuştur.

Nitrik oksid (NO): Nitrik oksid lokal etkili endotel kaynaklı bir vazodilatatördür. Daha önce endotel derive gevşetici faktör (Endothelium-derived relaxing factor) olarak bilinen maddenin daha sonraki yıllarda aslında NO olduğu saptanmıştır^{22,23}. Nitrik oksidin vazodilatasyon dışında trombosit aktivasyonu, adhezyonu ve agregasyonunun inhibisyonu ve kan akışkanlığının devamı gibi başka etkileri de vardır. Endotel fonksiyonunun bozulduğu iskemi reperfüzyon gibi birçok olayda nitrik oksid salımı da azalmaktadır²⁴.

Nitrik oksid superoksid ilişkisi: Nitrik oksidin mikrovasküler sistemde vazodilatatör etkisi olmakla birlikte aynı zamanda sitotoksik radikallerin üretiminde de paradoksal olarak rol oynar. Nitrik oksid, superoksid ile birlikte peroksinitrit oluşumuna neden olur. Bu madde ve ürünleri ise demir gerektirmeden lipid peroksidasyonuna başlayabilirler.

Endotelin

Rubanyi 1985'de hipoksiyi takiben bir vazokonstrüksiyon gözlemiş ve bunun endotelden salgılanan bir vazokonstrüktör madde olduğunu düşünmüştür²⁵. Daha sonra bu vazokonstrüktör cevaba endotelin adı verilen bir peptidin neden olduğu saptanmıştır. Endotelin bilinen en güçlü vazokonstriktör maddedir. Endotelin 1 ayrıca endotel hücresine nötrofil adhezyonunu da stimüle eder.

Endotelin ve nitrik oksid: İskemi hem nitrik oksid salımını ve fonksiyonunu azaltmakta hem de endotelin salımını uyarmaktadır. Endotelin ile nitrik oksid arasında kritik bir denge mevcuttur. Bu denge bölgesel ve sistemik hemodinamide ve hücre proliferasyonunda önemli bir belirleyicidir.

Trombosit aktive edici faktör (PAF)

PAF endotel hücrelerinde fosfolipaz A₂'nin etkisi ile bir membran fosfolipidinden yapılır. Trombositlerde şekil değişikliği, agregasyon ve granül içeriğinin salgılanmasına neden olur. Dokuların reperfüzyonu; nötrofillerin aktivasyonuna, adhezyonuna ve diapedesine ve vasküler permeabilitenin artmasına neden olur. PAF in vitro ve in vivo olarak mikrovasküler endotele lökosit adhezyonuna yol açmaktadır. Kubes ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada intraarterial verilen PAF'ın barsakta permeabiliteyi artırarak transkapiller, lenfatik ve transmukozal sıvı ve protein kaçısına neden olduğunu ve yine mezenterik venüler endotele nötrofil adhezyonuna neden olduğunu göstermiştir¹⁸.

Kompleman

Kompleman kaskadının aktive olması C3a ve C5a gibi biyolojik aktif peptidlerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu peptidler de kapiler permeabiliteyi arttırmakta, vazodilatasyona, nötrofil kemotaksisine, endotel adhezyonuna ve serbest oksijen radikali oluşumuna ve degranülasyonuna neden olmaktadır.

Sitokinler

İskemi reperfüzyonu takiben dolaşımda interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) gibi sitokinler belirir. Antagonistleri ile yapılan çalışmalar IL-1 ve TNF- α nin vasküler hasarda ve nötrofil infiltrasyonunda rol oynadığını göstermiştir.

KORUNMA MEKANİZMALARI

Birçok endojen mekanizma ve ilaçlar iskemi reperfüzyon hasarını inhibe edebilmektedir. Bunlar serbest radikalleri yok ederek, serbest radikal oluşumunu engileyerek, nötrofilleri inhibe ederek, antioksidan etki ile, iskemik hazırlanma ile ve hipotermi ile olabilmektedir.

Serbest radikal yokediciler (Free radical scavengers)

Serbest radikal yokediciler reaktif oksijen ürünleri ile etkileşmekte ve onları zararsız hale getirmektedir. Superoksid dismutaz (SOD) endojen bir enzimdir ve dokuları radikallere (özellikle superoksid) bağlı hasardan korur. Katalaz da yine endojen bir enzimdir. Hidrojen peroksidden su ve oksijen oluşumunu katalize eder ve SOD ile kombine olarak etki eder. Ayrıca seruloplasmin, dimetiltiöüre, dimetilsulfoksid, merkaptopropiyonil glisin, mannitol, N-asetilsistein ve kaptoprilin de serbest radikal yok edici etkileri olduğu saptanmıştır.

Serbest radikal oluşumunun inhibisyonu

Hipoksantin yapısal analogu olan allopurinol ksantin oksidazı inhibe ederek süperoksid anion oluşumunu engeller²⁶. Desferroksamin de Haber-Weiss reaksiyonunu ve hidroksil radikalının oluşumu için gerekli demiri bağlayarak engeller²⁷.

Nötrofil inhibisyonu

Reperfüzyon sonrası mikrovasküler alanda nötrofil toplanması daha ileri hasara neden olur. Antinötrofil serumlarla nötrofilleri dolaşımdan alıkoymak, nötrofillerce üretilen serbest radikallerin üretilmesini engellemek ve nötrofil kemotaksisini ve adhezyonunu önlemek ,reperfüzyon hasarını azaltır.

Antioksidanlar

Antioksidan ajanlar peroksidasyonu durdururlar. Böylece doku hasarını, peroksidlerin oluşumunu ve serbest radikallerin oluşumunu önlerler. Bu antioksidanlar, E vitamini, propranolol, kalsiyum kanal blokerleri, kaptopril, lipooksijenaz inhibitörü nafazatrom ve trimetazidindir.

Tablo 1. İskemi reperfüzyon hasarına karşı koruma mekanizmaları

Serbest radikal yokediciler

- Katalaz *
- Süperoksid dismutaz *
- Nafatazrom
 - Süperoksidi ve hidrojen peroksidi yok ederler
- Mannitol
- Dimetiltioüre
- Dimetilsulfoksid
- Merkaptopropionil glisin
 - Hidroksil radikalini yok ederler
- Histidin *
 - Singlet oksijeni yok eder

Serbest radikal üretiminin inhibisyonu

- Allopurinol
 - Ksantin oksidazı inhibe eder
- Desferroksamin
 - Demir şelatlayıcı ajan

Nötrofil inhibitörleri

- Adenozin *
 - Süperoksid anion oluşumunu modüle eder
- Transforme eden büyüme faktörü β *
- CD11 ve CD18 kompleksine karşı monoklonal antikolar
 - Nötrofil adhezyonunu inhibe ederler
- Antiproteazlar
 - Nötrofil proteaz aktivitesini inhibe ederler
- Perflorokemikaller
 - Nötrofil kemotaksisini ve lizozom degranulasyonunu süprese ederler

Antioksidanlar

- Vitamin E (α Tokoferol) *
- Propranolol
- Kalsiyum kanal blokerleri
- Kaptopril
- Nafazatrom
 - Peroksidasyonu durdururlar

İskemik hazırlanma

- A1 adenozin reseptörleri
- Sıcak şok proteinleri

Hipotermi

- Metabolizmayı azaltır

(* Endojen mekanizmalar)

İskemik hazırlanma

Bazı araştırmacılar kısa süreli iskemi periodlarının kalpte daha sonraki daha uzun süreli bir iskemiye karşı bir direnç geliştirdiğini saptamışlardır^{28,29}. Bu fenomen iki fazlı olmaktadır. Birinde öncelikle iki saat süren bir koruma olmakta ikinci fazda ise 24 saat sonra bir koruma gelişmektedir.

Adenozin: Erken fazın A₁-adenozin reseptörleri ve miyozitlerdeki protein kinaz C ile geliştiği görülmüştür. Bu reseptörlerin blokajı iskemik hazırlanmanın koruyucu etkisini engellemektedir. Aynı bulgular protein kinaz C yolu agonist ve antagonistleri ile saptanmıřtır³⁰.

Sıcak-şok proteinleri: Tüm canlı hücreler çevrelerindeki ters değişikliklere stresten koruyucu proteinleri sentezlerler. Sıcak-şok proteinleri geç faz korunmada rol oynayabilirler.

Hipotermi

Hipoterminin iskemi sırasında uygulanmasının yararlı olduğu klasik bir bilgidir. 1960'lı yıllardan beri hipotermi kalp cerrahisi, beyin cerrahisi, ortopedi ve vasküler cerrahi başta olmak üzere iskemik bir dönem gerektiren birçok ameliyatta kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca organ transplantasyonunun gelişiminde de organların hipotermik olarak daha uzun süre saklanabilmesinin rolü olmuştur.

Hipoterminin etkisi hücre metabolizmasını deprese etmesi ile olmaktadır. Böylece sitotoksik maddelerin üretimi ve salınımı azalmaktadır. Örneğin hipotermik iskemide böbrek bir ila iki saatte tüm canlılığını kaybederken, 6°C'nin altında soğutulduğu zaman altı ila sekiz saat canlılığını korumaktadır³¹. Beyin ameliyatlarında iki ila üç derecelik hipoterminin serebral iskeminin zararını azalttığı saptanmıřtır³². Ortopedik ameliyatlarda da hipotermi ekstremitelere uğulanan turnike süresini uzatmaktadır.

Ancak hipoterminin yararı dışında bazı zararları da vardır. Normal koşullarda hücre volümünün stabilitesi sodyum iyonunun aktif olarak dışarıya

pompalanması ile sağlanır. Bu da hücre içi protein anyonları ile bir Donnan dengesi oluşturur. Sodyum pompası hipoksi, soğuk veya metabolik inhibitörlerle yavaşlatılırsa sodyum iyonu hücreye girer ve diğer iyonlar da elektrokimyasal gradientleri yönünde difüze olurlar ve hücre ile hücre içi organeller şişerler. Bu soğuk strese cevabın derecesi sodyum pompasının hipotermiye duyarlılığına bağlıdır ki, bu da organdan organa değişmektedir^{31,33}. Hipotermimin bu zararlı etkilerinden dolayı dokuları hipotermik dönemde perfüze etmek için özel solüsyonlar hazırlanmış ve bunlar transplantasyon için organ korunması sırasında kullanılmaktadır³⁴.

BİYOKİMYASAL PARAMETRELER

LİPİD PEROKSİDASYONU (LP):

Lipid peroksidasyonu kompleks bir olaydır. Hücre membranı fosfolipidlerindeki doymamış yağ asitleri (PUFA), serbest oksijen radikali ile reaksiyona girerek lipid hidroperoksidleri (LOOH) oluşturur. Bu reaksiyon birbiri ardına devam eden bir zincirleme reaksiyonun başlangıcıdır³⁵. Lipid peroksidasyonu hücre serbest radikal hasarını göstermek isteyen araştırmacıların öncelikle kullandığı parametredir. Bunun nedenleri PUFA'ların biyolojik dokuda çok yaygın olarak bulunmaları ve lipid peroksidasyonunun hücreye hasar veren en önemli serbest radikal patolojisi olmasıdır. Tiobarbitürik asit reaksiyonu lipid peroksidasyonunu göstermek için en sık kullanılan ve en kolay yöntemdir. Bu reaksiyonun temeli lipid peroksidasyonunun bir aldehid ürünü olan malondialdehidi (MDA) ölçmektir. Lipid peroksidasyonu sonucu dokuda MDA artmaktadır. Tiobarbitürik asit reaksiyonu en sık kullanılan test olmasına karşın bazı dezavantajları da vardır. Bu test ile lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan MDA ölçülmektedir. Ancak tiobarbitürik asit ile az da

olsa MDA dışı maddeler de reaksiyon vermektedir. Ayrıca bu testin çalışma koşullarından da etkilendiği bildirilmiştir.

PROTEİN OKSİDASYONU (PO):

Protein oksidatif hasarı lipid peroksidasyonuna göre çok daha yakın zamanda incelenmeye başlanmıştır. Reaktif serbest radikaller proteinin konformasyonunda ve fonksiyonunda değişiklik yaparak oksidatif hasara neden olmaktadır. Hasar görmüş proteinler ise hemen proteazlar ile yıkılmakta ve birikmemektedirler. Proteinlerin oksidasyonu, hidroksil radikali gibi serbest radikallerin lizin gibi amino yan grupları ile reaksiyona girmeleri sonucu oluşan karbonil gruplarının artması ile gösterilebilmektedir. Bu test oldukça duyarlı bir test olarak değerlendirilmektedir.

PROTEİN SÜLFİDRİL GRUPLARI (PSH):

Protein oksidasyonu sırasında proteindeki bazı aminoasitler yan zincirlerdeki sülfidril (SH) grupları (Örneğin sistein) oksidlenerek proteinin sülfidril grubu sayısında azalma ortaya çıkar. Bu nedenle protein sülfidril gruplarının incelenmesi oksidatif hasarın diğer bir göstergesidir.

PROTEİN DIŞI SÜLFİDRİL GRUPLARI (PDSH):

Oksidatif hasar sonucu hücre içi antioksidan düzeyinde hasarı dengeleyebilmek için kullanılmaları nedeniyle belli bir azalma görülür. Bu antioksidanlar arasında hücre içi serbest sülfidril grubu (%95'i glutatyon) da vardır. Bu sülfidril gruplarının ölçümü de yine oksidatif hasarın bir göstergesi olarak değerlendirilir.

TESTİS OTOTRANPLANTASYONU

İNMEMİŞ TESTİS (Kriporşidizm):

Eski Yunanca'da cryptos saklanmış orchis ise testis demektir. Antik çağlardan beri bilinmesine karşın ilk anlamlı çalışmalar John Hunter tarafından yapılmıştır (1762 ve 1785). İnmemiş testisin insidansı prematürite ile birlikte artmaktadır. Prematürelde oran %21 iken 1500 gram altı bebeklerde ise %60 ila 70'dir. Term bebeklerde bu oran %2.7 ile 3.2 arasında değişmektedir. Bir yaşında bu oran %0.8'e düşmektedir³⁶.

Tablo 2. İnmemiş testiste testis lokalizasyonu. ⁽³⁷⁾

1. Intraabdominal testis
2. Kanaliküler testis
3. Superfisyal inguinal poştaki testis
4. Obstrakte olmuş testis
5. Ektopik testis
6. Retraktif testis
7. Asendan testis.

Modern cerrahi tedavi Bevan'ın 1899'de yayınladığı klasik yazı ile başlamıştır. İnternal inguinal ring veya intraabdominal yerleşimli olan ve cerrahi olarak indirilmesi zor vakalar için ise Davidson 1911'de inferior epigastrik damarların kesilerek yer kazanılmasını önermiştir, La Roque 1931'de kord uzunluğunu sağlayabilmek için retroperitoneal disseksiyonu önermiştir, Fowler ve Stephens 1959'da "long loop vas orşiopeksi" önermişlerdir³. İntraabdominal veya internal ring yerleşimli inmemiş testisler için ayrıca iki aşamalı orşiopeksi, ve Corkery'nin silastik kullanarak uyguladığı iki aşamalı orşiopeksi² ve mikrovasküler orşiopeksi önerilmiştir⁴.

İntraabdominal yerleşimli testis genellikle internal inguinal ringin bir ila iki santim üzerinde bulunur. Klinik olarak intraabdominal testis palpe edilemez. Cerrahi olarak testis internal ringde periton açılarak veya testiküler damarlar ve duktus deferens retroperitoneal olarak izlenerek veya laparoskopik olarak bulunur.

Testis palpe edilemiyorsa ya testis yoktur ya da intraabdominal veya internal inguinal ringdedir. Eğer testis var ise bunların malinite potansiyelleri olmaları ve steriliteye neden olmaları nedeni ile mutlaka bilinmesi gerekmektedir. Testis eğer tecrübeli bir cerrah tarafından bile palpe edilemiyorsa daha ileri incelemelere geçmek gerekir. Görüntüleme yöntemi olarak ultrason, komputeriye tomografi, magnetik rezonans görüntüleme, selektif venografi ve antreioografi yapılabilir, cerrahi olarak ise laparoskopiy uygulanabilir veya hasta eksplore edilebilir.

Testisin intraabdominal pozisyonda olduğu veya spermatik kordunun yetersiz uzunlukta olduğu saptanırsa yapılabilecek farklı ameliyatlarda vardır.

İki aşamalı orşiopeksi: Eğer testis damarları ve vas deferens yapılan ameliyatta testisin skrotuma yerleştirilebilmesi için kısa kalırsa testis skrotuma olabilecek en yakın mesafeye kadar indirilip oraya tutturulur ve 6 ila 18 ay sonra yapılan ikinci bir ameliyat ile skrotuma indirilir. Corkery bu ameliyata yaptığı bir modifikasyon ile, ilk aşamada testisi çevre dokulara yapışmaması için silastik bir tabaka içine yerleştirmektedir².

Fowler Stephen orşiopeksi: Bu ameliyatta testiküler arter ve ven kesilmekte ve testis duktus deferensin arterinden ve kremasterik vasküler anastomozlardan kanlanmaya devam etmekte ve testis bu durumda skrotuma indirilmektedir³. Ransley, Fowler Stephens orşiopeksisini modifiye ederek iki aşamalı hale getirmiştir³⁸. İlk aşamada testiküler arter kesilmekte ve 6 ila 12 ay kollateral gelişimi için süre tanındıktan sonra ikinci aşama uygulanmaktadır.

Mikrovasküler anastomoz (Testiküler ototransplantasyon): 1976'da Silber ve Kelly "Prune Belly" hastalığı olan bir bebekte ilk testis ototransplantasyonunu yayınladılar⁴. Mikro cerrahi tekniğin de gelişimi ile testis ototransplantasyonu yüksek intraabdominal testis için alternatif bir metod haline gelmiş ve birçok seriler yayınlanmıştır^{5,39,40,41}. Bu yöntemde inguinal ligaman üzerinde yukarıya ve laterale uzanan cilt kıvrımı insizyon kullanılmaktadır. Periton internal ring hizasında açılarak testis çevre peritoneal yapıları ile birlikte serbestleştirilip insizyonda çıkarılmakta ve periton kapatılmaktadır. Bundan sonra testiküler arter ve ven retroperitoneal olarak disseke edilmekte ve en proksimalden kesilmektedir. İnférieur epigastrik arter ve veni internal oblik ve transversus abdominus arasından internal ring hizasında disseke edilerek kesilip anastomoz için hazırlanmaktadır. Kesilen testiküler arter ve ven inguinal kanalda hazırlanan epigastrik inferior arter ve venine anastomoze edilmektedir. Daha sonra testis cild ile dartos kası arasında hazırlanan poşa yerleştirilmektedir. Testiküler iskemi süresi 28⁴ ila 120 dakika arasında değişmektedir⁵.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışma Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan Wistar Albino sıçanlar İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Merkezi (DETAM) ve Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma ve Hayvan Laboratuvarı'ndan sağlanmıştır. Biyokimyasal incelemeler Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

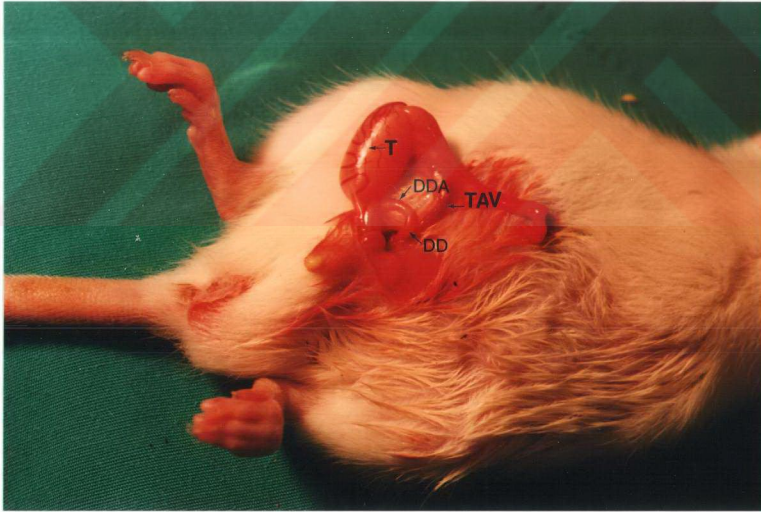
Deney hayvanı olarak 33 ila 38 günlük ağırlıkları 60 gram ile 124 gram arasında değişen erkek prepubertal Wistar Albino sıçanlar kullanılmıştır.

CERRAHİ İŞLEM

Sıçanlara 1.6 gr./kg.intraperitoneal üretan verilerek geri dönüşümsüz genel anestezi uygulanmıştır. Anesteziyi takiben pubis üzerinden başlayarak yaklaşık bir cm. uzunluğunda bir orta hat kesi ile laparotomi yapıldı (Resim 1). Duktus deferense ve testis damarlarına hiç dokunulmadan sağ testis skrotumdan itilerek insizyondan dışarıya çıkarıldı. Testis, duktus deferens ve testisin damarları sıçanın anatomisi gereği kolaylıkla ayırdedilebiliyordu (Resim 2). Duktus deferens ile damarlar birbirlerinden tamamen ayrı oldukları için damarları ayırmak için herhangi bir disseksiyon gerekmedi. Martin marka 13-102-04 kodlu mikroklipler ile damarlar testis girişinden yaklaşık bir santim proksimalden kliplenerek testis iskemisi sağlandı (Resim 3).



Resim 1. Çalışmada uygulanan laparotomi insizyonu.



Resim 2. İnsizyon dışına çıkartılmış testis.

T:Testis, DD:Duktus deferens, DDA:Duktus deferens arteri,
TAV: Testiküler arter ve ven

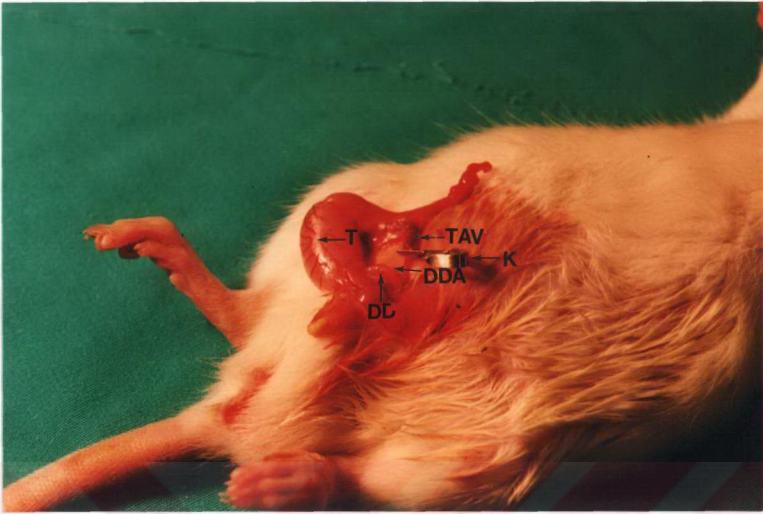
Sıçanlar protokole uygun olarak altı gruba ayrıldılar. Çalışmada birinci grupta 15, kalan gruplarda 10'ar sıçan olmak üzere 65 adet sıçan kullanılmıştır (Tablo 3.).

Grup I (*Bazal değerler*): Bazal değerler için genel anesteziyi takiben sağ testis hemen eksize edilmiştir.

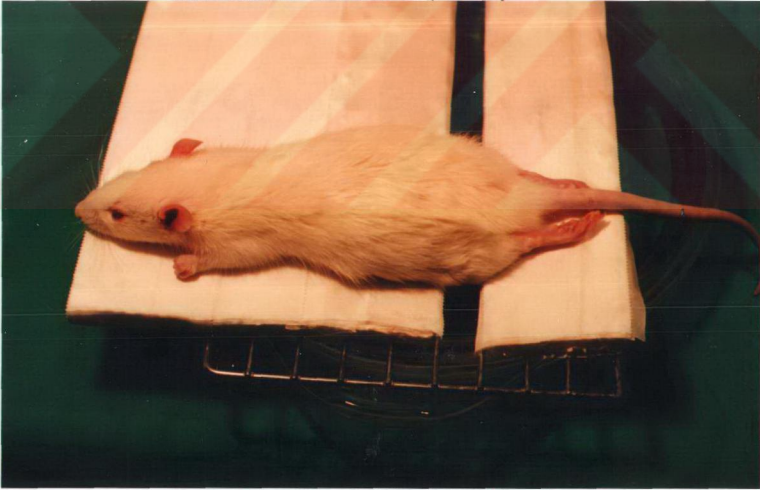
Grup II (*Sham grubu*): Sham grubunda ise sağ testis laparotomi insizyonundan çıkartılmış ve iskemi uygulanmadan iki saat dışarıda tutulmuştur. İki saatin sonunda testis tekrar skrotuma yerleştirilmiş ve iki saat te bu pozisyonda kaldıktan sonra testis eksize edilmiştir. Testis insizyon dışında kaldığı süre içinde üzerine serum fizyolojikli gaz örtülerek ıslak tutulmuştur. Böylece testis, duktus deferens ve özellikle damarların kuruması önlenmiştir.

Grup III (*İki saatlik normotermik iskemi ve iki saatlik normotermik reperfüzyon grubu*): Normotermik iskemi grubunda sıçan sırtüstü pozisyonda yatırıldı ve sağ testis insizyondan çıkarılarak kliplendi. İki saatlik iskemi süresi sonunda klip açıldı ve testis laparotomi insizyonundan tekrar skrotuma yerleştirildi. İnsizyon 5/0 ipek ile geçici olarak kapatıldı. Reperfüzyon süresinin sonunda testis epididim ve damarların çıkış yerinden tunica vaginalis zedelenmeden eksize edildi. Testis insizyon dışında kaldığı sürede yine serum fizyolojikli gazlarla ıslak tutulmuştur.

Grup IV (*İki saatlik hipotermik iskemi ve iki saatlik normotermik reperfüzyon grubu*): Hipotermik iskemi için sıçana laparotomi uygulandıktan sonra sağ testis çıkarıldı ve kliplendi. Laparotomi insizyonu damarlara ve duktus deferense baskı uygulamayacak şekilde 5/0 ipek ile geçici olarak tek tabaka halinde kapatıldı. Sıçan özel olarak hazırlanan ısı yalıtımını sağlayan yaklaşık 0.5 cm kalınlıktaki styopor platforma yüzüstü yatırıldı (Resim 4). Testis inguinal bölge hizasında daha önceden hazırlanmış olan yaklaşık bir santimlik bir aralıktan testis aşağıya doğru sallandırıldı. Bu platform buzlu serum fizyolojik içeren bir kap üzerine yerleştirilerek testisin soğuk serum fizyolojinin içinde kalması



Resim 3. Testiküler arter ve vane klip uygulanması.
T:Testis, DD:Duktus deferens, DDA:Duktus deferens arteri
TAV: Testiküler arter ve ven, K:Klip



Resim 4. Sıçanın testis hipotermisi sürecindeki pozisyonu

sağlandı (Resim 5). İki saatlik iskemi sonunda testis skrotuma geri yerleştirildi ve iki saatlik reperfüzyon döneminin de sonunda eksize edildi.

Grup V (İki saat hipotermik iskemi, bir saat hipotermik reperfüzyon ve bir saat normotermik reperfüzyon grubu): Bu grupta önceki gruptan farklı olarak testis reperfüzyonun ilk bir saatinde iskemi süresinde uygulandığı gibi soğuk serum fizyolojik içinde tutuldu. Testis bir saat sonunda tekrar skrotuma yerleştirildi ve bir saat te bu şekilde perfüze edildikten sonra eksize edildi.

Grup VI (İki saatlik hipotermik iskemi, bir saat normotermik olarak dışarıda reperfüzyon ve bir saat normotermik reperfüzyon grubu): Bu grupta ise sağ testis iki saat hipotermik iskemide tutulmuştur. Daha sonra klip açılarak testis skrotuma yerleştirilmeden dışarıda bir saat normotermik reperfüze edilmiş ve bunu takiben skrotuma yerleştirilmiştir. bir saat te bu pozisyonda kaldıktan sonra testis eksize edilmiştir.

Tablo 3. Deney grupları.

Grup I (n=15)	Bazal değerler.
Grup II (n=10)	Sham grubu.
Grup III (n=10)	2 saatlik normotermik iskemi ve 2 saatlik normotermik reperfüzyon.
Grup IV (n=10)	2 saatlik hipotermik iskemi ve 2 saatlik normotermik reperfüzyon.
Grup V (n=10)	2 saatlik hipotermik iskemi, 1 saatlik hipotermik reperfüzyon ve 1 saat normotermik reperfüzyon.
Grup VI (n=10)	2 saatlik hipotermik iskemi, 1 saat normotermik olarak dışarıda reperfüzyon ve 1 saat normotermik reperfüzyon.



Resim 5. Testisin soğuk serum fizyolojik içinde tutulması için hazırlanan düzenek.



Resim 6. Çalışma sırasında serum fizyolojinin ısısı elektronik termometre ile ölçüldü.

Sıçanlar tüm deneyler boyunca Ameda marka radiant ısıtıcı ile ısıtılmıştır. Sıçanların ısıları Electromedix marka rektal prob ile Protocol marka Propaq 104 model monitör ile ölçülmüş ve 35 ila 37.5 °C arasında tutulmuştur Hipotermi için kullanılan %0.9 NaCl solusyonunun ısısı ise Multi marka elektronik termometre ile ölçülmüş ve ısı 0 ila + 4°C arasında tutulmuştur (Resim 6).

Testisler eksizyonu takiben sıvı azotta bir dakika dondurulmuş ve biyokimyasal çalışmaya kadar -20°C'da saklanmıştır. Sıçanlar deney sonunda derin eter anestezisi ile sakrifiye edilmişlerdir.

BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER

DOKU PROTEİN MİKTARININ ÖLÇÜMÜ

Örneklerin protein miktarları standart olarak sığır serum albumininin kullanıldığı kısmen değiştirilmiş Lowry⁴² yöntemine göre yapılmıştır. -20 °C'de saklanmış testis dokusu soğuk 0.15 M KCl içinde %10 (ağırlık/volüm) olacak şekilde IKA marka Ultra Turrax T 25 model homojenizatör ile 8000 devir/dakikada homojenize edildi. 1/50 seğreltilmiş örneklerin 10 µl'si distile su ile 100 µl'ye tamamlandıktan sonra üzerlerine solusyon I (50 ml.%2 Na₂CO₃+1ml. %1 CuSO₄+1 ml. %2 Sodyum potasyum tartarat) eklendi. 10 dakika oda ısısında inkübasyondan sonra 100 µl solusyon II (Folin ve Ciocalteau fenol reagenti + H₂O 1:1 oranında) konularak karıştırıldı. Oda ısısında 30 dakika inkübe edilen örneklerin 750 nm'deki absorpsiyon değerleri (A₇₅₀) okundu. Daha sonra sığır serum albumini kullanılarak çizilen standart grafikten bilinmeyen örneklerin protein miktarı hesaplandı.

MDA ÖLÇÜMÜ

Örneklerin lipid peroksidasyonuna duyarlılığının saptanmasında Uchiyama'nın yöntemi kısmi değişiklikler ile kullanıldı⁴³. Buna göre 0.5 ml. homojenat 1 ml %20 TCA ile karıştırıldı ve bu karışım Hettich marka Universal 30 RF model santrifüj ile 4200 devir/dakika ile +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvınının 1 ml'si 1 ml %0.67 0.05 N NaOH TBA ile karıştırıldı ve sonra karışım 15 dakika 100°C su banyosunda ısıtıldı. Soğutma işleminden sonra karışımın absorbanı Shimadzu marka UV-2100 model spektrometrede örnek içeren köre karşı 532 nm.de ölçüldü. Örneklerdeki TBA reaktif maddelerin miktarı MDA için saptanmış molar ekstinksiyon katsayısı ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplandı ve nmol MDA/gram doku olarak ifade edildi.

PROTEİN KARBONİL GRUPLARININ ÖLÇÜMÜ (PROTEİN OKSİDASYONU)

Malondialdehit haricindeki aldehitler 2,4-dinitrofenil hidrozin boyası ile konjuge edilerek spektrofotometrik olarak tesbit edilir. 0.25 ml testis homejanıtına 0.25 ml boya eklendi (0.0998 gr 2,4 dinitrofenilhidrazin boyası / 10 ml 2N HCL) ve bir saat oda sıcaklığında karanlıkta arasıra karıştırılarak bekletildi. Sonrasında bu karışıma 0.5 ml %20 TCA çözeltisi konuldu ve 4500 devir/dakikada 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Pellet üzerine 2ml %10 TCA konarak tekrar santrifüj edildi. Oluşan pellet 1ml etanol etilasetat (1:1) karışımında üç kez yıkanarak (4200 devir/dakikada, +4°C 10 dakika) nonspesifik boya bağlanmaları uzaklaştırıldı. 2,4 dinitrofenilhidrazin boyası yerine 2 N hidroklorik asit konmuş köre karşı 370 nm' de absorban okundu. Karbonil içeriği için saptanmış molar ekstinksiyon katsayısı ($22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanarak örneklerin karbonil içeriği hesaplandı ve doku protein miktarına bölünerek nmol karbonil/mg protein olarak ifade edildi.

TOTAL SÜLFİDRİL GRUPLARI ÖLÇÜMÜ

Örneklerin total SH miktarının ölçümü Beutler⁴⁴ tarafından belirtilen yöntemin kısmi değişiklikleri ile yapıldı. 0.1 ml homojenat, 1ml. reaksiyon tamponu (100mM Tris Hcl (pH 8.2), %1SDS, 2 mM EDTA) ile karıştırıldı ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Karışım 4500 devir/dakikada 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı 40 µl Ellman ayıracı ile (10 mM DTNB (pH:7.0), 0.1mM KH₂PO₄/K₂HPO₄) ile karıştırıldı ve 5 dakika oda ısısında intübasyona bırakıldı. Homojenat yerine 0.15 M KCl çözeltisi kullanılarak hazırlanan ayıraç körüne karşı 412 nm.'de absorpsiyon okundu. Total SH düzeyleri oluşan sarı renkte ürünün 412 nm'deki ekstinksiyon katsayısı (13600M⁻¹ cm.⁻¹) kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar µmol/gr.doku olarak ifade edildi.

PROTEİN DIŞI SÜLFİDRİL GRUPLARI (PDSH) ÖLÇÜMÜ

NPSH'nın tesbiti için 0.5 ml homojenat 1:1 olacak şekilde %10 TCA ile karıştırılarak proteinler çöktürüldü. 3000 devir/dakika 15 dakika santrifüj edildi. Üst sıvının 0.25 ml'si 1 ml fosfat çözeltisi (0.3 M NaH₂PO₄)ile karıştırıldı, üzerine 0.125 ml Ellman ayıracı (4mg DTNB /10 ml, 10 ml. %1 sodyum sitrat) eklendi ve örnek yerine 0.15 M KCl kullanılarak hazırlanan ayıraç köre karşı 412 nm.de absorpsiyon okundu. Glutatyon düzeyleri oluşan sarı renkte ürünün 412 nm'deki ekstinksiyon katsayısı (13600 M⁻¹cm.⁻¹) kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar µmol/gr.doku olarak ifade edildi.

PROTEİN SÜLFİDRİL GRUBUNUN (PSH) ÖLÇÜMÜ

Protein sülfidril değeri ise protein dışı sülfidril değerinin her örnekte total sülfidril değerinden çıkarılması ile hesaplanmıştır. Çıkan sonuç da doku protein miktarına bölünerek µmol/mg.protein değeri bulunmuştur.

İSTATİSTİK ÇALIŞMASI

İstatistiksel değerlendirme için, veriler ölçümle elde edilmiş olduğundan, bağımsız ve ikişerli gruplar halinde karşılaştırılacağından ve gruplardaki sıçan sayısı 30'un altında olduğundan Mann-Whitney U testi tercih edilmiştir. p'nin 0.05'den düşük olduğu değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir. Çalışma Instat 2 adlı bilgisayar programında gerçekleştirilmiştir.



BULGULAR

Ölçülen biyokimyasal parametrelerden malondialdehid ve protein dışı sülfidril gram doku bazında, protein karbonilleri ve protein sülfidril ise dokunun protein miktarı ile orantılı olduğundan miligram protein bazında değerlendirilmiştir.

Tablo 4. Grupların parametrelere göre ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri

	MDA (nmol/gr.doku)	PO (nmol/mg.protein)	PSH (µmol/mg.protein)	PDSH (µmol/gr.doku)
GRUP I	8.33413±5.754 1.486	0.02051±0.023899 0.00617	0.084065±0.02634 0.006801	0.24382±0.1193 0.03079
GRUP II	16.704±10.056 3.180	0.01675±0.03635 0.01150	0.1067692±0.0393 0.01243	0.33868±0.09435 0.02984
GRUP III	17.5152±14.333 4.533	0.06669±0.06371 0.02015	0.075898±0.03207 0.01014	0.2226±0.1122 0.03548
GRUP IV	17.6352±5.775 1.826	0.05536±0.1102 0.03483	0.086399±0.04988 0.01577	0.27018±0.092487 0.02924
GRUP V	18.1284±11.434 3.616	0.04026±0.03742 0.01183	0.093985±0.03003 0.009496	0.31439±0.1405 0.04237
GRUP VI	18.806±15.292 4.836	0.08381±0.1314 0.04156	0.088405±0.03513 0.01111	0.27888±0.1120 0.03542

Grup I: Bu grupta anestezi sonrası bazal değerler alınmıştır. Bazal değerler ve standart sapmaları MDA için 8.33413 5.754 nmol/gram doku, PO için 0.02051±0.023899 nmol/mg.protein, PSH için 0.084065±0.02634 µmol/mg.protein, PDSH için ise 0.24382±0.1193 µmol/gr.doku olarak bulunmuştur.(Tablo 4.)

Grup II: Sham operasyonu grubu değerlendirildiğinde MDA (16.704± 10.056 nmol/gram doku), PSH (0.0106769±0.0393 µmol/mg.protein) ve PDSH'de (0.33868±0.09435 µmol/gram doku) bazal değerlere göre artış saptanmıştır. Bu artış incelendiğinde artışın MDA'da anlamlı olduğu (p<0.05) diğer

parametrelerde ise anlamsız olduğu bulunmuştur. Protein oksidasyonu ise bazal değerden çok hafif düşük bulunmuştur (0.01675 ± 0.03635 nmol/mg. protein).

Tablo 5. Karşılaştırılan gruplar arası parametrelere göre anlamlılıklar

GRUPLAR	PO	MDA	PSH	PDSH
1-2	ad	<i>a</i>	ad	ad
2-3	<i>a</i>	ad	<i>a</i>	<i>a</i>
2-4	<i>a</i>	ad	ad	ad
2-5	ad	ad	ad	ad
3-4	ad	ad	ad	ad
3-5	ad	ad	ad	<i>a</i>
4-5	ad	ad	ad	ad
5-6	ad	ad	ad	ad

a: anlamlı, ad: anlamlı değil ($p < 0.05$: anlamlı) Mann Whitney U;

Grup III: İki saat normotermik iskemi iki saat normotermik reperfüzyon grubunun sonuçları incelendiğinde MDA ve PO 'nun sham grubuna göre artmış oldukları izlenmiştir. Bu artış PO 'da (0.06669 ± 0.06371 nmol/mg.protein $p < 0.05$) anlamlı olarak değerlendirilirken MDA'da ise anlamlı olarak değerlendirilmemiştir. PSH (0.075892 ± 0.03207 μ mol/mg.protein $p < 0.05$) ve PDSH (0.2226 ± 0.1122 μ mol/gram doku $p < 0.05$) değerleri ise sham grubuna göre anlamlı bir şekilde düşmüştür. Bu grup sadece iskeminin hipotermik olduğu (grup IV) ve iskeminin ve bir saatlik reperfüzyonun hipotermik olduğu (grup V) gruplarla karşılaştırıldığında ise MDA'nın çok yakın değerlerde olduğunu, PO'nun diğer gruplardan daha yüksek değerde olduğunu ve PSH ile PDSH in ise tüm bu gruplar içinde en düşük değerlere sahip olduğunu izlemekteyiz. Ancak istatistiksel olarak incelendiğinde tüm bu gruplar arasında sadece grup III ile V arasında PDSH'de anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır. Diğer farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 5).

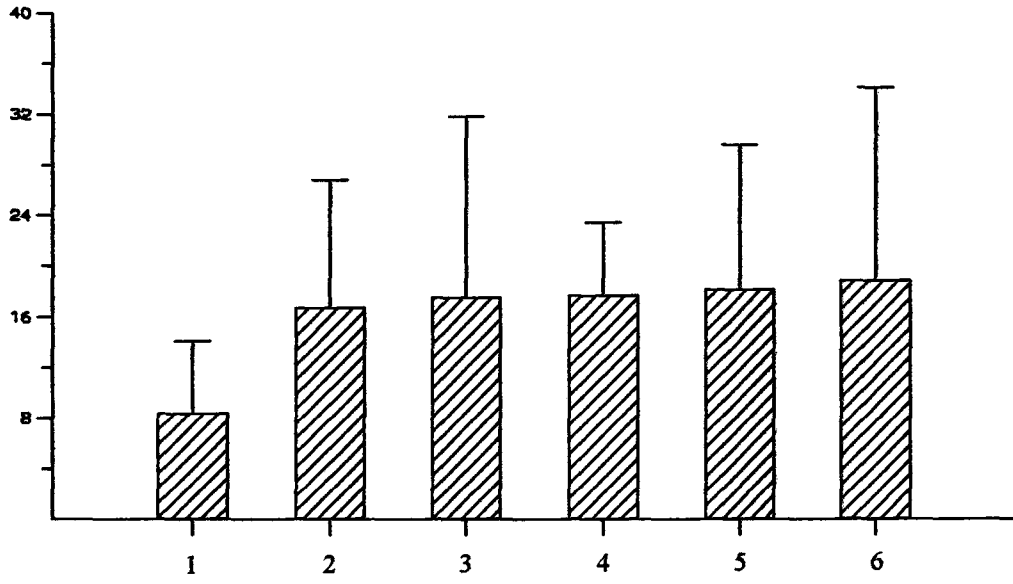
Grup IV: İki saat hipotermik iskemi iki saat normotermik reperfüzyon grubu, iki saat normotermik iskemi iki saat normotermik reperfüzyon grubu ile

karşılaştırıldığında ise MDA'nın eşit olduğu, PO artışında azalma olduğu ve yine PSH ve PDSH gruplarında düşüşte bir azalma olduğu saptanmıştır. Ancak yine tüm bu farklar anlamlı olarak değerlendirilmemiştir.

GrupV ve VI: İki saat hipotermik iskemi ve bir saat hipotermik reperfüzyon bir saat normotermik reperfüzyon grubu (grup V), bir saatlik hipotermik reperfüzyonun dışarıda normotermik olarak yapıldığı grupla (grupVI) karşılaştırıldığında ise MDA değerinin yaklaşık olarak eşit olduğu, PO değerinin daha az artmış olduğu PDSH ve PSH değerlerinin ise daha az düşmüş oldukları izlenmiştir. Yine bu sonuçlar istatistiksel olarak incelendiğinde aralarında anlamlı bir fark izlenmemiştir.

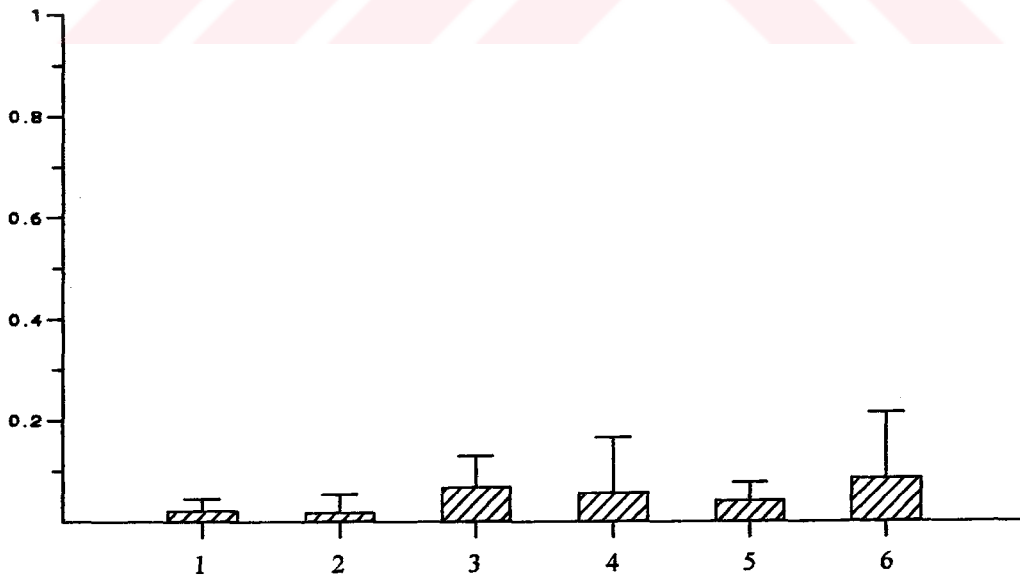


nmol/gram doku



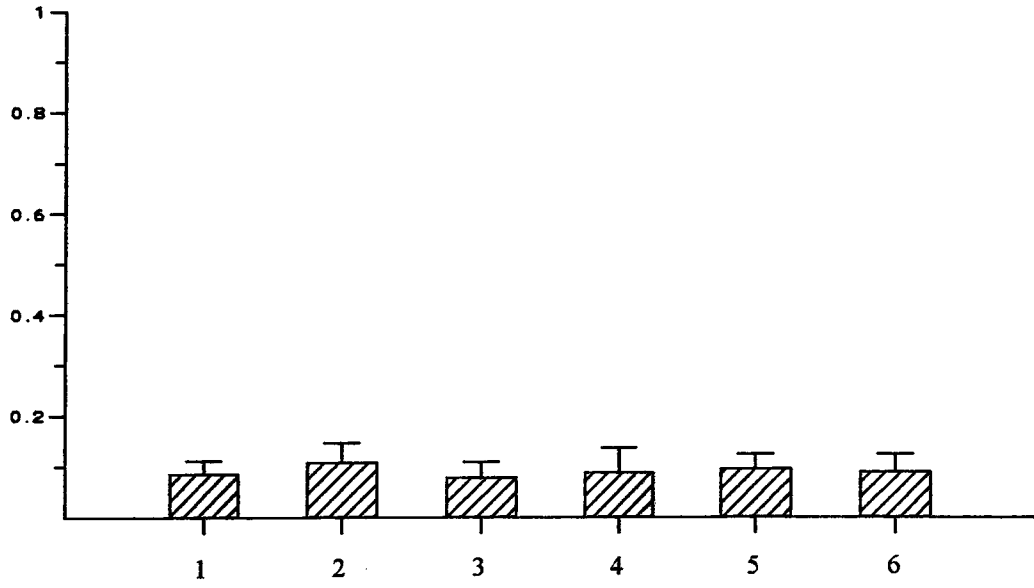
Şekil 2. Grupların MDA ortalama değerleri ve standart sapmaları

nmol/mg. protein



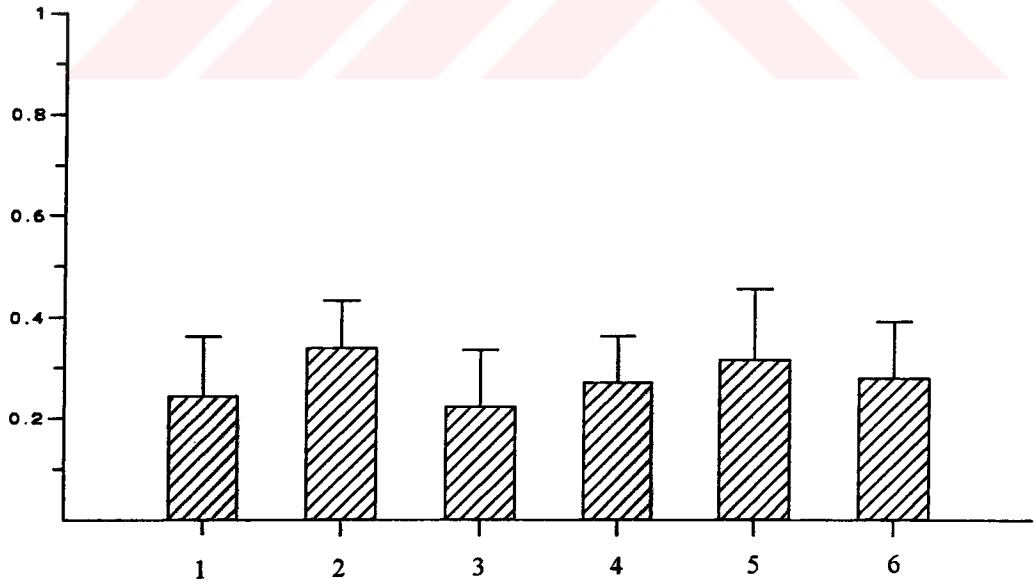
Şekil 3. Grupların PO ortalama değerleri ve standart sapmaları

$\mu\text{mol/mg.protein}$



Şekil 4. Grupların PSH ortalama değerleri ve standart sapmaları

$\mu\text{mol/gram doku}$



Şekil 5. Grupların PDSH ortalama değerleri ve standart sapmaları

TARTIŞMA

ÇALIŞMA PROTOKOLÜ

Bu deneysel çalışmada hipotermimin, testis iskemisi ve reperfüzyonu sırasında koruyucu etkisinin varlığı araştırılmıştır. Çalışmada prepubertal Wistar Albino sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanların prepubertal seçilmesinin nedeni bu çalışmanın klinik yansıması olan testis ootransplantasyonunun prepubertal döneme rastlamasıdır. Wistar Albino ratlar 45 günlük iken puberteye girmektedirler. Puberteye giriş kriteri olarak histolojik incelemede seminiferöz tubulusların içinde spermatozoa görülmesi kabul edilmektedir.

Prepubertal sıçanların kullanılmasının bazı dezavantajları olmuştur. Testis dokusunun 320 ila 620 mg. kadar küçük olması çok fazla biyokimyasal parametre çalışılmasına izin vermemiştir. Ayrıca sıçanlar yaklaşık 20 günlüğe kadar annesinden ayrılmadığı için, ağırlıkları annelerinin ilgisine ve besleme performansına bağlı kalmaktadır. Bu yüzden sıçanlar arası ağırlık farkları olmaktadır. Sıçanların küçük olmalarının diğer bir dezavantajı ise soğuğa karşı duyarlı olmalarıdır. Bu nedenle normal rektal ısıları 37.5°C olan sıçanlar deney boyunca radiant ısıtıcı ile ısıtılmışlar ve rektal ısıları 35 ile 37.5°C arasında tutulabilmıştır.

Testis iskemisi ve reperfüzyonu ile ilgili yapılan çalışmalar, testisin dört ile beş saatten uzun süren iskemi periodundan sonra tekrar perfüze olmadığını göstermiştir^{45,46,47,48}. Xu ise travmatik olarak testis damarları kopmuş olan bir hastasına altı saatlik iskemi sonrası testis replantasyonu uygulamış ve 120 gün sonra yaptığı biyopside Leydig hücrelerinin normal olduğunu ve germ hücrelerinin ise gelişimlerinin farklı aşamalarında mevcut olduğunu izlemiştir⁴⁹.

İntraabdominal inmemiş testislerde uygulanan testis ototransplantasyonunda ise testis 28 dakika⁴ ile iki saat iskemik kalmaktadır⁵. Çalışmamızda testis iskemi süresi bu bilgiler eşliğinde iki saat olarak belirlenmiştir. Reperfüzyon için de yine yapılan çalışmalara uygun olarak iki saatlik süre seçilmiştir^{46,47,50}.

Salt hipotermik reperfüzyonun koruyucu etkisinin anlaşılabilmesi için hipotermik reperfüzyon grubu (grup V), iki saat soğuk iskemi, bir saat insizyon dışında normotermik reperfüzyon ve bir saat intraskrotal normotermik reperfüzyon uygulanana grup VI ile karşılaştırılmıştır.

Testislerde hipotermi testisin 0 ile +4 °C arasındaki %0.9 NaCl içinde tutulması ile sağlanmıştır. Testis dokusu çok küçük olduğu için yüzeysel soğutmanın yeterli olduğu düşünülmüştür. Ayrıca iskemi sırasında testisin arter ve veninin devamlılığı korunduğundan soğuk perfüzyon yöntemi ile soğutulması mümkün değildi. Bu nedenlerle soğutucu solusyon olarak özel solusyonlar yerine %0.9 NaCl kullanılmıştır.

CERRAHİ TEKNİK

Çalışma 4 saat süreceği ve sonunda sıçan sakrifiye edileceği için geri dönüşümsüz bir anestetik ajan olan üretan kullanılmıştır. Testis herhangi bir travmayla karşılaşmadan skrotumdan insizyona doğru itilerek insizyondan çıkarılabilmektedir. Testis sıçanlarda vücuda oranla relatif olarak daha büyüktür, damarlar ve duktus deferens herhangi bir disseksiyon gerektirmeyecek şekilde birbirinden ayrıdır. Bu nedenle testiküler damarların kliplenmesi sırasında duktus deferense ve duktus deferensin damarına zarar verilmemiştir. Klipler damarların testise girdiği noktanın yaklaşık 1 cm. proksimaline konularak arteriyel ve venöz akım tamamen kesilmiştir. Ancak ratlarda iyi gelişmiş olarak gözlenen duktus deferens arteri ile testis kanlanmaya devam etmiştir. Duktus deferens arteri sıçanlarda iyi gelişmiş olmasına karşın venöz drenaj aynı

derecede iyi gelişmemiştir⁵¹. Pascual ratlarda yaptığı çalışmada testiküler arterin bağlanması halinde testis kan akımının %80 oranında azaldığını göstermiştir⁵². Testislerin reperfüze oldukları iskemi sonunda kliplerin açılması ile koyulaşmış olan renklerinin açılmasından ve hacimlerinin artmasından anlaşılmıştır.

BİYOKİMYASAL ÖLÇÜMLER

Biyokimyasal ölçümler tümüyle aynı koşullar altında, aynı kişi tarafından ve örneklerin hangi gruba ait olduğu bilinmeden yapılmıştır. Her seansta tek bir grup değerlendirilmeyip, farklı farklı gruplardan örnekler incelenerek seanslar arası olası farklılıklar gruplara eşit olarak bölüştürülmeye çalışılmıştır.

BULGULAR

PO ve PSH değerleri hücredeki protein miktarı ile orantılı olduğu için hasarın daha doğru değerlendirilebilmesi amacı ile hücrenin protein içerikleri de ölçülmüş ve PO ve PSH değerleri protein bazında değerlendirilerek miligram protein düzeyinde hesaplanmıştır.

Tüm parametreler değerlendirildiğinde sham grubunda değerlerin bazalden daha farklı olduğu gözlenmiştir. Hatta bu fark MDA 'da anlamlı bulunmuş, diğerlerinde ise anlamlı bulunmamıştır (Tablo 5). Bu iki grup arasındaki fark dört saatlik anestezinin ve cerrahi travmanın parametrelerimizde bazı değişikliklere neden olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Bu nedenle farklı ısı protokollerinin uygulandığı çalışma grupları bazal değerler grubu ile değil, sham operasyonu grubu ile karşılaştırılmıştır.

İki saat normotermik iskemi iki saat normotermik reperfüzyon uygulanan grubunun (Grup III) değerlendirilmesinde ise MDA ve PO'nun sham grubuna

göre artmış oldukları izlenmiştir. Bu artış PO'da istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bulunmuş, MDA'da ise istatistiksel olarak anlamlı değerlendirilmemiştir. PSH ve PDSH değerlerine bakıldığında, bu gruptaki değerlerin sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bir şekilde düştüğü saptanmıştır. Tüm bu değişiklikler yarattığımız modelde iskemi reperfüzyon hasarının oluştuğunu göstermektedir.

Hipotermik iskemi normotermik reperfüzyon grubu (Grup IV), normotermik iskemi normotermik reperfüzyon grubu (Grup III) ile karşılaştırıldığında ise; MDA değerlerinde bir fark olmadığı, PO artışında azalma olduğu ve yine PSH ve PDSH değerlerinde artma olduğu saptanmıştır (Tablo 4). Bu sonuçlar hipoterminin etkisi ile daha az proteinin oksidasyona uğradığını, glutatyonun daha az harcanmasına gerek kalındığını ve PSH lerin de daha az hasar gördüğünü düşündürmekte ise de bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Hipotermik iskemi ve bir saat hipotermik reperfüzyon bir saat normotermik reperfüzyon grubu (Grup V) ile iki saat hipotermik iskemi ve bir saatlik dışarıda normotermik reperfüzyon, bir saat intraskrotal normotermik reperfüzyon grubu (Grup VI) karşılaştırıldığında ise; MDA değerinin yaklaşık olarak eşit olduğu, PO değerinin belirgin oranda daha az artmış olduğu, PDSH ve PSH değerlerinin de daha az düşmüş oldukları izlenmiştir. Bu sonuçlar da istatistiksel olarak incelendiğinde aralarındaki fark anlamlı olarak bulunmamıştır.

Çalışmadaki tüm PO, PDSH ve PSH değerleri incelendiğinde gruplar arası değişikliklerin birbirlerini destekleyici olduğu izlenmiştir. Ancak MDA değerleri değerlendirildiğinde, MDA'nın diğer parametrelerle hiçbir ortak özelliği olmadığı görülmüştür. Bunun yanında en geniş standart sapmaların MDA'da bulunmuş olması da MDA'nın testiste iskemi reperfüzyon hasarında çok uygun bir kriter olmadığını düşündürülebilir.

Testis iskemisi ve reperfüzyonunun hasarı ile ilgili çalışmalar daha çok testis torsiyonu^{46,47,48,50,55,56,57,58}, deneysel testis iskemisi^{52,59,60,61}, mikrovasküler testis ototransplantasyonu^{49,51,62,63,64} ve kemoterapi sırasında testisin dolaşımının izolasyonu⁶⁵ üzerine yapılmıştır. Klinik ve deneysel olarak yapılan bu çalışmalarda gelişen hasar çoğu zaman histolojik olarak değerlendirilmiştir. İskemi reperfüzyon hasarının biyokimyasının aydınlanmaya başlaması ile birlikte testis iskemisi reperfüzyon hasarının biyokimyasal parametrelerle değerlendirildiği çalışmalar da artmıştır^{46,47,50}. Ancak yine de bu artış diğer organlardaki kadar fazla olmamış ve sınırlı sayıda kalmıştır.

Yapılan bu çalışmalar testis iskemisi reperfüzyon hasarına farklı yorumlar getirmiştir. Akgür ve arkadaşları, yaptıkları çalışmalarda testis torsiyonu ve detorsiyonu sırasında doku laktat, hipoksantin ve tiobarbitürik asitle reaksiyona giren maddelerin (TBARS) düzeylerini inceleyerek modellerinde bir iskemisi reperfüzyon hasarı geliştirdiklerini göstermişlerdir^{46,47}. Buna karşın bazı çalışmalar testiste diğer organlardan farklı olarak klasik iskemisi reperfüzyon hasarının gelişmediğini düşündüren sonuçlara ulaşmışlardır. Örneğin, Bergh ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada superoksit dismutaz ve katalaz gibi radikal scavengerlerle 60 ile 100 dakikalık testis iskemisi sonucu oluşan histolojik hasarı önleyemediği gösterilmiştir⁶⁰. Yine Greenstein ve arkadaşları yaptıkları çalışmada sıçanlarda üç saatlik 720 derece testis torsiyonu modelinde polietilen glikol superoksit dismutazın histolojik değişiklikleri önlemediğini göstermişlerdir⁵⁴.

İskemik testislerde iskemisi reperfüzyon hasarını önlemek için de çok az çalışma yapılmıştır. İskemisi reperfüzyon hasarının reaksiyonlarının en başında yer alan hipoksantin yıkıldığı reaksiyonda rol oynayan ksantin oksidazın inhibitörü olan allopürinol başka organ iskemilerinde klinikte de kullanılan bir maddedir. Akgür yaptığı bir çalışmada detorsiyon öncesi verilen allopürinol ile iskemisi reperfüzyon hasarını azalttıklarını biyokimyasal yöntemlerle göstermiştir⁵⁰. Schwaiger ve arkadaşları ise yaptıkları bir çalışmada testis

iskemisinde germinatif epitel hasarının heparin ve alfa reseptör blokerleri ile azaltılabileceğini göstermişler ve bunu testis ototransplantasyonunda önermişlerdir⁶³.

Testis iskemi hasarını önlemek için hipotermi uygulaması ile ilgili çalışma yine çok sınırlı sayıdadır^{8,9,10,64}. Testis ototransplantasyonu sırasında testisin düşük ısıda tutulması klasik bilgiler ışığında çok fazla araştırmaya dayandırılmadan önerilmektedir⁵. Yine Boyarsky editöre yazdığı mektupta testis torsyonunda klasik bilgi olan hipoterminin koruyucu etkisinin kullanılabileceğini önemiştir⁶⁶. Shiohvilli ise beş hastasında yaptığı testis ototransplantasyonunda operasyon süresince testisleri 20 °C kadar soğuttuğunu bildirmiştir⁶⁴. Kallerhof ve arkadaşları da ratlarda yaptığı çalışmada testis ısısını 35 °C'den 15°C'ye düşürerek testis doku pH'sının 6.0'a düşme süresini bir saatlik iskemiden altı saatlik iskemiyeye uzatmışlardır⁹. Hipoterminin ayrıca doku laktat değerinin düşük seviyede tutulmasını sağladığını ve histolojik hasarı da azalttığını göstermişlerdir. Miller ve arkadaşları ise sıçanlarda yaptıkları çalışmada iki, dört ve altı saatlik testis iskemisinin ilk 30 dakikadan sonraki döneminde testisleri +4°C'de tutmuştur. İki hafta sonra gelişen hasarları histolojik olarak incelemiştir. İki saatlik hipotermik iskemi ile normotermik iskemi grubunda, sham operasyonu grubundan farklı bulunmayan minimal değişiklikler bulmuştur. Ancak dört ve altı saatlik hipotermik iskemi grubunda hasarın aynı süreli normotermik iskemi grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğunu göstermişlerdir⁸. Bu çalışmalar hipoterminin, iskeminin testiste oluşturduğu hasarı azaltılmada yeri olduğunu düşündürmektedir. Buna karşın bir başka histolojik çalışmada Lui ve arkadaşları sıçanlarda en fazla 180 dakika olmak üzere farklı sürelerde testis iskemisi yaratmışlar ve 60 dakikaya kadar olan süredeki iskemide soğuk uygulamasının dokuya histolojik olarak daha fazla zarar verdiğini göstermişlerdir¹⁰.

Reperfüzyon sırasında hipotermi uygulamasının etkisi ise üzerinde çok az durulmuş bir konudur. Sadece beyin dokusu üzerinde bir çalışma yapılmış ve

reperfüzyonda uygulanan hipoterminin yararlı olduğu sonucuna varılmıştır⁶⁷. Ancak farklı bir doku olan testiste hipoterminin reperfüzyon süresinde uygulanmasının etkisi incelenmemiştir.

Çalışmamızda testiste iskemi ve reperfüzyon süresinde uygulanan hipoterminin etkisi, iskemi reperfüzyon hasarı için son zamanlarda önerilen biyokimyasal parametrelerle incelenmiştir. Sonuçlar hipoterminin testis ototransplantasyon modelinde uygulanan iki saatlik iskemi ve reperfüzyonda yararlı etkisinin olmadığını göstermiştir. Bu sonuç irdelendiğinde Bergh ve Greenstein'in çalışmaları sonucu ileri sürülen, testiste gelişen iskemi reperfüzyon hasarının diğer organlardan farklı olduğu düşüncesini desteklediği düşünülebilir. Diğer bir yaklaşım ise, seçilen iskemi süresinin kısa olması veya seçilen ısının düşük olmasıdır. Bu iki faktör kombine olarak düşünülmelidir. Hipoterminin yararlı etkilerinin yanında bazı zararlı etkilerinin de olduğu bilinmektedir³³. Bu yaklaşıma göre seçilen ısı zaman kombinasyonunda belki de hipoterminin yararlı yönü çok fazla ağır basmamış olabilir ve daha uzun süreli iskemilerde hipotermi testisi iskemi reperfüzyon hasarından koruyabilir. Ancak model olarak testis ototransplantasyonunu seçtiğimiz için iskemi için daha uzun süre seçilmesi uygun değildir. Ayrıca böbrek transplantasyonunda yapılan bir çalışma dokunun 0°C'ye ne kadar yakın soğutulursa ve bu soğutma süresi ne kadar kısa tutulursa o kadar fazla korunabileceğini göstermiştir³¹.

Sonuç olarak benzer çalışmalardan farklı olarak hipoterminin testis ototransplantasyon modelinde oluşturulan testis iskemi ve reperfüzyon hasarına anlamlı bir koruyucu etkisi olmadığı ortaya çıkmıştır. Bu sonuçla, çalışmamıza model olan testis ototransplantasyonunda testise hipotermi uygulanmasına gerek olmadığını düşünmekteyiz.

SONUÇ

Bu çalışmada hipotermi testis iskemi reperfüzyon hasarına olan etkisi araştırılmıştır. Bu etki hipotermi hem iskemide hem de reperfüzyonda uygulanarak değerlendirilmiştir. Değerlendirme lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu, protein sülfidril grubu ve protein dışı sülfidril grubu ölçülerek biyokimyasal olarak yapılmıştır.

Normotermik iskemi normotermik reperfüzyon grubu sham grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki fark, bir iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulduğu için anlamlı bulunmuştur. Buna karşın farklı ısı protokollerinin uygulandığı gruplar birbirleri ile karşılaştırıldığında aralarındaki fark anlamlı bulunmamıştır.

Bu bulgularla testis ototransplantasyon modelinde uygulanan iki saatlik testis iskemisinde hipotermi uygulanmasının, biyokimyasal yöntemlerle incelendiğinde yararlı bir etkisi olmadığı saptanmıştır. Çalışmamızdan çıkan sonuçla testis ototransplantasyonunda testise hipotermi uygulanmasına gerek olmadığını düşünmekteyiz.

ÖZET

Bu tez çalışmasında hipotermi nin iskemi reperfüzyon hasarına olan etkisi incelenmiştir. Çalışma prepubertal wistar albino sıçanlarda altı grupta yapılmıştır. Sıçanların testislerinde, testis ototransplantasyon modeline uygun olarak testiküler arter ve venleri kliplenerek iskemi yaratılmıştır.

Grup I'de bazal değerler araştırılmıştır. Grup II'de sham operasyonu uygulanan sıçanlar değerlendirilmiştir. Grup III'de testise iki saat normotermik iskemi ve iki saat normotermik reperfüzyon uygulanmıştır. Grup IV'de testise iki saat hipotermik iskemi ve iki saat normotermik reperfüzyon uygulanmıştır. Grup V'te testise iki saatlik hipotermik iskemi, bir saatlik hipotermik reperfüzyon ve bir saat normotermik reperfüzyon uygulanmıştır. Grup VI'da ise testise iki saatlik hipotermik iskemi, bir saat normotermik olarak insizyon dışında reperfüzyon ve bir saat intraskrotal normotermik reperfüzyon uygulanmıştır. Hipotermi testisin 0 ila +4°C arasında ısıda bulunan serum fizyolojik içinde tutulması ile sağlanmıştır.

Testislerde protein karbonil grupları, malondialdehid, proteine bağlı sülfidril grupları ve protein dışı sülfidril değerleri biyokimyasal yöntemlerle incelenmiştir.

Normotermik iskemi normotermik reperfüzyon grubu sham grubu ile karşılaştırıldığında, aralarında oluşan iskemi reperfüzyon hasarına uygun olarak, anlamlı bir fark bulunmuştur. Buna karşın farklı ısı protokollerinin uygulandığı gruplar arasındaki fark ise anlamlı bulunamamıştır.

Bu bulgularla iki saatlik testis iskemisinde +4°C hipotermi uygulanmasının, biyokimyasal yöntemlerle incelendiğinde yararlı bir etkisi olmadığı saptanmıştır. Çalışmamızdan çıkan sonuçla testis ototransplantasyonunda testise hipotermi uygulanmasının gerekli olmadığını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Levitt SB, Kogan SJ, Engel RM, et al.: The impalpable testis: a rational approach to management. *J Urol* 120:515, 1978
2. Corkery JJ: Staged orchiopexy-a new technique. *J Ped Surg* 10:515-8, 1975
3. Fowler R, Stephens FD: The role of testicular vascular anatomy in salvage of high undescended testes. *Aust NZ J Surg* 29:92-106, 1959
4. Silber SJ, Kelly J: Successful autotransplantation of an intra-abdominal testis to the scrotum by microvascular technique. *J Urol* 115:452-4, 1976
5. Bianchi A: Microvascular orchidopexy for high undescended testes, Frank JD, Johnston JH (editors) *Operative Paediatric Urology*, Chapter 12 Churchill Livingstone London 1990, 115-122
6. Parks DA, Granger DN: Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 250: G749-753, 1986
7. Grace PA: Ischemia-reperfusion injury *Br J Surg* 81:637-647, 1994
8. Miller DC, Peron SE, Keck RW, et al.: Effects of hypothermia on testicular ischemia. *J Urol* 143:1046-48, 1990
9. Kallerhof M, Coors A, Fischer C, et al.: Follow-up of tissue acidosis, lactic acid production and morphologic changes in testicular tissue in ischemia and the effect of cooling. *Helv Chir Acta* 60:371-6, 1993
10. Lui RC, LaRegina MC, Herbold DR, et al.: Tolerance of rat testis to graded periods of total circulatory isolation. *J Surg Oncol* 39:264-8, 1988
11. Carson DA, Ribeiro JM : Apoptosis and disease. *The Lancet* 341:1251-54, 1993
12. Chaudry IH, Clemens MG, Baue AE: Alterations in cell function with ischemia and shock and their correction. *Arch Surg* 116:1309-1317, 1981

13. Korthuis RJ, Smith JK, Carden DL: Hypoxic reperfusion attenuates postischemic microvascular injury. *Am J Physiol* 256:H315-19, 1989
14. Welbourn CRB, Goldman G, Paterson IS, et al: Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury: Central role of the neutrophil. *Br J Surg* 78:651-5, 1991
15. Hernandez LA, Grisham MB, Granger DN: A role of iron in oxidant-mediated ischemic injury to intestinal microvasculature. *Am J Physiol* 253:G49-53, 1986
16. Smith JK, Grisham MB, Granger DN, et al.: Free radical defense mechanisms and neutrophil infiltration in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol* 256:H789-93, 1989
17. Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, et al.: Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation* 67:1016-23, 1983
18. Kubes P, Ibbotson G, Russell J, et al.: Role of platelet-activating factor in ischemia/reperfusion-induced leucocyte adherence. *Am J Physiol* 257:G300-305, 1990
19. Suzuki M, Inauen W, Kvietys PR, et al.: Superoxide mediates reperfusion-induced leukocyte-endothelial cell interactions. *Am J Physiol* 256:H1740-45, 1989
20. Windsor ACJ, Mullen PG, Fowler AA, et al.: Role of the neutrophil in adult respiratory distress syndrome. *Br J Surg* 80:10-17, 1993
21. Fiessinger JN, Schaefer M: Trial of iloprost versus aspirin treatment for critical limb ischaemia of thromboangitis obliterans. *Lancet* 335: 555-57, 1990
22. Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-6, 1980
23. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-6, 1987

24. Stewart DJ, Pohl U, Bassenge E: Free radicals inhibit endothelium-dependent dilation in the coronary resistance bed. *Am J Physiol* 255:H765-9, 1988
25. Rubanyi GM, Vanhoutte PM: Hypoxia releases a vasoconstrictor substance from the canine vascular endothelium. *J Physiol* 364:45-56, 1985
26. Kukreja RC, Hess ML: The oxygen free radical system: From equations through membrane protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc Res* 26:641-55, 1992
27. Lelli JL Jr, Pradhan S, Cobb LM: Prevention of postischemic injury in immature intestine by deferoxamine. *J Surg Res* 54: 34-38, 1993
28. Walker DM, Yellon DM: Ischaemic preconditioning-from mechanism to exploitation. *Cardiovasc Res* 26:734-9, 1992
29. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA: Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74:1124-72, 1986
30. Copen MV, Downey JM: Ischaemic preconditioning: Can the protection be bottled? *Lancet* 342:6, 1993
31. Collins GM: Kidney preservation by cold storage. Cerilli GJ (Editor) *Organ Transplantation and Replacement*, Chapter 20 Lippincott Philadelphia 1988, 312-21
32. Busto R, Globus MYT, Dietrich WD, et al.: Effect of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain. *Stroke* 20:904-10, 1989
33. Clavien PA, Harvey PRC, Strasberg SM: Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. *Transplantation* 53:957-978, 1992
34. D'Alessandro AM, Southard JH, Love RB, et al.: Organ preservation. *Surg Clin NA* 74: 1083-95, 1994
35. Holley EA, Cheeseman KH: Measuring free radical reactions in vivo. *Br Med Bull* 49:494-505, 1993

36. Ellis DG: Undescended testes: Ashcraft (editor) Pediatric Urology, Chapter 17 W.B.Saunders 1990, 415-428
37. Hutson JM Classification and causes of undescended testes in humans Hutson JM, Beasley SW (editors) Descent of the Testis Chapter 4 Edward Arnold 1992, 50-73
38. Ransley PG, Vordermark JS, Caldamone AA, et al.: Preliminary ligation of the gonadal vessels prior to orchiopexy for the intra-abdominal testicle: a staged Fowler-Stephens procedure. *World J Urol* 2:266,1984
39. Macmahon RA, O'Brien BM, Abedeen J, et al.: Results of the use of autotransplantation of the intraabdominal testis using microsurgical vascular anastomosis. *J Ped Surg* 15: 92-6, 1980
40. Janecka IP, Romas NA: Microvascular free transfer of human testes. *Plast Reconstr Surg* 63:42-3, 1979
41. Bianchi A: Microvascular orchidopexy for high undescended testes. *Br J Urol* 56:521-4, 1984
42. Lowry OH, Rosenberg MY, Farr AL, Randal RT: Protein measurement with the folin phenol reagent *J Biol Chem* 192:265-275, 1951
43. Uchiyama M, Mihara M: Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86: 271, 1978
44. Beutler E, Duron O, Kelly BM: Improved method for the determination of blood glutathione *J Lab Clin Med* 61: 882-8, 1963
45. Turnet TT: Acute experimental testicular torsion: No effect on the contralateral testis. *J Androl* 6:65-72, 1985
46. Akgür FM, Kılınç K, Aktuğ K: Reperfusion injury after detorsion of unilateral testicular torsion. *Urol Res* 21:395-9, 1993
47. Akgür FM, Kılınç K, Tanyel FC, et al.: Ipsilateral and contralateral testicular biochemical acute changes after unilateral testicular torsion and detorsion. *Urology*. 44: 413-8, 1994

48. Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R, et al.: Histopathology of prepubertal rat testes subjected to various durations of spermatic cord torsion. *Androl* 7: 23-31, 1986
49. Xu YM, Wu p, Cai PC, Cheng ZC: Replantation of the testis: Report of a case. *J Urol* 139:596-8, 1988
50. Akgür FM, Kılınc K, Aktuğ T, et al.: The effect of allopurinol pretreatment before detorting testicular torsion. *J Urol* 151:1715-7, 1994
51. Tsang TM, Bianchi A, Carneiro PMR, et al.: A study of warm testicular ischemia and paternity in rats. *Ped Surg. Int.* 8: 41-44, 1993
52. Pascual JA, Villanueva-Meyer J, Salido E, et al.: Recovery of testicular blood flow following ligation of testicular vessels. *J Urol* 142: 549-52, 1989
53. Kolbe a, Chen-Chih JS, Hill JL: Unpredictability of capsulotomy in testicular torsion. *J Ped Surg* 22:1105-9, 1987
54. Greenstein A, Smith-Harrison LI, Wakely PE, et al.: The effect of polyethylene glycol-superoxide dismutase administration on histological damage following spermatic cord torsion. *J Urol* 148: 639-41, 1992
55. Chakraborty J, Hikim APS, Jhunjhunwala JS: Stagnation of blood in the microvasculature of the affected and contralateral testes of men with short-term torsion of the spermatic cord. *Androl* 6: 291-299, 1985
56. Cosentino MJ, Rabinowitz R, Valvo JR, et al.: The effect of prepubertal spermatic cord torsion on subsequent fertility in rats. *Androl* 5: 93-98, 1984
57. Heindel RM, Pakyz RE, Reinking LN, et al.: The effect of various degrees of unilateral spermatic cord torsion on fertility in the rat. *J Urol* 144:366-9, 1990
58. Costabile RA, Choyke L, Frank JA, et al.: Variability of ischemia during spermatic cord torsion in the rat. *J Urol* 151:1070-2, 1994
59. Stern JA, Lui RC, Lakegma MC, et al.: Long-term outcome following testicular ischemia in the rat. *J Androl* 11:390-5, 1990

60. Bergh A, Damber JE, Marklund SL: Morphologic changes induced by short-term ischemia in the rat testis are not affected by treatment with superoxide dismutase and catalase. *J Androl* 9: 15-20, 1988
61. Fuse H, Tsuritani S, Iwasaki M, et al.: Experimental testicular ischemia: Time course of the effect on rat spermatogenesis. *Int Urol Nephrol* 25:491-8, 1993
62. Nakagawa H, Imai T, Okuda Y, et al.: Microsurgical autotransplantation of abdominal testis. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 83:1898-901, 1992
63. Schwaiger R, Stief C, Ziegler M: Animal experimental studies on improving ischemia tolerance of the testis. *Urologe* 25:174-8, 1986
64. Shiohvilli TI: Bilateral abdominal cryptorchidism in males: autotransplantation of the testis. *Eur Urol* 11:386-7, 1985
65. van Vliet J, Dijkstra G, de Rooij DG, et al.: Repeated interruptions of the testicular blood flow do not have long term effects on spermatogenesis in the ram. *Androl* 25:245-9, 1993
66. Boyarsky S: Scrotal cooling and testicular torsion *J Urol* 141:960, 1989
67. Buchan A: Advances in cerebral ischemia: experimental approaches. *Neurol Clin* 10:49-61, 1992