

TORSİYONE RAT TESTİSİNDE GELİŞEN İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINDA PENTOKSİFİLİNİN ANTİOKSİDAN ETKİSİ

ANTIOXIDANT EFFECT OF PENTOXIFYLLINE IN ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY IN TORSIONED RAT TESTES

GÜRDAL M.*, TEKİN A.*, EROL A.**, ONMUŞ H.***, KONUKOĞLU D.****, ŞENGÖR F.*

* Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, İSTANBUL

** İzzet Baysal Üniversitesi Düzce Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, BOLU

*** İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, MALATYA

**** İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, İSTANBUL

ÖZET

Bu çalışmada, pentoksifilinin torsiyone testiste detorsiyon sonrası serbest oksijen radikalleri oluşumunu azaltıcı ve doku hasarını önleyici etkisini, deneysel bir model olarak ratlarda araştırdık.

Toplam 21 Wistar Albino rat 3 gruba ayrıldı: sham (5), iskemik kontrol (8) ve pentoksifilin (8). İskemik kontrol ve pentoksifilin gruplarındaki ratların sol testisleri bir saat süreyle 720° torsiyone edildi ve bunu izleyen iki saat boyunca reperfüze edildi. Pentoksifilin grubuna torsiyonun son 15 dakikasında intraperitoneal olarak 25 mg/kg pentoksifilin uygulandı. Daha sonra tüm ratlara bilateral orşiyektomi yapıldı. Testis doku örnekleri histopatolojik değişiklikler ve serbest oksijen radikalleri açısından incelendi. Doku serbest oksijen radikalleri oluşumu, son ürün malondialdehit doku düzeyinin kantitatif ölçümü ile belirlendi.

Histopatolojik incelemede tüm torsiyonlu testislerde primer spermatositlerde iskemik değişiklikler gözlemlendi. Ancak, iskemik kontrol grubunda hücresel değişiklikler pentoksifilin grubuna göre daha şiddetli idi. Karşı taraf testislerde histopatolojik bulgular normal idi. Doku malondialdehit düzeyleri iskemik kontrol grubu torsiyonlu testisinde, pentoksifilin grubu torsiyonlu testisine ve diğerlerine göre istatistiksel olarak daha yüksekti. Pentoksifilin grubu torsiyonlu testis doku malondialdehit düzeyleri karşı testis ve sham grubuna göre istatistiksel olarak farklı değildi.

Bu bulgular, testis torsiyonunda pentoksifilinin detorsiyon sonrası testis dokusunda serbest oksijen radikalleri oluşumunu azalttığını ve reperfüzyon hasarından koruyucu etkiye sahip olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Serbest oksijen radikalleri, malondialdehid, testis, testiküler torsiyon, pentoksifilin

ABSTRACT

In this study we investigated the preventive effect of pentoxifylline against the formation of oxygen free radicals (OFRs) and tissue damage in torsioned testes in rats as an experimental model.

A total of 21 Wistar albino rats were divided into three groups: sham (5), ischemic control (8) and pentoxifylline (8). In ischemic control and pentoxifylline groups a 720° torsion was made for one hour followed by reperfusion for the next two hours. In pentoxifylline group 25mg/kg pentoxifylline was administered intraperitoneally 15 min before the finish of reperfusion. Then, bilateral orchietomy was done in all rats. Testicular tissue samples were examined for histopathologic changes and OFRs formation. Tissue OFRs was determined by quantitative measurement of tissue malodialdehyde, an end product of OFRs reactions in the tissue.

At histopathologic examination ischaemic changes in primary spermatocytes were noted in all torsioned testes. However, cellular damage was more severe in ischemic controls than pentoxifylline group. Opposite testes were normal. Tissue malodialdehyde levels were statistically higher in torsioned testes in ischemic controls than all other testes. malodialdehyde levels in torsioned testes in pentoxifylline group were not statistically different from opposite testes and sham group.

The results demonstrate that pentoxifylline treatment is able to decrease the formation of FOR in torsioned testes and may have a preventive effect against reperfusion injury.

Key Words: Oxygen free radicals, malondialdehyde, testes, testicular torsion, pentoxifylline

GİRİŞ

Testis torsiyonu, puberte döneminde daha yaygın olmakla birlikte her yaşta gözlenebilen, torsiyonun derecesi ve süresi arttıkça testiküler fonksiyonlarda bozulmaya yol açan, bir acil ürolojik problemidir^{1,2}. Torsiyon sonrası testiküler hasarın gelişmesinde iskemi ve bunu izleyen reperfüzyon sırasında ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin (SOR) etkili olduğu bilinmektedir³⁻⁶. Serbest oksijen radikalleri hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna yol açarak proteinleri denatüre eder ve hücre harabiyetine neden olur⁷. Bu harabiyeti süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi endojen antioksidanlar azaltmaktadır⁷. Ayrıca deneysel olarak kalsiyum kanal blokerleri, allopurinol, polietilen glikol-süperoksit dismutaz, trimetazin gibi ajanların da torsiyon sonrası testiküler hasarı korumada antioksidan olarak etkili oldukları gösterilmiştir³⁻⁶. Pentoksifilin de kapiller yatakta kan akımını artırıcı özelliği ve antioksidan etkisi gösterilmiş bir ajan olmasına⁸⁻¹⁰ karşın bizim bilgilerimize göre daha önce testis torsiyonunda hiç araştırılmamıştır. Bu çalışmada, pentoksifilinin tek taraflı testis torsiyonu oluşturulan ratlarda iskemi-reperfüzyon hasarından koruyucu etkisi araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada toplam 21 adet ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen erkek Wistar-Albino rat kullanıldı. Ratlar 3 gruba ayrıldı: grup 1: sham (n=5), grup 2: iskemik kontrol (n=8) ve grup 3: pentoksifilin (n=8). Tüm cerrahi işlemler tek doz intraperitoneal 30 mg/kg ketamin anestezisi altında ve skrotal orta hat insizyonu ile gerçekleştirildi. Sham operasyonu yapılan ratlarda tunika vajinalis açılıp testisler serbestlendikten sonra torsiyon yapılmadan ipek sütürlere tunika albugineadan geçilerek skrotuma tespit edildi. Grup 2 ve grup 3'teki tüm ratlarda sol testisler saat yönünde 720° torsiyone edildikten sonra skrotuma 1 saat süreyle tespit edildi. Daha sonra 2 saat süreyle detorsiyone edilerek reperfüzyon sağlandı. Sadece grup 3'e torsiyonun son 15 dakikasınca 25 mg/kg pentoksifilin intraperitoneal olarak enjekte edildi. Bu işlemlerden sonra tüm ratlara bilateral orşiektomi uygulandı. Testis materyalinin yarısı, serbest oksijen radikallerinin yarattığı hasarın dolaylı göstergesi olan malondialdehit doku düzeyinin belirlenmesi için sıvı nitrojenle

dondurularak -70 C° saklanmak üzere fikse edildi. Diğer kısmı ise histopatolojik olarak incelemek amacıyla Bouin solüsyonu içinde 24 saat süreyle tespit edildi. Parafin bloklardan hazırlanan kesitler hematoksilin-eozin (HE) ile boyandı. Dokudaki morfolojik değişiklikler ışık mikroskopuyla değerlendirildi. Doku malondialdehit düzeyleri Buege ve Aust'un tribarbitürik asit reaksiyonu yöntemine göre ölçüldü¹¹. Doku proteinleri ölçümü Lowry ve arkadaşlarının yöntemine göre yapıldı¹². Doku malondialdehit düzeyi mg protein başına nmol (mg/nmol) olarak belirlendi.

İstatistiksel inceleme: Sonuçlar ortanca± standart sapma (SD) olarak belirtildi. Üç grup ortancaları Kruskal Wallis tek yönlü varyans analizi ile karşılaştırıldı. *Post hoc* karşılaştırma, istatistiksel p değeri 0.05:3 = 0.017 olarak kabul edilerek Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirildi. İki grup karşılaştırmaları 0.05 yanılma düzeyi ile Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

Tüm grupların sağ ve sol testis doku malondialdehit düzeyleri tablo 1'de görülmektedir. Doku malondialdehit düzeyleri iskemik kontrol grubu torsiyonlu testislerinde karşı testislere ve diğer gruplara göre istatistiksel olarak daha yüksek idi (p=0.02). Torsiyonlu testisler ile karşı testisler arasında doku malondialdehit düzeyleri iskemik kontrol ve pentoksifilin gruplarında farklı bulunmadı. İskemik kontrol grubu için bu fark daha belirgin ve istatistiksel olarak önemli iken (p=0.03), pentoksifilin grubunda iki testis arasındaki fark daha az ve istatistiksel olarak önemli değildi (p=0.37). Her iki grupta karşı testisler doku malondialdehit düzeyleri açısından sham grubu ile istatistiksel olarak farklı değildi. Ayrıca, pentoksifilin grubu torsiyonlu testisleri ve sham grubu arasındaki doku malondialdehit düzeyi farkı istatistiksel olarak önemli değildi (p = 0.21).

Histopatolojik olarak her iki grup torsiyone testislerde iskemi bulgusu olarak yaygın nekrozlar izlenmemekle birlikte erken dönem iskemik değişiklikler olarak primer spermatositlerde nükleuslarda dejeneratif değişiklikler gözlemlendi. İskemik kontrol grubunda torsiyonlu testiste hücre değişiklikleri daha belirgin olup spermatidlerde multinükleer görünüm saptandı. Karşı taraf testislerde ise herhangi bir değişiklik gözlemlenmedi.

Torsiyonlu testislerde ve karşı testislerde Sertoli ve Leydig hücrelerinde histopatolojik değişiklik mevcut değildi.

Grup	Ortanca $\pm$ SD (nmol/mg)
Sham (n = 5)	
Sağ testis	0.48 $\pm$ 0.10
Sol testis	0.45 $\pm$ 0.09
İskemik kontrol (n = 8)	
Sol testis (torsiyon)	0.88 $\pm$ 0.21
Sağ testis	0.56 $\pm$ 0.15
Pentoksifilin (n = 8)	
Sol testis (torsiyon)	0.61 $\pm$ 0.16
Sağ testis	0.51 $\pm$ 0.11

Tablo 1. Doku malondialdehit düzeyleri

TARTIŞMA

Serbest oksijen radikalleri moleküler oksijenden türemiş, dış elektron halkalarında tek elektron olan, kimyasal olarak oldukça reaktif maddelerdir⁷. Organizmada enzimatik reaksiyonların bir parçasını oluştururlar ve oksidasyon olayının bir ürünü olarak ortaya çıkarlar. Normal sağlıklı hücrelerde SOR sürekli oluşmaktadır. Süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil gibi serbest oksijen radikalleri hücre membranı yapısındaki lipidlerin peroksidasyonuna yol açarak hücre bütünlüğünün bozulmasına neden olur³⁻⁶. SOR, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi endojen antioksidan enzimler tarafından ortadan kaldırılır⁷. Fakat hipoksik ortamlarda SOR normal dışı artarak hücre ölümüne neden olabilirler^{3,7}. Bu nedenle SOR yaşlanma, ateroskleroz, katarakt, musküler inflamasyon, akut respiratuvar distress sendromu, travma, serebral bozukluklar, renal allograft atılımı, diyabetik retinopati, gastrik ülser gibi birçok patofizyolojik durumda önemli rol oynamaktadır¹³. Serbest oksijen radikalleri kısa ömürlü oldukları için doğrudan ölçümleri zordur. Bu nedenle, doku araştırmalarında malondialdehit ya da konjuge dien düzeyi gibi lipid peroksidasyon ürünleri, katalaz, süperoksit dismutaz gibi endojen antioksidanlar, vit-E ve indirgenmiş glutatyon düzeyi gibi dolaylı yöntemler uygulanmaktadır^{6,13}. Malondialdehit lipid peroksidasyonunun son ürünü olması açısından, SOR tarafından oluşan lipid peroksidasyonunun güvenilir bir göstergesidir¹¹.

Testis torsiyonunu takiben testiküler hasarın gelişmesinde iskemi ve reperfüzyon olmak üzere iki süreç vardır. Reperfüzyon hasarı, iskemiye takiben kan akımının geri dönüşüyle hipoksik ortamda açığa çıkan toksik SOR'lerine bağlıdır. İskemi sonrası dokuda SOR'nin bir kaynağı hipoksantin-ksantin oksidaz reaksiyonudur^{3,7}. İskemiyle ATP'deki bozulma (degradasyon) sonucu hücre içi hipoksantin artar. Reperfüzyon sırasında oksijen geldiğinde ksantin oksidaz enzimi hipoksantini ürik asit ve süperoksit radikallerine çevirir³. Diğer SOR kaynağı ise iskemi sırasında nötrofiller içine kalsiyum girişi olur, hücrede NADPH oksidaz aktivitesi artar ve hücre membranına bağlanarak oksijeni süperoksit anyonuna çevirir³.

Pentoksifilin metilksantin türevi non-spesifik bir fosfodiesteraz inhibitörüdür. Eritrosit fleksibilitesini artırarak ve trombosit agregasyonunu inhibe ederek kan viskozitesini arttırır. Dolayısıyla kapiller kan akımı artışına ve doku oksijenasyonuna neden olur⁸. Ayrıca spermelerde hücre içi c-AMP düzeyini arttırarak ve reaktif oksijen radikallerini azaltıp antioksidan etki göstererek spermelerin ömrünün uzamasına ve motilite artışına neden olmaktadır^{9,10}. Rat barsağı ile yapılan bir çalışmada, iskemi-reperfüzyon hasarının önlenmesinde pentoksifilinin ksantin oksidaz enzimini inhibe ederek antioksidan olarak etki ettiği gösterilmiştir⁸. Bizim bilgilerimize göre pentoksifilinin testis torsiyonundaki iskemi-reperfüzyon hasarına etkisi ile ilgili ilk yayınlanan araştırma bizim çalışmamızdır.

Oluşturulan bir saatlik torsiyon ve iki saatlik reperfüzyon sonrası dokularda malondialdehit düzeylerindeki artış lipid peroksidasyonundaki artışı, dolayısıyla SOR'nin arttığını göstermektedir. Yapılan çalışmalarda reperfüzyon hasarının gelişmesi için bir, üç veya beş saat süreli 720° uygulanacak torsiyonun yeterli olduğu, altı saat ten daha uzun süreli torsiyonlarda reperfüzyon hasarının gelişmediği bildirilmektedir⁴. Ayrıca 360°'lik torsiyonda fertilitenin etkilenmediği, 720° ve üzerindeki torsiyonlarda etkilendiği gösterilmiştir¹⁴. Bizim çalışmamızda bir saat boyunca 720° uygulanan torsiyon sonrası pentoksifilin verilen ratlarda malondialdehit düzeylerinin iskemik kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunması pentoksifilinin antioksidan olarak

etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Ancak, histopatolojik değişikliklerin gelişmesi için gereken süre ve verilen maddenin iyileşme sürecinde etkili olup olmadığı konusunda tam bir fikir birliği yoktur. Bazı araştırmacılar histopatolojik hasarın gelişmesi ve antioksidan etkinliğin değerlendirilmesi için en az 15 gün sürenin geçmesi gerektiğini belirtse de, 3 saatlik torsiyon sonrası 14. günde histolojik hasarın geliştiğini ve hasarın bu sürede uzun etkili polietilen glikol süperoksit dismutaz ile dahi önlenemediği belirten yazarlar da vardır^{3,5}. Bizim çalışmamızda iki saatlik reperfüzyonu takiben yapılan erken dönem orşiektomi sonrası histopatolojik incelemede erken iske-mi bulguları izlenmiştir. Histopatolojik bulgular erken dönemde petoksifilinin antioksidan etkisinin başladığını düşündürmüştür.

Tek taraflı testis torsiyonunun karşı taraf testis dokusunu etkileyip etkilemediği halen tartışmalı bir konudur. Yapılan iske-mi-reperfüzyon çalışmalarında karşı taraf testis dokusunda serbest oksijen radikallerinin iskemik olan taraf kadar olmasa da arttığı gösterilmiştir¹⁵. Fakat yapılan histolojik çalışmalarda değişikliklerin torsiyonun derecesi ve süresiyle orantılı olduğu belirtildiği gibi, bu histolojik değişikliklerin zeminde var olan doğumsal patolojilere ait olduğunu vurgulayan yazarlar da vardır^{16,17}. Bizim çalışmamızda hem malondialdehit düzeyleri hem de histopatolojik olarak belirgin değişiklik saptanmamıştır.

Bu deneysel çalışma, testis torsiyonu sırasında pentoksifilin tedavisinin, reperfüzyon sürecinde doku SOR miktarını azaltıcı, diğer bir deyişle antioksidan etki gösterdiğini kanıtlamaktadır. Bulgularımız, pentoksifilinin gözlenebilir hücresel değişikliklerini de azalttığını düşündürmekle birlikte, histopatolojik değerlendirme süresinin kısa olması bu konuda kesin bir yoruma ulaşmayı engellemektedir.

KAYNAKLAR

- 1- **Rabinowitz R, Hulbert WC:** Acute scrotal swelling. *Urol Clin North Am.* 22: 101-105, 1995
- 2- **Anderson JB, Williams RC:** Fertility after torsion of spermatic cord. *Br J Urol* 65: 225-230, 1990
- 3- **Prillaman HM, Turner TT:** Rescue of testicular function after acute experimental torsion. *J Urol.* 157: 340-345, 1997
- 4- **Akgür FM, Kılınç K, Aktuğ T, et al:** The effect of allopurinol pretreatment before detorting testicular torsion. *J Urol.* 151: 1715-1717, 1994
- 5- **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: 639-641, 1992
- 6- **Aybek Z, Demirkan N, Aybek H, et al:** Deney-sel testis torsiyonu sonucunda gelişen iskemi-reperfüzyon hasarında trimetazidinin etkisi. *Üroloji Bülteni.* 9: 67-71, 1998
- 7- **McCord JM:** Oxygen free radicals in postischemic tissue injury. *New Eng J Med.* 312: 159-163, 1985
- 8- **Hammerman C, Goldschmidt D, Caplan MS, et al:** Amelioration of ischemia-reperfusion injury in rat pentoxifylline-mediated inhibition of xanthine oxidase. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 29: 69-74, 1999
- 9- **Drobnis EZ:** Treating the sperm: Selection, stimulation, and cryopreservation techniques. *Hellstrom WJG (ed): Male infertility and sexual dysfunction.* 54-82, 1997
- 10- **Gavella M, Lipovac V, Marotti T:** Effect of pentoxifylline on superoxide anion production by human sperm. *Int J Androl.* 14: 320-327, 1991
- 11- **Buege JA, Aust SD:** Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymology.* 52: 302-310, 1978
- 12- **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr A, et al:** Protein measurement with the folin phenole reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275, 1951
- 13- **Erol U, Gürdal M, Erol A, et al:** Is midazolam effective as an antioxidant in preventing reperfusion injury in rat kidney? *Int Urol Nephrol.* (basımda)
- 14- **Heindel RM, Pakyz RE, RE, Reinking LN, et al:** The effect of various degrees of unilateral spermatic cord torsion on fertility in the rat. *J Urol.* 144: 366-369, 1990
- 15- **Akgür F, Kılınç K, Aktuğ T:** Reperfusion injury after detorsion of unilateral testicular torsion. *Urol Res.* 21: 395-399, 1993
- 16- **Hadziselimovic F, Synder H, Duckett J, et al:** Testicular histology in children with unilateral testicular torsion. *J Urol.* 136: 208-210, 1986
- 17- **Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R, et al:** Histopathological changes occurring in the contralateral testis of prepubertal rats subjected to various durations of unilateral spermatic cord torsion. *J Urol.* 133: 906-911, 1985