



T.C

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

**İSKEMİK ÖNKOŞULLAMANIN SIÇAN TESTİSİNİN İSKEMİ VE
REPERFÜZYON YARALANMASI ÜZERİNE ETKİSİ:
5-HİDROKSİDEKONAİK ASİT VE Y-27632’NİN ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. S. Ahmet GÖZEN

ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Haluk CEYLAN

Ocak 2012

T.C
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

İSKEMİK ÖNKOŞULLAMANIN SIÇAN TESTİSİNİN İSKEMİ VE
REPERFÜZYON YARALANMASI ÜZERİNE ETKİSİ:
5-HİDROKSİDEKONAİK ASİT VE Y-27632’NİN ROLÜ

UZMANLIK TEZİ
Dr. S. Ahmet GÖZEN
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Haluk CEYLAN

Ocak 2012

TEZ ONAY SAYFASI

**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

TEZ ADI:

**İSKEMİK ÖNKOŞULLAMANIN SIÇAN TESTİSİNİN İSKEMİ VE REPERFÜZYON YARALANMASI ÜZERİNE
ETKİSİ : 5 - HİDRSOKSİDEKANOİK ASİT VE Y-27632' NİN ROLÜ**

**Dr. Ahmet GÖZEN
12.01.2012**

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı

**Prof.Dr. Abdurrahman KADAYIFÇI
Tıp Fakültesi Dekanı**

Bu tez çalışmasının “Tıpta Uzmanlık” derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

**Prof. Dr. Bülent Hayri ÖZOKUTAN
Anabilim Dalı Başkanı**

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile “Tıpta Uzmanlık” tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

**Prof.Dr Haluk CEYLAN
Tez Danışmanı**

TEZ JÜRİSİ:

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.

I. ÖNSÖZ

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahi Anabilim Dalı'nda sürdürdüğüm uzmanlık eğitimim süresince ve yaptığım çalışmalarında her zaman destek ve katkılarını esirgemeyen, tezimin konusunu belirleyen başta tez danışmanım kıymetli hocam Prof. Dr. Haluk CEYLAN'a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım. Hiçbir konuda desteklerini esirgemeyerek beni teşvik edip yönlendiren Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Bülent Hayri ÖZOKUTAN'a teşekkürlerimi sunarım. Tezimin şekillenmesinde bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım sayın Prof. Dr. Nurten AKSOY'a, sayın Prof Dr. Abdullah AYDIN'a ve sayın Doç. Dr. Harun ÇARIKLI'ya en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Çalışmada desteğini esirgemeyen değerli meslektaşım sayın Y. Doç Dr. Şeniz DEMİRYÜREK'e teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlık eğitimim süresince klinikteki çalışmalarında hep yanımda olup, bana destek olan Çocuk Cerrahi Kliniği'nin değerli asistanları, Dr Sefa YAPICI, Dr Sedat SIMSIK, Dr Filiz GÜNDÜZ' e, hemşire ve personellerine ayrıca teşekkür ederim.

Asistanlık eğitimim süresince her türlü destek ve katkılarını esirgemeyen, sevgili eşim Olcay Hanım'a ve onlara vakit ayıramamanın üzüntüsünü derinlerde hissettiğim canım evlatlarım Tilda, Mahir ve İbrahim'e, desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen anneme, babama ve kardeşlerime teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Dr. S. Ahmet GÖZEN
Gaziantep
2012

II. İÇİNDEKİLER

	Sayfa
I. ÖNSÖZ	I
II. İÇİNDEKİLER	II
III. ÖZET	IV
IV. ABSTRACT	V
V. KISALTMALAR	VI
VI. TABLO LİSTESİ	VIII
VII. ŞEKİL LİSTESİ	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. TESTİS ANATOMİSİ	3
2.2. TESTİS HİSTOLOJİSİ	4
2.2.1. İNTERSTİSYEL DOKU	4
2.2.2. SEMİNİFER TÜBÜLLER	4
2.3. TESTİS TORSİYONU	5
2.3.1. EKSTRAVAGİAL TESTİS TORSİYONU	6
2.3.2. İNTRAVAGİNAL TESTİS TORSİYONU	6
2.4. İSKEMİ VE REPERFÜZYON HASARI	7
2.4.1. AKUT HÜCRE ZEDELENMESİNİN NEDENLERİ	7
2.4.1.1. GERİ DÖNÜŞÜMLÜ ZEDELENME	7
2.4.1.2. GERİ DÖNÜŞÜMSÜZ ZEDELENME	8
2.4.2. REPERFÜZYON HASARININ PATOFİZYOLOJİSİ	9
2.5. SERBEST RADİKALLER	10
2.5.1. SERBEST RADİKAL KAYNAKLARI	10
2.5.2. LİPİD PEROKSİDASYONU	11
2.5.3. ANTİOKSİDANLAR	12
2.6. İSKEMİK ÖNKOŞULLAMA	12
2.6.1. İSKEMİK ÖNKOŞULLAMANIN ETKİ MEKANİZMASI	13
2.6.1.1. ADENOZİN	16
2.6.1.2. BRADİKİNİN	17
2.6.1.3. OPOİDLER	18
2.6.1.4. REAKTİF OKSİJEN TURLERİ	18
2.7. 5- HİDROKSİDEKANOİK ASİT	20
2.8. Y 27632	20
3. MATERYAL VE METOD	23
3.1. DENEY HAYVANLARI	23
3.2. DENEY PROTOKOLÜ	23

3.3. HİSTOPATOLOJİK İNCELEMELER	25
3.4. BİYOKİMYASAL İNCELEMELER	26
3.4.1. DOKU HOMOJENİZASYONU	26
3.4.2. MYELOPEROKSİDAZ ÖLÇÜMÜ	26
3.4.3. LİPİT PEROKSİT ÖLÇÜMÜ	27
3.4.4. TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE DÜZEYİ ÖLÇÜMÜ	27
3.4.5. TOPLAM OKSİDATİF DÜZEY ÖLÇÜMÜ	27
3.4.6. OKSİDATİF STRES İNDEKSİ ÖLÇÜMÜ	27
3. 4. 7. MİKROPROTEİN ÖLÇÜMÜ	27
3. 5. İSTATİKSEL DEĞERLENDİRME	28
4. BULGULAR	29
4.1. HİSTOPATOLOJİ	29
4.2. BİYOKİMYA	29
5. TARTIŞMA	35
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	41
7. KAYNAKLAR	42

III. ÖZET

İSKEMİK ÖNKOŞULLAMANIN SIÇAN TESTİSİNİN İSKEMİ VE REPERFÜZYON YARALANMASI ÜZERİNE ETKİSİ: 5-HİDROKSİDEKANOİK ASİT VE Y-27632’NİN ROLÜ

Dr. S. Ahmet GÖZEN
Uzmanlık Tezi, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı
Tez danışmanı: Prof. Dr. Haluk CEYLAN
Ocak 2012, 53 sayfa

ÖZET

Amaç: Testisin torsiyon ve detorsiyonu organında iskemi-reperfüzyon (İR) yaralanmasına yol açar. Kısa süreli iskemik periyotların, daha uzun süreli iskemik dönemlerde organ, doku ve hücrelerde nekroz gelişmesine karşı belirgin bir direnç oluşturması iskemik önkoşullama olarak adlandırılır. Bu çalışma iskemik önkoşullamanın sıçan testisinin İR yaralanması üzerindeki etkilerini ve selektif bir K_{ATP} kanal inhibitörü olan 5-hidroksi dekanolik asit (5-HD) ve selektif bir Rho kinaz inhibitörü olan Y-27632’nin testisin iskemik önkoşullamasındaki rolünü araştırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Gereç ve yöntem: Testis iskemisi testis pedikülünün bir atarvamatik damar klipsi ile geçici olarak tutularak oluşturuldu. Testisin İR hasarı organın 180 dk iskemisi ve ardından 60 dk reperfüzyonuyla gerçekleştirildi. İskemik önkoşullamanın her bir siklüsü testisin 5 dk iskemi ve 5 dk reperfüzyonuyla gerçekleştirildi. Kırk erkek Wistar albino türü sıçan 5 eşit gruba ayrıldı. Deneyler sağ testis üzerinde gerçekleştirildi. Grup 1’de yalnızca sham operasyonu yapıldı. Grup 2’de yer alan sıçanlarda yalnızca testis İR uygulandı. Grup 3’te İR öncesi testiste 3 siklüsle iskemik önkoşullama yapıldı. Grup 4 ve grup 5’de yer alan deneklere iskemik önkoşullama ve İR öncesi sırasıyla 0.3 mg/kg Y-27632 ve 10 mg/kg 5-HD intraperitoneal yoldan verildi. Deney sonunda hayvanlar öldürüldü ve testis dokusu histopatolojik ve biyokimyasal incelemeler için alındı. Dokular histopatolojik olarak germinal epitelin incelenmesiyle yapılan modifiye Johnson skoru (MJS) ile değerlendirildi. Biyokimyasal incelemelerde lipidperoksit (LOOH) düzeyi, myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi, toplam antioksidatif kapasite (TAK), toplam oksidatif seviye (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSİ) ölçüldü.

Sonuçlar: İR hasarı, sıçan testisinde spermatozoaların, spermatid ve geç spermatidlerin kaybı gibi histopatolojik lezyonlara yol açarak MJS’nin sham grubuna göre anlamlı olarak düşmesinin yanısıra, LOOH düzeyinde ve MPO aktivitesinde yükselmeye, TAK, TOS ve OSİ’de anlamlı artışa neden oldu. İR hasarı öncesinde uygulanan iskemik önkoşullama MJS’de anlamlı yükselme ve MDA, MPO, TAK, TOS ve OSİ değerlerinde anlamlı düşme meydana getirdi. Grup 3 ile karşılaştırıldığında Y-27632 tedavisi MPO aktivitesindeki anlamlı azalma dışında MJS ve çalışılan diğer parametrelerde anlamlı değişikliğe yol açmadı. 5HD tedavisi uygulanan grup, grup 3 ile karşılaştırıldığında, MJS anlamlı olarak düşük, TOS dışında çalışılan biyokimyasal parametreler anlamlı olarak yüksek bulundu.

Yorum: Bu çalışmada uygulanan iskemik önkoşullama, sıçan testisinde İR’nin yol açtığı doku zedelenmesi üzerinde olumlu etki göstermiştir. Bu olumlu etkinin 5-HD uygulamasından sonra anlamlı olarak azalması, K_{ATP} kanallarının testisin iskemik önkoşullamasının oluşum mekanizmasında rolü olduğunu göstermiştir. Y-27632 tedavisi iskemik önkoşullamanın etkilerini değiştirmemiştir.

ANAHTAR KELİMELER: İskemik önkoşullama, testis, sıçan, Y-27632, 5-hidroksi dekanolik asit

IV. ABSTRACT

PROTECTIVE ROLE OF ISCHEMIC PRECONDITIONING ON RAT TESTICULAR ISCHEMIA: EFFECTS OF Y-27632 AND 5-HYDROXYDECANOIC ACID

S. Ahmet GÖZEN

Resident thesis, Department of Pediatric Surgery, Faculty of Medicine,
University of Gaziantep

Supervisor: Prof. Dr. Haluk CEYLAN

January 2012, 53 pages

ABSTRACT

Background/purpose: Torsion and detorsion of testis results in an ischemia/reperfusion (I/R) induced injury to the testis. Brief periods of ischemia with intermittent reperfusion protect an organ or tissue against a sustained period of subsequent ischemia. This phenomenon is known as ischemic preconditioning (IPC). This study was undertaken to determine the role of IPC on I/R-induced injury of rat testis. Furthermore, the effects of 5-hydroxydecanoic acid (5-HD), a selective K_{ATP} channel antagonist, and Y-27632, a selective Rho kinase inhibitor, on testis IPC was investigated.

Methods: Ischemia was achieved by clamping of the testicular pedicle using a vessel clip. I/R injury was created by 180 min ischemia and 60 min reperfusion of the testis. One cycle IPC was created by 5 min transient ischemia of the testis that was followed by 5 min reperfusion. Forty male adult Wistar albino rats were randomly allocated into 4 groups. Group 1 was served as untreated controls. The rats in Group 2 were subjected to I/R only. In group 3, 3 cycles of IPC performed prior to I/R. In groups 4 and 5, the rats were treated with intraperitoneal (i.p.) injection of 0.3 mg/kg Y-27632 and 10 mg/kg i.p. injection of 5-HD before 3 cycles of IPC that is followed by I/R. The rats were killed at the end of experimental protocols. Testis specimens were isolated for histopathology and biochemical investigation. Germinal epithelium was evaluated by the modified Johnson scoring (MJS) method. Biochemical analyses consisted of evaluation of tissue lipid peroxide (LOOH) levels, myeloperoxidase (MPO) activity, and total antioxidative capacity (TAC), total oxidative status (TOS) and oxidative stress index (OSI).

Results: I/R lead to severe histopathological lesions in the rat testis such as vanishing of spermatozoa, spermatids and late spermatids, and significantly lowered the MJS when compared to untreated controls. I/R resulted in significant elevation in LOOH levels, MPO activity, and TAC, TOS and OSI levels. Protective effects of IPC on I/R induced testicular injury of rats were observed with the significant elevation in the testicular injury score, suppression in MDA and MPO levels and increase in TAC, TOS and OSI. Y-27632 treatment only lead a significant decrease in MPO activity but there was no significant change in the remaining parameters when compared to group 3. 5-HD injection significantly depressed MJS and significantly increased all biochemical parameters, but TAC level, when compared to group 3.

Conclusion: IPC protected rat testis against I/R-induced injury. As this effect is blocked by 5-HD, K_{ATP} channel appears to be a mediator of IPC in the rat testis. Y-27632 did not alter the effect of IPC in this experimental model.

KEYWORDS: Ischemic preconditioning, testis, rat, Y-27632, 5-hydroxydecanoic acid

V. KISALTMALAR

ADE:	Anjiotensin dönüştürücü enzim
AMP:	Adenozin monofosfat
ATP:	Adenozin trifosfat
AT1:	Anjiotensin 1
Ca:	Kalsiyum
CCL4:	Karbon tetra klorür
CGRP:	Kalsitonin genle ilişkili peptid
EDHF:	Endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktör
ET1:	Endotelin
HSP27:	Isı-şok proteini 27
İÖ:	İskemik Önkoşullama
İp:	İtraperitoneal
İR:	İskemi Reperfüzyon
KCL:	Potasyum Klorür
K-ATP:	Potasyum duyarlı adenozin trifosfat kanalı
LOOH:	Lipid hidroperoksit
L-NAME:	N-nitro L- arginin metil ester
MAPK:	Mitojenle aktive olan protein kinaz
MDA:	Malonil dialdehid
MitoKATP:	Mitokondriyal potasyum adenozin trifosfat kanalı
MJS:	Modifiye Johnson Skoru
MPG:	Merkaptopropiyonil glisin

MPO:	Miyeloperoksidaz
NO:	Nitrik oksit
OSİ:	Oksidatif stress indeksi
PKC:	Protein kinaz C
ROCK:	Rho-associated coiled coil forming protein serine/threonine kinase
SOD:	Süperoksid dismutaz
SOR:	Serbest oksijen radikalleri
TAK:	Total antioksidan kapasite
TOS:	Total oksidatif status
WBC:	Beyaz küre
XAC:	Ksantin amin sınıfı
5-HD:	5-hidroksidekanoik asid

VI. TABLO LİSTESİ

TABLO 1: SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ	SAYFA
TABLO 2: MODİFİYE JOHNSON SKORLAMASI	10
	26

VII. ŞEKİL LİSTESİ

	SAYFA
ŞEKİL 1: SIÇANIN DENEY MASASINDAKİ POZİSYONU.	24
ŞEKİL 2: SAĞ TESTİS VE PEDİKÜLÜ	24
ŞEKİL 3: İSKEMİ OLUŞTURMAK AMACIYLA SAĞ TESTİS PEDİKÜLÜNÜN KLAMPE EDİLMESİ	24
ŞEKİL 4: UYGULANAN DENEY PROTOKOLLERİ.	25
ŞEKİL 5: GRUPLARDA HİSTOPATOLOJİK SKORLAMA SONUÇLARI.	29
ŞEKİL 6: NORMAL SPERMATOGENEZİSİN İZLENDİĞİ SEMİNİFER TUBÜL	30
ŞEKİL 7: SPERMATOOZOA VE SPERMATİDİN İZLENMEDİĞİ ANCAK ÇOK SAYIDA SPERMATOSİTİN İZLENDİĞİ SEMİNİFER TUBUL	30
ŞEKİL 8: HAFİF BOZULMUŞ SPERMATOGENEZİS İLE BİRLİKTE EPİTELDE DÜZENSİZLİK İZLENEN SEMİNİFER TUBÜL	30
ŞEKİL 9: GRUPLARIN LİPİTPEROKSİT KONSANTRASYONLARI.	31
ŞEKİL 10: GRUPLARIN MPO DÜZEYLERİ.	32
ŞEKİL 11: GRUPLARIN TAS DÜZEYLERİ.	32
ŞEKİL 12: GRUPLARIN TOS DÜZEYLERİ.	33
ŞEKİL 13: OSİ SONUÇLARI.	34

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Spermatik kordun kendi eksenini etrafında dönmesi sonucunda, testis ve eklentilerinin kan akımının engellenmesi testis torsiyonu, olarak tanımlanır. Testis torsiyonu çocukluk çağı akut skrotum tablosuna yol açan önemli sebeplerden biridir ve (1) zamanında ve uygun tedavi edilmediği takdirde organ kaybıyla sonlanan ağır bir acil cerrahi problemdir. Spermatik kordun torsiyonu ile testis dolaşımı bozulur ve organda iskemik hasar oluşur. Bunu takiben gerçekleştirilen detorsiyon ile kanlanma yeniden sağlandığında reperfüzyon hasarı oluşabilir. İskemi ve reperfüzyon (İR) hasarı testis dokusunda yapısal ve biyokimyasal bir takım patolojik değişikliklerin ortaya çıkmasına neden olur. İR hasarının oluşmasından, reperfüzyon sırasında ortama salıverilen serbest oksijen radikallerinin (SOR) sorumlu olduğunu gösterilmiştir (2). SOR hücrenin yapısal elemanlarını bozarak zararlı etkilere yol açar. Çeşitli antioksidan tedavilerin organları İR hasarının zararlı etkilerinden koruduğu gösterilmiştir (3).

Bilindiği gibi bir organın kalıcı iskemisi bir süre sonra dokunun nekrozu ile sonlanır. İskemik önkoşullama, bir tek veya tekrarlayan kısa süreli iskemik periyotların, daha uzun süreli iskemik periyotlarda organ, doku ve hücrelerde nekroz gelişmesine karşı belirgin bir direnç oluşturmaya ile gerçekleşen koruyucu bir mekanizmadır. İskemik önkoşullamanın bu etkisi ilk kez kalp kasında gösterilmiştir (4). Bunu takip eden farklı yayınlarda iskemik önkoşullamanın santral sinir sistemi, karaciğer, barsak, endotel hücreler, retina, iskelet kası, akciğer ve böbrek gibi farklı organlarda da koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (5 - 9).

İskemik önkoşullama çalışmalarının bir amacında, önkoşullamanın koruyucu etkisini taklit eden farmakolojik ajanları keşfetmek ve gelecekte bunları iskemik hastalıkların tedavisi için klinik kullanıma sunmaktır. Farmakolojik önkoşullamayı incelemeye yönelik yapılan bir çalışmada sıçan kalp kasının iskemik durumunda Y-27632'nin iskemik önkoşullamanın koruyucu etkisini taklit ettiği ve iskemiye bağlı gelişen aritminin önlenmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (10). Rho kinaz RhoA, RhoB ve RhoC gibi Rho proteinlerinin enzimatik reaksiyonlarını katalize eder (11). Y-

27632 selektif bir Rho kinaz enzim inhibitörüdür ve enzimin ATP bağlayıcı bölgesiyle yarışmaya girerek etkinlik gösterir (12). Rho proteinleri Rho bağımlı kinaz ailesindendir ve aktin stres liflerinin oluşumu, miyozin fosfataz formlarını etkiler ve bu yolla esas olarak kalsiyum sensitizasyonu için gereklidir. Y-27632, Rho-kinaz miyozin bağlayıcı alt ünitesini doğrudan fosforile etmesini selektif olarak inhibe eder. Bunun sonucunda hipertansiyon, vazospazm, preterm doğum, bronşial astım, glokom ve ereksiyon disfonksiyonuna karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (13). Bunun yanı sıra yapılan çalışmalarda ATP duyarlı potasyum kanallarının (K_{ATP}) iskemik önkoşullamanın mekanizmasında etkileyici end-effector olarak görev aldığına dair bulgular vardır. K_{ATP} kanalları, hücre içi ATP konsantrasyonu düştüğünde açılarak potasyum çıkışına izin vermekte, bu ise aksiyon potansiyeli süresini kısaltarak kalsiyum girişini azaltmaktadır. Aksiyon potansiyelinin kısalarak kalsiyum girişinin azalması, enerjinin korunmasını sağlar ve iskemi sonucu oluşan osmotik şişmeyi azaltır (12, 13). K_{ATP} 'yi bloke eden 5-hidroksidekonoik asidin (5-HD) farklı organlardaiskemik önkoşullanma ile sağlanan koruyucu etkiyi engellediği açıkça gösterilmiştir (13)

Literatürde, iskemik önkoşullamanın testisin İR üzerindeki koruyucu etkisi ile ilgili yayınlanmış az sayıda araştırma vardır (14 - 16). Bu çalışmada iskemik önkoşullamanın testisin İR hasarı üzerindeki koruyucu etkisi ile Y-27632 ve 5-HD'nin bu etki üzerindeki rolünün araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TESTİSİN ANATOMİSİ

Erişkin bir erkeğin testisi yaklaşık 4x3.5x3 cm boyutlarında ve hacmi 30 ml kadardır. Testisin anterolateral 2/3 bölümü serbest iken, posterolateral yüzü epididim, bağ dokusu ve damarlarla örtülüdür. “Mediastinum testis” olarak isimlendirilen kranioposterior kısmından, seminal taşıyıcılar çıkar (17).

Testis, tunika albuginea adı verilen kompakt bağ dokusu ile çevrelenmiştir. Bu tabaka; fibroblastlar ve kollajenden yoğun bir yapıdadır. Tunika albuginea’nın altında nispeten daha gevşek bağ dokusu yapısında, tunika vaskulosa adı verilen damarsal bir tabaka yer alır. Tunika albuginea testisin arkasında kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Burada tunika albugineanın iç yüzünden çıkan fibröz septalar testisi yaklaşık 250 adet, piramit biçimli lobüllere ayırır. Herbir lobülün içinde bir ile dört arasında değişen sayıda kıvrımlı seminifer tübül bulunur. Seminifer tübüller ise rete testis diye isimlendirilen kanal ağına açılırlar. Tunika albuginea’nın üzerinde peritonun uzantısı olan tunika vaginalis yer almaktadır. Tunika vaginalis iki yapraklıdır. Anteriorda, testise yakın olan ve epididimi çevreleyen kısmına viseral tabaka, daha dışta yer alan kısmına ise paryetal tabaka adı verilir. Bunların da dışında sırasıyla, “fascia spermatica interna”, “musculus cremaster”, “fascia spermatica externa”, tunika dartos ve cilt yer alır (18).

Spermatik kord; duktus deferens, duktus deferensin arter ve veni, testiküler arter, plexus pampiniformis, plexus deferentialis, processus vaginalis peritonei, musculus cremaster, arteria cremasterica, vena cremasterica, lenf damarları, ilioinguinal sinir ve genitofemoral sinirin genital dallarından oluşur. Tüm bu oluşumlar birbirine gevşek bir bağ dokusuyla bağlanmış ve dıştan kas lifleri ile fascia spermatica externa, fascia cremasterica, fascia spermatica interna adı verilen zarlarla sarılmıştır (18). Testisin ana damarı aortanın ön yüzünden ve böbrek arterinin yaklaşık iki-üç cm altından çıkan testiküler arterdir. Bu damar iç kasık halkasına kadar retroperitoneumda ilerleyip spermatik kord yapıları arasına katılır. Tek veya dallara ayrılan testiküler arter, testis arka yüzüne ulaşarak oblik biçimde tunika albugineayı geçer. Sonra ana dallar bölünerek ilerler ve seminifer tübüller arasında yer alan interlobüler arteriollerini oluşturur. Ana damar testiküler arter olmasına karşın, kremasterik, vazal ve epididimal arterlerle testiküler arter arasında birçok anastomoz görülebilmektedir.

Testisin venöz drenajı kapiler ile başlar ve testis dışında plexus pampiniformisi meydana getirirler. Çoğunlukla iç kasık halkası seviyesinde bu venler birleşerek testiküler veni oluştururlar. Sağ testiküler ven, sağ böbrek veninin dört-beş cm kadar altından vena kava inferiora, sol testiküler ven ise sol böbrek venine açılır.

Testisin innervasyonu asıl olarak sempatik postganglionik ve visceral afferent sinirlerle olmaktadır. Sinirler genelde damarları takip ederek testise ulaşırlar. Tunika albuginea dışında dallara ayrılan sinirler interstisyuma kan damarları ile birlikte ulaşırlar.

Testis lenfatikleri, seminifer tübüller etrafında görülmeyen lenfatik kapilerlerle interlobüler septadan başlar. Daha sonra spermatik kordu takip ederek paraaortik, interaortokaval ve perikaval lenf düğümlerine açılırlar (17, 18).

2.2. TESTİS HİSTOLOJİSİ

2. 2. 1. İnterstisyel Doku

Testis dokusunun %25-30'unu oluşturur. İntertübüler bölgede Leydig hücreleri, kan damarları, lenfatikler, sinirler, makrofajlar ve mast hücreleri bulunur. Leydig hücreleri ergenlikte ortaya çıkarlar. Bunlar, santral konumlu, tek, yuvarlak bir çekirdeğe sahip, görevi testosteron üretimi olan hücrelerdir. Testosteron, kolesterolden sentezlenen, sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu hormondur. Testosteron salgılanması lüteinizan hormon kontrolündedir. Plazmada testosteronun %65'i androjen bağlayıcı protein olarak adlandırılan bir beta globuline, %33'ü ise albumine bağlı olarak bulunur (19).

Spermatogenez; hipofizden salgılanan folikül stimulan hormon ile lüteinizan hormonun testis üzerindeki etkileriyle ilişkilidir. Lüteinizan hormon, Leydig hücrelerine olan etkisiyle normal spermatogenik hücrelerin gelişimi için gerekli testosteron yapımını uyarır. Folikül stimulan hormon ise Sertoli hücrelerini etkileyerek adenilat siklazı ve sonuçta siklik adenozin monofosfat artışı uyarır. Böylece androjen bağlayıcı protein sentezi ve salgısı artar. Androjen bağlayıcı protein testosteronu bağlayarak seminifer tübül lümenine taşır. Spermatogenez testosteron ile uyarılır, östrojen ya da progesteronla inhibe edilir (19, 20).

2. 2. 2. Seminifer Tübüller

Testisin herbir lobülü birbirleri arasında ilişkileri olan bir-dört kadar seminifer tübül içerir. Bunlar, dışta miyoid hücreleri de içeren bağ dokunun çevrelediği, belirgin

bir bazal membran ile interstisyumdan ayrılırlar. Seminifer tübüller yaklaşık 30-70 cm uzunlukta olup Sertoli hücreleri ile germ hücrelerini içerirler. Erişkin testisindeki Sertoli hücreleri, bölünme yeteneği olmayan, seminifer tübülün bazal kısmından lümene doğru uzanan destek hücreleridir. Seminifer tübüllerin hücresel yapısının %10-15'ini oluştururlar. Çekirdekleri düzensiz şekilli ve oldukça büklümlüdür. Sertoli hücreleri, belirgin nükleolusları ile germ hücre elemanlarından ayrılır. Puberte çağında Sertoli hücreleri arasında sıkı bağlantı kompleksleri oluşur. Kan testis bariyerini oluşturan bu kompleksler, kandan gelen maddelerin lümen içerisine geçişini önler. Fagositöz kapasiteleri dışında bu hücreler; spermatogenezin düzenlenmesinde rol alan androjen bağlayıcı protein, transferrin, büyüme hormonu, seruloplazmin ve inhibin gibi pek çok maddenin sentezini de yaparlar (19).

Germ hücreleri insanda olgunlaşmasını 64 günde tamamlayan ve çoğalabilen hücrelerdir. Bazal membrana oturan spermatogoniumların bir kısmı (spermatogonium A) kök hücreleri oluştururken, bir kısmı da (spermatogonium B) mitoz ile bölünerek lümene doğru göç ederler ve primer spermatositlere dönüşürler. Bunlar mayoz bölünme ile sekonder spermatositleri oluştururlar. Sekonder spermatositler ikinci bir mayoz bölünme daha geçirerek haploid spermatidlere dönüşürler. Haploid spermatidler ise olgunlaşarak, spermatozoonları oluştururlar (21).

2.3. TESTİS TORSİYONU

Testis torsiyonu, spermatik kord yapılarının kendi eksenini etrafında dönmesi sonucu testis kan akımının bozulmasıdır. Klinikte testis torsiyonları 360 ile 720 derece arasında görülmektedir. Tedavi edilmezse testis dokusunda nekroz gelişir (1,22). Testis torsiyonu sıklığı 25 yaş altındaki erkekler için 1:4000 kadardır. Geç çocukluk ya da erken adolesan döneminde daha fazla görülür. Ancak antenatal ve yenidoğan dönemlerinde de oluşabilmektedir. Sıklık 13-16 yaş civarında en üst düzeye ulaşır. Bilateral testis torsiyonu, olguların %2'sinde bildirilmiştir (22, 23). Torsiyonun sebebi genellikle bilinmemekte, fakat çeşitli hazırlayıcı etkenlerden söz edilmektedir. Pubertede testis volümünün beş, altı kat artışı, torsiyonun bu dönemde daha fazla görülmesine neden olmaktadır. Travma ya da aşırı egzersiz, torsiyonu başlatan bir etken olabilir. Yine kremaster veya dartos kaslarının kasılması da torsiyonu başlatabilir. Çevre ısısının 2°C'nin altına düştüğü ortamlarda torsiyonun daha sık görüldüğü bildirilmiştir

(24). Sol testis daha uzun bir spermatik korda sahip olduğundan sağ testise oranla iki defa daha sık torsiyone olur.

İnmemiş ve retraktil testislerde torsiyon olasılığı artmıştır (25). Testis torsiyonu iki tiptir.

2. 3. 1. Ekstravaginal Testis Torsiyonu

Perinatal dönemde görülen torsiyon tipidir. Bu dönemde testisin skrotuma inişi ile testiküler fiksasyon tamamlanamamış olduğundan torsiyon meydana gelebilir. İntrauterin torsiyonlar “vanishing testis” sendromundan sorumlu tutulmaktadır. Asemptomatik seyrettiğinden sıklığı tam olarak bilinmemektedir. Ekstravaginal testis torsiyonları genellikle testiküler atrofi ile sonuçlanır. Bu olgularda da erken cerrahi girişim ve kontralateral testisin fiksasyonu önerilmektedir (22).

Testis torsiyonunda kritik zaman dilimi ilk altı saattir. Bu dönemde testisin kurtarılma oranı %85-97’dir. 6-12 saatte bu oran %55-85 ve 12-24 saat arasında %20-80 iken 24 saatten sonra %10’un altına inmektedir (26).

2. 3. 2. İnvaginal Testis Torsiyonu

Çoğunlukla ergenlik öncesi dönemdeki erkek çocuklarında görülür. “Bell-clapper (zil tokmağı) deformitesi” adı verilen anatomik yapı bozukluğunun invaginal testis torsiyonuna sebep olabileceği ileri sürülmüştür. Bu malformasyonda periton testise normalde olması gereken yerden daha yukarıda yapışmaktadır. Sonuçta testis daha transvers pozisyonda, serbest bir biçimde tunika vaginalis içinde asılı durmakta ve kolaylıkla torsiyone olmaktadır. Sıklıkla kremasterin kasılması spermatik kordu kısaltarak torsiyonu başlatır. Torsiyonun devam etmesi testis ve epididimdeki konjesyonu artırır (1, 22).

Ani başlangıçlı ve ciddi bir skrotal ağrı torsiyon için özgün bir bulgudur. Skrotal ağrı kasığa ve aynı taraf karın alt kadranına yayılır. Olguların dörtte birinde ağrıya bulantı, kusma gibi diğer sindirim sistemi şikayetleri eşlik edebilir. Bazı hastalarda skrotal travma ya da skrotumu ilgilendiren başka bir hastalık öyküsü vardır (22, 23). Fizik bakıda testis büyük, hassas ve skrotumun üst kısmına horizontal yerleşmiş halde bulunur. Skrotumda ödem, eritem ile ipsilateral tarafta kremasterik refleksin kaybolduğu görülür. Testis ve epididim eklentilerinin torsiyonu ayırıcı tanıda düşünülmelidir. Appendiks testis torsiyonunda skrotumda mavi nokta işareti mevcuttur ve skrotum içerisinde mobil, hassas, sert bir nodül ele gelir. Pollakiüri, disüri gibi üriner

sistem semptomları olması ve idrar tahlilinde piyüri görülmesi epididimitisi destekler (22, 26). Torsiyon düşünülen olgularda yapılacak ultrasonografi, ilk saatlerden itibaren büyümüş ve hipoekojen testisi gösterir. Tanıda yardımcı olabilecek güvenilir diğer tetkikler, renkli doppler ultrasonografi ile testis sintigrafisidir. Technetium-99m ile radyoizotop görüntülemeye karakteristik olarak testiste izotop tutulumunun olmadığı görülür. İnflamatuvar yanıtın göstergesi olarak, tutulum olmayan bölgenin etrafında halka şeklinde skrotal perfüzyonun varlığı, gecikmiş torsiyonu işaret eder. Doppler ile normal kan akımı ve etkilenen tarafta artmış perfüzyon epididimitis ve bazen de appendiks testis torsiyonu ile uyumlu olabilir. Tedavisi detorsiyondur. Önce narkotik analjezikler yardımıyla manuel detorsiyon denenebilir (1, 22, 26, 27). Semptomların başlangıcından sonraki ilk 6-12 saat arasında yapılacak detorsiyon testisi kurtarabilir. Daha uzun süren torsiyonlarda oluşan ağır hasar, karşı testisi de etkileyebileceğinden orşiektomi gerekebilir. Bell-clapper deformitesi sıklıkla bilateral görüldüğü için bu hastaların cerrahisinde rutin kontralateral eksplorasyon ve testiküler fiksasyon önerilmektedir (22, 27).

2.4. İSKEMİ VE REPERFÜZYON HASARI

İskemi, dokunun oksijen ve yaşam için gerekli diğer maddelere olan ihtiyacı ile sunumu arasındaki dengesizlik halidir. Ayrıca iskemi sürecinde, ortaya çıkan metabolitlerin uzaklaştırılmasında da sorun meydana gelir (28).

2. 4. 1. Akut Hücre Zedelenmesinin Nedenleri

Akut hücre zedelenmesi, uyarana karşı oluşur ve hücre morfolojisinde değişimler meydana getirir. İskemide aktive olan SOR lipid peroksidasyonuna ve hücre hasarlanmasına neden olur (29). Akut iskemiye izleyen olaylar şu şekilde gelişir (29):

2. 4. 1. 1. Geri Dönüşümlü Zedelenme

a. Hipoksi, hücre hasarı ve ölümünün en sık nedenlerinden biridir. Hipoksidede, hücre içi oksijen azlığı nedeniyle aerobik solunum aksar ve mitokondrideki oksidatif fosforilasyon engellenir. Adenozin trifosfat (ATP) üretimi azalır ya da tamamen sona erer. ATP kaybı sonucu ATPaz aktivitesi de azalır. Bu, hücre zarında bulunan aktif sodyum pompası yetersizliği ve beraberinde hücre içinde sodyum birikimi sonucunu doğurur. Hücre içi potasyum dışarı atılır. Ardından su hücre içine girer ve hücre sel şişme meydana gelir. Hücre sel şişmenin bir diğer nedeni ise katabolitlerin birikimidir (28, 29).

b. Hücresinin enerji metabolizması bu süreç içerisinde glikoza bağımlı hale gelir. Glikojen depoları hızla azalır. Glikoliz, laktik asit ve fosfat türevlerinin hidrolizi ile inorganik fosfatların birikimine, bu ise hücre içi pH'yı düşürerek asidoza neden olur.

c. Sonrasında granüllü endoplazmik retikulumdan ribozomlar ayrılır ve polizomlar monozomlara parçalanarak protein sentezi azalır. Hipoksi devam ederse membran geçirgenliği artar ve mitokondri fonksiyonları yavaşlar. Bu sırada mitokondriler normal, hafif yoğunlaşmış ya da şişmiş, endoplazmik retikulum ise genişlemiş olarak görülür. Sonuçta hücre belirgin biçimde şişer. Buraya kadar olan olaylar geri dönebilir değişikliklerdir. İskemi bu andan sonra da devam ederse, geri dönüşümsüz hücre zedelenmesi başlar. Hücre hasarının yapısal değişiklikleri, bazı kritik biyokimyasal sistemlerin bozulmasından sonra görünür hale gelir. Hücre şişmesi geri dönüşümlü bir hasardır ve dakikalar içinde görülebilir.

Hücre ölümünün, örneğin miyokard bulguları tam iskemiden 10-12 saat sonrasına kadar ışık mikroskobu ile görülmez. Geri dönüşümsüz hasar bugünkü bilgilerimize göre ilk 20-60 dakika içinde oluşur (29).

2. 4. 1. 2. Geri Dönüşümsüz Zedelenme

Geri dönüşümsüz hücre zedelenmesinde mitokondri ve kristalarda aşırı vakuolizasyon ile plazma zarında aşırı zedelenme vardır. Hasarlanmış ve ileri derecede geçirgenleşmiş zarlardan hücre için gerekli yaşamsal elemanların kaybolduğu görülür. Hücre içi pH'nın düşmesi, lizozom zarlarının zedelenmesi ve beraberinde enzimlerin sitoplazmaya geçerek asit hidrolazları aktiflemesi sonucu, çekirdek ve sitoplazma yapıları sindirilir.

Hücre zedelenmesinde en önemli basamak kuşkusuz membran zedelenmesidir. Hücre membran zedelenmesinde altı neden suçlanmaktadır.

1. Mitokondri fonksiyon bozukluğu,
2. Membran fosfolipidlerinin giderek artan kaybı,
3. Hücre iskeletindeki değişimler,
4. SOR,
5. Lipid yıkım ürünleri,
6. Hücre içi aminoasitlerin kaybı.

Membran zedelenmesi, hücreler arası mesafeden hücre içine doğru kalsiyum (Ca^{+2}) tutulumuna neden olur. Reoksijenasyondan sonra mitokondri tarafından tutulan

Ca²⁺ hücresel enzimleri inhibe ve proteinleri denature eder. Sonuçta koagülasyon nekrozuna özgü hücresel değişimler meydana gelir.

İskemi sonrasında dokuda dolaşımın yeniden başlaması, reperfüzyon olarak adlandırılmaktadır. İskemi sonucunda artan SOR kan akımı düzeldikten sonra reperfüzyon zedelenmesine yol açar. Reperfüzyon oluşmazsa, öldürücü iskemik zedelenme gelişir fakat toksik SOR oluşmaz. Reperfüzyon sırasında iskemik alanda toplanan nötrofil ve trombositlerin aktivasyonu, hücre içi Ca²⁺ birikimi ile mikrovasküler hasarın dokudaki zedelenmenin nedeni olduğu bilinmektedir. Toksik oksijen türevlerinin büyük ölçüde iskemik alanda toplanan polimorf nüveli lökositler tarafından yapıldığı düşünülmektedir (28, 30).

2. 4. 2. Reperfüzyon Hasarının Patofizyolojisi

1. Serbest oksijen radikalleri.

2. Nötrofiller: İskemi sonrasında damar endotelinin hasar görmesi ile nötrofil ve trombosit aktivasyonu meydana gelmektedir. Bunun yanı sıra, iskemik alanda ortaya çıkan kemotaktik faktörlerden kompleman 3a ve kompleman 5a nötrofillerin bölgeye göç etmesine neden olur. İskemireperfüzyon alanına gelen nötrofiller, bu bölgede SOR üretir. Ortaya çıkan SOR antiproteazları inaktive eder. Sonuçta, lizozomlardan proteolitik enzimler salınarak hasar oluşur. Ayrıca nötrofillerde uyarılmaları sonucunda esnek yapılarını kaybederek mikrosirkülasyonda kalır ve embolizasyona neden olurlar (29, 30).

3. Kalsiyum: Reperfüzyon sırasında hücre ve organelleri içinde aşırı Ca²⁺ birikimi ciddi doku hasarı gelişiminin en önemli nedenidir. İskemide ortaya çıkan hücre membran hasarı ve gradient farkı nedeniyle Ca²⁺, hücre içine girer. Aynı zamanda iskemireperfüzyon sırasında, özellikle SOR tarafından sodyum-potasyum pompasının bozulmasıyla artan hücre içi sodyum Ca²⁺'yı daha da artırır. Dışarıdan Ca²⁺ girişinin yanı sıra, endoplazmik retikulum da iskemireperfüzyon hasarına bağlı membran zedelenmesi sonucu içerdiği Ca²⁺'yı sitoplazmaya bırakır. Normal koşullarda hücre için yararlı olan Ca²⁺'nın reperfüzyon sonrasında hücre içinde aşırı miktarda birikmesi sonucu ortaya çıkan hasara kalsiyum paradoksu denilmektedir. Artan hücre içi Ca²⁺ konsantrasyonu ATPaz enziminin inaktivasyonuna neden olur. Böylelikle iskemide zaten azalmış olan ATP depoları daha da boşalır. Hücrede litik ödevi olan birçok enzimin Ca²⁺ tarafından aktive edilmesiyle hücre yıkımı başlar. Membran

fosfolipidlerinin, aktive olan fosfolipaz tarafından parçalanması sonucu ise hücre bütünlüğü bozulur.

İskemi sonrasında endotel ve hücre zarı fonksiyonlarının bozulmasıyla hem hücre içinde, hem de hücre dışında ödem görülür. Endotel hücrelerinde şişme ile damar dışı boşluğa sızan sıvının neden olduğu bası sonucu kapiler damar lümeni daralır ve sonuçta reperfüzyon olsa da mikrosirkülasyonda ciddi yetersizlikler ortaya çıkar. Reperfüzyon ile iskemide bozulmuş mikrosirkülasyonun tam olarak düzeltilememesine “no-reflow olayı” denir. Dokuda ortaya çıkan ödemin yanısıra aktive olan nötrofil ve trombositlerin kapiler dolaşımında kalmaları bu tabloya katkıda bulunmaktadır (31).

SERBEST RADİKALLER

Serbest radikaller, dış yörüngesinde tek, paylaşılmamış elektron taşıyan kimyasal ürünlerdir. Bu dengesiz durumun yarattığı enerji, organizmanın temel yapı taşları olan proteinler, karbohidratlar, lipidler ile inorganik kimyasallar gibi komşu moleküllerle olan tepkimeler sonucu açığa çıkar. Serbest radikaller, hücre membranları ve nükleik asitlerin yapısında yer alan anahtar moleküllerdir (Tablo 1).

Tablo 1: Serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen bileşikler

Serbest radikaller	Radikal olmayan reaktif O ₂ bileşikleri	SOR etkisi sonucu oluşan radikaller
Stüperoksid (O ₂ [•])	Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	Karbon merkezli radikaller (R [•])
Hidroksil (OH [•])	Singlet oksijen (¹ O ₂)	Peroksil/Karboksil (ROO [•])
Hidroperoksil (HO ₂ [•])	Hipokloröz asit (HOCl)	Alkoksil (RO [•])
Nitrik oksid (NO [•])	Peroksinitrit (ONOO [•])	Thiyl radikaller (RS [•])
Azot dioksit (NO ₂ [•])	Ozon (O ₃)	
	Lipid hidroperoksit (LOOH)	

2.5.1. Serbest Radikal Kaynakları

1. Biyolojik kaynaklar: Aktive olmuş fagositler, antineoplastikler (Nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin, adriamisin) ve ekzojen kimyasalların enzimatik yıkımı, radyant enerjinin emilimi (ultraviyole, X ışını), alkol ve uyuşturucular, çevresel etkenler (hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, pestisid, sigara dumanı, solventler,

aromatik hidrokarbonlar), ruhi stres (streste katekolaminler artar. Artan katekolaminlerin oksidasyonu sonucu serbest radikaller meydana gelir) (32).

2. Hücresel kaynaklar: Normal metabolik olaylarda görülen oksidasyon-redüksiyon (redoks) reaksiyonları sırasında (Askorbat, tioller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavin, tetrahidropterin ve antibiotikler), enzim ve proteinler (Ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz ve hemoglobin gibi), mitokondrial elektron transport zinciri, endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron taşıma sistemleri (sitokrom p450, sitokrom b5 redüktaz), peroksizomlar (oksidazlar ve flavoproteinler), plazma membranı (lipooksijenaz, prostaglandin sentetaz, fagositlerde dihidronikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz ve lipid peroksidasyonu), oksidatif stres yapıcı durumlar (iskemi, travma ve intoksikasyon).

2.5.2.Lipid Peroksidasyonu

Serbest radikaller tarafından başlatılan ve zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan kimyasal olaya denir. Böylelikle membran lipid yapısı değişir, hücre yapı ve fonksiyonları bozulur. Lipid peroksidasyonu üç aşamada gerçekleşir: Başlangıç, zincir gelişimi ve sonlanma. Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan kuvvetli oksitleyici bir radikalın, zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asidi zincirindeki .-metilen gruplarından hidrojen atomunu uzaklaştırmasıyla başlar. Burada asıl etkili radikalın hidroksil radikali olduğu düşünülmektedir. Bu şekilde oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşik olup bir dizi değişikliğe uğramaktadır. Lipid radikalının moleküler oksijenle reaksiyona girmesiyle lipid peroksid radikalleri meydana gelmektedir. Lipid peroksid radikalleri de zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumunu sağlamakta, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine (LOOH) dönüşmektedir (33, 34).

Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerinin aldehid ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesiyle sona ermektedir. Bu bileşiklerden biri olan malondialdehid (MDA) miktartiyobarbitürik asid testiyle ölçülmekte ve yöntem lipid peroksid düzeylerinin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. MDA proteinlerin aminogruplarına, fosfolipidlere veya nükleik asidlere bağlanarak toksik etkisini gösterir (33, 34).

2.5.3 ANTİOKSİDANLAR

Hücrede serbest radikalleri uzaklaştırmak için çok sayıda antioksidan savunma mekanizması mevcuttur. Serbest radikaller durağan değildirler. Genellikle kendiliğinden güçlerini kaybederler. Ayrıca birçok enzimatik ve nonenzimatik sistem serbest radikallerin inaktivasyonuna neden olur. Çoğu hücrede bulunan süperoksit dismutazların (SOD) katalitik etkisiyle radikallerin kaybı belirgin olarak hızlanır. Glutasyon peroksidaz gibi enzimler serbest radikallere karşı koruyucudur. Peroksizomlarda bulunan katalaz hidrojen peroksidi enzimatik olarak parçalar. Ayrıca sistein, glutasyon, seruloplazmin gibi sülfidriller ile A, C ve E vitaminleri serbest radikallerin oluşumunu engelleyen ya da onları inaktive eden endojen ve eksojen antioksidanlardır (2, 28, 31, 35).

Hücresinin oksidanlara karşı savunmasında şu mekanizmalar rol oynar; Metal iyonlarının bağlanması ile toksik radikal oluşumunun önlenmesi, oluşan radikallerin toplanması ve bastırılması, radikal zincir reaksiyonlarının kırılması, hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri, tamir edilemeyecek moleküllerin uzaklaştırılması, antioksidan kapasitenin artırılması. Antioksidan bileşiklerin bir kısmı birkaç mekanizmayı birden kullanarak etkilerini göstermektedir. Toksik oksidanların oluşumunun önlenmesi için; organizmada oksidatif stres yapıcı nedenlerin ve risk faktörlerinin iyi belirlenmesi, bunlardan uzak durulması ve etkileriyle mücadele edilmesi ilk yapılması gerekenler olarak sıralanabilir (31, 35, 36)

2.6 İSKEMİK ÖNKOŞULLAMA

Bir organın maruz kaldığı kısa süreli iskemik periyotlar, aynı organda daha sonra meydana gelecek uzun süreli bir iskemik periyodun neden olacağı hücre ölümünü önleyebilir. Bu koruyucu mekanizma iskemik önkoşullama olarak adlandırılmaktadır. İskemik önkoşullamanın koruyucu etkisi farklı organlarda gösterilmiştir. İskemik önkoşullamanın ilk fazı 1-3 saat kadar koruma sağlar. Bunu izleyen geç faz, kısa oklüzyonlardan 24 saat sonra başlar ve yaklaşık 72-96 saatte sonlanır. İskemik önkoşullamayı indükleyebilmek için gereken iskemik tekrarlar, türe ve organ sistemine özgüdür (37). Sıçan, tavşan, köpek ve insan kalbi için literatürde iskemik önkoşullama oluşturan çok sayıda iskemik tekrar protokolleri bulunmaktadır (14, 4, 38, 39). İskemik önkoşullamanın erken döneminde oluşan koruyucu etkisinin süresi de türe özgüdür. Bu koruyucu etki tavşan kalbinde 30 dakikalık reperfüzyondan sonra sonlanırken (40),

sıçanda bir saat (39), köpekte iki saat sonra sonlandığını bildirmiştir (4). İskemik önkoşullamanın geç dönemdeki koruyucu etkisinin ortaya çıkması için gereken sürenin de türler arasında farklılık gösterdiği düşünülmektedir (41, 42). Genel olarak erken dönemdeki koruma, önkoşullamanın indüklenmesinden itibaren 3 saatlik bir dönemi takiben 12-24 saatlik korumasız bir dönem şeklinde tanımlanabilir. Geç koruma ise, önkoşullamanın indüklenmesinden 12-24 saat sonra başlayıp 72 saat sonra sona ermektedir (43).

İskemik önkoşullama ilk kez 1986 yılında Murry ve arkadaşları tarafından köpek kalbinde yapılan araştırma ile gösterilmiştir (4). Bu çalışmada, uzun süreli iskemiden önce dört kere 5'er dakikalık kısa süreli iskemi ve bunu takiben reperfüzyon uygulanması ile oluşturulan önkoşullamada miyokarddaki infarkt alanında %30'dan %7'ye kadar düşen bir azalma görülmüştür. Bunu izleyen çalışmalarda önkoşullamanın sadece infarkt alanında azalmaya neden olmakla kalmadığı, aynı zamanda iskemiden sonra gözlenen miyokardial donakalma ve aritmiler üzerinde de koruyucu etkiler oluşturduğu bildirilmiştir (44). Bu çalışmadan sonra önkoşullama ile ilgili yoğun araştırmalar başlamıştır. Değişik hayvan türleri üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda beyin, retina, akciğer, böbrek, karaciğer, ince barsak, spinal kord ve iskelet kasında iskemik önkoşullamanın sağladığı koruma ortaya konmuştur (4, 39, 40). Bununla birlikte önkoşullama ile ilgili yapılan çalışmalar özellikle kalp dokusu üzerinde yoğunlaşmış ve konuyla ilgili bilgilerin çoğunluğu kalpte yapılan araştırmalardan elde edilmiştir. Kardiak iskemik önkoşullama ile görülen korunma şimdiye kadar gözlenen en kuvvetli infarkt oluşumunu önleyici etkidir. İskemik önkoşullamanın myokardda en önemli özelliği koroner arter tıkanmasına bağlı olarak gelişen nekrozun azalmasını sağlamasıdır. Önkoşullama, iskemi ve reperfüzyonun yol açtığı endotel disfonksiyonuna karşı da endotel hücrelerinde koruma sağlamaktadır (45). Sıçanlarda ince barsak veya böbrek iskemi ve reperfüzyonu ile tavşanda da gastrokinemus kasının önkoşullaması ile myokardiyumun önkoşullanabileceği ortaya konmuştur. İskemik önkoşullamanın koruyucu etkisi çalışılan tüm türlerde gösterilmiştir (45).

2.6.1. İskemik Ön Koşullanmanın Etki Mekanizması

Kalpte pek çok türde yapılan çalışmalarda, iskemik önkoşullamada adenosin, bradikinin, opioidler gibi reseptör aracılı endojen maddelerin rol oynayabileceği gösterilmiştir. İskemik kalp kasının süratle adenosin trifosfatı (ATP) adenezine yıktığı,

adenozinin de o bölgede kan akımı olmadığı için birikme eğilimi gösterdiği bilinmektedir. Tavşan kalbinde, A1 ve A3 adenosin reseptör agonistlerinin iskemik önkoşullamayı taklit edebildikleri gösterilmiştir (46). Kedi akciğerinde A1 adenosin reseptör antagonisti 1,3-dipropil-8 siklopentilksantin (DPCPX) veya ksantin amin sınıfının (XAC) iskemiden 30 dakika önce verilmesinin iskemi reperfüzyon hasarını azalttığı bildirilmiştir (47). Reperfüzyon sırasında A2 adenosin reseptör agonisti olan CGS-21680 uygulamasının sıçanda oluşan iskemi reperfüzyon hasarını geri döndürebildiği gösterilmiştir (48). Adenozine ek olarak iskemik kalpte açığa çıkan mediatörlerden biri de bradikininidir. Bradikinin endotel hücrelerinden B2 reseptörleri aracılığıyla NO ve endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktör (EDHF) salıverici etkisi bilinmektedir (49). İskemik önkoşullama sırasında salıverilen bu endojen maddelerin tavşan kalbinde, G proteinleri ve hücre fosfolipazları üzerinden yaptıkları kombine etkileri ile hücre içi protein kinaz C (PKC) translokasyonuna ve aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (50). İskemik önkoşullamada artan anjiyotensin II seviyelerinin PKC aktivasyonuna yol açtığı, tavşan akciğerinde normotermik iskemi reperfüzyon hasarını azaltabildiği bildirilmiştir (50). Myokardda oluşturulan önkoşullama ile aktive olan PKC, iskemik önkoşullamada kalp kasında ilk basamak olarak işlev görmektedir. Son yıllardaki kanıtlar en azından bir tirozin kinazın da bu yolakta görev alabileceğini bildirmektedir (51). PKC ve tirozin kinazın daha büyük bir kinaz ailesi olan mitojenle aktive edilen protein kinazların bir üyesi olabileceği düşünülmektedir. Mitojenle aktive olan protein kinazların iskemik önkoşullamada, aktin filamanları üzerinden hücre iskeleti bütünlüğü sağlayarak koruyucu etki oluşturabilecekleri hakkında yapılmış çalışmalar vardır (52). Isı şok (HSP) proteinlerinin de önkoşullamada rolü olabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. P38 mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) için ilk substrat MAPK-aktive protein kinaz 2'dir. Bu enzim ısı-şok proteini 27'yi (HSP27) fosforile etmektedir. Fosforile HSP27 hücre iskeletinin bütünlüğünü artıran aktin filamanlarının polimerizasyonlarını yönlendirmektedir (53). Termal önkoşullamanın sıçan akciğerinde oluşan hasarı anlamlı olarak azalttığı, artmış olan HSP72 ekspresyonunun bu etkiden sorumlu olabileceği bildirilmiştir (54).

En son olarak, PKC ve diğer hücre içi kinazların (tirozin kinaz veya MAPK yolları) aktivasyonlarının HSP27 ya da ATP bağımlı potasyum kanallarını fosforile ettiği bildirilmiştir. Potasyum ATP kanallarının iskemik önkoşullama fenomeninde son

efektör olabileceği düşünülmektedir. Yine son yıllarda yapılan çalışmalarda kalpte iskemik önkoşullamanın koruyucu etkisine sarkolemmal K_{ATP} (sark K_{ATP}) kanallarının aracılık edebileceği gösterilmiştir. İskemik önkoşullamada aksiyon potansiyeli oluşma süresinin kısalmasının koruyucu etkiye aracılık edebileceği dolayısıyla sark K_{ATP} kanallarının önkoşullamanın oluşumunda rolü olabileceği düşünülmektedir (55). Fakat aksiyon potansiyeli oluşum süresindeki kısalmanın kardiyoprotektif etkide herhangi bir role sahip olamayacağını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (56). Sark K_{ATP} kanallarına ek olarak son kanıtlar mitokondrial K_{ATP} 'nin (mito K_{ATP}) iskemik önkoşullama ile indüklenen kardiyak korumaya aracılık eden potasyum kanalı olabileceğini göstermektedir. mito K_{ATP} kanallarının koruyucu etkiye katkısı, K girişi ve intramitokondriyel depolarizasyonla açıklanmaktadır. Bu etki mitokondrilere aşırı Ca^{+2} girişini önleyebilmekte ve matriks şişmesine yol açmaktadır. Matriks şişmesi, ATP sentezinde artışa sebep olmakta, mitokondriyal respirasyonu stimüle etmektedir (57).

Önkoşullamanın hücrel sinyalleri ileti mekanizmasını aydınlatmaya yönelik yoğun çalışmalar sürmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar, membran reseptörlerinin aktivasyonunun, K_{ATP} kanallarının, PKC'nin nükleer faktör Kb 'nin ısı- şok proteinlerinin, tirozin kinaz enziminin rolü olduğunu ortaya koymuştur. Kardiyak iskemik önkoşullamada, adenosin, asetilkolin, katekolaminler, anjiyotensin II, bradikinin, endotelin, prostaglandinler, nitrik oksit ve opioidler gibi birçok nöroendokrin ve parakrin tetikleyicilerin rolü olduğu belirlenmiştir. Ayrıca ventriküler pacing, hipoksi, sıcaklık, stresi ve egzersiz gibi nonfarmakolojik stimulusların da miyokarda önkoşullama oluşturduğu gösterilmiştir (41). Erken ve geç iskemik önkoşullamanın koruyucu etkileri farklı ileti mekanizmaları ile gerçekleşmektedir. Adenosin, bradikinin, opioid peptidler ve serbest radikaller aracılığıyla PKC stimülasyonu ve K_{ATP} kanallarının açılmasının erken önkoşullamanın başlatılmasında kritik bir role sahip olduğu gözükmemektedir (58). Erken iskemik önkoşullama, protein sentez inhibitörlerinin varlığında da oluşmaktadır. Gecikmiş önkoşullamada ise, antioksidan enzimler, NOS, siklooksijenaz-2, aldoz redüktaz ve HSP gibi yeni proteinlerin sentezine bağlı değişiklikler de rol oynamaktadır (59). İskemik önkoşullamada birden fazla tetikleyici aynı anda rol oynar. İskemik önkoşullamanın gerçekleşmesi için bu tetikleyicilerin belli bir eşik düzeyine erişmesi gerekir. Bir mediatörün blokajı ile diğer mediatörlerin eşik düzeyine erişmesi engellenebilir.

Önkoşullama ile gözlenen koruma, önkoşullama periyodlarının sayısına ve süresine bağlıdır. Birden fazla iskemik döngü ortama salıverilen mediatörlerde kümülatif olarak artışa yol açar. Çoklu döngülerde bir mediatör bloke edilse de, ortamdaki diğer mediatörler iskemik önkoşullamanın eşik düzeyine erişebilirler (59). Domuzda yapılan bir çalışmada interstisyel bradikinin konsantrasyonundaki artışın interstisyel adenozin konsantrasyonundaki artıştan daha erken oluştuğu görülmüştür (60). Önkoşullama protokolündeki iskemi süresi kısa tutulduğunda bradikinin rolü ön plana çıkarken, bu süre daha uzun tutulduğunda adenozin rolü ön plana çıkmaktadır (56). Önkoşullama sikluslarının artırılması muhtemelen adenozin ve diğer mediatörlerin düzeyini artırmaktadır (56). Alfa 1-adrenerjik reseptörler, AT1 anjiotensin ve ET1 endotelin reseptörleride PKC ile bağlantılıdır ve önkoşullama ile oluşan korumayı taklit edebilirler, ancak bu reseptörlerin antagonistleri tavşanda iskemik önkoşullamayı etkilememiştir. Dolayısıyla bunların, en azından tavşanda, önkoşullamada endojen tetikleyici olmadıkları görülmektedir (56).

Adenozin, bradikinin ve opioid reseptörlerin aynı anda aktivasyonları ve kısa süreli iskemi-reperfüzyon boyunca oksijen radikallerinin ortama verilmesi iskemik önkoşullamayı tetiklemeye katkıda bulunur (56). Aşağıda bu tetikleyicilerden bahsedilecektir.

2.6.1.1. Adenozin

Adenozin vücutta yaygın olarak bulunan bir modülatördür. Hücre içinde ve dışında devamlı sentezlenmektedir. Adenozin etkilerini özgül reseptörler aracılığıyla oluşturur. Hücre adenozinini sentezlemek için çeşitli yollar kullanır. En önemli adenozin kaynağı hücre içinde devamlı kullanılan ATP ve adenozin monofosfattır (AMP). Bu iki nükleotid hücre içinde önce AMP'a yıkılır ve oluşan AMP hücresel 5'nükleotidaz enziminin katalizlediği biyokimyasal reaksiyon ile adenozine çevirilir. Organizmada diğer önemli bir adenozin kaynağı da katekolaminlerin ve histaminin katabolizması sırasında ortaya çıkan ve adenozine hidrolize edilebilen 5-adenozil homosisteindir. Liu ve arkadaşları 1991 yılında adenozinin iskemik önkoşullamada önemli rolü olduğunu, adenozin A₁ reseptör antagonisti ile tavşan kalbinde önkoşullamayla oluşan korumanın ortadan kalktığını ortaya koydular (39). Adenozin regüle edici ajan olan akadezin, iskemi sırasında adenozin salıverilmesini artırır ve önkoşullama için gerekli eşiği düşürür. Adenozin tranport inhibitörü dipiridamol verilmesi de benzer etkiyi oluşturur

(56). Adenozinin A_1 , A_2 ve A_3 isimli üç farklı reseptörü vardır. A_2 reseptörlerinin A_{2A} ve A_{2B} olmak üzere iki alt tipi tanımlanmıştır. A_1 ve A_3 adenozin reseptör antagonistlerinin tavşanda infarkt alanındaki azalmayı tamamen bloke ettiği gösterilmiştir (61). Dolayısıyla korumanın başlatılmasında A_1 ve A_3 reseptörlerinin rolü olduğu düşünülmektedir. Tavşanda adenozinle oluşan miyokardial infarkt alanındaki azalma PKC inhibitörleri ile ortadan kaldırılmaktadır (62). Adenozin ve asetilkolin gibi pek çok endojen mediatörün iskemik önkoşullamayı K_{ATP} 'ye bağımlı mekanizma ile oluşturduğu gösterilmiştir (63). A_1 adenozin reseptörü ve K_{ATP} kanalı arasındaki bağlantının G-protein sistemi aracılığıyla olduğu gösterilmiştir (57). ATP'ye bağımlı K kanalları intraselüler ATP düzeyleri düştüğünde açılır. K_{ATP} kanallarının blokajı, birçok türde ve insanlarda iskemik önkoşullamayı ortadan kaldırmaktadır (64). Buna karşılık K_{ATP} kanallarını açan bir ajan olan bimakalim, iskemik önkoşullamayı taklit etmekte veya uyarılması için gerekli eşiği azaltmaktadır. Mito K_{ATP} kanallarını selektif olarak bloke eden 5-hidroksidekonat, diazoksidin K kanallarını açarak oluşturduğu korumayı tersine çevirebilmektedir (65).

2.6.1.2. Bradikinin

Bradikinin hormon benzeri etkileri olan bir peptiddir. Vücutta vazodilatasyon görevi görür ve inflamatuvar reaksiyonları inhibe eder. Miyokardiyal iskemi sırasında bradikinin salıverilmesinde artış olmaktadır (66). İntrakoroner olarak verilen bradikinin iskemi/reperfüzyon aritmilerine karşı oluşturduğu olumlu etki, NOS inhibitörü olan L-nitro arjinin metil ester (L-NAME) varlığında ortadan kalkmaktadır (67). Önkoşullamada bradikinin rolü, selektif B2 reseptör blokeri olan ikatibant kullanılarak anestezi altındaki köpekte gösterilmiştir (68). İkatibantın hem önkoşullama öncesinde hem de önkoşullama sırasında verilmesi ile önkoşullamanın olumlu etkilerinin ortadan kalkması, bradikininin önkoşullamada hem mediyatör hem de tetikleyici olarak görev alabileceği şeklinde yorumlanmıştır (66). İzole perfüze sıçan kalbinde ise ikatibant ile bu etki gösterilememiştir. Wall ve ark. anestezi altındaki tavşanın kalbinde dışarıdan verilen bradikininin infarkt büyüklüğünü iskemik önkoşullama gibi azalttığını ve ikatibant verilmesinin de önkoşullamanın olumlu etkilerini ortadan kaldırdığını göstermişlerdir (69). Eksojen verilen bradikinin izole sıçan kalbinde de önkoşullamaya benzer olumlu etkiler göstermiştir. İskemide önce salıverilen bradikinin, NO ve prostasiklin aracılığıyla kalbi korumaktadır (66). Tavşanda bradikininle oluşan koruma,

PKC inhibitörleri ile ortadan kalkmaktadır. Anestezi altındaki tavşanda anjiotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörü olan kaptopril uygulamasıyla ve insan atriyum trabekül hücrelerinde, yine birer ADE inhibitörü olan lizinopril ve kaptopril uygulanması ile bradikinin önkoşullamada sağladığı korumaya benzer etkiler gösterilmiştir (69). İkatibant, bradikinin olumlu etkilerini ortadan kaldırmıştır. Bradikinin önkoşullama ve infarkt büyüklüğünü azaltıcı etkileri göz önüne alındığında ADE inhibitörleri ile gözlenen kardiyak koruyucu etkinin bir kısmında bradikinin koruyucu etkisinden kaynaklanabileceği ortaya çıkmaktadır (70).

2.6.1.3. Opioidler

Opioid reseptör antagonisti olan naloksanın sıçanda infarktüse karşı iskemik önkoşullamanın oluşturduğu koruyucu etkiyi bloke etmesi, sıçan kalbinde opioidlerin başlıca endojen tetikleyici olduğunu düşündürmektedir (71). Tavşanlar üzerinde yapılan bir araştırmada, naloksanın çok döngülü önkoşullama ile değil de, bir döngü ile oluşan korumayı bloke etmesi, opioidlerin adenosin ve bradikinin ile birlikte etki gösterdiğini ortaya koymaktadır (72). Q reseptörü bu korumada rol oynayan opioid reseptörü olarak tanımlanmıştır. Ancak izole sıçan kalbinde yapılan bir çalışmada k-opioid reseptörünün blokajının iskemik önkoşullamayı ortadan kaldırdığı bulunmuştur. Aynı hayvan modelinde k-opioid reseptör aktivasyonun infarkt alanını artırdığı da gözlemlenmiştir (73). Tavşanda opioidler ile oluşan koruma PKC inhibitörleri ile ortadan kalkmaktadır (72).

2.6.1.4. Reaktif Oksijen Türleri

Yüksek konsantrasyonlardaki serbest radikaller hücre membranında lipid peoksidasyonunu indükleyerek hücre bütünlüğünü değiştirip permeabilitesini artırır. Serbest radikallerin diğer önemli etki yerleride hücresel homeostazisi sağlayan iyon transportu ile ilişkili membran proteinleridir (74). Difüze olabilen bir antioksidan olan N-2-merkaptopropiyonil glisin ve bir radikal temizleyici olan dimetiltiyöüre infüzyonunun iskemik önkoşullamadaki koruyucu etkiyi bloke etmesi serbest radikallerin sadece kardiyak miyositlerde hasar oluşturmadığını, aynı zamanda düşük konsantrasyonlarda iskemik önkoşullamayı da tetikleyebileceklerini göstermiştir (75). Serbest oksijen radikalleri, tavşan kalbinde reseptöre bağımlı olmayan tetikleyici olarak görev almaktadırlar (75).

Iwamoto ve ark. anestezi altındaki tavşanda süperoksit dismutaz ve katalaz kombinasyonu ile 4 kere 5'er dakikalık periyodlarla oluşturulan önkoşullamada etkisiz olduğunu göstermişlerdir (71). Richard ve ark. anestezi altındaki sıçanda intraselüler antioksidan olan merkaptopropiyonil glisin (MPG) kullanarak yaptıkları çalışmada benzer bulgular elde etmişlerdir (72). Tanaka ve ark. ise tavşan kalbinde yaptıkları çalışmada, Iwamoto ve arkadaşlarının bulgularına zıt sonuçlar elde etmişler ve yararlı etkinin süperoksit dismutaz (SOD) veya MPG verilmesi ile ortadan kaldırılabileceğini göstermişlerdir (73). Benzer bir bulgu da Baines ve ark. tarafından gösterilmiş ve MPG, tavşan kalbinde tek siklus ile yapılan önkoşullamanın koruyucu etkisini tamamen ortadan kaldırmıştır (74). MPG, önkoşullama için 4 kez iskemi-reperfüzyon uygulaması yapıldığında ise korunmayı engelleyememiştir. Serbest oksijen radikalleri oluşturmak amacı ile yapılan hipoksantin/ksantin infüzyonu önkoşullamayı taklit etmiş ve infarkt büyüklüğünü azaltmıştır. Tavşanlarda oluşan korunma PKC inhibitörü polimiksin B varlığında ortadan kaldırılmıştır (76). Dolayısı ile serbest oksijen radikalleri önkoşullamada tetikleyici olarak görev almaktadırlar, ancak önkoşullama için birden fazla iskemi-reperfüzyon döngüsü kullanıldığında adenosin, bradikinin, opioid peptidler gibi tetikleyiciler de koruma sağlayabilecek konsantrasyonlarda oluşmakta ve serbest oksijen radikallerinin ortamda olmamasına karşın koruma görülmektedir (76).

PKC aktivasyonu önkoşullamada sinyal ileti yolağında önemli bir basamaktır ve serbest oksijen radikalleri farklı mekanizmalarla PKC aktivasyonuna yol açabilirler. Serbest oksijen radikalleri PKC yi direkt olarak uyarabilirler (74). Fosfolipaz D yine serbest oksijen radikalleri tarafından aktive edilebilmekte ve fosfolipaz C gibi PKC aktivasyonuna yol açmaktadır. PKC aktivasyonu yanında, serbest radikaller G-proteinlerini ve ATP bağımlı potasyum kanallarını aktive edebilirler (76). Serbest oksijen radikalleri tavşan kalbinde reseptöre bağımlı olmayan tetikleyici olarak görev almaktadırlar ve PKC de bu korunmanın sinyal ileti yolağında bulunmaktadır (77). Hidroksil ve NO'nin reaksiyon ürünü olan peroksinitritin direkt olarak düşük konsantrasyonlarda izole sıçan kalbinde önkoşullama oluşturduğu ilk kez Altuğ ve ark. tarafından gösterilmiştir (78). Önkoşullama sırasında peroksinitrit oluşumu nitrotirozin ölçümü yapılarak da gösterilmiştir. Peroksinitrit önkoşullamasında tirozin kinazın rolü bulunmaktadır. Ayrıca, önkoşullama ile oluşan gecikmiş fazdaki koroner endotel korunmasında NO'nin değil de peroksinitin başlıca tetikleyici olduğu ortaya konulmuştur

(76). Bu sonuçlar, perosinitritin hem akut hem de gecikmiş fazdaki korumada rol oynadığını göstermektedir.

Sonuç olarak, yapılan çalışmalar endojen olarak oluşan adenozinin, bradikinin, opioidlerin ve reaktif oksijen türlerinin önkoşullamada önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır.

2.7. 5-HİDROKSİDEKANOİK ASİT

Mitokondride yer alan ATP duyarlı kanalların (K_{ATP}) iskemik önkoşullamanın önemli bir mediatörü olduğu kabul edilmektedir. 5-Hidroksidekanoik asit (moleküler formülü $C_{10}H_{19}O_3 \cdot Na$, molekül ağırlığı 210.3) farmakolojik ve iskemik önkoşullamayı bloke eden bir ajandır. 5-HD mitokondrial K_{ATP} kanallarının spesifik bir inhibitörü olduğu genel kabul görmekle birlikte, son zamanlarda yayınlanan makalelerde molekülün farklı etki mekanizmalarıyla da iskemik önkoşullamanın etkilerini bloke edebildiği belirtilmektedir (79, 80, 81). Yapılan çalışmalarda 5-HD'nin beta-oksidasyonun ilk basamağının substratı olan 5-Hidroksidekanoil-CoA'ya (5-HD-CoA)dönüşerek aktive olduğunu gösterilmiştir (79). 5-HD'nin iskemik önkoşullamayı sadece mitokondrial K_{ATP} üzerinden değil başka farklı mekanizmaları üzerinden de etki göstererek iskemik önkoşullama inhibisyonuna neden olduğu düşünülmektedir. Yapılan araştırmalarda bu olası mekanizmalar şu şekilde özetlenmektedir: i) Mitokondrial K_{ATP} kanalları sitozolik 5-HD veya 5-HD-CoA tarafından da inhibe edilebilir, ii) 5-HD metabolizmasının ara ürünleri beta-oksidasyon yolağını inhibe ederek başka hücresel fonksiyonları kullanabilir, iii) 5-HD betaoksidasyon yolağında tamamen metabolize olup solunum zincirine etki edebilir. iv) 5-HD hücre metabolizmasını glukozdan yağ asitleri oksidasyonuna çevirebilir, bu da iskemi sonrası kardiyak fonksiyonları inhibe edebilir (80). 5-HD beta-oksidasyon sırasında gerçekleşen elektron taşımaya katkıda bulunabilir. Bu bilgiler 5-HD'nin iskemik önkoşullamayı yalnızca mitokondrial K_{ATP} kanalları üzerinden inhibe ettiği öngörüsünün sorgulanmasına yol açmaktadır (81).

2.8. Y-27632

Y-27632, ROCK ailesinin bir selektif sentetik inhibitörüdür. Molekülün formülü $C_{14}H_{21}N_3O \cdot 2HCl \cdot 3/4 H_2O$ (Trans-4-[(1R)-1-Aminoethyl]-N-4-pyridinylcyclohexane carboxamide dihydrochloride)'dür ve molekül ağırlığı 333.77 daltondur (16).

ROCK proteinleri Rho bağımlı kinaz ailesindendir ve aktin stres liflerinin oluşumu, miyozin fosfataz formlarını (MLCK) etkiler ve bu yolda esas olarak

kalsiyum sensitizasyonu için gereklidir. Rho-kinaz miyozin bağlayıcı alt ünitesini direkt olarak fosforile eder. Bu fosforilasyon sonucu hipertansiyon, vazospazm, preterm doğum, bronşial astım, glukom ve ereksiyon disfonksiyonuna neden olabilir. Bu bileşik, agoniste bağlı düz kas kontraksiyonunu kalsiyum sensitizasyonunu engelleyerek inhibe eder.

Rho-kinaz inhibisyonu amacıyla birçok madde geliştirilmiştir. Bunlardan tanımlanmış olanları Y-27632 ve izoguinolon derivesi olan HA 1077 (fasudil)'dir. Y-27632, ROCK ailesine ait kinazları diğer kinazlardan (protein kinaz C, siklik adenosin mono fosfat kinaz ve MLCK) 100 kat daha güçlü inhibe eder. Y-27632'nin Rho-kinaza olan afinitesi ROCK ailesi üyesi olan protein kinaz ve sirton kinaza göre 20-30 kez daha fazladır (12).

Y-27632'nin düz kas gevşemesi, hücre proliferasyonunun inhibisyonu, anyon kanallarının aktivasyonu, nötrofil kemotaksisinin inhibisyonu, tümör invazyonunun inhibisyonu ve hücre transformasyonunun inhibisyonuna neden olduğu yapılan çeşitli deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (82, 83).

Y-27632'nin vasküler, bronşial ve gastrointestinal düz kaslarda uyarılara bağlı kasılmaları in vitro ve in vivo ortamda düz kas kontraksiyonunu inhibe ederek engellediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (82, 83). Uehata ve ark. (65) yaptıkları çalışmada, Y-27632'nin sistemik uygulanmasının hipertansif sıçanlarda tansiyonu düşürürken normotansif sıçanlarda sistemik kan basıncında değişme oluşturmadığını göstermişlerdir. Y-27632'nin sıçan, tavşan ve insan korpus kavernozumunda adrenerjik uyarıya bağlı kontraksiyonları inhibe ettiği ve sıçanlarda intrakavernozal basıncı artırdığı gösterilmiştir (84).

Litertürde yara iyileşmesinde Y-27632 ile yapılmış çalışmalar az sayıdadır. Vishwanath ve ark. (85) yaptıkları çalışmada Y-27632'nin korneal fibroblast hücrelerinde fibriller kollajen matrikste gevşeme ve uzamaya yol açarak yara iyileşmesinde etkili olduğunu göstermişlerdir. Y-27632'nin topikal, intravitreal ve intrakameral uygulanması sonrası göz içi basıncı düşerken pupilin büyüdüğü gösterilmiştir (86). İn vitro hücre kültürlerinde intestinal epitel hücrelerinde hasar oluşturulmasını takiben Y-27632'nin uygulanması sitotoksik nekrotizan faktör 1'de azalmaya neden olmuş ve hücrelerde hızlı iyileşmeye neden olduğu saptanmıştır (87). Yapılan in vitro çalışmada hasar oluşturulmuş astrosit hücrelerinde Y-27632'nin hasarlı

bölgede astrosit migrasyonunda artış ve yara kapanmasında hızlanmaya neden olduğunu göstermişlerdir (88). Hipertansiyon, astım, kanser, serebrovasküler hastalıklar, kemik ağrıları, pnömoni ve pulmoner fibrozis gibi durumlarda tedavi amacıyla kullanılmasına yönelik deneysel çalışmalar devam etmektedir (82, 83). Tomasek ve ark. (89) yaptıkları bir çalışmada Y-27632'nin granülasyon dokusu oluşurken miyofibroblastların kontraksiyonunu önleyerek yara iyileşmesinde etkili olduğunu göstermişlerdir. Gates ve ark. (90) Y-27632'nin yara iyileşmesinde fibroblastları düzenleyerek kontraksiyon oluşmasını önlediğini göstermişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. DENEY HAYVANLARI

Bu çalışma, Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitü'sünün (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) güncel laboratuvar hayvalarının bakım ve kullanım klavuzuna uygun şekilde yapılmış olup Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun izni alındıktan sonra gerçekleştirilmiştir. Deneyler 20-24°C sıcaklıkta, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ışık döngülü ortamda tutulan, standart laboratuvar yemi ve musluk suyu ile beslenen erişkin erkek Wistar albino türü sıçanlar üzerinde gerçekleştirilmiştir.

3.2. DENEY PROTOKOLÜ

Kırk adet erişkin Wistar albino türü sıçan 5 eşit gruba ayrıldı. Hayvanlar 100 mg/kg intraperitoneal (i.p) ketamin hidroklorür (Ketalar®, Pfizer, İstanbul, Türkiye) ile yapılan genel anestezi indüksiyonundan sonra sırtüstü yatar pozisyonda ameliyat masasına alındı (Şekil 1). Tüm gruplarda başlangıç i.p enjeksiyon için farklı ajanlar kullanıldı. İntraperitoneal tedaviden 15 dakika sonra, sağ testis ve sağ spermatik kord, sağ supraskrotal kesi ile vücut dışına alındı (Şekil 2). İskemi ve reperfüzyon (İR) hasarı şu şekilde oluşturuldu. Testis iskemisi spermatik kordun 180 dakika süreyle bir atravmatik damar klemp ile (FE 022 K, Aesculap AG & CO, Tuttlingen, Almanya) tutuldu (Şekil 3). Uygulanan bu iskemi dönemi sonunda pediküle yerleştirilen klemp açılarak 60 dakika sürdürülecek reperfüzyon dönemi başlatıldı. İskemik ön koşullamanın (İÖ) her bir siklusu 5 dakika süreyle yukarıda anlatıldığı şekilde iskemi ve takiben 5 dakika reperfüzyon uygulanarak yapıldı. İntraperitoneal ilaç enjeksiyonları grup 4'de 0,3 mg/kg Y-27632 (Tocris Cookson Ltd. Bristol, Birleşik Krallık) enjeksiyonu, grup 5'te 10 mg/kg 5-hidroksidekanoik asit (5-HD) (Sigma-Aldrich Chemical Co, St Louis, Mo, ABD). Deney grupları ve uygulanan protokoller Şekil 4'de gösterilmiştir.



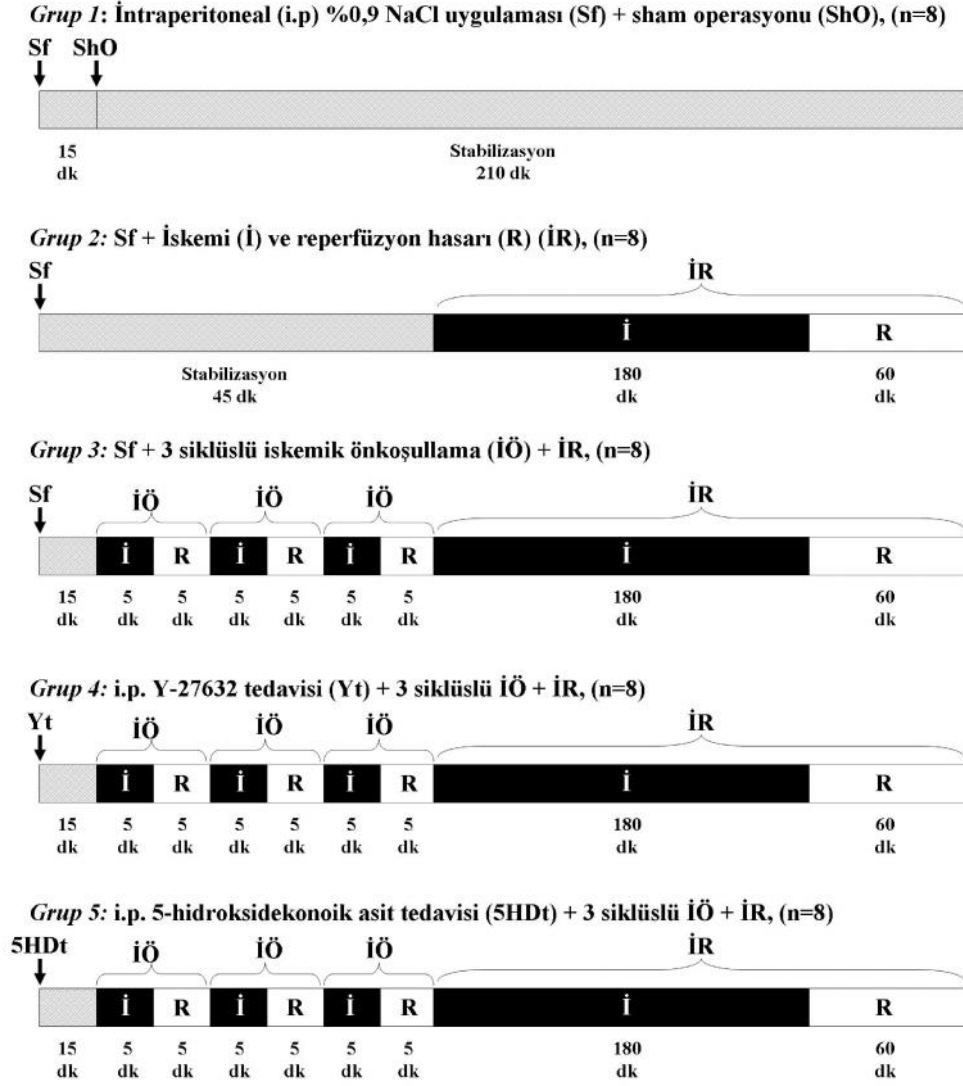
Şekil 1: Sıçanın deney masasındaki pozisyonu.



Şekil 2: Sağ testis ve pedikülü



Şekil 3: İskemi oluşturmak amacıyla sağ testis pedikülünün klampe edilmesi



Şekil 4: Uygulanan deney protokolleri.

Deney protokolleri sonunda hayvanlar genel anestezi altında servikal dislokasyon ile öldürüldü. Deneklerin sağ testisi alındı. Alınan testis dokusunun ½'si histopatolojik inceleme için %10 formaldehid solusyonunda fiske edildi, kalan yarısı da biyokimyasal incelemeler için -80oC'de saklandı.

3.3. HİSTOPATOLOJİK İNCELEMELER

Parafin bloklara gömülü testis dokularından 4-5 µm kalınlıkta kesitler alındı. Elde edilen kesitler eematoksilen-eozin (HE) boyası ile boyandı. Kesitler deneyde kullanılan sıçan grupları hakkında herhangi bir bilgisi olmayan bir patolog tarafından, ışık mikroskoupu altında incelendi. Testisin germinal epitelyumu modifiye Johnson skoru

Tablo 2. Modifiye Johnson skoru

Skor	Histolojik Bulgular
10	Tam spermatogenezis
9	Hafif zayıflamış spermatogenez, çok geç spermatid, disorganize epitelyum
8	Tübülde beşten az spermatozoa, az sayıda geç spermatid
7	Spermatozoa yok, geç spermatid yok, çok erken spermatid
6	Spermatozoa yok, geç spermatitler yok, birkaç adet erken spermatid
5	Spermatozoa ve spermatid yokluğu, çok sayıda spermatosit
4	Spermatozoa ve spermatidler yok, birkaç adet spermatosit
3	Sadece spermatogonia
2	Germinal hücre yokluğu, sadece sertoli hücreleri
1	Seminifer epitel yokluğu

(MJS) ile değerlendirildi (Tablo 2) (91). Her bir kesitte 30 farklı seminifer tüp değerlendirildi ve skorlandı.

3.4. BİYOKİMYASAL İNCELEMELER

3.4.1. Doku Homojenizasyonu

Biyokimyasal inceleme öncesi tüm testis dokusu tartılır ve boş bir cam şişeye konur. Her 1 gr doku başına 140 mM KCL solusyonundan 10 ml dokuya eklenir ve tüm dokular motor ile çalışan bir homojenizer jel homojenize edilir. Homojenat 2800 gr'ı 4 °C'de 10 dak santrifüj edilir. Elde edilen süpernatant, lipid hidroperoksit (LOOH), miyeloperoksidaz (MPO), total antioksidan kapasite (TAK), total oksidatif statuz (TOS) ve oksidatif strass indeksi (OSİ) çalışılması için kullanıldı. Homojenize dokular etiketli şişelere yerleştirilerek -80 °C'de saklandı.

3.4.2. Myeloperoksidaz (MPO) Ölçümü

MPO aktivitesi, Lökositlerin lizozomlarında bulunan bir oksidatif enzim olup Wei ve Frenkel tarafından tanımlanan bir metod ile test edildi (92). MPO aktivitesi U/g protein olarak birimlendirildi.

3.4.3. Lipid Hidroperoksit (LOOH) Ölçümü

Xylenol oranj ile Fe III'ün kompleksleşmesi ardından asidik koşullar altında lipid hidroperoksitler ile Fe +3 ve Fe +2 oksidasyonu yapılır. Bu yöntem için heparinize plazma veya serumun sadece 10-11 numune hacmi gerektirir. Bu, 570 ve 700 nm de iki renk tespiti ile iki uç nokta modunda, iki reaktif ile, otomatik olarak yapılmıştır (93). Sonuçlar gram protein başına mikromol olarak ifade edildi.

3.4.4. Toplam Antioksidan Kapasite (TAK) Düzeyi Ölçümü

Total antioksidan status (TAK) düzeyi tüm dokularda, Erel tarafından geliştirilen yeni bir otomatik kolorimetrik metod ile ölçüldü (94, 95). Bu metodta sarı-kahverenkli çok güçlü biyolojik radikal olan hidroksil radikali, fenton reaksiyonu ile renksiz bir substrat olan O-diznizidin ile reaksiyone girerek dianizil radikali üretir. Bir plazma örneğinde, hidroksil radikalleri başlangıçta oksidatif reaksiyona girer, tüm homojenatın antioksidan komponentleri renk değişimine göre total antioksidan kapasiteleri ölçülür. Tahlil % 3 daha düşük mükemmel kesinlik değerleri vardır. Sonuçlar mmol Trolox Eqv/g protein olarak ifade edildi.

3.4.5. Toplam Oksidan Status (TOS) Düzeyi Ölçümü

Total oksidan status (TOS) düzeyi, Erel tarafından geliştirilen tam otomatik bir yöntem olup, testin çalışma prensibinde ifade edildiği üzere örneklerin içerdiği oksidan moleküllerin ferroz iyonu ferrik iyonla kümülatif olarak oksitlemesine dayanan, kolorimetrik bir yöntemdir. Kalibratör olarak Hidrojen Peroksit kullanılır. Sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv./L olarak ifade edildi (96)

3.4.6. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Ölçümü

Örneklerin oksidatif stres indeksi (OSİ), örneklerin toplam oksidan status (TOS) düzeylerinin, örneklerin toplam antioksidan kapasite (TAK) oranına yüzdesi olarak belirtilir. Hesaplamadan önce TAK testinin birimindeki mmol değeri TOS testindeki gibi mikromol birimine çevrilir. Sonuçlar Arbitrary Units olarak ifade edilir. OSİ (arbitrary unit) $\frac{1}{4}$ TOS (mmol H₂O₂ equiv. /L) / TAK (mmol Trolox Equiv./L) (97)

3.4.7. Mikroprotein Ölçümü

Mikroprotein düzeyi Lowry methodu ile ölçülür (98).

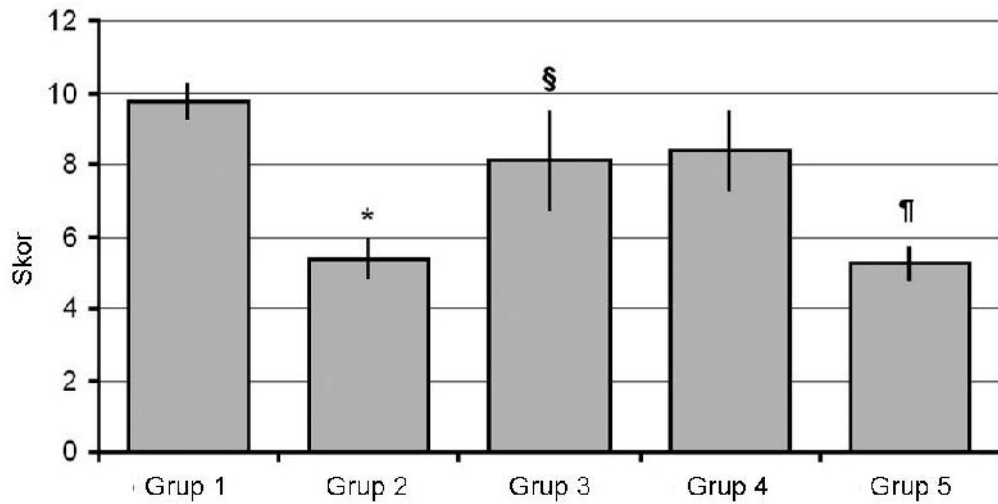
3.5. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Elde edilen değerler ortalama standart sapma olarak belirtildi. İki den fazla grubun karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. İki grup arasındaki karşılaştırmalarda ise biyokimyasal verilerin değerlendirilmesinde PostANOVA (Student-Newman-Keuls) testi, histopatolojik verilerin değerlendirilmesinde Mann-Whitney U testi kullanıldı. $P < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

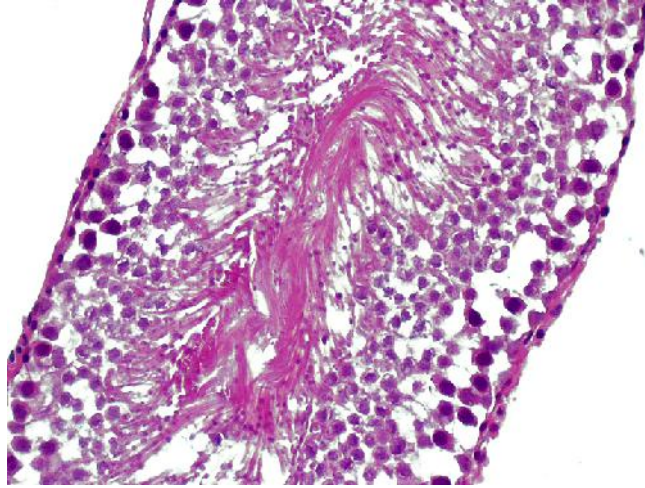
4. BULGULAR

4.1. HİSTOPATOLOJİ

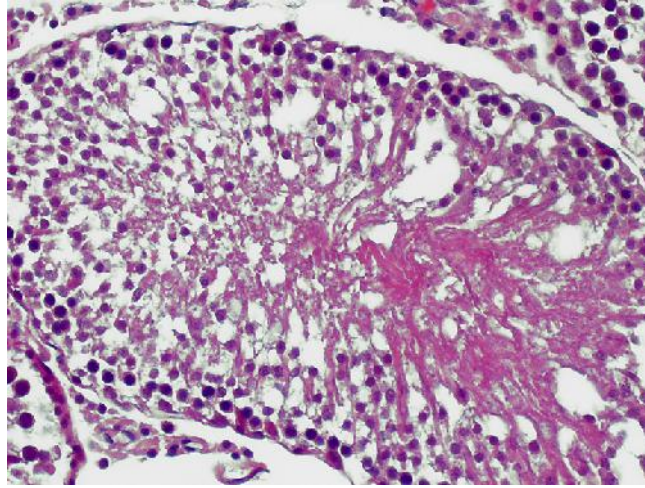
Histopatolojik skarlama sonuçları Şekil 5'te gösterilmiştir. Germinal epitel histopatolojik olarak değerlendirildiğinde Grup 1'de bulunan hayvanlardan alınan testis örneklerinde herhangi bir lezyon saptanmadı (Şekil 6). İR kontrol grubunda (Grup 2) spermatozoa, spermatid ve geç spermatid kaybı gibi şiddetli histopatolojik lezyonlar görüldü (Şekil 7). MJS Grup 1 ile karşılaştırıldığında Grup 2'de anlamlı olarak düşüktü. Grup 3'te, MJS Grup 2'ye göre anlamlı derecede yüksek bulundu (Şekil 8). Grup 3 ve 4 arasındaki istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. MJS'u Grup 5'te Grup 3 göre anlamlı derecede düşüktü.



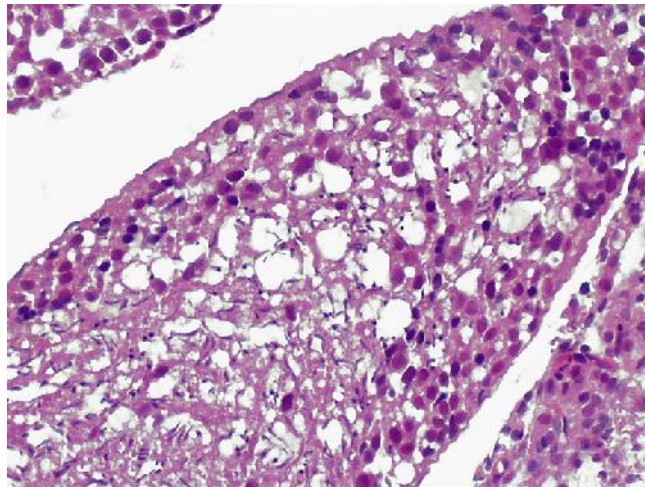
Şekil 5: Gruplarda histopatolojik skarlama sonuçları. * Grup 1 ile karşılaştırıldığında $P=0.0002$,
 §Grup 2 ile karşılaştırıldığında $P=0.0027$, ‡Grup 3 ile karşılaştırıldığında $P=0.0019$.



Şekil 6: Normal spermatogenezisin izlendiği seminifer tubül (H&E, x200)



Şekil 7: Spermatozoa ve spermatidin izlenmediği ancak çok sayıda spermatositin izlendiği seminifer tubul (H&E, x100)

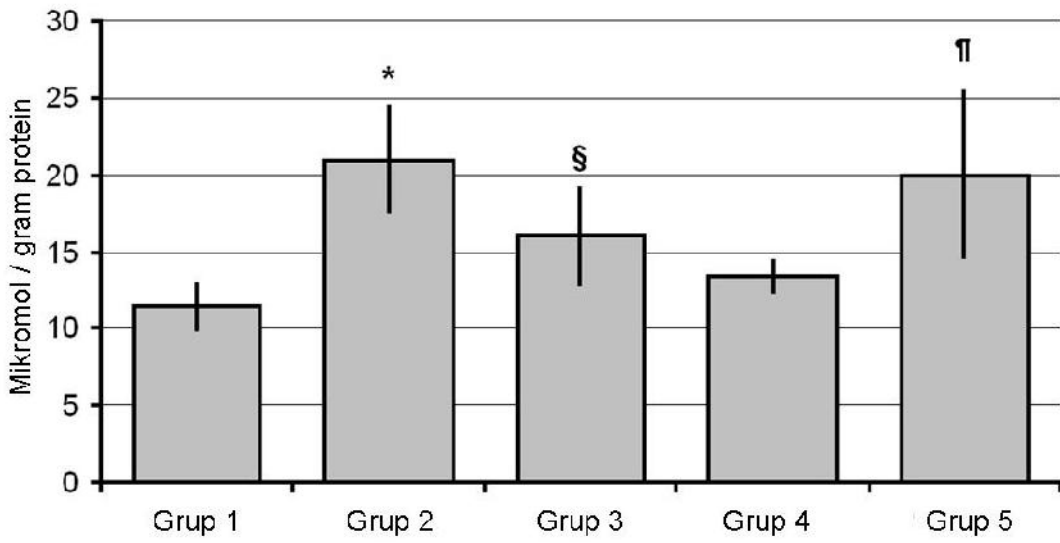


Şekil 8: Hafif bozulmuş spermatogenesis ile birlikte epitelde düzensizlik izlenen seminifer tubül (H&E, x200)

4.2. BİYOKİMYA

LOOH

Lipit hidroperoksit sonuçları Şekil 9’da gösterilmiştir. LOOH İR grubunda sham grubuna göre anlamlı olarak yüksek, Grup 3’te saptanan değerler ise İR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu. Grup 3 ve Grup 4 arasındaki fark anlamsızdı. Grup 5 LOOH değerleri Grup 3’e göre anlamlı olarak yüksekti.



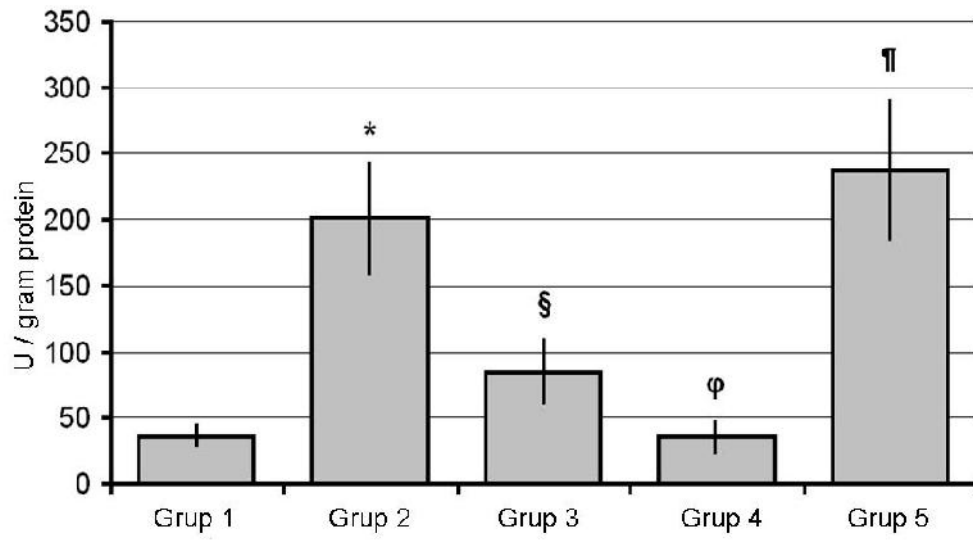
Şekil 9: Grupların Lipitperoksit konsantrasyonları. *Grup 1 ile karşılaştırıldığında $P < 0.001$, §Grup 2 ile karşılaştırıldığında $P < 0.05$, Grup 3 ile karşılaştırıldığında $P < 0.05$.

MPO

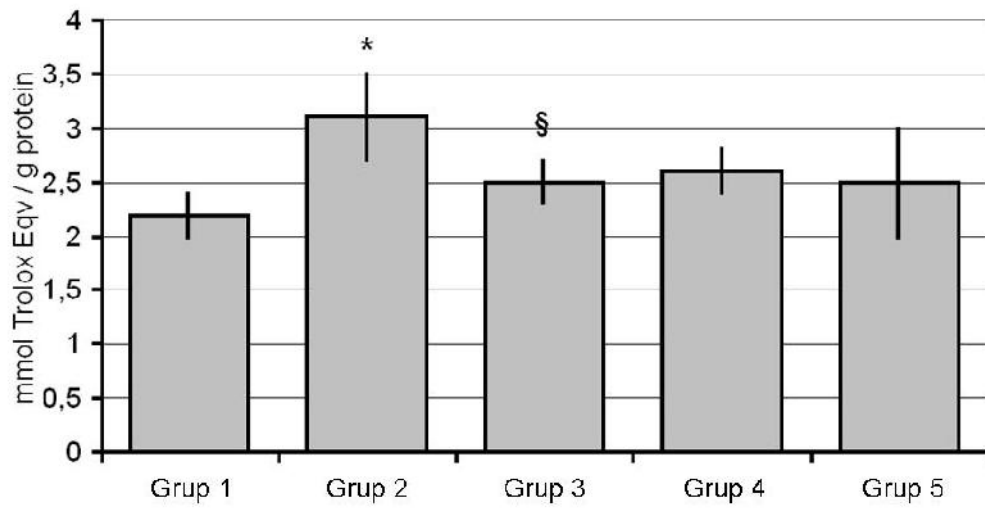
Tüm grupların MPO sonuçları Şekil 10’da gösterilmiştir. Grup 2’de MPO düzeyleri Grup 1’e göre anlamlı derecede yüksek, Grup 3 ve Grup 4’te saptanan düzeyler Grup 2’den anlamlı olarak düşük bulundu. Grup 5 MPO düzeyleri Grup 3’den anlamlı derecede yüksekti.

TAK

Sonuçlar Şekil 11’de gösterilmiştir. Grup 2’de TAS düzeyleri Grup 1’e göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Grup 3 ve Grup 2 karşılaştırıldığında, Grup 3 te TAK düzeyleri Grup 2’e göre anlamlı dercede düşüktü.



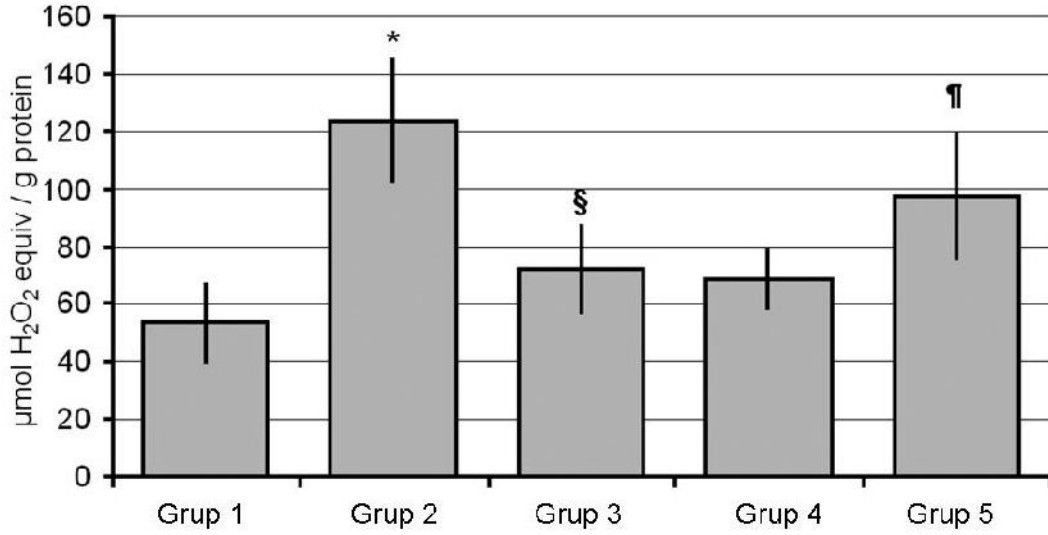
Şekil 10: Grupların MPO düzeyleri. *Grup 1 ile karşılaştırıldığında $P<0.001$, § Grup 2 ile karşılaştırıldığında $P<0.001$, φGrup 3 ile karşılaştırıldığında $P<0.05$, ¶ Grup 3 ile karşılaştırıldığında $P<0.001$.



Şekil 11: Grupların TAS düzeyleri. *Grup 1 ile karşılaştırıldığında $P<0.001$, §Grup 2 ile karşılaştırıldığında $P<0.01$

TOS

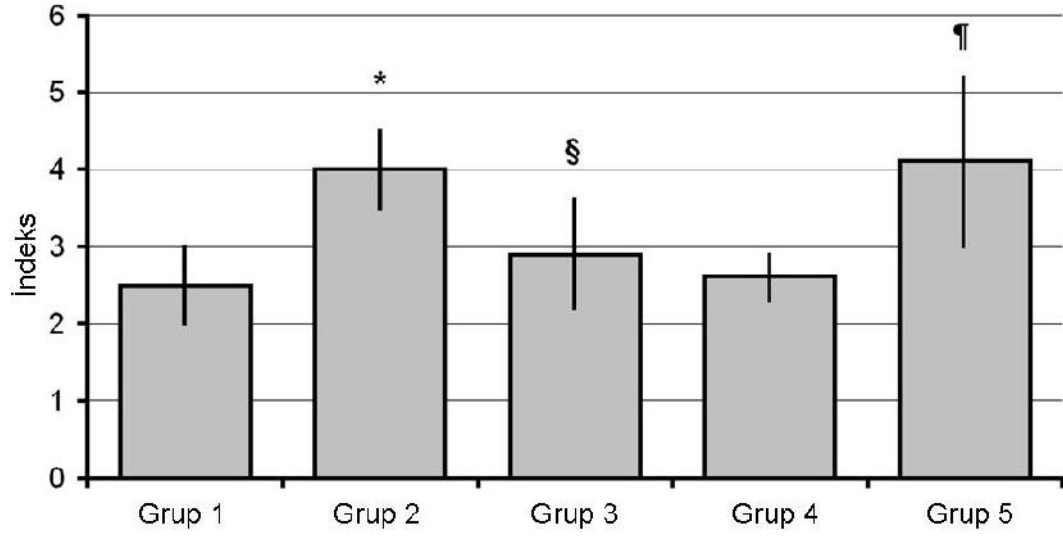
Grupların sağ testis TOS sonuçları Şekil 12’de gösterilmiştir. Grup 2 ve Grup 1 karşılaştırıldığında, TOS düzeyleri Grup 2’de Grup 1 göre anlamlı derecede yüksekti. Grup 3 ile Grup 2 karşılaştırıldığında, TOS düzeyleri Grup 3’te anlamlı derecede düşük bulundu. Grup 3 ve Grup 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Grup 5 ve Grup 3 karşılaştırıldığında, TOS düzeyleri Grup 5’te anlamlı derecede yüksek bulundu.



Şekil 12: Grupların TOS düzeyleri. *Grup 1 ile karşılaştırıldığında $P < 0.001$, §Grup 2 ile karşılaştırıldığında $P < 0.001$, ¶Grup 3 ile karşılaştırıldığında $P < 0.01$.

OSİ Değerleri

Grupların testis dokusu OSİ değerleri Şekil 13’te gösterilmiştir. Grup 2 ile Grup 1 karşılaştırıldığında, OSİ Grup 2’de Grup 1’e göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Grup 3 ile Grup 2 karşılaştırıldığında, OSİ değeri Grup 3’te anlamlı olarak düşük saptandı. Grup 3 ve Grup 4 arasında anlamlı fark yoktu. Grup 5 ve Grup 3 karşılaştırıldığında, OSİ’nin Grup 5’te Grup 3’e göre anlamlı dercede artmış saptandı.



Şekil 13: OSİ sonuçları. *Grup 1 ile karşılaştırıldığında $P < 0.001$, §Grup 2 ile karşılaştırıldığında $P < 0.01$, ¶Grup 3 ile karşılaştırıldığında $p < 0.01$

5.TARTIŞMA

Bu deneysel çalışmada sıçan spermatik kordunun 180 dakika süreyle klampe edilmesiyle gerçekleştirilen testis iskemisi ve ardından uygulanan 60 dk süreli reperfüzyon testis dokusunda İR yaralanmasına yol açmıştır. Oluşan İR hasarı sıçan testisinin germinal epitelinde histolojik lezyonlara ve incelenen biyokimyasal parametrelerde oksidatif strese bağlı değişikliklere neden olmuştur. Çalışmamızda uygulanan iskemik önkoşullama protokolü meydana gelen İR hasarı üzerinde olumlu etki göstererek testis incinmesini azaltmıştır. 5-HD uygulaması iskemik önkoşullamanın İR yaralanmasına karşı oluşan koruyucu etkisini engellemiştir. Y-27632 ise iskemik önkoşullamanın testis İR hasarı üzerindeki olumlu etkisinde önemli bir değişikliğe yol açmamıştır.

Bir organın maruz kaldığı kısa süreli iskemi dönemleri, bu organda daha sonra oluşabilecek uzun süreli bir iskeminin neden olacağı hücre ölümünü önleyebilir. Kısa iskemi dönemlerinin oluşturduğu bu koruyucu etki iskemik önkoşullama olarak adlandırılmaktadır. İskemik önkoşullamanın koruyucu etkisi ilk kez kalp kasında gösterilmiştir (4). Bunu takip eden çalışmalarda santral sinir sistemi, karaciğer, barsak, retina, iskelet kası, akciğer ve böbrek gibi farklı organlarda da iskemik önkoşullamanın koruyucu etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (6, 7, 8, 9, 99, 100). İskemik önkoşullamanın testis iskemisi üzerindeki rolü üzerinde yapılmış az sayıda çalışma mevcuttur. 2005 yılında yayınlanan deneysel çalışmamızda 10 dk iskemi ve 10 dk reperfüzyon şeklinde gerçekleştirilen 1 ve 3 döngülü iskemik önkoşullamanın, sıçanda spermatik kordun 90 dk süreli 720 derece torsiyonun meydana getirdiği testis iskemisi sonucu ortaya çıkan doku hasarı üzerinde koruyucu etkisinin olmadığını gözlenmiştir (14). Şahinkanat ve arkadaşları iskemik önkoşullamanın sıçan testisinin 180 dk süreli iskemisi ile oluşan doku iskemisi üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir (15). Yazarlar bu çalışmada kalıcı iskemi hasarı öncesinde 6 farklı

iskemik önkoşullama protokolü uygulamışlardır. Bu protokollerin ikisinde (1 ve 3 siklüs şeklinde 10 dk iskemi ve 10 dk reperfüzyon) iskemik önkoşullamanın iskemi grubuna göre biyokimyasal parametrelerde anlamlı düzeyde olumlu yönde değişiklik gösterdiğini bildirmişleridir. Bu çalışmada, tek siklüs 10 dk iskemi ve 10 dk reperfüzyon şeklinde uygulanan önkoşullama yalnızca MDA düzeylerinde anlamlı düşmeye, aynı döngünün 3 siklüs 10 dk uygulaması ise MDA ve NO düzeylerinde iskemi kontrol grubuna göre anlamlı azalmaya yol açmıştır. Yazarların uyguladığı 20 dk iskemi ve 10 dk reperfüzyon, 30 dk iskemi ve 10 dk reperfüzyon ve bunların 3 siklüs kombinasyonlarından oluşan iskemik önkoşullama protokolleri, iskemi kontrol grubuna göre biyokimyasal parametrelerde anlamlı bir değişiklik oluşturmamıştır. Buna karşın yazarlar uyguladıkları ve yularıda özetlenen tüm iskemik önkoşullama protokollerinin, iskeminin neden olduğu histopatolojik hasarlanma skorlarında anlamlı düzelme sağladığını bildirmişleridir (15). 2009 yılında yayınladıkları çalışmalarında Shimizu ve arkadaşları (16) 3 döngülü 5 dk iskemi ve 5 dk reperfüzyon periyotlarından oluşan iskemik önkoşullamanın sıçan testisinin 60 dk iskemi ve 120 dk reperfüzyonu ile oluşturulan İR yaralanması üzerinde olumlu etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Yazarlar İR grubuyla karşılaştırdıklarında İR öncesi iskemik önkoşullama uyguladıkları grupta histopatolojik bulgulara düzelme yanında MDA, 8-hidroksideoksigenaz, 70 mRNA ısı şok proteini düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma saptarken süperoksit dismutaz, katalaz, DNA fragantasyonu ve apoptotik hücrelerde fark olmadığını bildirmişlerdir (16). Bu bilgiler bizi testisin İR yaralanması üzerinde iskemik önkoşullamanın koruyucu etkisi ve bu etkinin mekanizması üzerinde yeni bir inceleme yapmaya yöneltmiştir. Sunduğumuz bu yeni çalışmada, İR öncesinde 5 dk iskemi ve 5 dk reperfüzyon dönemlerinden oluşan üç siklüs 10 dk iskemik önkoşullama uygulanarak İR hasarı üzerindeki etkisi araştırılmış ve bunun yanısıra mitokondride K_{ATP} kanallarını bloke ederek iskemik önkoşullamanın inhibisyonuna yol açtığı bilinen 5-HD ve selektif bir Rho-kinaz enzim inhibitörü olan Y-27632'nin testisin iskemik önkoşullaması üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Bu çalışmamızda önce uyguladığımız İR protokolünün testis üzerindeki etkileri incelenmiştir. Yalnızca İR hasarı yapılan sıçanların testis dokularında histopatolojik incelemesinde seminifer tubullerde ciddi hasar gözlenmiştir. Grup 2'deki sıçanların testisinde saptanan MJS sham grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. İskemik

önkoşullama uygulanan sıçanların testis histolojisinde İR grubuna göre belirgin bir düzelme gözlenmiş, MJS, grup 2'ye göre anlamlı olarak artmıştır. Bu durum iskemik önkoşullamanın İR hasarlanması üzerinde gösterdiği olumlu etkiye bağlanmıştır.

İR yaralanmanın yol açtığı testiküler incinme yaptığımız biyokimyasal incelemelerle de ortaya konmuştur. Oksidatif stres sırasında dokuda oluşan SOR hücre membranında bulunan poliansatüre yağ asitlerine zarar verir ve ortamda lipidperoksit oluşur. Lipidperoksit MDA'ya ayrışır. MDA stabil bir moleküldür ve bu özelliği nedeniyle dokuda İR hasarını ortaya koyan bir belirteç olarak kullanılır (101). Sunduğumuz çalışmamızda İR hasarının testis dokusunda lipidperoksit düzeyinde anlamlı yükselmeye yol açtığı görülmüştür. Bu sonuç İR sinucunda testis hücrelerinin hasar gördüğünü göstermektedir. İskemik önkoşullama uygulanan grupta lipidperoksit düzeyleri İR grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bu veriye dayanarak uygulanan deneysel protokollerde iskemik önkoşullamanın İR'nin sıçan testis dokusunda yol açtığı hücre hasarının önüne geçtiğini söyleyebiliriz.

MPO, nötrofillerin primer granülleri içinde saklanan bir enzimdir. Bir dokuda MPO enzim aktivitesinin artışı o dokuda nötrofil birikiminin ve gelişen inflamatuvar sürecin bir belirteçidir (102). Testisin İR yaralanmasında oluşan inflamasyon doku MPO enzim aktivitesinde artışla sonuçlanır (103). Çalışmamızda İR yaralanması, sham grubuyla karşılaştırıldığında testis dokusunda MPO enzim aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olmuştur. Bu artış, testis İR yaralanmasının dokuda meydana getirdiği inflamatuvar sürecin bir sonucudur. Grup 3'te yer alan sıçanlarda İR öncesi uygulanan iskemik önkoşullama testis dokusunda İR hasarında artan MPO aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürmüştür. Bu düşüş iskemik önkoşullamanın testisteki koruyucu etkisinin bir kanıtı olarak yorumlanmıştır.

Bu çalışmada toplam oksidatif stresin daha hassas bir şekilde değerlendirilmesi amacıyla toplam oksidatif ve antioksidatif kapasiteler ve oksidatif stres indeksi ölçüldü. Oksidatif stres, oksidatif ve antioksidatif parametrelerin ölçümüyle elde edilen OSI ile değerlendirildi. Toplam antioksidatif kapasite (TAK) ve toplam oksidatif seviyenin (TOS) belirlenmesi son yıllarda Erel tarafından geliştirilen yeni ölçüm metodlarıyla gerçekleştirildi. (94, 96, 104, 105). SOR ölçümünde lipid peroksidasyon ürünlerinin değerleri kullanılabilir. TOS'un ölçülmesi lipid peroksidasyonu ve oksidatif stresin

hassas bir şekilde ortaya konmasını sağlar (104). Çalışmamıza uyguladığımız deneysel protokolde oluşturulan İR hasarı testis dokusunda TAK, TOS ve OSI değerlerinde sham grubuna kıyasla anlamlı derecede artışa yol açtı. İR öncesi gerçekleştirilen iskemik önkoşullama ise her üç parametrede anlamlı düşme sağladı. Bu gözlemlere dayanarak iskemik önkoşullamanın testis dokusunda İR'nin neden olduğu lipid peroksidasyonu ve oksidatif stresi azaltarak hücre bütünlüğünde koruma sağladığını söyleyebiliriz.

İskemik önkoşullamanın etki mekanizmasını incelemeye yönelik çalışmalar devam etmektedir. Adenozin A_1 reseptörü ve/veya ATP'ye duyarlı potasyum kanallarının (K_{ATP}) işlevi bu iskemik önkoşullama etki mekanizmaları araştırmalarında üzerinde en yoğun çalışılan konu başlıklarıdır (106, 107). Mitokondrial K_{ATP} kanalları iskemik önkoşullamanın genel mediyatörüdür. K_{ATP} kanalların açılması iskemik önkoşullamanın koruyucu etkisini artırırken, inhibisyonu bu olumlu etkiyi ortadan kaldırmaktadır (106). Sunduğumuz çalışmada kullanılan 5-HD bir K_{ATP} kanal blokeridir. Schultz ve arkadaşları 5-HD'nin kalp kasında iskemik önkoşullamanın iskemiye karşı olumlu etkilerini ortadan kaldırdığını göstermiştir (107). Çalışmamızda 5-HD'nin iskemik önkoşullamanın testisin İR yaralanması üzerindeki koruyucu rolü üzerindeki etkisini araştırmayı amaçladık.

İskemik önkoşullama öncesinde i.p. 5-HD enjeksiyonu uygulanan deneklerde iskemik önkoşullamanın testisin İR yaralanması üzerindeki olumlu etkileri engellenmiştir. Bu deneklerde MJS anlamlı olarak düşerek İR grubu seviyesine gerilemiştir. MDA ve MPO grup 3'e göre anlamlı artış göstermiştir. Toplam oksidatif ve antioksidatif kapasiteler ve oksidatif stres incelendiğinde TAK değerleri grup 3'e göre farklılık göstermezken, TOS ve OSI'de belirgin artış gözlenmiştir. Çalışmamızda 5-HD iskemik önkoşullamanın koruyucu etkilerini ortadan kaldırmıştır. Literatür bilgilerine ve elde olunan sonuçlara dayanarak 5-HD'nin iskemik önkoşullamanın sıçan testisinin İR yaralanması üzerindeki yararlı etkisinin ortadan kaldırdığını söyleyebiliriz. Bulgularımız K_{ATP} kanallarının iskemik önkoşullamanın genel mediatörü olduğu görüşünü (107) desteklemektedir.

Rho kinaz RhoA, RhoB ve RhoC gibi Rho proteinlerinin enzimatik reaksiyonlarını katalize eder (108). Rho-kinaz, hücre morfolojisindeki değişimler, hücre hareketliliği, aktin stres liflerinin oluşumu, fokal adezyonlar ve sitokin oluşumu gibi

fonksiyonların oluşmasında önemli rol oynar (109, 110). Bunun yanısıra Rho kinaz İR hasarının oluşum mekanizmasında etki gösterir. Yapılan bir çalışmada Rho/Rho kinaz yolağının aktivasyonunun, yağlı karaciğer dokusundan izole edilen hücreleri İR hasarına yatkın hale getirdiği gösterilmiştir (111). Rho kinazın serebral iskemiye aktive ettiği, buna karşın Rho kinaz inhibitörlerinin iskemiye fokal serebral infarkt alanlarının küçülmesini sağladığı ortaya konmuştur (112). Böbrek üzerinde yapılan bir deneysel araştırmada renal Rho kinaz enziminin İR'ye bağlı doku hasarını artırdığını, buna karşın Rho kinaz yolağının inhibe edilmesinin böbrekteki İR hasarını hafiflettiği gösterilmiştir (113). İskemik önkoşullama Rho kinaz yolağını inhibe ederek etki göstermektedir. Rho kinazın inhibe farmakolojik olarak edilmesiyle iskemik önkoşullamanın olumlu etkilerine benzer faydaların edilebileceği düşünülmüştür.

Y-27632 selektif bir Rho kinaz inhibitörüdür ve enzimin ATP bağlayıcı bölgesiyle yarışmaya girerek etki yapar (12). Demiryürek ve arkadaşları gerçekleştirdikleri *in vivo* deneysel çalışmada 0,1 mg/kg dozda verilen Y-27632'nin önkoşullamayı taklit ederek sıçanlarda koroner arter tıkanıklığı nedeniyle oluşan iskemi sonucu ortaya çıkan aritmiyi engellediğini göstermişler ve Y-27632 potansiyel bir farmakolojik önkoşullayıcı ajan olabileceğini belirtmişlerdir (10). Sakamoto ve arkadaşları (114) sıçan kalp hücreleri üzerinde yaptıkları *invitro* çalışmada, uygulanan 1 mM Y-27632'nin erken iskemik önkoşullamanın kalpteki koruyucu etkisini değiştirmedeğini, buna karşın 10mM dozunda uygulanan Y-27632'nin sıçanlarda iskemik önkoşullamanın myokard üzerindeki koruyucu etkisini ortadan kaldırdığını göstermişlerdir. Bu gözlemlerine dayanarak, yazarlar, Y-27632'nin sıçan kalbinde gelişen iskemik hasar üzerindeki olumlu önkoşullama etkisinin doza bağımlı olduğunu, yüksek dozlarda Y-27632'nin, beklenenin tersine, iskemik hasarın daha da artmasına neden olabileceği yönünde görüş bildirmişlerdir (114). Sunduğumuz bu çalışmada, iskemik önkoşullama öncesinde grup 4'de verilen 0,3 mg/kg Y-27632, iskemik önkoşullama uygulanan grup 3'de bulunan sıçanların testis dokusundaki MPO enzim aktivitesine göre istatistiksel olarak önemli düşme sağlamıştır. Bu sonuç Y-27632'nin iskemik önkoşullamanın İR'nin dokuda neden olduğu inflamatuvar sürecin önlenmesine katkıda bulunduğu yönünde yorumlamak mümkün olabilir. Ancak Y-27632 uygulamasının çalışılan histolojik ve diğer biyokimyasal parametrelerin grup 3'e göre anlamlı farklılık göstermediği görülmüştür. Elde edilen verilere dayanarak çalışmamızda uygulanan

protokole göre verilen Y-27632'nin iskemik önkoşullamanın koruyucu etkisinde belirgin bir değişiklik yapmadığı kanaatine varılmışır.

Sonuç olarak; bu çalışmada kullanılan İR modeli testis dokusunda hasar meydana getirmiştir. İR öncesinde uygulanan iskemik önkoşullama bu hasarın azalmasını sağlamıştır. 5-HD iskemik önkoşullamanın yararlı etkilerini bloke etmiş, Y-27632 ise iskemik önkoşullamanı yararlı etkileri üzerinde belirgin değişikliğe yol açmamıştır. Geliştirilmesi muhtemel farmakolojik önkoşullama tekniklerinin gelecekte testis torsiyonu tedavisinde kullanım alana bulabileceğı görüşündeyiz.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1) Spermatik kodun 180 dk klempe tutularak testis kan akımının engellenmesi ve klampin açılarak 60 dk boyunca organın reperfüzyonu testiste iskemi ve reperfüzyon hasarlanmasına yol açar.

2) Bu deneysel çalışmada uygulanan iskemik önkoşullama modeli (5 dk iskemi ve 5 dk reperfüzyon, 3 siklslü) testisin iskemi ve reperfüzyon hasarında belirgin azalmaya yol açmıştır.

3) 0.3 mg/kg/gün dozda uyulanan Y-27632 sıçan testisinin İR yaralanmasında iskemik önkoşullamanın sağladığı koruyucu etkiyi değıştirmemiştir.

4) 5-hidroksi dekanolik asit iskemik önkoşullamanın testisin iskemi ve reperfüzyon yaralanması üzerindeki koruyucu etkisini ortadan kaldırmıştır.

5) Önkoşullama yapan farmakolojik ajanların klinik kullanıma girmesiyle, testis torsiyonu sonucu gelişen doku hasarının tedavisinde yeni alternatifler geliştirilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Rowe MI. Testis torsion. Essentials of Pediatric Surgery. St. Louis: Mosby-Year Book Inc, 1995:457-459.
2. Cadenas E. Mechanisms of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification. In: Ahmad S (Ed.). Oxidative stress and antioxidant defences in biology. New York: Chapman and Hall.1995:4-47.
3. Prillaman HM, Turner TT. Rescue of testicular function after acute experimental torsion. J Urol.1997;157:340-345.
4. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation. 1986;74:1124-1136.
5. Sommerschild HT, Kirkebøen KA. Preconditioning - endogenous defence mechanisms of the heart.. Acta Anaesthesiol Scand. 2002;46:123-137.
6. Dawson VL, Dawson TM. Neuronal ischaemic preconditioning. Trends Pharmacol Sci.2000;21:423-424.
7. Bonventre JV. Kidney ischemic preconditioning. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2002;11:43-48.
8. Aksöyek S, Cinel I, Avlan D, Cinel L, Oztürk C, Gürbüz P, Nayci A, et al. Intestinal ischemic preconditioning protects the intestine and reduces bacterial translocation. Shock. 2002;18:476-480.
9. Toprak AB, Ozbilgin K, Toprak V, Tuglu I, Guler C. A histological analysis of the protective effect of ischemic preconditioning in the rat retina. Curr Eye Res.2002;24:234-239.

10. Demiryürek S, Kara AF, Celik A, Tarakçıoğlu M, Bağci C, Demiryürek AT. Effects of Y-27632, a selective Rho-kinase inhibitor, on myocardial preconditioning in anesthetized rats. *Biochem Pharmacol.*2005;69:49-58.
11. Riento K, Ridley AJ: Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol.*2003;4:446-456.
12. Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, Maekawa M, et al: Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol Pharmacol* 2000;57:976-983.
13. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature.* 1997;389:990-994.
14. Ceylan H, Yüncü M, Armutçu F, Gürel A, Bağci C, Demiryürek AT. Effects of early phase of preconditioning on rat testicular ischemia. *Urol Int.*2005;74:166-172.
15. Sahinkanat T, Ozkan KU, Tolun FI, Ciralik H, Imrek SS. The protective effect of ischemic preconditioning on rat testis. *Reprod Biol Endocrinol.*2007;5:47.
16. Shimizu S, Saito M, Kinoshita Y, Shomori K, Satoh I, Satoh K. Ischemic preconditioning and post-conditioning to decrease testicular torsion-detorsion injury. *J Urol.*2009;182:1637-1643.
17. Snell RS. *Clinical anatomy.* 3rd ed. Boston: Brown and Company,1986:168-75.
18. Kuran O. *Sistematik anatomi.* İstanbul: Filiz Kitabevi,1983:512-4.
19. Kayalı H. *Özel histoloji.* İstanbul: İstanbul Üniversitesi Film Merkezi,1989:218-28.
20. Sternberg SS. *Histology for pathologist.* New York: Raven Press Lt, 1992: 731-739

21. Sadler TW: Langman's medikal embriyoloji. (Çeviri: AC. Başaklar). 7. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık;1996:274-5.
22. Hutson JM. Undescended testis, torsion and varicocele. In: O'Neill JA, Rowe MI, Grosfeld JL, Fonkalsrud EW, Coran AG (Eds.). Pediatric Surgery. Vol.2, 5th ed. St. Louis: Mosby-Year Book Inc,1998:1099-1101.
23. Prater JM, Overdorf BS. Testicular torsion: a surgical emergency. Am Fam Physician 1991; 44:834-840.
24. Shukla RB. Association of cold weather with testicular torsion. Br Med J 1982;285:1459-1460.
25. Fonkalsrud EW. Testicular undescend and torsion. Pediatr Clin North Am 1987;34:1305-1317.
26. Noseworthy J. Testicular torsion. In: Ashcraft KW (Ed.). Pediatric Surgery 3rd ed. Philadelphia: W.B.Saunders Co,2000:674-680.
27. Aygün C, Erkan İ. Çocuklarda ürolojik sorunlar ve genitoüriner sistem travması. Katkı Pediatri Dergisi 1998;19:5-14.
28. Mitchell RN, Cotran RS, Kumar V, Cotran RS, Robbins SL (Eds.): Hücre zedelenmesi, ölümü ve adaptasyonu. (Çeviri: U. Çevikbaş). Temel Patoloji. 6. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi;2000:3-24.
29. Sawada M, Sester U, Carlson JC. Superoxide radical formation and associated biochemical alterations in the plasma membrane of brain, heart, and liver during the lifetime of the rat. J Cell Biochem.1992;48:296-304.
30. Türkyılmaz Z: Karaciğer İskemi-Reperfüzyon Zedelenmesinde Pentoksifilin, Dimetilsülfoksit ve Eksojen Melatoninin Koruyucu Etkilerinin Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Trakya Üniv. Tıp Fakültesi, Edirne: 2003 (yayınlanmamış).
31. Taşkiran A. Koroner By-Pass Yapılan Olgularda Lipid Hidroperoksit, Antioksidan Kapasite ve Oksidan Strese Trakya Üniv. Tıp Fakültesi, Edirne: 2000. (yayınlanmamış).

32. Akpolat M. Alkolün Oluşturduğu Serbest Radikaller Üzerine İbuprofen ve Erusik Asidin Etkileri. Doktora tezi). Edirne: Trakya Üniv. Sağlık Bilimleri Enst. Edirne: 2000 (yayınlanmamış).
33. Söyük S. Anjiyografik Olarak Saptanan Arter Darlığının Derecesi ile Lipid-Lipoprotein, Lp(A), Apo A-I, Apo B ve MDA Düzeyleri Arasındaki İlişki. Uzmanlık Tezi, Trakya Üniv. Tıp Fakültesi, Edirne: 2001 (yayınlanmamış).
34. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem.1979;95:351-358.
35. Sawada M, Carlson JC. Biochemical changes associated with the mechanism controlling superoxide radical formation in the aging rotifer. J Cell Biochem.1990;4:153-165
36. Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. Mol Cell Biochem.2010;345:91-104.
37. Hawaleshka A, Jacobson. Ischemic preconditioning : Mechanisms and potential clinical applications. Can J Anaesth.1998;45:670-682
38. Cohen MV, Liu GS, Downey JM. Preconditioning causes improved wall motion as well as smaller infarcts after transient coronary occlusion in rabbits. Circulation.1991;84:341-349.
39. Liu Y, Downey JM. Ischemic preconditioning protects against infarction rat heart. AmJ Physiol.1992;263:1107-1112.
40. Van Winkle, Thornton JD, Downey DM, Downey JM. The natural history of preconditioning cardioprotection depends on duration of transient ischemia and time to subsequent ischemia. Coron Artery Dis 1991;2:613-619.
41. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. Circulation 1998; 88:1264-1272.

42. Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, Fuji H, Hori M, Kamada T. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res.*1993;72:1293-1299.
43. Pagliaro P, Gattullo D, Rastaldo R, Lasano G. Ischemic preconditioning is from the first to the second window of protection. *Life Sci.*2001;69:1-15.
44. Shiki K, Hearse D. Precontioning of ischemic myocardium reperfusion induced arthymias. *Am J Physiol.*1987;253:1470-1476.
45. Thornton J, Striplin S, Liu GS, Swatford A, Stanley AW. Inhibition of protein synthesis does not block myocardial protection afforded by preconditioning. *Am J Physiol.*1990;259:1822-1850.
46. Thornton JD, Liu GS, Olsson RA, Downey JM. Intravevenouse pretreatment with A₁-selective adenosine analogues protect the heart againts infarction. *Circulation.* 1992;85:659-665.
47. Neely CF, Keith IM. A₁ adenosine receptor antagonists block ischemia reperfusion injury of the lung. *Am J Physiol.*1995;268:1036-1046.
48. Khimenko PL, Moore TM, Hill LW, Wilson PS, Rizzo A, Taylor AE. Adenosine A₂ receptors reverse ischemia-reperfusion lung injury independent of B receptors. *J Appl Physiol.*1995;78:990-996.
49. Vanhoutte PM. Endothelium-derived free radicals for worse and for better. *J Clin Invest.*2001;107:23-25.
50. Mitchell MB, Meng X, Brown JM, Harke AH, Banerjee A. Preconditioning of isolated rat heart is mediated by protein kinase. *Circ Res.*1995;76:73-81.
51. Vahlhaus C, Schulz R, Post H, Rose J, Heausch G. Prevention of ischemic preconditioning only by combined inhibition of protein kinase C and protein tyrozine kinase in pigs. *J Mol Cell Cardiol.*1998;30:197-209.
52. Kim SO, Salh B, Pelech SL, Wong G, Katz S. Activation of mapkap kinase by Adenosine in rat heart. *J Nih Res.*1997;54:9-15.

53. Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Saklatvala J. Interleukin 1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of hsp 27. *Cell*.1994;78:1039-1049.
54. Guay J, Lambert H, Gingras G, Lavoie JN, Huot J, Landry J. Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase- mediated phosphorylation of heart shock protein 27. *J Cell Sci*.1997;110:357-368.
55. Schultz R, Rose J, Heusch G. Involvement of activation of ATP depended potassium channels in ischemic preconditioning in swine. *Am J Physiol*.1994;267:1341-1352.
56. Kuzmin AL, Gourine AV, Molosh AL, Lakomin VL, Vasort G. Effect of preconditioning on myocardial interstitial levels of ATP and its catabolites during regional ischemia and reperfusion in the rat. *Basic Res Cardiol*.2000;95:127-136.
57. Gross GJ, Fryer RM. Sarcolemmal versus mitochondrial ATP- sensitive K channels and myocardial preconditioning. *Circ Res*.1999;84:973-979.
58. Schoemaker RG, Van CL. Bradykinin mediates cardiac preconditioning at a distance. *Am J Physiol*.2000;278:1571-1580.
59. Pell TJ, Baxter GF, Yellon DM, Drew GM. Renal ischemia preconditioning myocardium role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol*.1998;75:1542-1547.
60. Patel HH, Moore J, Hsuak GJ. Cardioprotection at a distance mesenteric artery occlusion protect the myocardium via an opioid sensitive mechanism. *J Mol Cell Cardiol*.2002;34:1317-1323.
61. Kirsch GE, Codina J, Birnbaumer L, Brown AM. Coupling of ATP sensitive K channels to A₁ receptors by G proteins in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol*.1990;259:820-826.
62. Mizumurz T, Nithipatikom K, Gross GJ. Bimakalim an ATP sensitive potassium channel opener, mimics the effects of ischemic preconditioning to reduce infarct size, adenosinerelease, and neutrophil function in dogs. *Circulation*.1995;92:1236-1245.

63. McCully JD, Toyoda Y, Uematsu M, Stewart RD, Levitsky S. Adenosine-enhanced ischemic preconditioning: Adenosine receptor involvement during ischemic and reperfusion. *Am J Physiol.*2001;280:591-602.
64. Vegh A, Papp JG, Szekeres L, Parrall JR. Prevention by an inhibitor of the L arginine-nitric oxide pathway of the antiarrhythmic effects of bradykinin in anaesthetized dog. *Br J Pharmacol.*1993; 110:18-19.
65. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, Alonzo AJ et al. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP- sensitive K channels: Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res.*1997;81:1072-1082.
66. Miki T, Miura T, Ura N, Ogawa T, Suzuki K, Shimamoto K, et al. Captopril potentiates the myocardial infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning through bradykinin B₂ receptor activation. *J Am Coll Cardiol.*1996;28:1616-1622.
67. Morris SD, Yellon DM. Angiotensin converting enzyme inhibitors potentiate preconditioning through bradykinin B₂ receptor activation in human heart. *J Am Coll Cardiol.*1997;29:1599-1606.
68. Schults R, Post H, Vahlhausc H, Heusch G. Ischemic preconditioning in pigs: A graded phenomenon: Its relation to adenosine and bradykinin. *Circulation.*1998;98: 1022-1029.
69. Wall TM, Sheehy R, Hrtman JC. Role of bradykinin in myocardial preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther.*1994;270:681-689.
70. Aitchison KA, Baxter GF, Awan MM, Smith RM, Yellon DM, Opie LH. Opposing effects on infarction of delta and kappa opioid receptor activation in the isolated rat heart. Implications for ischemic preconditioning. *Basic Res.Cardiol.*2000; 95:1-10.
71. Iwamoto T, Miura T, Adachi T, Noto T, Ogawa T, Tsuchida A, et al. Myocardial infarct size limiting effect of ischemic preconditioning was not attenuated by oxygen free-radical scavengers in the rabbit. *Circulation.*1991;83:1015-1022.

72. Richard V, Kaeffer N, Tronc TC. Ischemic preconditioning protects against coronary endothelial dysfunction induced by ischemia and reperfusion. *Circulation*.1994;89:125-1264.
73. Tanaka M, Fujiwara H, Yamasaki K, Sasayama S. Superoxide dismutase and N-2 mercaptopropionyl glycine attenuate infarct size limitation effect of ischemic preconditioning in the rabbit. *Cardiovasc Res*.1994;28:980-986.
74. Baines CP, Goto M, Downey JM. Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *J Moll Cell Cardiol*.1997;29:207-216.
75. Gopalakrishna R, Anderson WB. Ca^{++} and phospholipid independent activation of protein kinase C by selective oxidative modification of the regulatory domain. *Proc Natl Acad Sci USA*.1989;86:6758-6762.
76. Laude K, Thuillez C, Richard V. Peroxynitrite triggers a delayed resistance of coronary endothelial cells against ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol*.2002;283:1418-1423.
77. Kliegman RM. Neonatal necrotizing enterocolitis: Implication for an infectious disease. *Pediatr Clin North Am* 1979;26:327-344.
78. Altug S, Demiryurek AT, Kane KA, Kanzik I. Evidence for the involvement of peroxynitrite in ischemic preconditioning in rat isolated hearts. *Br J Pharmacol*.2000;130:125-131.
79. Hanley PJ, Dröse S, Brandt U, Lareau RA, Banerjee AL, Srivastava DK, et al. 5-Hydroxydecanoate is metabolised in mitochondria and creates a rate-limiting bottleneck for beta-oxidation of fatty acids. *J Physiol*.2005;562:307-318.
80. Hanley PJ, Gopalan KV, Lareau RA, Srivastava DK, von Meltzer M, Daut J. Beta-oxidation of 5-hydroxydecanoate, a putative blocker of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *J Physiol*.2003;547:387-393.
81. Hanley PJ, Mickel M, Löffler M, Brandt U, Daut J. K(ATP) channel-independent targets of diazoxide and 5-hydroxydecanoate in the heart. *J Physiol*. 2002;542:735-741.

82. Masumoto A, Hirooka Y, Shimokawa H, Hironaga K, Setoguchi S, Takeshita A. Possible involvement of Rho-kinase in the pathogenesis of hypertension in humans. *Hypertension*.2001;38:1307-1310.
83. Robertson TP, Dipp M, Ward JP, Aaronson PI, Evans AM. Inhibition of sustained hypoxic vasoconstriction by Y-27632 in isolated intrapulmonary arteries and perfused lung of the rat. *Br J Pharmacol*.2000;131:5-9.
84. Rees RW, Ralph DJ, Royle M, Moncada S, Cellet S. Y-27632, an inhibitor of Rho-kinase, antagonizes noradrenergic contractions in the rabbit and human penile corpus cavernosum. *Br J Pharmacol*.2001;133:455-458.
85. Vishwanath M, Ma L, Otey CA, Jester JV, Petroll WM. Modulation of corneal fibroblast contractility within fibrillar collagen matrices. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.2003;44:4724-4735.
86. Honjo M, Tanihara H, Inatani M, Kido N, Sawamura T, Yue BY, et al. Effects of rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632 on intraocular pressure and outflow facility. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.2001;42:137-144.
87. Brest P, Turchi L, Le'Negrate G, Berto F, Moreilhon C, Mari B, et al. Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1 inhibits intestinal epithelial wound healing in vitro after mechanical injury. *Infect Immun*.2004;72:5733-5740
88. Hölte M, Hoffmann A, Hofmann F, Mucke C, Grosse G, Van Rooijen N, et al. Role of Rho GTPase in astrocyte morphology and migratory response during in vitro wound healing. *J Neurochem*.2005;95:1237-1248.
89. Tomasek JJ, Vaughan MB, Kropp BP, Gabbiani G, Martin MD, Haaksma CJ, et al. Contraction of myofibroblasts in granulation tissue is dependent on Rho/Rho kinase/myosin light chain phosphatase activity. *Wound Repair Regen*.2006;14:313-320.
90. Gates DH, Lee JS, Hultman CS, Cairns BA. Inhibition of rho-kinase impairs fibroblast stress fiber formation, confluence, and contractility in vitro. *J Burn Care Res*.2007;28:507-513.

91. Unal D, Karatas OF, Savas M, Yeni E, Keser BS, Verit A, et al. Protective effects of trimetazidine on testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *Urol Int.*2007;78:356-362.
92. Wei H, Frenkel K. Relationship of oxidative events and DNA oxidation in SENCAR mice to in vivo promoting activity of phorbol ester-type tumor promoters. *Carcinogenesis.*1993;14:1195-1201.
93. Khelifa Arab and Jean-Paul Steghens. Plasma lipid hydroperoxides measurement by an automated xylenol orange method. *Analytical Biochemistry.*2004;325:158–163.
94. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.*2004;37:277–285.
95. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem.*2004;37:112– 119.
96. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.*2005;38:1103-1111.
97. Kosecik M, Erel O, Sevinc E, Selek S. Increased Oxidative stress in children exposed to passive smoking. *Int J Cardiol.*2005;100:6164.
98. Lowry OH, Rosebrough NL, Farr AL, Randall RF. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*1951;193:265–275.
99. Xu B, Gao X, Xu J, Lei S, Xia ZY, Xu Y, et al. Ischemic postconditioning attenuates lung reperfusion injury and reduces systemic proinflammatory cytokine release via heme oxygenase 1. *J Surg Res.*2011;166:157-64.
100. Andreas M, Schmid AI, Keilani M, Doberer D, Bartko J, Crevenna R, et al. Effect of ischemic preconditioning in skeletal muscle measured by functional magnetic resonance imaging and spectroscopy: a randomized crossover trial *Cardiovasc Magn Reson.*2011;30:13:32.
101. Cooley JC, Lunte CE. Detection of malondialdehyde in vivo using microdialysis sampling with CE-fluorescence. *Electrophoresis.*2011;32:2994-2999.

102. Grisham MB, Benoit JN, Granger DN. Assessment of leukocyte involvement during ischemia and reperfusion of intestine. *Methods Enzymol.*1990;186:729–742.
103. Ozturk H, Ozturk H, Gideroglu K, Terzi H, Bugdayci G. Montelukast protects against testes ischemia/reperfusion injury in rats. *Can Urol Assoc J.*2010;4:174-179.
104. Aycicek A, Ipek A. Maternal active or passive smoking causes oxidative stress in cord blood. *Eur J Pediatr.*2008;167: 81–85.
105. Ziyatdinova GK, Voloshin AV, AKh G, Budnikov HC, Ganeev TS. Application of constant-current coulometry for estimation of plasma total antioxidant capacity and its relationship with transition metal contents. *J Pharm Biomed Anal.*2006;40:958–963.
106. Lim KH, Javadov SA, Das M, Clarke SJ, Suleiman MS, Halestrap AP. The effects of ischaemic preconditioning, diazoxide and 5-hydroxydecanoate on rat heart mitochondrial volume and respiration. *J Physiol.*2002;545:961-974.
107. Schultz JE, Qian YZ, Gross GJ, Kukreja RC. The ischemia-selective KATP channel antagonist, 5-hydroxydecanoate, blocks ischemic preconditioning in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol.*1997;29:1055-1060.
108. Riento K, Ridley AJ: Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol.*2003;4:446-456
109. Rattan S, Phillips BR, Maxwell PJ 4th: RhoA/Rho-kinase: pathophysiologic and therapeutic implications in gastrointestinal smooth muscle tone and relaxation. *Gastroenterology.*2010;138:13-18.
110. Amano M, Chihara K, Kimura K, Fukata Y, Nakamura N, Matsuura Y, et al. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science.* 1997;275:1308-1311.
111. Kuroda S, Tashiro H, Igarashi Y, Tanimoto Y, Nambu J, Oshita A, et al. Rho inhibitor prevents ischemia-reperfusion injury in rat steatotic liver. *J Hepatol.*2012;56:146-152.

112. Rikitake Y, Kim HH, Huang Z, Seto M, Yano K, Asano T, et al. Inhibition of Rho kinase (ROCK) leads to increased cerebral blood flow and stroke protection. *Stroke*.2005;36:2251-2257.
113. Prakash J, de Borst MH, Lacombe M, Opdam F, Klok PA, van Goor H, et al. Inhibition of renal rho kinase attenuates ischemia/reperfusion-induced injury. *J Am Soc Nephrol*.2008;19:2086-2097.
114. Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. Rho-Rho kinase pathway is involved in the protective effect of early ischemic preconditioning in the rat heart. *Biol Pharm Bull*.2011;34:156-159.