

## DENEYSEL ÇALIŞMA

SIÇAN İSKEMİK TESTİSİNDE FARKLI  
ISI UYGULAMASININ ETKİLERİTHE EFFECTS OF DIFFERENT TEMPERATURE APPLICATIONS ON  
ISCHEMIC RAT TESTES

Coşkun BÜYÜKSU  
Arif Kutsi GÜDER  
Murat SADE

## SUMMARY

The histopathological changes in testes were investigated during the short period ischemia of testes after cold application or after leaving in room temperature. Thirty rats have been used in this study. Testes have been kept ischemic for periods of 5,15 or 30 minutes. In this period of time the testes of one group were cooled with ice and the left testes of the other group were taken outside the scrotum. Orchiectomy was performed after 60 days and the testes were examined under light microscopy: for the narrowing of the tubulus diameter and the affected tubulus number.

Statistical analysis revealed that very short period of ischemia may be harmful to the testicular tissue cold ischemia time was significantly longer than warm ischemia time.

(Key Words: Testis, Cold Ischemia, Warm Ischemia.)

## ÖZET

Testislerin kısa süreli iskemisinde, bu süre içinde soğuk tatbiki ile veya testislerin oda sıcaklığında tutulmasıyla meydana gelen histopatolojik değişiklikler değerlendirildi. Bu çalışmada 30 sıçan kullanıldı. Testisler 5-15-30 dakika süre ile iskemik hale getirildi. Bu süre içinde bir grubun sol testisleri buz ile soğutuldu, diğer grubun sol testisleride skrotum dışına alındı. 60 gün sonra orşiektomi yapıldı. Testisler, tubulus çapı daralması ve etkilenen tubulus sayısını araştırmak için ışık mikroskopunda incelendi.

İstatistiksel değerlendirmeler 5 dakika süreli sıcak iskeminin bile testis dokusuna zarar verebildiğini gösterdi. Soğuk iskemi zamanı, sıcak iskemiyeye göre daha uzundu.

(Anahtar sözcükler: Testis, Soğuk İskemi, Sıcak İskemi.)

Üroloji Anabilim Dalı  
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi. Inciraltı - İZMİR  
(Doç. Dr. C. Büyüksu, Prof. Dr. M. Sade)  
Alsancak Devlet Hastanesi  
(Op. Dr. A.K. Güder)

Yazışma : (Doç. Dr. C. Büyüksu)

İskemnin dokular üzerine akut etkileri, dokuların normal fonksiyonlarına olur. Eğer bu fonksiyon vital ise henüz dokularda yapısal değişiklikler olmadan ölüm meydana gelir. Yapısal değişikliklerin meydana gelebilmesi için hücrelerin kollateral dolaşım oluşana kadar yaşaması gerekir (1).

Vücuttaki dokuların iskemik hipoksiye dayanıklılığı belirgin değişiklikler göstermektedir (2).

Son yıllarda kriptorşidizm olgularında mikrovasküler testiküler transfer tekniği uygulanarak abdominal olan veya kısa kordon elemanlarına sahip testislerin skrotuma implantasyonu arındırılan testisler skrotuma yerleştirilip revaskülarize edilmektedir (3, 4, 5). Bu işlem sırasında 1-2 saatlik testis iskemisi söz konusudur. Bundan başka kemoterapi sırasında germinal epitelin korunması için testis arterlerinin oklüzyonu düşünülmüş, Joska Van Vilet koç testislerinde 30-40 dakikalık bir iskemnin germinal epitelde hasar meydana getirmediğini bildirmiştir (6). Ayrıca sıcak iskemnin soğuk iskemiyeye oranla dokulara daha kısa sürede zarar verdiği bilinmektedir. Böbrekler için bir dakikalık sıcak iskemnin 40 dakikalık soğuk iskemiyeye eşdeğer olduğu anlaşılmıştır (7).

Çalışmamızda amacımız; testislerin kısa süreli total iskemiyeye uğratılması halinde testiste oluşabilecek patolojileri gözden geçirmek ve aynı iskemik şartlardaki testislere soğuk uygulamasıyla etkilenmenin değişip değişmediğini gözlemektir. Böylece soğuk uygulaması ile tolere edilebilir iskemik süresi araştırılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız 9 Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Laboratuvarında yapıldı. Ağırlıkları 220-250 Gm arasında değişen 30 adet yetişkin beyaz sıçan (Swiss Albino Rats) kullanılmıştır. Bu sıçanlar 5'erli 6 guruba ayrılmışlardır. 3-4 dakika eter kok-

latılarak cam kavonoz içerisinde uyutulmuşlar, skrotal ve inguinal bölgeleri sterilize edilmiştir.

Tüm hayvanların sol testisleri çalışmaya dahil edilmiş ve skrotal insizyonla testisler dışarıya alınmıştır. Atravmatik bir pensle ductus deferens hariç, kordon klampe edilerek testise total iskemik meydana getirilmiştir.

I. Grup 5 dakika

II. Grup 15 dakika

III. Grup 30 dakika oda sıcaklığında tutulmuştur.

Diğer grup sıçanlarda ise; (IV-V-VI grup) iskemiyeye uğratılmış sol testisler içinde buzlu su bulunan çalışma süresince 4-6 °C sıcaklıkta olan bir kaba daldırılmışlardır. Soğuk tatbiki;

IV. Gruba 5 dakika

V. Gruba 15 dakika

VI. Gruba 30 dakika uygulanmıştır.

Tüm gruplarda sağ testislere hiç bir şey yapılmayarak kontrol grubu olması sağlanmıştır. İşlemler bittikten sonra testis, torsiye edilmeksizin skrotuma yerleştirilmiştir.

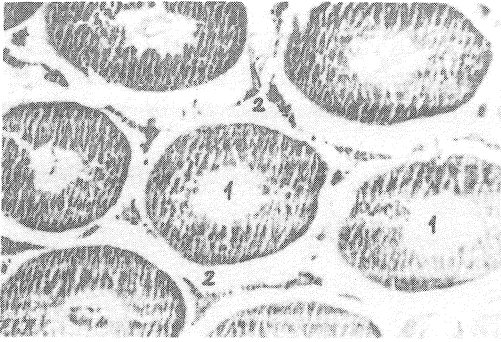
Normal sıçan spermatik siklusünün 48 gün olduğu bilinmektedir (8). Bu yüzden postoperatif 60.ncı günde eter anestezisi altında bütün sıçanlara bilateral orşiektomi uygulandı Boun solüsyonu içinde fikse edilip 24 saat içinde patolojik takibe alındı. Değerlendirmede iki parametre dikkate alınmıştır.

1. Seminifer tubulusların çapları : Işık mikroskobu altında incelenen preparatlarda her bir testis için kesit yüzeyine dik geçen yuvarlak 20 adet seminifer tubulus seçilerek oküler mikrometre ile ölçülmüştür.

II. Spermatogenez oranları : Aynı inceleme esnasında 50 yuvarlak seminifer tubulus incelenerek spermatogenetik hücreler gözlenmiştir. Böylece iskemiden etkilenen tubulusların yüzdeleri her çalışma grubunda ayrı ayrı hesaplanmıştır.

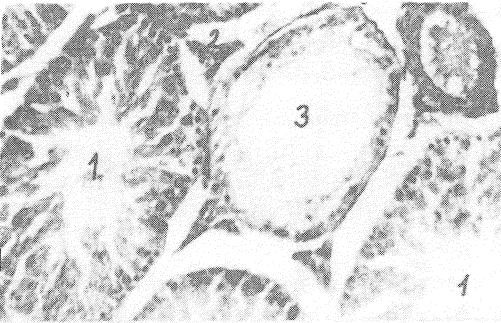
## SONUÇ VE BULGULAR

Her grup kendi kontrol grupları ile karşılaştırıldığında 5 dakikalık soğuk iskemi

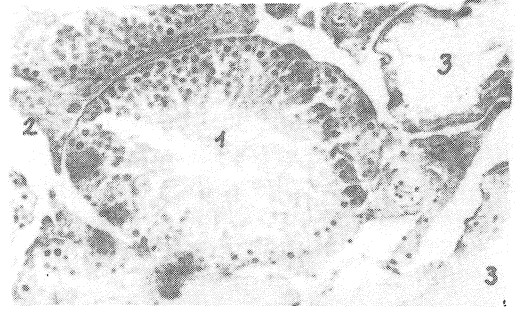


Resim 1: Kontrol Grubu. Normal sınırlarda Seminifer tubulusları (1) ve interstisyumda Leydig hücreleri (2)

grubu dışındaki tüm iskemi gruplarında belirgin seminifer tubulus daralması izlenmiştir (Resim 1, 2, 3).



Resim 2: 5 dakika soğuk iskemi grubu. Normal görünümdeki Seminifer tubulusları arasında (1) atrofik tubulus (3) ve interstisyumda Leydig hücreleri (2)



Resim 3: 5 dakika sıcak iskemi grubu. Sol üstte normal Seminifer tubulusları (1) sağ alt ve yanda atrofik tubuluslar (3).

İskemiden etkilenmiş tubulus oranları karşılaştırıldığında yine 5 dakikalık soğuk iskeminin belirgin seminifer tubulus hasarı oluşturmadığı görülmüştür. Ancak diğer tüm iskemi gruplarında tubuluslar anlamlı oranda hasara uğramıştır (Tablo I-II).

Tüm gruplarda kontrol grubu oluşturan sağ testislerin incelenmesinde belirgin bir fark gözlenmemiştir. Germinal epitelyum, Leydig hücreleri ve Sertoli hücreleri intakt olarak bulunmuştur. Spermatogenezin çeşitli devrelerine ait Spermatogenetik hücreler ile lümende bol miktarda spermium görülmüştür. 5 dakikalık soğuk iskemi grubu histolojik olarak kontrol grubu testislerden farklı bulunmamıştır. Diğer bütün gruplarda ise özellikle kapsüle yakın tübülüslerde atrofi, spermatogenezin çeşitli safhalarında duraksama ve interstisyel alana serum sızması izlenmiştir. Leydig hücreleri, Sertoli hücreleri intakt olarak gözlenmiştir. Atrofik tubulusları arasındaki Sertoli hücrelerinin de intakt olduğu belirlenmiştir (Resim 4-5). Çalışmamızda; Sıcak ve soğuk iskemide tubulus çapları ortalamalarını

TABLO-1 : Ortalama Seminifer tubulus Çapları ve Etkilenmiş Seminifer Tubulus Oranları

GRUP	İŞLEM İskemi / Isı	OTÇ (*)	ETO (**) %	GURUPLAR (KONTROL)	OTÇ (*)	ETO(**) (%)
1	5' Soğuk	245.54±1.82	6.8	7	217.23±206	5.2
2	15' Soğuk	190.58±3.32	12.0	8	209.82±1.98	5.6
3	30' Soğuk	171.73±2.86	13.2	9	210.99±2.19	6.4
4	5' Sıcak	183.95±1.98	18.0	10	205.79±1.88	7.2
5	15 Sıcak	189.28±2.35	23.6	11	227.24±2.00	6.0
6	30' Sıcak	175.37±2.68	36.8	12	218.14±2.01	8.4

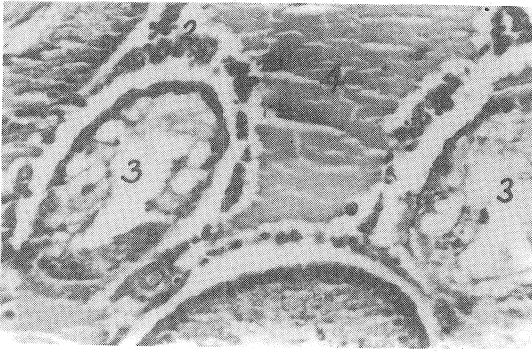
(\*) OTÇ : Ortalama seminifer tubulus çapları

(\*\*) ETO : Etkilenmiş seminifer tubulus oranları

karşılaştırmak üzere "iki ortalama arası farkın önem testi" (t testi) uygulandı.

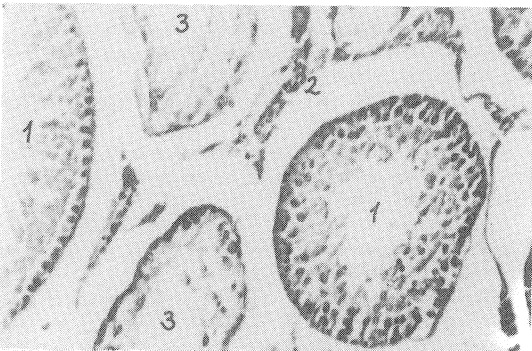
GRUPLAR	ORTALAMA SEMİNİFER TUBULUS ÇAPLARININ KARŞILAŞTIRILMASI		ETKİLENMİŞ TUBULUS ORANLARININ KARŞILAŞTIRILMASI	
	T Test	P	Ki Kare	P
1-7	-0.61	> 0.05	0.567	> 0.05
2-8	-6.31	< 0.01	6.380	< 0.05
3-9	-10.90	< 0.01	6.539	< 0.05
4-10	-8.00	< 0.01	13.240	< 0.01
5-11	-12.30	< 0.01	30.707	< 0.01
6-12	-12.76	< 0.01	57.636	< 0.01

Seminifer tubulus çapları ortalamasının karşı testisteki ile istatistiksel karşılaştırmasını yapmak üzere "eşler arası önem kontrolü için T testi" uygulandı.



Resim 4: 15 dakika sıcak iskemide grubu. Büyük oranda atrofik tubuluslar (3) ve interstisyumda Leydig hücreleri (2) ve serum sızması (4)

Hasara uğramış tubulus oranlarının karşılaştırması için "Ki kare testi" uygulandı.



Resim 5: 30 dakika soğuk iskemide grubu. Normal görünümdeki seminifer tubuluslar (1) yanısıra atrofik tubuluslar (3) ve interstisyumda Leydig hücreleri

## TARTIŞMA

Testis iskemisi ile ilgili çalışmalar son yıllarda mikrovasküler testiküler transfer ve kemoteropötiklerin erkek infertilitesine olan etkileri önemi kazandıktan sonra artmıştır. Yapılmış araştırmalar da testisi irreversibl hasara uğratmayacak iskemide süresinin ne olduğunu belirlemek güçtür. Oettle ve Harrison 10-20 dakikalık iskemide sonrasında belirgin spermatogenetik hasar oluştuğunu bildirdikleri halde, Stern ve arkadaşları sıçan testisinde 45 dakikalık bir iskemide germinal tüplerde belirgin bir hasar yaptığını ancak Sertoli ve Leydig hücrelerinin korunduğunu söylemişlerdir (9). Miller ve arkadaşları sıçan testisi üzerinde sıcak ve soğuk iskemide uygulamışlar. Eksternal buz uygulamasının sıçan testisinde iskemik hasarın 4'üncü ve 6'ncı saatlerinde seminifer tubulusleri belirgin olarak koruduğunu bildirmişlerdir (10). Steinberger ve Tjioe ancak 90 dakikalık iskemide sonrasında belirgin bir değişiklik izlemişler, 120 dakikalık iskemide ise çok şiddetli germinal hücre hasarına yol açtığını bildirmişlerdir (11, 12, 13). Vliet ve arkadaşları 60 dakikalık iskemide koç testislerinde hasar oluşmadığını bildirmişlerdir (6).

Yine Mac Mahon ve arkadaşları ile O'Brien ve arkadaşları mikrovasküler testiküler transfer uyguladıkları çocuk testisleri için bir iki saatlik iskemide süresini bildirmişlerdir. Aynı operasyonu uygulayan Garibyan ve arkadaşları da bu görüşe katılmışlardır (4, 5).

İskemik testis için optimum ısının ne olduğuna ilişkin bir çalışma yapılmamıştır. Böbrek transplantasyonu yaygınlaşmaya başladığı için donör böbreklerini saklamada optimum ısı belirlenmiştir (14, 15, 16, 17). 1986 yılında Lui ve arkadaşları 6 °C civarında soğuk iskemide uyguladıkları testislerde iskemide ilerlediğini bildirdikleri halde 1987 yılında Kelly ve arkadaşları 15 °C kadar soğuttukları testislerde iskemide daha az hasara yol açtığını bildirmişlerdi (8, 18).

Testiküler torsiyon ile ilgili çalışmalarda, karşı testiste de hasar oluşacağı hem deneysel hem de klinik olarak gösterilmiştir (12, 13, 19, 20). İmmunolojik kökenli

oluştugu kabul edilen karşı testisteki bir hasarın 6-8 saatlik bir torsiyon sonrasında oluştuğu ilk bir kaç saat içinde böyle immunolojik bir yanıtın ortaya çıkmadığı bildirilmektedir (21, 22, 23).

Bizim çalışmamızda 5 dakikalık soğuk iskemi hariç, diğer sürelerdeki iskemiden testislerin önemli derecede etkilendiği görüldü (Tablo I-II). Beş dakikalık soğuk iskeminin testiste herhangi bir hasar oluşturmamasına karşın, 5 dakikalık sıcak iskemi anlamlı bir tubulus çapı daralması ve hasarlanmış tubulus sayısı artmasına neden olmuştur. Sıcak iskeminin oluşturduğu tubulus değişiklikleri 15. dakikada da anlamlıydı. Ancak 30 dakikalık iskemi grubunda sıcak ve soğuk iskemiye bağlı tubulus çap daralması aynı oranda izlendi. Fakat hasar gören tubulus oranı sıcak iskemide, soğuk iskemiye göre anlamlı derecede fazla bulunmuştur (Tablo III).

GURUPLAR	ORTALAMA SEMINIFER TUBULUS ÇAPLARI		ETKİLENMİŞ TUBULUS ORANLARININ KARŞILAŞTIRILMASI
	T Test	P	
1-4x7-10	7.35	< 0.01	
2-5x8-11	6.1	< 0.01	
3-6x9-12	1.01	> 0.05	
1-4			14.435 < 0.01
2-5			11.496 < 0.01
3-6			37.13 < 0.01

Sıcak iskeminin süresi arttıkça etkilenen tubulus sayısı da belirgin şekilde artıyordu. Böyle doğru orantılı artışı soğuk iskemide izlemedik. 5 dakikalık sıcak iskemi sonrasında etkilenen tubulus oranının 30 dakikalık soğuk iskemi sonrasında etkilenen tubulus oranında bile fazla olması dikkat çekici bir bulgu idi.

Sonuç olarak 5 dakikalık bir iskeminin bile testisleri kötü yönde etkilediği görülmüştür. Ancak soğuk iskeminin, sıcak iskemiye oranla daha az etkilediği gözlenmiştir. Bu da iskemi süresini arttıracaktır. 15-30 dakikalık soğuk iskemilerde dahi etkilenen tubulus oranları iki kat artmaktadır. Bu da testislere uygulanan iskeminin soğuk şartlarda bile en kısa zamanda bitirilmesi gerektiğini göstermektedir.

## KAYNAKLAR

1. Florey L. *General Pathology* London: Saunders; 1970: 310-3.
2. Robbins, SL. *Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia: Saunders; 1989: 111-3.
3. O'Brien M McC, Rao VK, MacLeod AM, Morrison WA, MacMahon RA. *Microvascular Testicular Transfer*. *Plastic Rec Surg*. 1983; 71: 87.
4. Bianchi A. *Microvascular Orchiopexy for High Undescended Testes*. *Br J Urol* 1984; 56:521-4.
5. Garibyan H, Hazebroek FWJ, Schulkes JAR, Molenaar JC, Dabhoiwala N.F. *Microvascular Surgical Orchiopexy in the Treatment of High-lying Undescended Testes*. *Br J of Urol*. 1984; 56:326-9.
6. Van Vliet J, d'Ruiter-Bootsma AL, Oei YH et al. *Reversible Harmless Interruption of Testicular Blood Supply in the Rat*. *J Andrology* 1987; 8:108-5.
7. Elkadi HK, Mardan AH, Nghiem DD, Southard JH. *The Role of Calcium Antagonists in the Management of Renal Warm Ischemia*. *J Urol*. 1989; 141:974-80.
8. Lui C, La Regina M, Herbold DR, Johnson FE. *Tolerance of Rat Testis to Graded Periods of Total Circulatory Isolation*. *J Surg Oncol*. 1988; 39: 264-8.
9. Stern-JA, Lui RC, La Regina MC, Herbold DR, Tolman KC, Johnson FE. *Long-Term Outcome Following Testicular Ischemia in the Rat*. *J Androl*. 1990; 11 (4): 390-5.
10. Miller DC, Peron SE, Keck RW, Kropp KA. *Effects of hypothermia on testicular ischemia*. *J Urol*. 1990; 143: 1046-1048.
11. Kaya M, Harrison RG. *An Analysis of the Effect of Ischemia on Testicular Ultrastructure*. *J Pathol*. 1974; 117: 105-15.
12. Steinberger A, Tjioe DY? *Spermatogenesis in Rat Testes After Experimental Ischemia*. *Fertil Steril*. 1969; 20:639-48
13. Twioe DY, Steinberger EA. *Quantitative Study of the Effect of Ischemia on the Germinal Epithelium of Rat Testes*. *J Reprod Fert*. 1970; 21: 489.
14. Gowear JD, Fuler BJ, Green CJ. *Prevention by antioxidants of oxidative damage to rabbit kidneys subjected to cold ischemia*. *Biochemical Pharmacology*. 1989; 38: 213-5.
15. Haberal M, Güllay H, Arslan G, Bilgin N. *The Results of Cadaver Kidney Transplantation With Prolonged Cold-Ischemia Time*. *Transplant Proceed*. 1988; 20, (5): 935-7.
16. Walaszewski J, Rowinski W. *Decreased Incidence of Acute Tubular Necrosis After Cadaveric Donor Transplantation*. *Due to Lidocaine*. *Donor Pretreatment and Low-Dose Dopamine Infusion in the Recipient*. *Transplant Proceed*. 1988; 20 (5): 913.
17. Lambotte L, de Hemptinne B, Alvarez-Lopez, Besse T. *Effects of Calcium Blocking Agents and Prostaglandins 12 or E2 on the Tolerance of the Rat Liver To Ischemia*. *Transplant Proceed*. 1988; 20, 5: 986.
18. Kelly MJ, Wheatley R, Smith JHF, Thomas WEG. *Cooling Prevents Ischaemic Testicular Damage after Spermatic Cord Clamping in Rats*. *Int J Androl*. 1987; 10: 721-6.
19. Krarup T. *The Testes after Torsion*. *Br J Urol* 1978; 50: 43-6.
20. Bartsch G, Frank ST, Marberger H, Kikuz G. *Testicular Torsion: Late Results with Special Regard to Fertility and Endocrine Function*. *J Urol* 1980; 124: 375.
21. Ortolano V, Nasrallah PF. *Spermatic Vessel Ligation (Fowler-Stephens Maneuver): Experimental Results with Regard to Fertility*. *J Urol*. 1980; 124: 375.
22. Williamson RCN. *The Continuing Conundrum of Testicular Torsion*. *Br J Surg*. 1985; 72: 509.
23. Lewis-Jones DI, Maroal MM, Harrison RG. *Impairment of Rat Spermatogenesis Following Unilateral Experimental Ischemia*. *Fertil Steril*. 1982; 38: 482-90.