

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK CERRAHİ ANABİLİM DALI

RATLARDA HİDROJENLE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ SALİN SOLUSYONUNUN
TURNİKE UYGULANAN PENİL DOKUDA İSKEMİ REPERFÜZYON
HASARINDAN KORUYUCU ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ
DR. MERVE ALTIN GÜLBURUN

DANIŞMAN
PROF. DR . RAMAZAN KARABULUT

ANKARA 2020

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK CERRAHİ ANABİLİM DALI

RATLARDA HİDROJENLE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ SALİN SOLUSYONUNUN
TURNİKE UYGULANAN PENİL DOKUDA İSKEMİ REPERFÜZYON
HASARINDAN KORUYUCU ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ
DR. MERVE ALTIN GÜLBURUN

DANIŞMAN
PROF. DR . RAMAZAN KARABULUT

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2017-25
proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA 2020

İÇİNDEKİLER

İçindekiler

Tablolar Dizini

Resimler Dizini

Kısaltmalar Dizini

Önsöz

1. Giriş ve Amaç	1
2. Genel bilgiler	3
2.1. Penis Anatomi ve Histolojisi	3
2.1.1. Penisin Kanlanması	4
2.1.2. Penisin Lenf Drenajı	5
2.1.3. Penisin İnnervasyonu	6
2.1.4. Penisin Histolojisi	6
2.2. Mathieu Tip Flep	7
2.3. İskemi	8
2.4. Reperfuzyon ve Hasarı	10
2.5. Serbest Radikaller	12
2.6. Antioksidanlar	15
2.7. Hidrojenden Zengin Salin Solüsyonu	17
3. Gereç ve Yöntem	18
3.1. Deney Hayvanları	18
3.2. Deneysel Çalışma Yöntemi	18

3.3. Biyokimyasal İnceleme	20
3.3.1. Doku Örneklerinin Hazırlanması	20
3.3.2. Dokuda Yapılan Analizler	21
3.4. Histopatolojik İnceleme	23
3.4.1 Apoptozis İndeksi	23
3.5. İstatiksel İnceleme Yöntemi	24
4. Bulgular	25
4.1. Penil Dokudaki Biyokimyasal Analizler	26
4.2. Histopatolojik Değerlendirme ve Apoptotik Analiz	27
5. Tartışma	30
6. Sonuç	37
7. Kaynaklar	38
8. Özet	49
9. Summary	51
10. Ekler	53
11. Özgeçmiş	54

Tablolar Dizini

- 1. Tablo 1: Hücre Hasarlanmasındaki Serbest Radikaller 13**
- 2. Tablo 2: Lowry Metodu ile Protein Tayini için Standartlardan Elde Edilen Eğri 22**
- 3. Tablo 3: Myeloperoksidaz (ng/mg protein), Malondialdehit (nmol/mg protein), Interlökin-6 (pg/mg protein), TNF- α (pg/mg protein) ve GSH (ng/mg protein) Değerlerinin Gruplara Göre Dağılımı ve Standart Sapmaları 25**
- 4. Tablo 4: Gruplarda Kaya M. ve ark. Çalışmasına (3) Göre Doku Hasarı Derecelendirmesi ve Apoptozis İndeksi 28**

Resimler Dizini

- 1. Resim 1: Penis Anatomisi 4**
- 2. Resim 2: Mathieu Tip Flep ve Hazırlanışı (6) 7**
- 3. Resim 3: Turnike Sonrası Mathieu Tip Flep Yapılmış Penil Doku 21**
- 4. Resim 4: Sham grubunda grade 0 hasar penil doku görünümü (H&E boyası, 20'lik büyütme) 29**
- 5. Resim 5: HZSS^B grubunda grade 1 hasar penil doku görünümü (H&E boyası, 20'lik büyütme) 30**
- 6. Resim 6: PT³⁰ grubunda grade 2 hasar penil doku görünümü (H&E boyası, 20'lik büyütme) 30**

Şekiller Dizini

- 1. Şekil 1: İskeminin Hücreye Etkileri 10**

Kısaltmalar Dizini

SOD : Süper oksit dismutaz

CAT : Katalaz

GSH : Glutasyon

H₂O₂ : Hidrojen peroksit

H₂O : Su

O₂ : Moleküler oksijen

O₂⁻ : Süperoksit anyonu

ETZ : Elektron transport zinciri

Fe⁺ : Demir

Cu⁺ : Bakır

Ca⁺² : Kalsiyum

ATP : Adenozin trifosfat

ADP : Adenozin difosfat

AMP : Adenozin monofosfat

DNA : Deoksiribo nükleik asit

IgM : İmmünglobulin m

NAD : Nikotinamid adenin dinükleotit

NADP : Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

XD : Ksantin dehidrogenaz

XO : Ksantin oksidaz

ROS : Reaktif oksijen radiklleri

Zn : Çinko

Mn : Manganez

Se : Selenyum

GSH-R : Glutatyon Redüktaz

CoQ10 : koenzim q

HZSS : Hidrojenden zengin salin solusyonu

MDA : Malondialdehit

TNF- α : Tümör nekrozis faktor alfa

IL-6 : İnterlökin 6

K₂HPO₄ : Dipotasyum fosfat

HETAB : Heksadesitrimetil amonyum bromid

BSA : Bovin serum albumin

NaOH : Sodyum hidroksid

CuSO₄ : Bakırsülfat

Na-K tartarat : Sodyum potasyum tartarat

Pt : Penil turnike

VEGF: Vasküler endotelial growth faktör

İP: İntraperitoneal

H&E: hematoksilen-eozin

ÖNSÖZ

Çocuk cerrahi uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini bizlerle paylaşan; sabırları ve tecrübeleriyle pek çok konuda bize örnek olan, saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Kaan SÖNMEZ, Prof. Dr. Zafer TÜRKYILMAZ, Prof. Dr. İ. Onur ÖZEN, Prof. Dr. Y. Hakan Çavuşoğlu, Öğr. Üyesi Dr. Cem Kaya'ya,

Eğitimim boyunca sadece cerrahi konularda değil, her alanda desteğini yanımda hissettiğim, tez çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen hocam Prof. Dr. Ramazan KARABULUT'a,

Berber çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili sekreter, hemşire, personel, ameliyathane ve asistan ekibi ile Dr. Hayrunnisa ORAL'e ve Dr. Burak ARSLAN'a,

Uzmanlık eğitimine ilk başladığım günden itibaren hep yanımda olan sadece kıdemlim değil, aynı zamanda bana ablalık yapan sevgili kıdemlim Op. Dr. Sibel ERYILMAZ'a,

Hayatımın her anında yanımda olan kızları olmaktan gurur duyduğum canım annem Hatice ALTIN ve babam Sezai ALTIN, beni hep destekleyen kardeşim Kaan ALTIN'a,

Tez çalışmam dahil her zaman yanımda olan, desteğini esirgemeyen değerli eşim Sercan GÜLBURUN'a,

Sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

DR. Merve ALTIN GÜLBUN

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Hipospadias operasyonu sırasında kanamasız bir ortam sağlamak, başarılı bir işlemin en önemli faktörlerinden biridir. Kanama kontrolü uğraştırıcı bir süreç olmasına karşın, daha iyi görüş alanı, daha hızlı ve daha iyi kozmetik iyileşme sağlar. Bu kanama kontrolü için koterizasyon, penil turnike (Pt) kullanımı veya operasyon sahasına epinefrin benzeri vazokonstriktör ajan uygulanması gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (1).

Pt, hipospadias cerrahisinde çok sayıda cerrah tarafından kullanılan bir işlem olmasına rağmen güvenli turnike süresinin ne olması gerektiği hakkında ortak görüş yoktur. Bazı cerrahlar tüm operasyon süresince turnike uyguladıklarını bazıları ise belirli aralıklarla turnike uyguladıklarını bildirmişlerdir (2, 3, 4, 5, 6).

“Turnike” uygulaması antik çağlardan itibaren kanama kontrolünde yer almış, daha çok amputasyon olmak üzere ekstremitte cerrahisinde uygulanan ve güvenilirliği sorgulanan bir yöntem olmuştur (7). Bu yöntemde, turnikenin distalinde kalan tüm dokularda arteriyel ve venöz kan akımının engellenmesi ile kansız bir sahada çalışma hedeflenir. Turnike sırasında dokuda iskemi oluşmakta, turnike sonlandırıldığında ise kan akımının tekrar başlamasıyla reperfüzyon hasarı meydana gelmektedir (8). İskemi ve reperfüzyon hasarında birçok mekanizma sorumlu tutulmakta, bunlar arasında serbest oksijen radikalleri (SOR) önemli yer almaktadır (9, 10, 11).

Bu deneysel çalışmada çocuklarda ve yetişkinde hipospadias, epispadias, penil chordee, klitoris küçültme ya da ambigu genitalya (belirsiz cinsiyet) durumlarında penil dokuya yapılan girişimlerde ortaya çıkan; kanamayı azaltmak için uygulanan turnike tekniğinin penil doku ve cerrahi işlemlere etkisinin araştırılması amaçlandı. Pt sırasında

kansız ameliyat gerçekleşirken ince hassas penil dokuda yetersiz beslenme ve oksijensizlik ortaya çıkmaktadır. Turnikenin açılmasıyla, dokuda başlayan kan akımıyla beraber bu hasarlanmış dokuda reperfüzyon hasarı da oluşmakta ve SOR'lar salınmaktadır. Bu tablo ortaya çıktığında ameliyat sonrası üretral fistül, doku nekrozu gibi durumlar ortaya çıkmaktadır. Bu yüzden güncel olarak kullanılmaya başlayan ve antioksidan, antienflamatuar, ve anti apopitotik işlevleri ile doku hasarını engelleyici etkileri çeşitli şekillerde gösterilmiş olan hidrojenden zengin salin solüsyonun (HZSS), ratlarda Mathieu tipi flep ile oluşturulan hipospadias modelinde Pt uygulaması sonrası koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

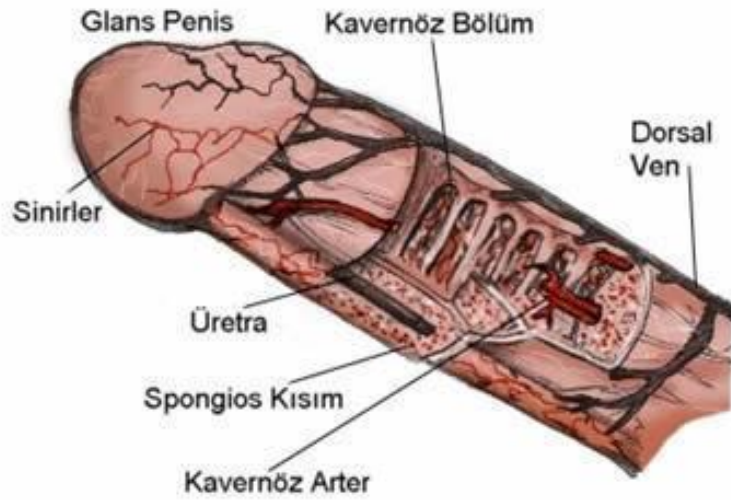
2.1. Penis Anatomi ve Histolojisi

Penis, radiks penis ve korpus penis olmak üzere iki bölümden oluşan erektile bir organdır. Penis, deri ve fibröz doku ile sarılı üç silindirik dokudan oluşur. Bu üç dokunun ikisini korpus kavernozum, diğerini de korpus spongiosum oluşturur. Her iki yapı hem korpus peniste hem de radiks peniste bulunur. Perineal bölgede radiks penisin oluşumuna katılan kavernoze cisimler birbirinden ayrılarak crus penisleri, spongioze cisim ise bulbus penisini meydana getirir (12).

Tuber ischiadicum'un hemen ön tarafından başlayan crus penis, iskiyon-pubis kolu boyunca symphysis pubise doğru birbirine uzanarak yaklaşır. Symphysis pubisin hemen ön-alt kısmında iki tarafın crus penisini bir araya gelerek, aşağı-öne doğru yön değiştirir. Bundan sonraki bölümüne korpus kavernozum denir. Bu doku korpus spongiosum ile birleşerek korpus penisini oluşturur. Korpus kavernozumlar korpus penisinin büyük kısmını meydana getirir (12).

Korpus kavernozumların ön uçları künt ve ince olup; penisin ön ucun 1 cm gerisinde sonlanır. Hafif çatalımsı olan bu ön uç, glans penis içine gömülür. Korpus kavernozumlar sağlam fibröz bir kılıfla sarılmıştır. "Tunica albuginea korporum kavernosorum" adlı bu kılıf, yüzeysel ve derin liflerden oluşur. Korpus spongiosum tektir, içinden üretra geçer. Korpus spongiosumu kavernoze cisminkinden daha ince olan tunica albuginea korporis spongiosi sarar. Genişlemiş ön kısmına glans penis denir. Glans penis, penis korpusundan fiziksel olarak "sulcus coronarius" ile ayrılır. Glans'ın yapısı erektile dokulardan farklıdır. Burada

bulunan kavernalar geniş, kıvrık damara benzer. Bu kavernalar arasında bağ dokusu çoktur. Bununla birlikte kas lifleri de çok az bulunur ve ayrıca tunika albuginea yoktur. Glansın ucunda üretranın sonlandığı meatus bulunur. Glans “prepusyum” adlı çift katlı penis cildi ile örtülüdür. Prepusyumun ön yüzünde bulunan “frenulum” cildin medial bir pili olup meatusa tutunur (12).



Resim 1: Penis anatomisi

Penisin derin ve yüzeysel olmak üzere iki fasyası vardır (13). Yüzeysel olan fasya “Colles fasyası” ismini alır. Bu fasya skrotumun dartos fasyası ve süperfisiyal perineal fasya ile uzanır. “Buck fasyası” olarak adlandırılan penisin derin fasyası korpus kavernosumlar ve korpus spongiosumu saran kuvvetli bir fasyadır ve derin perineal fasyaya uzanır. Buck fasyası korpus kavernosumların distal ucunda son bulur ve glans penisini örtmez. Buck fasyası distal uçta incilir, multipl delikler yardımı ile korpus kavernosumların birbiri ile olan ilişkisini sağlar.

2.1.1. Penis Kanlanması

Penisin arteriyel kanlanmasını başlıca a.iliaca internanın bir dalı olan a.dorsalis penis (penisi besleyen esas damar), a.profunda penis ve a.bulboüretralis gibi a.pudentalis internanın dalları sağlamaktadır (13). Ayrıca a.pudentalis externanın yüzeysel ve derin dalları a.pudentalis interna dalları ile anastomozlar oluşturan ve penil cildi besleyen bir çok küçük dal vermektedir.

Penisin venöz drenajı üç ayrı sistem aracılığıyla olur (13, 14, 15, 16). Birinci sistem, dartosun altındaki yüzeysel ven ağıdır, v.dorsalis penis superfisialis yolu ile v.saphena magna'ya drene olur. İkinci sistemi buck fasyası derininde bulunan ve v.dorsalis penis profunda'ya drene olan ven ağı meydana getirir. Ayrıca korpus kavernosumlardan çıkan lateral, inferior ve superior emitter venler ile çok sayıda circumfleks penil ven drene olur. Üçüncü sistem ise korpus kavernosumları ve korpus spongiosumu drene eden bir grup derin venden meydana gelir.

Korpus kavernosumu drene eden derin venler pudental pleksusa boşalır. Korpus spongiosum ise bulber ve üretral venlerden oluşan derin bir ven ağı aracılığı ile drene olur. Distal üretrayı ön ve arka üretral venler drene eder. Arka venler birleşerek pudental pleksusa veya bulber venlere boşalırlar. Üretral venlerin ön grubu sirkumfleks venöz sistemi oluşturmak üzere, sonradan posterior emitter venler ile birleşen birçok dala ayrılır (17).

2.1.2. Penisin Lenfatik Drenajı

Penil cildin lenfatik drenajı superfisiyal inguinal lenf bezlerine, glans ve distal

üretranın lenfatik drenajı ise derin inguinal, eksternal iliak lenf bezlerine boşalmaktadır. Korpus kavernosum ve proksimal üretra ise internal iliak lenf bezlerine drene olmaktadır (13).

2.1.3. Penisin İnnervasyonu

S2 – S4 spinal segmentten çıkan sinir lifleri ile sağlanmaktadır. Sempatik innervasyon n.pudentalis'in terminal bir dalı olan n.dorsalis penis tarafından sağlanmaktadır. Cildin ve glans penisin innervasyonundan sorumludur. Penis kökünde n. ilioinguinalis dalları innervasyona katkı sağlar. Kavernöz sistemin innervasyonu parasempatik sistemin kontrolündedir, prostatik pleksustan çıkan parasempatik lifler erektil dokuları innerve etmektedir (13). Nörovasküler sinir demeti penis dorsumunda saat 11 ile 13 arasında yerleşmiştir. Ayrıca nörovasküler demetten ayrılan küçük dallar korpus spongiosum içine girmektedir (18).

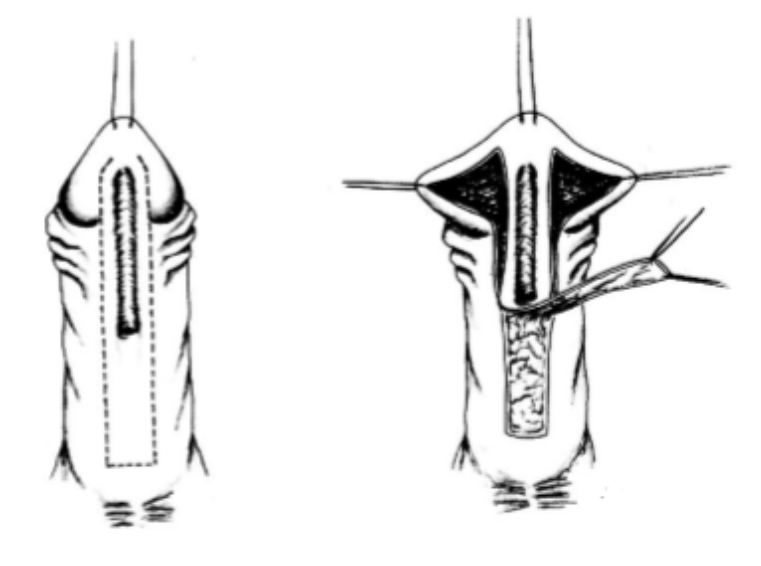
2.1.4. Penisin Histolojisi

Korpus kavernosumun tunike albugineası, kalın kollagen fibriller ve birkaç adet elastik liften meydana gelmiştir. Kollagen fibriller interstisyel kollagenlerden (Tip I – II – III) ve tropokollageniden meydana gelir. Tip I kollagen fonksiyonel olan birimdir. Elastik fibriller sıklıkla iki anatomik bölgede bulunur, bunlar proksimal krus ve distal tunikadır. Penisin istirahati sırasında tunika çok gevşektir. Korpus spongiosum penis bol, düzensiz yapıda elastik fibriller içerir. Elastik ağ, glans penis yapısında da bulunur ve düzensiz dağılım gösterir (19).

Korpus kavernosum bağ dokusu ve düz kasla birbirinden ayrılmış laküner aralıklar olarak tanımlanmıştır (20). Korpus kavernosumların fibröz iskeleti tunika albuginea ve sütunlarından oluşmaktadır.

2.2. Mathieu Tip Flep

Üretral meanın penis gövdesinin distal üçte birinde yer aldığı ve kordinin eşlik etmediği hypospadias vakaları Mathieu yöntemi için ideal vakalardır. Mathieu tip flep hazırlanırken; üretral mea ile glansın uç noktasının mesafesi ölçülür ve proksimal parameatal deri flebinin uzunluğu buna göre belirlenir. Öncelikli olarak glans tepesinden başlayıp orjinal mea seviyesine kadar iki paralel kesi yapılır ve glans kanatları serbestleştirilir. Belirlenen uzunluk kadar orjinal mea hizasından penis proksimaline doğru iki paralel kesi ile flebin proksimal kısmı hazırlanmış olur. Proksimalden kaldırılan flebin kanlanması ve doku desteğinin iyi olmasına dikkat edilir. Böylelikle mathieu tip flep hazırlanmış olur (6, 8).



Resim 2 : Mathieu Tip Flep ve Hazırlanışı (6)

2.3. İskemi

İskemi, bir dokuya gerekli oksijende azalma veya oksijenin tamamen kesilmesi ile sonuçlanan hedef organa yeterli kan akımının sağlanamadığı patolojik bir durumdur. İskemi, yalnızca oksijenlenmeyi bozmakla kalmaz, aralarında glukozun da bulunduğu metabolik substratlar hücreye yeterli düzeyde alınamaz ve oluşan atık ürünler hücreden uzaklaştırılmaz. Hücresel fonksiyonların gerçekleşmesi için gerekli olan oksijen desteği, azalan kan akımı nedeniyle sağlanamaz ve bu durum hücre hasarı ve ölümü ile sonuçlanır (21, 22, 23, 24).

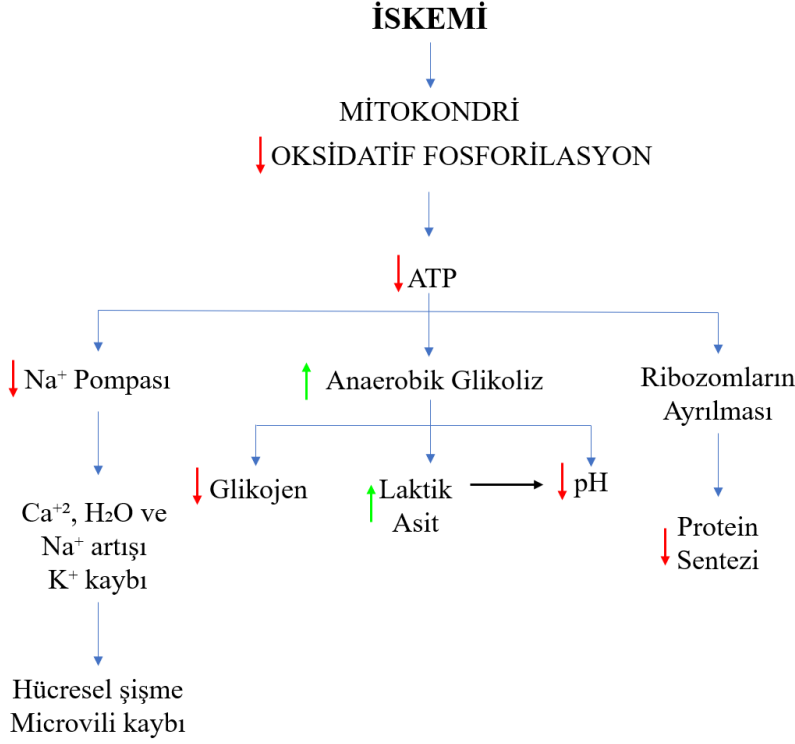
Ciddi ya da uzun süreli iskemi ATP üretimini azaltır, hücre içi ATP azalır. Bu kritik enerji kaynağının kaybı birçok hücresel sistemde hasara neden olur. ATP miktarındaki azalma, anaerobik glikolizde artmayla ve glikojen depolarında boşalmayla sonuçlanır. Artan glikoliz, fosfat türevlerinin hidrolizi ile laktik asit, inorganik fosfatların birikimine; buna bağlı olarak hücre içi pH düşmesine ve asidoza neden olur. İskeminin fonksiyonel sonuçları ise; hasarın yeri ve süresine göre değişkenlik gösterir. Örneğin koroner kan akımının 60 saniye boyunca kesilmesi kalp kasını durdururken, intestinal iskemide bu süre daha uzundur.

Dokularda oksijen eksikliği, pek çok enerji bağımlı metabolik yolağın aksamasına ve dolayısıyla nekroza neden olur. Hücre içi ATP'nin çoğu; oksidatif fosforilasyonun mitokondrideki elektron transport zincirinde (ETZ) oksijenin redüksiyonu sonrası ADP'den sentezlenir. ATP'deki yüksek enerjili fosfat için; hücre membran transportu, protein sentezi, lipogenez ve fosfolipit turnoverındaki deaçilasyon-reaçilasyon reaksiyonları gereklidir. Bu

yüzden hücrelerin oksijen eksikliğinin temel fonksiyonlarda yıkıcı hasar riski yüksektir. Oksijen eksikliği hücre hasarı ve nekrozun en yaygın nedenlerinden biridir.

İskemik hasarlanmanın iki aşaması vardır: Başlangıçtaki hipoksik zedelenme kan dolaşımının azalması ile ortaya çıkarken, sekonder reperfüzyon zedelenmesi hipoksik dokuda tekrar kan akımı başladığında oluşur. Reperfüzyon hasarlanması kompleks bir patofizyolojik süreçtir. Bu süreçteki en önemli faktörler serbest oksijen radikallerinin oluşması, nötrofil infiltrasyonu, serbest radikallerin ve diğer mediyatörlerin zararlarını azaltmak için yeterli metabolik rezervi olmayan dokuda enflamatuar mediatörlerin üretimidir (24).

İskemi sırasında ATP üretimi durup, kullanımı devam ettiği için ATP'den adenosin difosfat (ADP), adenosin monofosfat (AMP) ve adenosin meydana gelir. Adenosin hücre dışına difuze olup inozin ve hipoksantin'e dönüşür. Normal şartlarda hipoksantin, ksantin dehidrogenaz (XD) aracılığıyla ksantin ve ürik asit'e metabolize olurken; bu reaksiyonda elektron alıcısı okside nikotinamid adenin dinükleotid (NAD)'dir. Artan hücre içi Ca^{+2} , Ca^{+2} bağımlı proteazlar aracılığıyla XD'ın ksantin oksidaz'a (XO) dönüşümüne neden olur. Reperfüzyonun başlamasıyla hipoksantin'in ksantin'e, ksantin'in ürik aside dönüşümü XO tarafından meydana getirilir. Bu reaksiyonda elektron alıcısı olarak moleküler oksijen kullanılır ve reaktif oksijen radikalleri oluşur (23).



ŞEKİL 1: İskeminin hücreye etkileri (25)

2.4. Reperfüzyon Hasarı

Belirli şartlar altında iskemik fakat canlı dokuya oksijenden zengin kan akımının yeniden sağlanması ile dokudaki gerekli enerji ihtiyacının karşılanması ve toksik metabolik substratların uzaklaştırılması olayına reperfüzyon denir. İskemik dokunun kan akımının düzelmesi paradoksik olarak hücre hasarını artırır. Bu, beklenenin aksi etki normalde geri döndürülebilir hücre hasarının sonucudur. Ayrıca iskemi-reperfüzyon hasarı olarak da adlandırılır.

Reperfüzyon hasarının meydana gelişi; reperfüzyonun harekete geçirdiği yeni bir zedeleyici sürecin, iyileşmesi mümkün olan dokularda yol açtığı değişiklikler ile hücre

ölümüne neden olduğu yönündedir. Bunu açıklamaya yönelik çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür:

- Parankimal ve endotelyal hücelere infiltre olan lökositlerden yüksek miktarda serbest oksijen radikallerinin üretimi yoluyla reoksijenizasyon sırasında yeni zedelenmeler meydana gelir. Hasarlanmış mitokondriler tarafından oksijenin yetersiz veya eksik redüksiyonu sonucunda ya da lökositler, endotelyal hüceler veya parankimal hücelerden ortaya çıkan oksidazların aktivitesi nedeni ile reperfüze dokularda superoksit anyonları üretilir. Hücresel antioksidan savunma sistemleri iskemi nedeni ile aksar, bu da radikallerin birikimine neden olur.
- Reaktif oksijen radikalleri mitokondriyal geçirgenlik geçişini başlatabilir. Bu durumda mitokondriyal enerji oluşumu ve hücresel ATP'nin normale dönmesi engellenir ve hücre ölür.
- Hipoksik parankimal, endotelyal hüceler tarafından adezyon moleküllerinin ekspresyonunun artışı ve sitokinlerin üretilmesi sonucu olarak iskemik hasarlanma enflamasyon ile birliktedir. Bu ajanlar dolaşımdaki polimorfonükleer lökositleri reperfüze olan dokuya çeker; ortaya çıkan enflamasyon ek olarak hasarlanmaya neden olur.
- Kompleman yolağı aktivasyonunun iskemi-reperfüzyon hasarlanmasına katkısı olabileceği yönünde bilgiler mevcuttur. Kompleman sistemi konak savunmasına katılır ve immün hasarlanmada önemli bir mekanizmadır. Bazı IgM antikorları, bilinmeyen nedenlerden dolayı, iskemik dokuda birikme

eğimindedir ve kan akımı yeniden başladığında kompleman proteinleri antikorlara bağlanır, aktive hale gelerek hücre hasarlanması ve enflamasyona yol açarlar (24).

2.5. Serbest Radikaller

Hücreler, moleküler oksijeni suya indirgeyerek enerji üretirler. Bu işlem sırasında, mitokondriyal solunumun kaçınılmaz bir yan ürünü olarak, çok az miktarda kısmen indirgenmiş reaktif oksijen türevleri üretilir. Bu türevlerin bazıları; lipitlere, proteinlere ve nükleik asitlere zarar verebilen serbest radikallerdir. Bunlara serbest oksijen radikalleri (SOR) denir. Hücrelerde, bu ürünlerin neden olduğu hasarlanmalardan koruyucu savunma sistemleri vardır. Serbest radikal üreten ve serbest radikal yakalayan sistemler arası dengesizlik sonucunda, pek çok patolojik durumda hücre hasarlanması ile birlikte olan oksidatif stres oluşur. Serbest radikallerin neden oldukları yıkım, kimyasal ve radyasyona bağlı hasarlanma, iskemi-reperfüzyon hasarı, hücresel yaşlanma ve fagositlerin mikropları öldürmeleri gibi değişik süreçlere katılır.

Serbest Radikaller	Üretilme Mekanizması	Uzaklaştırma Mekanizması	Patolojik Etkiler
<i>Superoksit</i>	Mitokondriyal oksidatif fosforilasyon sırasında oksijenin tamamlanmamış indirgenmesi ile üretilir.	Superoksit dismutaz ile H_2O_2 ve O_2 'ye dönüştürülür.	Lipit peroksidasyonu, proteinler ve DNA'ya direk etkir.
<i>Hidrojen Peroksit</i>	Superoksit dismutazın aktivasyonu sonucu çoğunlukla superoksitten üretilir.	Katalaz ve glutatyon peroksidaz ile H_2O ve O_2 'ye dönüştürülür.	Hücreleri ve mikropları yok eden hidroksil ve hipokloride dönüşerek etkir.

<i>Hidroksil Radikali</i>	Çeşitli reaksiyonlar sonucu O_2^- , H_2O_2 ve H_2O 'dan üretilir.	Glutasyon peroksidaz ile H_2O 'ye dönüştürülür.	Lipitler, proteinler ve DNA'yı hasarlandırır.
<i>Peroksinitrit</i>	NO sentaz aracılığıyla O_2^- ve NO etkileşiminden üretilir.	Mitokondri ve sitozolde enzimlerle nitrite dönüştürülür.	Lipitler, proteinler ve DNA'yı direk hasarlandırır.

Tablo 1: Hücre Hasarlanmasındaki Serbest Radikaller (25)

Serbest radikaller, dış yörüngesinde eşleşmemiş tek bir elektron bulunan kimyasal moleküllerdir. Kararlı olmayan bu konfigürasyonun yarattığı enerji; özellikle membranlarda ve nükleik asitlerdeki kritik yapıları oluşturan inorganik ve organik kimyasal maddeler -proteinler, lipitler, karbonhidratlar- gibi komşu moleküller ile gerçekleşen reaksiyonlar yoluyla açığa çıkarılır. Ek olarak, serbest radikaller, reaksiyona girdikleri moleküllerin kendilerinin de hasarlanma zincirini sürdüren serbest radikallere dönüştükleri otokatalitik reaksiyonları başlatırlar.

Serbest radikaller plazma ve organel membranındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları ile reaksiyona girerek peroksidasyona neden olur. Lipit peroksidasyonu, serbest radikalın çoklu doymamış yağ asidinden hidrojen atomunu uzaklaştırmasıyla başlar. Oluşan lipit radikali oksijenle reaksiyona girerek lipit peroksit radikalini oluşturur. Lipit peroksit, membrandaki doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girip yeni lipit radikali oluşumunu sağlar. Açığa çıkan hidrojen atomunu alarak lipit hidroperoksit'e dönüşür. Lipit peroksitler de malondialdehit (MDA), 4-hidroksi nonenal gibi yıkım ürünlerine dönüşür (26, 27).

Serbest radikaller bazı aminoasitlerle reaksiyona girerek enzimleri etkisizleştirip, fonksiyon görmeyen proteinlerin oluşmasına neden olur. Enzim veya reseptör fonksiyonuna

sahip membran proteinlerinin özellikle serbest radikallerin modifikasyonuna duyarlı olmaları nedeniyle; protein oksidasyonu ile hücrelerin önemli membran ve hücresel fonksiyonları bozulmaktadır (28, 29).

Aktive nötrofillerden kaynaklanan H_2O_2 membranlardan geçerek hücre çekirdeğine ulaşp DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve ölümüne yol açabilir (27).

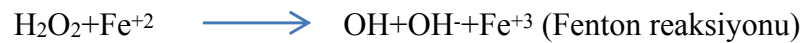
Hücreler, serbest radikalleri ortadan kaldırmak ve hasarlanma etkilerini minimize etmek için çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir.

Süperoksit radikali (O_2^-), oksijen molekülünün bir elektron alarak indirgenmesi sonucu; büyük bir kısmı mitokondrideki ETZ zincirindeki elektron kaçağından ve krebs döngüsünden meydana gelir. Serbest radikal olarak direkt zarar vermeyen O_2^- 'nin önemi hidrojen peroksit (H_2O_2) kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (30).

O_2^- , spontan olarak ya da SOD enzimi tarafından radikal olmayan reaktif oksijen bileşiklerinden H_2O_2 'ye dönüşür (31, 32).



Artmış O_2^- Fe^{+2} ve Cu^{+2} gibi geçiş metallerini azaltır. H_2O_2 'nin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle veya O_2^- ile tepkimeye girmesi sonucu oluşan güçlü hidroksil radikali (OH^-); nükleik asit, lipit ve proteinler ile rastgele tepkimeye girer (33, 34).



Radikaller bazen diğer radikallerle etkileşerek stabil moleküller meydana getirirken,

radikal olmayan bileşiklerle yeni radikaller oluşturabilirler. Yeni radikaller, daha toksik olabilir veya başka toksik radikal reaksiyonunu başlatabilirler (23, 25, 33, 35, 36).

2.6. Antioksidanlar

Hücreler, serbest radikalleri ortadan kaldırmak ve hasarlanmayı en aza indirmek için çok sayıda çeşitli antioksidan savunma sistemleri geliştirmişlerdir. Antioksidanlar, serbest radikal oluşumunu engelleyerek veya serbest radikalleri inaktive ederek radikal hasarlanmasını sonlandırır ve hücreyi oksidatif stresin neden olduğu zararlı faaliyetlere karşı korur. Antioksidan mekanizmalar; ilk savunma hattı olarak serbest radikallerin ve bunların türevlerinin biyolojik maddeler ile hasar vermesinin önlenmesi, radikal oksidasyon reaksiyona ara vermeyi içeren onarımın başlaması, serbest radikal reaksiyon ürünlerinin ve bunların türevlerinin yapısal hasarlarının onarılması ve ortadan kaldırılmasıdır (37).

Antioksidan sistemler endojen ve ekzojen olarak ikiye ayrılır. Endojen sistemler de enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlardan oluşur. Ekzojen antioksidanlar; vitamin E, vitamin C, bazı mineraller (Cu, Zn, Mn, Se), karotenoidler, ve polifenollerdir. Endojen enzimatik sistemler gibi antioksidan sistemler ise süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH) gibi çeşitli enzimler içerir. Bu antioksidanların varlığı patolojik koşullar altında oksidatif strese karşı savunmak için önemlidir (38). Bu enzimatik antioksidanlar birinci savunma hattında yer alır.

SOD sitoplazmada, mitokondride ve ekstrasellüler sıvıda bulunur. Süperoksit anyonu (O_2^-)'nin H_2O_2 'ye dismutasyon hızını artıran antioksidan enzimdir. O_2^- SOD yardımıyla H_2O_2 ve O_2 'ye dönüşür (37).



Çoğunluğu peroksisomlarda bulunan CAT, H₂O₂'yi su ve oksijen'e dönüştürerek OH⁻ oluşumunu önler.



Glutasyon peroksidaz (GSH) bir enzim grubu olup; asıl görevi hücreyi oksidatif stesten korumaktır. GSH hücre sitozolünde bulunur ve H₂O₂ 'yi H₂O'ya, lipid hidroperoksitleri alkol ve H₂O'ya dönüştürür. GSH; H₂O₂'yi suya, lipid hidroperoksitleri alkol ve suya dönüştürür (39, 40).



Okside GSH, NADPH varlığında GSH-R tarafından tekrar GSH'a indirgenir (23).



Reaktif oksijen radikallerine karşı ikinci savunma hattı non-enzimatik antioksidanlar ile karakterize moleküller (metal bağlayan proteinler, transferrin, ferritin, albumin, laktoferrin, seruloplazmin, CoQ10, ürik asit, melatonin ve bilirubin) radikalleri ve oksidanları hızla etkisiz hale getirme yeteneğine sahiptir.

2.7. Hidrojenden Zengin Salin Solüsyonu

Hidrojen en hafif ve en bol kimyasal elementtir. Ohsawa ve ark. (33) hidrojenin

antioksidan tedavi olarak kullanılabileceğini yayınlamasının ardından; pek çok çalışmada hidrojenin oksidatif stres, inflamasyon, apoptoz, lipid metabolizması ve sinyal yolları üzerine yararlı etkileri olduğu gösterilmiştir (41, 42). Hidrojen hayvan deneylerinde güvenilir, efektif antioksidan olarak bulunmuş olup minimal yan etkiye sahiptir. Hidrojen biyomembranlara penetre olabilir. Sitozol, mitokondri, hücrelerin içine girebilir ve oluşan serbest radikalleri engelleyerek hücre ve dokuları korur. Apoptozisi ve enflamatuar hasarı azalttığı bildiren yayınlar vardır. Ayrıca hayvan modellerinde kronik stress modellerinde öğrenme defisitlerini engellediği, Alzheimer modellerinde hafızayı artırdığı, bilişsel bozuklukları azalttığı gösterilmiştir. Hidrojen gazının inhalasyonu klinik olarak yapılması uygun değildir ve yüksek tutuşma riski nedeniyle tehlikeli bile olabilir. Bu nedenle; hidrojenle zenginleştirilmiş salin solusyonu (HZSS) kullanımı çalışmalarda güvenli ve yönetimi kolaydır (43).

Bu çalışmada HZSS'nun ratlarda penil turnike uygulanan penil doku üzerine koruyucu etkilerini araştırmak istedik. Hidrojen bu koruyucu etkilerini geçici iskemik beyin atağı, akut akciğer hasarı, spinal kord hasarı, kardiyak hasar, intestinal iskemi-reperfüzyon hasarı ve testis torsiyonu gibi pek çok deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. Hatta bu etkileri yanında tip II diabette lipid ve glukoz metabolizmasını düzenlediği, bağırsak transplantasyonunda greft yaralanmasını engellediğini, akut pankreatitte koruyucu olduğu belirtilmiştir (44, 45, 46, 47).

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1.Deney Hayvanları

G.Ü.ET-17.016 kod numarası ile Gazi Üniversitesi (GÜ) Deney Hayvanları Etik Kurul onayı alındıktan sonra çalışmamızda denek olarak Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilen ağırlıkları 220-250 gr arasında değişen 36 adet sağlıklı erkek Wistar Albino rat kullanıldı.

3.2. Deneysel Çalışma Yöntemi

Denekler randomize olarak altışarlı 6 gruba ayrıldılar. Ratlar deneyden bir gece önce aç bırakıldı. Tüm deneyler, 50 mg/kg i.m. ketamine hydrochloride (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) ve 10 mg/kg i.m. xylazine hydrochloride (Alfazyne %2, Ege Vet, Türkiye) anestezisi altında gerçekleştirildi. Öncelikle penil bölge ve skrotum povidone iyot ile sterilize edildi.

HZSS, H₂ gazının, serum fizyolojik içinde yüksek basınç altında (4 bar) 6 saat içinde çözülmesi prensibi ile hazırlandı. Hazırlanan solusyon gama radyasyon ile sterilize edildi ve + 4° C' de alüminyum poşetlerde saklandı (48).

Gruplar, aşağıdaki şekilde oluşturuldu:

Grup S: Sham (S) grubunda hiçbir işlem yapılmadı.

Grup PT¹⁰: Penis ventral yüzüne 0.4 cm uzunluk ve 0.2 cm genişlikte Mathieu tipi penil flep hazırlandıktan sonra 5 mm çaplı plastik band ile penis köküne 10 dakika penil turnike (Pt) yapıldı ve turnike açıldı (PT¹⁰).

Grup PT³⁰: Penis ventral yüzüne 0.4 cm uzunluk ve 0.2 cm genişlikte Mathieu tipi penil flep hazırlandıktan sonra 5 mm çaplı plastik band ile penis köküne 30 dakika Pt yapıldı ve turnike açıldı (PT³⁰).

Grup HZSS¹⁰: Penis ventral yüzüne 0.4 cm uzunluk ve 0.2 cm genişlikte Mathieu tipi penil flep hazırlandıktan sonra 5 mm çaplı plastik band ile penis köküne 10 dakika Pt yapıldı ve turnike açıldı. Pt açılmadan hemen önce Hidrojenden zengin salin solüsyonu (HZSS) 5ml/kg dozunda intraperitoneal (İP) olarak enjekte edildi (HZSS¹⁰).

Grup HZSS³⁰: Penis ventral yüzüne 0.4 cm uzunluk ve 0.2 cm genişlikte Mathieu tipi penil flep hazırlandıktan sonra 5 mm çaplı plastik band ile 30 dakika penis köküne Pt yapıldı ve turnike açıldı. Pt açılmadan hemen önce HZSS 5ml/kg dozunda İP olarak enjekte edildi (HZSS³⁰).

Grup HZSS^B: Turnike yapılmadan 1 saat önce HZSS 5ml/kg dozunda İP olarak enjekte edildi. Daha sonra penis ventral yüzüne 0.4 cm uzunluk ve 0.2 cm genişlikte Mathieu tipi penil flep hazırlandıktan sonra penis köküne 5 mm çaplı plastik band ile 10 dakika Pt yapıldı ve turnike açıldı (HZSS^B).

Tüm ratlar deneylerden 4 saat sonra kurban edildi. Hazırlanmış olan flepler eksize edilerek biyokimyasal ve histopatolojik çalışmalar için iki parçaya bölündü. Numuneler biyokimyasal analizler yapılana kadar -80°C'de saklandı. Patoloji spesmenleri formol içerisinde saklandı.

3.3. Biyokimyasal İnceleme

Mathieu tipi penil flep örneklerinde lipid peroksidasyon ürünü malondialdehid (MDA), ve antioksidan koruyucu glutatyon (GSH) düzeyi çalışıldı. Ayrıca doku, miyeloperoksidaz (MPO), tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) ve İnterleukin 6 (IL-6) düzeyleri ELİSA yöntemi ile tesbit edildi.

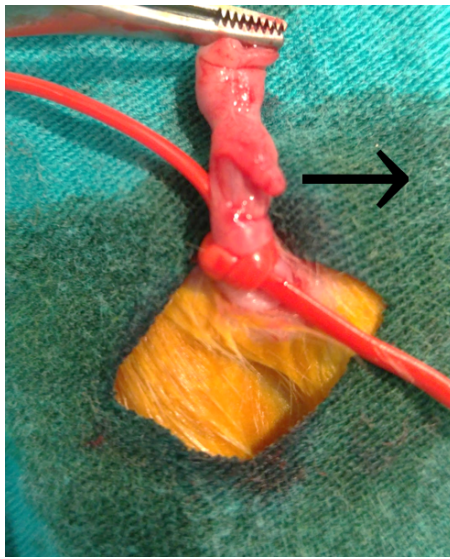
Kullanılan Gereçler ve Cihazlar: pH metre (Jenway-3510 phmeter), hassas terazi (Shimadzu Ax200), manyetik karıştırıcı, otomatik pipetler ve cam pipetler, soğutmalı santrifüj, sıcak su banyosu (Benmari), vorteks (fisher scientific vortex mixer), eppendorf santrifüjü (eppendorf minispinplus), homojenizatör(heidolph diax 900), spektrofotometre (Shimadzu, UV-1601 UV visible spectrophotometer).

Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler: Dipotasyum fosfat (K_2HPO_4), monopotasyum fosfat (KH_2PO_4), EDTA, hexadesil trimetil amonyum bromid (HETAB), bovine serum albümin (BSA), sodyum hidroksit (NaOH), bakır sülfat ($CuSO_4$), sodyum potasyum tartarat (Na-K tartarat), folin ciocalteu's fenol (folin çekolte); miyeloperoksidaz aktivitesinin ve dokudaki protein miktarının belirlenmesi için kullanılan kimyasallardır.

3.3.1. Doku Örneklerinin Hazırlanması

Doku Homojenizasyon Aşaması

Numuneler hassas terazide teker teker tartılıp dokuların ağırlıkları not edildi. Tartılan doku örnekleri, homojenizasyon aşamasında kullanılan kimyasalların farklı olmasından dolayı, 1/5 doku MPO için; 4/5 doku TNF- α , IL-6, Glutasyon ve MDA için oranlarına uyacak şekilde ayrıldı. Homojenizasyon sonrasında ependorf tüplerine konulan süpernatantlar çalışmanın yapılacağı güne kadar -80 derecede muhafaza edildi. Çalışma günü ependorf tüpleri +4 dereceye çıkarılıp çözünmesi sağlandı.



Mathieu tipi flep

Resim 3: Turnike Sonrası Mathieu Tip Flep Yapılmış Penil Doku

3.3.2. Dokuda Yapılan Analizler

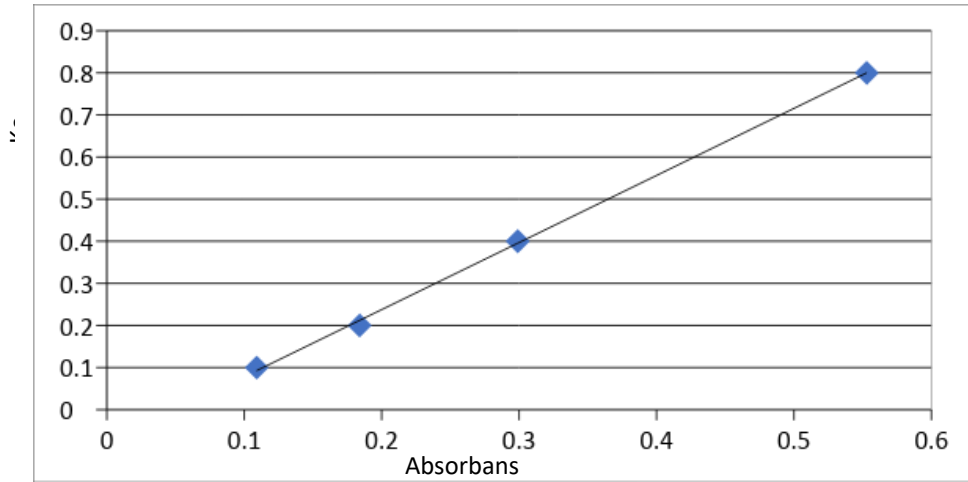
Doku; Glutasyon, TNF- α , IL-6, MDA (Shanghai YL Biotech Co, Ltd) ve MPO (Wuhan USCN Business Co., Ltd) seviyeleri ELISA kitlerle ölçüldü. Kit standartların konsantrasyonları ve buna karşılık gelen absorbans değerleri ile lineer regresyon eşitliğine göre standart eğrileri çizildi. Grafikten numunelerin absorbans değerlerine karşılık gelen konsantrasyon değerleri bulundu ve hesaplandı.

Dokulardaki Protein Miktarının Tayini (Lowry Metodu ile)

Dokulardaki protein miktarının tayini Lowry yöntemi ile belirlenmiştir (41).

Lowry metodunun prensibi: Proteinlerin alkali ortamda Cu^{+2} ile kompleks oluşturarak, folin çekolte fenol (folin-ciocalteau phenol) reaktifini (fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifini) indirgemesi sonucu mavi-mor renkte ürün oluşturması esasına dayanmaktadır. Protein konsantrasyonu; oluşan rengin koyuluğu ile doğru orantılıdır.

Lowry protein tayini için standart olarak 0-0.8 mg/mL konsantrasyonlarında bovine serum albumin hazırlanmış ve bu standartlara ait absorbans değerleri ölçülerek standart eğrisi (absorbans-konsantrasyon eğrisi) çizilmiştir.



Tablo 2: Lowry Metodu ile Protein Tayini için Standartlardan Elde Edilen Eğri

3.4. Histopatolojik inceleme

Parafin bloklar 5 mikron kesitler sonrası; varsa enflamasyon, ödem, ekstrasvazasyon, vasküler konjesyon açısından değerlendirildi.

Penisten Mathieu tip penil flep ile hazırlanıp alınan dokular, %10'luk tamponlu formalin solüsyonu içinde fiksasyona bırakıldı. Rutin doku takip işlemini takiben hazırlanan parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında kesitler hazırlandı ve hematoksilin-eozin (H&E) ile boyandı. H&E ile boyalı kesitler, penil doku I/R hasarı açısından ışık mikroskopik olarak incelendi ve doku hasarı aşağıda belirtildiği gibi sınıflandırıldı:

Grade 0: Normal (enflamasyon yok)

Grade 1: Hafif derece enflamasyon (minimal konjesyon ve ödem)

Grade 2: Orta derece enflamasyon (orta düzeyde konjesyon ve epitelde belirgin ödem)

Grade 3: Ağır derece enflamasyon (ileri düzeyde ödem, konjesyon ve ülser) (49).

3.4.1 Apoptozis İndeksi

Mathieu tipi penil flep dokuları poly L lysine'li lamlara kesitler alınarak TUNEL metodu ile boyama yapıldı (50). TUNEL boyamasında Millipore ApopTag deteksiyon kiti kullanıldı. Kesitler deparafinize edildi. PBS ile 5 dakika yıkandı. Proteinaz K damlatılıp 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. PBS ile 5 dakika yıkandı. Equalibration Buffer damlatılıp 10 saniye bekletildi. Yıkama yapılmadan lamalar üzerindeki fazla sıvı kurulandı. Working Strength Tdt enzimi damlatılıp 37 °C etüvde 1 saat bekletildi. Kesitler Stop Wash Buffer içerisine alınıp 10 saniye elle çalkalandı, 10 dakika bekletildi. PBS ile 5 dakika yıkandı. Anti-

Digoxigenin Conjugat damlatılıp 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. PBS ile 5 dakika yıkandı. DAB substrat damlatılıp oda sıcaklığında 3-6 dakika bekletildi. Üç kez distile su ile yıkandı. Methyl Green damlatılıp 10 dakika bekletildi. Distile suda iyice yıkandı. Alkole girmeden kurutuldu. Ksilende 1-2 dakika bekletildi. Entellan ile kapatıldı. Apoptozis indeksi 40'lık büyük büyütme alanı kullanılarak değerlendirildi. 1000 hücre sayıldı, 1000 hücre içermeyenlerde hücre katları alındı. Apoptozis indeksi; apoptotik hücre sayısı olarak belirlendi.

3.5. İstatiksel İnceleme Yöntemi

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS for Windows 22.0 programı kullanıldı. Biyokimyasal karşılaştırmalarda One Way Anova testi kullanıldı. Histopatolojik incelemelerde gruplar arası farkları hesaplamada Pearson Chi-Square testi kullanıldı. p değeri 0,05'ten küçük ($p<0,05$) sonuçlar anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde gerçekleştirilen çalışmaya toplam 36 adet erkek rat dahil edildi ve tüm denekler çalışmayı tamamladı. Çalışma kapsamında gruplar üzerinde penis ventral flep dokularında malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH), miyeloperoksidaz (MPO), interleukin 6 (IL-6) ve tumor nekrosis faktor- α (TNF- α) değerleri ölçüldü.

	MDA	GSH	MPO	IL-6	TNF- α
Sham	0,51 $\pm$ 0,14	1370,51 $\pm$ 751,47	7,94 $\pm$ 3,07*	79,45 $\pm$ 5,1	440,76 $\pm$ 268,46
PT ¹⁰	1,67 $\pm$ 0,44*	625,25 $\pm$ 240,98	7,63 $\pm$ 1,24*	140,19 $\pm$ 98, 26	701,39 $\pm$ 132,41*
PT ³⁰	1,74 $\pm$ 0,29*	545,86 $\pm$ 246,31	8,77 $\pm$ 1,13	364,01 $\pm$ 388,47*	552,6 $\pm$ 375,92
HZSS ¹⁰	0,37 $\pm$ 0,22	773,95 $\pm$ 161,41	3,12 $\pm$ 1,17	97,98 $\pm$ 17,97	426,76 $\pm$ 287,8
HZSS ³⁰	0,39 $\pm$ 0,18	767,24 $\pm$ 319,41	3,73 $\pm$ 1,91	78,68 $\pm$ 1,72	461,93 $\pm$ 262,13
HZSS ^B	0,57 $\pm$ 0,36	883,59 $\pm$ 471,57	3,46 $\pm$ 1,34	86,56 $\pm$ 20,92	502,89 $\pm$ 247,93
P değeri	0,001	0,028*	0,001	0,035	0,030

Tablo 3: MPO(ng/mg protein), MDA(nmol/mg protein), IL-6 (pg/mg protein), TNF- α (pg/mg protein) ve GSH(ng/mg protein) Değerlerinin Gruplara Göre Dağılımı ve Standart Sapmaları

4.1. Penil Dokudaki Biyokimyasal Analizler

MDA değeri PT¹⁰ grubunda $1,67 \pm 0,44$ ile en yüksek, HRSS¹⁰ grubunda $0,37 \pm 0,22$ ile en düşük olarak gözlemlenmiştir (Tablo 3). Sham grubu ile HZSS (hidrojenden zengin salin solusyonu) grupları arasında MDA değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır (p değerleri sırasıyla 0.369, 0.443 ve 0.668). PT¹⁰ grubu ile PT³⁰ grubu kendi aralarında fark tespit edilmemişken ($p > 0.05$) bu iki grup ile diğer tüm gruplar arasında anlamlı farklı bulunmuştur ($p = 0.001$). MDA değerleri HRSS¹⁰, HZSS³⁰ ve HZSS^B gruplarında PT¹⁰ ve PT³⁰ gruplarına göre anlamlı düşük bulunmuştur ($p = 0.001$).

GSH değeri Sham grubunda $1370,51 \pm 751,47$ ile en yüksek, PT³⁰ grubunda $545,86 \pm 246,31$ ile en düşük olarak gözlemlenmiştir (Tablo 3). GSH değerleri açısından Sham grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Diğer grupların kendi aralarında değerlendirmelerinde istatistiksel anlamlı fark bulunmazken ($p > 0.05$). GSH değerlerinin; penil turnike yapıldıktan sonra HZSS tedavisi verilen gruplarda sadece turnike yapılan gruplara göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

MPO değeri PT³⁰ grubunda $8,77 \pm 1,13$ ile en yüksek, HRSS¹⁰ grubunda $3,12 \pm 1,17$ ile en düşük olarak gözlemlenmiştir (Tablo 3). Sham grubu ile HRSS¹⁰, HZSS³⁰ ve HZSS^B grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark mevcuttur (p değerleri sırasıyla 0.001, 0.003 ve 0.002). PT¹⁰ ve PT³⁰ grupları ile HRSS¹⁰, HZSS³⁰ ve HZSS^B grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur (p değerleri sırasıyla 0.002, 0.006 ve 0.003). Fakat MPO değerleri için PT¹⁰ ve PT³⁰ gruplarının kendi arasında yine HRSS¹⁰, HZSS³⁰ ve HZSS^B

grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında aralarında herhangi bir istatistiksel fark bulunmamaktadır ($p>0.05$).

IL-6 değeri PT³⁰ grubunda $364,01\pm388,47$ ile en yüksek, HZSS³⁰ grubunda $79,45\pm5,1$ ile en düşük olarak gözlemlenmiştir (Tablo 3). IL-6 değerleri PT³⁰ grubunda diğer gruplardan istatistiksel olarak yüksek olarak bulunmuş olup (p değerleri sırasıyla 0.005, 0.009, 0.006, 0.025 ve 0.005); diğer grupların kendi içlerindeki karşılaştırmaları istatistiksel açıdan anlamsızdır ($p>0.005$). IL-6 değerlerinin penil turnike yapıp HZSS tedavisi verilen gruplarda sadece turnike yapılan gruplara göre istatistiksel olmasa da daha düşük olduğu görülmüştür.

TNF- α değeri PT¹⁰ grubunda $701,39\pm132,41$ ile en yüksek, HRSS¹⁰ grubunda $426,76\pm287,8$ ile en düşük olarak gözlemlenmiştir (Tablo 3). TNF- α değerlendirmesinde yapılan istatistiksel incelemelerde sadece PT¹⁰ grubu ile Sham ve HRSS¹⁰ grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p=0.049$ ve 0.039). Diğer gruplar arası yapılan değerlendirmelerde p değeri anlamsız ($p>0.005$) olarak hesaplanmıştır.

4.2. Histopatolojik Değerlendirme ve Apoptotik Analiz

Ratlardan alınan ventral penil flep spesmenlerde hemotoksilen eozin boyama yapılarak enflamasyon sınıflandırmasına göre doku hasarı derecesi ve TUNEL boyama yapılarak apoptozis indeksi bakıldı.

Enflamasyon sınıflamasına göre Sham grubunda hücre hasarı görülmedi.

PT¹⁰ grubunda iki spesimende grade 1 hasar görülürken dördünde grade 2 enflamatuar hasar görüldü. PT³⁰ grubunda ise beş spesimende grade 2 hasar mevcutken bir spesimende grade 3 hasar tespit edildi. HRSS¹⁰ grubunda yapılan sınıflamada üç spesimen grade 1, diğer üçü de grade 2 olarak değerlendirildi. HZSS³⁰ grubunun değerlendirmeleri dört adet grade 1 hasar, iki adet grade 2 hasar şeklindedir. Altıncı ve son grubumuz olan HZSS^B de ise bir adet grade 2 hasar görülürken diğer spesimenler grade 1 hasar olarak değerlendirilmiştir.

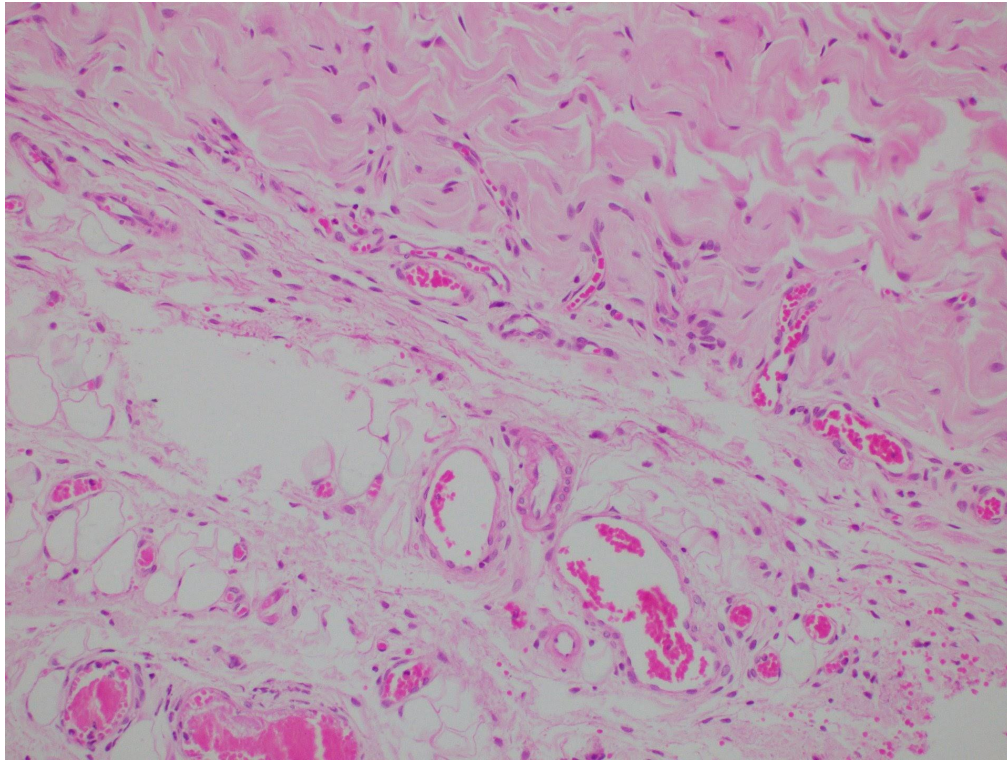
Değerlendirilmeye alınan bütün ratlarda ApopTaq kitiyle yapılan TUNEL methoduyla boyamada apoptozise gitmiş hücreye rastlanmadı. Bu nedenle apoptozis indeksi altı grupta da 0 (sıfır) olarak kabul edildi.

Grup	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Apoptozis İndeksi
Sham	6	-	-	-	0
PT ¹⁰	-	2	4	-	0
PT ³⁰	-	-	5	1	0
HRSS ¹⁰	-	3	3	-	0
HZSS ³⁰	-	4	2	-	0
HZSS ^B	-	5	1	-	0

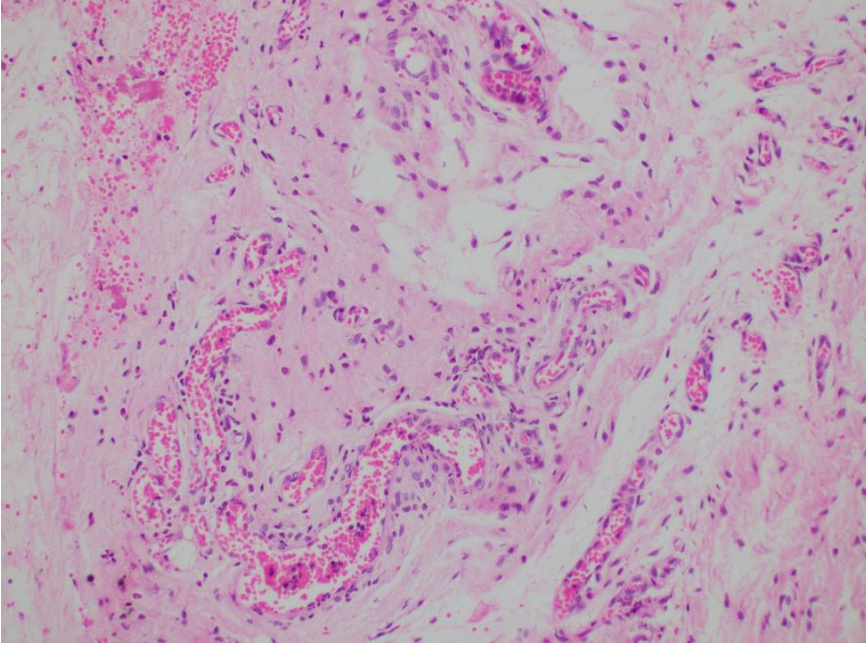
Tablo 4. Gruplarda Kaya M. ve ark. Çalışmasına (49) Göre Doku Hasarı Derecelendirmesi ve Apoptozis İndeksi

Bu sınıflamaya göre iskemi yapılmayan Sham grubunda histopatolojik olarak enflamasyon tespit edilmemiş olup diğer tüm gruplara göre istatistiksel anlamlı fark mevcuttur ($p<0.05$). PT¹⁰ ve PT³⁰ gruplarında enflamasyon en yüksek tespit edilmiş olup diğer

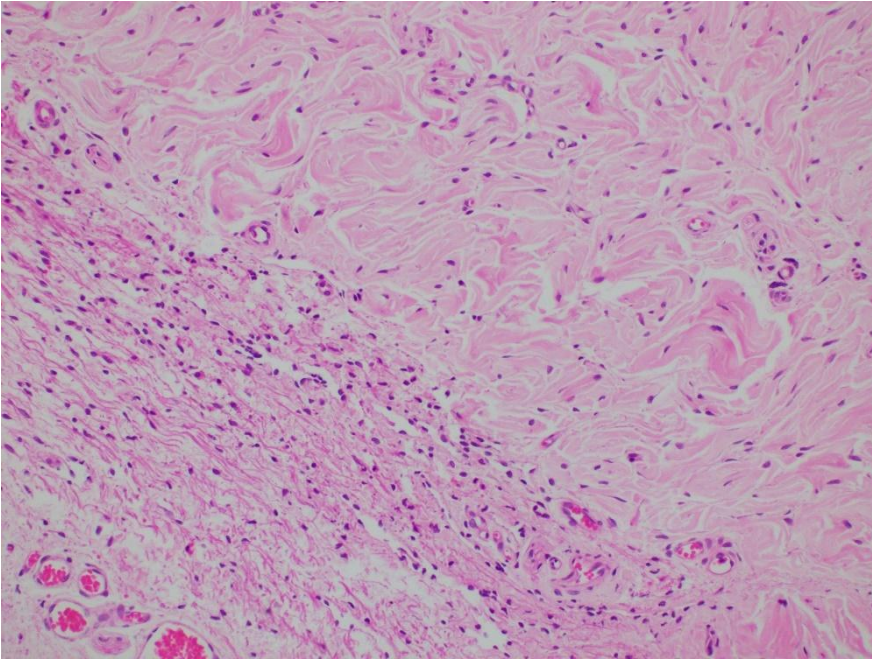
gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur (p değerleri sırasıyla 0.036, 0.009, 0.001 ve 0.001). Penil turnike (Pt) sonrası ve öncesi HZSS tedavisi verilen gruplarda enflamasyon derecesi sadece Pt yapılan gruplara göre daha düşük derecelere yer değiştirmiştir. Pt öncesi HZSS tedavisi verilen HZSS³⁰ grubunda hasarlanma derecesi daha az olmakla beraber, diğer HZSS gruplarıyla arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).



Resim 4: Sham grubunda grade 0 hasar penil doku görünümü (H&E boyası, 20’lik büyütme)



Resim 5: HZSS^B grubunda grade 1 hasar penil doku görünümü (H&E boyası, 20'lik büyütme)



Resim 6: PT³⁰ grubunda grade 2 hasar penil doku görünümü (H&E boyası, 20'lik büyütme)

5.TARTIŞMA

Hipospadias ya da penisi ilgilendiren sünnet, penil kordi, epispadias gibi hastalıkların cerrahisi sırasında penil turnike (Pt) uygulaması, kansız bir ortam sağlamak için esastır. Bu amaçla genellikle lateks kateter, Penrose dren, kauçuk band ya da standart bir lastik tüp kullanılır ve penisin tabanına yerleştirilir (51). Redman, 1986 yılında ilk defa Pt kullanımını gerçekleştirdikten sonra, en güvenli Pt uygulama zamanını ve onarımın başarı oranı üzerine etkisini değerlendirmek için birçok çalışma yapılmıştır (52). Ameliyat sırasında önerilen Pt uygulama süresi tıbbi literatürde 9 ile 50 dakika arasındaki sınırlarda değişmektedir (52, 53). Cerrahların bazıları operasyon boyunca, diğerleri 10 dakikada bir aralıklı Pt uygulamıştır. Kimi yazarlar sadece diseksiyon sırasında Pt uygularken bazıları ise aralıklı Pt ve penil deriye epinefrin enjeksiyonu yapmışlardır. Her ne kadar Pt uygulaması karpus kavernezumdaki kasılma mekanizmasını değiştirmese de, 20 dakikadan daha uzun süreler önerilmemiştir (54). Hatta Redman hipospadias cerrahisinde glans insizyonuna başlamadan yapılan Pt ve glans suture edildikten sonra açılan turnikenin 50 dakikaya kadar güvenli olduğunu bildirmiştir. Pathak ise meatotomi, sünnet, meatoplasti gibi hafif penil cerrahide 9-14 dakika arası Pt kullanmış ve % 4.17 penil ödem geliştiğini rapor etmiştir. Bunun beraber, iki evreli hipospadias cerrahisinde, penil turnike uygulamasına bağlı greft hasarı da bildirilmiştir (55). Üstteki makaleler ışığında, bu çalışmada hipospadias cerrahisi temel alınarak, rat penisinde Mathieu flep benzeri cerrahi model oluşturulup 10 ve 30 dakikalık Pt uygulaması ile farklı sürelerin penil dokuya olan etkisinin incelenmesi planlandı.

Pt uygulaması ve sonrasında kan akımının restorasyonu, penil deri ve eğer flep ile onarım yapılıyorsa bu dokularda iskemi-reperfüzyon hasarına neden olur. Pt sonrası iskemi

reperfüzyon (I/R) hasarına bağı malondialdehit (MDA), miyeloperoksidaz (MPO), interleukin 6 (IL-6) ve tümör nekrosis faktor- α (TNF- α) gibi oksidan ve enflamasyon parametrelerinin arttığı, doku iyileşmesinin bozulduğu ve bakteriyel adezyon moleküllerinin arttığı gösterilmiştir (2, 49, 56, 57) (tablo 1). Ek olarak, Pt sonrası vasküler endotelial growth faktör (VEGF) seviyelerinin azalarak yara iyileşmesine angiogenez üzerinden kötü etkileri olduğu da bildirilmiştir (49). Yukarıda anlatılan çalışmalar Pt'nin iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı yaptığını kanıtlamaya ya da doku üzerine kötü etkilerini göstermeye çalışan ve Pt uygulamasının süresi üzerine odaklanmış çalışmalardır. Pt'ye bağı hasarı ya da uzamış Pt süresinin etkilerini azaltacak tedaviler üzerine deneysel çalışma şimdiye kadar planlanmamıştır. Bu amaçla bu deneysel çalışmada, antioksidan, antienflamatuar ve anti-apoptotik özelliklerinden faydalanmak üzere 10 ve 30 dakika Pt altında Mathieu flep oluşturulan sıçanlarda ilk kez HZSS kullanılarak, bu flepler üzerindeki olası koruyucu etkilerinin ortaya çıkarılması hedeflenmiştir.

İskemi sonrası reperfüzyondan kısa bir süre sonra çok miktarda serbest oksijen radikali (SOR) salınır. SOR'lar oksidatif stresi tetikleyerek endotel disfonksiyonuna ve nötrofil infiltrasyonuna neden olur (42, 58, 59). I/R hasarı mekanizması SOR saldırısı, kapiller dolaşım yetmezliği ve nötrofille ilişkili doku hasarı ve venöz endotelial hücre hasarının toplamı olarak tanımlanabilir (33). SOR'lar, doku beslenmesindeki eksiklik ve oksijen yoksunluğu nedeniyle ortaya çıkar. Doku reperfüzyonundan sonra, SOR'lar sistemik dolaşıma girer ve yıkıcı etkiler meydana gelir (43). Hidroksil radikali (OH⁻), SOR'ların en güçlüsüdür ve memelilerde, onu nötralize edecek endojen detoksifikasyon sistemlerinden yoksundur. Bu nedenle, OH'nin nötralize edecek tedavi seçenekleri, oksidatif hasarın iyileştirilmesi için kritik olabilir. Moleküler hidrojen biyomembranlara kolayca tutunup

sitozol, mitokondri (major SOR üretim yeri) ve hücrenin diğer organellerinin içine girebilir ve oluşan OH⁻'yi H₂O'ya dönüştürerek hücre ve doku hasarını engeller (60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67). Bu çalışma Pt'nin daha önceki deneysel çalışmaları destekler tarzda I/R hasarı sonrası MDA, MPO, TNF- α , IL-6 gibi oksidan ve enflamatuar parametreleri penil doku düzeyinde artırıcı etkileri olduğu gösterilmiştir (49, 56). Pt sonrası antioksidan glutatyon (GSH) değerlerinin düştüğü de ilk kez bu çalışmayla gösterilmiştir.

HZSS'nin intraabdominal adezyonları antioksidan ve antienflamatuar etkisi ile azalttığı intraperitoneal (İP) HZSS uygulanan modellerde uygulanmayanlara göre MDA, MPO VE TNF- α ve IL-6 seviyelerini düşürdüğü ve histopatolojik olarak adezyon oluşumunu azalttığı tespit edilmiştir (62). Benzer şekilde invaginasyonla oluşturulan intestinal iskemi ve mezenter iskemisi ile oluşturulan iki farklı intestinal I/R modelinde intestinal doku enflamatuar ve oksidan maddelerin seviyeleri HZSS tedavisi ile azalmış, histopatolojik olarak hasarlanma daha düşük derecelere dönüşmüş ve apoptoz azalmıştır (60, 63). Yine HRSS tedavisi ile enflamatuar barsak hastalığı modelinde kolon dokusu MDA, MPO, IL-6 ve TNF- α düzeylerini azalırken, antioksidan GSH düzeyi artmıştır. Ovarian iskemi ve testiküler torsiyon modellerinde bu oksidan parametreler HZSS tedavisi ile azalmış GSH ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan parametreler artmış ve bu iyileşme histopatolojik olarak da gösterilmiştir (61, 66). Bizim çalışmamızda ise hipospadias modelinde Pt sonrası 4. saatte alınan doku MDA düzeyleri HZSS verilen tedavi gruplarında HZSS verilmeyen Pt gruplarına göre daha düşük çıkmıştır (p=0.001). Bunun aksine, GSH düzeyleri ise en düşük olarak sırasıyla PT³⁰ ve PT¹⁰ ile Pt gruplarında bulunmuştur. HZSS tedavisi ile istatistiksel olarak anlamlı olmasa da GSH seviyeleri tedavi gruplarında yükselmiştir (p=0.28). Bu sonuçlar, oluşturulan deneysel modelde, HZSS'nin antioksidan etkilerini destekler niteliktedir. Ayrıca,

MPO, IL-6 ve TNF- α gibi enflamatuar parametreler HZSS tedavisi alan 3 grupta, almayan gruplara göre daha düşük çıkmıştır. PT³⁰ grubunda bu parametreler en yüksek değere (TNF- α hariç) ulaşmıştır. MPO için tüm HZSS grupları ile PT grupları arasında, IL-6 için PT³⁰ ile diğer gruplar arasında ve TNF- α için PT¹⁰ grubu ile HRSS¹⁰ grupları arası anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$) (tablo 3). Bu sonuçlar ile, uzamış iskeminin doku üzerinde enflamatuar süreci artırdığı, HZSS uygulamasının ise bu süreci baskılayabildiği gösterilmiştir. Bu bulgular ışığında penil cerrahide daha kısa süreli Pt uygulaması tercih edilmesi önerilir.

Pt sonrası histopatolojik incelemelerde, hasarlanma ancak 24 saat ve özellikle 30 dakika gibi uzun turnike uygulamalarından sonra gösterilebilmiştir (49). Kajbafzadeh ve arkadaşları ise değişik Pt uygulama sürelerinde, yapısal değişikliklerin elektron mikroskopik olarak en erken 60 dakikada, ışık mikroskopisi de ile 48 saatte gösterilebileceğini kanıtlamışlardır (68). Bu çalışmada ise, Pt uygulamasının histopatolojik etkisi, 4. saatte gösterilebilmiş ve HZSS'nin biyokimyasal olarak tespit edilen antienflamatuar ve antioksidan etkilerinin yanısıra, histopatolojik olarak da hasarlanmayı azalttığı gözlenmiştir (tablo 4). Ratlarda hazırladığımız Mathieu benzeri flep çalışmasına benzer tek çalışmada ratlarda deri flepinde oluşturulan iskemi modelinde, reperfüzyondan önce verilen intraperitoneal HZSS ile doku MDA seviyeleri azalmış, flep canlılığı ve perfüzyonu artmış olarak tespit edilmiştir (67). HZSS ve hipospadias-penil doku ile ilgili benzer çalışma olmadığı için bu çalışmanın sonuçları ile HZZS'nin penil doku üzerinde de antioksidan ve antienflamatuar etkileri olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada gruplarda apoptozis tespit edilememesi çalışmanın 4 saat gibi kısa sürede bitirilmesine bağlanabilir. Bu konudaki tek araştırma olan Kajbafzadeh ve arkadaşlarının çalışmasında Pt'den günler sonra yapılan örneklerde apoptoz gösterilmiştir (68). Ayrıca bu çalışmada koruyucu olarak Pt öncesi HZSS verme ile Pt sonrası HZSS

vermenin sonuç olarak fark etmediği görülmüştür. Bu HZSS'nin hızla ve kolaylıkla sitozol, mitokondri ve diğer organellerin içine hızlıca geçerek koruyucu etkisini göstermesiyle ilgili olabilir.

İnsanlar kanser, stres ve radyasyona bağlı yaralanmalardan korunmak için HZSS'yi günlük yaşamda da tüketmektedir (7, 69). Saitoh ve arkadaşları sıçan modelinde hidrojenin mutajenik, genotoksik ve subkronik oral toksik etkileri olduğunu belirtmiştir. Dişi sıçanlarda bazofil oranında değişiklikler ve erkek sıçanlarda ise aspartat aminotransferaz ve alanin aminotransferaz değerlerinde azalma tespit etti. Ancak, bu değişiklikler biyolojik olarak anlamlı kabul edilmedi. Ayrıca, karaciğer ve diğer organların hem otopside hem de histopatolojik incelemelerinde önemli bir değişiklik bulunmadı. Her iki cinsiyette, sıçanda ve insanda günde 20 ml/kg hidrojen alımına kadar hiçbir olumsuz etki ve toksik değişiklik gösterilmemiştir. HZSS bu çalışmada 5 ml/kg dozunda verildi ve bu nedenle yan etkiler için ek izleme yapılmadı (8).

HZSS hazırlanması basit, kullanımı kolay, ucuz, ayrıca vücut tarafından hızlı bir şekilde emilen ve hücrelere hızlı bir şekilde yayılan bir solusyondur. H₂, gaz halinde solunabilir, hidrojen bakımından zengin su olarak oral alımı veya HZSS olarak enjekte edilmesi veya diğer hidrojen bakımından zengin solusyonlarla enjekte edilebilir çözeltilerle uygulanabilir. Bununla birlikte, gaz formu oldukça yanıcı olduğundan patlamaya neden olabileceğinden, tıbbi kullanım için güvenli değildir. Oral alım güvenli ve uygundur, ancak mide ve bağırsakta kaybı nedeniyle H₂ konsantrasyonu ayarlamak genellikle zordur. Enjekte edilebilir form, daha doğru konsantrasyonda uygulamaya izin verir. Enjeksiyon için hazırlanan tüm çözeltiler, gama radyasyonu ile sterilize edilebilir ve bir hafta boyunca 4 °

C'de alüminyum poşetlerde depolanabilir. Bu, acil durumlarda olduğu gibi gerektiğinde kullanım için uygun hale getirilir (1, 9, 10).

6.SONUÇ

Antienflamatuar, antioksidan ve antiapoptotik olarak insanlarda da kullanılan hidrojen zengin salin solüsyonu penil flep ile hazırlanan hipospadias modelinde yapılan penil turnike uygulamasında; flep dokusunda oksidatif stresini, enflamasyonu azaltarak ve histopatolojik olarak enflamasyon derecelerini düşürerek koruyucu etkisini göstermiştir. Bu nedenle ucuz, kullanımı kolay, hazırlanması basit olan hidrojen zengin salin solüsyonu penisi ilgilendiren basit ya da komplike ameliyatlarda bu koruyucu etkisinden faydalanmak için kullanılabilir.

7.KAYNAKLAR

1. Alizadeh F, Fakoor A, Haghdani S. A comparison between tourniquet application and epinephrine injection for hemostasis during hypospadias surgery: The effect on bleeding and postoperative outcome. *J Pediatr Urol*. 2016 Jun;12(3):160.
2. Parsons BA, Kalejaiye O, Mohammed M, Persad RA. The penile tourniquet. *Asian J Androl*. 2013 May;15(3):364-7.
3. Baskin S L. Hypospadias and uretral development *J Urol* 2000; 163: 951-956.
4. Stein R, Schröder A, Thüroff W J. Surgery Illustrated, Surgical Atlas, Primary hipospadias repair with buccal mucosa. *BJU Int* 2006; 97:871-889.
5. Smith E.D. History of hypospadias, *Ped Surg Int* 1997; 12: 81-85.
6. Başaklar A.C. Bebek ve Çocukların Cerrahi ve Ürolojik Hastalıkları. Ankara: Palme Kitabevi; 2006.
7. Price RD, Lambe GF, Jones RP Two-stage hypospadias repair: audit in a district general hospital. *Br J Plast Surg*. 2003 Dec;56(8):752-8.
8. Smith E.D. Malformations of the bladder and urethra, and hypospadias, Holder and Ashcraft: Pediatric Surgery, W.B. Saunders Company, Philadelphia ,1980 ,752-792.
9. Söylet Y et all. Hypospadias Reoperations. *Eur J Pediatr Surg* 2004; 14: 188-192.
10. Dessanti A, Rigamonti W, Merulla V. Autologous buccal mucosa graft for hypospadias repair: An initial report, *J Urol* 1992; 147: 1081-1084.

11. Humby G, A one stage operation for hypospadias Br J Surg 1941; 29: 84-92.
12. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 4. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 2006.
13. Cilento B, Freeman M, Schneck F, Retik A, Atala A, Phenotypic and cytogenetic characterization of human bladder urothelia expanded in vitro J Urol 1994; 152: 665-670.
14. Atala A. Regenerative Medicine And Urology. BJU Int 2003; 92: 58-67.
15. Kim SB, Mooney D. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. TIBTECH 1998; 16: 224-229.
16. oo JJ, Meng J, Oberpenning F, Atala A. Bladder augmentation using allogenic bladder submucosa seeded with cells. Urology 1998; 51: 221-225.
17. Pariente JL, Kim SB, Atala A. In vitro biocompatibility assesment of naturally derived and synthetic biomaterials using normal human urothelial cells. J Biomed Mat Res 2001; 55:33-39.
18. Chen F, Yoo JJ, Atala A. Acelluler collagen matrix as a possible “of the shelf” biomaterial for urethral repair Urology 1999; 54: 407-410.
19. Nuininga J E, Moerkerk H V, Hansen A, Hulsbergen C A. Rabbit üretra replacement with a defined biomatriks or small intestinal submukoza Eur Urol 2003; 44:266-271.
20. De Filippo, Roger E, Yoo James J, Atala A. Urethral replacement using cell seeded tubularised collagen matrices J Urol 2002; 168: 1789-1793.

21. Gonzalez LM, Moeser AJ, Blikslager AT. Animal models of ischemia-reperfusion-induced intestinal injury: progress and promise for translational research. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2015 Jan 15;308(2): G63-75.
22. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med*. 2011 Nov 7;17(11):1391-401.
23. Kaya C, Karabulut R, Turkyilmaz Z, Sonmez K, Kulduk G, Gülbahar Ö, Köse F, Basaklar AC. Lycopene has reduced renal damage histopathologically and biochemically in experimental renal ischemia-reperfusion injury. *Ren Fail*. 2015;37(8):1390-5.
24. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins ve Cotran Hastalığın Patolojik Temeli. 7. Baskı, Philadelphia(Pennsylvania), Elsevier Saunders. 2009.
25. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robins Basic Pathology. 10. ed., Philadelphia(Pennsylvania), Elsevier Saunders. 2018.
26. Memişoğulları R. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi, *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 2005; 3:30-39.
27. Akkuş I, Kalak S, Vural H. Leukocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum and leukocyte vitamin C levels of patients with type II diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 1996; 244:221-7.
28. Nordberg J,Arner E.S.J.Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine* 2001; 31(11):1287-1312.

29. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyolojik Etkileri, 2. Baskı, Konya: Mimoza Yayınları, 1995.
30. Ozgür O, Kubilay I, Fazil TA, Dilara Z, Sevdâ FM. Sildenafil attenuates renal ischemia reperfusion injury by decreasing leukocyte. *Acta Histochem* 2009; 10:10–6.
31. Özel Y. Ratlarda Karaciğer İskemi/Reperfuzyon Hasarında Grape Seed Proanthocyanidinin Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi (tez). İstanbul: Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Bölümü; 2006.
32. Davies SJ, Reichardt-Pascal SY, Vaughan D, Russel GI. Differential effect of ischemia-reperfusion injury on anti-oxidant enzyme activity in the rat kidney. *Exp Nephrol* 1995; 3: 348-354.
33. Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, Katsura K, Katayama Y, Asoh S, Ohta S. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med*. 2007 Jun;13(6):688-94.
34. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL: Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocrine Reviews*. 2004; 25: 612–628.
35. Akçetin Z, Busch A, Kessler G, Heynemann H, Holtz J, Brömme H.J. Evidence for only a moderate lipid peroxidation during ischemia-reperfusion of rat kidney due to its high antioxidative capacity. *Urol Res* 1999; 27: 280-284.
36. Sorensen V, Nilsson U, Pettersson S, Schersten T, Sjöquist PO, Svensson L, Jonsson O. Effects of pretreatment with an indole-indole compound on lipid peroxidation in

the cortex and medulla of rabbit kidneys after ischemia- reperfusion. *Acta Physiol Scand* 1997; 161: 403-409.

37. Mirończuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Adv Med Sci.* 2018 Mar;63(1):68-78.
38. Miyata Y, Matsuo T, Mitsunari K, Asai A, Ohba K, Sakai H. A Review of Oxidative Stress and Urinary Dysfunction Caused by Bladder Outlet Obstruction and Treatments Using Antioxidants. *Antioxidants (Basel).* 2019 May 15;8(5).
39. Oral T. İnsan biyokimyası. Ankara: Palme Yayıncılık, 2002.
40. Şener G, Yeğen BÇ. İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim* 2009; 22 (3): 5- 13.
41. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.
42. Song G, Li M, Sang H, Zhang L, Li X, Yao S, Yu Y, Zong C, Xue Y, Qin S. Hydrogen-rich water decreases serum LDL-cholesterol levels and improves HDL function in patients with potential metabolic syndrome. *J Lipid Res.* 2013 Jul;54(7):1884-93.
43. Li J, Hong Z, Liu H, Zhou J, Cui L, Yuan S, Chu X, Yu P. Hydrogen-Rich Saline Promotes the Recovery of Renal Function after Ischemia/Reperfusion Injury in Rats via Anti-apoptosis and Anti-inflammation. *Front Pharmacol.* 2016 Apr 22;7:106.
44. Liu YQ, Liu YF, Ma XM, Xiao YD, Wang YB, Zhang MZ, Cheng AX, Wang TT, Li JL, Zhao PX, Xie F, Zhang X. Hydrogen-rich saline attenuates skin ischemia/

- reperfusion induced apoptosis via regulating Bax/Bcl-2 ratio and ASK-1/JNK pathway. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2015 Jul;68(7): 147-56.
45. Ji Q, Hui K, Zhang L, Sun X, Li W, Duan M. The effect of hydrogen-rich saline on the brain of rats with transient ischemia. *J Surg Res*. 2011 Jun 1;168(1): 95-101.
 46. Shi J, Yao F, Zhong C, Pan X, Yang Y, Lin Q. Hydrogen saline is protective for acute lung ischaemia/reperfusion injuries in rats. *Heart Lung Circ*. 2012 Sep;21(9): 556-63.
 47. Shingu C, Koga H, Hagiwara S, Matsumoto S, Goto K, Yokoi I, Noguchi T. Hydrogen-rich saline solution attenuates renal ischemia-reperfusion injury. *J. Anesth*. 2010 Aug;24(4):569-74.
 48. Ohta S. Molecular hydrogen as a novel antioxidant: overview of the advantages of hydrogen for medical applications. *Methods Enzymol*. 2015; 555: 289-317.
 49. Kaya M, Soyer T, Ayva S, Cakmak M. Effect of penile tourniquet on growth factors in rat penile tissue. *Eur J Pediatr Surg*. 2009 Aug;19(4):236-40.
 50. Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, et al. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochem Cytochem*. 1996;44(9):959-68.
 51. Karaguzel E, Bayraktar C, Kutlu O, Yulug E, Mentese A, Okatan AE, Colak F, Ozer S, Kazaz IO. The possible protective effects of dipyridamole on ischemic reperfusion injury of priapism. *Int Braz J Urol*. 2016 Jan-Feb;42(1):146-53.

52. Zheng X, Mao Y, Cai J, Li Y, Liu W, Sun P, Zhang JH, Sun X, Yuan H. Hydrogen-rich saline protects against intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Free Radic Res.* 2009 May;43(5):478-84.
53. Çevik Ö, Çadircı S, Şener TE, Tinay I, Akbal C, Tavukçu HH, Çetinel S, Kıran D, Şener G. Quercetin treatment against ischemia/reperfusion injury in rat corpus cavernosum tissue: a role on apoptosis and oxidative stress. *Free Radic Res.* 2013 Sep;47(9):683-91.
54. Bozkurt NB, Moralioglu S, Vural IM, Sarioglu Y, Pekiner C. Does tourniquet application alter the nitregric responses of rabbit corpus cavernosum penis? A functional study. *World J Urol.* 2008 Apr;26(2):191-6.
55. Davis DG, Harrold MW. Treatment of hypospadias by a modified Cloutier two-stage repair. *Plast Reconstr Surg.* 1980 Aug;66(2):271-8.
56. Cakmak M, Caglayan F, Kisa U, Bozdogan O, Saray A, Caglayan O. Tourniquet application and epinephrine injection to penile skin: is it safe? *Urol Res.* 2002 Sep;30(4):268-72. Epub 2002 Jul 3.
57. Boybeyi-Turer O, Kacmaz B, Arat E, Atasoy P, Kisa U, Gunal YD, Aslan MK, Soyer T. Does penile tourniquet application alter bacterial adhesion to rat urethral cells: an in vitro study. *J Pediatr Surg.* 2018 Apr;53(4):818-824.
58. Chen K, Wang N, Diao Y, Dong W, Sun Y, Liu L, Wu X. Hydrogen-Rich Saline Attenuates Brain Injury Induced by Cardiopulmonary Bypass and Inhibits

Microvascular Endothelial Cell Apoptosis Via the PI3K/Akt/GSK3 β Signaling Pathway in Rats. *Cell Physiol Biochem*. 2017;43(4):1634-1647.

59. Takahashi M, Chen-Yoshikawa TF, Saito M, Tanaka S, Miyamoto E, Ohata K, Kondo T, Motoyama H, Hijiya K, Aoyama A, Date H. Immersing lungs in hydrogen-rich saline attenuates lung ischaemia-reperfusion injury. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2017 Mar 1;51(3):442-448
60. Wu MJ, Chen M, Sang S, Hou LL, Tian ML, Li K, Lv FQ. Protective effects of hydrogen rich water on the intestinal ischemia/reperfusion injury due to intestinal intussusception in a rat model. *Med Gas Res*. 2017 Jun 30;7(2):101-106.
61. Gokalp N, Basaklar AC, Sonmez K, Turkyilmaz Z, Karabulut R, Poyraz A, Gulbahar O. Protective effect of hydrogen rich saline solution on experimental ovarian ischemia reperfusion model in rats. *J Pediatr Surg*. 2017 Mar;52(3):492-497.
62. Liu Z, Cheng S, Gu C, Pei H, Hong X. Effect of Hydrogen-Rich Saline on Postoperative Intra-Abdominal Adhesion Bands Formation in Mice. *Med Sci Monit*. 2017 Nov 11; 23: 5363-5373.
63. Eryilmaz S, Turkyilmaz Z, Karabulut R, Gulburun MA, Poyraz A, Gulbahar O, Arslan B, Sonmez K. The effects of hydrogen-rich saline solution on intestinal anastomosis performed after intestinal ischemia reperfusion injury. *J Pediatr Surg*. 2019 Aug 13. pii: S0022-3468(19)30506-8.
64. Shen NY, Bi JB, Zhang JY, Zhang SM, Gu JX, Qu K, Liu C. Hydrogen-rich water protects against inflammatory bowel disease in mice by inhibiting endoplasmic

reticulum stress and promoting heme oxygenase-1 expression. *World J Gastroenterol*. 2017 Feb 28;23(8):1375-1386. doi: 10.3748/wjg.v23.i8.1375.

65. Du Z, Liu J, Jia H, Xu W, Zhao X. Three hydrogen-rich solutions protect against intestinal injury in uncontrolled hemorrhagic shock. *Int J Clin Exp Med*. 2015 May 15;8(5):7620-6.
66. Jiang D, Wu D, Zhang Y, Xu B, Sun X, Li Z. Protective effects of hydrogen rich saline solution on experimental testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *J Urol*. 2012 Jun;187(6):2249-53. doi: 10.1016/j.juro.2012.01.029.
67. Zhao L, Wang YB, Qin SR, Ma XM, Sun XJ, Wang ML, Zhong RG. Protective effect of hydrogen-rich saline on ischemia/reperfusion injury in rat skin flap. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2013 May;14(5):382-91.
68. Kajbafzadeh AM, Payabvash S, Tavangar SM, Salmasi AH, Sadeghi Z, et al. Comparison of different techniques for hemostasis in a rabbit model of hypospadias repair. *J Urol*. 2007;178:2555–60.
69. Kolukcu E, Kilic S, Parlaktas BS, Erdemir F, Unsal V, Atilgan D, Uluocak N. The effects of oxytocin on penile tissues in experimental priapism model in rats. *Int Urol Nephrol*. 2019 Feb;51(2):231-238.
70. Yılmaz Y, Taken K, Atar M, Ergün M, Söylemez H. Protective effect of curcumin on priapism and ischemia-reperfusion injury in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015 Dec;19(23):4664-70.

71. Mao YF, Zheng XF, Cai JM, You XM, Deng XM, Zhang JH, Jiang L, Sun XJ. Hydrogen-rich saline reduces lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Apr 17;381(4):602-5.
72. Kehrer JP, Klotz LO. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. *Crit Rev Toxicol*. 2015;45(9):765-98.
73. Guo SX, Jin YY, Fang Q, You CG, Wang XG, Hu XL, Han CM. Beneficial effects of hydrogen-rich saline on early burn-wound progression in rats. *PLoS One*. 2015 Apr 13;10(4)
74. Huang L. Molecular hydrogen: a therapeutic antioxidant and beyond. *Med Gas Res*. 2016 Dec 30;6(4):219-222.
75. Shigeta T, Sakamoto S, Li XK, Cai S, Liu C, Kurokawa R, Nakazawa A, Kasahara M, Uemoto S. Luminal injection of hydrogen-rich solution attenuates intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Transplantation*. 2015 Mar;99(3):500-7.
76. Yu J, Yu Q, Liu Y, Zhang R, Xue L. Hydrogen gas alleviates oxygen toxicity by reducing hydroxyl radical levels in PC12 cells. *PLoS One*. 2017 Mar 31;12(3).
77. Wang X, Yu P, YongYang, Liu X, Jiang J, Liu D, Xue G. Hydrogen-rich saline resuscitation alleviates inflammation induced by severe burn with delayed resuscitation. *Burns*. 2015 Mar;41(2):379-85.
78. Barzegar M, Kaur G, Gavins FNE, Wang Y, Boyer CJ, Alexander JS. Potential therapeutic roles of stem cells in ischemia-reperfusion injury. *Stem Cell Res*. 2019 May; 37: 101421.

79. Hu C, Zhao L, Wu D, Li L. Modulating autophagy in mesenchymal stem cells effectively protects against hypoxia- or ischemia-induced injury. *Stem Cell Res Ther.* 2019 Apr 17;10(1):120.
80. Abualruz AR, O'Malley R, Ponnatapura J, Holbert BL, Whitworth P, Tappouni R, Lalwani N. MRI of common penile pathologies and penile prostheses. *Abdom Radiol (NY).* 2019 Jun 1.
81. Dennis JM, Witting PK. Protective Role for Antioxidants in Acute Kidney Disease. *Nutrients.* 2017 Jul 7;9(7).
82. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase(CAT) and glutathione peroxidase(GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine* 54 (2018) 287-293.
83. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg.* 1970;101(4):478-83.
84. Park PO, Haglund U, Bulkley GB, Falt K. The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. *Surgery.* 1990;107(5):574-80.

8.ÖZET

Bu çalışmada deneysel Mathieu tipi penil flep yapılarak penil turnike uygulanan ratlarda hidrojen zengin salin solüsyonunun (HZSS) penil doku üzerine koruyucu etkilerinin araştırılmasını amaçladık.

Çalışmamızda 36 adet erkek Wistar-albino rat rastgele seçilerek altışarlı altı gruba ayrıldı. Sham(S) grubuna hiçbir işlem yapılmadı. Diğer beş grupta Mathieu tip penil flep yapılarak penil turnike(Pt) yapıldı. PT¹⁰ ve PT³⁰ gruplarında sırasıyla 10 ve 30 dakika Pt yapıldı. HZSS¹⁰ ve HZSS³⁰ gruplarında ise 10 ve 30 dakikalık Pt açılmadan önce intraperitoneal HZSS 5ml/kg verilirken HZSS^B grubunda Pt'den 1 saat önce HZSS verilerek 30 dakikalık Pt flep uygulaması yapıldı. Tüm ratlar 4 saat sonra sakrafiye edilerek penil doku örnekleri alındı. Biyokimyasal olarak GSH, MPO, MDA, IL-6 ve TNF- α değerleri ölçüldü. Histopatolojik olarak doku hasarı ve apoptotik indeks bakıldı. Sonuçlar One-way Anova ve Pearson's ki kare testlerle değerlendirildi. Biyokimyasal olarak MDA, MPO ve IL-6 değerlerinde HZSS verilen gruplar lehine istatistiksel anlamlı azalma mevcutken ($p<0.05$), GSH değerlerinde ise PT gruplarının tersine HZSS gruplarında artma tespit edilirken istatistiksel olarak anlamsızdır ($p>0.05$). TNF- α değerlerinde HZSS gruplarında daha düşük değerler varken sadece PT¹⁰ grubu ile HRSS¹⁰ arası anlamlı fark mevcuttur. Patolojik olarak incelenen dokularda HZSS tedavisi verilen gruplarda sadece Pt yapılan gruplara göre enflamasyon anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.05$). Apoptozis ise hiçbir grupta saptanmamıştır.

Sonuç olarak hidrojen zengin salin solüsyonu penil flep ile hazırlanan hipospadias modelinde yapılan penil turnike uygulamasında penil doku oksidatif stresi, enflamasyonu

azaltarak ve histopatolojik olarak enflamasyon derecelerini düşürerek koruyucu etkisini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Penil doku, Hidrojenden zengin salin solusyonu, turnike, iskemi-reperfuzyon hasarı

9.SUMMARY

In this study, we aimed to investigate the protective effects of hydrogen-rich saline solution (HZSS) on penile tissue in rats who underwent an experimental Mathieu type penile flap with penile tourniquet.

In this study, 36 male Wistar-albino rats were randomly selected and divided into six groups. No operations were performed on the sham (S) group. In the other five groups, penile tourniquet (Pt) was performed with Mathieu type penile flap. PT¹⁰ and PT³⁰ groups were performed Pt for 10 and 30 minutes, respectively. In the HZSS¹⁰ and HZSS³⁰ groups, intraperitoneal HZSS 5ml/kg was given before opening the 10 and 30 minutes of Pt. All rats were sacrificed after 4 hours and penile tissue samples were taken. Biochemically, GSH, MPO, MDA, IL-6 and TNF- α values were measured. Tissue damage and apoptotic index were examined histopathologically. Results were evaluated by one-way ANOVA and Pearson's chi-square tests. Biochemically, MDA, MPO and IL-6 values were significantly decreased in favor of HZSS groups ($p < 0.05$), while GSH values were increased in HZSS groups in contrast to PT groups ($p > 0.05$). While TNF- α values were lower in HZSS groups, there was only significant difference between PT¹⁰ group and HRSS¹⁰. Inflammation was significantly decreased in treated groups compared to the PT groups ($p < 0.05$). Apoptosis was not detected in any group.

As a result, hydrogen rich saline solution showed protective effect on penile tourniquet application after hypospadias model prepared by penile flap, reducing oxidative stress, inflammation and decreasing inflammation histopathologically.

Keywords: Penile tissue, Hydrogen-rich saline solution, tourniquet, ischemia-reperfusion injury

10.EKLER

Bu tez kapsamında ek bulunmamaktadır.

11.ÖZGEÇMİŞ

ADI: MERVE

SOYADI: ALTIN GÜLBURUN

DOĞUM YERİ ve TARİHİ: ANTALYA - 13/02/89

EĞİTİMİ: DOKTORA

YABANCI DİLİ: İNGİLİZCE

ÜYE OLDUĞU BİLİMSEL KURULUŞLAR: -

BİLİMSEL ETKİNLİKLER: WOFAPS 2016, WOFAPS 2019