

# Testis torsiyonunda metilen mavisinin reperfüzyon hasarına etkisi\*

Naim KOKU, Hüseyin İLHAN, Baran TOKAR, Emine KARA, Ömer ÇOLAK

Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi, Patoloji ve Biyokimya Anabilim Dalları

## Özet

**Amaç:** Yapılan *in vitro* çalışmalarda, metilen mavisinin (MM) iskemi/reperfüzyon sonrası ortaya çıkan serbest oksijen radikallerini, ksantin oksidaz enzimi üzerine alternatif bir elektron yakalayıcı rolü oynayarak azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada testis torsiyonu modelinde, detorsiyondan önce intraperitoneal verilen MM'nin reperfüzyon hasarı üzerine etkisi incelendi.

**Yöntem:** Çalışmada 10 denekli dört grup Sprague-Dawley cinsi sıçan kullanıldı. Grup1 sham, diğer üçü tedavi grubu olarak düzenlendi. Bir saatlik torsiyon döneminde, detorsiyondan 10 dakika önce Grup 2'de serum fizyolojik (SF), Grup 3'de allopurinol (AL) ve Grup 4'te MM verildi. Bir saat detorsiyondan sonra testis çıkarıldı, kan örneği alındı. Serum ürik asit (ÜA) ve myeloperoksidaz (MPO) düzeyleri ve testis histopatolojisi değerlendirildi.

**Bulgular:** ÜA değerleri açısından AL grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı fark gözlemlendi ( $p<0.001$ ). MPO düzeyinde, MM ile SF grubu arasında fark saptanmazken, AL grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı fark saptandı ( $p<0.05$ ). Histopatolojik bulgular  $\chi^2$  analizi ile değerlendirildi. AL grubunun sham ve MM gruplarından farklılık göstermediği, SF grubundan ise anlamlı farklılık gösterdiği saptandı. AL grubunda düşük evrelerin daha fazla yoğunlaştığı görüldü. MM ile diğer gruplar karşılaştırıldığında anlamlı bir fark göstermemekle beraber, SF grubu ile kıyaslandığında MM grubunda daha az sayıda evre 3 hasar saptandı.

**Sonuç:** Bu sonuçlara göre, MM'nin deneysel testis torsiyonunda, detorsiyondan önce verilmesinin testis reperfüzyon hasarını ve enflamatuar cevabı anlamlı olarak azaltmamakla beraber, histopatolojik hasarın şiddetini azaltan bir etkisinin olabileceği düşünüldü.

**Anahtar kelimeler:** Testis, torsiyon, iskemi/reperfüzyon, metilen mavisini, allopurinol

## Summary

**The effect of methylene blue on reperfusion injury in torsion of the testis**

**Aim:** *In vitro* studies have demonstrated that methylene blue (mb) acts as an alternative electron acceptor for xanthine oxidase enzyme and suppresses the production of superoxide radicals  $o_2^-$  in reperfusion injury. In this study, the effect of intraperitoneal mb on reperfusion injury was investigated in a testicular torsion model.

**Method:** Sprague-Dawley rats were divided into four groups, each consisting 10 rats. In group I, sham operation was performed. In other three groups after 60 min torsion and 10 min before detorsion of the right testis, only isotonic saline (IS) in group II, Allopurinol (AL) in group III and MB in group IV were injected intraperitoneally. Following the 60 min detorsion period, blood sample were obtained and orchiectomy was performed. Serum uric acid (UA) and myeloperoxidase (MPO) level and testis histopathology were evaluated.

**Results:** UA was significantly lower in AL group compared with the other groups ( $p<0.001$ ). For MPO, while the difference was significant between AL group and the others ( $p<0.05$ ), no difference was determined between IS and MB groups. Histopathological findings were evaluated with  $\chi^2$  test. No difference was determined between AL and MB and also Sham groups. But the difference was significant between AL and IS groups. In AL group, injury spectrum was toward the low grades. There was no significant difference between MB and the others, but when compared to group IS, grade III injury was encountered less in MB group.

**Conclusion:** According to these results, it could be concluded that in experimental torsion of the testis, injection of MB before detorsion does not significantly decrease the reperfusion injury of the testis and the inflammatory response, but it may reduce the severity of histopathological changes.

**Key words:** Testis, torsion, ischemia/reperfusion, methylene blue, allopurinol

\*XIX. Ulusal Çocuk Cerrahisi Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur (7-11 Ekim 2001, Belek-Antalya)

**Adres:** Dr Naim Koku, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Meşelik 26480, Eskişehir

**Yayına kabul tarihi:** 27.08.2002

## Giriş

Testis torsiyonunda, erken tanı ve cerrahi girişim iskemik testislerin kurtarılmasında esastır. Erken testiküler eksplorasyon yaklaşık olarak % 90 oranında testisin kurtarılmasını sağladığı halde izlemde bu hastaların % 67 sinden fazlasında testiküler atrofi ve daha sonra subfertilite geliştiği bildirilmiştir (5,14,15).

İskemi reperfüzyon hasarının mekanizmasına ve tedavisine yönelik bilimsel çalışmaların artması sonucu, testis torsiyonunda testiküler hasarlanmanın ana nedeninin detorsiyondan sonra oluşan reperfüzyon hasarına bağlı olduğu düşünülmektedir (3,14,19).

Yapılan in vitro çalışmalar da, metilen mavisinin (MM) iskemik reperfüzyon hasarında serbest oksijen radikallerini, ksantin oksidaz enzimi üzerine alternatif bir elektron yakalayıcı olarak etki göstererek azalttığı bildirilmiştir (7,13,24,21). Bu çalışmada, testis torsiyonu modelinde, detorsiyondan önce intraperitoneal verilen MM'nin reperfüzyon hasarı üzerine etkisi, daha önce doku reperfüzyon hasarını azaltıcı etkinliği gösterilmiş olan allopürinol ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

## Gereç ve Yöntem

Çalışmada, standart fare yemi ve su ile "ad libitum" beslenen, ağırlığı 220-280 gr arasında Sprague-Dowley sıçanlar (n:40) kullanıldı. Denekler rastgele 4 gruba ayrıldı. Grup 1 (n:10), Sham grubu olarak düzenlenirken, Grup2 (n:10) serum fizyolojik (SF), Grup 3 (n:10) allopürinol (AL) ve Grup 4 (n:10) metilen mavisi (MM) verilerek tedavi edilen deneklerden oluşturulan gruplar olarak oluşturuldu.

Denekler çalışma öncesi 6 saat süre ile aç bırakıldı, su almalarına izin verildi. Ketamin HCl 50 mg/kg, (Ketamin, Eczacıbaşı, İstanbul) ve chlorpromazin 4 mg/kg (Largaktıl, Eczacıbaşı, İstanbul) karışımı İM verilerek uyutuldu. Çalışma süresi boyunca denekler infant incubator (Elektro-Mag M305, Türkiye) içerisinde tutuldular. İnkübatörün kabin ısı 34°C, nem % 40 ve kabin içi parsiyel oksijen basıncı % 21 olacak şekilde ayarlandı.

Sham grubu: Anesteziden sonra sağ hemiskrotal in-

sizyon ile tunica vaginalis açıldı. Testis insizyondan çıkarıldı, torsiyon yapılmadan tekrar skrotum içine alınarak tunica albuginea skrotuma sütüre edildi. 3 saat sonra testis çıkarıldı, histopatolojik çalışma için Bouin's solüsyonuna koyuldu. Biyokimyasal çalışma için vena cava inferiordan 4 ml kan alındı.

Çalışma grupları: Anesteziden sonra sağ hemiskrotal insizyon ile tunica vaginalis açıldı. Testis insizyondan çıkarıldı. Saatin tersi yönünde 720 0 torsiyone edildi. Tunica albuginea skrotuma sütüre edildi. İntraperitoneal 0.5-0.9 mm cut down (Braun, Almanya) kateteri yerleştirilerek insizyondan çıkarıldı. Torsiyonun 50. dk sında bir gruba intraperitoneal 3 ml SF, bir gruba 50 mg/kg AL, 3 ml SF içinde (Allopurinol, Sigma Chemical, A-8003, ABD) ve son gruba da 5 mg/kg MM, 3 ml SF içerisinde verildi. Torsiyonun 60. dk'sında detorsiyon yapıldı. Detorsiyondan 120 dk sonra testis çıkarıldı. Histopatolojik çalışma için Bouin's solüsyonuna koyuldu. Vena cava inferiordan biyokimyasal incelemeler için 4 ml kan örneği alındı.

## Biyokimyasal çalışmalar

Ürik asit (ÜA): Hücre enerji metabolizmasının son ürünlerinden biridir. ATP'nin yıkımından oluşan hipoksantin ve ksantin ÜA dönüşür (4,21). Otoanalizör de ölçüldü (Modular automated analyzer and uric acid test kit, Roche Diagnostics, Almanya).

Myeloperoksidaz (MPO): Nötrofil granüllerinde fazla miktarda bulunan bir enzimdir. MPO normal polimorfonükleer fonksiyon için esastır. İltihabi püy oluşumunda yeşil renk MPO dan dolayı oluşur, MPO hidrojen peroksitten hipohalous asit meydana getirir (16). MPO aktivitesi Suzuki yöntemi ile belirlendi (22).

## Histopatolojik değerlendirme

Doku örnekleri Bouin's solüsyonu içinde tespit edildi. En az 24 saat bekletilerek takibe alındı. Parafin bloklara gömülerek 6'luk kesitler hazırlandı. HE ile boyanarak ışık mikroskobunda değerlendirildi.

Histopatolojik bulgular Cosentino şemasına göre evrelendi (6).

*Evre 1. Düzenli sıralı germ hücreleri ile birlikte normal testis dokusu*

*Evre 2. Daha az düzenli germ hücreleri, düzensiz yaklaşmış seminifer tübülleri.*

*Evre 3. Düzensiz germ hücreleri, küçülmüş piknotik çekirdek ve sınırları bozulmuş seminifer tübüller.*

*Evre 4. Düzensiz, koagülasyon nekrozu oluşmuş germ hücreleri ile dolu seminifer tübüller.*

#### İstatistiksel çalışma

*Biyokimyasal değerler tek yönlü varyans analizi ve çoklu karşılaştırma testi (Tukey W testi) kullanılarak karşılaştırıldı. Histopatolojik bulgular  $\chi^2$  analizi ile değerlendirildi.*

#### Bulgular

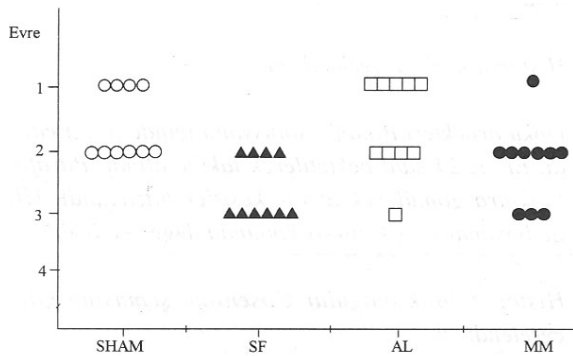
##### Biyokimyasal çalışmalar

UA değerleri açısından guruplar arasında önemli düzeyde farklılık saptandı (F4; 45=20.31,  $p<0.001$ ). UA değerleri açısından sham grubu ile SF ve MM gurupları arasında belirgin bir fark saptanmazken ( $p>0.05$ ), AL grubu ile diğer guruplar arasında anlamlı fark gözlemlendi ( $p<0.001$ ), (Tablo 1).

MPO serum değerleri karşılaştırıldığında SF ve MM arasında fark saptanmazken, AL ile SF grubu ara-

**Tablo 1. Guruplara göre MPO ve ÜA ortalama değerleri (mean±SEM).**

Grup	MPO (u/L)	ÜA (mg/dL)
Sham	1.63±0.17	1.85±0.22
SF	1.97±0.18	1.56±0.15
AL	0.83±0.13	0.10±0.01
MM	2.28±0.18	1.35±0.18



**Şekil 1. Guruplara göre histopatolojik evre dağılımı.**

sında anlamlı fark bulundu ( $p<0.05$ ). AL grubu MPO serum düzeyi diğer guruplarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük saptandı, diğer guruplar arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi (Tablo 1).

#### Histopatolojik değerlendirme

Histopatolojik bulgular Cosentino testis histopatolojik hasar evrelemesine göre değerlendirildi. Gurupların hiçbirinde evre 4 hasara rastlanılmadı. Çalışmada bu sınıflamaya göre Evre 1-3 arası hasar tespit edildi (Şekil 1).

SF grubu incelendiğinde bu gurubun sham grubu ile anlamlı fark gösterdiği saptandı ( $p<0.05$ ). SF grubu ile AL grubu karşılaştırıldığında allopurinolün çok önemli fark ( $p<0.01$ ) gösterecek şekilde evre 1 ağırlıklı olarak dağılım gösterdiği, evre 3 kriter olarak alındığında yapılan karşılaştırmada ise farkın önemli anlamlılıkta olduğu belirlendi ( $p<0.05$ ). Allopurinol gurubunun Sham gurubu ile karşılaştırılmasında ise tüm evrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark ortaya çıkmadığı saptandı ( $p>0.05$ ). Allopurinol grubunda düşük evrelerin daha fazla yoğunlaştığı görüldü.

Sham gurubu ile MM grubu karşılaştırıldığında, histopatolojik değişiklikler anlamlı fark oluşturmaya- cak şekilde bulundu ( $p>0.05$ ). MM ile SF gurubunun karşılaştırılmasında evrelerin dağılımının istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği belirlendi. Bununla beraber MM' nin evre 3 düzeyindeki hasar oluşumundaki etkinliğinin sham gurupları referans olarak alındığında kuvvetli olmadığı ve sadece 2 denekte evre 3 ün gözlemlendiği saptandı. SF grubu ile kıyaslandığında MM grubunda daha az sayıda evre 3 hasar gözlemlendi.

#### Tartışma

Testiküler torsiyon ve detorsiyon, dokuların hem iskemisi hemde reperfüzyonu sırasında morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler oluşturur (1,2,10,14,17,19). Birçok çalışma iskemi reperfüzyon (İ/R) hasarının oksijen serbest radikalleri tarafından oluşturulduğunu ortaya koymuştur (2,8,11). İ/R hasarlanmasının patogenezinin adım adım aydınlatılması ile testis de dahil çeşitli organda bu hasarlanmayı önlemek için; a) Serbest radikallerin oluşumunun önlenmesi, b)

Oluşan radikallerin ortamdaki temizlenmesi, c) Nötrofillerin inhibisyonu ve d) Antioksidan kullanılması gibi hemen hemen her basamak için bir çok ilaç ve enzim çalışılmıştır (3,20,23,25).

İskemi ve ardından reperfüzyonun olduğu bir dokuda serbest oksijen radikallerinin üretimini engellenmesi için ilk adım ksantin oksidaz inhibitörlerinin kullanılmasıdır (3,18). Bu inhibitörler arasında en iyi bilineni allopurinol olup, ksantin oksidaz enziminin bağlanacağı bölgede pürine bağlanır. Akgür ve ark.'ları 1, 3 ve 5 saat 720 derece torsion ve ardından detorsiyon oluşturdukları ratlarda detorsiyondan önce allopurinol verilmesinin testiste hasarlanmayı önlediğini bildirmişlerdir (3). Bu çalışmada hasarın değerlendirilmesi, biyokimyasal olarak lipid peroksidasyonuna bakılarak yapılmıştır. Çalışmamızda da detorsiyondan önce verilen allopurinolün gerek biyokimyasal olarak, gerekse histopatolojik olarak testis doku hasarlanmasını azalttığı gösterilmiştir.

Serbest oksijen radikallerinin açığa çıkmasının farmakolojik olarak engellenmesinde bir başka yöntem MM kullanılmasıdır. MM'sinin ksantin oksidaz enziminin elektron yakalayıcısı olarak rol oynaması sonucu İR hasarında serbest oksijen radikallerini azalttığı bildirilmiştir (7,12,13,21). Salaris ve ark.'ları iskemik alana serbest oksijenin gelmesinden önce metilen mavisinin verilmesinin etkili bir antioksidan görevi yapabileceğini ve MM'sinin doku oksidazları tarafından süperoksit (O<sub>2</sub>) oluşumunu önleyen yeni bir antioksidan ilaç sınıfı oluşturabileceğini bildirmişlerdir (21). Galili ve ark.'ları, intraperitoneal olarak verilen MM'nin barsak iskemisi reperfüzyonundan sonra ortaya çıkan akciğer hasarlanmasını serbest oksijen radikallerini inhibe ederek azaltabileceğini bildirmişlerdir (7). MM'sinin hem intestinal reperfüzyondan sonra akciğerde polimorfonükleer lokositlerin toplanmasını önlemede, hemde postiskemik karaciğer reperfüzyonuna maruz kalmasından sonra aortal disfonksiyonu önlemede yararlı olabileceği gösterilmiştir (7,12).

Metilen mavisinin iskemi-reperfüzyon hasarlanmasında koruyucu etkisi karaciğer ve akciğer dokularında gösterilmiştir (24). Buna karşılık Greenstein ve ark. bir antioksidan olarak değerlendirdikleri MM'nin ratlarda spermatik cord torsiyon ve detorsi-

yonundan sonra histolojik değişiklikler üzerinde hafifletici etkisinin olmadığını bildirmişlerdir (9).

Klasik ksantin oksidaz inhibitörlerine zıt olarak, MM hipoksantin ve ksantin ürik aside dönüşümünü engellemez, alternatif co-substrat olarak kompetisyonla seçici olarak superoksit oluşumunu engeller. Çalışmamızda ksantin oksidaz enzimini inhibe eden allopurinolün kanda ürik asit değerlerini düşürürken, metilen mavisinin ürik asit değerini düşürmediği, serum fizyolojik ve sham gruplarındaki değerlerle istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmayacak değerlerde kaldığı saptanmıştır. Bu sonuçta metilen mavisinin hipoksantin ve ksantin ürik asite dönüşümünü engellemediğini, enzim üzerine etkinliğinin elektron transferi için oksijen molekülü ile rekabet olduğunu gösterir. Bu Kelner'in gözlemine uygundur. MM'si burada klasik ksantin oksidaz inhibitörü olarak rol oynamaz ve hipoksantin veya ksantin oksidasyon hızını azaltmaz, aksine böyle reaksiyonlarda hızı arttırdığı gösterilmiştir (13).

Bu çalışmada, MM'nin testis detorsiyonundan hemen önce verilmesinin koruyucu etkisini araştırmak için bir grup oluştururken, yeterli kıyaslama yapabilmek için hemen hemen her organda reperfüzyon hasarından koruyucu etkisi ortaya konulan, bir ksantin oksidaz inhibitörü olan, allopurinol ile de bir çalışma grubu oluşturulmuştur. Değerlendirme yapıldığında, daha önce başka çalışmalarda da etkinliği doğrulanmış olan allopurinolün hem reperfüzyona bağlı doku hasarının indirek bir göstergesi olan serum MPO düzeyini azaltıcı etkisi, hem de histopatolojik olarak hasarı daha düşük evrelerde tuttuğunu gösteren yönü belirlenmiştir.

Çalışmamızda MM, torsiyon öncesi 5 mg/kg dozunda kullanılmıştır. Bu, literatürde MM'nin klinik kullanımını için 2-5 mg/kg olarak önerilen dozun üst sınırıdır (21). MM, MPO düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşmeye neden olmamıştır. Histopatolojik değerlendirmelerimizde, SF grubuna göre MM grubunda sayısal olarak düşük evrelerin daha ağırlıklı olduğu görülmekle beraber, istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Bu MM'nin testis reperfüzyon modelinde çalışıldığı tek makale olan Greenstein ve ark.'larının bulguları ile uyusmaktadır (9). Histopatolojik değerlendirmeler İR



hasarını önlemede MM'nin diğer organlarda bildirildiği kadar etkili olmadığı sonucunu ortaya koymuştur. Greenstein ve ark'ları bu çalışmada detorsiyondan 20 dakika önce 2 mg/kg intraperitonial+1-2 dakika önce ise penil venden 1 mg/kg intravenöz MM vermiş, detorsiyonu takip eden günde uzun bir reperfüzyon dönemi sonrası testis histopatolojik çalışma için çıkarmıştır. Gerek bu çalışmadaki doz ve süre, gerekse bizim çalışmamızda vermiş olduğumuz doz ve iskemi-reperfüzyon süresinin oluşturduğu spektrumda, MM'sinin detorsiyondan önce uygulanması ile testis reperfüzyon hasarını azaltan bir etkinliğinin oluşmadığı söylenebilir. Weinbroum ve ark'ları karaciğer reperfüzyondan sonra MM'nin akut akciğer hasarlanmasını selektif olarak azalttığını bildirdikleri çalışmalarında MM'nin bu etkisinin süreye bağımlı ve doza bağımlı olarak iki farklı etkisinin olabileceği üzerinde durmuşlardır (24). MM'nin reperfüzyon doku hasarı üzerine etkinliğini araştıran çalışmalar oldukça sınırlı sayıda olduğundan, gerek tedavinin etkinliği, gerekse hasar ile tedavinin verilme doz ve süresi arasındaki ilişkinin üzerinde yapılacak yorumlar spekülatif olacaktır. Bu nedenle elde etmiş olduğumuz sonuçlar MM'nin testis doku hasarı üzerine azaltıcı etkisinin olmadığını göstermekle beraber, özellikle histopatolojik incelemede istatistiksel olarak anlamlı olmayan ancak daha düşük evrelerde hasar tespit edilmiş olması; tedavinin doz, uygulama zamanı, süresi ve şekli ile ilgili olarak yeni çalışmaların yapılması gerektiğini ortaya çıkarmaktadır.

### Kaynaklar

1. Akgür FM, Kılınç K, Aktuğ T: Reperfusion injury after detorsion of unilateral testicular torsion. *Urol Res* 21:396, 1993
2. Akgür FM, Kılınç K, Tanyel FC, et al: Ipsilateral and contralateral testicular biochemical acute changes after unilateral testicular torsion and detorsion. *Urology* 44:413, 1994
3. Akgür FM, Kılınç K, Aktuğ T, Olguner M: The effect of allopurinol pretreatment before detorting testicular torsion. *J Urol* 151:1715, 1994
4. Bishop ML, Duben-Engelkirk JL, Fody EP: *Clinical Chemistry* (4th ed). Lippincott W&W, Philadelphia, s:267-268, 2000
5. Cass A.S, Cass BP, Veeraraghavan K: Immediate exploration of the unilateral acute scrotum in young male subjects. *J Urol* 124:829, 1980
6. Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R, et al: Histopathology of prepubertal rat testes subjected to various duration of spermatic cord torsions. *J Androl* 7:23, 1986
7. Galili Y, Ben-Abraham R, Weinbroum A, et al: Methylene Blue Prevents Pulmonary Injury after Intestinal Ischemia-Reperfusion. *J Trauma* 45:222, 1998
8. Grace PA: Ischemia-Reperfusion injury. *B J Surg* 81:637, 1994
9. Greenstein A, Schreiber L, Matzkin H: The effect of methylene blue on histological after spermatic cord torsion in a rat model. *BJU Int* 88:90, 2001
10. Janetschek G, Heilbronner R, Schachtner W, et al: Unilateral testicular disease: Effect on the contralateral testis (morphometric study). *J Urol* 138:878, 1987
11. Joe M Mccord: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312:159, 1985
12. Keaney JF, Puyana JC, Francis S, et al: Methylene blue reverses endotoxin-induced Hypotension. *Circulation Research* 74:1121, 1993
13. Kelner MJ, Bagnell R, Hale B, Alexander NM: Potential of methyleneblue to block oxygen radical generation in reperfusion injury. *Basic Life Sci* 49:895, 1988
14. Kolski JM, Mazolewski PJ, Stephenson LL: Effect of hyperbaric oxygen therapy on testicular ischemia-reperfusion injury. *J Urol* 160:601, 1998
15. Krarup T: The testis after torsion. *Br J Urol* 50:43, 1978
16. Laight DW, Lad N, Woodward B, Waterfall JF: Assesment of myeloperoxidase activity in renal tissue after ischemia/reperfusion. *Eur J Pharmacol* 292:81, 1994
17. Lieveno G, Nguyen L, Radhakrishnan J, et al: New animal model to evaluate testicular blood flow during testicular torsion. *J Ped Surg* 34:1004, 1999
18. Oğuz Kayaalp: *Tıbbi Farmakoloji*, II. Cilt, Hacettepe-Taş, s:1052, 1998
19. Özokutan H, Küçükaydın M, Muhtaroglu S, Tekin Y: The role of nitric oxide in testicular ischemia-reperfusion injury. *J Pediatr Surg* 35:101, 2000
20. Palmer JS, Cromie WJ, Lee RC: Surfactant administration reduces testicular ischemia-reperfusion injury. *J Urol* 159:2136, 1998
21. Salaris SC, Babbs CF, Voorhees WD: Methylene blue as an inhibitor of superoxide generation by xanthine oxidase. *Biochem Pharmacol* 42:499, 1991
22. Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, et al: Assay method for Myeloperoxidase in human Polymorphonuclear Leukocytes. *Anal Biochem* 132:345, 1983
23. Turner TT, Tung KSK, Tomomasa H, et al: Acute testicular ischemia results in germ cell-specific apoptosis in the rat. *Biol Reprod* 57:1267, 1997
24. Weinbroum AA, Paret G, Szold O, et al: Selective Attenuation of Acute Lung Ventilatory Injury by Methylene blue after liver Ischemia-Reperfusion: A drug response study in an isolated perfused double organ model. *Transplantation* 72:385, 2001
25. Zini A, Schlegel PN: Cu/Zn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase mRNA expression in the rat testis after surgical cryptorchidism and efferent duct ligation. *J Urol* 158:659, 1997