

T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI



RATLARDA UNİLATERAL TESTİS TORSİYONU MODELİNDE  
İSKEMİ REPERFÜZYON HASARININ ÖNLENMESİNDE  
OZONUN ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Emrah DEMİRCİ

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Eyüp Burak SANCAK

Çanakkale/2017

**T.C.**  
**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**RATLARDA UNİLATERAL TESTİS TORSİYONU MODELİNDE**  
**İSKEMİ REPERFÜZYON HASARININ ÖNLENMESİNDE**  
**OZONUN ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ**

Dr. Emrah DEMİRCİ

**TEZ DANIŞMANI**

Yrd. Doç. Dr. Eyüp Burak SANCAK

**Çanakkale/2017**

**Bu tez, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından TTU-2017-1258 proje numarası ile desteklenmiştir.**

T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

Üroloji uzmanlık  
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından  
Dr. Emrah DEMİRCİ' nin **Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 26/07/2017

**TEZ KONU BAŞLIĞI**  
**RATLARDA UNİLATERAL TESTİS TORSİYONU MODELİNDE İSKEMİ**  
**REPERFÜZYON HASARININ ÖNLENMESİNDE OZONUN ETKİNLİĞİNİN**  
**DEĞERLENDİRİLMESİ**

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Eyüp Burak SANCAK

Tez Jürisi Üyeleri:  
Adı Soyadı

Prof. Dr. Ahmet Reşit ERSAY

Yrd. Doç. Dr. Eyüp Burak SANCAK

Doç. Dr. Cenk Murat YAZICI

İmzası  
  


ONAY:

Bu tez Anabilim/Bilim Dalı Akademik Kurulunca belirlenen yukarıdaki  
jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Fakülte Yönetim  
Kurulunun 27.07.2017 tarih ve 137.13... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tamer DEMİR  
Dekan V.

  
Dekan

## TEŞEKKÜR

Üroloji uzmanlığı eğitimim süresince bilgi ve deneyimi ile teorik ve pratik olarak bana kazandırdığı mesleki beceriler başta olmak üzere hastalara karşı örnek tutumu ile bana yol gösteren başta sayın Prof. Dr. Ahmet Reşit ERSAY' a,

Ayrıca uzmanlık eğitimim süresince bilgi, deneyim ve mesleki becerileri ile mesleğime kattığı değer ve ilkeler için sayın Doç. Dr. Cabir ALAN' a,

Tez oluşturma süresince yardımlarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Eyüp Burak SANCAK'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Hakan TÜRKÖN'e, Sayın Yrd. Doç. Dr. Selda AKSU AKKAN'a ve Sayın Uzm. Dr. Emin Tunç DEMİR'e,

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım eğitimini tamamlamış ve halen eğitimlerine devam eden üroloji hekimlerine,

Beni yetiştiren ve bu güne gelmemde büyük emekleri olan aileme,

Her zaman beni destekleyen ve yanımda olarak her duygumu paylaşan sevgili eşim Tuğba DEMİRCİ'ye ve hayatımıza anlam katan biricik kızım Defne Deniz'e

En içten teşekkürlerimi sunarım...

Dr. Emrah DEMİRCİ  
Temmuz , 2017

## ÖZET

**Amaç:** Testis torsiyonu testiste ileri düzeyde iskemiye sebep olan akut seyirli, her yaşta görülebilen ve teşhis sonrasında hızlı şekilde tedavi gerektiren acil ürolojik bir durumdur. Spermatik kord torsiyonu olduğunda, damar obstrüksiyonuna ve uzayan iskemi ile birlikte testiküler hasara yol açar. Torsiyon-detorsiyon sonrasında meydana gelen iskemi ve reperfüzyon süreçleri testiküler hasara neden olur. Bu çalışmanın amacı torsiyon sonrası oluşan testiküler hasarı biyokimyasal, immünohistokimyasal, histopatolojik olarak belirlemek ve ratlarda testis torsiyonuna bağlı gelişen iskemi reperfüzyon hasarında ozonun koruyucu etkisinin araştırılmasıdır.

**Materyal ve Metod:** Deney için Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan gerekli onay alındı. 40 adet Wistar albino cinsi erkek rat (ağırlık: 250-300 gr) randomize şekilde 5 gruba ayrıldı. 1.Grup sham grubu olarak belirlendi. 2.Grupta sol testis torsiyonu ve detorsiyon oluşturuldu. 3.Grupta 2.Gruba uygulanan prosedüre ek olarak torsiyonun 30. dakikasınca intraperitoneal olarak 4 mg/kg ozon uygulandı. 4.Grupta 2.Gruba uygulanan prosedüre ek olarak torsiyonun 30. dakikasınca intratestiküler olarak 4 mg/kg ozon uygulandı. 5. grupta 2. gruba uygulanan prosedüre ek olarak torsiyonun 30. dakikasınca intratestiküler ve intraperitoneal olarak 4 mg/kg ozon uygulandı. Sham grubu hariç diğer gruplara 60 dakika süren torsiyon sonrasında detorsiyon (reperfüzyon) uygulandı ve 240 dakika reperfüzyon için beklendi. Daha sonra sol orşiektomi yapıp ratlardan biyokimyasal değerlendirme için kan ve doku, histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirme için ise doku örnekleri alındı. Ratlar servikal dislokasyon uygulanarak sakrifiye edildi. İşlem sonlandırıldı.

**Bulgular:** Serum ve dokuda elde edilen MDA, TOS ve OSİ değerleri tedavi gruplarında iskemi/reperfüzyon (İ/R) grubuna göre düşük bulundu( $p<0,001$ ). TAS ve SOD değerleri incelendiğinde tedavi ve İ/R grupları arasında anlamlı farklılık saptanamadı ( $p>0,05$ ). İMA ve İMAR değerlerinin İ/R grubunda tedavi gruplarına göre yüksek olduğu tespit edildi ( $p<0,001$ ). Histopatolojik değerlendirmede tedavi gruplarında İ/R grubuna göre daha düşük skorlar

elde edildi ( $p<0,001$ ). Histopatolojik olarak tedavi grupları arasında etkinlik açısından anlamlı fark saptanmadı ( $p>0,05$ ). İmmünohistokimyasal değerlendirmede iNOS ve eNOS tutulumunun tedavi gruplarında İ/R grubuna göre anlamlı şekilde düşük olduğu tespit edildi ( $p<0,001$ ). İmmünohistokimyasal olarak tedavi grupları arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p>0,05$ ).

**Sonuç:** Testis torsiyonu sonrasında oluşan iskemi reperfüzyon sürecinde farklı verilif yöntemleri ile uyguladığımız ozon tedavisinin oluşan hasarı önlemede etkili olduğunu gördük. Ancak bu bulguların klinik uygulamalara geçiş öncesinde yapılacak daha geniş kapsamlı deneysel çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Ozon, iskemi reperfüzyon hasarı, immünohistokimya, iNOS, eNOS

## ABSTRACT

**Objective and Background:** Testicular torsion is a surgical urological urgency, which is acute onset and seen at any age, can be lead to advanced level of ischemia in the testis and requires rapid diagnosis and treatment. When the spermatic cord rotates, it causes vascular obstruction and testicular damage with prolonged ischemia. Ischemia and reperfusion processes following torsion-detorsion, cause testicular injury. The aim of this study is to determine the biochemical, immunohistochemical and histopathologic findings of testicular torsion and to investigate the protective effect of ozone in ischemia-reperfusion (IR) injury caused by testicular torsion in rats.

**Materials and methods:** This study was conducted after approval of Çanakkale Onsekiz Mart University, Experimental Research Ethical Committee. 40 Wistar albino male rats (weight: 250-300 gr) were randomly divided into 5 groups. Group 1 was identified as sham group. Torsion and detorsion was formed in group 2. In the 3rd group, 4 mg / kg ozone was administered intraperitoneally in the 30th minute of the torsion in addition to the procedure applied in the second group. In the 4th group, 4 mg / kg ozone was administered intratesticular in the 30th minute of the torsion in addition to the procedure applied in the second group. In the 5th group, 4 mg / kg ozone was administered intraperitoneally and intratesticular in the 30th minute of the torsion in addition to the procedure applied in the second group. Other groups except sham group were detorsioned (reperfusion) after 60 minutes of torsion and waited for reperfusion for 240 minutes. Tissue samples were taken for histopathological and immunohistochemical evaluation and blood / tissue samples for biochemical evaluation, after left orchietomy. The rats were sacrificed by cervical dislocation. The process has been terminated.

**Results:** MDA, TOS and OSI values obtained in serum and tissue were significantly lower in the treatment groups than IR group( $p<0,001$ ). When TAS and SOD values were examined, there was no significant difference between treatment and IR groups( $p>0,05$ ). IMAR and IMAR values were

significantly higher in the IR group than the treatment groups( $p<0,001$ ). Histopathological evaluation showed that we had significantly lower scores in all treatment groups than the IR group( $p<0,001$ ). Histopathologically, no significant difference was found between treatment groups( $p>0,05$ ). Immunohistochemical assessment of iNOS and eNOS involvement was significantly lower in all treatment groups than the IR group( $p<0,001$ ). Immunohistochemically, there was no significant difference between treatment groups( $p>0,05$ ).

**Conclusion:** We have seen that ozone therapy applied by different delivery methods in the ischemia reperfusion process that occurs after testicular torsion is effective in preventing damage. However, before the transition clinical practice needs to be supported by more extensive experimental studies.

**Keywords:** Ozone, ischemia reperfusion injury, immunohistochemistry, iNOS, eNOS



# İÇİNDEKİLER

<b><u>DİZİN</u></b>	<b><u>SAYFA NUMARASI</u></b>
İç Kapak	
Kabul - Onay Sayfası	
Teşekkür	
Özet ve Anahtar Sözcükler	iii
İngilizce Özet (Abstract and Key Words)	v
İçindekiler	vii
Kısaltmalar ve Simgeler Dizini	ix
Tablolar Dizini	xi
Şekiller Dizini	xii
1. Giriş ve Amaç	1
2. Genel Bilgiler	3
2.1 Testis Embriyolojisi	3
2.2 Testis Histolojisi	6
2.2.1. İnterstisyel Doku	7
2.2.2. Seminifer Tübüller	7
2.3. Testis Anatomisi	8
2.4. Testis Torsiyonu Epidemiyoloji ve Etyolojisi	11
2.5. Tanısal Testler ve Görüntüleme Yöntemleri	15
2.6. Ayırıcı Tanı	16
2.7. Tedavi	16
2.8. Komplikasyonlar	18
2.9. Testis Torsiyonu, İskemi / Reperfüzyon Sonrası	
Oksidatif Stres	18
2.10. Serbest Oksijen Radikalleri	21
2.10.1 Serbest Radikal Çeşitleri	22
2.10.2 Reaktif Oksijen Bileşikleri	22
2.11. Antioksidan Savunma Sistemleri	24
2.11.1. Antioksidanların Etkileri	24
2.11.2. Enzim Yapısında Olanlar	24

2.11.3. Enzim Olmayanlar	26
2.12. Nitrik Oksit (NO)	27
2.13. Glutasyon (GSH)	28
2.14. Malondialdehit (MDA)	28
2.15. Medikal Ozon	29
2.15.1. Medikal Ozon ve Etki Mekanizması	29
2.15.2. Medikal Ozon Tedavisinin Klinik Uygulamaları	35
2.15.3. Medikal Ozon Tedavisinin Yan Etki ve Kontrendikasyonları	35
3. Gereç ve Yöntem	36
3.1. Çalışmada Kullanılan Deney Hayvanları	36
3.2. Çalışma Grupları ve Deney Protokolü	36
3.3. Ozunun Elde Edilmesi	37
3.4. Gruplar	38
3.5. Deneyin Tamamlanması ve Örneklerin Muhafaza Edilmesi	39
3.6. Biyokimyasal Yöntem	39
3.7. Histopatolojik Yöntem	40
4. Bulgular	42
5. Tartışma	52
6. Sonuç	59
7. Kaynaklar	60
8. Ekler	76
Ek 1 Etik Kurul onayı	76

## KISALTMALAR VE SİMGELER

ROS	Reaktif oksijen radikalleri
WT-1	Wilm's tümör 1 geni
SF-1	Steryodojenik faktör
SRY	Sex belirleyici bölge
SOX9	SRY box 9
FGF-9	Fibroblast büyüme faktörü 9
MIF	Mülleryan inhibe edici faktör
ET	Ekstravajinal torsiyon
MR	Manyetik rezonans
RNT	Reaktif nitrojen türevleri
NO	Nitrik oksit
PARP	Poli ADP riboz polimeraz
PARS	Poli ADP riboz sentaz
İNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentaz
TNF	Tümör nekrozis faktör
IL	İnterlökin
SOD	Süperoksit dismutaz
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
GSSG	Yükseltgenmiş glutatyon
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
MDA	Malondialdehit
HT	Majör otohemoterapi

SH	Sülfhidril
TGF	Transforme edici büyüme faktörü
ROT	Reaktif oksijen türevleri
LOP	Lipid oksidasyon ürünü
CO	Karbon monoksit
HSP-70	Isı şok proteini 70
HBV	Hepatit B virüsü
HCV	Hepatit C virüsü
HIV	İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü
G6PD	Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz
ACE	Anjiyotensin dönüştürücü enzim
İM	İntramüsküler
İP	İntraperitoneal
İR	İskemi/Reperfüzyon
İT	İntratestiküler
TAS	Toplam antioksidan kapasite
TOS	Toplam oksidan kapasite
İMA	İskemi modifiye albumin
İMAR	İskemi modifiye albümin ile serum albümin oranı
PBS	Fosfat tampon solüsyonu
RIPA	Radyo immüno presipitasyon tahlili

## TABLolar DİZİNİ

<b><u>TABLO</u></b>	<b><u>SAYFA NUMARASI</u></b>
1 Gruplar arası doku parametrelerinin karşılaştırılması	44
2 Gruplara göre doku parametrelerinin ortanca değerleri	45
3 Gruplar arası serum parametrelerin karşılaştırılması	47
4 Gruplara göre serum parametrelerinin ortanca değerleri	48
5 Kontrol ve tedavi gruplarına göre histolojik grade karşılaştırılması	49
6 Tedavi gruplarına göre histolojik grade karşılaştırılması	49
7 Kontrol, deney ve tedavi gruplarına göre iNOS tutulum durumunun karşılaştırılması	50
8 Tedavi gruplarına göre iNOS tutulum durumunun karşılaştırılması	50
9 Kontrol, deney ve tedavi gruplarına göre eNOS tutulum durumunun karşılaştırılması	51
10 Tedavi gruplarına göre eNOS tutulum durumunun karşılaştırılması	51

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b><u>SEKİL</u></b>	<b><u>SAYFA NUMARASI</u></b>
1 Testis gelişimi	6
2 Testis anatomisi	9
3 Ozon uygulamasının etkileri	32
4 Testis torsiyonu oluşturulması ve fiksasyonu	37
5 Gruplara göre dokudaki MDA değerlerinin karşılaştırılması	42
6 Gruplara göre dokudaki OSI değerlerinin karşılaştırılması	43
7 Gruplara göre dokudaki TOS değerlerinin karşılaştırılması	44
8 Gruplara göre serum IMA değerlerinin karşılaştırılması	46

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Testis torsiyonu testiste ileri düzeyde iskemiye sebep olan akut seyirli, her yaşta görülebilen ve hızlı şekilde teşhis sonrasında tedavi gerektiren acil ürolojik bir durumdur (1). Spermatik kord torsiyonu olduğunda, damar obstrüksiyonuna ve uzayan iskemi ile birlikte testiküler hasara yol açar. Her yaşta görülebilmemesine rağmen sıklıkla 12-18 yaş aralığında daha sık görülür. Testis torsiyonu acil girişim gerektiren hastalıklar arasında olup, yirmibeş yaş altındaki erkeklerde 1/4000 oranında görülmektedir (2). Ani başlangıçlı skrotal ağrı en sık rastlanan başvuru sebebidir. Doğru tanı konulamaz ve uygun ve erken tedavi yapılmaz ise geri dönüşümsüz iskemiye neden olarak, testis kaybı ile sonuçlanabilmektedir. Bu nedenle özellikle ani başlayan skrotal ağrı şikayeti ile başvuran hastalarda hızlı bir şekilde tanı konulduktan sonra tedavi amaçlı manuel detorsiyon veya cerrahi eksplorasyon yapılması gerekmektedir (3). Spontan veya travmaya ikincil olarak görülebilmektedir. Akut ağrılı skrotal şişlik şikayeti ile gelen hastalarda ayırıcı tanıda; orşit, epididimit, akut hidrosel, strangüle inguinal herni, intratestiküler kanama ya da spermatik kord yağ nekrozu akla gelmelidir. Semptomların ilk birkaç saatinde eksplorasyon ile % 100' e yakın başarı sağlanırken, 12-24 saat arasında bu oran % 20'lere kadar düşer. 24 saatten uzun süren iskemi genellikle geri dönüşümsüz infarkta neden olur (4).

Akut skrotumun değerlendirilmesinde akut testiküler torsiyonu destekleyen hikaye ve fizik muayene bulguları genellikle acil cerrahi yaklaşım için yeterlidir. Pratikte de sıklıkla tanı klinik ile konularak cerrahi eksplorasyon ile doğruluğu kanıtlanır. Radyolojik görüntülemeler teşhisi destekler (1).

Testiküler torsiyonun en önemli komplikasyonu gonadların infarktıdır. Bu durum torsiyonun süresine ve derecesine bağlı olmakla birlikte detorsiyon ya da orşiektomi uygulanması ile önlenabilir. Başarılı bir cerrahi girişime

rağmen anormal semen analizi ve kontralateral testis apoptozisi testiküler torsiyon sonrası görülebilen komplikasyonlardır. Bu nedenle her hastaya subfertilite riski nedeniyle bilgilendirme yapılmalıdır (1).

Testis torsiyonunda venöz dönüşün bozulmasına bağlı olarak ödem ve hemoraji meydana gelir. İlerleyen süreçte arteriyel obstrüksiyon bulgularının da tabloya eklenmesiyle kan akımı azalarak testiste hipoksi ve devamında iskemi meydana gelir. Yapılan deneysel çalışmalar göstermiştir ki, testis dokusunda iskemiye en duyarlı hücreler başlıca germ hücreleridir (5). Testis torsiyonu sırasında oluşan iskemik hasarın etyolojisi değerlendirildiğinde ortamda bulunan reaktif oksijen radikallerine (ROS) bağlı oksidatif stres ve inflamasyon süreçlerinin yer aldığı görülür. İskemik hasar dönemi olan bu süreçte testiküler hasar primer olarak oksijen desteğinin azalması ile ilişkilidir (6). İskemiye uğramış dokuların canlılığını koruyabilmek için en kısa sürede doku reperfüzyonun sağlanması gerekmektedir. Testisin detorsiyone edilmesi ile birlikte reperfüzyonun neden olduğu hasarlanma meydana gelmektedir (5). Reperfüzyon ile oluşan hücresel hasarın ROS üretiminde artış ve nötrofil infiltrasyonu ile bağlantılı olduğu bilinmektedir. Bu süreçte meydana gelen radikaller hücre membranında bulunan lipidlerin peroksidasyonu, proteinlerin denaturasyonu ve DNA hasarına neden olur (7).

Testis torsiyonuna bağlı iskemi reperfüzyon hasarı sonrası testislerde meydana gelen histolojik ve fonksiyonel değişiklikleri ve farklı tedavi metodlarını inceleyen çok sayıda yayın bulunmaktadır. Yapılan deneysel çalışmalarda iskemi reperfüzyon hasarında ozonun koruyucu etkisi farklı doku gruplarında ve farklı uygulama yöntemleriyle gösterilmeye çalışılmıştır. Biz bu çalışmamızda, literatürdeki çalışmalardan farklı olarak, testisin iskemi ve reperfüzyonuna bağlı oluşan hasarının önlenmesinde, ozonun farklı verilmiş yöntemlerine göre etkisini biyokimyasal ve patolojik parametreler kullanarak değerlendirmeyi amaçladık.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Testis Embriyolojisi

Embriyo cinsiyetinin, fertilizasyon sırasında belirlenmesine rağmen, gelişimin 7. haftasına kadar gonadlar erkek veya dişi morfolojik özelliklerine sahip değildir. Gonadlar başlangıçta bir çift halinde, çöломik epitelin proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşması sonucunda oluşmuş genital veya gonadal kabartı halinde belirirler. Gelişimin 6. haftasına kadar geçen sürede bu genital kabartılar içinde germ hücreleri bulunmamaktadır (8).

Primordial germ hücreleri, gelişimin erken evrelerinde yolk kesesinin allontoise yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında belirirler ve 5. haftanın başında primitif gonadlara ulaşırlar. Sonrasında epitelyum hücreleri altlarındaki mezenşimin içine gömülürler. Genital kabartı içinde germ hücrelerinin görülmesi 6. gestasyonel haftada olur. Burada primitif cinsiyet kordonları denilen irregüler şekilli kordonları meydana getirmek üzere biraraya gelirler. Hem erkek hem dişi embriyolarda bu kordonlar yüzey epiteline bağlı şekilde bulunmaktadır. Bu safhada erkek veya dişi gonadal yapıların birbirinden ayırt edilmesi mümkün değildir ve farklılaşmamış gonad olarak adlandırılır. Böylece gelişimin 5. Haftasının sonunda korteks ve medullaya sahip bipotansiyel gonad oluşturulmuştur (8). Bu gelişimden wilms tümörü geni (WT1) ve steroidojenik faktör 1 (SF-1) genlerinin aktivasyonu sorumludur. Bipotansiyel gonadların testis veya over dokusuna dönüşümü genetik yapı ile belirlenir. Primordial germ hücrelerinin sahip olduğu kromozomlar XY ise embriyo genetik olarak erkektir. Altıncı haftada Y kromozomunun kısa kolundaki SRY (seks belirleyici bölge) geni ve SOX9, FGF9 ve DAX1 gibi diğer testis belirleyici genlerin birlikte gerçekleşen aktivasyonu sonucunda gonadın korteks dokusu gerileyerek testis veya medullar kordonları oluşturulur. Mülleryan inhibe edici madde (MIS) üreten

Sertoli hücreleri 6. haftada; testosteron ve insülin benzeri büyüme faktör-3 (IGF-3) üreten Leydig hücreleri ise 8. haftada ortaya çıkmaktadır (9).

Gonadal sekse göre gelişen internal ve eksternal genital organlar, diferansiye olan gonadın hormonal fonksiyonuna göre belirlenmektedir. Her hormon aynı taraf parakrin etkiye sahiptir. Bu kritik hormon mekanizmasında bir aksama olduğunda dişi yönde farklılaşma veya anormal erkek yönde farklılaşma gelişebilmektedir. Erkek dış genital organlarının gelişimi için bu dokularda testosteronun dihidrotestosterona dönüşümünü sağlayan 5-Alfa redüktaz tip-2 enzimine gerek vardır (8).

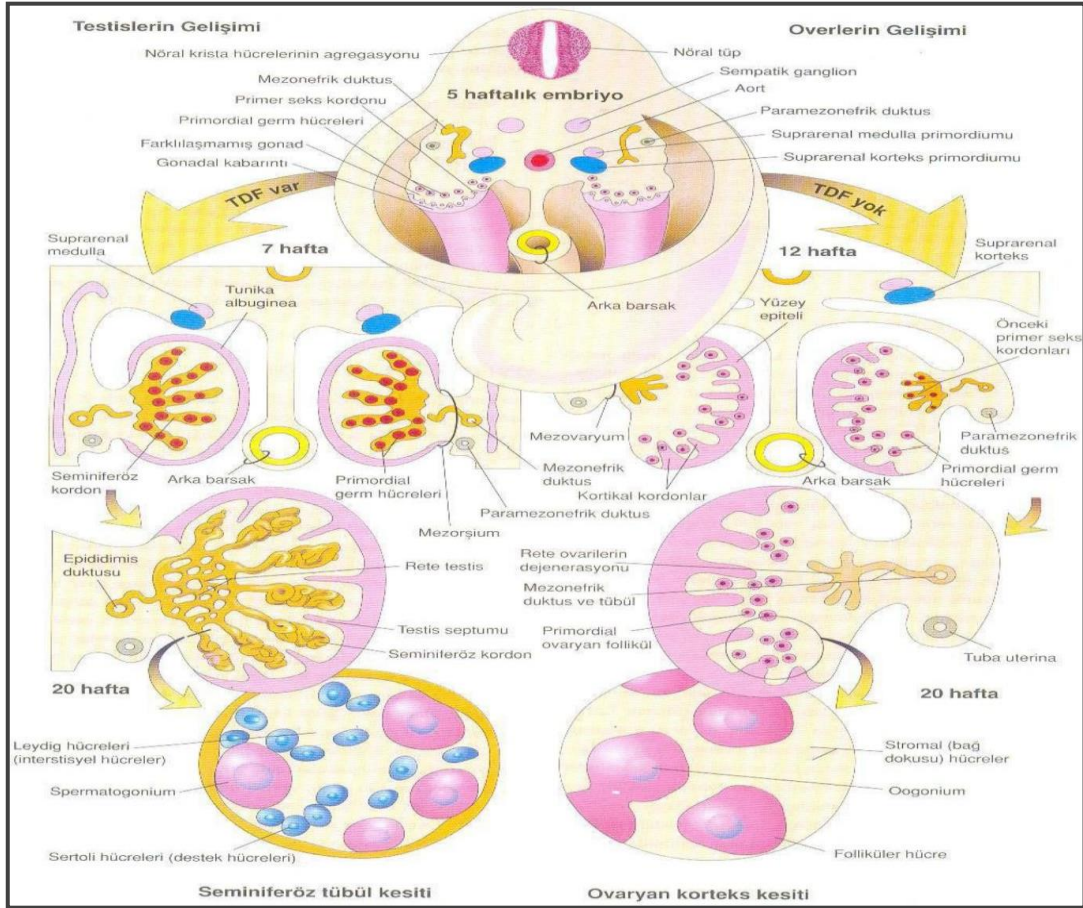
Erkek fetüs gelişiminin dördüncü ayında, testis kordonları atnalı şeklini alır ve bu atnalının uçları rete testis ile devamlılık gösterir. Bu safhada testis kordonları primitif germ hücreleri ve bezin yüzey epitelinden kaynaklanan sertoli destek hücrelerinden oluşur. Gonadal sırtın kendi mezenşiminden gelişen intertisyel leyding hücreleri testis kordonlarının arasında yer alır ve bu kordonların farklılaşmaya başlamasından sonra gelişmeye başlarlar. Gestasyonun 8.haftasında, leyding hücrelerinde testosteron sentezi başlamış olur. Testisler artık genital kanal ve dış genital organların cinsiyetini belirleyebilecek duruma gelmiştir (8).

Testis gelişiminde temel rol oynayan SRY geni testisin, mezonefrik kanal tubüllerinin gonadal sırtta penetre olabilmesini ve testislerin gelişimini sağlayan kemotaktik ajan salgılamasını uyarmaktadır. Bunun yanında SRY geni, sertoli ve leydig hücrelerinin farklılaşma süreçlerini tamamlayabilmeleri için gereken steroidogenezis faktörü 1' in düzenleyicisidir. Sertoli hücrelerinin salgıladığı müllerian inhibe edici faktör (MIF) müllerian (paramezonefrik) kanalların regresyonunu neden olur. Testis kordonları arasında yer alan interstisyel leydig hücrelerinden salgılanan testosteron, 5-alfa redüktaz enzimi yardımıyla dihidrotestosterona dönüştürülür. Reseptörü ile kompleks oluşturan testosteron wolfian (mezonefrik) kanalların virilize olmasından sorumluyken, Reseptörü ile kompleks oluşturan dihidrotestosteron ise erkek dış genital yapılarının diferansiyasyonuna yardımcı olur (8).

Pübertal gelişime kadar solid yapıda olan testis kordonları pübertal gelişim ile birlikte lümenleri açılır ve bu dönemden sonra seminifer tübül yapısını oluştururlar. Rete testis tübüleri ve seminifer tübüllerin bir araya gelmesiyle duktus efferentesler meydana gelir. Wolfian kanallar kıvrımlar yaparak duktus epididimisi meydana getirir (8,10). Mezonefrik kanal epididimin kuyruk kısmından seminal vezikul tomurcuğuna ulaşınca kadar kalın bir kas kılıfı ile sarılıdır ve bu kısma duktus deferens adı verilir. Seminal veziküllerden sonra devamlılık gösteren duktus deferens kısmı ise duktus ejakulatoryus adını alır. Erkeklerde paramezonefrik kanalın kranial ucu dışında tümü dejenere olmaktadır. Dejenere olmayarak devamlılık gösteren kısımdan apendiks testis oluşur (11).

Testis ve mezonefroz 2. ayın sonunda ürogenital mezenter aracılığıyla karın arka duvarına bağlı şekilde bulunur. Testisin kaudal kısmından başlayarak uzanım gösteren mezenşimal yapı ise gubernakulumdur. Testisin skrotuma inişini tamamlamasından önce gubernakulum inguinal bölgede eksternal ve internal oblik kaslar arasında uzanım gösterir. Testisin skrotum içine inmeye başlaması ile birlikte gubernakulumun ekstraabdominal kısmı oluşur ve inguinal bölgeden başlayarak skrotal şişliğe doğru ilerler. Testis inguinal kanalı terk ederken gubernakulumun ekstraabdominal bölümü skrotuma tutunmaktadır. Testisin inişini kontrol eden faktörler tam olarak bilinmemektedir. Testisin skrotuma iniş dönemi müllerian inhibe edici faktör (MIF) ve androjen hormonların etkisi altında gerçekleşmektedir (11). Patolojik bir durum söz konusu değilse gestasyonun yaklaşık 12.haftasında testisler inguinal bölgeye ulaşmakta, inguinal kanalı 28. haftada terk etmekte ve skrotuma yaklaşık 33. haftada gelmektedir. Çölemik boşluktan oluşan periton, karın ön duvarının her iki yanında vaginal proses adı verilen peritoneal bir cep oluşturur. Musküler ve fasiyal yapılarla birlikte skrotuma doğru ilerleyen proses vaginalis inguinal kanalı meydana getirir. Testisler inguinal kanaldan geçtikten sonra skrotuma inerler ve vaginal prosesin katlantısı ile sarılırlar. Testisi saran ve peritondan kaynaklanan, iç kısımda kalan parçası

tunika vaginalisin viseral yaprağını, dış tarafta kalan parçası ise pariyetal yaprağını oluşturur. Fasya transversalis İnternal spermatik fasyayı, internal oblik kas kremaster liflerini ve eksternal oblik kas ise eksternal spermatik fasyayı meydana getirir (11).



Şekil 1: Testisin embriyolojik gelişimi (10)

## 2.2. Testis Histolojisi

Testisler; seksüel maturasyonla birlikte embriyolojik gelişimi ve üreme yeteneğini etkileyen; ekzokrin ve endokrin fonksiyonlara sahiptir. Testislerde Leydig hücreleri tarafından üretilen testosteron puberte döneminde sperm üretiminin başlamasını ve sekonder seks karakterlerinin oluşumunu etkiler.

Testis, dıştan içe doğru tunika vaginalis, tunika albuginea ve tunika vasküloza olarak bilinen bir kapsül ile kaplı haldedir. Mezotelyal hücrelerinin

tek sıra halinde sıralanması ile oluşan tunika vajinalisi preparatlarda izleyebilmek zordur. Yoğun şekilde fibroelastik bağ dokusu içeren tunika albuginea kapsülün en belirgin tabakası olup testisin arka yüzünde kalın bir yapı halini alarak mediastinum testisi meydana getirir. Kapsülden başlayarak ince bağ dokusu şeklinde testisin iç kısımlarına ulaşan tunika albuginea, testiste lobüllerin oluşmasını sağlar (12).

### **2.2.1. İnterstisyel Doku**

Testisin %30'unu intersitisyel doku oluşturur. Leydig hücreleri, lenfatikler, kan damarları, sinirler, makrofajlar bulunur. Santral yerleşimli ve tek çekirdeği bulunan leydig hücreleri, testosteron üretimini sağlar. Lüteinizan hormonun uyarısıyla kolesterolden sentezlenen testosteronun; dolaşımında %98'i proteinlere bağlı, % 2'si ise serbest halde bulunur.

Folikül stimulan hormon ve lüteinizan hormon hipofizden salgılanarak testiste spermatogenezi başlatır. Folikül stimulan hormon aracılığıyla sertoli hücrelerinde üretilen androjen bağlayıcı protein; lüteinizan hormon etkisiyle leydig hücrelerinde üretilen testosteronu bağlayarak seminifer tübüle getirir. (8,12,13).

### **2.2.2. Seminifer Tübüller**

Tunica albuginea tarafından oluşturulan testis lobülleri kan damarlarını, sinirleri ve interstisyel hücreleri içeren seminifer tubüllerinden meydana gelir. Düz veya kıvrıntılı şekilde olabilen seminifer tubüller mediastinumda rete testis olarak devam eder. Rete testis, duktuli efferentes ile, daha sonra da epididim ile devamlılık gösterir. Lümenleri epitel ile kaplıdır (12).

Seminifer epitel iki ayrı hücre grubu içerir. Birincisi germ hücreleri olan spermatogenetik hücrelerdir. Diğerleri ise germ hücrelerine destek olan ve beslenmelerini sağlayan sertoli hücreleridir. Bu hücreler bazal membrandan lümene doğru uzanım gösteren bir yapıya sahiptir. Spermatogenetik hücreler

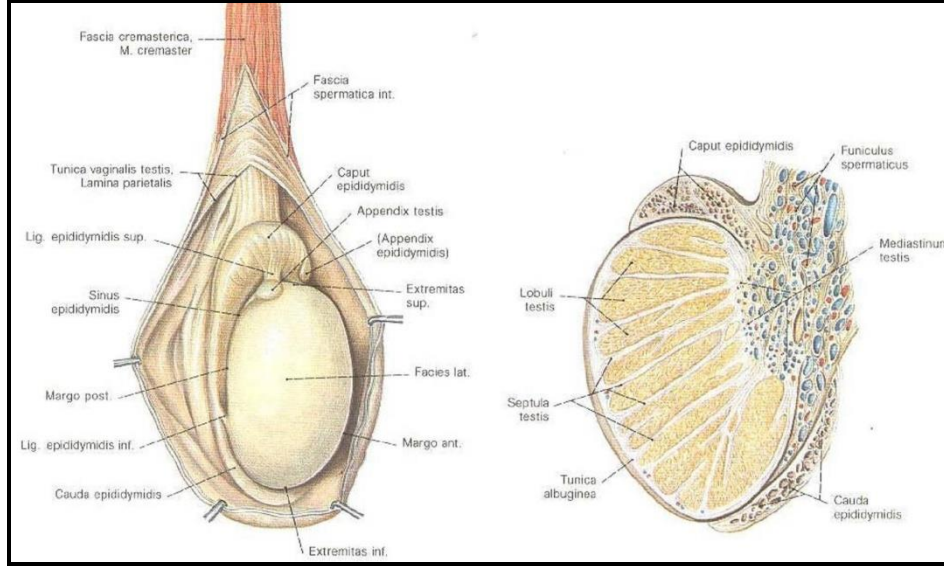
sertoli hücrelerinin lateral kısmındaki bölmelerde bulunmaktadır. Kan-testis bariyerini oluşturan yapı bu iki hücre grubu arasındaki sıkı bağlantı kompleksleridir (14).

Seminifer tübüllerin karbonhidrat, iyon, aminoasit ve protein içeriği; kan ve lenf dolaşımından oldukça farklıdır. Kan-testis bariyeri ile oluşan bu fark germ hücrelerinin dolaşım yolu ile gelen zararlı maddelere karşı korunmasını sağlamaktadır. Spermatogenetik hücreler farklı gelişim safhalarından geçerler. Bazal membrana yakın yerleşimli olanlar spermatogonyumlardır. Lümen yakınında yerleşim gösteren spermatid hücreleri, daha olgun yapıdadır. Lümeninde bulunan hücreler ise spermiyumlardır. Seminifer tübüllerin enine alınan kesitinde spermatogenetik hücreler bazı özellikleri ile birbirlerinden ayırt edilebilirler (13).

Seminifer tübüller bağ dokusundan oluşan kılıf, bazal lamina ve bir seminifer epitelden meydana gelir. Tübül çevresini saran lamina propria bir dizi fibroblast tabakasından meydana gelmiştir (13).

### **2.3. Testis Anatomisi**

Testis ortalama 15-20 ml hacminde ve 4×3×2,5 cm boyutlarındadır. Sıklıkla sol testis sağdakine oranla yaklaşık 1cm daha aşağıda yer almaktadır (15,16). Testis dıştan içe doğru tunika vaginalis, kollajen ve düz kas elamanlarını içeren tunika albuginea ve vasküler yapıların yoğun şekilde bulunduğu tunika vaskulosa adları verilen 3 yapının oluşturduğu sert bir kapsül ile kaplıdır. Peritondan kaynaklanan tunika vaginalis visseral ve parietal olmak üzere 2 tabakadır. Bu iki tabaka arasındaki potansiyel boşlukta testisin etrafını saran az miktarda seröz sıvı bulunur, bu sıvının artışı ile hidrosel meydana gelir. Ekstravaginal testis torsiyonu bu boşlukta oluşur (17).



**Şekil 2: Testis Anatomisi**

Tunika albuginea testis içeriğini saran, yapısında kollajen doku içinde, karmaşık dallanmalar gösteren düz kas hücreleri bulunduran bir yapıdan ibarettir. Burada bulunan kas lifleri ejakülasyonda kasılarak sperm hücrelerinin efferent duktuslara doğru hareket etmesini sağlar. Tunika albuginea septalar oluşturarak seminifer tübülleri 250-300 lobüle ayırır. Tunika vaskulosa testisin septumlarının iç yüzeyini örten yapıdır. Her bir septum seminifer tübül ve sentrifugal arterden oluşur. İnterstisyel dokuda, leydig hücreleri, mast hücreleri makrofajlar, sinir, kan ve lenfatik damarları bulunur. Testiste yaklaşık 600-1200 seminifer tübül bulunur (18). Rete testis 6-12 efferent duktusun birleşmesi ile oluşarak, testiküler sıvı ve spermatazoanın epididime aktarılmasını sağlar.

İnsan testiküler parankimi için kan akımı 100 mg doku için yaklaşık 9 ml/dk'dır. Testiküler arter (internal spermatik) abdominal aortadan renal arterin hemen altında anterolateral yüzeyden çıkar. Ana testiküler arter olup testis kan akımının yaklaşık 2/3'sini sağlar. Kremasterik (eksternal spermatik) arter a. iliaca eksterna'nın dalı olan a.epigastrika inferior'dan ayrılır. Deferenial arterler (vazal) a.iliaca interna'nın son dalı olan a.vezikalis inferior ya da superior'dan ayrılır. Üç arter de testiküler mediastinumda anastomoz oluşturarak testisin kanlanmasına katkıda bulunur. Testiküler arter testise posteriyordan girer. Tunika albugineayı geçtikten sonra anteryorda testis

parankimi üzerinden geçerek dallanır, sonra posteriyora ve inferiyora doğru ilerler. Testisin anterior ve inferior bölgeleri, medial ve lateral bölgelerine oranla daha fazla damar içermektedir (15,17,19).

Testiküler venöz drenaj internal testiküler (spermatik) ven, kremasterik (eksternal spermatik) ven, vazal (deferensiyel) ven ve gubernakuler ven yardımıyla sağlanmaktadır (17,20). İnternal spermatik (testiküler) ven, internal spermatik artere eşlik eder ve solda renal vene dik, sağda vena cava inferiora oblik olarak venöz dönüşü sağlar. Kremasterik ven, spermatik kordun arkasında seyreder, eksternal inguinal ring düzeyinde yüzeyel ve derin inferior epigastrik venlere ve yüzeyel eksternal ile derin pudental venler yoluyla eksternal iliak vene dökülür. Deferensiyel (vazal) ven, vaz deferense eşlik eder, süperior-inferiorvezikal venler yoluyla internal iliak vene dökülür. Gubernakular ven, eksternal pudental ven, safen ven yoluyla eksternal iliak vene drene olur (18,21-23).

Testis ve epididimden kaynaklanan venler, mediastinumdan çıktıktan sonra duktus deferens önünde ve testiküler arter çevresinde 8-12 venden oluşan bir şebeke halinde serbest anastomoz yapan 3 ayrı ven grubu pampiniform pleksusu oluşturur (24).

Pleksus pampiniformis ile skrotum ve epididimin venöz dönüşünü sağlayan kremasterik pleksus ve vazal ven sistemi, inguinal ring hizasında birbirleriyle anastomoz oluştururlar. Pleksuslar daha yukarıda gonadal veni meydana getirirler. Böylece olası bir durumda deferansiyel ve kremasterik venöz yapılar, testiküler venin ligasyonu sonrasında kollateral dolaşım ağı oluşumunu sağlar (17,21).

Testisin innervasyonu torasik ve splanknik sinirlerin çıktıkları T5-T12 seviyesinden kaynaklanır. Ayrıca genitofemoral sinirin genital dalı (L1-L2) inguinal kanala internal inguinal halkadan girer. Bu dal kremasterik kası innervasyonunu sağlar. İlioinguinal sinir (L1) krista iliaka anterior süperior medialinde eksternal ve internal oblik kaslar arasından çıkar, eksternal oblik fasya altında seyrettikten sonra kanala girer, en sonunda dış inguinal



halkadan çıkar. İlioinguinal sinir penis kökünün derisini, skrotum'un üst kısmını ve uyluğun üst medial bölümünün innervasyonundan sorumludur (24,25).

Pelvik pleksusa uygulanan anestezi, şiddetli testis ağrılarında kullanılabilen bir yöntemdir. Bazı afferent ve efferent sinirler karşı taraf pelvik pleksusa dallar verebilmekte (8). Bu nöral çapraz bağlantılar bir testisteki patolojik olayların karşı taraf testisin fonksiyonlarını da etkileyebileceğini açıklayabilir. Genitofemoral sinirin genital dalları pariyetal ve visseral tunika vaginalis ve skrotumun duyarlılığını sağlamaktadır (24).

#### **2.4. Testis Torsiyonu Epidemiyoloji ve Etyolojisi**

Testis torsiyonu ilk defa 1800' lü yıllarda Hunter tarafından, etkilenen testiste kalıcı iskemik yaralanmaya sebep olan ürolojik acil durum olarak tanımlanmıştır. Spermatik kordun vertikal ekseninde dönmesi ile testis ve eklerinin kanlanması bozulmasına bağlı olarak etkilenen testiste kalıcı iskemik yaralanmaya sebep olabilen bir durumdur (16,26,27). Testis ve tüm eklerinde 25 yaşına kadar torsiyon görülme sıklığı 1/160 iken (28), sadece testis değerlendirmeye alındığında bu oran 1/4000'dir (29). Testis torsiyonu neonatal dönemde ve puberte civarında olmak üzere iki kez pik yapar. Testis torsiyonu sırasında oluşan iskemik hasarın etyolojisinde gelişen durumla birlikte fazla miktarda üretilen reaktif oksijen metabolitlerine bağlı oksidatif stres ve inflamasyon süreci yer almaktadır. İskemik hasar dönemi olarak adlandırılan bu süreçte testiste meydana gelen hasar öncelikli olarak oksijen desteğinin azalması sonucunda gelişen hipoksiye bağlıdır. Öncelikle gelişen bu dönem, iskemik hasar dönemi olarak adlandırılır. Reaktif oksijen ve nitrojen ürünlerinin oluşması sonrasında torsiyonun ortadan kaldırılması ile reperfüzyon hasarı süreci başlamış olur (2). Yapılan deneysel çalışmalarda testis dokusunda iskemiye en hassas hücrelerin başlıca germ hücreleri olduğu bildirilmiştir (30). Torsiyon sonucunda gelişen hasar, torsiyonun süresi ve derecesi ile yakın ilişki içindedir (30,31). Testis torsiyonu için bir takım predispozan faktörlerden söz edilse de, yapılan bazı çalışmalarda torsiyonun

sebepleri arasında korddan testis ve epididime uzanan dar bir mezenterik bağlantının varlığı gösterilmiştir. Bu dar mezenterik bağlantının varlığında testisin inferiora doğru yerleşiminden söz edilebilir. Vajinal kavite içerisinde testis rahatlıkla dönebilir hale gelir (32).

Pübortal dönemde testesteron seviyesinin göreceli artışına cevap olarak testis hacminin hızlı artışı predispozan faktörler arasında sayılabilir (33-35). Testis ve epididime uzanan mezenterik bağlantı geniş yapıya sahip ise testis inferiora doğru seyir göstermez ve vajinal kavite içinde daha dik bir pozisyonda kalır, bunun sonucunda torsiyon gelişme ihtimali azalmaktadır. Bu özellik pubertal dönemde testis hacminin yaklaşık beş katına çıkması nedeniyle, puberte öncesi döneme göre daha yüksek oranlarda torsiyone olmasına ışık tutar niteliktedir (36). Bu durum aynı zamanda inmemiş testisin torsiyone olmasının tümör gelişiminin erken bir göstergesi olmasını da açıklar; çünkü tümörler de mezentere oranla testis boyutunun artmasına sebep olarak vajinal kavite içinde dönebilmesine zemin hazırlar (37).

Testis torsiyonu, sıklıkla adolesan dönemde ortaya çıkan, meydana gelen hipoksi sonucunda testis kaybına kadar gidebilen ürolojik acil bir klinik tablodur (38,39). Bu duruma özellikle ilk 4-6 saatte acil müdahale edilip tedavi uygulanmaz ise tam arteriel oklüzyon sonucunda testiküler nekroz meydana gelecektir (40,41). Başarılı bir cerrahi girişim ve tedavi uygulanmasına rağmen vakaların yaklaşık yarısında çeşitli derecelerde testis dokusunun atrofiye uğradığı ve infertiliteye kadar uzanan patolojik durumların görülebildiği bildirilmiştir (42). Yapılan bir çalışmada tek taraflı testis torsiyonu gerçekleşen 55 hasta incelenmiş ve bu hastaların sadece 7'sinde tedavi sonrası spermogram sonuçlarının normal olduğu görülmüştür (42).

Testis torsiyonu başlıca extravajinal, intravajinal ve testis eklerinin torsiyonu olmak üzere 3 farklı durum olarak sınıflandırılabilir.

Extravajinal torsiyon (ET) testisin skrotuma inişi sırasında yaşanan bozukluk ve gubernakular bağlantının skrotum duvarında sonlandığı noktada bozukluk olması sonucunda gelişir. Çoğunluğu prenatal dönemde

görülmektedir (43). Extravajinal torsiyonda testis ve ekleri spermatik kordun üst seviyelerinde, tunika vajinalislerin spermatik korda bağlantı yaptıkları noktaların proksimalinden vertikal aksda torsiyona maruz kalması söz konusudur. Küçük yasta görülen torsiyonların en önde gelen sebebidir (44). Extravajinal torsiyon; doğum öncesi veya doğum sonrası ilk bir ayda gelişebilir, fakat tanının doğum sonrasında konulabilmesinden dolayı intrauterin torsiyonlarda testisin kurtarılabilmesi çok zordur (45). İntrauterin dönemde gelişen torsiyonlar monoorşidizmin başlıca nedenleri arasında gelir. Genellikle tek taraflı gelişir ve tedavisi mutlak cerrahidir. ET' de genellikle yapılan eksplorasyon sırasında testis dokusu gangrenöz görünümde (46). Eksplorasyon uygulanıp sorunun değerlendirilmesi, patolojik durumun uygun müdahale ile ortadan kaldırılması ve kontralateral testis fiksasyonu yapılması önerilmektedir (47,48). Malesef cerrahi müdahale ile kurtarıldığı düşünülen bazı vakalarda testisler sekonder atrofiye gider (42). Erken müdahaledeki amaçlardan biri karşı taraftaki testiste torsiyon gelişme riskine karşı fiksasyon uygulanma gerekliliğidir (49).

İntravajinal torsiyon, spermatik kordun tunika vajinalise yapıştığı yerin distal kesiminde torsiyon gelişmesidir. İntravajinal torsiyona neden olan predispozan faktörler arasında tunika vajinalislerin normale oranla spermatik kord üzerinde daha proksimal bir noktaya yapışmasının sorumlu tutulduğu bildirilmektedir. Konjenital anormallikler olarak inmemiş testis, gevşek epididimal birleşme, testisin horizontal uzanımı, testisin gubernakular yapısının anormal uzun veya kısa olması ve yaşam içinde gelişen travmalar da torsiyona sebep olabilmektedir (45). Tunika vajinalisin spermatik kordonun üst kısımlarında sonlandığı durumlarda, testis vajinal kavite içinde serbestçe hareket edebilir yapıdadır. Postmortem otopsi çalışmalarında % 12 oranında saptandığı bildirilen bu varyasyon "çan tokmağı deformitesi" olarak adlandırılır (32). Çocukluk ve adolesan döneminde gerçekleşen testis torsiyonunun en sık görülen nedenlerindendir ve sıklıkla bilateral tutulum görülür (32). En az iki farklı noktadan yapılacak kontralateral testis fiksasyonu önemlidir, çünkü gelişen torsiyon bilateral olma eğilimindedir (50,51). Tedavide torsiyon manual olarak redükte edilse bile cerrahi fiksasyon mutlaka

yapılmalıdır. Aksi takdirde hasta taburculuk öncesinde ya da sonraki dönemde tekrarlayan torsiyona bağlı olarak testis kaybı gelişebilir (42,52). İntratestiküler arteriyel kanlanma yapısı nedeniyle fiksasyon sütürlerinin testis ön alt yüzüne yerleştirilmemesi gerektiği gösterilmiştir (19).

Appendiks testis ve epididimislerin üst kısımlarında bulunan embriyolojik kalıntıların torsiyonu da meydana gelebilen bir durumdur. Bu durumda testisin veya epididimisin üst bölümünde kitlesel oluşumun ele gelmesi patognomoniktir (15,53). Appendiks testis torsiyonunda apendiks yerleşimi ile uyumlu olarak skrotum cildinde mavi-nokta bulgusu (blue-dot sign) gözlenir, fizik muayenede appendiks testis ödemli ve şiş, geri kalan testis dokusu ise normal palpe edilir. Tedavide ağrı kesici ve skrotal elevasyon önerilir. Tedavi edilmeyen olgularda ağrı ve skrotal ödem genellikle 5-7 günde geriler ve kaybolur (15).

Klinik bulgu olarak sol testis genelde daha sık etkilenir, ayrıca inmemiş testislerde de torsiyon solda daha sık saptanır (54) Torsiyon gelişen testis genelde retrakte, skrotumda yüksek yerleşimli ve horizontal pozisyonundadır (55). Olgularda kremasterik refleks kaybolabilir (56). Yapılan bazı klinik çalışmalarda testis torsiyonu olgularında kremasterik refleks kaybının %90-%100 sıklığında görüldüğü belirtilmiş, diğer akut skrotum vakalarında ise kremasterik refleksin % 80'lere varan oranda devam ettiği gösterilmiştir (56,57). Genel olarak bakıldığında hastaların yaklaşık yarısında geçirilmiş ve tedavi almadan gerilemiş skrotal ağrı öyküsü mevcuttur (58,59). Torsiyona uğrayan testisin elevasyonu ile birlikte ağrıda artış olurken, epididimit ve orşitte hastanın ağrısı elevasyon ile geriler. Bu bulgu (prehn bulgusu) orşit ve testis torsiyonu ayırıcı tanısında önemli bir yere sahiptir (56). Eğer hasta 4-6 saat içinde opere edilir ve kontralateral testis fiksasyonu yapılırsa prognoz iyidir (42). Testis torsiyonu geliştiği dönemde bazı proteinlerin sistemik sirkülasyona katıldığı, bunun da kontralateral normal testis dokusuna zarar veren anti-testiküler antikörlerin gelişimine neden olabileceği düşünülmektedir (60). İlk 6 saat içerisinde tedavi uygulanan vakalarda testis dokusu %100 hasarsız kurtulabilirken, daha gecikmiş vakalarda tedavi

uygulansa bile bu oran %20'leri geçememektedir (61). Hellner' in testis torsiyonu ile meydana gelen 6 saatlik iskemi süresinin testisin kaderini belirleyen ana faktör olduğu düşüncesi günümüzde de kabul görmektedir (62).

Yapılan birçok araştırmada tek taraflı testis torsiyonunun, kontralateral testiste de biyokimyasal değişikliklere yol açabildiğini ve bu değişikliklerin yapılan uygun tedaviden sonra da şiddetlenebileceği gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada iki gruba ayrılmış olgulardan; birinci gruba torsiyon sonrası detorsiyon uygulanıp orşiektomi yapılmış, diğer gruba ise detorsiyon uygulamadan direk orşiektomi yapılmıştır. Çalışmaya alınan deneklerde; kontralateral testisteki etkilenen seminifer tubül yüzdesinin, detorsiyon uygulanıp orşiektomi yapılanlarda, direk orşiektomi yapılanlara göre anlamlı şekilde daha yüksek olduğu gösterilmiştir (63). Bu kontralateral testis hasarına nörohormonal bağlantıların sebep olduğu sanılmaktadır. Buna rağmen meydana gelen kontralateral testis hasarının patofizyolojisi henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır.

## **2.5. Tanısal Testler ve Görüntüleme Yöntemleri**

Dopler Ultrasonografi son yıllarda testis torsiyonunun değerlendirilmesinde en sık başvurulan tanı yöntemi haline gelmiştir (64). Hızlı, ekonomik ve non invazif bir yöntemdir. Torsiyon dışında olası hematoma, apendiks torsiyonu ve hidroselin görüntülenebilmesini de sağlar. Testis torsiyonunda, doppler görüntüleme kan akımı tamamen kaybolmuş ya da torsiyon derecesine göre kan akımı azalmış da olsa halen görülebilir durumdadır. Görüntüleme bulgusu olarak etkilenen testis genişlemiş ve heterojen görünümündedir (63). Akut skrotal şişliği olan ve kesin tanılarını kanulmamış olgularda renkli doppler ultrasonografinin %88.9 sensitivitesi ve %98.8 spesifitesi olduğu, bunun yanında %1 yanlış pozitif sonuç verdiği gösterilmiştir. Testis torsiyonu olgularında ultrasonografide etkilenen testis olayın gerçekleştiği ilk saatlerden itibaren büyük ve hipoekojen olarak görülür (65).

Manyetik rezonans (MR) görüntüleme testis torsiyonu tanısında kullanılabilen bir yöntemdir (66). Klinik uygulamada özellikle pediatrik dönemde anestezi gerekliliğinden dolayı rutin kullanıma girmemiştir. Bu nedenle (MR) görüntüleme testis torsiyonu tanısında ileri tetkik amacıyla kullanılabilir (66).

Radyonüklid sintigrafi yöntemi en sık izotop Tc 99 kullanılarak testis kan akımının değerlendirilmesine yardımcı olur (67). Torsiyon tanısında söz konusu testisin zayıf radyonüklid izotop tutulumu ile tanıda yardımcı olur. Radyonüklid sintigrafi intravenöz girişim gerektirir ve daha yüksek maliyetlidir. Yapılan bazı çalışmalarda radyonüklid görüntüleme ile renkli doppler USG karşılaştırıldığında tanı koyma sensitivite oranlarının birbirine yakın değerlerde olduğu bildirilmiştir (68).

## **2.6. Ayırıcı Tanı**

Testis torsiyonunun; apendiks testis torsiyonu, inkarsere-strangüle herni, orşit, epididimit gibi akut skrotal ağrı yapan diğer hastalıklardan ayırımının yapılması uygulanacak tedaviyi belirleme açısından önemlidir. Testis torsiyonunda oluşan ağrı genellikle epididimorşit ağrısına göre daha şiddetlidir (69). Apendiks testis torsiyonu testis torsiyonuna göre daha yavaş seyirli bir tabloyla karşımıza çıkar, “mavi nokta” bulgusu ve testisin üst polünde lokalize edilen hassasiyet mevcuttur. Çocukluk döneminde akut skrotal ağrının %35-67’sinden apendiks testis torsiyonu sorumludur ve bu olgularda kremasterik refleks genellikle mevcuttur. Akut travma öyküsü bulunan hastalarda testis rüptürü ve hematosel ayırıcı tanıda akla gelmelidir. Henoch-Schonlein purpurası ve poliartritis nodoza gibi farklı durumlar da akut skrotal ağrının diğer nadir nedenleri arasındadır (56).

## **2.7. Tedavi**

Akut skrotum ile başvuran erkekte hikaye, muayene veya görüntüleme yöntemleri ile torsiyon tanısını koymak mümkündür. Manuel detorsiyon

cerrahiye alternatif değildir, fakat ilk 6 saat içinde cerrahi hazırlığın devam ettiği dönemde uygulanabilir. Manuel detorsiyon kronik intermitan torsiyonlarda da denenmelidir (59). Ağrılı bir işlem olduğu için sedasyon altında veya spermatik kord blokajı yapıldıktan sonra uygulanmalıdır. Genel uygulama olarak testisler medialden laterale doğru döndürülerek detorsiyone edilir. Başarılı bir manuel detorsiyon uygulaması sırasında skrotal ağrının kısa süre içinde geçmesi gerekir. Manuel detorsiyon başarısının kesin göstergesi ise dopler ultrasonografide kan akımının düzeldiğinin görülmesidir (70).

Manuel detorsiyonun başarılı olduğu durumlarda da cerrahi müdahale ile testiküler fiksasyon uygulanması gereklidir. Altı saatten sonra kalıcı iskemi sürecinin başladığı unutulmamalıdır. Cerrahi müdahalede genellikle transskrotal yaklaşım tercih edilir. Eksplozasyon sırasında etkilenen testis ve spermatik kord detorsiyone edildikten sonra testisin reperfüzyonu değerlendirilir ve testis nemli-sıcak ortamda tutulur. Testiste reperfüzyon bulgusu yoksa veya nekroz gelişmişse orşiektomi yapılır. Bu durumda orşiektomiye ek olarak kontralateral testis fiksasyonu uygulanmalıdır. Detorsiyon uygulandıktan sonra testis reperfüzyonu iyiye ve doğal rengine döndüyse bilateral testis fiksasyonu uygulanır. Torsiyon gelişimi sonrasında uygulanan testis fiksasyonunda testis dartosa fikse edilir (71). Fiksasyon yapılması düşünülüyorsa ince, absorbe olabilen ve non-reaktif sütürlerin kullanılmasına özen gösterilmelidir (72). Fiksasyonun oluşturabileceği lokal reaksiyonların da testise zarar verebileceği unutulmamalıdır. Cerrahi müdahale sırasında mutlaka karşı hemiskrotum incelenmelidir (72).

İlk 6 saate kadar yapılacak detorsiyon girişimi sonrası testis fonksiyonları % 100'e kadar korunabilir. Torsiyonun ilk 12 saatlik döneminden sonra uygulanan tedavilerde testis fonksiyonlarının ancak % 20'sinin korunabildiği, 24 saatten daha uzun süre geçmiş olgularda testiste irreversibl değişikliklerin belirginleştiği bildirilmiştir (45). Testis torsiyonunda fertilitenin korunmasında, oksidan hasarın engellenmesinde veya azaltılmasında uygulanacak birincil tedavi, en erken şekilde yapılan cerrahi girişimdir (73).

Testis torsiyonu tedavisinde uygulanan cerrahi müdahale altın standart olarak görülmesine rağmen, iskemi süresi 6 saatten daha fazla olduğunda germ hücrelerinde irreversibl değişikliklere yol açması ve tedavi sonrası gelişen reperfüzyon hasarının da germ hücrelerinde olumsuz sonuçlar doğurması, cerrahi tedaviye ek olarak farklı medikal tedavilerin de kullanım gereksinimini gündeme getirmiştir (29). İpsilateral veya kontralateral hasarı en az seviyeye düşürmek için torsiyon gelişen testisin erken cerrahi müdahale ile çıkarılması, tek taraflı testis torsiyonu sonrası steroid uygulaması ve hiperbarik oksijen tedavisi günümüzde de denenmektedir (29).

## **2.8. Komplikasyonlar**

Spermatogenez testis torsiyonu tedavisi uygulanan hastalarda belirgin olarak bozulmuştur. Yaşanan torsiyon süresine bakmaksızın hastaların yaklaşık %36' sında sperm sayısı 15 milyon/ml' nin altında saptanmıştır (74). İnfertilite riski testis torsiyonu sonrası uzun dönemde istenmeyen yan etkilerin başında gelir. Bu hastalarda ortaya çıkan fertilitate bozukluğu oluşan iskemi derecesine ve kontralateral testiste oluşan hasara bağlıdır (75).

Testiküler torsiyon modeli oluşturulan deneysel çalışmalarda detorsiyon uygulaması sonrasında, leydig ve sertoli hücrelerinin fonksiyonlarının düzelmesine ve arteriyel kanlanmanın tekrar sağlanmasına rağmen sperm üretiminde duraklama meydana gelmesi farklı patofizyolojik mekanizmaları gündeme getirmiştir (75).

## **2.9. Testis Torsiyonu, İskemi / Reperfüzyon Sonrası Oksidatif Stres**

İskemi-reperfüzyon hasarı vücudumuzdaki tüm organlarda oluşabilen ve sadece olduğu organla sınırlı kalmayan, pek çok organ ve sistemi de olumsuz etkileyen patolojik bir durumdur (68). İskemi sonucunda gereken enerjinin sağlanamaması, hücre membranında bulunan Adenozin Trifosfat



(ATP) bağımlı Sodyum-Potasyum ( $\text{Na}^+/\text{K}$ ) pompasının görevini yerine getirememesine sebep olur. Bunun sonucunda oluşan iyon dengesizliği, hücre içinde izo-ozmotik vasıfta su birikimine ve akut hücre sel şişmeye sebep olur. Anaerobik glikoliz sonucunda meydana gelen asidoz, karbondioksit ( $\text{CO}_2$ ) birikimi sonucunda oluşan karbonik asit ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) ile daha da derinleşir (76).

ATP bağımlı çalışan, hücre membranında bulunan diğer bir pompa ise ekstrasellüler ve intrasellüler kalsiyum ( $\text{Ca}^{++}$ ) un dengelenmesini sağlamaktadır. İntrasellüler ( $\text{Ca}^{++}$ ) un artması sonucunda proteolitik enzimler ve fosfolipazlar aktive olur. Fosfolipazların aktivasyonu sonucunda oluşan araşidonic asit direkt etki ile mitokondriyal enzimleri inhibe ederek serbest radikal oluşumunu hızlandırır (76). Hücre içinde meydana gelen bu sitotoksik olaylar sonucunda ribozomlar granüllü endoplazmik retikulum ile olan bağlarını kaybeder. Polizomların monozomlara parçalanması sonucunda protein sentezi azalır ve durur. Bu aşamadan sonra iskemik süreç devam ederse irreversible hasarlar meydana gelir. Oluşan hasara, mitokondrielerde meydana gelen şiddetli vakualizasyon ve matrikste  $\text{Ca}^{+2}$  dan zengin, şekilsiz yoğunluk birikimi eklenir. Meydana gelen membran hasarı ile bol miktarda  $\text{Ca}^{++}$  hücre içine girer (76).

İskemi geliştiğinde hücre sel ATP hipoksantin'den elde edilmektedir. Normal şartlarda hipoksantin, ksantin dehidrogenaz ile ksantine oksitlenir (77). İskemi sırasında ise ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza çevrilmesi nedeniyle, hipoksantin'in ksantine oksitlenmesi gerçekleştirilemez ve dokularda aşırı hipoksantin birikimi meydana gelir (77).

Testis, serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu hasara karşı oldukça duyarlı bir dokudur (78). Testis torsiyonu geliştiğinde venöz kan akışı azalır ve bunun sonucunda ödem, hemoraji ve daha sonra arteriyel tıkanıklık meydana gelir. Bunun sonucunda da dokuda iskemik süreci başlamış olur (42).

Testis torsiyonu sürecinde gelişen iskemik hasardan sorumlu olan mediyatörler tam olarak bilinmemekte olup, çeşitli immünolojik ve

biyokimyasal belirteçler belirlenmeye çalışılmıştır (73,79). Cerrahi müdahale ile testis torsiyonunun tedavisi sonrasında, oluşan kan akımı artışının iskeminin etkilerine ek olarak dokuya önemli hasar verdiğini gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (80). Testis torsiyonu sonrasında doku hasarının gelişmesinde iskemi ve detorsiyon uygulanması sonucunda reperfüzyon sürecinde ortaya çıkan reaktif oksijen radikallerinin (ROS) belirleyici rol aldığı bildirilmiştir (78,81,82). Reaktif oksijen radikalleri, hücre membranlarında oluşturduğu lipid peroksidasyonu sonucunda protein denatürasyonuna ve hücre hasarına yol açar (83).

Reperfüzyon sürecinde oluşan hasar nötrofil infiltrasyonu ve serbest oksijen radikallerinin artışıyla ilişkili bulunmuştur (5,7). İskemi sonrasında meydana gelen reperfüzyon, dokuyu iskemi hasarından daha fazla zarara uğratar (84). Reperfüzyon hasarı, iskemiye uğrayan dokularda oksijenizasyonun sağlanması sonrasında gelişen doku hasarı hatta gelişen nekroz olarak tanımlanmıştır(85). Sonuçta iskemi sonucunda meydana gelen hasar, reperfüzyonun başlaması ile daha da artmaktadır(78,86).

Reperfüzyon sürecinde ortamda bulunan nötrofiller, postkapiller endotele yapışarak vasküler yapılara ve interstisyuma zarar verirler (87). İskemi ve buna takip eden reperfüzyon dönemlerinden oluşan sürecin tümü İ/R hasarı olarak adlandırılır. İskemi-reperfüzyon hasarı sürecinde, etkilenen bölgeye nötrofil infiltrasyonunun yanında ROS, RNT(reaktif nitrojen türevleri), NO gibi toksik metabolitlerde ciddi artış meydana gelir (78,86). Meydana gelen SOR oluşumu ile mitokondri ve hücre membranında gelişen peroksidasyon sonucunda membran bütünlüğünde ve geçirgenliğinde bozulma, ilerleyen süreçte protein yıkımı ve sonuçta nükleik asit hasarı meydana gelir (7,60). Bunun sonucunda iskemi sebebiyle meydana gelen hasar artmış olur (78,86).

İskeminin kritik süresi organa bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bu süre böbrekte 15-20 dakika, iskelet kasında 2,5 saat iken testiste yaklaşık 6 saattir (88). Son yıllarda, çalışmalardan çıkan sonuçlarla iskemi ve reperfüzyon sürecinde meydana gelen DNA hasarının sonunda etkin olan

poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP), ya da farklı isimlendirmeyeyle poli (ADP-riboz) sentaz (PARS) enziminin katalizlediği vurgulanmıştır (89). Dokularda DNA'nın onarılmasına yardımcı olan PARP, oksijen radikallerinin oluşturduğu hasarda fazla ATP kullanarak oluşturduğu enerji tükenmesi neticesinde ölüme sebep olmaktadır. Oluşturulan doku ve organ modellerinde PARP enzim inhibitörlerinin iskemi-reperfüzyon hasarını önlediği bildirilmiştir (90).

Oluşan iskemi ve bunu takip eden reperfüzyon döneminde oksijen radikallerinin artışı, inflamatuvar sitokinlerin üretilmesi, ilgili dokuya nötrofillerin göç etmesi, böylece lipid peroksit ürünlerinin artışı sonucunda hücresel yapılarda hasar olduğu gösterilmiştir (7,91). İskemi-reperfüzyon hasarının en önemli belirticinin doku lipid peroksit içeriğinin olduğu ve bunun da lipid peroksidasyonunun son ürünü olarak bilinen MDA seviyesinin belirlenmesi ile gösterilebileceği belirtilmiştir (78).

Yapılan bazı çalışmalarda iNOS ve eNOS üretimindeki artışın ratlarda nekroz veya apoptozisi indükleyerek hücre ölümüne sebep olduğu bildirilmiştir (92). Reperfüzyon döneminde NO düzeyinin arttığı (7), inflamatuvar sitokinlerden TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ 'deki artışın buna eşlik ettiği tespit edilmiştir (91). Reperfüzyon sürecinde NO etkisiyle makrofajlar tarafından üretilen inflamatuvar sitokinler tarafından inflamasyonun başlatıldığını ve aktive olan nötrofiller ile oluşturulan ROS'un reperfüzyon ile meydana gelen hasarda önemli rol aldığı gösterilmiştir (91).

## **2.10. Serbest Oksijen Radikalleri**

Serbest oksijen radikalleri en dış yörüngelerinde eşlenmemiş elektron bulunduran atom ya da atom gruplarıdır. Oksijenin tek elektronunun indirgenmesi sonucunda meydana gelen serbest oksijen radikallerinin yol açtığı oksidan yıkım; iskemi, heperoksijenizasyon ve doku inflamasyonu gibi birçok olayda yer alarak sonuçta oluşan hastalıkların patogenezinde rol almaktadır (77).

Serbest oksijen bileşikleri aerobik metabolizmada ara veya son ürün olarak devamlı şekilde üretim halindedir. Konak savunma mekanizmalarında önemli rol oynayarak bir denge halindedir. Serbest radikallerinin ömürleri diğer metabolizma ürünlerine oranla oldukça kısa olmasına karşın protein, nükleik asit, ve lipidler ile kısa süreli ilişkileri sonucunda bile, hücrede farklı olaylara yol açarlar (77).

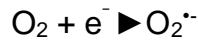
### **2.10.1 Serbest Radikal Çeşitleri**

Serbest radikaller 2 ayrı kategoride sınıflandırılırlar. O<sub>2</sub> ve OH oksijen merkezli serbest radikallerin başlıcaları iki üyesidir. Ayrıca radikal olarak nitelendirilmeyen, ancak kimyasal etkileri güçlü olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi bileşikler de bulunmaktadır (77).

### **2.10.2 Reaktif Oksijen Bileşikleri**

#### **a) Süperoksit Radikali (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)**

Moleküler oksijen en önemli radikal öncüsü maddedir. Moleküler oksijen bulunduğu ortamdan bir elektron alarak indirgendiğinde süperoksit radikali meydana gelir. O<sub>2</sub><sup>-</sup> serbest radikal olarak değerlendirilir fakat belirgin toksik etkisi gösterilmemiştir. Sitoplazmadaki P<sub>450</sub> sistemi tarafından üretilmektedir (93).

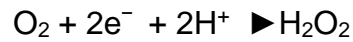


#### **b) Hidroksil Radikali (OH<sup>-</sup>)**

Süperoksit radikali ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' nin tepkimeye girmesiyle oluşan hidroksil radikali en reaktif fazda bulunan ve en zarar verici serbest oksijen radikali olarak bilinmektedir. Oluşması ve yıkımı arasında çok kısa bir süre vardır (94).

### c) Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Moleküler oksijenin bulunduğu ortamdan iki elektron alarak indirgenmesi sonucunda hidrojen peroksit meydana gelir. Eşlenmemiş elektronu bulunmadığı için Hidrojen peroksit serbest radikal olarak değerlendirilmez. Hidrojen peroksit biyolojik sistemlerde asıl olarak O<sub>2</sub><sup>-</sup> 'nin dismutasyonu sonucunda oluşur. Bahsedilen bu reaksiyon süperoksit dismutaz (SOD) ile enzimatik olarak veya spontan gerçekleşebilir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biyolojik membranları geçebilen ve uzun ömürlü bir yapıya sahiptir (95).



Asıl önemi geçiş metal iyonlarının varlığında hidroksil (OH-) radikallerini oluşturabilmesi olan hidrojen peroksit, protein tiyollerini oksitleme ve DNA'da zincir kırılmaları oluşturarak hasar meydana getirir.

### d) Singlet Oksijen

Singlet oksijen, eşlenmemiş elektron bulundurmadığı için radikal olarak değerlendirilmez. Serbest radikal reaksiyonları sırasında oluşabileceği gibi, radikal reaksiyonları başlatma etkisine de sahiptir. Yarılanma ömrü kısa olan singlet oksijen, reaktif bir tür olup, moleküler oksijenin enerji alması sonucunda meydana gelir (95).

### e) Hipoklorik Asid (HOCl)

Bakterilerin fagositik hücreleri öldürmesinde önemli rolü vardır. Enzimatik olarak nötrofil ve makrofajlar tarafından üretilerek bakterisit etki gösterirler (95).



Serbest radikallerin başlıca etkileri deoksiribonükleik asidi tahrip etme, nükleotid yapılı koenzimleri yıkma, tiyollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarını bozma, lipid peroksidasyonu, zar yapısı ve fonksiyonunu

değiştirme, lipid peroksidasyonu, zar yapısı ve fonksiyonunu değiştirme olarak sıralanabilir. Serbest radikallerin koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, psöriasis, diyabet gibi birçok hastalığın patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir (96).

## **2.11. Antioksidan Savunma Sistemleri**

### **2.11.1. Antioksidanların Etkileri**

Organizmada serbest radikallerin meydana getirdiği zararlı etkilerini nötralize etmek üzere gelişen çeşitli savunma mekanizmaları antioksidanlar tarafından yönetilir. Antioksidan ve oksidan moleküller arasındaki denge bozulduğunda, doku hasarına yol açabilen birçok patolojik değişiklik meydana gelir.

Hücre zarı yapısında bulunan lipidlerin metabolik süreçte oluşan serbest radikaller tarafından peroksidasyona karşı korunması antioksidanların ilk belirlenen etkileridir. Antioksidanlar ayrıca karbonhidrat ve proteinli- yapısındaki molekülleri de zararlı etkilerden korumaktadır.

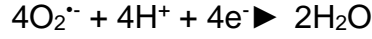
Antioksidanların başlıca etkileri; metal iyonları bağlayarak radikal oluşumunun engellenmesi, hasar gören hücrelerin tamiri ya da ortamdaki temizlenmesi, reaktif oksijen türlerinin nötralize edilmesi olarak sıralanabilir.

Antioksidanlar çeşitli kriterlere göre sınıflandırılırlar (97).

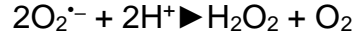
- Enzim yapısında olanlar
- Enzim yapısında olmayan protein veya daha küçük moleküler yapıda olanlar

### **2.11.2. Enzim Yapısında Olanlar;**

**a) Sitokrom Oksidaz:** Mitokondilerde bulunan bu enzim bakır (Cu) içermektedir. Mitokondride solunum siklusundaki görevinin yanı sıra, süperoksit radikalının suya dönüştürülmesinde görev alır (98).



**b) Süperoksit Dismutaz (SOD):** Hücre içindeki  $\text{O}_2^{\cdot-}$  düzeylerini azaltmak amacıyla süperoksitin moleküler oksijen ve hidrojen peroksite dönüştürülmesini sağlamaktadır.



SOD 'un asıl görevi, membranları radikallerinin oluşturduğu peroksidasyona karşı savunmaktır. Yüksek miktarda oksijen kullanan dokularda, peroksidasyonu engellemek amacıyla SOD aktivitesi artar. Bunun yanında ekstrasellüler sıvılarda SOD aktivitesinin çok düşük olduğu gösterilmiştir (95,98).

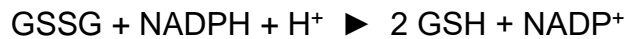
**c) Katalaz:** Katalaz enzimi yardımıyla  $\text{H}_2\text{O}_2$ ' nin, su ve oksijene dönüşümü sağlanır



Yapısında dört tane hem grubu içermekte ve peroksizomlarda bulunmaktadır. Bunun yanında lipid hidroperoksitlerine karşı etkisizdir (77,95).

**d) Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px):** Tetramer yapıda olup dört selenyum atomu içerir ve sitoplazmada serbest halde bulunur. Katalizlediği reaksiyonlar sonucunda, hidrojen peroksidin ve organik hidroperoksitlerin (ROOH) indirgenmesine yardımcı olur.

Glutasyon peroksidaz peroksitlerin alkole indirgenmesini sağlarken, aynı zamanda GSH'nın yükseltgenmesine yardımcı olur. Meydana gelen yükseltgenmiş glutasyon (GSSG), glutasyon redüktaz enziminin aracılığıyla tekrar indirgenmiş glutatyona dönüşmektedir (97).



e) **Glutasyon Transferaz:** Çok sayıda izoenzimi mevcut olup dimerik yapıda, sitozolde yer alır. Glutasyon yardımı ile endojen ve eksojen bileşiklerin konjugasyonunu sağlar (95,97).



### 2.11.3. Enzim Olmayanlar

Alfa-tokoferol, beta-karoten, alfa-lipoik asid lipid fazda bulunurken, albumin, askorbat, bilirubin, ferritin, glutasyon, laktoferrin, melatonin, urat, sistein sıvı fazda bulunmaktadır (77,95).

#### a) Karotenoidler ve Retinoidler

Karotenoidler bitkilerde bulunan bir pigmenttir. Karotenoidlerin başlıcası A vitamininin metabolik ön maddesi olan beta-karotendir. Retinoidlerin bazıları LDL'nin yapısına katılarak oluşturduğu yapı ile LDL'nin oksidasyondan korunmasını sağlar. Oksidan stresin yaratacağı hasara üç farklı mekanizma ile engel olurlar.

- i. Flavinler ve porfirinlerin zararlı etkilerini baskılama,
- ii. Singlet oksijenin etkilerini baskılama,
- iii. Peroksil radikallerinin ortamdaki temizlenmesini sağlama

Karotenoidlerin ayrıca antikarsinojen etkili oldukları bilinmektedir (97).

#### b) Askorbik Asid (C Vitamini)

Askorbik asid, vücutta sentezlenemediği için diyetle alınması gerekir. Yeşil yapraklı bitkisel besinler bol miktarda askorbik asid içermektedir. İnce barsaklardan emilir.

Askorbik asidin en önemli özelliği, indirgeyici gücünün çok yüksek olmasıdır. Ayrıca kollajen sentezinde olduğu gibi hidroksilasyon



reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak yer alır. Askorbik asid aynı zamanda güçlü bir antioksidan olup  $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$  ve  $^1O_2$  nin etkilerini nötralize eder. Sonuç olarak lipidleri ve zarları oksidan hasarın zararlı etkilerine karşı korumaktadır (95,97).

### **c) E Vitamini**

Tokoferol ve tokotrienol türevleri ve bunların alt gruplarından oluşan bir vitamindir. Alfatokoferol en yüksek antioksidan aktivitesine sahip olanıdır. Yapısında bulunan aromatik zincir aktif bölgesidir ve moleküle antioksidan yapı kazandırır.

Hücre zarında bulunan lipidlerin peroksidasyondan korumasındaki ilk savunma hattını oluşturur. E vitamininin başlıca fonksiyonu; lipidlerin peroksidasyonunu engelleyerek oksidan zararı sonlandırmaktır (99).

### **d) Flavonoidler**

Lipidlerde çözünen antioksidan sınıfını üyesidir ve polifenol türevlerindedir. Kateşin, asit, klorogenik asit ve kuersetin bazı flavonoidlerdir. Farklı yollarla lipid peroksidasyonuna karşı savunmada rol aldığı belirtilmiştir. Bunları peroksidasyonda önemli rolü olan radikal ürünlerin tutulması ve serbest radikalleri oluşturan enzimlerin inhibisyonu şeklinde sıralayabiliriz. Bu gruba ait bazı üyelerin metal yapıdaki iyonlarla etkileşime girerek pro-oksidan etkiye sahip olabileceği gösterilmiştir (99).

## **2.12. Nitrik Oksit (NO)**

Nitrik oksit (NO) patofizyolojik ve fizyolojik süreçlerin oluşmasında önemli yeri olan serbest radikal yapısında bir moleküldür. NO sentezi bazen stimülatör-reseptör ilişkisi veya bazen de meydana gelen sinir uyarıları

sonrasında üretilir. Nitrik oksit sentaz (NOS) aracılığıyla L-arjinin ve oksijenden sentezlenir (100).

NOS (Nitrik oksit sentaz) damar endotelinde, nöronal dokuda, trombositlerde ve vücutta farklı dokularda bulunur. Nitrik oksit sentazın endotelial, nöronal ve indüklenebilir olmak üzere üç farklı izoenziminin olduğu bilinmektedir. (100,101).

### **2.13. Glutasyon (GSH)**

Tripeptid yapıya sahip olan glutasyon sentezinde, bir çok dokunun yüksek miktarda içerdiği; glutamat, sistein ve glisin aminoasitleri kullanılır. Önemli göreve sahip antioksidan bir moleküldür. Glutasyon peroksidaz, glutasyon redüktaz ve glutasyon transferaz enzimlerinin çalışmasında aktif rol alır.

Glutasyon, peroksitler ve serbest radikaller ile reaksiyon oluşturarak hücrelerde oluşan oksidan hasarı önler. İndirgenmiş halde bulunan glutasyon (GSH) çeşitli reaksiyonlara girip yükseltgenerek, GSSG'ye dönüşür (102).

### **2.14. Malondialdehit (MDA)**

Malondialdehit (MDA), hücre membran lipidlerinin oksidasyonu sonucunda yapılarının bozulması ile oluşan ana metabolittir. Lipid peroksidasyon ürünlerinin yaklaşık % 40' ı MDA tarafından oluşturulur. Bu nedenle MDA, lipid peroksidasyonunu değerlendirmede önemli bir belirteç olduğu bildirilmiştir (103). Organ ve dokularda oluşan membran hasarı sonucunda lipid peroksidasyonu uyarılır ve ürünler meydana gelir.

Lipid peroksidasyonuna neden olan en önemli radikallerin başında  $O_2$  ve  $OH\bullet$  gelir. Lipid peroksidasyonu sonucunda, özellikle doymamış yağ asitlerin çift bağlarının oksidasyonu; membran akışkanlığında azalma, membran salınım fonksiyonlarında düzensizlik ve membran geçirgenliğinde bozulma ile sonuçlanır (103). Peroksidasyonürünü olan MDA, DNA ve

proteinlerle çapraz bağlar kurarak bunların fonksiyon ve aktivitelerini değiştirebilirler.

Peroksidasyon ürünleri, iskemik ve travmatik hasarlarda önemli bir yere sahiptir. LDL ve membran fosfolipitleri oksijen radikallerin etkilerine karşı en duyarlı makromoleküllerin başında gelir (104).

### **2.15. Medikal Ozon**

Ozon üç adet oksijen atomunun oluşturduğu gaz halinde bulunan bir moleküldür. Moleküler oksijen (O<sub>2</sub>) kararlı halde iken, ozon (O<sub>3</sub>) kararsız haldedir. 1839 yılında Alman kimyager Schönbein tarafından bulunmuştur. Ozon keskin kokulu, renksiz bir gazdır. Keşfedildikten sonra ilk olarak dezenfektan olarak kullanılmıştır. Ozonun mevcut oksidan özelliği sayesinde dezenfeksiyon oluşturduğu aşikardır. Ayrıca deterjanları, kimyasal atıkları ve aromatik bileşiklerin de etkili şekilde nötralize edilmesini sağlar (105,106). Radikal özelliği taşıyamamasının yanında, florin ve persülfattan sonra, bilinen en güçlü üçüncü oksidan moleküldür (107,108).

Ozon oluşumu aşağıdaki tepkime ile gerçekleşir.



Reaktif yapıda olup, vücut için toksik etkilidir. Toksikiteye en duyarlı dokular akciğer ve gözlerdir. Ozonun düşük dozda inhalasyonu, hafif iritasyon ve öksürük oluştururken daha yüksek konsantrasyonlarda akciğerde meydana gelen hücre hasarına bağlı ödeme sebep olabilir (109,110).

#### **2.15.1. Medikal Ozon ve Etki Mekanizması**

Ozonun medikal kullanımını ilk olarak 1880'de Dr. John Harvey Kellogg yapmıştır. Farklı kaynaklara göre ilk medikal uygulama Birinci Dünya Savaşı'nda kangren ve ciddi iskemik yaralanmaları tedavi etmeye çalışan Dr. Albert Wolff ile başlamıştır. Ozonun tedavi edici etkisinden ilk defa 1935'te

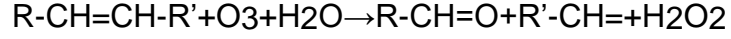
59uncu Alman Cerrahi Birliği toplantısında bahsedilmiştir. Bu toplantıda tedavi uygulanmış vakaların anlatıldığı bir bildiri yayınlanmıştır (111,112). Dolaşım sistemine veya vücut boşluklarına oksijen/ozon karışımının uygulanması tedavinin temelini oluşturur. Elde edilen karışım farklı vücut boşluklarına verilebildiği gibi en sık uygulama şekilleri intravenöz ve intraperitoneal uygulamalardır (107). 1974 yılında Wolff tarafından tarif edilen ve klasik uygulama haline gelmiş olan yöntem; bir miktar kanın (50–270 ml) vücut dışına alınarak, ozona dayanıklı bir şişede 5-10 dakika oksijen/ozon karışımıyla temasını takiben tekrar aynı kişiye geri verilmesi esasına dayanır(ototransfüzyon) (107,113). Majör otohemoterapi (HT) bu uygulamaya denir.

Reaktif bir molekül olması nedeniyle ozonun tıbbi uygulamalarında dikkatli olunmalıdır. Saf ozon uygulamasından kaçınılmalı ve belirli oranlardada oksijen karışımı ile birlikte verilmelidir. Elde edilen karışım en fazla %5 oranında ozon içermelidir. Bu karışımın atmosfer havasını içermemesine dikkat edilmelidir. Aksi takdirde ozonun reaktif olma özelliği nedeniyle atmosfer gazlarıyla etkileşimi sonucunda canlılar için toksik etkili nitrojen dioksit ( $N_2O_2$ ) meydana gelebilmektedir. Ayrıca olası embolileri önlemek amacıyla ozonun gaz halinde intravenöz verilmesinden kaçınılmalıdır. Yapılan işlemlerin tümünde ozonun etkilerine dayanabilecek malzeme kullanılmasına dikkat edilmelidir (107).

Oksijenle kıyaslandığında ozon daha yoğun ve suda daha fazla çözünürlüğe sahip yapıdadır. Saf suda diğer gazlara benzer şekilde çözünür. Çözünmesi konsantrasyona, ısıya ve basınca bağlıdır. Oksijenden farklı şekilde biyolojik sıvılarda ortamdaki ile hızlıca reaksiyona girme eğilimindedir.

Ozon/oksijen karışımı HT ile uygulandığında karışımda bulunan ozon öncelik sırasına göre çoklu doymamış yağ asitleriyle, antioksidan moleküllerle ve sülfhidril (SH) grubu bulunduran bileşiklerle reaksiyona girerek etki gösterir. Ozonun miktarına bağlı olarak karbonhidratlar, proteinler, DNA ve RNA da bu reaksiyondan etkilenebilmektedir. Bahsedilen bileşikler ozon ile karşılaştığında elektron vericisi gibi davranarak oksitlenirler. Sonuçta

süperoksit (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve hipoklorik asit (HClO) gibi reaktif oksijen bileşikleri (ROB) meydana gelir. Doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu bu reaksiyonlardan en önemlisidir. Ana reaksiyon aşağıda gösterilmiştir (107).

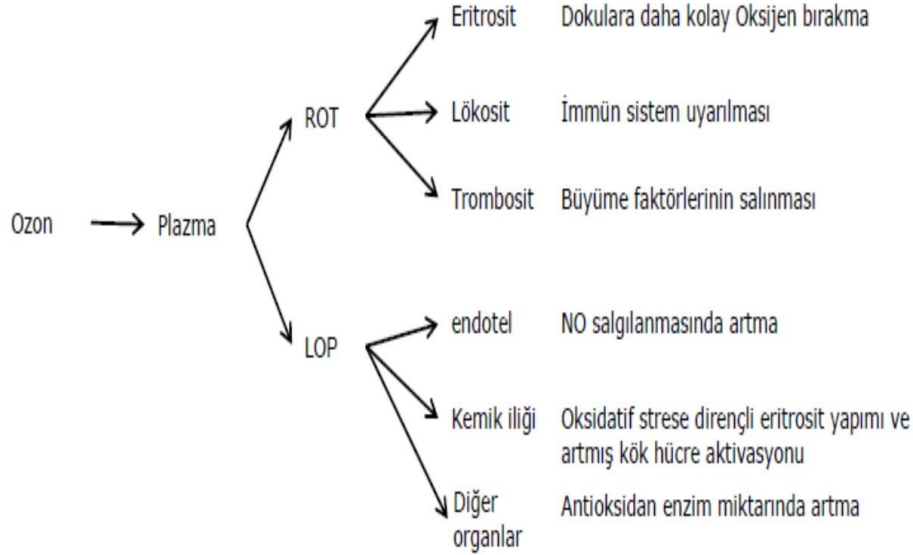


Yapılan çalışmalarda ozonun biyolojik etkilerini açıklamada, daha çok HT tedavisi model alınmıştır (114,115). HT esnasında uygulanan ozon/oksijen karışımındaki ozon plazma içerisinde hızlı bir şekilde çözünür. Sıvılardaki çözünürlüğünün fazla olduğu bilinen ozonun bir kısmı karışım için hazırlanan plazmada bulunan antioksidanlar ile reaksiyona girerek bunların miktarlarını azaltır. Bu anlık olaylar esnasında çeşitli miktarlarda ROB da oluşabilmektedir. Oluşan radikallerin yarı ömürleri kısadır ve alınan kan daha hastaya geri verilemeden, yani ototransfüzyon öncesinde ortamdaki temizlenerek yerlerini lipit oksidasyon ürünlerine bırakmış olurlar. Bu ürünlerin büyük çoğunluğu kanda en fazla bulunan hücre olan eritrositlerin membranlarının oksidasyonu ile meydana gelir. Eritrosit membranındaki doymamış yağ asitleri oksidasyona çok duyarlıdır. Oluşan reaksiyonlar sonucunda meydana gelen hidrojen peroksit, moleküler açıdan radikal sınıfında olmayan oksitleyicilerdendir(107,116,117).

Ozonun tedavide etkin oluşunun nedeni, hidrojen peroksidin ikincil haberci gibi davrandığı kabul gömektedir. İlk etkisi öncelikle eritrositlerde 2,3-difosfoglisarat düzeyinin artırılması sonucunda hemoglobin-oksijen disosiyasyon eğrisinin sağa kaymasına ve bunun neticesinde oksijenin dokulara daha kolay bırakılmasına Zemin hazırlamasıdır. Plazmada konsantrasyonu artan hidrojen peroksit diffüzyon ile hücrelerin içine kolayca girerek; lökositlerde ve endotelial hücrelerde çeşitli interferon, interlökin ve transforme edici büyüme faktörü (TGF) yapımını da arttırıcı etkiler ortaya çıkarır (118). Meydana gelen lipit oksidasyon ürünlerinin yarı ömürleri ise saatlere varabilmekte, böylece yarı ömrü kısa olan oksijen radikallerinin başta ortaya çıkan etkileri sonrasında ozonun gecikmiş etkileri

gözlenmektedir. Yarı ömürlerinin uzun olması nedeniyle bu maddeler ototransfüzyon aracılığıyla dolaşıma verilmiş olur ve dokuya ulaştıklarında farklı etkiler meydana getirirler (117,119,120).

HT tedavisi uygulanmadan önce karışım için hazırlanan kanın bulunduğu ortam antikoagülan içermelidir. Aksi takdirde ozon doza bağlı olarak trombosit fonksiyonlarında artışa neden olduğu için istenmeyen etkiler doğurabilir. Trombosit fonksiyonlarındaki artışın, ile aktive olmuş trombositler içlerinde bulunan büyüme faktörlerini salarak iskemiye uğramış dokularda iyileşmeye olumlu katkı sağladığı gösterilmiştir (116). HT sonrası ozonlanmış kanın vücuda geri verilmesi sonucunda oluşan terapötik etkileri şekil 3'te belirtilmiştir (117).



**Şekil 3.** Ozon uygulamasının etkileri. (LOP: Lipit oksidasyon ürünü, ROT: Reaktif oksijen türevleri)

Ozonun konsantrasyona bağlı olarak artan güçlü oksiden olması sebebiyle yüksek dozlarda vücutta toksik etkiler oluşturabileceği unutulmamalıdır. Sonuçta organizmada bulunan antioksidan savunma üyesi moleküller ozonun oksidatif etkilerine karşı tepki gösterecektir. Plazmada fazla miktarda antioksidan molekül bulunması ve eritrositlerin içerdiği antioksidan moleküller de göz önüne alındığında, ozonun oluşturduğu toksisiteye karşı direncin en fazla olduğu doku kandır. HT uygulamalarında plazmada çözülmüş ozonun plazmada yer alan antioksidan moleküller

(askorbik asit, bilirubin, -SH grubu taşıyan moleküller) ile reaksiyona girmesiyle birlikte ortamdaki antioksidanların konsantrasyonunu azalttığı görülmüştür (117). Diğer yandan, HT sonucu oluşan ROB artışı ve antioksidan miktarının azalması kısa süreli bir gelişmedir. Bocci ve arkadaşları, çalışmalarında aynı verilmiş yöntemiyle farklı dozlarda ozonlanmış kan örneklerinde uygulanan ozon dozuyla orantılı olarak glutasyon seviyelerinde ve antioksidan kapasitesinde azalma, peroksidasyon ürünlerinde artma olduğunu göstermiş, uygulamadan sonra 20. dakikada antioksidan molekül düzeylerinin başlangıç düzeyine geldiğini göstermişlerdir (115).

Böylece, HT uygulamasında tedavinin etkinliğini belirleyen ana unsur kanın sahip olduğu antioksidan kapasitedir. Antioksidan kapasitenin düşük, uygulanan ozon konsantrasyonun fazla olduğu durumlarda ise yüksek miktarda lipid oksidasyonu meydana gelir ve eritrositler hemolize uğrar. Bunun karşılığı bir durum oluştuğunda ozon uygulamasından beklenen oksidan cevap yeterince oluşmayabilir ve beklenen tedavi etkisi ortaya çıkmayabilir. Ozon tedavisi sonrasında ortamda artması beklenen ROB ve lipid peroksidasyon ürünlerinin tedavi edici etki oluşturabilmeleri için eşik konsantrasyon değerlerine ulaşmaları gerekmektedir (107). Bu yönüyle, kanın antioksidan kapasitesinin önemini belirten bir çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmada eritrositler kandan ayrıştırılmış ve sonrasında belirlenen farklı dozlarda ozon verilmiştir. Yapılan değerlendirmelerde düşük (10-20 µg/ml) ozon dozlarındaki uygulamalarda bile eritrositlerin hemen tümünde hemoliz meydana geldiği görülmüştür (121). Yapılan çalışmalar sonucunda ozonun terapötik indeksi 10-80 µg/ml olarak kabul edilmiştir. Belirtilen ozon konsantrasyonu uygulandığında, Rice-Evans'ın da vurguladığı gibi total antioksidan kapasitenin %25' ten fazla düşmediği, bununla beraber azalan antioksidanların 20 dakika sonra eski haline geldiği gösterilmiştir (114,121-123).

Ozon uygulamasının hem oksijenaz-1 (HO-1) enziminin de uyarılmasını sağladığı gösterilmiştir. Bahsedilen enzim seviyelerinin yükselmesinden hem ROB, hem de daha önce söz edilen eritrosit hemolizi

sorumlu tutulabilir. HO-1, mikrozomal bir enzim olup hem halkasının yıkımında görev alır ve yapımını arttıran sebepler arasında nitrik oksit (NO) artışı, oksidatif stres artışı, proinflamatuvar sitokinler sayılabilir. HO-1, hem molekülünün biliverdin ve karbon monoksit (CO) parçanmasından sorumludur. Son dönemde HO-1 enzimi birçok çalışmada yer almış olup, bu enzimin etki yepazesinde; antioksidan, antiapoptotik, antiinflamatuvar etkiler geösterebilmektedir. Ozon uygulamasını takiben oluşan en fazla HO-1 artışının aynı zamanda ozonun etkin ve güvenli doz aralığı olarak belirtilmiştir. Bu durum 20- 80 µg/ml ozon uygulandığı durumlarda ortaya çıkmaktadır. 123-125).

Farklı bir ozon uygulama ise minör hemoterapidir. Bu uygulamada da hastadan 5 ml kan alınır ve 5ml hacminde 80-100 µl/ml konsantrasyona sahip oksijen/ozon karışımı aynı ortama konularak bir dakika bekletilerek inkübasyon sağlanır. İşlem esnasında ozonunun, yine benzer mekanizma ile kanda öncelikle çözünmesi sonra da kanda bulunan moleküller ile reaksiyon oluşturması istenir. Daha sona oluşturulan karışım, gluteus adalesine yavaş bir şekilde enjeksiyon ile verilir. Bu uygulamada kasa verilen karışımda bulunan kan komponenti dokunun derinine giderken pıhtılaşmaya başlamasına rağmen hastaların çoğu şişlik ya da ağrı tariflememektedir. Bu işlemin anestezi altında yapılmasına gerek yoktur. Net olmamakla birlikte, bu uygulamanın immünmodülatör bir etki gösterdiği iddia edilmektedir. Uygulama yapılan bölgede minimal derecede steril inflamatuvar süreç görülmekte, bölgeye lökosit infiltrasyonu sonucunda denatüre olmuş proteinler ve yapıları bozulmuş eritrositler fagositoz ile ortamdan temizlenmektedir. Eğer kan içinde HCV, HBV ve HIV gibi virüsler var ise ozon tarafından inaktive edilerek parçalanmış durumdaki bu virüs atıkları bölgeye gelen bu immün hücreler tarafından yok edilirler. Bu sebeple yapılan işlemin bir çeşit aşı etkisi yarattığı ve immün sistemi bu antijenlere karşı uyardığı kabul edilir (107).



### **2.15.2. Medikal Ozon Tedavisinin Klinik Uygulamaları**

Ozon uygulamalarının özellikle inflamatuvar sürecin yoğun olarak yaşandığı ve immün sistemin ön planda olduğu fizyopatolojik durumlarda tedavi edici etkisi yüz güldürücüdür. Bununla birlikte basit enfeksiyonlardan komplike vakalara kadar geniş yelpazedeki çeşitli enfeksiyon durumlarında etkin olarak tedavide kullanılmaktadır (126-128). Martinez-Sanchez ve ark. diyabetik ayak oluşmuş hastalara uyguladıkları, ozonun etkinliğini değerlendirdikleri çalışmalarında, ozon tedavisinin antibiyotik tedavisine oranla yara iyileşmesini hızlandırdığı, hastanede yatış sürelerinin kısaldığı, ölçülen kan şekeri seviyelerinin daha kolay kontrol altına alındığı ve antioksidan molekül düzeylerinde artış saptandığı gösterilmiştir (129). Başka bir çalışmada Mutu ve arkadaşlarının lomber disk hernisi olan hastalara oksijen/ozon karışımını disk içine enjeksiyon yoluyla uygulaması sonrasında hasta memnuniyeti ve medikal değerlendirmeler bu tedavinin faydalı olduğunu göstermiştir (130).

### **2.15.3. Medikal Ozon Tedavisinin Yan Etki ve Kontrendikasyonları**

Ozon tedavi uygulamalarının yan etkileri çok azdır. Günümüze kadar gözlemlenmiş yan etkiler hatalı uygulamalar sonucunda gelişen lokal komplikasyonlardan ibarettir. Ozon tedavisinin kontrendike olduğu durumlar; glukoz 6 fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzim eksikliği (favizm) olması, özellikle erken dönemdeki gebelik, anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörü tedavisi almak, hipertiroidi, kanama bozukluğu, kontrol altına alınamayan kardiyovasküler hastalık ve ozona ile tetiklenen astım hastalığı olarak sıralanabilir (131).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

Deneysel testis iskemisi ve reperfüzyon hasarında ozonun koruyucu etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılan bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi hayvan deneyleri yerel etik kurulundan 09.06.2016 tarih ve 2016/05-01 karar numarası ile onay alındıktan sonra Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi bünyesinde bulunan Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi.

#### **3.1. Çalışmada Kullanılan Deney Hayvanları**

ÇOMÜ Deneysel Araştırma Merkezi'nden 40 adet Wistar albino cinsi erkek ratlar (ağırlık: 250-300 gr) temin edilerek ve çalışma süresince uygun beslenme şartlarında ve özel kafeslerde tutuldu. Deney süresince hayvanlar standart yemle beslendi, sürekli olarak suya ulaşma imkanları sağlandı, barınma ortamlarının sıcaklığı  $21\pm 2$  °C ve ışık ise 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlandı. Hayvanlara anesteziyeye alınacakları günün öncesinde saat 24:00'dan itibaren yem kısıtlaması yapıldı. Tüm ratların bakımları Gıda, Tarım Ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından hazırlanan "Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar İçin Kullanılan Hayvanların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmelik'e (13.12.2011-28141) uygun olarak yapıldı.

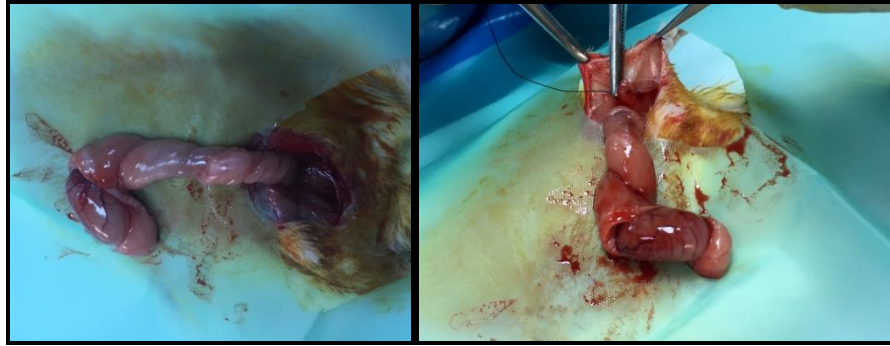
#### **3.2. Çalışma Grupları ve Deney Protokolü**

Bütün denekler 15 mg /kg (i.p.) Ksilazin (Alfazyne®, %2, Alfasan International, 3440 AB, Woerden, Holland) + 35 mg/kg (i.m.) ketamin (Ketalar®, Pfizer Pharma GMBH, Germany) anestezisi ile uyutuldu. Deneklerin sol inguinokrotal bölgeleri tıraş edilip %10 polivinilpirolidon iyot kompleksiyle sterilize edildi. Sol inguinokrotal insizyon yapıldı. Sol testisin saat yönünde 720° rotasyonu ile tek taraflı testis torsiyonu gerçekleştirildi ve skrotuma 4/0

atravmatik ipek sütür ile tespit edildi. Hemen ardından 4 mg/kg ozon intraperitoneal ve intratestiküler olarak IR-IP, IR-IT, IR-IP+IT gruplarinkaki 8 'er rata sırasıyla verildi.1 saat sonra testis detorsiyone edilip reperfüzyon süresi için 4 saat beklendi. Reperfüzyondan 4 saat sonra ratlar sakrifiye edildi ve sol orşiektomi yapılarak doku ve aynı zamanda kan rnekeri alındı.

### 3.3. Ozunun Elde Edilmesi

Çalışmada kullanılacak ozon, ozon jeneratöründen elde edildi(TURKOZONE, Blue S, TURKEY). Ozon, tıbbi bir oksijenli elektrik dearj ile elde edildi ve ozon / oksijen gaz karımının yaklaşık% 3'n oluşturdu. Jeneratör ozon konsantrasyon ayar 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  ye getirildikten sonra oksijenden, ozon / oksijen gaz karımının yaklaşık % 3'n oluşturacak Şekilde elde edildi. Her sanın vücut ağırlığına göre 4 mg/kg ozon dozu intraperitoneal, intratestiküler ve intraperitoneal+intratestiküler olarak uygulandı.



Şekil 4: Testis torsiyonu oluşturulması ve fiksasyonu

### 3.4. Gruplar

1. Sham Grup (n=8; S ): Cerrahi olarak sol inguinokrtotal kesi yapılıp spermatik kord ve testis diseke edildi ve torsiyon uygulanmadan insizyon kapatıldı.

2. Grup İskemi-Reperfüzyon (n=8; İR): Cerrahi olarak sol inguinokrtotal kesi yapılıp spermatik kord ve testis diseke edildi ve torsiyon uygulanıp skrotuma tespit edildi. 1 saat sonra testis detorsiyone edilip reperfüzyon süresi için 4 saat beklendi. Tedavi uygulanmadı. Reperfüzyondan 4 saat sonra ratlar sakrifiye edildi ve sol orşiektomi yapılarak doku ve aynı zamanda kan örnekleri alındı.

3. Grup İskemi Reperfüzyon + İP Ozon(n=8; İR+İP): Cerrahi olarak sol inguinokrtotal kesi yapılıp spermatik kord ve testis diseke edildi ve torsiyon uygulanıp skrotuma tespit edildikten sonra 4 mg/kg ozon intraperitoneal olarak verildi. 1 saat sonra testis detorsiyone edilip reperfüzyon süresi için 4 saat beklendi. Reperfüzyondan 4 saat sonra ratlar sakrifiye edildi ve sol orşiektomi yapılarak doku ve aynı zamanda kan örnekleri alındı.

4. Grup İskemi-reperfüzyon + İntratestiküler Ozon (n=8; İR+İT): Cerrahi olarak sol inguinokrtotal kesi yapılıp spermatik kord ve testis diseke edildi ve torsiyon uygulanıp skrotuma tespit edildikten sonra 4 mg/kg ozon intratestiküler olarak verildi. 1 saat sonra testis detorsiyone edilip reperfüzyon süresi için 4 saat beklendi. Reperfüzyondan 4 saat sonra ratlar sakrifiye edildi ve sol orşiektomi yapılarak doku ve aynı zamanda kan örnekleri alındı.

5. Grup İskemi-reperfüzyon + İntravenöz Ozon + İntratestiküler Ozon (n=8; İR+İV+İT): Cerrahi olarak sol inguinokrtotal kesi yapılıp spermatik kord ve testis diseke edildi ve torsiyon uygulanıp skrotuma tespit edildi. Hemen ardından 4 mg/kg ozon intraperitoneal ve intratestiküler olarak verildi. 1 saat sonra testis detorsiyone edilip reperfüzyon süresi için 4 saat

beklendi. Reperfüzyondan 4 saat sonra ratlar sakrifiye edildi ve sol orşiektomi yapılarak doku ve aynı zamanda kan örnekleri alındı.

### **3.5. Deneyin Tamamlanması ve Örneklerin Muhafaza Edilmesi**

Deney bitiminde alınan testis dokuları iki parçaya ayrıldı. Birinci parça steril şekilde kurulandıktan sonra TAS, TOS, NO, IMA, SOD ve MDA ölçümünü içeren biyokimyasal işlemler için ölçüm yapılacağı güne kadar -86°C'de derin dondurucuya kaldırıldı. İkinci parça histopatolojik ve immünohistokimyasal inceleme amacıyla formol solüsyonu içinde beklemeye alındı. Sonrasında ratlar sakrifiye edildi ve deneyin cerrahi kısmı sonlandırıldı. Ratlardan biyokimyasal işlemler için intrakardiyak kan alındı.

### **3.6. Biyokimyasal Yöntem**

Deney sonunda biyokimya analizleri için doku ve kan örnekleri alındı. Kan örnekleri antikoagülan içermeyen jelli biyokimya tüplerine alınarak +4°C 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serum örnekleri polipropilen tüpler içine ayrılarak -80°C'de saklandı. Doku örnekleri alındıktan sonra soğuk fosfat tampon(PBS) ile yıkandı. Doku MDA ölçümü için RIPA, doku TAS ve TOS ölçümü için PBS tamponu kullanılarak dokular homojenizatör ile(Mixer Mill MM 400, Retsch, Haan, Germany) homojenize edildi. Elde edilen doku homojenat ve serum örneklerinden MDA(Kat. No. 10009055, Cayman, USA), TAS(Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Turkey), TOS(Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Turkey), SOD(Kat. No. 19160, Sigma Aldrich, St. Louis), NO(Kat. No. 780001, Cayman, USA) düzeyleri ticari kitler kullanılarak çalışıldı. Serum örneklerinden ayrıca IMA ve albumin düzeyleride çalışıldı. TOS/TAS oranı hesaplanarak oksidatif stres

indeksi(OSI) değerleri belirlendi. İskemi-modifiye albumin (IMA) düzeyleri, Bar-Or ve ark.'ları tarafından geliştirilen kolorimetrik yöntem kullanılarak ölçüldü ve sonuçlar ABSU olarak rapor edildi<sup>132</sup>. Serum IMA / albümin oranı (IMAR) hesaplandı. Doku protein lmleri Lowry ve ark.'larının belirlediği yönteme göre değerlendirildi<sup>133</sup>. Tüm çalışılan testler için otomatik mikroplaka okuyucusu (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, USA) kullanıldı.

### 3.7. Histopatolojik Yöntem

Morfoloik değerlendirme için deneklerden alınan dokular %10'luk formaldehitte 24 saat saklandıktan sonra oda sıcaklığında parafine batırılarak bloklandı. Parafin bloklardan mikrotom cihazında (thermo scientific) yaklaşık 5µm lik kesitler alınarak genel değerlendirme amacıyla hemotoksilen-eozin (LEİCA APS 300S) boyama yöntemi ve İmmunhistokimyasal değerlendirme için eNOS (Nitric Oxide Synthase, endothelial (eNOS) (poliklonal) RB-9279-P0 Thermo Scientific/LabVision), iNOS (Nitric Oxide Synthase, inducible (iNOS) (poliklonal) RB-9242-P0 Thermo Scientific/LabVision) boyama yöntemleri uygulandı.

Kapatma işleminden sonra morfoloji ve immunhistokimyasal değerlendirilmesi için işık mikroskopunda incelendi. Her gruptaki Testis dokuları ödem, konjesyon, pnl infiltrasyonu ve kanama açısından ayrıca değerlendirildi. Histolojik açıdan aşağıdaki özelliklere göre gradelendi.

Grade I: Normal testiküler yapı

Grade II: Germinal hücrelerde kohezyon kaybı, düzensiz dökülmüş, büzülmüş germinal hücreler, piknotik nukleuslar, sınırları belirsiz seminifer tubuller

Grade III: Hasar seminifer tubuluslara sınırlıdır. Germinal hücrelerde nekroz mevcut.

E-NOS ve İ-NOS ekspresyonlarının değelendirilmesi her kesit için x40 büyütmede boyanmanın yoğun olduğu rastgele seçilen alanlarda pozitif tutulum sağlayan hücrelerin sayılması ile yapıldı. Hücrelerin yüzdesi semikantitatif olarak belirlendi.

Boyanma yoğunluğuna göre 1'dan 3' e kadar skorlandırıldı.

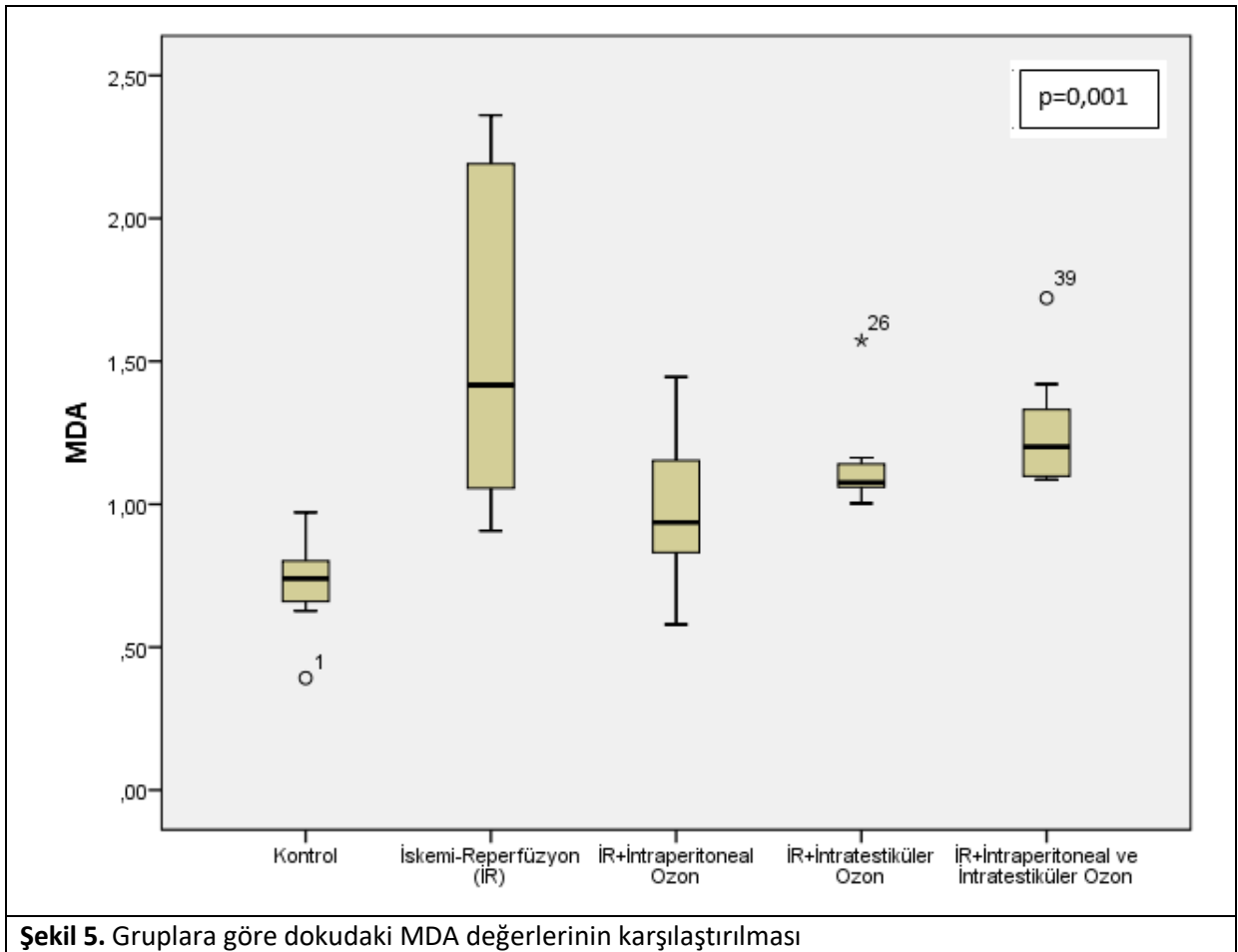
Skor 1: Hafif boyanma

Skor 2: Orta derecede boyanma

Skor 3: Şiddetli derecede boyanma

#### 4. BULGULAR

Her grupta 8 adet rat olmak üzere toplam 40 rat ile çalışıldı. Kontrol ve tedavi türüne göre 5 grup arasında MDA (D) parametresi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p=0,001$ ). Kontrol grubunun MDA (D) ortalaması deney, İR+İT ve İR+İP+İT gruplarının ortalamalarından daha düşüktü ve bu fark Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U Testine göre istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla  $p=0,002$ ,  $p=0,002$ ,  $p=0,002$ ) (Tablo 1).

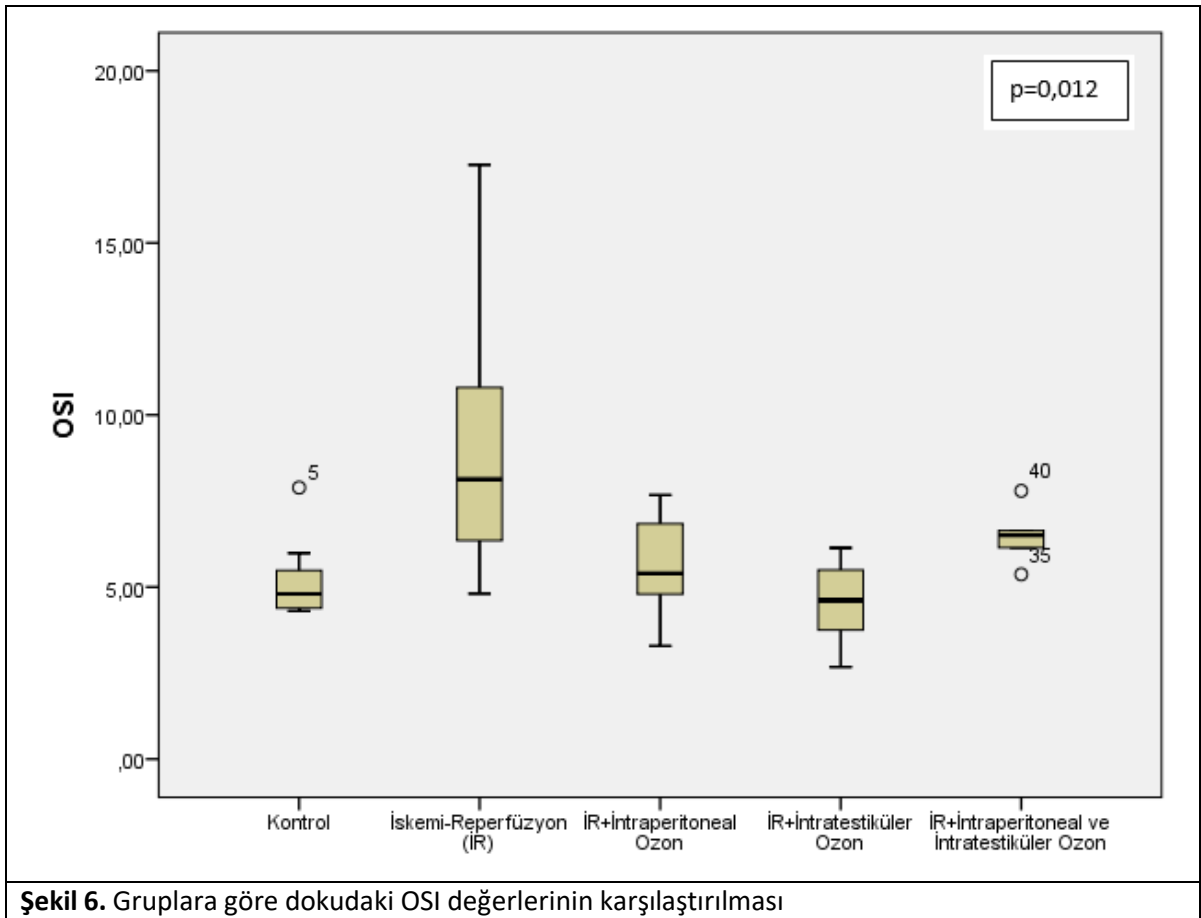


Kontrol ve tedavi türüne göre 5 grup arasında TAS(D) parametresi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p<0,001$ ). Kontrol grubunun TAS(D) ortalaması deney ve İR+İP+İT gruplarının ortalamalarından daha yüksekti ve Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U Testine göre bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla  $p=0,002$ ,  $p=0,003$ ). İR+İT grubunun



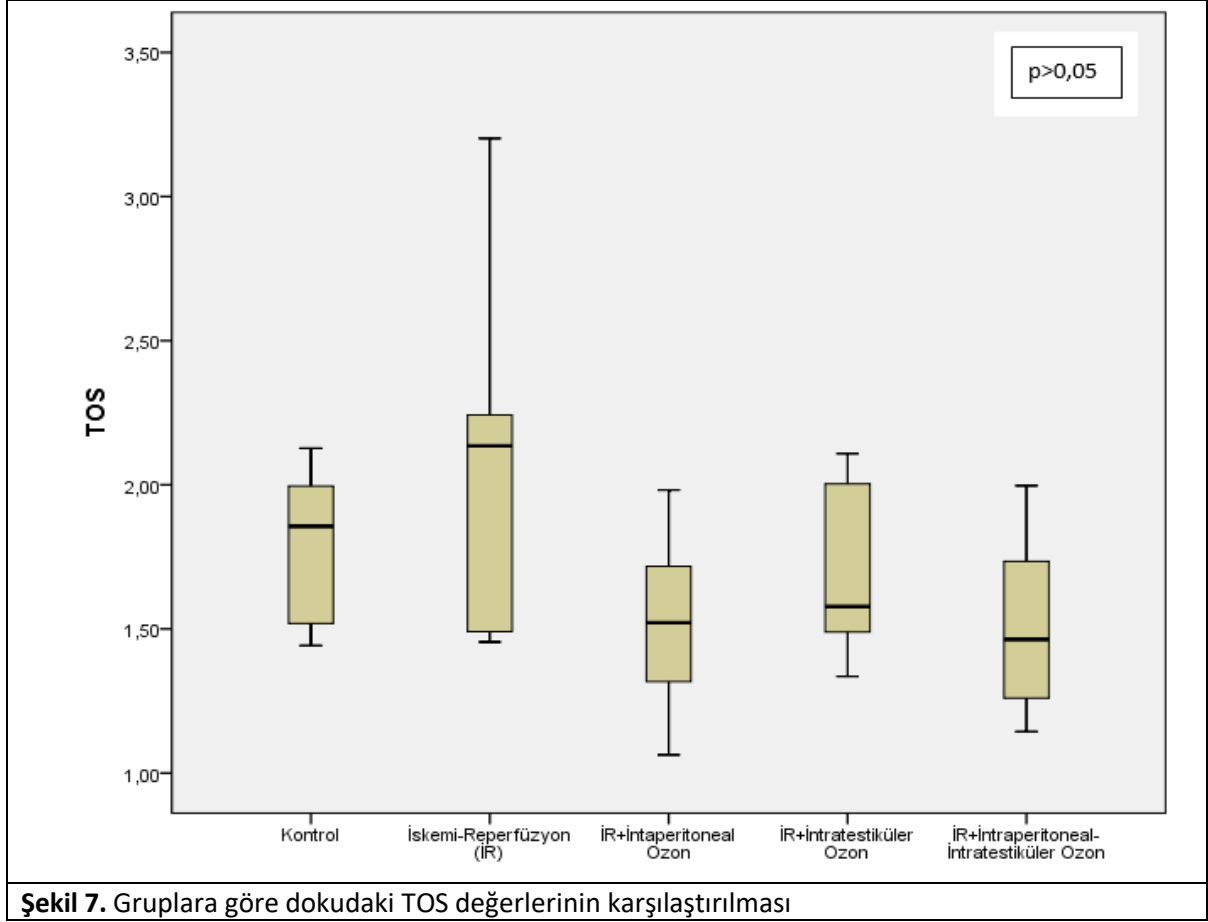
TAS(D) ortalaması deney ve İR+İP+İT gruplarının ortalamalarından daha yüksekti ve Bonferroni düzeltilmiş Mann Whitney U Testine göre bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla  $p=0,002$ ,  $p=0,002$ ) (Tablo 1).

Kontrol ve tedavi türüne göre 5 grup arasında OSİ(D) parametresi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p=0,012$ ). Deney grubunun OSİ(D) ortalaması diğer gruplara göre daha yüksekti, fakat Bonferroni düzeltilmiş Mann Whitney U Testine göre ikili karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Tablo 1).



Kontrol ve tedavi türüne göre 5 grup arasında SOD(D) parametresi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p=0,003$ ). Kontrol grubunun SOD(D) ortalaması İR ve İR+İP gruplarının ortalamalarından daha yüksekti ve Bonferroni düzeltilmiş Mann Whitney U Testine göre bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla  $p=0,003$ ,  $p=0,004$ ) (Tablo 1).

Kontrol ve tedavi türüne göre 5 grup arasında TOS(D) ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p>0,05$ ) (Tablo 1).



**Tablo 1.** Gruplar arası doku parametrelerinin karşılaştırılması

	SHAM (n=8)	İR (n=8)	İR+İP (n=8)	İR+İT (n=8)	İR+İP+İT (n=8)	p
	Ort.±ss	Ort.±ss	Ort.±ss	Ort.±ss	Ort.±ss	
<b>MDA(D)</b>	0,7±0,2	1,6±0,6	0,9±0,3	1,2±0,2	1,3±0,2	<b>0,001</b>
<b>TOS(D)</b>	1,8±0,3	2,0±0,6	1,5±0,3	1,7±0,3	1,5±0,3	0,157
<b>TAS(D)</b>	0,3±0,04	0,2±0,05	0,3±0,07	0,4±0,1	0,3±0,04	<b>&lt;0,001</b>
<b>OSİ(D)</b>	5,2±1,3	9,2±4,4	5,7±1,5	4,6±1,3	6,5±0,8	<b>0,012</b>
<b>SOD(D)</b>	24,2±4,4	17,0±1,8	17,6±2,6	23,4±6,1	17,3±3,2	<b>0,003</b>

Ss: Standart sapma, p: Kruskal Wallis Testi

**Tablo 2.** Gruplara göre doku parametrelerinin ortanca değerleri

	<b>SHAM (n=8)</b>	<b>İR (n=8)</b>	<b>İR+İP (n=8)</b>	<b>İR+İT (n=8)</b>	<b>İR+İP+İT (n=8)</b>
	<b>Ortanca (min-maks)</b>	<b>Ortanca (min-maks)</b>	<b>Ortanca (min-maks)</b>	<b>Ortanca (min-maks)</b>	<b>Ortanca (min-maks)</b>
<b>MDA(D)</b>	0,7 (0,4-0,9)	1,4 (0,9-2,4)	0,9 (0,6-1,5)	1,2 (1,0-1,6)	1,3 (1,1-1,7)
<b>TOS(D)</b>	1,8 (1,4-2,1)	2,1 (1,5-3,2)	1,5 (1,1-1,9)	1,6 (1,3-2,1)	1,5 (1,1-2,0)
<b>TAS(D)</b>	0,3 (0,3-0,4)	0,2 (0,2-0,3)	0,3 (0,2-0,4)	0,3 (0,3-0,7)	0,3 (0,2-0,3)
<b>OSİ(D)</b>	4,8 (4,3-7,9)	8,1 (4,8-17,3)	5,4 (3,3-7,7)	4,6 (2,7-6,1)	6,5 (5,4-7,8)
<b>SOD(D)</b>	24,3 (19,1-32,7)	16,7 (14,9-19,5)	17,6 (14,5-22,7)	21,5 (16,8-33,4)	16,9 (13,9-20,9)

Kontrol ve tedavi türüne göre 5 grup arasında MDA(S) parametresi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p<0,001$ ). Deney grubunun MDA(S) ortalaması İR+İP, İR+İT ve İR+İP+İT gruplarının ortalamalarından daha yüksekti ve Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U Testine göre bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla  $p=0,001$ ,  $p=0,001$ ) (Tablo 3).

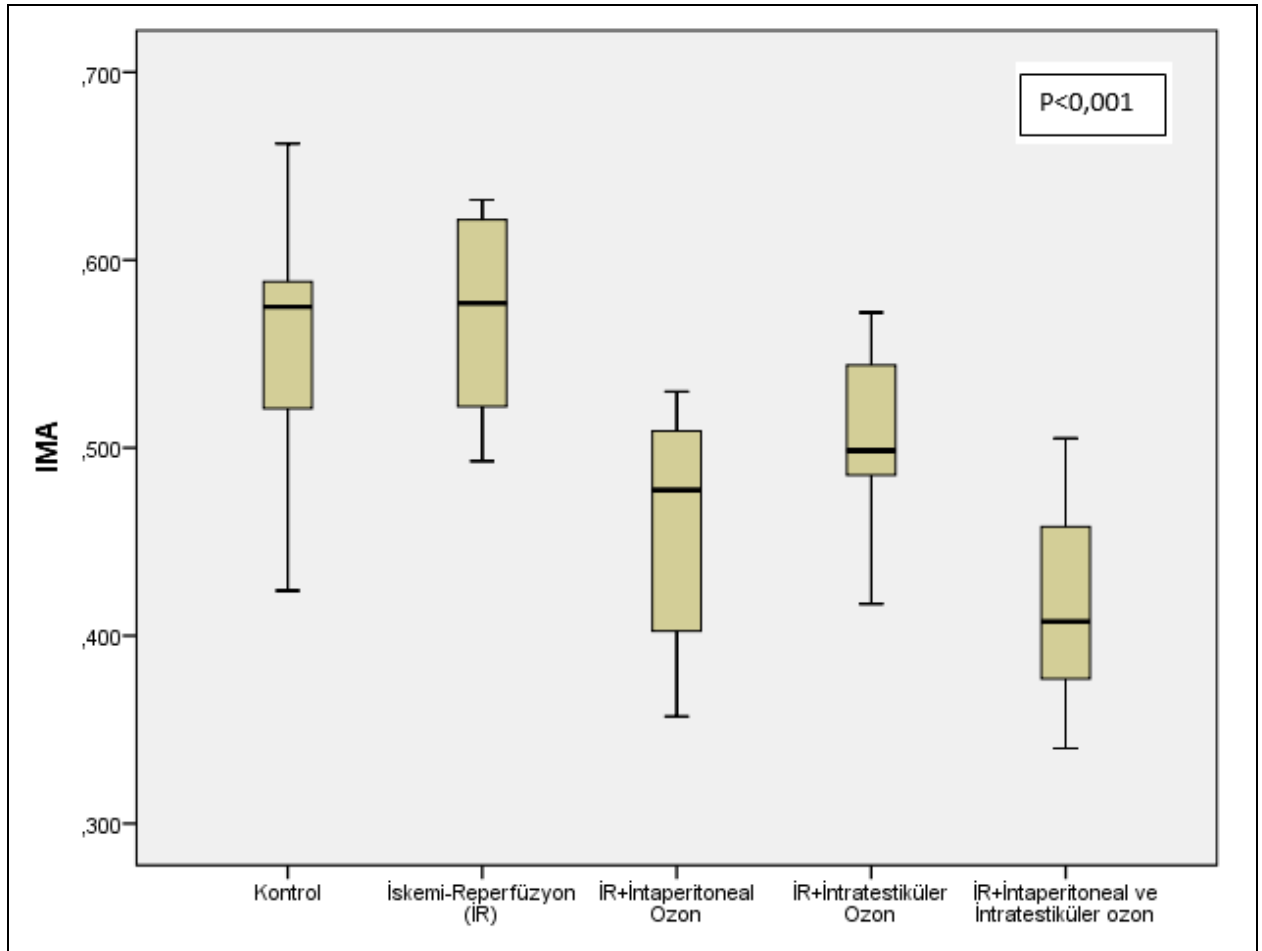
Kontrol ve tedavi türüne göre 5 grup arasında TAS(S) parametresi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p=0,017$ ). Deney grubunun TAS(S) ortalaması İR+İP grubunun ortalamasından daha düşüktü ve Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U Testine göre bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p=0,001$ ) (Tablo 3).

Kontrol ve tedavi türüne göre 5 grup arasında OSİ(S) parametresi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p=0,026$ ). Deney grubunun OSİ(S) ortalaması diğer gruplara göre daha yüksekti, fakat

Bonferroni düzeltilmiş Mann Whitney U Testine göre ikili karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Tablo 3).

Kontrol ve tedavi türüne göre 5 grup arasında SOD(S) parametresi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p=0,017$ ). İR+İP grubunun SOD(S) ortalaması İR+İT grubunun ortalamasından daha yüksekti ve Bonferroni düzeltilmiş Mann Whitney U Testine göre bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p=0,002$ ) (Tablo 3).

Kontrol ve tedavi türüne göre 5 grup arasında İMA(S) parametresi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p<0,001$ ). İR+İP+İT grubunun İMA(S) ortalaması kontrol ve deney gruplarının ortalamalarından daha düşüktü ve Bonferroni düzeltilmiş Mann Whitney U Testine göre bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla  $p=0,004$ ,  $p=0,001$ ) (Tablo 3).



Şekil 8. Gruplara göre serum İMA değerlerinin karşılaştırılması

Kontrol ve tedavi türüne göre 5 grup arasında İMAR(S) parametresi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p=0,001$ ). Deney grubunun İMAR(S) ortalaması İR+İP ve İR+İP+İT gruplarının ortalamalarından daha yüksekti ve Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U Testine göre bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla  $p=0,001$ ,  $p=0,001$ ) (Tablo 3).

Kontrol ve tedavi türüne göre 5 grup arasında TOS(S) ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p>0,05$ ) (Tablo 3).

**Tablo 3.** Gruplar arası serum parametrelerin karşılaştırılması

	<b>SHAM (n=8)</b>	<b>İR (n=8)</b>	<b>İR+İP (n=8)</b>	<b>İR+İT (n=8)</b>	<b>İR+İP+İT (n=8)</b>	<b>p</b>
	<b>Ort.±ss</b>	<b>Ort.±ss</b>	<b>Ort.±ss</b>	<b>Ort.±ss</b>	<b>Ort.±ss</b>	
<b>MDA(S)</b>	20,0±5,6	41,7±16,3	21,2±5,0	16,6±3,9	16,4±3,1	<b>&lt;0,001</b>
<b>TOS(S)</b>	9,3±3,3	15,4±12,6	13,3±3,7	9,3±1,4	12,1±4,4	0,124
<b>TAS(S)</b>	1,1±0,2	0,8±0,3	1,3±0,1	1,1±0,3	1,1±0,4	<b>0,017</b>
<b>OSİ(S)</b>	8,8±3,8	18,4±9,7	9,9±2,6	8,9±2,1	12,8±5,9	<b>0,026</b>
<b>SOD(S)</b>	93,6±2,1	93,1±2,2	96,8±2,8	92,2±2,7	94,0±3,9	<b>0,017</b>
<b>İMA(S)</b>	0,6±0,1	0,6±0,1	0,5±0,1	0,5±0,04	0,4±0,1	<b>&lt;0,001</b>
<b>İMAR(S)</b>	0,2±0,02	0,2±0,1	0,1±0,01	0,2±0,02	0,1±0,02	<b>0,001</b>

Ss: standart sapma, p: Kruskal Wallis Testi

**Tablo 4.** Gruplara göre serum parametrelerinin ortanca değerleri

	<b>SHAM (n=8)</b>	<b>İR(n=8)</b>	<b>İR+İP (n=8)</b>	<b>İR+İT (n=8)</b>	<b>İR+İP+İT (n=8)</b>
	<b>Ortanca (min-maks)</b>	<b>Ortanca (min-maks)</b>	<b>Ortanca (min-maks)</b>	<b>Ortanca (min-maks)</b>	<b>Ortanca (min-maks)</b>
<b>MDA(S)</b>	18,6 (13,4-29,4)	40,2 (25,5-69,9)	19,9 (15,4-30,3)	15,4 (12,4-23,4)	15,9 (12,9-22,9)
<b>TOS(S)</b>	7,7 (6,3-15,1)	11,1 (8,3-45,9)	12,8 (7,2-17,9)	9,6 (7,3-11,8)	10 (8,4-19,2)
<b>TAS(S)</b>	1,1 (0,9-1,6)	0,8 (0,5-1,2)	1,4 (1,2-1,6)	0,9 (0,9-1,9)	0,9 (0,6-1,8)
<b>OSİ(S)</b>	6,9 (5,3-15,1)	15,7 (9,8-39,3)	9,7 (6,2-13,2)	9,8 (5,1-11,1)	11,9 (4,8-20,8)
<b>SOD(S)</b>	93,5 (90,9-98,1)	93,9 (88,2-94,9)	95,9 (94,0-102,1)	93,4 (86,6-94,2)	93,1 (88,9-101,6)
<b>İMA(S)</b>	0,6 (0,4-0,7)	0,6 (0,5-0,6)	0,5 (0,4-0,5)	0,5 (0,4-0,6)	0,4 (0,3-0,5)
<b>İMAR(S)</b>	0,2 (0,1-0,2)	0,2 (0,2-0,3)	0,2 (0,1-0,2)	0,2 (0,1-0,2)	0,1 (0,1-0,2)

Kontrol grubunun %62,5' inin histolojik grade 1, %37,5' inin 2'ydi. Deney grubunun %100' ünün histolojik grade 3' tü. Tedavi grubunun %20,0' sinin histolojik grade 1, %30,0' unun 2 ve %50,0' sinin 3' tü. Üç grup arasında histolojik grade açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p<0,001$ ). İkili karşılaştırmalarda farkın birden fazla gruptan kaynaklandığı görülmüştür (Tablo 5).

**Tablo 5.** Kontrol ve tedavi gruplarına göre histolojik grade karşılaştırılması

	1	2	3	
	n (%)	n (%)	n (%)	p
<b>Kontrol</b>	5 (62,5)	3 (37,5)	0 (0,0)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Deney</b>	0 (0,0)	0 (0,0)	8 (100,0)	
<b>Tedavi</b>	8 (20,0)	12 (30,0)	20 (50,0)	

?: satır yüzdesi, p: Ki-Kare Testi

IR+IP grubunun %25,0' inin histolojik grade 2, %75,0' inin 3' tü. IR+IT grubunun %12,5' inin histolojik grade 1, %50,0' inin 2, %37,5' inin 3' tü. IR+IP+IT grubunun %25,0' inin histolojik grade 1, %37,5' inin 2 ve %37,5' inin 3' tü. Üç grup arasında histolojik grade açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p>0,05$ ) (Tablo 6).

**Tablo 6.** Tedavi gruplarına göre histolojik grade karşılaştırılması

	1	2	3	
	n (%)	n (%)	n (%)	p
<b>IR+IP</b>	0 (0,0)	2 (25,0)	6 (75,0)	0,301
<b>IR+IT</b>	1 (12,5)	4 (50,0)	3 (37,5)	
<b>IR+IT+IP</b>	2 (25,0)	3 (37,5)	3 (37,5)	

?: satır yüzdesi, p: Ki-Kare Testi

Kontrol grubunun %75,0' inin iNOS tutulumu grade 1, %25,0' inin 2 idi. Deney grubunun %12,5' inin iNOS tutulumu grade 2, %87,5' inin 3'tü. Tedavi grubunun %33,4' ünün histoloji grade 1, %45,8' inin 2 ve %20,8' inin 4' tü. Üç grup arasında iNOS tutulum grade açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p<0,001$ ). Bu farkın deney grubunun büyük çoğunluğunun (%87,5) Grade 3' te yer almasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Tablo 7).

**Tablo 7.** Kontrol, deney ve tedavi gruplarına göre iNOS tutulum durumunun karşılaştırılması

	1	2	3	
	n (%)	n (%)	n (%)	p
<b>Kontrol</b>	6 (75,0)	2 (25,0)	0 (0,0)	<0,001
<b>Deney</b>	0 (0,0)	1 (12,5)	7 (87,5)	
<b>Tedavi</b>	8 (33,4)	11 (45,8)	5 (20,8)	

‰: satır yüzdesi, p: Ki-Kare Testi

IR+IP grubunun %25,0' inin iNOS tutulumu grade 1, %37,5' inin 2, %37,5' inin 3' tü. IR+IT grubunun %50,0' sinin iNOS tutulumu grade 1, %37,5' inin 2, %12,5' inin 3' tü. IR+IT+IP grubunun %25,0' inin iNOS tutulumu grade 1, %62,5' inin 2 ve %12,5' inin 3' tü. Üç grup arasında iNOS tutulum grade açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p>0,05$ ) (Tablo 8).

**Tablo 8.** Tedavi gruplarına göre iNOS tutulum durumunun karşılaştırılması

	1	2	3	
	n (%)	n (%)	n (%)	P
<b>IR+IP</b>	2 (25,0)	3 (37,5)	3 (37,5)	0,538
<b>IR+IT</b>	4 (50,0)	3 (37,5)	1 (12,5)	
<b>IR+IT+IP</b>	2 (25,0)	5 (62,5)	1 (12,5)	

‰: satır yüzdesi, p: Ki-Kare Testi

Kontrol grubunun %87,5'inin eNOS tutulum grade 1, %12,5'inin 2'ydi. Deney grubunun %100,'ünün eNOS tutulum grade 3'tü. Tedavi grubunun %83,3'ünün eNOS tutulum grade 1, %16,7'sinin 2'ydi. Üç grup arasında eNOS tutulum grade açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $p<0,001$ ). Bu farkın deney grubunun tamamının (%100,0) Grade 3'te yer almasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Tablo 9).



**Tablo 9.** Kontrol, deney ve tedavi gruplarına göre eNOS tutulum durumunun karşılaştırılması

	1	2	3	
	n (%)	n (%)	n (%)	P
<b>Kontrol</b>	7 (87,5)	1 (12,5)	0 (0,0)	<0,001
<b>Deney</b>	0 (0,0)	0 (0,0)	8 (100,0)	
<b>Tedavi</b>	20 (83,3)	4 (16,7)	0 (0,0)	

?: satır yüzdesi, p: Ki-Kare Testi

IR+IP grubunun %87,5'inin eNOS tutulum grade 0+1, %12,5'inin 2'ydi. IR+IT grubunun %87,5'inin eNOS tutulum grade 0+1, %12,5'inin 2'di. IR+IT+IP grubunun %75,0'inin eNOS tutulum grade 0+1, %25,0'inin 2'ydi. Üç grup arasında eNOS tutulum grade açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p>0,05$ ) (Tablo 10).

**Tablo 10.** Tedavi gruplarına göre eNOS tutulum durumunun karşılaştırılması

	1	2	
	n (%)	n (%)	p
<b>IR+IP</b>	7 (87,5)	1 (12,5)	0,751
<b>IR+IT</b>	7 (87,5)	1 (12,5)	
<b>IR+IT+IP</b>	6 (75,0)	2 (25,0)	

?: satır yüzdesi, p: Ki-Kare Testi

## 5. TARTIŞMA

Testis torsiyonu özellikle çocukluk çağında sık görülmekle birlikte tedavisinde erken müdahale önemlidir (1,2). Torsiyon sonrası dönemin ilk saatlerinde gerçekleştirilen müdahale ile %100' e yakın başarı şansı varken, süreç ilerledikçe yapılan müdahaleye rağmen başarı şansı azalmaktadır.

Testis torsiyonu meydana geldiğinde önce venöz dönüşün bozulmasına bağlı olarak ödem ve hemoraji gelişir. İlerleyen dönemde arteriyel obstrüksiyonunda eklenmesi ile kan akımı giderek azalır, dokuda hipoksi ve iskemi meydana gelir. İskemiye uğramış dokuların canlılığını koruyabilmesi için en kısa sürede doku reperfüzyonunun sağlanması gerekir. Reperfüzyon gerçekleştiğinde oluşan nötrofil infiltrasyonu ve ROT, doku hasarına sebep olur. Oluşan serbest radikallerin proteinlerin yapısında bulunan -SH gruplarında, oksidasyon oluşturması protein oksidasyonunun ilk ortaya çıkan belirtisidir (92).

Deneysel çalışmalar 720° torsiyonda, kan akımının tam olarak kesildiği ve geri dönüşümsüz şekilde iskemi meydana geldiğini ortaya koymuştur. (34). Ayrıca embriyolojik gelişime bağlı olarak uzun spermatik korda sahip olan sol testisin torsiyonunun sağ testis ile kıyaslandığında iki kat fazla karşılaşıldığı gösterilmiştir (134). Yapılan çalışmalarda tam iskemi süresi olarak 1 saatlik sürenin yeterli olduğu ve 4 saatlik reperfüzyon süresinde membran lipid peroksidasyon ürünlerinin arttığı tespit edilmiştir (60,135). Turner ve ark. çalışmalarında bir saat süreyle, 720° torsiyonun, ratlar üzerinde iskemi oluşturmak için yeterli olduğunu göstermiştir (31). Torsiyon ve detorsiyon sürelerinin, torsiyon derecesinin, iskemi reperfüzyon hasarına etkilerinin araştırıldığı literatür çalışmalarından elde ettiğimiz bilgiler doğrultusunda, yaptığımız çalışmada sol testise uygulanan 1 saat süren 720° torsiyon ve dört saatlik reperfüzyon uygulanmasını tercih ettik.

Biz çalışmamızda ratlarda tek taraflı testis torsiyonu-detorsiyonu deneysel modelinde oluşan iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesinde ozonun koruyucu etkilerini araştırdık. Medikal ozonun farklı veriliş

yöntemlerinin oluşan hasarı önlemede etkilerini tespit edebilmek için biyokimyasal, immünohistokimyasal ve histopatolojik parametreleri birlikte değerlendirdik. Ozon verilmiş yöntemleri olarak intraperitoneal, intratestiküler ve intraperitoneal + intratestiküler uygulamaların etkilerini karşılaştırdık. Çalışmamızın özelliği histopatolojik ve biyokimyasal (hem doku hem de serumda) parametreleri hem birlikte değerlendirebilmesi hem de tedavi verilmiş şekillerinin çeşitliliğinin karşılaştırılmasıdır.

Erken müdahale edilerek detorsiyone edilen ve kan akımı sağlanabilen olguların bu aşamadan sonra reperfüzyonun gelişimiyle oluşan ROT'ların testiste çeşitli hasarlara sebep olabileceği bilinmektedir (5,7). İskemi reperfüzyon hasarından başlıca prooksidan ve oksidan moleküller sorumlu tutulmuştur. Dokuda artan oksidan moleküller çevreye hızla zarar vermekte, geri dönüşü olmayan hasarlar meydana getirmektedir. Yapılan çalışmalarda iskemi reperfüzyon hasarını önlemede kullanılmak üzere antioksidan etkileri olan bir çok ajan (ozon, melatonin, hesperidin, quercetin, propofol, taurin, ellagic asid, hiperbarik oksijen, vb.) denenmiştir (136-144). Yapılan çalışmaların uygulama yöntemleri ve tedavi sonrası takip süreleri değişkendir. Chi ve ark. yaptıkları çalışmada intraperitoneal ve intraepididimal olarak querceptin molekülünü tedavide kullanmışlar ve reperfüzyon sonrası denekleri 24 saat takip etmişlerdir (138). Yine Taşkara ve ark. reperfüzyon öncesi intraperitoneal olarak propofol uygulayıp denekleri reperfüzyon sonrası 30 gün takip etmişlerdir (139). Ekici ve ark. (136) testis iskemi reperfüzyon hasarında ozonun etkinliği ile melatoninin kuyucu etkilerini kıyaslamıştır. Aydos ve ark. (141) yine testis iskemi reperfüzyon hasarında ozon ile taurinin koruyucu etkilerini değerlendirmiştir.

Yapılan çalışmalarda iskemi reperfüzyon hasarı durumunda ozonun koruyucu etkilerini böbrek, karaciğer, over, akciğer, kalp, retina, kas, kemik gibi doku ve organlarda gösterilmiştir (143,145-151). Tanyeli ve ark. (145) kadiyak MI sonrasında oluşan iskemi reperfüzyon hasarında intraperitoneal ozon tedavisinin koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Bianzhi ve ark. (146)

reperfüzyon sonrası gözlem yaptıkları çalışmada böbrek iskemi reperfüzyon hasarında ozonun koruyucu etkilerini değerlendirmişlerdir.

Biyoaktif aldehitlerden olan Malondialdehit (MDA) hücre membran lipidlerinin peroksidasyonunun önemli bir belirteci olup iskemi reperfüzyon hasarında meydana gelir (103). Bu nedenle doku peroksidasyonunu göstermede MDA ölçümünün yeri önemlidir. Ekici ve ark. (136) reperfüzyon sonrasında testiste ozonun koruyucu etkilerini değerlendirdikleri çalışmada, MDA'nın torsiyon grubunda kontrol grubuna göre anlamlı yüksekliğini saptamış; intraperitoneal olarak ozon uygulanan tedavi grubunda ise torsiyon grubuna göre anlamlı şekilde düşük tespit etmiştir. Tanyeli ve ark. (145) kardiyak iskemi reperfüzyon hasarında ozonun koruyucu etkilerini değerlendirdikleri çalışmada MDA'nın intraperitoneal olarak ozon verilen tedavi grubunda deney grubuna göre anlamlı şekilde düşük olduğunu saptamıştır. Kal ve ark. (147) retinal iskemi reperfüzyon hasarında ozonun koruyucu etkilerini değerlendirdikleri çalışmada MDA'nın tedavi grubunda deney grubuna göre anlamlı şekilde düşük olduğunu tespit etmiştir. Bizim çalışmamızda hem reperfüzyon hasarının varlığını göstererek tedavi grubundaki değişiklikleri değerlendirebilmek, hem de diğer literatür çalışmalarıyla kıyaslayabilmek için MDA değerlerini belirlemeyi amaçladık. Farklı veriliş yöntemleriyle ozon tedavisi uyguladığımız tedavi gruplarında ölçülen doku/serum MDA değerleri deney grubunda ölçülen seviyeden istatistiksel olarak anlamlı düşük saptandı ( $p<0,001$ ). Ayrıca intraperitoneal olarak ozon uyguladığımız grupta kontrol grubunun MDA düzeylerine çok yakın değerlerde olduğunu tespit edildi.

Total antioksidan kapasite ölçümü oksidatif stresin bir başka göstergesi olarak kabul edilmektedir. Antioksidan moleküllerin ayrı ayrı değerlendirilerek ölçülmesi hücre içi toplam oksidan stresi göstermekte yeterli olmayabilir çünkü oksidatif stres, oksidan ve antioksidan moleküllerin oluşum hızları ile ortamdan temizlenmeleri arasında oluşan denge farkına dayanmaktadır (152). TAS serumda bulunan tüm antioksidan molekülleri temsil etmektedir. Total oksidan kapasite, serumda bulunan oksidan

maddelerinin tümünü ifade etmektedir. Oksidatif stres indeksi (OSİ) ise bu iki değer birbirine oranı ile belirlenmektedir (152). Tusat ve ark. (153) ratlarda testis torsiyonu modelinde intraperitoneal ozonun koruyucu etkilerini değerlendirdikleri çalışmada 1mg/kg ozon kullanmış; yapılan değerlendirmede TOS ve OSİ değerlerinin deney grubunda anlamlı olarak yüksek, ozon tedavisi uygulanan grupta ise anlamlı şekilde düşük saptamıştır. Bunun yanında TAS değerleri arasında gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Kal ve ark. (147) retinal iskemi reperfüzyon hasarı üzerine yaptıkları çalışmada TOS seviyelerinde deney grubunda tedavi grubuna göre anlamlı şekilde yüksek olarak değerlendirmiştir. Chi ve ark. (138) testiste meydana gelen iskemi reperfüzyon hasarının değerlendirilmesinde, intraperitoneal ve intraepididimal olarak farklı bir molekül olan quercetin tedavisi uygulamış; serum TOS ve OSİ değerlerini tedavi grubunda deney grubuna göre düşük tespit ederken, TAS seviyelerinde tedavi grubunda deney grubuna göre anlamlı farklılık saptamamıştır. Bizim çalışmamızda tüm tedavi gruplarında İR grubuna göre doku/serum TOS ve OSİ değerleri düşüktü. Doku/serum TAS değerleri tüm tedavi gruplarında İR grubuna göre yüksek saptandı fakat tüm gruplar değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı. Bu bulgular literatür sonuçlarını destekler nitelikteydi.

Hücre içindeki  $O_2^-$  düzeylerini azaltmak amacıyla meydana gelen süperoksit radikalini moleküler oksijen ve hidrojen peroksite dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD) enzimi, iskemi reperfüzyon hasarı sonucunda oluşan oksidan stres ile mücadele amacıyla aktivitesini artırır (95-98). Sayar ve ark. (142) over torsiyonu uygulayarak oluşturdukları iskemi reperfüzyon modeli intraperitoneal ozon tedavisini değerlendirdikleri çalışmalarında SOD değerlerini deney grubunda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek, tedavi grubunda ise deney grubuna göre anlamlı şekilde düşük bulmuşlardır. Peralta ve ark. (150) karaciğerde oluşan iskemi reperfüzyon hasarı modelinde rektal yolla uygulanan ozonun etkinliğini değerlendirdikleri çalışmada SOD değerlerini tedavi grubunda İR grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulmuşlardır. Koca ve ark (143,144) iskelet kası ve kemikte oluşan

iskemi reperfüzyon hasarında ozonun koruyucu etkilerini hiperbarik oksijen tedavisi ile karşılaştırdıkları her iki çalışmalarında da deney grubunda SOD değerlerinin düşük, intraperitoneal ozon uygulaması yapılan tedavi grubunda ise yüksek olarak saptamışlardır. Literatür değerlendirildiğinde yapılan bazı çalışmalarda SOD aktivitesinin tedavi gruplarında da düşük saptanabildiği görülmüştür (154-157). Deneysel çalışmamızda SOD değerleri kontrol grubunda deney ve tedavi gruplarına göre anlamlı şekilde yüksek saptandı. Tedavi grupları arasında sadece intraperitoneal ve sadece intratestiküler ozon tedavisi uygulanan gruplarda yüksek saptandı fakat bu istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Son dönemlerde yapılan çalışmalar iskemi oluştuğunda serumda bulunan albuminin yapısında farklı değişikliklerin meydana geldiğinin gösterilmesi, bunun sonucunda da farklı bir serum iskemi belirtecinin ortaya çıkmasını gündeme getirmiştir. Albuminin yapısında; nikel, kobalt ve bakır gibi metallerin bağlanmasını sağlayan bir bölge vardır (132). İskemi nedeniyle meydana gelen oksijenizasyonun azalması, serbest radikallerin ortaya çıkardığı hasar, asidoz gelişmesi gibi nedenler, bu metallerin albumine bağlanmasını zorlaştırır (158,159). Bu olaylar sonucunda albüminde meydana gelen değişiklikler sonucunda artık iskemi modifiye albumin (İMA) olarak adlandırılır. İMA değerleri albümin değerlerinin düşük ya da yüksek oluşuna göre farklılık gösterebilir. İMA'nın serum albumin değerlerine göre ayarlanmış ölçümü İMAR olarak adlandırılmaktadır. Tusat ve ark. (153) testiste meydana gelen iskemi reperfüzyon hasarını önlemede intraperitoneal olarak verilen ozonun koruyucu etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında serum İMA değerlerini deney grubunda tedavi gruplarına göre yüksek olarak tespit etmişler. Yuluğ ve ark. (160) antioksidan bir molekül olarak belirttikleri intraperitoneal resveratrol uygulaması sonucunda ölçülen serum İMA değerlerinin deney grubunda tedavi grubuna göre yüksek olduğunu bildirmiştir. Türkmen ve ark. (161) testiküler iskemi reperfüzyon modelinde N-asetilsistein ve etil pirüvat tedavilerini değerlendirmiş; deney grubunda ölçülen İMA değerleri tedavi gruplarına göre yüksek olduğu tespit edilmiş. Biz çalışmamızda İMA'nın serum albümin değerlerinin değişebileceği

düşüncesiyle İMA ve İMAR değerlerini hesapladık. Hem İMA hem de İMAR için benzer sonuçlar elde ettik. Her ikisinin de serum düzeyleri deney grubunda tedavi grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek saptandı.

Testiküler torsiyon sonucunda oluşan iskemi reperfüzyon hasarında testis dokusunda meydana gelen histopatolojik değişiklikler geniş bir yelpazede değerlendirilmektedir. Başlıca bulguları konjesyon, interstisyel ödem, artmış PNL infiltrasyonu, hemoraji varlığı, gelişimini tamamlamamış spermatogenik hücrelerin lümen içerisinde birikimi, nekroz ve apoptozis olarak sıralanabilir. Ekici ve ark. (136) testiste iskemi reperfüzyon hasarında ozonun koruyucu etkisini histopatolojik olarak da değerlendirdikleri çalışmada deney grubunda konjesyon, interstisyel ödem, PNL infiltrasyonu ve fokal hemoraji alanlarının tedavi grubuna göre anlamlı şekilde arttığını tespit etmişler. Aydos ve ark. (141) iskemi reperfüzyon hasarında ozon ve taurinin koruyucu etkilerini karşılaştırdıkları çalışmada histopatolojik değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olmasa da her iki tedavi grubunda da deney grubuna göre azaldığını göstermiştir. Mete ve ark. (162) intraperitoneal ve intratestiküler ozon uygulamalarının iskemi reperfüzyon hasarına olan etkilerini değerlendirdikleri çalışmada deney grubundaki histopatolojik değişikliklerin yoğun olduğunu, tedavi gruplarında bu değişikliklerin hafif ve orta derecede olduğunu göstermiştir. Tusat ve ark. (153) sadece intraperitoneal yolla verilen ozon tedavisinin iskemi reperfüzyon hasarında etkilerini araştırdıkları çalışmada deney grubunda görülen histopatolojik değişikliklerin tedavi grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde yüksek olduğunu tespit etmiştir. Sayar ve ark. (142) overde iskemi reperfüzyon hasarı oluşturarak ozon tedavisinin etkilerini araştırdıkları çalışmada histopatolojik olarak doku hasarının tedavi gruplarında deney grubuna göre anlamlı şekilde düşük olduğunu belirlemiş; tedavi grupları arasında histopatolojik açıdan anlamlı fark olmadığını bildirmiştir. Bizim çalışmamızda yaptığımız histopatolojik değerlendirme sonuçlarına göre deney grubundaki değişikliklerin tedavi ve kontrol grubunda göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu. Tedavi gruplarına göre değerlendirme yapıldığında

her üç tedavi grubunda da histopatolojik açıdan bulgular benzerdi ve istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

NOS (Nitrik oksit sentaz) damar endotelinde, nöronal dokuda, trombositlerde ve vücutta farklı dokularda bulunur. Endotelial NOS (eNOS) en fazla böbreklerde bulunur. eNOS aracılığıyla oluşan NO (nitrik oksit), damar relaksasyonunu gerçekleştiren önemli bir habercidir. İndüklenebilir NOS (iNOS) normalde doku ve serumda tespit edilemez. İnflamasyon ile oluşan enfeksiyon sürecinde, iskemi oluşan ortamlarda, vücutta üretilen ikincil haberciler aracılığıyla indüklenerek uzunca bir süre üretilir ve tespit edilebilir (100,101). Literatür değerlendirildiğinde yapılan çalışmalarda genellikle elisa ve molekül ekspresyonunun değerlendirilmesi yöntemleriyle çalışıldığını, sadece bir çalışmada immünohistokimyasal yöntemle çalışıldığını gördük. Çalışmamızda immünohistokimyasal olarak eNOS ve iNOS değerlendirmesini kullandık. Aydos ve ark. (141) iskemi reperfüzyon hasarında ozon ve taurinin koruyucu etkilerini değerlendirdikleri çalışmada eNOS ekspresyonunu değerlendirmiş ve tedavi gruplarında deney grubuna göre eNOS ekspresyonunda anlamlı şekilde azalma tespit etmiştir. Mete ve ark. (162) intraperitoneal ve intratestiküler ozon kullanımının etkilerini araştırdıkları çalışmada eNOS seviyelerini tedavi gruplarında deney grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük tespit etmiştir. İntraperitoneal ozon uygulanan grupta iNOS açısından deney grubu ile anlamlı fark saptanmamış, intratestiküler ozon uygulanan grupta deney grubuna göre düşük tespit edilmiştir. Tedavi verilmiş yöntemlerine göre iNOS ve eNOS değerlerinde anlamlı fark saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda immünohistokimyasal olarak yapılan değerlendirmede iNOS değerleri tedavi gruplarında deney grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük tespit edildi. Tespit edilen eNOS değerleri tedavi gruplarında deney grubuna göre düşük tespit edildi ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı. Tedavi verilmiş yöntemlerine göre değerlendirme yaptığımızda üç grupta da iNOS ve eNOS değerleri benzer seviyelerdeydi; bu üç grup arasında tedavi verilmiş yöntemlerine göre iNOS ve eNOS değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.



## 6. SONUÇ

Deneysel çalışmamızda biyokimyasal verileri elde ederken serum ve dokuda eş zamanlı değerlendirmeye gayret ettik. Serum ve dokuda değerlendirdiğimiz MDA, TOS, TAS, OSİ ve SOD; ayrıca serumda değerlendirdiğimiz İMA ve İMAR literatür verileriyle korele şekilde düşük ya da yüksek tespit edildi. Ayrıca çalışmamızdan çıkan sonuç ile literatür verileri birlikte değerlendirildiğinde tek başına TAS ya da TOS bakılmasının anlamlı farklılık göstermeyeceği, her ikisinin birlikte değerlendirilerek OSİ değerinin hesaplanması gerektiği sonucuna ulaştık. Verilerimizde OSİ değerleri daha sağlıklı sonuçlar elde etmemizi sağladı. Histopatolojik olarak elde ettiğimiz verilerde ozon tedavisinin veriliş yöntemleri arasında fark görülmezsizin tedavi gruplarında IR gubuna göre anlamlı şekilde düşük histopatolojik skorlar elde ettik. Çalışmamızda iNOS ve eNOS değerlerini nadir olarak kullanılan immünohistokimyasal yöntemlerle belirledik ve bunun literatür bulgularıyla korele olarak tedavi gruplarında anlamlı şekilde düşük tespit ettik. Çalışmamızın sonuçlarına göre ozon tedavisinin biyokimyasal ve histopatolojik olarak yararlı etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Tedavi veriliş şekilleri iskemi reperfüzyon hasar sürecini azaltmada anlamlı farklılık yaratmamaktadır.

Elde ettiğimiz verilerin yapılacak olan yeni deneysel çalışmalara ışık tutacağını umuyoruz. Bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak elde ettiğimiz veriler literatür verileri ile benzerlik göstermektedir. İskemi reperfüzyon hasarı sonrası oluşabilecek özellikle lokal ve sistemik etkilerin azaltılmasında ozon tedavisinin adjuvan kullanımının faydalı olabileceği düşünülmektedir. Klinik uygulamalara geçiş öncesinde ozon tedavisinin yararlı etkilerinin hangi mekanizmalar ile oluştuğu ve bu tedavinin etkin olması için uygun dozun ayarlanabilmesi amacıyla yeni deneysel çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 7. KAYNAKLAR

1. DORİN, R. P. (2010). Glenn's Urologic Surgery. *JAMA*. 303(21): 2192-2196.
2. YAGMURDUR, H., AYYİLDİZ, A., KARAGUZEL, E., OGUS, E., SURER, H., CAYDERE, GERMİYANOGLU, C. (2006). The preventive effects of thiopental and propofol on testicular ischemia-reperfusion injury. *Acta anaesthesiologica scandinavica*. 50(10): 1238-1243.
3. CUMMINGS, J. M., BOULLIER, J. A., SEKHON, D., BOSE, K. (2002). Adult testicular torsion. *The Journal of urology*. 167(5): 2109-2110.
4. YUSUF, G. T., SİDHU, P. S. (2013). A review of ultrasound imaging in scrotal emergencies. *Journal of ultrasound*. 16(4): 171-178.
5. BECKER, E. J., TURNER, T. (1995). Endocrine and exocrine effects of testicular torsion in the prepubertal and adult rat. *Journal of andrology*. 16(4): 342-351.
6. TURNER, T. T., LYSIAK, J. (2008). Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *Journal of andrology*. 29(5): 488-498.
7. CUZZOCREA, S., RİLEY, D. P., CAPUTİ, A. P., SALVEMİNİ, D. (2001). Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacological reviews*. 53(1): 135-159.
8. SADLER, T. W. (2005). Langman Medikal Embriyoloji,(Çev.: Başaklar, AC), 9. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara.
9. WİLHELM, D., KOOPMAN, P. (2006). The makings of maleness: towards an integrated view of male sexual development. *Nature Reviews Genetics*. 7(8): 620-631.
10. MOORE, K. L., PERSAUD, T. V. N. (2004). Clinically oriented embryology. *The Developing Human*: 10.
11. JONES, R. E., LOPEZ, K. H. (2013). Human reproductive biology. Academic Press.

12. JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. (2005). Basic histology text and atlas. *London: McGraw Hill.*
13. KIERSZENBAUM, A. L., DEMİR, R. (2006). *Histoloji Ve Hücrebiyolojisi: Patolojiye Giriş.* Palme Yayıncılık.
14. SCHOENWOLF, G. C., BLEYL, S. B., BRAUER, P. R., FRANCIS-WEST, P. H. (2014). *Larsen's Human Embryology E-Book.* Elsevier Health Sciences.
15. BAYDİNÇ, C. (1998). Ürogenital organların anatomik ve histolojik yapısı; Temel Üroloji. Güneş kitabevi Ltd Şti, Ankara.
16. KRİEGER, J. N., TANAGHO, E. A., MCANINCH, J. W. (2004). Sexually transmitted diseases Smith's general urology.
17. BROOKS, J. D. (2007). Anatomy of the lower urinary tract and male genitalia. Campbell-Walsh Urology. 9th ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier.
18. PABST, R., PUTZ, R. (2006). Sobotta İnsan Anatomisi Atlası (Gövde, Organlar, Alt Ekstremiteler) 2.
19. JAROW, J. P. (1990). Intratesticular arterial anatomy. *Journal of andrology.* 11(3): 255-259.
20. SHAFİK, A., MOFTAH, A., OLFAT, S., MOHİ-EL-DİN, M., EL-SAYED, A. (1990). Testicular veins: anatomy and role in varicocele genesis and other pathologic conditions. *Urology.* 35(2): 175-182.
21. CHEHVAL, M. J., PURCELL, M. H. (1992). Deterioration of semen parameters over time in men with untreated varicocele: evidence of progressive testicular damage. *Fertility and sterility.* 57(1): 174-177.
22. COOLSAET, B. L. R. A. (1980). The varicocele syndrome: venography determining the optimal level for surgical management. *The Journal of urology.* 124(6): 833-838.
23. NOSNİK, I. P., FRIEDMANN, P., NAGLER, H. M., DİNLENC, C. Z. (2010). Resume fraud: unverifiable publications of urology training program applicants. *The Journal of urology,* 183(4): 1520-1523.
24. SNELL, R. S., YILDIRIM, M. (1998). Tıp Fakültesi öğrencileri için klinik anatomi. Nobel Tıp.

25. SKANDALAKIS, J. E., SKANDALAKIS, L. J., COLBORN, G. L. (1996). Testicular atrophy and neuropathy in herniorrhaphy. *The American surgeon*, 62(9): 775-782.
26. ROWE, M. I., O'NEILL, J. A., GROSFELD, J. L., FONKALSRUD, E. W., CORAN, A. G. (1995). *Essentials of Pediatric Surgery*. St. Louis. Mosby-Year Book. Inc. 1: 446-61.
27. SABA, M., MORALES, C. R., DE LAMIRANDE, E., GAGNON, C. (1997). Morphological and biochemical changes following acute unilateral testicular torsion in prepubertal rats. *The Journal of urology*. 157(3): 1149-1154.
28. WILLIAMSON, R. C. N. (1976). Torsion of the testis and allied conditions. *British Journal of Surgery*. 63(6): 465-476.
29. BARADA, J. H., WEINGARTEN, J. L., CROMIE, W. J. (1989). Testicular salvage and age-related delay in the presentation of testicular torsion. *The Journal of urology*. 142(3): 746-748.
30. TJIOE, D. Y., STEINBERGER, E. (1970). A quantitative study of the effect of ischaemia on the germinal epithelium of rat testes. *Journal of reproduction and fertility*. 21(3): 489-494.
31. TURNER, T. T., BROWN, K. J. (1993). Spermatogenic cord torsion: loss of spermatogenesis despite return of blood flow. *Biology of reproduction*. 49(2): 401-407.
32. CAESAR, R. E., KAPLAN, G. W. (1994). Incidence of the bell-clapper deformity in an autopsy series. *Urology*. 44(1): 114-116.
33. GATTI, J. M., MURPHY, J. P. (2007). Current management of the acute scrotum. *In Seminars in pediatric surgery* (Vol. 16, No. 1, pp. 58-63). WB Saunders.
34. HUTSON, M. (1998). Undescended testis, torsion and varicocele. *Pediatric surgery*.
35. RINGDAHL, E., TEAGUE, L. (2006). Testicular torsion. *American family physician*. 74(10).

36. MARSHALL, W. A., TANNER, J. M. (1970). Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Archives of disease in childhood*. 45(239): 13-23.
37. BELLER, A. J. (1935). Torsion of an intra-abdominal testicle. *Annals of surgery*. 102(1): 41.
38. RABINOWITZ, R., HULBERT JR, W. C. (1995). Acute scrotal swelling. *The Urologic clinics of North America*. 22(1): 101-105.
39. HILD, F., WILBRAND, U., KLEESIEK, K. (1980). Fertility after torsion of the testicle (author's transl). *Der Urologe. Ausg. A*. 19(5): 263.
40. MÜLLER, D. C., PERON, S. E., KECK, R. W., KROPP, K. A. (1990). Effects of hypothermia on testicular ischemia. *The Journal of urology*. 143(5): 1046-1048.
41. SMITH, G. I. (1955). Cellular changes from graded testicular ischemia. *The Journal of urology*. 73(2): 355-362.
42. KRARUP, T. (1978). The testes after torsion. *BJU International*. 50(1): 43-46.
43. BACKHOUSE, K. M. (1982). Embryology of testicular descent and maldescent. *The Urologic clinics of North America*. 9(3): 315.
44. CUCKOW, P. M., FRANK, J. D. (2000). Torsion of the testis. *BJU international*. 86(3): 349-353.
45. SEVÜK, M., DANIŞMAN, A., BİRCAN, K., ŞAHİN, H. (2007). Ürogenital Sistem Hastalıklarında Semptomatoloji ve Klinik Muayene. İn: Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N Editör. Temel Üroloji. Üçüncü Baskı. Ankara: Öncü Basımevi. S:56.
46. STONE, K. T., KASS, E. J., CACCIARELLI, A. A., GIBSON, D. P., NOE, H. N. (1995). Pediatric Urology: Management of Suspected Antenatal Torsion. *The Journal of urology*. 153(3): 782-784.
47. GIACOMANTONIO, M., LAU, H. (1981). Torsion of the testicle in the newborn. *Canadian journal of surgery*. 24(1): 14-5.
48. LAQUAGLIA, M. P., BAUER, S. B., ERAKLIS, A., FEINS, N., MANDELL, J. (1987). Bilateral neonatal torsion. *The Journal of urology*. 138(4): 1051-1054.

49. RARELY, A. F. O. T. T., TORSION, E. T. Testis Torsiyonunun Erişkinde Görülen Nadir Şekli: Ekstravajinal Testis Torsiyonu.
50. BURTON, J. A. (1972). Atrophy following testicular torsion. *British Journal of Surgery*. 59(6): 422-426.
51. ANDERSON JB, WILLIAMSON RCN. (1986). The Fate of the Human Testes Following Unilateral Torsion of the Spermatic Cord. *British Journal of Urology*. 58(6):698-704.
52. SPARKS, J. P. (1972). Torsion of the testis in adolescents and young adults: some comments on clinical expressions and management. *Clinical pediatrics*. 11(8): 484-486.
53. DRESNER, M. L. (1973). Torsed appendage Diagnosis and management: Blue dot sign. *Urology*. 1(1): 63-66.
54. ZILBERMAN, D., INBAR, Y., HEYMAN, Z., SHINHAR, D., BİLİK, R., AVİGAD, I., MOR, Y. (2006). Torsion of the cryptorchid testis can it be salvaged?. *The Journal of urology*. 175(6): 2287-2289.
55. CİFTÇİ, A. O., ŞENOCAK, M. E., TANYEL, F. C., BÜYÜKPAMUKÇU, N. (2004). Clinical predictors for differential diagnosis of acute scrotum. *European journal of pediatric surgery*. 14(05): 333-338.
56. RABINOWİTZ, R. (1984). The importance of the cremasteric reflex in acute scrotal swelling in children. *The Journal of urology*. 132(1): 89-90.
57. KARMAZYN, B., STEINBERG, R., KORNREICH, L., FREUD, E., GROZOVSKİ, S., SCHWARZ, M., LİVNE, P. (2005). Clinical and sonographic criteria of acute scrotum in children: a retrospective study of 172 boys. *Pediatric radiology*. 35(3): 302-310.
58. BOURNE, H. H., LEE, R. E. (1975). Torsion of spermatic cord and testicular appendages. *Urology*. 5(1): 73-75.
59. STİLLWELL, T. J., KRAMER, S. A. (1986). Intermittent testicular torsion. *Pediatrics*. 77(6): 908-911.
60. MAKGÜR, F., KİLİNÇ, K., TANYEL, E. C., BÜYÜKPAMUKCU, N. (1994). Ipsilateral and contralateral testicular biochemical acute changes after unilateral testicular torsion and detorsion. *Urology*. 44(3): 413-418.

61. COLEY, B. D. (2006). The acute pediatric scrotum. *Ultrasound Clinics*. 1(3): 485-496.
62. NOSKE, H. D., KRAUS, S. W., ALTINKILIĆ, B. M., WEIDNER, W. (1998). Historical milestones regarding torsion of the scrotal organs. *The Journal of urology*. 159(1): 13-16.
63. MERNAGH, J. R., CACO, C., DE MARÍA, J. (2004). Testicular torsion revisited. *Current problems in diagnostic radiology*. 33(2): 60-73.
64. LERNER, R. M., MEVORACH, R. A., HULBERT, W. C., RABINOWITZ, R. (1990). Color Doppler US in the evaluation of acute scrotal disease. *Radiology*. 176(2): 355-358.
65. BAKER, L. A., SIGMAN, D., MATHEWS, R. I., BENSON, J., DOCIMO, S. G. (2000). An analysis of clinical outcomes using color Doppler testicular ultrasound for testicular torsion. *Pediatrics*. 105(3): 604-607.
66. KAIPÍA, A., RYYMİN, P., MÄKELÄ, E., AALTONEN, M., KÄHÄRÄ, V., KANGASNIEMI, M. (2005). Magnetic resonance imaging of experimental testicular torsion. *International journal of andrology*. 28(6): 355-359.
67. WU, H. C., SUN, S. S., KAO, A., CHUANG, F. J., LIN, C. C., LEE, C. C. (2002). Comparison of radionuclide imaging and ultrasonography in the differentiation of acute testicular torsion and inflammatory testicular disease. *Clinical nuclear medicine*. 27(7): 490-493.
68. PALTIEL, H. J., CONNOLLY, L. P., ATALA, A., PALTIEL, A. D., ZURAKOWSKI, D., TREVES, S. T. (1998). Acute scrotal symptoms in boys with an indeterminate clinical presentation: comparison of color Doppler sonography and scintigraphy. *Radiology*. 207(1): 223-231.
69. BLASK, A. R. N., RUSHTON, H. G. (2006). Sonographic appearance of the epididymis in pediatric testicular torsion. *American Journal of Roentgenology*. 187(6): 1627-1635.
70. VÍGUERAS, R. M., MEDINA, P., REYES, G., ROJAS, J. C., ROSALES, M. L. (1998). The effect of naloxone pretreatment before relieving testicular torsion. *In Proceedings of the Western Pharmacology Society* (Vol. 41, p. 41).

71. ANDERSON, J. B., WILLIAMSON, R. C. N. (1988). Testicular torsion in Bristol: a 25-year review. *British Journal of Surgery*. 75(10): 988-992.
72. BELLINGER, M. F., ABROMOWITZ, H., BRANTLEY, S., MARSHALL, G. (1989). Orchiopexy: an experimental study of the effect of surgical technique on testicular histology. *The Journal of urology*. 142(2): 553-555.
73. PALMER, J. S., CROMIE, W. J., PLZAK, L. F., LEFF, A. R. (1997). A platelet activating factor antagonist attenuates the effects of testicular ischemia. *The Journal of urology*. 158(3): 1186-1190.
74. VISSER, A. J., HEYNS, C. F. (2003). Testicular function after torsion of the spermatic cord. *BJU international*. 92(3): 200-203.
75. BAKER, L. A., TURNER, T. T. (1995). Leydig cell function after experimental testicular torsion despite loss of spermatogenesis. *Journal of andrology*. 16(1): 12-17.
76. Kumar, V., Abbas, A. K., Aster, J. C. (2013). Robbins Basic Pathology. St Louis: Elsevier.
77. REILLY, P. M., SCHILLER, H. J., BULKLEY, G. B. (1991). Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *The american journal of surgery*. 161(4): 488-503.
78. WILHELM FILHO, D., TORRES, M. A., BORDIN, A. L., CREZCYNSKI-PASA, T. B., BOVERIS, A. (2004). Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. *Molecular aspects of medicine*. 25(1): 199-210.
79. PLANTE, G. E., SIROIS, P., BRAQUET, P. (1988). Platelet activating factor antagonism with BN52021 protects the kidney against acute ischemic injury. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 34(1): 53-60.
80. NAGLER, H. M., DEVERE WHITE, R. (1982). The effect of testicular torsion on the contralateral testis. *The Journal of urology*. 128(6): 1343-1348.
81. OZTURK, H., BUYUKBAYRAM, H., OZDEMİR, E., KETANİ, A., GUREL, A., ONEN, A., OTÇU, S. (2003). The effects of nitric oxide on the expression of cell adhesion molecules (ICAM-1, UEA-1, and tenascin) in



- rats with unilateral testicular torsion. *Journal of pediatric surgery*. 38(11): 1621-1627.
82. PRILLAMAN, H. M., TURNER, T. T. (1997). Rescue of testicular function after acute experimental torsion. *The Journal of urology*. 157(1): 340-345.
83. ÜNSAL, A., DEVRİM, E., GUVEN, C., EROGLU, M., DURAK, I., BOZOKLU, A., BALBAY, M. D. (2004). Propofol attenuates reperfusion injury after testicular torsion and detorsion. *World journal of urology*. 22(6): 461-465.
84. Kandilci, H. B., Gümüşel, B. (2005). Akciğerlerde iskemi reperfüzyon hasarı ve iskemik önkoşullanma. Hacettepe Üniversitesi. Eczacılık Fakültesi Dergisi, 25, 35.
85. GRANGER, D. (1999). Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation*. 6(3): 167-178.
86. LYSIAK, J. J., NGUYEN, Q. A. T., TURNER, T. T. (2002). Peptide and nonpeptide reactive oxygen scavengers provide partial rescue of the testis after torsion. *Journal of andrology*. 23(3): 400-409.
87. ZAMBONI, W. A., ROTH, A. C., RUSSELL, R. C., GRAHAM, B., SUCHY, H., KUCAN, J. O. (1993). Morphologic analysis of the microcirculation during reperfusion of ischemic skeletal muscle and the effect of hyperbaric oxygen. *Plastic and reconstructive surgery*. 91(6): 1110-1123.
88. TAPURIA, N., KUMAR, Y., HABİB, M. M., AMARA, M. A., SEİFALIAN, A. M., DAVIDSON, B. R. (2008). Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury a review. *Journal of Surgical Research*. 150(2): 304-330.
89. SZABÓ, C. (1998). Role of poly (ADP-ribose) synthetase in inflammation. *European journal of pharmacology*. 350(1): 1-19.
90. TENTORİ, L., PORTARENA, I., GRAZIANI, G. (2002). Potential clinical applications of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors. *Pharmacological research*. 45(2): 73-85.

91. TURNER, T. T., BANG, H. J., LYSIAK, J. L. (2004). The molecular pathology of experimental testicular torsion suggests adjunct therapy to surgical repair. *The Journal of urology*. 172(6): 2574-2578.
92. SHIRAISHI K, NAITO K, YOSHIDA K. (2001). Nitric oxide promotes germ cell necrosis in the delayed phase after experimental testicular torsion of rat. *Biology of reproduction*. 65(2): 514-521.
93. BACHSCHMID, M., SCHILDKNECHT, S., ULLRICH, V. (2005). Redox regulation of vascular prostanoid synthesis by the nitric oxide-superoxide system. *Biochemical and biophysical research communications*. 338(1): 536-542.
94. KRUSZEWSKI, M. (2003). Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 531(1): 81-92.
95. YU, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological reviews*. 74(1): 139-163.
96. DE ZWART, L. L., MEERMAN, J. H., COMMANDEUR, J. N., VERMEULEN, N. P. (1999). Biomarkers of free radical damage: applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology and Medicine*. 26(1): 202-226.
97. RANGAN, U., BULKLEY, G. B. (1993). Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *British medical bulletin*. 49(3): 700-718.
98. MCCORD, J. M., EDEAS, M. A. (2005). SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 59(4): 139-142.
99. YAPAR, S. B. (2006). Alfa lipoik asidin rat karaciğer homojenatlarında indüklenmiş lipid peroksidasyonuna etkisi.
100. DIMMELER, S., ZEHER, A. M. (1999). Nitric oxide—an endothelial cell survival factor. *Cell Death & Differentiation*. 6(10).
101. CHAMBERLAIN, C. G., MANSFIELD, K. J., CERRA, A. (2008). Nitric oxide, a survival factor for lens epithelial cells. *Molecular vision*. 14: 983.

102. STEIN, H. J., HINDER, R. A., OOSTHUIZEN, M. M. (1990). Gastric mucosal injury caused by hemorrhagic shock and reperfusion: protective role of the antioxidant glutathione. *Surgery*. 108(2): 467-73.
103. SLATER, T. F. (1988). Free radical mechanisms in tissue injury. *In Cell Function and Disease* (pp. 209-218). Springer US.
104. GRIFFITHS, H. R., MØLLER, L., BARTOSZ, G., BAST, A., BERTONI-FREDDARI, C., COLLINS, A., LOFT, S. (2002). Biomarkers. *Molecular aspects of medicine*. 23(1): 101-208.
105. JACQUELINE, I. K. (1981). Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology.
106. BOCCI, V. (2004). Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators of inflammation*. 13(1): 3-11.
107. BOCCI, V. A. (2006). Scientific and medical aspects of ozone therapy. *State of the art. Archives of medical research*. 37(4): 425-435.
108. ROWLAND, F. S. (2006). Stratospheric ozone depletion. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 361(1469): 769-790.
109. WRIGHT, E. S., DZIEDZIC, D., WHEELER, C. S. (1990). Cellular, biochemical and functional effects of ozone: new research and perspectives on ozone health effects. *Toxicology letters*. 51(2): 125-145.
110. SANHUEZA, P. A., REED, G. D., DAVIS, W. T., MILLER, T. L. (2003). An environmental decision-making tool for evaluating ground-level ozone-related health effects. *Journal of the Air & Waste Management Association*. 53(12): 1448-1459.
111. BOCCI, V. (2002). Oxygen-Ozone Therapy: A Critical Review.
112. RUBIN, M. B. (2001). The history of ozone. The Schönbein period, 1839–1868. *Bull. Hist. Chem*. 26(1): 40-56.
113. WOLFF, H. H. (1974). Die Behandlung peripherer Durchblutungsstörungen mit Ozon. *Erfahr hk*. 23: 181-184.
114. BOCCI, V., VALACCHI, G., CORRADESCI, F., FANETTI, G. (1998). Studies on the biological effects of ozone: 8. Effects on the total

- antioxidant status and on interleukin-8 production. *Mediators of inflammation*. 7(5): 313-317.
115. BOCCI, V., ALDINUCCI, C. (2006). Biochemical modifications induced in human blood by oxygenation-ozonation. *Journal of biochemical and molecular toxicology*. 20(3): 133-138.
116. DÌ PAOLO, N., GAGGIOTTI, E., GALLI, F. (2005). Extracorporeal blood oxygenation and ozonation: clinical and biological implications of ozone therapy. *Redox Report*. 10(3): 121-130.
117. BOCCI, V. (2006). Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma. *Toxicology and applied pharmacology*. 216(3): 493-504.
118. DÌ PAOLO, N., BOCCI, V., GAGGIOTTI, E. (2004). Ozone therapy. *The International journal of artificial organs*. 27(3): 168-175.
119. HALLIWELL, B., CLEMENT, M. V., LONG, L. H. (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS letters*. 486(1): 10-13.
120. DÌ OSSIGENO-OZONOTERAPIA, R. I. (2005). The use of hydrogen peroxide as a medical drug. *ossigeno-ozonoterapia*. 4: 30-39.
121. TRAVAGLI, V., ZANARDI, I., SILVIETTI, A., BOCCI, V. (2007). A physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. *International journal of biological macromolecules*. 41(5): 504-511.
122. Rice-Evans, C., Miller, N. J. (1994). Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in enzymology*. 234: 279-293.
123. BOCCI, V., ALDINUCCI, C., MOSCI, F., CARRARO, F., VALACCHI, G. (2007). Ozonation of human blood induces a remarkable upregulation of heme oxygenase-1 and heat stress protein-70. *Mediators of inflammation*. 2007.
124. BACH, F. H. (2005). Heme oxygenase-1: a therapeutic amplification funnel. *The FASEB Journal*. 19(10): 1216-1219.
125. OTTERBEIN, L. E., SOARES, M. P., YAMASHITA, K., BACH, F. H. (2003). Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends in immunology*. 24(8): 449-455.

126. STÜBINGER, S., SADER, R., FİLİPPİ, A. (2006). The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: a review. *Quintessence international*. 37(5).
127. NOGALES, C. G., FERRARÌ, P. H., KANTOROVICH, E. O., LAGEMARQUES, J. L. (2008). Ozone therapy in medicine and dentistry. *J Contemp Dent Pract*. 9(4): 75-84.
128. BOCCÌ, V. (2007). The case for oxygen-ozonotherapy. *British journal of biomedical science*. 64(1): 44-49.
129. MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G., AL-DALAIN, S. M., MENÉNDEZ, S., RE, L., GIULIANI, A., CANDELARIO-JALİL, E., LEÓN, O. S. (2005). Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *European journal of pharmacology*. 523(1): 151-161.
130. MUTO, M., AMBROSANIO, G., GUARNIERI, G., CAPOBIANCO, E., PICCOLO, G., ANNUNZIATA, G., ROTONDO, A. (2008). Low back pain and sciatica: treatment with intradiscal-intraforaminal O2-O3 injection. Our experience. *La radiologia medica*. 113(5): 695-706.
131. BOCCÌ, V. (2011). Ozone A new medical drug. 2011.
132. BAR-OR, D., LAU, E., WINKLER, J. V. (2000). A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia preliminary report. *The Journal of emergency medicine*. 19(4): 311-315.
133. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*. 193(1): 265-275.
134. FONKALSRUD, E. W. (1987). Testicular undescend and torsion. *Pediatric clinics of North America*. 34(5): 1305-1317.
135. GRANDSTAFF, P. M. (1994). The effect of allopurinol pretreatment before detorting testicular torsion: Akgür FM, Kiliç K, Aktug T, et al J Urol 151: 1715–1717 Jul 1994. *Annals of Emergency Medicine*. 24(6): 1203.
136. EKİCİ S, DOAN EKİCİ AI, ÖZTÜRK G. (2012). Comparison of melatonin and ozone in the prevention of reperfusion injury following unilateral testicular torsion in rats. *Urology*. 80(4): 899-906.

137. CELİK, E., OGUZTURK, H., SAHİN, N., TURTAY, M. G., OGUZ, F., CİFTÇİ, O. (2016). Protective effects of hesperidin in experimental testicular ischemia/reperfusion injury in rats. *Archives of medical science: AMS*. 12(5): 928.
138. CHİ, K. K., ZHANG, W. H., WANG, G. C., CHEN, Z., HE, W., WANG, S. G., CHEN, H. (2017). Comparison of intraperitoneal and intraepididymal quercetin for the prevention of testicular torsion/detorsion-induced injury. *Urology*. 99: 106-111.
139. AMİRHASSANİ, S., MEHRABİ, S., HOSSEİNİPANAHA, S. M., KASHKOULİ, A. I., TORABİAN, S., MOSLEMİ, M. K. (2017). Does intraperitoneal injection of propofol prior to detorsion improve testes weight and histopathological findings in a rat model?. *Research and Reports in Urology*. 9: 101.
140. YAGMURDUR, H., AYYİLDİZ, A., KARAGUZEL, E., AKGUL, T., USTUN, H., GERMİYANOĞLU, C. (2008). Propofol reduces nitric oxide-induced apoptosis in testicular ischemia reperfusion injury by downregulating the expression of inducible nitric oxide synthase. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. 52(3): 350-357.
141. AYDOS, T. R., BAŞAR, M. M., KUL, O., ATMACA, H. T., UZUNALIOĞLU, T., KISA, Ü., EFE, O. E. (2014). Effects of ozone therapy and taurine on ischemia/reperfusion-induced testicular injury in a rat testicular torsion model. *Turkish journal of medical sciences*. 44(5): 749-755.
142. SAYAR, I., BİCER, S., GURSUL, C., GÜRBÜZEL, M., PEKER, K., IŞİK, A. (2016). Protective effects of ellagic acid and ozone on rat ovaries with an ischemia/reperfusion injury. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 42(1): 52-58.
143. KOCA, K., YURTTAS, Y., YİLDİZ, C., CAYCI, T., UYSAL, B., KORKMAZ, A. (2010). Effect of hyperbaric oxygen and ozone preconditioning on oxidative/nitrosative stress induced by tourniquet ischemia/reperfusion in rat skeletal muscle. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 44(6): 476-483.

144. KOCA, K., YURTTAS, Y., BİLGİC, S., CAYCI, T., TOPAL, T., DURUSU, M., OGUZ, E. (2010). Effect of preconditioned hyperbaric oxygen and ozone on ischemia-reperfusion induced tourniquet in skeletal bone of rats. *Journal of Surgical Research*. 164(1): e83-e89.
145. TANYELİ, Ö., YÜKSEK, T., GÖRMÜŞ, N., ULU, N., KIYICI, A., & ESEN, H. H. (2012). The Effects of Medical Ozone in Rat Heart Exposed to Ischemia-Reperfusion Injury: Experimental Study. *Turkiye Klinikleri Cardiovascular Sciences*. 24(2): 102-107.
146. Chen, H., Xing, B., Liu, X., Zhan, B., Zhou, J., Zhu, H., Chen, Z. (2008). Ozone oxidative preconditioning protects the rat kidney from reperfusion injury: the role of nitric oxide. *Journal of Surgical Research*. 149(2): 287-295.
147. KAL, A., KAL, O., AKİLLİOĞLU, I., CELİK, E., YILMAZ, M., GONUL, S., ONAL, O. (2017). The protective effect of prophylactic ozone administration against retinal ischemia-reperfusion injury. *Cutaneous and ocular toxicology*. 36(1): 39-47.
148. WANG, L., CHEN, H., LIU, X. H., CHEN, Z. Y., WENG, X. D., QIU, T., ZHU, H. C. (2014). Ozone oxidative preconditioning inhibits renal fibrosis induced by ischemia and reperfusion injury in rats. *Experimental and therapeutic medicine*. 8(6): 1764-1768.
149. KORKUT, Y., CEYLAN AYADA, Ü. T. (2014). Ozon Tedavisi ve Servikal-Lomber Disk Hernileri Üzerine Etkisi.
150. PERALTA, C., LEON, O. S., XAUS, C., PRATS, N., JALİL, E. C., PLANELL, E. S., ROSELLO-CATAFAU, J. (1999). Protective effect of ozone treatment on the injury associated with hepatic ischemia-reperfusion: antioxidant-prooxidant balance. *Free radical research*. 31(3): 191-196.
151. PERALTA, C., XAUS, C., BARTRONS, R., LEON, O. S., GELPİ, E., ROSELLÓ-CATAFAU, J. (2000). Effect of ozone treatment on reactive oxygen species and adenosine production during hepatic ischemia-reperfusion. *Free radical research*. 33(5): 595-605.

152. DAVIES, K. J. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB life*. 50(4-5): 279-289.
153. TUSAT, M., MENTESE, A., DEMİR, S., ALVER, A., IMAMOĞLU, M. (2017). Medical ozone therapy reduces oxidative stress and testicular damage in an experimental model of testicular torsion in rats. *Journal of the Brazilian Society of Urology*. 43.
154. OZKAN, F., ŞENAYLİ, Y., OZYURT, H., ERKORKMAZ, U., BOSTAN, B. (2012). Antioxidant effects of propofol on tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury: an experimental study. *Journal of Surgical Research*. 176(2): 601-607.
155. ERTEN SF, KOCAK A, OZDEMİR I, AYDEMİR S, COLAK A, REEDER BS. (2003). Protective effect of melatonin on experimental spinal cord ischemia. *Spinal cord*. 41(10):533-538.
156. AJAMİEH, H. H., MENÉNDEZ, S., MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G., CANDELARIO-JALİL, E., RE, L., GIULIANI, A., FERNÁNDEZ, O. S. L. (2004). Effects of ozone oxidative preconditioning on nitric oxide generation and cellular redox balance in a rat model of hepatic ischaemia reperfusion. *Liver International*. 24(1): 55-62.
157. ERDOĞAN, H., FADİLLİOĞLU, E., YAGMURCA, M., UÇAR, M., IRMAK, M. K. (2006). Protein oxidation and lipid peroxidation after renal ischemia-reperfusion injury: protective effects of erdosteine and N-acetylcysteine. *Urological research*. 34(1): 41-46.
158. MCCORD, J. M. (1985). Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New England Journal of Medicine*. 312(3): 159-163.
159. COBBE, S. M., POOLE-WILSON, P. A. (1980). The time of onset and severity of acidosis in myocardial ischaemia. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 12(8): 745-760.
160. YULUĞ, E., TÜREDİ, S., KARAGÜZEL, E., KUTLU, Ö., MENTEŞE, A., ALVER, A. (2014). The short term effects of resveratrol on ischemia-reperfusion injury in rat testis. *Journal of pediatric surgery*. 49(3): 484-489.



161. TURKMEN, S., MENTESE, A., KARAGUZEL, E., KARACA, Y., KUCUK, A., UZUN, A. TUREDİ, S. (2012). A comparison of the effects of N-acetylcysteine and ethyl pyruvate on experimental testicular ischemia-reperfusion injury. *Fertility and sterility*. 98(3): 626-631.
162. METE, F., TARHAN, H., CELİK, O., AKARKEN, I., VURAL, K., EKİN, R. G., ILBEY, Y. O. (2017). Comparison of intraperitoneal and intratesticular ozone therapy for the treatment of testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *Asian journal of andrology*. 19(1): 43.

## 8. EKLER

### EK 1: Etik Kurul onayı




T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

#### HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ :09.06.2016  
TOPLANTI SAYISI :2016/05  
DOSYA KAYIT NUMARASI :2016/41  
KARAR NUMARASI :2016/05-01  
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR : Arş. Gör. Dr. Emrah Demirci  
HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI : Wistar albino cinsi rat (250gr-300gr) ve 5x8 adet

Yrd. Doç. Dr. Eyüp Burak Sancak tarafından Etik Kurulumuza sunulan "Ratlarda unilateral testis torsiyonu modelinde iskemi-reperfüzyon hasarının önlenmesinde Ozon un etkinliğinin değerlendirilmesi" başlıklı proje Hayvan Deneylerine ilişkin mevzuatın emirleri doğrultusunda incelenerek, ilgili mevzuat hükümleri çerçevesinde Hayvan Deneyleri Etiği açısından uygun olduğuna; oybirliği ile karar verilmiştir. (Yrd. Doç. Dr. Eyüp Burak Sancak proje ekibinde yer aldığından dolayı bu araştırma önerisi için oy kullanmamıştır.)

  
Prof. Dr. Sebahattin ERGÜN  
Üye  
(Başkan)

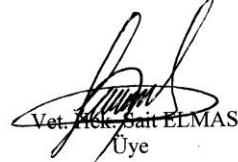
Prof. Dr. Şükran YALÇIN ÖZDİLEK  
Üye  
(Katılmadı)

Yrd. Doç. Dr. Eyüp Burak SANCAK  
Üye  
(Proje Çalışanı)

Yrd. Doç. Dr. Cemil TÖLÜ  
Üye  
(Katılmadı)

Yrd. Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN  
Üye

Yrd. Doç. Dr. Hakan TÜRKÖN  
Üye

  
Vet. Fikri Sait ELMAS  
Üye

Tayfun TAŞBİLEK  
Sivil Üye  
(Katılmadı)

Erdoğan GÜRSEL  
Sivil Üye