

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

RAT TESTİSİNDEKİ İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI SONUCU OLUŞAN
OKSİDATİF STRES VE HİSTOPATOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER
ÜZERİNE MEDİKAL OZONUN ETKİSİ

Uzmanlık Tezi
Araş. Gör. Dr. Mustafa TUŞAT

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mustafa İMAMOĞLU

Trabzon-2012

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

RAT TESTİSİNDEKİ İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI SONUCU OLUŞAN
OKSİDATİF STRES VE HİSTOPATOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER
ÜZERİNE MEDİKAL OZONUN ETKİSİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Mustafa TUŞAT

Trabzon-2012

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-----------|
| İÇİNDEKİLER..... | II |
| KISALTMALAR..... | IV |
| 1.GİRİŞ..... | 1 |
| 2.GENEL BİLGİLER..... | 3 |
| 2.1. TESTİS TORSİYONU..... | 3 |
| 2.1.1. Tanım..... | 3 |
| 2.1.2. Anatomi..... | 3 |
| 2.1.3 Histoloji..... | 4 |
| 2.1.4. Patoloji..... | 5 |
| 2.1.5. Klinik..... | 5 |
| 2.1.6. Tanısal Çalışmalar..... | 6 |
| 2.1.7. Tedavi..... | 6 |
| 2.2. İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI..... | 7 |
| 2.2.1. Tanım..... | 7 |
| 2.2.2. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller..... | 8 |
| 2.2.3. Antioksidan Sistemler..... | 9 |
| 2.3. TESTİSTE İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI..... | 10 |
| 2.3.1. Testisin İskemik Hasarlanmalarında Antioksidan Tedavi..... | 10 |
| 2.4. OZON GAZININ TIBBİ AMAÇLI KULLANILMASI..... | 11 |
| 2.4.1. Medikal Ozon Uygulamalarının Tarihçesi..... | 11 |
| 2.4.2. Medikal Ozonun Etki Mekanizması..... | 12 |
| 2.4.3. Medikal Ozon Tedavisinin Yan Etki ve Kontrendikasyonları..... | 14 |
| 2.4.4. Medikal Ozon Tedavisinin Klinik Uygulamaları..... | 15 |

| | |
|---|----|
| 3. MATERYAL VE METOD..... | 16 |
| 3.1. BİYOKİMYASAL İNCELEME..... | 17 |
| 3.1.1. Testis Dokusunda MDA Düzeyinin Belirlenmesi | 17 |
| 3.2. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME | 18 |
| 3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ | 19 |
| 4.BULGULAR..... | 21 |
| 4.1. TESTİSTEKİ HASARIN BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRİLMESİ | 21 |
| 4.2. TESTİSTEKİ HASARIN HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ | 22 |
| 4.2.1. Histopatolojik Hasarın İstatistiksel Değerlendirilmesi | 29 |
| 5.TARTIŞMA | 33 |
| 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER..... | 38 |
| 7. ÖZET | 39 |
| 8. SUMMARY | 40 |
| 9. KAYNAKLAR | 41 |

KISALTMALAR

| | |
|--------|--|
| ACE | :Anjiotensin dönüştürücü enzim |
| ATP | : Adenozin trifosfat |
| ATPas | : Adenozin trifosfatase |
| DNA | : Deoksiribonükleik asit |
| FSH | :Folikül Uyarıcı Hormon |
| GSH-Px | : Glutasyon Peroksidaz |
| HHDS | : Histopatolojik Hasar Derecelendirme Skorlaması |
| JTBS | : Johnsen Testiküler Biopsi Skorlaması |
| LOP | :Lipit Oksidasyon ürünü |
| MDA | : Malondialdehit |
| NO | : Nitrit Oksit |
| PCO | : Protein Karbonil |
| ROT | : Reaktif Oksijen Türevleri |
| RNT | :Reaktif Nitrojen Türevleri |
| SOD | : Süperoksit Dismutaz |
| SOR | : Serbest Oksijen Radikalleri |
| TBA | :Tiyobarbitürik asit |
| VKI | :Vena Kava İnfierior |

1.GİRİŞ

Testis torsiyonu, bebeklik ve adolesan çağında akut skrotuma yol açan önemli sebeplerden biridir. Spermatik kordun kendi eksenini etrafında dönmesine bağlı olarak, testis ve eklentilerinin kan akımının engellenmesi olarak tanımlanır. Torsiyon derecesi ve süresi ile ilişkili olarak dönmüş kordun düzeltilmesi ile SOR oluşumu, intrasellüler Ca⁺ iyon değişiklikleri, çeşitli yangısal olaylar ve sempatik hiperaktivasyon gibi pek çok unsuru içeren iskemi-reperfüzyon hasarına bağlı her iki testiste de ciddi yaralanma meydana gelir (1-4). Gonadlarda meydana gelen bu yaralanma da subinfertilite/ infertilite ile sonuçlanabilir (1).

Torsiyon sonrası testiküler hasarın gelişmesinde iskemi ve bunu izleyen reperfüzyon sırasında ortaya çıkan SOR'in etkili olduğu bilinmektedir (5-8). İskemi sırasında oksijen miktarının metabolik ihtiyaçlara oranla düşük seviyede olması, hücreler enerji depolarındaki azalma ve toksik metabolitlerin birikimine bağlı olarak germ hücre ölümü gerçekleşir (9). Reperfüzyon safhasında hem SOR de (başlıca hidroksil radikalleri ve süpeoroksid anyonları olmak üzere) hem de RNT de (başlıca nitrik oksit ve onun peroksinitrit gibi toksik metabolitlerinde olmak üzere) ciddi artış olur (10-11). Bu serbest radikaller mitokondri ve hücre membranındaki lipidlerin peroksidasyonu yoluyla membran geçirgenliğinde artışa ve membran bütünlüğünde bozulmaya neden olur (12). Sonuçta iskemi nedeniyle oluşan germ hücre hasarı daha da artar.

Yapılan deneysel çalışmalarda, detorsiyon sonrası ortaya çıkabilecek bu hasar,dolayısı ile infertilite gelişimini önlemek için birçok madde kullanılmıştır (1 ,5 ,6 ,10 ,13 ,14). Tüm araştırmalara rağmen ek tedavi yöntemi olarak kabul edilebilecek, klinik adaptasyonu kolay ve yararı kanıtlanabilmiş yöntemler halen elde edilememiştir. Medikal ozonun kan akımını arttırıcı ve antioksidan etkisi vardır. Bu özellikleri nedeniyle iskemi-reperfüzyon hasarının yol açtığı doku tahribatlarında iyileştirici özelliği birçok çalışmada gösterilmiştir (15-25).

Medikal ozonun ülkemizde kullanımı artan bir tedavi şekli olması nedeni ile üzerinde çok sayıda deneysel ve klinik çalışma yapılmaktadır. Bu sayede birçok klinik

sorunda rutin kullanıma girmiştir. Medikal ozon tedavisinin iskemi-reperfüzyon hasarının yol açtığı doku tahribatlarında iyileştirici etkisi birçok çalışmada gösterilmiş olmasına rağmen(15,16), testis torsiyonuyla ilgili çalışma bulunmamaktadır. Biz bu çalışmamızda medikal ozonun testis torsiyonunda iskemi-reperfüzyon hasarına karşı etkisini ve bir tedavi şekli olarak kullanılabilirliğinin araştırılmasını amaçladık. Bunun için medikal ozonun etkisini oksidatif stres markırı olan doku MDA seviyesini ölçerek ve histopatolojik değişiklikleri değerlendirerek araştırdık. Böylece, özellikle reperfüzyon döneminin oluşturduğu toksik etkileri azaltarak veya engelleyerek fertilitiyi korumayı amaçladık. Çalışmamızın testis torsiyonu sonrası başarılı cerrahi tedaviye rağmen infertilite nedeni olan bu patolojiye yönelik ek tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine önemli katkısı olacağını düşünmekteyiz.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. TESTİS TORSİYONU

2.1.1. Tanım

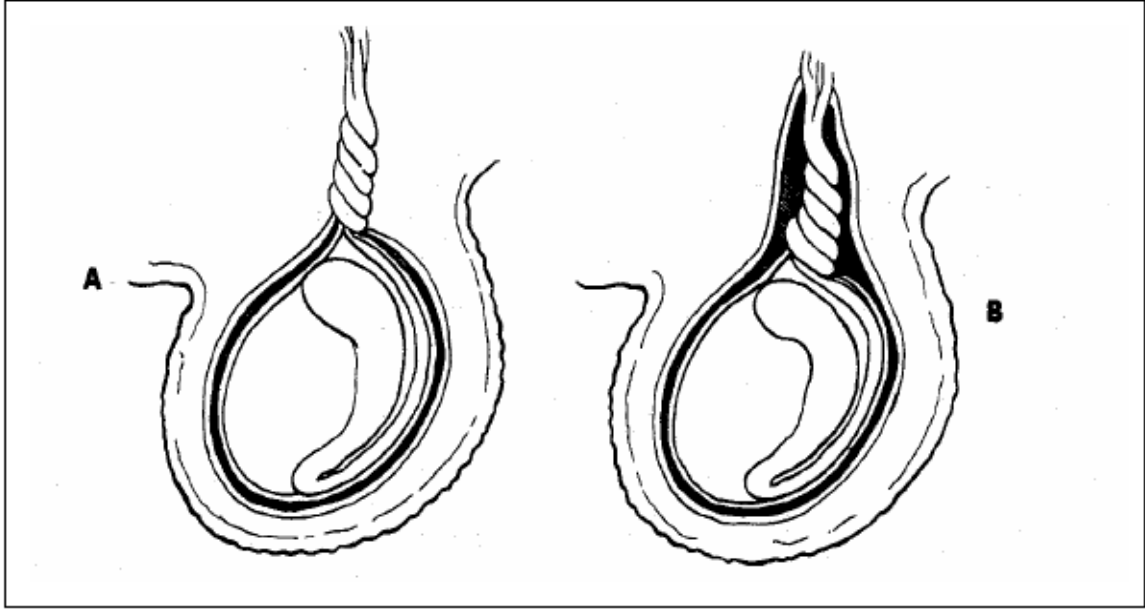
Testisin kendi etrafında dönmesi, testis kan akımının engellenmesi ve müdahale edilmediği takdirde testisin nekrozuna neden olur. Testisin torsiyone halde kaldığı süre uzadıkça testisin kurtarılma şansı giderek azalacağından testis torsiyonu gerçek bir acildir (26). Torsiyon sonrası önce venöz ve lenfatik akım durur ve ödem meydana gelir. Testis dokusunda artan basınçtan dolayı arteriel dolaşım önce yavaşlar, süreç devam ederse dolaşım durarak testiste iskemi meydana gelir (27). Olayın ilerlemesi ile testiste nekroza kadar gidecek süreç başlamış olur.

2.1.2. Anatomi

Bazı erkek çocuklar testis torsiyonuna karşı anatomik predispozisyon gösterirler. Normalde tunika vajinalis testisi ve epididimin anteriorunu kaplar. Epididim arkasında küçük bir çıplak alan kalır ve epididim bu çıplak yüzden skrotuma yapışır. Böylece testis, tunika vajinalis içinde epididime, epididimde arkadan skrotum duvarına tutunur ve testisin stabilizasyonu bu şekilde sağlanır (28).

Testisler, gelişimleri sırasında karın arka duvarındaki yerlerinden, kanalis inguinalis aracılığı ile skrotuma doğru inerlerken, kan ve lenf damarlarını da beraberlerinde sürüklerler. Bu yüzden testisleri besleyen arter ve venler batin içerisinde uzun bir seyire sahiptir. Testis ve epididimisin kanlanması sağlayan arteria testikularis, aorta abdominalisin bir dalıdır. Vena testikularis, testis ve epididimin venlerinin bir ağı olan pleksus pampiniformisten çıkar. Vena testikularis, kanalis inguinalisten yukarı doğru çıkarken tek bir ven haline gelir. Karın içindeki seyirleri sonrasında; sağ testiküler ven VKİ'ye, sol testiküler ven ise sol renal vene dökülür (28).

Testis torsiyonları tunika vajinalis içinde gerçekleşip gerçekleşmemesine göre ekstravajinal ve intravajinal torsiyonu diye sınıflandırılır(Şekil 1)



Şekil 1. Testis torsiyonu tipleri; A: Ekstravaginal, B: İnvaginal (1).

2.1.3 Histoloji

Seminifer tubuller, testis hacminin % 85-90'ını oluşturur ve farklı olgunlaşma evrelerindeki germ hücrelerini ve sertoli hücrelerini içerir.

Testisin yüzey epitelinden köken alan destek hücrelerine sertoli hücreleri denir. Sertoli hücreleri, sabit sayıda ve çoğalmayan hücrelerdir, seminifer tubullerin bazal membranına oturmuşlardır ve sıkı eklemlerle birbirine bağlanmışlardır. Sertoli hücreleri, peritubuler kontraktıl hücrelerinin (myoloid hücreler) katılımıyla kan-testis bariyerini oluştururlar. Bu bariyer, spermatogenezi kolaylaştıran ve germ hücrelerini immünolojik açıdan ayrıcalıklı bir konumda idame ettiren benzersiz bir mikroortam sağlar. Spermatozoalar, bağışıklık sisteminin olayın farkına varmasından uzunca bir dönem sonra, yani pubertede üretildiklerinden bu izolasyon önem taşır. Böylece spermatozoalar immünolojik açıdan korunmuş olurlar. Yani, bu bariyer spermatogenetik hücrelerin immün sistemle karşılaşmasını engelleyerek immünolojik bir infertiliteyi önler. Sertoli hücreleri bir taraftan gelişen germ hücrelerini beslerken, harab olmuş hücreleri ve diğer yabancı artıkları fagosite eder. Ayrıca sertoli hücreleri, androjen bağlayıcı protein ve inhibin üretir, androjen ve östrojenlerin katabolizmasını sağlar ve FSH reseptörü taşır(29).

Leydig hücreleri, gonadal kabarıklığın orjinal mezenşiminden köken alır. Testis kordonlarının arasında yani interstisyumda bulunurlar ve bu kordonların farklılanmaya

başlamasından hemen sonra gelişmeye başlarlar. Leydig hücreleri, lutein hormonun etkisiyle kolesterolden testesteron sentez ederler. Sertoli hücreleri iskemide daha erken dejenere olurken, leydig hücreleri ise iskemiyeye karşı daha dayanıklıdır (29).

Spermatojenik hücreler (germ hücreleri) bazal membrandan lümene doğru düzenli bir biçimde dizilmişlerdir. Spermatogonialar doğrudan bazal membran üzerinde bulunurlar ve daha sonra merkeze doğru primer spermatisitler ve spermatidler şeklinde sıralanırlar (29).

2.1.4. Patoloji

Testis torsiyonunda testis dokusunun zedelenmesinin mekanizmasının başlangıcında venöz tıkanıklık vardır. Bu durum testiste ödem ve ağrıya yolaçar . Testisin tunikası elastik olmadığından, venöz konjesyon arteriel dolaşımı bozar. Bir süre sonra venöz tromboz, daha sonrada arteriel tromboz ve testiküler infark gelişir.

Testis torsiyonunda gonadın canlılığı iki parametreyle yakından ilgilidir; torsiyonun derecesi ve süresi. Torsiyonun başlangıcı ile testisin canlılığını kaybetmesi arasındaki süre hastadan hastaya değişir. Bazı hastalarda testis iki saat içinde nekroz olabileceği gibi , 24 saat sonunda da dolaşımı fazlaca bozulmamış olabilir (30,31). Ancak genellikle ilk 4-8 saat çok önemlidir (27).

2.1.5. Klinik

Testis torsiyonunda en sık semptom olguların %80'inde ani başlayan skrotal ağrıdır. Ağrı istirahat halindeyken, çocuğun zıpladığı bir anda veya skrotumu hedef alan bir travma sonrasında da başlayabilir. Ağrı skrotum dışında kasığa veya aynı tarafta karın alt kesimlerinde yayılabilir. Bu yüzden alt karın ağrısıyla başvuran hastaların skrotal muayenesine özen gösterilmelidir (32).

Torsiyone olan tarafta skrotum cildi ödemli, hiperemik ve gergindir. Ayrıca reaktif hidroselde olabilir. Skrotum kapsamı ile birlikte yukarı seviyededir. Testisin yüksek bir yerleşimde ve transvers bir pozisyonda olması testis torsiyonunu işaret eder (32).

2.1.6. Tanısal Çalışmalar

Renkli doppler ultrasonografi akut skrotumun değerlendirilmesinde non-invazif olması ve sintigrafiyle neredeyse eşdeğer oranda testis torsiyonu tanısı koyabilmesi nedeni ile tercih edilmektedir. Renkli dopplerin en önemli özelliği skrotal duvardaki ve testis içindeki kan akımlarını ayırt edebilmesidir. Öncelikle normal testis değerlendirildikten sonra aynı ayarlar korunarak karşı taraftaki testis değerlendirildiğinde kan akımının azalmış veya kaybolmuş olması testis torsiyonunu gösterir. Epididim-orşitte ise kan akımı artmıştır (33,34).

Küçük çocuklarda testisin küçük olması nedeni ile hem renkli doppler hemde nükleer sintigrafinin güvenilirliği azdır. Görüntüleme yöntemlerinin yetersiz kaldığı olgularda hikaye ve fizik muayene bulgularına dayanılarak tanı ve tedavi amaçlı cerrahi müdahale yapılması doğru bir yaklaşım olacaktır (35).

2.1.7. Tedavi

Çocuklardaki akut skrotum olgularında testis torsiyonu düşünüldüğünde acil cerrahi eksplorasyon yapılması önerilir. Eksplorasyon intravajinal torsiyonlarda skrotal, ekstravajinal torsiyonlarında ise inguinal yaklaşımla yapılır.

Sağ testis saatin dönüş yönünün aksi istikametinde, sol testis ise saat yönünde detorsiyone edilir. Detorsiyon sonrası testis üzerine sıcak kompres uygulanır. Testisin renginin düzelmesi ve tunika albuginea'ya yapılacak küçük bir kesiden oksijene kan gelmesi ile testisin canlılığı değerlendirilir. Testis torsiyonunda en iyi sonuçlar ilk 6 saat içinde başvurmuş hastalarda alınır. Testis canlılığını koruyorsa tespit yapılır. Canlılığından kuşku duyulan, semptomları yaklaşık 12-24 saat olan olgularda ise tedavi tartışmalıdır. Postpubertal dönemde testiküler iskemi, kan-testis bariyerini bozarak çocuğun kendi spermatogonialarına karşı otoimmünize olmasına yol açmaktadır. Bu nedenle karşı taraftaki testisin de etkilendiğini savunan yazarlar postpubertal testis torsiyonlarında orşiektomi önermektedirler (36-41). Detorsiyone edilen testislerin iki yıllık takiplerinde %60 oranında atrofi ve karşı taraftaki testisler normal olmasına rağmen %80-95 oranında anormal sperm analizleri tespit edilmiş (36). Buna karşın prepubertal dönemdeki çocuklarda kan-testis bariyeri ve spermatogenez henüz olgunlaşmadığı için otoimmünizasyon olamayacağı ve bu çocuklarda canlılığından şüphe edilen testisin

yerinde bırakılarak tespit edilebileceğini belirten yazarlar vardır (42-44). Özellikle şikayetleri en az 24 saattir devam eden hastalarda orşiektomi yapılması konusunda fikir birliği mevcuttur.

Torsiyone testis detorsiyone edilirken veya orşiektomi yapılırken karşı taraftaki testis de tespit edilir. En az iki adet emilmeyen sütün ile testis tunika vajinalis'e tespit edilmesi en fazla tercih edilen yöntemdir. Torsiyone testis nekrotikse veya abse mevcutsa karşı taraftaki testisin sabitlenmesi enfekte olmaması için aynı seansta yapılmaz (35).

2.2. İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI

2.2.1. Tanım

Bir organa gelen kan akımının çeşitli nedenlerle yetersiz hale gelmesine veya duraklamasına iskemi denir. Reperfüzyon ise dokunun kanlanmasının yeniden başlamasıdır (63). İskemi sırasında oksijen miktarının metabolik ihtiyaçlara oranla düşük olması, hücresel enerji depolarındaki azalma ve toksik metabolitlerin birikimine bağlı olarak hücre ölümü meydana gelebilir (9). Reperfüzyon safhasında hem SOR da, hemde RNT de ciddi artış olur (10,11). Reperfüzyon hasarının fizyopatolojisinde SOR'un önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir (46,47).

İskemi sonrası oluşan hipoksi, hücre hasarı ve ölümünün en sık nedenlerinden biridir. Hipokside hücre içi oksijen azlığı nedeniyle aerobik solunum aksar ve mitokondrideki oksidatif fosforilasyon engellenir. ATP üretimi azalır yada tamamen sona erer. ATP kaybı sonucu ATPaz aktiviteside azalır. Bu hücre zarında bulunan aktif sodyum pompası yetersizliği ve beraberinde hücre içinde sodyum birikimi olur. Hücre içi potasyum hücre dışına atılır ardından su hücre içine girer ve hücre sel şişme meydana gelir. Hücre sel şişmesinin bir nedeni de katabolitlerin birikimidir (48,49).

Hücrenin enerji metabolizmasında bu süreç içerisinde glikoza bağımlı hale gelir. Glikojen depoları hızla azalır. Glikoliz, laktik asit ve fosfat türevlerinin hidrolizi ile inorganik fosfatların birikimine buda hücre içi Ph'yı düşürerek asidoza neden olur. Sonrasında granüllü endoplazmik retikulumdan ribozomlar ayrılır ve protein sentezi azalır .Hipoksi devam ederse membran geçirgenliği artar ve mitokondri fonksiyonları yavaşlar. Bunların sonucunda organeller su alarak şişer ve sonuçta hücrede belirgin şişme meydana

gelir. İskemi bundan sonrada devam ederse geri dönüşümsüz hücre zedelenmesi başlar (49).

Eğer iskemi düzeltilirse dokuda yeniden dolaşım başlayacaktır. Reperfüzyon oluşmazsa, hücrede öldürücü iskemik zedelenme gelişir fakat yüksek düzeylerde serbest radikaller oluşmaz (48-50). İskemi sırasında küçük oranda serbest radikal oluşmaktaysa da, reperfüzyon döneminde dokunun yeniden oksijenlenmesinin ardından çok daha büyük miktarlarda serbest radikal oluşmakta ve bunlar doku hasarını daha da artırmaktadır (51).

Reperfüzyon döneminde gözlenen hasarda ,hücre içine moleküler oksijen girişi ile hızla oluşan SOR başta olmak üzere bir çok mekanizma rol oynamaktadır. Reperfüzyon hasarına en fazla duyarlı olan hücresel yapılar zar lipitleri, proteinler, nükleik asitlerdir (52).

Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikallerin endojen kaynakları oksijen, nitrit oksit, uyarılmış nötrofil, mitokondrial elektron transport sistemleri, endoplazmik retikulum, peroksizom, plazma membranı sayılabilir. Reperfüzyonda mikrovasküler permabilededeki artışta başlıca nötrofillerin sorumlu olduğu gösterilmiştir (53). İskemi-reperfüzyon ile lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adezyonu meydana gelir (54). Diğer taraftan nötrofiller yüksek miktarda SOR üretme kapasitesinede sahiptir (55).

2.2.2. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller

Fizyolojik ve patolojik reaksiyonlar esnasında başka moleküller ile kolayca elektron alışverişine girip onların yapısını bozan moleküllere serbest radikaller denir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan radikaller olup bunlara serbest oksijen radikalleri denir. Bunların en önemlileri süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleridir. Serbest radikaller hücrelerin protein, DNA, karbonhidrat, lipidler ve diğer molekül grupları ile reaksiyona girerek onların metabolizmalarını etkilerler (56,57).

Oksijen canlılar için hayati önemi olan bir moleküldür ve hücrede enerji üretim süreçlerinde kullanılır. Fizyolojik olarak SOR enerji üretim süreçlerinin doğal bir yan ürünü olup yüksek düzeyde reaktif ve potansiyel olarak zararlı maddelerdir (58). SOR'un

oluşumu ve bunların oluşturduğu hasarı önlemek için vücut antioksidanlar olarak bilinen bir çok savunma sistemi geliştirmiştir. SOR'un oluşum hızı ve bunların antioksidanlar tarafından nötralize edilme hızı arasında bir denge bulunması beklenir. Böylece hücre serbest radikallerin olumsuz etkilerinden korunur. Eğer bu denge serbest radikaller lehine bozulursa, yani yapımdan daha yavaş nötralize edirlirse, hücrede serbest radikaller artar. Serbest radikallerin hücrede artışı ve hücre fonksiyonları üzerinde yaptığı olumsuz etkiye "oksidatif stres" denir (56). Bu durum SOR oluşumu ile antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (56,57).

2.2.3. Antioksidan Sistemler

Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve bunların oluşturduğu hasarı önlemek için vücut antioksidanlar olarak bilinen birçok savunma sistemi geliştirmişlerdir. Antioksidanlar oksijen radikallerinin yıkıcı reaksiyonlarını engelleyerek veya bu radikalleri toplayarak zararlı etkilerini inhibe ederler. Antioksidanlar endojen veya eksojen kaynaklı olmak üzere iki gruba ayrılır. Ayrıca enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılırlar. Enzimatik antioksidanlar arasında en önemli olanları süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi enzimlerdir. Enzimatik olmayanlar arasında ise tokoferol, beta karoten, askorbik asit, urat, sistein, seruloplasmin, transferin ve albumin sayılabilir (59).

Antioksidanlar etki mekanizmalarını serbest radikalleri tutarak veya daha zayıf yeni bir moleküle çevirerek, serbest radikal ile etkileşip aktivitelerini azaltarak, serbest radikalleri kendilerine bağlayıp reaksiyon zincirini kırarak yada onarım yaparak gösterirler (59).

İskemi-reperfüzyon hasarıyla ilgili yapılan biyokimyasal çalışmalarda bakılan süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz antioksidan defans enzimleridir. İskemi-reperfüzyon hasarı bu enzimlerde belirgin azalmaya neden olmaktadır (60).

Son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit anyonu antioksidan bir enzim olan süperoksit dismutaz aracılığı ile daha az zararlı olan hidrojen peroksit dönüşmektedir. Hidrojen peroksit ise dokularda bulunan katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz kılınır

(56,57) .

2.3. TESTİSTE İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI

Testis steroidogenez ve spermatogenez üretimini desteklemek amacı ile antioksidan açıdan korunmasına rağmen bazı endojen ve eksojen faktörler bu savunmayı alt-üst ettiği ve oksidatif stres meydana getirdiği bilinmektedir. Bu faktörlerden bazıları testis torsiyonu, inmemiş testis, varikosel, diyabet, enfeksiyon, hipertiroidizmdir.

Testis torsiyonu ve detorsiyonunun tipik bir iskemi-reperfüzyon durumu olup iskemi süresine bağlı olarak germinal epitelde irreversibl değişiklikler olduğu ve bununda fertilitiyi olumsuz yönde etkilediği klinik ve deneysel olarak belirlenmiştir (61-64) . Testisteki bu hasar nötrofil infiltrasyonu ve oksijen radikallerinin artmasıyla da yakından ilişkilidir(65)

Testis torsiyonu tipik bir iskemi –reperfüzyon hasarlanması modeli olduğundan, etkili olan mekanizmalara müdahale edilerek testis harabiyeti dolayısıyla fertilitiyeteneğinin önlenmesi mümkün görülmektedir (66,67) .

2.3.1. Testisin İskemik Hasarlanmalarında Antioksidan Tedavi

Antioksidanlar, çeşitli hastalıkların oluşmasında tetikleyici rol oynayan ‘‘oksidatif stres’’ sonucu açığa çıkan serbest radikallerin üretilmesini engellemekle vazifelendirilmiştir.

Canlı hücrede bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen ve/veya geciktirebilen maddelere antioksidan ve bu olayada antioksidan savunma denir. Vücutta bulunan antioksidan savunma sistemleri, serbest radikalleri tesirsiz hale getirmeye çalışır. Ancak savunma sistemlerinin yeterli olmadığı durumlarda güncel bir metod olan ve erkek infertilite nedenlerinde de kullanılan antioksidan tedavi devreye girmektedir. Antioksidan tedavi ile lipid peroksidasyon potansiyelinin azaltılması, fertilizasyon oranlarının gelişimiyle paralellik göstermektedir (68-74) .

Testis torsiyonunda dokuların torsiyondan etkilenme derecesinin iskemi süresi ve derecesiyle doğrudan ilişkili olduğu bilinmektedir (75). Bu yüzden testis torsiyonuna

yönelik acil cerrahi müdahale, alternatif medikal tedavi modellerinin araştırılmasına rağmen hala geçerliliğini koruyan ve en yaygın uygulanan tek tedavi şeklidir (6,61,62).

Testis torsiyonunun cerrahi olarak düzeltilmesi yanında, iskemi-reperfüzyon hasarında etkin olan mediatörlere yönelik medikal tedavinin testis dokusu hasarını azaltabileceği gösterilmiştir (1). Yapılan bu çalışmalarda melatonin, amrinon, pentoksifilin, diklofenak, N-asetil sistein, NO gibi antioksidan olarak etkinliği deneysel modellerde gösterilmiş maddeler kullanılmıştır (76-80).

2.4. OZON GAZININ TIBBİ AMAÇLI KULLANILMASI

2.4.1. Medikal Ozon Uygulamalarının Tarihçesi

Ozonun tıbbi amaçla kullanımının ilk olarak 1.Dünya Savaşı sırasında alman askerlerinin gangren ve benzeri ciddi yaralanmalarını tedavi eden Dr. Albert Wolff'a dayanır. 1935 de ise berlinde toplanan 59.Alman Cerrahi Birliği toplantısında Dr. Erwin Payr "Cerrahide Ozon Uygulamalar" başlığı altında kendi vakalarından oluşan derleme türünde bir sunum yapmıştır (81,82). Bu tarihten sonra 80'li yıllara kadar, ozon tedavisini münferit olarak uygulayan çeşitli hekimler ve araştırmacılar olmuş, 1980'li yıllardan itibaren ise tıbbi amaçla ozon kullanımına yönelik gerek bilimsel çalışmalar, gerek vaka serileri literatürde artmaya başlamıştır.

Medikal ozon tedavisi belirli bir miktarda oksijen-ozon karışımının vücut boşluklarına yada kan dolaşımına uygulanmasıdır (83). Medikal ozon tedavisinin klasik uygulaması haline gelmiş olan yöntem 1974 yılında Wolff tarafından tarif edilmiştir. Bu yöntemde; bir miktar kan (50-270cc) vücut dışına alınarak ozona dayanıklı bir cam şişede 5-10 dk oksijen-ozon karışımıyla temas ettikten sonra tekrar kanın aynı kişiye geri verilmesidir (ototransfüzyon) (81-85). Bu uygulama şekli major otohemoterapi olarak adlandırılmaktadır (86).

Ozon reaktif bir molekül olduğu için tıbbi amaçlı kullanımda dikkat edilmesi gereken bazı durumlar vardır. Ozon hiçbir zaman saf olarak verilmemeli ve belli oranda oksijenle karıştırılarak uygulanmalıdır. Bu karışımda oksijen %95'ten az, ozon %5'ten fazla olmamalıdır. Normal atmosfer havasının bu karışıma girmesi engellenmelidir. Çünkü ozonun reaktif özelliğinden dolayı hava ile teması sonucu toksik bir gaz olan

nitrojendioksit oluşabilmektedir. Ayrıca emboliye sebep olmaması için medikal ozon gaz olarak damar sistemine verilmemelidir. Tüm bu işlemler sırasında ozona dayanıklı malzemeler kullanılmalıdır (83).

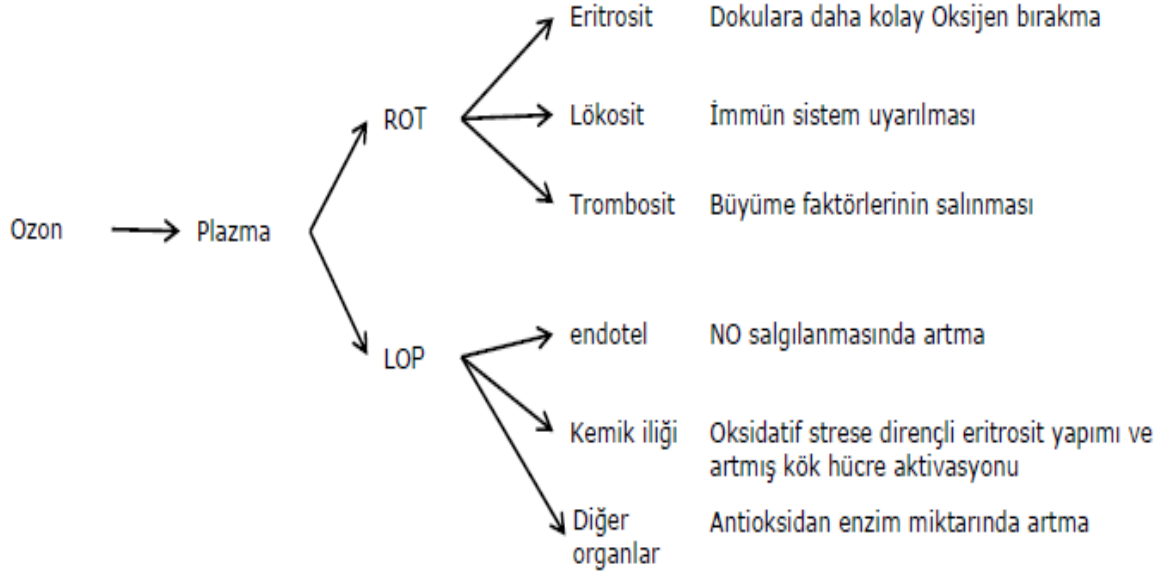
2.4.2. Medikal Ozonun Etki Mekanizması

Ozon diğer gazlar (CO₂, O₂) gibi suda çözünebilir. Ozon oksijene göre 1,6 kat daha yoğun ve suda çözünürlüğü 10 kat daha fazla olan bir moleküldür. Çözünmesi ısı, basınç ve konsantrasyonuna bağlıdır. Biyolojik sıvılarda ozon oksijenden farklı olarak hızlıca biyomeleküller ile reaksiyona girer. Dolayısıyla uygulanan medikal ozon karışımındaki ozon, sırasıyla çoklu doymamış yağ asitleriyle, antioksidanlarla ve sistein gibi sülfhidril grubu tiyol bileşiklerle reaksiyona girer. Ozonun miktarına bağlı olarak karbohidratlar ve proteinler bu reaksiyonlardan etkilenebilir. Tüm bu bileşikler ozon karşısında elektron donörü gibi davranarak oksitlenirler. Sonuçta süperoksit, hidrojen peroksit ve hipoklorit gibi reaktif oksijen türevleri oluşur. Bu reaksiyonlardan en önemlisi doymamış yağ asitlerinin oksidasyonudur (83). Bu reaksiyonda her hidrojen peroksitle birlikte iki de lipid oksidasyon ürünü oluşmaktadır (87-90).

Hidrojen peroksitin ozonun tedavi edici etkinliklerinin en az bir kısmından sorumlu ikincil haberci gibi davrandığı kabul edilmektedir. İlk etkilerinden biri eritrositlerdeki 2,3-difosfogliserat düzeyini artırma yolu ile hemoglobin-oksijen ayrışma eğrisinin sağa kaymasına ve böylece oksijenin dokulara daha kolay bırakmasına neden olmasıdır. Plazmada konsantrasyonu artan hidrojen peroksit kolayca hücrelerin içine diffüze olarak lökosit ve endotelial hücrelerde çeşitli interferon, interlökin ve transforme edici büyüme faktörü yapımında arttıran uyarıları tetikler (91). Lipid oksidasyon ürünlerinin yarı ömürleri ise saatlere varabilmekte, dolayısıyla ömrü çok kısa olan reaktif oksijen türevlerinin ilk etkileri sonrasında ozonun geçikmiş etkilerinden sorumlu tutulmaktadır. Uzun yarı ömürlerinden dolayı bu ürünler dokularda çeşitli biyolojik etkiler gösterirler (91-93). Medikal ozona maruz kalınması doza bağımlı olarak trombosit fonksiyonlarının artışına neden olmaktadır. Aktive olmuş trombositler içlerinde bulunan büyüme faktörlerini salarak iskemi ve ülserli hastalarda iyileşmeye olumlu etkileri gösterilmiştir (94). Ayrıca oksidatif stres oluşturularak medikal ozonun etkilerinin araştırıldığı bir çok çalışmada SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzim düzeylerinin arttırdığı ve MDA düzeylerinin azalttığı ve sonuçta dokuların iskemi-reperfüzyon

hasarından koruduğu gösterilmiştir (95).

Medikal ozon sonrası oluşan terapötik etkiler aşağıdaki gibidir (96).



Görülüyorki; ozonun biyolojik etkilerinin ortaya çıkması için serbest radikallerin varlığı önemlidir. Serbest radikaller çeşitli patolojik süreçlerin gerek başlatıcısı, gerek ara basamaklarda işe karışabilen , gerekse sonunda ortaya çıkabilen reaktif maddelerdir. Bunlar organizmada aerobik solunum sırasında mitokondri ve fagositlerde solunum patlaması gibi çeşitli fizyolojik durumlarda da oluşabilmektedir (97).

Son zamanlara kadar oksidatif stresin hücre hasarındaki rolü ve hastalıkların altında yatan patolojik süreçlerde oksidatif stresin artış mekanizmaları ve etkilerini açıklayan yüzlerce çalışma yapılmıştır (98-103). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda ise oksidatif stresin bilinen ters etkilerinin de olabileceği görülmüştür. Bu çalışmalarda oksidasyon / redüksiyon reaksiyonlarının başta hücre içi haberleşme olmak üzere biyolojik mekanizmalarda da rol aldığı gösterilmiştir. Gerek reaktif moleküller gerekse bunların çeşitli biyolojik moleküllerle reaksiyona girmesi sonucu ortaya çıkan oksidasyon ürünleri düşük konsantrasyonlarda hücrede önemli roller üstlenmektedir (103-106).

Genel olarak medikal ozona maruz kalma ile biyolojik fonksiyonları zararlı etkiler olmadan aktive etmek için vücutta gerekli olan geçici oksidatif stres meydana getirilir. Bu nedenle uygulanan medikal ozon dozu fizyolojik mekanizmaları aktive edecek kadar yeterli olmalı (eşik değerinin altında olmamalı), ancak hücre içi antioksidan sistemleri

tamamen azaltan ve hasara sebep olacak kadar çok olmamalıdır (91).

Medikal ozonun biyolojik etkilerini açıklamak için yapılan çalışmalarda daha çok major hemoterapi model alınmıştır (18,86,107,108). Uygulanan ozon / oksijen karışımındaki ozon plazmada hızla çözünür. Sıvılarda çözünürlüğü fazla olan ozonun bir kısmı plazmada bulunan antioksidanlarla reaksiyona girerek bunların miktarını azaltır. Bu anlık olaylar sırasında reaktif oksijen türevleri oluşabilmektedir. Bu radikallerin yarı ömrü çok kısa olduğu için bunlar ortadan kalkarak yerlerini lipid oksidasyon ürünlerine bırakırlar. Bu ürünler büyük oranda kandaki hakim hücre olan eritrositlerin membranlarının oksidasyonu ile ortaya çıkar. Eritrosit membranındaki doymamış yağ asitleri oksidasyona çok duyarlıdır. Bu reaksiyonlar sırasında ortaya çıkan hidrojen peroksit, molekül yapısı itibariyle radikal olmayan oksitleyici bir moleküldür(83,91,93,).

Medikal ozonun konsantrasyonuna bağlı olarak artan kuvvetli okside edici özelliği nedeniyle belli bir orandan sonra vücut için toksik olabileceği gerçeğini unutmamak gerekmektedir. Doğal olarak, organizmadaki antioksidan savunma sistemleri ozon oksidasyonuna karşı koyacaktır. Organizmanın sahip olduğu antioksidan kapasite ve antioksidan enzimler medikal ozonla karşılaşma sonrası başlangıçta antioksidan kapasite ve enzimlerin aktivitesi azalmakta kısa bir süre sonra ise antioksidan savunma sistemlerinin düzeyleri artmakta ve organizmada deneysel veya hastalık nedeniyle oluşmuş olan oksidatif stres üzerine olumlu etkinliği gösterilmiştir (15,16,109,110). Bocci ve Carlo yaptıkları çalışmada, değişik dozlarda medikal ozon uygulanması sonrası glutatyon ve total antioksidan seviyesinde azalma, lipid peroksidasyonu ve okside glutatyon düzeyinde artma olduğunu göstermiş, uygulamanın 20 dakika sonrasında ise antioksidan düzeylerinin eski haline döndüğünü tespit etmişlerdir (108).

2.4.3. Medikal Ozon Tedavisinin Yan Etki ve Kontrendikasyonları

Ozon tedavisinin yan etkisi yok denecek kadar azdır. Şimdiye kadar bildirilen yan etkiler uygulama hatalarına bağlı lokal komplikasyonlardır. Bazı durumlarda ozon terapisi uygulanması sakıncalı olabilir. Bu durumlar: glukoz 6 fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği, özellikle erken dönem olmak üzere hamilelik, ACE inhibitörü tedavisi görenler, hipertiroidi, kanama bozukluğu, kontrol altına alınamayan kardiyovasküler hastalıklar ve ozona reaksiyon gösteren astım hastaları olarak sıralanabilir (111).

2.4.4. Medikal Ozon Tedavisinin Klinik Uygulamaları

Ozon tedavisinin özellikle inflamatuvar sürecin yoğun yaşandığı ve immün sistemin ön planda yer aldığı fizyopatolojik durumlarda sık olarak kullanılır hale gelmiş ve etkinliği gösterilmiştir. Ozon uygulamaları yara iyileşmesi, yaşa bağlı maküler dejenerasyon, iskemik ve enfeksiyöz hastalıklarda yapılan vaka analiz çalışmalarında olumlu etkiler gösterilmiştir. Bunun yanında basit diş ve ağız enfeksiyonlarından hepatitlere kadar uzanan geniş bir aralıktaki çeşitli enfeksiyon hastalıklarında etkin olarak uygulanmaktadır (112-114). Martinez –Sanchez ve arkadaşları diyabetik ayak gelişmiş hastalarda yaptıkları çalışmada ozon tedavisinin etkinliğini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada ozon tedavisi uygulanan hastalarda antibiyotik tedavisi alanlara göre yara iyileşmesi hızlanmış, hastanede kalma süreleri kısalmış, kan şekeri düzeyleri daha iyi kontrol edilebilmiş ve antioksidan enzim düzeyleri artmış olarak bulunmuş (17). Çeşitli derecelerde artrit, artroz ve lomber disk herni ile romatizmal hastalıkları da kapsayan vakalarda etkileri gösterilmiştir. Buna örnek olarak Mutu ve arkadaşlarının lomber disk hernisi olan hastalarda disk içine medikal ozon enjeksiyonu yaptığı çalışmada, gerek hasta memnuniyeti gerekse medikal olarak yapılan değerlendirmede bu tedavi yönteminin yararlı olduğunu rapor etmişler(115). Ayrıca deneysel olarak iskemi-reperfüzyon modeli oluşturulan ratlarda oksidatif stresten koruyucu etkisi ve antioksidan kapasite ve enzim aktivite düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir. Güven ve arkadaşlarının yaptığı iki ayrı deneysel çalışmada, nekrotizan enterokolit ve kostik özefagus yanığı oluşturulan ratlara intraperitoneal verilen medikal ozonun oksidatif stres markırı olan MDA yı azalttığı ve antioksidan enzim miktarlarını arttırdığı gösterilmiş olup ayrıca iyileşme sürecini olumlu etkilediği bulunmuştur (15,16). Aslan ve arkadaşlarının yaptığı başka bir deneysel çalışmada ise ratlarda over torsiyonu oluşturulmuş ve periton içine verilen medikal ozonun over dokusunda oluşan iskemi-reperfüzyon hasarında histopatolojik ve biyokimyasal belirteçlerde olumlu değişiklikler sağladığı gösterilmiştir(95).

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma KTÜ Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı tarafından planlanıp 2011/9 dosya 1 karar nolu etik kurul izni alındıktan sonra Biyokimya ve Embriyoloji-Histoloji Anabilim Dallarının katkılarıyla yapılmıştır. Çalışmada KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi tarafından sağlanan ağırlıkları 250-300 gram arasında olan 32 adet Sprague-Dawlen tipi rat kullanıldı. Ameliyatlar KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Laboratuvarında yapıldı. Ratlar ameliyat öncesi 24 saat süreyle aç bırakıldı ve bu süre içerisinde sadece su verildi.

Tablo 1 Her grupta 8 adet rat olmak üzere 4 grup oluşturuldu.

| | |
|--------|---|
| Grup 1 | Sham grubu |
| Grup 2 | Torsiyon-Detorsiyon grubu |
| Grup 3 | Torsiyon-Detorsiyon sonrası 1 kez medikal ozon verilen grup |
| Grup 4 | Torsiyon-Detorsiyon sonrası 2 kez medikal ozon verilen grup |

Tüm cerrahi işlemlerde anestezi intraperitoneal yolla uygulanan 10 mg/kg ksilazin ve 50 mg/kg ketamin hidroklorid verilerek yapıldı. Ameliyat bölgesi traş edilerek betadin solüsyonla temizlendi. Ameliyatlarda skrotal orta hattan yapılan insizyon kullanıldı. Torsiyon yapılan gruplarda; sol testis saat yönünde kendi etrafında 720 derece döndürülmesiyle torsiyon oluşturuldu.

Grup 1: Anestezi sonrası skrotal orta hattan yapılan vertikal kesi ile sol testis dışarı alınıp gubernakulum kesildi ve daha sonra testis skrotuma anatomik pozisyonda yerleştirilip tüm katlar 4/0 ipekle kapatıldı. 24 saat sonra bilateral orşiektomi yapıldı.

Grup 2: Bu gruptaki ratlara grup 1 deki işlemler aynen yapıldıktan sonra sol testis saat yönünde 720 derece döndürüldükten sonra testis detorsiyone olmasın diye tunika albuginea dan geçilen dikişlerle üç yerden skrotuma tespit edildi. Sonra skrotal katlar kapatıldı. Torsiyon işleminden iki saat sonra testis katları açılarak testis detorsiyone edildikten 24 saat sonra iki taraflı orşiektomi yapıldı. Bu gruba anestezi hariç hiçbir ilaç uygulaması yapılmadı.

Grup 3: Bu gruptaki ratlara iki saat süreli torsiyon işlemi uygulandıktan sonra intraperitoneal 1 mg/kg dozunda medikal ozon verildi. Sonra testis detorsiyone edilerek anatomik pozisyonda skrotuma yerleştirildikten sonra anatomik katlar kapatıldı ve 24 saat sonrasında da iki taraflı orşiektomi yapıldı.

Grup 4: 3.gruptadaki işlemlerden orşiektomi hariç hepsi uygulandı ve ilave olarak ilk medikal ozon uygulamasından 24 saat sonra aynı miktarda ikinci doz medikal ozon verildi .Bu işlemlerden 24 saat sonra(detorsiyondan 48 saat sonra) iki taraflı orşiektomi yapıldı.

Elde edilen dokular 2 parçaya bölündü. Elde edilen testis dokusunun yarısı derhal sıvı nitrojen ile işlem edilerek donduruldu ve biyokimyasal incelemeler yapılana kadar -80 derecede saklandı. Diğer yarısı ise histolojik incelemeler için ayrıldı.

3.1. BİYOKİMYASAL İNCELEME

Lipid peroksidasyon ürünü olan MDA ölçümü yapıldı.

3.1.1. Testis Dokusunda MDA Düzeyinin Belirlenmesi

Ratlardan elde edilen ve -80 C^0 de saklanan testis dokularında MDA düzeyi Mihara ve Uchiyama tarafından geliştirilen metod ile tayin edildi (116). Lipid peroksidasyon ürünü MDA ile TBA arasındaki reaksiyon sonucu oluşan kırmızı renk spektrofotometrik olarak ölçüldü. TBA ile reaksiyona girerek aynı rengi veren suda çözünür maddeleri uzaklaştırmak için serum lipidleri proteinle birlikte fosfotungistik asit/sülfirik asit sistemiyle çöktürüldü.

Testis dokuları tartılarak 0,5mL/L triton-X 100 içeren %1,15 KCl çözeltisi ile homojenize edildi (% 10 ağırlık/hacim). Homojenizasyon için 9500 rpm (4x10s, 4^0C)’ de Ultra-Turrax homejenizatör (model T25, Jane and Kunkel, Germany) kullanıldı.

Deneyin Yapılışı :

1.500 µL homojenata 3 mL % 1’ lik H_3PO_4 eklenerek karıştırıldı.

2.Karışıma 1 mL % 0,672 lik TBA eklendikten sonra 45 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi.

3.2 mL n-bütanol eklendi.

4.Oda sıcaklığında 4000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi.

5.Organik faz alınarak 532 nm dalga boyunda absorbanslar okundu.

6.1 mmol 1,1,3,3-tetrametoksipropan 100 mL 0.01 M HCl içinde 50 °C' de 1 saat inkübe edildi ve bu bileşiğin hidrolizi sonucu oluşan MDA çözeltisinden 10, 5, 3,2,1, 0.5 nmol/mL çalışma standartları hazırlandı. Elde edilen sonuçlarla standart grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak plazma MDA miktarı nmol MDA/gram ıslak doku olarak hesaplandı.

3.2. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Testis dokularının yaklaşık aynı kısımlarından alınan doku örnekleri histopatolojik değerlendirme yapılması için Bovin solüsyonu içinde 72 saat fikse edildi. Fikse edilen doku parçaları %70, %90, %96 ve %100 lük dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Daha sonra ksilen solüsyonundan geçirilerek şeffaflaştırıldı. Dokuların parafin blokları hazırlandıktan sonra tam otomatik mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler deparafinizasyon işleminden sonra hematoxilen-eozin (H&E) ile boyandı. Hazırlanan preparatlar Işık mikroskopik (Olympus BX 51; Olympus Optical Co, Ltd ,Tokyo, Japan) olarak değerlendirildi. Histopatolojik değerlendirme çalışma gruplarından habersiz bu konuda deneyimli bir histolog tarafından yapıldı.

Testis dokularının hasarı iki farklı derecelendirme sistemi kullanılarak yapıldı. Birincisi Histopatolojik Hasar Derecelendirme Skorlaması (75) ; her bir gruba ait testis preparatından elde edilen bulgular dikkate alınarak Tablo 2'de tanımlanan kriterlere göre derecelendirildi.

Tablo 2. Histopatolojik Hasar Derecelendirme Skoru

| |
|--|
| <p>Grade 1Düzenli normal testiküler yapı, düzenli germinal hücreler mevcut.</p> <p>Grade 2Seminifer tubul germinal epitelinde az hasar mevcut, germinal hücreler lümene dökülmüş</p> <p>Grade 3Seminifer tubul germinal epiteli düzensiz, germinal epitel hücreleri arasında açılmalar mevcut.</p> <p>Grade 4Seminifer tubuller germinal epiteli hemen hemen tamamen dökülmüş, germinal epitel hücreleri düzensiz bir şekilde lümene dökülmüş.</p> |
|--|

İkincisi; Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlamasıdır(JTBS). Bu skorlamada ışık mikroskopisinde yüksek büyütmede (200X) 5 farklı alanda testis dokuları yarı kantitatif olarak değerlendirildi (Tablo 3) (117).

Tablo 3. Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması

| |
|---|
| <p>Skor Tanımlama</p> <p>Tubuler bölümlerde hiç hücre yok</p> <ol style="list-style-type: none">1. Germ hücreleri yok, ancak sertoli hücreleri mevcut2. Germ hücreleri sadece spermatogonia hücrelerinden oluşmuş3. Sadece birkaç adet spermatosit mevcut (her 5 tubulde)4. Çok sayıda spermatosit mevcut5. Sadece birkaç adet spermatid mevcut (her 5 tubulde)6. Diferansiyasyonun olmadığı çok sayıda spermatid mevcut7. Spermatozoa maturasyonunun olmadığı geç spermatidler mevcut8. Sadece birkaç adet spermatozoa mevcut (her 5 tubulde)9. Çok sayıda spermatozoanın olduğu tamamlanmış spermatogenez |
|---|

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin istatistiksel analizinde iki değişik metod kullanıldı. Veriler, ölçümsel ve normal dağılıma uymadığı için 4 grup karşılaştırılırken; Kruskal Walls varyans analizi, gruplar ikişerli karşılaştırılırken Mann Whitney-U testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi Kruskal Walls'te $P < 0.05$ olarak alındı. Mann Whitney-U testinde ise $P < 0.05$ /karşılaştırılan grup sayıolarak anlamlı kabul edildi. Herbir grupta sağ ve sol

testislerin incelenen parametreler açısından karşılaştırmaları ise Wilcoxon testi ile yapılmıştır.

4.BULGULAR

4.1. TESTİSTEKİ HASARIN BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu deneysel çalışmada oluşturulan dört gruptaki ratlardan elde edilen testislerin MDA değerleri Tablo 4’te verilmiştir. Her bir grubun sol ve sağ testisin MDA değerlerinin Wilcoxon analiz testiyle yapılan karşılaştırmalarında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmuştur(p=0.012)(Tablo 4).

Tablo 4. Tüm grupların MDA değerleri

| Gruplar | Ortalama sol testis MDA (nmol/ml) | Ortalama sağ testis MDA (nmol/ml) | P |
|---------|------------------------------------|-----------------------------------|-------|
| Grup1 | 207,028 SS: 7,0699 | 134,684SS:22,3557 | 0,012 |
| Grup2 | 292,709 SS:26,9873 | 126,727 SS:12,0545 | 0,012 |
| Grup 3 | 212,83 SS:16,0760 | 140,112SS:45,3885 | 0,012 |
| Grup 4 | 213,536 SS:28,3153 | 140,216SS:27,3795 | 0,012 |

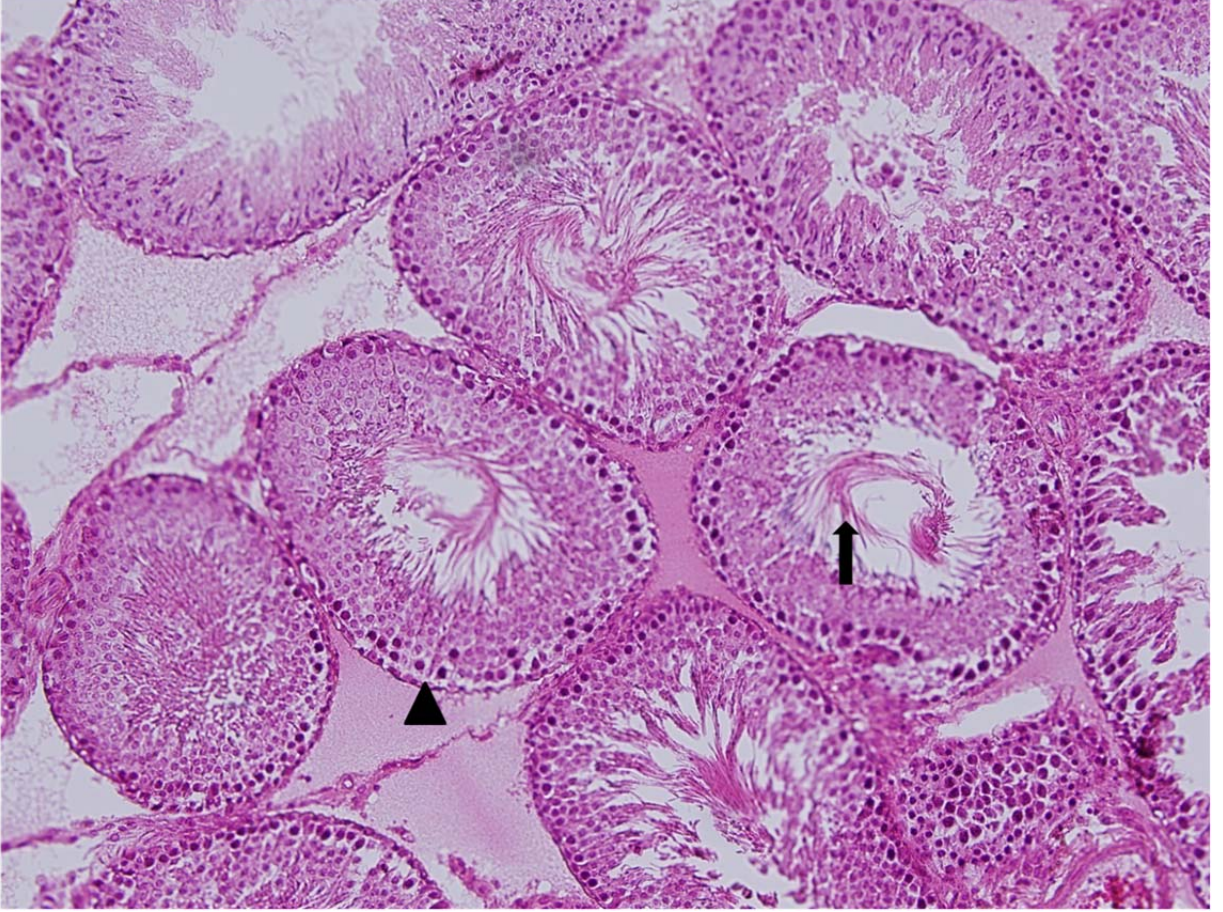
Sol Testiste Grup1-Grup2, Grup2-Grup3, Grup2-Grup4 ‘ün Mann Whitney-U testiyle karşılaştırmaları istatistiksel olarak anlamlıdır (P<0,05).Diğer gruplar arasındaki karşılaştırmalar anlamsızdır.(Tablo 5)

Tablo 5: Grupların sol testis MDA değerlerinin birbirleri arasında karşılaştırılması verilmiştir

| Sol Testis | Ortalama MDA (nmol/ml) | P |
|-------------|------------------------|----------|
| Grup1-Grup2 | 207,028 – 292,709 | P<0,005 |
| Grup1-Grup3 | 207,028-212,838 | anlamsız |
| Grup1-Grup4 | 207,028- 213,536 | anlamsız |
| Grup2-Grup3 | 292,709 – 212,838 | P<0,005 |
| Grup2-Grup4 | 292,709 – 213,536 | P<0,005 |
| Grup3-Grup4 | 212,838- 213,536 | anlamsız |

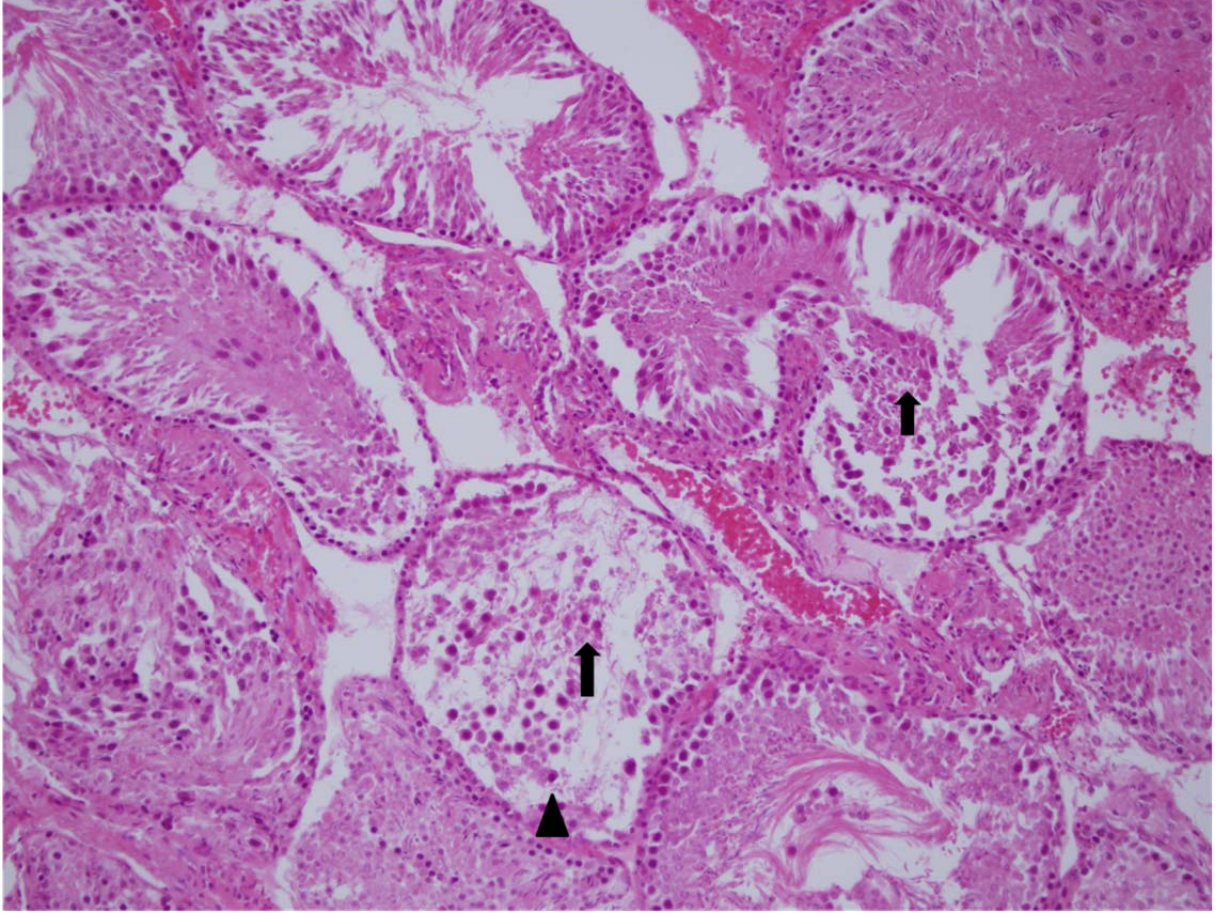
4.2. TESTİSTEKİ HASARIN HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ

Çalışma gruplarının ışık mikroskopik olarak değerlendirilmesinde , kontrol grubuna ait ratlarda sol testislerinde normal histolojik yapısı izlendi. Seminifer tubul germinal epiteli düzenli dizilimli ve seminifer tubul lümeninde spermatozoonlar mevcut idi (Resim 1).



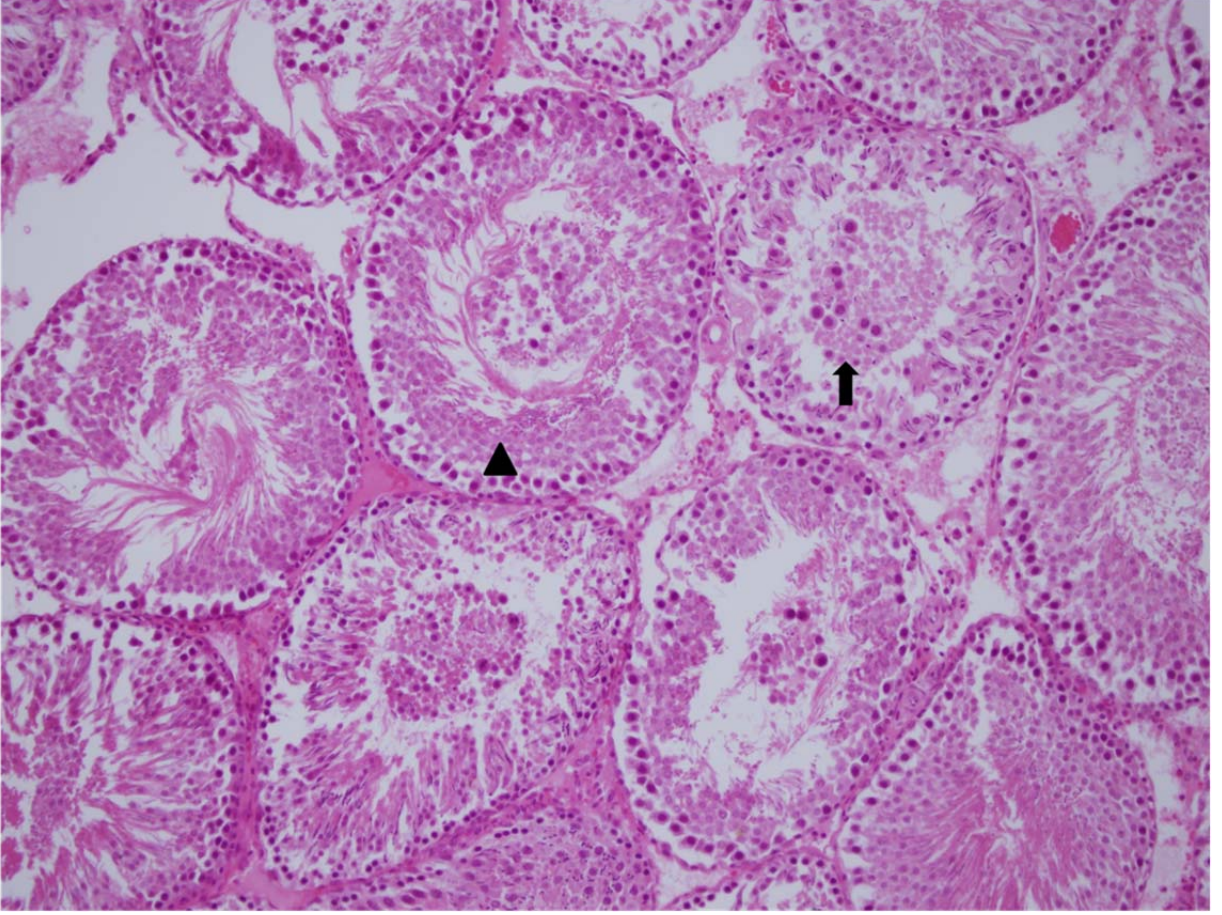
Resim 1: Kontrol grubuna ait sol testiste, normal seminifer tubul epitel yapısı (▲) ve spermatozoonlar (↑) izlendi (H&E X 200).

Grup 2 sol testiste seminifer tubul germinal epiteli lümene dökülmüş ve tamamen düzensiz olarak izlendi. Lümeninde spermatozoonlar mevcut değildi. İntertubuler alanda yer yer vazokonjesyon izlendi (Resim 2).



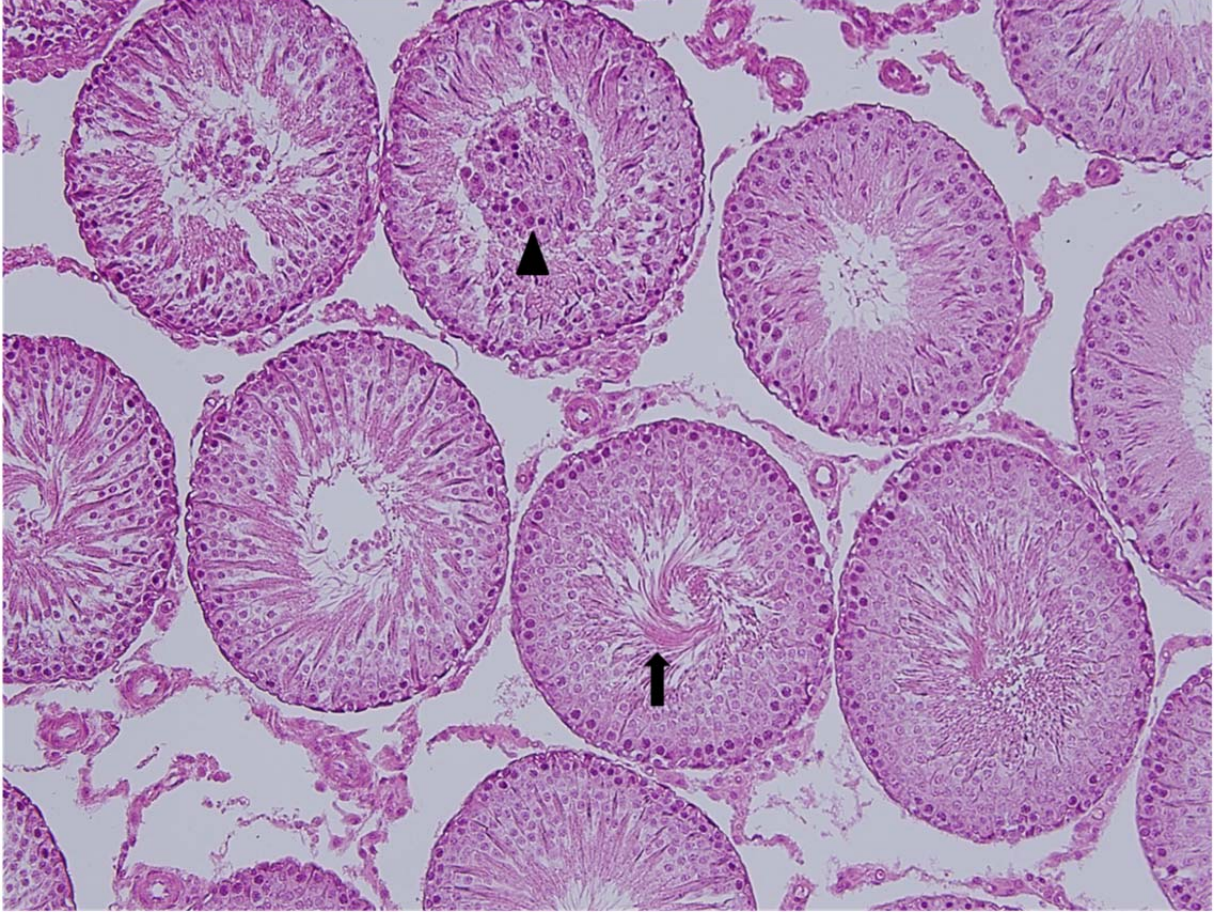
Resim 2: Torsiyon/Detorsiyon grubuna ait sol testiste, seminifer tubul germinel epiteli tamamen dökülmüş (▲), lümene düzensiz dizilimli germinal hücreler(↑) izlendi. (H&E X200)

Grup 3 sol testiste seminifer tubul epitel torsiyon grubuna göre daha düzenli olarak izlendi. Germinal epitel hücreleri lümende düzenli dizilim gösteriyordu ve yer yer spermatozoonlar mevcut idi (Resim 3).



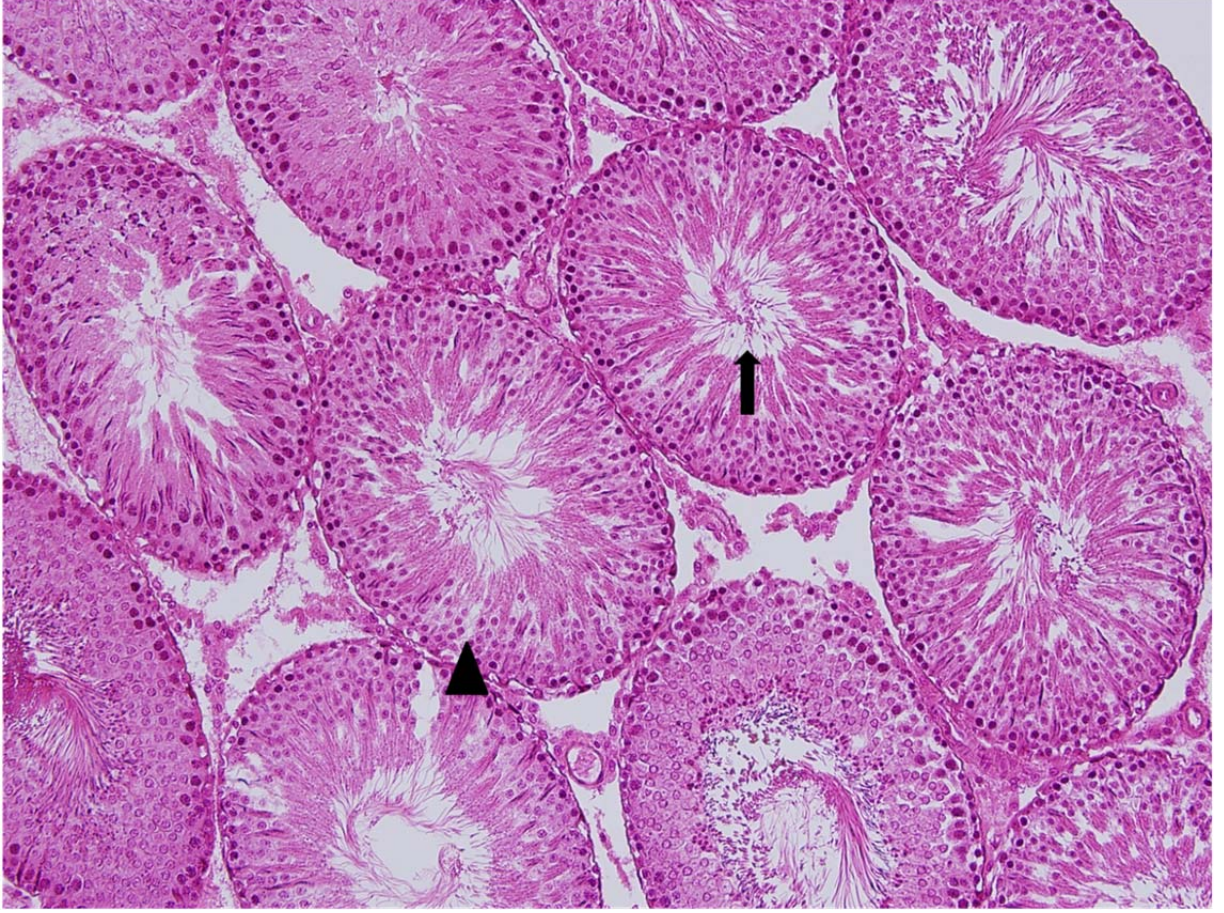
Resim 3: Grup 3 sol testiste, germinal epitel yapısı düzenli (▲) ve lümende düzenli dizilimli germinal epitel hücreleri (↑) izlendi. (H&E X 200).

Grup 4 sol testiste seminifer tubul epitel yapısı düzenli olarak izlendi. Lümeninde germinal epitelyum izlenen seminifer tubuller yanında lümeninde spermatozoonlar olan tubullerde mevcut idi (Resim 4).



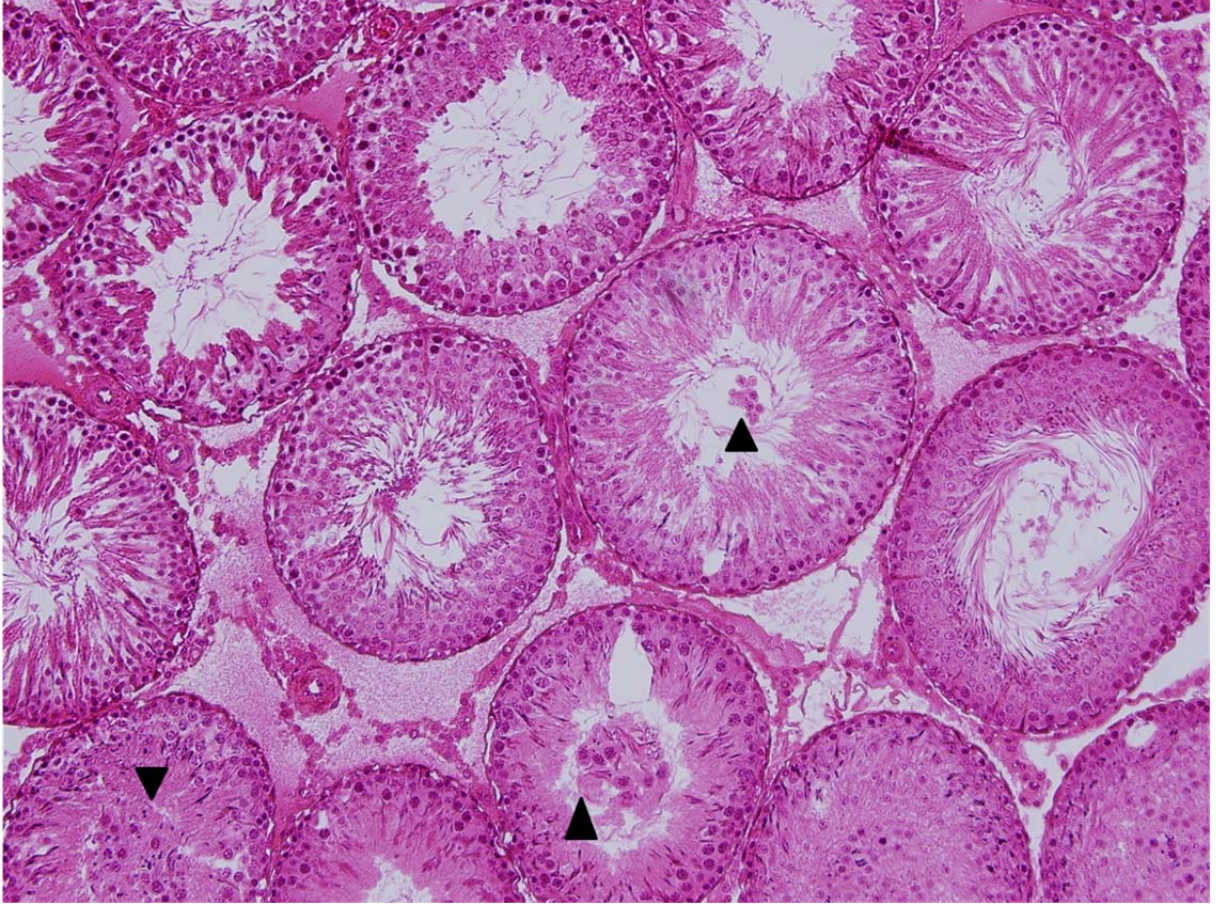
Resim 4: Grup 4 sol testiste, lümeninde germinal epitel hücreleri (▲) ve spermatozoonlar (↑) olan düzenli seminifer tubul yapısı izlendi. (H&E X 200).

Çalışma gruplarına ait sağ testislerin incelenmesinde, kontrol grubunda normal testis histolojik yapısı izlendi. Seminifer tubuller düzenli ve lümende spermatozoonlar mevcut idi (Resim 5).



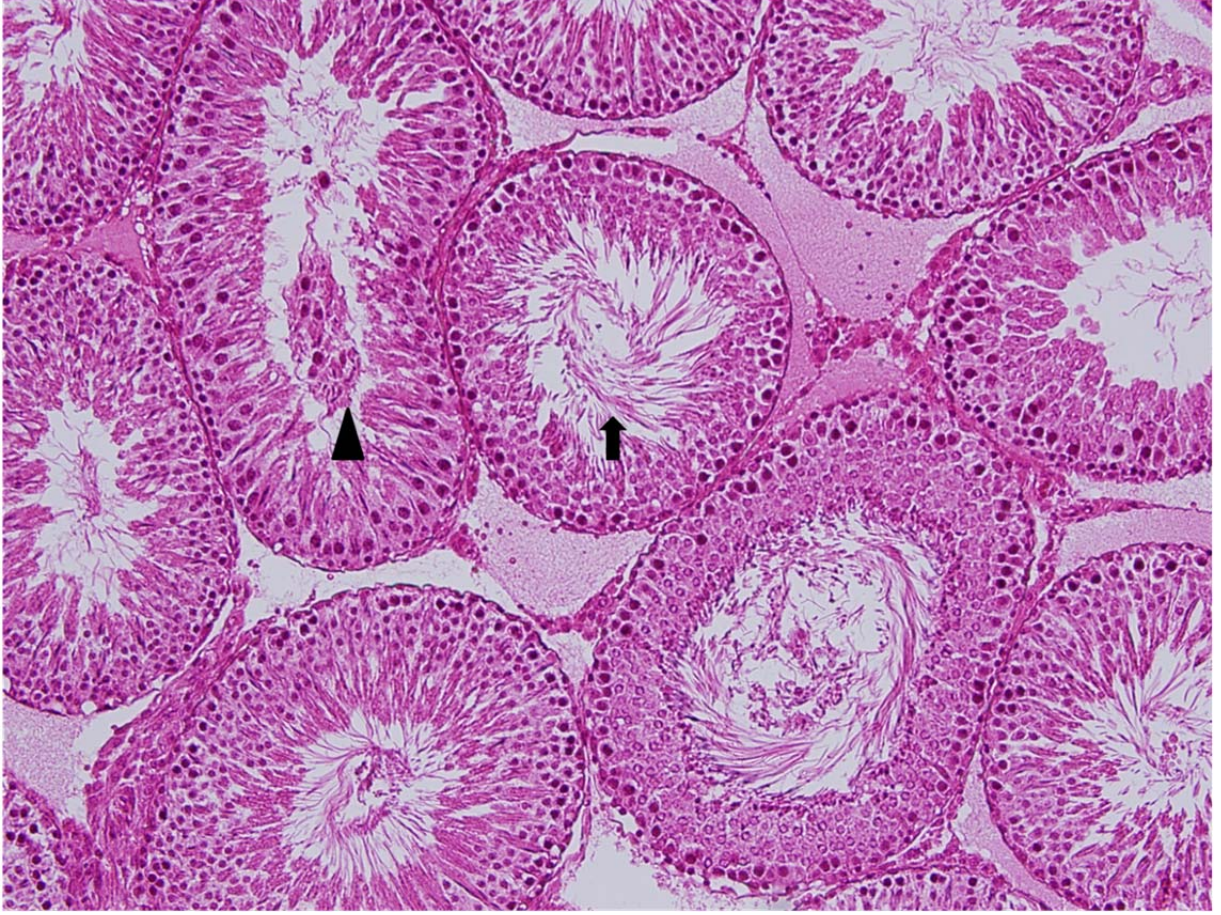
Resim 5: Kontrol grubuna ait sağ testiste, normal testis histolojik yapısı izlendi. Normal seminifer tubul (▲) ve lümende spermatozoonlar (↑) mevcut idi (H&E X 200).

Grup 2 sağ testiste seminifer tubul epitel yapısı normale yakındı. Seminifer tubul epitelinde yer yer açılmalar izlendi. Tubul lümeninde yer yer geminal epitel izlenen tubuller yanında, lümeninde spermatozoonlar olanlar da mevcut idi. Bazı tubullerde spermatozoonlar azalmıştı (Resim 6).



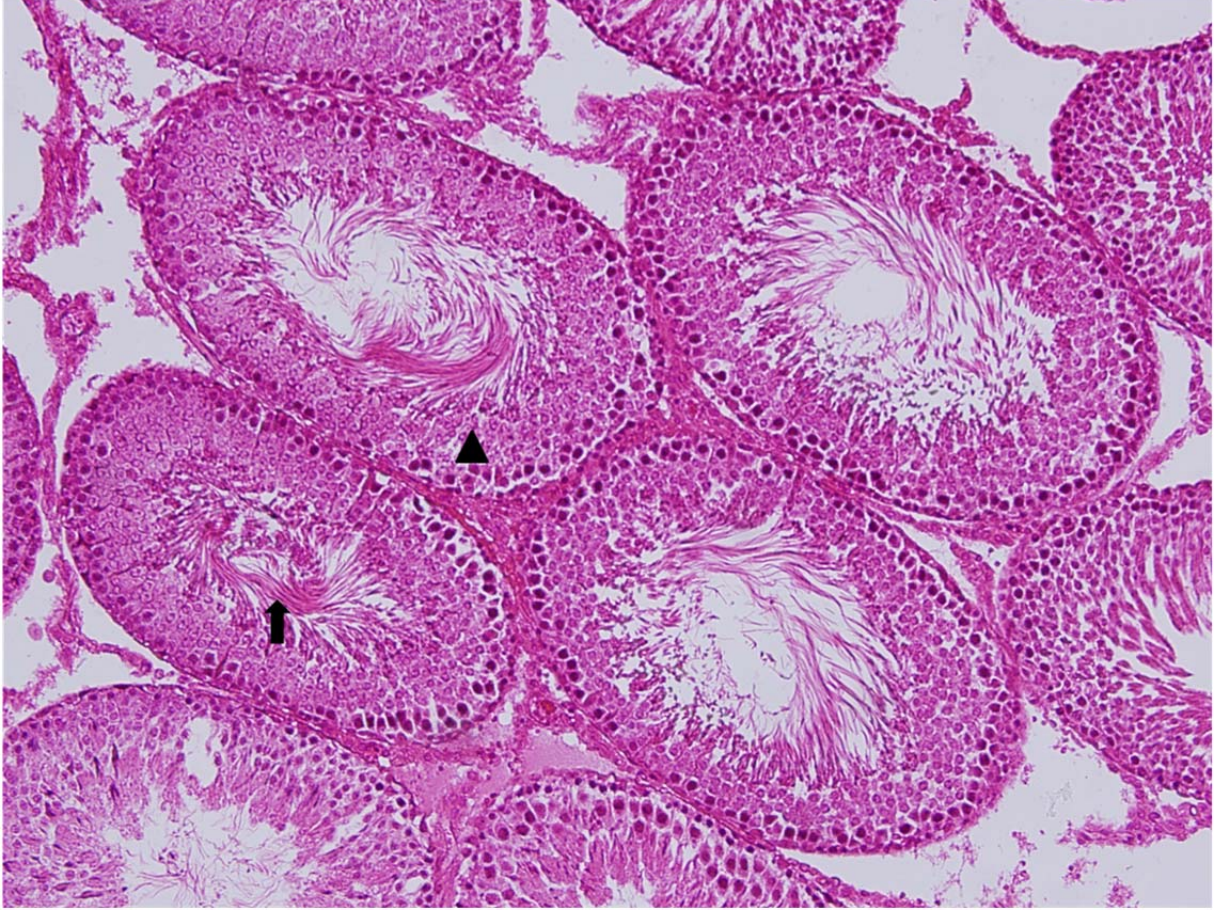
Resim6:Torsiyon/Detorsiyon grubuna ait sağ testiste, seminifer tubul lümeninde germinal hücre kümeleri (▲) izlendi (H&E X 200).

Grup 3 sağ testiste seminifer tubul epiteli dzenli olarak izlendi. Yer yer lumeninde germinel epitel izlenen tubuller olmasına rağmen, çoğunluğu normal seminifer tubul yapısı gösteriyordu(Resim 7).



Resim 7: 1 doz medikal ozon verilen grupta sağ testiste, lumeninde germinel epitelyum kumeleri (▲) ve normal spermatozoonlar (↑) izlenen túbüller mevcut idi (H&E X 200).

Grup 4 sağ testiste kontrol grubu gibi normal testis histolojik yapısı izlendi (Resim 8).



Resim 8: 2 doz medikal ozon verilen grupta sağ testiste, normal testis seminifer tubul (▲) ve lümende spermatozoonlar (↑) izlendi (H&E X 200).

4.2.1. Histopatolojik Hasarın İstatistiksel Değerlendirilmesi

Her bir gruba ait sağ ve sol testis preparatlarından elde edilen histopatolojik incelenmesi sonucu JTBS skorlaması Tablo 6 da verilmiştir.

Tablo 6 :JTBS'a göre Histopatolojik hasarın istatistiksel değerlendirme sonuçları

| | | JTBS-sol | JTBS-sağ |
|--------------|----------|-----------------|-----------------|
| Grup1 | Ortanca | 10 | 10 |
| | Minimum | 9 | 10 |
| | Maksimum | 10 | 10 |
| Grup2 | Ortanca | 5,20 | 8,10 |
| | Minimum | 4,80 | 7,80 |
| | Maksimum | 5,40 | 8,60 |
| Grup3 | Ortanca | 8,20 | 9,10 |
| | Minimum | 7,80 | 8,80 |
| | Maksimum | 8,40 | 9,60 |
| Grup4 | Ortanca | 9,20 | 10 |
| | Minimum | 9 | 9 |
| | Maksimum | 9,40 | 10 |

JTBS'a göre tüm grupların **sol** testislerinin birbirleri ile histopatolojik olarak Mann-Witney U testi kullanılarak yapılan analizde tüm grupların birbirleriyle karşılaştırılmasında anlamlı fark bulunmuştur.(Tablo 7)

Tablo 7

| Sol Testis | P |
|-------------|---------|
| Grup1-Grup2 | P<0,005 |
| Grup1-Grup3 | P<0,005 |
| Grup1-Grup4 | P<0,005 |
| Grup2-Grup3 | P<0,005 |
| Grup2-Grup4 | P<0,005 |
| Grup3-Grup4 | P<0,005 |

JTBS'a göre tüm grupların **sağ** testislerinin birbirleri ile histopatolojik olarak Mann-Witney U testi kullanılarak yapılan istatistiksel analizde Sham grubunun iki kez medikal ozon verilmiş grup ile karşılaştırılmasında anlamlı fark bulunamamıştır. Diğer grupların birbirleri ile karşılaştırmalarında ise anlamlı fark bulunmuştur(Tablo 8)

Tablo 8 :

| Sağ Testis | P |
|-------------|----------------|
| Grup1-Grup2 | P<0,005 |
| Grup1-Grup3 | P<0,005 |
| Grup1-Grup4 | P=0,064 |
| Grup2-Grup3 | P<0,005 |
| Grup2-Grup4 | P<0,005 |
| Grup3-Grup4 | P<0,005 |

HHDS''a göre istatistiksel olarak ortanca, minimum ve maksimum değerleri Tablo 9'da görülmektedir

Tablo 9 : HHDS istatistiksel değerlendirme sonuçları

| | | HHDS-sol | HHDS-sağ |
|--------------|----------|-----------------|-----------------|
| Grup1 | Ortanca | 1 | 1 |
| | Minimum | 1 | 1 |
| | Maksimum | 2 | 1 |
| Grup2 | Ortanca | 4 | 2 |
| | Minimum | 3 | 1 |
| | Maksimum | 4 | 2 |
| Grup3 | Ortanca | 2 | 1 |
| | Minimum | 2 | 1 |
| | Maksimum | 3 | 2 |
| Grup4 | Ortanca | 1,50 | 1 |
| | Minimum | 1 | 1 |
| | Maksimum | 2 | 2 |

Testisin HHDS'a göre tüm grupların **sol** testislerinin Mann-Witney U testi kullanılarak yapılan istatistiksel karşılaştırılmasında, Sham grubunun 2 kez medikal ozon verilen gruba ve 1 kez medikal ozon verilen grubunun, 2 kez medikal ozon verilen grup ile karşılaştırılmasında anlamlılık bulunamamıştır. Diğer grupların karşılaştırılmasında anlamlı fark vardır.(Tablo 10)

Tablo 10

| Sol Testis | P |
|-------------|----------------|
| Grup1-Grup2 | P<0,005 |
| Grup1-Grup3 | P=0,001 |
| Grup1-Grup4 | P=0,117 |
| Grup2-Grup3 | P=0,001 |
| Grup2-Grup4 | P=0,001 |
| Grup3-Grup4 | P=0,015 |

Testisin HHDS'a göre tüm grupların **sağ** testislerinin birbirleri ile histopatolojik olarak Mann-Witney U testi kullanılarak yapılan istatistiksel karşılaştırılmasında, tüm grupların kendi aralarındaki karşılaştırmalarında anlamlı fark bulunamamıştır.(Tablo 11)

Tablo 11

| Sağ Testis | P |
|-------------|----------------|
| Grup1-Grup2 | P=0,009 |
| Grup1-Grup3 | P=0,063 |
| Grup1-Grup4 | P=0,317 |
| Grup2-Grup3 | P=0,333 |
| Grup2-Grup4 | P=0,046 |
| Grup3-Grup4 | P=0,264 |

5.TARTIŞMA

Testis torsiyonu testis hasarına veya subfertiliteye neden olan sıklıkla yenidoğan ve adölesan öncesi dönemde görülen acillerden birisidir. Testis, hipoksiye en duyarlı organlardan biri olduğu için kısa süreli torsiyon durumlarında dahi, testis dokusunda önemli hasarlar meydana gelebilmektedir(4).

Testisin torsiyon-detorsiyonu esnasında oluşan iskemi-reperfüzyon hasarın etyolojisinde ortamda bulunan reaktif oksijen metabolitlerine bağlı oksidatif stres ve inflamasyon süreci yer almaktadır. Testis torsiyonunda kan akımının azalması ile iskemi sonrası oluşan hipoksi, hücre hasarı ve ölümünün en sık nedenlerinden biridir. Hipoksidede hücre içi oksijen azlığı nedeniyle aerobik solunum aksar ve mitokondrideki oksidatif fosforilasyon engellenir. ATP üretimi azalır yada tamamen sona erer. ATP kaybı sonucu ATPaz aktiviteside azalır. Bu hücre zarında bulunan aktif sodyum pompası yetersizliği ve beraberinde hücre içinde sodyum birikimi olur. Hücre içi potasyum hücre dışına atılır ardından su hücre içine girer ve hücre sel şişme meydana gelir. Hücre sel şişmesinin bir nedeni de katabolitlerin birikimidir (7,8).

Eğer iskemi düzeltilirse dokuda yeniden dolaşım başlayacaktır. Reperfüzyon oluşmazsa, hücrede öldürücü iskemik zedelenme gelişir fakat yüksek düzeylerde serbest radikaller oluşmaz (7-9). İskemi sırasında küçük oranda serbest radikal oluşmaktaysa da, reperfüzyon döneminde dokunun yeniden oksijenlenmesinin ardından çok daha büyük miktarlarda serbest radikal oluşmakta ve bunlar doku hasarını daha da artırmaktadır (10).Reperfüzyon döneminde gözlenen hasarda ,hücre içine moleküler oksijen girişi ile hızla oluşan SOR başta olmak üzere bir çok mekanizma rol oynamaktadır

Etyolojik faktör ne olursa olsun testis torsiyonuna yönelik alternatif medikal tedavi modelleri araştırılmasına rağmen acil cerrahi müdahale halen geçerliliğini koruyan ve en yaygın uygulanan tedavi şeklidir(61,63,118,119). Dokuların torsiyondan etkilenmesi torsiyonun süresi ve derecesi ile ilişkili olmasına rağmen, asıl önlenebilir doku hasarı detorsiyon sonrası reperfüzyon döneminde meydana geldiği için torsiyonun cerrahi tedavisi yanında alternatif tedaviler bu dönemdeki hasarlanmaya karşı etkili olabilecek medikal tedavi modelleri üzerine yoğunlaşmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmalarda

allopürinol, katalaz, heparin, verapamil, ATP-MgCl₂, anti-inflamatuar ilaçlar ,asetilsistein, hiperbarik oksijen gibi ajanlar kullanılmıştır. Bunların bazılarının etkisinin yetersizliği ,bazılarının kullanım güvenilirliği ve dozajı hakkında yeterli bilgi olmaması ve yan etkilerinin belirsizliği yüzünden rutin klinik kullanıma girememiştir(1,120-123).

Medikal ozonun ülkemizde kullanımı artan bir tedavi şekli olması nedeni ile üzerinde çok sayıda deneysel ve klinik çalışma yapılmaktadır. Bu sayede birçok klinik sorunda rutin kullanıma girmiştir. Ozon tedavisinin özellikle inflamatuvar sürecin yoğun yaşandığı ve immün sistemin ön planda yer aldığı fizyopatolojik durumlarda sık olarak kullanılır hale gelmiş ve etkinliği gösterilmiştir. Ozon uygulamaları yara iyileşmesi, yaşa bağlı maküler dejenerasyon, iskemik ve enfeksiyöz hastalıklarda yapılan vaka analiz çalışmalarında olumlu etkiler gösterilmiştir.

Medikal ozonun bu etkilerini birden çok mekanizmayla meydana getirdiği gösterilmiştir. İlk etkilerinden biri, eritrositlerdeki 2,3-difosfogliserat düzeyini artırma yolu ile hemoglobin-oksijen ayrışma eğrisinin sağa kaymasına ve böylece oksijenin dokulara daha kolay bırakmasına neden olmasıdır. Plazmada konsantrasyonu artan hidrojen peroksit kolayca hücrelerin içine diffüze olarak lökosit ve endotelial hücrelerde çeşitli interferon, interlökin ve transforme edici büyüme faktörü yapımında arttıran uyarıları tetikler (111). Medikal ozona maruz kalınması doza bağımlı olarak trombosit fonksiyonlarının artışına neden olmaktadır. Aktive olmuş trombositler, içlerinde bulunan büyüme faktörlerini açığa çıkararak iskemi ve ülserli hastalarda iyileşmeye olumlu etkileri gösterilmiştir (94). Ayrıca oksidatif stres oluşturularak medikal ozonun etkilerinin araştırıldığı bir çok çalışmada SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzim düzeylerinin arttırdığı ve MDA düzeylerinin azalttığı ve sonuçta dokuların iskemi-reperfüzyon hasarından koruduğu gösterilmiştir (15,16,95,109,110,124).

Chen ve arkadaşları yaptıkları böbrek iskemi-reperfüzyon çalışmasında ozonun etkisini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada, ozon böbrek dokusunun antioksidan enzim düzeyini arttırarak , MDA düzeyini ise azaltarak reperfüzyon hasarından korumuştur(124).

Özler ve arkadaşları, sıçanlarda oluşturulmuş peritoneal adezyon ve oksidatif stres üzerine ozon tedavisinin etkisini araştırmışlar üç gruba ayrılan tüm ratlara peritoneal yapışıklık modeli oluşturulmuş. Medikal ozon uygulaması bir gruba operasyondan hemen sonra başlanırken diğer bir gruba operasyondan 24 saat sonra uygulanıp 15 gün boyunca

1mg/kg dozunda intraperitoneal olarak verilmiş. Her iki grup sham grubu ve birbirleri ile makroskopik gözleme dayalı yapışıklık skorlaması ve çekumdaki yapışıklık bölgesinden doku örnekleri alınarak MDA, PCO seviyeleri ile SOD,GSH-Px gibi enzim ölçümleri yapılarak karşılaştırılmış. Çalışmanın sonucunda ozon tedavisinin genel olarak peritoneal yapışıklığı azaltıcı yönde etkisi olduğunu, oksidatif parametreler açısından hem MDA hemde PCO seviyelerini anlamlı olarak azalttığı ,operasyon sonrası hemen ozon verilen grupta MDA ve PCO azalmasının 24 saat sonra tedaviye başlanan gruba göre daha düşük bulunduğu, antioksidan parametreler açısından ise antioksidan bir enzim olan SOD aktivitesinin ozon uygulamaları ile anlamlı yükseldiği, tedaviye önce başlanan grupta dahada yüksek olduğu yani antioksidan sistemi uyardığı ,oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir(110).

Aslan ve arkadaşlarının deneysel over iskemi-reperfüzyon hasarında intraperitoneal verilen ozonun etkisini araştırdıkları deneysel çalışmada 18 adet dişi rat 3 gruba ayrıldıktan sonra torsiyon-detorsiyon grubunda sağ over 720 derece torsiyon yapıp 2 saat beklenmiş daha sonra detorsiyon yapıp 2 saat sonrasında overler çıkarılmış. Ozon uygulanan grupta ise detorsiyondan 10 dk öncesinde 0,5 mg/kg dozunda intraperitoneal ozon verilip 2 saatlik reperfüzyon sonrası overler çıkarılmış. Histopatolojik inceleme ve MDA, NO, sülfhidril ölçümleri yapıldıktan sonra her üç grubun değerleri istatistiksel olarak karşılaştırılmış. Ozon verilen grupta torsiyon-detorsiyon grubuna göre histopatolojik olarak over ve paraoveryan intersitisyel ödem,overyan konjesyonun daha az olduğu, MDA değerinin anlamlı olarak azalmış olduğu ve sonuçta over torsiyonu sonrası meydana gelen iskemi-reperfüzyon hasarında intraabdominal medikal ozon uygulamasının histolojik ve biyokimyasal markırlara olumlu etkisi olduğunu tespit etmişler (95) .

Güven ve arkadaşlarının özefagus yanığı oluşturulmuş ratlarda intraperitoneal verilen medikal ozonun stenoz indeksi, histopatolojik hasar skoru , biyokimyasal olarakta oksidatif stres ve antioksidan enzimlere etkisini araştırdıkları deneysel çalışmasında stenoz indeksi ve histopatolojik hasar skorunun medikal ozon verilen grupta verilmeyen gruba göre anlamlı derecede düşük olduğu , ayrıca tedavi edilen grupta SOD ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin tedavisiz gruba göre yüksek olduğu, MDA ve PCO düzeyinin ise anlamlı derecede düşük olduğu izlenmiş ve sonuç olarak ozon tedavisinin fibrozis gelişimini azalttığı ,antioksidan kapasiteyi arttırdığı ve oksidatif stresi azalttığı deneysel olarak gösterilmiştir(16). Başka bir çalışmalarında ise deneysel NEC

oluşturulmuş ratlarda intraperitoneal verilen medikal ozonun etkisi incelenmiş. Sonuç olarak medikal ozonun antioksidan kapasiteyi arttırdığı, oksidatif stresi azalttığı bu çalışmalarında da gösterilmiş olup ayrıca histopatolojik injüri skorunun ozon tedavisi yapılan grupta anlamlı olarak düşük olduğu izlenmiştir(15).

Bu deneysel çalışmada, 2.gruptaki MDA değerleri 1.gruptakilere göre yüksek olduğu ve istatistiksel olarak incelendiğinde belirgin bir farklılık olduğu gösterildi ($p<0,05$). Bu bulgu bize testiste iskemi-reperfüzyon hasarının meydana geldiğini gösterdi.Yapılan birçok çalışmada reperfüzyon hasarının iskemik hasarı daha da şiddetlendirdiği gösterildiği için ve medikal ozonun asıl etkisinin reperfüzyon döneminde gösterdiği için iskemi grubu yapmadık.

Grup3 ile grup2'deki torsiyon yapılan testislerinin MDA değerleri incelendiğinde ozon verilen grupta belirgin düşük olduğu ve istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir fark olduğu gösterildi($p<0,05$). Ayrıca grup1'in MDA değerlerinin grup3 ve grup4'ün torsiyon yapılan testis MDA değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı . Bunların sonucu olarak medikal ozonun iskemi-reperfüzyon hasarında biyokimyasal olarak etkili olduğu düşünüldü.

Grup4'ün torsiyon yapılan testisteki MDA değeri, grup2' nin aynı taraflı testisteki MDA değerinden belirgin düşük olduğu ve istatistiksel olarak incelendiğinde aralarında anlamlılık vardı ($p<0,05$). Fakat grup3 ile grup4 'ün torsiyon yapılan testis MDA değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlılık bulunamadı ve bu bulgu tekrarlanan ozon uygulamasının biyokimyasal oksidatif stres markırlarında anlamlı olarak bir değişikliğe yol açmadığını düşündürmektedir.

Histopatolojik olarak incelendiğinde ise grup2' nin torsiyon yapılan testisi ile grup1'in aynı taraflı testisi karşılaştırıldığında grup1'in testisinde normale yakın histoloii izlenirken grup2'de ise iskemi-reperfüzyondan dolayı ağır hasar bulgusu gösteren histopatolojiye sahip olduğu görüldü ve HHDS ' a göre istatistiksel olarak incelendiğinde aralarında anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0,05$) ve sonuçta iskemi-reperfüzyon hasarının olduğu gösterildi. Aynı skorlamaya göre grup2' nin torsiyon yapılan testisi ile grup3 ve grup4'ün aynı taraflı testisleri incelendiğinde ise ozon verilen grupların testislerinin çok az hasarlanma belirtileri olduğu ve istatistiksel olarak incelendiğinde aralarında anlamlı fark olduğu görüldü($p<0,05$) ve bu da medikal ozonun testisteki iskemi-reperfüzyon hasarını

histopatolojik olarak azalttığını düşündürdü. grup3 ile grup4 karşılaştırıldığında ise anlamlı fark bulunmadı ve HHDS'a göre tekrarlayan ozon uygulamasının histopatolojik bulgular üzerine anlamlı bir değişiklik yapmadığı görüldü.

JTBS 'a göre ise tüm grupların sol testislerinin birbirleriyle histopatolojik olarak karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Oluşturduğumuz deneysel testis torsiyonu modelinde testis dokusu hasarlanması üzerine medikal ozonun etkisi incelenmiştir. Testis torsiyonun düzeltilmesinden önce ve sonrasında verilen medikal ozonun torsiyone olan testiste meydana gelen reperfüzyon hasarını azaltmada biyokimyasal ve histopatolojik düzeyde etkisi gösterilmiştir.

Medikal ozon tedavisi dünyada ve türkiyede klinik olarak uygulanmasına rağmen tam anlamıyla etki mekanizması ve güvenilirliği ortaya konulamamıştır. Tüm dünyada devam eden deneysel ve klinik ozon tedavisi çalışmaları , yakın gelecekte mekanizmanın daha ayrıntılı açıklanmasına katkıda bulunacaktır.

Sonuç olarak yeterli araştırmalar sonrasında ,testis torsiyonunda operayondan önce uygulanacak medikal ozon bazen infertilite ile sonuçlanabilecek testis hasarını önlemede yararlı olabilir.

7. ÖZET

Testis torsiyonunun derecesi ve süresi ile ilişkili olarak dönmüş kordun düzeltilmesi sonrası SOR oluşumu sonucu iskemi-reperfüzyon hasarına bağlı her iki testiste de ciddi yaralanma meydana gelir ve bu durum subinfertilite/ infertilite ile sonuçlanabilir .Torsiyon derecesi ve süresi değiştirilemeyeceği için testis hasarlanmasını önlemek için yapılan çalışmalar detorsiyondan sonraki döneme yoğunlaşmıştır.Biz de bu çalışmamızda medikal ozonun testis torsiyonunda iskemi-reperfüzyon hasarına karşı etkisini ve bir tedavi şekli olarak kullanılabilirliğini araştırdık.

Her grupta 8 adet olmak üzere 4 grup rat üzerinde çalışıldı. Testis torsiyonu sol testisin saat yönünde 720 derece döndürülmesiyle oluşturuldu.grup 1 sham grubuydu. Grup 2’de testis torsiyonu yapıp iki saat beklenip detorsiyondan 24 saat sonra orşiektomi yapıldı. Grup 3’de torsiyon yapıp 2 saat beklendikten sonra detorsiyon öncesi 1mg/kg dozunda intraperitoneal medikal ozon verilip 24 saat sonrasında orşiektomi yapıldı.Grup 4’de ise detorsiyondan önce ve 24 saat sonra olmak üzere toplam iki kez 1mg/kg dozunda intraperitoneal medikal ozon verilip ikinci dozdan 24 saat sonra orşiektomi yapıldı. Testis torsiyonunda reperfüzyon hasarının önlenmesinde medikal ozonun etkisi biyokimyasal olarak, lipid peroksidasyon indeksi olan doku MDA düzeyleri tesbit edilerek gösterirken, histopatolojik etkisi ise hasar derecelendirme ve testis biyopsi skorlamalarıyla gösterildi.

Bu çalışmada, medikal ozon verilen gruplarda MDA değerlerinde anlamlı olarak azalma olduğu gösterilmiş olup medikal ozon verilen grup3 ve grup4 ile grup2’nin sol testislerinin MDA değerlerinin karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur($p<0,005$) . Histopatolojik incelemede ise medikal ozon verilen gruplarda testiste meydana gelen iskemi-reperfüzyon hasarında anlamlı azalma olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür($p<0,005$).Testis torsiyonun düzeltilmesinden hemen önce ve/veya sonrasında verilen medikal ozonun torsiyone olan testiste meydana gelen reperfüzyon hasarını azaltmada biyokimyasal ve histopatolojik düzeyde etkili olabileceğini gösteren bulgular elde edilmiştir..

Anahtar Kelimeler: Testis torsiyonu, iskemi-reperfüzyon hasarı, medikal ozon

8. SUMMARY

Testicular torsion is one of the important reasons leading to acute scrotum in the age of infancy and adolescence. associated with torsion degree and duration, returned to the correction of the cord as a result of the formation of SOR consists of ischemia-reperfusion injury so serious injury occurs due to both testes. Injury occurring in the gonads may result in subinfertile / infertility. For duration and degree of torsion can not be changed studies in order to prevent structural failure of testicular concentrated in the period after detorsion. we also research medical ozone's effects against ischemia-reperfusion injury in testicular torsion and availability as a treatment modality in this study.

Being 8 for each group, it was worked on 4 groups of rat. Testicular torsion was formed by rotating left testicle 720 degree clockwise. Group 1 was sham group. In group 2, torsion was applied, we waited for 2 hours and orchietomy was applied 24 hours later after detorsion. In group 3, torsion was applied and after waiting 2 hours before the detorsion, 1mg/kg intraperitoneal medical ozone was applied and after 24 hours, orchietomy was applied. In group 4, before detorsion and after 24 hours from detorsion 1mg/kg dosage intraperitoneal medical ozone was applied two times at total and orchietomy was applied after 24 hours of the second dosage. In testicular torsion, the effect of medical ozone for preventing reperfusion damage was showed biochemically by transfixing tissue MDA levels which are lipid peroxidation index and histopathological effect is showed by damage rating and testicular biopsy scorings.

In this work, it is shown MDA levels are decreased meaningfully at the groups which medical ozone was applied and at the group 3, 4 and 2's left testicals MDA levels comparisons was found statistically significance ($p < 0,005$). With histopathological inspection, at the groups which medical ozone was applied, ischemia-reperfusion damage which occurred in the testicals, decreased meaningfully and was seen statistically meaningfull. ($p < 0,005$). Medical ozone which applied just before or after the reclamation of testicular torsion being decreasing the reperfusion damage which occurred at the torsioned testical might be effective at biochemical and histopathological levels is understood from the achieved findings.

Key words: testicular torsion, ischemia-reperfusion injury, medical ozone

9. KAYNAKLAR

1. Abes M, Sarihan H, Deger O, et al :The effect of ATP-Mgcl₂ on prevention of reperfusion injury after unilateral testicular torsion Eur Ped Surg 11:255,2001
2. Dokucu AI, Ozturk H, Ozdemir E, et al: The protective effects of nitric oxide on the contralateral testis in prepubertal rats with unilateral testicular torsion . BJU Int 85:767 , 2000
3. Palmer JS , Cromie WJ, Lee RC : Surfactant administration reduces testicular ischemia – reperfusion injury . J Urol 159:2136 , 1998
4. Saba M, Morales CL, De Lamirande E , et al : Morphological and biochemical changes following acute unilateral testicular torsion in prepubertal rats. J Urol 157 : 1149 , 1997
5. Prillaman HM, Turner TT: Rescue of testicular function after acute experimental torsion. J Urol.157:340-345,19976. Akgür FM, Kılınç K, Aktuğ T, et al: The effect of allopurinol pretreatment before detorting testicular torsion. J Urol. 151: 1715-1717, 1994.
6. Greenstein A, Smith-Harrison LI, Wakely PE, et al: The effect of polyethylene glycol-superoxi-de dismutase administration on histological damage following spermatic cord torsion. J Urol. 148: 639-641, 1992
7. Aybek Z, Demirkan N, Aybek H, et al: Deney-sel testis torsiyonu sonucunda gelişen iskemi-reperfüzyon hasarında trimetazidinin etkisi. Üroloji Bülteni. 9: 67-71, 1998
8. Mogilner JG, Lurie M, Coran AG, Nativ O, Shiloni E,Sukhotnik I: Effect of diclofenac on germ cell apoptosis following testicular ischemia-reperfusion injury in a rat.Pediatr Surg Int. 22: 99-105, 2006.
9. Lysiak JJ, Nguyen QA, Turner TT: Peptide and nonpeptidereactive oxygen scavengers provide partial rescue of the testis after torsion. J Androl. 23: 400-409, 2002.
10. Filho DW, Torres MA, Bordin AL, Crezcynski-PasaTB, Boveris A: Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury.Mol Aspects Med. 25: 199-210, 2004.
11. Akgül FM, Kılınç K, Tanyel FC, Büyükpamukçu N,Hiçsönmez A: Ipsilateral and contralateral testicular biochemicalacute changes after unilateral testicular torsionand detorsion. Urology. 44: 413-418, 1994.
12. Sarıca K, Bakır K. Semiquantitative evaluation of testicular histology after testicular torsion: protective effect of external cooling. Urol Int 63: 110, 1999

13. Çay A , Alver A, Küçük M , Işık O , Eminağaoğlu MS, Karahan C , Değer O: The effects of N-Acetylcysteine on Antioxidant Enzyme Activities in Experimental Testicular Torsion : J Surg Res :131.199-203 2006
14. Guven A, Gundogdu G, Sadir S, Topal T, Erdogan E, Korkmaz A, Surer İ, Oztur H :Medical ozone therapy reduces oxidative stres and intestinal damage in a experimental model of necrotizing enterocolits in rats.JPed Surg .44:1730-1735,2009
15. Guven A, Gundogdu G, Sadir S, Topal T, Erdogan E, Korkmaz A, Surer İ, Oztur H : The efficacy of ozone therapy in experimental caustic esophageal burn . JPed Surg . 43:1679-1684, 2008
16. Bocci V, Valacchi G, Corradeschi F, Fanetti G. Studies on the biological effects of ozone: 8. Effects on the total antioxidant status and on interleukin-8 production. *Mediat Inflamm.* 1998; 7: 313-317.
17. Le'on OS, Men'endez S, Merino N, et al. Ozone oxidative preconditioning:a protection against cellular damage by free radicals. *Mediators Inflamm*1998; 7: 289–294.
18. Sharma YK, Davis KR. The effects of ozone on antioxidant responses in plants. *Free Rad Biol Med* 1997; 23: 480–488.
19. Barber E, Men'endez S, Le 'on OS, et al. Prevention ofrenal injury after induction of ozone tolerance in rats submitted to warm ischaemia. *Mediators Inflamm.*1999;8(1):37–41.
20. Peralta C, Le 'on OS, Xaus C, et al. Protective effect ofozone treatment on the injury associated with hepatic ischemia-reperfusion: antioxidant-prooxidantbalance. *Free Radic Res.* 1999;31(3):191–196.
21. Ajamieh H,Merino N, Candelario-Jalil E, et al. Similarprotective effect of ischaemic and ozone oxidativepreconditionings in liver ischaemia/reperfusion injury. *Pharmacol Res.* 2002;45(4):333–339.
22. Al-Dalain SM, Mart'inez G, Candelario-Jalil E, et al.Ozone treatment reduces markers of oxidative and endothelial damage in an experimental diabetes model in rats. *Pharmacol Res.* 2001;44(5):391–396.
23. Zamora Z, Borrego A, L'opez O, et al. Effects ofozone oxidative preconditioning on TNF- α release and antioxidant-prooxidant intracellular balance inmice during endotoxic shock. *Mediators Inflamm* 2005;2005(1):16–22.
24. Colodny AH: Acute urologic conditions. *Pediatr Ann* 23: 207-210 ,1994
25. O'Neill, Jr. JA, Rowe MI, Grosfeld JL, Fonkalsrud EW, Coran AG: *Pediatric Surgery.* Fifth ed,Mosby, St.Louis, pp 1099-1101, 1998.
26. Richard S. Snell. *Klinik Anatomi*, Bölüm 4, Sayfa 150,151,152.

27. Emil A. Tanagho, Jack W. McAninch. Smith Genel Üroloji, Bölüm 45, Sayfa 741-742.
28. Atallah MW, Mazzarino AF, Horton RF: Testicüler scan, diagnosis and follow-up for torsion of the testis. J Urol 118: 120-124,1977.
29. Kaplan GW, King LR: Acute scrotal swelling in children .J Urol 104: 219-222 , 1970.
30. Rabinowitz R, Hulbert WC: Acute scrotal swelling. Urol Clin North Am 22: 101-105, 1995.
31. Brown JM , Hammers LW,Barton JW, et al. Quantitative Doppler assessment of acute scrotal inflammation. Radiology 1995; 197:427-31.
32. Dewire DM, Begun FP, Lawson RK, Fitzgerald S, Foley WD. Color Doppler ultrasonography in the evaluation of the acute scrotum. J Urol 1992; 147:89-91
33. Başaklar AC. Akut Skrotum. Başaklar AC, editör. Bebek ve Çocukların Cerrahi ve Ürolojik Hastalıkları. 1. Baskı. Ankara: Palme,2006. S.1753-64.
34. Bartsch G, St. Frank H,Marberger H, et al. Testicular torsion: late results with spesific regard to fertility and endocrine function. J Urol 1980 ;124:375.
35. Puri P, Barton D, O'Donnell B. Prepubertal testicular torsion: Subsequently fertility. J Pediatr Surg 1985;20:598.
36. 38. Pakyz RE, Heindel RM, Kallish M, Cosentino MJ, Spermatic cord torsion: Effect of cyclosporin and prednizone on fertility and the contrlateral testis in the rat. Journal of Andrology.11(5): 401-408, 1990.
37. Harrison RG, Lewis-jones DI, Moreno De Marval MJ, Connolly RC: Mechanizm of the damage to the contrlateral testis in rats with an ischemic testis. The Lancet. 3: 723-725, 1981.
38. Kaerney SE, Lewis-jones DI: Effect of ACTH on contrlateral testicular damage and cytotoxic antisperm antibodies after unilateral testicular ischemia in the rat. 75: 531-535, 1985.
39. Gordon JL: Extracellular ATP: Effect, sources and fate. Biochem.J. 223: 309-319, 1986.
40. Hutson JM,Undescended Testis , Torsion and Varicocele. Ln:O'Neill JA, Rowe MI, Grosfeld JL, eds. Pediatric Surgery. 5th ed. St. Louis :Mosby; 1998. P.1087-109
41. Mininberg DT . Chen ME,Witkin SS. Antisperm antibodies in cryptorchid boys. Eur J Pediatrics 1993; 152: 523
42. Urry RL. The incidence of antisperm antibodies in infertility patients with a history of cryptorchidism. J Urol 1994;151: 381

43. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Temel patoloji. Çevikbaş U (Çeviren) 5. Baskı. İstanbul: Nobel ve Yüce, 1995.
44. Nath KA, Norby SM. Reactive oxygen species and acute renal failure. Am J Med 2000; 109: 655-678.
45. Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in rat. J Clin Invest 1984; 74: 1156-1164.
46. Mitchell RN, Cotran RS (Çeviri: U. Çevikbaş). Hücre zedelenmesi, ölümü ve adaptasyonu . Kumar V, Cotran RS, Robbins SL (Eds.). Temel patoloji'de. 6. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp
47. Kitabevi (WB Saunders Co. izniyle); 2000. s.3-24.
48. <http://med.ege.edu.tr/~saitesen/ogrenci/hucre.html>
49. Türkyılmaz Z. Karaciğer İskemi-Reperfüzyon Zedelenmesinde Pentoksifilin, Dimetilsülfoksit ve Eksojen Melatoninin Koruyucu Etkilerinin Karşılaştırılması (tez). Edirne: TÜ Tıp Fak; 2003.
50. Paller MS. The cell biology of reperfusion injury in the kidney. J Invest Med 1994; 42: 632-639.
51. Orrenius S, Burkitt MJ, Kass GE, Dypbukt JM, Nicotera P. Calcium ions and oxidative cell injury. Ann Neurol 1992; 32 Suppl: S33- 42.
52. Lopez-Neblina F, Paez-Rollys AJ, Toledo-Pereyra LH. Mechanism of Protection of Verapamil by Preventing Neutrophil Infiltration in the Ischemic Rat Kidney. J SurgRes 1996; 61: 469-472.
53. Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. Thromb Haemost. 2007; 97: 738-747.
54. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. Br Med Bull 2004; 70: 71-86.
55. Çavdar C, Sifil A, Çamsar T. Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi/Office Journal of the Turkish Nephrology, Association 1997; 3-4: 92-95
56. Burçak G, Andican G. Oksidatif DNA Hasarı ve Yaşlanma. Cerrahpafla Tıp Dergisi Cilt (Sayı) 35 (4).
57. Janos Z, Krishnamurti D. Oxidative Stres and Disease 10: Nutrients and cell signaling. Taylor & Francis, 2005: Önsöz
58. Dobashi K, Ghosh B, Orak JK, Singh I, Singh AK. Kidney ischemia-reperfusion: Modulation of antioxidant defenses. Mol Cell Biochem 2000;

205: 1-11.

59. Somuncu S, Cakmak M, Dikmen G, et al: Ischemia-reperfusion injury of rabbit ovary and protective effect of trapidil. An experimental study. *Pediatr Surg Int* 24:315-318, 2008
60. Palmer JS, Cromie WJ, Plzak LF, et al : A platelet activating factor antagonist attenuates the effects of testicular ischemia. *J Urol.* 158 : 1186-1190, 1997.
61. Cerasero TS, Nachtsheim DA, Otero F ,et al: The effect of testicular torsion on the contralateral testis and the production of antisperm antibodies in rabbits. *J Urol.* 132 :577-579,1984.
62. Nagler HM and White RD:The effect of testicular torsion the contralateral testis *J Urol* 128:1343-1348, 1982
63. Tijoe DY, Steinberger E. A quantitative study of the effect of ischemia on the germinal epithelium of the rat testes. *J Reprod Fert* 21: 489, 1970
64. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant Therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 53: 135, 2001
65. Ashcraft KW, Holder TM: *Pediatric Surgery*. Second ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 595-601, 1993.
66. Leibovitch I, Buttyan R: Sulfated glycoprotein-2 induced endogenous resistance to ischemia and reperfusion injury in the seminiferous tubules. *American Journal of Reproductive Immunology.* 26: 114-117,1991.
67. Oner-Iyidogan Y, Gurdol F, Oner P. The effects of acute melatonin and ethanol treatment on antioxidant enzyme activities in rat testes. *Pharmacol Res* 2001; 44:89-93.
68. Othman AI, El-Missiry MA, Amer MA. The protective action of melatonin on indomethacin-induced gastric and testicular oxidative stress in rats. *Redox Rep* 2001; 6:173-177.
69. Hussein MR, Abu-Dief EE, Abou El-Ghait AT et al. Melatonin and roentgen irradiation of the testis. *Fertil Steril* 2006; 86:750-752.
70. Gavazza M, Catala A. Melatonin preserves arachidonic and docosapentaenoic acids during ascorbate-Fe²⁺ peroxidation of rat testis microsomes and mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35:359-366.
71. Gavazza MB, Catala A. Protective effect of N-acetyl-serotonin on the non-enzymatic lipid peroxidation in rat testicular microsomes and mitochondria. *J Pineal Res* 2004; 37:153-160.
72. Juan ME, Gonzalez-Pons E, Munuera T et al. Trans-resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. *J Nutr* 2005;

135:757-760.

73. Orozco TJ, Wang JF, Keen CL. Chronic consumption of a flavanol- and procyanindin-rich diet is associated with reduced levels of 8-hydroxy- 2'-deoxyguanosine in rat testes. *J Nutr Biochem* 2003; 14:104-110.
74. Cosentino MJ, Nishida M, Robinowitz R, et al: Histopathology of prepubertal rat testes subjected to various duration of spermatic cord torsion. *J Androl.* 7:23,1986.
75. Barlas M, Hatiboğlu C. The effect of nitric oxide in testicular ischemia-reperfusion injury. *Int Urol Nephrol* 34:81, 2002
76. Etensel B, Özkısacık S, Özkara E, et al: Dexpanthenol attenuates lipid peroxidation and testicular damage at experimental ischemia and reperfusion injury. *Pediatr Surg Int* 23:177, 2007
77. Guven A, Tunc T, Topal T, et al: Alpha-lipoic acid and ebselen prevent ischemia/reperfusion injury in the rat intestine. *Surg Today* 38:1029, 2008
78. Inan M, Basaran UN, Dokmeci D, et al: Methylene blue increases contralateral testicular ischaemia-reperfusion injury after unilateral testicular torsion. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35:50, 2008
79. Savas C, Dindar H, Bilgehan A, et al: Pentoxifylline attenuates reperfusion injury in testicular torsion. *Scand J Urol Nephrol* 36:65, 2002
80. Bocci V. Oxygen-ozone therapy: a critical evaluation. Springer, 2002, p.1-8
81. Rubin MB. The history of ozone. *Bull Hist Chem.* 2001; 26(1): 40-56.
82. Bocci V. Scientific and medical aspects of ozone therapy. state of the art. *Archives of Medical Research.* 2006; 37: 425-435.
83. Rowland FS. Stratospheric ozone depletion. *Phil Trans R Soc B.* 2006; 361: 769-790.
84. Wolff HH. Die Behandlung peripherer Durchblutungsstörungen mit Ozon. *Erfahr-Heilkd.* 1974; 23: 181-184.
85. Travagli V, Zanardi I, Silviotti A, Bocci V. Physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2007; 4: 1504-511.
86. Mustafa MG. Biochemical basis of ozone toxicity. *Free Radical Biol Med.* 1990; 9: 245-265.
87. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biol*

- Med. 1991; 11: 81-128.
88. Hamilton RF, Eschenbacher WL, Szweda L, Holian A. Potential involvement of 4-hydroxynonenal in the response of human lung cells to ozone. *Am J Physiol.* 1998; 274: L8–L16.
 89. Schaur RJ. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. 2003; 24: 149-159.
 90. Bocci V. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2006; 216: 493-504.
 91. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.* 2000; 486: 10-13.
 92. Bocci V, Aldinucci C, Bianchi L. The use of hydrogen peroxide as a medical drug. *Riv Ital Ossigeno Ozonoterapia.* 2005; 4: 30-39.
 93. Di Paolo N, Gaggiotti E, Galli F. Extracorporeal blood oxygenation and ozonation: clinical and biological implications of ozone therapy. *Redox Rep.* 2005; 10(3): 121-30.
 94. Aslan MK, Boybeyi Ö, F.Şenyücel M, Ayva Ş, Kısa Ü, Aksoy N, Soyer T, Cesur Ö, Çakmak M: Protective effect of intraperitoneal ozone application in experimental ovarian ischemia/reperfusion injury *J Pediatric Surgery* article number 55724;2012
 95. Özler M : The use of ozone gas for Medical Purposes: *TAF Prev Med Bull* 2009 ;8(1): 59-64
 96. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal.* 2008; 10(8): 1343-74.
 97. Korkmaz A, Oter S, Sadir S, Coskun O, Topal T, Ozler M, Bilgic H. Peroxynitrite may be involved in bladder damage caused by cyclophosphamide in rats. *J Urol.* 2005; 173(5): 1793-6.
 98. Oter S, Korkmaz A, Topal T, Ozcan O, Sadir S, Ozler M, Ogur R, Bilgic H. Correlation between hyperbaric oxygen exposure pressures and oxidative parameters in rat lung, brain, and erythrocytes. *Clin Biochem.* 2005; 38(8): 706-11.
 99. Farber JL, Kyle ME, Coleman JB. Mechanism of cell injury by activated oxygen species. *Lab Invest.* 1990; 62: 670-679.
 100. Jannsen YMW, Van Houten B, Borm PJA, Mossman BT. Cell and tissue response to oxidative damage. *Lab Invest.* 1993; 69: 261-274.
 101. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen

- species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J.* 1996; 313: 17-29.
102. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol.* 2001; 54: 176-186.
103. Powis G, Briehl M, Oblong J. Redox signaling and the control of cell growth and death. *Pharmacol Ther.* 1995; 65: 149-173.
104. Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J.* 1997; 11: 118-124.
105. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 279(6): L1005–L1028.
106. Valacchi G, Bocci V. Studies on the biological effects of ozone: 10. Release of factors from ozonated human platelets. *Mediators Inflamm.* 1999; 8(4-5): 205-9.
107. Bocci V, Aldinucci C. Biochemical modifications induced in human blood by oxygenation-ozonation. *J Biochem Mol Toxicol.* 2006; 20(3): 133-8.
108. Oter S, Korkmaz A. Relevance of hyperbaric oxygen to ozone therapy. *Arch Med Res.* 2006; 37(7): 917-8.
109. Özler M, Ersöz N, Özerhan İH, Harlak A, Sadır S, Topal T, Öter Ş, Korkmaz A. Sıçanlarda oluşturulmuş peritoneal adezyon üzerine ozon tedavisinin etkisi. 2009; in pres
110. Bocci V. Ozone a new medical drug. Dordrecht. The Netherlands. Springer, 2005, p. 75-85.
111. Stübinger S, Sader R, Filippi A. The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: a review. *Quintessence Int.* 2006; 37(5): 353-9.
112. Nogales CG, Ferrari PH, Kantorovich EO, Lage-Marques JL. Ozone therapy in medicine and dentistry. *J Contemp Dent Pract.* 2008; 9(4): 75-84.
113. Bocci V. The case for oxygen-ozonotherapy. *Br J Biomed Sci.* 2007; 64(1): 44-9.
114. Muto M, Ambrosanio G, Guarnieri G, Capobianco E, Piccolo G, Annunziata G, Rotondo A. Low back pain and sciatica: treatment with intradiscal-intraforaminal O₂-O₃ injection. Our experience. *Radiol med.* 2008; 113: 695-706.
115. Uchiyama M, Mihara M: Determinant of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry.* 86: 271-278, 1978.

- 116.S. Johnsen, Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*, 1 (1970), pp. 2–25.
- 117.Cerasero TS, Nachtsheim DA , Otero F , et al: The effect of testicular torsion on the contralateral testis and the production of antisperm antibodies in rabbits. *J Urol*. 132:577-579, 1984.
- 118.Haynes BE, Bessen HA, Haynes VE :The diagnosis of testicular torsion *JAMA*. 249:2522-2525: 1983.
- 119.Bernay F, Özçelik B, Kılıç K, Kandemir B, Gürses N: Deneysel testis torsiyonunda reperfüzyon sendromunun yeri ve allopurinol ile önlenebilirliği. *OMU Tıp Dergisi*. 8(2): 157-161, 1991.
- 120.Taşcı İ, Yavuz N, Caner M, Göksel S, Yılmaz O, Vardar M, Sertel İ: Mezenterik iskemi-reperfüzyon hasarının önlenmesinde dimetilsulfoksit ve desferoksamin'in etkileri. *Çağdaş Cerrahi Dergisi*. 9: 67-73, 1995.
- 121.Pul N: Deneysel olarak mezenterik iskemi-reperfüzyon travması oluşturulan ratlarda verapamilin tedavi değerinin araştırılması. Uzmanlık tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fak. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı. Trabzon , s.3-11, 1992.
- 122.Akyazıcı R: Mezenterik iskemi-reperfüzyon travması oluşturulan ratlarda, reperfüzyon döneminde verilen ATP-MgCl₂'ün tedavi değerinin araştırılması.Uzmanlık Tezi, Karadeniz Teknik Üni.Tıp Fak. Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı. Trabzon, s.1-9, 1996.
- 123.Chen H, Xing B , Liu X, Zhan B, Zhou J, Zhu H , et al. Ozone oxidative preconditioning protects the rat kidney from reperfusion injury : the role of nitric oxide : *J Surg Res* 2008;149.287-95