



T.C.  
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ADENOSİN A<sub>2A</sub> RESEPTÖR AGONİST VE ANTAGONİSTİNİN  
SIÇANLARDA OVER İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI  
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Azad MAMMADOV  
DOKTORA TEZİ

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Abdullah Tuncay DEMİRYÜREK

Gaziantep

2023

T.C.  
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**ADENOZİN A<sub>2A</sub> RESEPTÖR AGONİST VE ANTAGONİSTİNİN  
SIÇANLARDA OVER İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI  
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Azad MAMMADOV**

Tez Savunma Tarihi: 25.07.2023

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

**Doç. Dr. Davut Sinan KAPLAN**  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Doktora” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

**Prof. Dr. Belgin ALAŞEHİRLİ**  
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

**Prof. Dr. Abdullah Tuncay DEMİRYÜREK**  
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

**Tez Jürisi**

**İmzası**

**Prof. Dr. Abdullah Tuncay DEMİRYÜREK**

**Prof. Dr. Şeniz DEMİRYÜREK**

**Prof. Dr. Zeynel Abidin ÖZTÜRK**

**Doç. Dr. Nadire ESER**

**Dr. Öğr. Üyesi Mehmet GÖL**

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

25/07/2023

İmza

Azad MAMMADOV

## TEŞEKKÜR

Bilimsel yaklaşımı ve yönlendirmeleriyle bana yol gösteren, yardımlarını ve desteğini esirgemeyen, doktora eğitimim boyunca çalışma disiplini benimsemeye çalıştığım kıymetli hocam ve saygıdeğer tez danışmanım Prof. Dr. Abdullah Tuncay Demiryürek'e ve desteğini her zaman hissettiğim ve doktora eğitimimde beni motive eden Prof. Dr. Şeniz Demiryürek'e teşekkür ederim.

Doktora sürecim boyunca tecrübe, bilgi ve rehberliğinden faydalandığım ve üzerimde emeği geçen değerli hocalarımdan Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Belgin Alaşehirli'ye ve Prof. Dr. Muradiye Nacak'a teşekkür ederim. Doktora eğitimimde zaman kavramı gözetmeden yardımlarını ve katkılarını esirgemeyen hocalarımdan Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Saracaloğlu'na teşekkür ederim.

Çalışmama katkıda bulunan değerli arkadaşım Arş. Gör. Dr. Cahit Demirkıran'a ve bu süreçte ilgi ve desteklerini esirgemeyen Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda birlikte eğitim aldığım değerli araştırma görevlilerine ve lisansüstü öğrenci arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışmanın gerçekleşmesine katkıda bulunan Biruni Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İsmail Tuncer Değim'e ve Dr. Öğr. Üyesi Gamze Çamlık'a ve Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndan Dr. Öğr. Üyesi Ömer Eronat'a teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi, çalışmam sırasında da yoğun ilgilerini, özverilerini ve her türlü desteklerini esirgemeyen başta annem ve babam olmak üzere aileme teşekkür ederim.

Doktora eğitimimde 100/2000 YÖK Doktora Bursu ile finansal destek sağlayan Yükseköğretim Kurulu'na teşekkür ederim. Bu çalışma Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Tarafından Desteklenmiştir. Proje Numarası: TF.DT.21.46. Teşekkür ederim.

6 Şubat 2023 tarihinde meydana gelen depremlerde başta arkadaşım Ecz. Okan Bucak olmak üzere hayatını kaybedenlere Allah'tan rahmet, yakınlarına başsağlığı diliyorum. Saygıyla anıyorum...

Azad MAMMADOV



# İÇİNDEKİLER

|                                                     |     |
|-----------------------------------------------------|-----|
| TEŞEKKÜR .....                                      | i   |
| İÇİNDEKİLER .....                                   | iii |
| SİMGE ve KISALTMALAR .....                          | vii |
| ŞEKİL LİSTESİ.....                                  | ix  |
| TABLO LİSTESİ.....                                  | x   |
| RESİM LİSTESİ.....                                  | xi  |
| ÖZET .....                                          | 1   |
| ABSTRACT.....                                       | 2   |
| 1. GİRİŞ ve AMAÇ .....                              | 3   |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                              | 7   |
| 2.1. Over .....                                     | 7   |
| 2.1.1. Over anatomisi .....                         | 7   |
| 2.1.2. Over embriyolojisi.....                      | 8   |
| 2.1.3. Over histolojisi .....                       | 10  |
| 2.1.4. Over fizyolojisi.....                        | 12  |
| 2.2. Sıçanlarda dişi üreme sistemi .....            | 14  |
| 2.3. Over torsiyonu .....                           | 16  |
| 2.3.1. Over torsiyonu tanımı ve tarihçesi .....     | 16  |
| 2.3.2. Epidemiyoloji .....                          | 16  |
| 2.3.3. Risk faktörleri.....                         | 16  |
| 2.3.4. Etyopatogenez .....                          | 17  |
| 2.3.5. Tanı.....                                    | 18  |
| 2.3.6. Tedavi.....                                  | 19  |
| 2.4. İskemi/Reperfüzyon.....                        | 20  |
| 2.4.1. İskemi .....                                 | 20  |
| 2.4.2. İskemi/Reperfüzyon hasarı (İ/R hasarı) ..... | 21  |

|                                                         |    |
|---------------------------------------------------------|----|
| 2.4.3. İskemi/Reperfüzyon hasarı mekanizmaları .....    | 22 |
| 2.4.3.1. Komplemanın rolü .....                         | 22 |
| 2.4.3.2. Polimorfonükleer Lökositlerin (PMN) rolü ..... | 23 |
| 2.4.3.3. Endotel hücrelerinin rolü .....                | 24 |
| 2.4.3.4. Serbest radikallerin rolü .....                | 24 |
| 2.5. Serbest radikaller .....                           | 24 |
| 2.5.1. Serbest radikallerin oluşumu .....               | 25 |
| 2.5.2. Serbest radikal kaynakları .....                 | 29 |
| 2.5.2.1. Endojen kaynaklar .....                        | 29 |
| 2.5.2.1.1. Mitokondri... ..                             | 29 |
| 2.5.2.1.2. Peroksizomlar .....                          | 30 |
| 2.5.2.1.3. Endoplazmik Retikulum (ER) .....             | 31 |
| 2.5.2.1.4. Enzim sistemi.....                           | 31 |
| 2.5.2.2. Ekzojen kaynaklar.....                         | 32 |
| 2.5.3. Serbest radikallerin etkileri .....              | 33 |
| 2.5.3.1. Lipitler .....                                 | 33 |
| 2.5.3.2. Proteinler.....                                | 34 |
| 2.5.3.3. Deoksiribonükleik Asit (DNA).....              | 34 |
| 2.5.3.4. Ribonükleik asit (RNA) .....                   | 35 |
| 2.6. Antioksidanlar.....                                | 35 |
| 2.6.1. Endojen antioksidanlar .....                     | 36 |
| 2.6.1.1. Enzimatik antioksidanlar .....                 | 36 |
| 2.6.1.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) .....              | 37 |
| 2.6.1.1.2. Katalaz (CAT).....                           | 37 |
| 2.6.1.1.3. Glutasyon sistemi .....                      | 37 |
| 2.6.1.1.4. Diğer antioksidan enzimler .....             | 38 |
| 2.6.1.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar.....          | 38 |

|                                                                               |           |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.6.2. Ekzojen antioksidanlar .....                                           | 38        |
| 2.7. Oksidatif stres/Nitrozatif stres .....                                   | 38        |
| 2.7.1. Oksidatif/Nitrozatif stres ve İskemi/Reperfüzyon hasarı ilişkisi ..... | 39        |
| 2.8. Adenozin.....                                                            | 40        |
| 2.8.1. Adenozin reseptörleri .....                                            | 42        |
| 2.8.1.1. Adenozin A <sub>1</sub> reseptörü.....                               | 43        |
| 2.8.1.2. Adenozin A <sub>2A</sub> reseptörü.....                              | 44        |
| 2.8.1.3. Adenozin A <sub>2B</sub> reseptörü.....                              | 44        |
| 2.8.1.4. Adenozin A <sub>3</sub> reseptörü.....                               | 45        |
| 2.8.2. Adenozin reseptör agonist ve antagonistleri .....                      | 45        |
| 2.8.2.1. Regadenoson.....                                                     | 47        |
| 2.8.2.2. İstradefilin.....                                                    | 48        |
| 2.8.3. Adenozinin İskemi/Reperfüzyon hasarındaki rolü.....                    | 48        |
| 2.9. Nanosüspansiyonlar .....                                                 | 49        |
| <b>3. GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>                                                | <b>52</b> |
| 3.1. Etik Kurul onayı .....                                                   | 52        |
| 3.2. Deneysel gruplar ve cerrahi prosedür .....                               | 52        |
| 3.3. Biyokimyasal analizler .....                                             | 58        |
| 3.3.1. Kan örneklerinde yapılan analizler.....                                | 58        |
| 3.3.1.1. Serum MDA ölçümü.....                                                | 58        |
| 3.3.1.2. Serum 3-NT ölçümü .....                                              | 59        |
| 3.3.1.3. Serum NO ölçümü .....                                                | 59        |
| 3.3.1.4. Serum tiyol-disülfid parametrelerinin ölçümü.....                    | 60        |
| 3.3.2. Doku örneklerinde yapılan analizler .....                              | 61        |
| 3.3.2.1. Doku homojenatlarının hazırlanması.....                              | 61        |
| 3.3.2.2. Doku SOD1 ölçümü.....                                                | 62        |
| 3.3.2.3. Doku 3-NT ölçümü.....                                                | 63        |



|                                                             |            |
|-------------------------------------------------------------|------------|
| 3.3.2.4. Doku NO analizi .....                              | 63         |
| 3.3.2.5. Doku tiyol-disülfid parametrelerinin ölçümü .....  | 63         |
| 3.3.2.6. Doku protein ölçümü .....                          | 63         |
| 3.4. Nanosüspansiyonların hazırlanması .....                | 64         |
| 3.4.1. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) analizi.....      | 64         |
| 3.4.2. Partikül boyutu ölçümü .....                         | 65         |
| 3.5. Histopatolojik analizler.....                          | 65         |
| 3.6. İstatistiksel analiz.....                              | 66         |
| <b>4. BULGULAR.....</b>                                     | <b>68</b>  |
| 4.1. Biyokimyasal analiz bulguları .....                    | 68         |
| 4.1.1. Serum tiyol-disülfid parametrelerinin bulguları..... | 68         |
| 4.1.2. Doku tiyol-disülfid parametrelerinin bulguları ..... | 74         |
| 4.1.3. Doku SOD1 bulguları.....                             | 78         |
| 4.1.4. Serum MDA bulguları.....                             | 79         |
| 4.1.5. Serum 3-NT bulguları .....                           | 80         |
| 4.1.6. Doku 3-NT bulguları .....                            | 81         |
| 4.1.7. Serum NO bulguları .....                             | 82         |
| 4.1.8. Doku NO bulguları .....                              | 83         |
| 4.1.9. Korelasyon analizleri.....                           | 83         |
| 4.2. Nanosüspansiyon karakterizasyon bulguları .....        | 86         |
| 4.2.1. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) analizleri .....  | 86         |
| 4.2.2. Partikül boyutu ölçümleri.....                       | 88         |
| 4.3. Histopatolojik bulgular .....                          | 91         |
| <b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>                           | <b>97</b>  |
| <b>6. KAYNAKLAR .....</b>                                   | <b>104</b> |
| <b>7. EKLER.....</b>                                        | <b>128</b> |
| <b>8. ÖZGEÇMİŞ.....</b>                                     | <b>129</b> |

## SİMGE ve KISALTMALAR

|                                    |                                                                            |
|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <b><math>^1\text{O}_2</math></b>   | Singlet oksijen                                                            |
| <b>3-NT</b>                        | 3-nitrotirozin                                                             |
| <b>AC</b>                          | Adenilat siklaz                                                            |
| <b>ADP</b>                         | Adenozin difosfat                                                          |
| <b>AMP</b>                         | Adenozin monofosfat                                                        |
| <b>AR</b>                          | Adenozin reseptörü                                                         |
| <b>ATP</b>                         | Adenozin trifosfat                                                         |
| <b><math>\text{Ca}^{+2}</math></b> | Kalsiyum                                                                   |
| <b>CAT</b>                         | Katalaz                                                                    |
| <b>CRP</b>                         | C-reaktif protein                                                          |
| <b>CYP450</b>                      | Sitokrom P450                                                              |
| <b>D<sub>2</sub>R</b>              | Dopamin D2 reseptörü                                                       |
| <b>DNA</b>                         | Deoksiribonükleik asit                                                     |
| <b>EDTA</b>                        | Etilendiamin tetraasetik asit                                              |
| <b>Ekto-ADA</b>                    | Ekto-adenozin deaminasyon                                                  |
| <b>ENT</b>                         | Dengeli nükleozit taşıyıcı ( <i>Equilibrative Nucleoside Transporter</i> ) |
| <b>ER</b>                          | Endoplazmik retikulum                                                      |
| <b>ETZ</b>                         | Elektron transport zinciri                                                 |
| <b>FDA</b>                         | ABD Gıda ve İlaç Dairesi                                                   |
| <b>FSH</b>                         | Folikül uyarıcı hormon                                                     |
| <b>GAÜNDAM</b>                     | Gaziantep Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi                  |
| <b>GnRH</b>                        | Gonadotropin salgılatıcı hormon                                            |
| <b>GPx</b>                         | Glutasyon peroksidaz                                                       |
| <b>GSH</b>                         | Glutasyon                                                                  |

|                                   |                              |
|-----------------------------------|------------------------------|
| <b>GSSG</b>                       | Okside olmuş glutatyon       |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | Hidrojen peroksit            |
| <b>IMP</b>                        | İnozin mono-fosfat           |
| <b>İ/R</b>                        | İskemi/reperfüzyon           |
| <b>İP</b>                         | İntraperitoneal              |
| <b>L<sup>•</sup></b>              | Lipit radikali               |
| <b>LH</b>                         | Luteinizan hormon            |
| <b>LOOH</b>                       | Lipid hidroperoksit          |
| <b>MDA</b>                        | Malondialdehit               |
| <b>MPO</b>                        | Miyeloperoksidaz             |
| <b>NO</b>                         | Nitrik oksit                 |
| <b>NOS</b>                        | Nitrik oksit sentaz          |
| <b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b> | Süperoksit anyonu            |
| <b>•OH</b>                        | Hidroksil                    |
| <b>ONOO<sup>-</sup></b>           | Peroksinitrit                |
| <b>PBS</b>                        | Fosfat tampon çözeltisi      |
| <b>PG</b>                         | Prostaglandin                |
| <b>PKA</b>                        | Protein kinaz A              |
| <b>PLC</b>                        | Fosfolipaz C                 |
| <b>PMN</b>                        | Polimorfonükleer lökosit     |
| <b>RNA</b>                        | Ribonükleik asit             |
| <b>RNS</b>                        | Reaktif nitrojen türleri     |
| <b>ROS</b>                        | Reaktif oksijen türleri      |
| <b>sAMP</b>                       | Siklik adenzin monofosfat    |
| <b>SEM</b>                        | Taramalı elektron mikroskopu |
| <b>SOD</b>                        | Süperoksit dismutaz          |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b>    | Tümör nekroz faktör-alfa     |
| <b>USG</b>                        | Ultrasonografi               |

## ŞEKİL LİSTESİ

|                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1. Kadın iç üreme organları .....                                                          | 7  |
| Şekil 2.2. Adenozin sentezi ve metabolizması .....                                                 | 41 |
| Şekil 4.1. Grupların serum total tiyol düzeyleri .....                                             | 68 |
| Şekil 4.2. Grupların serum doğal tiyol seviyeleri .....                                            | 69 |
| Şekil 4.3. Grupların serum disülfid düzeyleri .....                                                | 70 |
| Şekil 4.4. Grupların serum doğal tiyol/total tiyol oranı .....                                     | 71 |
| Şekil 4.5. Grupların serum disülfid/total tiyol oranı .....                                        | 72 |
| Şekil 4.6. Grupların serum disülfid/doğal tiyol oranı .....                                        | 73 |
| Şekil 4.7. Grupların doku total tiyol düzeyi .....                                                 | 74 |
| Şekil 4.8. Grupların doku doğal tiyol düzeyleri .....                                              | 75 |
| Şekil 4.9. Grupların doku disülfid düzeyleri .....                                                 | 76 |
| Şekil 4.10. Grupların doğal tiyol/total tiyol oranı düzeyleri .....                                | 76 |
| Şekil 4.11. Grupların doku disülfid/total tiyol oranı .....                                        | 77 |
| Şekil 4.12. Grupların doku disülfid/doğal tiyol oranı .....                                        | 77 |
| Şekil 4.13. Grupların doku SOD1 düzeyleri .....                                                    | 78 |
| Şekil 4.14. Grupların serum MDA düzeyleri .....                                                    | 79 |
| Şekil 4.15. Grupların serum 3-NT düzeyleri .....                                                   | 80 |
| Şekil 4.16. Grupların doku 3-NT düzeyleri .....                                                    | 81 |
| Şekil 4.17. Grupların serum NO düzeyleri .....                                                     | 82 |
| Şekil 4.18. Grupların doku NO düzeyleri .....                                                      | 83 |
| Şekil 4.19. Boş nanosüspansiyonların partikül boyutu dağılımı .....                                | 89 |
| Şekil 4.20. Boş nanosüspansiyonların yoğunluk olarak partikül boyutu dağılımı .....                | 89 |
| Şekil 4.21. İstradefilin yüklü nanosüspansiyonların partikül boyutu dağılımı .....                 | 90 |
| Şekil 4.22. İstradefilin yüklü nanosüspansiyonların yoğunluk olarak partikül boyutu dağılımı ..... | 90 |
| Şekil 4.23. Gruplara göre toplam histopatolojik skor dağılımı .....                                | 96 |

## TABLO LİSTESİ

|                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 2.1.</b> Sıçanda ve insanda doğum sonrası gelişim evreleri .....                                                                      | 15 |
| <b>Tablo 2.2.</b> Başlıca Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Reaktif Nitrojen Türleri (RNS) .                                                    | 26 |
| <b>Tablo 2.3.</b> Peroksizomlarda ROS/RNS oluşumuna yol açan başlıca enzimler.....                                                             | 31 |
| <b>Tablo 2.4.</b> Serbest radikal oluşumuna yol açan ekzojen kaynaklar .....                                                                   | 32 |
| <b>Tablo 2.5.</b> Adenozin reseptörlerinin dağılımı ve fizyolojik işlevi .....                                                                 | 42 |
| <b>Tablo 2.6.</b> Adenozin reseptör agonist ve antagonistlerinin etki mekanizmaları .....                                                      | 46 |
| <b>Tablo 3.1.</b> Over dokusundan elde edilen örneklerin histopatolojik bulgularının şiddetinin değerlendirilmesinde kullanılan skorlama ..... | 66 |
| <b>Tablo 4.1.</b> Sıçanlarda over İ/R deneylerinde ölçülen parametreler arasındaki istatistiksel olarak anlamlı korelasyonlar.....             | 85 |
| <b>Tablo 4.2.</b> Sıçanlarda over İ/R deneylerinde ölçülen parametreler arasındaki istatistiksel olarak anlamlı korelasyonlar.....             | 86 |
| <b>Tablo 4.3.</b> Boş nanosüspansiyonların ve İstradefilin yüklü nanosüspansiyonların partikül boyutları .....                                 | 88 |

## RESİM LİSTESİ

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Resim 3.1.</b> Paslanmaz çelik kafeste tutulan 160-240 g ağırlığında Wistar albino dişi sıçanlar ..... | 52 |
| <b>Resim 3.2.</b> Tek taraflı (sol) tam over iskemisi modeli oluşturma .....                              | 54 |
| <b>Resim 3.3.</b> İntrakardiyak kan alımı .....                                                           | 58 |
| <b>Resim 3.4.</b> Spektrofotometre .....                                                                  | 59 |
| <b>Resim 3.5.</b> Kemilüminesans tekniği ile NO tayini .....                                              | 60 |
| <b>Resim 3.6.</b> Doku homojenizatörü .....                                                               | 62 |
| <b>Resim 3.7.</b> Ultrasonik homojenizatör .....                                                          | 62 |
| <b>Resim 3.8.</b> Altın-Paladyum kaplama cihazı .....                                                     | 65 |
| <b>Resim 3.9.</b> Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) .....                                                | 65 |
| <b>Resim 4.1.</b> Boş nanosüspansiyonların SEM görüntüsü .....                                            | 87 |
| <b>Resim 4.2.</b> İstradefilin yüklü nanosüspansiyonların SEM görüntüsü .....                             | 87 |
| <b>Resim 4.3.</b> Sham grubunun over dokusunun histopatolojik görüntüsü .....                             | 91 |
| <b>Resim 4.4.</b> İskemi/reperfüzyon grubunun over dokusunun histopatolojik görüntüsü ...                 | 91 |
| <b>Resim 4.5.</b> Boş nano + İ/R grubunun over dokusunun histopatolojik görüntüsü .....                   | 92 |
| <b>Resim 4.6.</b> Rega 3 + İ/R grubunun over dokusunun histopatolojik görüntüsü .....                     | 92 |
| <b>Resim 4.7.</b> Rega 30 + İ/R grubunun over dokusunun histopatolojik görüntüsü .....                    | 93 |
| <b>Resim 4.8.</b> Ist 0.3 + İ/R grubunun over dokusunun histopatolojik görüntüsü .....                    | 93 |
| <b>Resim 4.9.</b> Ist 3 + İ/R grubunun over dokusunun histopatolojik görüntüsü .....                      | 94 |
| <b>Resim 4.10.</b> Nano Ist 3 + İ/R grubunun over dokusunun histopatolojik görüntüsü .....                | 94 |
| <b>Resim 4.11.</b> Ist 3 + Rega 30 + İ/R grubunun over dokusunun histopatolojik görüntüsü                 | 95 |
| <b>Resim 4.12.</b> Nano Ist 3 + Rega 30 + İ/R grubunun over dokusunun histopatolojik görüntüsü .....      | 95 |

## ÖZET

### ADENOZİN A<sub>2A</sub> RESEPTÖR AGONİST VE ANTAGONİSTİNİN SIÇANLARDA OVER İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Azad MAMMADOV

Doktora Tezi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Abdullah Tuncay DEMİRYÜREK

Temmuz 2023, 129 sayfa

Over torsiyonu kadınlarda sık görülen ve ameliyat gerektiren en tehlikeli jinekolojik acil durumlardan biridir. Over torsiyonu görülen hastalarda klinik bulguların spesifik olmaması tanıda ve tedavide gecikmeye neden olmaktadır. Over torsiyonunda doku hasarını irreversibl hale getiren başlıca patoloji iskemidir. Detorsiyondan dolayı over reperfüze olmaya başladığında iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarı riski oluşur. Çalışmamızda, over İ/R hasarı ile selektif adenosin A<sub>2A</sub> reseptör agonisti Regadenoson ve selektif adenosin A<sub>2A</sub> reseptör antagonisti İstradefilin arasındaki ilişki ve bunların over İ/R hasarına karşı biyokimyasal ve histopatolojik düzeylerde koruyucu etkilerine aracılık etmede rolü olup olmadığı araştırıldı. Bu çalışmada toplam 80 adet Wistar albino dişi sıçan kullanıldı ve her bir grupta 8 sıçan olmak üzere 10 gruba ayrıldı. Ayrıca, daha önce çalışılmamış İstradefilin nanoformülasyonunun over İ/R modelinde etkisinin ortaya koyulması amaçlandı. Bundan dolayı da boş ve İstradefilin yüklü nanosüspansiyon formülasyonları hazırlanarak bunların SEM analiziyle görüntüleri incelendi. Biyokimyasal analizler, kanda NO, MDA, tiyol/disülfid dengesi, 3-NT düzeylerinin araştırılmasını; dokuda ise, NO, SOD1, tiyol/disülfid dengesi ve 3-NT analizlerini kapsamaktadır. Elde edilen sonuçların korelasyon analizleri yapıldı. Adenosin A<sub>2A</sub> reseptör agonisti Regadenosonun oksidatif ve nitrozatif stresi azaltıcı etkileri gözlemlendi. Yüksek doz Regadenoson uygulaması ile serum doğal tiyol düzeyi ve serum doğal tiyol/total tiyol oranında belirgin artış gözlemlendi (sırasıyla P<0.01, P<0.01). Ayrıca, serum disülfid düzeyi, serum disülfid/total tiyol oranı, serum disülfid/doğal tiyol oranı, serum 3-NT düzeyi, doku 3-NT ve serum NO düzeyinde ise Regadenoson ile azalma saptanmıştır (sırasıyla P<0.05, P<0.001, P<0.01, P<0.05, P<0.05, P<0.05). Bu çalışma, sıçan over İ/R hasarına karşı Regadenoson ve İstradefilin ile yapılan ilk çalışmadır.

**Anahtar sözcükler:** Adenosin, iskemi/reperfüzyon hasarı, over torsiyonu, Regadenoson, İstradefilin

## ABSTRACT

### INVESTIGATION THE EFFECTS OF ADENOSINE A<sub>2A</sub> RECEPTOR AGONIST AND ANTAGONIST ON OVARIAN ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY IN RATS

Azad MAMMADOV

PhD Thesis, Department of Medical Pharmacology

Supervisor: Prof. Dr. Abdullah Tuncay DEMİRYÜREK

July 2023, 129 pages

Ovarian torsion is one of the most dangerous gynecologic emergencies that is common in women and requires surgery. The lack of specific clinical findings in patients with ovarian torsion leads to delayed diagnosis and treatment. The main pathology that makes tissue damage irreversible in the ovary with torsion is ischemia. When the ovary starts to reperfuse due to detorsion, the risk of ischemia/reperfusion (I/R) injury occurs. In our study, we investigated the relationship between ovarian I/R injury and the selective adenosine A<sub>2A</sub> receptor agonist Regadenoson and the selective adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonist Istradefylline and examined whether they mediate their protective effects against ovarian I/R injury at biochemical and histopathological levels. In this study, a total of 80 Wistar albino female rats were used and divided into 10 groups with 8 rats in each group. Additionally, the aim was to demonstrate the effect of the previously unstudied nanoformulation of Istradefylline in ovarian I/R model. Therefore, empty and Istradefylline-loaded nanosuspension formulations were prepared and their images were examined by SEM analysis. Biochemical analyses included NO, MDA, thiol/disulfide balance, 3-NT levels in blood and NO, SOD1, thiol/disulfide balance, 3-NT analysis in tissue. Correlation analyses of the obtained results were performed. The adenosine agonist Regadenoson had decreasing effects on oxidative and nitrosative stress. A significant increase was observed in serum native thiol levels and serum native thiol/total thiol ratio with the administration of a high dose of Regadenoson (P<0.01, P<0.01, respectively). Additionally, Regadenoson was found to reduce serum disulfide levels, serum disulfide/total thiol ratio, serum disulfide/native thiol ratio, serum 3-NT levels, tissue 3-NT levels, and serum NO levels (P<0.05, P<0.001, P<0.01, P<0.05, P<0.05, P<0.05, respectively). This study is the first investigation using Regadenoson and Istradefylline against rat ovarian I/R injury.

**Key Words:** Adenosine, ischemia/reperfusion injury, ovarian torsion, Regadenoson, Istradefylline



## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Over torsiyonu ya da adneksiyal torsiyon, tarihte ilk kez 1890 yılında Bland-Sutton tarafından bildirilmiştir (1). Over torsiyonu; over dokusunu besleyen ve destekleyen bağların tam veya kısmi olarak dönmesi ile birlikte overin kan akımında bozulma ya da kesilmeye bağlı olarak iskemik değişikliklerin ortaya çıktığı akut bir obstetrik ve jinekolojik acil durum olarak tanımlanır (2-4). Overde torsiyona bağlı olarak gelişen over iskemisi ile birlikte dokuda hemoraji, nekroz ve peritonit ortaya çıkabilir. İskemik dokunun detorsiyon yapılması ve sonrasında da iskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarına zaman kaybetmeden müdahale edilmesi önem arz etmektedir (5, 6).

Acil servise akut karın ağrısı ile başvuran hastalarda over torsiyonu, jinekolojik acil vakaların yaklaşık %3'ünü oluşturur ve torsiyon vakalarının %80'inde 5 cm veya daha büyük bir over kisti varlığıyla birlikte ortaya çıkar (7-10). Gebelik insidansı kesin bilinmemekle birlikte bazı çalışmalarda 1-5/10.000 olarak bildirilmektedir (11, 12). Over torsiyonu, vakaların çoğunluğunda üreme çağındaki kadınlarda 20 yaş üzeri ile 40 yaşın altındaki bayanlarda rastlansa da pediatrik popülasyonda da rastlanabilir (5, 13, 14). Doğumdan itibaren uzun gelişen over ligamentleri, pelvik ligamentlerin aşırı gevşek olması ya da over torsiyonun ekseninde daha fazla dönmesine ve hareket etmesine izin veren nispeten daha küçük uterus da over torsiyonu için predispozan faktörlerden sayılabilir (15, 16).

Over torsiyonu, genellikle ani başlayan alt karın ağrısı, pelvik ağrı, bulantı ve kusma belirtilerinden biri veya birkaçı ile kendini gösterebilir (17-19). Semptomlar genellikle spesifik olmadığı için klinik olarak teşhisi zordur (13). Over torsiyonu, korpus luteum kisti rüptürü, akut apandisit, overlerin hiperstimülasyonu, üriner obstrüksiyon, ürolitiazis, gastroenterit, hemorajik over kisti rüptürü, pelvik inflamatuvar hastalık ve ektopik gebelik gibi diğer tanılardan ayırt edilmelidir (19-24). Görüntüleme yöntemleri, over kistini değerlendirmede tanısal değerlendirme için önemli olmakla birlikte over torsiyonunun tanısında ilk tercih edilen görüntüleme yöntemi ultrasonografidir (USG) (8, 25).

Over torsiyonunu tedavi etmek için standart uygulanan yöntem cerrahidir. Yaygın olarak kullanılan iki cerrahi yöntem laparoskopi ve laparotomidir. Laparoskopik yaklaşım daha yaygın bir prosedür haline gelse de over veya fallop tüp kanseri şüphesi varsa, laparotomi

daha sık kullanılmaktadır (26, 27). Overin detorsiyonu ile birlikte overin reperfüze olması sonucu bazı lokal ve sistemik etkiler görülebilir. Buna bağlı olarak, overde İ/R hasarına neden olabilir. Bu hasarın önlenmesi için farklı tedavi stratejileri üzerinde çalışılmaktadır (28, 29).

İskemi-reperfüzyon hasarındaki temel mekanizma, anaerobik metabolizmanın iskemi ile indüklenmesiyle başlar, bu da iyon değişim kanallarının bozulmasına yol açan daha düşük adenozin trifosfat (ATP) üretimi ile sonuçlanır. Azalan ATP üretimine rağmen, sürekli ATP kullanımı nedeniyle sırasıyla adenozin difosfat (ADP), adenozin monofosfat (AMP) ve inozin mono-fosfata (IMP) ardından adenozin, inozin, hipoksantin ve ksantine dönüşür. İskemi sırasında reperfüzyon ile oksijen akışının yeniden sağlanmasıyla oluşan ksantin oksidaz, biriken hipoksantini ksantine dönüştürür ve serbest oksijen radikali oluşumuna neden olur ki bu da otofaji, mitoptoz, nekroz, nekroptoz ve apoptoza neden olarak hücre ölümüne yol açabilir (30, 31). Hücre hasarını önlemek için gerekli olan ilk yöntem hipoperfüzyon süresini kısaltmak ve reperfüzyon sağlamaktır (32). İskemi-reperfüzyon hasarının neden olduğu toplam doku hasarı, iskemi hasarı ve reperfüzyon hasarı olarak iki kısma ayrılır. İskemik hasar başlangıçta hipoksi ve hiponutrisyona neden olabilir (32). Uzun süreli iskemi sonrasında, hücrelerden gelen metabolik ürünler tutulur ve metabolik asidoza neden olur. Kan akımı yeniden sağlandığında, inflamatuvar yanıt ortaya çıkabilir, reaktif oksijen türleri (ROS) ya da reaktif nitrojen türleri (RNS) üretimi artabilir ve bu da ikincil hasara yol açabilir. Hücre yanıtı, toplam doku hasarının şiddetine bağlıdır (33-35). İskemi-reperfüzyona bağlı doku hasarının, organ transplantasyonu, miyokard infarktüsü, serebrovasküler hastalıklar, majör cerrahi girişimler, akut renal hasar, hepatik hasar, orak hücre anemisi, over torsiyonu, hemorajik şok ve resüsitasyon gibi çeşitli durumlarda yüksek morbidite ve mortaliteye katkıda bulunduğu düşünülmektedir (36-43).

İskemi-reperfüzyon hasarının altında yatan mekanizmalar karmaşık ve çok faktörlü olmakla birlikte reperfüzyon ile birlikte oksijen ile indüklenen serbest oksijen radikalleri, kompleman sistem aktivasyonunu, endotel hücre disfonksiyonu ve polimorfonükleer lökosit (PMN) aktivasyonu içerir (44-50). İskemi-reperfüzyonda ortaya çıkan hasardan başlıca mitokondrideki, peroksizomlardaki, birçok enzim aktivitesindeki artış ve endoplazmik retikulumdaki (ER) biyokimyasal mekanizmalar ile ortaya çıkan serbest radikal oluşumu sorumlu tutulmaktadır (51-53). Overin detorsiyonu ile birlikte over

reperfüzyonu iskemiyi önlerken reperfüzyona bağlı olarak nötrofillerden adezyon moleküllerinin aktivasyonuna, proinflamatuvar moleküllerin salınmasına ve ROS/RNS oluşumuna neden olur (4, 39, 54). İskemi-reperfüzyon sonucunda ROS'un genel zararlı etkileri arasında makromoleküllerin hasarı/modifikasyonu, etkilenen dokuda endotelial ve/veya parankimal hücre ölümünün indüklenmesi, çeşitli hücre tipleri tarafından pro-inflamatuvar mediatörlerin üretiminin/serbest bırakılmasının uyarılması, lökosit/lenfosit-endotelial hücre adheziv etkileşimlerini destekleyen adhezyon moleküllerinin indüksiyonu ve koruyucu nitrik oksit (NO) miktarında azalması yer almaktadır (55-57).

Vücut enzimatik antioksidan mekanizmaları kullanarak serbest radikal regülasyonlarını modüle eder ve biyomoleküllerin oksidatif hasara uğramasını önler. Antioksidan enzimler lipid hidroperoksit (LOOH) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) seviyelerini azaltır, bu nedenle lipid peroksidasyonunun önlenmesinde ve hücre membranlarının yapı ve işlevinin korunmasında önemlidirler. Ayrıca, deoksiribonükleik asit (DNA) ve proteinleri onarabilme yeteneğine de sahiptir (58). Tüm vücut hücrelerindeki antioksidan enzimler, katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPX) enzimlerinden oluşur ve bunların tümü, hücrelerde homeostazın korunmasında önemli rol oynar (58).

Over torsiyonunda İ/R hasarını önlemek için antioksidan ve anti-inflamatuvar özellikleri olan birçok farmakolojik ajan, son zamanlarda hayvan modellerinde İ/R hasarının tedavisinde denenmiş ancak rutin klinik uygulamaya dahil olmamıştır (59-62).

Adenozin; hipoksi, iske mi, stres, nöbet, ağrı, travma ve inflamasyon gibi hücre sel stres durumlarında artış göstermekle birlikte dokularda çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik olayların ortaya çıkmasında önemli rolü bulunmaktadır (63-65). Adenozin reseptör agonist ve antagonistleri, nöro-modülasyon, immün regülasyon, vasküler fonksiyon ve metabolik kontrol dahil olmak üzere birçok önemli fizyolojik süreçle ilişkilendirilmiştir (65, 66). Hücre sel stres sırasında hücre dışı adenozin konsantrasyonu artarak kardiyak ritim ve dolaşımın kontrolü, lipid metabolizması, immün fonksiyonlar, uykunun düzenlenmesi, anjiyogenez, vazodilatasyon ve antiinflamatuvar eylemler gibi birçok fizyolojik eylem üretir (67-71). Adenozin reseptör agonist ve antagonistlerinin over İ/R hasarı üzerine deneysel bir çalışma henüz mevcut değildir. Hem adenozin  $A_{2A}$  agonisti Regadenoson hem de  $A_{2A}$  antagonisti İstradefilin ile overlerde İ/R hasarında daha önce araştırma yapılmamıştır ve ilk kez bu tez çalışmasında etkilerinin belirlenmesi

amaçlanmaktadır. Bunun dışında adenosin  $A_{2A}$  reseptör antagonisti İstradefilinin nanotaşıyıcı sistem içerisinde uygulanması ile overlere daha iyi hedefleme sağlanması amaçlanmaktadır.

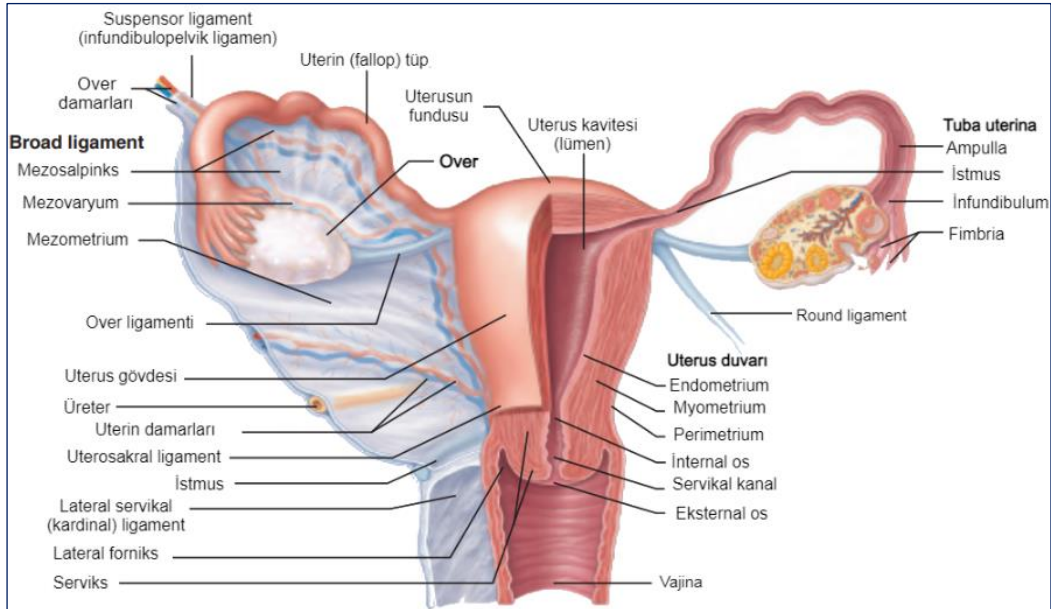


## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Over

#### 2.1.1. Over anatomisi

Over, yaklaşık olarak 4x2 cm ölçülerinde olup oval bir şekle sahiptir. Ön yüzü mesovaryum olarak adlandırılan peritoneal katlantı ile *ligamentum latum uteri* (broad ligamentinin) arka tarafına bağlanır (72, 73). Overe ait uzun eksenler vertikal yönde konumlanmıştır (74) (Şekil 2.1). Peritonun başka bir yükseltilmiş plikası, overin üst kısmından giren overin venlerini, sinirlerini ve lenfatiklerini kaplayarak overin *ligamentum suspensorium ovarii* (infundibulopelvik ligament) oluşturur. Overin altında yer alan kısma fibromusküler kordon tutunur. Embriyonik dönemde gubernaculum'un kalıntısı olan bu kordon *ligamentum ovarii proprium* olarak adlandırılır. Mesovaryumun kenarında uterusu doğru mediale uzanan *ligamentum ovarii proprium* anterolaterale doğru *ligamentum teres uteri* olarak devam eder. Pelvisi geçerek annulus inguinalis profundus'a ulaşan *ligamentum teres uteri* daha sonra canalis inguinalis'i de geçip perineum'da labium majus'un bağ dokusunda konumlanır. *Ligamentum ovarii proprium* ve *ligamentum teres uteri gubernaculum*'un kalıntılarıdır (75).



Şekil 2.1. Kadın iç üreme organları (74)

Overler tipik olarak pelvisin lateral duvarında yer alan *fossa ovarica* isimli çukur içerisinde bulunur. *Fossa ovarica*'nın üst kısmını *vasa iliaca externae* (dış iliak

damarlar), arka kısmını *vasa iliaca interna* (iç iliak damarlar) sınırlandırmıştır. Overin konumu büyük ölçüde değişebilir ve genellikle rektouterin çukuruna (Douglas çukuru) doğru eğilim gösterir. Büyüyen uterus, gebelik sırasında overi karın boşluğuna doğru iter. Doğum sonrası *ligamentum latum uteri* gevşediğinde over pelvis içerisinde değişken pozisyon alır (72). Overler, *tunica albuginea* olarak bilinen ince fibröz bir kapsülle çevrilidir. Yüzeyini, germinal (columnar) epitel adı verilen modifikasyona uğramış periton alanı bu kapsülü dıştan kaplar (72, 73).

Overin perfüzyonu, esas olarak *arteria ovarica*'dan sağlanır. Over, *ligamentum suspensorium ovarii* içinde bulunan ve uterus arterinin dallarıyla anastomoz yapan ovaryan arterler tarafından beslenir (73). *Aorta abdominalis*'ten orijin alan *arteria ovarica*, alt kısımda pelvis girişini çaprazlayarak overi besler. Gebelik durumunda overin perfüzyonundan sorumlu arterler uterus kan akışını artırmak için önemli ölçüde genişler (75). Venöz perfüzyonu sağlayan over venleri sağda *vena cava inferior*'a ve solda ise *vena renalis sinistra*'ya katılır (72). Overin lenf damarları, *cavitas pelvis*'ten ayrılır ve *arteria ovarica*'yı takip ederek paraaortik lenf nodlarına birinci lumbal vertebra düzeyinde lenfatik drenaj yaparlar. Overin innervasyonundan otonom pleksuslar sorumludur (72, 75). Sinirler, *plexus aorticus*'dan türeyerek *arteria ovarica*'yı takip ederler. Overin alt kısımları *plexus hypogastricus superior* ve *plexus hypogastricus inferior*'dan inen liflerle beslenir. Bu pleksuslarda pregangliyonik parasempatik lifler, postgangliyonik sempatik lifler ve visseral afferent lifler yer almaktadır. Pregangliyonik parasempatik lifler *Nervus Vagus*'tan, postgangliyonik sempatik lifler ise *Nervus splanchnicus minor* ve bir kısmı torakal medulla spinalis segmentlerinden kaynaklanır (75).

Overin perfüzyonu, lenfatik drenajı ve sinir innervasyonu pelvise giriş yaptığı bölgede *arteria iliaca externa* ve *vena iliaca externa*'yı çaprazlar. Overe girişin yapıldığı bölge, overin *ligamentum suspensorium ovarii*'nin kısmı olarak da bilinen *ligamentum latum uteri*'nin lateral ucudur. Damarlar ve sinirler son olarak mezovaryum aracılığıyla *hilum ovarii* olarak adlandırılan ovaryum hilusuna girer (72).

### 2.1.2. Over embriyolojisi

Overler, embriyonik gelişimin farklılaşmamış safhası sırasında gelişmeye başlayan genital sistemin bir parçasıdır. Bu organın embriyolojik gelişimi, gonadların

oluşumundan başlayıp korteks ve medulla adı verilen iki farklı yapıya ayrılmasıyla devam eder.

Gonadlar, üç kaynaktan köken alırlar.

- Posterior karın duvarını kaplayan mezotelyum (mezodermal epitel)
- Altındaki mezoderm (embriyonik bağ dokusu)
- Primordiyal germ hücreleri (Farklanmamış cinsiyet hücreleri) (76).

Embriyonun cinsiyeti döllenme durumunda genetik olarak belirlenmekle birlikte, gonadlar gelişimin yedinci haftasına kadar erkek veya dişi morfolojik özellikler kazanmazlar. Gonadlar, ilk olarak uzunlamasına bir çift kabartı çıkıntısı olarak ortaya çıkar ve genital ya da gonadal kabartı çıkıntıları olarak adlandırılır. Ortaya çıkan bu kabartı çıkıntıları epitelin proliferasyonu ve altta yatmakta olan mezenşimin yoğunlaşması sonucunda oluşmaktadır. Germ hücreleri ise genital kabartı çıkıntılarında altıncı haftadan önce görünmemektedir. Primordiyal germ hücreleri, gelişimin erken aşamalarında epiblast adı verilen embriyonik tabakadan köken alır. Daha sonra primitif şerit boyunca göçü devam eder ve üçüncü haftada yolk kesesi duvarındaki endoderm hücreleri arasında bulunarak allantoise yakın bir konuma yerleşirler (77). Embriyonun katlanması süreci ile birlikte umbilikal vezikülün dorsal kısmı embriyoya dahil olmaktadır ve bu gerçekleşirken, primordiyal germ hücreleri arka bağırsağın dorsal mezenteri boyunca gonadal kabartılara doğru göçü meydana gelmektedir. Bu göçü düzenleyen genler *stella*, *fragilis* ve *BMP-4* olarak bilinmektedir. (76). Beşinci haftanın başında primitif gonadlara ulaşan primordiyal germ hücreleri altıncı haftada genital kabartılara invaze olarak yerleşmektedirler. Eğer primordiyal germ hücreleri genital kabartılara ulaşamazlarsa gonadların gelişimi gerçekleşmez.

Primordiyal germ hücrelerinin primitif gonadlara göçünden kısa bir süre önce ve göçün gerçekleştiği anda, genital kabartının epitelinin proliferasyonu meydana gelir. Bunun sonucunda da epitel hücreleri alttaki mezenşime penetre olmaktadır. Burada primitif cinsiyet kordonları olarak adlandırılan bir dizi düzensiz biçimli kordonlar meydana getirirler. Erkek ve dişi embriyolarda, bu kordonlar yüzey epiteline bağlanır ve bu evrede erkek veya dişi gonad arasında ayırım yapmak imkansız hale gelmektedir. Bu nedenle de farklanmamış gonad olarak bilinir. XX cinsiyet kromozom dizilimine sahip ve Y kromozomu olmayan dişi embriyolarda, primitif cinsiyet kordonları düzensiz hücre kümeleri halinde ayrılmalara olur. Primitif germ hücre gruplarını ihtiva eden bu kümeler,

overde medulla bölgesini istila ettikten sonra kaybolurlar ve yerlerini overin medullasını oluşturan vasküler bir stromaya bırakırlar (77). Dişi gonadın yüzey epiteli sürekli çoğalmaya devam eder ve bu epitelin kökeni peritonun mezotelyumundan türemiştir. Yedinci haftada, kortikal kordonların ikinci bir neslini oluşturan kortikal kordonlar ortaya çıkar ve altındaki mezenşime nüfuz ederler, ancak yüzeye yakın konumda kalırlar. Yaklaşık 16. haftada bu kordonlar, izole hücre kümelerine ayrılır. Bu hücre kümeleri oogonyum adı verilen hücrelerin çoğalması ile birlikte foliküler hücreler adı verilen bir epitelyal hücre tabakasıyla çevrelenir. Oogonyumlar ve foliküler hücreler birlikte primordiyal folikülü oluştururlar (76, 77). Fetüsün gelişim sürecinde, oogonyumlar aktif olarak mitoz bölünme yaparak primordiyal foliküllerin oluşmasına katkı sağlarlar. Oogonyumlar doğum sonrasında oluşmazlar. Birçok oogoni doğumdan önce dejenerasyona uğrasa da, kalan iki milyon kadar oogoni büyüyerek primer oositlere dönüşmektedir. Doğumdan sonra overin yüzey epiteli düzleşerek, damar ve sinirlerin girip çıktığı over hilumunda periton mezoteli ile devamlılık gösteren tek bir hücre tabakasına dönüşür. Yüzey epiteli korteksteki foliküllerden ince bir fibröz kapsül olan tunika albuginea ile ayrılır. Overler, gerileyen mezonefroza ayrıldıklarında, mezenteri olan mezovarium ile bağlanırlar (76).

### **2.1.3. Over histolojisi**

Overler görünüm olarak badem şeklinde yapılar olup, genellikle 3 cm uzunluğunda, 1.5 cm genişliğinde ve 1 cm kalınlığındadır. Her bir over, sıkı bağ doku kapsülü olan tunika albuginea adlı bir bağ dokusu katmanının üzerinde yer alan over yüzey epitelinden oluşan basit küboidal bir epitel ile kaplıdır. Overin büyük bir bölümü korteksten oluşur; kortikal bölge yoğun hücreli bağ dokusu stroması ve menarş sonrasında ise büyüklükleri önemli ölçüde değişkenlik gösteren birçok over folikülünü içermektedir. Overde en içte yer alan medulla gevşek bağ dokusu ve overi asılı tutan mezenterlerden hilum vasıtasıyla organa dahil olan kan damarlarını içermektedir. Over korteksi ile medulla bölgeleri arasında belirgin bir sınır bulunmamaktadır. Fetal yaşam sırasında oluşan foliküller -primordiyal foliküller- düzleşmiş foliküler hücrelerin tek bir tabakası tarafından sarılmış bir primer oositten oluşur. Bu foliküller yüzeysel over korteksinde meydana gelir. Primordiyal foliküldeki oosit küreseldir ve yaklaşık 25 µm çapında olup ilk mayotik profazda kromozom içeren büyük bir çekirdeğe sahiptir. Organeller genellikle çekirdeğin yakınında yoğunlaşma eğilimindedir ve çok sayıda mitokondri, birkaç Golgi kompleksi ve geniş granüllü ER içerir. Foliküler hücreleri saran bazal lamina, folikül ile vasküler



stroma arasında net bir sınır oluşturur ve kan-folikül bariyeri görevi görür. Foliküller hücreler mitoz geçirir ve büyüyen oositin çevresinde basit bir küboidal epitel oluştururlar. Bu yapı, unilaminar primer folikül olarak adlandırılır. Foliküler hücreler çoğalmaya devam ederek granüloza adlı foliküler epiteli oluştururlar. Bununla birlikte, foliküler hücreler granüloza hücreleri olarak adlandırılır ve folikül hâlâ avasküler olan ve bir bazal membranla çevrili çok katmanlı bir primer folikül görünümünü kazanır. Oosit ile büyümekte olan primer folikülün ilk granüloza hücreleri tabakası arasında, 5-10-µm kalınlığında ve oosit tarafından salgılanan dört glikoprotein içeren zona pellisuda adı verilen hücre dışı materyal birikir. Granüloza hücrelerinin uzantıları (filopodlar) ve oositin mikrovillüsleri zona pellusidaya nüfuz ederler. Gelişmekte olan folikülün dışında yer alan bağ dokusu stromal hücreleri bir iç vaskülarize teka interna ve bir dış fibröz teka eksterna olarak farklılaşır (78, 79).

Granüloza hücrelerinin büyümesi ve çoğalmasıyla birlikte korteksin daha derin bölgelerine doğru göç gerçekleşir ve folikül hücreleri arasında likör folikül olarak adlandırılan sıvı birikintisi oluşur. Sıvı bulunan küçük boşluklar zamanla birleşerek antrum denilen daha büyük bir boşluk oluştururlar. Oluşan bu foliküllere sekonder folikül ya da antral folikül ismi verilir. Foliküler sıvı, glikozaminoglikanlar hyalüronik asit, büyüme faktörleri, plazminojen, fibrinogen, heparan sülfat proteoglikan ve bağlayıcı proteinlerle yüksek konsantrasyonlarda steroidler (progesteron, androstenedion ve östrojenler) içerir. Antrumun gelişmesi ile birlikte oosit etrafındaki granüloza hücreleri, antruma doğru çıkıntı yapan kumulus ooforus adlı küçük bir yükselti oluşturur. Oositin çevresinde yoğunlaşan granüloza hücreleri korona radyata olarak adlandırılan bir yapı meydana getirir. Bu yapı, granüloza hücreleri, overi terk ederken oosite eşlik eder. Adını 17. yüzyıl üreme biyoloğu Regnier De Graaftan almış olan Graafian ya da olgun folikülün tek büyük antrumu hızla daha fazla foliküler sıvı biriktirir ve 2 cm çapa kadar genişler. Granüloza tabakası bu aşamada incelir çünkü hücreleri antrumun büyümesiyle orantılı olarak çoğalmaz. Olgun bir folikül, kalın tekal tabakalara sahiptir ve normalde yaklaşık 90 günlük bir süre içinde bir primordiyal folikülden gelişebilmektedir (78).

Ovulasyondan sonra, ovule olan foliküle ait granüloza hücreleri ve teka interna, over korteksinde daha büyük geçici bir endokrin bez olan *corpus luteum*'u (sarı cisim) oluşturmak amacıyla yeniden düzenlenir. Luteinizan hormon (LH) stimülasyonu ve gebelik olmadığı durumlarda, korpus luteumun her iki ana hücre tipi de steroid üretimini

durdurur ve dokunun regrese olmasıyla birlikte hücreleri de apoptoz ile dejenere olur. Kalıntılar makrofajlar tarafından fagosite edildikten sonra fibroblastlar bölgeye invaze olur. Fibroblastların da gelmesiyle birlikte korpus luteumun bulunduğu yer fibroblastlar tarafından kaplanır ve yoğun bağ dokusundan oluşan bir skar gelişir. Yeni oluşan bu yapıya da corpus albicans (beyaz cisim) adı verilir (78, 79).

#### 2.1.4. Over fizyolojisi

Kadın üreme fonksiyonları, gebe kalma ve gebelik için vücutta fonksiyonların ve hormonların hazırlanması ile gebelik dönemi olmak üzere iki ana aşamaya ayrılır (80). Over fonksiyonları, hipotalamus, hipofiz bezinin anterior lobunun pars distalis ve ovaryum arasında üç farklı merkezin kontrolü altındadır. Bu kontrol, hipotalamustan salınan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), hipofiz bezinin anterior lobunun pars distalisinden salınan folikül uyarıcı hormon (FSH) ve LH ile ovaryumdan salınan östrojen ve progesteron aracılığıyla gerçekleştirilir. Puberte döneminde hipotalamustan  $\beta$ -endorfin, serotonin, noradrenalin ve dopaminin etkisiyle pulsatil salınan GnRH hormonu, ön hipofizi uyatarak FSH ve LH olmak üzere her iki gonadotropinin de salgılanmasını tetikler (81). Overde önceden inaktif olan foliküller, FSH ve LH hormonlarının etkilerinden dolayı gelişmeye başlar. Menstrüasyonun başlangıcından ovulasyona kadar olan aşama **foliküler faz**dır. Ovulasyon sonrası başlayan döneme ise **luteal faz** adı verilir ve korpus luteumun yıkımına kadar devam eder. Ovaryan döngü, bu şekilde iki evreye ayrılarak dişi üreme sisteminin doğal yapısını oluşturur (80).

Doğumdan itibaren bazı primordiyal foliküller preantral ve erken antral aşamalara ilerler ve bu süreç menstrüel döngü boyunca devam eder. Ovaryumdaki çoğu folikül primordiyal folikül olarak kalmaya devam ederken, preantral ve erken antral folikül ise her zaman mevcuttur. Her menstrüel döngünün başlangıcında, bu preantral ve erken antral foliküllerin 10 ila 25'i büyür ve olgun folikül oluşumu gerçekleşir (82).

Folikül döngüsünün bu aşamasında, granüloza hücrelerinin bulunduğu kitle, yüksek yoğunlukta östrojen içeren folikül sıvısı salgılar. Granüloza hücrelerinden östrojen salınımı bu dönemde gerçekleşir ve ovulasyondan sonra korpus luteum östrojen ve progesteron üretir. Erken foliküler evrenin ilk birkaç günü boyunca, ön hipofiz bezinde üretilen FSH ve LH hormonlarının salınımı hafif ya da orta derecede artar. Folikül uyarıcı hormonun artışı, bu dönemde LH'dan daha yüksektir. Folikül uyarıcı hormon, granüloza

hücrelerinde hücre büyümesini ve östrojen üretimini uyararak antrumun genişlemesine katkıda bulunur. Östrojen hormonu, granüloza hücrelerinin çoğalmasını tetikleyerek daha fazla östrojen üretime yol açar. Luteinizan hormon, teka hücrelerine etki ederek teka hücrelerinin çoğalmasını ve androjen üretimini uyarır. Androjenler granüloza hücrelerine difüzyon yoluyla girer ve aromataz enzimi tarafından östrojene dönüştürülür (80).

Folikül uyarıcı hormon seviyelerinin düşmesiyle bir haftanın sonunda gelişen foliküller dejenerasyona uğrarken daha büyük antral foliküllerden yalnızca biri, dominant folikül, gelişmeye devam eder. Folikül uyarıcı hormon, foliküllerin canlılığını korumak için önemlidir ve atrezinin önlenmesine yardımcı olur. Dominant folikülün granüloza hücreleri daha fazla FSH ve LH reseptörüne sahip olduğundan, folikülün hayatta kalması sağlanır (80, 82).

Dominant folikülün artan östrojen salgısı, ön hipofizden FSH ve LH salınımını azaltarak gonadotropin salgılanmasına negatif geri bildirimde bulunur. Ayrıca granüloza hücreleri tarafından salgılanan inhibin, FSH salgısını baskılayarak FSH düzeyinin LH'dan daha fazla azalmasıyla sonuçlanır. Foliküler dönemin ilerleyen safhalarında plazmadaki östrojen seviyesinin kısa süreli yükselmesi, östrojenin hipotalamustan GnRH salınımını uyararak pozitif geri bildirim mekanizması olarak işlev görür. Bu durum da hipofiz bezinin LH salınım mekanizmalarını GnRH'a karşı daha duyarlı hale getirir. Bu ani artış, foliküler dönemin sonunda meydana gelen östrojen pikinin ardından gerçekleşir ve ovulasyonun indüklenmesine yol açar. LH seviyesinde meydana gelen artışla primer oosit ilk mayotik bölünme sürecini gerçekleştirir. Bu süreç sonunda, fertilizasyon olması durumunda ovumu implante hale getiren sitoplazmik değişiklikler meydana gelir. LH'nin primer oosit üzerindeki etkileri, granüloza hücreleri tarafından salınan haberciler aracılığıyla gerçekleşir. Antrum boyutunda (sıvı hacmi) ve foliküle giden kan akışında önemli ölçüde artış olur ve antrumda genişleme meydana gelir (79, 82).

Granüloza hücrelerinin progesteron salınımına başlaması ve östrojen üretimini azaltması, ovulasyondan hemen önce plazma progesteron konsantrasyonunda hafif bir artışa ve plazma östrojen konsantrasyonunda düşüşe neden olur (82). Granüloza hücreleri tarafından sentezlenen enzimler ve prostaglandinler, folikül içindeki plazma transüstasyonu nedeniyle şişmeye neden olur. Bu şişme ve stigma dejenerasyonu sonucunda foliküler-over membranların zayıflayarak parçalanıp yırtılmasına ve ovumun

serbest bırakılmasına neden olur. Oosit ile çevreleyen granüloza hücreleri ovaryumun yüzeyine taşınabilir hale gelir. LH seviyesinde artışın olmasıyla; yırtılmış olan folikülden kalan granüloza hücreleri, bu folikülde yer alan teka hücreleri ile birlikte progesteron ve östrojen salgılamaya başlayan korpus luteuma dönüşür. Ovulasyon sonrası ilk birkaç saat içinde, folikülün geride kalan granüloza ve teka interna hücreleri hızla korpus luteum hücrelerine dönüşürler. Oluşan lutein hücreleri, içlerini dolduran lipid birikintileri nedeniyle boyutları iki kat veya daha fazla artar ve sarı renk görünümü alırlar. Bu sürecin adı **luteinizasyon** olarak bilinirken, tüm hücre kitlesi **korpus luteum** olarak adlandırılır. Bu süreç boyunca, korpus luteumu beslemek için damar sistemi de gelişir. Fertilizasyon olmaması halinde, korpus luteumun işlevi düşük seviyede LH'nın etkisiyle devam eder (82, 83).

Gebe olmayan kadınlarda kısa ömrü olan korpus luteum, önemli miktarda progesteron, östrojen ve inhibin salgılar. Östrojen varlığında yüksek plazma konsantrasyonu olan progesteron, hipofiz bezi tarafından gonadotropin salgılanmasını azaltır. Bu etkisini muhtemelen hipotalamus üzerine GnRH'nın pulsatil salınımını azaltmak amacıyla gerçekleştirir. Luteal fazın ilk yarısında, yüksek östrojen konsantrasyonlarına rağmen, progesteron aynı zamanda LH artışlarını da önler. Luteal fazda plazma inhibin konsantrasyonundaki yükselme, FSH salgısının bastırılmasına katkıda bulunur ve bu da siklusun luteal fazında gonadotropinlerin plazma konsantrasyonlarının düşük olmasına neden olur (82). Gonadotropin salgısında artış olmadığı durumda, korpus luteumun ömrü azalır. Gebelik oluşmazsa, korpus luteum 2 hafta içinde dejenerasyona uğrar. Bu dejenerasyon sonucunda plazma progesteron ve plazma östrojen konsantrasyonlarında düşüş olur. Yüksek konsantrasyonlarda östrojen ve progesteronun inhibitör etkilerinin sonlanması sonucu, hipofiz bezinden FSH ve LH hormonlarının salgısı artar ve böylece döngü yeniden başlar (82, 83).

## 2.2. Sıçanlarda dişi üreme sistemi

Sıçanlarda overler Psoas kasının lateral sınırı boyunca uzanır ve overler böbreklerin kaudalinde yer alır (84, 85). Olgunlaşmış bir sıçanda over boyutu  $5 \times 4 \times 3 \text{ mm}^3$  ve ağırlığı ise ortalama 0,6 g'dır. Sağ overin konumu sıçanın 4. ve 5. lumbar vertebra seviyelerinde yer alırken, sol overin konumu ise 5. ve 6. lumbar vertebra seviyelerinde bulunur. Sağ overin perfüzyonu abdominal aortanın bir dalı olan sağ over arterinden gelir ve sağ over

veni yoluyla posterior vena kavaya geri döner. Sol over perfüzyonu ise renal damarlarla birleşerek sağlanır. Over arterleri broad ligament içinde seyrederek ve iliak arterlerden çıkan uterin arterlerle anastomoz yaparlar (84).

Sıçanlar ve insanlar arasında doğum sonrası gelişim evreleri farklılık göstermektedir (Tablo 2.1). Sıçan dişi üreme sisteminde over, tuba uterina, uterus, serviks ve vajina prenatal dönemde immatür olarak gelişir, ancak postnatal süreçte olgunlaşarak tamamlanır (86).

**Tablo 2.1.** Sıçanda ve insanda doğum sonrası gelişim evreleri (86)

| Sıçan/İnsan'da Evre Adı | Sıçan (Dişi) | İnsan     |
|-------------------------|--------------|-----------|
| Neonatal/Yenidoğan      | 0-7 gün      | 0-28 gün  |
| İnfantil/İnfant         | 8-20 gün     | 1-23 ay   |
| Juvenil/Çocuk           | 21-32 gün    | 2-12 yıl  |
| Prepubertal/Adölesan    | 33-37 gün    | 12-16 yıl |
| Geç pubertal / Adölesan | 38-46 gün    |           |

Dişi sıçan üreme sisteminin olgunlaşması doğumda gerçekleşmez. Sıçan, en az iki ovulasyon döngüsü geçirdiğinde over olgunlaşmış kabul edilir ve genellikle doğum sonrası 42. günde sıçan üreme sistemi tamamen işlevsel hale gelir. Over yüzeyi, paryetal peritondan köken alan veya gelişmiş over yüzey epiteli ile örtülüdür. Over yüzey epitelinin hücreleri, yassı veya kübik şekillerde olabilen farklı morfolojik tiplerden oluşur. Epitel hücreleri skuamözden kübik yapıya kadar değişiklik gösterebilir ve bu hücreler, ovulasyon sırasında oluşan hasarların onarımında önemli rol oynarlar. Over yüzey epitelinin altında, birçok fibroblast benzeri hücre içeren bağ dokusu tabakası olan tunika albuginea yer alır. Tunika albuginea'nın kolajen lifleri, testislere göre daha ince ve daha az gelişmiştir. Overin geri kalan kısmı korteks ve medulla olarak ikiye ayrılır. Korteks, folikülleri, medullayı ve hilumda overin perfüzyonunu sağlayan damarsal

yapıları içerir. Korteksteki foliküller ve medulladaki damarsal yapılar arasında, fibroblast açısından zengin bir bağ dokusu olan over stroması bulunur (84).

## **2.3. Over torsiyonu**

### **2.3.1. Over torsiyonu tanımı ve tarihçesi**

Over torsiyonu ya da adneksiyal torsiyon ilk defa 1890'da Bland-Sutton tarafından rapor edilmiştir (1). Over torsiyonu, over dokusunu besleyen ve destekleyen bağların tam veya kısmi olarak dönmesi ile birlikte overde kan akımında bozulma ya da kesilme ve ortaya çıkan bu duruma bağlı olarak da iskemik değişikliklerin ortaya çıktığı akut bir obstetrik ve jinekolojik acil durum olarak tanımlanır (2-4). Bu durum, over fonksiyon bozukluğuna, nekroza ve hatta infertiliteye yol açabilen ciddi sonuçlara neden olabilir. Fallop tüpü sıklıkla over ile birlikte torsiyona uğrar ve bu durum **adneksiyal torsiyon** olarak adlandırılır. Yaygın olmamakla birlikte, izole tubal torsiyona da rastlanır ve bunun sonucunda tubal fonksiyon olumsuz yönde etkilenebilir (2, 3, 87).

### **2.3.2. Epidemiyoloji**

Over torsiyonu her yaşta kadında görülebilse de, en sık doğurganlık çağındaki kadınlarda görülmektedir (5). Acil servislere akut karın ağrısı şikayeti ile başvuran hastalarda over torsiyonu, jinekolojik acil vakaların yaklaşık %3'ünü oluşturur ve torsiyon vakalarının %80'inde 5 cm veya daha büyük bir over kisti varlığıyla birlikte ortaya çıkar (7-10). Gebelikte insidansı kesin olmamakla birlikte bazı çalışmalarda 1-5/10.000 olarak bildirilmektedir (11, 12). Özellikle gebeliğin ilk trimesterinde daha sık görülmektedir (11). Bununla birlikte, mevcut popülasyonda hastalığın gerçek insidansı bilinmemektedir. Hindistan'da gebe kadınlardan oluşan geniş bir kohortta insidans %0.03 (5/16260) olarak bildirilmiştir (88). İngiltere'de, 1. trimesterde erken gebelik ünitesine başvuran kadınlar üzerinde yapılan bir çalışmada, rutin taramada over kisti saptanan kadınlarda torsiyon oranı %3 (5/161) olarak bulunmuştur (89). Over torsiyonu, vakaların çoğunluğunda 20 yaş üstündeki ve 40 yaşın altındaki kadınlarda rastlanmıştır (13, 14).

### **2.3.3. Risk faktörleri**

Over torsiyonunda görülen en önemli risk faktörleri; doğurganlık çağına olmak, ortalama 5 cm'nin üzerinde benign veya malign over kitlesi bulunması, gebelik, ovulasyonun indüklenmesi, polikistik over sendromu ile birlikte over torsiyonu

geçmişine sahip olmak da sayılabilir (5). Over kistinin büyüklüğü, over torsiyonu riskiyle ilişkilidir (8). Yapılan bir çalışmada, 87 over torsiyonu vakasında risk oluşturabilecek kitlelerin ortalama büyüklüğünün 9.5 cm olduğu ve bunların %89'unun 5 cm'den büyük olduğu bildirilmiştir (13). Bununla birlikte, çeşitli büyüklükteki kistlerde de over torsiyonu riski bulunmaktadır (8). Over kisti, overin tutunmasını sağlayan iki ligamendin eksenini üzerinde dönme ihtimalini arttırır. Bu durum venöz çıkışı ve sonunda arteriyel girişi engeller (35). Bunlara ek olarak, normal over torsiyonu vakalarına pediatrik popülasyonda da rastlanmaktadır (5). Kesin etiyolojisi henüz bilinmemekle birlikte, overin boyutunda meydana gelen artış, serbest mobilizasyon ve uzun pedikül predispozan faktörlerdendir (11). Over torsiyonu, intrauterin dönemden postmenopozal döneme kadar her yaşta ortaya çıkabilir (90). Fertilite için tedavi alan hastalar dışında risk barındıran durumlardan biri de gebelikte overde genişlemiş foliküllerdir (91). Yaygın olarak, doğum yapmamış veya gebe olma eğiliminde olan üreme çağındaki kadınlarda görülür (13, 92).

#### **2.3.4. Etyopatogenez**

Over dokusunu besleyen ve destekleyen infundibulopelvik ligament ve utero-ovaryan ligamentlerin tam veya kısmi olarak dönmesi ile birlikte over kan akımı azalır veya kesilir ve bunun sonucunda ligamentlerde bükülme meydana gelir (5). Doğuştan uzun olan over ligamentleri, pelvik ligamentlerin aşırı gevşekliği veya over torsiyonun ekseninde daha fazla dönmesine ve hareket etmesine izin veren nispeten küçük bir uterus da over torsiyonu için predispozan faktörler olabilir (15, 16). Ligamentlerde dönme sonucunda ödem ve kan akımında azalma meydana gelir. İlk olarak, venöz akış bozulur ve bunu artan ödemin bir sonucu olarak arteriyel akımın engellenmesi takip eder ve iskemi oluşur. İskemi sonucu overde nekroz, hemoraji ve peritonit gelişebilir (5, 6). Sigmoid kolonun pelvisin sol tarafında yer almasından dolayı, sağ tarafta torsiyon sol tarafa göre daha sık görülmektedir (93).

Over torsiyonlu pediatrik hastaların %25'ine kadarı normal overlere sahiptir. Bu popülasyonda artan over torsiyonu eğilimi, pediatrik hastalarda uterusun küçük boyutu ve overin fazla hareketliliğine neden olan göreceli olarak uzun utero-ovaryan ligamentlerden kaynaklanabilir (24, 94). Over torsiyonu olan adolesanlarda en sık rastlanan over patolojileri, benign fonksiyonel over kistleri ve benign teratomlardır (16). Bu popülasyonda malign over kitlelerinin torsiyona uğraması nadir görülür (15, 95). Sıklıkla, pediatrik over torsiyonu vakalarının %51 ila %84'ü, overe bağlı çeşitli

patolojilere bağlıdır. Bu patolojiler arasında; kistik teratomlar veya dermoidler (%31), foliküler veya hemorajik over kistleri (%23-%33), daha az sıklıkla ise paraovaryan/paratubal kistler, kistadenomlar veya hidrosalpinks yer alır (24, 96).

### 2.3.5. Tanı

Over torsiyonu; genellikle ani başlayan alt karın ağrısı, pelvik ağrı, bulantı ve kusma belirtilerinden biri veya birkaçı ile kendini gösterebilir (17-19). Ağrı hastalarda değişiklik gösterebilmekte ve her hastada görülme sıklığı değişmektedir. Rotasyonun derecesine göre ağrının şekli değişir. Sabit veya aralıklı şekilde gerçekleşebilir. Ağrı birçok durumda tek lokalizasyonda olmasına rağmen karına, sırtta veya yana doğru yayılabilir (18). Semptomlar genellikle spesifik olmadığı için klinik olarak teşhisi zordur (13). Over torsiyonu; korpus luteum kisti rüptürü, akut apandisit, overlerin hiperstimülasyonu, üriner obstrüksiyon, ürolitiazis, gastroenterit, hemorajik over kisti rüptürü, pelvik inflamatuvar hastalık ve dış gebelik gibi diğer tanılardan ayırt edilmelidir (19-24). Tanıyı kesinleştirmede kanıtlanmış hiçbir laboratuvar testi bulunmamakla birlikte gebelik, over torsiyonu için bir risk faktörü olabileceğinden, üreme çağındaki hastaya öncelikle beta-insan koryonik gonadotropin ( $\beta$ -HCG) testi yapılarak olası bir ektopik gebelik dışlanmalıdır (93, 97). Buna ek olarak, hastalara tam kan sayımı ve elektrolit değerlerin ölçümü klinik değerlendirme ve ayırıcı tanıda yardımcıdır (5). Tsai ve ark. (97) tarafından pediatrik popülasyon üzerinde yapılan bir çalışmada, lökosit artışı ve yüksek C-reaktif protein (CRP) seviyeleri, over iskemisi ile ilişkilendirilmiştir.

Görüntüleme yöntemleri, over kitlesini değerlendirmede tanısal değerlendirme için önemlidir (8, 25). Bunlar arasında, ultrasonografi (USG), renkli Doppler USG ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) sayılabilir (8, 22). Over torsiyonunun tanısında ilk tercih edilen görüntüleme yöntemi USG'dir (8). Torsiyone olmuş bir over; ödem veya vasküler ve lenf tıkanıklığı nedeniyle diğer taraftaki overe kıyasla, daha yuvarlak ve genişlemiş şekilde olabilir (98-100). USG ile over kitlesi bileşenlerine, lokalizasyonuna, dansitesine ve boyutuna göre ayırt edebilmektedir. Bununla birlikte girdap işareti olarak da bilinen kendi etrafında dönmüş over pedikülü ve over etrafında ve Douglas çukurunda serbest sıvı gibi bulgular da USG yardımı ile tespit edilebilir (98-101). Doppler kullanıldığında arteriyel veya venöz akışında azalma ya da durmuş olması, torsiyonun varlığını göstererek doğru tanının konulmasına yardımcı olabilir (102). Fakat, anormal veya azalmış over kan akışı bulguları torsiyon için duyarlı olsa da, arteriyel perfüzyon



torsiyonun nispeten geç dönemlerine kadar korunabileceğinden normal vaskülarite görünümü ile yanlış bir şekilde yorumlanmaması önemlidir (102, 103).

Manyetik rezonans görüntüleme pahalıdır ancak USG bulguları belirsiz ise over torsiyonunun teşhisinde olumlu etkisi olabilir (8, 104). MRI, over kitlesinin bileşenlerini USG'den daha detaylı bir şekilde gösterebilir (8). Bilgisayarlı tomografi ise genellikle radyasyon ve yoğunluk nedeniyle over torsiyonunda kullanılsa da akut karın veya pelvik ağrısı olan hastaların apandisit, divertikülit ve diğer tanıları dışlamak için kullanılabilir (8, 15, 22, 105).

### **2.3.6. Tedavi**

Over torsiyonunu tedavi etmek için standart uygulanan yöntem cerrahidir. Yaygın olarak kullanılan iki cerrahi yöntem olan laparoskopi ve laparotomidir. Laparoskopik yaklaşım daha yaygın bir prosedür haline gelse de over veya fallop tüp kanseri şüphesi varsa, laparotomi daha sık kullanılmaktadır (26, 27). Cerrahi işlem yapılırken, over canlılığının değerlendirilmesi ve fonksiyonunun korunması önemlidir. Torsiyone olmuş bir overin canlılığını saptamanın cerrahi işlem sırasında tek yolu görsel muayenedir (8, 106). Geleneksel görüşe göre, koyu renkli ve büyümüş overler vasküler ve lenfatik konjesyon yaşayabilir ve canlı görünmeyebilirler. Yapılan birçok çalışma ise siyah veya mavi renkteki overlerin detorsiyon sonrasında bile fonksiyonunu koruyabileceğini öne sürmüştür (107, 108). Benign over kisti olgularında genellikle over kistektomi yapılır. Maligniteden şüpheleniliyorsa ooforektomi önerilmektedir (8). Overin detorsiyonu ile birlikte overin reperfüze olması sonucu bazı lokal ve sistemik etkiler görülebilir. Buna bağlı olarak, overde İ/R hasarına neden olabilir. Bu hasarın önlenmesi için farklı tedavi stratejileri üzerinde çalışılmaktadır (28, 29). Detorsiyondan sonra nüks etme riski vardır, ancak insidansı ve nedenleri bilinmemektedir. Buna ek olarak, torsiyonun sağ tarafta meydana gelme olasılığı daha yüksektir. Buna neden olarak da, infundibulopelvik bağın sağda daha uzun olması ve/veya solda torsiyonu önleyen sigmoid kolonun varlığı olduğu düşünülmektedir (109). Ooforoeksi veya over fiksasyon prosedürü, nüks eden ya da nüks etme ihtimali yüksek bulunan vakalarda ve operasyon sırasında normalden daha uzun bir uteroovaryan ligament varlığı tespit edildiğinde tercih edilebilir (110-112). Ooforoeksi, hastanın fertilitasını korumak ve gelecekteki over torsiyonu riskini azaltmak için yapılan bir cerrahi işlemdir, ancak en iyi yöntem konusundaki tartışmalar devam

etmektedir (113, 114). Buna ek olarak, nüks olgularında ooforopeksi yaklaşımı uzun vadeli takip ve sistematik çalışmadan yoksundur (8, 114).

## **2.4. İskemi/Reperfüzyon**

### **2.4.1. İskemi**

İskemi terimi, dokulara yetersiz kan akışını ifade etmek için ilk kez 19. yüzyılın başlarında kullanılmıştır (57). İskemi ya da dokuya ulaşan arteriyel kan miktarında azalma, insanlarda görülen çeşitli hastalıkların arka planında yer alabilen ve sık karşılaşılan bir akut hücre hasarı nedenidir (115). Ayrıca, iskemi, dokulara ulaşan kan miktarında azalma ya da tamamen kesilme durumunda oksijen ile diğer metabolitlerin hedeflerine ulaşamaması olarak da tanımlanabilir. İskemi sürecinde metabolik fonksiyonlarda bozulmalar meydana gelir (30). Arteriyel kan akımının engellenmesi hipoksiye neden olur ve mitokondride elektron taşıma zincirinin işlev bozukluğuna yol açabilir (32).

Başlangıçta, mitokondriyal anaerobik glikoliz yoluyla glikojen parçalanması laktik asitle birlikte iki ATP molekülü üretilmesine neden olur ve bu da doku pH'ında azalmaya yol açar ve daha sonra, negatif feedback (geribildirim) yoluyla ATP üretimini inhibe eder (30, 115). Dokuda artan laktik asidin tutulumu metabolik asidoza yol açabilir (32). Ayrıca, hücre yüzeyindeki sodyum-potasyum pompaları ( $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPaz}$ ) ve kalsiyum pompaları ( $\text{Ca}^{+2}\text{/ATPaz}$ ) da işlevsiz hale gelebilir.  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPaz}$  pompası işlevsiz hale gelmesi hücrede sodyumun ( $\text{Na}^+$ ) ve potasyumun ( $\text{K}^+$ ) birikmesine neden olur. Hücre içinde  $\text{Na}^+$  düzeyinin yükselmesi, sodyum-hidrojen ( $\text{Na}^+\text{-H}^+$ ) pompalarının aktivitesini azaltır. Endoplazmik retikulumda  $\text{Ca}^{+2}\text{/ATPaz}$  pompaları da işlevsiz hale gelerek kalsiyumun geri alımını sınırlar. Hücrelerde  $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Ca}^{+2}$  iyonlarının birikimi hiperosmolariteye neden olur, bu da sitoplazmaya sıvı göçüne ve hücrenin şişmesine yol açar. Hücrede  $\text{H}^+$  birikimi ile hücre pH'ın düşmesi, enzim aktivitesinin bozulmasına ve nükleer kromatinin kümelenmesi ile sonuçlanır. Buna ek olarak, hücre pH'ın düşüşü ER'da ribozomların ayrılmasına ve buna bağlı olarak protein sentezini azalmasına neden olur (32). İyon dengesini korumak için,  $\text{K}^+$  iyonları hücreden interstisyuma geçer. Kalsiyum mitokondriden sitoplazmaya ve ekstrasellüler ortama salınır, böylece kalpain dahil mitokondriyal kalsiyuma bağımlı sitozolik proteazları aktive eder ve bu da hücre pH'ını düşürür. Fosfolipazlar ayrıca iskemi

sırasında aktive olur, membran lipitlerini bozar ve dolaşımdaki yağ asitlerinin seviyelerini artırır (30). İskemi-reperfüzyon hasarındaki temel mekanizma; anaerobik metabolizmanın iskemi ile indüklenmesiyle başlar, bu da iyon değişim kanallarının bozulmasına yol açan daha düşük ATP üretimi ile sonuçlanır. Azalan ATP üretimine rağmen, sürekli ATP kullanımı nedeniyle sırasıyla ADP, AMP ve IMP ardından adenozin, inozin, hipoksantin ve ksantine dönüşür (30, 31). Hücre hasarını önlemek için gerekli olan ilk yöntem hipoperfüzyon süresini kısaltmak ve reperfüzyon sağlamaktır (32).

#### **2.4.2. İskemi/Reperfüzyon hasarı (İ/R hasarı)**

İskemi/reperfüzyon hasarı, oksijen ve metabolik substratlarda dengesizliğe neden olan, dokuya veya organa arteriyel kan akışının engellenmesini takiben ortaya çıkan bir fenomen olarak tanımlanabilir (34). Bu dengesizlik de doku hipoksisine neden olur ve hücrelerdeki metabolik süreçleri inhibe eder; paradoksal olarak, arteriyel kan akımının ve yeniden oksijenlenmenin sağlanması, doku hasarının şiddetlenmesi ve şiddetli bir inflamatuvar yanıt ile ilişkilidir (15, 34, 57, 116).

İskemi/reperfüzyon hasarı, dokuda iskemik hasardan daha zararlı olabilmektedir. İskemi-reperfüzyon hasarının neden olduğu toplam doku hasarı, iskemi hasarı ve reperfüzyon hasarı olarak iki kısma ayrılır. İskemik hasar başlangıçta hipoksi ve hiponutrisyona neden olabilir (32). Uzun süreli iskemi sonrasında, hücrelerden gelen metabolik ürünler tutulur ve metabolik asidoza neden olur. Kan akımı yeniden sağlandığında; inflamatuvar yanıt ortaya çıkabilir, RNS ya da ROS üretimi artabilir ve bu da ikincil hasara yol açabilir. Hücre yanıtı, toplam doku hasarının şiddetine bağlıdır (33, 34). Uzun süreli İ/R hasarının neden olduğu hücre hasarı apoptoz, otofaji, nekroz ve nekroptozu neden olur (117-119). Orta dereceli İ/R hasarı, otofaji yoluyla hücre disfonksiyonuna neden olur ve hücrelerin hayatta kalma mekanizmalarını aktive eder. Hasar şiddetli ise, hücre ölümü apoptotik veya nekrotik yollardan indüklenir (120). Daha kısa süreli İ/R hasarı, ROS oluşumunu ve hücre hasarını kontrol etmek için hücre hayatta kalma programlarını aktive edebilir (121). İskemi-reperfüzyon hasarının farklı patogeneze yollarına bağlı olarak farklı hücre ölümü mekanizmaları indüklenir (32). İskemi-reperfüzyona bağlı doku hasarının, organ transplantasyonu, miyokard infarktüsü, serebrovasküler hastalıklar, majör cerrahi girişimler, akut renal hasar, hepatik hasar, orak hücre anemisi, over torsiyonu, hemorajik

şok ve resüsitasyon gibi çeşitli durumlar için yüksek morbidite ve mortaliteye katkıda bulunduğu düşünülmektedir (36-43).

#### **2.4.3. İskemi/Reperfüzyon hasarı mekanizmaları**

Reaktif oksijen türlerinin İ/R hasarında rol oynadığına dair bulgular farklı kanıtlara dayanmaktadır. Bunlar; ROS'un temizlemesini ve/veya detoksifikasyonunu artıran müdahalelerin reperfüzyon hasarını önlemesi, normal dokuda yapay ROS üretimi İ/R'ye verilen hasar yanıtını tekrarlaması, iskemik dokularda artmış ROS üretimi ve bunların karakteristik hücresel 'ayak izlerinin' post-iskemik dokularda tespiti olmak üzere üç kanıt dizisine dayanmaktadır (48).

Reperfüzyon hasarının altında yatan mekanizmalar karmaşık ve çok faktörlü olmakla birlikte reperfüzyon ile birlikte oksijen ile beslenen serbest oksijen radikalleri, kompleman sistem aktivasyonunu, endotel hücre disfonksiyonu ve PMN aktivasyonunu içerir (44-50).

##### **2.4.3.1. Komplemanın rolü**

İskemi/reperfüzyon hasarının artmasına katkıda bulunduğu düşünülen başka bir olay da inflamasyondur. Kompleman sisteminin aktivasyonu, İ/R hasarında inflamasyon ve doku hasarının artmasına katkıda bulunur (122). Kompleman sistemin aktivasyonu proinflamatuvar maddelerin salınımına neden olur. Aktive olan kompleman bileşenleri, inflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin salınımını tetikler. Özellikle kompleman 3a (C3a) ve kompleman 5a (C5a) anafilotoksinleri, proinflamatuvar yanıtların artmasına neden olur (123). Bu durum, lökositlerin aktivasyonunu tetiklemesiyle inflamatuvar yanıt oluşmasına neden olur (124, 125).

İskemi/reperfüzyon hasarında kompleman sisteminin rolü tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte, sitokinler, İ/R hasarında pro-inflamatuvar veya anti-inflamatuvar olarak rol alabilir. Tümör nekroz faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ), çeşitli hücre tipleri tarafından üretilse de, makrofajlar İ/R'de başlıca sebeplerdendir. Bu sitokinler, hem parakrin hem de endokrin etki gösterebilir. Salındıktan sonra, TNF- $\alpha$ , spesifik reseptörlere bağlanarak kemokinlerin ekspresyonunu indükler, ROS üretimini uyarır ve nükleer faktör kappa B (NF $\kappa$ B) gibi transkripsiyon faktörlerini aktive ederek adezyon moleküllerinin ekspresyonunu uyarır.

Bu durum, postiskemik dokularda nötrofillerin toplanmasını ve aktivasyonunu sağlar (57, 125).

Yapılan bir çalışmada, proinflamatuvar interlekin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) ve TNF- $\alpha$ 'nın İ/R'ye maruz kalan dokularda arttığı gösterilmiştir (123). Ayrıca, ROS'un, proinflamatuvar sitokinlerin üretimini kontrol eden NF $\kappa$ B ekspresyonunu uyardığı bilinmektedir (126). Buna ek olarak, yapılan başka bir çalışma ise, İ/R uygulanan overde oksidan ve proinflamatuvar sitokinlerin artışının infertilite ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (127).

#### **2.4.3.2. Polimorfonükleer Lökositlerin (PMN) rolü**

Serbest radikaller ve nötrofiller dahil olmak üzere birçok faktör İ/R hasarı ile ilişkilendirilmiştir. Polimorfonükleer lökositlerin dokuya infiltrasyonu akut inflamasyonun karakteristiğidir ve kemotaktik medyatörlerin kollektif etkisini gösterir. Bu lökositler, mikrovasküler oklüzyon, süperoksit radikalleri ve sitotoksik enzimlerin salınması, vasküler permeabilite artışı ve sitokin salınımına neden olarak hasarın oluşmasına katkıda bulunurlar (48, 128, 129).

Polimorfonükleer lökositlerin; aktivasyonu ve migrasyonu, adezyon molekülleri ile gerçekleşir. Adezyon molekülleri L, P ve E selektinler olmak üzere üç üyeden ibarettir. P selektinlerin görevi, İ/R hasarı oluşumunda lökositlerin endotel ile bağlantısını sağlamaktır. Daha sonra lökosit beta-2 integrinler ve intersellüler adezyon molekülü 1 (ICAM-1) ile PMN'lerin adezyonu ve agregasyonu ile sonuçlanan bir süreç olan adezyon ve migrasyon meydana gelir. Bu zinciri trombosit endotel adezyon molekülü 1 (PECAM-1), lökosit transmigrasyonunu takip ederek tamamlar. Bir dizi kemotaktik faktörler, lökositlerin migrasyon zincirini başlatır ve inflamatuvar süreci tetikler. Bu faktörler arasında C3a, lökotrien B (LT-B), interlekin-1 (IL-1), trombosit aktive edici faktör (PAF) ve prostaglandinler bulunur (50, 129, 130). Aktive olmuş lökositler, nükleus transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna ve TNF- $\alpha$  sentezine yol açar. Bu süreçte, hücrede serbest radikaller ve lökositlerin ürettiği maddeler ortaya çıkar ve adezyon molekülleri inflamatuvar sürecin başlamasına katkıda bulunur. Nötrofillerin aktif hale geldiği durumlarda, çeşitli kimyasal maddeler salarak hasara neden olmalarının yanı sıra damar içinde hücresel agregatlar oluşturup aktif trombositlerin damar endoteline adezyonunun mikrovasküler oklüzyonlara yol açtığı bilinmektedir (124, 128, 129).

#### **2.4.3.3. Endotel hücrelerinin rolü**

Endotel hücrelerine bağlı vazomotor tonus kontrolü, İ/R sonrası vazodilatasyonda azalma ve vazokonstriksiyonda artış ile önemli ölçüde tehlikeye girer (131, 132). İskemi/reperfüzyon hasarı sırasında meydana gelen oksidatif stres, endotel hücrelerde aktivasyonu ve fonksiyon bozulmasını tetikler. Endotel hücreleri, hem ROS üretirken hem de ROS'un hedefi olarak rol oynarlar. Bu süreçte, endotel hücreleri hem endotelin, hem de nitrik oksit üretimine neden olurlar. Ancak, bozulan endotelin/nitrik oksit dengesi arterlerde vazokonstriksiyon, venlerde ise vazodilatasyon şeklinde kendini gösterir. Ayrıca, endotel hücrelerinin aktivasyonu, kompleman sistemini aktive ederek lökosit üretimini artırır ve inflamasyon mekanizmasının başlatılmasına yol açar (57, 133).

#### **2.4.3.4. Serbest radikallerin rolü**

Serbest radikaller iskemi sırasında az miktarda oluşurken, reperfüzyon sırasında oksijenin ortama yeniden ulaşmasından sonra çok daha fazla ROS ve RNS meydana gelir. Moleküler oksijenden oluşan ROS, serbest radikaller veya diğer formlar olarak ortaya çıkabilir (35). Fizyolojik koşullarda, bir hücre tarafından tüketilen oksijenin %1-2'si oksijen radikallerine dönüşür ve bu da ROS oluşumuna yol açabilir (134). İn vivo ROS'un ana kaynağı aerobik solunumdur. Bununla birlikte, ROS ve RNS yağ asitlerinin peroksizomal  $\beta$ -oksidasyonu, mikrozomal sitokrom P450 (CYP450), ksenobiyotik bileşiklerin metabolizması, patojenler veya lipopolisakkaritler tarafından fagositozun uyarılması, arjinin metabolizması ve dokuya özgü hücresel enzimler tarafından da üretilir (135, 136). Hücresel ROS üretimi ve hücrede meydana gelen redoks tepkimeleri hücre patofizyolojisini anlamak için öneme sahiptir (134). Endoplazmik retikulum, lizozomlar veya peroksizomlar daha oksitleyici olabilirken, mitokondri ve nükleus daha indirgeyici olabilir. Hücredeki ROS seviyelerinde meydana gelen değişken durumlardan dolayı, ROS'un hem yararlı hem de zararlı etkilere yol açabildiği düşünülmektedir (137).

#### **2.5. Serbest radikaller**

Serbest radikaller, normal hücresel metabolizmanın ürünleridir. Serbest radikal, dış yörüngesinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren ve bağımsız olarak var olabilen bir atom veya molekül olarak tanımlanabilir (138).

### 2.5.1. Serbest radikallerin oluşumu

Serbest radikaller, kimyasal olarak kararsız yapıya sahip olduklarından dolayı dış yörüngelerinde bulunan elektronları eşleştirerek daha kararlı hale geçmek için moleküller veya atomlarla etkileşime girme eğilimindedirler (135). Ancak, moleküle bir elektron ilavesi ya da bir elektron kaybı onu kararsız, kısa ömürlü ve yüksek reaktif yapar (138, 139). Serbest radikallerin, kararlı bir bileşik oluşturmak için diğer moleküllerle ya da atomlarla bağ kurmaya çalışması serbest radikallerin oksidan ya da redüktan davranabilmesine neden olur (140).

Oksijen, aerobik organizmaların yaşamı için gereklidir ve oksijen kullanma yeteneği, insanların ve hayvanların enerji üretmek için lipitleri, proteinleri ve karbonhidratları metabolize etmelerini sağlamıştır, ancak paradoksal olarak oksijen kullanımı insanlarda yaşlılık ve hastalık sürecine katkıda bulunur (139). Hücreler enerji üretmek için oksijen kullandığında, mitokondri tarafından ATP üretiminin bir sonucu olarak serbest radikaller üretilir. Serbest radikaller, oksijen ve nitrojen kaynaklı olabilir (135). Bu yan ürünler genellikle hücresel redoks işleminden kaynaklanan ROS ve RNS'dir. Serbest radikallerin lipitler, proteinler ve nükleik asitler için özel bir afinitesi vardır (139, 141, 142).

Reaktif oksijen ve nitrojen türleri, radikal veya radikal olmayan bileşikler olabilirler (Tablo 2.2) (136, 139, 140, 143). Oksijen molekülünün kendisi bir radikal olup, eşlenmemiş iki elektronun varlığı nedeniyle biradikal olarak adlandırılır (136). Başlıca reaktif oksijen türleri arasında süperoksit anyonu ( $O_2^{\cdot-}$ ), oksijen radikali ( $O_2^{\cdot\cdot}$ ), hidroksil ( $\cdot OH$ ), alkoksil radikali ( $RO\cdot$ ), peroksil radikali ( $ROO\cdot$ ) sayılabilir. Reaktif nitrojen türleri ise nitrik oksit ( $NO\cdot$ ) ve nitrojen dioksit (veya azot dioksit,  $NO_2\cdot$ ) dahil olmak üzere azot bazlı radikalleri içerir. ROS'lar ve RNS'ler radikal olmayan türlere dönüşür. Radikal olmayan türler arasında  $H_2O_2$ , hipokloröz asit ( $HOCl$ ), hipobromöz asit ( $HOBr$ ), ozon ( $O_3$ ), singlet oksijen ( $^1O_2$ ), nitroz asit ( $HNO_2$ ), nitrozil katyonu ( $NO^+$ ), nitroksil anyonu ( $NO\cdot$ ), dinitrojen trioksit ( $N_2O_3$ ), dinitrojen tetraoksit ( $N_2O_4$ ), nitronyum katyonu ( $NO_2^+$ ), organik peroksitler ( $ROOH$ ), aldehytler ( $HCOR$ ) ve peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) bulunur (135, 136, 139, 142). Radikal olmayan türler, serbest radikal olmasa da canlı organizmalarda serbest radikal reaksiyonlarını kolayca tetikleyebilirler (144). Serbest radikallerin kimyasal reaktivitesi, biyolojik moleküllere zarar verme potansiyelleri ile doğrudan ilişkilidir. Reaktif oksijen türleri, sadece radikalleri değil aynı zamanda radikal olmayan

türleri de kapsar. Ancak biyolojik sistemler esas olarak oksijenden üretilen radikaller tarafından hasara uğramaktadır (139).

**Tablo 2.2.** Başlıca Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Reaktif Nitrojen Türleri (RNS) (136, 139, 140, 143)

| Reaktif Oksijen Türleri (ROS) |                               | Reaktif Nitrojen Türleri (RNS) |                               |
|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Radikaller                    |                               |                                |                               |
| İsim                          | Sembol                        | İsim                           | Sembol                        |
| Süperoksit                    | O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>  | Nitrik Oksit                   | NO <sup>•</sup>               |
| Hidroksil                     | •OH                           | Nitrojen dioksit               | NO <sub>2</sub> <sup>•</sup>  |
| Hidroperoksil                 | HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>  | Nitrat radikali                | NO <sub>3</sub> <sup>•</sup>  |
| Peroksil radikali             | ROO <sup>•</sup>              |                                |                               |
| Alkoksil radikali             | RO <sup>•</sup>               |                                |                               |
| Organik hidroperoksit         | ROOH                          |                                |                               |
| Lipit peroksil                | LOO <sup>•</sup>              |                                |                               |
| Radikal Olmayanlar            |                               |                                |                               |
| Hidrojen peroksit             | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Nitröz asit                    | HNO <sub>2</sub>              |
| Singlet oksijen               | <sup>1</sup> O <sub>2</sub>   | Nitroksil anyonu               | NO <sup>-</sup>               |
| Ozon                          | O <sub>3</sub>                | Nitrozil katyonu               | NO <sup>+</sup>               |
| Hipokloröz asit               | HOCl                          | Nitronyum katyonu              | NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>  |
| Hipobromöz asit               | HOBr                          | Peroksinitrit                  | ONOO <sup>-</sup>             |
| Nitronyum (nitril) katyonu    | NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>  | Dinitrojen trioksit            | N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> |
| Aldehitler                    | HCOR                          | Dinitrojen tetraoksit          | N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> |
| Organik peroksitler           | ROOH                          | Nitril klorid                  | NO <sub>2</sub> Cl            |

Süperoksit anyon radikali; enzimatik yollar, oto-oksidasyon reaksiyonu ve bir elektronun moleküler oksijene transfer edildiği enzimatik olmayan elektron transfer reaksiyonları ile oluşturulan en önemli yaygın ROS'dur. Çoğunlukla mitokondri içinde üretilir ve biyomoleküllerle reaktivitesi düşüktür (136). Süperoksit üretebilen enzimler arasında ksantin oksidaz, lipooksijenaz, siklooksijenaz ve NADPH bağımlı oksidaz yer alır. Düşük pH'de  $O_2^{\bullet-}$  veya hidroperoksil radikal ( $HO_2^{\bullet}$ ) gibi iki farklı şekilde bulunabilir (145). Hidroperoksil radikali, yüklü form  $O_2^{\bullet-}$ 'den daha kolay bir şekilde çift fosfolipid katmanına girebilir. Fizyolojik pH altında en sık görülen form süperoksittir. İndirgeyici bir ajan olarak işlev görebilir ve sitokrom-c ve ferrik-etilen diaminetetraasetik asit ( $Fe^{3+}$ -

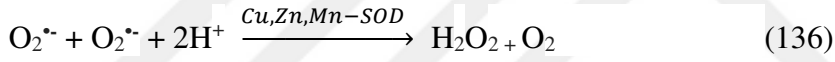


EDTA) gibi demir komplekslerini indirger, böylece  $Fe^{+3}$  ise  $Fe^{+2}$ ye indirgenir. Ayrıca oksitleyici bir ajan olarak da işlev görebilir ve askorbik asit ve tokoferolü oksitleyebilir (136). Moleküler oksijen, benzersiz bir elektron konfigürasyona sahiptir ve bir radikaldir. Dioksijene bir elektron eklenmesi süperoksit anyon radikalini oluşturur (135).



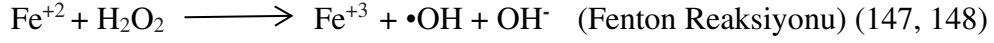
Reaksiyon sonucu meydana gelen süperoksit anyonu "birincil" ROS olarak bilinir ve doğrudan veya çoğunlukla enzim veya metal katalizli süreçler yoluyla "ikincil" ROS oluşturmak için diğer moleküllerle etkileşime girebilir (135).

Süperoksit radikali, başka bir süperoksit radikaliyle reaksiyona girerek dismutasyon reaksiyonu oluşturur. Oluşan reaksiyonda bir radikal oksijene oksitlenirken diğer radikal ise  $H_2O_2$  olarak indirgenir (136).



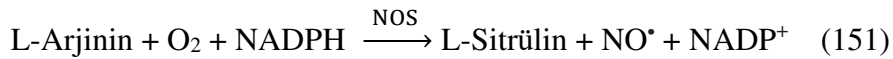
Hidroksil radikali ( $\bullet OH$ ), hidroksit iyonunun nötr formu olmakla birlikte çok kısa yarılanma ömrüne ( $10^{-9}$  sn) sahip yüksek reaktiviteye sahip serbest radikaldir (145, 146). Hidroksil radikali; DNA, proteinler, lipitler ve karbonhidratlar gibi organik ve inorganik bileşiklerle güçlü bir şekilde reaksiyona girme yeteneğine sahiptir. Bu durum, diğer tüm bilinen ROS'lara kıyasla daha büyük hücrel hasara neden olmasını sağlar (136).

Hidroksil radikali, Fenton reaksiyonu ile Haber-Weiss reaksiyonu adı verilen iki farklı biyokimyasal reaksiyonların neticesinde meydana gelebilir (147, 148). Hidrojen peroksit, ferritin (demir depolayan hücre içi protein), seruloplazmin (plazma bakır taşıyıcı protein) gibi farklı proteinlerle veya diğer moleküllerle kompleks halinde bulunan  $Fe^{+2}$  ve  $Cu^+$  gibi metal iyonları ile reaksiyona girerek Fenton Reaksiyonu sonucunda  $\bullet OH$  oluşturur (148). Stres koşullarında;  $O_2^{\bullet -}$  fazlalığı; ferritinden serbest demiri salıverir ve salıverilen serbest demir, Fenton reaksiyonuna katılarak  $\bullet OH$  oluşturur. Bunun dışında,  $O_2^{\bullet -}$  ile  $H_2O_2$ 'in arasında gerçekleşen Haber-Weiss reaksiyonu adı verilen bir reaksiyon sonucunda da  $\bullet OH$  oluşmaktadır (136).



Hidrojen peroksit, SOD enzimi tarafından katalizlenen dismutasyon reaksiyonuyla veya oksijen molekülünün doğrudan indirgenmesi gibi yollar ile oluşabilmektedir. Serbest radikal olarak nitelendirilmese de, nispeten düşük konsantrasyonda (10 µM) hücreye zarar verebilir ve daha yüksek seviyelerde gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz gibi hücrel enerji üreten enzimleri etkisiz hale getirebilir ve biyolojik membranlara kolayca nüfuz eder (136). Oksidazların (ürat oksidaz, glikoz oksidaz, D-amino asit oksidaz) varlığı, iki elektronun moleküler oksijene aktarılmasıyla doğrudan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sentezine yol açabilir; bu enzimler mikrozomlarda, peroksisomlarda ve mitokondride bulunur (149). Buna ek olarak, hidrojen peroksit, DNA üzerinde doğrudan bir etkiye sahip değildir, fakat geçiş metal iyonlarının varlığında •OH radikalini üreterek DNA'yı hasara uğratabilir (150). Hidrojen peroksitin diğer etkileri; demirin salıverilmesi, enzim inaktivasyonu ve lipidlerin, sülfidril gruplarının (-SH) ve keto-asitlerin oksidasyonu ile hem proteinlerinin yapısında hasara neden olmayı içerir (139, 143).

Nitrik oksit, L-arjinini L-sitrüline dönüştüren farklı nitrik oksit sentazlar (NOS) tarafından dokularda üretilen küçük bir moleküldür (151). Nitrik oksit (NO), hem lipofilik hem de hidrofilik özelliklere sahip bir molekül olduğundan dolayı plazma membranına ve sitoplazmaya geçişi kolay olur. İnsan kan plazması NO'ya maruz kaldığında, askorbik asit ve ürik asit konsantrasyonları azalır ve lipid peroksidasyonu tetiklenir (107). Nöronal NOS (nNOS), endotelial NOS (eNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS) gibi üç farklı NOS izoformu, nitrik oksit radikalinin oluşumunda görev alır (152).



Nitrik oksit, guanilat siklaz ve protein kinazları uyarak vasküler düz kas hücrelerinde vazodilatasyona yol açan ikincil haberci olarak davranır. Aynı zamanda önemli hücrel redoks düzenleyicisi, düz kasta gevşeme, vazodilatasyon, kan basıncının düzenlenmesi, gen ekspresyonu ve immün mekanizmaların düzenleyicisi olarak birçok biyolojik aktivitede yer alır (136).

Peroksinitrit, süperoksit anyonu ve NO arasındaki reaksiyondan oluşur (153). Nitrik oksit, süperoksit anyonu ile reaksiyona girerek peroksinitrit adı verilen güçlü oksidan üretirler (154). Böylelikle her biri diğerinin etkilerini modüle edebilir. Nitrik oksit ve süperoksit anyonu güçlü oksidanlar olmasalar da, ONOO<sup>-</sup>'nin etkilediği biyolojik hedefler oldukça geniştir (155). Yüksek toksisiteye sahiptir ve reaktivitesi yüksek nitrozo-perokso-karboksilat (ONOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup>) veya peroksinitröz asit (ONOOH) oluşturmak için doğrudan karbondioksit (CO<sub>2</sub>) ile reaksiyona girebilir (156). Buna ek olarak, peroksinitritin dekompozisyonu neticesinde •OH ve nitrojen dioksit oluşur (154). Peroksinitrit, biyolojik sistemlerde membranlarla birlikte sitozolik ve nükleer reseptörler gibi çeşitli hedeflere etki eder. Ayrıca, lipidlerin oksidasyonuna, proteinlerde metiyonin ve tirozinin oksidasyonu ve DNA'nın oksidasyonuna neden olabilir (136, 157). Oluşan nitrotirozin kalıntıları, ONOO<sup>-</sup>'nin neden olduğu doku hasarı ve inflamasyon gibi patolojik süreçlerde önemli bir belirteç olarak kullanılır (139, 158).



Nötrofil lökositlerin primer granüllerinden salınan miyeloperoksidaz (MPO) enzimi, degranülasyon yoluyla fagozom içine bırakılır. Bu enzim, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve klor (Cl<sup>-</sup>) gibi bileşikleri kullanarak HOCl adı verilen güçlü bir oksidan oluşturur (159).

### **2.5.2. Serbest radikal kaynakları**

Serbest radikaller, hem endojen kaynaklardan hem de ekzojen kaynaklardan oluşabilir (136).

#### **2.5.2.1. Endojen kaynaklar**

İskemi-reperfüzyonda ortaya çıkan hasardan başlıca mitokondrideki, peroksizomlardaki, birçok enzim aktivitesindeki artış ve ER biyokimyasal mekanizmalar ile ortaya çıkan serbest radikal oluşumu sorumlu tutulmaktadır (51-53).

##### **2.5.2.1.1. Mitokondri**

Hücre içinde oluşan ROS'ların büyük bir kısmı, mitokondride ATP üretimi sırasında elektron transport zinciri (ETZ) kaynaklıdır. Süperoksit radikalleri elektron taşıma zincirindeki iki ana bölgede, yani kompleks I (NADH dehidrojenaz) ve kompleks III'te (ubikinon sitokrom c redüktaz) üretilir (136). Bunun yanı sıra, serbest radikal oluşumuna

katkıda bulunan diğer mitokondriyal bileşenler arasında monoamino oksidaz,  $\alpha$ -ketoglutarat dehidrogenaz, gliserol fosfat dehidrogenaz ve p66Shc proteini bulunmaktadır (160, 161).

P66Shc proteini hücrel sinyal iletiminde önemli bir rol oynayan bir protein olan Src homoloji 2 alanı içeren dönüştürücü protein A (ShcA) ailesinin bir üyesi olup sinyal transdüksiyonu yoluyla hücre büyümesi, farklılaşma, proliferasyon ve apoptoz gibi birçok hücrel süreci düzenleyen önemli adaptör proteinleridir. P66Shc, mitokondride ROS üretimine aracılık eder. P66Shc'nin çoğu sitoplazmada bulunur ve küçük bir kısmı mitokondriyal intermembran boşlukta lokalize olur. Oksidatif stres ile P66Shc mitokondriyal intermembran boşluğa transloke olur ve burada sitokrom-c ile birleşerek ROS üretimini indükler (136, 161).

#### **2.5.2.1.2. Peroksizomlar**

Peroksizom, ilk olarak  $H_2O_2$  üreten ve parçalayan bir organel olarak tanımlanmıştır (162). Katalaz enziminin varlığına rağmen, peroksizomlar  $H_2O_2$ 'nin ana kaynaklarından biridir (163, 164). Hidrojen peroksit, birçok peroksizomal enzimin normal katalitik aktivitesi sırasında bir yan ürün olarak açığa çıkmakla birlikte süperoksit radikalinin spontan veya enzimatik dismutasyonu da oluşabilir (165). Ayrıca,  $H_2O_2$ , Fenton reaksiyonu aracılığıyla  $\bullet OH$  radikalleri oluşturabilir (135).

Peroksizomlar, yağ asidi  $\beta$ -oksidasyonu ve  $\alpha$ -oksidasyonu yanı sıra purinlerin, poliaminlerin, amino asitlerin, glioksilatın, ROS/RNS, geçiş metal iyonlarının ve diğer maddelerin metabolizmasını içeren birçok işleve sahiptir (166). Peroksizomlar, ROS ve RNS olarak,  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\bullet-}$ ,  $\bullet OH$ ,  $NO\bullet$  ve  $ONOO^-$  radikali oluşumuna neden olur (137).

Peroksizomlar, hem matriks hem de membranda süperoksit radikalleri ( $O_2^{\bullet-}$ ) üretir. Matrikste, ksantin oksidoredüktaz ve ürat oksidaz,  $O_2^{\bullet-}$  radikalinin oluşumundan sorumludur. Ksantin oksidoredüktaz, purin metabolizması sırasında ürik asit oluşumunu katalizler ve bu da ürat oksidaz tarafından allantoina dönüştürülür. Her iki enzim de  $O_2^{\bullet-}$  ve  $H_2O_2$  üretir (53). Ayrıca, ksantin oksidoredüktaz nitrat ve nitritlerin nitrik okside indirgenmesini de katalize eder (147). Nitrik oksit, NOS tarafından katalizlenen L-arjinininden de oluşabilir (167).  $O_2^{\bullet-}$ 'nin  $NO\bullet$  ile reaksiyonu, yüksek reaktif bir radikal olan  $ONOO^-$  radikalinin oluşumuna yol açar (53, 168).

Buna ek olarak, açıl CoA oksidazlar, D-amino asit oksidaz, L- $\alpha$ -hidroksi oksidaz, ürat oksidaz, ksantin oksidaz, D-aspartat oksidaz gibi peroksizomal enzimlerin de serbest radikal oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (Tablo 2.3) (136, 165, 169, 170).

**Tablo 2.3.** Peroksizomlarda ROS/RNS oluşumuna yol açan başlıca enzimler (136, 165, 169, 170)

| Enzim                                                    | Substrat                                | ROS/RNS                                                                        |
|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Açıl-CoA-oksidadazlar ( $\beta$ -oksidadasyon enzimleri) | Yağ asitleri                            | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                  |
| D-amino asit oksidaz                                     | D-prolin                                | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                  |
| L- $\alpha$ -hidroksi oksidaz                            | Glikolat                                | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                  |
| Ürat oksidaz                                             | Ürik asit                               | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                  |
| D-aspartat oksidaz                                       | D-aspartat                              | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                  |
| Poliamin Oksidaz                                         | Spermin ve Spermidin N-asetil türevleri | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                  |
| Ksantin oksidaz                                          | Ksantin                                 | O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> , NO <sup>•</sup> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
| İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (NOS2)                | L-arjinin                               | NO <sup>•</sup> , O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>                                 |

#### 2.5.2.1.3. Endoplazmik Retikulum (ER)

Endoplazmik retikulum enzimlerinden CYP450, sitokrom b5 enzimleri ve diamin oksidaz da serbest radikal oluşumuna rol oynar (171). Ayrıca tiyol oksidaz enzimi olan Eroplp, elektronların ditiyollerden moleküler oksijene transferini katalize ederek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşumuna neden olur (172).

Serbest radikallerin diğer endojen kaynakları arasında olan prostaglandin sentezi, adrenalinin oto-oksidadasyonu, fagositik hücreler, indirgenmiş riboflavin, FMNH<sub>2</sub>, FADH<sub>2</sub>, CYP450, immün hücrelerin aktivasyonu, inflamasyon, zihinsel stres, aşırı egzersiz, enfeksiyon, kanser, yaşlanma ve iskemi de yer almaktadır (136, 171).

#### 2.5.2.1.4. Enzim sistemi

Hücrede bulunan çeşitli oksidatif enzimler serbest radikal oluşumuna katkıda bulunur. ROS oluşumunu katalize edenler arasında nitrik oksit sentazlar, NADPH oksidaz,

prostaglandin sentaz, ksantin oksidaz, lipooksijenazlar, ribonükleotid redüktaz, glukoz oksidaz, miyeloperoksidaz, siklooksijenazlar ve CYP450 bulunur (173). Çeşitli oksidazlar tarafından belirli miktarda ROS üretilir. Örneğin, ksantin oksidaz ve CYP450 redüktaz esas olarak süperoksit anyon radikalini oluştururken, amino asitler ve glukoz oksidazlar çoğunlukla  $H_2O_2$  oluşumuna katkıda bulunur (174). Özellikle normal fizyolojik koşullarda, ksantin oksidaz bir dehidrogenaz olarak işlev görerek ksantin veya hipoksantinden hidrojeni uzaklaştırır ve nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) ile bağlar, böylece NADH üretir (139). Ayrıca, lipooksijenazlar da serbest radikaller oluşumunda rol oynar;  $Fe^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ 'e oksitlendikten sonra çoklu doymamış yağ asitlerini (PUFA) hidroperoksitlere dönüştürebilir (175).

Yüksek ROS seviyeleri, immün hücreleri (lenfositler, granülositler ve fagositler) tarafından da oluşturulur (176). Sitokrom P450 enzimleri, biyokimyasal reaksiyonlarda oksijen kullanır ve az miktarda ROS oluşumuna neden olur. Oluşturulan ROS'un miktarı, bozunan bileşiğe ve reaksiyonda yer alan CYP450 enzimine bağlı olarak değişir. ROS oluşumunda özellikle aktif olan enzim sitokrom P450 2E1'dir (139, 177).

#### 2.5.2.2. Ekzojen kaynaklar

ROS ve RNS biyolojik sistemlerde çeşitli ekzojen kaynaklar tarafından da üretilmektedir (Tablo 2.4) (136).

**Tablo 2.4.** Serbest radikal oluşumuna yol açan ekzojen kaynaklar (136)

| Ekzojen kaynaklar                |                                                                                  |
|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Hava ve su kirliliği             | Ultraviyole ışık                                                                 |
| Alkol                            | Pişirme (Füme et, kullanılmış sıvı yağ, katı yağ)                                |
| Tütün dumanı                     | Parasetamol, Belomisin, Halotan, Metronidazol, Doksorubisin, Etanol gibi ilaçlar |
| Geçiş metalleri - Cd, Hg, Pb, As | $CCl_4$ (Karbon tetraklorür)                                                     |
| Ağır metaller - Fe, Cu, Co, Cr   | Yüksek sıcaklık                                                                  |
| Endüstriyel solventler           | Pestisitler                                                                      |

### 2.5.3. Serbest radikallerin etkileri

Serbest radikal oluşumunda (ROS/RNS) artış veya antioksidan savunma sisteminde yetersizlik nedeniyle organizmada oksidatif stres ve nitrozatif stres durumları ortaya çıkabilir (178). Serbest radikaller, hücre hasarına ve homeostatik bozulmaya yol açan önemli makromoleküllere saldırır. Serbest radikallerin hedefleri vücuttaki her türlü molekülü içerir. Bunlar arasında lipitler, nükleik asitler ve proteinler başlıca hedeflerdir (138). Bu durumda, lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve DNA gibi hücrel bileşenlerde hasar meydana gelir ve hücrel fonksiyonlar bozulabilir (178).

#### 2.5.3.1. Lipitler

Membran lipitleri, esas olarak fosfolipitlerin çoklu doymamış yağ asidi kalıntıları, serbest radikal oksidasyonuna karşı daha duyarlıdır (179). Lipit peroksidasyonu, membranlarda çeşitli fonksiyon kayıplarına neden olabilir. Bu kayıplar arasında membran akışkanlığının azalması, membrana bağlı enzimlerin ve reseptörlerin inaktivasyonu, ve membran geçirgenliğinin bozulması yer alır (180). Lipit peroksidasyonu süreci, başlatma, yayılma ve sonlandırma olmak üzere üç adımdan ibarettir. Lipit peroksidasyonunun ilk aşaması, serbest radikalın lipitte bulunan bir metilen grubundan ( $-CH_2$ ) bir hidrojen atomunu ayırmasıyla başlar. Metilen grubu, bitişik bir çift bağın varlığı nedeniyle hidrojen ve karbon arasındaki bağ zayıflar, bu da hidrojen atomunun molekülden kolayca ayrılmasına ve karbon merkezli bir lipit radikalının ( $L^*$ ) oluşumuna yol açar. Yayılma aşamasında,  $L^*$  radikali oksijenle hızla reaksiyona girerek lipid peroksi radikali ( $LOO^*$ ) oluşturur ve bu da başka bir lipid molekülünden bir hidrojen soyutlayarak yeni bir  $L^*$  ve  $LOOH$  oluşturur. Lipit peroksidasyonunun ana birincil ürünleri,  $LOOH$ 'dur. Bu süreç, kendini katalize eden (otokatalitik) zincir reaksiyonlar şeklinde sürekli olarak ilerler (181).

Sonlandırma aşamasında, lipit peroksitlerinin DNA ve proteinlere zarar veren lipit peroksidasyonunun toksik son ürünleri olan 4-hidroksinonenal (4-HNE), malondialdehit (MDA), propanal ve heksanal gibi aldehitlere dönüşümü gerçekleşir. Ayrıca, izoprostanlar araziidonik asidin lipit peroksidasyonunun önemli bir ürününü oluşturur ve oksidatif lipit hasarının yapıcıları olarak kabul edilir (136, 180, 181).

### 2.5.3.2. Proteinler

Protein oksidasyonu;  $O_2$ ,  $\bullet OH$ , peroksil, alkoksil, hidroperoksil gibi radikal türlerin yanı sıra  $H_2O_2$ ,  $O_2$ ,  $HOCl$ ,  $^1O_2$ ,  $OONO-$  gibi radikal olmayan türler tarafından da indüklenebilir (182). Reaktif oksijen türleri proteinler ile etkileşime girerek karbonil ve diğer amino asit türevlerinin oluşumuna katkıda bulunur. Oksijen, süperoksit anyonu ve protonlanmış formu ( $HO_2^-$ ) protein oksidasyon sürecini belirler. Hipokloröz asit tarafından tirozinden 3-klorotirozinin oluşturulması, histidinin proteinlerin metal bağlanma bölgesinde 2-oksohistidine oksidasyonu, tiyol gruplarının oksidasyonu ve amino asitlerin karbonil türevlerinin oluşumu protein modifikasyonlarının örneklerindendir (183). Reaktif oksijen türleri; lizin, prolin, treonin ve arjinin gibi amino asit kalıntılarında oksidatif hasara neden olarak karbonil türevleri oluşumuna yol açar. Farklı amino asitlerin oksidasyonu proteinleri denatüre eder ve enzim aktivitesi, reseptör fonksiyonu veya transport fonksiyonu gibi fonksiyon kayıplarına neden olur (184).

Metiyonin ve sistein gibi sülfür içeren amino asitler ROS tarafından oksidasyona daha duyarlıdır ve sırasıyla disüflitlere ve metiyonin sülfoksite dönüştürülür (185, 186). Ancak biyolojik sistemlerde, proteinlerin yalnızca bu iki oksitlenmiş formu, sırasıyla disülfid redüktazlar ve metiyonin sülfoksit redüktazlar olmak üzere iki farklı enzim tarafından doğal formlarına geri dönüştürülebilir (139, 187).

Proteinlerde yer alan karbonil grupları, serbest radikallerin aracılık ettiği oksidasyon proteinlerinin belirteçleri olarak kabul edilir (188). Protein oksidasyonunun spesifik belirteçleri arasında hidroksil radikalının belirteci olarak O-tirozin ve peroksinitritin belirteci olarak 3-nitrotirozin (3-NT) yer alır (139).

### 2.5.3.3. Deoksiribonükleik Asit (DNA)

Hem ROS hem de RNS nükleik asitlere oksidatif olarak zarar verebilir. Mitokondriyal DNA, ROS'a karşı nükleer DNA'dan daha savunmasızdır, çünkü ROS oluşumuna daha yakın bir yerde bulunur. Yüksek reaktiviteye sahip  $\bullet OH$  radikali, purin ve pirimidin bazlarıyla ve deoksiriboz gibi DNA bileşenleri ile doğrudan reaksiyona girerek DNA'da tek ve çift zincir kırıklar dahil bir dizi değişikliğe neden olabilir (140, 189, 190). Hidroksil radikalının pirimidinler ile etkileşimi sonucunda, timin glikol, urasil glikol, 5-hidroksideoksi üridin, 5-hidroksi deoksisitidin, hidantoin gibi modifiye pirimidin bazları oluşurken;  $\bullet OH$  radikalının pürin bazları ile etkileşimi sonucunda ise 8-



hidroksideoksiguanosin, 8-hidroksideoksiadenosin, 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamido pirimidin oluşur. DNA bazlarının diğer serbest radikal kaynaklı bazları arasında 5-formil urasil, sitozin glikol, 5,6-dihidrotironin, 5-hidroksi-6-hidro-sitozin, 5-hidroksi-6-hidro urasil, urasil glikol ve alloksan yer alır (191).

Buna ek olarak,  $OONO^-$ , guanin ile etkileşime girerek sırasıyla 8-nitroguanin ve 8-oksodeoksiguanozin gibi nitrozatif ve oksidatif DNA hasarına yol açabilir (136, 192).

#### **2.5.3.4. Ribonükleik asit (RNA)**

RNA; tek sarmallı yapısı, oksidasyona uğramış RNA için aktif onarma mekanizmasına sahip olmaması, proteinler tarafından DNA'ya göre daha az protein tarafından korunması ve ayrıca sitoplazmik RNA'ların yüksek miktarda ROS'un üretildiği mitokondriye yakın bulunması nedeniyle oksidatif hasara daha fazla maruz kalma eğilimindedir (136, 193).

#### **2.6. Antioksidanlar**

Antioksidanlar, hedef moleküllerin oksidatif hasarını önleme, azaltma, ortadan kaldırma veya onarma yeteneği olan moleküllerdir. Antioksidanlar, oksitlenebilir bir substratla karşılaştırıldığında düşük konsantrasyonlarda bile substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya engelleyen maddelerdir (194, 195). Hücreler, dokular ve hücre dışı matriks reaktif türlerin zararlı etkilerine maruz kaldığında, çeşitli reaksiyonlara neden olur. Bu reaksiyonlar, reaktif türlerin etkisini ortadan kaldırmak için çoklu iç savunma mekanizmalarının aktive edilmesini tetikler. Hücre içinde biyomoleküllerin serbest radikaller ve oksidatif stresin zararlı etkilerinden korunması amacıyla antioksidan etkiye sahip moleküller ile enzimleri de içeren antioksidan savunma sistemi bulunur (196). Antioksidan savunma sistemi, serbest radikal oluşumunu önleyen, redoks-aktif metal iyonlarını bağlayıp redoks dengesinin korunmasını sağlayarak hücrel hasarı geciktiren ve önleyen mekanizma olarak tanımlanır (194). Serbest radikallerin ortadan kaldırılması bir dizi karmaşık süreçle ilişkilidir. Antioksidanlar, elektron donörü olarak davranıp reaktiflere hidrojen veya elektron vererek, enzim yapılı antioksidanlara katılarak, şelat ajanı gibi davranıp demir ve bakır gibi geçiş metallerinin  $H_2O_2$  ve süperoksit ile etkileşimini ve dolayısıyla yüksek reaktif hidroksil radikallerinin oluşumunu önleyerek etkilerini gösterebilirler (139).

Oksidasyon reaksiyonları hücreler için hayati öneme sahip olmakla birlikte, zararlı etkilere de sahiptir; bu nedenle askorbik asit (C vitamini),  $\alpha$ -tokoferol (E vitamini) ve glutatyon gibi çeşitli antioksidanların yanı sıra katalaz, SOD ve peroksidazlar gibi antioksidan reaksiyonları katalize eden farklı enzimatik sistemler içerir (58). Bu antioksidan enzimlerin disfonksiyonu veya inhibisyonu oksidatif stresi tetikleyerek hücrede hasara ve lizise neden olabilir (135).

Antioksidan savunma sisteminde temel mekanizmalar şunlardır:

- 1) Serbest radikallerin oluşumunun önlenmesi,
- 2) Oksidanların temizlenmesi (scavenging),
- 3) Toksik serbest radikallerin daha az toksik bileşiklere dönüştürülmesi,
- 4) Sekonder toksik metabolitlerin ve inflamasyon mediyatörlerinin oluşumun önlenmesi,
- 5) İkincil oksidanların zincir reaksiyon oluşumunun engellenmesi,
- 6) Hasarlı moleküllerin onarımı,
- 7) Endojen antioksidan savunma sisteminin tetiklenmesi.

Tüm bu savunma mekanizmaları, vücudu oksidatif stresten korumak için bir arada çalışır (58, 197).

Antioksidanlar, endojen ve ekzojen antioksidanlar olarak iki ana gruba ayrılabilir (139).

### **2.6.1. Endojen antioksidanlar**

İnsan vücudu, oksidanların etkisini dengelemeye yarayan çeşitli antioksidanlarla donatılmıştır (198). Endojen antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki sınıfa ayrılır (197).

#### **2.6.1.1. Enzimatik antioksidanlar**

Vücut enzimatik antioksidan mekanizmaları kullanarak serbest radikalleri modüle eder ve biyomoleküllerin oksidatif hasara uğramasını önler. Antioksidan enzimler lipid hidroperoksit ve  $H_2O_2$  seviyelerini azaltır, bu nedenle lipid peroksidasyonunun önlenmesinde ve hücre membranlarının yapı ve işlevinin korunmasında önemlidirler. Ayrıca, DNA ve proteinleri onarabilme yeteneğine de sahiptir. Tüm vücut hücrelerindeki antioksidan enzimleri; CAT, SOD ve GPX olan üç ana antioksidan enzim sınıfından oluşur ve bunların tümü, hücrelerde homeostazın korunmasında çok önemli rol oynar (58).

#### **2.6.1.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)**

Süperoksit dismutazlar, süperoksit radikalının moleküler oksijen ve hidrojen peroksit'e parçalanmasını katalize eder (199). Süperoksit dismutaz enzimleri çoğunlukla aerobik hücrelerde ve hücre dışı sıvılarda bulunur (200). İnsanlarda SOD üç formda bulunur. Bunlardan, SOD1 temel olarak sitoplazmada bulunan bir enzimdir ve bütün hücre tiplerinde genellikle yaygın olarak bulunmakla birlikte hem bakır (Cu) hem de çinko (Zn) bağlar. Ayrıca peroksizomlarda ve nükleusta da yer alır (138, 201). İkinci formu, SOD2 ise, mitokondriyal oksidatif fosforilasyon sırasında oluşan süperoksit anyonlarının detoksifikasyonunda rol alan mitokondriyal mangan (Mn) SOD enzimidir (201). Üçüncü formu SOD3 ise ekstrasellüler bir enzim olup aynı zamanda SOD1'e benzer şekilde hem bakır (Cu) hem de çinko (Zn) bağlayabilir (138).

#### **2.6.1.1.2. Katalaz (CAT)**

Katalaz, dört polipeptit zincirden oluşur. Her polipeptit zincir 500 amino asit uzunluğundadır ve enzimin  $H_2O_2$  ile reaksiyona girmesini sağlayan dört porfirin hem grubu içerir. Esas olarak peroksizomlarda bulunan CAT,  $H_2O_2$ 'yi  $H_2O$  ve  $O_2$ 'ye dismutasyona uğratır. Hidrojen peroksit, yüksek oranda hidroksil radikali oluşan spesifik bir reaksiyon için substrat görevi gördüğünden, katalazın hücresel antioksidan savunma mekanizmalarındaki birincil rolünün  $H_2O_2$  birikimini azaltmak olduğu bilinmektedir (58).

#### **2.6.1.1.3. Glutasyon sistemi**

Glutasyon sistemi, glutasyon (GSH), glutasyon redüktaz, GPx ve glutasyon S-transferaz içerir (155). Glutasyon peroksidaz; mitokondri, sitoplazma ve ekstrasellüler matrikste bulunur (202). Glutasyon peroksidaz,  $H_2O_2$  ve organik hidroperoksitlerin parçalanmasını katalizleyen dört selenyum kofaktör içeren bir enzimdir. Glutasyon peroksidaz enziminin, GPx1, GPx2, GPx3, GPx4, GPx5, GPx6, GPx7 ve GPx8 olmak üzere sekiz farklı izotipi olduğu bilinmektedir. Bu izotipler, farklı genler tarafından kodlanır ve hücresel yerleşimleri ve substrat tercihleri açısından farklılık gösterir. Tüm GPx enzimleri, GSH'ı indirgeyici olarak kullanarak hidrojen peroksitin suya indirgenmesini katalizler. Bu reaksiyon sonucunda su ve okside olmuş glutasyon (GSSG) meydana gelir. Glutasyon redüktaz ise NADPH bağımlı olarak GSSG'nin redükte edilerek tekrar GSH formuna dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir (155, 203-205).

#### **2.6.1.1.4. Diğer antioksidan enzimler**

Süperoksit dismutazlar, katalaz ve glutatyon sistemi ile birlikte mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi ve hidroperoksidaz da enzimatik antioksidanlar olarak yer alırlar (58).

#### **2.6.1.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar**

Enzimatik olmayan antioksidanlar, serbest radikallere ve ROS'a karşı önleyici etkiler sunarlar (135). Glutatyon, melatonin, ürik asit, bilirubin ile birlikte seruloplazmin, ferritin, albümin, transferrin gibi proteinler bu tür antioksidan örnekleri olarak sayılabilir (206).

#### **2.6.2. Ekzojen antioksidanlar**

Ekzojen antioksidanlar; vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olarak sınıflandırılabilirler (207).

Vitamin ekzojen antioksidanlar şunlardır: 1)  $\alpha$ -tokoferol (E vitamini), 2)  $\beta$ -karoten, 3) Askorbik asit (C vitamini), 4) Folik asit (folat) (208).

İlaç olarak kullanılan ekzojen antioksidanlar şunlardır: 1) Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopurinol, oksipurinol, tungsten), 2) NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, difenilamin iyodonyum), 3) Rekombinant süperoksit dismutaz, 4) Trolox-C (E vitamini analogu), 5) Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-PX aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein), 6) Enzimatik olmayan serbest radikal temizleyiciler (mannitol, albümin), 7) Demir şelatörleri, 8) Nötrofil adezyon inhibitörleri, 9) Sitokinler (TNF ve IL-1), 10) Barbitüratlar.

Gıdalarda bulunan ekzojen antioksidanlar şunlardır: 1) Butillenmiş hidroksitoluen (BHT), 2) Butillenmiş hidroksianisol (BHA), 3) Sodyum benzoat, 4) Etoksikuin, 5) Propilgalat, 6) Fe-süperoksit dismutaz (207).

#### **2.7. Oksidatif stres/Nitrozatif stres**

Serbest radikaller, İ/R'ye maruz kalan dokuda hasar patogenezinde yer alır. Bu aynı zamanda İ/R'nin oksidatif strese yol açtığını gösterir (120). Oksidatif stres, başta oksijen veya nitrojen olmak üzere reaktif türlerin kontrolsüz üretiminden kaynaklanan bir olgudur

(209). Oksijenli kanın iskemik dokuya yeniden girişı, aerobik ATP üretiminin restorasyonu için gerekli olmakla birlikte, aynı zamanda ROS üretimi ile sonuçlanır. Bu moleküllerin temel özelliği, biyolojik bileşenlere, lipitlere, proteinlere, nükleik asitlere veya karbonhidratlara karşı yüksek reaktiviteleridir (57, 210). Yüksek reaktif yapıları nedeniyle reperfüzyon ile oluşan ROS'lar, hücrelerde bulunan biyomolekölü oksidatif olarak değıştirebilirler ve bu paradoksal bir şekilde hücre disfonksiyonuna neden olabilir (oksijen paradoksu). Nitrik oksitten türetilen redoks molekülleri olan RNS de İ/R'ye hücresel ve sistemik yanıtta modölatör bir rol oynar. ROS ve RNS arasındaki etkileşimler, güçlü prooksidan peroksinitrit gibi RNS oluşumu ile hasar için kritik öneme sahiptir (57).

İskemi-reperfüzyon sonucunda ROS/RNS'nin genel olumsuz etkileri arasında makromoleküllerin hasarı/modifikasyonu, etkilenen dokuda endotelial ve/veya parankimal hücre ölümünün indüklenmesi, çeşitli hücre tipleri tarafından pro-inflamatuar mediatörlerin üretiminin/serbest bırakılmasının uyarılması, lökosit/lenfosit-endotelial hücre adeziv etkileşimlerini destekleyen adezyon moleküllerinin indüksiyonu ve koruyucu NO miktarında azalma yer almaktadır (55-57).

Bu etkileri destekleyen genel durum oksidatif veya oksidan stres ya da NO durumunda nitrozatif stres olarak adlandırılmıştır. İlk defa Sies ve ark. (211) tarafından ortaya atılan geleneksel görüş, oksidan stresin prooksidan ve antioksidan bileşiklerin hücresel seviyeleri arasındaki dengesizlikten kaynaklandığı ve bunun sonucunda ortaya çıkan net ROS fazlalığının hücre/doku hasarı oluşturduğu yönündeydi. Son zamanlarda bu hipotezin geliştirilmesinde başlıca üç faktör etkili olmuştur. Bunlar, klinik çalışmalarda serbest radikal temizleyicilerle tedaviden büyük fayda sağlanamaması, oksidan ve redoksa duyarlı hücre sinyal yollarının kontrolünün anlaşılmasındaki ilerleme ve ROS'a ek olarak RNS'lerin de hücre fizyolojisinde önemli bir modölatör rolü oynadığının kabul edilmesidir (212-214).

### **2.7.1. Oksidatif/Nitrozatif stres ve İskemi/Reperfüzyon hasarı ilişkisi**

Oksidatif stres, pro-oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizlikten kaynaklanır (215). Bu oran, artan ROS ve/veya RNS seviyeleri veya antioksidan savunma mekanizmalarında bir azalma ile modüle edilebilir (216). Oksidasyon sonrası her molekülün indirgenmiş durumuna geri dönmesi koşuluyla, normal hücre fonksiyonlarının ilerlemesi için belirli bir miktarda ROS gereklidir (217). Ancak aşırı ROS üretimi,

vücudun doğal antioksidan savunma sistemini etkisiz hale getirerek normal fizyolojik reaksiyonlar için uygun olmayan bir ortama neden olabilir (215).

İskemi/reperfüzyon süreci ile birlikte; mitokondriyal oksidatif fosforilasyonda azalma, ATP'de azalma ve hücre içi  $Ca^{+2}$  miktarında artma meydana gelir. Ayrıca, hücre iskeleti ve membran fosfolipitlerinde bozulmaya sebep olan proteaz ve fosfatazların aktive olması ile birlikte ROS oluşarak oksidatif stres ile sonuçlanmasına sebep olur (35). Başlangıçta, overde detorsiyon ile birlikte over reperfüzyonu iskemiye önlerken reperfüzyona bağlı olarak nötrofillerden adezyon moleküllerinin aktivasyonuna, proinflamatuvar moleküllerin salınmasına ve RNS/ROS oluşumuna neden olur (4, 39, 54). Ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri sürekli olarak belirli bir miktarda üretilir ve vücut tarafından endojen antioksidan enzimlerle nötralize edilir. Ancak, reperfüzyon sırasında oldukça yüksek konsantrasyonda oluşan RNS ve ROS ile birlikte bunların toksik ürünleri, DNA ve hücre hasarına neden olur. Buna ek olarak, hücresel ve mitokondriyal membranlarda lipid peroksidasyonuna yol açar (4, 34, 35).

Over torsiyonunda İ/R hasarını önlemek için antioksidan ve anti-inflamatuvar özellikleri olan birçok farmakolojik ajan, son zamanlarda hayvan modellerinde İ/R hasarının tedavisinde kullanılmış ancak rutin klinik uygulamaya dahil olmamıştır (59-62). Yapılan araştırmalar, oksidatif stresin menstrüasyon döngü, ovulasyon, embriyo implantasyonu, plasenta gelişimi ve menopozun fizyolojik süreçlerinde kilit rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır (218).

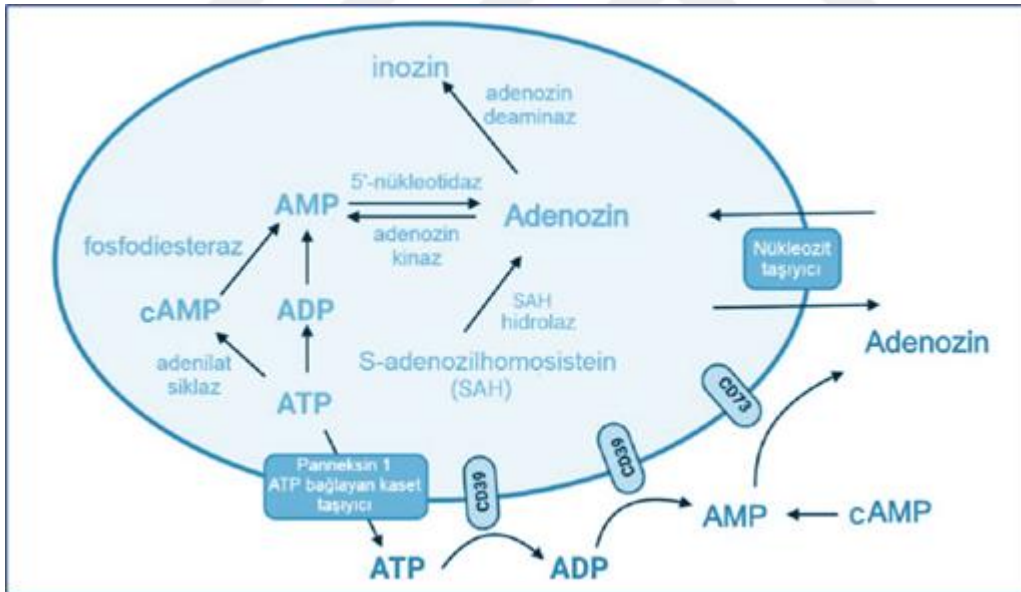
## **2.8. Adenozin**

1929 yılında ortaya atılan bir teoriye göre, hücre içinde ve dışında sürekli olarak sentezlenen ve kullanılan adenozinin çeşitli fizyolojik olaylarda rolü olduğu düşünülmüştür. Ancak, bu rolünü nasıl gerçekleştirdiği, yani etkilerini hangi reseptörler aracılığıyla oluşturduğu ancak 1974 yılında anlaşılmıştır (219, 220). Adenozin, hücrelerin işlevlerini düzenlemekte kritik rol oynayan, adenin bazına pentoz halkası eklenerek oluşan bir moleküldür (221, 222).

Hücre içinde enerji üretimi için kullanılan ATP, ardışık defosforilasyon reaksiyonlarıyla önce adenozin difosfata, sonra AMP'ye ve son olarak da adenozine dönüşümü gerçekleştirir. Bu süreçte, hücre içindeki 5'-nükleotidaz enzimi, AMP'nin adenozine dönüşümünde

önemli rol oynar (221) (Şekil 2.2). G-protein kenetli reseptörlerin uyarılması ise siklik AMP (cAMP) oluşumunu tetikler ve cAMP de fosfodiesteraz enzimi tarafından daha yavaş bir şekilde AMP'ye dönüştürülerek adenoze dönüşür. Hücre içi adenozinin başka bir kaynağı da S-adenozilhomosistein hidrolaz (SAHaz) hidrolizi sonucu L-homosistein oluşumudur (63, 222, 223).

Adenozin, hücre içi ve hücre dışı adenozin konsantrasyonları arasındaki dengeyi korumak için hücre membranları boyunca difüze olabilir. Hücre içi adenozin, plazma membranı boyunca çift yönlü, konsantre nükleozit taşıyıcılar (CNT) ve dengeli nükleozit taşıyıcılar (ENT1 ve ENT2) yoluyla taşınabilir. Konsantrasyon farklarına bağlı olarak, ENT1 ve ENT2 olarak adenozini plazma membranı boyunca taşıyan sodyumdan bağımsız pasif çift yönlü taşıyıcılardır, CNT'ler ise sodyum bağımlı aktif taşıyıcılardır. Ayrıca, adenozin hücrelerin plazma membranından geçebilir ve hücre içinde kullanılabilir (63, 224). Ancak, hücrelerden adenozin alımının veya salınımının yönü, membran boyunca konsantrasyon farkı ile belirlenir (67).



**Şekil 2.2.** Adenozin sentezi ve metabolizması (221)

Adenozin; iskemi, hipoksi, inflamasyon, travma, stres, nöbet, ağrı ve inflamasyon gibi hücrel stres durumlarda artar ve dokularda çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik olayların ortaya çıkmasında önemli role sahiptir (63, 64).

### 2.8.1. Adenozin reseptörleri

Pürinler ve bu pürinlerin nükleozit ve nükleotid formu, hücre içi iletişimde ve hücreler arası iletişimde önemli rol oynar. Bu iletişim süreci, hücre yüzeyinde bulunan ve plazma membranına yerleşmiş reseptörler aracılığıyla gerçekleşir. Adenozin ise farmakolojik etkilerini dört farklı grup reseptör olan  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  ve  $A_3$  üzerinden G proteinine bağlanarak gösterir. Adenozin reseptörleri (AR), memeli organizmasında farklı fizyolojik işlevlere ve düzenledikleri organ ve dokularda farklı dağılımlara sahiptir (Tablo 2.5) (67, 70, 225-227).

**Tablo 2.5.** Adenozin reseptörlerinin dağılımı ve fizyolojik işlevi (67, 70, 225-227)

| Reseptör | Dağılımı                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Fizyolojik İşlevi                                                                                                                                                                                                                                                          |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $A_1$    | <p><u>Yüksek düzeyde</u> : Beyin (korteks, hipokampus, serebellum), omurilik, göz, adrenal bez, atriyum.</p> <p><u>Orta düzeyde</u> : Beynin diğer bölümleri, iskelet kasları, karaciğer, böbrek, adipoz doku</p> <p><u>Düşük düzeyde</u> : Akciğerler (ancak muhtemelen bronşlarda daha yüksek), pankreas</p> | Bradikardi; lipoliz inhibisyonu; azalmış glomerüler filtrasyon oranı; tubero-glomerüler feedback; antinosiseptif etki; sempatik ve parasempatik aktivitede azalma; presinaptik inhibisyon; nöronal hiperpolarizasyon; iskemik önkoşullanma; insülin sekresyonu inhibisyonu |
| $A_{2A}$ | <p><u>Yüksek düzeyde</u> : Lenfoid dokular (dalak, timus), trombositler ve lökositler</p> <p><u>Orta düzeyde</u> : Kalp, akciğer, kan damarları, periferik sinirler</p> <p><u>Düşük düzeyde</u> : Beynin diğer bölümleri</p>                                                                                   | Bazal ganglionlarda sensorimotor entegrasyonun düzenlenmesi; trombosit agregasyonu ve polimorfonükleer lökositlerin inhibisyonu; vazodilatasyon, iskemik hasara karşı koruma; duyuşal sinir aktivitesinin uyarılması; ROS inhibisyonu, İ/R hasarına karşı koruma           |



**Tablo 2.5.** Adenozin reseptörlerinin dağılımı ve fizyolojik işlevi (67, 70, 225-227) (devam)

|                       |                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                   |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>A<sub>2B</sub></b> | <u>Yüksek düzeyde</u> : İntraperitoneal kese (çekum), mesane ve kolon<br><u>Orta düzeyde</u> : Akciğer, kan damarları, göz, mast hücreleri<br><u>Düşük düzeyde</u> : Yağ dokusu, adrenal bez, beyin, böbrek | Vasküler ve intestinal düz kas gevşemesi; monosit ve makrofaj fonksiyonunun inhibisyonu, mast hücre mediatör salınımının uyarılması (bazı türler) |
| <b>A<sub>3</sub></b>  | <u>Yüksek düzeyde</u> : Testis ve mast hücreleri<br><u>Orta düzeyde</u> : Serebellum, hipokampus<br><u>Düşük düzeyde</u> : Tiroid, beyin çoğu, böbreküstü bezi, dalak, karaciğer, böbrek                    | Mast hücrelerinden mediatör salınımının artırılması (bazı türler); ön koşullanma (bazı türler)                                                    |

#### 2.8.1.1. Adenozin A<sub>1</sub> reseptörü

Adenozin A<sub>1</sub> adenozin reseptörleri, pürinerjik reseptör ailesinin en iyi karakterize edilmiş reseptörleri olmakla birlikte beyinde, özellikle uyarıcı sinapslarda yaygın ve homojen şekilde dağılmıştır ve fizyolojik sinaptik iletimin kontrolünde önemli rol oynamaktadır. Adenozin A<sub>1</sub> reseptörünün aktivasyonu G<sub>i</sub> proteini aracılığı ile adenilat siklaz (AC) aktivitesini inhibe eder, nöronlar ve miyokarddaki K<sup>+</sup>-ATP kanalları dahil tüm K<sup>+</sup> kanallarını aktive eder, N tipi kalsiyum kanallarını bloke eder ve PLC'yi aktive ederek hücre içi Ca<sup>2+</sup> ve inositol-1,4,5-trisfosfat (Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>) seviyelerini artırır (225). Adenozin A<sub>1</sub> adenozin reseptörlerinin nöroprotektif etkileri ve Adenozin A<sub>1</sub> adenozin reseptör agonistlerinin antinosiseptif ve/veya antihiperalezik özellikler sergilediği çeşitli inflamatuvar ve nöropatik ağrı modellerinde incelenmiştir. A<sub>1</sub>AR'ların aktivasyonu spinal, supraspinal ve periferik nöronların yanı sıra glial hücrelere de etki ederek ağrıyı azaltır (67). Ağrının azaltılmasında rol oynayan moleküler yollar, AC ve PKA üzerinden tanımlanan klasik sinyal mekanizmalarını; PLC indüksiyonunu; Ca<sup>2+</sup> ve K<sup>+</sup> kanal düzenlemesini ve ERK, CREB, kalmodulin kinaz (CaMKIIα) inhibisyonunun yanı sıra uyarıcı amino asit salıverilmesinin azaltılmasını içerir (228).

### **2.8.1.2. Adenozin A<sub>2A</sub> reseptörü**

Adenozin A<sub>2A</sub> reseptörü, hem merkezi hem de periferik dağılıma sahip olmakla birlikte beyinde striatum ve substantia nigra bölümlerinde ve periferde ise dalak, timüs, lökositler ve kan trombositleri gibi bağışıklık hücrelerinde yüksek düzeylerde bulunur. Ayrıca, kalp, akciğer ve kan damarlarında orta düzeylerde bulunur. Buna ek olarak, adenozin A<sub>2A</sub> reseptörleri hem presinaptik hem de postsinaptik nöronlarda astrositler, mikroglia ve oligodendrositlerde eksprese edilir ve burada nöronal glutamat salınımı, glial reaktivite, kan-beyin bariyeri permeabilitesi ve periferik immün hücre migrasyonunu kapsayan eksitotoksikite ile ilgili regülasyonlarda rol oynar (67, 225). Adenozin A<sub>2A</sub> reseptör aktivasyonu, periferik dokularda G<sub>s</sub> proteinine veya beyinde G<sub>olf</sub> proteinine bağlanarak sAMP-PKA yolağını uyarır. Beyindeki adenozin A<sub>2A</sub> reseptörleri, motor aktiviteyi, psikiyatrik davranışları, uyku-uyanıklık döngüsünü ve nöronal hücre ölümünü düzenlemek için çeşitli nörotransmitterlerle etkileşime girer. Periferik dokularda ise A<sub>2A</sub> reseptörleri, inflamasyonun modülasyonunda, miyokardiyal oksijen tüketiminde, koroner kan akımında, anjiyogenezde ve kanser patogenezinin kontrolünde önemli bir rol oynar (225). Ayrıca, adenozin A<sub>2A</sub> reseptör aktivasyonunun, C-Raf/ERK aracılığıyla antiinflamatuvar sinyali artırarak diyabete bağlı retinal hücre ölümünde koruyucu bir rol oynadığı bildirilmiştir (229). Yapılan diğer çalışmalar, A<sub>2A</sub> adenozin reseptörlerinin böbrekleri ve kalbi iskemik reperfüzyon hasarından koruduğunu ve ROS oluşumunu azaltmada önemli rol oynadığını ortaya koymuştur (230, 231).

### **2.8.1.3. Adenozin A<sub>2B</sub> reseptörü**

Adenozin A<sub>2B</sub> reseptörleri hem santralde hem de periferde bulunur. Adenozin A<sub>2B</sub> reseptörleri periferde çoğunlukla bağırsak, mesane, akciğer, vas deferens ve fibroblastlar, düz kas, endotel, bağışıklık, alveolar epitel, kromafin, tat hücreleri ve trombositler dahil olmak üzere farklı hücre tiplerinde bulunurlar. Santral düzeyde astrositlerde, nöronlarda ve mikroglialarda yer alırlar ve artan kanıtlar bu alt tipin kanser, diyabet, böbrek, akciğer ve damar hastalıkları gibi patolojilerde inflamasyon ve immün yanıtların modülasyonunda rol oynadığını göstermektedir (67, 232). Mikroglial hücrelerde IL-6 salgılanması ve bunun sonucunda adenozin A<sub>2B</sub> reseptörlerini ve p38'i içeren bir yolağın aracılık ettiği hücre proliferasyonunda bir artış gözlenmiştir, bu nedenle de bu alt tipin proinflamatuvar bir rolü olabileceği düşünülmektedir (233). Adenozin A<sub>2B</sub> reseptörlerinin çeşitli dokulardaki farklı işlevleri ve ağrı patogenezindeki rolleri yeterince

bilinmemektedir. Bundan dolayı, ağrı ve adenosin A<sub>2B</sub> reseptörler arasındaki ilişki üzerine yapılan çalışmalar, selektif ligandların eksikliği nedeniyle sınırlıdır (234).

#### **2.8.1.4. Adenosin A<sub>3</sub> reseptörü**

Adenosin A<sub>3</sub> reseptör alt tipi çeşitli primer hücrelerde, dokularda ve hücre hatlarında yaygın olarak bulunur. Talamus, hipotalamus, hipokampus, korteks ve retinal ganglion hücrelerinin yanı sıra motor sinir terminalleri ile pial ve interserebral arterlerde bulunduğu beyinde düşük seviyeler bildirilmiştir. Adenosin A<sub>3</sub> reseptörleri etkisini adenilat siklazı inhibe edip fosfolipaz C enzimini aktive ederek gösterir. Adenosin A<sub>3</sub> reseptörleri ayrıca mikrogliya ve astrositlerde de eksprese edilir ve bu hücrelerde nöroinflamatuvar yanıtın inhibisyonu analjezik etki indüksiyonu ile ilişkilendirilmiştir (67, 235). Periferik düzeyde, adenosin A<sub>3</sub> reseptörü enterik nöronların yanı sıra epitel hücrelerinde, kolon mukozasında, akciğer parankiminde ve bronşlarda bulunmuştur. Ayrıca, adenosin A<sub>3</sub> reseptörü mast hücreleri, eozinofiller, nötrofiller, monositler, makrofajlar, köpük hücreleri, dendritik hücreler, lenfositler, splenositler, kemik iliği hücreleri, lenf düğümleri, sinoviyositler, kondrositler ve osteoblastlar gibi inflamatuvar hücrelerde geniş bir dağılıma sahiptir ve burada anti-inflamatuvar etkilere aracılık eder (37). Buna ek olarak, adenosin A<sub>3</sub> reseptörü, birçok kanser hücresi ve dokusunda aşırı eksprese edilir ve bu nedenle antitümöral role sahip olabileceği düşünülmektedir (67).

#### **2.8.2. Adenosin reseptör agonist ve antagonistleri**

Adenosin reseptör agonist ve antagonistleri, nöro-modülasyon, immün regülasyon, vasküler fonksiyon ve metabolik kontrol dahil olmak üzere birçok önemli fizyolojik süreçle ilişkilendirilmiştir (65, 66). Hücrel stres sırasında hücre dışı adenosin konsantrasyonu artarak kardiyak ritim ve dolaşımın kontrolü, lipid metabolizması, immün fonksiyonlar, uykunun düzenlenmesi, anjiyogenez, vazodilatasyon ve antiinflamatuvar eylemler gibi birçok fizyolojik eylem üretir (Tablo 2.6) (67-71).

**Tablo 2.6.** Adenozin reseptör agonist ve antagonistlerinin etki mekanizmaları (67-71)

|                                                       | <b>Adenozin A<sub>1</sub> Reseptörü</b>                                                                                                                                                                             | <b>Adenozin A<sub>2A</sub> Reseptörü</b>                                                                                                                                                                                | <b>Adenozin A<sub>2B</sub> Reseptörü</b>                                                               | <b>Adenozin A<sub>3</sub> Reseptörü</b>                                               |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Agonistler</b>                                     | Neladenoson, CPA, CCPA, S (-)ENBA, CVT510, ADCAC                                                                                                                                                                    | Regadenoson, Binadenoson, Apadenoson, CV-1808, UK-432097                                                                                                                                                                | BAY60-6583, 2-hexynyl-NECA (2-N-ethylcarboxamidoadenosine)                                             | 2-Cl-IB-Piclidenoson (CF-101), CF-102, AB-MECA                                        |
| <b>Antagonistler</b>                                  | DPCPX, WRC-0571, PSB-36, SLV320                                                                                                                                                                                     | İstradefilin, Preladenant, PBF-509, CPI-444, tozadenant/SY N115, DT1133, ZM241385, ST1535, İmaradenant (AZD4635),                                                                                                       | MRS1754, PSB603, PSB1115                                                                               | MRE 3008F20, VUF5574, MRS1523                                                         |
| <b>Transdüksiyon Mekanizmaları</b>                    | G <sub>i/o</sub> , ↓cAMP; ↑K <sup>+</sup> , ↓Ca <sup>2+</sup> kanalları, PLA <sub>2</sub> ; Gα16 NF-κB, PLC, PKC, ↑IP3/DAG                                                                                          | G <sub>s/olf</sub> , ↑cAMP                                                                                                                                                                                              | G <sub>s</sub> /↑cAMP; G <sub>q</sub> /PLC, ↑IP3/DAG                                                   | G <sub>i</sub> /↓cAMP; ↑Ca <sup>2+</sup> , ERK1/2, G <sub>q</sub> /PLC, ↑IP3/DAG; PLD |
| <b>Terapötik Roller (Agonistler ve Antagonistler)</b> | <u>AGONİSTLER:</u><br>AV düğüm iletimini inhibe eder ve supraventriküler taşiaritmi.<br><br><u>ANTAGONİSTLER:</u> İnförior miyokard infarktüsü, kardiyak arrest, kardiyak transplant reddi ile ilişkili bradiaritmi | <u>AGONİSTLER:</u><br>Solunum bozuklukları, sepsis, reperfüzyon hasarı, koroner arter vazodilatasyon, tromboz, hipertansiyon, antiinflamatuvar etki.<br><br><u>ANTAGONİSTLER:</u> Parkinson hastalığı, nörodejenerasyon | <u>AGONİSTLER:</u><br>Alerjik reaksiyonlar<br><br><u>ANTAGONİSTLER:</u><br>Astım, pulmoner inflamasyon | <u>AGONİSTLER:</u><br>İskemik önkoşullama<br><br><u>ANTAGONİSTLER:</u> Glokom, astım  |

### 2.8.2.1. Regadenoson

Regadenoson, kalpte yeterli stres oluşturacak kadar egzersiz testine giremeyen hastalarda koroner arter hastalığını tespit eden ve karakterize eden radyonüklit miyokardiyal perfüzyon görüntüleme (MPI) için farmakolojik stres ajanı olarak kullanımı 2008 yılında ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan potent ve selektif adenosin A<sub>2A</sub> reseptörü agonistidir (67, 236). Adenosin A<sub>2A</sub> reseptörleri, lökositlerde, trombositlerde ve vaskülerde büyük ölçüde eksprese edildiğinden antiinflamatuvar, antiagregan ve vazodilatör etkiye aracılık ederler. Regadenoson da etkisini vasküler hücreler üzerinde bulunan ve koroner vazodilatasyonun kontrolünde önemli rolü olan A<sub>2A</sub> adenosin reseptörünün aracılık etmesiyle oluşturur ve koroner stres ajanı olarak görev alır. Regadenosonun bağlanması ile adenosin A<sub>2A</sub> reseptörünün aktivasyonu sonucunda, G<sub>s</sub> protein aracılığı ile AC aktivitesi ve cAMP oluşumunu artırarak PKA'nın fosforilasyonuna ve membran hiperpolarizasyona yol açar. Bu durum ise, koroner arterleri genişleterek hiperemiye ve koroner kan akımının artmasına neden olur (67, 237). Regadenoson için koroner vazodilatasyonun etki başlangıcının yaklaşık 30 sn olduğu bildirilmektedir. Daha spesifik olarak, regadenosonun plazma konsantrasyonu ile zaman arasındaki ilişki üç fazlı olarak incelenmiştir. Koroner vazodilatasyonun ilk fazın yaklaşık 3 dk sürdüğü ve Regadenoson yanıtının başlangıcını gösterdiği; orta fazın, yaklaşık 30 dk süren koroner vazodilatasyonun etki kaybı ile gösterilir. Son fazda plazma Regadenoson konsantrasyonunda bir azalma görülmüştür (237, 238). Renal eliminasyon, 38 litre/saat'lik bir klirens oranı ile Regadenosonun toplam eliminasyonunun %58'inden sorumlu olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, Regadenosonun adenzinden 10 kat daha yüksek bir afiniteyle A<sub>2A</sub> adenosin reseptörüne bağlandığı bildirilmektedir (237).

Yapılan bir çalışmada, adenzinin, A<sub>2A</sub> adenosin reseptörü aktivasyonu yoluyla böbrek hasarında immün hücre fonksiyonlarının önemli bir modülatörü olduğu kanıtlanmıştır. Adenosin A<sub>2A</sub> reseptörü hem böbrek hem de hematopoetik hücrelerde bulunması ve glomerülde yüksek düzeyde ekspresyona sahip olmasının ve hematopoetik hücrelerdeki adenosin A<sub>2A</sub> reseptörlerinin böbreği İ/R hasarından koruduğu gösterilmiştir. Ayrıca, T hücreleri tarafından üretilen adenosin, farelerde böbrek İ/R hasarı modelinde koruyucu etki göstermiştir; bu etki T hücreleri üzerinde CD73 ve adenosin A<sub>2A</sub> reseptörlerinin varlığına bağlanmıştır (67, 239). Buna ek olarak, adenosin A<sub>2A</sub> reseptörünün aktivasyonunun miyokard üzerinde İ/R hasarında azalma sağladığı ve reperfüzyon sonrası mitokondriyal oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (240).

### 2.8.2.2. İstradefilin

İstradefilin, "off" epizodları yaşayan yetişkin Parkinson hastaları için levodopa/karbidopaya ek tedavi olarak önce Japonya otoriteleri tarafından daha sonra da FDA tarafından onaylanmış potent selektif adenozin A<sub>2A</sub> reseptör antagonistidir (241, 242). Parkinson hastalığı, striatum bölgesindeki dopamin salgısının dejenerasyonundan kaynaklanan bir patolojidir ve L-DOPA veya dopamin agonistleri kullanılarak tedavi edilmektedir. Bu bağlamda, adenozin A<sub>2A</sub> reseptör antagonisti kullanılmasının önemi, A<sub>2A</sub> adenozin reseptörü aktivasyonunun D<sub>2</sub> reseptörü (D<sub>2</sub>R) agonistlerinin bağlanma afinitesi üzerindeki inhibitör etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir (67, 243). A<sub>2A</sub> reseptörlerinin nöronal düzeyde indirekt yolda GABAerjik etkiyi tam olarak nasıl modüle ettiği tam olarak anlaşılamamıştır (242). Adenozin A<sub>2A</sub> reseptörleri çoğunlukla striatum, eksternal globus pallidus ve substantia nigra arasındaki indirekt yolda nöronların dış yüzeylerindeki bazal ganglionlara lokalizedir (244). Özellikle D<sub>2</sub>R içeren striatopallidal nöronlarda yüksek bir yoğunluğa sahiptir. Adenozin A<sub>2A</sub> reseptörleri, indirekt yoldan dopaminerjik D<sub>2</sub>R ile lokalize olur ve bunun da adenozin ve dopamin arasında antagonistik etkileşimlere neden olduğu düşünülmektedir (241). A<sub>2A</sub> reseptörleri ve dopamin D<sub>2</sub>R'nin reseptör dimerleri oluşturabileceğine dair kanıtlar vardır, bu da A<sub>2A</sub> adenozin reseptörünün D<sub>2</sub>R reseptörlerinin fonksiyonlarına dahil olduğunu düşündürmektedir. Adenozin A<sub>2A</sub> reseptör aktivasyonu, dopamin agonistlerinin dopaminerjik D<sub>2</sub>R'ye afinitesini azaltır. Bu nedenle, adenozin A<sub>2A</sub> reseptörünün antagonizması, dopaminerjik D<sub>2</sub>R aktivasyonunun arttırılması yoluyla Parkinson hastaları için iyileştirme potansiyeline sahiptir (67, 241, 242, 244).

### 2.8.3. Adenozinin İskemi/Reperfüzyon hasarındaki rolü

Nükleik asitlerin bir yapı taşı ve önemli bir ara metaboliti olarak adenozin; hipoksi, enerji tükenmesi ve doku hasarı koşullarında hücreyel yanıtın düzenlenmesini sağlayan bir anahtar sinyal molekülüdür. Adenozin, fizyolojik koşullarda vücudumuzdaki hücrelerin neredeyse tamamında yaygın olarak üretilse de hipoksi veya enerji tükenmesi durumunda daha fazla üretilir (245). Normal fizyolojik koşullar altında, hücre dışı adenozin seviyeleri 20 ila 300 nM arasındadır, yoğun egzersiz veya düşük atmosferik oksijen seviyeleri (örneğin, yüksek irtifada) gibi aşırı fizyolojik durumlarda düşük mikromolar aralığa ulaşır. Bu durumda, hücre içindeki adenozin konsantrasyonunun düşük olmasına bağlı olarak adenozin hücre içine doğru taşınır. Ancak, iskemi gibi patolojik koşullarda hücre içi adenozin konsantrasyonu yüksek mikromolar seviyelere (30 µM) yükselir ve

adenozinin net taşınma yönü hücre dışına doğru yönelir (67). ATP stres koşulları altında endotel hücreleri, nötrofiller ve glial hücreler gibi hasarlı hücrelerden konneksinler veya panneksinler gibi transmembran protein kanalları yoluyla salınır. Hücre dışı ATP birikimi ile birlikte ATP'yi ADP/AMP'ye dönüştüren ektonükleozit trifosfat difosfohidrolaz (CD39) ve AMP'yi adenozeine dönüştüren ekto-5'-nükleotidaz (CD73) gibi ekto-nükleotidazlar tarafından hücre dışı adenozeine defosforile edilir (64, 67, 246). Hücre dışı adenozein konsantrasyonunu azaltmak için ekto-adenozein deaminasyon (ekto-ADA) yoluyla inozeine dönüştürülür ve inaktif olur ya da ENT'ler yoluyla hücre içine alım meydana gelebilir. Adenozein, hücre içi alımdan sonra, adenozein deaminaz ile inozeine veya adenozein kinaz ile AMP'ye fosforile olarak adenozein <1 s'lik fizyolojik bir yarı ömre sahip olur (64). Enzimatik aktivitesine ek olarak, ekto-ADA ayrıca adenozein reseptörlerine ligand bağlanması da modüle edebilir ve birçok hücre tipinde AR aktivasyonu ile bir sinyal molekülü olarak işlev görebilir. Spesifik olarak, adenozein A<sub>1</sub> adenozein reseptörleri, adenozein A<sub>2A</sub> reseptörleri ve adenozein A<sub>2B</sub> adenozein reseptörleri ekto-ADA için bağlanma bölgelerini temsil eder ve bunlarla etkileşiminin reseptör afinitesini ve sinyalleme arttırdığı bildirilmiştir (64, 247, 248). Fizyolojik koşullar altında, hücre dışında bulunan adenozeinin metabolizasyonunu sağlayan temel mekanizma adenozein kinaz enzimi olsa da iskemi gibi patolojik durum meydana geldiğinde yüksek adenozein konsantrasyonları oluşabilir ve adenozein deaminaz enzimi, adenozein taşıyıcılarının inaktivasyonu ile ilişkili olarak daha önemli hale gelebilir (249). İskemi ile ortaya çıkan hücre hasarına karşı hipoperfüzyon süresinin kısılması ve reperfüzyon sağlanması İ/R hasarının temel mekanizmasını ortaya çıkarır. Bu durum ise, iskemi ile birlikte anaerobik metabolizmanın indüklenmesi ile başlar, bu da ATP üretiminin azalmasına ve iyon değişim kanallarının bozulmasına neden olur. ATP üretiminin durmasına rağmen, ATP'nin kullanılmaya devam edilmesi nedeniyle ATP'den adenozein, inozein ve hipoksantin oluşur. Reperfüzyonda, oksijen akışının yeniden sağlanmasıyla iskemi sırasında oluşan ksantin oksidaz, biriken hipoksantini ksantine dönüştürür ve aşırı serbest oksijen radikali oluşumuna ve lipid peroksidasyonuna neden olarak doku hasarı meydana getirebilir (31, 35).

## 2.9. Nanosüspansiyonlar

Son yıllarda hem ilaç endüstrisinde hem de farmasötik çalışmalarda karşılaşılan en zorlu konulardan biri suda çözünürlüğü düşük ilaç adayları olmuştur (250). Suda çözünürlüğü düşük olan ilaçların doz-cevap doğrusallığının azalabilmesi, uygulama sonrasında ilacın

beklenmedik şekilde çökmesi ile karşılaşılabilmesi, hasta uyumunun azalması ve biyoyararlanımın düşmesi başlıca zorluklardır. Ayrıca etken maddelerin sudaki çözünürlüğünün düşük olması nedeniyle ilacın açlık ve tokluk durumlarında emiliminin değişmesi sonucu varyasyonlar oluşabilmektedir (251). Bu sorunların üstesinden gelmek için son yüzyılda yapılan çalışmalarda oldukça umut verici gelişmeler yaşanmış olup bunlardan en önemlisi nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesidir. Bu yaklaşımların temeli, etken maddenin partikül boyutunun küçültülmesi sonucunda Noyes-Whitney denkleminin bağlı olarak yüzey alanı artırıldığında çözünürlüğün artması, dolayısıyla çözünme ve biyoyararlanımın artmasına dayanmaktadır (252). Çözünürlüğü ve dolayısıyla biyoyararlanımı artırmak için lipozomlar, nanopartiküller, katı lipid nanopartiküller, polimerik miseller, dendrimerler, kuantum noktaları, nanoemülsiyonlar ve nanosüspansiyonlar gibi ilaç taşıyıcı sistemler en yaygın kullanılanlardır (253).

Nanosüspansiyonlar yüzey aktif maddeler tarafından stabilize edilen mikron altı ilaç etken madde partiküllerinin kolloidal dispersiyonlarıdır ve genellikle 1 µm'den küçük katı ilaç etken maddesi partikülleri içeren bifazik kolloidler olarak tanımlanır (254). Nanosüspansiyonların tanımı konusunda literatürde bazı farklılıklar olmasına ve bu çalışmalarda nanosüspansiyon ve nanokristal kelimelerinin birbirinin yerine kullanılmasına rağmen, "yüzey aktif madde veya polimer ile stabilize edilmiş 10-1000 nm arasındaki saf aktif farmasötik bileşenler" ve ayrıca "%100 saf aktif maddeden oluşan, 1 mikrometrenin altında yaklaşık 200-600 nm partikül boyutuna sahip partiküller" olarak nitelendirilmektedir (255, 256).

Nanosüspansiyonlar çoğunlukla sıvı ortamda saf ilaçlardan oluşsa da, stabilizanlar, organik çözücüler, yüzey aktif maddeler, yardımcı yüzey aktif maddeler, kriyoprotektanlar ve diğer bileşenler de kullanılarak hazırlanabilir (257).

Nanosüspansiyonların diğer ilaç dağıtım sistemlerine göre birçok avantajı vardır. Nanosüspansiyonların, hedeflenen bölgeye özgü nanosüspansiyonun yüzey modifikasyonu imkanı, etken maddenin dissolüsyon hızı ve çözünürlüğünde artış, geliştirilmiş biyolojik performans, çeşitli uygulama yolları imkanı, subkutan/intramüsküler uygulama durumunda daha az doku irritasyonunu azaltması, düşük çözünürlüğe sahip etken maddelerin formülasyonu için de uygulanabilir olması, düşük maliyetli üretim ve ölçek büyütme uygun olması gibi avantajlara sahiptir (258).



Fakat fiziksel dayanıksızlık ve stabilite sorunları, çökme ve benzeri sorunlar ortaya çıkabilmekle birlikte kriyoprotektan gibi koruyucu maddelerin partikül büyüklüğünü önleme açısından yetersiz gelebilir. Ayrıca, nanosüspansiyonlar için kullanılan yüzey aktif maddelerden kaynaklı istenmeyen etkiler görülebilir (259).

Nanosüspansiyon formu hazırlamanın amacı, hedeflenen dokularda daha yüksek ilaç absorpsiyonu elde etmek için partikül boyutunu küçülterek ve ilaç partiküllerinin yüzey alanını artırarak ilacın çözünürlüğünü arttırmaktır. Nanosüspansiyonlar, ilaç çözünürlüğünü iyileştirmekle birlikte ilacın farmakokinetiğini de değiştirir. Bunun dışında, ilaç güvenliğini ve etkinliğini artırır. Nanosüspansiyon formunun diğer faydaları arasında suda çözünmeyen ilaçların emiliminin artması, hedeflenen dokuda istenilen doz konsantrasyonunun sağlanması ve yüksek fiziksel/kimyasal stabiliteye sahip olması sayılabilir (260-262).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Etik Kurul onayı

Çalışma protokolü, Gaziantep Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 08.09.2022 tarihli 278 sayılı karar doğrultusunda onay almıştır. Sıçanlar üzerinde yapılan çalışma etik kurallara uygun olarak Eylül 2022 tarihinde Gaziantep Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nde (GAÜNDAM) gerçekleştirildi.

#### 3.2. Deneysel gruplar ve cerrahi prosedür

Bu çalışmada, her bir grupta 160-240 g ağırlığında toplam 80 adet Wistar albino dişi sıçan kullanıldı. Her bir grupta 8 sıçan olmak üzere toplam 10 gruba ayrıldı. Sıçanlar GAÜNDAM'dan temin edilmiş olup merkezde kontrollü olarak sabit oda sıcaklığında ve nem ortamında ortamda 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ortamda tutuldular (Resim 3.1). Sıçanlar, stres olmadan normal laboratuvar koşulları altında deney gününe kadar standart diyet ve su ile ad libitum beslendiler.



**Resim 3.1.** Paslanmaz çelik kafeste tutulan 160-240 g ağırlığında Wistar albino dişi sıçanlar

Tüm hayvanlar için, cerrahi işlem öncesi aynı hazırlık işlemi gerçekleştirildi. Bu doğrultuda, işlemlere başlamadan önce, çalışma yapılacak hayvan tartıldı ve intraperitoneal (İP) yoldan 100 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketasol %10, Richter Pharma, Avusturya) ve 10 mg/kg ksilazin hidroklorür (Xylazinbio %2, Bioveta, Çek Cumhuriyeti) anestezisi uygulandı.

Çalışmanın henüz başlangıç aşamasında hayvanlar tartılarak randomizasyonu yapıldı ve her biri sekiz hayvandan oluşan on gruba ayrıldı. Tüm hayvanlar anestezisi uygulaması sonrası operasyon masasında supin pozisyonunda sabitlenerek kesi yapılan batin derisinin tıraşı yapılmış ve %10 povidon iyot (Ficomed, Halıcı Sağlık, Türkiye) ile temizlendikten sonra cerrahi örtü ile örtülerek aseptik ortamda çalışılmıştır. Ardından abdomen 2 cm'lik alt orta hat vertikal insizyonu ile açılıp overe ulaşılmıştır. Regadenoson, MedChemExpress (NJ, ABD) firmasından ve istradefilin abcr GmbH (Karlsruhe, Almanya) firmasından satın alınmıştır.

Grup 1 (Sham grubu, n=8): İP salin ve DMSO (Regadenoson ve İstradefilin çözücüsü) uygulandı. Anestezisi altında insizyon işlemi gerçekleştirildi fakat bu gruptaki sıçanlara over İ/R uygulanmadı. Bu grupta bazal değerler elde etmek amacıyla işlemler uygulamadan laparotomi yapılarak sol over görüldükten sonra insizyon ile ayrılmış olan batin derisi 3/0 ipek iplik ile kapatıldı. Diğer gruplarla aynı sürede fakat işlem yapılmayan ve bekleme süresi boyunca batin derisi kapalı tutulan bu gruptaki hayvanlara deney sonunda anestezisi altında intrakardiyak kan alınarak cerrahi sırasında eksanguinasyonla ötenazi yapıldı. Bilateral ooferektomi uygulandı.

Grup 2 (İ/R grubu, n=8): Salin ve DMSO intraperitoneal olarak uygulandı. Anestezisi altında laparotomi sonrası sol over gözlemlendikten sonra iskemik koşullar elde etmek amacıyla sol overin damarları baş düğüm stili kullanılarak 2 saat süreyle çift taraflı atravmatik ipek iplik ile sonrasında geri çözülmeye elverişli olacak biçimde bağlanarak tek taraflı (sol) tam over iskemisi modeli elde edildi (Resim 3.2). Ardından, batin içi kanamanın olmadığını gözlemleyerek insizyon ile ayrılmış olan batin derisi 3/0 ipek iplik ile kapatıldı. Sıçanların işlemler esnasında solunum hareketleri takip edildi ve vücut sıcaklığının korunması sağlandı. Daha sonra ipek iplikler açılarak 2 saat boyunca reperfüzyon sağlandı. Deney sonunda anestezisi altında intrakardiyak kan alınarak cerrahi sırasında eksanguinasyonla ötenazi yapıldı. Bilateral ooferektomi uygulandı.



**Resim 3.2.** Tek taraflı (sol) tam over iskemisi modeli oluşturma

Grup 3 (İ/R + Etken madde içermeyen nanotaşıyıcı, n=8): Bu grupta, etken madde içermeyen nanotaşıyıcı İP olarak iskemiden 1 saat önce uygulandı. Anestezi altında laparotomi sonrası sol over gözlendikten sonra iskemik koşullar elde etmek amacıyla sol overin damarları baş düğüm stili kullanılarak 2 saat süreyle çift taraflı atravmatik ipek iplik ile sonrasında geri çözülmeye elverişli olacak biçimde bağlanarak tek taraflı (sol) tam over iskemisi modeli elde edildi. Ardından, batın içi kanamanın olmadığını gözlemleyerek insizyon ile ayrılmış olan batın derisi 3/0 ipek iplik ile kapatıldı. Sıçanlar işlemler esnasında solunum hareketleri takip edildi ve vücut sıcaklığı korunması sağlandı. Daha sonra ipek iplikler açılarak 2 saat boyunca reperfüzyon sağlandı. Deney sonunda anestezi altında intrakardiyak kan alınarak cerrahi sırasında eksanguinasyonla ötenazi yapıldı. Bilateral ooforektomi uygulandı.

Grup 4 (İ/R grubu + Regadenoson (3 µg/kg), n=8): Bu grupta, Regadenoson (3 µg/kg) İP olarak iskemiden 1 saat önce uygulandı. Anestezi altında laparotomi sonrası sol over gözlendikten sonra iskemik koşullar elde etmek amacıyla sol overin damarları baş düğüm stili kullanılarak 2 saat süreyle çift taraflı atravmatik ipek iplik ile sonrasında geri çözülmeye elverişli olacak biçimde bağlanarak tek taraflı (sol) tam over iskemisi modeli elde edildi. Ardından, batın içi kanamanın olmadığını gözlemleyerek insizyon ile ayrılmış olan batın derisi 3/0 ipek iplik ile kapatıldı. Sıçanlar işlemler esnasında solunum hareketleri takip edildi ve vücut sıcaklığı korunmasını sağlandı. Daha sonra ipek iplikler açılarak 2 saat boyunca reperfüzyon sağlandı. Deney sonunda anestezi altında intrakardiyak kan alınarak cerrahi sırasında eksanguinasyonla ötenazi yapıldı. Bilateral ooferektomi uygulandı.

Grup 5 (İ/R + Regadenoson (30 µg/kg), n=8): Bu grupta, Regadenoson (30 µg/kg) İP olarak iskemiden 1 saat önce uygulandı. Anestezi altında laparotomi sonrası sol over gözlendikten sonra iskemik koşullar elde etmek amacıyla sol overin damarları baş düğüm stili kullanılarak 2 saat süreyle çift taraflı atravmatik ipek iplik ile sonrasında geri çözülmeye elverişli olacak biçimde bağlanarak tek taraflı (sol) tam over iskemisi modeli elde edildi. Ardından, batın içi kanamanın olmadığını gözlemleyerek insizyon ile ayrılmış olan batın derisi 3/0 ipek iplik ile kapatıldı. Sıçanlar işlemler esnasında solunum hareketleri takip edildi ve vücut sıcaklığı korunmasını sağlandı. Daha sonra ipek iplikler açılarak 2 saat boyunca reperfüzyon sağlandı. Deney sonunda anestezi altında intrakardiyak kan alınarak cerrahi sırasında eksanguinasyonla ötenazi yapıldı. Bilateral ooferektomi uygulandı.

Grup 6 (İ/R + İstradefilin (0.3 mg/kg), n=8): Bu grupta, İstradefilin (0.3 mg/kg) İP olarak iskemiden 1 saat önce uygulandı. Anestezi altında laparotomi sonrası sol over gözlendikten sonra iskemik koşullar elde etmek amacıyla sol overin damarları baş düğüm stili kullanılarak 2 saat süreyle çift taraflı atravmatik ipek iplik ile sonrasında geri çözülmeye elverişli olacak biçimde bağlanarak tek taraflı (sol) tam over iskemisi modeli elde edildi. Ardından, batın içi kanamanın olmadığını gözlemleyerek insizyon ile ayrılmış olan batın derisi 3/0 ipek iplik ile kapatıldı. Sıçanlar işlemler esnasında solunum hareketleri takip edildi ve vücut sıcaklığı korunmasını sağlandı. Daha sonra ipek iplikler açılarak 2 saat boyunca reperfüzyon sağlandı. Deney sonunda anestezi altında

intrakardiyak kan alınarak cerrahi sırasında eksanguinasyonla ötenazi yapıldı. Bilateral ooferektomi uygulandı.

Grup 7 (İ/R + İstradefilin (3 mg/kg), n=8): Bu grupta, İstradefilin (3 mg/kg) İP olarak iskemiden 1 saat önce uygulandı. Anestezi altında laparotomi sonrası sol over gözlendikten sonra iskemik koşullar elde etmek amacıyla sol overin damarları baş düğüm stili kullanılarak 2 saat süreyle çift taraflı atravmatik ipek iplik ile sonrasında geri çözülmeye elverişli olacak biçimde bağlanarak tek taraflı (sol) tam over iskemisi modeli elde edildi. Ardından, batın içi kanamanın olmadığını gözlemleyerek insizyon ile ayrılmış olan batın derisi 3/0 ipek iplik ile kapatıldı. Sıçanlar işlemler esnasında solunum hareketleri takip edildi ve vücut sıcaklığı korunmasını sağlandı. Daha sonra ipek iplikler açılarak 2 saat boyunca reperfüzyon sağlandı. Deney sonunda anestezi altında intrakardiyak kan alınarak cerrahi sırasında eksanguinasyonla ötenazi yapıldı. Bilateral ooferektomi uygulandı.

Grup 8 (İ/R + Nanotaşıyıcı içinde İstradefilin (3 mg/kg), n=8): Nanotaşıyıcı içinde İstradefilin (3 mg/kg) İP olarak iskemiden 1 saat önce uygulandı. Anestezi altında laparotomi sonrası sol over gözlendikten sonra iskemik koşullar elde etmek amacıyla sol overin damarları baş düğüm stili kullanılarak 2 saat süreyle çift taraflı atravmatik ipek iplik ile sonrasında geri çözülmeye elverişli olacak biçimde bağlanarak tek taraflı (sol) tam over iskemisi modeli elde edildi. Ardından, batın içi kanamanın olmadığını gözlemleyerek insizyon ile ayrılmış olan batın derisi 3/0 ipek iplik ile kapatıldı. Sıçanlar işlemler esnasında solunum hareketleri takip edildi ve vücut sıcaklığı korunmasını sağlandı. Daha sonra ipek iplikler açılarak 2 saat boyunca reperfüzyon sağlandı. Deney sonunda anestezi altında intrakardiyak kan alınarak cerrahi sırasında eksanguinasyonla ötenazi yapıldı. Bilateral ooferektomi uygulandı.

Grup 9 (İ/R + İstradefilin (3 mg/kg) + Regadenoson (30 µg/kg), n=8): Bu grupta, İstradefilin (3 mg/kg), Regadenoson (30 µg/kg)'dan İP olarak 10 dk önce uygulandı. Ardından, 1 saatlik bekleme süresi sonrasında anestezi altında laparotomi yapıldı ve sol over gözlendikten sonra iskemik koşullar elde etmek amacıyla sol overin damarları baş düğüm stili kullanılarak 2 saat süreyle çift taraflı atravmatik ipek iplik ile sonrasında geri çözülmeye elverişli olacak biçimde bağlanarak tek taraflı (sol) tam over iskemisi modeli elde edildi. Ardından, batın içi kanamanın olmadığını gözlemleyerek insizyon ile ayrılmış

olan batin derisi 3/0 ipek iplik ile kapatıldı. Sıçanlar işlemler esnasında solunum hareketleri takip edildi ve vücut sıcaklığı korunmasını sağlandı. Daha sonra ipek iplikler açılarak 2 saat boyunca reperfüzyon sağlandı. Deney sonunda anestezi altında intrakardiyak kan alınarak cerrahi sırasında eksanguinasyonla ötenazi yapıldı. Bilateral ooferektomi uygulandı.

Grup 10 (İ/R + Nanotaşıyıcı içinde İstradefilin (3 mg/kg) + Regadenoson (30 µg/kg), n=8): Bu grupta, Nanotaşıyıcı içinde İstradefilin (3 mg/kg), Regadenoson (30 µg/kg)'dan 10 dk önce İP olarak uygulandı. Ardından, 1 saatlik bekleme süresi sonrasında anestezi altında laparotomi yapıldı ve sol over gözlendikten sonra iskemik koşullar elde etmek amacıyla sol overin damarları baş düğüm stili kullanılarak 2 saat süreyle çift taraflı atravmatik ipek iplik ile sonrasında geri çözülmeye elverişli olacak biçimde bağlanarak tek taraflı (sol) tam over iskemisi modeli elde edildi. Ardından, batin içi kanamanın olmadığını gözlemleyerek insizyon ile ayrılmış olan batin derisi 3/0 ipek iplik ile kapatıldı. Sıçanlar işlemler esnasında ve iskemik halde solunum hareketleri takip edildi ve vücut sıcaklığı korunmasını sağlandı. Daha sonra ipek iplikler açılarak 2 saat boyunca reperfüzyon sağlandı. Deney sonunda anestezi altında intrakardiyak kan alınarak cerrahi sırasında eksanguinasyonla ötenazi yapıldı. Bilateral ooferektomi uygulandı.

Regadenoson (3-30 µg/kg) ve İstradefilin (0.3-3 mg/kg) İP olarak iskemiden 1 saat önce uygulandı. Kombinasyon deneylerinde (Grup 9 ve 10) İstradefilin, Regadenoson'dan 10 dk önce uygulandı (263).

Tüm işlemler genel anestezi altında ve steril koşullarda gerçekleştirildi. Hayvanlarla çalışma esnasında vücut sıcaklığını korumak amacıyla steril cerrahi örtü ve üstten bir ışık lambası kullanıldı. Bekleme süreleri boyunca abdominal bölgedeki insizyon hattı 3/0 ipek sütür ile kapatıldı. Hayvanları hipotermiden korumak için ısıtıcı plaka (ATC-2000, World Precision Instruments, ABD) ve sıcak beyaz ışıktan faydalanıldı. Hayvanların refleks yanıtları periyodik olarak değerlendirildi ve gerek duyulduğunda hayvanların anestezi derinliğini sabit olarak tutmak amacıyla 40 mg/kg ketamin (Ketasol %10, Richter Pharma, Avusturya) idame dozu verildi.

Tüm sıçanlardan işlemin sonunda over doku örnekleri ve intrakardiyak yolla kan örnekleri alınarak biyokimyasal analizler için ayrılmıştır. Ayrıca alınan sol overin bir



kısmı biyokimyasal incelemeler için sıvı azot ile muamele edildikten sonra -150°C’de saklandı. Kalan kısmı histopatolojik inceleme için %10 formaldehit solüsyona koyulup ayrılmıştır. Her çalışmanın sonunda, sıçanların anestezi altında iken kan ve doku örnekleri alındıktan sonra sakrifikasyonları eksanguinasyon yöntemiyle gerçekleştirildi.



**Resim 3.3.** İntrakardiyak kan alımı

### **3.3. Biyokimyasal analizler**

#### **3.3.1. Kan örneklerinde yapılan analizler**

Sıçanlardan deney sonunda MDA, tiyol/disülfid, NO ve 3-NT için intrakardiyak yolla kan örnekleri toplandı. Toplanan kan örnekleri, EDTA’lı tüplerde 20 dk süreyle beklettikten sonra serum elde etmek amacıyla +4 °C’de 10 dk boyunca 1500 rpm devirde santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra, serumlar küçük hacimlere ayrılarak tüplere aktarıldı ve -80 °C’de dondurularak saklandı. Tüm bu işlemler kan örneklerinin alınmasını takiben 30 dk içerisinde yapıldı.

##### **3.3.1.1. Serum MDA ölçümü**

Çalışmada, serum MDA seviyeleri, ticari olarak temin edilebilen bir ELISA kiti (Kat. No. E0156Ra, BT LAB, Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, Çin) kullanılarak üretici



firmanın belirlediği protokole göre ölçüldü. Örnekler, spektrofotometrik yöntem ile mikropłaka okuyucu (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, ABD) kullanılarak 450 nm'lik absorbansta okundu (Resim 3.4).



**Resim 3.4.** Spektrofotometre

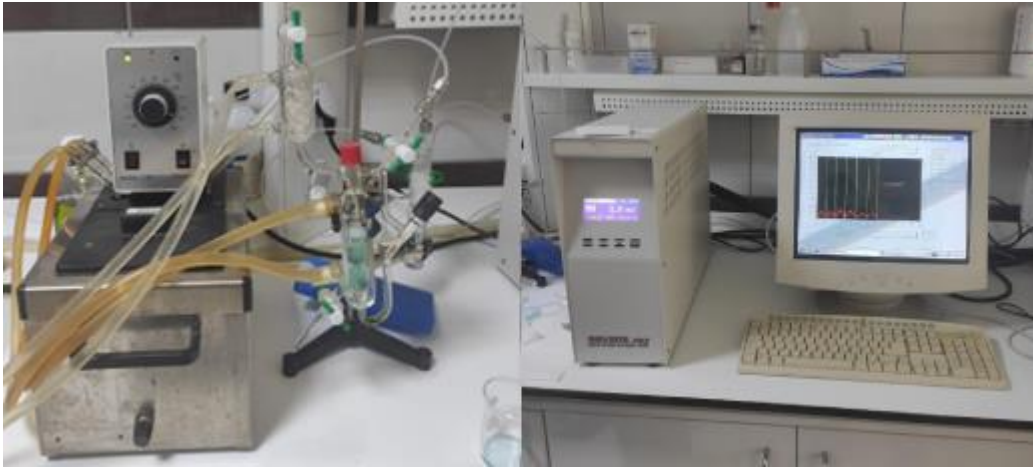
#### **3.3.1.2. Serum 3-NT ölçümü**

Çalışmada, serum 3-NT seviyeleri, ticari olarak temin edilebilen bir ELISA kiti (Kat.No. E0019Ra, BT LAB, Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, Çin) kullanılarak üretici firmanın belirlediği protokole göre ölçüldü. Örnekler, spektrofotometrik yöntem ile mikropłaka okuyucu (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, ABD) kullanılarak 450 nm'lik absorbansta okundu.

#### **3.3.1.3. Serum NO ölçümü**

Nitrik oksite ait birincil oksidasyon ürünleri nitrat ve nitrit olup plazmadaki kararlı nitrat/nitrit düzeyleri genellikle NO üretimi için bir indeks olarak kabul edilmektedir (264). Bu çalışmada kullanılan teknik, NO/ozon kemilüminesans olarak adlandırılır. Bu teknik, nitrat/nitritin NO'ya geri dönüştürülmesini sağlar ve NO düzeylerini gaz formunda ölçmektedir. Çalışmada, serum numuneleri deproteinize etmek için mutlak etanol ile 1:2 oranında karıştırıldı. Deproteinizasyon işlemi sonrasında 0°C'de 30 dk boyunca inkübe edildi. Daha sonra, numuneler 5 dk boyunca 20,800 g devirde santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonucunda oluşan pelletler atıldıktan sonra elde edilen süpernatant, NO/ozon

kemilüminesans tekniği ile NO seviyelerini ölçmede kullanıldı. Pelletler atıldı ve süpernatant, NO/ozon kemilüminesans tekniği (Model 280i NOA, Sievers Instruments, Boulder, CO, ABD) ile NO seviyelerini ölçmek için kullanıldı. Enjekte edilen numuneler, nitrat, nitrit ve S-nitrozo bileşiklerini NO'ya dönüştürebilen indirgeyici ajan (95°C'de 1 M HCl içinde çözülmüş) vanadyum III klorür ile reaksiyona sokuldu. Bu reaksiyon sonucunda ortaya çıkan ve son ürün olan NO'nun, saf azot altında ölçümü yapıldı. Numuneye ait NO konsantrasyonu, standart eğri (sodyum nitrat ile elde edilmiş olan) ile karşılaştırılmış ve hesaplama gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerin analizi NOAnalysis™ yazılımı (3.21 sürümü, Sievers, Boulder, CO, ABD) kullanılarak yapılmıştır (Resim 3.5).



**Resim 3.5.** Kemilüminesans tekniği ile NO tayini

#### **3.3.1.4. Serum tiyol-disülfid parametrelerinin ölçümü**

Çalışmada, serum tiyol/disülfid düzeyleri, ticari kitler (Rel Assay Diagnostics, Mega Tıp Ltd., Gaziantep, Türkiye) kullanılarak üreticinin belirlediği protokole göre ölçüldü. Örneklerin analizi Erel ve Neselioğlu tarafından geliştirilen spektrofotometrik yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir (265). Bu yöntem ile mikrolaka okuyucu (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, ABD) kullanılarak 450 nm'lik absorbansta okunarak analiz edilmiştir. Serum doğal tiyol (yalnızca indirgenmiş olan tiyoller yansıtır, -SH) düzeyleri ve total tiyol düzeylerinin (-SH ile birlikte -S-S- de içermektedir) ölçümü yapılarak doğal ve total tiyollerin arasındaki farkın yarısı dinamik disülfid (-S-S-) içeriği olarak kabul edilmiştir.

### **3.3.2. Doku örneklerinde yapılan analizler**

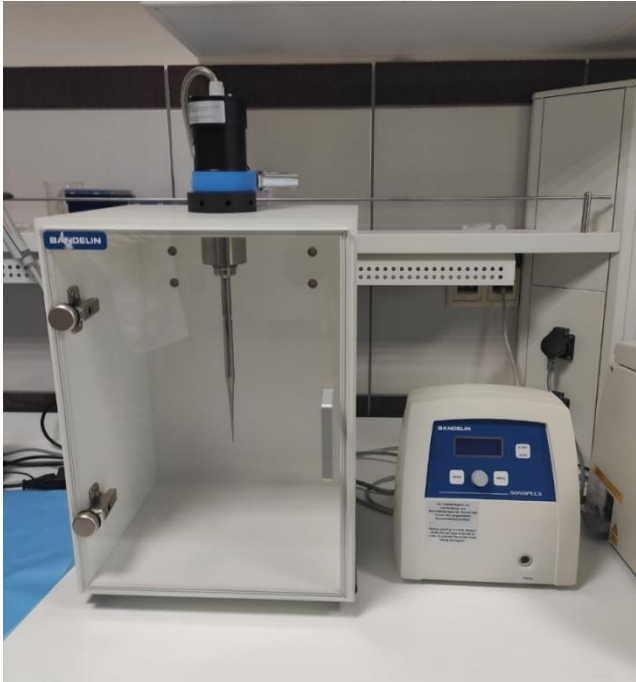
Yapılan deney sonunda sıçanlardan 3-NT, tiyol/disülfit, NO, SOD1 ve protein analizleri için sol over doku örnekleri alındı. Alınan örneklerin bir kısmı -150°C’de muhafaza edildi ve kalan kısmı ise histopatolojik inceleme amacıyla %10 formaldehit içeren kaplarda bekletildi.

#### **3.3.2.1. Doku homojenatlarının hazırlanması**

Çalışma sonunda -150°C’de muhafaza edilen over dokuları aşamalı olarak çözündürülerek soğuk fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile yıkandı. Dokular, kan hücrelerinden temizlendikten sonra 2 cc’lik cryovial tüpe alınarak tüpler buzun üzerine konuldu. Dokular, kit protokolüne uygun olarak 1 g dokuya 9 mL PBS ve üzerine proteaz inhibitörü eklendi. Ardından, bilye konuldu ve buzdolabında -20 °C’de soğutuldu. Soğutma işleminden sonra doku homojenizatöründe (Tissue Lyser LT, Qiagen GmbH, Almanya) 3 dk boyunca işleme tabi tutuldu (Resim 3.5). İşlem sonunda buzdolabında soğutulduktan sonra bilyeli homojenizasyon işlemi tekrarlandı. Bu işlemin ardından vorteksleme yapıldı (BR-2000 Vortexer, Bio-Rad, Hercules, CA, ABD). Daha sonra ise soğumaya bırakıldı. Ardından, 25-30 sn boyunca ultrasonik homojenizatör (Sonopuls, Bandelin, Almanya) cihazında homojenizasyon işlemine tabi tutuldu (Resim 3.6). Vorteksleme işlemine tekrar tabi tutulduktan sonra 10 dakika boyunca 5000 g devirde santrifüj edilerek süpernatantlar toplandı. Çalışmanın aşamaları, +4 °C’de (buz üzerinde) gerçekleştirildi fakat cihazda yapılan işlemlere maruz kaldığı sürelerin sonunda 5 dk boyunca -20°C’de soğumaya bırakıldı. Tüm işlemlerin sonunda, doku lizatları analizi yapılana kadar -80°C’ye konulup bekletildi.



**Resim 3.6.** Doku homojenizatörü



**Resim 3.7.** Ultrasonik homojenizatör

#### **3.3.2.2. Doku SOD1 ölçümü**

Çalışmada, doku homojenatlarından elde edilen doku lizatlarında SOD1 seviyeleri, ticari olarak temin edilebilen bir ELISA kiti (Kat.No. ER0332, FineTest, Wuhan Fine Biotech Co., Ltd, Wuhan, Hubei, Çin) kullanılarak üretici firmanın belirlediği protokole göre

ölçüldü. Örnekler, spektrofotometrik yöntem ile mikrolaka okuyucu (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, ABD) kullanılarak 450 nm'lik absorbansta okundu.

#### **3.3.2.3. Doku 3-NT ölçümü**

Çalışmada, doku homojenatlarından elde edilen doku lizatlarında 3-NT seviyeleri, ticari olarak temin edilebilen bir ELISA kiti (Kat. No. E0019Ra, BT LAB, Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, Çin) kullanılarak üretici firmanın belirlediği protokole göre ölçüldü. Örnekler, spektrofotometrik yöntem ile mikrolaka okuyucu (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, ABD) kullanılarak 450 nm'lik absorbansta okundu.

#### **3.3.2.4. Doku NO analizi**

Çalışmada, doku homojenatlarından elde edilen süpernatant NO seviyelerine bakıldı. NO'ya ait birincil oksidasyon ürünleri nitrat ve nitrit olup plazmadaki kararlı nitrat/nitrit düzeyleri genellikle NO üretimi için bir indeks olarak kabul edilmektedir (264). Bu çalışmada serum NO ölçümü bölümünde belirtilen NO/ozon kemilüminesans yöntemiyle homojenize edilen dokularda NO düzeyi ölçülmüştür.

#### **3.3.2.5. Doku tiyol-disülfid parametrelerinin ölçümü**

Çalışmada, doku homojenatlarından elde edilen doku lizatlarında tiyol/disülfid düzeyleri, ticari kitler (Rel Assay Diagnostics, Mega Tıp Ltd., Gaziantep, Türkiye) kullanılarak üreticinin belirlediği protokole göre ölçüldü. Doku lizatlarının analizi Erel ve Neselioğlu tarafından geliştirilen spektrofotometrik yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir (265). Bu yöntem ile mikrolaka okuyucu (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, ABD) kullanılarak 450 nm'lik absorbansta okunarak analiz edilmiştir. Doku doğal tiyol (yalnızca indirgenmiş olan tiyoller yansıtır, -SH) düzeyleri ile total tiyol düzeyleri (-SH ile birlikte -S-S- de içermektedir) ölçülerek doğal ve total tiyoller arasındaki farkın yarısı ise dinamik disülfid (-S-S-) içeriği olarak kabul edilmiştir.

#### **3.3.2.6. Doku protein ölçümü**

Doku homojenatlarından elde edilen doku lizatlarında protein ölçümü, mikro hacimli plaka (Epoch Take3 micro-volume plate, Biotek, ABD) kullanarak mikrolaka okuyucu

spektrofotometre cihazı (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek Instruments, ABD) ile 260 ve 280 nm dalga boylarında gerçekleştirilmiştir.

### **3.4. Nanosüspansiyonların hazırlanması**

Nanosüspansiyon formülasyonlarının hazırlanmasında, iki farklı beher içerisine 5 mL etanol ve içerisine 650 mg Eudragit RS 100 (Evonik Nutrition & Care GmbH, Almanya) ilave edilerek oda sıcaklığında çözündürülmüştür. Çözünme işlemi gerçekleştirildikten sonra hazırlanan beherlerden birine (1. beher) 0.5 mg/mL İstradefilin ve 5 mL DMSO eklendi. Diğer beher (2.beher) ise boş formülasyon olarak bırakıldı. Hazırlanan 1. ve 2. beherdeki çözeltiler % 0.02 Tween 80 içeren buz banyosundaki 100 mL distile su içerisine enjektör yardımıyla damlalar halinde enjekte edildi. Damlaların eklenmesi sırasında 1000 rpm hızla karıştırılması sağlandı. Oluşan nanoformülasyonlar, düşük sıcaklıkta bir süre daha bekletildi. Organik çözücünün aşamalı şekilde buharlaşması polimerin in situ çökmesine neden olarak mikro ve nano damlacıklara dönüşüp matris tipi nanopartiküller oluşmasını sağladı.

#### **3.4.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi**

İstradefilin yüklü nanosüspansiyonlar seyreltikten sonra kurutulmuş ve kaplayıcı cihaz (SC7620 Mini Sputter Coater / Glow Discharge System, Emitech/Quorum, İngiltere) yardımıyla 150 sn boyunca altın-paladyum (Au-Pd) ile kaplanması sağlanmıştır (Resim 3.8). Ardından, numunenin yüzeyinden yüksek çözünürlüklü görüntülerin çekilmesi taramalı elektron mikroskobu (SEM) cihazı (GeminiSEM 300, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Corp., Almanya) ile Uluğ Bey Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (ULUTEM)'de yapılmıştır (Resim 3.9).



**Resim 3.8.** Altın-Paladyum kaplama cihazı



**Resim 3.9.** Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

#### **3.4.2. Partikül boyutu ölçümü**

Nanosüspansiyon boyutları, SEM analizinden elde edilen nanosüspansiyonların görüntüleri kullanılarak Image J (1.54d) programı ile incelenmiştir (266, 267).

#### **3.5. Histopatolojik analizler**

Histopatolojik inceleme için sıçanlardan elde edilen over dokuları numuneleri %10'luk formaldehit içinde fiks edilmiştir. Daha sonra, solüsyondan çıkarılmış olan over dokuları parafin bloklara gömüldü. Parafine gömülü over dokusu örnekleri hematoksilin-eozin

(H-E) ile boyanmıştır. Ölçümler için kesitler ışık mikroskobu (Nikon Eclipse E600; Nikon, Tokyo, Japonya) altında x200 büyütme ile analiz edilmiş ve görüntü kaydedilmiştir.

Histolojik kesitler interstisyel ödem, vasküler konjesyon, hemoraji ve PMN infiltrasyonu açısından değerlendirildi. Her örnek, Eser ve ark. (268) tarafından yayınlanan skorumla kullanılarak 1 ile 4 arasında değişen ölçekte (1, yok; 2, hafif; 3, orta; 4, şiddetli) skorlanmıştır: Skor 1, hafif ödem/hafif vasküler konjesyon/ hemoraji yok/PMN yok; Skor 2, orta ödem/orta vasküler konjesyon/ hemoraji yok/PMN yok; Skor 3, şiddetli ödem/şiddetli vasküler konjesyon/hafif hemoraji/hafif PMN; ve Skor 4, şiddetli ödem/şiddetli vasküler konjesyon/şiddetli hemoraji/şiddetli PMN (Tablo 3.1).

**Tablo 3.1.** Over dokusundan elde edilen örneklerin histopatolojik bulgularının şiddetinin değerlendirilmesinde kullanılan skorumla (268)

| Skor | Hasar                                                                                               |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1    | Hafif interstisyel ödem/Hafif vasküler konjesyon/Hemoraji yok/PMN infiltrasyonu yok                 |
| 2    | Orta interstisyel ödem/Orta vasküler konjesyon/Vasküler hemoraji yok/PMN infiltrasyonu yok          |
| 3    | Şiddetli interstisyel ödem/Şiddetli vasküler konjesyon/Hafif hemoraji/Hafif PMN infiltrasyonu       |
| 4    | Şiddetli interstisyel ödem/Şiddetli vasküler konjesyon/Şiddetli hemoraji/Şiddetli PMN infiltrasyonu |

### 3.6. İstatistiksel analiz

Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma (S.D.), standart hata (S.E.M.) veya yüzde olarak ifade edildi. Çalışmadan elde edilen verilerin değerlendirilmesi amacıyla, istatistiksel analizlerden SPSS paket programı (SPSS Inc., versiyon 22.0, Chicago, IL, ABD) ve GraphPad InStat versiyon 3.05 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, ABD) programlarından yararlanıldı. Değişkenlerin normal dağılıma sahip olup olmadığını incelemek için Kolmogorov-Smirnov normalite testi kullanıldı ve tüm değişkenlerin normal dağılıma uyduğu belirlendi ( $P>0.1$ ). İki grup ortalamalarını karşılaştırmak için



eşleşmemiş Student t-testi kullanıldı, yüzdeleri karşılaştırmak için ise Ki-kare testi uygulandı. İki'den çok olan grup ortalamalarının karşılaştırılması için ANOVA analizi gerçekleştirildi ve daha sonra da Student-Newman-Keuls ya da Dunnett testinden faydalandı. Histopatolojik deneylerde gruplar arasında skorlarının karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi uygulanmış olup ardından da Dunn testinden yararlanıldı. Korelasyon analizi, Pearson korelasyon testi kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm istatistik testlerinde, P değeri iki yönlü olup 0.05'ten küçük P değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

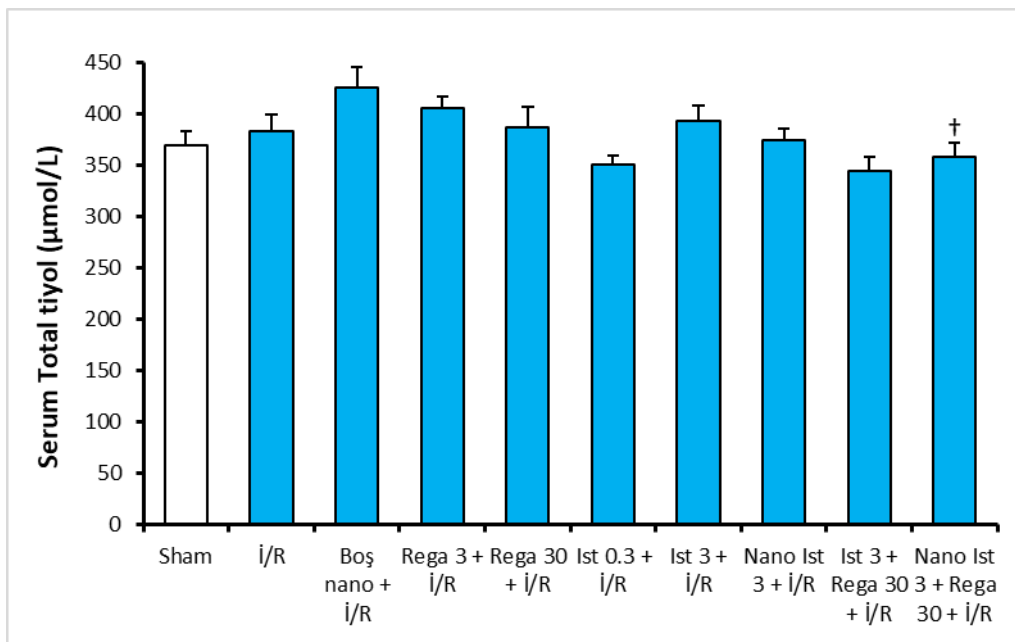


## 4. BULGULAR

### 4.1. Biyokimyasal analiz bulguları

#### 4.1.1. Serum tiyol-disülfid parametrelerinin bulguları

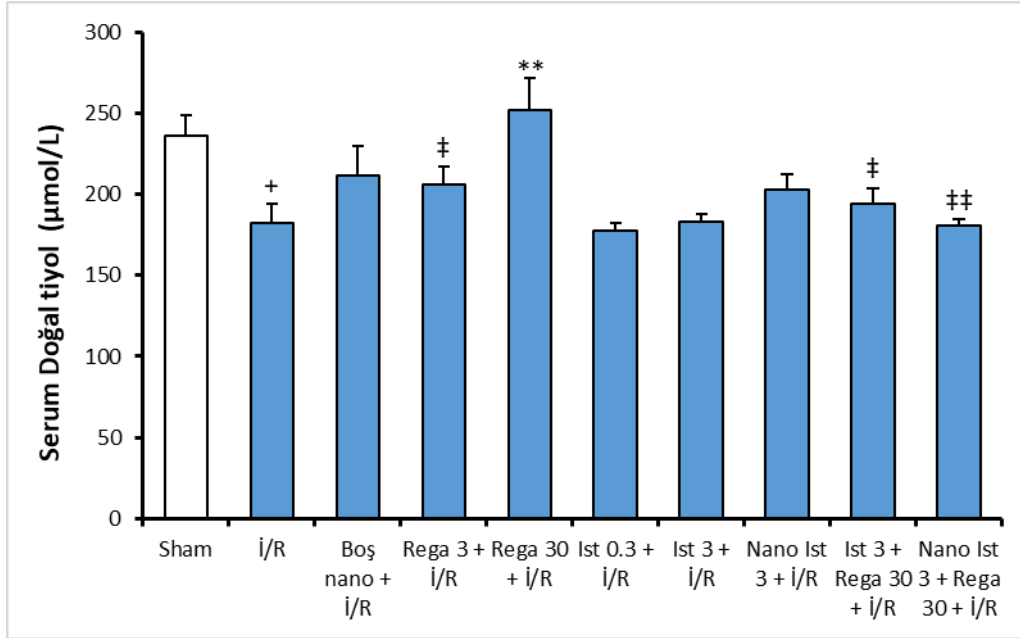
Grupların serum total tiyol düzeyleri Şekil 4.1’de sunulmuştur. Serum total tiyol düzeyi, nanotaşıyıcı içinde İstradefilin (3 mg/kg) ardından da Regadenoson (30 µg/kg) verilerek İ/R uygulanan grupta (Nano Ist 3 + Rega 30 + İ/R) boş nanoformülasyon verilerek İ/R uygulanan gruba (Boş nano + İ/R) göre daha düşüktür ve bu ilişki istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.05$ ). Diğer gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiştir ( $P > 0.05$ ).



**Şekil 4.1.** Grupların serum total tiyol düzeyleri

Sonuçlar ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Her grup için  $n=8$ . † $P < 0.05$  Boş nanoformülasyon + iskemi/reperfüzyon grubuyla karşılaştırıldığında

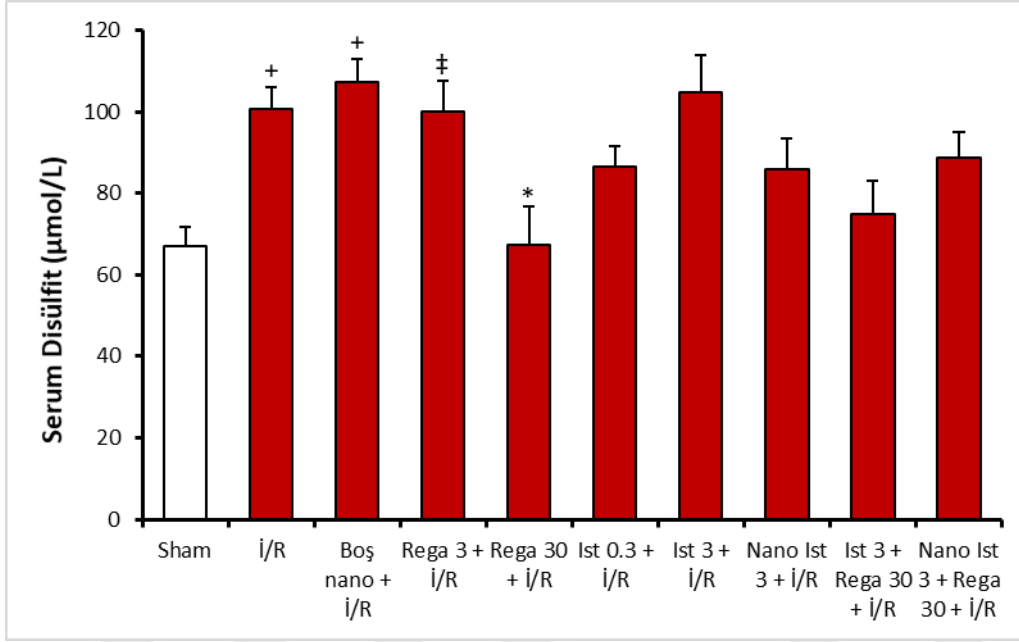
Grupların serum doğal tiyol düzeyleri Şekil 4.2’de sunulmuştur. Serum doğal tiyol düzeyi, İ/R uygulanan grupta Sham grubuna göre daha düşük bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Tek başına Regadenoson ( $30 \mu\text{g/kg}$ ) verilerek İ/R uygulanan (Rega 30 + İ/R) grupta ölçülen serum doğal tiyol düzeylerinin İ/R uygulanan gruba göre daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla  $P<0.01$ ). Rega 30 + İ/R grubunda ölçülen serum doğal tiyol düzeyi İstradefilin ( $3 \text{ mg/kg}$ ) ardından Regadenoson ( $30 \mu\text{g/kg}$ ) verilerek İ/R uygulanan (İst 3 + Rega 30 + İ/R) grubuna ve Regadenoson ( $3 \mu\text{g/kg}$ ) verilerek İ/R uygulanan grubuna (Rega 3 + İ/R) göre yüksek bulunmuştur (sırasıyla  $P<0.05$ ,  $P<0.05$ ). Buna ek olarak, serum doğal tiyol düzeyi, Rega 30 + İ/R grubunda Nano Ist 3 + Rega 30 + İ/R grubuna göre oldukça yüksek bulunmuştur ( $P<0.01$ ).



**Şekil 4.2.** Grupların serum doğal tiyol seviyeleri

Sonuçlar ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Her grup için  $n=8$ . + $P<0.05$  Sham grubuyla karşılaştırıldığında, \*\* $P<0.01$  İskemi/Reperfüzyon grubuyla karşılaştırıldığında, ‡ $P<0.05$ , ‡‡ $P<0.01$  Regadenoson ( $30 \mu\text{g/kg}$ ) + İskemi/Reperfüzyon grubuyla karşılaştırıldığında

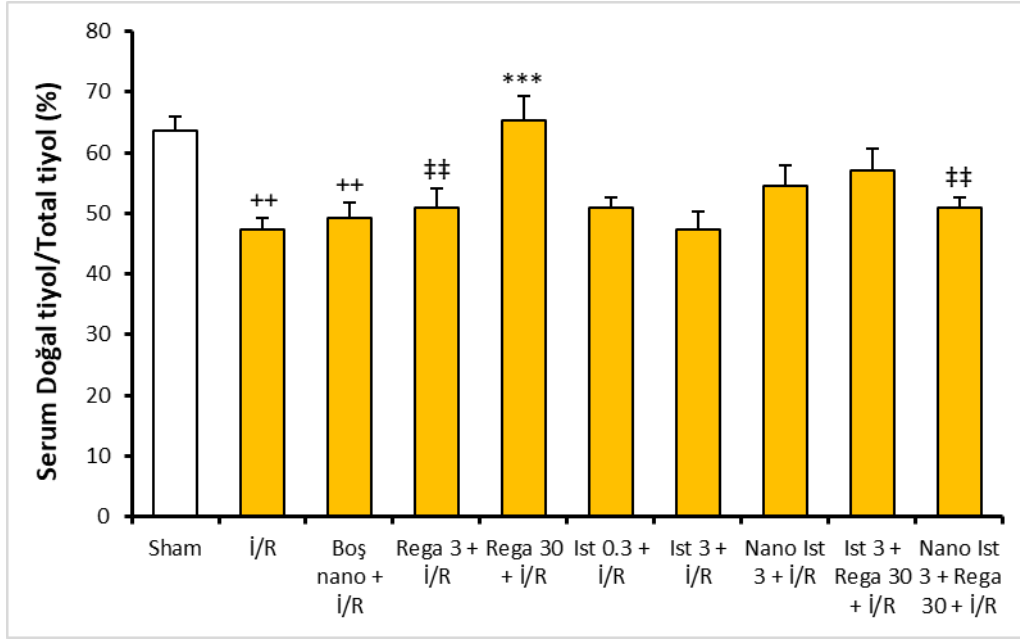
Grupların serum disülfid düzeyleri Şekil 4.3’de sunulmuştur. Serum disülfid düzeyi, İ/R grubu ve Boş nano + İ/R grubunda Sham grubuna göre yüksek bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Ayrıca, Rega 30 + İ/R grubunda sadece İ/R uygulanan gruba göre serum disülfid düzeyleri düşük bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Düşük doz uygulanan Rega 3+İ/R grubunda serum disülfid düzeyi Rega 30+İ/R grubuna göre yüksek bulunmuştur ( $P<0.05$ ).



**Şekil 4.3.** Grupların serum disülfid düzeyleri

Sonuçlar ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Her grup için  $n=8$ . + $P<0.05$  Sham grubuyla karşılaştırıldığında, \* $P<0.05$  İskemi/Reperfüzyon grubuyla karşılaştırıldığında, ‡ $P<0.05$  Regadenoson (30  $\mu\text{g/kg}$ ) + İskemi/Reperfüzyon grubuyla karşılaştırıldığında

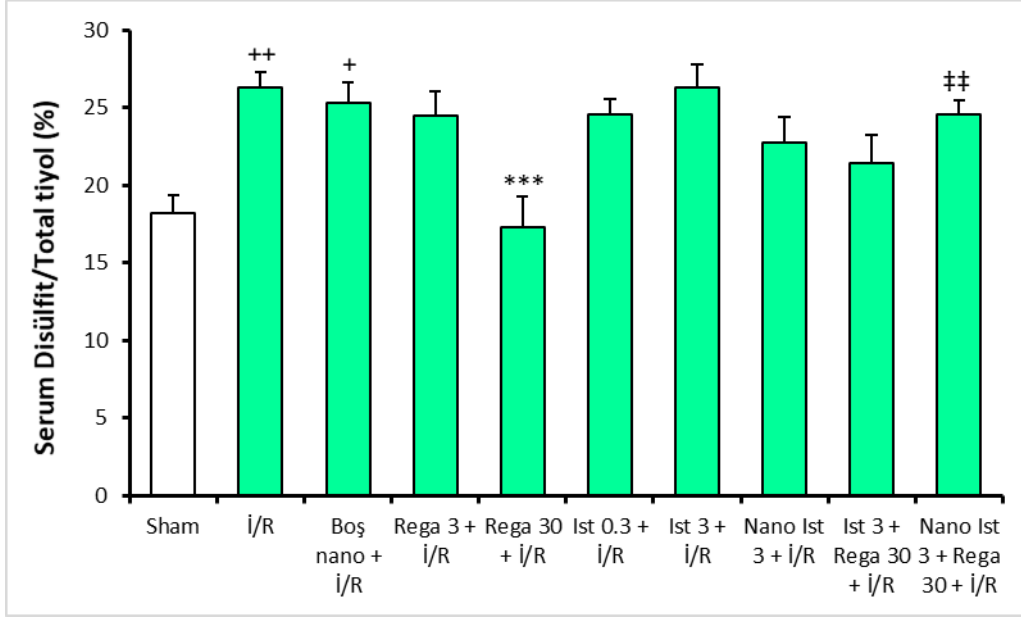
Grupların serum doğal tiyol/total oranı Şekil 4.4’de sunulmuştur. Serum doğal tiyol/total tiyol düzeyi, İ/R ve Boş nano+İ/R grubunda Sham grubuna göre düşük bulunmuştur ( $P<0.01$ ). Rega 30 + İ/R grubunda İ/R grubuna göre serum doğal tiyol/total tiyol düzeyleri oldukça yüksek bulunmuştur ( $P<0.001$ ). Rega 3 + İ/R ve Nano Ist 3 + Rega 30+İ/R gruplarında serum doğal tiyol/total tiyol düzeyleri Rega 30 + İ/R grubuna göre düşük bulunmuştur ( $P<0.01$ ).



**Şekil 4.4.** Grupların serum doğal tiyol/total tiyol oranı

Sonuçlar ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Her grup için  $n=8$ . ++ $P<0.01$  Sham grubuyla karşılaştırıldığında, \*\*\* $P<0.001$  İskemi/Reperfüzyon grubuyla karşılaştırıldığında, ## $P<0.01$  Regadenoson (30  $\mu\text{g/kg}$ ) + İskemi/Reperfüzyon grubuyla karşılaştırıldığında

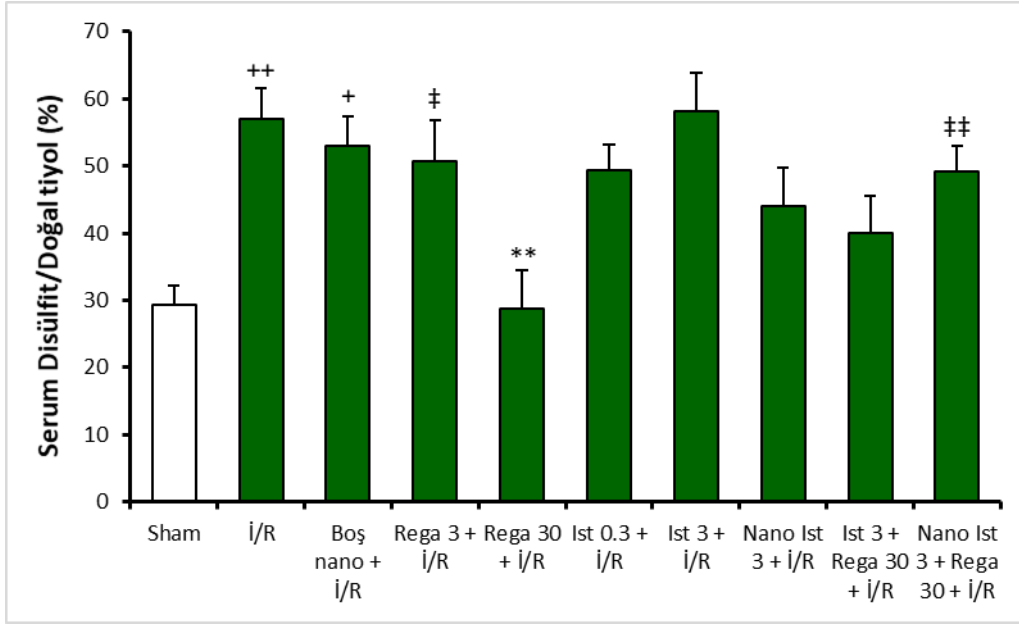
Grupların serum disülfid/total tiyol oranı Şekil 4.5’de sunulmuştur. İ/R grubunda ve Boş nano + İ/R grubunda serum disülfid/total tiyol oranı Sham grubuna göre yüksek bulunmuştur (sırasıyla  $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Rega 30 + İ/R grubunda serum disülfid/total tiyol oranı İ/R grubuna göre önemli ölçüde düşük bulunmuştur ( $P<0.001$ ). Ayrıca, serum disülfid/total tiyol oranı, Nano Ist 3 + Rega 30 + İ/R grubunda Rega 30 + İ/R grubuna göre yüksek bulunmuştur ( $P<0.01$ ).



**Şekil 4.5.** Grupların serum disülfid/total tiyol oranı

Sonuçlar ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Her grup için  $n=8$ . + $p<0.05$ , ++ $P<0.01$  Sham grubuyla karşılaştırıldığında, \*\*\* $P<0.001$  İskemi/Reperfüzyon grubuyla karşılaştırıldığında, ‡‡ $P<0.01$  Regadenoson (30  $\mu\text{g/kg}$ ) + İskemi/Reperfüzyon grubuyla karşılaştırıldığında

Grupların serum disülfid/doğal tiyol oranı Şekil 4.6’da sunulmuştur. İ/R grubunda ve Boş nano + İ/R grubunda serum disülfid/doğal tiyol oranı Sham grubuna göre yüksek bulunmuştur (sırasıyla  $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Rega 30 + İ/R grubunda serum disülfid/doğal tiyol oranı İ/R grubuna göre oldukça düşük bulunmuştur ( $P<0.01$ ). Buna ek olarak, serum disülfid/doğal tiyol oranı, Rega 3 + İ/R ve Nano Ist 3 + Rega 30 + İ/R grubunda Rega 30 + İ/R grubuna göre yüksek bulunmuştur (sırasıyla  $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ).

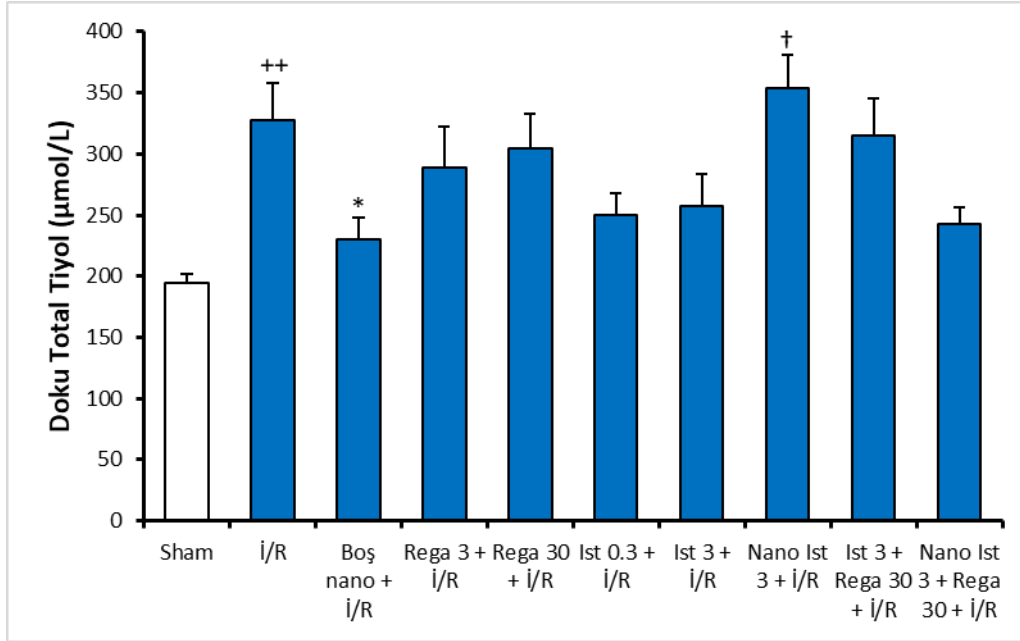


**Şekil 4.6.** Grupların serum disülfid/doğal tiyol oranı

Sonuçlar ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Her grup için  $n=8$ . + $p<0.05$ , ++ $P<0.01$  Sham grubuyla karşılaştırıldığında, \*\* $P<0.01$  İskemi/Reperfüzyon grubuyla karşılaştırıldığında, ‡ $P<0.05$ , ‡‡ $P<0.01$  Regadenoson (30  $\mu\text{g/kg}$ ) + İskemi/Reperfüzyon grubuyla karşılaştırıldığında

#### 4.1.2. Doku tiyol-disülfid parametrelerinin bulguları

Grupların doku total tiyol düzeyi Şekil 4.7’de sunulmuştur. Doku total tiyol düzeyi, İ/R grubunda Sham grubuna göre yüksek bulunmuştur ( $P<0.01$ ). Boş nano + İ/R grubunda doku total tiyol oranı İ/R grubuna göre düşük bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Ayrıca, Nano Ist 3 + Rega 30 + İ/R grubunda doku total tiyol oranı Boş nano + İ/R grubuna göre yüksek bulunmuştur ( $P<0.05$ ).

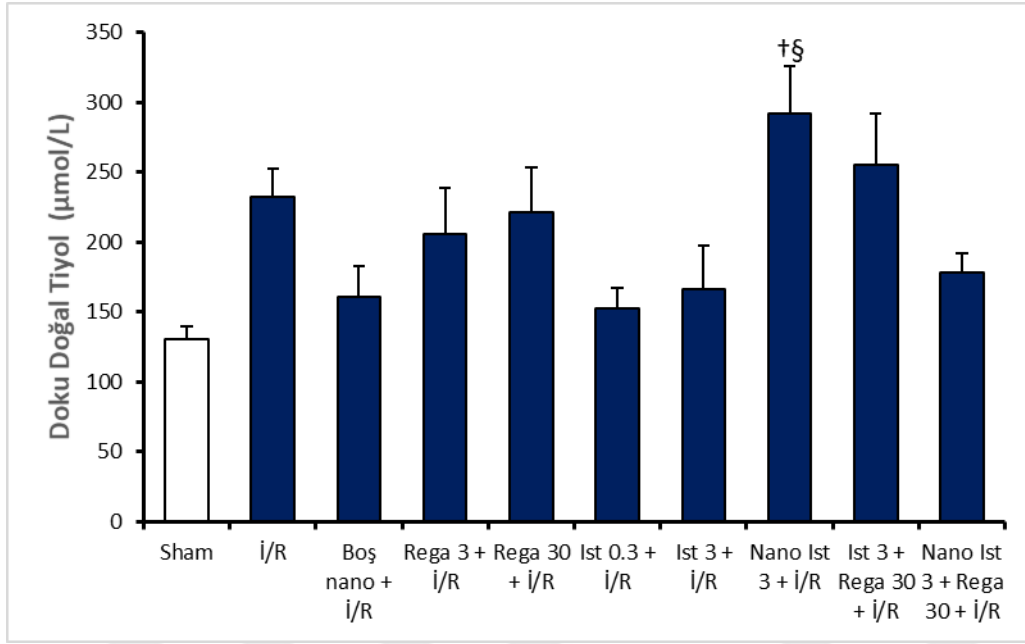


Şekil 4.7. Grupların doku total tiyol düzeyi

Sonuçlar ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Her grup için  $n=8$ . ++ $P<0.01$  Sham grubuyla karşılaştırıldığında, \* $P<0.05$  İskemi/Reperfüzyon grubuyla karşılaştırıldığında, † $P<0.05$  Boş nanoformülasyon + iskemi/reperfüzyon grubuyla karşılaştırıldığında



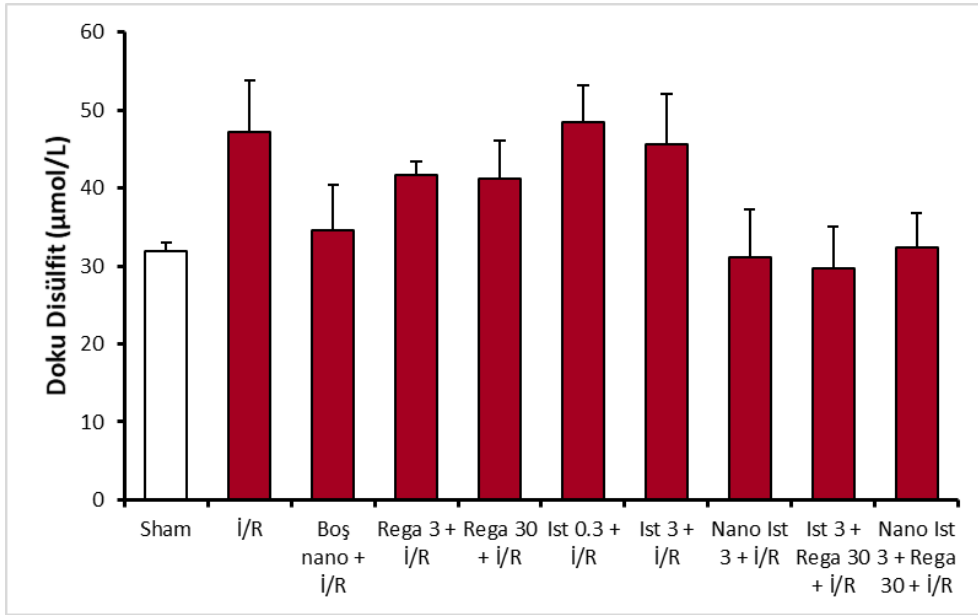
Grupların doku doğal tiyol düzeyi Şekil 4.8’de sunulmuştur. Doku doğal tiyol düzeyi, nanotaşıyıcı içinde İstradefilin (3 mg/kg) verilerek İ/R uygulanan (Nano Ist 3 + İ/R) grupta Boş nano + İ/R grubuna göre yüksek bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Yine Nano Ist 3 + İ/R grubunda doku doğal tiyol oranı İstradefilin (3 mg/kg) verilerek İ/R uygulanan (Ist 3 + İ/R) gruba göre yüksek bulunmuştur ( $P<0.05$ ).



**Şekil 4.8.** Grupların doku doğal tiyol düzeyleri

Sonuçlar ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Her grup için  $n=8$ . <sup>†</sup> $P<0.05$  Boş nanoformülasyon + iskemi/reperfüzyon grubuyla karşılaştırıldığında, <sup>§</sup> $P<0.05$  İstradefilin 3 mg/kg + iskemi/reperfüzyon grubuyla karşılaştırıldığında

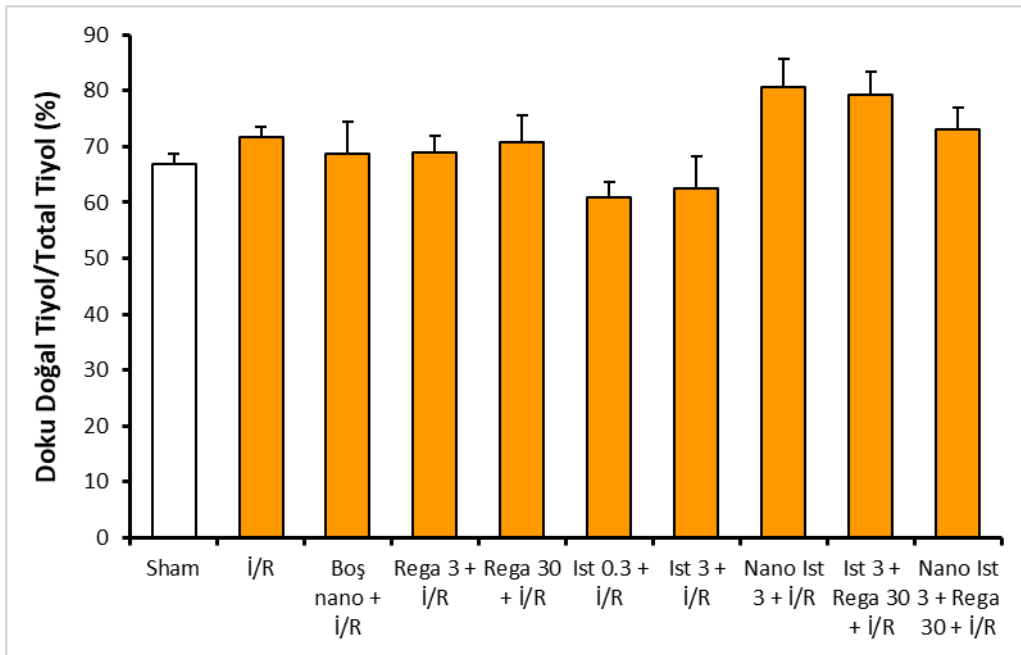
Grupların doku disülfid düzeyleri Şekil 4.9’da sunulmuştur. Doku disülfid düzeyleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır.



**Şekil 4.9.** Grupların doku disülfid düzeyleri

Sonuçlar ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Her grup için n=8.

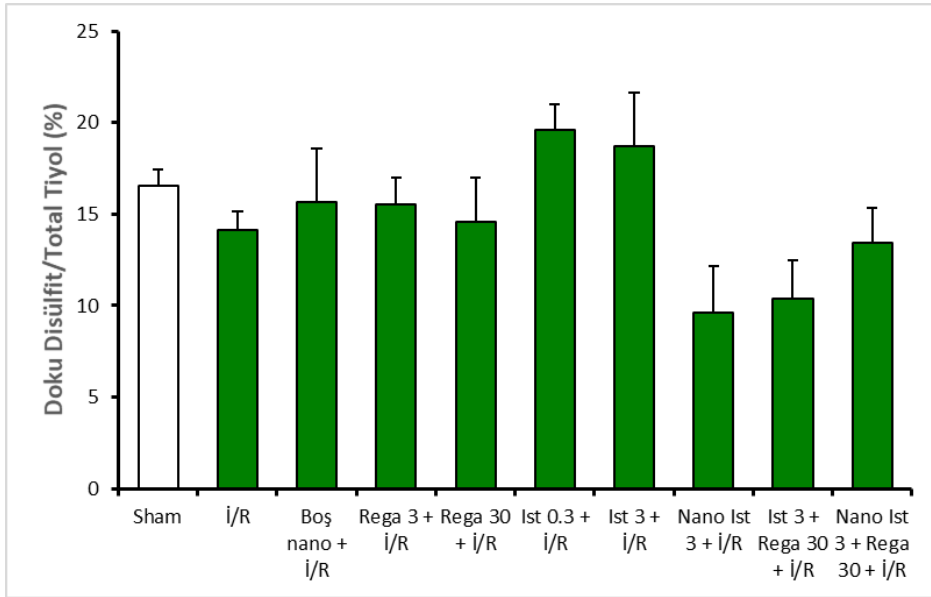
Grupların doku doğal tiyol/total tiyol oranı Şekil 4.10’da sunulmuştur. Doku doğal tiyol/total tiyol oranında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır.



**Şekil 4.10.** Grupların doğal tiyol/total tiyol oranı düzeyleri

Sonuçlar ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Her grup için n=8.

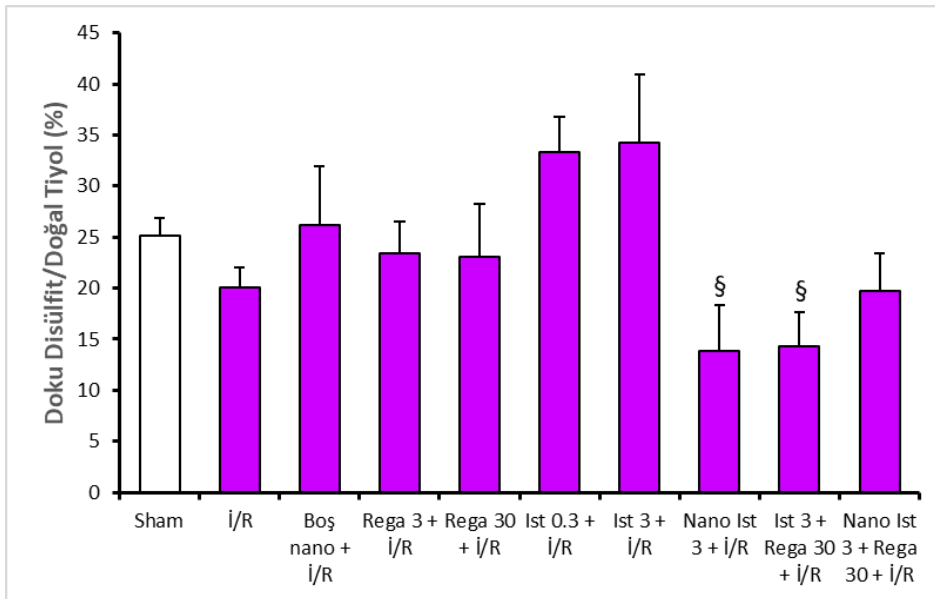
Grupların doku disülfid/total tiyol oranı Şekil 4.11’de sunulmuştur. Doku disülfid/total tiyol oranı bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır.



**Şekil 4.11.** Grupların doku disülfid/total tiyol oranı

Sonuçlar ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Her grup için n=8.

Grupların doku disülfid/doğal tiyol oranı Şekil 4.12’de sunulmuştur. Doku disülfid/doğal tiyol oranı, Nano Ist 3 + I/R ve Ist 3 + Rega 30 + I/R grubunda Ist 3 + I/R grubuna göre düşük bulunmuştur ( $P<0.05$ ).

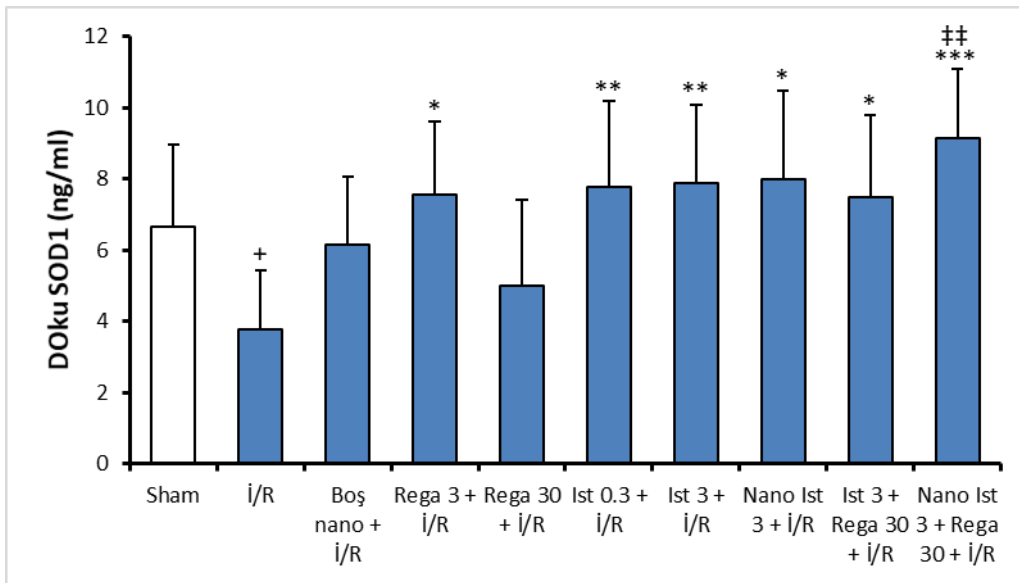


**Şekil 4.12.** Grupların doku disülfid/doğal tiyol oranı

Sonuçlar ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Her grup için n=8.  $\S P<0.05$  İstradefilin 3 mg/kg + iskemi/reperfüzyon grubuyla karşılaştırıldığında

#### 4.1.3. Doku SOD1 bulguları

Grupların doku SOD1 düzeyleri Şekil 4.13’de sunulmuştur. Doku SOD1 düzeyi, İ/R grubunda Sham grubuna göre düşük bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Rega 3 + İ/R grubunda, Nano Ist 3 + İ/R grubunda ve Ist 3 + Rega 30 + İ/R grubunda ölçülen doku SOD1 düzeyi İ/R uygulanan gruba göre yüksek bulunmuştur (sırasıyla  $P<0.05$ ,  $P<0.05$ ,  $P<0.05$ ). İstradefilin (3 mg/kg) verilerek İ/R uygulanan (Ist 0.3 + İ/R) grupta ve Ist 3 + İ/R grubunda ölçülen doku SOD1 düzeyleri ise İ/R grubuna göre yüksek bulunmuştur (sırasıyla  $P<0.01$ ,  $P<0.01$ ). Ayrıca, doku SOD1 düzeyi, Nano Ist 3 + Rega 30 + İ/R grubunda Rega 30 + İ/R grubuna göre yüksek bulunmuştur ( $P<0.01$ ).

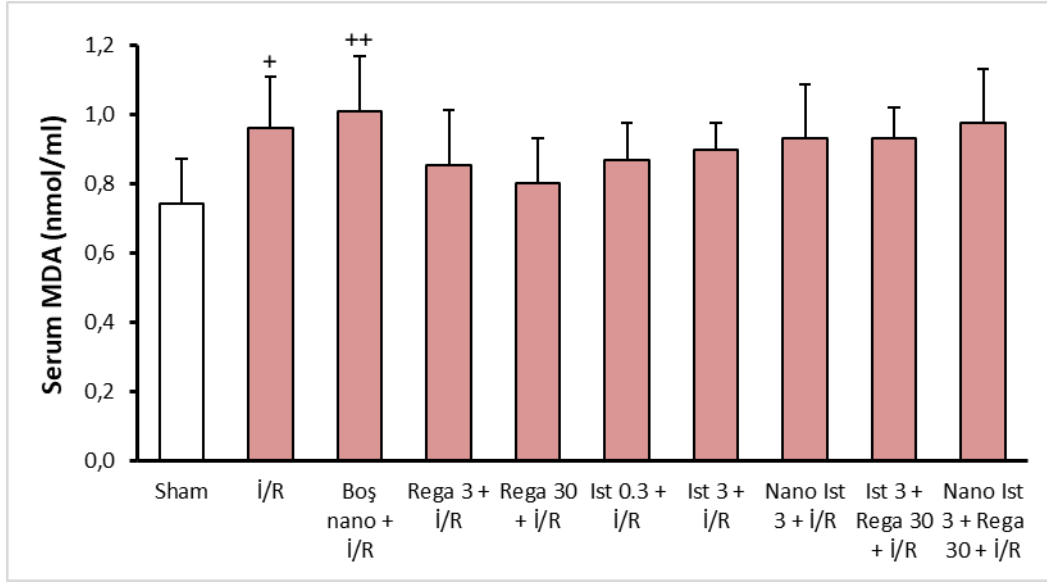


Şekil 4.13. Grupların doku SOD1 düzeyleri

Sonuçlar ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Her grup için  $n=8$ . + $P<0.05$  Sham grubuyla karşılaştırıldığında, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.01$  İskemi/Reperfüzyon grubuyla karşılaştırıldığında, †† $P<0.01$  Regadenoson (30  $\mu$ g/kg) + İskemi/Reperfüzyon grubuyla karşılaştırıldığında

#### 4.1.4. Serum MDA bulguları

Grupların serum MDA düzeyleri Şekil 4.14’de sunulmuştur. Serum MDA düzeyleri, İ/R grubunda ve Boş nano + İ/R grubunda Sham grubuna göre yüksek bulunmuştur (sırasıyla  $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ).

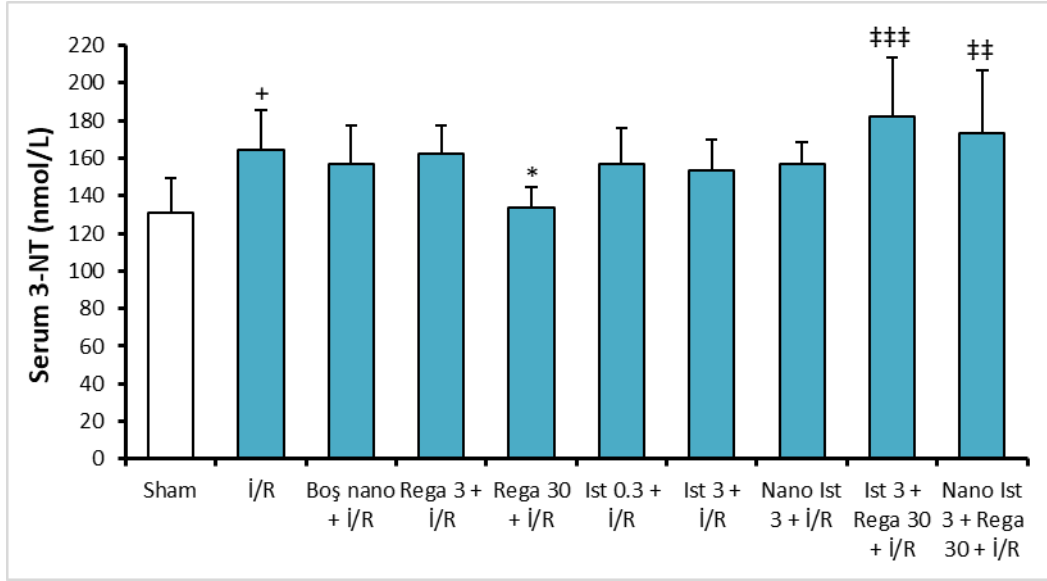


Şekil 4.14. Grupların serum MDA düzeyleri

Sonuçlar ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Her grup için  $n=8$ . + $p<0.05$ , ++ $P<0.01$  Sham grubuyla karşılaştırıldığında

#### 4.1.5. Serum 3-NT bulguları

Grupların serum 3-NT düzeyleri Şekil 4.15’de sunulmuştur. Serum 3-NT düzeyi, İ/R grubunda Sham grubuna göre yüksek bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Rega 30 + İ/R grubunun 3-NT düzeyi ise İ/R grubuna göre düşük bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Nano Ist 3 + Rega 30 + İ/R grubunun ve Ist 3 + Rega 30 + İ/R grubunun 3-NT düzeyleri ise Rega 30 + İ/R grubuna göre yüksek bulunmuştur ( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ).

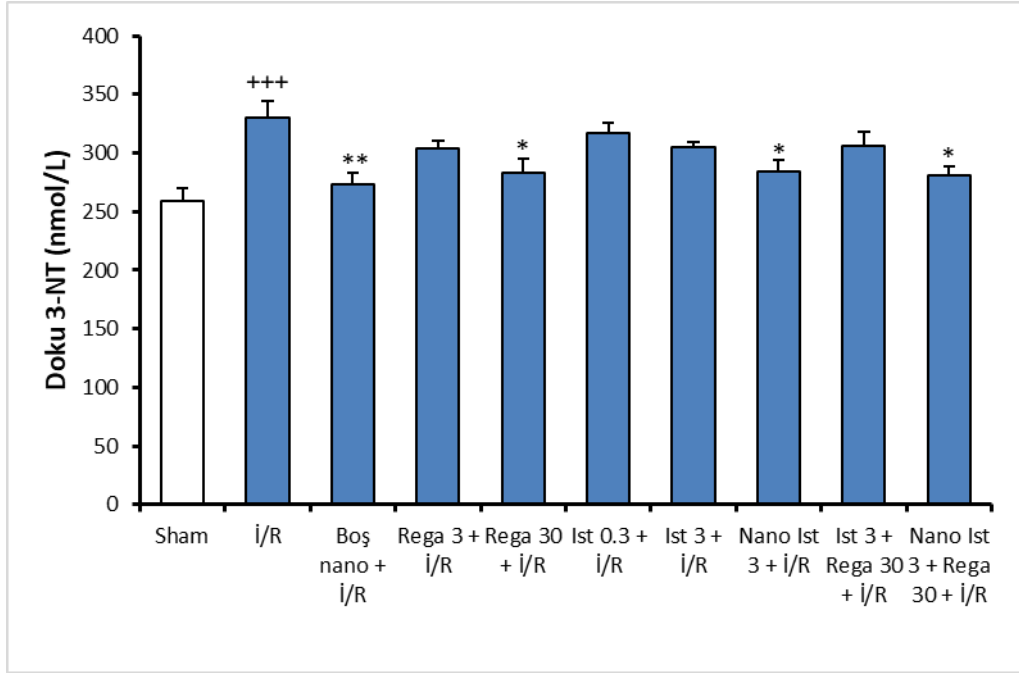


**Şekil 4.15.** Grupların serum 3-NT düzeyleri

Sonuçlar ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Her grup için  $n=8$ . + $P<0.05$  Sham grubuyla karşılaştırıldığında, \* $P<0.05$  İskemi/Reperfüzyon grubuyla karşılaştırıldığında, ### $P<0.01$ , ### $P<0.001$  Regadenoson (30  $\mu\text{g/kg}$ ) + İskemi/Reperfüzyon grubuyla karşılaştırıldığında

#### 4.1.6. Doku 3-NT bulguları

Grupların doku 3-NT düzeyleri Şekil 4.16’da sunulmuştur. İ/R grubunun doku 3-NT düzeyi Sham grubuna göre yüksek bulunmuştur ( $P<0.001$ ). Rega 30 + İ/R grubunun, Nano Ist 3 + İ/R grubunun, Nano Ist 3 + Rega 30 + İ/R grubunun ve Boş nano + İ/R grubunun ölçülen doku 3-NT düzeyleri İ/R grubuna göre yüksek bulunmuştur (sırasıyla  $P<0.05$ ,  $P<0.05$ ,  $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ).

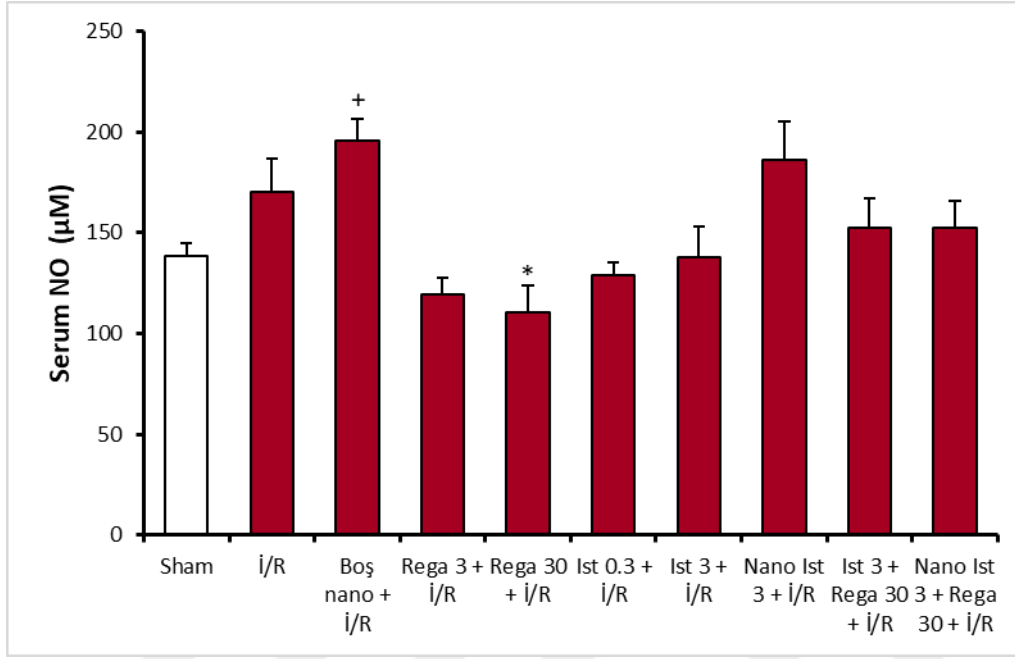


**Şekil 4.16.** Grupların doku 3-NT düzeyleri

Sonuçlar ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Her grup için  $n=8$ . +++ $P<0.001$  Sham grubuyla karşılaştırıldığında, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  İskemi/Reperfüzyon grubuyla karşılaştırıldığında

#### 4.1.7. Serum NO bulguları

Grupların serum NO düzeyleri Şekil 4.17’de sunulmuştur. Boş nano + İ/R grubunun serum NO düzeyi Sham grubuna göre yüksek bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Rega 30 + İ/R grubunun serum NO düzeyi ise İ/R uygulanan gruba göre düşük bulunmuştur ( $P<0.05$ ).



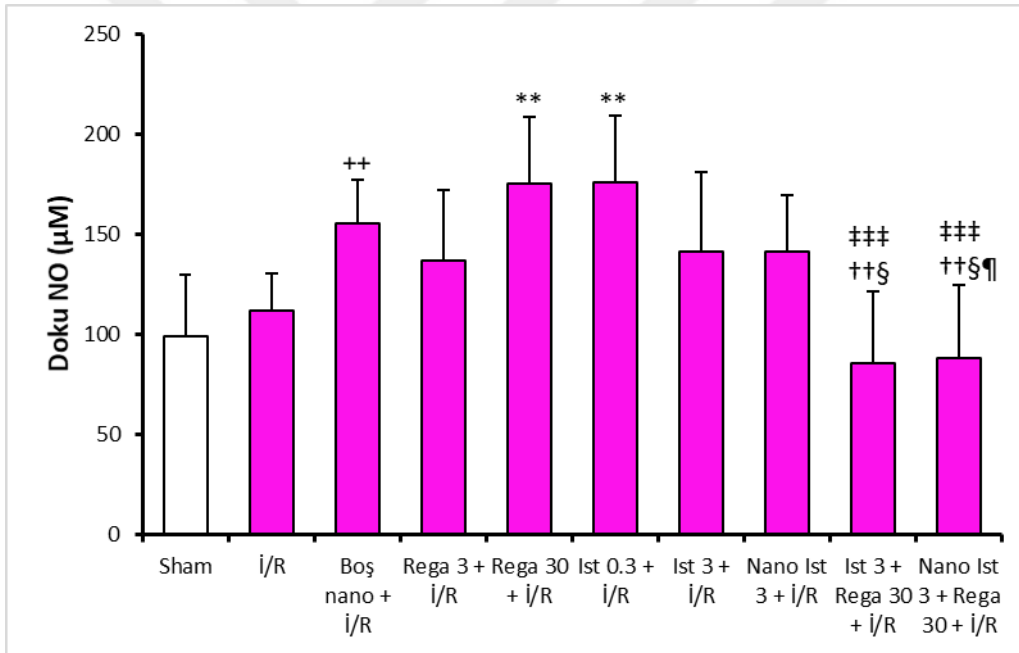
**Şekil 4.17.** Grupların serum NO düzeyleri

Sonuçlar ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Her grup için  $n=8$ . + $P<0.05$  Sham grubuyla karşılaştırıldığında, \* $P<0.05$  İskemi/Reperfüzyon grubuyla karşılaştırıldığında



#### 4.1.8. Doku NO bulguları

Grupların doku NO düzeyleri Şekil 4.18’de sunulmuştur. Boş nano + İ/R grubunda doku NO düzeyi Sham grubuna göre yüksek bulunmuştur ( $P<0.01$ ). Doku NO düzeyi, Rega 30 + İ/R grubu ve Ist 0.3 + İ/R grubunda İ/R uygulanan gruba göre yüksek bulunmuştur (sırasıyla  $P<0.01$ ,  $P<0.01$ ). Ist 3 + Rega 30 + İ/R grubunda ve Nano Ist 3 + Rega 30 + İ/R grubunda doku NO düzeyleri Rega 30 + İ/R grubuna göre oldukça düşük bulunmuştur (sırasıyla  $P<0.001$ ,  $P<0.001$ ). Ist 3 + Rega 30 + İ/R grubunda ve Nano Ist 3 + Rega 30 + İ/R grubunda doku NO düzeyleri Boş nano + İ/R grubuna göre düşük bulunmuştur (sırasıyla  $P<0.01$ ,  $P<0.01$ ). Ist 3 + Rega 30 + İ/R grubunda ve Nano Ist 3 + Rega 30 + İ/R grubunda doku NO düzeyleri Ist 3 + İ/R grubuna göre düşük bulunmuştur (sırasıyla  $P<0.05$ ,  $P<0.05$ ). Nano Ist 3 + Rega 30 + İ/R grubunda ise doku NO düzeyleri Nano Ist 3 + İ/R grubuna göre düşük bulunmuştur ( $P<0.05$ ).



Şekil 4.18. Grupların doku NO düzeyleri

Sonuçlar ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Her grup için  $n=8$ . ++ $P<0.01$  Sham grubuyla karşılaştırıldığında, \*\* $P<0.01$  İskemi/Reperfüzyon grubuyla karşılaştırıldığında, ††† $P<0.001$  Regadenoson (30  $\mu\text{g/kg}$ ) + İskemi/Reperfüzyon grubuyla karşılaştırıldığında, †† $P<0.01$  Boş nanoformülasyon + iskemi/reperfüzyon grubuyla karşılaştırıldığında, § $P<0.05$  Istradefilin 3  $\text{mg/kg}$  + iskemi/reperfüzyon grubuyla karşılaştırıldığında, ¶ $P<0.05$  Nano Istradefilin 3  $\text{mg/kg}$  + iskemi/reperfüzyon grubuyla karşılaştırıldığında

#### 4.1.9. Korelasyon analizleri

Sıçanlarda over İ/R deneylerinde ölçülen parametreler arasındaki istatistiksel olarak anlamlı korelasyonlar Tablo 4.1 ve 4.2’de sunulmuştur.

Regadenoson 3 mg/kg + İ/R grubunda serum doğal tiyol düzeyleri ile serum disülfid düzeyleri arasında negatif korelasyon bulundu ( $P=0.0442$ ). Bu grupta, doku total tiyol düzeyleri ile doku doğal tiyol düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptandı ( $P<0.0001$ ) (Tablo 4.1).

Regadenoson 30 mg/kg + İ/R grubunda doku total tiyol düzeyleri ile doku doğal tiyol düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptandı ( $P=0.0003$ ) (Tablo 4.1).

İstradefilin 0.3 mg/kg + İ/R grubunda serum total tiyol düzeyleri ile serum disülfid düzeyleri arasında pozitif korelasyon bulundu ( $P=0.0042$ ). Bu grupta, serum doğal tiyol düzeyleri ile doku NO düzeyleri arasında negatif korelasyon saptandı ( $P=0.0403$ ) (Tablo 4.1).

İstradefilin 3 mg/kg + İ/R grubunda serum total tiyol düzeyleri ile serum disülfid düzeyleri arasında ayrıca doku total tiyol düzeyleri ile doku doğal tiyol düzeyleri arasında pozitif korelasyon bulundu (sırasıyla  $P<0.0001$ ,  $P=0.0016$ ). Bu grupta, serum total tiyol düzeyleri ile doku 3-NT düzeyleri arasında, serum disülfid düzeyleri ile doku total tiyol düzeyleri arasında ayrıca serum disülfid düzeyleri ile doku 3-NT düzeyleri arasında negatif korelasyon saptandı (sırasıyla  $P=0.0189$ ,  $P=0.0239$ ,  $P=0.0470$ ) (Tablo 4.1).

Nano İstradefilin 3 mg/kg + İ/R grubunda serum total tiyol ile serum disülfid arasında, serum disülfid ile serum NO arasında, serum disülfid ile doku SOD1 ayrıca doku total tiyol ile doku doğal tiyol arasında pozitif korelasyon bulundu ( $P=0.0212$ ,  $P=0.0024$ ,  $P=0.0013$ ,  $P=0.0005$ ). Bu grupta, serum doğal tiyol ile doku SOD1 ve serum doğal tiyol ile serum 3-NT arasında negatif korelasyon saptandı (sırasıyla  $P=0.0187$ ,  $P=0.0175$ ) (Tablo 4.1).

İstradefilin 3 mg/kg + Regadenoson (30 µg/kg) + İ/R grubunda serum total tiyol ile serum disülfid, doku total tiyol ile doku doğal tiyol arasında ayrıca doku doğal tiyol ile doku NO arasında pozitif korelasyon saptandı (sırasıyla  $P=0.0124$ ,  $P<0.0001$ ,  $P=0.0474$ ). Bu grupta, doku disülfid ile doku NO arasında ve serum NO ile doku SOD1 arasında negatif korelasyon bulundu (sırasıyla  $P=0.0004$ ,  $P=0.0062$ ) (Tablo 4.2).

Nano İstradefilin 3 mg/kg + Regadenoson (30 µg/kg) + İ/R grubunda serum total tiyol ile serum MDA, serum total tiyol ile serum 3-NT, serum total tiyol ile serum disülfid, serum

disülfid ile serum MDA ayrıca doku total tiyol ile doku doğal tiyol arasında pozitif korelasyon saptandı (sırasıyla  $P=0.0025$ ,  $P=0.0291$ ,  $P=0.0001$ ,  $P=0.0054$ ,  $P=0.0201$ ). Bu grupta, doku doğal tiyol ile doku SOD1 düzeyleri arasında negatif korelasyon saptandı ( $P=0.0209$ ) (Tablo 4.2).

**Tablo 4.1.** Sıçanlarda over İ/R deneylerinde ölçülen parametreler arasındaki istatistiksel olarak anlamlı korelasyonlar

| Parametreler                                     | Correlation coefficient (r) | Coefficient of determination ( $r^2$ ) | P       |
|--------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------|---------|
| <i>Regadenoson 3 µg/kg + İ/R grubunda:</i>       |                             |                                        |         |
| Serum Doğal tiyol ↔ Serum Disülfid               | -0.7194                     | 0.5176                                 | 0.0442  |
| Doku Total tiyol ↔ Doku Doğal tiyol              | 0.9946                      | 0.9893                                 | <0.0001 |
| <i>Regadenoson 30 µg/kg + İ/R grubunda:</i>      |                             |                                        |         |
| Doku Total tiyol ↔ Doku Doğal tiyol              | 0.9504                      | 0.9912                                 | 0.0003  |
| <i>İstradefilin 0.3 mg/kg + İ/R grubunda:</i>    |                             |                                        |         |
| Serum Total tiyol ↔ Serum Disülfid               | 0.8770                      | 0.7691                                 | 0.0042  |
| Serum Doğal tiyol ↔ Doku NO                      | -0.7288                     | 0.5311                                 | 0.0403  |
| <i>İstradefilin 3 mg/kg + İ/R grubunda:</i>      |                             |                                        |         |
| Serum Total tiyol ↔ Serum Disülfid               | 0.9740                      | 0.9487                                 | <0.0001 |
| Serum Total tiyol ↔ Doku 3-NT                    | -0.7929                     | 0.6287                                 | 0.0189  |
| Serum Disülfid ↔ Doku Total tiyol                | -0.7751                     | 0.6008                                 | 0.0239  |
| Serum Disülfid ↔ Doku 3-NT                       | -0.7133                     | 0.5089                                 | 0.0470  |
| Doku Total tiyol ↔ Doku Doğal tiyol              | 0.9120                      | 0.8317                                 | 0.0016  |
| <i>Nano İstradefilin 3 mg/kg + İ/R grubunda:</i> |                             |                                        |         |
| Serum Total tiyol ↔ Serum Disülfid               | 0.7842                      | 0.6149                                 | 0.0212  |
| Serum Doğal tiyol ↔ Doku SOD1                    | -0.8374                     | 0.7012                                 | 0.0187  |
| Serum Doğal tiyol ↔ Serum 3-NT                   | -0.7985                     | 0.6376                                 | 0.0175  |
| Serum Disülfid ↔ Serum NO                        | 0.8982                      | 0.8068                                 | 0.0024  |
| Serum Disülfid ↔ Doku SOD1                       | 0.9462                      | 0.8953                                 | 0.0013  |
| Doku Total tiyol ↔ Doku Doğal tiyol              | 0.9418                      | 0.8870                                 | 0.0005  |

NO, nitrik oksit; 3-NT, 3-nitrotirozin; MDA, malondialdehit, SOD, Süperoksit dismutaz  
Pearson korelasyon testi

**Tablo 4.2.** Sıçanlarda over İ/R deneylerinde ölçülen parametreler arasındaki istatistiksel olarak anlamlı korelasyonlar

| Parametreler                                                              | Correlation coefficient (r) | Coefficient of determination (r <sup>2</sup> ) | P       |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------|---------|
| <i>İstradefilin 3 mg/kg + Regadenoson (30 µg/kg) + İ/R grubunda:</i>      |                             |                                                |         |
| Serum Total tiyol ↔ Serum Disülfid                                        | 0.8217                      | 0.6751                                         | 0.0124  |
| Doku Total tiyol ↔ Doku Doğal tiyol                                       | 0.9677                      | 0.9365                                         | <0.0001 |
| Doku Doğal tiyol ↔ Doku NO                                                | 0.7123                      | 0.5074                                         | 0.0474  |
| Doku Disülfid ↔ Doku NO                                                   | -0.9470                     | 0.8968                                         | 0.0004  |
| Serum NO ↔ Doku SOD1                                                      | -0.8596                     | 0.7389                                         | 0.0062  |
| <i>Nano İstradefilin 3 mg/kg + Regadenoson (30 µg/kg) + İ/R grubunda:</i> |                             |                                                |         |
| Serum Total tiyol ↔ Serum MDA                                             | 0.8974                      | 0.8054                                         | 0.0025  |
| Serum Total tiyol ↔ Serum 3-NT                                            | 0.7587                      | 0.5756                                         | 0.0291  |
| Serum Total tiyol ↔ Serum Disülfid                                        | 0.9643                      | 0.9298                                         | 0.0001  |
| Serum Disülfid ↔ Serum MDA                                                | 0.8661                      | 0.7501                                         | 0.0054  |
| Doku Total tiyol ↔ Doku Doğal tiyol                                       | 0.7885                      | 0.6217                                         | 0.0201  |
| Doku Doğal tiyol ↔ Doku SOD1                                              | -0.7853                     | 0.6167                                         | 0.0209  |

NO, nitrik oksit; 3-NT, 3-nitrotirozin; MDA, malondialdehit, SOD, Süperoksit dismutaz  
Pearson korelasyon testi

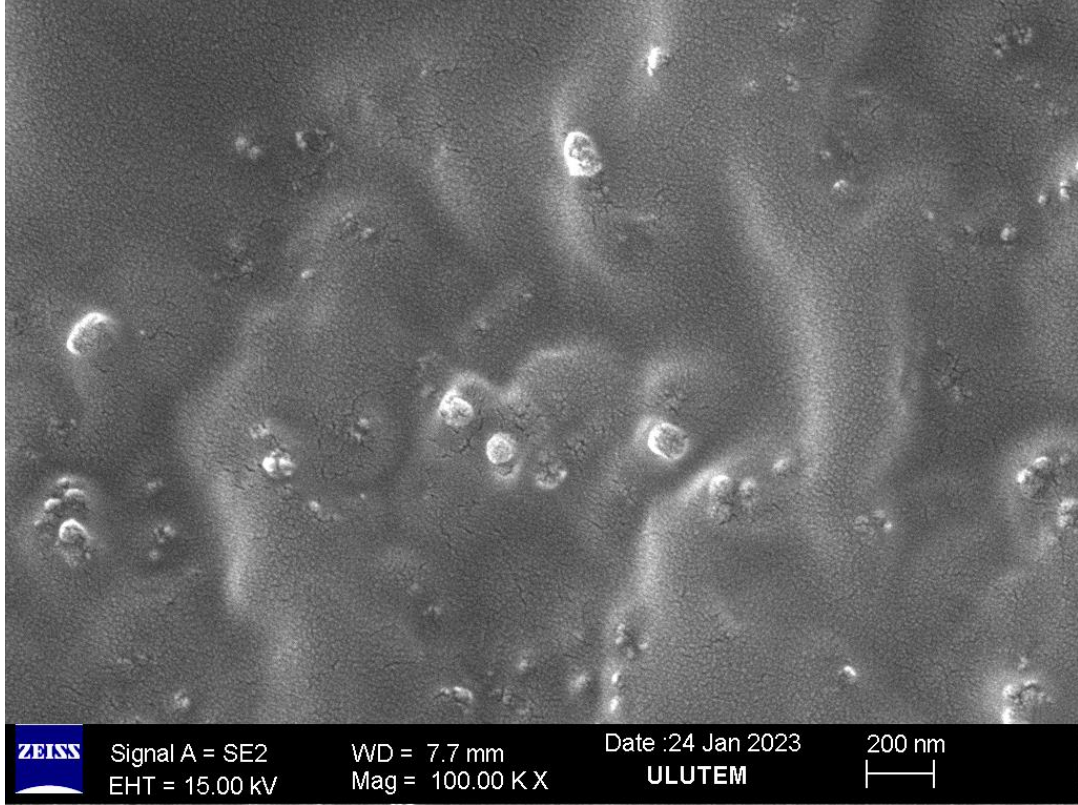
## 4.2. Nanosüspansiyon karakterizasyon bulguları

### 4.2.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizleri

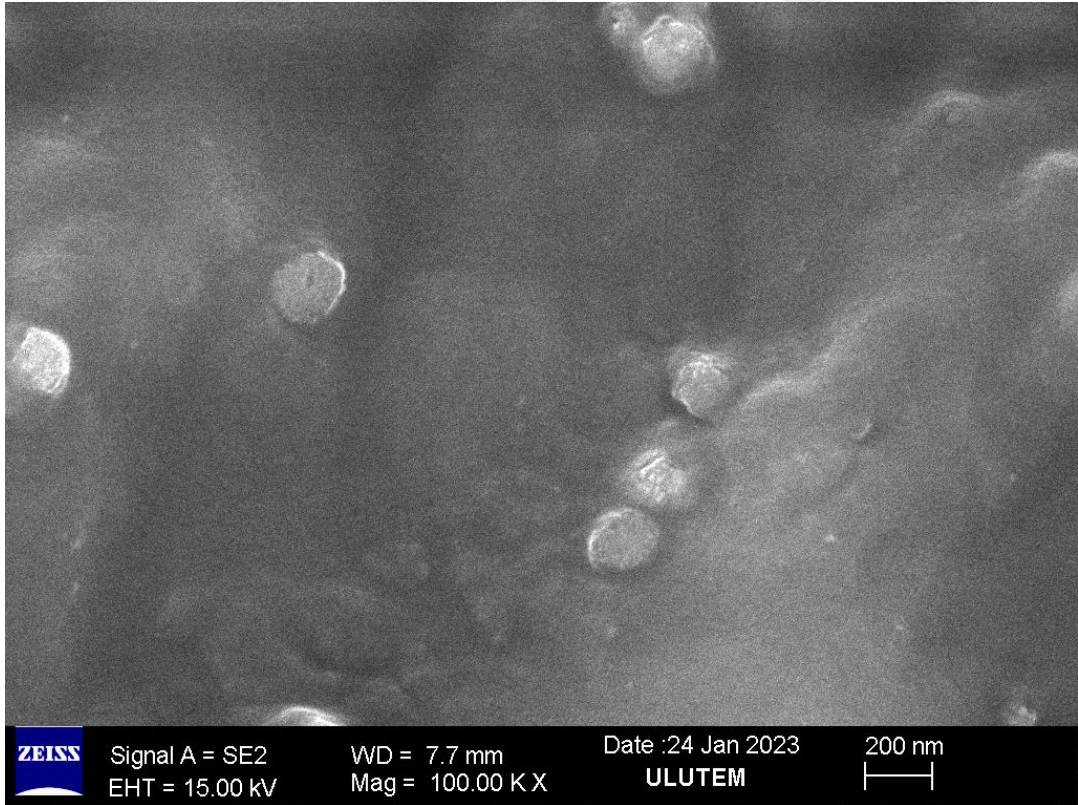
Sunulan çalışmalar kapsamında hazırlanan boş nanosüspansiyonların ve istradefilin yüklü nanosüspansiyonların morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülerinden yararlanılmıştır.

Elde edilen boş nanosüspansiyonlara ait SEM görüntüsü Resim 4.1’de sunulmuştur.

Elde edilen İstradefilin yüklü nanosüspansiyonlara ait SEM görüntüsü Resim 4.2’de sunulmuştur.



**Resim 4.1.** Boş nanosüspansiyonların SEM görüntüsü



**Resim 4.2.** İstradefilin yüklü nanosüspansiyonların SEM görüntüsü

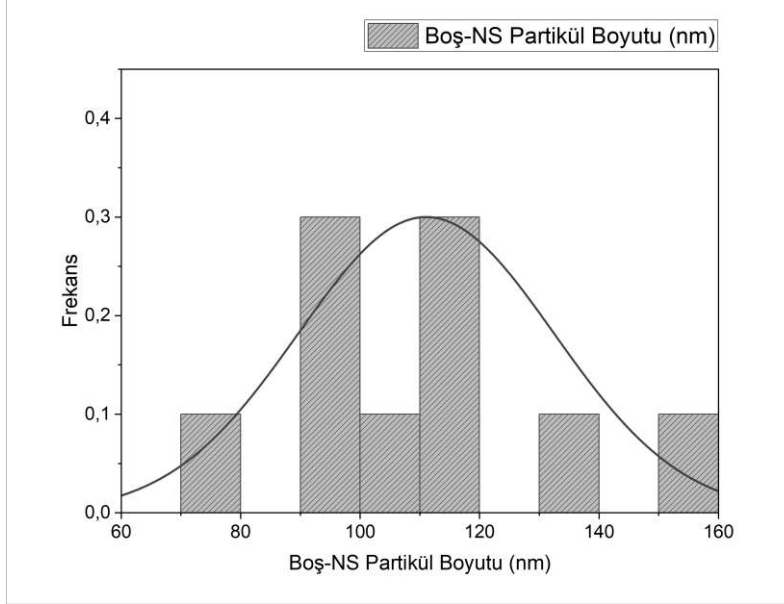
#### 4.2.2. Partikül boyutu ölçümleri

Boş nanosüspansiyon ve İstradefilin yüklü nanosüspansiyonların partikül boyutlarının değerleri Tablo 4.3'te verilmiştir.

**Tablo 4.3.** Boş nanosüspansiyonların ve İstradefilin yüklü nanosüspansiyonların partikül boyutları

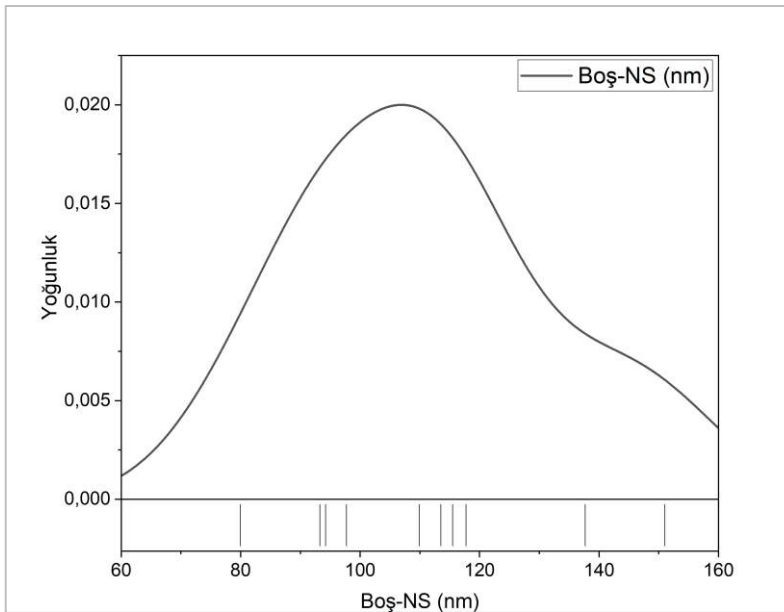
| Partikül Boyutu (nm) | Boş nanosüspansiyon                   | İstradefilin yüklü nanosüspansiyon    |
|----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
|                      | 151.04                                | 219.66                                |
|                      | 137.71                                | 215.05                                |
|                      | 115.50                                | 167.50                                |
|                      | 93.29                                 | 170.16                                |
|                      | 113.52                                | 217.63                                |
|                      | 94.24                                 | 223.08                                |
|                      | 79.96                                 | 347.99                                |
|                      | 109.94                                | 261.00                                |
|                      | 117.74                                | 240.13                                |
|                      | 97.73                                 | 182.96                                |
|                      | Ortalama $\pm$ SD: 111.07 $\pm$ 21.40 | Ortalama $\pm$ SD: 224.52 $\pm$ 52.61 |
|                      |                                       |                                       |

Boş nanosüspansiyonlarda partikül boyut dağılımı verilerinden ortalama partikül boyutunun  $111.07 \pm 21.40$  nm ve boyut aralığının 79.96 nm ile 151.04 nm arasında olduğu belirlendi (Şekil 4.19).



**Şekil 4.19.** Boş nanosüspansiyonların partikül boyutu dağılımı

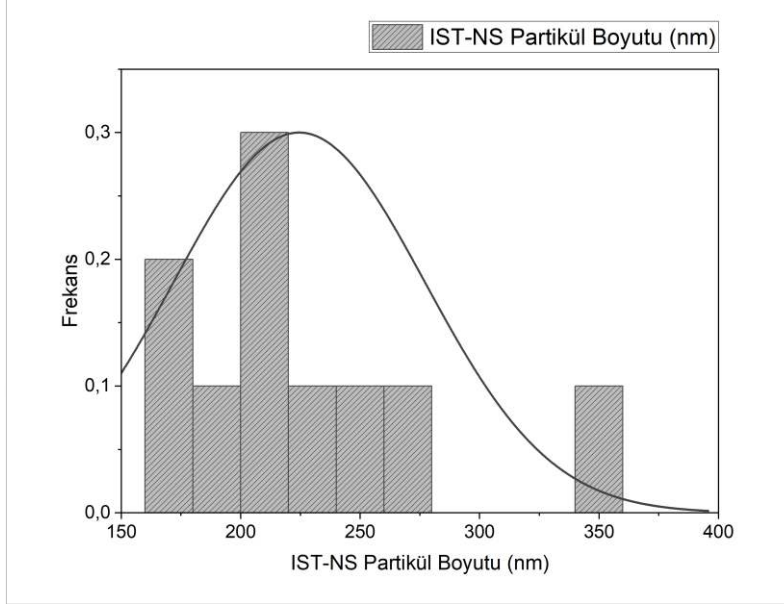
Boş nanosüspansiyonların yoğunluk olarak partikül boyutu dağılımı Şekil 4.20’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.20.** Boş nanosüspansiyonların yoğunluk olarak partikül boyutu dağılımı

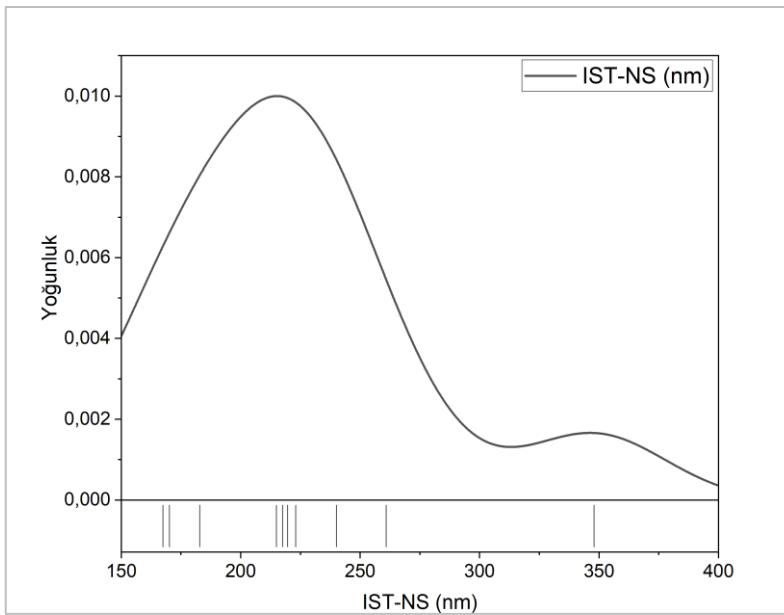


İstradefilin yüklü nanosüspansiyonların partikül boyut dağılımı verilerinden ortalama partikül boyutunun  $224.52 \pm 52.61$  nm ve boyut aralığının 167.50 nm ile 347.99 nm arasında olduğu belirlendi (Şekil 4.21).



**Şekil 4.21.** İstradefilin yüklü nanosüspansiyonların partikül boyutu dağılımı

Ayrıca, İstradefilin yüklü nanosüspansiyonların yoğunluk olarak partikül boyutu dağılımı grafiği de Şekil 4.22’de gösterilmiştir.

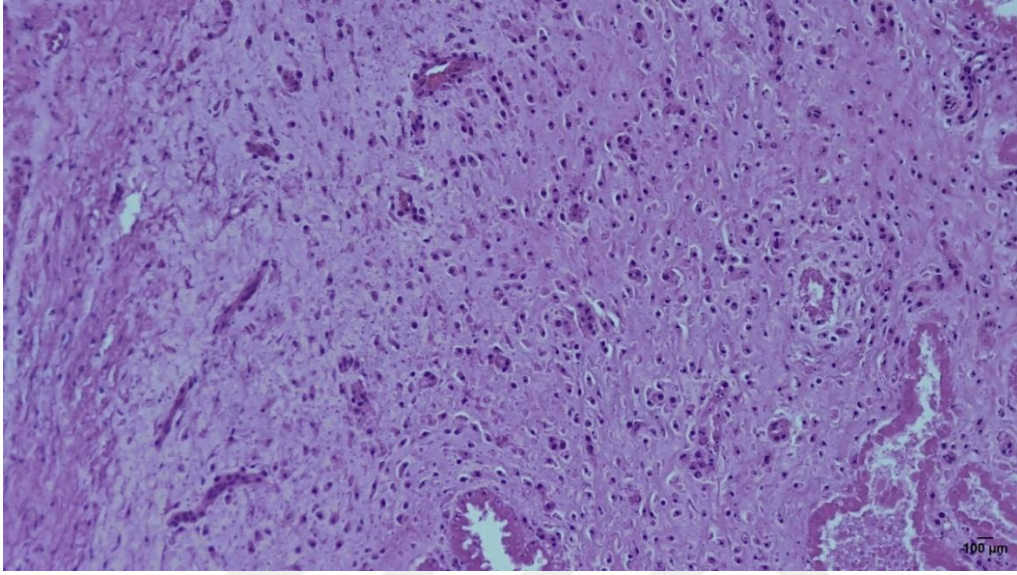


**Şekil 4.22.** İstradefilin yüklü nanosüspansiyonların yoğunluk olarak partikül boyutu dağılımı



#### 4.3. Histopatolojik bulgular

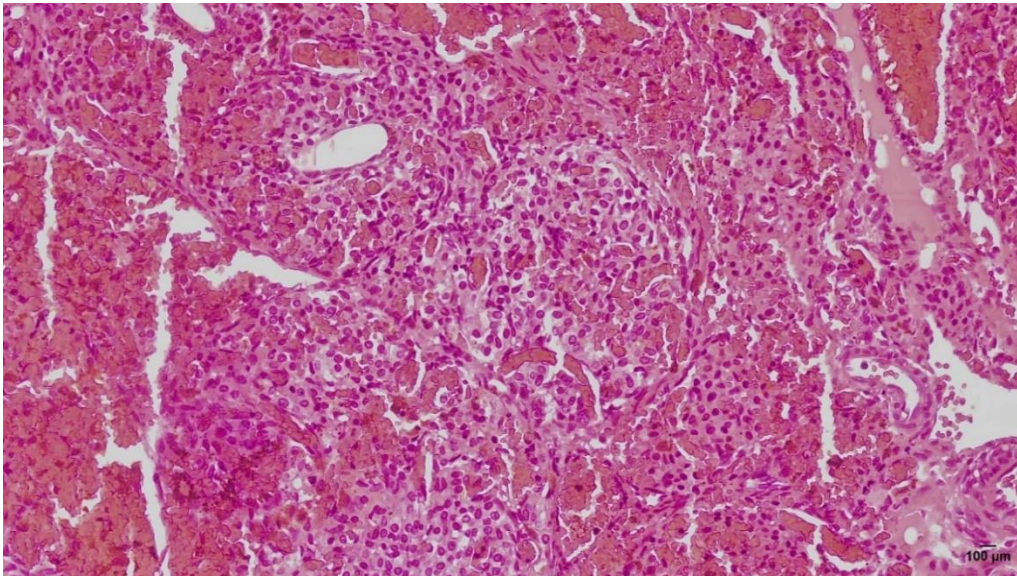
Sham grubundaki dokuların histopatolojik incelemesinde over dokusu genel hatlarıyla korunmuştur. Bu grupta, hafif PMN infiltrasyonuna rastlanmış olup interstisyel ödem, vasküler konjesyon, hemorajiye rastlanmadı (Resim 4.3).



**Resim 4.3.** Sham grubunun over dokusunun histopatolojik görüntüsü

(H-E Boyama, x200)

İskemi/reperfüzyon grubu. histopatolojik olarak incelendiğinde, şiddetli hemoraji, şiddetli PMN infiltrasyonu, şiddetli interstisyel ödem ve şiddetli vasküler konjesyon bulguları izlendi (Resim 4.4).

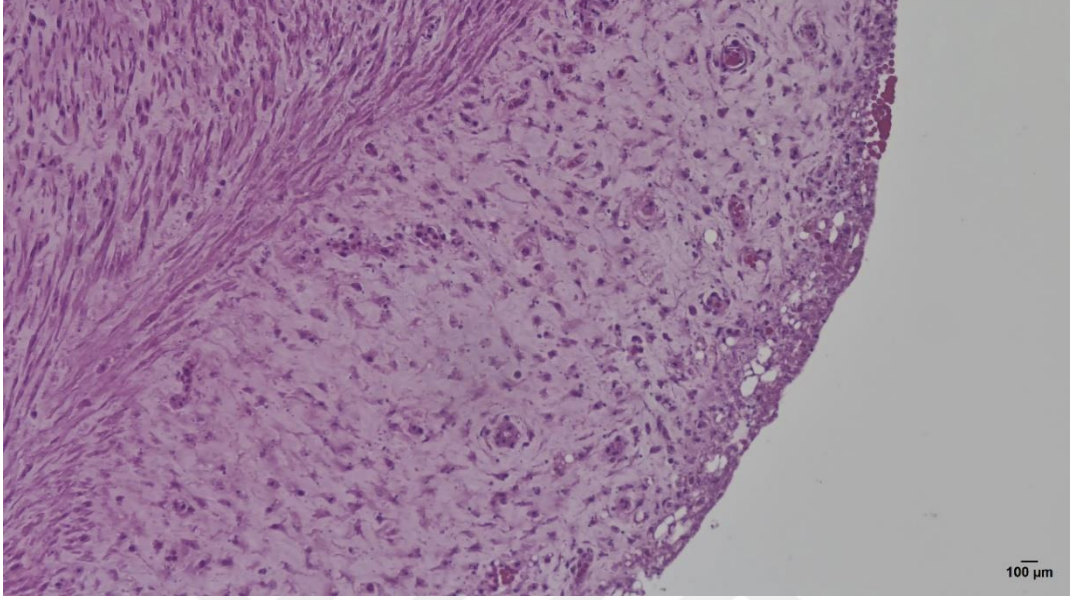


**Resim 4.4.** İskemi/reperfüzyon grubunun over dokusunun histopatolojik görüntüsü

(H-E Boyama, x200)

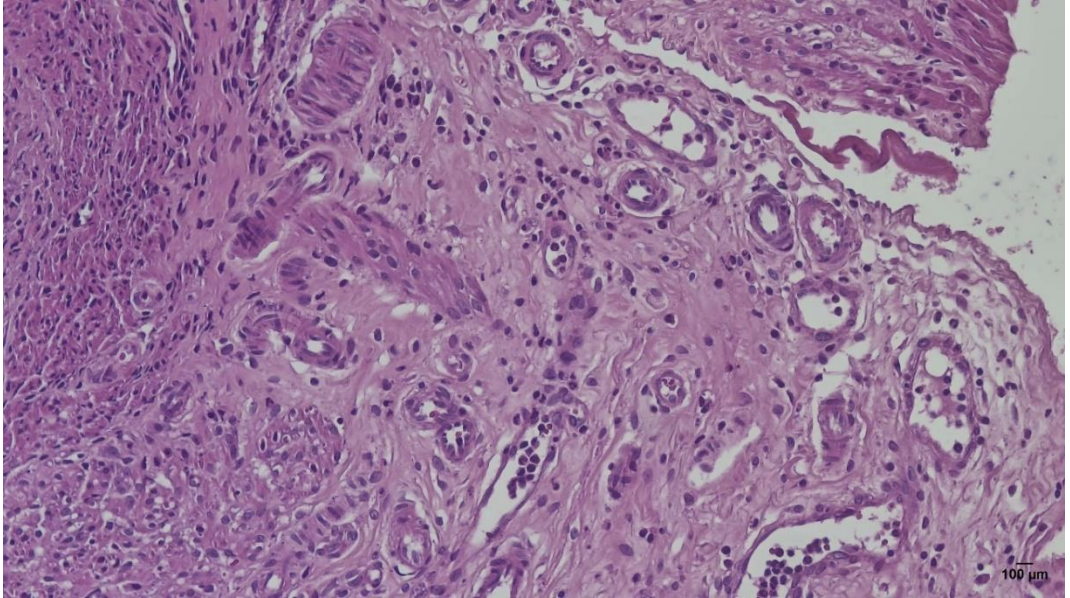


Boş nano + İ/R grubu histopatolojik olarak incelendiğinde, dokularda orta PMN infiltrasyonuna ve hafif interstisyel ödem rastlandı. Vasküler konjesyon ve hemoraji bulguları izlenmedi (Resim 4.5).



**Resim 4.5.** Boş nano + İ/R grubunun over dokusunun histopatolojik görüntüsü (H-E Boyama, x200)

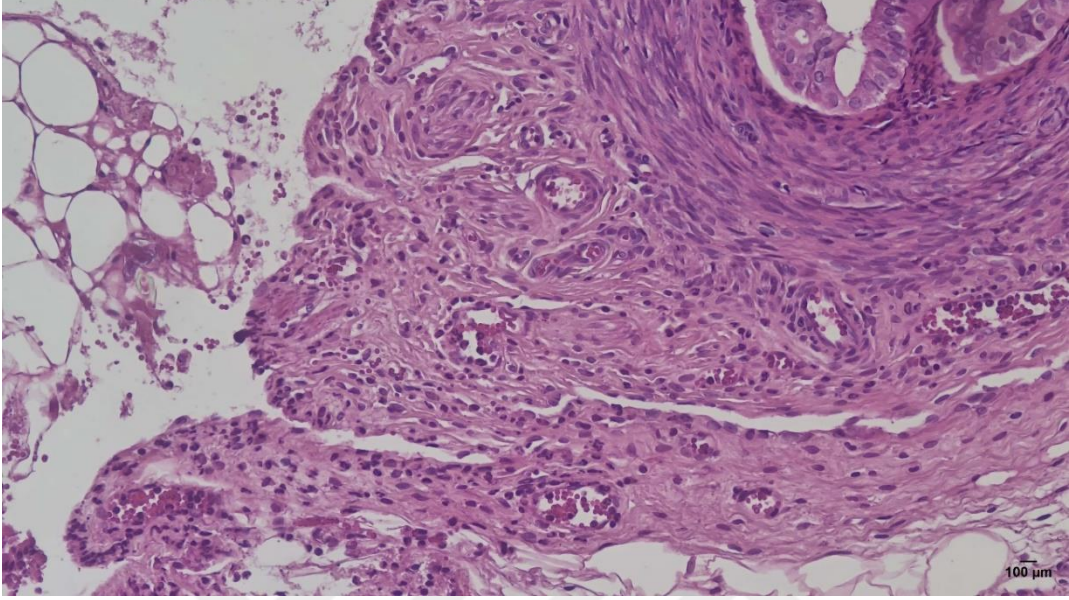
Rega 3 + İ/R grubu histopatolojik olarak incelendiğinde, şiddetli interstisyel ödem ve hafif PMN infiltrasyonu bulgularına rastlandı (Resim 4.6).



**Resim 4.6.** Rega 3 + İ/R grubunun over dokusunun histopatolojik görüntüsü (H-E boyama, X200)

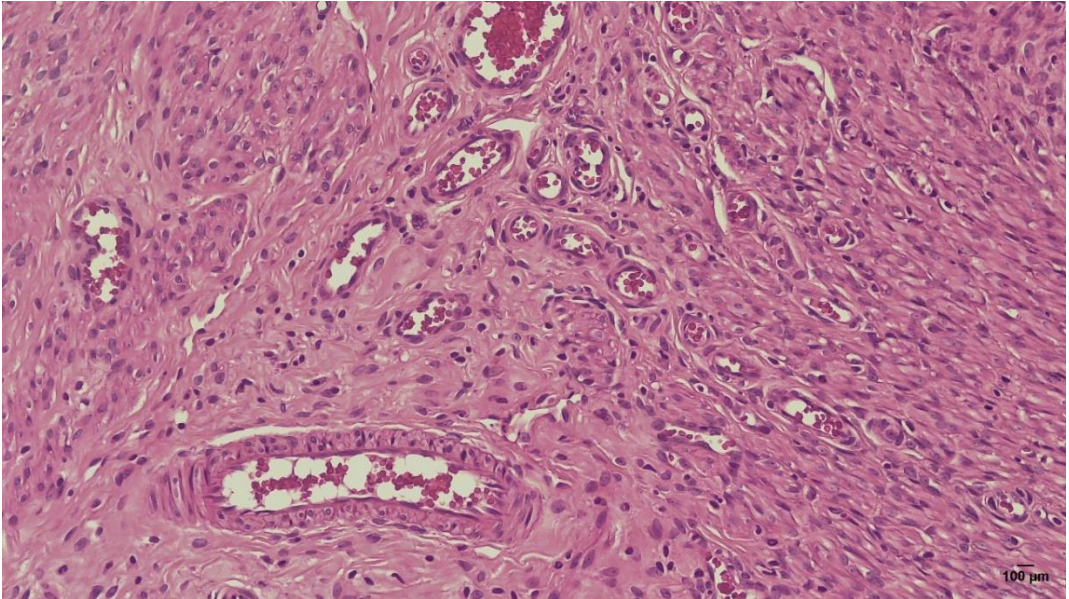


Rega 30 + İ/R grubu histopatolojik olarak incelendiğinde, orta interstisyel ödem ve hafif PMN infiltrasyonuna rastlandı. Vasküler konjesyon ve vasküler hemoraji bulgularına rastlanmadı (Resim 4.7).



**Resim 4.7.** Rega 30 + İ/R grubunun over dokusunun histopatolojik görüntüsü (H-E Boyama, x200)

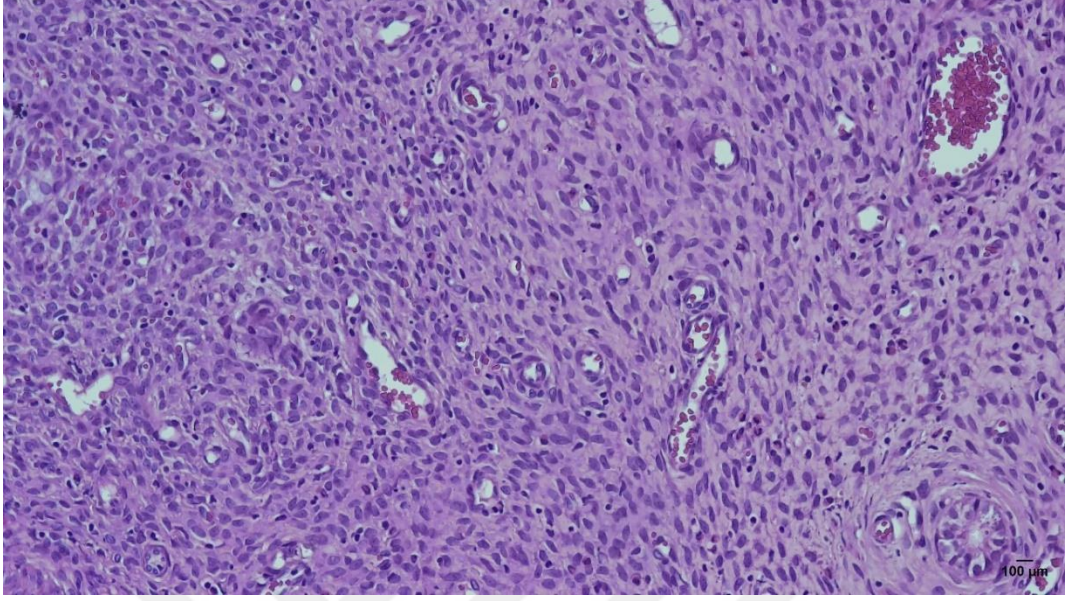
Ist 0.3 + İ/R grubu histopatolojik olarak incelendiğinde, şiddetli interstisyel ödem, şiddetli vasküler konjesyon, hafif hemoraji ile şiddetli PMN infiltrasyonuna rastlandı (Resim 4.8).



**Resim 4.8.** Ist 0.3 + İ/R grubunun over dokusunun histopatolojik görüntüsü (H-E Boyama, x200)

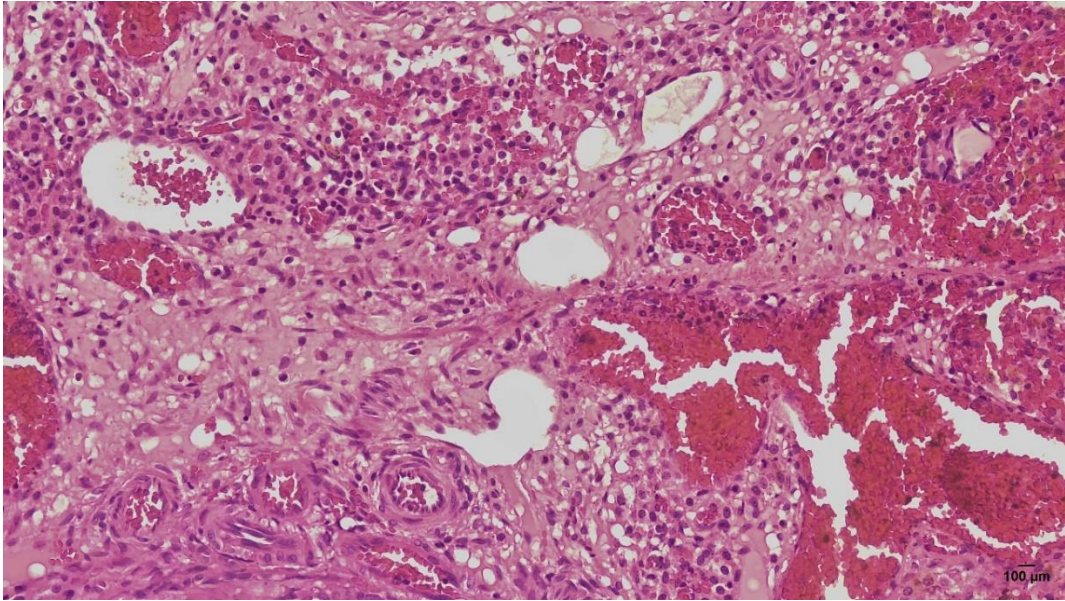


Ist 3 + İ/R grubu histopatolojik olarak incelendiğinde, şiddetli PMN infiltrasyonuna, orta vasküler konjesyona, şiddetli interstisyel ödeme ve hafif hemoraji görüldü (Resim 4.9).



**Resim 4.9.** Ist 3 + İ/R grubunun over dokusunun histopatolojik görüntüsü  
(H-E Boyama, x200)

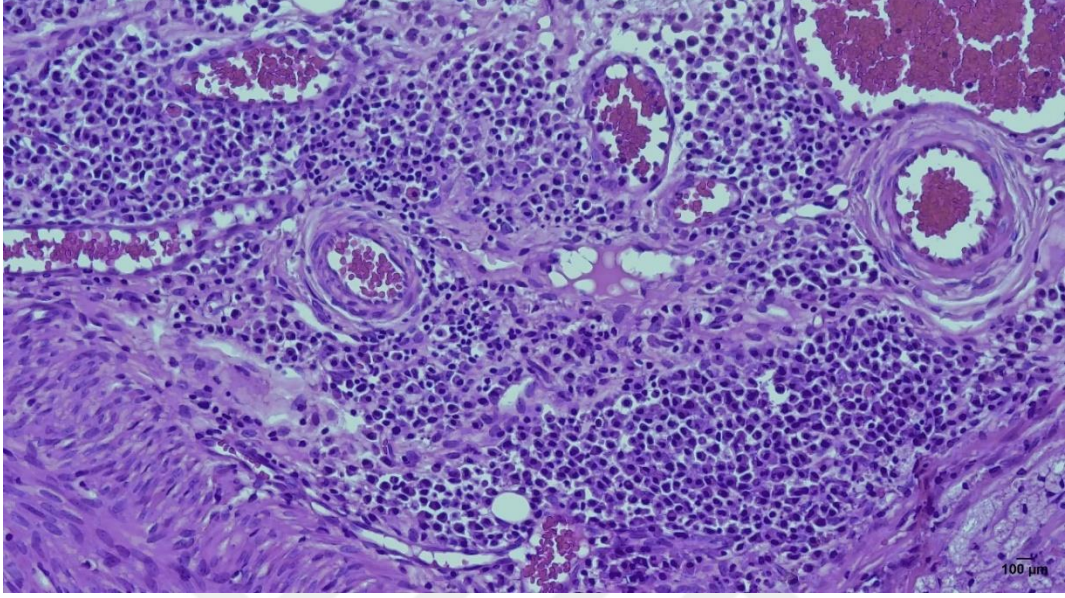
Nano Ist 3 + İ/R grubu histopatolojik olarak incelendiğinde, şiddetli interstisyel ödem, şiddetli hemoraji ve orta vasküler konjesyon ile hafif PMN infiltrasyonuna rastlandı (Resim 4.10).



**Resim 4.10.** Nano Ist 3 + İ/R grubunun over dokusunun histopatolojik görüntüsü  
(H-E Boyama, x200)

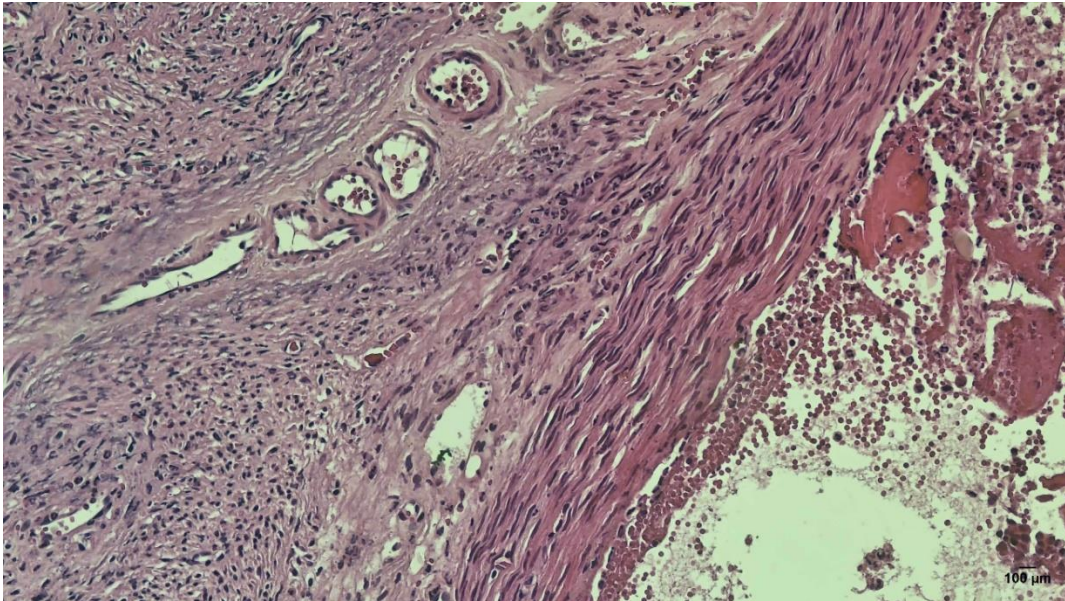


Ist 3 + Rega 30 + İ/R grubu histopatolojik olarak incelendiğinde, şiddetli vasküler konjesyon, şiddetli interstisyel ödem ve orta hemoraji ile hafif PMN infiltrasyonuna rastlandı (Resim 4.11).



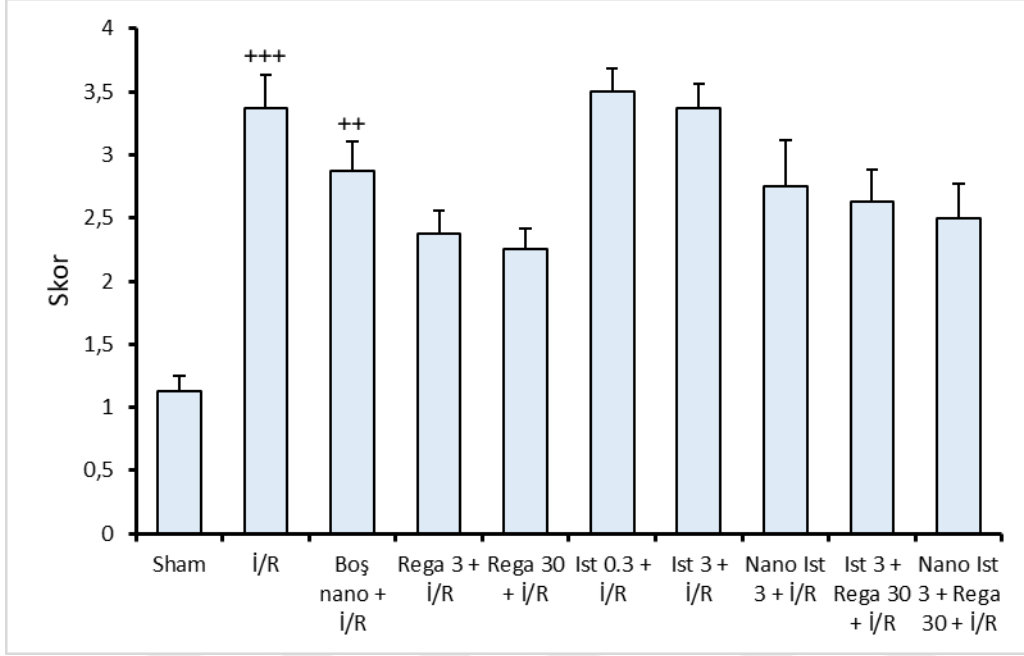
**Resim 4.11.** Ist 3 + Rega 30 + İ/R grubunun over dokusunun histopatolojik görüntüsü (H-E Boyama, x200)

Nano Ist 3 + Rega 30 + İ/R grubu histopatolojik olarak incelendiğinde, orta vasküler konjesyon, orta interstisyel ödem ve hafif PMN infiltrasyonu izlendi. Genel hatlarıyla hemoraji bulguları izlenmedi (Resim 4.12).



**Resim 4.12.** Nano Ist 3 + Rega 30 + İ/R grubunun over dokusunun histopatolojik görüntüsü (H-E Boyama x200)

Gruplara göre toplam histopatolojik skor dağılımı Şekil 4.23’de sunulmuştur. İ/R grubu ve Boş nano İ/R grubunun histopatolojik skorları Sham grubuna göre yüksektir ve bu ilişki istatistiksel olarak anlamlıdır ( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ). Diğer gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiştir ( $P>0.05$ ).



**Şekil 4.23.** Gruplara göre toplam histopatolojik skor dağılımı

Kruskal-Wallis ve sonrasında Dunn testi, ++ $P<0.01$ , +++ $P<0.001$  Sham grubuyla karşılaştırıldığında

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu deneysel çalışma ile sıçanlarda oluşturulan over İ/R modelinde adenozin A<sub>2A</sub> reseptör agonisti Regadenosonun ve adenozin A<sub>2A</sub> reseptör antagonisti İstradefilin mevcut literatür bilgilerimize dayanarak ilk kez bu çalışmada kullanılmıştır. Adenozinin; mikrovasküler kan akımının korunmasını sağladığı, nötrofilleri ve bunun sonucunda ortaya çıkan inflamatuvar kaskadı inhibe ettiği, hücre membranlarını stabilize ettiği, serbest radikallerin oluşumunu azalttığı, kalsiyum homeostazını sağlayarak birçok reperfüzyon hasarı mekanizmaları üzerinde etkisinin bulunduğu farklı çalışmalarda gösterilmiştir (65, 66, 269). Ayrıca, bu çalışmada, daha önce çalışılmamış İstradefilin nanoformülasyonunun over İ/R modelinde etkisini de ortaya konulması amaçlanmıştır. Nanotaşıyıcı şeklinde verilmesi ile istenilen bölgeyi hedefleyebilme, daha düşük toksisite ve etki etmek istediğimiz bölgede terapötik doza kolay erişim amaçlanmıştır (270). Yakın zamanda yayınlanan üç kapsamlı inceleme, nanosüspansiyon formunun kullanımı ile hedeflenen uygulama, kontrollü salınım, yüksek stabilite ve nispeten düşük toksisite gibi çok sayıda avantaj sunduğunu bildirmiştir (271-273).

Çalışmamızda, over İ/R hasarı ile selektif adenozin A<sub>2A</sub> reseptör agonisti Regadenoson ve selektif adenozin A<sub>2A</sub> reseptör antagonisti İstradefilin arasındaki ilişki araştırılmış ve bunların over İ/R hasarına karşı biyokimyasal ve histopatolojik düzeylerde koruyucu etkilerine aracılık etmede rolü olup olmadığı araştırıldı. Biyokimyasal analizler, kanda NO, MDA, tiyol/disülfid dengesi, 3-NT düzeylerinin araştırılmasını, dokuda ise, NO, SOD1, tiyol/disülfid dengesi ve 3-NT analizlerini kapsamaktadır. Ayrıca, elde edilen sonuçların korelasyon analizleri yapılmıştır. Buna ek olarak, hazırlanan boş ve İstradefilin yüklü nanosüspansiyon formlarının SEM analiziyle görüntüleri incelenmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalar, over İ/R hasarında oksidatif stresin önemli olduğunu göstermektedir (31, 44). İskemi-reperfüzyon hasarı, iskeminin anaerobik metabolizmayı uyarması ile başlar, bu da iyon kanallarında bozulmaya ve ATP üretiminin düşmesine neden olur. ATP üretiminin düşmesine rağmen ATP'nin kullanılmaya devam edilmesi ise ATP'den adenozin, inozin ve hipoksantin oluşumuna sebep olur. İskemik durum sonrası reperfüzyon sağlanması ile oksijen akışının gerçekleşmesi ksantin oksidazı oluşturur. Oluşan ksantin oksidaz, biriken hipoksantin ksantine dönüşümünü sağlayarak aşırı serbest oksijen radikali oluşumuna neden olur (31, 32). Reperfüzyon mediyatörleri olarak

bilinen bu ROS'lar hücre membran lipidlerini oksitleyerek lipidlerden aldehit ve MDA gibi toksik ürünlerin oluşmasına neden olur (31, 44, 274).

Çalışmamızda, İ/R hasarını lipid peroksidasyon ürünleri ile değerlendirmek amacıyla serum MDA düzeyleri araştırıldı. Çalışma kapsamında, etken madde yüklü olmayan boş nanotaşıyıcı verildikten sonra İ/R uygulanan grup ile yalnızca İ/R uygulanan grubun serum MDA düzeyleri Sham grubuna göre yüksek saptanmış olup her iki artışın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (sırasıyla  $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ). Diğer gruplarda İ/R'ye göre değişimler görülse de istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır ( $P>0.05$ ). İ/R hasarının patogenezinde rolü olduğu düşünülen ve kanda artışı görülen MDA'nın lipid peroksidasyonu sonucunda oluşumu birçok over İ/R çalışmasında belirtilmiştir (275, 276). Bizim çalışmamızda da, İ/R grubunda gözlenen serum MDA artışının lipid peroksidasyonuna ve dolayısıyla hücre hasarı oluşumuna neden olduğunu düşündürmektedir.

İskemi-reperfüzyon sırasında oluşan oksijen kaynaklı serbest radikaller dokularda açığa çıkar ve SOD gibi enzimatik antioksidan savunma sistemleri tarafından temizlenir. Süperoksit dismutaz (SOD),  $O_2^{\cdot-}$  radikalinin  $H_2O_2$ 'ye dönüşümünü katalize eden önemli bir enzimdir (277). Üç farklı formda bulunabilen SOD enziminin SOD1 formu çoğunlukla sitoplazmada olmak üzere nükleus ve peroksizomlarda da bulunmakla birlikte bütün hücre tiplerinde görülmektedir (138, 201). Çalışmamızda doku SOD1 düzeyleri incelendiğinde, gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmıştır. En düşük değer İ/R grubunda görülmüş olup en yüksek değer İstradefilin'in nanotaşıyıcı şeklinde uygulandığı kombine tedavi grubunda saptanmıştır. İ/R grubunun doku SOD1 düzeyi, Sham grubuna göre daha düşüktür ( $P<0.05$ ). Yüksek doz Regadenoson grubu ve boş nano uygulanan grubun SOD1 düzeylerinde, İ/R grubuna göre yükselme olsa da fark anlamlı değildir. Diğer tedavi gruplarında, SOD1 düzeyi İ/R uygulanan gruba göre yüksek bulunmuştur ve fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Çalışmamızda ayrıca, nanotaşıyıcı kullanılan kombine tedavi ile tek başına Regadenoson uygulaması karşılaştırıldığında kombine nano tedavi grubunun doku SOD1 düzeyi daha yüksek bulunmuştur ( $P<0.01$ ).

Nitrozatif stres, oksidatif stres ile yakından ilişkilidir. Oksidatif streste rol oynayan süperoksit anyonu ( $O_2^{\cdot-}$ ), singlet oksijen ( $^1O_2$ ), hidroksil radikali ( $\cdot OH$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), peroksinitrit anyonu ( $ONOO^-$ ) ve nitrik oksit (NO) gibi ROS ve RNS oluşum ve



temizlenme yollarıyla örtüşür ve karşılıklı olarak birbirlerini düzenler (278). Üretilen  $\text{ONOO}^-$ , 3-nitrotirozin (3-NT) oluşturmak için proteinler, lipitler ve DNA dahil olmak üzere çeşitli biyomolekülleri nitratlayabilir. Nitrozatif stresin en önemli özelliği tirozin nitrasyonudur. Protein nitrasyon modifikasyonu, proteinlerin RNS/ROS ile etkileşiminden kaynaklanan post-translasyonel bir modifikasyondur (279). Son yıllarda yapılan çeşitli çalışmalar 3-NT oluşumunun nitrozatif stresin spesifik bir biyobelirteci olduğunu göstermiştir (280, 281).

Çalışmamızda, İ/R uygulanan grupta saptanan serum 3-NT düzeyi Sham grubuna göre anlamlı olarak yükselmiştir ( $P<0.05$ ). Kombine tedavi uygulanan her iki grupta da yüksek doz Regadenoson uygulanan gruba kıyasla yüksek serum 3-NT düzeyleri saptanmıştır ( $P<0.001$ ). Ancak, yüksek doz Regadenoson uygulanan grupta serum 3-NT düzeyinin, İ/R grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı bulunmuştur ( $P<0.05$ ).

Bu çalışmada, serum 3-NT düzeyleri ile birlikte doku 3-NT düzeyleri de çalışılmış olup yine İ/R grubunda gözlenen doku 3-NT düzeyinin Sham grubuna göre oldukça yüksek olduğu saptanmıştır ( $P<0.001$ ). Elde ettiğimiz bulgular, Boş nano + İ/R ile birlikte Rega 30 + İ/R grubunun, Nano Ist 3 + İ/R grubunun ve Nano Ist 3 + Rega 30 + İ/R grubunun doku 3-NT düzeyinin İ/R uygulanan gruba göre anlamlı olarak düşük olduğu bulunmuştur. Bu bulgulara göre, yüksek doz Regadenoson uygulanan grubu İ/R grubu ile kıyasladığımızda; hem serum 3-NT hem de doku 3-NT düzeylerini azaltmada etkili olduğu gözlemlenmiştir.

İskemi-Reperfüzyon hasarı, ROS'a ek olarak endotelial faktör NO'yu da içeren karmaşık bir mekanizma aracılığıyla oluşturulur. Hasarı tetikleyen olayın endotel hücrelerindeki hasardan kaynaklandığını belirten çalışmalar mevcuttur. NO, NOS enziminden sentezlenir. Genellikle üç nitrik oksit sentaz (NOS) izoformu vardır: endotelial NOS (eNOS), indüklenebilir NOS (iNOS) ve nöronal NOS (nNOS). Sıçan overlerinde iki tip NOS izoformu (iNOS ve eNOS) baskın olarak bulunmaktadır (282-284). Hücre içi NO konsantrasyonunun aşırı yükselmesi, özellikle ROS oluşumu ve peroksinitrit gibi daha zararlı ürünlerin üretilmesi ile hücre ölümüne yol açan toksik olayların başlamasına neden olur (46).

Çalışmamızda, Boş nano + İ/R grubunda serum NO düzeyinin Sham grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Ayrıca, yüksek doz Regadenoson uygulanan grupta saptanan NO düzeyinin ise İ/R grubuna göre düşük olduğu ve bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ( $P<0.05$ ).

Over İ/R hasarı üzerine sıçanlarda yapılan bazı çalışmalarda, İ/R uygulanan grup ile sham grubu karşılaştırıldığında, İ/R grubunda eNOS ekspresyonunda azalma ile birlikte iNOS ekspresyonunda artış olduğu gözlenmiştir (49, 126). Ayrıca, NO'nun iskemi sırasında ilgili NOS izoformunun ekspresyonuna bağlı olarak koruyucu veya toksik olabileceği gösterilmiştir (285).

Ali ve ark. (126) tarafından over İ/R hasarı üzerine yapılan bir çalışmada, İ/R uygulanan grupta elde edilen yüksek NO seviyesinin artmış iNOS izoformuna bağlı olabildiği ve eNOS tarafından üretilen NO'nun apoptozu azalttığı ve koruma sağladığı bildirilmiştir. Buna karşın, iNOS'tan kaynaklanan NO'nun patolojik konsantrasyonları apoptozu indüklemiş ve toksik sonuçlara neden olmuştur. Ayrıca, yüksek NO üretiminin agresif ve güçlü hücresel oksidan ürün olan peroksinitrit oluşumuyla sonuçlanması nedeniyle NO'nun serbest radikal oluşumunun kaynağı olduğu bildirilmiştir (46).

Doku NO düzeylerinin araştırılması amacıyla yaptığımız çalışmada, etken madde yüklü olmayan boş nano uygulanan grubun NO düzeyinin, Sham grubuna göre yüksek olduğu saptanmıştır ( $P<0.01$ ). Yüksek doz Regadenoson ve düşük doz İstradefilin uygulanan grup, İ/R grubuyla karşılaştırıldığında doku NO düzeyinin yüksek olduğu bulunmuştur ( $P<0.01$ ). Kombine tedavi uygulanan gruplarda ölçülen doku NO düzeylerinin yüksek doz Regadenoson grubu, etken madde yüklü olmayan boş nano grubu ve yüksek doz İstradefilin grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır. Ayrıca, İstradefilin yüklü nanotaşıyıcı ile Regadenosonun kombine olarak uygulandığı grupta İstradefilin yüklü nanotaşıyıcı olarak uygulanan gruba göre doku NO düzeyinde düşüşe neden olduğu bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Bu ölçüm sonuçları kapsamında, kombine tedavilerin dokuda yüksek NO'yu düşürmede daha etkili olduğu gözlenmiştir.

Dinamik tiyol/disülfid homeostazı çeşitli patolojilerde rol oynar. Tiyol/disülfid homeostazı; protein fonksiyonunun düzenlenmesi, protein yapısının stabilizasyonu, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, apoptoz, proteinlerin sistein kalıntılarının geri

dönüşümsüz oksidasyonuna karşı korunması, transkripsiyon ve hücrel sinyal iletim mekanizmaları dahil olmak üzere çeşitli biyokimyasal süreçlerde kritik rol oynar (286-288).

Atasever ve Bakacak (289) tarafından yapılan bir çalışmada, over torsiyonunda tiyol/disülfid dengesi araştırılmıştır. Total tiyol ve doğal tiyol seviyeleri İ/R grubunda sham grubuna kıyasla daha düşük bulunmuştur. Ayrıca, aynı grupta disülfid düzeyleri ve disülfid/tiyol indeksleri sham grubuna kıyasla daha yüksek bulunsada bu değerlerin anlamlı olmadığı belirtilmiştir.

Gruplar arasında serum total tiyol seviyeleri karşılaştırıldığında, İstradefilin yüklü nanotaşıyıcının Regadenoson ile kombine edildiği grubun etken madde yüklü olmayan nanotaşıyıcı uygulanan gruba göre azaldığı saptanmıştır ( $P<0.05$ ). Serum doğal tiyol seviyeleri, İ/R grubunda belirgin şekilde baskılandı ancak Regadenoson tarafından doza bağımlı bir şekilde eski haline döndü. Kombine uygulanan tedaviler yüksek doz Regadenoson grubuna kıyasla anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur. İ/R grubunda serum disülfid seviyeleri artmış bulundu ve bu artış yüksek doz Regadenoson ile inhibe edildi ( $P<0.05$ ). İ/R grubunda serum doğal tiyol/total tiyol oranı azaldı ve yüksek doz Regadenoson ile bu azalma oldukça güçlü bir şekilde önleildi ( $P<0.01$ ). Serum disülfid/total tiyol ve serum disülfid/doğal tiyol oranları İ/R grubunda önemli ölçüde yüksekti ve bu artışlar yüksek doz Regadenoson ile inhibe edildi (sırasıyla  $P<0.001$ ,  $P<0.01$ ). İstradefilin ön tedavisinin her iki kombine uygulamada da Regadenoson etkilerini ortadan kaldırdığı gözlenmiştir. Çalışmamızda, İ/R grubu ve İstradefilin yüklü nanotaşıyıcı + İ/R grubunda artan doku total tiyol düzeylerinin etken madde yüklü olmayan boş nano taşıyıcıları tarafından anlamlı derecede düşürüldüğü saptanmıştır. Doku doğal tiyol düzeylerinin İstradefilin yüklü nanotaşıyıcı grubunda hem İstradefilin uygulanan gruba göre hem boş nanotaşıyıcı uygulanan gruba göre anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca, ölçümlerini yaptığımız doku disülfid, doku doğal tiyol/total tiyol oranı ve doku disülfid/total tiyol oranları bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır. Doku disülfid/doğal tiyol oranlarında ise İstradefilin yüklü nanotaşıyıcı grubunda ve İstradefilin ile Regadenosonun kombine uygulandığı grupta İstradefilin uygulanan gruba göre anlamlı olarak düşük olduğu saptanmıştır.

Bunlara ek olarak, çalışmamızda, sıçanların over İ/R deneyleri sonunda serum ve dokudan elde edilen veriler arasında korelasyon analizleri yapılmıştır. Düşük doz uygulanan Regadenoson grubunda serum doğal tiyol düzeyleri ile serum disülfid düzeyleri arasında negatif korelasyon, doku total tiyol düzeyleri ile doku doğal tiyol düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Yüksek doz uygulanan Regadenoson grubunda doku total tiyol düzeyleri ile doku doğal tiyol düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Düşük doz uygulanan İstradefilin grubunda serum total tiyol düzeyleri ile serum disülfid düzeyleri arasında pozitif korelasyon, serum doğal tiyol düzeyleri ile doku NO düzeyleri arasında negatif korelasyon saptanmıştır. Yüksek doz uygulanan İstradefilin grubunda serum total tiyol düzeyleri ile serum disülfid düzeyleri arasında ve doku total tiyol düzeyleri ile doku doğal tiyol düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Yine bu grupta, serum total tiyol düzeyleri ile doku 3-NT düzeyleri arasında ve serum disülfid düzeyleri ile doku total tiyol düzeyleri arasında ayrıca serum disülfid düzeyleri ile doku 3-NT düzeyleri arasında negatif korelasyon saptanmıştır. Nanotaşıyıcı şeklinde verilen yüksek doz İstradefilin grubunda serum total tiyol düzeyleri ile serum disülfid düzeyleri arasında, serum disülfid düzeyleri ile serum NO düzeyleri arasında, serum disülfid ile doku SOD1 ayrıca doku total tiyol ile doku doğal tiyol düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Bu grupta, serum doğal tiyol ile doku SOD1 ayrıca serum doğal tiyol ile serum 3-NT arasında negatif korelasyon saptanmıştır. Kombine uygulanan gruplardan yüksek doz İstradefilin ve yüksek doz Regadenoson grubunda serum total tiyol ile serum disülfid, doku total tiyol ile doku doğal tiyol arasında ayrıca doku doğal tiyol ile doku NO arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Bu grupta, doku disülfid ile doku NO arasında ayrıca serum NO ile doku SOD1 arasında negatif korelasyon saptanmıştır. Yüksek doz olarak uygulanan nanotaşıyıcı İstradefilin ve yüksek doz Regadenoson uygulanan kombine tedavi serum total tiyol ile serum MDA, serum total tiyol ile serum 3-NT, serum total tiyol ile serum disülfid, serum disülfid ile serum MDA ayrıca doku total tiyol ile doku doğal tiyol arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Bu grupta, doku doğal tiyol ile doku SOD1 düzeyleri arasında negatif korelasyon saptanmıştır.

Histopatolojik skorlar karşılaştırıldığında ise, İ/R grubu ve Boş nano İ/R grubunun histopatolojik skorlarının Sham grubuna göre yüksek olduğu ve bu ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu saptadık ( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ). Diğer gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiştir ( $P>0.05$ ).

İskemi-reperfüzyon modeli için literatürde farklı süreler uygulanmış olsa da biz en sık kullanılan 2 saat iskemi ve sonrasında 2 saat reperfüzyon ile oluşturulan modeli tercih edilmiştir (268). Oksidatif enzimlerde ve lipid peroksidasyonunda artış, hedef dokuda oksidatif stresin geliştiğini ortaya koymaktadır. Çalışmamızda sadece iskemi öncesi ilaç uygulaması yapılmış olması ve adenosin reseptör agonisti ve antagonisti olmayan diğer kimyasal ajanlarla karşılaştırma yapılmamış olması çalışmamızın limitasyonları arasında sayılabilir. Mevcut bulgular, farklı torsiyon süreleri, farklı torsiyon yöntemi ve iskemi sonrası uygulamalar ile genişletilerek desteklenebilir. Adenosin A<sub>2A</sub> reseptörü dışındaki diğer adenosin reseptörlerinin agonist ve antagonistlerinin over I/R reperfüzyon hasarı üzerindeki etkileri de henüz çalışılmamıştır.

Yaptığımız çalışmanın, adenosin A<sub>2A</sub> reseptör agonisti Regadenoson ve adenosin A<sub>2A</sub> reseptör antagonisti İstradefilinin etkilerinin birlikte araştırıldığı ve beraberinde nanoformülasyon ile desteklenerek hem serumda hem de dokuda ölçümleri ile literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz. Saptanan sonuçların over I/R hasarı açısından rolünün daha iyi anlaşılması için daha geniş kapsamlı deneysel çalışmalar yapılması önerilmektedir. Deney sonunda elde edilen verilerin gelecekte yapılması planlanan deneysel çalışmalar için yol gösterici olması beklenmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Sutton JB. Salpingitis and some of its effects. *The Lancet*. 1890;136(3510):1206-1209.
2. McWilliams GD, Hill MJ, Dietrich CS, 3rd. Gynecologic emergencies. *Surg Clin North Am*. 2008;88(2):265-283.
3. Rock J, Thompson J. Surgery for benign disease of the ovary. *Oper Gynecol*. 2003;648:649.
4. Hyttel TE, Bak GS, Larsen SB, Lokkegaard EC. Re-torsion of the ovaries. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2015;94(3):236-244.
5. Guile SL, Mathai JK. Ovarian Torsion. *StatPearls*. Treasure Island (FLZ)2022.
6. Beyazit F, Buyuk B, Turkon H, Elmas S, Uzun M. Adalimumab mitigates ovarian ischemia-reperfusion injury in rats by regulating oxidative stress, apoptosis and resolution of inflammation. *J Obstet Gynaecol Res*. 2019;45(2):358-367.
7. Bacanakgil BH, Kaban I, Deveci M, Hasanova M. Ovarian Torsion: 10 Years' Experience of a Tertiary Medical Center. *Istanbul Medical Journal*. 2018;19(3):258-262.
8. Huang C, Hong MK, Ding DC. A review of ovary torsion. *Tzu Chi Med J*. 2017;29(3):143-147.
9. Bertozzi M, Esposito C, Vella C, Briganti V, Zampieri N, Codrich D, Ubertaini M, Trucchi A, Magrini E, Battaglia S, Bini V, Conighi ML, Gulia C, Farina A, Camoglio FS, Rigamonti W, Gamba P, Riccipetitoni G, Chiarenza SF, Inserra A, Appignani A. Pediatric Ovarian Torsion and its Recurrence: A Multicenter Study. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2017;30(3):413-417.
10. Becker JH, de Graaff J, Vos MC. Torsion of the ovary: a known but frequently missed diagnosis. *Eur J Emerg Med*. 2009;16(3):124-126.
11. Nasiri A, Rahimi S, Tomlinson E. Ovarian torsion in pregnancy: A case report. *Gynecol Obstet Case Rep*. 2017;3:2.
12. Mathew M, Al Ghaithi H, Al Shukaili S, Shivrudraiah G. Torsion of normal adnexa in the third trimester of pregnancy mimicking acute appendicitis. *EMJ Repro Health*. 2017;3[1]:54-56.
13. Houry D, Abbott JT. Ovarian torsion: a fifteen-year review. *Ann Emerg Med*. 2001;38(2):156-159.

14. Poonai N, Poonai C, Lim R, Lynch T. Pediatric ovarian torsion: case series and review of the literature. *Can J Surg*. 2013;56(2):103-108.
15. Adeyemi-Fowode O, McCracken KA, Todd NJ. Adnexal Torsion. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2018;31(4):333-338.
16. Kives S, Gascon S, Dubuc E, Van Eyk N. No. 341-Diagnosis and Management of Adnexal Torsion in Children, Adolescents, and Adults. *J Obstet Gynaecol Can*. 2017;39(2):82-90.
17. Ashwal E, Krissi H, Hirsch L, Less S, Eitan R, Peled Y. Presentation, Diagnosis, and Treatment of Ovarian Torsion in Premenarchal Girls. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2015;28(6):526-529.
18. Cohen A, Solomon N, Almog B, Cohen Y, Tsafrir Z, Rimon E, Levin I. Adnexal Torsion in Postmenopausal Women: Clinical Presentation and Risk of Ovarian Malignancy. *J Minim Invasive Gynecol*. 2017;24(1):94-97.
19. Sasaki KJ, Miller CE. Adnexal torsion: review of the literature. *J Minim Invasive Gynecol*. 2014;21(2):196-202.
20. Kolluru V, Gurumurthy R, Vellanki V, Gururaj D. Torsion of ovarian cyst during pregnancy: a case report. *Cases J*. 2009;2:9405.
21. Li C, Wang S, Tao X, Hu Y, Li X, Xiao X. Torsion of normal-sized ovary during late pregnancy: A case report and review of the literature. *J Obstet Gynaecol Res*. 2018;44(11):2110-2114.
22. Singh T, Prabhakar N, Singla V, Bagga R, Khandelwal N. Spectrum of magnetic resonance imaging findings in ovarian torsion. *Pol J Radiol*. 2018;83:e588-e599.
23. Lourenco AP, Swenson D, Tubbs RJ, Lazarus E. Ovarian and tubal torsion: imaging findings on US, CT, and MRI. *Emerg Radiol*. 2014;21(2):179-187.
24. Geimanaite L, Trainavicius K. Ovarian torsion in children: management and outcomes. *J Pediatr Surg*. 2013;48(9):1946-1953.
25. Dahmouh H, Anupindi SA, Pawel BR, Chauvin NA. Multimodality imaging findings of massive ovarian edema in children. *Pediatr Radiol*. 2017;47(5):576-583.
26. Oelsner G, Cohen SB, Soriano D, Admon D, Mashiach S, Carp H. Minimal surgery for the twisted ischaemic adnexa can preserve ovarian function. *Hum Reprod*. 2003;18(12):2599-2602.

27. Tsafirir Z, Hasson J, Levin I, Solomon E, Lessing JB, Azem F. Adnexal torsion: cystectomy and ovarian fixation are equally important in preventing recurrence. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012;162(2):203-205.
28. Nur Azurah AG, Zainol ZW, Zainuddin AA, Lim PS, Sulaiman AS, Ng BK. Update on the management of ovarian torsion in children and adolescents. *World J Pediatr.* 2015;11(1):35-40.
29. Weng X, Xie X, Liu C, Hong X, Yi J. Ovarian preservation and prognosis in adnexal torsion surgery - a retrospective analysis. *Ginekol Pol.* 2020;91(5):277-280.
30. Cowled P, Fitridge R. Pathophysiology of Reperfusion Injury. İçinde: Fitridge R, Thompson M (Editörler). *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists.* Adelaide (AU)2011.
31. Kirmizi DA, Baser E, Okan A, Kara M, Yalvac ES, Doganyigit Z. The effect of a natural molecule in ovary ischemia reperfusion damage: does lycopene protect ovary? *Exp Anim.* 2021;70(1):37-44.
32. Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai AP, Cheng YL, Cheng PW, Li CY, Li CJ. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem.* 2018;46(4):1650-1667.
33. Gottlieb RA. Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2011;16(3-4):233-238.
34. Rodriguez-Lara SQ, Cardona-Munoz EG, Ramirez-Lizardo EJ, Totsuka-Sutto SE, Castillo-Romero A, Garcia-Cobian TA, Garcia-Benavides L. Alternative Interventions to Prevent Oxidative Damage following Ischemia/Reperfusion. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:7190943.
35. Lagana AS, Sofo V, Salmeri FM, Palmara VI, Triolo O, Terzic MM, Patrelli TS, Lukanovic A, Bokal EV, Santoro G. Oxidative Stress during Ovarian Torsion in Pediatric and Adolescent Patients: Changing The Perspective of The Disease. *Int J Fertil Steril.* 2016;9(4):416-423.
36. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;284(1):G15-26.
37. Arkadopoulos N, Defterevos G, Nastos C, Papalois A, Kalimeris K, Papoutsidakis N, Kampouroglou G, Kypriotis D, Pafiti A, Kostopanagiotou G, Smyrniotis V. Development of a porcine model of post-hepatectomy liver failure. *J Surg Res.* 2011;170(2):e233-242.



38. Douzinas EE, Livaditi O, Tasoulis MK, Prigouris P, Bakos D, Goutas N, Vlachodimitropoulos D, Andrianakis I, Betrosian A, Tsoukalas GD. Nitrosative and oxidative stresses contribute to post-ischemic liver injury following severe hemorrhagic shock: the role of hypoxemic resuscitation. *PLoS One*. 2012;7(3):e32968.
39. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med*. 2011;17(11):1391-1401.
40. Wallace KL, Linden J. Adenosine A2A receptors induced on iNKT and NK cells reduce pulmonary inflammation and injury in mice with sickle cell disease. *Blood*. 2010;116(23):5010-5020.
41. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation*. 2005;112(17):2660-2667.
42. Park SW, Kim M, Brown KM, D'Agati VD, Lee HT. Paneth cell-derived interleukin-17A causes multiorgan dysfunction after hepatic ischemia and reperfusion injury. *Hepatology*. 2011;53(5):1662-1675.
43. Bashandy MA, Badawy Khair NS. Ischemia–reperfusion induced injury of rat ovary and the possible protective effect of amlodipine: Histological, immunohistochemical and biochemical study. *Egyptian Journal of Histology*. 2018;41(4):487-502.
44. Sahin N, Isaoglu U, Suleyman B, Yazici GN, Coban TA, Uzel K, Suleyman H, Arslan V. The effect of carvacrol on oxido-inflammatory ovarian injury and infertility induced by ischemia-reperfusion in rats. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2022;49(3):058.
45. Huang R, Zhang C, Wang X, Hu H. PPARgamma in Ischemia-Reperfusion Injury: Overview of the Biology and Therapy. *Front Pharmacol*. 2021;12:600618.
46. Refaie MMM, El-Hussieny M. Protective effect of pioglitazone on ovarian ischemia reperfusion injury of female rats via modulation of peroxisome proliferator activated receptor gamma and heme-oxygenase 1. *Int Immunopharmacol*. 2018;62:7-14.
47. Uludag O, Dogukan M, Duran M, Annac E. Effects of Prostaglandin Analogue Iloprost Treatment on Distant Organ Damage Following Ovarian Ischemia/Reperfusion Injury in Rats: An Experimental Study. *Cureus*. 2020;12(6):e8695.

48. Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol.* 2015;6:524-551.
49. Pinar N, Soylu Karapinar O, Ozcan O, Atik Dogan E, Bayraktar S. Protective effects of tempol in an experimental ovarian ischemia-reperfusion injury model in female Wistar albino rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2017;95(7):861-865.
50. Zuidema MY, Zhang C. Ischemia/reperfusion injury: The role of immune cells. *World J Cardiol.* 2010;2(10):325-332.
51. Dokuyucu R, Karateke A, Gokce H, Kurt RK, Ozcan O, Ozturk S, Tas ZA, Karateke F, Duru M. Antioxidant effect of erdosteine and lipoic acid in ovarian ischemia-reperfusion injury. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2014;183:23-27.
52. Gupta RK, Patel AK, Shah N, Chaudhary AK, Jha UK, Yadav UC, Gupta PK, Pakuwal U. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(11):4405-4409.
53. Snezhkina AV, Kudryavtseva AV, Kardymon OL, Savvateeva MV, Melnikova NV, Krasnov GS, Dmitriev AA. ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:6175804.
54. Turk E, Karaca I, Ozcinar E, Celebiler A, Aybek H, Ortac R, Guven A. The effect of hypothermia on adnexal torsion/detorsion injury in a rat ovary model. *J Pediatr Surg.* 2015;50(8):1378-1381.
55. Raedschelders K, Ansley DM, Chen DD. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol Ther.* 2012;133(2):230-255.
56. Kvietys PR, Granger DN. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radic Biol Med.* 2012;52(3):556-592.
57. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2012;298:229-317.
58. Adwas AA, Elsayed A, Azab A, Quwaydir F. Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *J Appl Biotechnol Bioeng.* 2019;6(1):43-47.
59. Sahin C, Yildirim N, Hortu I, Akdemir A, Ozsener S, Yigitturk G, Erbas O. Tadalafil attenuates ischemic damage as well as reperfusion injury in the rat ovary. *J Turk Ger Gynecol Assoc.* 2020;21(1):35-40.

60. Bektas G, Karasu Y, Yurtcu E, Togrul C, Sen SÖ, Dirican AO, Uzunlar O, Gungor T, Caydere M. Effect of doxycycline on aseptic reperfusion injury in ovarian torsion. *Gynecology Obstetrics & Reproductive Medicine*. 2019;25(1):38-43.
61. Ozlem K, Birkan Y, Mustafa K, Emin K. Protective effect of Vaccinium myrtillus on ischemia- reperfusion injury in rat ovary. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2018;57(6):836-841.
62. Tokgoz VY, Sipahi M, Keskin O, Guvendi GF, Takir S. Protective effects of vitamin D on ischemia-reperfusion injury of the ovary in a rat model. *Iran J Basic Med Sci*. 2018;21(6):593-599.
63. Mustafa SJ, Morrison RR, Teng B, Pelleg A. Adenosine receptors and the heart: role in regulation of coronary blood flow and cardiac electrophysiology. *Handb Exp Pharmacol*. 2009(193):161-188.
64. Liu H, Xia Y. Beneficial and detrimental role of adenosine signaling in diseases and therapy. *J Appl Physiol (1985)*. 2015;119(10):1173-1182.
65. Laubach VE, French BA, Okusa MD. Targeting of adenosine receptors in ischemia-reperfusion injury. *Expert Opin Ther Targets*. 2011;15(1):103-118.
66. Forman MB, Stone GW, Jackson EK. Role of adenosine as adjunctive therapy in acute myocardial infarction. *Cardiovasc Drug Rev*. 2006;24(2):116-147.
67. Borea PA, Gessi S, Merighi S, Vincenzi F, Varani K. Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. *Physiol Rev*. 2018;98(3):1591-1625.
68. Wilson CN, Nadeem A, Spina D, Brown R, Page CP, Mustafa SJ. Adenosine receptors and asthma. *Handb Exp Pharmacol*. 2009(193):329-362.
69. Dettori I, Gaviano L, Ugolini F, Lana D, Bulli I, Magni G, Rossi F, Giovannini MG, Pedata F. Protective Effect of Adenosine A(2B) Receptor Agonist, BAY60-6583, Against Transient Focal Brain Ischemia in Rat. *Front Pharmacol*. 2020;11:588757.
70. Fredholm BB. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ*. 2007;14(7):1315-1323.
71. IJzerman AP, Jacobson KA, Müller CE, Cronstein BN, Cunha RA. International union of basic and clinical pharmacology. CXII: adenosine receptors: a further update. *Pharmacol Rev*. 2022;74(2):340-372.
72. Wineski LE. *Snell's Clinical anatomy by regions*. Tenth edition. Wolters Kluwer Health, 2019.

73. Chung KW, Chung HM, Halliday NL. Gross anatomy. Board review series, Eighth edition. baskı. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 2015.
74. Marieb EN, Hoehn K. Human anatomy & physiology. Twelfth edition. Global edition. baskı. Upper Saddle River: Pearson, 2022.
75. Drake RL. Gray's anatomy for students. 4th edition. baskı. Philadelphia, MO: Elsevier, 2019.
76. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. The developing human : clinically oriented embryology. 10th edition. baskı. Philadelphia, PA: Elsevier, 2016.
77. Sadler TW, Sadler-Richmond SL, Sadler-Redmond SL, Tosney K, Byrne J, Imseis H. Langman's medical embryology. Fourteenth edition. baskı. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer, 2019.
78. Mescher AL. The Female Reproductive System.İçinde: Weitz M (Editör). Junqueira's Basic Histology Text and Atlas, 16e. New York, NY: McGraw Hill, 2021: s.460-469.
79. Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. Hum Reprod Update. 2012;18(1):73-91.
80. Hall JE. Guyton and hall textbook of medical physiology. 14. baskı. Philadelphia: Elsevier, 2020.
81. Barrett KE, Barman SM, Yuan JXJ, Brooks H. Ganong's Review of Medical Physiology (Review Questions). McGraw-Hill's AccessMedicine, 26th edition baskı. New York, N.Y: McGraw-Hill Education LLC, 2019.
82. Widmaier EP, Vander AJ. Vander's human physiology : the mechanisms of body function. Fifteenth edition / baskı. New York, NY: McGraw-Hill Education, 2019.
83. Kumar P, Sait SF. Luteinizing hormone and its dilemma in ovulation induction. J Hum Reprod Sci. 2011;4(1):2-7.
84. Maynard RL, Downes N. Anatomy and histology of the laboratory rat in toxicology and biomedical research. London, United Kingdom: Elsevier/Academic Press, 2019.
85. Suckow MA, Hankenson FC, Wilson RP, Foley PL, Science D. The laboratory rat. American College of Laboratory Animal Medicine series, Third edition. baskı. London, United Kingdom: Academic Press, an imprint of Elsevier, 2020.
86. Parker GA PC. Atlas of histology of the juvenile rat. Boston, MA: Elsevier, 2016.
87. Huchon C, Fauconnier A. Adnexal torsion: a literature review. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2010;150(1):8-12.

88. Kumari I, Kaur S, Mohan H, Huria A. Adnexal masses in pregnancy: a 5-year review. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2006;46(1):52-54.
89. Condous G, Khalid A, Okaro E, Bourne T. Should we be examining the ovaries in pregnancy? Prevalence and natural history of adnexal pathology detected at first-trimester sonography. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2004;24(1):62-66.
90. Asfour V, Varma R, Menon P. Clinical risk factors for ovarian torsion. *J Obstet Gynaecol.* 2015;35(7):721-725.
91. Mahonski S, Hu KM. Female Nonobstetric Genitourinary Emergencies. *Emerg Med Clin North Am.* 2019;37(4):771-784.
92. Smorgick N, Pansky M, Feingold M, Herman A, Halperin R, Maymon R. The clinical characteristics and sonographic findings of maternal ovarian torsion in pregnancy. *Fertil Steril.* 2009;92(6):1983-1987.
93. Albayram F, Hamper UM. Ovarian and adnexal torsion: spectrum of sonographic findings with pathologic correlation. *J Ultrasound Med.* 2001;20(10):1083-1089.
94. Focseneanu MA, Omurtag K, Ratts VS, Merritt DF. The auto-amputated adnexa: a review of findings in a pediatric population. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2013;26(6):305-313.
95. Oltmann SC, Fischer A, Barber R, Huang R, Hicks B, Garcia N. Pediatric ovarian malignancy presenting as ovarian torsion: incidence and relevance. *J Pediatr Surg.* 2010;45(1):135-139.
96. Cass DL. Ovarian torsion. *Semin Pediatr Surg.* 2005;14(2):86-92.
97. Tsai J, Lai JY, Lin YH, Tsai MH, Yeh PJ, Chen CL, Chang YJ. Characteristics and Risk Factors for Ischemic Ovary Torsion in Children. *Children (Basel).* 2022;9(2):206.
98. Melcer Y, Maymon R, Pekar-Zlotin M, Pansky M, Smorgick N. Clinical and sonographic predictors of adnexal torsion in pediatric and adolescent patients. *J Pediatr Surg.* 2018;53(7):1396-1398.
99. Anthony EY, Caserta MP, Singh J, Chen MY. Adnexal masses in female pediatric patients. *AJR Am J Roentgenol.* 2012;198(5):W426-431.
100. Wilkinson C, Sanderson A. Adnexal torsion -- a multimodality imaging review. *Clin Radiol.* 2012;67(5):476-483.
101. Chang HC, Bhatt S, Dogra VS. Pearls and pitfalls in diagnosis of ovarian torsion. *Radiographics.* 2008;28(5):1355-1368.

102. Nizar K, Deutsch M, Filmer S, Weizman B, Beloosesky R, Weiner Z. Doppler studies of the ovarian venous blood flow in the diagnosis of adnexal torsion. *J Clin Ultrasound*. 2009;37(8):436-439.
103. Mashiaeh R, Melamed N, Gilad N, Ben-Shitrit G, Meizner I. Sonographic diagnosis of ovarian torsion: accuracy and predictive factors. *J Ultrasound Med*. 2011;30(9):1205-1210.
104. Naffaa L, Deshmukh T, Tumu S, Johnson C, Boyd KP, Meyers AB. Imaging of Acute Pelvic Pain in Girls: Ovarian Torsion and Beyond(☆). *Curr Probl Diagn Radiol*. 2017;46(4):317-329.
105. Swenson DW, Lourenco AP, Beaudoin FL, Grand DJ, Killelea AG, McGregor AJ. Ovarian torsion: Case-control study comparing the sensitivity and specificity of ultrasonography and computed tomography for diagnosis in the emergency department. *Eur J Radiol*. 2014;83(4):733-738.
106. Wang Z, Zhang D, Zhang H, Guo X, Zheng J, Xie H. Characteristics of the patients with adnexal torsion and outcomes of different surgical procedures: A retrospective study. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(5):e14321.
107. Harkins G. Ovarian torsion treated with untwisting: second look 36 hours after untwisting. *J Minim Invasive Gynecol*. 2007;14(3):270.
108. Wang JH, Wu DH, Jin H, Wu YZ. Predominant etiology of adnexal torsion and ovarian outcome after detorsion in premenarchal girls. *Eur J Pediatr Surg*. 2010;20(5):298-301.
109. Weitzman VN, DiLuigi AJ, Maier DB, Nulsen JC. Prevention of recurrent adnexal torsion. *Fertil Steril*. 2008;90(5):2018 e2011-2013.
110. Smorgick N, Melcer Y, Sarig-Meth T, Maymon R, Vaknin Z, Pansky M. High risk of recurrent torsion in premenarchal girls with torsion of normal adnexa. *Fertil Steril*. 2016;105(6):1561-1565 e1563.
111. Celik A, Ergun O, Aldemir H, Ozcan C, Ozok G, Erdener A, Balyk E. Long-term results of conservative management of adnexal torsion in children. *J Pediatr Surg*. 2005;40(4):704-708.
112. Hartley J, Akhtar M, Edi-Osagie E. Oophoropexy for Recurrent Ovarian Torsion. *Case Rep Obstet Gynecol*. 2018;2018:8784958.
113. Simsek E, Kilicdag E, Kalayci H, Yuksel Simsek S, Parlakgumus A. Repeated ovariopexy failure in recurrent adnexal torsion: combined approach and review of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013;170(2):305-308.

114. Obut M, Deger U. A New Technique of Oophoropexy: Folding and Fixating of Utero-Ovarian Ligament to Round Ligament in a Patient with Recurrent Ovarian Torsion. *Case Rep Obstet Gynecol*. 2019;2019:7647091.
115. Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Robbins SL. Robbins basic pathology. Robbins Pathology. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, 2013.
116. Turer AT, Hill JA. Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy. *Am J Cardiol*. 2010;106(3):360-368.
117. Zhu J, Yao K, Wang Q, Guo J, Shi H, Ma L, Liu H, Gao W, Zou Y, Ge J. Ischemic Postconditioning-Regulated miR-499 Protects the Rat Heart Against Ischemia/Reperfusion Injury by Inhibiting Apoptosis through PDCD4. *Cell Physiol Biochem*. 2016;39(6):2364-2380.
118. Ling Q, Yu X, Wang T, Wang SG, Ye ZQ, Liu JH. Roles of the Exogenous H<sub>2</sub>S-Mediated SR-A Signaling Pathway in Renal Ischemia/ Reperfusion Injury in Regulating Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Autophagy in a Rat Model. *Cell Physiol Biochem*. 2017;41(6):2461-2474.
119. Lopez-Neblina F, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH. Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion. *J Invest Surg*. 2005;18(6):335-350.
120. Eefting F, Rensing B, Wigman J, Pannekoek WJ, Liu WM, Cramer MJ, Lips DJ, Doevendans PA. Role of apoptosis in reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2004;61(3):414-426.
121. McCully JD, Wakiyama H, Hsieh YJ, Jones M, Levitsky S. Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286(5):H1923-1935.
122. Howard MC, Nauser CL, Farrar CA, Sacks SH. Complement in ischaemia-reperfusion injury and transplantation. *Semin Immunopathol*. 2021;43(6):789-797.
123. Nayki C, Nayki U, Keskin Cimen F, Kulhan M, Yapca OE, Kurt N, Bilgin Ozbek A. The effect of rutin on ovarian ischemia-reperfusion injury in a rat model. *Gynecol Endocrinol*. 2018;34(9):809-814.
124. Thrane AS, Skehan JD, Thrane PS. A novel interpretation of immune redundancy and duality in reperfusion injury with important implications for intervention in ischaemic disease. *Med Hypotheses*. 2007;68(6):1363-1370.
125. Gorsuch WB, Chrysanthou E, Schwaeble WJ, Stahl GL. The complement system in ischemia-reperfusion injuries. *Immunobiology*. 2012;217(11):1026-1033.

126. Ali FF, Ahmed AF, Elroby Ali DM. Underlying mechanisms behind the protective effect of angiotensin (1-7) in experimental rat model of ovarian ischemia reperfusion injury. *Life Sci.* 2019;235:116840.
127. Aksoy A. Ovarian ischemia-reperfusion injury: a brief review. *SM J Gynecol Obstet.* 2015;1(2):1008.
128. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull.* 2004;70:71-86.
129. Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb Haemost.* 2007;97(5):738-747.
130. Rao RM, Yang L, Garcia-Cardena G, Luscinskas FW. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circ Res.* 2007;101(3):234-247.
131. Zhang C, Wu J, Xu X, Potter BJ, Gao X. Direct relationship between levels of TNF- $\alpha$  expression and endothelial dysfunction in reperfusion injury. *Basic Res Cardiol.* 2010;105:453-464.
132. Gourdin MJ, Bree B, De Kock M. The impact of ischaemia-reperfusion on the blood vessel. *Eur J Anaesthesiol.* 2009;26(7):537-547.
133. Garcia-Villalon AL, Amezcua YM, Monge L, Fernandez N, Salcedo A, Dieguez G. Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascul Pharmacol.* 2008;48(2-3):109-114.
134. Checa J, Aran JM. Reactive Oxygen Species: Drivers of Physiological and Pathological Processes. *J Inflamm Res.* 2020;13:1057-1073.
135. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
136. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem.* 2015;30:11-26.
137. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1245049.
138. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010;4(8):118-126.



139. Martemucci G, Costagliola C, Mariano M, D'andrea L, Napolitano P, D'Alessandro AG. Free radical properties, source and targets, antioxidant consumption and health. *Oxygen*. 2022;2(2):48-78.
140. Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals in biology and medicine. Oxford university press, USA, 2015.
141. Shinde A, Ganu J, Naik P. Effect of free radicals & antioxidants on oxidative stress: a review. *J Dent Allied Sci*. 2012;1(2):63-66.
142. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*. 2008;4(2):89-96.
143. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*. 2002;30(6):620-650.
144. Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal*. 2007;19(9):1807-1819.
145. Bielski BH, Cabelli DE. Superoxide and hydroxyl radical chemistry in aqueous solution. *Active oxygen in chemistry*. 1995:66-104.
146. Pastor N, Weinstein H, Jamison E, Brenowitz M. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *J Mol Biol*. 2000;304(1):55-68.
147. Haber F, Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London Series A-Mathematical and Physical Sciences*. 1934;147(861):332-351.
148. Fenton HJH. LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*. 1894;65:899-910.
149. Winterbourn CC. The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Methods Enzymol*. 2013;528:3-25.
150. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett*. 2000;486(1):10-13.
151. Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res*. 1999;43(3):521-531.
152. Mattila JT, Thomas AC. Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns. *Front Immunol*. 2014;5:478.
153. Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(23):5839-5848.

154. Demiryurek AT, Cakici I, Kanzik I. Peroxynitrite: a putative cytotoxin. *Pharmacol Toxicol.* 1998;82(3):113-117.
155. Nimse SB, Pal D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC advances.* 2015;5(35):27986-28006.
156. Tvrdá E, Benko F. Free radicals: what they are and what they do. *Pathology.* Elsevier, 2020: s.3-13.
157. Szabo C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(8):662-680.
158. Ziegler K, Kunert AT, Reinmuth-Selzle K, Leifke AL, Widera D, Weller MG, Schuppan D, Frohlich-Nowoisky J, Lucas K, Poschl U. Chemical modification of pro-inflammatory proteins by peroxynitrite increases activation of TLR4 and NF-kappaB: Implications for the health effects of air pollution and oxidative stress. *Redox Biol.* 2020;37:101581.
159. Thomas EL, Bozeman PM, Jefferson MM, King CC. Oxidation of bromide by the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. Formation of bromamines. *J Biol Chem.* 1995;270(7):2906-2913.
160. Starkov AA. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1147:37-52.
161. Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, Paolucci D, Moroni M, Contursi C, Pelliccia G, Luzi L, Minucci S, Marcaccio M. Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell.* 2005;122(2):221-233.
162. De Duve C, Baudhuin P. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev.* 1966;46(2):323-357.
163. Boveris A, Oshino N, Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 1972;128(3):617-630.
164. Fritz R, Bol J, Hebling U, Angermuller S, Volkl A, Fahimi HD, Mueller S. Compartment-dependent management of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by peroxisomes. *Free Radic Biol Med.* 2007;42(7):1119-1129.
165. Fransen M, Nordgren M, Wang B, Apanasets O. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822(9):1363-1373.
166. Singh I. Biochemistry of peroxisomes in health and disease. *Mol Cell Biochem.* 1997;167(1-2):1-29.

167. Del Río LA. Peroxisomes as a cellular source of reactive nitrogen species signal molecules. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2011;506(1):1-11.
168. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007;87(1):315-424.
169. Schrader M, Fahimi HD. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1763(12):1755-1766.
170. Antonenkov VD, Grunau S, Ohlmeier S, Hiltunen JK. Peroxisomes are oxidative organelles. *Antioxid Redox Signal*. 2010;13(4):525-537.
171. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*. 1993;49(3):481-493.
172. Gross E, Sevier CS, Heldman N, Vitu E, Bentzur M, Kaiser CA, Thorpe C, Fass D. Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(2):299-304.
173. Davies MJ. The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2005;1703(2):93-109.
174. Bonnefont-Rousselot D. Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2002;5(5):561-568.
175. Spiteller G. Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases. *Exp Gerontol*. 2001;36(9):1425-1457.
176. Rosen GM, Pou S, Ramos CL, Cohen MS, Britigan BE. Free radicals and phagocytic cells. *The FASEB Journal*. 1995;9(2):200-209.
177. Lieber CS. Cytochrome P-4502E1: its physiological and pathological role. *Physiol Rev*. 1997;77(2):517-544.
178. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82(1):47-95.
179. Ashraf MZ, Srivastava S. Oxidized phospholipids: introduction and biological significance. *Lipoproteins-Role in Health and Diseases*. IntechOpen, 2012.
180. Sharifi-Rad M, Anil Kumar NV, Zucca P, Varoni EM, Dini L, Panzarini E, Rajkovic J, Tsouh Fokou PV, Azzini E, Peluso I, Prakash Mishra A, Nigam M, El Rayess Y, Beyrouthy ME, Polito L, Iriti M, Martins N, Martorell M, Docea AO, Setzer WN, Calina D, Cho WC, Sharifi-Rad J. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Front Physiol*. 2020;11:694.

181. Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:360438.
182. Collin F. Chemical Basis of Reactive Oxygen Species Reactivity and Involvement in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*. 2019;20(10):2407.
183. Stadtman ER. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;928:22-38.
184. Butterfield DA, Koppal T, Howard B, Subramaniam R, Hall N, Hensley K, Yatin S, Allen K, Aksenov M, Aksenova M. Structural and Functional Changes in Proteins Induced by Free Radical-mediated Oxidative Stress and Protective Action of the Antioxidants N-tert-Butyl- $\alpha$ -phenylnitrone and Vitamin E a. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;854(1):448-462.
185. Pryor WA, Jin X, Squadrito GL. One- and two-electron oxidations of methionine by peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(23):11173-11177.
186. Brodie AE, Reed DJ. Cellular recovery of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity and thiol status after exposure to hydroperoxides. *Arch Biochem Biophys*. 1990;276(1):212-218.
187. Ahmad S, Khan H, Shahab U, Rehman S, Rafi Z, Khan MY, Ansari A, Siddiqui Z, Ashraf JM, Abdullah SM, Habib S, Uddin M. Protein oxidation: an overview of metabolism of sulphur containing amino acid, cysteine. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2017;9(1):71-87.
188. Chevion M, Berenshtein E, Stadtman E. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res*. 2000;33:S99-108.
189. Juan CA, Perez de la Lastra JM, Plou FJ, Perez-Lebena E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9).
190. Cha MY, Kim DK, Mook-Jung I. The role of mitochondrial DNA mutation on neurodegenerative diseases. *Exp Mol Med*. 2015;47(3):e150.
191. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med*. 2002;32(11):1102-1115.

192. Hiraku Y, Kawanishi S, Ichinose T, Murata M. The role of iNOS-mediated DNA damage in infection- and asbestos-induced carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1203:15-22.
193. Hofer T, Badouard C, Bajak E, Ravanat JL, Mattsson A, Cotgreave IA. Hydrogen peroxide causes greater oxidation in cellular RNA than in DNA. *Biol Chem.* 2005;386(4):333-337.
194. Qazi MA, Molvi KI. Free radicals and their management. *American Journal of Pharmacy and Health Research.* 2018;6(4):1-10.
195. Sindhi V, Gupta V, Sharma K, Bhatnagar S, Kumari R, Dhaka N. Potential applications of antioxidants—A review. *Journal of pharmacy research.* 2013;7(9):828-835.
196. Ifeanyi OE. A review on free radicals and antioxidants. *Int J Curr Res Med Sci.* 2018;4(2):123-133.
197. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(Pt 5):1147-1150.
198. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012;5(1):9-19.
199. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med.* 2002;33(3):337-349.
200. Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Molecular aspects of medicine.* 2005;26(4-5):340-352.
201. De Lazzari F, Bubacco L, Whitworth AJ, Bisaglia M. Superoxide radical dismutation as new therapeutic strategy in Parkinson's disease. *Aging Dis.* 2018;9(4):716.
202. Toppo S, Vanin S, Bosello V, Tosatto SC. Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily. *Antioxidants & redox signaling.* 2008;10(9):1501-1514.
203. Vona R, Pallotta L, Cappelletti M, Severi C, Matarrese P. The Impact of Oxidative Stress in Human Pathology: Focus on Gastrointestinal Disorders. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(2).
204. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact.* 2014;224:164-175.

205. Kim Y, Jang HH. Role of Cytosolic 2-Cys Prx1 and Prx2 in Redox Signaling. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8(6).
206. Ozougwu JC. The role of reactive oxygen species and antioxidants in oxidative stress. *International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences*. 2016;3(6):1-8.
207. Atasoy N, Yücel UM. *Antioxidants from Plant Sources and Free Radicals. Reactive Oxygen Species*. IntechOpen, 2021.
208. Sinbad OO, Folorunsho AA, Olabisi OL, Ayoola OA, Temitope EJ. Vitamins as antioxidants. *J Food Sci Nutr Res*. 2019;2(3):214-235.
209. Kumbasar S, Salman S, Al RA, Ozturk C, Yarali O, Alp HH, Altuner D, Suleyman B. The effect of metamizole on ischemia/reperfusion injury in the rat ovary: An analysis of biochemistry, molecular gene expression, and histopathology. *Indian J Pharmacol*. 2016;48(1):32-36.
210. Chazelas P, Steichen C, Favreau F, Trouillas P, Hannaert P, Thuillier R, Giraud S, Hauet T, Guillard J. Oxidative Stress Evaluation in Ischemia Reperfusion Models: Characteristics, Limits and Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2021;22(5).
211. Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1985;311(1152):617-631.
212. Lima B, Forrester MT, Hess DT, Stamler JS. S-nitrosylation in cardiovascular signaling. *Circ Res*. 2010;106(4):633-646.
213. Go YM, Park H, Koval M, Orr M, Reed M, Liang Y, Smith D, Pohl J, Jones DP. A key role for mitochondria in endothelial signaling by plasma cysteine/cystine redox potential. *Free Radic Biol Med*. 2010;48(2):275-283.
214. Allen CL, Bayraktutan U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *Int J Stroke*. 2009;4(6):461-470.
215. Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(10):1634-1650.
216. Ruder EH, Hartman TJ, Goldman MB. Impact of oxidative stress on female fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2009;21(3):219-222.
217. Chandra A, Surti N, Kesavan S, Agarwal A. Significance of oxidative stress in human reproduction. *Arch Med Sci*. 2009;5(1A):S28–S42.

218. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol.* 2012;10:49.
219. Drury A, Szent-Györgyi Av. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *The Journal of physiology.* 1929;68(3):213.
220. Cobbin L, Einstein R, Maguire MH. Studies on the coronary dilator actions of some adenosine analogues. *British journal of pharmacology.* 1974;50(1):25.
221. Zhang Y, Wernly B, Cao X, Mustafa SJ, Tang Y, Zhou Z. Adenosine and adenosine receptor-mediated action in coronary microcirculation. *Basic Res Cardiol.* 2021;116(1):22.
222. Fredholm BB. Adenosine--a physiological or pathophysiological agent? *J Mol Med (Berl).* 2014;92(3):201-206.
223. Reiss AB, Grossfeld D, Kasselman LJ, Renna HA, Vernice NA, Drewes W, König J, Carsons SE, DeLeon J. Adenosine and the Cardiovascular System. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2019;19(5):449-464.
224. Sheth S, Brito R, Mukherjea D, Rybak LP, Ramkumar V. Adenosine receptors: expression, function and regulation. *Int J Mol Sci.* 2014;15(2):2024-2052.
225. Chen J-F, Eltzschig HK, Fredholm BB. Adenosine receptors as drug targets—what are the challenges? *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(4):265-286.
226. Jamwal S, Mittal A, Kumar P, Alhayani DM, Al-Aboudi A. Therapeutic Potential of Agonists and Antagonists of A1, A2a, A2b and A3 Adenosine Receptors. *Curr Pharm Des.* 2019;25(26):2892-2905.
227. Sachdeva S, Gupta M. Adenosine and its receptors as therapeutic targets: an overview. *Saudi Pharm J.* 2013;21(3):245-253.
228. Sawynok J. Adenosine receptor targets for pain. *Neuroscience.* 2016;338:1-18.
229. Charles BA, Conley YP, Chen G, Miller RG, Dorman JS, Gorin MB, Ferrell RE, Sereika SM, Rotimi CN, Orchard TJ. Variants of the adenosine A(2A) receptor gene are protective against proliferative diabetic retinopathy in patients with type 1 diabetes. *Ophthalmic Res.* 2011;46(1):1-8.
230. Okusa MD, Linden J, Macdonald T, Huang L. Selective A2A adenosine receptor activation reduces ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *Am J Physiol.* 1999;277(3):F404-412.

231. Xu Z, Park SS, Mueller RA, Bagnell RC, Patterson C, Boysen PG. Adenosine produces nitric oxide and prevents mitochondrial oxidant damage in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2005;65(4):803-812.
232. Koupenova M, Johnston-Cox H, Vezeridis A, Gavras H, Yang D, Zannis V, Ravid K. A2b adenosine receptor regulates hyperlipidemia and atherosclerosis. *Circulation.* 2012;125(2):354-363.
233. Merighi S, Bencivenni S, Vincenzi F, Varani K, Borea PA, Gessi S. A2B adenosine receptors stimulate IL-6 production in primary murine microglia through p38 MAPK kinase pathway. *Pharmacol Res.* 2017;117:9-19.
234. Vincenzi F, Pasquini S, Borea PA, Varani K. Targeting Adenosine Receptors: A Potential Pharmacological Avenue for Acute and Chronic Pain. *Int J Mol Sci.* 2020;21(22):8710.
235. Janes K, Esposito E, Doyle T, Cuzzocrea S, Tosh DK, Jacobson KA, Salvemini D. A3 adenosine receptor agonist prevents the development of paclitaxel-induced neuropathic pain by modulating spinal glial-restricted redox-dependent signaling pathways. *Pain.* 2014;155(12):2560-2567.
236. Vasu S, Bandettini WP, Hsu L-Y, Kellman P, Leung S, Mancini C, Shanbhag SM, Wilson J, Booker OJ, Arai AE. Regadenoson and adenosine are equivalent vasodilators and are superior than dipyridamole-a study of first pass quantitative perfusion cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2013;15(1):1-9.
237. Elkholy KO, Hegazy O, Okunade A, Aktas S, Ajibawo T. Regadenoson Stress Testing: A Comprehensive Review With a Focused Update. *Cureus.* 2021;13(1):e12940.
238. Jackson S, George RT, Lodge MA, Piotrowski A, Wahl RL, Gujar SK, Grossman SA. The effect of regadenoson on the integrity of the human blood-brain barrier, a pilot study. *J Neurooncol.* 2017;132(3):513-519.
239. Kinsey GR, Huang L, Jaworska K, Khutsishvili K, Becker DA, Ye H, Lobo PI, Okusa MD. Autocrine adenosine signaling promotes regulatory T cell-mediated renal protection. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(9):1528-1537.
240. Xia Y, He F, Moukeila Yacouba MB, Zhou H, Li J, Xiong Y, Zhang J, Li H, Wang Y, Ke J. Adenosine A2a Receptor Regulates Autophagy Flux and Apoptosis to Alleviate Ischemia-Reperfusion Injury via the cAMP/PKA Signaling Pathway. *Front Cardiovasc Med.* 2022;9:755619.



241. Chen JF, Cunha RA. The belated US FDA approval of the adenosine A(2A) receptor antagonist istradefylline for treatment of Parkinson's disease. *Purinergic Signal*. 2020;16(2):167-174.
242. Jenner P, Mori A, Aradi SD, Hauser RA. Istradefylline—a first generation adenosine A2A antagonist for the treatment of Parkinson's disease. *Expert Rev Neurother*. 2021;21(3):317-333.
243. Navarro G, Borroto-Escuela DO, Fuxe K, Franco R. Purinergic signaling in Parkinson's disease. Relevance for treatment. *Neuropharmacology*. 2016;104:161-168.
244. Berger AA, Winnick A, Welschmeyer A, Kaneb A, Berardino K, Cornett EM, Kaye AD, Viswanath O, Urits I. Istradefylline to Treat Patients with Parkinson's Disease Experiencing "Off" Episodes: A Comprehensive Review. *Neurol Int*. 2020;12(3):109-129.
245. Idzko M, Ferrari D, Eltzschig HK. Nucleotide signalling during inflammation. *Nature*. 2014;509(7500):310-317.
246. Lazarowski ER. Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic Signal*. 2012;8(3):359-373.
247. Pacheco R, Martinez-Navio JM, Lejeune M, Climent N, Oliva H, Gatell JM, Gallart T, Mallol J, Lluís C, Franco R. CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(27):9583-9588.
248. Gracia E, Farre D, Cortes A, Ferrer-Costa C, Orozco M, Mallol J, Lluís C, Canela EI, McCormick PJ, Franco R, Fanelli F, Casado V. The catalytic site structural gate of adenosine deaminase allosterically modulates ligand binding to adenosine receptors. *FASEB J*. 2013;27(3):1048-1061.
249. Lloyd HG, Fredholm BB. Involvement of adenosine deaminase and adenosine kinase in regulating extracellular adenosine concentration in rat hippocampal slices. *Neurochem Int*. 1995;26(4):387-395.
250. Guner G, Yilmaz D, Yao HF, Clancy DJ, Bilgili E. Predicting the Temperature Evolution during Nanomilling of Drug Suspensions via a Semi-Theoretical Lumped-Parameter Model. *Pharmaceutics*. 2022;14(12):2840.
251. Merisko-Liversidge EM, Liversidge GG. Drug nanoparticles: formulating poorly water-soluble compounds. *Toxicol Pathol*. 2008;36(1):43-48.

252. Uhlemann J, Diedam H, Hoheisel W, Schikarski T, Peukert W. Modeling and Simulation of Process Technology for Nanoparticulate Drug Formulations-A Particle Technology Perspective. *Pharmaceutics*. 2020;13(1):22.
253. Salama L, Pastor ER, Stone T, Mousa SA. Emerging Nanopharmaceuticals and Nanonutraceuticals in Cancer Management. *Biomedicines*. 2020;8(9).
254. Zhang J, Xie Z, Zhang N, Zhong J. Nanosuspension drug delivery system: preparation, characterization, postproduction processing, dosage form, and application. *Nanostructures for Drug Delivery*. Elsevier, 2017: s.413-443.
255. Keck CM, Muller RH. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. *Eur J Pharm Biopharm*. 2006;62(1):3-16.
256. DURAN T, KARAKUŞ O, DEĞİM İT, Burcu E, Sezigen S, GÜNEY Z, ULUOĞLU C. Evaluating of Two Type of Cyclosporine-A Containing Nanosuspension for Ophthalmic Administration. *Journal of Basic and Clinical Health Sciences*. 2021;5(3):107-116.
257. Khandbahale SV. A review-Nanosuspension technology in drug delivery system. *AJPRes*. 2019;9(2):130-138.
258. Patel HM, Patel BB, Shah CN. Nanosuspension: a novel approach to enhance solubility of poorly water soluble drugs-a review. *Int J Adv Pharm*. 2016;5(2):21-29.
259. Du J, Li X, Zhao H, Zhou Y, Wang L, Tian S, Wang Y. Nanosuspensions of poorly water-soluble drugs prepared by bottom-up technologies. *Int J Pharm*. 2015;495(2):738-749.
260. Müller RH, Jacobs C, Kayser O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: rationale for development and what we can expect for the future. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;47(1):3-19.
261. Landry FB, Bazile DV, Spenlehauer G, Veillard M, Kreuter J. Peroral administration of <sup>14</sup>C-poly(D,L-lactic acid) nanoparticles coated with human serum albumin or polyvinyl alcohol to guinea pigs. *J Drug Target*. 1998;6(4):293-307.
262. Liversidge GG, Cundy KC. Particle size reduction for improvement of oral bioavailability of hydrophobic drugs: I. Absolute oral bioavailability of nanocrystalline danazol in beagle dogs. *International journal of pharmaceutics*. 1995;125(1):91-97.

263. Dhalla AK, Wong M-Y, Wang W-Q, Biaggioni I, Belardinelli L. Tachycardia caused by A2A adenosine receptor agonists is mediated by direct sympathoexcitation in awake rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;316(2):695-702.
264. Wennmalm A, Benthin G, Edlund A, Jungersten L, Kieler-Jensen N, Lundin S, Westfelt UN, Petersson A-S, Waagstein F. Metabolism and excretion of nitric oxide in humans. An experimental and clinical study. *Circulation research.* 1993;73(6):1121-1127.
265. Erel O, Neselioglu S. A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis. *Clin Biochem.* 2014;47(18):326-332.
266. Party P, Bartos C, Farkas A, Szabo-Revesz P, Ambrus R. Formulation and In Vitro and In Silico Characterization of "Nano-in-Micro" Dry Powder Inhalers Containing Meloxicam. *Pharmaceutics.* 2021;13(2).
267. Shahmoradi M, Rohanizadeh R, Sonvico F, Ghadiri M, Swain M. Synthesis of stabilized hydroxyapatite nanosuspensions for enamel caries remineralization. *Aust Dent J.* 2018.
268. Eser A, Hizli D, Haltas H, Namuslu M, Kosus A, Kosus N, Kafali H. Effects of curcumin on ovarian ischemia-reperfusion injury in a rat model. *Biomed Rep.* 2015;3(6):807-813.
269. Monassier JP. Reperfusion injury in acute myocardial infarction: from bench to cath lab. Part II: Clinical issues and therapeutic options. *Arch Cardiovasc Dis.* 2008;101(9):565-575.
270. Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres MDP, Acosta-Torres LS, Diaz-Torres LA, Grillo R, Swamy MK, Sharma S, Habtemariam S, Shin HS. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J Nanobiotechnology.* 2018;16(1):71.
271. Jacob S, Nair AB, Shah J. Emerging role of nanosuspensions in drug delivery systems. *Biomater Res.* 2020;24:3.
272. Ahire E, Thakkar S, Darshanwad M, Misra M. Parenteral nanosuspensions: a brief review from solubility enhancement to more novel and specific applications. *Acta Pharm Sin B.* 2018;8(5):733-755.
273. Elmowafy M, Shalaby K, Al-Sanea MM, Hendawy OM, Salama A, Ibrahim MF, Ghoneim MM. Influence of Stabilizer on the Development of Luteolin Nanosuspension for Cutaneous Delivery: An In Vitro and In Vivo Evaluation. *Pharmaceutics.* 2021;13(11):1812.

274. Yapca OE, Borekci B, Suleyman H. Ischemia-reperfusion damage. *The Eurasian journal of medicine*. 2013;45(2):126.
275. Yapca OE, Turan MI, Borekci B, Akcay F, Suleyman H. Bilateral ovarian ischemia/reperfusion injury and treatment options in rats with an induced model of diabetes. *Iran J Basic Med Sci*. 2014;17(4):294-302.
276. Javadi-Afshar A, Najafpour A. Effect of systemic administration of curcumin on ischemia-reperfusion injury in ovaries: An animal model study. *Iranian Journal of Veterinary Surgery*. 2019;14(1):1-8.
277. Fridovich I. Mitochondria: are they the seat of senescence? *Aging cell*. 2004;3(1):13-16.
278. Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011;35(3):676-692.
279. Ischiropoulos H. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;305(3):776-783.
280. Ahsan H. 3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions. *Hum Immunol*. 2013;74(10):1392-1399.
281. Wang F, Yuan Q, Chen F, Pang J, Pan C, Xu F, Chen Y. Fundamental Mechanisms of the Cell Death Caused by Nitrosative Stress. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:742483.
282. Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum Reprod Update*. 1998;4(1):3-24.
283. Zackrisson U, Mikuni M, Wallin A, Delbro D, Hedin L, Brannstrom M. Cell-specific localization of nitric oxide synthases (NOS) in the rat ovary during follicular development, ovulation and luteal formation. *Hum Reprod*. 1996;11(12):2667-2673.
284. Ingec M, Calik M, Gundogdu C, Kurt A, Yilmaz M, Isaoglu U, Salman S, Akcay F, Suleyman H. Biological and histopathological investigations of moclobemide on injured ovarian tissue following induction of ischemia-reperfusion in rats. *Int J Fertil Steril*. 2012;6(1):19-26.
285. Ali FF, Rifaai RA. Preventive effect of omega-3 fatty acids in a rat model of stress-induced liver injury. *J Cell Physiol*. 2019;234(7):11960-11968.

286. Brülisauer L, Gauthier MA, Leroux J-C. Disulfide-containing parenteral delivery systems and their redox-biological fate. *J Control Release*. 2014;195:147-154.
287. Ellgaard L, Sevier CS, Bulleid NJ. How are proteins reduced in the endoplasmic reticulum? *Trends Biochem Sci*. 2018;43(1):32-43.
288. Erel O, Erdogan S. Thiol-disulfide homeostasis: an integrated approach with biochemical and clinical aspects. *Turk J Med Sci*. 2020;50(SI-2):1728-1738.
289. Atasever M, Bakacak Z. Nigella Sativa oil protects the rat ovary from oxidative injury due to ischemia-reperfusion. *Med Sci Monit*. 2017;23:5027-5033.



## 7. EKLER

### Ek 1. Etik kurul onay yazısı

| T.C.<br>GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ<br>HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI<br>ARAŞTIRMA BAŞVURU ONAYI |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                               |               |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>TOPLANTI TARİHİ</b><br>06.04.2023                                                                       | <b>TOPLANTI SAYISI</b><br>7                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | <b>TOPLANTI YERİ</b><br>Gaziantep Hayvanat Bahçesi                                                                            |               |
| <b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>                                                                                   | <b>Araştırmacının Başlığı</b><br>(Türkçe ve İngilizce)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Adrenalin reseptör agonist ve antagonistlerin sıçanlarda over iskemik reperfüzyon hasarı üzerindeki etkilerinin araştırılması |               |
|                                                                                                            | <b>Başvuru Tarihi</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 01.04.2023                                                                                                                    |               |
|                                                                                                            | <b>Protokol no</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 278                                                                                                                           |               |
|                                                                                                            | <b>Kullanılacak deney hayvanı</b><br>(tür/cins/insan/kuş/veya)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Sıçan / Wistar Albino / Dişi / 80                                                                                             |               |
| <b>KARAR BİLGİLERİ</b>                                                                                     | <b>Karar No:</b> 2023/47<br><input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret<br>Prof. Dr. Abdullah Tuncay DEMİRYÜREK'in yürüttüğü olduğu ve uygunluk karar alınan Etik kurul karar no: 2023/32 - 2023/36) daha önceki başvuruları ile ilgili değişiklik önerisi incelenmiş, değişiklik başvurusunun Gaziantep Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yürürlüğünde "uygun" olduğuna toplantıda katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir. |                                                                                                                               |               |
| <b>Yürütücü</b>                                                                                            | Prof. Dr. Abdullah Tuncay DEMİRYÜREK<br>Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                               |               |
| <b>Araştırmacılar</b>                                                                                      | Prof. Dr. Şenay DEMİRYÜREK, Dr. Öğr. Üyesi Ömer ERGÜZAY, Dr. Öğr. Üyesi Ahmet SARACALIOĞLU, Doçtora Öğrencisi Azad MAMMAOĞLU, Dr. Cahit DEMİRKIRAN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                               |               |
| <b>ETİK KURUL ÜYELERİ</b>                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                               |               |
| <b>Ünvanı/Adı/Soyadı</b>                                                                                   | <b>Kurumu</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | <b>İhtis</b>                                                                                                                  | <b>Katkım</b> |
| Prof. Dr. Peyman KÖRÜMÇÜOĞLU<br>(Başkan)                                                                   | GAÜN Tıp Fakültesi<br>Anestezoloji AD.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | H                                                                                                                             | E             |
| Doç. Dr. Nevruz İsmail KAPLAN<br>(Başkan Yardımcısı)                                                       | GAÜN Tıp Fakültesi<br>Fizyoloji AD.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | H                                                                                                                             | H             |
| Prof. Dr. A. Tuncay DEMİRYÜREK<br>(Üye)                                                                    | GAÜN Tıp Fakültesi<br>Tıbbi Farmakoloji AD.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | E                                                                                                                             | H             |
| Prof. Dr. Tahir KARSLAN<br>(Üye)                                                                           | GAÜN Tıp Fakültesi<br>Tıbbi Mikrobiyoloji AD.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | H                                                                                                                             | E             |
| Prof. Dr. İsmail GÜLLÜKAR SALT<br>(Üye)                                                                    | GAÜN Tıp Fakültesi<br>Tıbbi Biyoloji AD.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | H                                                                                                                             | H             |
| Prof. Dr. Emine Elvan DEMİR<br>(Üye)                                                                       | GAÜN Fen Edebiyat Fakültesi<br>Kimya Bölümü                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | H                                                                                                                             | E             |
| Prof. Dr. Can DEMİRALP<br>(Üye)                                                                            | GAÜN Tıp Fakültesi<br>Biyofizik AD.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | H                                                                                                                             | E             |
| Doç. Dr. Hulusi ŞEN<br>(Üye)                                                                               | GAÜN Tıp Fakültesi<br>Üroloji AD.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | H                                                                                                                             | E             |
| Doç. Dr. Murat GÜZMAN<br>(Üye)                                                                             | GAÜN Sağlık Bilimleri Fakültesi<br>Ortodontoloji AD.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | H                                                                                                                             | E             |
| Dr. Öğr. Üyesi A. Serkan BÖRÜKÇÜ<br>(Üye)                                                                  | GAÜN Tıp Fakültesi<br>Fizyoloji AD.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | H                                                                                                                             | E             |
| Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Gülden KAYMAKÇI<br>(Üye)                                                               | GAÜN Tıp F. Radyasyon Onkolojisi<br>AD.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | H                                                                                                                             | E             |
| Yardımcı Doçent Fikri BİÇER<br>(Üye)                                                                       | GAÜN Deney Hayvanları Uygulama<br>ve Araştırma Merkezi (GAÜN/HDÜM)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | H                                                                                                                             | E             |
| Yardımcı Doçent Cahit DEMİRKIRAN<br>(Üye)                                                                  | Gaziantep Meslek Yüksekokulu<br>Hayvanat Bahçesi                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | H                                                                                                                             | E             |
| Avukat Ümitcan BEYAZ<br>(Üye)                                                                              | Serbest, Serbest Üye                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | H                                                                                                                             | E             |

E. Erol, H. Hacı

## 8. ÖZGEÇMİŞ

Liseyi Mersin’de tamamladıktan sonra 2017 yılında Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’ni bitirdim. Ayrıca, 2016 yılında Anadolu Üniversitesi İktisat bölümünü ve 2020 yılında Anadolu Üniversitesi Adalet programını bitirdim. 2017 yılında 100/2000 YÖK doktora bursiyeri olarak Gaziantep Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı’nda doktora eğitimime başladım.

