

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINA
KARŞI MİRİSETİN'İN OVER VE OOSİT KALİTESİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN MİKROSKOBİK VE
BİYOKİMYASAL ANALİZLERLE ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sevda AYDIN

Enstitü Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Elvan ŞAHİN
Ortak Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Betül ÖZBEK

KASIM-2024

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINA
KARŞI MİRİSETİN'İN OVER VE OOSİT KALİTESİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN MİKROSKOBİK VE
BİYOKİMYASAL ANALİZLERLE ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sevda AYDIN

Enstitü Anabilin Dalı: Histoloji ve Embriyoloji

“Bu tez 01/11/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.”

JÜRİ ÜYESİ	KAANATI	İMZA

BEYAN

Bu çalışma T.C. Sakarya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 03/01/2024 tarihinde etik onay alınarak hazırlanmıştır. Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih:

24/10/2024

Sevda AYDIN

İmza

TEŞEKKÜR

Bu tez, Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAPK) tarafından 2024-26-62-10 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda aldığım yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım ve deneysel araştırma süreçlerinde desteklerini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Elvan ŞAHİN'e ve tez ortak danışmanım olan Altınbaş Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda görevli Dr. Öğretim Üyesi Betül ÖZBEK'e,

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam sırasında değerli katkılarından dolayı Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Özcan BUDAK'a ve deney aşamasındaki cerrahi katkılarından dolayı Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet Sühha BOSTANCI'ya,

Her zaman tecrübelerinden yararlanabilme imkanı bulduğum Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Gamze GÜNEY ESKİLER'e,

Yanımda olduklarını bildiğim, ilgi ve destekleriyle yalnız olmadığımı hissettiren sevgili arkadaşlarım Fizyoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Fadime KÖSE'ye ve Tıbbi Biyoloji yüksek lisans öğrencisi Rabia Rana DERLİOĞLU'na,

Hayatım boyunca hep yanımda olup beni yüreklendiren ve bugünlere gelişimde her zaman maddi ve manevi desteklerini aldığım annem Refiye AYDIN'a ve babam Mümin AYDIN'a,

Hayattaki en büyük şansım olan abim Tayfun AYDIN'a ve eşi Berna AYDIN ablama, ailemizin en yeni üyesi yeğenim Zeynel Harun AYDIN'a

Tüm kalbimle teşekkürlerimi sunarım.

Arş. Gör. Sevdâ AYDIN

İÇİNDEKİLER

BEYAN	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMA VE SİMGELER	vi
ŞEKİLLER	viii
RESİMLER	ix
TABLolar	xii
ÖZET	xiii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. OVARYUMLAR	3
2.1.1. Over Histolojisi	3
2.1.1.1. Over folikülleri	4
2.1.1.1.1. Primordiyal (ilkel) foliküller	5
2.1.1.1.2. Primer (birincil) foliküller	5
2.1.1.1.3. Sekonder (ikincil) foliküller	5
2.1.1.1.4. Graaf (olgun) foliküller	6
2.1.2. Over Fizyolojisi	7
2.1.2.1. Oosit üretimi	7
2.1.2.2. Oosit rezervi	8
2.1.2.2.1. Anti-Müllerian hormon (AMH)	8
2.1.2.3. Oosit olgunluğu ve kalitesi	9
2.2. OVER TORSİYONU	9
2.2.1. İskemi Hasarı	10

2.2.1.1. İskemide VEGF ve Caspase-3'ün değerlendirilmesi.....	10
2.3. OVER DETORSİYONU	11
2.3.1. Reperfüzyon Hasarı	11
2.3.1.1. İnflamatuvar yanıt.....	12
2.3.1.1.1. Sitokinler.....	12
2.3.1.1.1.1. Tümör nekroz faktör- α (TNF- α)	12
2.3.1.1.1.2. İnterlökin- 1 β (IL-1 β)	133
2.3.1.1.2. Nükleer Faktör kappa B (NF- κ B).....	13
2.3.1.2. Serbest oksijen radikalleri (SOR)	13
2.3.1.2.1. Glutasyon (GSH).....	14
2.4. ANTİOKSİDAN SİSTEMLERİ.....	14
2.4.1. Mirisetin.....	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1. ETİK İZİN VE PROJE DESTEĞİ.....	16
3.2. DENEKLER	16
3.2.1. Deney Grupları	16
3.3. DENEY SÜRECİ.....	16
3.3.1. Cerrahi İşlemler	16
3.3.1.1. Kontrol grubu.....	17
3.3.1.2. İskemi grubu	17
3.3.1.3. İskemi-Reperfüzyon grubu	18
3.3.1.4. Tedavi grubu	19
3.3.2. Oosit Stimülasyonu.....	20
3.3.3. Deneyin Sonlandırılması ve Doku Örneklerinin Elde Edilmesi.....	20
3.3.3.1. Kan örneklerinin alınması.....	21
3.3.3.2. Overlerin çıkarılması ve oosit eldesi	22

3.4. HİSTOLOJİK İŞLEMLER	23
3.4.1. Doku Takibi ve Kesitlerin Elde Edilmesi	23
3.4.2. Işık Mikroskopik Boyamalar	24
3.4.2.1. Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama.....	25
3.4.2.2. Masson-Trikrom boyama.....	25
3.4.2.3. İmmünperoksidaz boyama	26
3.4.3. Boyanan Kesitlerin Fotoğraflanması ve Skorlaması	27
3.5. BİYOKİMYASAL İŞLEMLER.....	28
3.6. KULLANILAN SARF MALZEMELERİ VE CİHAZLAR	28
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. IŞIK MİKROSKOBİK BULGULAR.....	31
4.1.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Bulguları	31
4.1.2. Masson-Trikrom Boyama Bulguları.....	42
4.1.3. İmmünperoksidaz Boyama Bulguları	48
4.1.3.1. VEGF primer antikoru ile immünperoksidaz işaretleme.....	48
4.1.3.2. Caspase-3 primer antikoru ile immünperoksidaz işaretleme.....	53
4.2. İNVERT MİKROSKOP BULGULARI	59
4.3. BİYOKİMYASAL ANALİZ BULGULARI.....	66
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	70
KAYNAKLAR	75
EKLER.....	82
EK-1.....	82
ÖZGEÇMİŞ	83

KISALTMA VE SİMGELER

AMH:	Anti-Müllerian Hormon
EDTA:	Etilendiamintetraasetik Asit
GSH:	Glutasyon
GV:	Germinal Vezikül
hCG:	İnsan Koryonik Gonadotropini
HCL:	Hidroklorik Asit
H-E:	Hematoksilen-Eozin
IL-1 β :	İnterlökin – 1 Beta
i.m.:	İntramüsküler
i.p.:	İntraperitoneal
I/R:	İskemi-Reperfüzyon
LPS:	Lipaz
M1:	Metafaz I
M2:	Metafaz II
NF- κ B:	Nüklear Faktör Kappa B
OMI:	Oosit Maturasyonunu İnhibe Eden Madde
PMNL:	Polimorf Nukleuslu Lökosit
PMSG:	Gebe Kısırak Serum Gonadotropini
SEM:	Ortalamanın Standart Hatası
SF:	Serum Fizyolojik
SOR:	Serbest Oksijen Radikalleri

TGF- β : Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β

TNF α : Tümör Nekroz Faktör Alfa

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü



ŞEKİLLER

Şekil 1. Anatomik Bağlarla Ovaryum.....	3
Şekil 2. Over Histolojisi: Tunika Albuginea, Korteks ve Medulla.....	4
Şekil 3. Vasküler dilatasyon ve hemoraji skorlamasının dört deney grubu arasında istatistiksel karşılaştırılması.....	31
Şekil 4. Dokuda ayrışma skorlamasının dört deney grubu arasında istatistiksel karşılaştırılması.....	32
Şekil 5. Folikül dejenerasyonu skorlamasının dört deney grubu arasında istatistiksel karşılaştırılması.....	33
Şekil 6. Ödem skorlamasının dört deney grubu arasında istatistiksel kıyaslaması...33	
Şekil 7. Dört deney grubunda VEGF-pozitif hücre sayılarının karşılaştırması.....	48
Şekil 8. Dört deney grubunda Caspase-3-pozitif hücre sayılarının karşılaştırması...53	
Şekil 9. Toplam oosit, M2, M1 ve GV oositlerin dört deney grubundaki sayılarını gösteren grafik.....	60
Şekil 10. Dört deney grubunda M2 oosit sayısının toplam oosit sayısına yüzde oranı	62
Şekil 11. Dört deney grubunda M1 oosit sayısının toplam oosit sayısına yüzde oranı.....	62
Şekil 12. Dört deney grubunda GV oosit sayısının toplam oosit sayısına yüzde oranı.....	63
Şekil 13. Dört deney grubunda AMH ELISA sonuçlarının karşılaştırılması.....	67
Şekil 14. Dört deney grubunda GSH ELISA sonuçlarının karşılaştırılması.....	67
Şekil 15. Dört deney grubunda NF-κB ELISA sonuçlarının karşılaştırılması.....	68
Şekil 16. Dört deney grubunda TNFα ELISA sonuçlarının karşılaştırılması.....	68
Şekil 17. Dört deney grubunda IL-1β ELISA sonuçlarının karşılaştırılması.....	69

RESİMLER

Resim 1. Over foliküllerinin gelişim aşamaları.....	6
Resim 2. Batın bölgesi tıraş edilmiş ve traştan sonra batikonlanmış sıçan.....	17
Resim 3. Abdominal insizyondan sonra görülen tuba uterinalar.....	18
Resim 4. Cerrahi işlemler sonrası batınların kapatılması.....	19
Resim 5. Tedavi grubuna mirisetin enjeksiyonu.....	20
Resim 6. Batın bölgesi ve göğüs kafesinin açılması.....	21
Resim 7. Kalpten kan enjeksiyonu ile ötenazinin gerçekleştirilmesi.....	22
Resim 8. Ötenazi sonrası tuba uterinalar ve overler.....	23
Resim 9. Histokimyasal ve biyokimyasal analizlerde kullanılan cihazlar.....	28
Resim 10. Kontrol grubuna ait over kesiti.....	34
Resim 11. Kontrol grubuna ait over kesiti.....	35
Resim 12. İskemi grubuna ait over kesiti.....	36
Resim 13. İskemi grubuna ait over kesiti.....	36
Resim 14. İskemi grubuna ait over kesiti.....	37
Resim 15. İskemi grubuna ait over kesiti.....	38
Resim 16. İskemi grubuna ait over kesiti.....	38
Resim 17. İ/R grubuna ait over kesiti.....	39
Resim 18. İ/R grubuna ait over kesiti.....	40
Resim 19. İ/R grubuna ait over kesiti.....	40
Resim 20. Tedavi grubuna ait over kesiti.....	41
Resim 21. Tedavi grubuna ait over kesiti.....	42

Resim 22. Kontrol grubuna ait over kesiti.....	43
Resim 23. Kontrol grubuna ait over kesiti.....	43
Resim 24. İskemi grubuna ait over kesiti.....	44
Resim 25. İskemi grubuna ait over kesiti.....	44
Resim 26. İskemi grubuna ait over kesiti.....	45
Resim 27. İ/R grubuna ait over kesiti.....	45
Resim 28. İ/R grubuna ait over kesiti.....	46
Resim 29. Tedavi grubuna ait over kesiti.....	46
Resim 30. Tedavi grubuna ait over kesiti.....	47
Resim 31. Kontrol grubuna ait over kesitinde VEGF immünperoksidaz boyama....	49
Resim 32. Kontrol grubuna ait over kesitinde VEGF immünperoksidaz boyama....	49
Resim 33. İskemi grubuna ait over kesitinde VEGF immünperoksidaz boyama.....	50
Resim 34. İ/R grubuna ait over kesitinde VEGF immünperoksidaz boyama.....	50
Resim 35. Tedavi grubuna ait over kesitinde VEGF immünperoksidaz boyama.....	51
Resim 36. İskemi grubuna ait over kesitinde VEGF immünperoksidaz boyama.....	51
Resim 37. İ/R grubuna ait over kesitinde VEGF immünperoksidaz boyama.....	52
Resim 38. Tedavi grubuna ait over kesitinde VEGF immünperoksidaz boyama....	52
Resim 39. Kontrol grubuna ait over kesitinde Caspase3 immünperoksidaz boyama	54
Resim 40. Kontrol grubuna ait over kesitinde Caspase3 immünperoksidaz boyama	54
Resim 41. İskemi grubuna ait over kesitinde Caspase-3 immünperoksidaz boyama.	55
Resim 42. İ/R grubuna ait over kesitinde Caspase-3 immünperoksidaz boyama....	55
Resim 43. Tedavi grubuna ait over kesitinde Caspase-3 immünperoksidaz boyama.	56
Resim 44. Tedavi grubuna ait over kesitinde Caspase-3 immünperoksidaz boyama.	56

Resim 45. İskemi grubuna ait over kesitinde Caspase-3 immünperoksidaz boyama.	57
Resim 46. İskemi grubuna ait over kesitinde Caspase-3 immünperoksidaz boyama.	57
Resim 47. İ/R grubuna ait over kesitinde Caspase-3 immünperoksidaz boyama.....	58
Resim 48. Tedavi grubuna ait over kesitinde Caspase-3 immünperoksidaz boyama.	58
Resim 49. Kontrol grubundan toplanan oositler (a), kümülüs oosforus hücrelerinden temizlenmiş oositler (b).....	64
Resim 50. İskemi grubundan toplanan oositler (a), kümülüs oosforus hücrelerinden temizlenmiş oositler (b)	64
Resim 51. İskemi-Reperfüzyon grubundan toplanan oositler (a), kümülüs oosforus hücrelerinden temizlenmiş oositler (b)	65
Resim 52. Tedavi grubundan toplanan oositler (a), kümülüs oosforus hücrelerinden temizlenmiş oositler (b)	65

TABLÖLAR

Tablo 1. Histolojik doku takibi işlemleri.....	24
Tablo 2. Histolojik doku takibi be boyamalarda kullanılan kimyasallar.....	29
Tablo 3. Dört deney grubuna ait oosit sayıları.....	59
Tablo 4. Dört deney grubu arasında toplam oosit, M2, M1 ve GV oosit sayılarının ve farklı matürasyon evresindeki yüzdelik oranlarının karşılaştırılması.....	61
Tablo 5. Dört deney grubuna ait biyokimyasal analiz verileri.....	66

ÖZET

GİRİŞ VE AMAÇ: Bu çalışmada, over detorsiyonunu takiben gelişen iskemi-reperfüzyon hasarında Mirisetin'in olası koruyucu etkilerini sıçan modelinde histokimyasal ve biyokimyasal analizlerle araştırmak amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM: Wistar Albino cinsi 32 dişi sıçan Kontrol, İskemi, İskemi-Reperfüzyon (İ/R) ve Tedavi olarak rastgele 4 gruba ayrıldı. Tüm gruplara abdominal insizyon yapıldı. Kontrol hariç diğer gruplara over torsiyonu uygulandı. İ/R ve Tedavi gruplarına torsiyonu takiben 3 saat sonra detorsiyon yapıldı. Tedavi grubuna ilaveten intraperitonel Mirisetin (20 mg/kg) verildi. Sıçanlar üç östrus siklusu boyunca takip edildikten sonra tüm gruplara oosit stimülasyonu için hormonlar uygulandı. Sıçanlar eksanguinasyonla sakrifiye edilerek kan örnekleri ve overler alındı. Kanda AMH, GSH, NF- κ B, TNF α ve IL-1 β düzeyleri ELISA ile ölçüldü. Tüm sıçanların sağ overlerinden toplanan oositler invert mikroskopta incelendi. Histolojik takibe alınan sol overlerin H-E, Masson-Trikrom ve immünperoksidaz yöntemleriyle boyanan kesitleri ışık mikroskopunda değerlendirildi.

BULGULAR: Histopatolojik over hasarını değerlendirmek için kesitlerde vasküler dilatasyon-hemoraji, ödem, doku ayrışması ve foliküler dejenerasyon skorlaması yapıldı. Kontrol grubuyla kıyaslandığında, İskemi ve İ/R gruplarında doku hasarı anlamlı düzeyde yüksek ($p<0,001$) bulunurken, Tedavi grubunda saptanan minimal hasar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Tedavi grubundaki hasar İskemi ve İ/R gruplarına kıyasla anlamlı olarak düşüktü ($p<0,01$). VEGF ve Caspase-3 antikolları ile işaretlenen immün-pozitif hücre sayıları İskemi ve İ/R gruplarında, Kontrol ve Tedavi gruplarına kıyasla anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0,001$). Kontrol ve Tedavi grupları kıyaslandığında, VEGF-pozitif hücreler ve Caspase3-pozitif hücreler sırasıyla $p<0,05$ ve $p<0,001$ düzeyinde Tedavi grubunda yüksek bulundu. Toplam oosit sayısı, İskemi ve İ/R gruplarında Kontrole kıyasla anlamlı düzeyde düşüktü ($p<0,001$); Kontrol ile Tedavi grubu arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). Biyokimyasal analizlerde, IL-1 β bakımından, İskemi ve Tedavi grupları arasında anlamlı fark olması ($p=0,05$) dışında, diğer analizlerde gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

SONUÇ: Elde edilen bulgular ışığında, over torsiyonu/detorsiyonu ile gelişen klinik tabloda tedaviye Mirisetin eklenmesinin iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: İmmünohistokimya, iskemi-reperfüzyon, mirisetin, oosit, over torsiyonu

SUMMARY

Investigation Of The Effects Of Myricetin On Ovarian And Oocyte Quality Against Experimental Ischemia-Reperfusion Damage With Microscopic And Biochemical Analysis

INTRODUCTION AND PURPOSE: This study aimed to investigate the possible protective effects of Myricetin on ischemia-reperfusion injury following the ovarian torsion/detorsion model in rats by histochemical and biochemical analyses.

MATERIALS AND METHODS: Thirty-two female Wistar Albino rats were randomly divided into 4 groups as Control, Ischemia, Ischemia-Reperfusion (I/R) and Treatment. Abdominal incision was performed in all groups. Ovarian torsion was applied to all groups except Control. Detorsion was performed 3 hours after torsion in I/R and Treatment groups. Intraperitoneal Myricetin (20 mg/kg) was additionally administered to the Treatment group. After the rats were followed for three estrous cycles, hormones were applied to all groups for oocyte stimulation. The rats were sacrificed by exsanguination and blood samples and ovaries were taken from them. AMH, GSH, NF- κ B, TNF α and IL-1 β levels in the blood were measured by ELISA. Oocytes collected from the right ovaries of all rats were examined under an inverted microscope. The sections of the left ovaries that were taken for histological follow-up, stained with H-E, Masson-Trichrome and immunoperoxidase methods, were evaluated under a light microscope.

RESULTS: To evaluate histopathological ovarian damage on the sections, vascular dilatation-hemorrhage, edema, tissue separation and follicular degeneration were scored. Compared to the Control group, tissue damage was significantly higher in the Ischemia and I/R groups ($p < 0.001$), while the minimal damage detected in the Treatment group was not statistically significant ($p > 0.05$). The damage in the Treatment group was significantly lower compared to the Ischemia and I/R groups ($p < 0.01$). The number of immune-positive cells labeled with VEGF and Caspase-3 antibodies was significantly higher in the Ischemia and I/R groups compared to the Control and Treatment groups ($p < 0.001$). When the Control and Treatment groups were compared using VEGF-positive cells and Caspase-3-positive cells, the Treatment group was found to be higher than the control with significance levels of $p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively. The total oocyte count was significantly lower in the Ischemia and I/R groups compared to the Control ($p < 0.001$); no significant difference was found between the Control and Treatment groups ($p > 0.05$). In biochemical analyses, except for a significant difference between the Ischemia and Treatment groups in terms of IL-1 β ($p = 0.05$), no significant difference was found between the groups in other analyses ($p > 0.05$).

CONCLUSION: The findings of this study reveal the protective effect of Myricetin treatment against ischemia and reperfusion injury on rats due to ovarian torsion/detorsion model.

Key Words: Immunohistochemistry, ischemia-reperfusion, myricetin, oocyte, ovarian torsion

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Over torsiyonu, ovaryumların kendi vasküler eksenini etrafında kısmen veya tamamen dönmesi sonucu kan akımının kesilmesi ile oluşan jinekolojik acil durumlardan biridir. Kadınlarda her dönem görülebilse de özellikle reproduktif dönemde görülme sıklığı yüksektir ve prevalansı %2,7'dir (Hibbard 1985).

Over torsiyonunun devamı halinde kan akımı acilen sağlanmazsa iskemi gelişir, bu durum organ kaybı ile sonuçlanabilecek kadar ilerlerse kadın üreme sağlığını tehdit eder. İskemi sonrasında gelişen doku hasarı, torsiyonun süresine bağlıdır. Bu sebeple tanı konulmada geç kalınmaması ve tedavinin hemen yapılması, kadın üreme sağlığını koruyabilmek adına elzemdir (Chen et al 2001).

Geleneksel tedavi yöntemi iskemi gelişen over dokusunun cerrahi operasyon ile çıkarılmasıdır (Bayer and Wisken 1984). Ancak günümüzde kadın üreme sağlığını korumak için overler organ koruyucu cerrahi yaklaşım ile detorsiyone edilmektedir (Kılıç, Uyanıkoğlu ve İncebıyık 2016).

Dokulara kan akışının kesilmesi ile dokunun oksijensiz kalma durumu iskemi, bu durumu geri döndürmek adına dokunun tekrar oksijenlenmesinin sağlanması reperfüzyon olarak adlandırılmaktadır. Over torsiyonu sebebi ile gelişen iskemiye geri döndürmek amacıyla yapılan detorsiyon işlemi, overde reperfüzyonu sağlar ancak reperfüzyon işlemi dokuda toksik metabolik ürünlerini arttırarak iskemi-reperfüzyon hasarı denilen doku hasarının ortaya çıkmasına yol açmaktadır.

Detorsiyon işlemi sonrası yeniden oksijenlenme, dokuda serbest oksijen radikallerinin üretilmesine, proinflatuar sitokin seviyelerinin artmasına, antioksidan özellik gösteren moleküllerin azalmasına ve bu olaylara bağlı doku hasarının oluşmasına yol açmaktadır (Ali, Mokhemer and Elroby Ali 2022). Overdeki torsiyon-detorsiyon neticesinde ortaya çıkan iskemi-reperfüzyon hasarı, overin hormonal fonksiyonunu ve oosit rezervlerini olumsuz yönde etkilemektedir.

İskemi-reperfüzyon hasarı dokuları iskemi hasarından daha fazla tahrip etmektedir. Bu sebeple deneysel iskemi-reperfüzyon modelleri üzerinde çeşitli yardımcı ajanlar kullanılarak doku hasarını iyileştirmek için yapılan çalışmalar mevcuttur. Kullanılan yardımcı ajanlardan olan antioksidanlar serbest oksijen radikallerinin oluşmasını önleyebilen, dokudan uzaklaştırılmasını sağlayabilen veya dokudaki hasarın giderilmesine yardımcı olan maddelerdir.

Mirisetin de bu antioksidan maddelerden birisidir. Flavonoid sınıfına ait bitkisel kaynaklı bu ürünün, daha önce yapılmış bir over çalışmasında oksidatif stres belirteçleri üzerine etkisi biyokimyasal yöntemlerle incelenmiş ve over torsiyonu açısından olumlu etkileri gösterilmiştir (Topdağı, Tanyeli, Ekinci Akdemir, Eraslan and Güler 2021). Ancak çalışma biyokimyasal analizler ile sınırlı kalmış, dokudaki histolojik değişiklikler ve oosit üzerine etkisi incelenmemiştir.

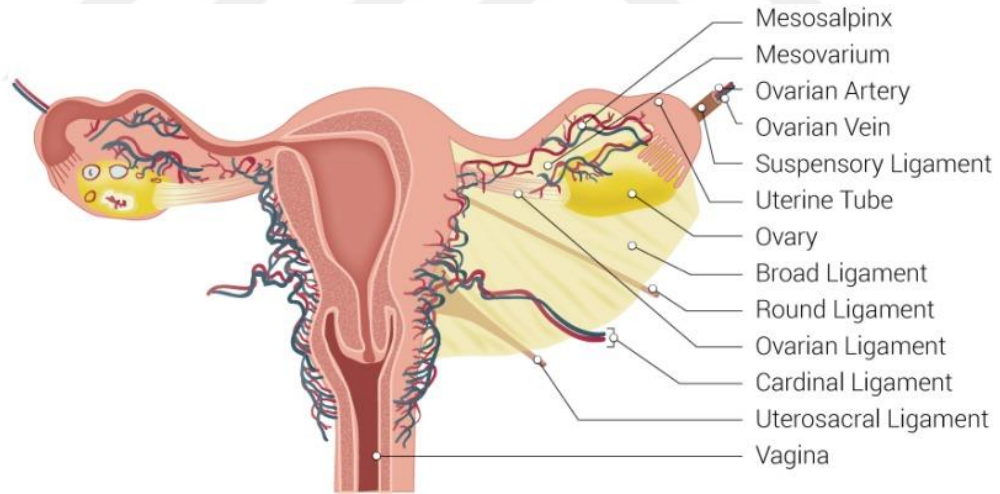
Bu çalışmada, sıçanda over torsiyonu/detorsiyonuna bağlı iskemi-reperfüzyon modeli oluşturarak, mirisetinin over dokusunda yaratılan hasarı gidermeye veya azaltmaya yönelik olası etkilerini, over morfolojisini direkt değerlendiren histokimyasal analizlerle ve inflamatuvar belirteçlerin ölçüldüğü biyokimyasal yöntemlerle araştırmayı ve ayrıca, hem oosit rezervi hem de oosit kalitesi üzerindeki etkilerini anti-Müllerian hormon (AMH) tayini yaparak ve invert mikroskopunda oositleri inceleyerek araştırmayı amaçlamaktayız.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. OVARYUMLAR

Overler (ovaryumlar) uterusun her iki yanına ve tuba uterinaların (ovidukt) altına yerleşmiş olan bir çift organdır. Boyutları hormonal durumlarda değişebilmekle beraber reproduktif dönemde genelde 1 cm kalınlıkta, 3-4 cm uzunlukta ve 1.5-2 cm genişlikte iri bir badem büyüklüğündedir (Ağartan 2017).

Overler, süperior (tubal) kutbundan uzanan ve içinde damarları ve sinirleri barındıran süspansör ligament aracılığı ile pelvis duvarına bağlanır. Overlerin inferior (uterin) kutbu ise ovaryan ligament aracılığı ile uterusu bağlanır. Overler ve bu iki ligamenti, birlikte uterusun broad ligamenti (ligamentum latum) tarafından en dıştan örtülmüştür. Overler mezovaryum adı verilen bir periton katlantısı ile broad ligamentin posterior yüzüne bağlanmıştır. Hilus ise overin mezovaryuma bağlanma yeridir. Organın sinir ve damarları hilus denilen bölümden girer ve çıkarlar (Şekil 1).

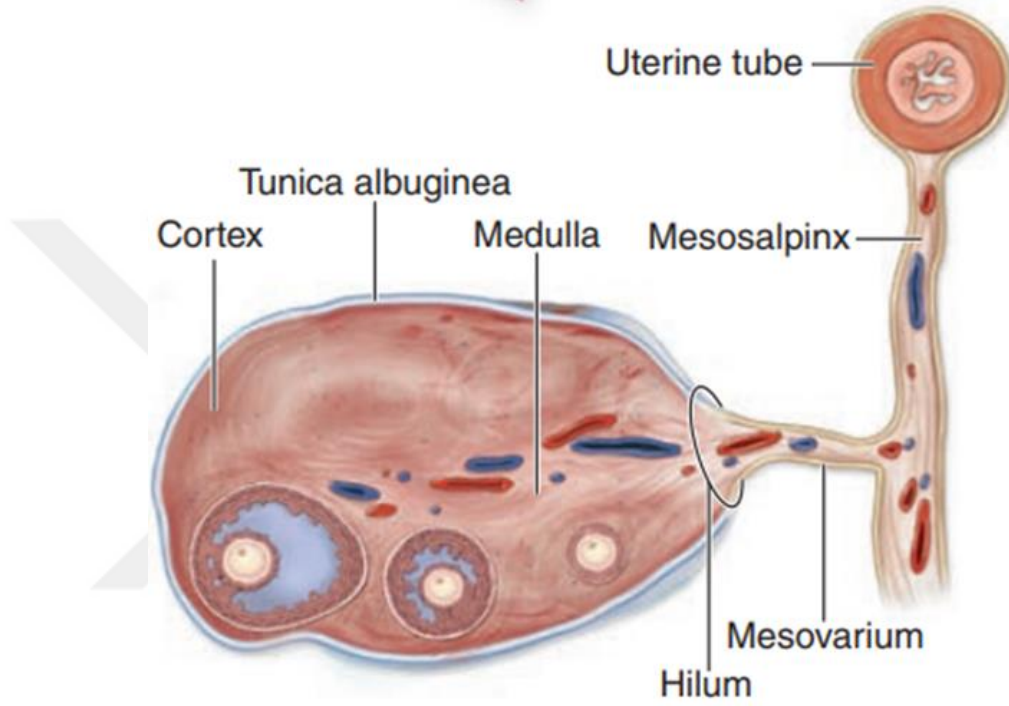


Şekil 1. Anatomik Bağlarla Ovaryum (Han ve Sadiq 2023)

2.1.1. Over Histolojisi

Overin dış yüzeyinde tek katlı yassı ya da tek katlı kübik örtü epiteli olan germinal epitel bulunmaktadır. Germinal epitelin hemen altında bulunan sıkı bağ dokusu yapısındaki tabaka tunika albuginea olarak adlandırılır (Auersperg et al 2001).

Albuginea tabakası sebebiyle overin yüzeyi pembe-beyazımsı renkte gözükür (Gökmen 2003). Bu tabaka altında overler dışta korteks ve merkezde medulla bölümlerini içerir. Gelişmekte olan oositler için mikroçevreyi sağlayan ovaryum folikülleri kortekste yer alır; medullada folikül yoktur. Medulla overin çok sayıda damar, sinir, lenfatik damar içeren bağ dokusundan zengin bölgesidir (Standring S 2005; Şekil 2)



Şekil 2. Over Histolojisi: Tunika Albuginea, Korteks ve Medulla (McKinley and O'Loughlin, 2nd ed)

2.1.1.1. Over folikülleri

Overde foliküller, gelişim evrelerine göre sınıflandırılırlar. Histolojik olarak 3 tip folikül bulunur;

- Primordiyal Foliküller
- Gelişmekte Olan Foliküller (Primer ve Sekonder Foliküller)
- Olgun (Graaf) Foliküller

2.1.1.1.1. Primordiyal (ilkel) foliküller

Foliküler gelişimin ilk evresi olan primordiyal foliküllerin ilk olarak ortaya çıkışı fetal gelişimin 3. ayında olur. Tunika albuginea tabakasının hemen altındaki korteks bölümünde yer alırlar. Primer oosit tek tabaka yassı folikül hücreleri ile çevrilidir (Resim 1).

2.1.1.1.2. Primer (birincil) foliküller

Gelişmekte olan foliküllerin ilk evresidir. Primer oosit büyümeye başladığında folikül hücrelerinde ve komşu stromada da değişimler meydana gelir. Oosit çevresindeki yassı hücreler önce proliferasyonla kübik şeklini alır. Primer oositi tek tabaka kübik folikül hücrelerinin çevrelediği bu yapıya unilaminer primer folikül veya erken primer folikül denir (Resim 1).

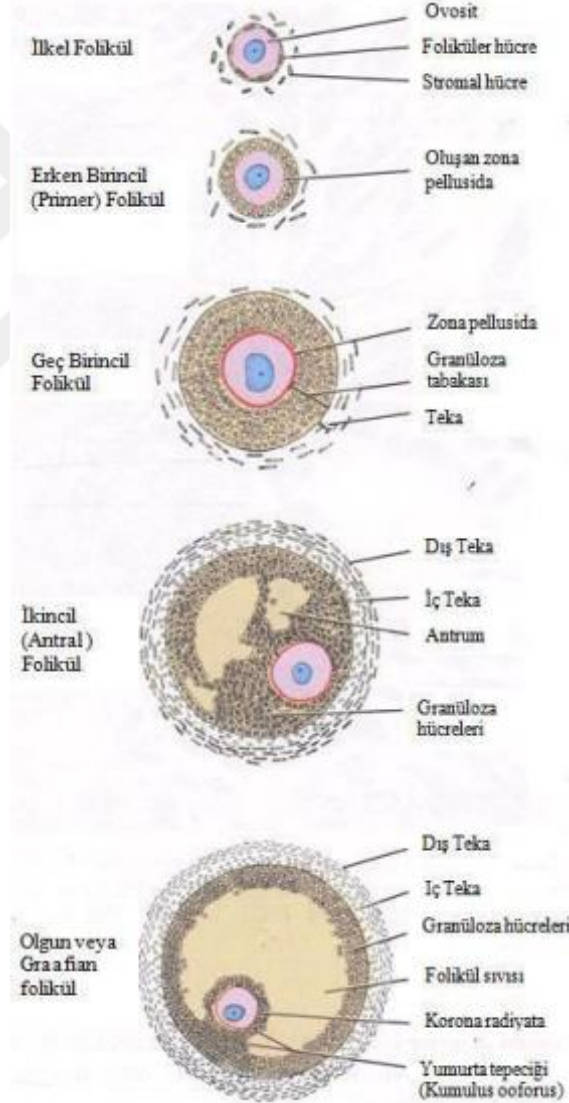
Primer oositin büyümeye devam etmesi ile salgılanan özel proteinler ile oosit ve folikül hücreleri arasında zona pellusida tabakası oluşur. Zona pellusida oosit tarafından yapılan koruyucu bir tabakadır. Tek katlı kübik folikül hücreleri mitotik proliferasyona uğrar ve primer oositi çok katlı folikül hücreleri çevreler. Bu aşamada folikül hücreleri artık granüloza hücreleri; oosit çevresindeki çok katlı epitel yapı da granüloza tabakası ismini alır. Folikül çevresindeki stromal hücrelerin düzenlenişi ile folikül çevresinde teka folikülü adı verilen bağ doku kılıfı oluşur (Bukovsky et al., 2004). Primer oositi granüloza hücrelerinin çevrelediği, zona pellusida ve teka folikülü tabakasının görülebilir olduğu yapıya multilaminer primer folikül veya geç primer folikül denir (Resim 1).

2.1.1.1.3. Sekonder (ikincil) foliküller

Primer folikülün hacimce büyümesi ile konumu korteks stromasının derinliklerine doğru değişir. Bu konumlandırmada granüloza hücrelerinin aralarında likör folikülü denilen içi sıvı dolu kaviteler oluşur ve bunların birleşmesi ile tek bir kavite meydana gelir ve antrum olarak isimlendirilir. Folikül bu durumda sekonder folikül veya antral folikül adını alır (Resim 1).

2.1.1.1.4. Graaf (olgun) foliküller

Sekonder folikülün büyümesi arttıkça antrum genişler ve granüloza tabakası şekillenir. Oositin çevresinde antruma doğru çıkıntı yapan granüloza hücreleri kümülüs ooforus, oositin hemen çevresinde bulunarak ovulasyon sırasında oositle beraber atılacak olan granüloza hücreleri ise korona radiyata adını alır (Şekil 1). Folikül olabilecek en büyük hacmine ulaştığında granüloza hücreleri mitotik aktivitelerini kaybetmeye başlar ve antrum boyutu arttıkça granüloza tabakası incelir (Ross, Histology A Text and Atlas, 6th ed). Folikül gelişmesinin bu aşamasında teka tabakaları folikülün dışında görünür haldedir.



Resim 1. Over foliküllerinin gelişim aşamaları (Ross, Histology A Text And Atlas, 1995)

2.1.2. Over Fizyolojisi

Overlerin temelde iki görevi vardır (Espey 1994). Bunlardan biri dişi üreme hücresi olan oosit üretimini sağlamak, diğeri de bazı steroid hormonların sentezi yapmaktır.

Over tarafından salgılanan steroid hormonlardan en temel iki tanesi östrojen ve progesteron hormonlarıdır (Hardy et al 2000). Bu hormonlar üreme hücrelerinin gelişmesinde, ovulasyonda, gebeliğin başlamasında ve devamında rol oynar, sekonder seks karakterlerinin gelişimlerinde ve meme bezlerinin büyümelerinde kontrolü sağlarlar (Hawkins and Matzuk 2008).

2.1.2.1. Oosit üretimi

Gametogenez, üreme hücreleri olan gametlerin oluşması ve gelişmesi sürecidir. Gametlerin kökeni primordiyal germ hücreleri olup ilk olarak yolk kesesi duvarında, allantoise yakın bölgede görülürler. Bu olay intrauterin dönemde 3. haftanın sonlarına denk gelir. 4-5. haftalarda yolk kesesinden ilkel gonadlara geçiş gametogenez sürecinin başlangıcıdır. Dişi üreme hücrelerinin oluşumu olan oogenezi, primordiyal germ hücreleri, genetik olarak dişi gonada ulaştığında başlar. Gonadlara ulaşamayan germ hücreleri elimine edilir, ayrıca gonadlar da primordiyal germ hücresi göçü almazsa gelişimlerini tamamlayamaz (Motta et al 1997). Gonadlara ulaşıldığında, oogoniumlara farklılaşma ilk adımdır. Mitoz geçirerek sayılarını arttıran oogoniumlar, bölünerek birbirleri ile ilişkili hücre kümeleri oluşturur. Fetal gelişimin 3. ayında primer oositler ortaya çıkar ve foliküler hücreler tarafından çevrelenir. Doğuma az bir zaman kala primer oositlerin hepsi 1. mayoz bölünmenin profaz evresine girmiş ve foliküler hücreler ile çevrelenerek primordiyal folikül halini almış durumdadır. Bu evrede mitoz bölünme durmuş, primer oositler 1. mayoz bölünmenin profaz evresinde beklemektedir. Bunu sağlayan oosit maturasyonunu inhibe eden madde (OMI) isimli küçük bir peptittir. Yenidoğan korteksinde bulunan 1-2 milyon primordiyal folikülün atreziye uğraması devam eder ve puberteye gelindiğinde sayı 400 bine kadar düşer. Bunların çok azı ovulasyon ile gonad dışına atılır. Ovulasyondan önce gerçekleşen ani gonodotropin salınımı primer oositin bölünmeye devam etmesini sağlar. Bu durum sekonder oosit ve 1. kutup cisimciğinin oluşmasıyla sonuçlanır. Sekonder oosit 2. mayoz bölünmeye girer ancak

ovulasyondan hemen önce duraklar. Ancak döllenme olduğu takdirde bölünme devam eder.

2.1.2.2. Oosit rezervi

Oosit rezervi bir kadında üreme potansiyelini açıklayan bir terimdir. Oosit sayısı ve oosit kalitesi üreme sağlığını direkt etkileyen unsurlardır. Doğumda overde bulunan tek folikül türü primordiyal foliküldür. Her kadın 1-2 milyon primordiyal folikül havuzu ile doğar ancak puberteye kadar bu foliküllerin çoğu atreziye uğrar ve sayıları giderek azalır. Folikül sayısının yaşla beraber azalması beraberinde oosit kalitesinin düşüşünü de getirmektedir. Özellikle 35 yaş sonrası kadınlarda oosit kalitesinin düştüğü gözlenmektedir. Bu duruma çeşitli çevresel ve genetik faktörlerin ve jinekolojik hastalıkların sebep olduğu düşünülmektedir (Tal and Seifer 2017).

2.1.2.2.1. Anti-Müllerian hormon (AMH)

Dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) ailesinde yer alan, glikoprotein yapıya sahip bir hormon olan AMH, gelişmekte olan folikülün granüloza hücrelerinden sentezlenir (Zec et al 2011). Üreme çağı boyunca varlığını sürdürür (Visser and Themmen 2005). AMH'nin overlerde ana fizyolojik rolü foliküler rezervin erken tükenmesini engellemektir (Zec et al 2011). AMH yokluğunda primordiyal folikülden gelişmekte olan foliküllere olan geçiş daha hızlıdır (Nilsson et al 2007). Aynı zamanda dominant folikül seçimini düzenleyen otokrin bir faktör olarak da görev yapar (Zec et al 2011). Reprodüktif yaşam boyunca gelişmekte olan foliküllerden AMH salınımı serum seviyelerine de etki eder. Klinikte over rezervinin belirteci olarak serum AMH düzeyleri kullanılır. Ayrıca menstrual siklusun herhangi bir fazında ölçülebilmesi de klinik kullanımı açısından avantaj sağlar (Marca et al 2006) Over torsiyonuna bağlı oluşan iskemi ve detorsiyon sonrası gelişen reperfüzyona bağlı iskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarında doku hasarının şiddetini ve hasar sonrası kalan oosit miktarını tespit etmek için kullanılabilir.

2.1.2.3. Oosit olgunluğu ve kalitesi

Oositler bölünme evrelerine göre 3 farklı olgunlukta olabilir. Bunlar germinal vezikül oositler, metafaz I oositler ve metafaz II oositlerdir. Bu derecelendirme oosit incelendiğinde görülen kutup cisimciği ve zona pellusida ikilisine bağlıdır.

Germinal Vezikül (GV) Oositler: Mayoz bölünmeleri henüz gerçekleşmemiş olan oositlerdir. Olgun olmayan bu oositler döllenme aşamasına geçemez.

Metafaz I (M1) Oositler: Henüz olgunlaşma aşamasına geçmemiş, mayoz 1 evresinde bekleyen oositlerdir. Olgunlukları yeterli değildir; ancak uygun koşullar ile olgunlaşmaları sağlanabilir.

Metafaz II (M2) Oositler: Olgun, döllenmeye hazır oositlerdir. Mayoz bölünmenin 2. evresindedirler.

Oosit kalitesi, döllenme başarısı ve takiben embriyo kalitesini de etkileyen önemli bir etkidir. Folikül içerisinde bulunan oositlerin gelişmesi, granüloza hücreleri ve çevresindeki stromal hücreler ile ilişkilidir ve bu hücrelerin oosit ile arasında gerçekleşen iletişime bağlıdır. Bu hücrel bağlantılarda meydana gelen herhangi bir sorun, oositin maksimum genişliğine ulaşmasını, olgunlaşmasını ve döllenme yeteneğini etkiler (Hutt and Albertini 2007). İyi kalite bir oosit, normal görümlü ve şeffaf sitoplazmaya sahiptir. Bir tane normal görünümde kutup cisimciği vardır, zona pellusidası normal kalınlığa sahiptir ve berrak gözükür. Orta kalite oositte, sitoplazmada yoğun olmayan bozulmalar görülür ve hafif granülasyonlar mevcuttur. Zona pellusida da şekil bozukluğu ve düşük pigmentasyon gözlenir. Düşük kalite oositlerde ise; sitoplazma tamamen bozulmuş, kutup cisimciği anormal şekilli, zona çok kalın ve koyu renklidir.

2.2. OVER TORSİYONU

Over torsiyonu, overin kendisine ait vasküler eksen etrafında kısmen veya tamamen dönmesi sonucu kan akımının bozulması olayıdır (Huchon and Faucannier 2010). Torsiyon, kan ve lenf damarlarında bozulma, over dokusunda iskemi ve hatta nekroza kadar giden ciddi bir duruma yol açar (Graif and Itzhak 1988). Bu sebeple

over torsiyonu, erken tanısı konularak tedaviye geç kalınmaması önem arz eden jinekolojik acil bir durumdur ve görülme sıklığı %2,7'dir (Hibbart 1985).

Kadınlarda her dönemde görülebilse de özellikle reproduktif dönemde görülme sıklığı yüksektir. Ancak bütün torsiyon vakalarının içinde en yüksek oran (%20-25) gebelik sırasında görülen over torsiyonuna aittir (Bouguizane et al 2003, Graif and Itzhak 1988).

2.2.1. İskemi Hasarı

İskemi, bir organa veya dokuya gelen kan akışının pıhtı veya mekanik etkenler ile yeterli olmaması veya tamamen durması ile organın veya dokunun oksijensiz kalmasıdır (Dorweiler et al 2007, Stokes and Granger 2005). Yeterli oksijenlenme, hücrede normal fonksiyonların sürdürülebilmesi için temel şartlardan biridir. İskemi sonucu dokuda yeterli oksijen sağlanamaması hücresel fonksiyonlarda bozukluğa ve hücreyi ölüme götürecek kimyasal olaylar serisine sebebiyet verir, dokuda iskemi hasarı oluşur (Jennings et al 1990, Kloner and Jennings 2001).

Over torsiyonunda iskemi nedeniyle gelişen doku hasarı, torsiyonun süresine ve derecesine bağlıdır.

2.2.1.1. İskemide VEGF ve Caspase-3'ün değerlendirilmesi

Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF), 6p21.3 kromozomu üzerinde yer alan VEGF geni tarafından vaskülogenez ve anjiyogenezi uyaran hücrelerde kodlanır (Vincenti et al 1996). Vücutta endotel hücreleri, düz kas hücreleri, osteoblastlar, makrofajlar, fibroblastlar ve hipertrofik kondrositler tarafından üretilir (Deckers et al 2002, Bluteau et al 2007). Literatürde, hasarlı dokuda VEGF'in vaskülogenez ve anjiyogenezi başlatarak, doku tamiri sürecine katıldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Ferrara and Davis-Smyth 1997, Patrick et al 2011).

Caspase-3, CASP3 geni tarafından kodlanan bir kaspaz proteindir. Apoptozla ilişkili sistein protezların bir grubu olan kaspazlar, hücrede apoptozu engelleyen proteinleri inhibe eder veya ortadan kaldırır (Yerlikaya 2009). Apoptoz, hasara uğramış ya da ömrünü tamamlamış hücrelerin ortadan kaldırıldığı "programlanmış hücre ölümü" mekanizmasıdır. Apoptoz başladığında hücreler boyutlarını küçültür, kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmentasyonları oluşur. Yanı sıra, süreç ilerledikçe fagosit

edilecek olan membranla çevrilmiş apoptotik cisimler de gözlenir (Altunkaynak ve Özbek 2008). Hasarlanan dokuda, proteolitik parçalanmadan sonra kaspazlar aktif hale geçerek kaspaz aktivasyon zincirini başlatır. Kaspazlar mitokondride membran hasarı oluşturur ve bu olayların sonucunda; zar değişimleri, hücre iskeleti ve çekirdek değişimine yol açan hasarlar ortaya çıkar (Saikumar et al 1999, Leach 1998).

2.3. OVER DETORSİYONU

Over torsiyonunun geleneksel tedavisi, torsiyone olmuş dokunun cerrahi olarak çıkarılmasıdır (Bayer and Wiskind 1994). Ancak bu durum kadınlarda üreme sağlığına olumsuz etki ederek, üreme başarısızlığına sebep olur. Günümüzde konservatif tedavi yaklaşımı olarak over detorsiyone edilmektedir. Over detorsiyonu, kendi vasküler eksen etrafında dönerek torsiyone olmuş overin cerrahi müdahale ile geri döndürülmesidir. Organ koruyucu cerrahi bir yaklaşım olan over detorsiyonu ile organın fonksiyonunu geri kazandığı bilinmektedir, nadiren overin atrofiye gitmesi söz konusu olabilir (Kılıç ve ark 2016, Oelsner et al 1993).

2.3.1. Reperfüzyon Hasarı

Reperfüzyon, iskemi sonrası dokunun tekrar kanlanması kimyasal veya mekanik müdahaleler ile sağlanması ve böylece, dokuda oksijen miktarının yeniden artmasıdır (Kukan 2003; Sasaki and Joh 2007; Stokes and Granger 2005). İskemiye bağlı hasarı geri döndürmek amacıyla yapılan doku reperfüzyonu, hücre fonksiyonları büyük ölçüde yerine getirmesine rağmen, dokuda reperfüzyon hasarı denen olayların meydana gelmesine sebep olur (Yazıhan 2007). Reperfüzyon hasarında temel olarak sorumlu iki mekanizma vardır:

1. İnflamatuvar Yanıt
 - a. Nötrofil-Endotel Etkileşimi
 - b. Kompleman Aktivasyonu
2. Serbest Oksijen Radikalleri (SOR) Oluşumu

İskemi ve reperfüzyonu takiben gelişen doku hasarı “İskemi-Reperfüzyon Hasarı (İ/R Hasarı)” olarak adlandırılır. İ/R hasarı hakkında yapılmış çalışmalardan

anlaşılan; iskemiye maruz kalan dokuda esas hasarın dokunun tekrar kanlanması ile ortaya çıkan toksik metabolit ürünlere bağlı olduğudur (Cerqueira et al 2005, Mangino et al 1989, Piper et al 2003).

2.3.1.1. İnflamatuvar yanıt

Reperfüzyon sonrası gelişen inflamatuvar yanıt, kompleman ve polimorf nükleuslu lökosit (PMNL) – endotel aktivasyonu ile ilgilidir. İnflamatuvar yanıtın sadece torsiyon ve reperfüzyon bölgesinde kalmayıp, reperfüzyon ile ilişkili vücudun diğer bölümlerini ya da başka bir organı etkilemesi halinde çok sayıda sitokin, kemokin ve proinflamatuvar metabolitlerin kan dolaşımı aracılığıyla dağılması ve inflamasyonun tüm vücuda yayılması söz konusu olur (Gourdin et al 2009).

2.3.1.1.1. Sitokinler

Sitokinler hücrelerde haberleşme, biyolojik fonksiyonların düzenlenmesi ve özellikle inflamasyonda önemli rolleri bulunan protein yapılı moleküllerdir. Başlıca makrofaj, lenfosit, fibroblast ve endotel hücrelerinde üretilen bu moleküller birçok hücre tarafından salınır. Sitokinler; interlökinler, interferonlar, tümör nekroz faktörler, kemokinler ve büyüme faktörlerinden oluşmaktadır (Onat 2nd ed., Desborough 2000).

2.3.1.1.1.1. Tümör nekroz faktör- α (TNF- α)

Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α), 6p21.3 kromozomu üzerinde bulunan gen tarafından üretilen, molekül ağırlığı 17 kDa olan proinflamatuvar bir sitokindir ve hücrelerde SOR'lara yanıt olarak salınırlar. Makrofaj, monosit, T ve B lenfositler gibi hücrelerde üretilirler (Burtis et al 2006, Gruss ve Dower 1995). Çeşitli inflamatuvar durumların patogeneğinde rol oynarlar. TNF- α 'nın, çoğu hücrede bulunan TNF reseptörlerine bağlanması; NF- κ B transkripsiyon faktörü aktivasyonu gibi çeşitli sinyal yollarını aktive ederek sitokin salınımı ve apoptozu başlatır, böylece inflamatuvar yanıtı neden olur (Gottlieb 2007). TNF- α , endotel aktivasyonunda ve lenfosit hareketinde rol oynar ve otoimmünite, akut ve kronik inflamatuvar durumlarında önemli araçlardan biridir (Gruss and Dower 1995).

2.3.1.1.1.2. İnterlökin- 1 β (IL-1 β)

İnterlökin- 1 β (IL-1 β), IL1B geni tarafından kodlanan ve sitokinlerin İnterlökin-1 ailesinin üyesi olan bir proteindir. Temel olarak inflamasyon, yaralanma ve enfeksiyon üzerine mononükleer ve epitel hücreler tarafından üretilirler, lenfositleri aktive ederek inflamatuvar sistemde birincil önem arz ederler (Dinarello 1997). Böylece inflamatuvar yanıtta düzenleyici rol oynayarak hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptoz gibi hücreysel olaylarda yer alırlar.

2.3.1.1.2. Nükleer faktör kappa B (NF- κ B)

Nükleer Faktör kappa B (NF- κ B), tüm hücrelerde bulunan bir transkripsiyon faktörüdür. İnflamatuvar sinyal yollarından biri olan NF- κ B, normal ve uyarılmamış hücrelerde sitoplazmada inaktif haldedir. Bu sayede NF- κ B'nin p50/p65 heterodimerlerinin nükleer translokasyonu engellenmektedir.

İnflamatuvar yanıtın izlenmesinde önemli bir yere sahip olan p65 heterodimeri doku hasarı, serbest radikaller gibi faktörler veya TNF α ve IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinlerin varlığında aktive edilir. İ/R sonrası doku hasarı ve SOR'ların etkisi ile aktive olduğunda NF- κ B/p65 konsantrasyonunun artması beklenir.

2.3.1.2. Serbest oksijen radikalleri (SOR)

Serbest radikaller, eşleşmemiş tek elektronu bulunan bileşikler olup bu özelliklerinden dolayı reaktif özellik gösterirler (Tinggi 2008, Serafini ve Del Rio 2004). Hücre zarı ve DNA gibi önemli hücreysel bileşikler ile reaksiyona girerek hücrelerde fonksiyon bozukluğuna sebep olurlar (Sarıoğlu Yardımcı 2017). Fizyolojik süreçte, metabolizmanın normal seyri boyunca sürekli olarak üretilirler ancak konsantrasyonları belli bir değerin altında kaldığı sürece toksik etkiler gözlenmez. Üretim ve yıkımları arasındaki denge bozulduğunda, hücrelerdeki protein, lipid ve karbonhidrat metabolizmasında inreferanslar meydana gelir. Bu ürünler yüksek konsantrasyonda lipidler ile etkileşerek lipid peroksidasyonuna neden olurlar ve hücre membranı geçirgenliğini olumsuz yönde etkilerler (Akkoç 2008). SOR'ların proteinler ile etkileşimlerinde ise hücredeki hasar oranı, SOR'ların

etkileştiği proteinin aminoasit yapısına bağlıdır (Karabulut and Göluy 2016). Serbest oksijen radikalleri reperfüzyon hasarının çoğunluğundan sorumludur.

2.3.1.2.1. Glutasyon (GSH)

Glutasyon (GSH), bütün memeli dokularında bulunan ve hücreleri oksidatif strese karşı korumada görevli proteinlerden biridir (Cadirci ve ark 2010). Karaciđerde glutamat, sistein ve glisinden sentezlenir ve tripeptid yapıdadır. Hücrelerde reaktif oksijen türlerinin toksik etkilerinden koruyucu antioksidan savunmada görev alır, SOR'ların ortaklanmamış elektronuna kendi yapısındaki elektronlardan bir tanesini bağışlayarak bunların hücrede oluşturacağı hasarları önler ve kendileri okside hale gelir (Meister ve Larsson 1989). Okside formları kendilerinin hücre hasarı oluşturmaması için dimerler oluşturarak (GS-SG) eşleşmemiş elektronlarını paylaşırlar. Glutasyon redüktaz enziminin okside glutasyonu redükte glutasyon formuna dönüştürmesi sonrasında başta anlatılan SOR türevlerinin nötralizasyon işleminin devam eder. SOR miktarının artışına bağlı olarak düzeylerinde azalmanın izlendiği redükte GSH, lipid peroksidasyonunu gösteren belirteçlerden bir tanesidir. 2014 yılında yapılan bir çalışmada İ/R sonrası sıçan over dokusunda GSH konsantrasyonlarının anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (Yapca ve ark 2014).

2.4. ANTİOKSİDAN SİSTEMLERİ

Vücutta serbest oksijen radikallerinin toksik etkilerini ve oluşumlarını önleyen, bu moleküllerin dokudan temizlenmesini arttırarak hücre ve doku hasarını azaltan veya engelleyen savunma maddeleri bulunmaktadır (Sarioğlu Yardımcı 2017). Antioksidanlar olarak adlandırılan bu maddeler, işlevlerine göre üç grup altında incelenir. Primer antioksidanlar yeni SOR oluşumunu önlerken, sekonder antioksidanlar dokuda var olan SOR'ların uzaklaştırılmasında görev alır. Tersiyer antioksidanlar ise dokuda fonksiyonu bozulan mekanizmaların onarılmasında yer alır (Akkuş 1996).

2.4.1. Mirisetin

Mirisetin (3, 3', 4', 5, 5', 7-heksahidroksiflavon) çayda, sebze ve meyvelerde bunlara ek olarak kuruyemişlerde de bulunan dođal bir flavonoiddir (Jung et al 2017, Ross

and Kasum 2002). Anti-inflamatuar (Ekinci-Akdemir et al 2018, S-J Wang et al 2010) antioksidan (Ekinci-Akdemir et al 2018, B Wang et al 2017) analjezik, antitümöral (Ma et al 2015) ve antibakteriyel (Silva et al 2017) etkilere sahip bir maddedir.

Literatürde Mirisetin ile ilgili daha önce yapılmış çeşitli çalışmalar mevcuttur. Sepsis modeli oluşturulan fareler üzerinde yapılan çalışmada deneklerde hayatta kalma oranına bakılmış, sepsis ile ilişkili akut akciğer hasarında Mirisetin'in koruyucu etkisi araştırılmıştır (Xu et al 2021). Bağırsak İ/R hasarında inhibitör olarak görev yaptığı (Sun et al 2018), NF-κB yolağının aktivasyonunu ve inflamatuvar sitokinlerin salınımını inhibe ederek LPS kaynaklı kalp hasarını hafiflettiği bilgisi mevcuttur. Mirisetin'in fare kalbinde oksidatif stresi ve hücrel apoptozu azalttığı bilinmektedir (Zhang et al 2018). Sıçan modelinde yapılmış bir deneysel çalışmada ise Mirisetin'in gastrointestinal sisteme etkisi araştırılmış ve Mirisetin'in alkole bağlı gelişen mide ülseri üzerinde ön tedavi olarak kullanıldığında koruyucu etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Park et al 2021). Sıçanlarda deneysel testis iskemisi üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise İ/R hasarı üzerine Mirisetin'in olumlu etki gösterdiği bildirilmiştir (Öztürk ve ark 2021).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ETİK İZİN VE PROJE DESTEĞİ

Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAPK) tarafından 2024-26-62-10 numaralı proje ile desteklenen bu çalışmaya, Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 03/01/2024 tarihli ve 05 sayılı yazısı ile etik onay verildi.

3.2. DENEKLER

Çalışmada Wistar Albino cinsi genç yetişkin 200-250 g ağırlığında 32 adet dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar, Sakarya Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi (SÜDETAM)'nde oda sıcaklığında, 12 saat karanlık / 12 saat aydınlık ortamda, çelik kafesler içinde, standart sıçan yemini ve musluk suyunu ad-libitum olarak beslendi.

3.2.1. Deney Grupları

32 adet sıçan rastgele 4 gruba ayrıldı. Deney grupları aşağıdaki şekilde belirlendi.

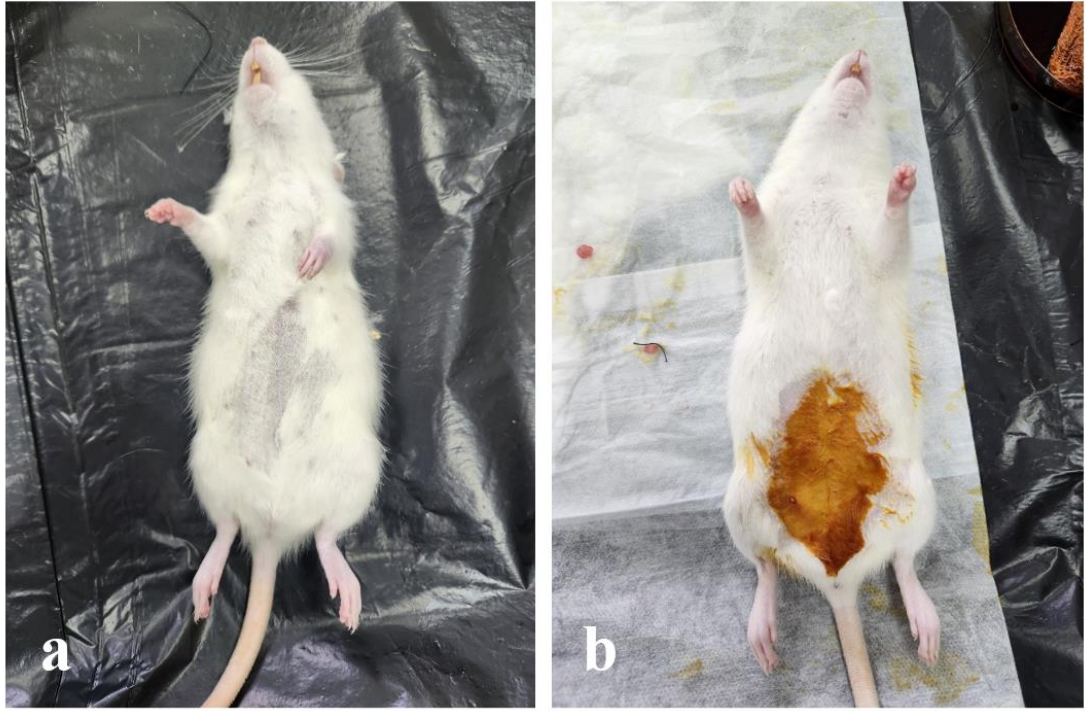
- Grup I – Kontrol (K) Grubu
- Grup II – İskemi (İ) Grubu
- Grup III – İskemi-Reperfüzyon (İ/R) Grubu
- Grup IV – Tedavi (T) Grubu

3.3. DENEY SÜRECİ

3.3.1. Cerrahi İşlemler

Bütün gruplara cerrahi işlem öncesi; Ketamin HCL 100 mg/kg i.m. ve Ksilazin 10 mg/kg i.m. uygulanarak genel anestezi yapıldı. Ekstremitte çekme yanıtı ile sıçanların anestezide olup olmadığı kontrol edildi.

Anestezi sağlandıktan sonra tüm sıçanların batin bölgesi tıraş edilerek batikon ile temizlendi (Resim 2).



Resim 2. Batın bölgesi tıraş edilmiş (a) ve tıraştan sonra batikonlanmış (b) sıçan

3.3.1.1. Kontrol grubu

Kontrol grubu sıçanlarına sadece laparotomi yapılarak batın açıldıktan sonra, herhangi bir tubal işlem yapılmadan tekrar andominal duvar kas ve cilt süturları atılarak batın kapatıldı. Böylece kontrol olarak sham grubu oluşturuldu.

3.3.1.2. İskemi grubu

İskemi grubu sıçanlarına abdominal insizyon sonrası over torsiyonu işlemi uygulandı. Bu amaçla İskemi grubunun batınları açıldı, önce tuba uterinalar görüldü (Resim 3) ve takiben overler bulundu. Daha sonra bilateral overler saat yönünde 360⁰ döndürüldü ve bu pozisyonda 5/0 ipek sütur ile karın duvarına sabitlendi. Takiben abdominal insizyon alanı kontrol grubundaki gibi kapatıldı.



Resim 3. Abdominal insizyondan sonra görülen tuba uterinalar

3.3.1.3. İskemi-Reperfüzyon grubu

İskemi-Reperfüzyon grubu sıçanlarına, iskemi grubunda yapıldığı şekilde over torsiyonu işlemi uygulandı ve batinları kapatıldı. Üç saat beklendikten sonra tekrar genel anestezi altında batinları açıldı ve torsiyon dikişleri alınarak overlerde detorsiyon işlemi gerçekleştirildi. Reperfüzyonun göstergesi olarak kan dolaşımının tekrar başladığı gözle görülür olduğunda, batinları diğer gruplarda tanımlandığı şekilde kapatıldı (Resim 4). Böylece İ/R modeli oluşturuldu.



Resim 4. Cerrahi işlemler sonrası batının kapatılması

3.3.1.4. Tedavi grubu

Tedavi grubu sıçanları, iskemi grubunda tarif edildiği şekilde 3 saat boyunca over torsiyonuna maruz bırakıldıktan sonra İ/R grubunda tarif edildiği gibi detorsiyon işlemi uygulandı ve takiben tek doz 20 mg/kg Mirisetin (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) i.p. enjeksiyonu gerçekleştirildi (Resim 5). Sıçanların batınları diğer gruplardaki gibi kapatıldı.



Resim 5. Tedavi grubuna mirisetin enjeksiyonu

3.3.2. Oosit Stimülasyonu

Cerrahi işlemleri takiben tüm gruplara ait sıçanlar üç östrus siklusu (ortalama 15 gün) boyunca ad-libitum takip edildikten sonra ovaryan stimülasyona tabi tutuldu. Ovaryan stimülasyon için, cerrahi işlemler sonrası 16.günde tüm sıçanlara gebe kısrak serum gonadotropini (CHRONOGEST/PMSG, Intervet, İstanbul, Türkiye) 150-300 IU/kg i.p. olarak uygulandı. Bu enjeksiyondan 48 saat sonra tüm gruplara insan koryonik gonadotropini (hCG; Gonatropin, CHORULON, Intervet, İstanbul, Türkiye) 150-300 IU/kg i.p. verildi. HCG uygulamasından 17-19 saat sonra tekrar 15 IU PMSG i.p. enjekte edildi (Agca and Critser 2006).

3.3.3. Deneyin Sonlandırılması ve Doku Örneklerinin Elde Edilmesi

Bütün deneklere işlem öncesi; Ketamin HCL 100 mg/kg i.m. ve Ksilazin 10 mg/kg i.m. uygulanarak genel anestezi yapıldı ve anestezide olup olmadıkları ekstremitte çekme yanıtı ile kontrol edildi. Sakrifikasyon işlemi 20. günde sıçanların tüm kanları alınarak gerçekleştirildi.

3.3.3.1 Kan örneklerinin alınması

Genel anestezi altındaki sıçanların önce batın bölgeleri açıldı. İnsizyon diyaframa kadar devam ettirilerek diyaframda da bir kesi yapıldıktan sonra göğüs kafesi tamamen açıldı ve kalbe ulaşıldı (Resim 6). Tüm gruplarda kalpten enjektörle kan çekilerek EDTA'lı kan tüplerine alındı (Resim 7). Kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerak (NÜVE NF 800R, İstanbul, Türkiye) plazmalar elde edildi. AMH, GSH, NF- κ B, TNF α ve IL-1 β düzeylerinin ELISA yöntemi ile ölçülme işlemine kadar örnekler -80 $^{\circ}$ C'de (Aucma DW-86L390, Çin) muhafaza edildi.



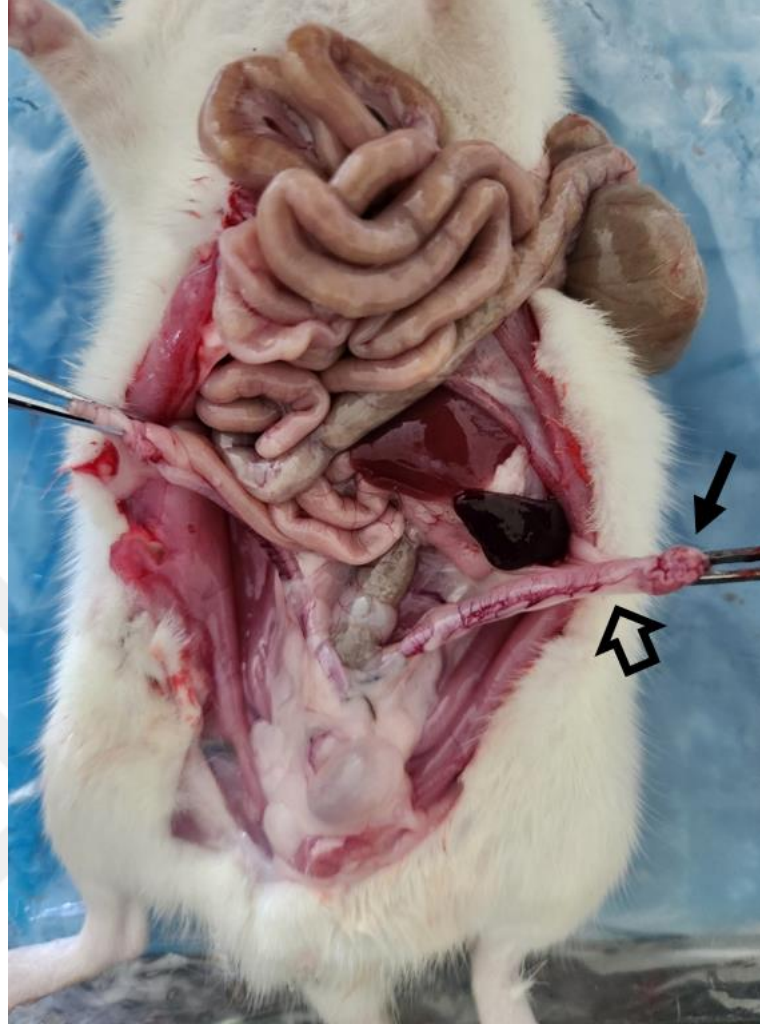
Resim 6. Batın ve göğüs kafesinin açılması



Resim 7. Kalpten kan enjeksiyonu ile ötenazinin gerçekleştirilmesi

3.3.3.2 Overlerin çıkarılması ve oosit eldesi

Batın bölgesi açılan ve ötenazi işlemi gerçekleştirilen sıçanlarda önce tuba uterinalar bulundu, takiben overlere ulaşıldı (Resim 8). Tüm sıçanların sol overleri histolojik değerlendirmeler için %10 tamponlu (nötral) formalin içerisine konularak muhafaza edildi. Oosit toplamak amacıyla tüm sıçanların sağ overleri tuba uterinaları ile birlikte alındı. Örneklerin üzerine çıkacak miktarda Serum Fizyolojik (SF, Wallcur, San Diego, ABD) eklenerek oosit toplama işlemine kadar $+4^{\circ}\text{C}$ ' de muhafaza edildi.



Resim 8. Ötenazi sonrası tuba uterinalar ve overler. **Ok:** over, **çerçeveleli ok:** tuba uterina

3.4. HİSTOLOJİK İŞLEMLER

Tüm histolojik işlemler Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.4.1. Doku Takibi ve Kesitlerin Elde Edilmesi

Deneyin sonlandırılması ile beraber alınan sol overler, ışık mikroskopik değerlendirmeler için histolojik doku takibi prosedürüne tabi tutularak (Tablo 1) önce %10 tamponlu (nötral) formalin solüsyonu içerisine konuldu ve fiksasyon sağlanması amacıyla 2-3 gün oda sıcaklığında bekletildi. Takiben;

- Fikse olan dokular akan suda 5 saat yıkandı.
- Dehidratasyon işlemi için dereceli alkol serilerinden geçirildi.
- Doku şeffaflandırması amacıyla ksilen serisinde tutuldu.
- İnfiltrasyon işlemi için dokular 60 °C etüv içerisinde erimiş halde bulunan parafinlerden geçirildi.
- Kesit alınabilmesi için dokular parafin bloklara gömüldü.

Tablo 1. Histolojik doku takibi işlemleri

MADDE	SÜRE
Akan su	5 saat
%50 Etanol	1 saat
%70 Etanol	1 saat
%80 Etanol	1 gece
%90 Etanol	1 saat
%100 Etanol	1 saat
%100 Etanol	1 saat
%100 Etanol	1 saat
Ksilen I	15 dakika
Ksilen II	15 dakika
Ksilen III	15 dakika
Parafin I	1 saat
Parafin II	1 saat
Parafin III	1 saat

Hazırlanan parafin doku bloklarından Thermo Scientific Microm HM 340E (Thermo Scientific, Walldorf, Almanya) marka mikrotom kullanılarak 5 µm kalınlığında seri kesitler alındı ve ilgili boyamaya uygun olan lamalar üzerine yerleştirildi.

3.4.2. Işık Mikroskobik Boyamalar

Alınan over kesitleri, genel histolojik yapının değerlendirilmesi amacıyla Hematoksilen-Eozin (H-E) ve Masson-Trikrom boyama yöntemleri ile boyandı.

Ayrıca immünohistokimyasal değerlendirme için VEGF ve Caspase-3 antikorları ile immünperoksidaz boyaması yapıldı.

3.4.2.1. Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama

Boyama sepetine dizilen lamalar 60 °C’de etüvde parafinin erimesi ve dokuların lam yüzeyine daha iyi yapışabilmesi için 2 saat bekletildi.

Boyama işlemine başlamadan önce seçilen lamalar ksilen içerisinde 1 gece boyunca bekletildi.

H-E boyama prosedürü:

- Kesitler her birinde 2’şer dakika olmak üzere 3 ayrı ksilen serisinden geçirildi.
- Takiben etanol serilerine daldırılıp çıkarıldı (sırasıyla %90, %80, %70’lik alkol).
- Akan suda 3 dakika yıkandı.
- Hematoksilen solüsyonunda 2 dakika boyandı.
- Akan suda 5 dakika yıkandı.
- Asit alkol karışımına 2 kez daldır çıkar yapıldı.
- Akan suda 2 dakika yıkandı.
- Eozinde 3 dakika boyandı.
- Etanol serilerine daldırılıp çıkarıldı (sırasıyla %70, %80, %90’lık alkol).
- Her birinde 10’ar dakika olmak üzere 3 ayrı ksilen serisinden geçirildi.
- Boyama işlemi tamamlanan lamalar Entellan™ kullanılarak lamel ile kapatıldı.

3.4.2.2. Masson-Trikrom boyama

Boyama prosedürü Masson-Trikrom Boyama Kiti (Bio-Optica, Milona, İtalya) ile, kit prosedürü dikkate alınarak yapıldı.

Seçilen 4-5 µm kalınlığındaki kesitler 60 °C’de etüvde 2 saat bekletildi. Boyama işlemine geçilmeden önce kimyasal deparafinizasyon işlemi uygulandı.

- Kesitler üzerine eşit miktarda karıştırılan A ve B solüsyonları damlatıldı, 10 dakika bekletildi.
- Distile su ile yıkama yapıldı.

- Kesitler üzerine C solüsyonundan damlatılarak 4 dakika bekletildi.
- Distile su ile yıkama yapıldı.
- Kesitler üzerine D solüsyonundan damlatılarak 15 dakika bekletildi.
- Distile su ile yıkama yapıldı.
- Kesitler üzerine E solüsyonundan damlatılarak 5 dakika bekletildi.
- Kesitler üzerindeki solüsyon döküldü, yıkama yapılmadı.
- Kesitler üzerine F solüsyonu damlatılarak 7 dakika bekletildi.
- Distile su ile yıkama yapıldı.
- Önce %96 etanol takiben %100 etanolden geçirildi.
- Her birinde 2'şer dakika olmak üzere 2 ayrı ksilen serisinden geçirildi.
- Boyama işlemi tamamlanan lamalar Entellan™ kullanılarak lamel ile kapatıldı.

3.4.2.3. İmmünperoksidaz boyama

Overdeki VEGF ve Caspase-3 ekspresyonunu ışık mikroskopik düzeyde incelemek amacıyla, VEGF primer antikoru (Bioss, Massachusetts, ABD) ve Caspase-3 primer antikoru (Bioss, Massachusetts, ABD) kullanılarak kesitler immünperoksidaz yöntemi ile boyandı. Mikrotom ile alınan 4-5 µm kalınlığındaki kesitler polilizin kaplı lamalar üzerine alınarak 60 °C etüvde 2 saat bekletildi.

Boyama işlemine başlamadan önce seçilen lamalar ksilen içerisinde 1 gece boyunca bekletildi.

İmmünperoksidaz boyama prosedürü:

- Kesitler her birinde 2'şer dakika olmak üzere 3 ayrı ksilen serisinden geçirildi.
- Takiben etanol serilerine daldırılıp çıkarıldı (sırasıyla %90, %80, %70'lik alkol).
- Akan suda 3 dakika yıkandı.
- Kesitler içerisinde citrat buffer bulunan kap içerisine yerleştirilerek mikrodalga fırında 15 dakika bekletildi.
- Kesitler soğuması için oda sıcaklığında bekletildi.
- Kesitlerin etrafı Pap-Pen kalem ile çizildi.

- Lamların üzerine endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için %3'lük H₂O₂ damlatıldı ve 15 dakika bekletildi.
- PBS (Phosphate Buffer Saline, marka) ile 5 dk yıkandı.
- Protein blokajı yapıldı. Yıkama yapmadan lamlar üzerindeki blokaj akitıldı.
- Takiben bir seri lam üzerine VEGF diğer seri lam üzerine Caspase-3 primer antikorları damlatıldı. Nemli ve üstü kapalı ortamda 1 gece bekletildi.
- PBS ile yıkama 5 dk süre ile yapıldı.
- Kesitlere sekonder antikor damlatılarak nemli ve üstü kapalı ortamda 20 dakika bekletildi.
- PBS ile yıkama 5 dk süre ile yapıldı.
- Yıkama sonrası 100 µl HRP uygulaması yapıldı. Oda sıcaklığında, nemli ve üstü kapalı ortamda 20 dakika beklenildi.
- PBS ile yıkama 5 dk süre ile yapıldı.
- DAB solüsyonu uygulandı ve kahverengi renk oluşuncaya kadar 5 dk bekletildi.
- DAB akıtılması için akan suda 5 dk boyunca yıkandı.
- Hematoksilende 2 dakika boyandı.
- Akan suda 5 dk boyunca yıkandı.
- Kesitler alkol ve ksilen serilerinden geçirildi.
- Boyama işlemi tamamlanan lamlar EntellanTM kullanılarak lamel ile kapatıldı.

3.4.3. Boyanan Kesitlerin Fotoğraflanması ve Skorlaması

Boyanan ışık mikroskopik preparatlar renkli dijital kamera (*Nikon DS-Fi2*, Nikon, Tokyo, Japonya) eklentisi olan bir ışık mikroskopunda (*Nikon Eclipse Ni*, Nikon, Tokyo, Japonya) incelenerek fotoğrafları çekildi ve genel histolojik yapı değerlendirildi.

Tüm gruplara ait over kesitlerinde over hasarını değerlendirebilmek için histopatolojik skorlama yapıldı. Bu amaçla lamlarda hemoraji, ödem, doku ayrışması ve foliküler dejenerasyonun derecesi, 0: hasar yok, 1: hafif, 2: orta ve 3: ciddi olmak üzere değerlendirilerek deney grupları arasında istatistiksel olarak kıyaslandı.

Tüm deney gruplarına ait immünperoksidaz tekniği ile boyanan her preparatta, 10 farklı mikroskopik alanın her birinde 100 hücre olmak üzere immün-pozitif ve immün-negatif hücreler sayıldı. Elde edilen veriler deney grupları arasında istatistiksel olarak kıyaslandı.

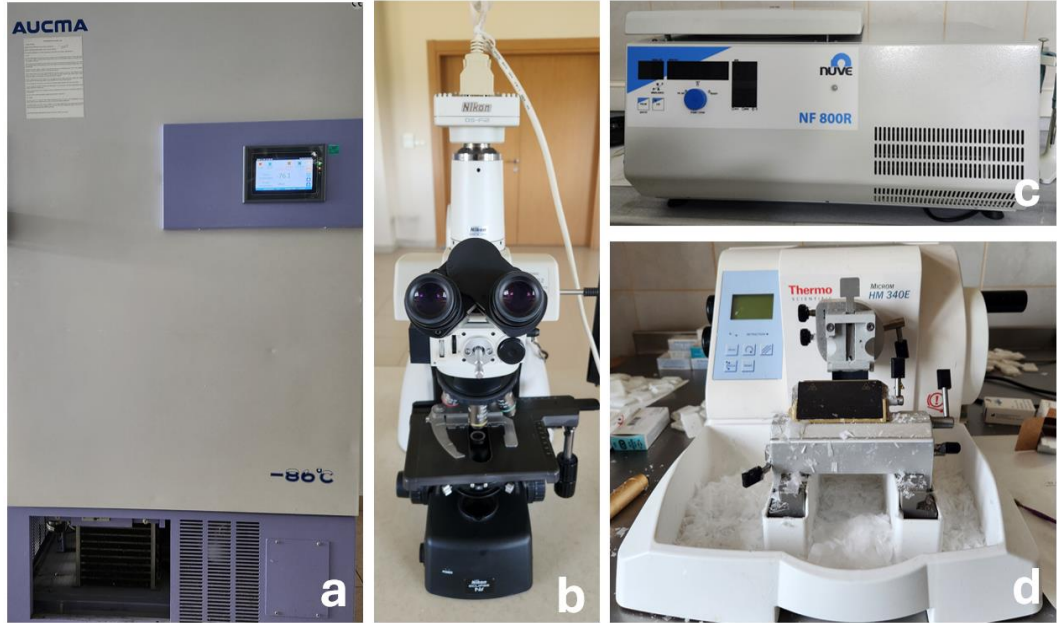
3.5 BİYOKİMYASAL İŞLEMLER

Yapılan tüm biyokimyasal analizler Altınbaş Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı (MERLAB)’ında yürütüldü.

Serum örneklerindeki AMH, GSH, NF- κ B, TNF α ve IL-1 β düzeyleri, üretici firma tarafından sağlanan kit (BT Lab, Shanghai, Çin) prosedürlerine uygun olarak ELISA yöntemi ile analiz edildi.

3.6. KULLANILAN SARF MALZEMELERİ VE CİHAZLAR

Çalışmada kullanılan cihazlar Resim 9’da gösterilmiştir. Deney aşaması, histolojik ve biyokimyasal işlemler sırasında kullanılan sarf malzemeleri Tablo 2’de verilmiştir.



Resim 9. Kullanılan cihazlar. **a:** -80 °C derin dondurucu, **b:** kamera eklentili ışık mikroskobu, **c:** santrifüj, **d:** mikrotom.

Tablo 2. Histolojik doku takibi ve boyamalarda kullanılan sarf malzemeler

SARF MALZEME	MARKA	MENŞEİ
Etanol	Isolab	Türkiye
Ksilen	Isolab	Türkiye
Entellan	Merck	Almanya
Parafin	Merck	Almanya
Hematoksilen	Bio-Optica	İtalya
Eozin	Bio-Optica	İtalya
Hidroklorik Asit	Merck	Almanya
DAB Kromojen	Scytek	Amerika Birleşik Devletleri
Hidrojen Peroksit	Merck	Almanya
Citrate Buffer	Epifarma	Türkiye
PBS	Epifarma	Türkiye
Antibody Diluent	Scytek	Amerika Birleşik Devletleri
UltraVision Detection System Anti-Polyvalent HRP Kit	Scytek	Amerika Birleşik Devletleri
Caspase-3 Primer Antibody	Bioss	Amerika Birleşik Devletleri
VEGF Primer Antibody	Bioss	Amerika Birleşik Devletleri
Pap-Pen Kalem	Patolab	İngiltere
Polilizinli Lam	Patolab	İngiltere

3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmada elde edilen veriler IBM SPSS Statistics v.23 istatistiksel yazılımı kullanılarak analiz edildi. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM (ortalamanın standart hatası, standart hata) olarak verildi. Gruplar arası anlamlılığın değerlendirilmesi için One Way ANOVA, Posthoc Tukey testi analizleri yapıldı. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



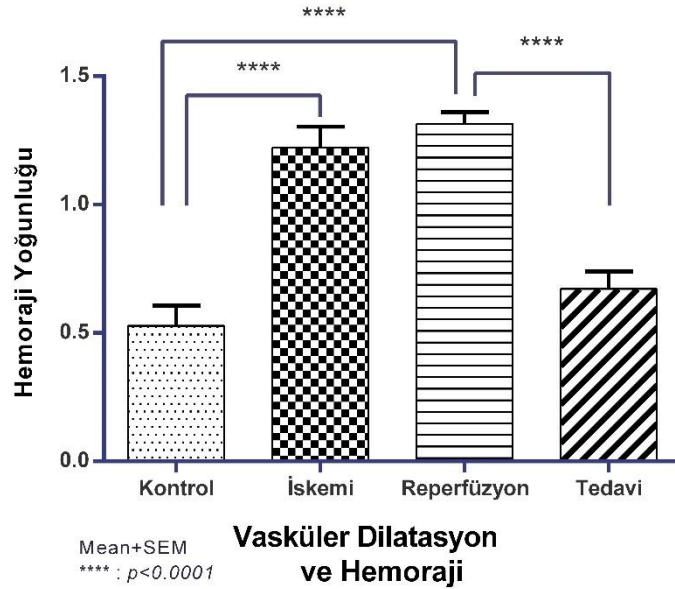
4. BULGULAR

4.1. IŞIK MİKROSKOBİK BULGULAR

4.1.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Bulguları

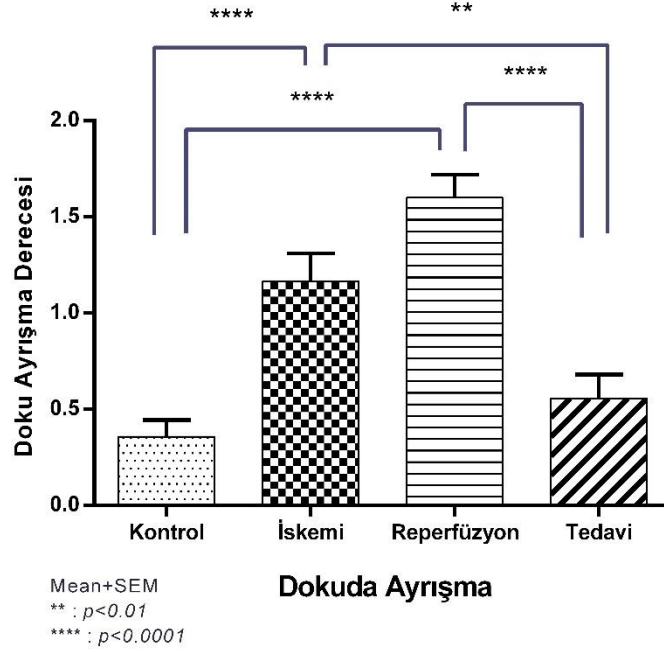
Tüm gruplara ait over hasarını değerlendirebilmek için histopatolojik skorlama, H-E ile boyanan kesitlerde yapıldı. Bu amaçla lamlarda hemoraji, ödem, doku ayrışması ve foliküler dejenerasyonun derecesi değerlendirilerek deney grupları arasında istatistiksel olarak kıyaslandı.

Kontrol grubuna kıyasla İskemi ve İ/R gruplarına ait over kesitlerinde vasküler dilatasyon-hemoraji alanlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu saptandı ($p=0,000$). Kontrol ve Tedavi grupları arasında istatistiksel bir fark bulunmadı ($p>0,05$). Tedavi grubunda, İskemi ve İ/R gruplarına kıyasla vasküler dilatasyon-hemoraji alanlarının istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi ($p=0,000$) (Şekil 3).



Şekil 3. Vasküler dilatasyon ve hemoraji skorlamasının dört deney grubu arasında istatistiksel kıyaslaması

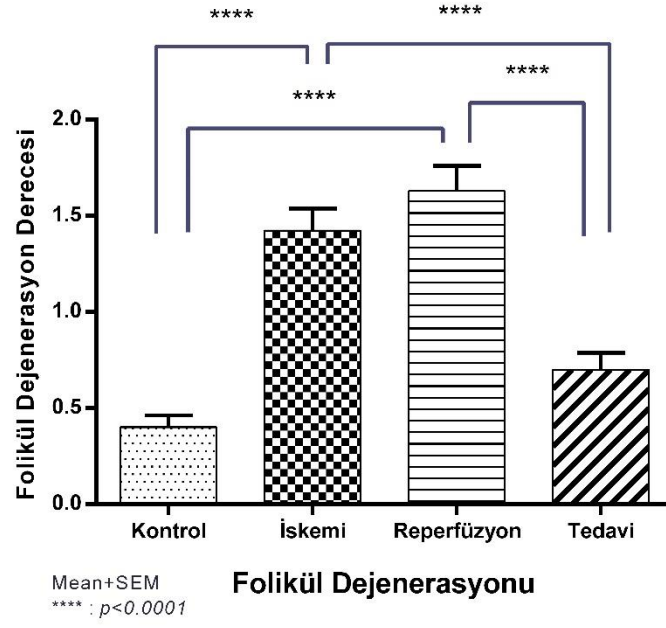
Dokuda ayrışma skorlamasına göre, Kontrole kıyasla İskemi ve İ/R gruplarında anlamlı artış bulundu ($p=0,000$). Tedavi grubu ile Kontrol grubu arasında anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). Tedavi grubunda, İskemi ve İ/R gruplarına kıyasla anlamlı bir azalma olduğu saptandı (sırasıyla $p=0,008$ ve $p=0,000$) (Şekil 4).



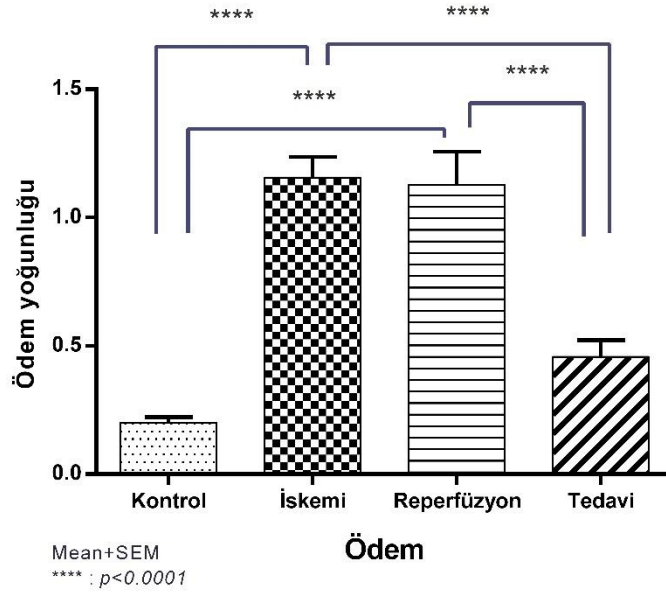
Şekil 4. Dokuda ayrışma skorlamasının dört deney grubu arasında istatistiksel kıyaslaması

Folikül dejenerasyonu skorlamasına göre, Kontrol grubuna kıyasla İskemi ve İ/R grubunda anlamlı bir artma vardı ($p=0,000$). Tedavi grubunda, İskemi ve İ/R gruplarına kıyasla folikül dejenerasyonunda anlamlı azalma olduğu tespit edildi ($p=0,000$). Tedavi ve Kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$) (Şekil 5).

Ödem alanları incelendiğinde, İskemi ve İ/R gruplarında Kontrol grubuna kıyasla anlamlı artış görüldü ($p=0,000$). Tedavi ve Kontrol grupları arasında anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). Tedavi grubunda ödem alanları İskemi ve İ/R gruplarına göre anlamlı düzeyde azalmıştı ($p=0,000$) (Şekil 6).

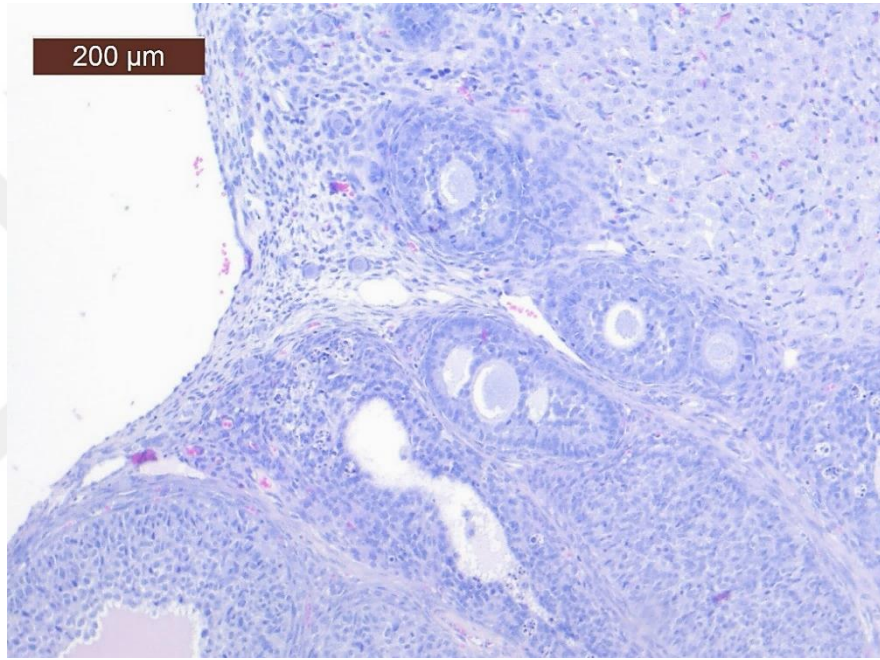


Şekil 5. Foliküler dejenerasyon skorlamasının dört deney grubu arasında istatistiksel kıyaslaması

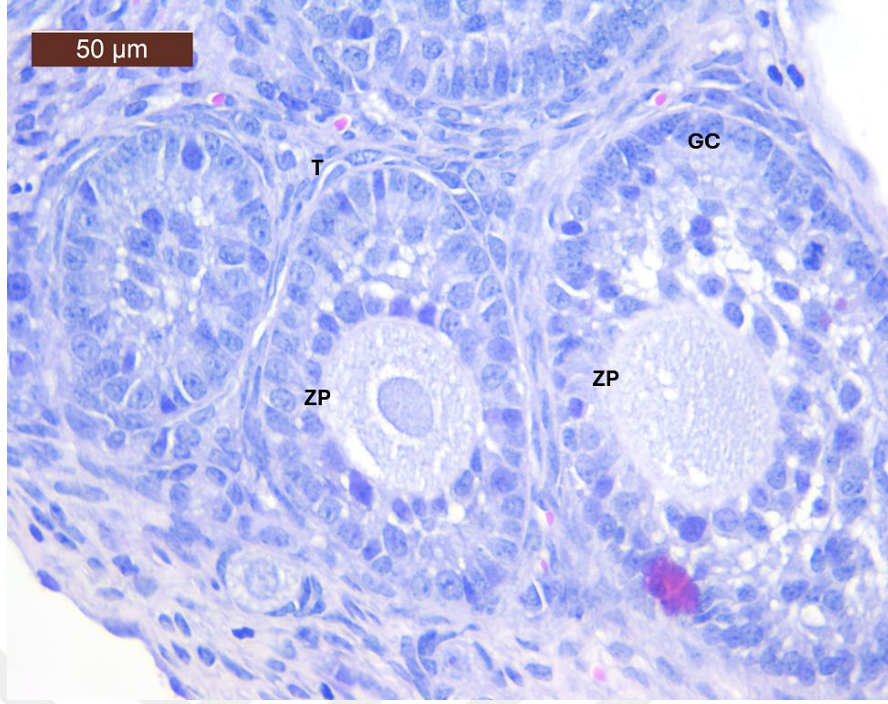


Şekil 6. Ödem skorlamasının dört deney grubu arasında istatistiksel kıyaslaması

H-E ile boyanmış kesitlerde genel histolojik yapı değerlendirildiğinde, Kontrol grubu overlerinde en dışta overi saran germinal epitel ve hemen altında sıkı bağ dokusu yapısındaki tunika albuginanın yer aldığı görüldü. Korteks bölümünde farklı gelişim aşamalarında olan over folikülleri, foliküller arasını dolduran over stroması, yer yer atrezik foliküller ve korpus luteumlar görüldü. Medullada bağ dokusu içinde kan ve lenf damarları ile sinirler mevcuttu. Over morfolojisi düzgün ve hasarsızdı (Resim 10 ve Resim 11)



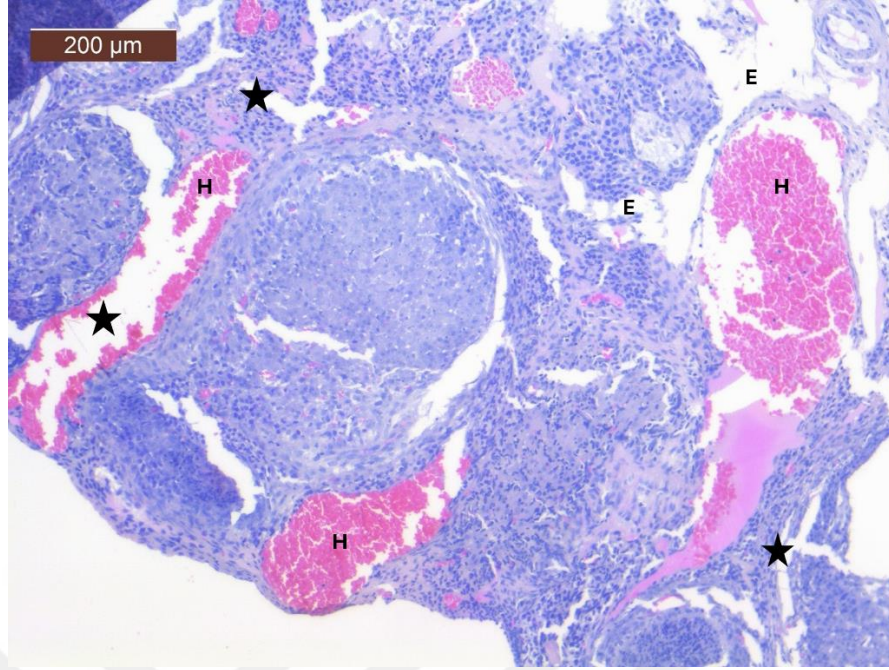
Resim 10. Kontrol grubuna ait over kesiti. **Boya:** H-E. **Büyütme objektifi:** 10x.



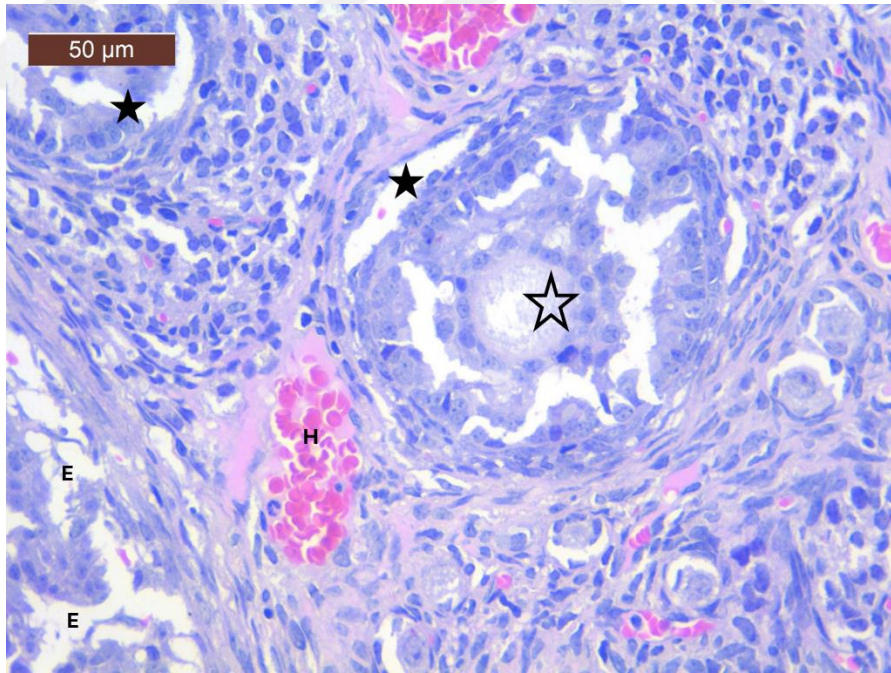
Resim 11. Kontrol grubuna ait over kesiti. **ZP:** zona pellusida, **T:** teka tabakası, **GC:** granüloza hücreleri. **Boya:** H-E. **Büyütme objektifi:** 40x.

İskemi grubuna ait over kesitlerinde, histolojik yapıda ciddi bozulmalar mevcuttu. Küçük objektif büyötmelerinde dikkat çekecek düzeyde geniş vasküler dilatasyon-hemorajik alanlar, intersisyonel ödem ve doku ayrışmaları göröldü (Resim 12, 13).

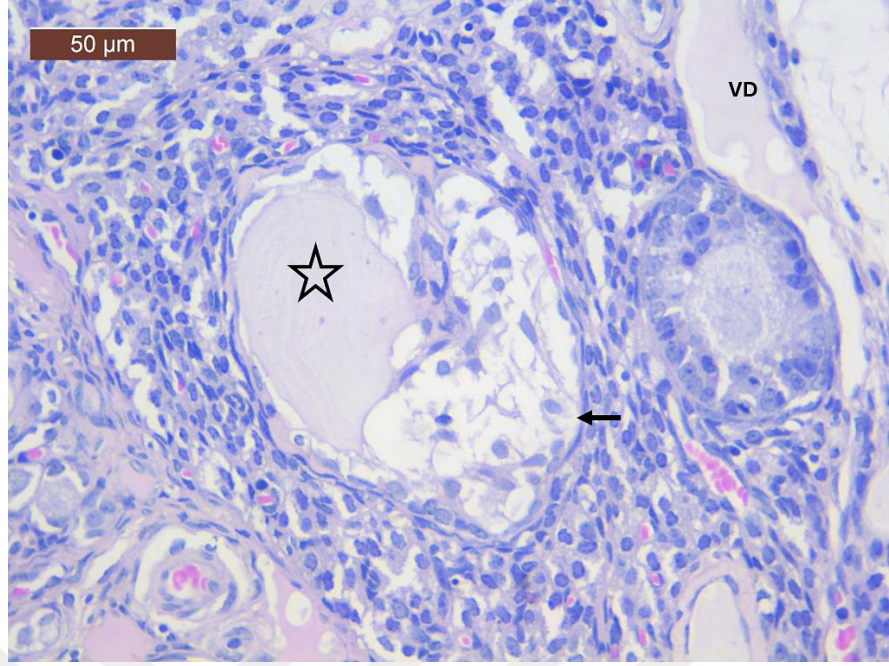
İskemi grubuna ait kesitler büyüt objektifte incelendiğinde, foliköl epiteli içinde yağlı dejenerasyon ve şişme sergileyen hücreler olduğu ve hasarlı foliköl içerisindeki oositin dejenere olduğu göröldü (Resim 14).



Resim 12. İskemi grubuna ait over kesiti. **Yıldız:** dokularda ayrışma, **E:** ödem, **H:** hemoraji. **Boya:** H-E. **Büyütme objektifi:** 10x.

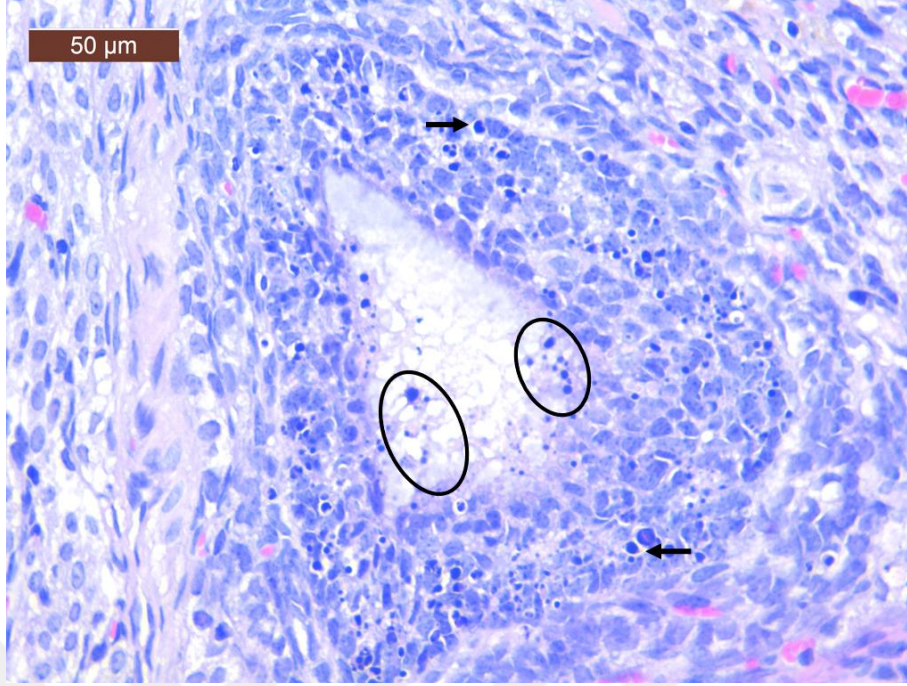


Resim 13. İskemi grubuna ait over kesiti. **Yıldız:** dokularda ayrışma, **İçi boş yıldız:** dejenere oosit, **E:** ödem, **H:** hemoraji. **Boya:** H-E. **Büyütme objektifi:** 40x.

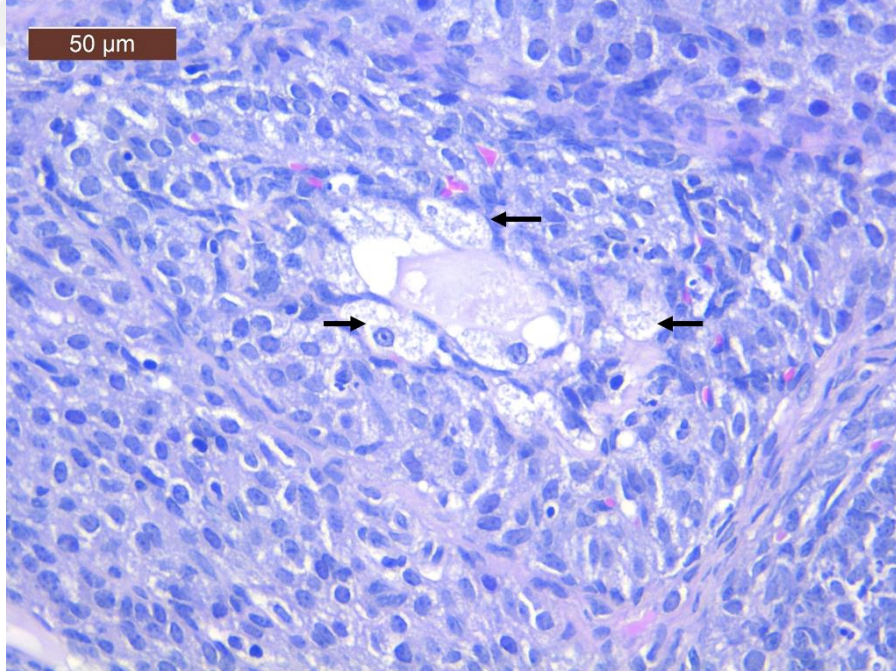


Resim 14. İskemi grubuna ait over kesiti. **İçi boş yıldız:** dejenere oosit, **ok:** sitoplazmik şişme ve yağlı dejenerasyon, **VD:** vasküler dilatasyon. **Boya:** H-E. **Büyütme objektifi:** 40x.

İskemi grubuna ait kesitler büyük objektif ile incelendiğinde, folikül duvar bütünlüğünün bozulduğu ve epitel hücrelerinde histopatolojik değişikliklerin olduğu saptandı. Folikül epiteli içinde piknotik nukleuslu nekrotik hücreler, yağlı dejenerasyon sergileyen ve sitoplazmik şişme saptanan hücreler ve ayrıca çok sayıda apoptotik cisimler görüldü. Hasarlı foliküllerin içerisindeki oositlerde de yapısal bozulma saptandı (Resim 14,15, 16).

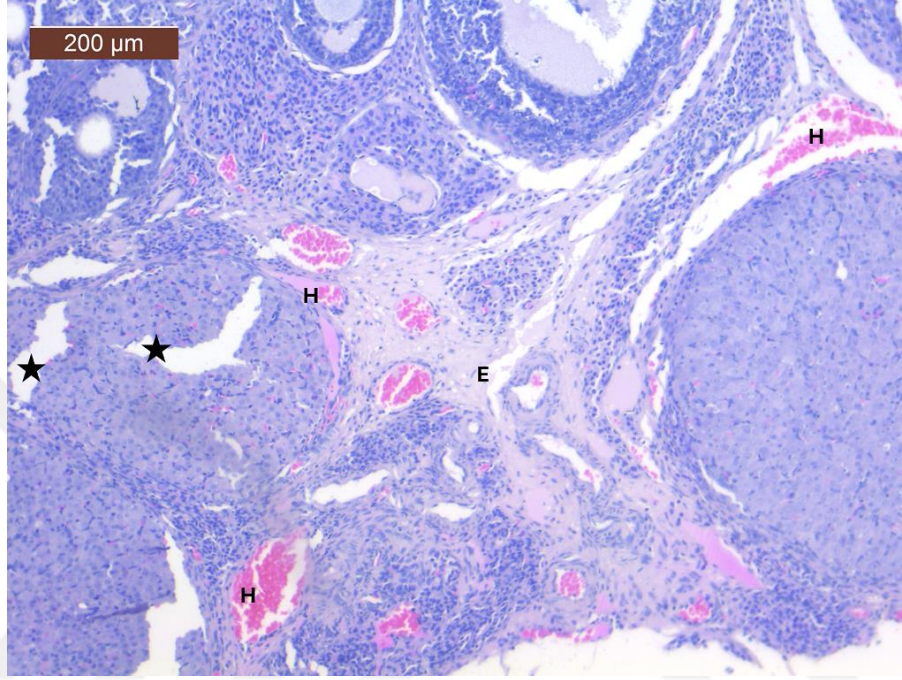


Resim 15. İskemi grubuna ait over kesiti. **Ok:** piknotik nukleuslu dejenere hücreler, **daire içindeki alan:** apoptotik cisimler. **Boya:** H-E. **Büyütme objektifi:** 40x.



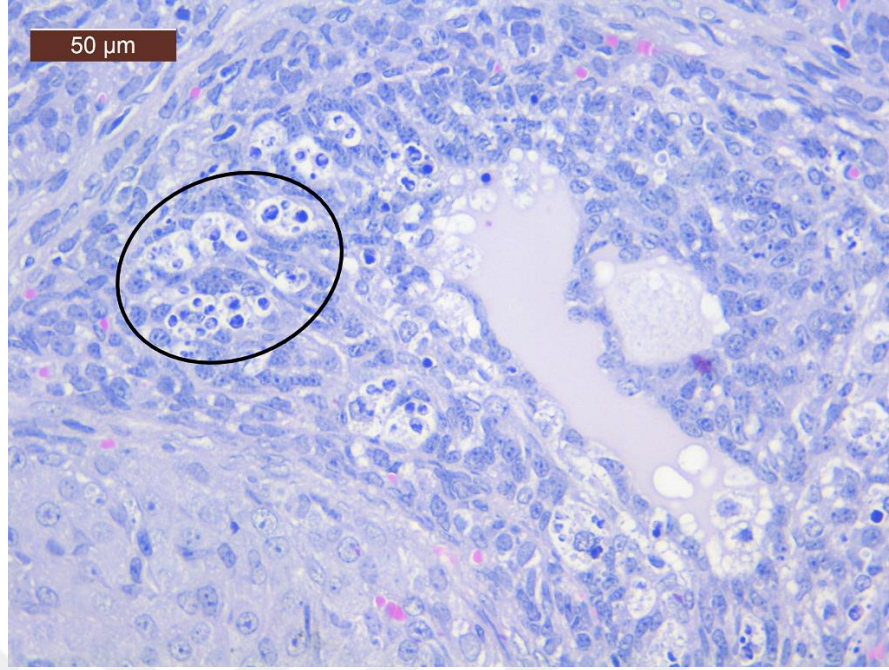
Resim 16. İskemi grubuna ait over kesiti. Fotoğrafın merkezinde dejenere folikül görülmekte. **Ok:** sitoplazmik şişme ve yağlı dejenerasyon. **Boya:** H-E. **Büyütme objektifi:** 40x.

İ/R grubuna ait over kesitleri küçük objektifte incelendiğinde, ciddi vasküler dilatasyon-hemoraji alanları ve genel morfolojide bozulmalar olduğu görüldü. Perivasküler ödem alanları ve ciddi doku ayrışmaları tespit edildi (Resim 17).

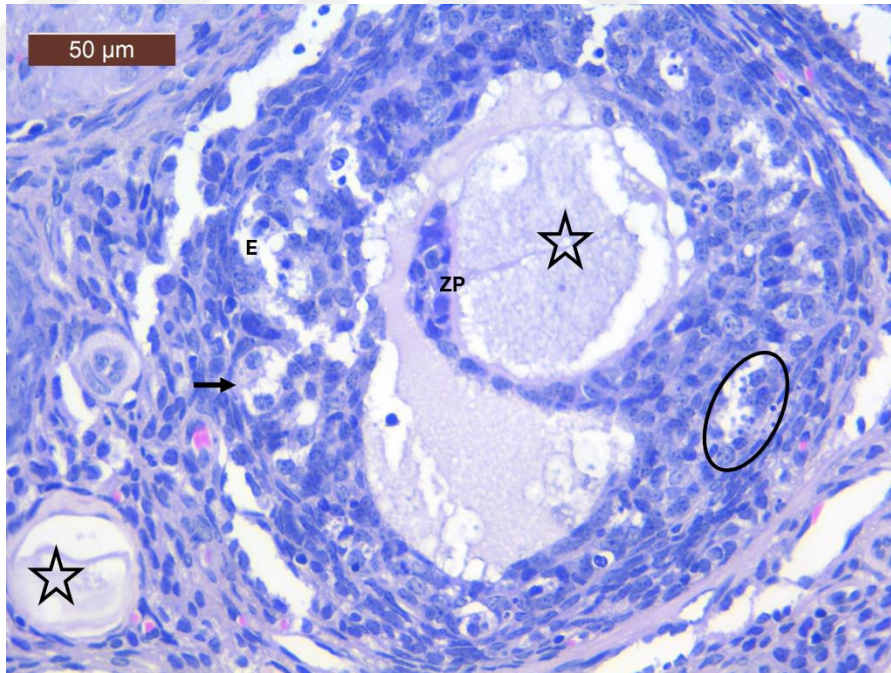


Resim 17. İ/R grubuna ait over kesiti. **H.** Hemoraji, **E:** ödem, **yıldız:** dokuda ayrışma. **Boya:** H-E. **Büyütme objektifi:** 10x.

İ/R grubuna ait over kesitleri büyük objektif ile incelendiğinde, ciddi folikül dejenerasyonu olduğu saptandı. Dejenere foliküllerde epitel içerisinde kromatini yoğunlaşmış piknotik nükleuslu nekrotik hücreler, sitoplazmik şişme gösteren dejenere hücreler ve nükleer fragmanları içeren apoptotik cisimler görüldü. Duvar bütünlüğü bozulan foliküller içindeki oositlerin de dejenere olduğu saptandı (Resim 18, 19).



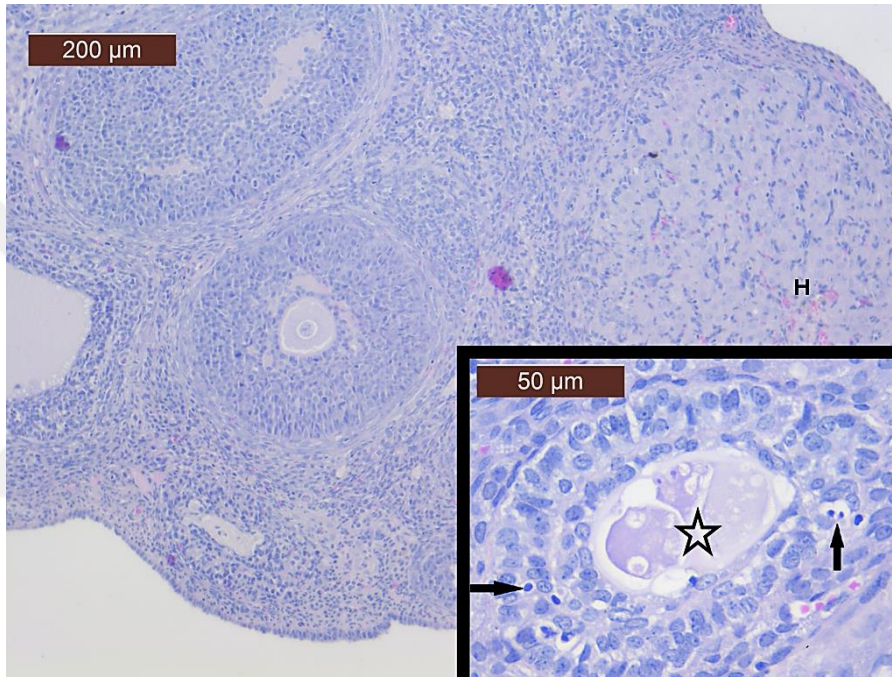
Resim 18. İ/R grubuna ait over kesiti. **Daire içindeki alan:** apoptotik cisim. **Boya:** H-E. **Büyütme objektifi:** 40x.



Resim 19. İ/R grubuna ait over kesiti. **E:** ödem **ok:** sitoplazmik şişme gösteren dejenere hücre, **daire içindeki alan:** çok sayıda apoptotik cisim, **yıldız:** dejenere oosit, **ZP:** zona pellusida. **Boya:** H-E. **Büyütme objektifi:** 40x.

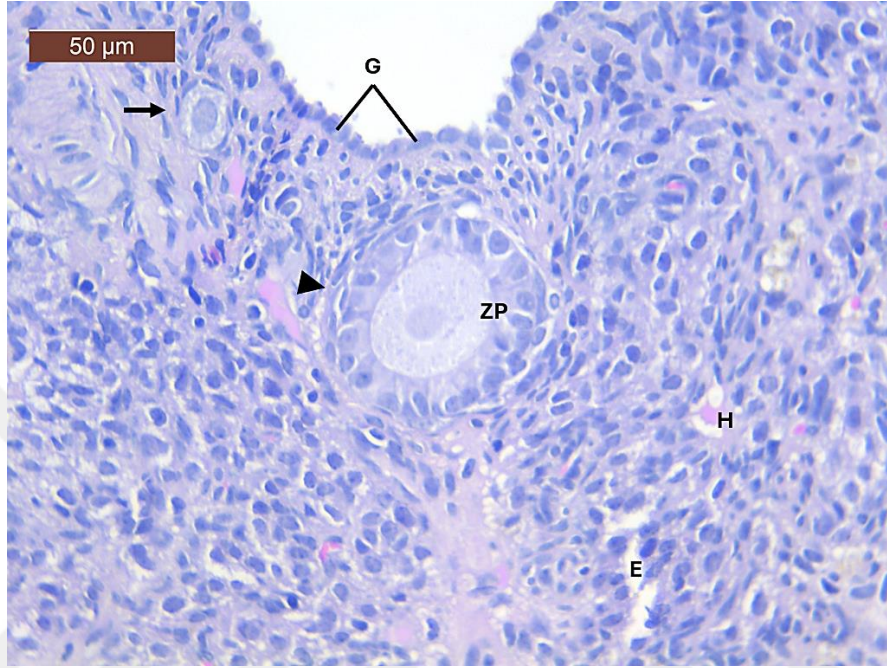
Tedavi grubuna ait over kesitleri küçük objektif ile incelendiğinde, genel morfolojik yapının korunduğu ve vasküler dilatasyon-hemaroji alanlarının daha minimal olduğu gözlemlendi (Resim 20).

Folikül duvarında İskemi ve İ/R gruplarına kıyasla daha az miktarda apoptotik cisimler gözlemlendi. Az sayıda bazı foliküllerde ise oosit dejenerasyonunun olduğu tespit edildi (Resim 20-inset).



Resim 20. Tedavi grubuna ait over kesiti. **H:** minimal hemoraji. **Boya:** H-E. **Büyütme objektifi:** 10x. **İnset:** yıldız: dejenere oosit, ok: apoptotik cisimler. **Büyütme objektifi:** 40x.

Tedavi grubuna ait over kesitlerinde büyük objektif ile incelendiğinde, vasküler dilatasyon-hemoraji ve ödem alanları İskemi ve İ/R gruplarına göre daha minimal düzeydeydi (Resim 21).

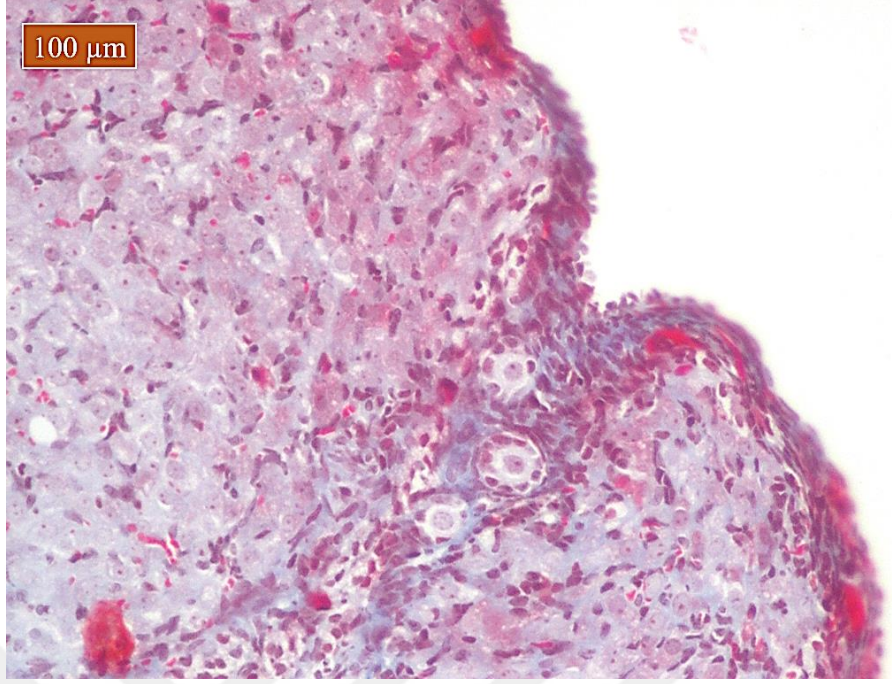


Resim 21. Tedavi grubuna ait over kesiti. **G:** germinal epitel, **Ok:** primordiyal folikül, **ok başı:** unilaminar primer folikül, **ZP:** zona pellusida **H:** hemoraji, **E:** ödem. **Boya:** H-E. **Büyütme objektifi:** 40x.

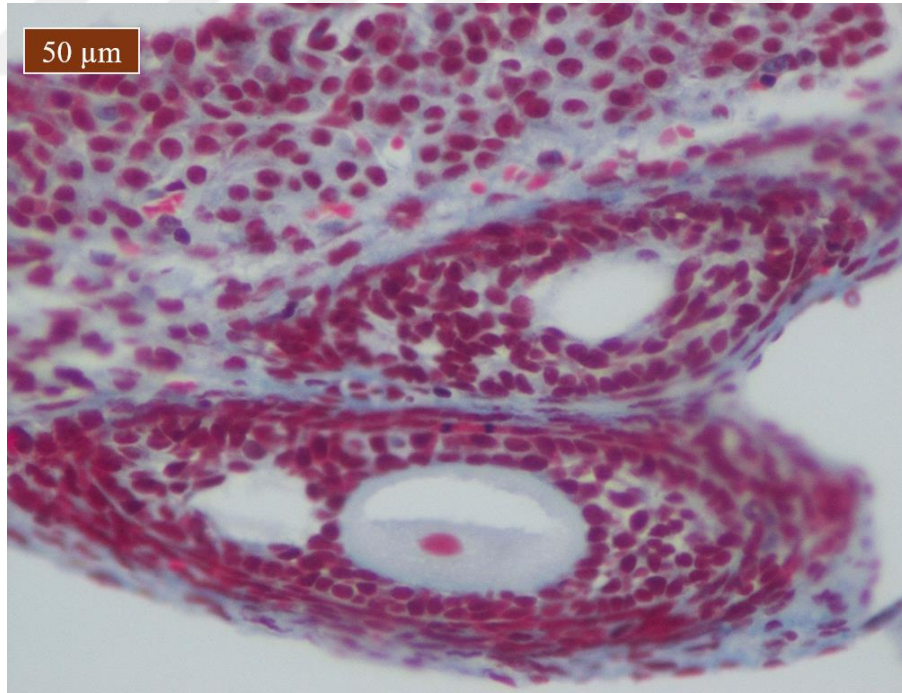
4.1.2. Masson-Trikrom Boyama Bulguları

İskemi ve İ/R gruplarına ait H-E ile boyanmış preparatlarda saptanan vasküler dilatasyon-hemoraji, ödem, foliküler dejenerasyon ve doku ayrışması gibi yapısal bozulmaların, Masson-Trikrom ile boyanmış over kesitlerinde de mevcut olduğu görüldü.

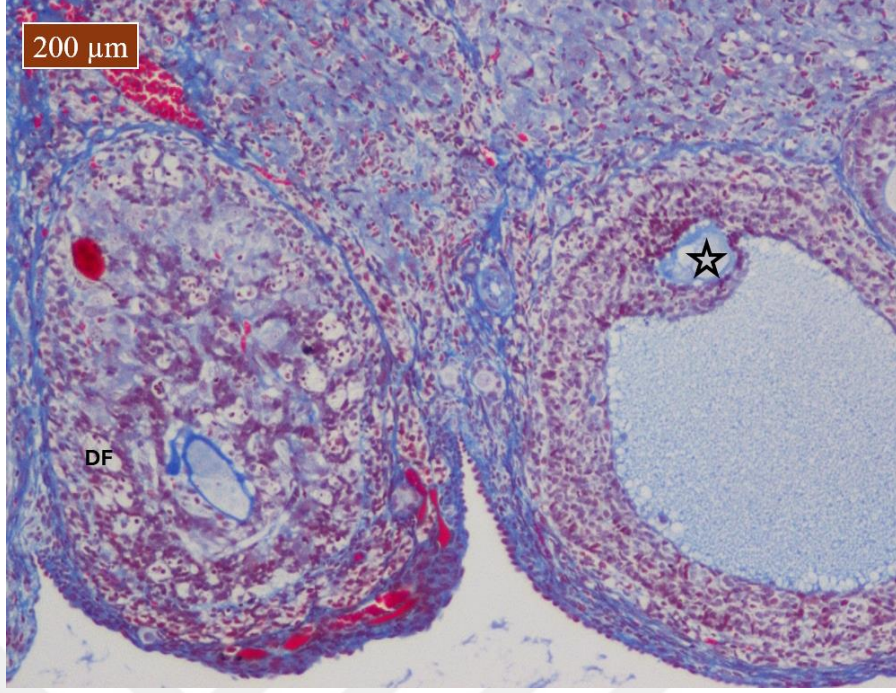
Bunların yanı sıra, Masson-Trikrom ile boyanmış kesitlerde Kontrol grubu (Resim 22, 23) ile kıyaslandığında, İskemi (Resim 24, 25, 26) ve İ/R (Resim 27, 28) gruplarında ciddi fibrozis alanları görüldü. Yapısal bozulmanın, Tedavi grubu preparatlarında daha minimal düzeyde olduğu saptandı (Resim 29, 30).



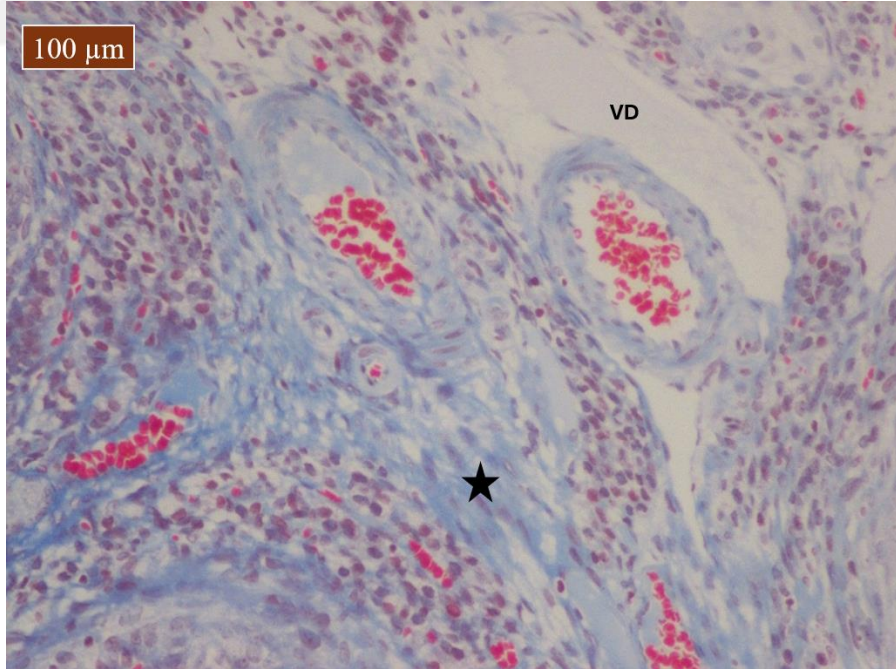
Resim 22. Kontrol grubuna ait over kesiti. **Boya:** Masson-Trikrom. **Büyütme objektifi:** 20x.



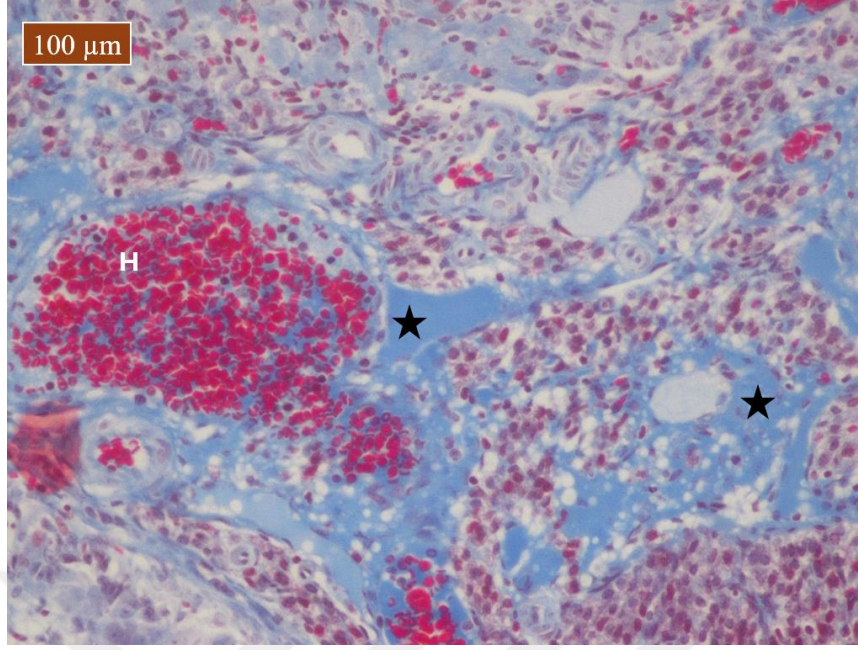
Resim 23. Kontrol grubuna ait over kesiti. **Boya:** Masson-Trikrom. **Büyütme objektifi:** 40x.



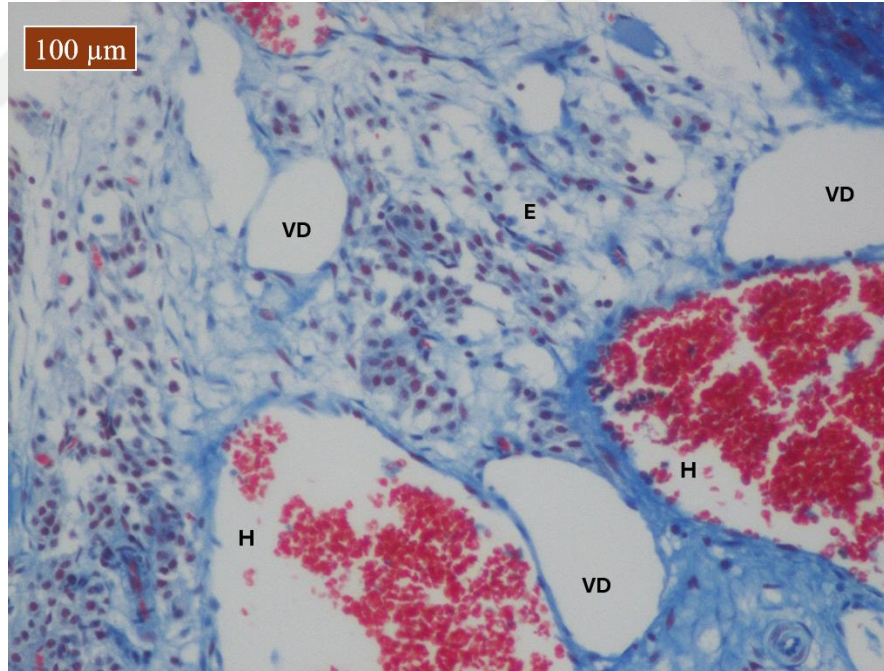
Resim 24. İskemi grubuna ait over kesiti. **DF:** dejenere folikül, **yıldız:** dejenere oosit. **Boya:** Masson-Trikrom. **Büyütme objektifi:** 10x.



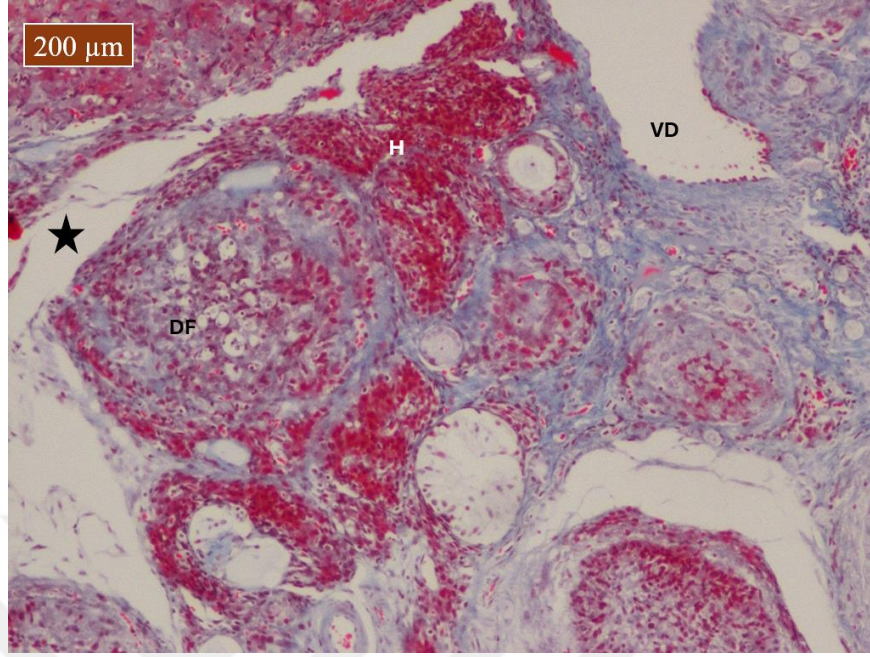
Resim 25. İskemi grubuna ait over kesiti. **VD:** vasküler dilatasyon, **yıldız:** fibrozis alanı. **Boya:** Masson-Trikrom. **Büyütme objektifi:** 20x.



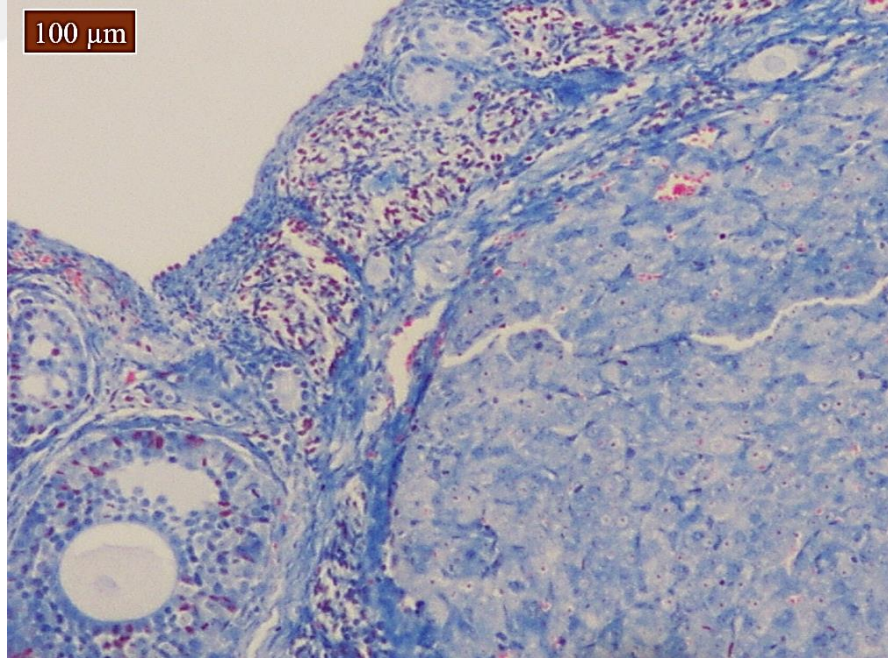
Resim 26. İskemi grubuna ait over kesiti. **Boya:** Masson-Trikrom. **Yıldız:** fibrozis alanları, **H:** hemoraji. **Büyütme objektifi:** 20x.



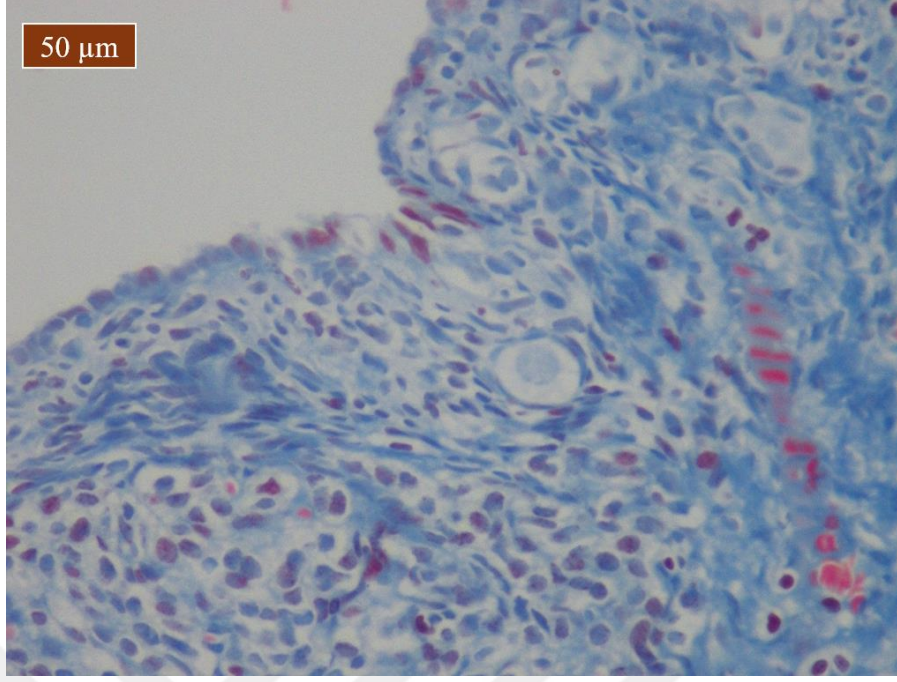
Resim 27. İ/R grubuna ait over kesiti. **H:** hemoraji, **VD:** vasküler dilatasyon, **E:** ödem. **Boya:** Masson-Trikrom. **Büyütme objektifi:** 20x.



Resim 28. İ/R grubuna ait over kesiti. **Boya:** Masson-Trikrom. **VD:** vasküler dilatasyon, **yıldız:** doku ayrışması. **Büyütme objektifi:** 20x.



Resim 29. Tedavi grubuna ait over kesiti. **Boya:** Masson-Trikrom. **Büyütme objektifi:** 20x.

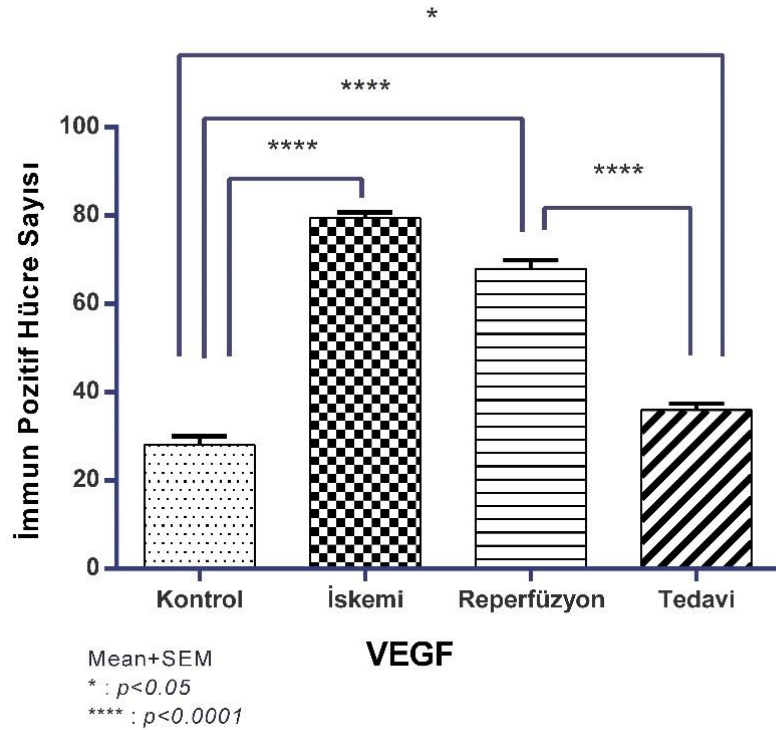


Resim 30. Tedavi grubuna ait over kesiti. **Boya:** Masson-Trikrom. **Büyütme objektifi:** 40x.

4.1.3. İmmünperoksidaz Boyama Bulguları

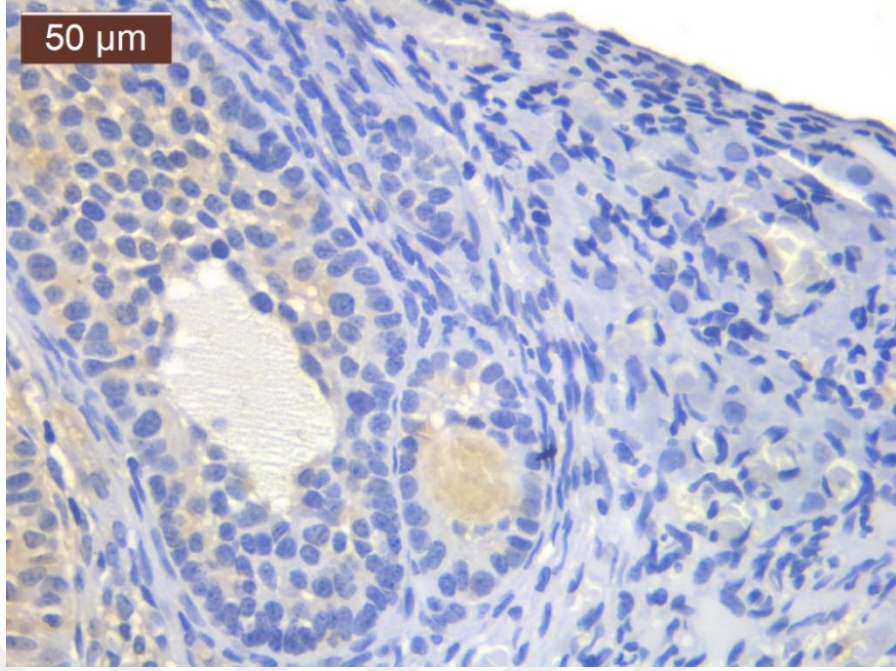
4.1.3.1. VEGF primer antikoru ile immünperoksidaz işaretleme

VEGF antikoru kullanılarak immünperoksidaz tekniği ile boyanan kesitlerde, İskemi ve İ/R gruplarında, Kontrol grubuna kıyasla immün-pozitif hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu tespit edildi ($p=0,000$). Kontrol grubu ve Tedavi grubu arasındaki fark $p=0,013$ düzeyinde anlamlı bulundu. Tedavi grubunda VEGF-pozitif hücre sayısı, İskemi ve İ/R gruplarındakine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktü ($p=0,000$) (Şekil 7).

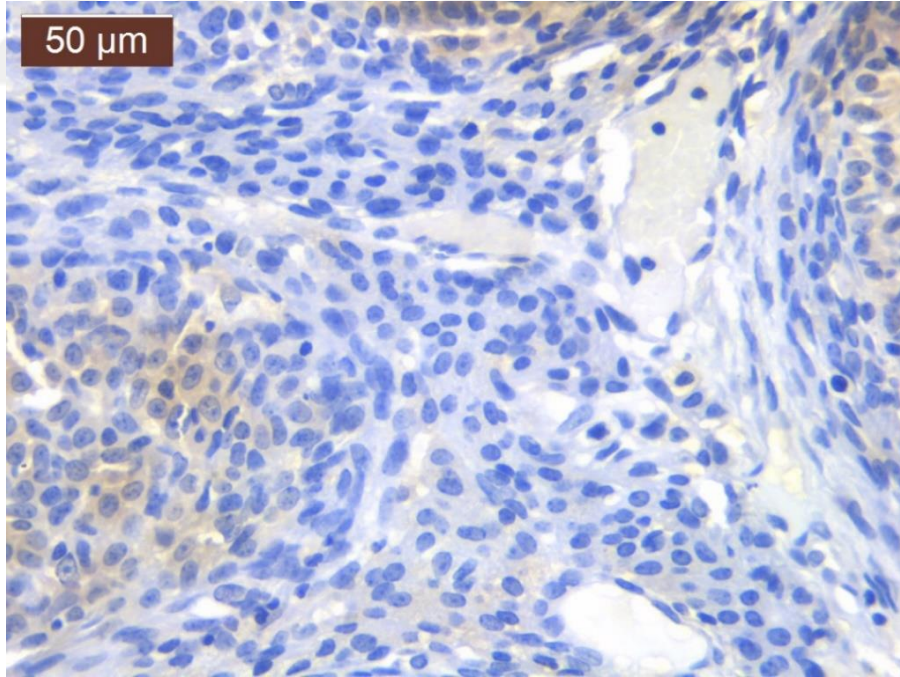


Şekil 7. Dört deney grubunda VEGF-pozitif hücre sayılarının karşılaştırılması

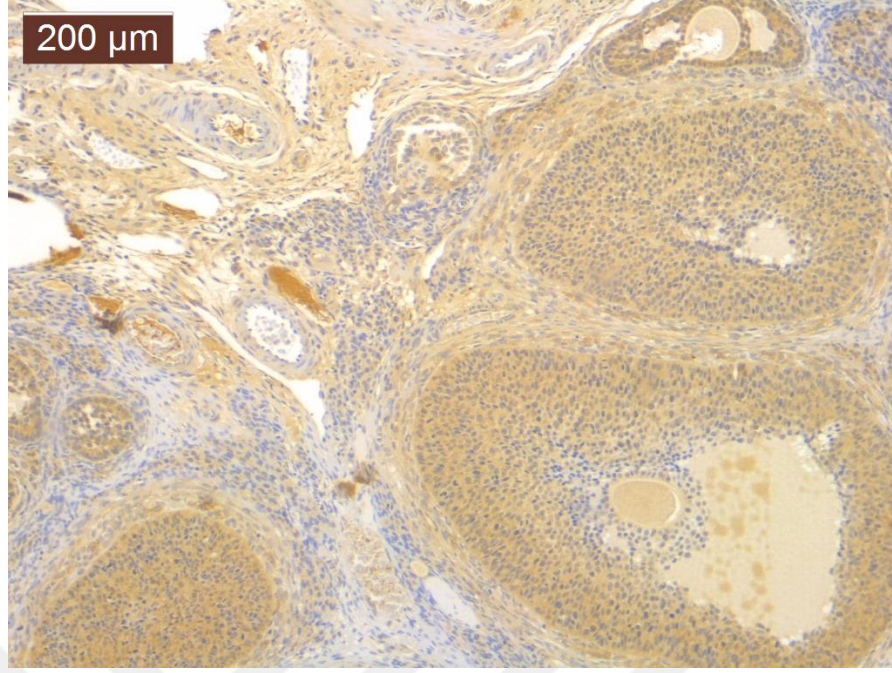
VEGF antikoru ile immünperoksidaz boyanmış kesitlerde immün-pozitif reaksiyonun, Kontrol grubu (Resim 31, 32) ile kıyaslandığında, İskemi (Resim 33) ve İ/R (Resim 34) gruplarında daha fazla olduğu görüldü.



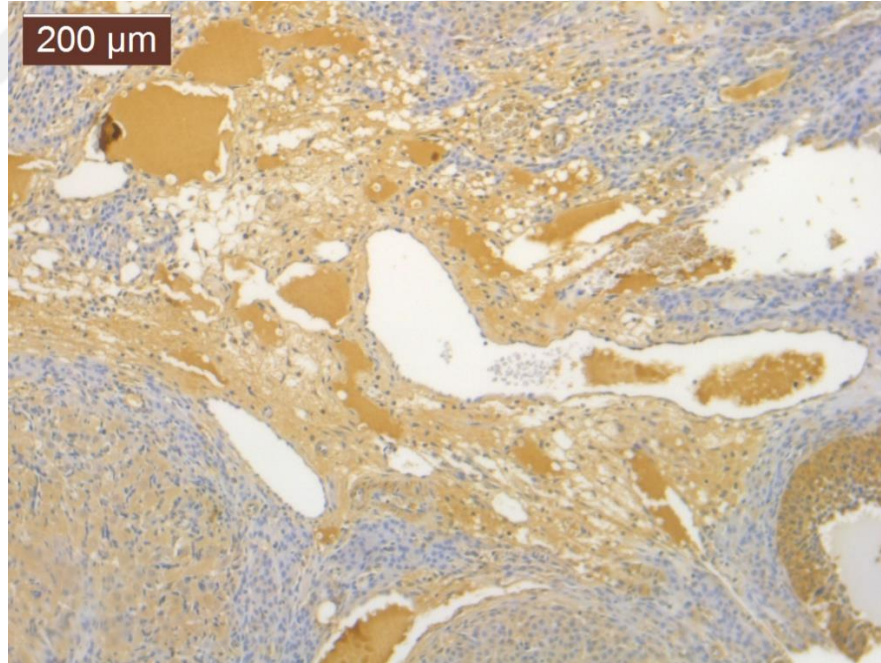
Resim 31. Kontrol grubuna ait over kesitinde VEGF immünperoksidaz boyama.
Büyütme objektifi: 40x.



Resim 32. Kontrol grubuna ait over kesitinde VEGF immünperoksidaz boyama.
Büyütme objektifi: 40x.

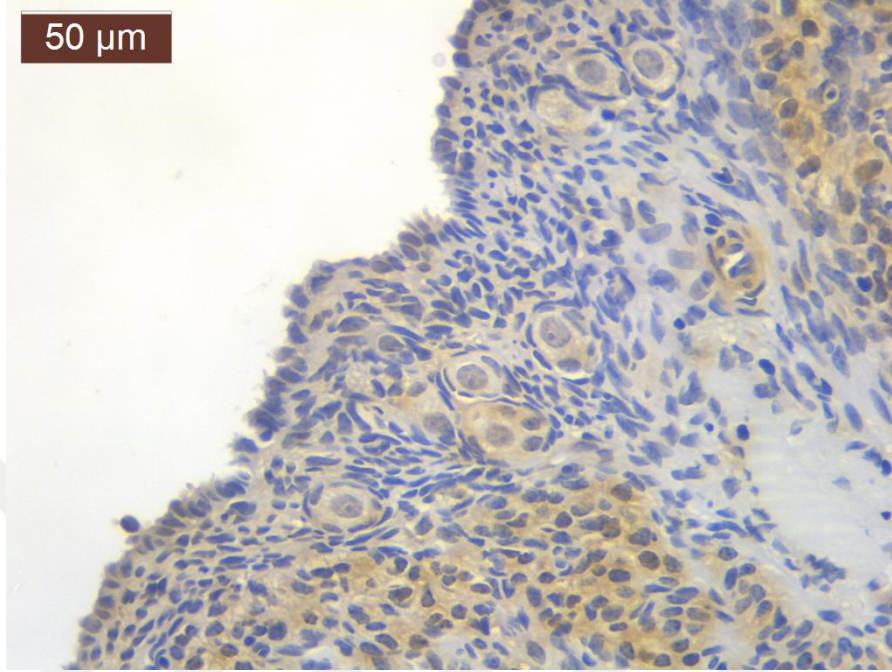


Resim 33. İskemi grubuna ait over kesitinde VEGF immünperoksidaz boyama.
Büyütme objektifi: 10x.

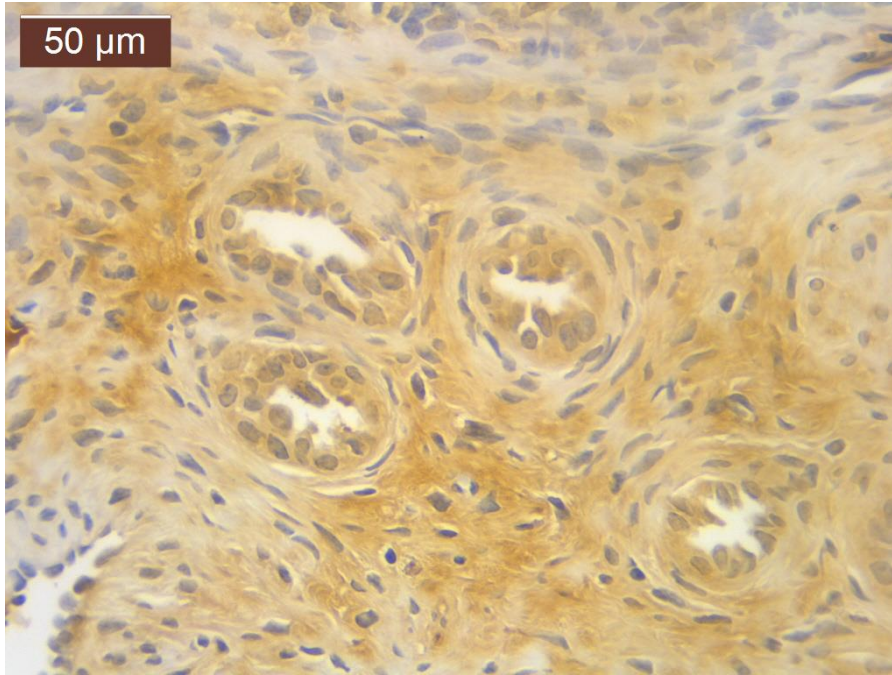


Resim 34. İ/R grubuna ait over kesitinde VEGF immünperoksidaz boyama.
Büyütme objektifi: 10x.

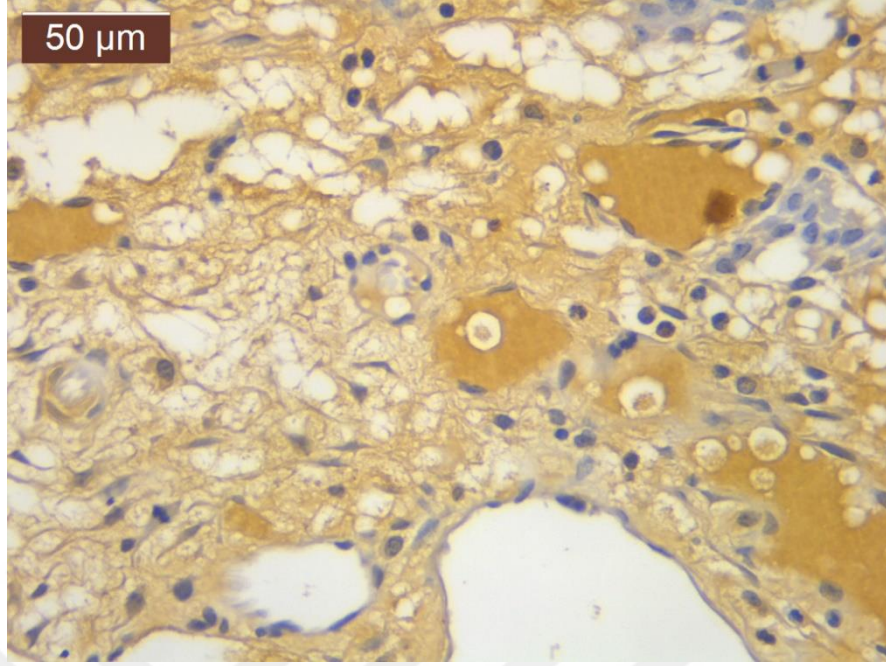
Tedavi grubundaki (Resim 35) VEGF-pozitif boyanma, Kontrol grubuna (Resim 31, 32) kıyasla yüksekti. İskemi (Resim 33, 36) ve İ/R (Resim 34, 37) gruplarındaki immün-pozitif reaksiyon, Tedavi grubuna (Resim 38) kıyasla çok daha yüksekti.



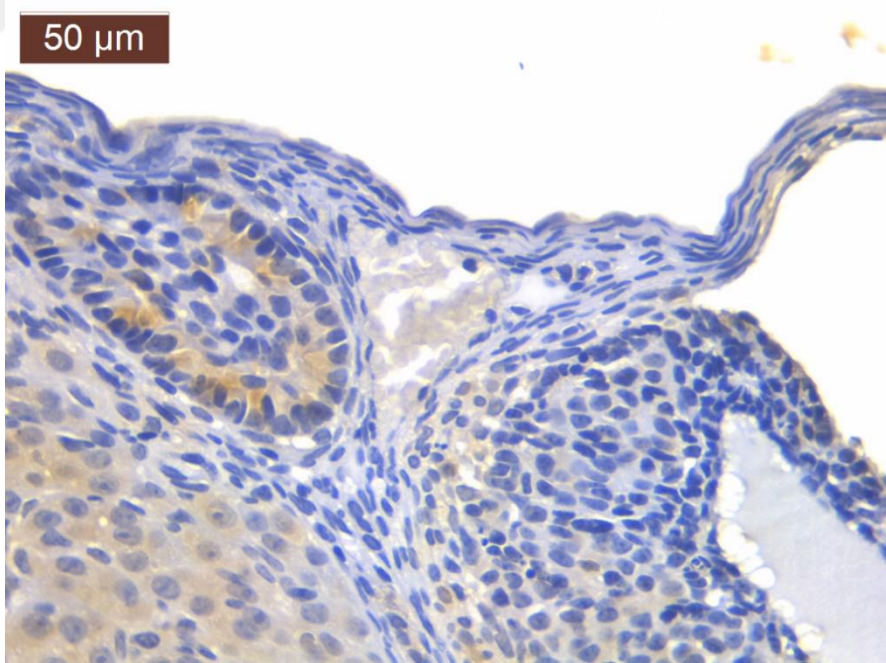
Resim 35. Tedavi grubuna ait over kesitinde VEGF immünperoksidaz boyama. Büyütme objektifi: 10x.



Resim 36. İskemi grubuna ait over kesitinde VEGF immünperoksidaz boyama. Büyütme objektifi: 40x.



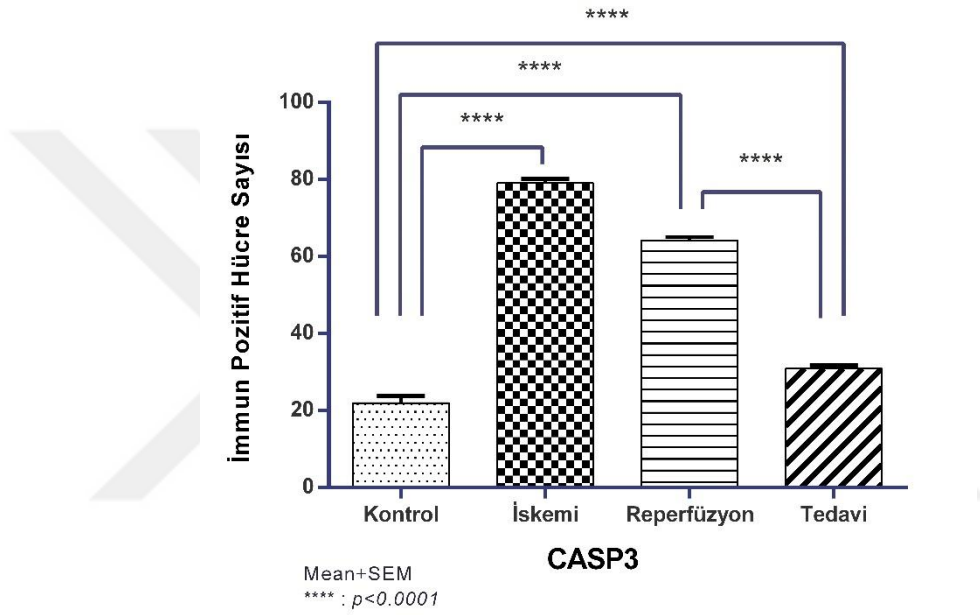
Resim 37. İ/R grubuna ait over kesitinde VEGF immünperoksidaz boyama.
Büyütme objektifi: 40x.



Resim 38. Tedavi grubuna ait over kesitinde VEGF immünperoksidaz boyama.
Büyütme objektifi: 40x.

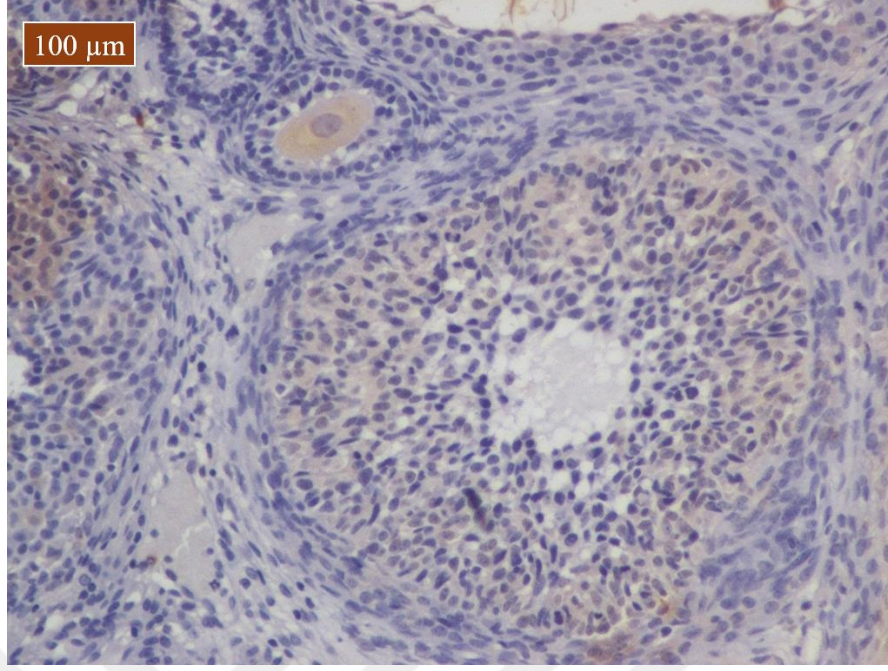
4.1.3.2. Caspase-3 primer antikoru ile immünperoksidaz işaretleme

Caspase-3 antikoru kullanılarak immünperoksidaz tekniği ile boyanan kesitlerde, Kontrole kıyasla İskemi, İ/R ve Tedavi gruplarında immün-pozitif hücre sayısı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulundu ($p=0,000$). Tedavi grubundaki Caspase 3-pozitif hücre sayısı Kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olmasına karşın, İskemi ve İ/R gruplarına kıyasla anlamlı düzeyde daha az bulundu ($p=0,000$) (Şekil 8).

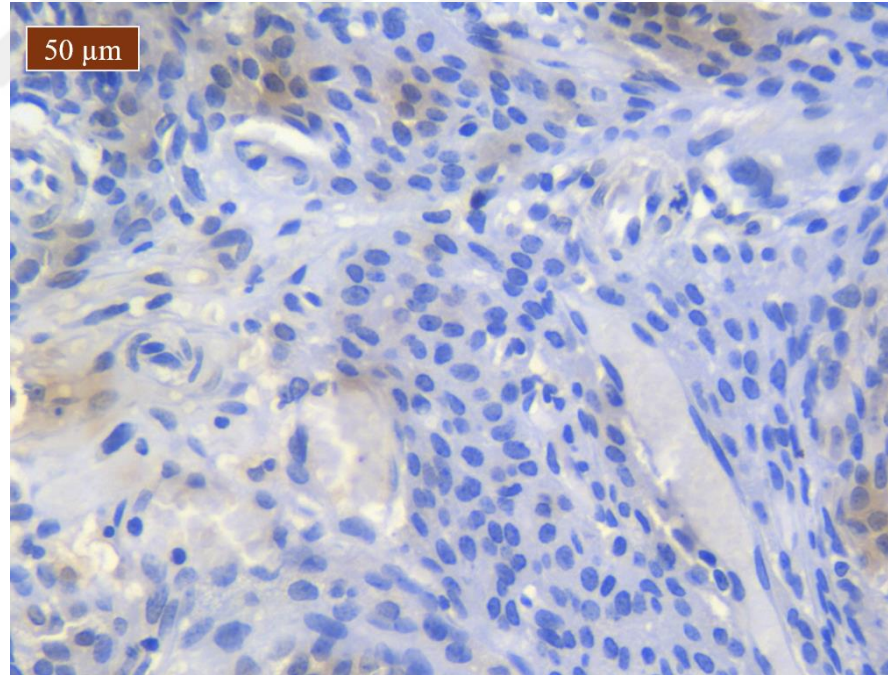


Şekil 8. Dört deney grubunda Caspase 3-pozitif hücre sayılarının karşılaştırılması

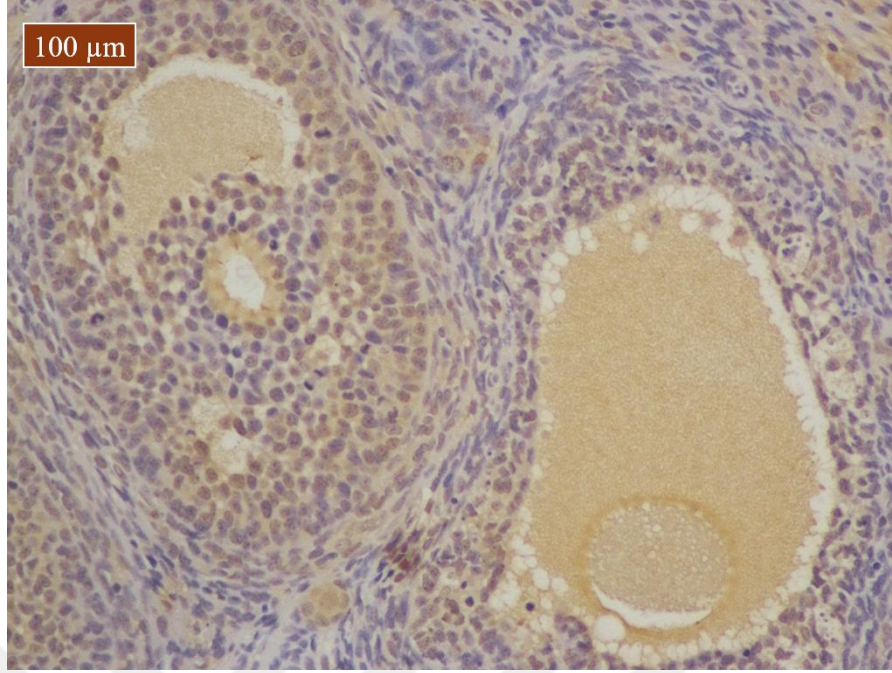
Caspase-3 antikoru ile immünperoksidaz boyanmış kesitlerde immün-pozitif reaksiyonun, Kontrol grubuna (Resim 39, 40) kıyasla, İskemi (Resim 41) ve İ/R (Resim 42) gruplarında daha fazla olduğu görüldü.



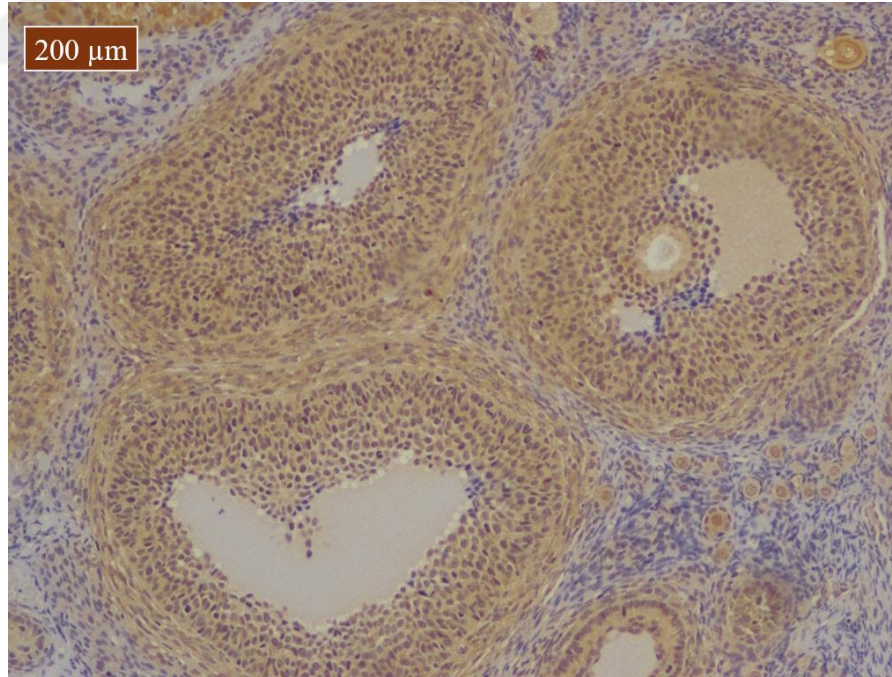
Resim 39. Kontrol grubuna ait over kesitinde Caspase-3 immünperoksidaz boyama.
Büyütme objektifi: 20x.



Resim 40. Kontrol grubuna ait over kesitinde Caspase-3 immünperoksidaz boyama.
Büyütme objektifi: 40x.

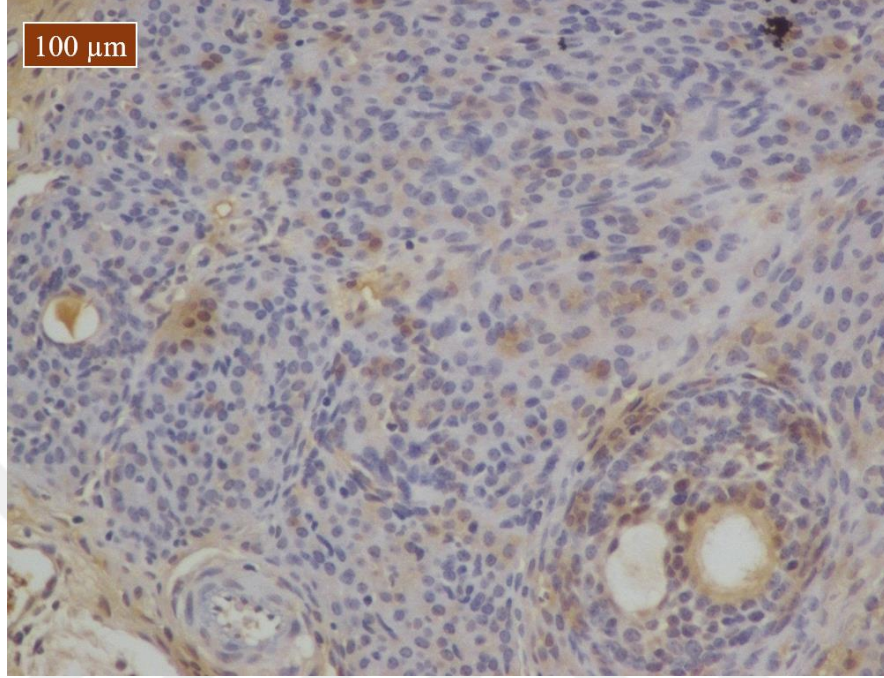


Resim 41. İskemi grubuna ait over kesitinde Caspase-3 immünperoksidaz boyama.
Büyütme objektifi: 20x.

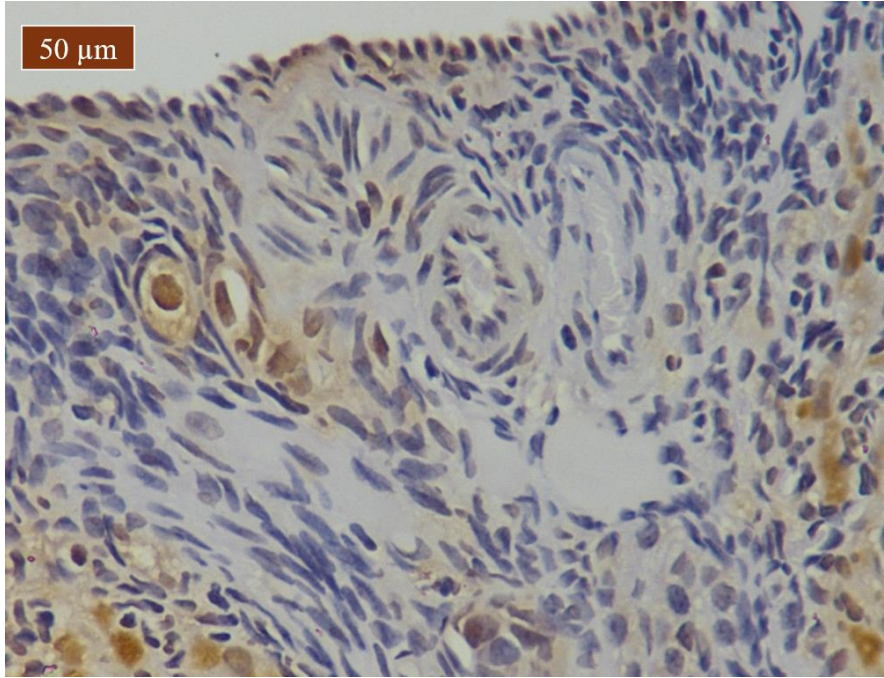


Resim 42. İ/R grubuna ait over kesitinde Caspase-3 immünperoksidaz boyama.
Büyütme objektifi: 10x.

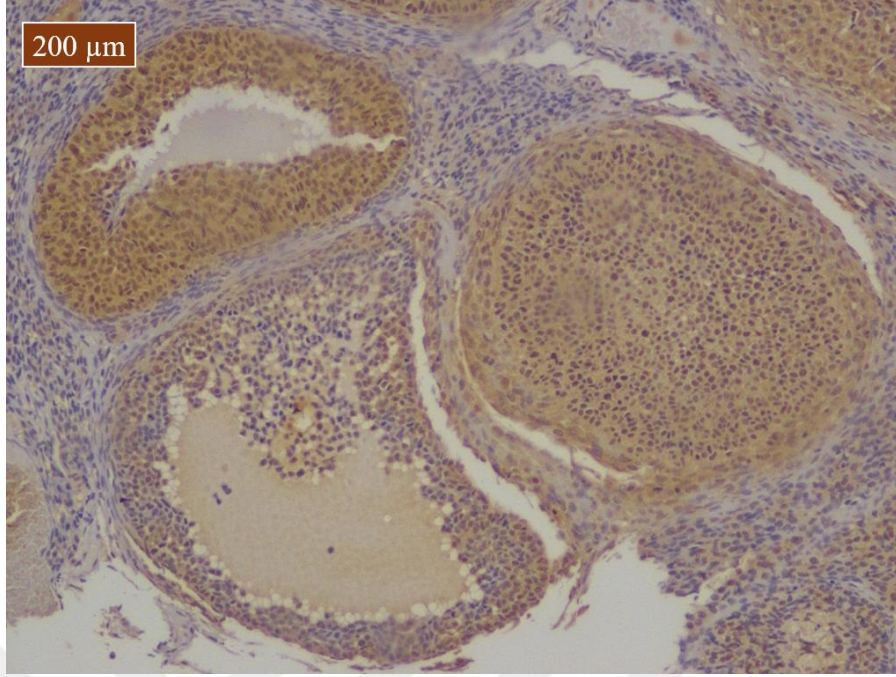
Tedavi grubundaki (Resim 43, 44) Caspase 3-pozitif boyanma, Kontrol grubuna (Resim 39, 40) kıyasla yüksekti. İskemi (Resim 41, 45, 46) ve İ/R (Resim 42, 47) gruplarındaki immün boyanma Tedavi grubuna (Resim 48) kıyasla daha yüksekti.



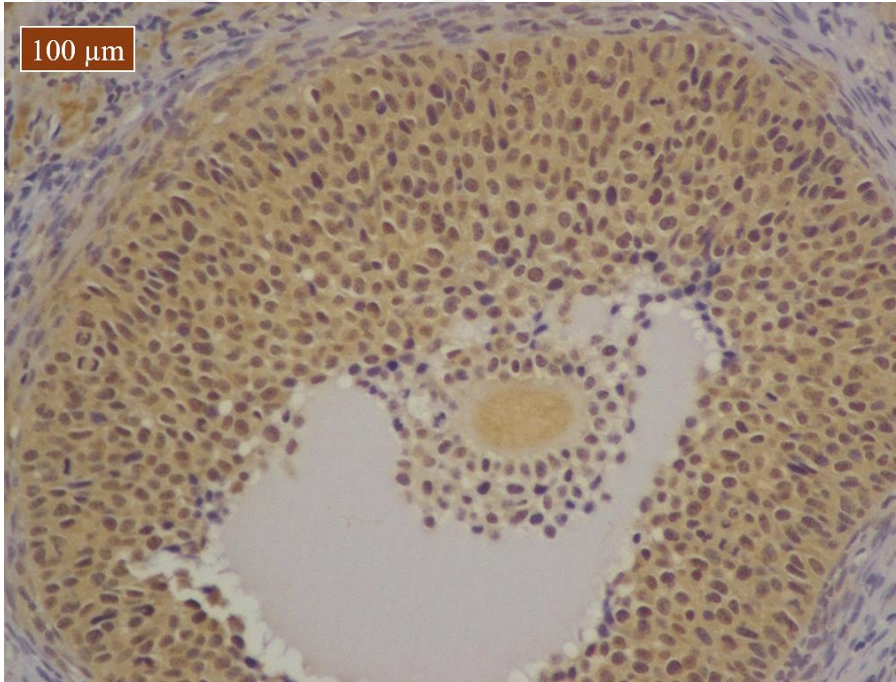
Resim 43. Tedavi grubuna ait over kesitinde Caspase-3 immünperoksidaz boyama. Büyütme objektifi: 20x.



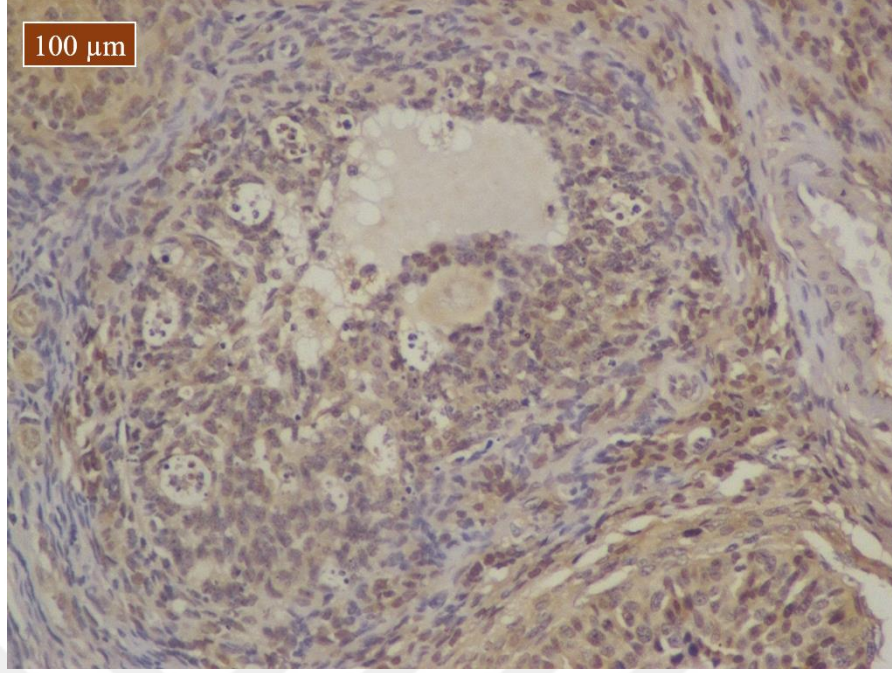
Resim 44. Tedavi grubuna ait over kesitinde Caspase-3 immünperoksidaz boyama. Büyütme objektifi: 40x.



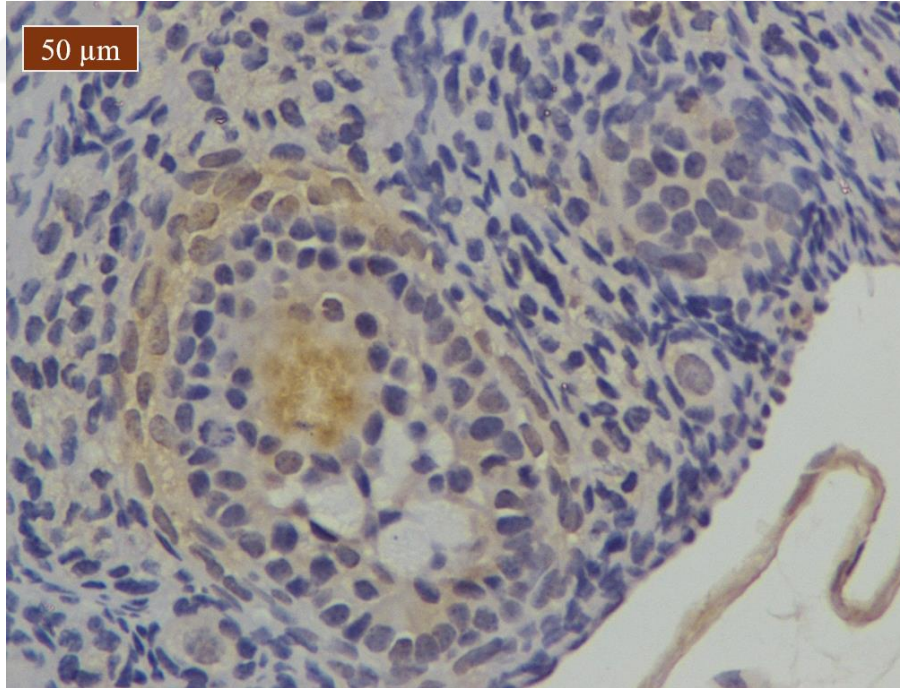
Resim 45. İskemi grubuna ait over kesitinde Caspase-3 immünperoksidaz boyama.
Büyütme objektifi: 10x.



Resim 46. İskemi grubuna ait over kesitinde Caspase-3 immünperoksidaz boyama.
Büyütme objektifi: 20x.



Resim 47. İ/R grubuna ait over kesitinde Caspase-3 immünperoksidaz boyama.
Büyütme objektifi: 20x.



Resim 48. Tedavi grubuna ait over kesitinde Caspase-3 immünperoksidaz boyama.
Büyütme objektifi: 40x.

4.2. İNVERT MİKROSKOP BULGULARI

Çalışma sonunda tüm deneklerin sağ overlerinden toplanan oositler invert mikroskop altında sayıldı ve M2, M1 ve GV olarak kategorize edildi. Tüm gruplara ait oosit sayıları Tablo 3’ de gösterildi.

Tablo 3. Dört deney grubuna ait oosit sayıları

GRUPLAR	OOSİT SAYISI			
	Toplam	M2	M1	GV
KONTROL	43	23	9	11
İSKEMİ	15	3	2	10
İSKEMİ- REPERFÜZYON	17	6	4	7
TEDAVİ	29	13	11	5

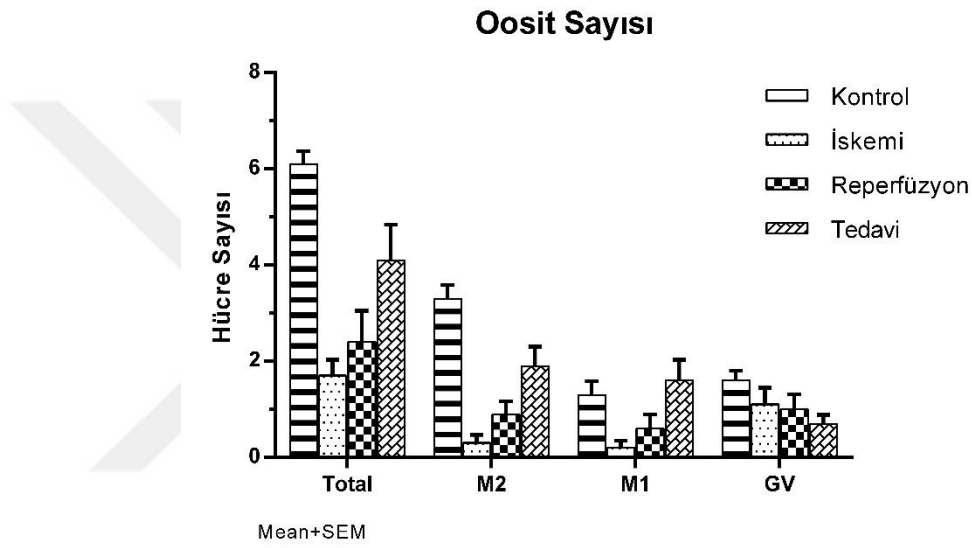
Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar, toplam oosit, M2 oosit, M1 oosit ve GV oosit sayıları dikkate alınarak yapıldı. Toplam oosit sayısı, Kontrol grubuna kıyasla İskemi ve İ/R gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha azdı ($p=0,000$) (Şekil 9).

Tablo 3’te verilen oosit sayım sonuçlarına göre, Tedavi grubundaki toplam oosit sayısı Kontrol grubuna kıyasla daha az olmakla birlikte, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$) (Şekil 9).

M2 oosit sayısı bakımından karşılaştırma yapıldığında, Kontrol grubundaki M2 oosit sayısı diğer gruplardakinden anlamlı düzeyde yüksekti ($p=0,000$). Tedavi grubu ile İskemi grubu arasındaki fark anlamlı ($p=0,030$) olmasına karşın, Tedavi ile İ/R grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$) (Şekil 9).

M1 oosit sayısı bakımından karşılaştırma yapıldığında, Tedavi grubu ile İskemi grubu arasındaki fark (Tablo 3) istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,012$) bulunmasına karşın, diğer gruplara ait M1 oosit sayıları (Tablo 3) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$) (Şekil 9).

GV oosit sayıları bakımından karşılaştırma yapıldığında tüm gruplar arasında istatistiksel düzeyde anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$) (Şekil 9).



Şekil 9. Toplam oosit, M2, M1 ve GV oositlerin dört deney grubundaki sayılarını gösteren grafik

Toplam oosit, M2, M1 ve GV sayılarının gruplar arası istatistiksel kıyaslaması yukarıdaki şekilde yapılmakla birlikte (Şekil 9), her bir deney grubunda farklı olgunlaşma evresindeki oositlerin o gruba ait toplam oosit sayısına oranı hesaplanarak; M2, M1 ve GV sayılarının yüzdelik oranları bakımından da gruplar arası anlamlı fark olup olmadığı istatistiksel olarak kıyaslandı (Tablo 4).

Tablo 4. Dört deney grubu arasında Toplam oosit, M2, M1 ve GV oosit sayılarının ve farklı matürasyon evresindeki yüzdelik oranlarının karşılaştırılması

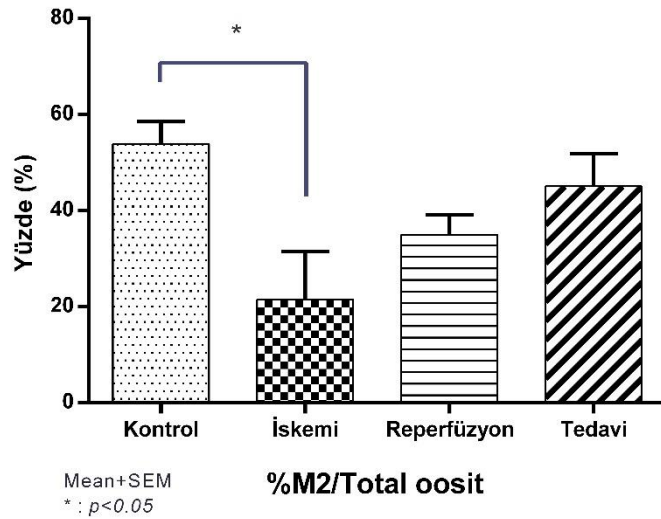
		Kontrol vs. İskemi		Kontrol vs. İ/R		Kontrol vs. Tedavi		İskemi vs. İ/R		İskemi vs. Tedavi		İ/R vs. Tedavi	
Toplam Oosit	Mean±SEM	6,14±0,261	1,67±0,333	6,14±0,261	2,43±0,649	6,14±0,261	4,14±0,738	1,67±0,333	2,43±0,649	1,67±0,333	4,14±0,738	2,43±0,649	4,14±0,738
	p değeri	0,000		0,000		0,060		0,707		0,009		0,129	
M2 Oosit	Mean±SEM	3,29±0,286	0,33±0,167	3,29±0,286	0,86±0,261	3,29±0,286	1,86±0,404	0,33±0,167	0,86±0,261	0,33±0,167	1,86±0,404	0,86±0,261	1,86±0,404
	p değeri	0,000		0,000		0,009		0,533		0,003		0,092	
M1 Oosit	Mean±SEM	1,29±0,286	0,22±0,147	1,29±0,286	0,57±0,297	1,29±0,286	1,57±0,429	0,22±0,147	0,57±0,297	0,22±0,147	1,57±0,429	0,57±0,297	1,57±0,429
	p değeri	0,060		0,353		0,906		0,819		0,012		0,112	
GV Oosit	Mean±SEM	1,57±0,202	1,11±0,351	1,57±0,202	1,00±0,309	1,57±0,202	0,71±0,184	1,11±0,351	1,00±0,309	1,11±0,351	0,71±0,184	1,00±0,309	0,71±0,184
	p değeri	0,655		0,534		0,199		0,992		0,749		0,903	
%M2/Toplam	Mean±SEM	53,8±4,71	21,4±10,1	53,8±4,71	34,9±4,08	53,8±4,71	45,0±6,83	21,4±10,1	34,9±4,08	21,4±10,1	45,0±6,83	34,9±4,08	45,0±6,83
	p değeri	0,016		0,317		0,820		0,589		0,123		0,801	
%M1/Toplam	Mean±SEM	20,8±4,54	14,9±9,22	20,8±4,54	21,6±9,71	20,8±4,54	37,2±8,36	14,9±9,22	21,6±9,71	14,9±9,22	37,2±8,36	21,6±9,71	37,2±8,36
	p değeri	0,926		1,000		0,475		0,921		0,199		0,584	
%GV/Toplam	Mean±SEM	25,3±2,79	64,2±14,2	25,3±2,79	43,3±9,64	25,3±2,79	11,7±3,79	64,2±14,2	43,3±9,64	64,2±14,2	11,7±3,79	43,3±9,64	11,7±3,79
	p değeri	0,023		0,553		0,935		0,427		0,008		0,289	

*Sonuçlar Mean ± SEM şeklinde yazılmıştır.

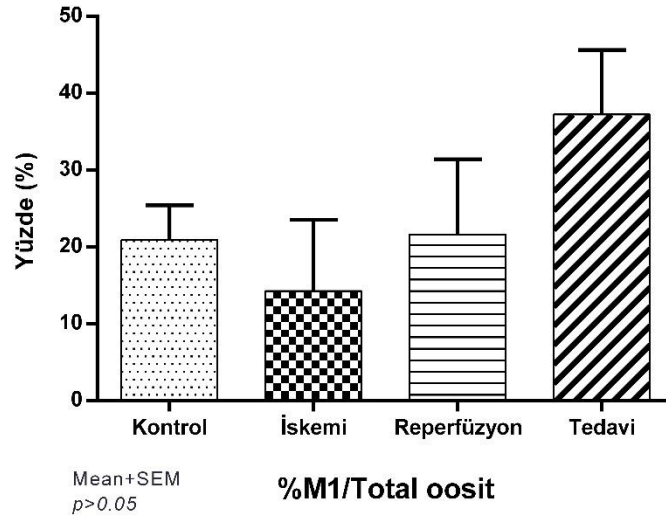
*İ/R: iskemi-reperüzyon

Her bir grup içinde M2/Toplam oosit, M1/Toplam oosit ve GV/Toplam oosit yüzdelik oranları (Tablo 4) hesaplanarak gruplar arasında istatistiksel olarak kıyaslandığında;

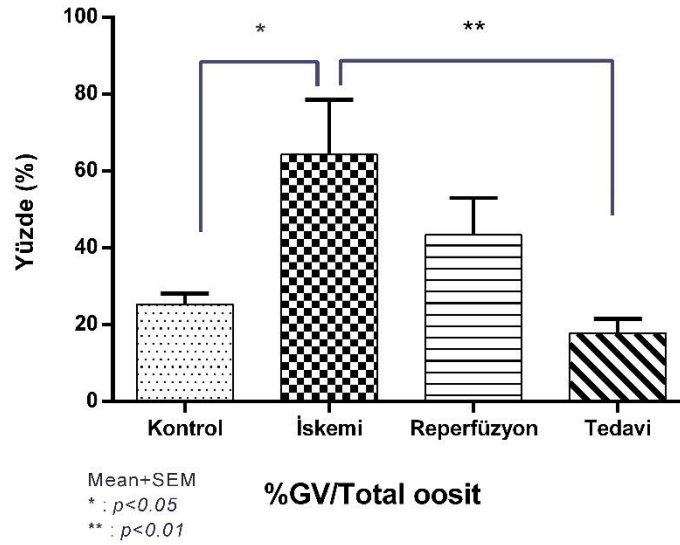
1. M2 oosit yüzdeleri kıyaslandığında; Kontrol grubunda İskemi grubuna kıyasla anlamlı düzeyde yüksek olduğu ($p=0,016$), diğer gruplar ile Kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olmadığı bulundu ($p>0,05$) (Şekil 10).
2. M1 oosit yüzdeleri kıyaslandığında; dört deney grubu arasında anlamlı istatistiksel fark bulunmadı ($p>0,05$) (Şekil 11).
3. GV oosit yüzdeleri kıyaslandığında; İskemi grubu ile karşılaştırıldığında hem Kontrol grubunda ($p=0,023$) hem de Tedavi grubunda ($p=0,008$) GV sayıları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az bulundu. İskemi grubu ile İ/R grubu arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,005$). Diğer gruplar arasında da anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$) (Şekil 12).



Şekil 10. Dört deney grubunda M2 oosit sayısının Toplam oosit sayısına yüzde oranı

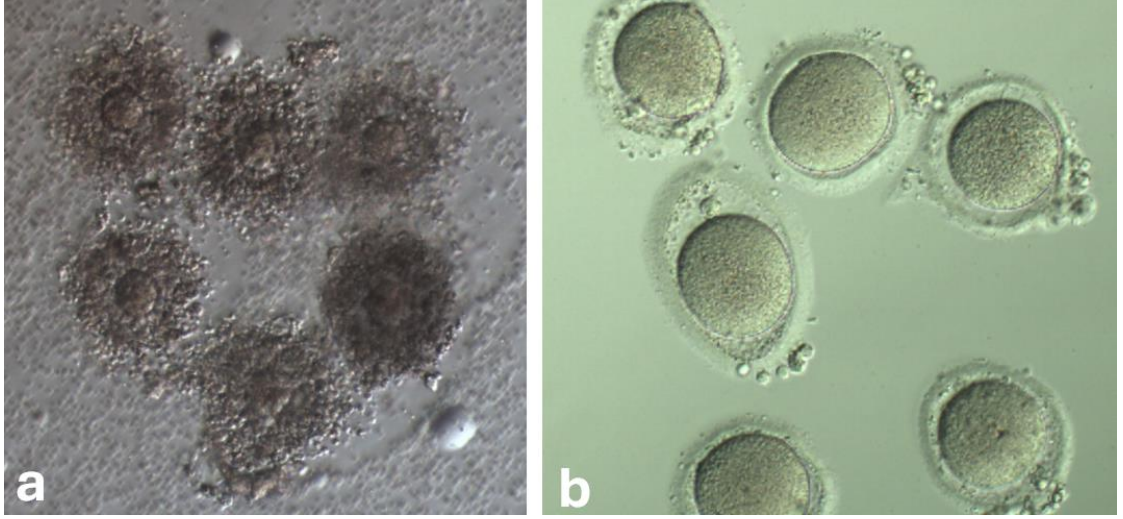


Şekil 11. Dört deney grubunda M1 oosit sayısının Toplam oosit sayısına yüzde oranı



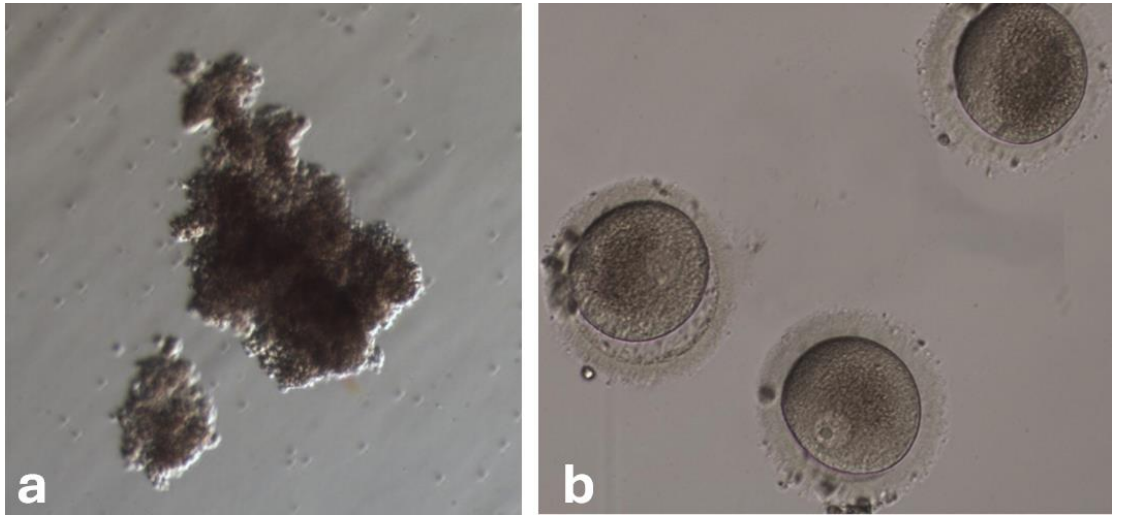
Şekil 12. Dört deney grubunda GV oosit sayısının Toplam oosit sayısına yüzde oranı

Kontrol grubu oositleri, kümülüs ooforus hücrelerinden ayıklandıktan sonra invert mikroskop altında incelendiğinde; çoğunlukla şeffaf sitoplazmaya sahip, normal şekilli ve zona pellusidaları normal kalınlıkta olan M2 oositler olduğu görüldü (Resim 49).

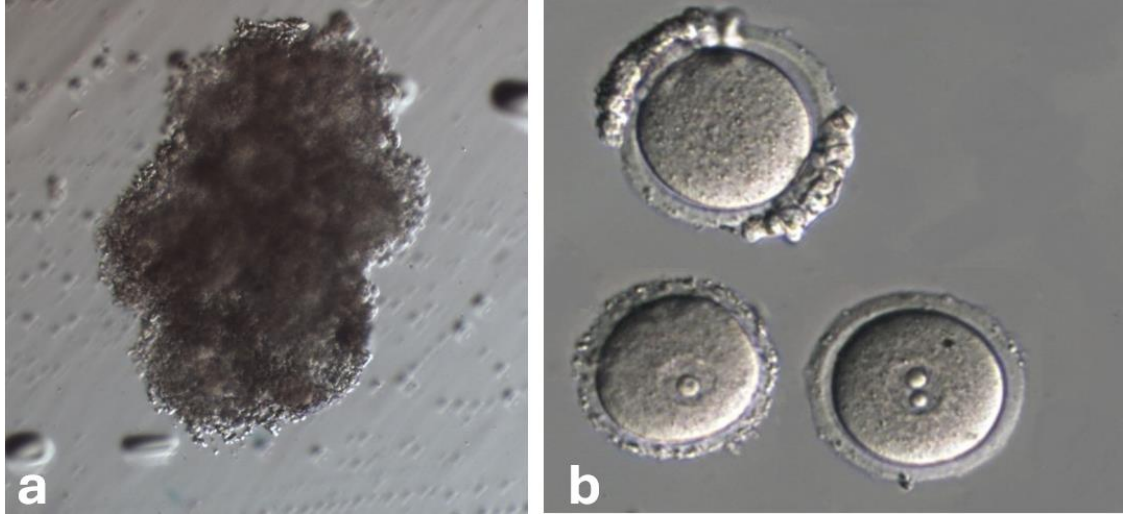


Resim 49. Kontrol grubundan toplanan oositler (a), kumulus ooforus hücrelerinden temizlenmiş oositler (b)

İskemi (Resim 50) ve İ/R (Resim 51) gruplarından toplanan oositler invert mikroskop altında incelendiğinde, Kontrole kıyasla bu gruplarda zona pellusidaların daha kalın olduğu, perivitellin aralığın daha geniş olduğu ve sitoplazmalarının bol granüllü ve koyu renkte olduğu tespit edildi.

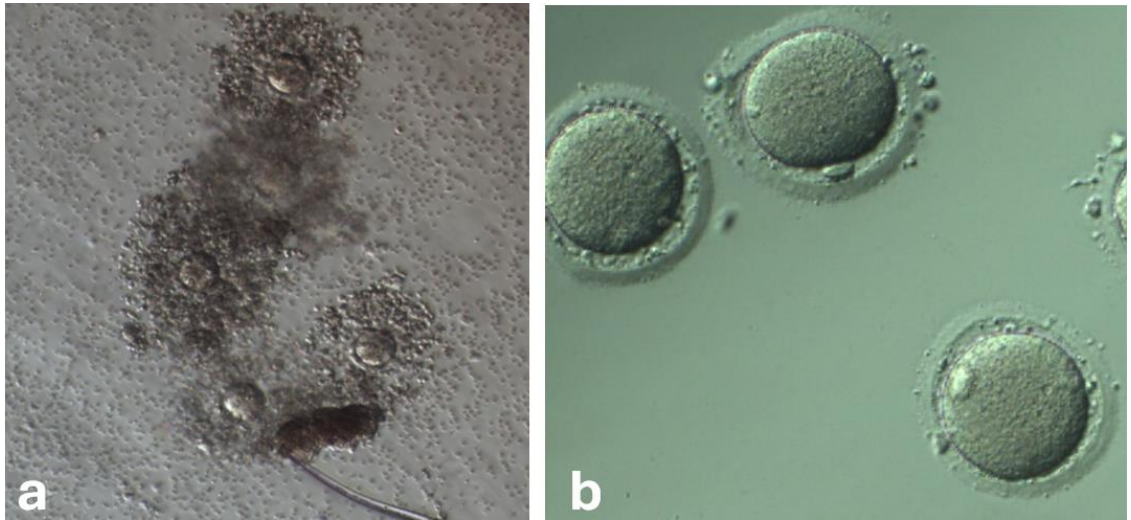


Resim 50. İskemi grubundan toplanan oositler (a), kumulus ooforus hücrelerinden temizlenmiş oositler (b)



Resim 51. İ/R grubundan toplanan oositler (a), kümülüs ooforus hücrelerinden temizlenmiş oositler (b)

Tedavi grubundan toplanan oositler invert mikroskop altında incelendiğinde, Kontrol grubundakilere benzer şekilde şeffaf sitoplazmalı ve normal kalınlıkta zona pellusidaya sahip oldukları g r ld . Kutup cisimcikleri perivitellin aralıkta tespit edildi (Resim 52).



Resim 52. Tedavi grubundan toplanan oositler (a), kümülüs ooforus hücrelerinden temizlenmiş oositler (b)

4.3. BİYOKİMYASAL ANALİZ BULGULARI

Tüm deneklerin sakrifikasyon sırasında alınan kan örneklerinden hazırlanan serum biyokimyasal verileri Tablo 5’te gösterildi.

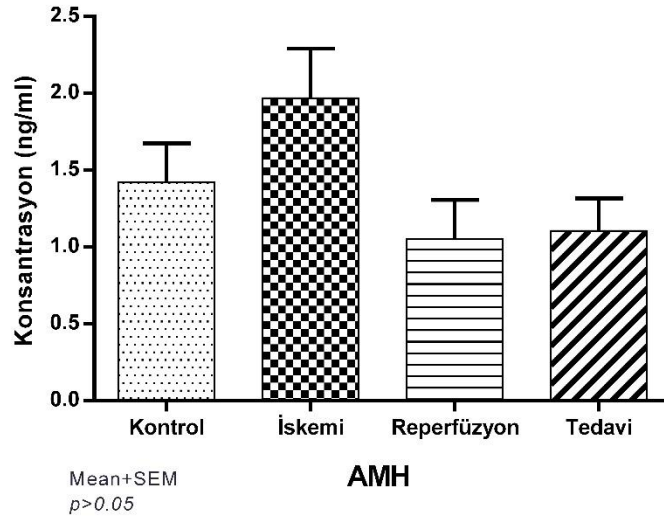
Tablo 5. Dört deney grubuna ait biyokimyasal analiz verileri

GRUP	KONTROL	İSKEMİ	İSKEMİ - REPERFÜZYON	TEDAVİ	P Değeri
AMH	1,41±0,127	1,96±0,232	1,05±0,250	1,10±0,211	0,062
GSH	176,6±12,5	176,1±25,2	100,0±11,0	184,8±28,2	0,052
NF-κB	1,58±0,169	1,24±0,141	1,53±0,087	1,52±0,096	0,242
TNFα	81,9±1,45	75,8±3,82	91,0±7,60	82,9±2,23	0,132
IL-1β	6,58±0,475	5,72±0,192	6,90±0,497	7,17±0,153	0,048

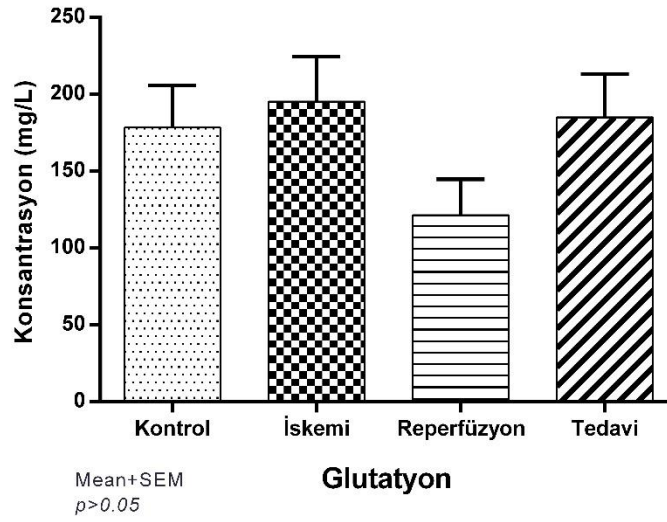
* Sonuçlar Mean ± SEM şeklinde yazılmıştır.

Dört deney grubuna ait serum AMH düzeylerine analiz edildiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Kontrol, İskemi, İ/R ve Tedavi gruplarına ait ortalama±SEM değerleri (sırasıyla 1,41±0,127; 1,96±0,323; 1,05±0,250; 1,0±0,211) istatistiksel olarak birbirinden farklı değildi ($p>0,05$) (Şekil 13).

Dört deney grubuna ait serum GSH düzeyleri incelendiğinde, Kontrol grubunda ortalama±SEM değeri 176,6±12,5; İskemi grubunda 176,1±25,2; İ/R grubunda 100,0±11,0 ve Tedavi grubunda 184,8±28,2 olarak tespit edildi. Ortalamalar dikkate alındığında deney grupları arasında anlamlı istatistiksel bir fark olmadığı saptandı ($p>0,05$) (Şekil 14).

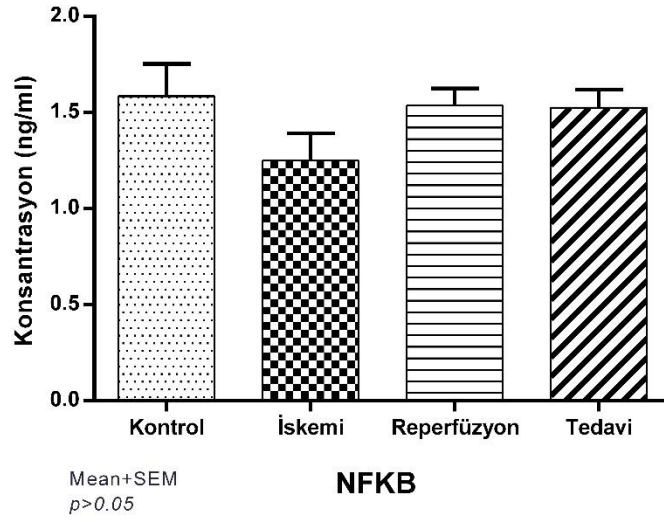


Şekil 13. Dört deney grubunda AMH ELISA sonuçlarının karşılaştırılması



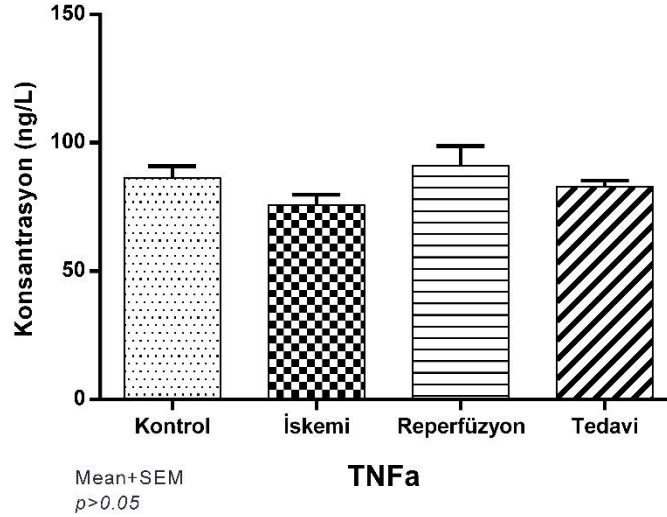
Şekil 14. Dört deney grubunda GSH ELISA sonuçlarının karşılaştırılması

Dört deney grubuna ait serum NF- κ B düzeyleri, ortalama $\pm$ SEM değeri olarak Kontrol 1,58 $\pm$ 0,169; İskemi 1,24 $\pm$ 0,141; İ/R 1,53 $\pm$ 0,087 ve Tedavi 1,52 $\pm$ 0,096 şeklinde bulundu. Tüm grupların ortalama $\pm$ SEM değerlerine göre, gruplar arası istatistiksel fark anlamlı değildi ($p>0,05$) (Şekil 15).



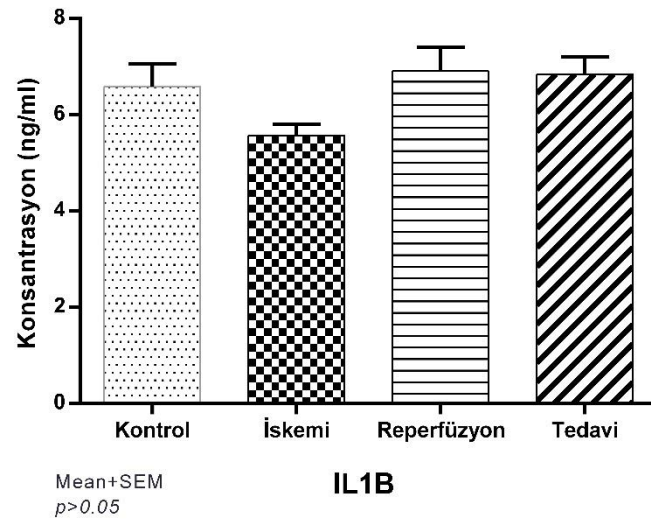
Şekil 15. Dört deney grubunda NF-κB ELISA sonuçlarının karşılaştırılması

Dört deney grubuna ait serum TNFα değerlerine göre, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p>0,05$). Grup ortalama±SEM değerleri Kontrol 81,9±1,45; İskemi 75,8±3,82; İ/R 75,8±3,82 ve Tedavi 82,9±2,23 olarak bulundu (Şekil 16).



Şekil 16. Dört deney grubunda TNFα ELISA sonuçlarının karşılaştırılması

Dört deney grubuna ait serum IL-1 β sonuçlarına göre, Kontrol grubuna kıyasla İskemi, İ/R ve Tedavi grubu arasında fark bulunmadı ($p>0,05$); İskemi ve Tedavi grupları arasındaki fark $p=0,05$ düzeyinde anlamlıydı. Grup ortalamaları $\pm$ SEM değerleri Kontrol, İskemi, İ/R ve Tedavi olmak üzere sırasıyla $6,58\pm0,475$; $5,72\pm0,192$; $6,90\pm0,497$ ve $7,17\pm0,153$ olarak bulundu (Şekil 17).



Şekil 17. Dört deney grubunda IL-1 β ELISA sonuçlarının karşılaştırılması

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Over torsiyonu % 2,7 prevalansa sahip jinekolojik acil durumlardan biridir ve tedavisine geç kalındığı durumlarda kadınlarda üreme sağlığını tehdit eden klinik bir tablo oluşturur (Hibbard 1985). Geleneksel tedavi yöntemi, torsiyone olmuş overin cerrahi müdahale ile çıkarılmasıdır; ancak günümüzde bu yöntem kadın üreme sağlığına olumsuz etkilerinden dolayı pek kabul görmemektedir. Organ koruyucu cerrahi yaklaşım olarak uygulanan detorsiyon işlemi, günümüzde over torsiyonunu tedavi etmekte kullanılan etkin bir yöntemdir (Kılıç ve ark 2016). Fakat bu işlem, over dokusunda iskemi nedeniyle oluşmuş olan hasarı daha da fazla arttırmaktadır. Bu hasarın en temel sebebi serbest oksijen radikallerinin (SOR) dokuda birikmesidir. Reaktif özellikleri yüksek olan bu serbest oksijen radikalleri dokuda hücresel hasara sebep olduğundan, bu hasarı önlemeye yönelik tedaviye yardımcı ajanların kullanılması düşüncesi ile yapılmış birçok deneysel çalışma literatürde mevcuttur (Toktay et al 2022, Çelik ve ark 2002). Bu yardımcı ajanlardan bir grubu da antioksidanlardır. Bitkisel kaynaklı bir madde olan Mirisetin, flavonoid sınıfına ait bir antioksidan maddedir (Jung et al 2017).

Yapılan literatür araştırmasında Mirisetin ile fare ve sıçan modellerinde birçok deneysel çalışmaya rastlanmıştır. Fare sepsis modelinde, Mirisetin'in sepsis ile ilişkili akciğer hasarında olumlu etki gösterdiği rapor edilmiştir (Xu et al 2021). Bir başka çalışmada Mirisetin'in gastrointestinal sisteme etkisi sıçan modelinde incelenmiş olup alkol kaynaklı mide ülserinde ön tedavi olarak kullanımının koruyucu etki sağladığı bildirilmiştir (Park et al 2021). Öztürk ve ark. tarafından çalışılan sıçan testis İ/R modelinde, detorsiyon öncesi uygulanan Mirisetin'in İ/R hasarına karşı olumlu etkileri rapor edilmiştir (Öztürk ve ark 2021). Başka bir sıçan modeli çalışmasında, akut İ/R kaynaklı miyokardiyal hasar üzerine Mirisetin'in koruyucu kardiyovasküler etkilerinin olduğunu bildirilmiştir (Qiu ve ark 2017).

Daha önce yapılmış bir çalışmada, Mirisetin'in deneysel over İ/R hasarında, biyokimyasal olarak oksidatif stres belirteçlerini azaltarak tedaviye yardımcı olabileceği bildirilmiştir (Topdağı ve ark 2021). Ancak bu biyokimyasal çalışmada, mikroskobik düzeyde over dokusu ve oosit değerlendirilmesi açısından histolojik bir

inceleme yapılmadığı tespit edilmiştir. Yapılan bu tez çalışmasında Mirisetin'in sıçan overinde İ/R hasarına karşı olası koruyucu etkileri hem ışık mikroskopik düzeyde histokimyasal boyama yöntemleriyle hem de kanda biyokimyasal analizlerle araştırılmış olup ayrıca, overlerden toplanan oositlerin invert mikroskopta incelenmesi ile Mirisetin'in oosit sayılarına etkileri de değerlendirilmiştir.

Bu tez çalışmasında yapılan ışık mikroskopik incelemelerde, over dokusu histopatolojisi vasküler dilatasyon-hemoraji, ödem, foliküler dejenerasyon ve dokuda ayrışma kriterlerine göre değerlendirildi. Bu parametreler üzerinden deney grupları arasında yapılan istatistiksel değerlenmeye göre, İskemi ve İ/R gruplarında doku hasarının Kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edildi. Masson-Trikrom ile boyanmış kesitlerde de Kontrol grubuna kıyasla, İskemi ve İ/R gruplarında doku hasarlanmasının göstergesi olarak yoğun fibrozis alanları görüldü. Literatürde mevcut olan deneysel over İ/R hasarı yayınlarında (Soyman ve ark. 2017; Toktay ve ark. 2022; Tokgoz ve ark.2017; Karakaş ve ark. 2020) belirtilen bulgular, çalışmamızda saptadığımız histopatolojik over verilerini desteklemektedir. İskemi ve İ/R gruplarında gözlenen histopatolojik hasarın, Mirisetin uygulanan Tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmış olduğu ilk kez çalışmamızda elde edilen verilerle saptandı. Kanımızca bu bulgular, antioksidan bir madde olan Mirisetin'in over dokusunda İ/R hasarına karşı koruyucu etkilerinin olduğunu göstermektedir. Nitekim, Tedavi ve Kontrol grupları arasında yukarıda belirtilen vasküler dilatasyon-hemoraji, ödem, foliküler dejenerasyon ve dokuda ayrışma gibi histopatolojik kriterler bakımından istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark olmaması da bu görüşümüzü desteklemektedir.

Topdağı ve ark., sıçan over İ/R modelinde doku biyokimyası üzerine Mirisetin'in etkilerini araştırdıklarında, Mirisetin'in oksidatif stres belirteçlerini düşürdüğünü göstermiş olsalar da (Topdağı ve ark. 2021), tez çalışmamızda sakrifiye edilen deneklerin serum örneklerinde yaptığımız biyokimyasal analizlerde deney grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Yapılan literatür araştırmasında, over torsiyon/detorsiyon modellerinde, cerrahi işlemler ile sakrifikasyon arasında geçen sürenin 2-4 saat olduğu görülmüştür (Kılıç ve ark 2016; Toktay ve ark 2022; Haftaci ve ark 2013). Topdağı ve ark. da yukarıda bahsedilen çalışmalarında, doku örneklerini cerrahi işlemlerden 3 saat sonra alarak analiz etmişlerdir (Topdağı ve ark.

2021). Çalışmamızın biyokimyasal analizlerinde gruplar arasında anlamlı fark bulunmaması, oosit sitümülasyonu için üç östrüs siklusu beklenerek deneyin 20. gününde sakrifikasyonla alınan serum örneklerinin kullanılmasından kaynaklanabilir. Bu nedenle, cerrahi işlemler ile sakrifikasyon arasında geçen süre içinde serum değerlerinde iyileşme olabileceği düşünüldü. Nitekim, İskemi ve İ/R gruplarının Masson-Trikrom ile boyanmış kesitlerinde yoğun fibrozisin saptanması, deneklerin hasarlı dokuyu tamir sürecine girdiklerini göstermektedir.

İmmünperoksidaz ile boyanan preparatlarımızda, İskemi ve İ/R gruplarında VEGF-pozitif boyanan hücre sayısı Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu. VEGF, hücrelerde vaskülogenez ve anjiyogenezi uyarmak için üretilen bir sinyal proteindir (Vincenti et al 1996). Literatürde, VEGF'in overde İ/R hasarının belirteci olduğuna dair bulgular mevcuttur (Ersoy Canillioğlu ve ark 2020). VEGF seviyeleri çeşitli dokularda da İ/R hasarında artış göstermektedir (Tiriveedhi et al 2014; Zhang et al 2016). Bunun sebebi doku reperfüzyonuna yardımcı olmak amacıyla anjiyogenezi sağlamaktır. Dolayısıyla hasarlı dokuda vaskülogenez ve anjiyogenezi sağlamak amacıyla artış göstermesi beklenir. VEGF'in aynı zamanda over hücre farklılaşmasına ve foliküler olgunlaşmaya da etki ettiği düşünülmektedir (Ersoy Canillioğlu ve ark 2020). Çalışmamızda VEGF-pozitif hücre sayısı, Kontrol grubuna kıyasla Tedavi grubunda da anlamlı derecede yüksek bulunsada, Tedavi grubundaki VEGF-pozitif hücre sayısı İskemi ve İ/R gruplarındakine kıyasla daha düşüktü. Kanımızca, VEGF-pozitif hücre sayısının Tedavi grubunda İskemi ve İ/R gruplarından daha düşük olması, Mirisetin'in doku hasarını azalttığıının göstergesi olabilir.

Çalışmamızda ışık mikroskopik preparatlarda, İskemi ve İ/R gruplarına ait kesitlerde bol miktarda olmak üzere, Tedavi grubunda da yer yer apoptotik cisimlere rastlanıldı. Bilindiği üzere apoptoz, fizyolojik düzeyde programlanmış hücre ölümü olmakla birlikte, vücutta hastalık ya da zararlı maddeler nedeniyle hasarlanmış hücrelerin ortadan kaldırıldığı bir savunma mekanizmasıdır (Eröz ve ark. 2012). Biz de, Caspase-3 antikoru kullanarak immünperoksidaz yöntemi ile boyadığımız preparatlarımızda, Kontrol grubuna kıyasla İskemi ve İ/R gruplarında immün-pozitif boyanan hücre sayısını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulduk. Mirisetin ile tedavi edilen grupta da Caspase-3 immün-pozitifliği, İskemi ve İ/R gruplarına

kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşüktü. Caspase-3, hücrenin apoptoza gitmesini engelleyen proteinleri ortadan kaldıran veya inaktive eden sistein proteazlardan biridir (Yerlikaya 2009). Dolayısıyla verilerimiz, İskemi ve İ/R gruplarında tetiklenen apoptotik hücre ölümlerini Mirisetin'in azaltabileceğini göstermektedir.

Oosit rezervi kadın üreme sağlığının en önemli belirteçlerinden biridir. Over torsiyonu/detorsiyonu sonrası gelişen İ/R hasarı, overde oosit sayısında azalmaya sebep olur. Klinikte oosit rezervinin belirteci olarak kullanılan serum AMH düzeyi bakımından çalışma gruplarımız arasında istatistiksel anlamlı fark bulunamamasına karşın, sıçanların sağ overlerinden toplanan oosit sayıları (Toplam, M2, M1, GV) gruplar arasında kıyaslandığında, toplam oosit sayısı bakımından Kontrol ve Mirisetin uygulanan Tedavi grupları arasında istatistiksel anlamlı fark yoktu; buna karşın, Kontrol grubuna kıyasla İskemi ve İ/R gruplarında toplam oosit sayısı anlamlı düzeyde düşüktü. Ayrıca, Tedavi grubundaki toplam oosit sayısı İskemi grubuna kıyasla anlamlı düzeyde yüksek bulundu. M2 oosit sayısı, Kontrol grubuna kıyasla diğer üç grupta istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşüktü; ayrıca, Tedavi grubundaki M2 oosit sayısı İskemi grubundan anlamlı düzeyde daha yüksek bulundu. Bu verilerimize göre, over torsiyonunda tedavi amaçlı yapılan detorsiyon işleminin, toplam oosit ve M2 oosit sayılarının artışı sağlamada tek başına yararlı olmadığı, reperfüzyonla birlikte uygulanan Mirisetin tedavisinin torsiyon ile oluşan over iskemisinde oosit sayısının artışı üzerine olumlu etki sağladığı sonucuna varıldı. Oosit sayıları ile ilgili bu verilerimize dayanarak, tez kapsamında zaman kısıtlılığı nedeniyle gerçekleştiremediğimiz, aynı deney gruplarına ait serum örneklerinde AMH ölçümlerinin tekrarlanmasının yararlı olacağını düşünmekteyiz.

M1 oosit sayıları gruplar arasında kıyaslandığında; Tedavi grubunda İskemi grubuna kıyasla anlamlı düzeyde fazla sayıda M1 oosit bulundu. Diğer gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. GV oosit sayısı bakımından da gruplar arasında bir fark bulunmadı. Her bir deney grubunda oosit yüzdelerini görmek için; M2/Toplam oosit, M1/Toplam oosit ve GV/Toplam oosit yüzdelik oranları kıyaslandı. Buna göre, GV oosit verileri dikkat çekiciydi. İskemi grubunda GV oosit oranı, Kontrol ve Tedavi grubundakilerle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksekti. Ancak, İskemi grubu ile İ/R grubu arasında GV oosit oranı bakımından anlamlı bir

fark yoktu. Mirisetin uygulanan Tedavi grubunda, İskemi grubuna kıyasla GV oositlerin daha az, M1 oositlerin ise daha fazla bulunması, over torsiyonu tedavi protokolüne Mirisetin'in eklenmesinin daha olumlu etki göstereceğini düşündürmektedir.

Over İ/R hasarında detorsiyon tedavisine ek olarak Brusatol ve D vitamini gibi antioksidan maddelerin kullanılması ile ilgili daha evvel yapılmış deneysel çalışmalara literatür araştırması sırasında rastlanılmıştır (Akdemir et al 2021, Tokgoz et al 2018). Literatürde, antioksidan maddelerden biri olan Mirisetin'in de İ/R hasarlı over biyokimyası üzerine olumlu etkilerinin olduğunu bildiren bir çalışma rapor edilmiştir (Topdağı et al 2020). Ancak, İ/R hasarlı over dokusu üzerine Mirisetin'in etkilerini araştıran ne ışık mikroskopik düzeyde ne de oosit verilerine ilişkin bir araştırmaya literatürde rastlanmamıştır. Literatürde eksik görülen bu konuya yönelik olarak yaptığımız tez çalışmamızda, over torsiyonunu takiben tedavi amaçlı uygulanan detorsiyon işlemi sebebiyle gelişen İ/R hasarında Mirisetin'in tedaviye yardımcı ajan olarak kullanılmasının faydalı olabileceği sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

- Agca Y, Critser JK. (2006). The Laboratory Rat (Second Edition), Editörler: Suckow, M. A., Weisbroth, S. H., Franklin, C. L. Burlington: Academic Press. Sayfa 165-89.
- Ağartan ES. (2017). Sıçanlarda Ovaryum İskemi-Reperfüzyon Hasarı: 3',4'-Dihydroxyflavonol'un Lipid Peroksidasyonuna Etkisi. S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Konya, (Danışman: Prof. Dr. R Moğulkoç).
- Akdemir FNE, Tanyeli A, Güler MC, Eraslan E, Yılmaz EPT, Topdağı YE. (2021). Brusatol Over İskemi Reperfüzyonu ile İndüklenmiş Over Dokusu Oksidatif Yaralanmasını Azaltır. Akdeniz Medical Journal, 7(2),206-211.
- Akkoç H. (2008). Miyokardiyal iskemi reperfüzyon hasarı. Dicle Tıp Dergisi, 35(3):211-215.
- Akkuş İ. (1996). Serbest Radikaller Ve Fizyopatolojik Etkileri.
- Ali FF, Mokhemer SA, Elroby Ali DM. (2022). Administration of hemin ameliorates ovarian ischemia reperfusion injury via modulation of heme oxygenase-1 and p-JNK/p-NFκBp65/iNOS signaling pathway. Life Sciences, 296:1.
- Altunkaynak BZ, Özbek E. (2008). Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir? Tıp Araştırmaları Dergisi. 6 (2): 93 -104.
- Auersperg N, Wong AST, Choi K-C, Kang SK, Leung PCK. (2001). Ovarian Surface Epithelium: Biology, Endocrinology, and Pathology*. Endocrine Reviews, 22(2),255–288.
- Bayer AI. Wiskind AK. (1994). Adnexal torsion: can the adnexa be saved?. Am J Obstet Gynecol, 171: 1506-1510.
- Bluteau G, Julien M, Magne D. (2007) VEGF and VEGF receptors are differentially expressed in chondrocytes. Bone, 40:568-76.
- Bouguizane S, Bibi H, Farhat Y, Dhifallah S, Darraji F, Hidar S, Lassoued L, Chaieb A, Khairi H. (2003). Adnexal torsion: a report of 135 cases. Journal de Gynecologie, Obstetrique et Biologie de La Reproduction, 32(6),535–540.
- Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M, Upadhyaya NB. (2004). Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. Reproductive Biology and Endocrinology, 2(1),20.

- Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. (2006). Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 4th ed. St. Louis, Missouri. Elsevier Saunders, 671-675, 702-708.
- Çelik H, Özercan İ, Çıkım G, Moğulkoç R, Özçelik O, Atılğan R. (2002). Overde İskemi-Reperfüzyon Hasarı ve Melatonin Etkisi. T Klin Jineköl Obst, 12:73-77.
- Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. (2005). Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. Acta Cirúrgica Brasileira, 20(4),336–343.
- Chen M, Chen CD, Yang YS. (2001). Torsion of the previously normal uterine adnexa. Evaluation of the correlation between the pathological changes and the clinical characteristics. Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica, 80(1),58–61.
- Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, Hoogendam J, van Der Bent C, Papapoulos SE ve ark. (2002). Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. Endocrinology, 143:1545-53.
- Desborough JP. (2000). The stress response to trauma and surgery. Br J Anaesth, 85: 109-117.
- Dinarelli CA. (1997). Interleukin-1. Cytokine Growth Factor Rev., 8:253–265.
- Dorweiler B, Pruefer D, Andradi TB, Maksan SM, Schmiedt W, Neufang A, Vahl CF. (2007). Ischemia-Reperfusion Injury: Pathophysiology and Clinical Implications. European Journal of Trauma and Emergency Surgery, 33(6),600–612.
- Ekinci Akdemir FN, Yildirim S, Kandemir FM, Gülçin İ, Küçükler S, Sağlam YS, Yakan S. (2018). The effects of casticin and myricetin on liver damage induced by methotrexate in rats. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 21(12),1281–1288.
- Ersoy Canillioglu Y, Erkanli Senturk G. (2020). Alterations of IL-1 and VEGF after ischemia reperfusion injured uterus and ovary in rats. Medeniyet Med J. 35:106–15.
- Espey LL. (1994). Current Status of the Hypothesis that Mammalian Ovulation is Comparable to an Inflammatory Reaction. Biology of Reproduction, 50(2),233–238.
- Ferrara N, Davis-Smyth T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr Rev, 18: 4–25.
- Gökmen G. (2003). Sistemik Anatomi, İzmir Güven Yayınevi.

- Gottlieb AB. (2007). Tumor necrosis factor blockade: mechanism of action. *J Investig Dermatol Symp Proc*, May;12(1):1-4.
- Gourdin MJ, Bree B, Kock MD. (2009). The impact of ischaemia–reperfusion on the blood vessel. *European Journal of Anaesthesiology*, 26(7),537–547.
- Graif M, Itzhak Y. (1988). Sonographic evaluation of ovarian torsion in childhood and adolescence. *AJR. American Journal of Roentgenology*, 150(3),647–649.
- Gruss HJ, Dower SK. (1995). TNF ligand süper ailesi ve insan hastalıkları açısından önemi. *Sitokinler Mol Ther*, 1 :75–105.
- Haftacı SM, Albayrak M, Demır S, Yıldırım U, Ankaralı H, Keskin F. (2013). Rat Overinde Oluşturulan Adneksiyal Torsiyon Modelinde Per-Operatif Selenyum ve C Vitamini Uygulamasının Ovaryan Nekroz Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi. *Türk Jinekolojik Onkoloji Dergisi*, 4, Sayfa 118-123.
- Han J, Sadiq NM. Anatomy, Abdomen and Pelvis: Fallopian Tube. [Updated 2023 Jul 24]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547660/>
- Hardy K, Wright CS, Franks S, Winston RML. (2000). In Vitro maturation of oocytes. *British Medical Bulletin*, 56(3),588–602.
- Hawkins SM, Matzuk, MM. (2008). The Menstrual Cycle: Basic Biology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1135(1),10–18.
- Hibbard LT. (1985). Adnexial torsion. *Am J Obstet Gynecol*, 52:456-461.
- Huchon C, Fauconnier A. (2010). Adnexal torsion: a literature review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 150:8–12.
- Hutt KJ, Albertini DF. (2007). An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reproductive BioMedicine Online*, 14(6),758–764.
- Jennings RB, Murry CE, Steenbergen C, Reimer KA. (1990). Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation*, 82(3 Suppl), II2-12.
- Jung H-Y, Lee D, Ryu HG, Choi B-H, Go Y, Lee N, Lee D, Son HG, Jeon J, Kim S-H, Yoon JH, Park S-M, Lee S-JV, Lee I-K, Choi KY, Ryu SH, Nohara K, Yoo S-H, Chen Z, Kim K-T. (2017). Myricetin improves endurance capacity and mitochondrial density by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Scientific Reports*, 7(1),6237.
- Karabulut H, Gülay MŞ. (2016). Antioksidanlar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1(1),65–76.

- Karakaş S, Kaya C, Güraslan H, Sakız D, Süzen Çaypınar S, Cengiz H, Ekin M, Yaşar L. (2020). Effect of metformin and detorsion treatment on serum anti-Müllerian hormone levels and ovarian histopathology in a rat ovarian torsion model. *Turk J Med Sci*, 50: 455-463.
- Kiersenbaum AL, Tres LL. *Histology and Cell Biology*. 14th ed.
- Kılıç A, Uyanıkoğlu H, İncebıyık A. (2016). Rat Overinde İskemi-Reperfüzyon Üzerine N-Asetil Sistein ve Resveratrol'ün Koruyucu Etkisi. *Dicle Medical Journal*, 43(2):229-236.
- Kloner RA, Jennings RB. (2001). Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation*, 104(24),2981–2989.
- Kukan M. (2003). Emerging roles of proteasomes in ischemia-reperfusion injury of organs. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 55(1 Pt 1),3–15.
- Leach AP. (1998). Apoptosis molecular mechanism for physiologic cell death in health and disease. *Clin Lab Sci*. 11: 346-349.
- Ma Z, Wang G, Cui L, Wang Q. (2015). Myricetin Attenuates Depressant-Like Behavior in Mice Subjected to Repeated Restraint Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12),28377–28385.
- Mangino MJ, Anderson CB, Murphy MK, Brunt E, Turk J. (1989). Mucosal arachidonate metabolism and intestinal ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 257(2),G299–G307.
- Marca AL, Stabile G, Artenisio AC, Volpe A. (2006). Serum anti-Müllerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Human Reproduction*, 21(12),3103–3107.
- McKinley MP, O'Loughlin VD. *Anatomie et physiologie, une approche intégrée* 2e édition, 28-11.
- Morayma H, Netro G, Guerrero H. (2014). Université de Montréal Differential Regulation Of Early Response Genes By Fibroblast Growth Factor (Fgf) 8 And Fgf18 In Bovine Granulosa Cells In Vitro par.
- Motta P, Makabe S, Nottola S. (1997). The ultrastructure of human reproduction. 1. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary. *Human Reproduction Update*, 3(3),281–297.
- Nilsson E, Rogers N, Skinner MK. (2007). Actions of anti-Müllerian hormone on the ovarian transcriptome to inhibit primordial to primary follicle transition. *Reproduction (Cambridge, England)*, 134(2),209–221.

- Oelsner G, Bider D, Goldenberg M, Admon D, Mashlach, S. (1993). Long-term follow-up of the twisted ischemic adnexa managed by detorsion. *Fertility and Sterility*, 60(6),976–979.
- Onat T, Emerk K, Sözmen EY. İnsan Biyokimyası. Ankara: Palme Yayıncılık, 2. Baskı: 702-705, 749-754.
- Öztürk D, Tanyeli A, Güzel Erdoğan D, Güler MC, Eraslan E, Baylan H. (2021). The Effects of Myricetin Against Testicular and Lung Injury Induced by Testicular Ischemia Reperfusion Model. *Sakarya Med J*, 11(1):109-114.
- Park H, Seo C-S, Baek EB, Rho J, Won Y-S, Kwun H. (2021). Gastroprotective Effect of Myricetin on Ethanol-Induced Acute Gastric Injury in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 9968112.
- Patrick C. Angelos, Winn SR et al. (2011) Evaluating Revascularization and Flap Survival Using Vascular Endothelial Growth Factor in an Irradiated Rat Model *Arch Facial Plast Surg*. E1-E2.
- Piper HM, Meuter K, Schäfer C. (2003). Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *The Annals of Thoracic Surgery*, 75(2),S644–S648.
- Qiu Y, Cong N, Liang M, Wang Y, Wang J. (2017). Systems Pharmacology Dissection of the Protective Effect of Myricetin Against Acute Ischemia/Reperfusion-Induced Myocardial Injury in Isolated Rat Heart. *Cardiovasc Toxicol*, 17:277–286.
- Ross JA, Kasum CM. (2002). Dietary flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annual Review of Nutrition*, 22(1),19–34.
- Ross MH, Pawlina W. (2016). *Histology: A text and atlas : with correlated cell and molecular biology*. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins.
- Ross MH, Romrell LJ, Kaye GI. (1995). *Histology A Text And Atlas*, 3rd edition, Williams and Wilkins.
- Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. (1999). Apoptosis definition, mechanism and relevance to disease. *Am J Med*. 107: 489-506.
- Sarioğlu Yardımcı EA. (2017). Sıçan Overinde İskemi Reperfüzyon Hasarında Diazoksidin Koruyucu Etkisinin İncelenmesi. B.V.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıpta Uzmanlık Tezi, İstanbul, (Danışman: Prof. Dr. R Dansuk).
- Sasaki M, Joh T. (2007). Oxidative Stress and Ischemia-Reperfusion Injury in Gastrointestinal Tract and Antioxidant, Protective Agents. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 40(1),1–12.

- Serafini M, Del Rio D, (2004). Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the Total Antioxidant Capacity the right tool? *Redox Rep*, 9,145-152.
- Silva LN, Hora GCAD, Soares TA, Bojer MS, Ingmer H, Macedo AJ, Trentin DS. (2017). Myricetin protects *Galleria mellonella* against *Staphylococcus aureus* infection and inhibits multiple virulence factors. *Scientific Reports*, 7(1),2823.
- Soyman Z, Kelekçi S, Sal V, Şevket O, Bayındır N, Uzun H. (2017). Effects of Apigenin on Experimental Ischemia/Reperfusion Injury in the Rat Ovary. *Balkan Med J*, 34:444-9.
- Standring S. (2005). *Gray's Anatomy. The Anatomical Basis of Clinical Practice*, 39th edition, Elsevier Churchill Livingstone, 39: 134-137.
- Stokes KY, Granger DN. (2005). Hypercholesterolemia: its impact on ischemia-reperfusion injury. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 3(6),1061–1070.
- Sun Y, Lian M, Lin Y, Xu B, Li Y, Wen J, Chen D, Xu M, Almoiliqy M, Wang L. (2018). Role of p-MKK7 in myricetin-induced protection against intestinal ischemia/reperfusion injury. *Pharmacological Research*, 129,432–442.
- Tal R, Seifer DB. (2017). Ovarian reserve testing: a user's guide. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 217(2),129–140.
- Tinggi U. (2008). Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 13(2),102–108.
- Tiriveedhi V, Upadhya GA, Busch RA, et al. (2014). Protective role of bortezomib in steatotic liver ischemia/reperfusion injury through abrogation of MMP activation and YKL-40 expression. *Transpl Immunol*. 30:93.
- Tokgoz VY, Sipahi M, Keskin O, Guvendi GF, Takir S. (2018). Protective effects of vitamin D on ischemia-reperfusion injury of the ovary in a rat model. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 21(6),593–599.
- Toktay E, Tastan TB, Gurbuz MA, Erbas E, Demir O, Ugan RA, Selli J. (2022). Potential protective effect of astaxanthin on ovary ischemia-reperfusion injury. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 25(2),173–178.
- Topdağı YE, Tanyeli A, Akdemir FNE, Eraslan E, Güler MC. (2020). Myricetin Decreases Ovarian and Lung Tissue Injury Induced by Ovarian Torsion-Detorsion: A Biochemical Study. *Southern Clinics Of Istanbul Eurasia*, 32(1),25–29.
- Topdağı YE, Tanyeli A, Ekinci Akdemir FN, Eraslan E, Güler MC. (2021). Myricetin decreases ovarian and lung tissue injury induced by ovarion torsion-detorsiyon: a biochemical study. *South Clin Ist Euras*, 32(1):25-29.

- Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, et al. (1996). Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*, 93:1493-1495.
- Visser JA, Themmen APN. (2005). Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 234(1–2),81–86.
- Wang B, Zhong Y, Gao C, Li J. (2017). Myricetin ameliorates scopolamine-induced memory impairment in mice via inhibiting acetylcholinesterase and down-regulating brain iron. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 490(2),336–342.
- Wang S-J, Tong Y, Lu S, Yang R, Liao X, Xu Y-F, Li X. (2010). Anti-inflammatory Activity of Myricetin Isolated from *Myrica rubra* Sieb. et Zucc. Leaves. *Planta Medica*, 76(14),1492–1496.
- Xu H, Qi Q, Yan X. (2021). Myricetin ameliorates sepsis-associated acute lung injury in a murine sepsis model. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 394(1),165–175.
- Yazıhan N. (2007). Renal İskemi Reperfüzyon Hasarında Eritropoietinin Koruyucu Etkisine K-Atp Kanallarının Katılımı. A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara, (Danışman: Prof. Dr. G Özelçi Kavas).
- Yerlikaya A, Dokudur H. (2009). Protein yıkımının önemi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 35: 93-99.
- Zec I, Tislaric-Medenjak D, Megla ZB, Kucak I. (2011). Anti-Müllerian hormone: A unique biochemical marker of gonadal development and fertility in humans. *Biochemia Medica*, 21(3),219–230.
- Zhang N, Feng H, Liao H, Chen S, Yang Z, Deng W, Tang Q. (2018). Myricetin attenuated LPS induced cardiac injury in vivo and in vitro. *Phytotherapy Research*, 32(3),459–470.
- Zhang Y, Jia X, Yang J, et al. (2016). Effects of Shaoyao-Gancao Decoction on Infarcted Cerebral Cortical Neurons: Suppression of the Inflammatory Response following Cerebral Ischemia-Reperfusion in a Rat Model. *BioMed Res Int*. 1859254:14.

EKLER

EK-1: Etik Kurul Kararı



ÖZGEÇMİŞ

1. Kişisel Bilgiler

Adı – Soyadı: Sevda AYDIN

Doğum Yeri: xxxx/xxxxxx

Doğum Tarihi: xx.xx.19xx

E-posta Adresi: xxxxxxxxxx@sakarya.edu.tr

Posta Adresi: Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD

Korucuk, Adapazarı

Yabancı Dili: İngilizce

2. Eğitim Bilgileri

İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Lisans Programı, 2021

İstanbul Üniversitesi, Açık Öğretim Fakültesi, Sosyoloji, Lisans Programı, 2018-Halen

3. Mesleki Deneyim

Sakarya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi, 2022-Halen