



**DIŞI SIÇANLARIN OVER DOKUSUNDA DENEYSEL
OLARAK OLUŞTURULMUŞ İSKEMİ VE
REPERFÜZYON MODELİNDE ZAMANA BAĞLI
MOLEKÜLER MEKANİZMALARIN SEYRİNİN VE
STRÜKTÜREL DEĞİŞİKLİKLERİN ARAŞTIRILMASI**

Elif POLAT

**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı**

Yrd. Doç. Dr. Jale SELLİ

Doktora Tezi -2017

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİŞİ SIÇANLARIN OVER DOKUSUNDA DENEYSEL
OLARAK OLUŞTURULMUŞ İSKEMİ VE REPERFÜZYON
MODELİNDE ZAMANA BAĞLI MOLEKÜLER
MEKANİZMALARIN SEYRİNİN VE STRÜKTÜREL
DEĞİŞİKLİKLERİN ARAŞTIRILMASI**

Elif POLAT

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Jale SELLİ

ERZURUM

2017

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DİŞİ SIÇANLARIN OVER DOKUSUNDA DENEYSEL
OLARAK OLUŞTURULMUŞ İSKEMİ VE REPERFÜZYON
MODELİNDE ZAMANA BAĞLI MOLEKÜLER
MEKANİZMALARIN SEYRİNİN VE STRÜKTÜREL
DEĞİŞİKLİKLERİN ARAŞTIRILMASI**

Elif POLAT

Tez Savunma Tarihi : 17.01.2017

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Jale SELLİ (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Tuba DEMİRCİ (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Samet KAPAKİN (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. İbrahim ŞAHİN (Erzincan Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Elanur AYDIN (Erzurum Teknik Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Mehtap TAN
Enstitü Müdürü

Doktora Tezi
ERZURUM – 2017

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Overler	4
2.1.1. Over Anatomisi.....	4
2.1.1.1. Overlerin Damar ve Sinirleri	4
2.1.2. Over Embriyolojisi	5
2.1.3. Over Histolojisi.....	7
2.1.4. Over Fizyolojisi	10
2.2. İskemi.....	12
2.3. Reperfüzyon.....	15
2.4. Serbest Radikaller	16
2.4.1. Reaktif Oksijen Türleri	17
2.4.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot -}$).....	17
2.4.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2).....	18
2.4.1.3. Hidroksil Radikali ($OH^{\cdot}$)	18
2.4.1.4. Nitrik Oksit	18
2.4.1.5. Singlet Oksijen ($^1O_2$):	19
2.4.2. Serbest Radikallerin Etkileri.....	19

2.5. Lökosit - Endotel Etkileşimi	19
2.6. Kompleman Sistemi.....	21
2.7. İskemi Reperfüzyon Hasarında Sitokinlerin Rolü	22
2.7.1. Sitokinlerin Genel Özellikleri.....	22
2.7.2. Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α)	23
2.7.3. İnterlökin-1 β (IL-1 β)	25
2.7.4. İnterlökin-6 (IL-6).....	25
2.8. Nükleer Faktör Kappa B (NF- κ B)	26
2.9. Antioksidanlar.....	27
2.9.1. Endojen Antioksidanlar	28
2.9.1.1. Enzim.....	28
2.9.1.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	28
2.9.1.2. Glutatyon (GSH).....	28
2.10. Malondialdehit (MDA)	29
3. MATERYAL VE METOT.....	30
3.1. Etik Kurul İzni, Deneklerin Temini ve Deney Grupları	30
3.1.1. Etik Kurul Onayı.....	30
3.1.2. Deneklerin Temini ve Özellikleri	30
3.1.3. Çalışmanın Deney Grupları	30
3.2. Çalışmanın Deney Prosedürü ve Uygulanan Deneysel Modeller.....	31
3.2.1. Çalışmanın Deney Prosedürü ve Zamanlaması	31
3.2.1.1. İskemi, İskemi/Reperfüzyon Prosedürü Uygulaması	31
3.3. Çalışmanın Değerlendirilmesinde Kullanılan Uygulamalar.....	33
3.3.1. Işık Mikroskopik İşlemler.....	33
3.3.1.1. Doku Takip İşlemleri	33

3.3.1.2. Blokların kesilmesi	34
3.3.1.3. Hematoksilen ve Eosin (H&E) Boyanma İşlemi	34
3.3.1.4. Kesitlerden Görüntü Alınması	35
3.3.2. İmmunohistokimyasal Analiz	35
3.3.3. Dokuların Transmisyon Elektron Mikroskobu Preparasyonu	37
3.3.3.1. Elektron Mikroskobik Blokların Hazırlanması	37
3.3.3.2. Yarı İnce Kesitlerin Alınması ve Toluidin Mavi Boyaması	38
3.3.3.3. İnce Kesitlerin Alınması	39
3.3.3.4. Gridlerin Boyanması	39
3.3.4. Biyokimyasal Analiz	39
3.3.4.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivite Tayini	40
3.3.4.2. Malondialdehit (MDA) Miktar Ölçümü	41
3.3.4.3. Glutatyon (GSH) Enzim Aktivite Tayini	42
3.3.4.4. Ksantin Oksidaz (KO) Aktivite Ölçümü	43
3.3.5. Moleküler Analizler	43
3.3.5.1. Gerçek Zamanlı PCR (Real Time Polimeraz Chain Reaction)	43
3.3.5.2. RNA İzolasyonu	43
3.3.5.3. RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması	44
3.3.5.4. Reverse Transkriptaz Reaksiyonu ve cDNA Sentezi	44
3.3.5.5. Gerçek Zamanlı PCR Primerleri ve Çalışma Prensipleri	45
3.3.6. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler	47
4. BULGULAR	48
4.1. Işık Mikroskobik Bulgular	48
4.1.1. Histopatolojik Bulgular	48
4.1.2. Yarı İnce Kesitlerin Değerlendirilmesi	52

4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	65
4.3. Elektron Mikroskopik Bulgular	68
4.4. Biyokimyasal Verilerin Değerlendirilmesi.....	75
4.5. Gerçek Zamanlı PCR Bulguları.....	79
4.5.1. IL-1 β PCR Bulguları.....	79
4.5.2. IL-6 PCR Bulguları.....	80
4.5.3. iNOS PCR Bulguları.....	80
4.5.4. eNOS PCR Bulguları	81
4.5.5. TNF- α PCR Bulguları.....	82
4.5.6. NF- κ B PCR Bulguları.....	83
5. TARTIŞMA.....	85
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	96
KAYNAKLAR	98
EKLER	119
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	119
EK-2. ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ DENEY HAYVANLARI YEREL ETİK	
KURUL ONAY FORMU	120

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince sahip oldukları bilgi birikimi ve görüşleriyle beni yönlendiren, her zaman desteklerini hissettiğim çok kıymetli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Jale SELLİ 'ye şükran ve minnetlerimi sunarım.

Tez izleme komitesinde olup yapmış olduğu katkılarından dolayı Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Yrd. Doç. Dr. Tuba DEMRCİ'ye ve Anatomi Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Samet KAPAKİN'e teşekkür ederim. Tez çalışmam süresince cerrahi uygulamalarda, moleküler analizlerde ve doku biyokimyası analizlerinin yapılması ve yorumlanması aşamalarında yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Farmakoloji Anabilim Dalı hocalarımdan Sayın Prof. Dr. Zekai HALICI'ya şükran ve minnetlerimi sunarım. Ayrıca tüm laboratuvar analizlerinde bana destek olan Farmakoloji Anabilim Dalı asistanlarından Büşra DİYARBAKIR, İrfan ÇINAR ve Arş. Gör. Duygu KÖSE'ye, yine ayrıca yardım ve desteklerini esirgemeyen arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Muhammed YAYLA'ya teşekkür ederim. Elektron mikroskopik işlemleri gerçekleştirilirken yaptığı katkılardan dolayı Hilal ATILAY'a ve Uzm. Özgen VURALER'e teşekkür ederim. Bahsi geçen süreç boyunca aynı çalışma ortamını paylaştığım ve yardımlarını benden esirgemeyen Arş. Gör. Erdem TOKTAY, Arş. Gör. Tuğba BAL, Zeliha YETİM, Seçil Nazife PARLAK, Yunus AKTÜRK ve ilgi ve dostluklarını her zaman hissettiğim tüm değerli asistan arkadaşlarıma, katkıları ve sabırlarından ötürü Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli yönetici ve personeline, tüm hayatım boyunca sevgilerini ve desteklerini esirgemeyen biricik anneme, babama ve kardeşlerime teşekkürü bir borç bilirim.

Elif POLAT

ÖZET

Dişi Sıçanların Over Dokusunda Deneysel Olarak Oluşturulmuş İskemi ve Reperfüzyon Modelinde Zamana Bağlı Moleküler Mekanizmaların Seyrinin ve Strüktürel Değişikliklerin Araştırılması

Amaç: Bu çalışmanın amacı over torsiyonu oluşturulduktan sonra detorsiyone edilmiş sıçan overlerinde gelişen iskemi/reperfüzyon hasarının şiddetini, zamanla olan değişimini ve inflamatuvar sitokinlerle bağlantısını, histopatolojik, elektron mikroskopik, biyokimyasal ve moleküler düzeyde incelemektir.

Materyal ve Metot: Çalışmada 12 haftalık 78 adet Wistar albino cinsi dişi sıçan kullanıldı. Tüm hayvanlar her grupta 6 adet hayvan bulunan 13 gruba ayrıldı. Deney grupları sham, iskemi (I) ve iskemi/reperfüzyon (I/R) grupları olarak ayrıldı. İskemi grupları 30 dk (I/30), 60 dk (I/60), 90 dk (I/90), 120 dk (I/120), 150 dk (I/150) ve 180 dk (I/180) iskemi sürelerinden oluşturuldu. İskemi/reperfüzyon gruplarında ise 180 dk iskemi yapılan tüm hayvanlara sırasıyla 30 dk (IR/30), 60 dk (IR/60), 90 dk (IR/90), 120 dk (IR/120), 150 dk (IR/150) ve 180 dk (IR/180) reperfüzyon uygulandı. Deney sonunda elde edilen ovaryum doku örnekleri ışık mikroskopik, elektron mikroskopik, biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle incelendi.

Bulgular: Ovaryum doku örneklerinin ışık mikroskopik incelenmesinde I/90, I/180, IR/60 ve IR/90 gruplarında yoğun hemoraji ve vasküler konjesyon izlendi. İmmünohistokimyasal değerlendirmede I/180, IR/60 ve IR/90 gruplarında şiddetli immünreaktivite gözlemlendi. IL-1 β , IL-6, TNF- α , NF- κ B ve iNOS ekspresyonlarının kontrol grubuna göre I/180, IR/30, IR/60 gruplarında anlamlı derecede arttığı gözlenirken, eNOS ekspresyonlarının I/120, I/150, I/180 gruplarında anlamlı derecede azaldığı görüldü. Ultrastrüktürel incelemelerde ise I/120 ve IR/150 gruplarında bazal membranda kalınlaşmalar, I/150 ve IR/90 gruplarında da endotel hücrelerinde değişimler tespit edildi.

Sonuç: Çalışmanın sonuçları ovaryum dokusunun iskemi ve reperfüzyon süreçlerinden anlamlı derecede etkilendiğini göstermektedir. Özellikle I/90, I/120, I/150, I/180 gruplarında doku hasarı iskemi süresine bağlı şiddetle artarken, IR/180, IR/150 ve IR/120 gruplarında ise oluşan hasarın diğer gruplarla kıyaslandığında ileri derecede azaldığı görüldü.

Anahtar Kelimeler: İskemi ve reperfüzyon, moleküler mekanizma, ovaryum, sıçan.

ABSTRACT

Investigation of the Time-Dependent Molecular Mechanisms Progression and Structural Changes in Experimentally Created Ischemia and Reperfusion Model in the Ovarian Tissues of Female Rats

Aim: The aim of this study is to investigate severity of ischemia and reperfusion injury, it's connection with inflammatory cytokines and time dependent changes of reperfusion in the detorsioned rat ovary created after ovarian torsion by using histopathological, biochemical, electron-microscopic methods at the molecular level.

Material and Method: 12-week-old 78 Wistar-Albino female rats were used in this study. A total of rats were divided into 13 groups which consist of 6 rats. Experimental groups consists of sham, ischemia(I) and ischemia/reperfusion(I/R) groups. Ischemia groups consists of 30-min (I/30), 60-min (I/60), 90-min (I/90), 120-min (I/120), 150-min (I/150), 180-min (I/180) groups due to ischemia periods. In ischemia/reperfusion groups all animals underwent reperfusion respectively for 30-min (IR/30), 60-min (IR/60), 90-min (IR/90), 120-min (IR/120), 150-min (IR/150), 180-min. (IR/180), after 180-minute ischemia. Obtained ovarian tissues were evaluated by light-microscopy, electron-microscopy, biochemical and molecular methods at the end of the experiment.

Results: Light-microscopic evaluation of I/90, I/180, IR/60 and IR/90 groups revealed an intensive vascular congestion and hemorrhage in ovarian tissues. Immunohistochemical assessment indicated severe immunoreactivity in I/180, IR/60 and IR/90 groups. IL-1b,IL-6,TNF- α ,NF- κ B and iNOS expression significantly increased compared to the control group in I/180,IR/30,IR/60 groups, while eNOS expression significantly decreased in I/120,I/150,I/180 groups. Various basement membrane changes detected in I/120 and IR/150 groups, also changes of endothelial-cells detected in I/150 ve IR/90 groups by ultrastructural-examination.

Conclusion: The results of our study revealed that the ovarian tissue significantly affected from the ischemia and reperfusion. Tissue damage strongly increased especially in I/90, I/120, I/150, I/180 groups according to the duration of ischemia, while in IR/180, IR/150 ve IR/120 groups it was severely decreased when compared to other groups.

Key Words: Ischemia and reperfusion, molecular mechanism, ovary, rat.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMP	: Adenozin monofosfat
ATADEM	: Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi
CAT	: Katalaz
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
GF	: Graaf folikülü
ATP	: Adenozin trifosfat
GH	: Granüloza hücreleri
GSH	: Glutasyon peroksidaz
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
H⁺	: Proton
HO₂⁻	: Perhidroksil
ICAM	: İnterselüler Adezyon Molekülü
I/R	: İskemi-Reperfüzyon
IL-1 β	: İnterlökin-1Beta
IL-6	: İnterlökin-6
IL-8	: İnterlökin-8
KO	: Ksantin oksidaz
KL	: Korpus luteum
KDH	: Ksantin Dehidrojenaz
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
MPx	: Miyeloperoksidaz
Mn⁺⁵	: Mangan

Mo⁺⁵	: Molibden
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NO	: Nitrik oksit
NO₂⁺	: Nitronyum
NO₂	: Nitrojen Dioksit
NF- κB	: Nükleer Faktör-kappa B
O₂⁻	: Süperoksit radikali
ONOO⁻	: Peroksinitrit
PAS	: Periyodik asit schiff
PCR	: Polymerase Chain Reaction / Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PECAM	: Trombosit-Endotel Hücre Adhezyon Molekülü
PF	: Primer Folikül
PMF	: Primordial Folikül
PO	: Primer Oosit
PGH	: Primordiyal Germ Hücreleri
PSGL-1	: P- selektin glikoprotein ligand-1
PMNL	: Polimorf Nüveli Lökositler
RNA	: Ribonükleik Asit
SF	: Sekonder folikül
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör - alfa
VCAM-1	: Vasküler hücre adezyon molekülü-1
ZP	: Zona Pellusida

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Kalsiyum kaynakları ve hücresel hasar	13
Şekil 2.2. İskemide pürin metabolizması ve KD'in KO'a dönüşümü	14
Şekil 2.3. İskemi Reperfüzyonda Ksantin Oksidaz Enziminin Rolü.....	15
Şekil 3.1. Sıçan overlerinde vasküler klemp uygulanmasının şematik çizimi	33
Şekil 3.2. Termal döngü koşulları	45
Şekil 3.3. Gerçek Zamanlı PCR Reaksiyon ısı ve süreleri	45
Şekil 4.1. Sham/kontrol grubu ışık mikroskopik kesitler	49
Şekil 4.2. İskemi gruplarına ait ışık mikroskopik kesitler.....	50
Şekil 4.3. İskemi/reperfüzyon gruplarına ait ışık mikroskopik kesitler	51
Şekil 4.4. Sham/kontrol grubuna ait yarı ince kesitlerde vasküler yapılar	52
Şekil 4.5. İskemi 30 grubuna ait yarı ince kesitlerde vasküler değişimler	53
Şekil 4.6. İskemi 60 grubuna ait yarı ince kesitlerde vasküler değişimler	54
Şekil 4.7. İskemi 90 grubuna ait yarı ince kesitlerde vasküler değişimler	55
Şekil 4.8. İskemi 120 grubuna ait yarı ince kesitlerde vasküler değişimler	56
Şekil 4.9. İskemi 150 grubuna ait yarı ince kesitlerde vasküler değişimler	57
Şekil 4.10. İskemi 180 grubuna ait yarı ince kesitlerde vasküler değişimler	58
Şekil 4.11. İskemi/reperfüzyon 30 grubuna ait yarı ince kesitlerde vasküler değişimler.....	59
Şekil 4.12. İskemi/reperfüzyon 60 grubuna ait yarı ince kesitlerde vasküler değişimler.....	60
Şekil 4.13. İskemi/reperfüzyon 90 grubuna ait yarı ince kesitlerde vasküler değişimler.....	61

Şekil 4.14. İskemi/reperfüzyon 120 grubuna ait yarı ince kesitlerde vasküler değişimler.....	62
Şekil 4.15. İskemi/reperfüzyon 150 grubuna ait yarı ince kesitlerde vasküler değişimler.....	63
Şekil 4.16. İskemi/reperfüzyon 180 grubuna ait yarı ince kesitlerde vasküler değişimler.....	64
Şekil 4.17. NF- κ B immunreaktivite skrolama grafiği.	66
Şekil 4.18. NF- κ B immünohistokimyasal boya kesitleri.....	67
Şekil 4.19. Sham/kontrol grubuna ait elektron mikroskobik kesitler	68
Şekil 4.20. İskemi 30 (A, B) ve İskemi 60 (C, D) gruplarına ait elektron mikroskobik kesitler.....	69
Şekil 4.21. İskemi 90 (A, B) ve İskemi 120 (C, D) gruplarına ait elektron mikroskobik kesitler.....	70
Şekil 4.22. İskemi 150 (A, B) ve İskemi 180 (C, D) gruplarına ait elektron mikroskobik kesitler.....	71
Şekil 4.23. İskemi/reperfüzyon 30 (A, B) ve İskemi/reperfüzyon 60 (C, D) gruplarına ait elektron mikroskobik kesitler.	72
Şekil 4.24. İskemi/reperfüzyon 90 (A, B) ve İskemi/reperfüzyon 120 (C, D) gruplarına ait elektron mikroskobik kesitler	73
Şekil 4.25. İskemi/reperfüzyon 150 (A, B) ve İskemi/reperfüzyon 180 (C, D) gruplarına ait elektron mikroskobik kesitler	74
Şekil 4.26. İskemi/reperfüzyon sürecinde MDA miktarının grafikle gösterilmesi	75
Şekil 4.27. İskemi/reperfüzyon sürecinde SOD miktarının grafikle gösterilmesi.....	76
Şekil 4.28. İskemi/reperfüzyon sürecinde GSH miktarının grafikle gösterilmesi.....	77
Şekil 4.29. İskemi/reperfüzyon sürecinde KO miktarının grafikle gösterilmesi.	78

Şekil 4.30. Gerçek zamanlı PCR metodu ile IL-1 β ekspresyonu	79
Şekil 4.31. Gerçek zamanlı PCR metodu ile IL-6 ekspresyonu	80
Şekil 4.32. Gerçek zamanlı PCR metodu ile iNOS ekspresyonu.	81
Şekil 4.33. Gerçek zamanlı PCR metodu ile eNOS ekspresyonu.	82
Şekil 4.34. Gerçek zamanlı PCR metodu ile TNF- α ekspresyonu.	83
Şekil 4.35. Gerçek zamanlı PCR metodu ile NF- κ B ekspresyonu.	84



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. cDNA sentezi için kullanılan mix içeriği	44
Tablo 3.2. Rölâtif Gene Ekspresyonu Primer/Prob Dizilimleri	46
Tablo 4.1. Histopatolojik skörlama verileri	48
Tablo 4.2. İskemi gruplarında NF-κB immunreaktivite skörlama tablosu	65
Tablo 4.3. İskemi/reperfüzyon gruplarında NF-κB immunreaktivite skörlama tablosu	65

1. GİRİŞ

Overin kendi damarsal yapıları etrafında dönmesi sonucunda ortaya çıkan duruma over torsiyonu denilmektedir. Dönme derecesine bağlı olarak gelişen ve organı besleyen kan akışının ya tamamen veya kısmen kesilmesi ise iskemi olarak bilinmektedir.

Over torsiyonu, akut dönemde over rezervlerinin tükenmesine, yani; infertiliteye, kronik safhasında ise; ovaryan dokunun hasarına bağlı olarak, ciddi hormonal düzensizliklere yol açmaktadır. Özellikle ergenlik ve nadiren de çocukluk döneminde rastlanılan, tüm jinekolojik acil vakalar içinde %2,7 ile beşinci sırada yer alan over torsiyonu gerek teşhisindeki zorluk, gerek tedavisinin zorluğu sebebiyle, halen önemli bir problem olarak karşımızda bulunmaktadır. Yapılan pek çok deneysel çalışma da bu durumu desteklemektedir.¹⁻³

Over torsiyonu, kolaylıkla teşhis edilebilecek bir problem değildir. Bu problemin hem teşhisindeki hem de tedavisindeki gecikmelerden kaynaklanan veya bu durumun kendi doğasından kaynaklanan birçok zorluk mevcuttur.

Canlılığını yitirdiği düşünülen ve makroskopik görünüm olarak nekroz geliştiği tahmin edilen overlerde yaygın olarak tercih edilen klasik tedavi ooferektomi, yani overin çıkarılmasıdır.⁴ Olguların erken yaşta menapozla karşı karşıya kalması cerrahları, ooferektomi seçeneği dışında başka bir tedavi arayışına zorlamaktadır. Bu amaçla son yıllarda, torsiyone olan overlerin, cerrahi manipülasyon ile eski pozisyonuna getirilmesi, yani detorsiyone edilmesi ayrı bir tedavi seçeneği olarak önerilmektedir.⁵ Overin detorsiyone edilmesi ile kan akımı yeniden sağlanmış olur ve bu durum reperfüzyon olarak adlandırılır.

Yalnız ooferektomi yapılmamış detorsiyone edilmiş overlerde bir hasarın oluşması söz konusudur. Bu konu ile ilgili olarak iki temel sorun hala daha

Reperfüzyon sırasında dokuya gelen O₂ ve metabolitleri, iskemi sırasında oluşan hasarın paradoksal biçimde artışına neden olmaktadır. Literatürde bu paradoksal durum iskemi ve reperfüzyon hasarı (IR/H) olarak adlandırılmakta olup, esas itibariyle de birbirinin devamı veya biri diğerinin hem sebebi hem de neticesi olarak karşımıza çıkmaktadır.¹³

Reperfüzyon hasarından sorumlu olan, temel iki mekanizmadan biri; inflamatuvar yanıtın tetiklenmesi, diğeri de serbest oksijen radikallerinin artışı biçiminde sıralanmaktadır. IR/H sırasında aktive olan ilk hücre nötrofil olup, dokudaki hasardan sorumlu olan en önemli hücrelerin başında gelir. Reperfüzyon nötrofil aktivasyonu ve göçünü uyarır ve iskemik dokuda hasarın daha da ilerlemesine neden olur.¹⁴⁻¹⁹ Ayrıca makrofajlar, mast hücreleri ve aktive olmuş nötrofiller tarafından sentezlenen TNF- α ve IL-1 moleküllerinin^{20, 21} ve bu moleküllerin reseptörlerinin ekspresyonu da artmaktadır. Tabiki oluşan reperfüzyon hasarının ne kadar süreyle kadar devam ettiği ve hasar sonrası oluşan doku hasarının boyutunun zamanla değişimi hala daha bir soru işareti olarak karşımıza çıkmaktadır.

Çalışmamızın amacı over torsiyonu oluştuktan sonra detorsiyone edilmiş sıçan overlerinde gelişen iskemi ve reperfüzyon hasarının şiddeti, inflamatuvar sitokinlerle bağlantısı ve reperfüzyon hasarının zamanla olan değişimini biyokimyasal, histopatolojik ve moleküler düzeyde incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Overler

2.1.1. Over Anatomisi

Dişi üreme sisteminde iç genital organlardan biri olan overler, erkeklerde testislerin analogunu oluşturmaktadır. Ovaryumlar medial hatta uterus, lateralde ise infundibulopelvik ligament arasına yerleşmiş bir çift organdır.^{22, 23} Elipsoid şekilli olan overlerin erişkin dönemindeki uzunluğu 3-4 cm, genişliği 1,5-2,5 cm, kalınlığı da 0,6–1,5 cm olabilmektedir. İlerleyen yaşlarda menopoza oluşumuyla birlikte over boyutlarında küçülme görülür. Overlerin facies lateralis ve facies medialis olmak üzere iki yüzü, anterior (mezoovaryan) ve posterior (serbest) kısımlardan oluşan iki kenarı, tubal (extremitas superior) ve uterin (extremitas inferior) iki ucu vardır.²⁴ Ön kenarında *hilum ovarii* bulunur ve ovaryuma buradan damar ve sinirler giriş ve çıkış yaparlar. Lateral yüzeyini pariyetal periton örterken, medial yüzde örtü yoktur.²⁵

Ovaryumun sabit bir şekilde kalması ligamentler aracılığıyla olur. Ovaryan ligamentler uteroovaryan ve infundubulopelvik (suspansör) ligamentlerden oluşur.^{26(s.1303)} Uteroovaryan ligament overi iç kenar kısmından uterusu bağlarken, infundubulopelvik (asıcı bağ) ligament ise overi dış kenarından pelvik duvara sabitler.²⁷ Infundubulopelvik ligament ayrıca içinde bulundurduğu damar ve sinirler sayesinde, ovaryumun beslenmesini ve innervasyonunu sağlar.²⁸

2.1.1.1. Overlerin Damar ve Sinirleri

Overlerin esas arteri L2 (bel omuru) seviyesinde aorta abdominalisten ayrılan *arteri ovarica*'dır. Ligamentum suspensorium ovarii ve mezovaryum içinde bulunarak ovaryuma ulaşır. Bunun dışında uterin arterin *ramus ovaricus* dalı da ovaryum beslenmesine katılır. *A. ovarica* dalları ile anastomoz yapan *r. ovaricus*, *a. ovarica*'nın

tıkanması durumunda ovaryumu besler. Bu iki büyük arter, helisin arteri olarak da isimlendirilir.^{24, 26, 29}

Overlerden çıkan venler önce plexus pampiniformisi oluşturur. Plexus pampiniformis venleri de vena ovaricayı meydana getirir. *V. ovarica*, sağda *v.cava inferiora*, solda *v. Renalis*'e direne olur.²⁹

Overlerin lenfatikleri a. renalislere yakın olarak yerleşmiş nodi lumbalese açılırlar.²⁹

Ovaryumun innervasyonu plexus ovaricus'tan sağlanır. Parasempatikleri *nervus vagus*, sempatikleri T10- T12 medulla spinalis segmentlerinden *n. Splanchnicus minor*'den kaynaklanır. Ağrı durumu göbeğin hemen altında T10 - T11 alt abdominal ve pubik bölgelerinde hissedilir. Otonom innervasyonun overler üzerindeki etkileri bilinmemektedir.^{29, 30}

2.1.2. Over Embriyolojisi

Embriyonun genetik ve kromozomal cinsiyeti, her ne kadar ovumu döleyen sperm çeşidi ile (X veya Y) fertilizasyon sırasında belirleniyor olsada, erkek ve dişi morfolojik değişiklikler, embriyo gelişiminin 7. haftasına kadar farklılaşmazlar.^{31, 32} Genital sistem erken dönemde her iki cinste de birbirine benzer, bu sebeple genital sistem gelişiminin başlangıç dönemi seksüel dönemin farklılanmamış safhası olarak isimlendirilir. 7. haftada nötr durumdaki embriyo fenotipik olarak gelişmeye başlar. 12. haftaya gelindiğinde dış genitallerin dişilik veya erkeklik özellikleri fark edilmeye başlanır. Fenotipik olarak cinsel farklılaşma embriyonik gelişimin 20. haftasında tamamlanır.

Fenotipik cinsel farklılaşma SRY geni tarafından belirlenir. Yp11.3 kromozomu üzerindeki SRY geni cinsiyet belirleyici bölge Y proteini testis belirleyici faktör (TDF)'ü kodlar. TDF yüksek oranda korunmuş DNA bağlayıcı domain HMG-box (high

mobility group) içerir. Farklılaşmamış gonad testis haline gelirken Sertoli hücreleri ve Leydig hücreleri farklılaşarak, sırasıyla Müllerian inhibe edici faktör (MIF) ve testosteron üretirler. TDF, testosteron ve MIF varlığında farklılaşmamış embriyo erkek fenotipe, yokluğunda ise dişi fenotipe yönelecektir.³³

Intermediate mezoderm dorsal vücut duvarı boyunca uzunlamasına bir yükseklik meydana getirerek ürogenital kabartıyı oluşturur. Sölom epiteli ve onun altında yer alan ürogenital kabartı mezodermi çoğalarak gonadal kabartıyı şekillendirir. Gonadal kabartı primer cinsiyet kordonlarını oluşturur. Yolk kesesi duvarından gonada göç eden primordiyal germ hücreleri XX genotipi içerir. Primordiyal germ hücreleri (PGH) epiblasttan köken alarak yolk kesesinin endoderm ve mezoderm tabakalarına göç eder. Primer cinsiyet kordonları gelişen ovaryumun medullasına uzanır, burada ağızlaşarak rete ovarii'yi oluşturur. Rete ovarii sonrasında dejenere olur ve yerini ince bir tabaka olan tunika albuginea alır. Böylece ikincili cinsiyet kordonları gelişir ve PGH bu kordonların içine yerleşir. İkincili cinsiyet kordonları parçalara ayrılır ve primordial foliküller olarak bilinen hücresel kümeleri oluşturur. Bu hücre kümelerinde primer oositler ve onları çevreleyen tek katlı yassı hücre tabakası bulunur. Primer oositler PGH'lerden türer.³³

Farklılaşan PGH, mitoz bölünmelerle artış gösterir. Embriyonik gelişimin 20. haftasında germ hücre sayısı en yüksek sayıya, yaklaşık olarak 6-7 milyona ulaşır. Mitozu tamamlayan oogoniyumlar 3. ayın sonunda 1. mayoz bölünmeye girerler ve bu oositler primer oosit (PO) olarak adlandırılırlar. Ancak bu oositler cinsel olgunlaşmanın ve menstrüel siklusun başladığı ergenlik dönemine kadar mayoz bölünmenin profaz evresinin diploten safhasında kalırlar (46, 4N).^{34, 35}

Bir kız çocuğu doğduğunda overlerinde yaklaşık 2 milyon primer oosit rezervi bulundurur. Ancak bu sayı giderek azalır ve ergenlik döneminde 400 bin civarı kalır. Bunlardan ancak 400 tanesi sekonder oosit olarak ovulasyonla atılır.³⁶

2.1.3. Over Histolojisi

Overlerin yüzeyi tek katlı kübik ve bazı bölgelerde yassı epitel ile kaplıdır. Bu epitel germinal epitel olarak bilinmektedir. Bu hücreli tabaka mezovaryumu kaplayan mezotelyum ile devam eder. Germinal epitelin hemen altında, overin beyazımsı rengini veren ve tunika albuginea olarak adlandırılan ve overleri bir kapsül gibi hem saran hem de koruyan sıkı bir bağ dokusu tabakası bulunur.³⁷⁻⁴¹

Ovaryum genel itibariyle iki ayrı bölgeden meydana gelir. Medulla ya da medullar bölge ovaryum merkezinde bulunmaktadır. Medulla gevşek fibroelastik bağ dokusu, büyük ve kıvrımlı kan damarları, lenf damarları ve sinirleri içermektedir. Korteks ya da kortikal bölge ise tunica albugineanın hemen altında yer alır ve medullayı çevreleyecek şekilde ovaryumun periferine yerleşir. Korteks zengin bağ dokusu içerisine gömülü ovaryum foliküllerini içermektedir. Folikül çevresindeki stroma yer yer düz kas liflerini içerir. Korteks ovaryumun büyük yüzdesini kaplamaktadır. Bu iki kısım histolojik olarak birbirinden farklılıklar gösterse de kesin sınırlarla birbirinden ayrılmaz.^{41, 42}

Çeşitli boyutlardaki ovaryum folikülleri korteks stromasına dağılmış olarak bulunmaktadır. Oositin gelişim evreleri folikülün boyutu ile belirlenir. Korteksin en dış kısmında en küçük folikül olarak bilinen çok sayıda primordiyal foliküller yer alır. Korteksin daha iç kısımlarında ise daha büyük foliküllere rastlanmaktadır.

Gelişim evrelerine göre histolojik olarak üç farklı folikül tanımlanmaktadır. Bunlar primordiyal foliküller, büyümekte olan foliküller yani primer ve sekonder foliküller ve olgun foliküller ya da Graaf folikülleridir.

Ovaryumun erken foliküler gelişimi, birbirleriyle sekronize olan lokal büyüme faktörleri, ovaryuma spesifik faktörler, ovaryum steroid hormonları ve gonodotropinler aracılığıyla düzenlenir.^{43, 44}

Primordiyal foliküller, fetal gelişimin üçüncü ayı itibarıyla ortaya çıkarlar. Erken safhalarda oogonium hücreleri mitozla artar, bu artışla beraber bazı hücreler primer oositleri meydana getirirler. Primordiyal foliküller oositlerin pregranüloza hücreleriyle etkileşime geçmesi sonucu şekillenir.^{45, 46} Primordiyal foliküllerin erken gelişimi gonadotropinlerin uyarımlarından bağımsızdır. Olgun ovaryumda primordiyal foliküller korteks stromasında tunika albugineanın hemen altında yer almaktadırlar. Oositi tek bir tabaka halinde yassı folikül hücreleri çevreler. Folikül hücresinin dış yüzeyini bazal lamina çevreler. Her menstrual döngüde bu foliküllerden 10-12 tanesi uyarılır ancak sadece bir tanesinin gelişimi devam eder ve diğerleri atreziye olurlar.

Primordiyal folikülün uyarılmasıyla büyüyen yassı folikül hücrelerinin kübikleşmesiyle tek katlı (unilaminar) primer folikül (PF) oluşur. Sonrasında folikül hücrelerinin mitoz bölünme geçirerek çoğalmasıyla çok katlı (multilaminar) primer folikül meydana gelir. Bu çok katlı hücrelerin oluşturduğu tabaka granüloza tabakası adını alır.^{47, 48}

Folikülün etrafını saran stromada bir takım değişiklikler meydana gelerek farklılaşır ve teka tabakasını oluşturur. Teka tabakası gelişerek iki tabakaya ayrılır. Bunlardan içteki kübik hücrelerden oluşan ve salgı yapan teka internayı, dıştaki ise bağ dokusu ile folikülü saran ve aynı zamanda koruyan teka eksternayı meydana getirir. Teka internayı oluşturan kübik hücreler farklılaşır ve steroid hormon üreten hücrelere dönüşürler. Luteinleştirici hormon (LH) reseptörü bulunduran bu hücreler östrojen öncülü olan androjenleri salgırlar. Teka eksterna ise kollajen lifler, fibroblastlar ve küçük damarlardan oluşur. Oositi hemen dışından sıkıca saran zona pellusida (ZP) ;

asidofilik ve homojen yapıdadır. Glikoprotein içeren zona pellusida ayrıca periyodik asit solüsyonu (PAS) ile koyu pembe boyanan zar katmanını oluşturur.⁴⁹ Zona pellusida ZP1, ZP2 ve ZP3 denilen 3 farklı glikoproteinden oluşur. Bu tabaka ilk aşamalarda kesintili bir yapıdayken, folikül gelişimi sırasında birleşir ve primer oositin etrafını tamamen sarar ve folikülün etrafındaki hücreleri primer oositinle ayırır.

Multilaminar primer folikül bölünmeye devam eder ve granüloza hücrelerinin arasında içi sıvı dolu boşluklar oluşur. Bu boşluklar birbirleriyle birleşerek yarım ay şekilli folikül antrumunu (oda) meydana getirir. Bu aşamadaki foliküle sekonder folikül (SF) denir. Granüloza hücrelerinin artışı folikül stimulan hormona (FSH) bağlıdır. FSH'nin salınımı hipofizin ön lobundaki bazofil hücrelerden gerçekleşir. Çoğalan granüloza hücrelerinin arasında folikül sıvısı denilen bir sıvı birikir. Bu sıvı proteoglikan, glikozaminoglikan ve hormon bağlayıcı proteinlerden zengin plazma benzeri yapıdadır. Ayrıca folikül sıvısı hormonlardan progesteron, östradiol, inhibin, follistatin ve FSH ile LH'nin salınımını düzenleyen aktivin içerir.^{41, 47}

Folikülde sıvı birikimiyle folikül boşluğunda artış olur ve oluşan bu foliküle Graaf folikülü (GF) denmektedir. Folikül içerisindeki primer oosit granüloza hücrelerinden oluşturulan bir sap ile folikül duvarına bağlanır. Oositi foliküle bağlayan bu yapıya kumulus ooforus adı verilir.⁴² Granülüza hücreleri (GH) sıvı toplanmasına orantılı olarak çoğalamadığı için granüloza katmanı daha ince bir hal alır. Primer oositin etrafındaki granülüza hücreleri zona pellusida ile sıkı bir bağlantı kurarak korona radiatayı oluştururlar. Korona radiata katmanı ovulasyonda ovaryumu terk eden oositle bir aradadır.⁴⁷

Ovaryum içinde atretik foliküller de bulunmaktadır. Atretik folikül; birçok foliküller hücre ve oositin dejenere olması ve devamında fagositik hücrelerce imha edilmesi ile oluşur. Atrezi süreci apoptozu, granüloza hücrelerinin ayrılmasını, oositin

otolizini ve zona pellusidanın parçalanmasını içerir. Bu foliküller lütealizasyonu tamamlanmış korpus luteumlardan oluşabileceği gibi gelişimine hiç başlamamış primordiyal foliküllerden de oluşabilirler.^{42, 47}

Ovulasyonun gerçekleşmesi sonucu folikülün teka interna hücreleri ve granüloza hücreleri ovaryum korteksinde büyük geçici bir endokrin bez olan korpus luteumu oluşturmak için bir araya gelirler. Bu bez steroid hormon salgılayan bir yapıdır. Granüloza ve teka interna hücreleri LH'nin etkisiyle yapısal ve işlevsel olarak değişir. Östrojene ek olarak daha fazla progesteron üretmek üzere özelleşirler.^{41, 42, 50}

2.1.4. Over Fizyolojisi

Dişi gonadları olan overler, iki temel steroid hormon olan östrojenleri ve progestinleri salgırlar. Bu hormonların salınması (steroidogenez) ve ayrıca oositin periyodik olarak oluşumu ve atılması (oogenez) olmak üzere yumurtalığın iki temel fonksiyonu bulunur.⁵¹ Over fonksiyonları endokrin aksın geri bildirim özeliği ile kontrol edilir. Over kontrolünde rol oynayan temel hipotalamik bölgeler preoptik ve supraoptik çekirdeklerdir. Bu bölgedeki nöronlar gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH) salgırlar. GnRH somada prohormon olarak sentezlenen bir peptit hormondur. Aktif formu hipofizer portal sisteme salınır.^{43, 50} Hipotalamusta sentezlenen GnRH'ye cevap olarak ön hipofiz tarafından gonadotrop hücrelerince folikül stimulan hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH) salınır. Hipofizden salgılanan bu hormonlara yanıt olarak ise yumurtalık tarafından östrojen ve progesteron salgılanır. Bu hormonlar, dişilerde üreme hücrelerinin gelişerek olgunlaşmasını, ovulasyonu, hamileliğin başlamasını ve sürdürülmesini sağlarken bununla birlikte meme bezlerinin gelişim ve büyümelerini de kontrol ederler.^{43, 52, 53}

Overlerin endokrin kısmı temel olarak foliküllerle ilgilidir ve teka ve granüloza hücrelerini kapsar. Bu hücreler birlikte çalışarak östrojen sentezler ve salgırlar.

Teka hücreleri: Folikülün yüzeyinde bulunan hücre tabakasıdır. Bu hücreler hücre zarı düşük dansiteli lipoprotein (LDL) reseptörleri ile etkileşim yaparak hücre içine LDL taşınmasını sağlarlar. Reseptörler ligand üzerine bağlandığında, LDL hücre içine alınır ve kolesterol serbest kalır. Kolesterol, steroid hormon sentezinin ilk maddesidir (substrat). Adenil siklaz (AC) ile indüklenen siklik adenozin monofosfat (cAMP) ikinci haberci sistemi ile çalışır. cAMP, kolesterolün pregnenolona dönüşümünü sağlayan yan zincir ayırıcı enzim kompleksini aktive eder. Teka hücrelerinde androstenedion ve testosteron şeklinde steroid hormon sentezi sürer. Bu androjenlerin birçoğu teka hücrelerinden çıkarak hemen yanındaki granüloza hücrelerine girerler. Çünkü teka hücreleri androstenedion veya testosteronun östrojenlere dönüşümünü kolaylaştıracak uygun miktarda aromataz enzimi içermez.⁵⁰

Granüloza hücreleri: Foliküllerde bulunan granüloza hücreleri, teka hücreleriyle karşılaştırıldığında daha dip bölgelere yerleşmişlerdir. Sekonder folikül gelişimi sırasında granüloza hücre tabakası primer foliküle kıyasla belirgin bir şekilde artar. Granüloza hücreleri, membranları üzerinde LH ve FSH reseptörleri bulundurulur. Bu sebeple teka hücrelerinde olduğu gibi hem kolesterolün pregnenolona dönüşümünü kolaylaştırır, hem de aromataz enzimini aktive ederler. Aromataz enziminin aktive edilmesi, FSH reseptörlerinin adenil siklaz–cAMP yolağıyla gerçekleşir. Östradiyol gibi ürünler sentezlenerek kan dolaşımına verilir. 17 α -hidroksilaz veya 17- 20 desmolaz eksikliği durumlarında granüloza hücreleri steroid sentezini tamamlamak için teka hücrelerinden testosteron ve androstenedion sentezine başlarlar.

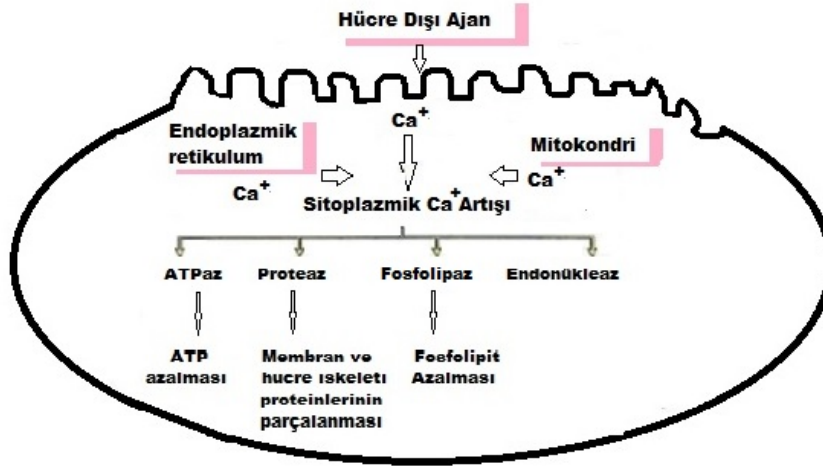
Dişilerde sentezlenen östrojenlerden biri olan östradiol, foliküllerdeki granüloza hücreleri tarafından üretilir. Doğurganlık dönemindeki bir kadında en fazla bulunan ve en etkili cinsiyet hormondur.

FSH, folikül gelişimini ve foliküler hücrelerden de östrojen salgılanmasını uyarır. LH, oositte birinci mayoz bölünmenin gerçekleşmesini uyarak yumurtlamayı tetikler. Ayrıca ovulasyon bitiminde yumurtanın atılması ile birlikte geriye kalan folikülü korpus luteuma dönüştürür ve buradan progesteron salınmasını sağlar.^{54,55}

2.2. İskemi

İskemi, doku veya organa giden arteriyal ve venöz kan akımındaki yetersizlik ve oluşan atık ürünlerin yine dolaşım tarafından uzaklaştırılamamasına bağlı olarak meydana gelen geri dönüşümlü veya dönüşümsüz oluşabilen hücre ve doku hasarıdır.⁵⁶

İskemi sonucu dokuya yeterli O₂ sağlanamaması hücrede fonksiyon bozukluğuna sebep olur. Sonuç olarak hücre ölümünü ve bununla birlikte bir dizi kimyasal olayı başlatmaktadır.^{57,58} Dokuya ulaşan kan akımındaki kesinti hücresel oksidatif fosforilasyona neden olur. Bununla birlikte fosfokreatin ve ATP gibi yüksek enerjili fosfat sentezi azalarak düşer.⁵⁹ Hücrede temel enerji kaynağı, anaerobik glikoliz olur; ancak oluşan anaerobik glikoliz, oksidatif fosforilasyonla kıyaslandığında minimum bir ATP üretimi sağlar. ATP'nin bu kaybı hücre içinde olumsuz etkiler gösterir. Hücresel ATP'deki azalma, adenosin monofosfatın (AMP) artışıyla birlikte dir. Hücredeki enerji düşüşü ile hücre zarında bulunan Na⁺/K⁺-ATPaz pompasının aktivitesinde azalma görülür. Na⁺ ve Ca⁺² hücre içinde birikirken, K⁺ azalır. Katı maddenin artışı, suyun izosmotik artışıyla birlikte hücrede şişmeye neden olur.⁶⁰ Hücre içerisinde Ca⁺² iyon artışı hem hücre dışı, hem de hücre içi girişlerle gerçekleşmektedir. Ca⁺² salınımı mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi organellerde gerçekleşmektedir. Ca⁺² iyon artışıyla fosfolipaz, endonükleaz, proteaz ve ATPaz gibi hücre içi litik enzimlerin aktivasyonu iskemik doku hasarını artırır.⁶¹ Örneğin, fosfolipazlar membran fosfolipitlerini bozarak membran hasarına neden olur (Şekil 2.1).

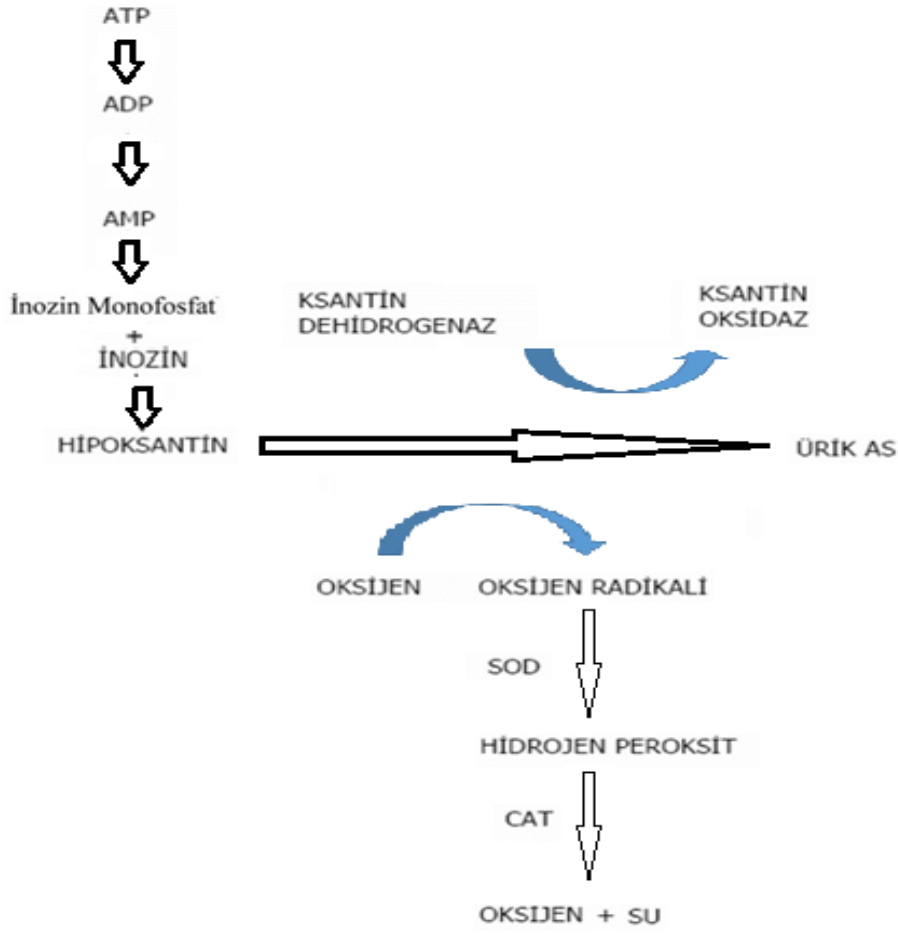


Şekil 2.1. Kalsiyum kaynakları ve hücresel hasar

ATP miktarının azalması, anaerobik glikolizin artışı ve glikojen depolarının tükenmesiyle sonuçlanır. Glikolizin artışı ile fosfat türevleri hidrolize olur. Bu da inorganik fosfat ve laktik asit birikimiyle sonuçlanır ve bununla birlikte hücre içi pH düşer ve asidoz oluşur. ATP ve pH azalması, protein sentezinde azalmaya neden olur.⁶²

İskemide oluşan hasarın şiddeti; iskeminin süresine, yoğunluğuna, hücre ve organ tipinin metabolik ihtiyaçlarına göre değişiklik gösterebilir. Dokuda yeterince oksijen bulunmaması hipoksi olarak tanımlanır. Hipoksiye en sık iskemi durumunda rastlanır.^{12,63}

İskemi ile birlikte oluşan hipooksijenizasyon neticesinde hücrede ATP sentezi durur.⁶⁴ Ancak mevcut ATP kullanılmaya devam eder ve adenozine parçalanır. Adenozin hücre dışına difüze olur, inozin ve hipoksantin meydana gelir. Oksijen yetersizliğinde ksantin dehidrogenaz enzimi (KD) aktifleşemez, dolayısı ile hipoksantin, ksantin oksidaz (KO) ile metabolize olur ve ksantin oluşur (Şekil 2.2). Oluşan KO enzimi, oksijeni NAD yerine elektron alır duruma getirir. Bu reaksiyonlar sonucunda serbest oksijen radikalleri açığa çıkar.⁶⁵⁻⁶⁷



Şekil 2.2. İskemide pürin metabolizması ve KD'in KO'a dönüşümü

İskemi sürecinde hücrede bazı proteinler hızla eksprese olmaya ve salınmaya başlarlar. Nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) iskemi sırasında aktivasyonu artan proteinlere örnek verilebilir.^{63,68}

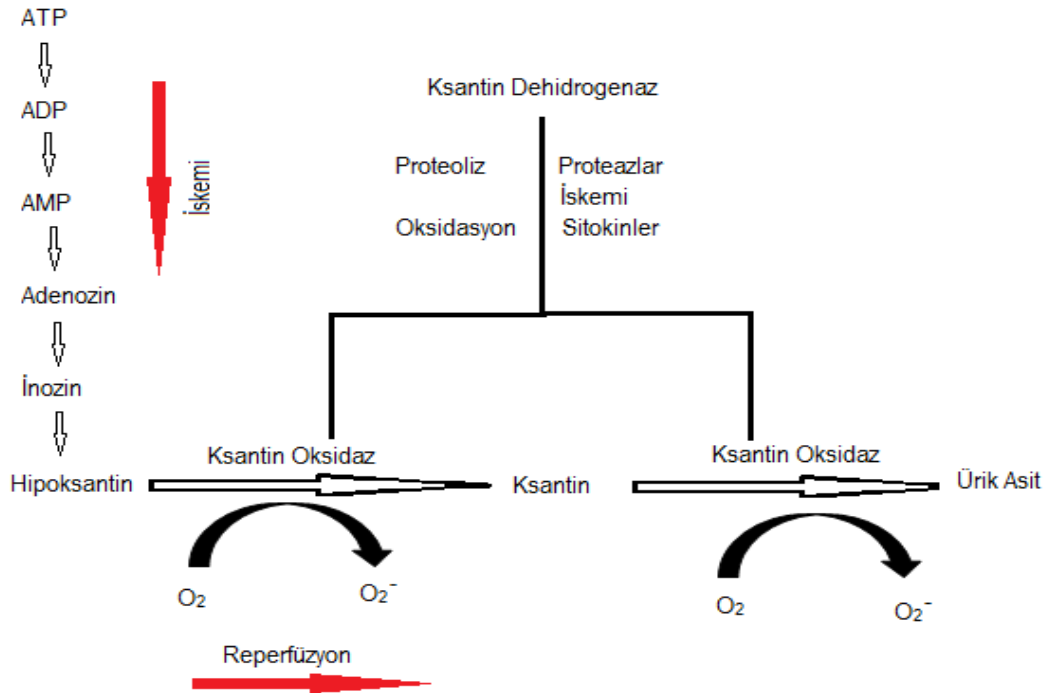
İskemik dokuda, inflamasyon öncüsü IL-6 (İnterlökin-6), IL-1 β (İnterlökin-1Beta), TNF- α (Tümör Nekroz Faktör-alfa) ve IL-8 (İnterlökin-8) gibi sitokinlerin ve endotelin gibi bazı vazoaktif ajanların sentezlenmesi ve salınımı artarken, NO (nitrik oksit) ve prosiklin gibi maddelerin sentezi ise baskılanır. Bu ve benzeri diğer sitokinler dokuda inflamasyonun başlamasından sorumludur. Sonuç olarak hücresel düzeyde birbirini izleyen birçok moleküler ve yapısal hasar gerçekleşir.⁶⁹

2.3. Reperfüzyon

Reperfüzyon, iskemik dokuda kan akımının ve bununla beraber oksijenin dokuya tekrar sağlanmasıdır. Reperfüzyon sonrasında yeniden sağlanan O_2 ve metabolitler iskemiden sonra oluşan doku hasarının artışına neden olur. Önce iskemide sonrasında ise reperfüzyon sırasında oluşan bu hasara iskemi/reperfüzyon hasarı (IR/H) denmektedir. IR/H ile ilgili yapılan çalışmalarda reperfüzyon sırasında oluşan toksik maddeler ve doku hasarı, iskekiye kıyaslandığında artabilmektedir.⁷⁰

Reperfüzyon, önemli endotelial disfonksiyon ile ilişkilidir. Reperfüzyon sürecinde oluşan ve endotel yüzeyinde hasara sebep olan serbest oksijen radikalleri (SOR), endotelin sentezindeki artış ve NO sentezindeki düşüşler endotelde fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır.⁷⁰

Reperfüzyon sırasında reoksijenizasyonla, iskemide oluşan ksantin oksidaz (KO) enzimi aktive olarak biriken hipoksantini sırayla ksantin ve ürik aside dönüştürür, bu da O_2^- radikali ve hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşumuyla sonuçlanır (Şekil 2.3).⁷¹



Şekil 2.3. İskemi Reperfüzyonda Ksantin Oksidaz Enziminin Rolü

Reperfüzyon hasarında rol alan hücrel ve humoral olaylar henüz tam olarak aydınlatılamamış hem fizyolojik hemde patolojik bir süreçtir. Bu mekanizma içerisinde ayrıntısıyla değerlendirilmesi gereken birçok süreç barındırır. Bu süreçte serbest O_2^- radikallerinin artması, Na^+-K^+ iyon pompasının bozulması, endoteldeki selektin ekspresyonunun görülmesi ve hücre içi Ca^{+} iyonunun artış mekanizmaları incelenmelidir.^{60,72} Ayrıca lipid peroksidasyonunun gerçekleşmesi, nitrik oksit sentaz seviyelerindeki artış, lökositlerdeki integrinlerin olayda rol alması, protein kinaz C'nin (PKC) aktivasyonu, fosfotidil inositol 3 kinaz-protein kinaz B (PI3K-Akt) ve mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) gibi hücre içi sinyal yollarının etkisiyle hücrede nekroz ve apoptozla sonuçlanan patolojik olaylar ortaya çıkar.^{60,72-76}

Reperfüzyon hasarından sorumlu temel mekanizmalar şunlardır:

- 1) Serbest Oksijen Radikallerinin Oluşumu
- 2) İnflamatuvar Yanıt ile Oluşan Mekanizmalar
 - Lökosit - Endotel Etkileşimi
 - Kompleman Sisteminin Aktivasyonu
 - Sitokinler ve diğer Faktörlerin Rolü

2.4. Serbest Radikaller

Serbest radikal, en dış orbitalinde tek ya da daha fazla sayıda çift olmamış tek elektron bulunduran atom veya moleküllerdir. Etkileşime girdikleri moleküllere bir elektron verir ya da bir elektron alırlar. Bu moleküller elektron ve proton sayıları arasındaki eşitsizliği dengeleyerek kendi yapılarını kararlı hale getirmek isterler, bu da hücre içindeki diğer moleküllere bağlanarak gerçekleşir, böylece onların kararsız hale geçmelerine sebep olurlar.⁷⁷

Serbest radikaller, organizmada günlük metabolik işleyiş sırasında veya çeşitli dış uyaranların etkisiyle oluşmaktadırlar. Canlı fizyolojisinde hücre sinyal iletiminde ve

biyolojik işleyişte rol alırlar. Elektron taşıma sistemlerinde ve hücrel enzimlerde de ara ürün olarak az miktarlarda oluşurlar.

Serbest radikal molekülleri, belirli bir seviyede kaldıkları sürece, organizmada yabancı olabilecek maddelere ve bazı enfeksiyöz ajanlara karşı önemli savunma molekülleri. Ancak oluşan serbest radikaller karşısında antioksidanlar yetersiz kalırsa, bu durumda serbest radikaller hücrenin yapısal elemanları olan lipid, protein, karbohidrat, nükleik asitler ve yararlı olan enzimlerin yapılarını bozarak organizmada zararlı etkilere yol açarlar.⁷⁸

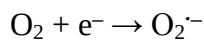
Fizyolojik durumlarda, reaksiyon dahilinde kullanılan O_2 'nin yaklaşık % 10'luk kısmı toksik ürünlere dönüşür. Bu toksik ürünler hemen detoksifiye edilmediklerinde organik bileşikler ile reaksiyona girerler.⁷⁹

Serbest radikaller hücrede yapısal proteinlerin, hücre zarında aktif iyon transportu yapan proteinlerin hasarına, enzimlerin inaktivasyonuna, membran lipidlerinin peroksidasyonuna, DNA'da baz değişikliklerine ve kırılmalara yol açar. Sonuç itibarıyla serbest radikaller; yaşlanmadan kanser gelişimine, kronik inflamatuvar hastalıklardan nörodejeneratif hastalıklara, hatta diabetes mellitus ve kardiyovasküler hastalıklar gibi pek çok hastalığa neden olmaktadır.⁷⁹

2.4.1. Reaktif Oksijen Türleri

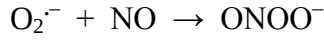
2.4.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot -}$)

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$), indirgenmiş oksijen molekülüdür. İndirgenme bir elektron almasıyla oluşur. Serbest radikal olarak direkt zarar vermez. Ancak $O_2^{\cdot -}$, bir hidrojen peroksit (H_2O_2) kaynağıdır. Bu şekilde iyonlarının indirgeyicisi konumunda bulunmaktadır.⁸⁰



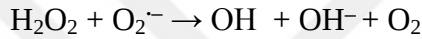
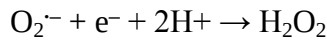
Süperoksit radikali nitrik oksit (NO) ile birleşerek peroksinitriti meydana getirir.

Peroksinitrit reaktif bir oksijen türevidir.⁸¹



2.4.1.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

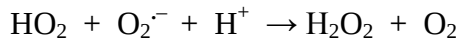
Moleküler durumdaki oksijenin ya iki elektron ya da süperoksitin bir elektron alması ile oluşan hidrojen peroksit, en zarar verici ve reaktif serbest oksijen radikali olan hidroksil radikaline kolaylıkla yıkılmaktadır.



O₂^{·-}, direkt ya da SOD enziminin katalizörlüğünde dismutasyona uğrar ve radikal olmayan reaktif oksijen bileşiklerinden H₂O₂'ye dönüşür.⁸²

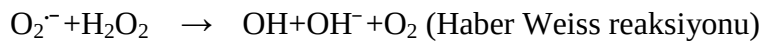
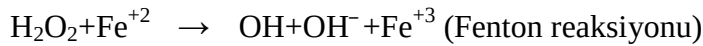


Süperoksit ile perhidroksil (HO₂[·]) radikallerinin birbirleriyle reaksiyona girmeleri sonucunda hidrojen peroksit meydana gelir.⁸³



2.4.1.3. Hidroksil Radikali (OH[·])

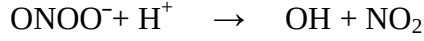
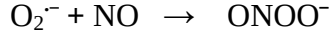
H₂O₂'nin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle veya O₂^{·-} ile tepkimeye girmesi sonucu oluşan hidroksil radikali (OH[·]) güçlü bir oksijen radikali.⁸⁴



2.4.1.4. Nitrik Oksit

Nitrik oksit vasküler endotel, beyin dokuları ve fagositik hücrelerde sentezlenen ve ayrıca “*relaxing factor*” olarak da bilinen birçok önemli fizyolojik fonksiyonları olan serbest bir radikaldir. NO'nun yüksek miktarda bulunması toksisiteye neden olur.

O_2^- , NO ile birleşmesiyle reaktif nitrojen türevi olan peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşur. Bunun sonucunda NO'nun normal fizyolojik etkileri azalırken, $ONOO^-$ 'lar proteinler için zararlı etkiler oluşturlar ve NO_2 (Nitrojen dioksit), OH ve NO_2^+ (Nitronyum iyon) gibi toksik ürünlere dönüşürler.⁸⁵



2.4.1.5. Singlet Oksijen ($^1O_2$):

Singlet oksijen [$O^- (^1O_2)$] ortak elektron taşımadığı için radikal sayılmaz. Ancak serbest radikal reaksiyonlarını başlatabilir. Bu nedenle reaktif olan oksijen molekülüdür. Hem serbest radikal reaksiyonlarından hem de bunların başlamasından sorumlu tutulur.^{86, 87}

2.4.2. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller; proteinler, serbest aminoasitler, nükleik asitler, karbonhidratlar, lipitler, lipoproteinler ve bağ dokusu bileşenleri de dahil organizmada neredeyse tüm biyomoleküllerle reaksiyona girerek geri dönüşümlü veya dönüşümsüz etkiler oluşturmaktadır. Ancak serbest radikal hasarından en fazla etkilenen bileşikler lipitlerdir.⁸⁸⁻⁹⁰

Lipitler serbest radikallerin etkilerine karşı oldukça duyarlı moleküllerdir. Doymamış yağ asitleri ve kolesterol, serbest radikallerle reaksiyon sonucu peroksidasyon ürünleri oluşturlar. Lipit peroksidasyonun ilerlemesiyle lipit peroksit, lipit alkol ve aldehitler gibi organizma için çok zararlı yan ürünler meydana gelir.^{91, 92}

2.5. Lökosit - Endotel Etkileşimi

Endotel; damar duvarının lümene bakan kısmını döşeyen, tek sıra halinde dizilmiş hücrelerden oluşan bir bariyerdir. Endotel hücreleri tunika intimada yer alır. Geçirgenliğin sağlanması, immünitinin düzenlenmesi ve koagülasyon ile fibrinoliz

arasındaki denge endotelin önemli görevlerinden olmakla beraber, vazodilatasyon ve vazokonstriksiyonda etkili, vasküler homeostazdan sorumlu en küçük endokrin organdır.⁹³

Endotel kaynaklı en önemli vazodilatatör nitrik oksittir (NO). NO sentezleyen enzimlerin (NOS) katalizlediği reaksiyonlar ile L-arjinin, L-sitrullin ve NO'ya dönüştürülür. Bunun için ortamda hem oksijen hemde bazı ko-faktörlerin (NADPH, FAD gibi) bulunması gerekir.⁹⁴⁻⁹⁶

NO oluşumunu sağlayan üç farklı NO⁻ sentetaz (NOS) izoformu olduğu bilinir. Endotel hücrelerinde bulunan (eNOS) kalsiyuma bağımlı bir enzimdir ve kalsiyum (Ca⁺²) yoğunluğunun artışıyla aktive olur. Nöronlarda bulunan nöronal NOS (nNOS) da Ca⁺²'a bağımlıdır. İndüklenebilir NOS (iNOS) enzimi, makrofajların endotoksinler ve sitokinler tarafından uyarılmasıyla ortaya çıkar. iNOS Ca⁺² iyonuna bağımlı değildir. iNOS uyarılması ile fazla miktarda ve uzun süreli NO salınımı olur. Bu durum eNOS ve nNOS enzimlerinde daha kısa süreli olmaktadır.⁹⁷ Bunlardan iNOS (Tip II) normal şartlarda bulunmaz, ancak inflamasyon ve enfeksiyon durumlarında sitokin ve endotoksinler yoluyla indüklenerek uzunca bir süre üretilmektedir. Normal olmayan şartlarda ortaya çıkabilen iNOS, iskemi/reperfüzyon hasarında sıklıkla bakılan değerlerden biridir. iNOS miktarının oksidatif stresle doğru orantılı arttığı görülmüştür.⁹⁸⁻¹⁰⁰

Nitrik oksitin sahip olduğu kompleks etki mekanizması bu etkilerin üretim hızı ve miktarına göre değişiklik gösterir. Bu durum da IR/H çok kritik rol oynar. NO dokularda normalde oksijen olduğunda argininin sitrülline okside olmasıyla sentezlenir. Kofaktör olarak ise tetrahidrobiopterin kullanılır.¹⁰¹ Normal fizyolojik şartlarda endotelial hücrelerce eNOS üretimi oldukça az miktardadır. Bu durum ise düz kaslarda relaksasyon, vazodilatasyon, hücre içi sinyal iletiminde düzenleyici ve lökosit

adhezyonunu engelleyici rol oynar.¹⁰² I/R'de ise ortamda süperoksit radikallerinin miktarı yükselir. Artan süperoksitle birlikte ortamdaki NO reaksiyon oluşturur. Bu da hem reaktif, hem de toksik bir bileşen olan peroksinitrit (ONOO⁻) ve nitrogen trioksit (N₂O₃) oluşumuna neden olur.¹⁰³ Bunlara ek olarak, endojen şekilde üretilen NO miktarının düşmesine sebep olacağından, NO'nun koruyucu etkilerini engelleyerek oksidatif strese katkı sağlar. Ortamdaki NO, arginin veya tetrahidrobiopterin kofaktörünün miktarındaki azalma da “*eNOS-uncoupling*” olarak bilinir. Bu durum NOS'un süperoksit üretimini tetikler ve ROS oluşumunu artırır.¹⁰⁴ Endotel hücrelerinde oluşan oksidatif stres ile birlikte kompleman sistemi aktive edilir. Bu durumda lökosit adezyon molekülleri artar. Endotel hücreleri serbest oksijen radikallerinin etkisi ile oluşan hasara yanıt olarak IL-1, PAF, prostaglandinler, büyüme faktörleri, endotelin ve NO salgılarlar. Aktifleşen endotel hücreleri bazal membranlarını sindirebilen kollajenazlar salgılayabilmektedir.¹⁰⁵

Endotelial hücrelerin immün yanıtındaki rolü sitokinler aracılığı ile oluşur. Endotel hücreleri, inflamatuvar olsun veya olmasın, çeşitli uyaranlara yanıt olarak sitokin salgılar. Örneğin; bakteriyel lipopolisakkaritler, endotel hücrelerinden IL-1 ve TNF- α salınımını uyarır. Ayrıca diğer dokulardan salınan ve dolaşıma geçen sitokinler de endotel hücrelerini uyarır. Sonuç olarak endotel hücrelerinin yüzeyinde inflamatuvar hücreler için adezyon molekülleri açığa çıkar.¹⁰⁶

2.6. Kompleman Sistemi

İskemi/reperfüzyon hasarı sırasında kompleman sisteminin rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Kompleman sistemi aktivasyonu ile proinflamatuvar bileşenler meydana gelir. Bunlar C3b, C3a, C5b-9 ve C5a'dır. C3a ve C5a anafatoksinlerdir. Bunlar ise lökositleri aktive ederler. C5a ayrıca monosit kemoatraktan protein, TNF- α , IL-6, IL-1 ve makrofaj inflamatuvar proteinlerin üretimini indükler ve inflamatuvar yanıtı

oluşturur.¹⁰⁷ Kompleman sistemi tarafından sentezlenmesi sağlanan ve lökosit adezyon molekülleri olarak bilinen moleküller bulunur. Bunlar E-selektin, P-selektin, interselüler adezyon molekülü- 1 (ICAM-1) ve vasküler hücre adezyon molekülü -1 (VCAM-1)'dir.

C5b-9 endotel yüzeyinde monosit kemoatraktan protein, IL-8 ve IL-1 α salınımıyla lökosit aktivasyonunu artırır. Ayrıca endotel bağımlı dilatasyonu baskılayarak ve endotelde cGMP'yi azaltmak suretiyle vasküler kasılmayı bozduğu bilinmektedir.^{108,109}

2.7. İskemi Reperfüzyon Hasarında Sitokinlerin Rolü

Sitokinler, kan yapımında görevli olan ve olmayan hücreler ile üretilip salgılanan polipeptidlerdir. Ayrıca hormon yapılarına benzlik göstermelerine rağmen hormon değildirler. Sitokinler çözünebilir proteinlerdir. Doğal ve kazanılmış immün yanıt için çok büyük önem taşırlar.¹¹⁰ Sitokinler inflamasyon durumu, hücre büyümesi ve immün yanıtın da içinde yer aldığı, bağışıklık ve inflamatuvar olayları düzenlerler. Özellikle TNF- α , TNF- β , IL-1, IFN- γ ve kemokinler inflamatuvar yanıt oluşumunu sağlarlar.¹¹¹ Birçok farklı sitokin benzer fonksiyonları gösterebildiği gibi bir sitokin de birçok farklı hücrede etkili olabilmektedir. Bu özellik birçok hücre sitokin reseptörü içerdiği için mümkün olabilmektedir, böylece sitokin ağları oluşur.¹¹²

2.7.1. Sitokinlerin Genel Özellikleri

Sitokinler geniş olan protein ailesi gruplarından oluşur. Oldukça fazla özellikleri vardır.^{110,113} Sitokinler çeşitli hücrelerce üretilirler.¹¹³ Sitokin salınımı kısa sürer ve belli bir sürede sınırlandırılır. Sitokinler öncül molekül şeklinde depo edilmezler ve sentezleri gen transkripsiyonu ile başlamaktadır. Bu transkripsiyonel aktivasyon genelde geçici olur ve sitokinleri sabit olmayan mRNA'lar kodlanır. Bu sebeple sitokin salınımı geçici olmaktadır ve bir kere sentezlendiklerinde, sitokinler hızlı bir şekilde salınırlar.¹¹⁰ Sitokinler *pleiotropizm* özelliğindedir, yani çok farklı hücre tiplerine etki edebilirler.¹¹⁴

Sitokinlerin aynı hedef hücre için çok çeşitli etkileri bulunur. Bazı etkiler hemen oluşurken, bazıları farklı zamanlarda oluşabilir.¹¹³ Sitokinler birçok hedef hücrede hücre bölünmesini düzenleyerek büyüme faktörü şeklinde etki ederler.¹¹⁰ Sitokinler diğer sitokinlerin fonksiyonlarını etkileyerek birbirini antagonize ederler. Sitokinler, hedef hücre yüzeyinde bulunan membran reseptörlerine bağlanır ve etki mekanizmalarını başlatırlar. Bir hücre sitokini kendiliğinden salgılayabilir (otokrin olarak), komşu hücrelerce salgılanabilir (parakrin etki) ya da direkt dolaşımdaki sitokinler ile uyarılmış bir hücre yardımı ile olabilir (endokrin etki).¹¹⁴

İskemik dokunun reperfüze olması ile birlikte, TNF- α , IL-1 ve IL-6 gibi sitokinler dolaşıma katılır.¹¹⁵ İ/R sırasında sitokin salınımı bilinmesine karşın bu sitokinlerin geçirgenliğinin doğrudan ya da hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonu ile veya nötrofil adezyon aktivitesiyle mi gerçekleştiği bilinmemektedir.^{116,117}

2.7.2. Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α)

Tümör nekroz faktör (TNF), doğal immün sistem sitokinlerindendir. Mononükleer fagositler TNF'nin hücresel kaynağıdır.¹¹³ T hücreleri, aktif olan naturel killer (NK) hücreleri ve mast hücreleri de bu proteini salgılamaktadır.¹¹⁸ TNF'nin iki çeşidi bulunur. Bunlardan TNF- α aktif makrofajlardan salınırken, TNF- β aktif T hücrelerinden salınır (lenfotoksin).¹¹⁹

İnsanda TNF-alfa geni 6. kromozomunun kısa kolunda yer alır ve TNF-alfa 157 aminoasit içerir. TNF reseptörü 80 kD ağırlığında bir glikoproteindir. Hücrelerin yüzeylerindeki TNF reseptörler sayısı 1000 ile 10.000 arasında bulunur.

İki tip TNF reseptörü vardır. Bunlar, fibroblast proliferasyonunu ve sitotoksik aktiviteyi arttıran TNFR Tip I (75-80 kDa) ile T hücrelerinde proliferasyona sebep olan TNFR-Tip II (55-60 kDa)'dir.¹¹⁹ Damarlardaki düz kasları gevşeten TNF, kan basıncını

ve bununla birlikte dokuda perfüzyonu azaltır. TNF'nin etki mekanizması ya düz kas hücreleri ya da prostasiklin ve NO gibi damar genişleticileri uyarmasıyla dolaylı yoldandır.¹²⁰ TNF, intravasküler koagülasyona yol açarak doku içerisinde perfüzyonu azaltır.¹¹³

TNF- α düzeyinin enfeksiyon hastalıkları dışında yanıklar, akut romatoid artrit gibi olgularda da arttığı bilinmektedir.¹²¹

TNF- α İ/R'da inflamatuvar cevabın oluşumunda önemli rol oynar.¹²² TNF- α dokular arası polimorf nüveli lökosit (PMNL) geçişinde ve bu hücrelere bağlı hasarda rol oynamaktadır.¹²³

TNF- α 'nın Biyolojik Yönden Etkileri:

İmmünolojik Etkiler: TNF öncelikle T lenfositler içinde IL-2 reseptörlerinin tanımlanmasını sağlayarak lenfokin üretiminin artmasını sağlar. Ayrıca B lenfositlerin çoğalmasını sağlayarak antikor üretiminde artışa sebep olurlar. Eozinofil, makrofaj ve nötrofilleri aktive ederek nötrofillerde kemotaksiyi arttırırlar. Makrofaj ve monositlerde IL-1, IL-6, IL-8 ve prostaglandin yapımını uyarır.¹¹⁴

Karaciğer Üzerine Etkileri: Kompleman C3 ve plazma bakır düzeylerini arttırırken, sitokrom P-450 düzeyini ve plazma demir, çinko düzeylerini azaltır.¹²⁴

Vasküler Etkileri: Rekombinant TNF infüzyonu organizmada doku hasarına neden olur. Bu değişiklikler; solunum yetmezliği, akciğer ödemi, yaygın hemorajik nekroz ve akut tübüler nekroz şeklinde görülür. TNF infüzyonu sonucu oluşan hipotansiyon doza bağımlı olarak gelişir.¹²⁴

Hematolojik Etkileri: TNF kemik iliğinde bazı proaktif hücrelerin farklılaşmasını ve çoğalmasını baskılayarak endotel prokoagülan aktivitenin artışına neden olur. Bu da pıhtılaşma ve kapiller tromboza yol açar.¹²⁴

Diğer Etkileri: TNF'nin virüs, bakteri ve tümör hücrelerine karşı öldürücü etkileri bulunur. Kemik dokusunda ise kollajenazı artırır, kemik rezorpsiyonuna neden olur ve yağ dokusunda da lipolizi arttırır.¹¹⁸

2.7.3. İnterlökin-1 β (IL-1 β)

İnterlökin-1 ilk tanımında endojen pirojen olarak adlandırılmıştır.¹²⁵ Bu maddenin plazmada çinko ve demir düzeylerini azalttığı bilinir. Ayrıca nötrofiliye yol açtığı, koloni uyarıcı aktiviteyi tetiklediği ve karaciğerde amiloid-A'nın sentezini başlattığı saptanmıştır. Sonrasında ise nitrojenlere karşı T lenfosit yanıtını arttırdığı bulunmuştur. Bu molekül “lenfosit aktive edici faktör” olarak bilinir. Makrofajlar tarafından üretilen bu maddenin lenfositleri aktive etmesi nedeniyle “interlökin” olarak adlandırılmıştır.

İntravenöz olarak uygulanan IL-1'in ateş, iştahsızlık, uyku, baş ağrısı ve ayrıca gastrointestinal bozukluklara yol açtığı görülmüştür.

IL-1'in B hücre gelişimini sağlayan faktörleri etkilediği bilinir. Bu durum B hücrelerinin artışına sebep olur ve antikor yapımını arttırır.¹²⁶ B hücresinin olgunlaşmasına neden olan doğal faktörlerin aktiviteleri IL-6'nın varlığında ortaya çıkar.

2.7.4. İnterlökin-6 (IL-6)

IL-6, 26 kD'lik 186 aminoasitten oluşmuş ve glikoprotein yapısındadır. IL-6 geni 7. kromozomda bulunur. IL-6; T lenfositler, monositler ve fibroblastlarda üretilir.¹²⁷ IL-6 savunmada önemli rol oynayan bir sitokindir. IL-6 hedef hücreye kıyasla değişebilen, büyümeyi uyarıcı veya baskılayıcı ve farklılaşmayı uyarıcı görevler üstlenir. Bu molekül I/R hasarının gösterilmesinde önemlidir.

IL-6 monosit, makrofajlar, mast hücreleri, T hücreleri, B hücreleri, granülositler ve fibroblastlarda bulunur. Ayrıca keratinositler, osteoblastlar, endotel hücreleri,

kondrositler, mezangial hücreler, düz kas hücreleri, glial hücreler ve bazı tümör hücrelerince de yapılmaktadır.¹²⁸

IL-6; E-selektin, VCAM-1 ve ICAM-1 gibi adezyon moleküllerinin ekspresyonunun artmasını sağlayarak adezyonu artırırlar. IL-6 ayrıca PMNL'lerin kemotaksisini artırmaktadır.¹²⁹ Stres veya travma anında, kan seviyesinin yükselmesi nedeni ile IL-6'nın sistemik düzeyde inflamatuvar cevabın bir belirtici olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.¹³⁰

Over torsiyonu çalışmalarında, serum IL-6 düzeylerinin artarak IL-6 düzeyleri ve over torsiyonu arasında önemli bir ilişkinin olduğu gösterilmiştir.¹³¹

2.8. Nükleer Faktör Kappa B (NF-κB)

Nükleer faktör kappa B (NF-κB), hücre sitoplazmasında hetero-homodimer olarak yer alır. NF-κB'nin aktivasyonu proinflamatuvar sitokinlerin yanı sıra adezyon moleküllerinin sentezinde de artışla sonuçlanır. I/R hasarında artan oksidatif stres ile hem hücresel mediatör, hem de transkripsiyon faktörü NF-κB aktive olmakta, böylece iNOS aktivasyonu oluşmaktadır. NF-κB, inflamatuvar kaskatta merkezi role sahip transkripsiyon faktörüdür. Hücrede NF-κB aktivasyonu; P-selektin, L-selektin intersellular adezyon molekülü (ICAM) ve trombosit-endotel hücre adhezyon molekülü (PECAM) gibi adhezif moleküllerin ekspresyonunun artışına ve reperfüzyon sırasında lökositlerin infiltrasyonuna neden olur.¹³²⁻¹³⁴

NF-κB'nin hücre sitoplazmasında inhibitör alt ünitesi ise IκB şeklinde bulunur ve bu NF-κB'nin hücre nükleusuna geçişini ve böylece gen ekspresyonunu başlatmasını engellemektedir. SOR, TNF-α ve IL-1; IκB'nin fosforillenerek parçalanmasına sebep olur ve NF-κB açığa çıkar. NF-κB adezyon molekülleri, proinflamatuvar sitokinler, iNOS aktivasyonu ve kemokinler için gen ekspresyonunu başlatmaktadır.^{135, 136}

İskemi sürecinde de hücre içinde bazı proteinler hızla eksprese olmaya ve salınmaya başlarlar. Nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) iskemi sırasında aktivasyonu artan proteinlere örnek verilebilir.^{63,68}

2.9. Antioksidanlar

Organizmada serbest radikallerin hasarını engelleyebilmek için antioksidanlar olarak bilinen savunma sistemleri bulunur. Antioksidanlar oksidasyonu inhibe eden veya geciktiren maddeler olarak bilinmektedir.¹³⁷

Antioksidanlar ilk olarak zarların yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonlarının engellenmesini sağlarlar. Antioksidanların proteinleri, nükleik asitleri, lipitleri ve diğer makromolekülleri koruyucu etkiler bulunmaktadır. Antioksidan etki mekanizmaları ise baskılayıcı, toplayıcı, onarıcı ve zincir kırıcı şeklindedir.^{138,139}

1) Toplayıcı Etki: Serbest oksijen radikallerini tutarak veya zayıf bir moleküle çevirerek etki eder. Küçük moleküller ve antioksidan enzimler bu şekilde etki gösterirler.^{140,141}

2) Baskılayıcı (uyarıcı) Etki: Serbest oksijen radikalleriyle bir araya geldiğinde bir hidrojen aktararak ya aktivitelerini azaltma ya da inaktif hale getirme şeklindedir. Vitaminler, flavanoidler böyle bir etkiye sahiptirler.¹⁴²

3) Zincir Kırıcı Etki: Serbest oksijen radikallerini bağlayarak bu alandaki zincirleri kırarak fonksiyonlarını engelleyici etki gösterir. Seruloplazmin, mineraller ve hemoglobin zincir kırıcı etki yaparlar.¹⁴³

4) Onarıcı Etki: Serbest radikallerin hasarlarının onarılması şeklindeki etkidir.¹⁴⁴

2.9.1. Endojen Antioksidanlar

2.9.1.1. Enzim

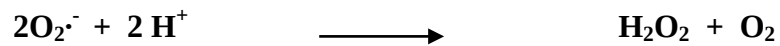
2.9.1.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD, süperoksitlerin, moleküler oksijen ve hidrojen peroksit'e dönüşümünü katalizler. Aktivitesi yaşla birlikte artar. SOD'un insanlarda dimerik bakır (Cu) ve çinko (Zn) ihtiva eden, sitozolde yer alan Cu, Zn-SOD ile tetramerik mangan (Mn) içeren ve mitokondride bulunan Mn-SOD olmak üzere birbirinin izomeri olan iki tipi bilinmektedir.¹⁴⁵

Her iki enzimin de katalizlediği reaksiyon birbirinin aynı olup fizyolojik fonksiyonları, lipid peroksidasyonunu inhibe etmektir. Böylece hücreler oksijeni metabolize ederek, süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korunmaktadırlar.^{83,146}

SOD normal bir metabolizmada hücreler tarafından üretilen süperoksit miktarının hücresel olarak düşük tutulması ile sağlanmaktadır. Nötrofiller ve fagositik hücreler fagositoz yaptığında NADPH-oksidaz ile oksijen tüketiminde ani bir yükseliş görülür. Bu hızlı oksijen tüketim olayı O_2^- , H_2O_2 , OH^- , hipoklorit iyonu ($HOCl$) gibi tepki veren türevlerin aşırı miktarda üretimi ile kendini gösterir.⁸¹

Fagositik hücrenin sitozolüne giren herhangi bir süperoksit SOD etkisiyle H_2O_2 'ye çevrilir. Oluşan H_2O_2 'ya miyeloperoksidaz (MPx) tarafından kullanılır ve ya GPx veya CAT ile yok edilir.¹⁴⁷



2.9.1.2. Glutasyon (GSH)

Glutasyon karaciğerde genetik bilgi olmaksızın L-glutamat, L-sistein ve glisinden iki basamakta sentezlenen bir tripeptiddir. GSH önemli bir antioksidandır. Peptid bağı içermesi nedeniyle düşük enerjili bileşiklerden kabul edilen GSH, organik oksitleri veya

H₂O₂'yi detoksifiye edebilme yeteneğindedir. Hücre proteinlerini indirgemiş biçimde duran disülfit-sülfidril tepkimelerinde de etkilidir.¹⁴⁸ Hemoglobinin oksitlenmesini önleyerek methemoglobine dönüşümünün önüne geçer. Glutasyon (GSH) hücresel olmayan bileşiklerin detoksifikasyonunu ve ayrıca amino asitlerin membranlardan geçişini sağlar. GSH göz lensini, lökositleri ve eritrositleri oksidatif stresin etkilerine karşı korumada çok önemli bir yere sahiptir. Glutasyon aktivitesinin azalması, hidrojen peroksit seviyesinin artmasına, bu durum da şiddetli hücre hasarı oluşumuna yol açmaktadır.⁸¹

2.10. Malondialdehit (MDA)

Lipid peroksitlerin toksik yıkım ürünü olan MDA sıklıkla lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak kullanılır. Artan lipid peroksidasyon ürünleri dolaşımında endotelial hücre hasarı oluşturur.¹⁴⁹⁻¹⁵¹

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan MDA, membran bileşenlerinin polimerize olması ve çapraz bağlanmasına neden olur. Bu durum enzim aktivitesi, iyon transportu, deformasyon ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi membran özelliklerini değiştirmektedir. Organizmada meydana gelen bu değişiklikler MDA'nın ne kadar mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu gösterir.⁸⁵

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Etik Kurul İzni, Deneklerin Temini ve Deney Grupları

3.1.1. Etik Kurul Onayı

“Dişi Sıçanların Over Dokusunda Deneysel Olarak Oluşturulmuş İskemi ve Reperfüzyon Modelinde Zamana Bağlı Moleküler Mekanizmaların Seyrinin ve Strüktürel Değişikliklerin Araştırılması” adlı çalışmamız Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığının **2016-157** sayılı kararıyla etik kurallara uygunluğuna karar verilmiştir.

3.1.2. Deneklerin Temini ve Özellikleri

Çalışmada kullanılan hayvanların temini Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (**ATADEM**)’den sağlanmıştır. Toplamda 12 haftalık 78 adet ortalama 230-250 gram ağırlığında Wistar albino cinsi dişi sıçan kullanılmıştır.

3.1.3. Çalışmanın Deney Grupları

Çalışmada, her biri 6 adet sıçandan oluşan 13 ayrı grup oluşturuldu. Oluşturulan gruplar sırasıyla aşağıdaki gibi adlandırıldı.

Grup 1 (6 hayvan)- Sham /kontrol

Grup 2 (6 hayvan)- 30 dk’lık İskemi

Grup 3 (6 hayvan)- 60 dk’lık İskemi

Grup 4 (6 hayvan)- 90 dk’lık İskemi

Grup 5 (6 hayvan)- 120 dk’lık İskemi

Grup 6 (6 hayvan)- 150 dk’lık İskemi

Grup 7 (6 hayvan)- 180 dk’lık İskemi

Grup 8 (6 hayvan)- 180 dk’lık İskemi + 30 dk’lık Reperfüzyon

Grup 9 (6 hayvan)- 180 dk’lık İskemi + 60 dk’lık Reperfüzyon

Grup 10 (6 hayvan)- 180 dk’lık İskemi + 90 dk’lık Reperfüzyon

Grup 11 (6 hayvan)- 180 dk'lık İskemi + 120 dk'lık Reperfüzyon

Grup 12 (6 hayvan)- 180 dk'lık İskemi + 150 dk'lık Reperfüzyon

Grup 13 (6 hayvan)- 180 dk'lık İskemi + 180 dk'lık Reperfüzyon

Çalışma süresi boyunca tüm hayvanlar standart laboratuvar koşullarında (12 saat gün ışığı, 12 saat karanlık, sabit ısı, havalandırılmalı ve serbest su ve gıda sağlanan) tutuldu.

3.2. Çalışmanın Deney Prosedürü ve Uygulanan Deneysel Modeller

3.2.1. Çalışmanın Deney Prosedürü ve Zamanlaması

3.2.1.1. İskemi, İskemi/Reperfüzyon Prosedürü Uygulaması

Çalışmanın bu aşamasında bulunan gruplar (Grup: 0-13), esas itibariyle, kendi içinde;

A-Sham/ Kontrol grubu (Grup 1, n:6),

B- İskemi grupları (Grup 2 - Grup 7, n:6) ve

C- İskemi/Reperfüzyon grupları (Grup 8 - Grup 13, n:6) biçiminde üç alt gruba ayrıldı.

Kontrol Grubu (Grup 1, Sham / kontrol): Hayvanlara uygulanan anestezi 25 mg/kg tiopental sodyum dozunda olup, lateral karın bölgesinden 2-3 cm insizyon açılarak, periton ve karın kasları geçilip overlere ulaşıldı. Tekrar overler batın içine yerleştirilerek uygun şekilde kapatıldı. Bahsedilen bu işlemin ardından, başka bir uygulama yapılmaksızın, hayvanların overleri 6 saat sonra cerrahi olarak çıkarıldı. Bütün bu işlemler tamamlanınca, deneklere yüksek doz tiopental sodyum uygulamasıyla ötenazi uygulanarak deney sonlandırıldı.

Her hayvandan birer over histopatolojik için %10'luk paraformaldehit içinde, diğer overler elektron mikroskopik incelemeler için gluteraldehit solüsyonunda, moleküler ve biyokimyasal incelemeler için ise -80°C'de muhafaza edildi.

İskemi Grupları (Grup 2-7): Benzer cerrahi işlemler bu gruba da uygulandı.

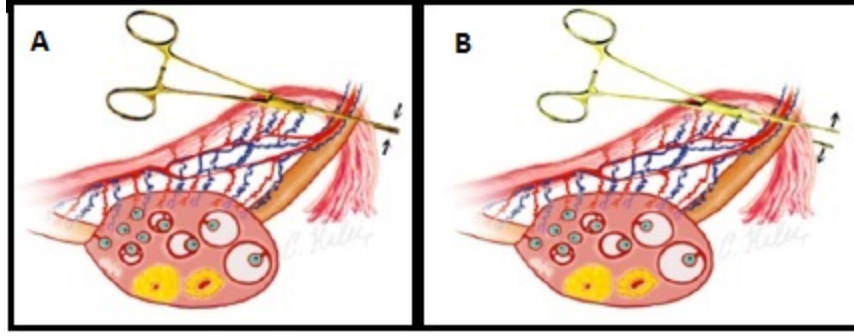
Grup 2-7’ deki hayvanların her birinin overlerine, farklı sürelerle sırasıyla 30, 60, 90, 120, 150 ve 180 dk, atravmatik vasküler klempler yardımıyla ovarian arterlerin üzerinden geçirilerek, bilateral iskemi işlemi uygulandı. İskemi işlemi süresinde overler ve batin ısıtılmış serum fizyolojik emdirilmiş steril gazlı bezlerle örtüldü. İskemi sürelerinin sonunda, Grup 2-7’deki deneklere uygulanan vasküler klempler açılarak hayvanların overleri cerrahi olarak çıkarılırdı. Bütün bu işlemler tamamlanınca, deneklere yüksek doz tiopental sodyum (50 mg/kg) uygulamasıyla ötenazi uygulanarak deney sonlandırıldı (Şekil 3.1-A).

Her hayvandan over dokuları histopatolojik, elektron mikroskopik, moleküler ve biyokimyasal incelemelerin yapılabilmesi için muhafaza edildi.

İskemi/Reperfüzyon Grupları (Grup 8-13) İçin Uygulamalar:

İskemi gruplarındaki gibi benzer cerrahi işlemler bu gruba da uygulandıktan sonra;

Grup 8-13’deki hayvanların her birinin overlerine, 3 saat boyunca atravmatik vasküler klempler yardımıyla, bilateral iskemi işlemi uygulamasının ardından, deneklerin her birine, farklı sürelerle sırasıyla 30, 60, 90, 120, 150 ve 180 dk, reperfüzyon işlemi uygulandı. Gerek iskemi gerekse reperfüzyon sırasında overler tekrar batına yerleştirildi ve batin ısıtılmış serum fizyolojik emdirilmiş steril gazlı bezlerle örtüldü. Önceden belirlenen sürelerin sonunda, reperfüzyon işlemi tamamlanan deneklerden incelenmek üzere elde edilen doku örnekleri bir öncekiler gibi ve aynı şekliyle muhafaza edildi (Şekil 3.1-B).



Şekil 3.1. Sıçan overlerinde vasküler klemp uygulanmasının şematik çizimi. A. İskemi; B. Reperfüzyon.¹⁵²

3.3. Çalışmanın Değerlendirilmesinde Kullanılan Uygulamalar

3.3.1. Işık Mikroskopik İşlemler

Işık mikroskopik işlemler A.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında bulunan laboratuvarlarda gerçekleştirildi.

Sıçanlardan alınan over dokuları, etiketlenerek % 10'luk formaldehit bulunan şişelere alındı. 72 saat sonra aşağıda belirtilen doku takip işlemleri izlendi.

3.3.1.1. Doku Takip İşlemleri

- a. Suda yıkama (4 saat)
- b. Artan derecelerde alkol serilerinden geçirilerek dehidratasyon işlemi yapılması
 - 1) % 70'lik Alkol içerisinde (Merck)[®] 1 gece süreyle,
 - 2) % 80'lik Alkol içerisinde 1 saat süreyle
 - 3) % 96'lık Alkol içerisinde 1 saat süreyle
 - 4) % 96'lık Alkol içerisinde 1 saat süreyle,
 - 5) % 100'lük Alkol içerisinde 1 saat süreyle,
 - 6) % 100'lük Alkol içerisinde 1 saat süreyle tutuldu.
- c. Ksilan serilerinden geçirilerek şeffaflaştırma uygulaması yapılması
 7. Ksilende (Merck)[®] 10 dakika süreyle,
 8. Ksilende 10 dakika süreyle bekletildi.

d. Parafin serilerinden geçirilerek infiltrasyon işlemi yapılması

9. Ksilen ve parafin (Merck) ® içinde 60°C'lik etüv içerisinde bir saat süreyle,

10. Parafinde 60°C'lik etüv içerisinde bir saat süreyle,

11. Parafinde 60°C'lik etüv içerisinde iki saat süreyle tutuldu.

e. Doku örneklerinin parafine gömülmesi

12. Parafin bloklara gömülen dokular kesit alınması için hazırlandı.

3.3.1.2. Blokların kesilmesi

Parafin bloklara gömülen dokulardan mikrotom (Leica RM2125RT) yardımıyla 5 µm'lik seri kesitler alındı. Tüm bloktan 50 mikron aralıkla alınan, 8 seri kesit elde edildi. Elde edilen bu seri kesitler H&E ve histokimyasal boyalar ile boyanarak aynı kesit yüzeyine düşen aynı hücrenin karakteri belirlenmiş oldu. Tüm boyamaların mikroskopik fotoğrafları, grupların değerlendirmelerinin objektif olması için, aynı ışık ayarlarında çekildi.

3.3.1.3. Hematoksilen ve Eosin (H&E) Boyanma İşlemi

1. Deparafinizasyon işlemi yapıldıktan sonra
2. Ksilolde 20 dakika süreyle bekletme
3. Ksilolde 10 dakika süreyle bekletme
4. İki ayrı %96'lık Alkol serisinde 5 dakika süreyle bekletme
5. % 80'lik Alkol 10 dakika süreyle bekletme ve boyamadan önce akar suda yıkama işlemi
6. Hematoksilen boyasında 1 dakika süreyle bekletme
7. Asit ve Alkol karışımından hızlıca geçirme
8. Eozin solüsyonu içinde 1 dakika süreyle bekletme
9. Suda 1 dakika süreyle yıkama

10. % 80'lik Alkol içinde 10 dakika süreyle bekletme
11. %96'lık iki farklı Alkol serisinde 10 dakika süreyle bekletme
12. Ksilol serilerinde 20 dakika süreyle bekletme
13. Entellan ile kapatma işlemi yapıldı.

3.3.1.4. Kesitlerden Görüntü Alınması

Gruplara ait kesitlerin fotoğrafları kamera ataçmanı bulunan Olympus BH 40 model ışık mikroskobu ile çekildi.

3.3.2. İmmunohistokimyasal Analiz

İmmunohistokimyasal analizler için dokuların bulunduğu bloklardan mikrotom (Leica DSC2) kullanılarak 5 µm'lik kesitler pozitif şarjlı cam lamalar üzerine alındıktan sonra aşağıda sıralanan işlemlere tabi tutularak NF-κB p65 boyama işlemi gerçekleştirildi.

Pozitif şarjlı lamlara alınan 5 µm kalınlığında kesitler Ventana BENCHMARK GX otomatik immünohistokimya boyama cihazına yerleştirildi. Primer antikor (NF-κB-p65 Santa Cruz, sc-8008, mouse monoclonal, 200 µg/ml,) sulandırma oranı 1/80) kullanılan immünohistokimyasal boyama protokolünde diğer tüm işlemler benzer olarak yapıldı. Cihaz tarafından aşağıdaki işlemler sırasıyla gerçekleştirildi.

1. Doku kesitleri 75°C'de 4 dakika inkübe edildi,
2. EZPrep uygulamasıyla 4 dakika inkübe edildi,
3. Reaksiyon Tamponu (Reaction Buffer) kullanılarak yıkandı,
4. EZPrep uygulanarak 4 dakika inkübasyon sağlandı,
5. Reaksiyon Tamponu kullanılarak yıkandı,
6. EZPrep uygulamasıyla 4 dakika inkübe edildi,
7. Reaksiyon Tamponu kullanılarak yıkandı,
8. Kesitler 75°C sıcaklıkta 4 dakika süreyle inkübe edildi,

9. Reaksiyon Tamponu ile yıkandı (3 tekrar ile),

Kısa 8 dakika iyileştirme:

10. Kesitler 95°C'de CC uygulanmasıyla 8 dakika inkübe edildi,

Yumuşak 30 dakika iyileştirme:

11. Kesitler 100°C'de EZPrep/CC uygulanarak 30 dakika inkübe edildi,

Standart 60 dakika iyileştirme:

12. Kesitler 100°C'de EZPrep/CC uygulanarak 60 dakika inkübe edildi,

13. Reaksiyon Tamponu ile yıkandı,

14. Kesitler 37°C'de 2 dakika inkübe edildi,

15. Reaksiyon Tamponu ile yıkandı,

16. Kesitler ultraView (UV) INHIBITOR (3% H₂O₂) ile 4 dakika inkübe edildi,

17. Reaksiyon Tamponu ile yıkandı,

18. Kesitler AMPLIFIER (NF-κβ p65) A ile 8 dakika inkübe edildi,

19. Reaksiyon Tamponu ile yıkandı,

20. Kesitler AMPLIFIER B ile 8 dakika inkübe edildi,

21. Reaksiyon Tamponu ile yıkandı,

22. Kesitler UV HRP UNIV MULT ile 8 dakika inkübe edildi,

21. Reaksiyon Tamponu ile yıkandı (3 tekrar ile),

22. Kesitler UV DAB ve UV DAB H₂O₂ ile 8 dakika inkübe edildi,

23. Reaksiyon Tamponu ile yıkandı,

24. Kesitler UV COPPER ile 4 dakika inkübe edildi,

25. Reaksiyon Tamponu ile yıkandı,

26. Kesitler HEMATOKSİLEN ile 8 dakika inkübe edildi,

27. Reaksiyon Tamponu ile yıkandı,

28. Kesitler BLUİNG REAGENT ile 4 dakika inkübe edildi,

29. Reaksiyon Tamponu ile yıkandı,
30. % 99 Alkol'de 2 dakika bekletildi
31. Ksilol'de 2 dakika bekletildi,
32. Entellan ile kapatıldı.

IHC Işık mikroskobu işlemlerinde kullanılan sarf malzemeler

VIEW DAB Detection Kit	: VENTANA (Kat No: 5266157)
UltraView Universal DAB Detection Kit	: VENTANA (Kat No: 5269806)
Amplificaiton Kit	: VENTANA (Kat No: 5266114)
Bluing Reagent	: VENTANA (Kat No: 5266769)
Hematoxylin	: VENTANA (Kat No: 5266726)
Protease 1	: VENTANA (Kat No: 5266688)
Endogenous Biotin Blocking Kit	: VENTANA (Kat No:5266092)

3.3.3. Dokuların Transmisyon Elektron Mikroskobu Preparasyonu

3.3.3.1. Elektron Mikroskobik Blokların Hazırlanması

Elde edilen ovaryum örnekleri elektron mikroskobik takip için sırasıyla;

1. %3'lük 0,2 Mol fosfat tamponlu gluteraldehit solüsyonunda 1saat bekletildi
(+4°C'de),
2. 0.1 Mol fosfat tamponuyla 15 dakika yıkandı,
3. 0.1 Mol fosfat tamponuyla 15 dakika yıkandı,
4. 0.1 Mol fosfat tamponuyla 15 dakika yıkandı,
5. 0.1 Mol fosfat tamponuyla 15 dakika yıkandı,
6. Post fiksasyon 0,2 Mol fosfat tamponlu OsO₄ solüsyonunda 1 saat bekletildi,
7. 0.1 Mol fosfat tamponuyla 15 dakika yıkandı,

8. 0.1 Mol fosfat tamponuyla 15 dakika yıkandı,
9. 0.1 Mol fosfat tamponuyla 15 dakika yıkandı,
10. 0.1 Mol fosfat tamponuyla 15 dakika yıkandı,
11. % 35 etil alkolde 15 dakika bekletildi,
12. % 50 etil alkolde 15 dakika bekletildi,
13. % 70 etil alkolde 30 dakika bekletildi,
14. % 95 etil alkolde 20 dakika bekletildi,
15. % 100 etil alkolde 20 dakika bekletildi,
16. % 100 etil alkolde 20 dakika bekletildi,
17. % 100 etil alkolde 20 dakika bekletildi,
18. Propilen oksitte 20 dakika bekletildi,
19. Propilen oksitte 20 dakika bekletildi,
20. 1 kısım Propilen oksit + 1 kısım Aralditte 1 saat bekletildi,
21. 1 kısım Propilen oksit + 2 kısım Aralditte 1 saat bekletildi,
22. Saf Aralditte 4 saat bekleme işlemlerinden geçirildi.

Daha sonra araldit kapsüllere döküldü, parçalar kapsüllere yerleştirildi ve 1 gece desikatörde bekletildi. Ertesi gün parçalar sentralize edilerek 45°C 1 saat, 50 °C 1 saat, 55 °C 1 saat, 62 °C 48 saat bekletilerek bloklar elde edilmiş oldu.

3.3.3.2. Yarı İnce Kesitlerin Alınması ve Toluidin Mavi Boyaması

Hazırlanan blok materyallerinden bir ultramikrotom (LKB NOVA, Bromma, Sweden) aracılığı ile yaklaşık 1µm kalınlığa sahip yarı ince kesitler elde edildi. Alınan kesitler lam üzerine alındı ve %2'lik toluidin mavi (blue) ile boyandı. Boyaması yapılan preparatlar kamera ataçmanı bulunan Olympus BH 40 model ışık mikroskobu ile incelenerek görüntüleri elde edildi.

3.3.3.3. İnce Kesitlerin Alınması

Yarı ince kesitlerin olduğu preparatların incelenmesi ile yer tayini yapıldıktan sonra ultramikrotomla 60-70 nm kalınlığında ince kesitler elde edildi. Alınan bu ince kesitler cam havuzdan bakır gridler (S 162 -PELCO) üzerine taşındı.

3.3.3.4. Gridlerin Boyanması

İnce kesitleri içeren gridlerin boyanması sürecinde aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi.

1. Gridler 30 dakika süreyle % 2'lik uranil asetat ile boyandı,
2. Distile su ile 1 dakika yıkandı,
3. Distile su ile 1 dakika yıkandı,
4. Distile su ile 1 dakika yıkandı,
5. Gridler kurutma kağıdı üzerine alınarak kurumaları için bekletildi,
6. Kuruyan gridler 5-7 dakika süre ile kurşun sitrat ile kontrastlandı,
7. Distile su ile 1 dakika yıkandı,
8. Distile su ile 1 dakika yıkandı,
9. Distile su ile 1 dakika yıkandı,
10. Gridler kurutma kağıdı üzerine alınarak kurutuldu.

Gridlerin boyanma protokollerinin tamamlanmasının ardından örnekler transmisyon elektron mikroskobunda (100 SX Jeol, Tokyo, Japan) incelenmeye hazır hale getirilerek görüntülendi.

3.3.4. Biyokimyasal Analiz

A.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD. Laboratuvarlarında Biyokimyasal ölçümlerin tamamı gerçekleştirilmiştir.

Deney sonunda elde edilen over dokuları çevre dokulardan disseke edilerek makroskopik olarak incelendikten sonra over dokuları biyokimyasal incelemeler için

-80°C’de saklandı. Dokuların enzim aktiviteleri en geç üç gün içerisinde analize alındı. Over dokusundan elde edilen homojenatların süpernatantları alınarak SOD, GSH ve enzim aktiviteleri ve MDA miktar tayinleri literatürlere dayalı uygun metotlar kullanılmak suretiyle ölçüldü. Tüm ölçümler oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

Over dokularından 0.50 mg alınarak uygulanacak biyokimya parametresine uygun tampon solüsyonundan da 1 ml alınarak, sterilize edilmiş çelik bilye içeren tüplere alındı. Dokular 2,5 dk 25 Hz’da Tissue Lyser II (Qiagen) homojenizasyon cihazı ile homojenize edildi.

3.3.4.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivite Tayini

Çalışmada Yararlanılan Kimyasallar: Assay buffer (pH:0.8, 0.1 mM diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), 50 mM Tris-HCl (Sigma T5941-500G)), Sample Buffer (pH:0.8, 50 mM Tris-HCl), Ksanthine Oxidase (Sigma X4875-40UN), Sod Standart (Bovine eritrosit SOD (Cu/Zn)(Sigma S7571-300KU)), Radical Detector (Tetrazolium tuzu (Sigma N6876-1G)), 0.6 mM 20 ml EDTA (Sigma- E9884-100G). 1.2 g / L BSA (Bovine Serum Albumine)(Sigma-A2153)

Deneyin yapılışı: Doku homojenizasyonu;

Eritrositler ve kan pıhtılarını uzaklaştırmak için dokular PBS kullanılarak yıkandı.

1. Sıvı azot kullanılarak dokular homejenize edildi.
2. 70 mM sükroz, 210 mM mannitol ve 1 mM etilen glikol-bis tetraasetik asit (EGTA) bulunan pH’ı 7.2 olan doku başına 1 ml soğuk HEPES buffer ve ultra turrax homojenizatör vasıtasıyla buz üzerinde bir dk homojenizasyon sağlandı.
3. Tüm dokular işlem sonuna kadar +4 °C saklandı.
4. +4 °C sıcaklıkta 1,500 x g’de 5 dk süreyle santrifüjleme işlemi yapıldı.

Ölçüm süpernatant kısmı kullanılarak gerçekleştirildi.

Çalışma 96 kuyucuklu platelerde yapıldı.

1. Numune kuyucuklarına 20 µl numune ve standart'lardan ilave edildi.
2. 200 µl seyreltilmiş radikal detektörü kuyulara eklendi ve 10 dakika çalkalayıcıda (karıştırıcıya) tutuldu.
3. Reaksiyonun başlaması amacıyla 20 µl seyreltilmiş ksantin oksidaz (KO) ilave edildi.
4. Plate'in üstü birkaç saniye kapalı olacak şekilde çalkalayıcıya konuldu.

24°C'de 20 dakika süreyle inkübe edilip sonrasında 460 nm dalga boyunda ELISA reader cihazında okutuldu. Standart ve numunelerin konsantrasyonları hesaplandı.

3.3.4.2. Malondialdehit (MDA) Miktar Ölçümü

Ölçüm yolağı: Serbest radikallerin hücre zarında oluşturduğu lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden olan malondialdehit (MDA) seviyesini belirlemede kullanılan yöntemlerin çoğu MDA'nın tiyobarbitürik asitle (TBA) verdiği reaksiyonu temel alır. İki molekül TBA ve bir molekül MDA, sabit kırmızı renk oluşturarak reaksiyona girer. Lipid peroksidasyonu (LPO) ölçümü, Ohkawa ve arkadaşlarının metoduna göre MDA'nın TBA asitle meydana getirdiği rengin 532 nm'de optik dansitesinin ölçülmesi prensibiyle yapıldı.

MDA Ölçümü: Ohkawa ve arkadaşlarının geliştirdiği yönteme göre belirlendi. 0.5 g dokuya 4,5 ml % 10 KCl katılarak homojenize edildi. Homojenatlar, 5000 x g'de 20 dakika santrifüj edildi ve bu alınan süpernatantlar, LPO düzeyinin belirlenmesinde kullanıldı. Kapaklı deney tüpleri içerisine 250 µl homojenat, %8'lik 100 µl SDS (sodyum dodesil sülfat (Sigma-I4390-500G)), % 20'lik 750 µl asetik asit, % 0.08'lik 750 µl TBA (T5500-25G) ve 150 µl saf su pipetlenerek vortekslendi. Karışım 100°C'de

60 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra üzerine 2,5 ml n-bütanol ilave edildi ve spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı.

532 nm’de 3 ml’lik küvetler kullanılarak meydana gelen kırmızı renk miktarları okunarak önceden hazırlanmış MDA çözeltisi kullanılarak standart grafiklerle örneklerin MDA miktarı belirlendi. Numunelerin LPO miktarları, nmol MDA/g doku olarak tarif edildi. Her bir numunenin ölçümü 3 kez tekrarlandı.

3.3.4.3. Glutasyon (GSH) Enzim Aktivite Tayini

Kullanılan reaktifler: Glutasyon reduktaz, Kromojen, Assay buffer, Metafosforik asit, Glutasyon disulfid, NADPH.

Dokuların homojenizasyonu;

1. Dokulardaki eritrositler ve kan pıhtısını uzaklaştırmak için PBS’yle yıkandı,
2. Sıvı azot ile dokuların homojenizasyonu sağlandı.
3. Sonra 1 ml MPA çözeltisi (5 g MPA kristalleri 100 ml deiyonize suda çözülür) eklenerek ve Ultra Turrax homojenizatörde 1 dakika buz üzerinde homojenize edildi.

Deneyin yapılışı;

1. Homojenize numuneler 15 dakika + 4 derece 12000 Rpm de santrifüjlenip süpernatantları ölçüm için toplandı,
2. 1 X glutasyon redüktaz 96 kuyuluk plate’e 25 µl herbir kuyuya eklendi,
3. 1 X NADPH solüsyonundan 25 µl herbir kuyuya eklendi,
4. Hazırlanan GSH standartlarından ve örneklerinden 190 µl her kuyuya eklendi,
5. Plate okuyucu, kinetik ölçüm için ayarlanarak 405 nm dalga boyunda hazırlanan plate okutuldu, 1 X kromojenden 50 µl eklenip karıştırıldı. Hızlı bir şekilde 10 dk boyunca, 1 dk aralıklarla 405 nm de absorbans okutularak, Standart ve numunelerin konsantrasyonları hesaplandı.

3.3.4.4. Ksantin Oksidaz (KO) Aktivite Ölçümü

Sıvı azot altında dokular homojenize edildikten sonra Ksantin Oksidaz (KO) Aktivite Assay kit (MAK078 SIGMA) kullanılarak ölçümler kit protokolünde belirtilen şekilde gerçekleştirildi.

3.3.5. Moleküler Analizler

3.3.5.1. Gerçek Zamanlı PCR (Real Time Polimeraz Chain Reaction)

A.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD'nın Moleküler Farmakoloji Laboratuvarlarında moleküler analizler gerçekleştirildi.

3.3.5.2. RNA İzolasyonu

-80°C de bulunan over dokuları yağ doku bölgesinden tamamen ayrılarak moleküler analizler için disseke edildi ve eppendorf tüp içerisine konuldu, RNA Later RNA Stabilization Reagent (Qiagen) solüsyonu tüm dokuyu kaplayacak şekilde üzerine eklendi. Doku içine geçmesini sağlamak için 24 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra 20°C'de saklandı.

RNA Laterdan çıkarılan dokular çelik jarların içerisine konularak sıvı azot ile mikroskopik parçalama yapıldı. Soğuk zincir korunarak, her gruptan 20 mg over dokusu alındı ve 6 µl β-merkaptoetanol (β-ME) (Aldrich-M6250-1L) + 600 µl Buffer RLT lysis(Qiagen) solüsyonuyla beraber içinde bir adet sterilize edilmiş çelik bilyeli plastik tüplere konularak homojenizasyon cihazı (Tissue Lyser II (Qiagen)) ile 3 dakika 25 Hz'de homojenize edildi. Homojenizasyon sonrası yeni bir eppendorf tüpe alındı ve 3 dk süreyle 13.000 rpm hızda santrifüjleme yapıldı.

Santrifüj sonrası süpernatantı başka bir tüpe alarak RNeasy Mini-Kit (cat no: 74106)'in protokolüne uygun olarak total RNA izolasyonu QIAcube (QIAGEN) yapıldı. RNA eppendorf içine alınarak -80°C'de saklandı.

3.3.5.3. RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

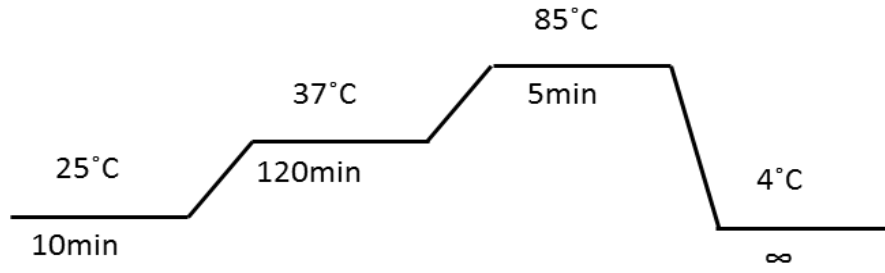
Çalışmada RNA miktarını ve saflığını saptamak için 995 µl dH₂O ve 5 µl RNA vortekslenerek karıştırıldı. Karışım spektrofotometre (EPOCH Take3 Plate, Biotek) kullanılarak 260 nm dalga boyunda ölçümler yapıldı.

3.3.5.4. Reverse Transkriptaz Reaksiyonu ve cDNA Sentezi

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit enzimi kullanılarak total RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. Reaksiyonlar Tablo 3.1 de belirtildiği şekilde hacim toplamda 10 µl RNA ile hazırlandı. cDNA'nın sentezlenmesi için Şekil 3.1 'de gösterilen sıcaklıklara göre Veriti 96 Well Thermal Cyclers (Applied Biosystem) kullanılarak gerçekleştirildi. cDNA'nın miktarları ölçülürken nano-drop spektrofotometri (EPOCH Take3 Plate, Biotek) kullanıldı. Örnekler -20°C'de muhafaza edildi.

Tablo 3.1. cDNA sentezi için kullanılan mix içeriği

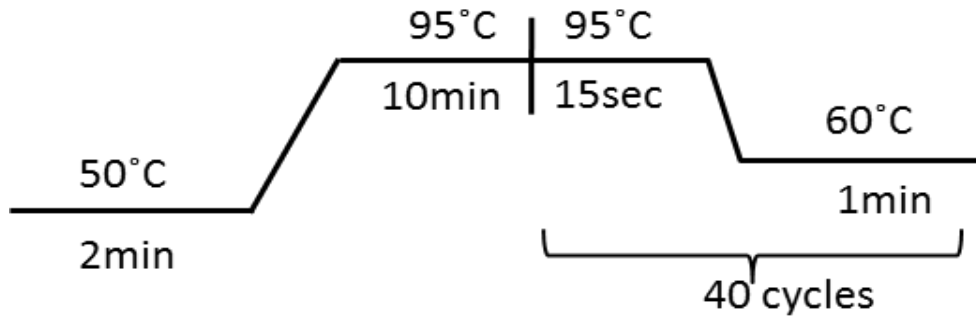
PCR Master mix içeriği	Mix Miktar (µl)
10X Buffer RT	2
25 X dNTPs mix	0,8
10 X RT Random Primers	2
MultiScribe Reverse Transcriptase	1
DEPC-H ₂ O	4,2
RNA	10
Toplam	20



Şekil 3.2. Termal döngü koşulları

3.3.5.5. Gerçek Zamanlı PCR Primerleri ve Çalışma Prensibi

Sıçan over dokularında rölatif NF- κ B, Nos2 (iNOS), Nos3 (eNOS), TNF- α , IL-1 β ve IL-6 mRNA ekspresyonları Step One Plus Real Time PCR System technology (Applied Biosystem) cihazıyla ölçüldü. TaqMan bazlı genlerin primer problemleri (Tablo 3.2) Primer Design Ltd. firmasına dizayn ettirilerek temini sağlandı (Southampton,UK). Bulgular ise kontrole kıyasla rölatif kat olacak şekilde değerlendirildi. β -actin endojen kontrol geni olarak kullanıldı. Her cDNA örneğine üçlü tekrar yapıldı. Real Time PCR reaksiyonu için 96 kuyucuklu plaklar kullanılarak 1 μ l Primer Perfect Probe mix, 10 μ l QuantiTect Probe PCR Master miks (Qiagen, Hilden, Germany) ve 9 μ l cDNA (100 ng) şeklinde toplam reaksiyon hacmi her kuyucuk için 20 μ l'ye tamamlandı. qPCR reaksiyon için hazırlanan plak Şekil 3.3 de belirtilen şartlarda sürdürüldü. Verilerin sham/kontrol grubu ile karşılaştırmalı olacak şekilde $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metoduna uygun olarak hesaplaması yapıldı.⁷⁵



Şekil 3.3. Gerçek Zamanlı PCR Reaksiyon ısı ve süreleri

Tablo 3.2. Rölatif Gene Ekspresyonu Primer/Prob Dizilimleri

Primer	Prob Dizilimleri
NOS2 (iNOS)	F: 5'-CACCACCCTCCTTGTTCAAC-3'
	R: 5'-CAATCCACAACCTCGCTCCAA-3'
Rn00561646	
NOS3 (eNOS)	F: 5'-CCGATTACACGACATTGAGATC-3'
	R: 5'-CGGTAGAGATGGTCCAGTTG-3'
Rn02132634	
NF-κB	F: 5'-ATCATCAACATGAGAAACGATCTGTA-3'
	R: 5'-CAG CGG TCC AGA AGA CTC AG-3'
Rn01399583	
TNF-α	F: 5'-GCT CCC TCT CAT CAG TTC CA -3'
	R: 5'-CTC CTC TGC TTG GTG GTT TG-3'
Rn00562055	
IL-1B	F: 5'-AGTGCTGACAATCTGTATGTACC-3'
	R: 5'-ACTAGGCTTTGCTCTTCTCTTAC-3'
Rn00580432	
IL-6	F: 5'-GCA GAA AAC AAC CTG AAC CTT-3'
	R: 5'-ACC TCA AAC TCC AAA AGA CCA-3'
Rn01410330	
Actin-β	F: 5'-TGG TGG GTA TGG GTC AGA AG-3'
	R: 5'-GAC AAT GCC GTG TTC AAT GG-3'
Rn00667869	

DNA çift sarmalı birbirinden ayrılarak tek iplikli duruma geldi. Sonrasında hibridizasyon basamağına geçilerek primerler bağlandı. Çoğaltılacak bölge kesildi ve polimerizasyon basamağına geçilerek sentez işlemi başladı. Hem hibridizasyon hem de polimerizasyon 40 döngü şeklinde devam ettirildi (95°C’de 15 saniye kalarak denatüre olur ve sentezlenen kısma tekrar primer bağlanmasını sağlar). 40 döngü bittiğinde her örneğin amplifikasyon kalitelerini anlayabilmek amacıyla 55°C sıcaklıktan 95°C sıcaklığa hızlı şekilde ısınması sağlandı ve bu şekilde melt analizi yapıldı.

3.3.6. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler

Çalışmadan çıkan sonuçlar ortalama (ort) $\pm$ standart sapma (ss) olarak değerlendirildi. P değerleri olarak 0.05’in ($p < 0.05$) altındaki veriler istatistiksel açıdan anlamlı olarak sayıldı. Çalışma grupları arasındaki farkın önemlilik derecesi değerlendirilirken tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testindeki post-hoc testlerinden “Duncan” tekniği kullanıldı. Her bir farklı harf diğer gruptan istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir. Aynı harfler anlamsız olduğunu göstermektedir.

4. BULGULAR

4.1. Işık Mikroskopik Bulgular

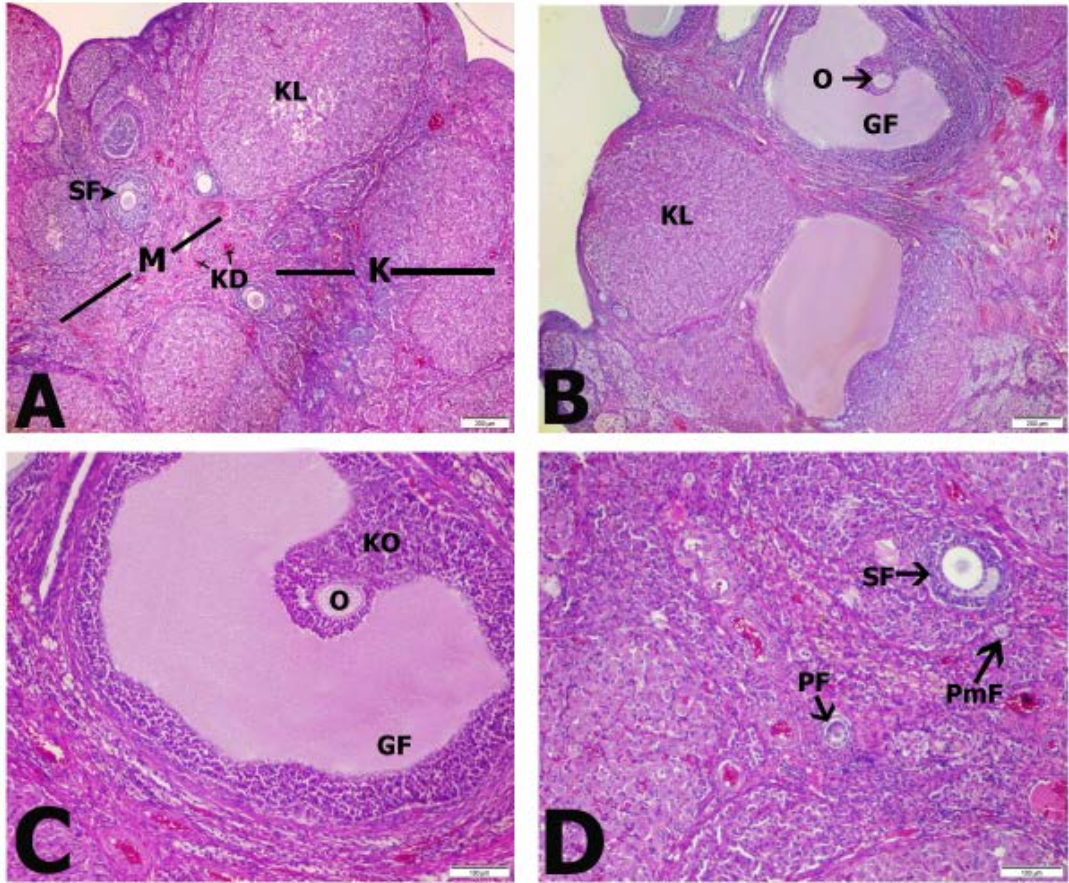
4.1.1. Histopatolojik Bulgular

Çalışmamızın değerlendirilme aşamasında deney hayvanlarından alınan birer over histolojik olarak incelendi. Her grup için toplam altı alan taranarak, vasküler konjesyon, ödem, kanama (hemoraji) ve inflamatuvar hücreler parametrelerine bakılarak skorlama yapıldı. Skorlamada 1 değeri- değişiklik bulunmadığını, 2 değeri- değişikliğin hafif düzeyde olduğunu, 3 değeri- değişikliğin orta düzeyde olduğunu, 4 değeri- değişikliğin şiddetli düzeyde olduğunu göstermektedir. (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Histopatolojik skorlama verileri

Grup	Ödem	Vasküler Konjesyon	Hemoraji	Polimorf Nüveli Lökosit (PMNL)
Sham	Yok	Yok	Yok	Yok
I/30	Hafif	Hafif	Yok	Hafif
I/60	Hafif	Orta	Orta	Hafif
I/90	Orta	Şiddetli	Şiddetli	Orta
I/120	Şiddetli	Şiddetli	Şiddetli	Orta
I/150	Şiddetli	Şiddetli	Şiddetli	Şiddetli
I/180	Şiddetli	Orta	Şiddetli	Şiddetli
IR/30	Şiddetli	Orta	Şiddetli	Şiddetli
IR/60	Orta	Şiddetli	Şiddetli	Şiddetli
IR/90	Orta	Şiddetli	Şiddetli	Şiddetli
IR/120	Hafif	Orta	Şiddetli	Şiddetli
IR/150	Hafif	Hafif	Orta	Orta
IR/180	Hafif	Hafif	Orta	Orta

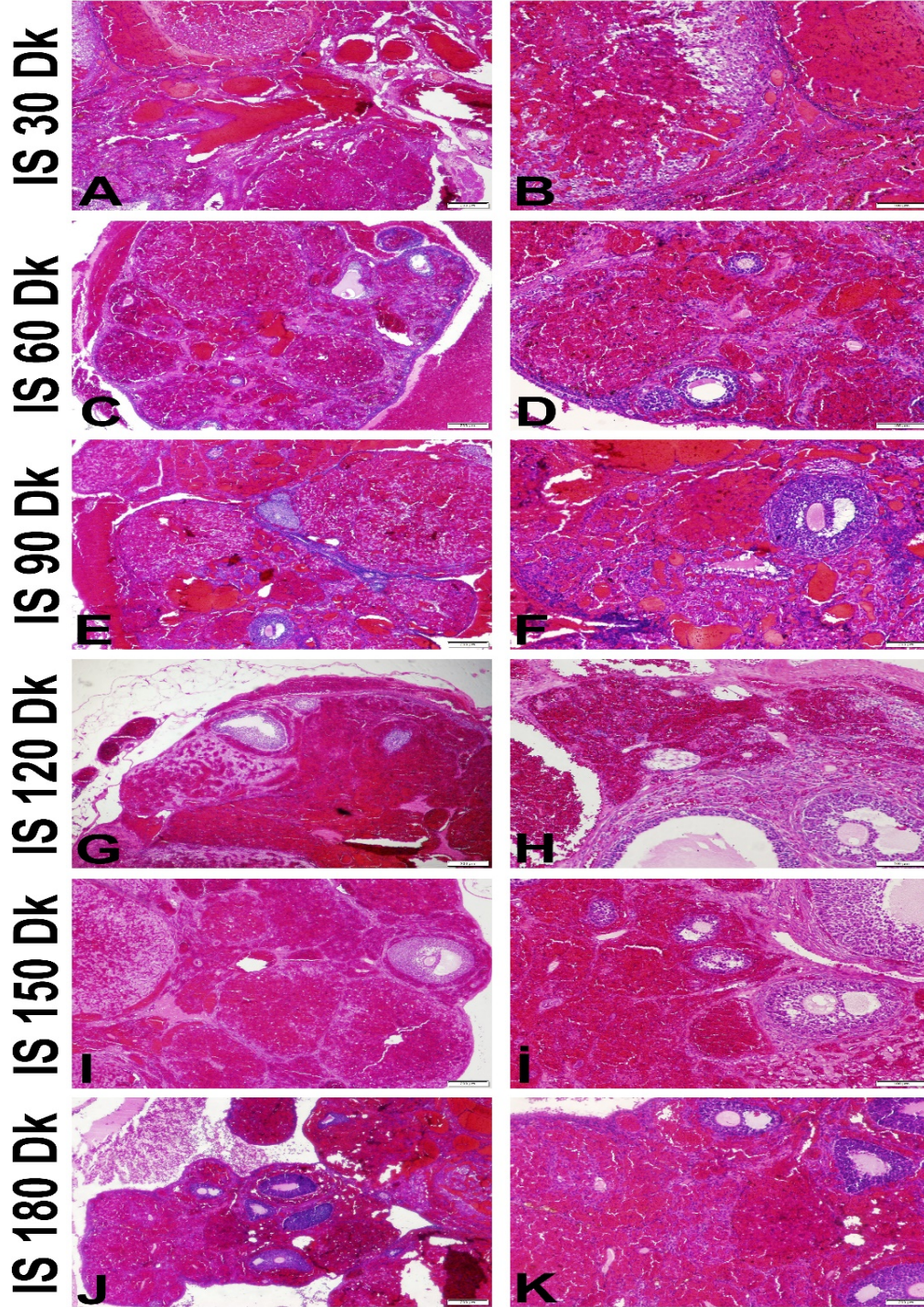
Sham/kontrol grubuna ait kesitler incelendiğinde korteks ve medullanın sağlıklı bir over histolojine sahip olduğu görüldü. Kesitlerin ovaryum yüzeylerine baktığımızda germinal epitelin sınırlarını koruduğu, sıkı bağ dokusundan oluşan tunika albugineanın ise normal şekilde olduğu ayırt edilmekteydi. Korteks tabakasında çok sayıda primordiyal, primer ve sekonder foliküller bulunmaktaydı. Hem granüloza tabakası hem de teka tabakasının sekonder foliküllerde normal görünümde olduğu izlenmekteydi. Ayrıca kortekste çok miktarda korpus luteum olduğu görülmekteydi. Medulla bölgesinde bulunan arter ve venler de sağlıklı bir görünümdeydi (Şekil 4.1 A-D).



Şekil 4.1. Sham/kontrol grubu ışık mikroskopik kesitler. **PmF:** Primordial Folikül, **PF:** Primer Folikül, **SF:** Sekonder Folikül, **KO:** Kümlüs ooforus, **GF:** Graaf folikülü, **M:** Medulla **K:** Korteks **O:** Oosit **KL:** Korpus Luteum. (Büyütme: A,B-4X, C,D-10X) (Boya: Mayer's hemotoksilen &Eozin)

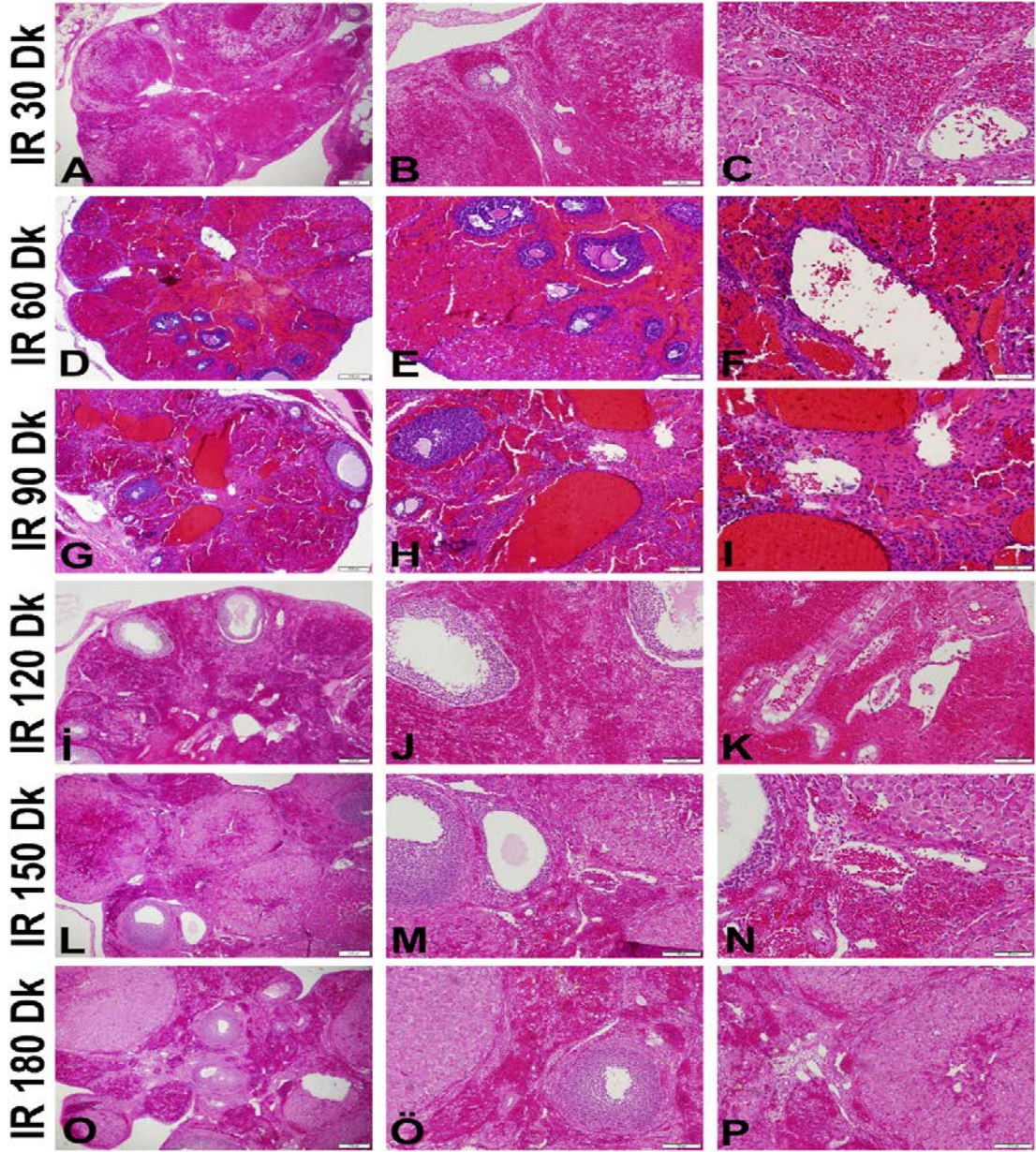
İskemi grupları incelendiğinde, artan sürelerde, ovaryan kortekste oluşan hemorajinin yoğunlaşarak arttığı görüldü. Ovaryan medullaya bakıldığında, artan

iskemi süreleriyle beraber vasküler konjesyonun sırasıyla I/30, I/60, I/90 ve I/120 gruplarında arttığı izlendi. Ovaryumu besleyen kan damarlarında tıkanmalara bağlı dilatasyon bulguları görüldü. Ayrıca damar endoteline PMNL göçünün başladığı ve bu alanlardan bağ dokuya geçen savunma hücrelerinin artan iskemi sürelerinde yoğunlaştığı görüldü (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. İskemi gruplarına ait ışık mikroskopik kesitler. (Büyütme: A,C,E,G,I,J-4X, B,D,F,H,I,K-10X) (Boya: Mayer's hemotoksilen &Eozin)

İskemi/reperfüzyon grupları incelendiğinde, artan sürelerde, ovarian kortekste oluşan hemorajinin IR/60, IR/90 ve IR/120 gruplarında yoğunlaşarak arttığı görüldü. Ovarian medullaya bakıldığında, iskemi sonrası artan reperfüzyon sürelerinde vasküler konjesyonun şiddetini IR/60, IR/90 ve IR/120 gruplarında arttırdığı izlendi. Ayrıca damar endotelinden PMNL göçünün başladığı ve bu alanlardan bağ dokuya geçen hücrelerin IR/60, IR/90, IR/120 ve IR/150 gruplarında yoğunlaştığı görüldü (Şekil 4.3)

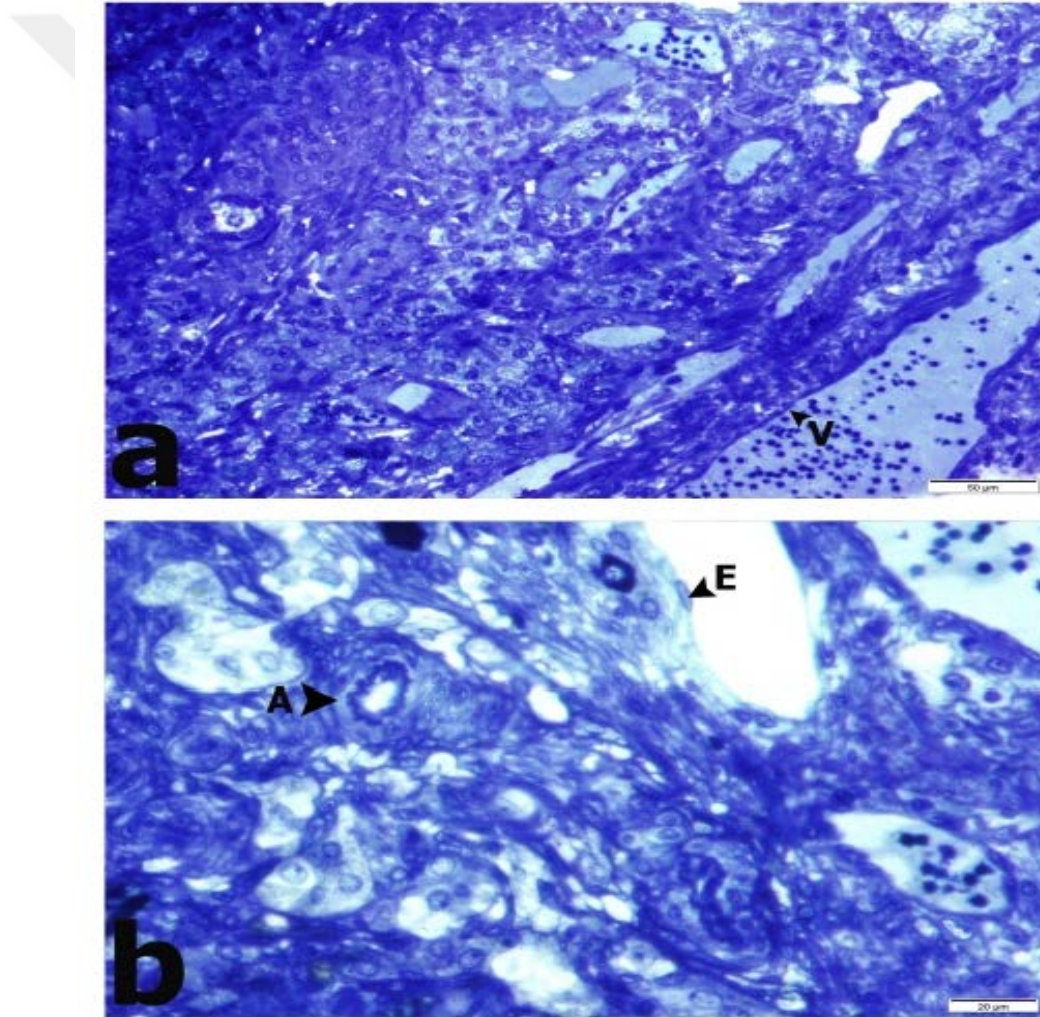


Şekil 4.3. İskemi/reperfüzyon gruplarına ait ışık mikroskopik kesitler. (Büyütme: A,D,G,İ,L,O-4X, B,E,F,H,J,M,Ö,P-10X, C,I,K,N-20X) (Boya: Mayer's hemotoksilen &Eozin)

4.1.2. Yarı İnce Kesitlerin Değerlendirilmesi

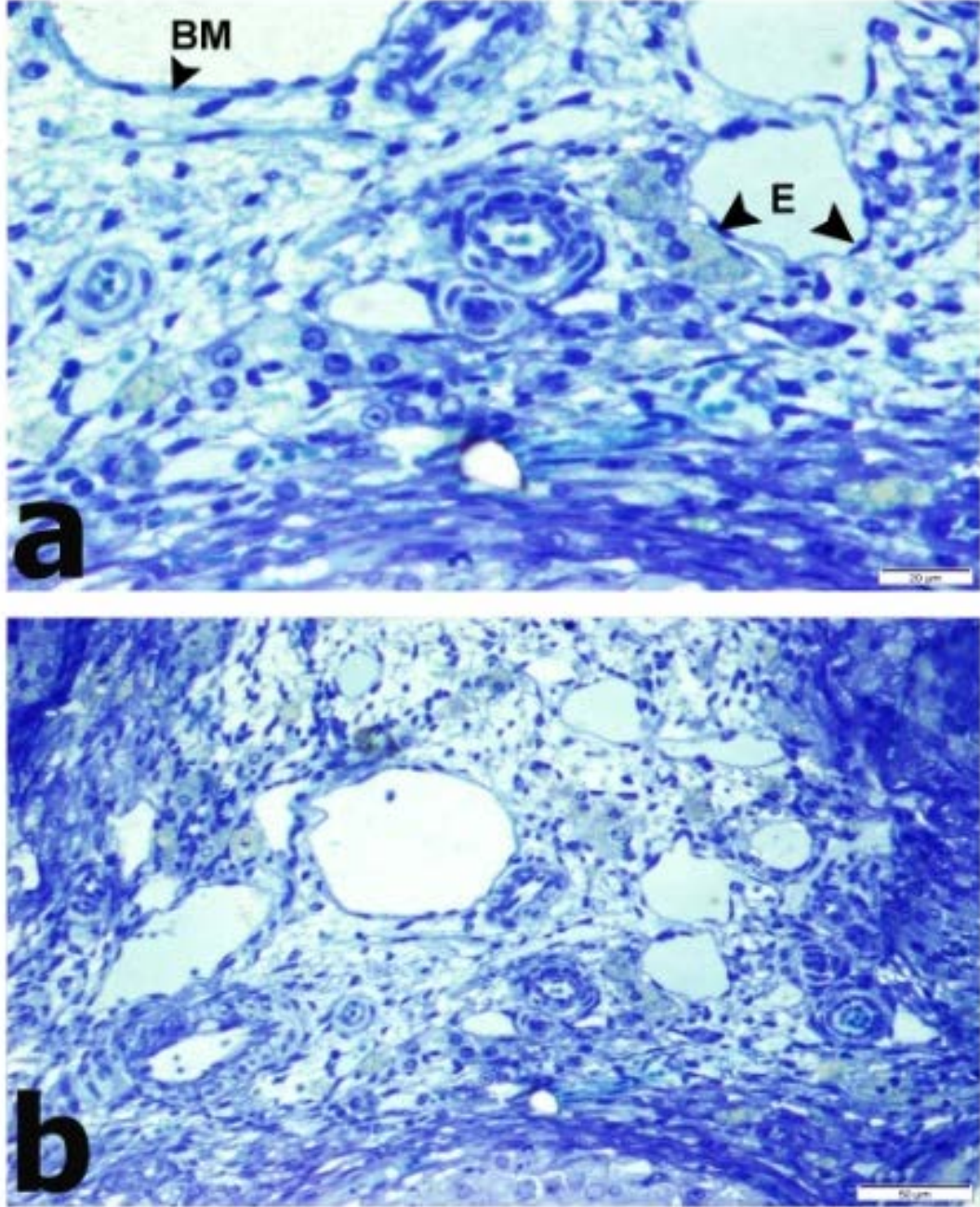
Toluidin blue boyaması ile boyanmış olan yarı ince kesitlerde özellikle vasküler alanlardaki yapılar incelendi. Arter ve venlerde meydana gelen yapısal değişiklikler ultrastrüktürel inceleme öncesi histolojik olarak incelenerek, damar endoteli ve damar duvarı farklılaşmaları göz önünde bulundurularak değerlendirildi.

Sham grubuna ait kesitleri incelediğimizde damar duvarı düzgün olarak gözlenmekteydi. Aynı şekilde arteriöl damar lümeni de sağlıklı yapısını korumaktaydı (Şekil 4.4).



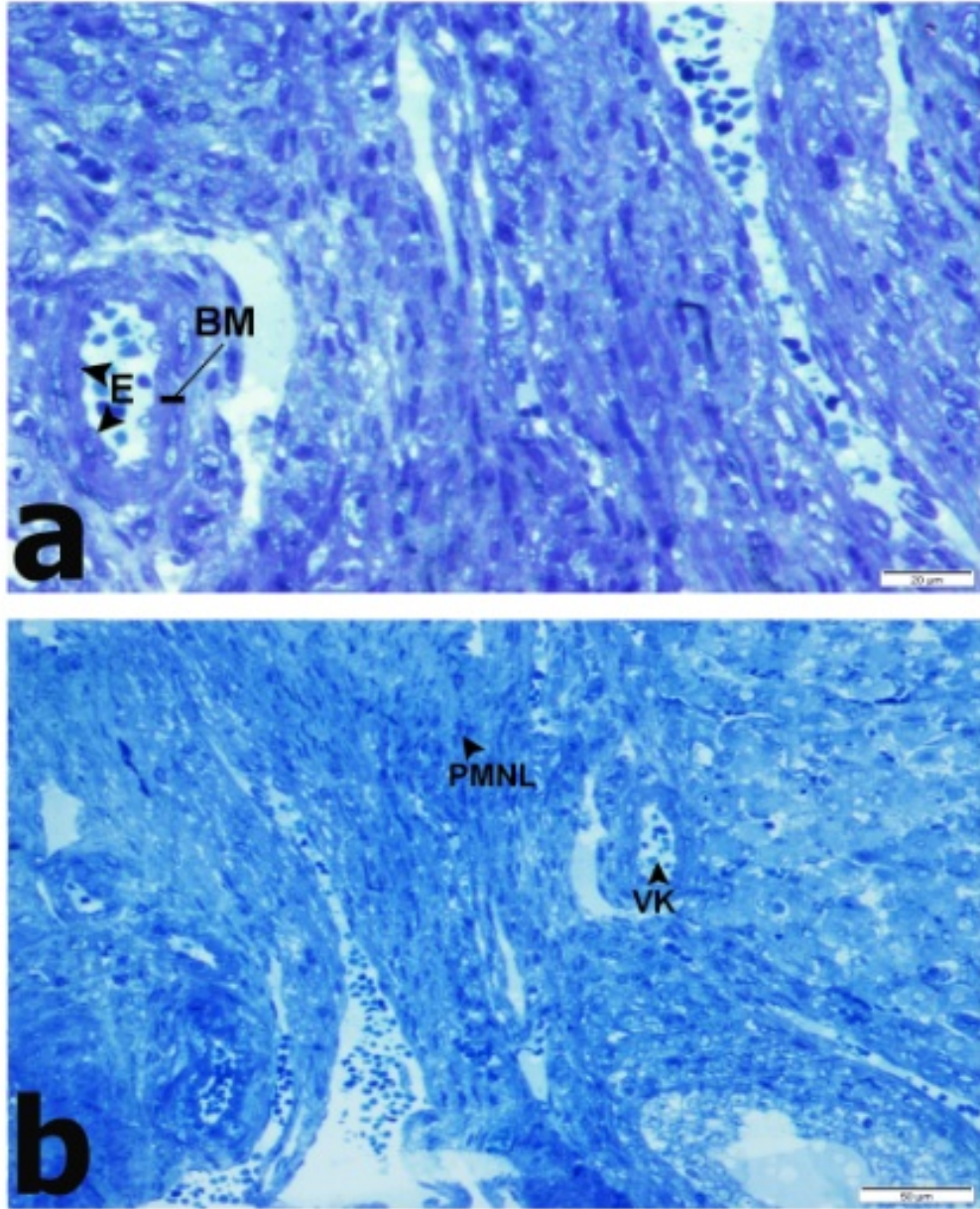
Şekil 4.4. Sham/kontrol grubuna ait yarı ince kesitlerde vasküler yapılar. **A:** Arter, **V:** Ven **E:** Endotel. (Büyütme: a-20X, b-40X)(Boya: Toluidin blue)

I/30 grubunun vasküler yapılarında meydana gelen değişimleri değerlendirdiğimiz zaman bazal membranda hafif kalınlaşmalar dikkat çekmekteydi. Damar lümeni düzenli görünümde izlenirken, damar duvarında bulunan endotel hücreleri de yapılarını korumaktaydı (Şekil 4.5).



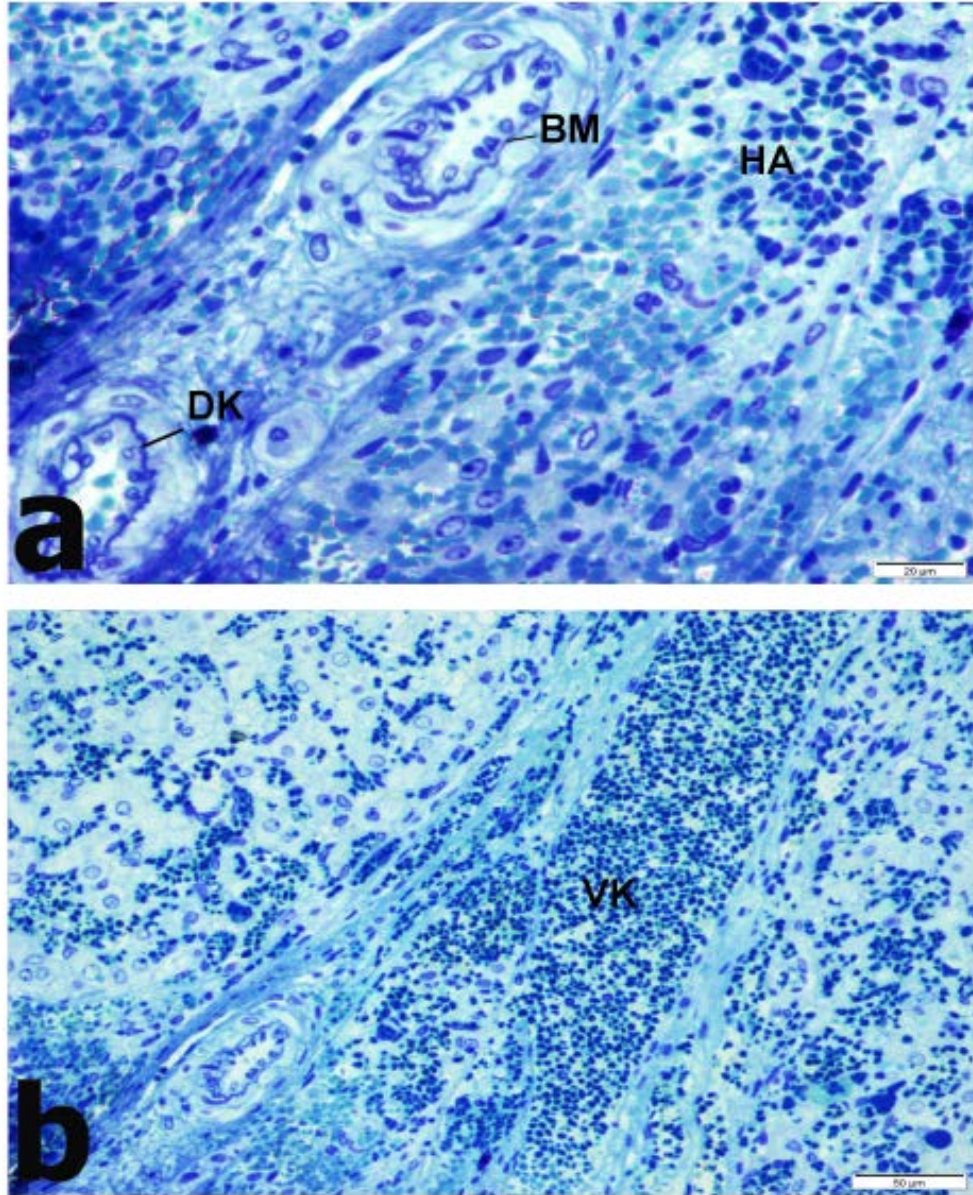
Şekil 4.5. İskemi 30 grubuna ait yarı ince kesitlerde vasküler değişimler. **E:**Endotel, **BM:** Bazal Mebmrn (Büyütme: a- 20X, b- 40X)(Boya: Toluidin blue)

I/60 grubuna ait yarı ince kesitleri değerlendirdiğimizde damarların bazal membranının irregüler bir görünüm kazandığı ve kalınlaşmanın arttığı görülmektedir. Aynı zamanda vasküler konjesyonun artmaya başladığı tespit edildi. I/30 grubundan farklı olarak damarların endotel hücrelerinde yapısal değişimlerin olduğu izlenmektedir. Ayrıca ovaryumların stromasında hücresel elemanların artışı da dikkat çekmekteydi (Şekil 4.6).



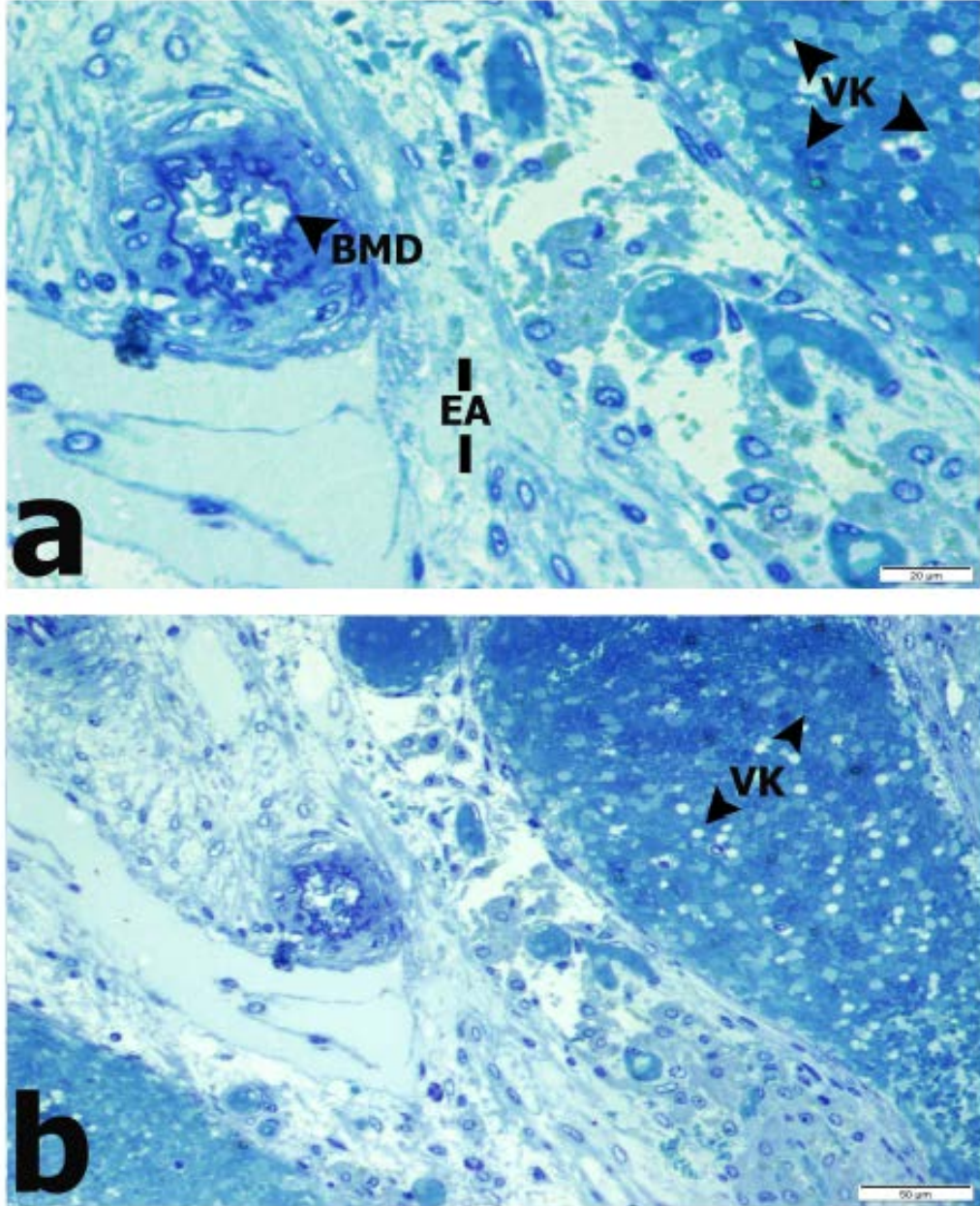
Şekil 4.6. İskemi 60 grubuna ait yarı ince kesitlerde vasküler değişimler. **E:** Endotel, **BM:** Bazal Mebman, **VK:** Vasküler Konjesyon, **PMNL:** Polimorfo nükleer lökosit. (Büyütme: a- 20X, b- 40X)(Boya: Toluidin blue)

I/90 grubundaki hayvanların ovaryum dokularını incelediğimiz zaman bazal membran bütünlüğünde bozulmaların başladığı görülmektedir. Endotel hücrelerinde kalınlaşmalar sayesinde lümeneye doğru belirginleşmeler izlenmektedir. Ekstravasküler hemorajinin artmaya başladığı gözlenmektedir. Ayrıca damar duvarının kalınlığı belirgin şekilde artması bu grupta tespit ettiğimiz önemli bulgulardandı (Şekil 4.7).



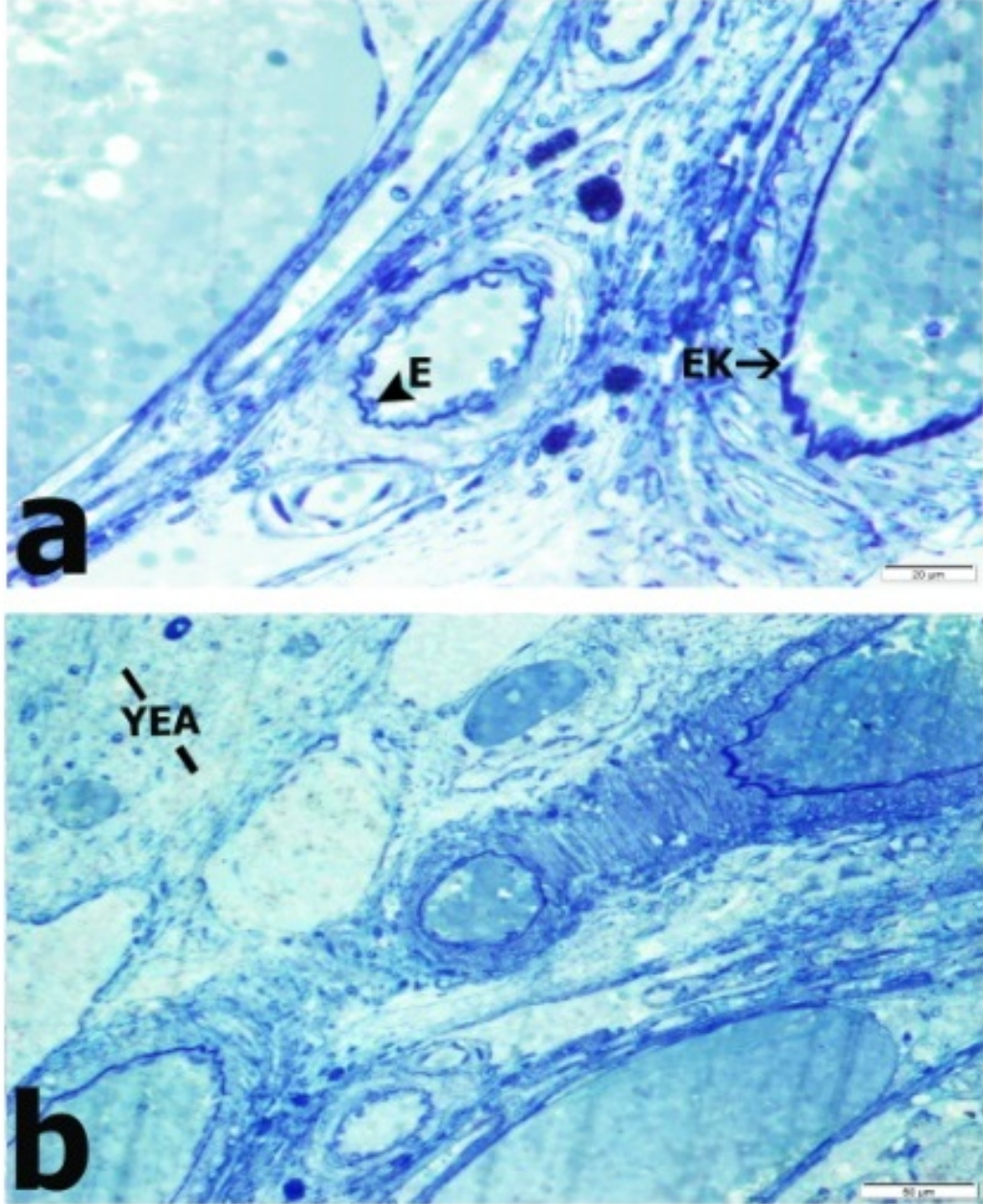
Şekil 4.7. İskemi 90 grubuna ait yarı ince kesitlerde vasküler değişimler. **VK:** Vasküler Konjesyon, **BM:** Bazal Membran, **HA:** Hemoraji Alanı, **DK:** Damar Duvarı Kalınlaşması. (Büyütme: a- 20X, b- 40X)(Boya: Toluidin blue)

I/120 grubunun yarı ince kesitlerini histolojik açıdan incelediğimizde damarların bazal membranının belirgin biçimde bozulmaya uğradığını ve kalınlaştığını tespit ettik. Damar lümeninin bariz irregüler yapı şeklinde izlenmesi bu grubun dikkat çekici bulgularındandı. Bu değişikliklerle birlikte damar dışındaki stromada ödemler bulunmaktaydı. Ekstravasküler hemorajinin arttığı da görülmektedir (Şekil 4.8).



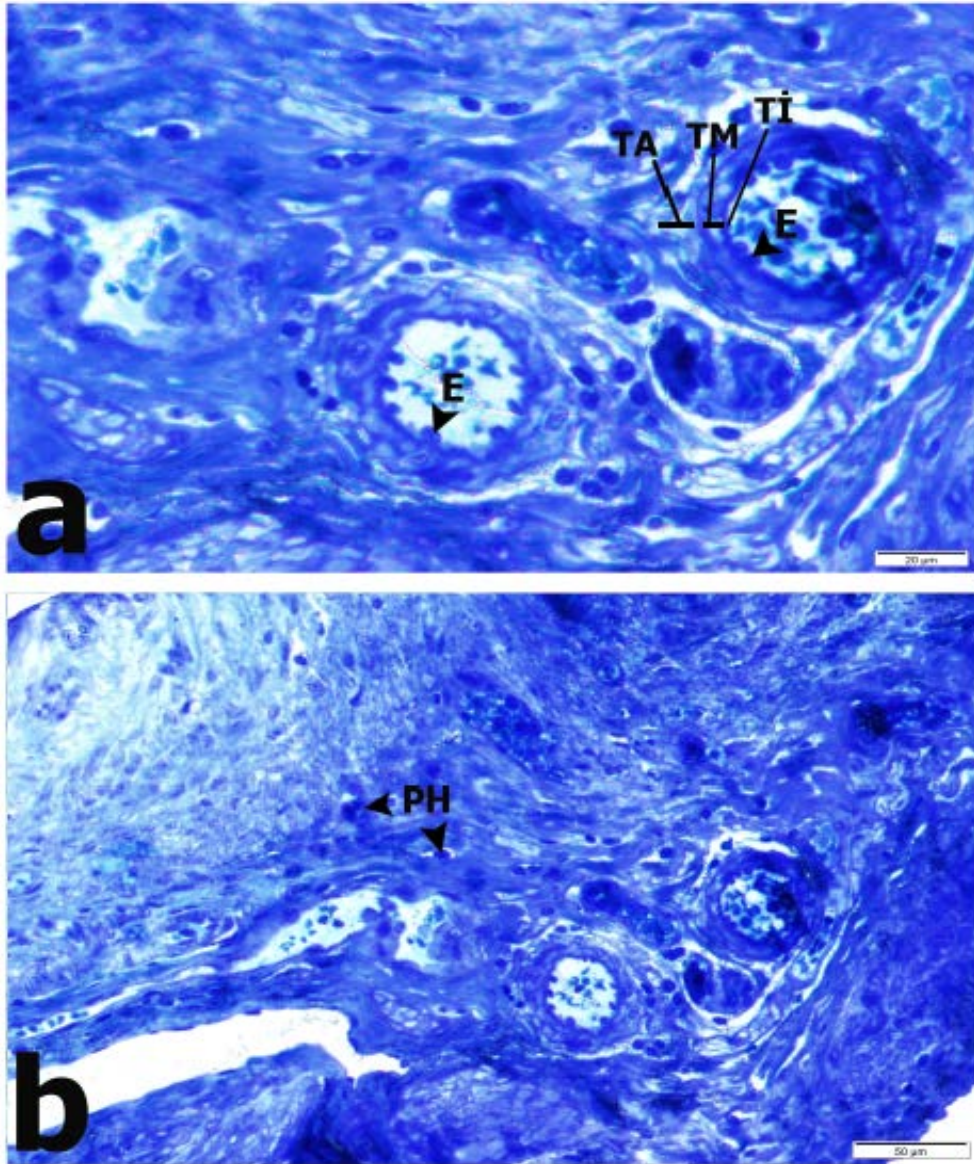
Şekil 4.8. İskemi 120 grubuna ait yarı ince kesitlerde vasküler değişimler. **VK:** Vasküler Konjesyon, **BMD:** Bazal Mebman Değişimi, **EA:** Ödem Alanı. (Büyütme: a-20X, b-40X) (Boya: Toluidin blue)

I/150 grubuna ait kesitleri değerlendirirken yassı endotel hücrelerinin şişerek epitel boyutunu değiştirdiği izlenmekteydi. Bazal membranın düzensizliği devam ederken, yer yer incelerek kesintiye uğradığı önemli bulgulardandı. Stromada I/120 grubunda görülmeye başlanan ödem bu grupta da devam etmekteydi (Şekil 4.9).



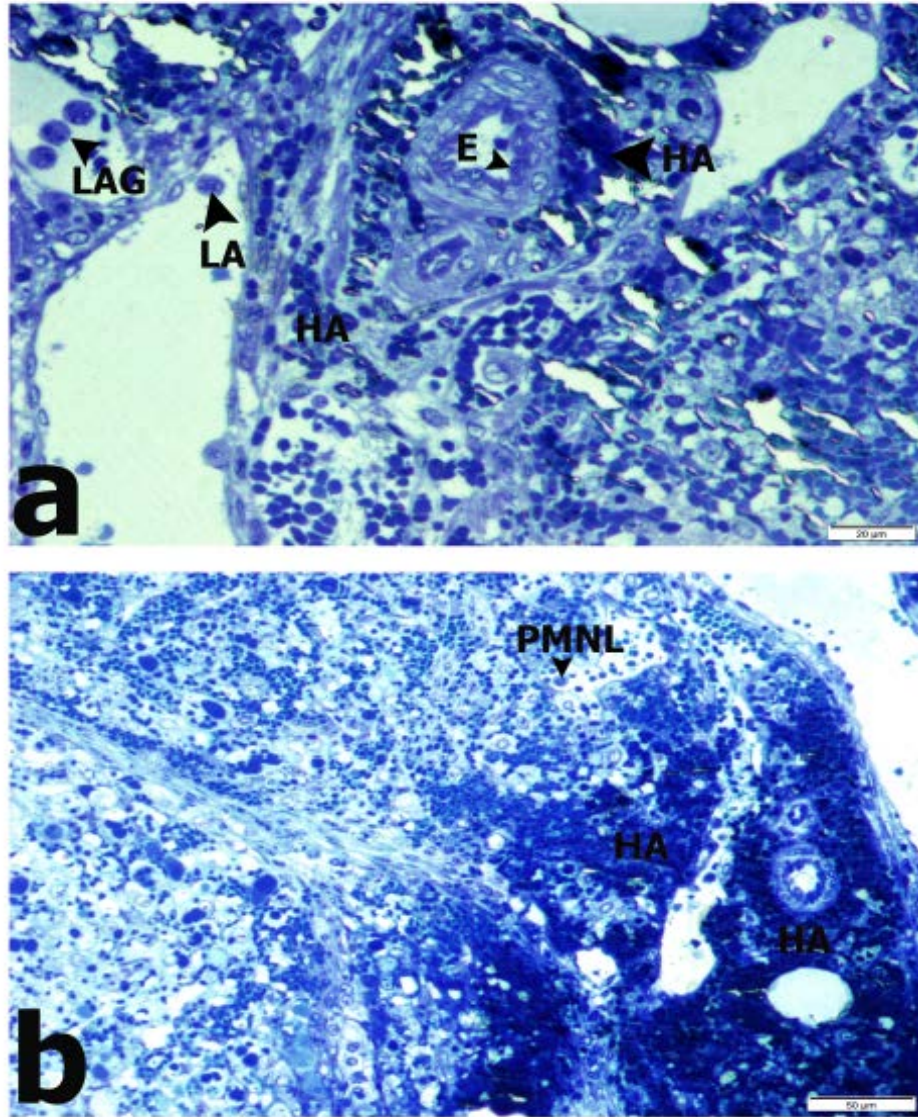
Şekil 4.9. İskemi 150 grubuna ait yarı ince kesitlerde vasküler değişimler. **YEA:** Yoğun ödem alanı, **EK:** Endotelyal kesinti, **E:**Endotel. (Büyütme: a- 20X, b- 40X) (Boya: Toluidin blue)

I/180 grubu yarı ince kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüleri incelendiğinde bazal membranın kalınlaştığı, aynı zamanda endotel hücrelerinin boyutlarının daha da arttığı ve damar lümenine doğru belirginleştiği izlenmekteydi. Damar duvarındaki hücresel değişimler sadece tunika intimayla sınırlı kalmamış, aynı şekilde tunika media ve tunika adventisyada da devam etmekteydi. Stroma hücreleri arasında da yer yer piknotik çekirdekli hücreler dikkat çekmekteydi (Şekil 4.10).



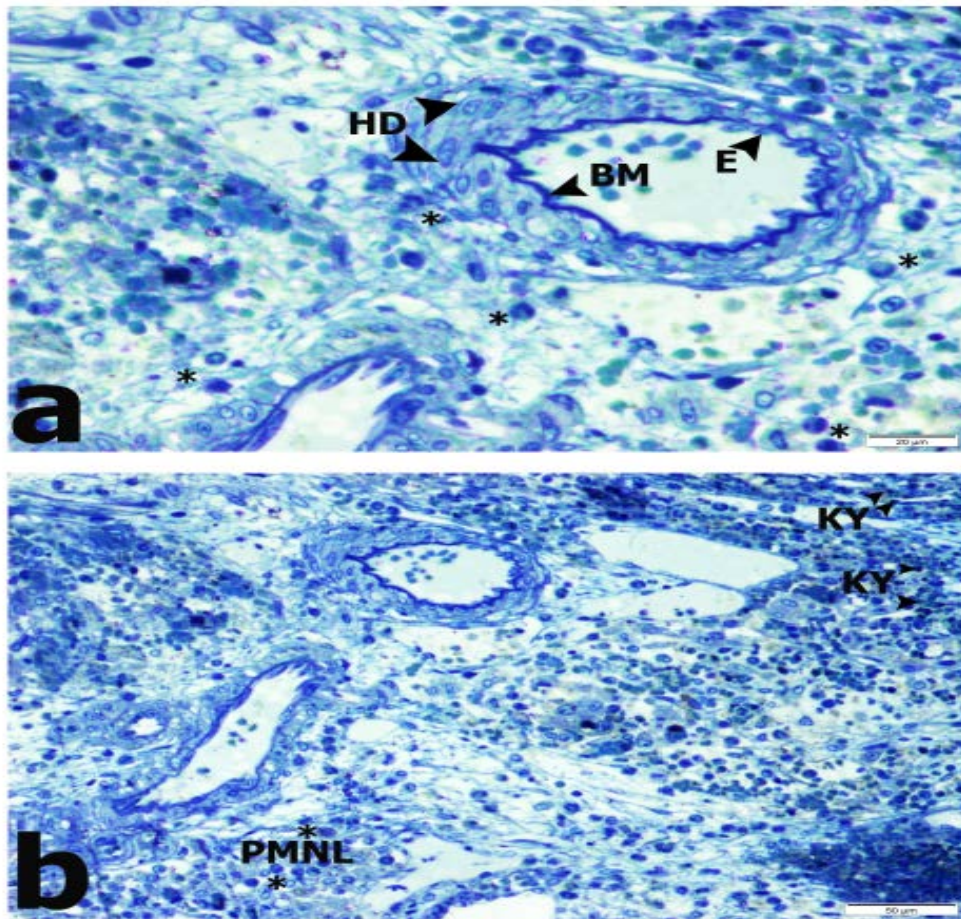
Şekil 4.10. İskemi 180 grubuna ait yarı ince kesitlerde vasküler değişimler. **E:**Endotel **PH:** Piknotik Hücre, **Tİ:** Tunika İntima, **TM:** Tunika Media, **TA:** Tunika Adventisya. (Büyütme: a-20X, b-40X)(Boya: Toluidin blue)

IR/30 grubunun kesitlerini histolojik olarak değerlendirdiğimiz zaman damarların endotel hücrelerinin dejenerasyona uğradığını tespit ettik. Endotel hücrelerinin boyutları çok fazla artmakla birlikte endotelin bütünlüğünde bozulmalar ve buna bağlı yer yer bazı bölgelerde epitelin dökülmesi dikkat çekici bulgulardandı. İntravasküler alanda lökosit agregasyonu ve lökosit adezyonu gerçekleştiği görüldü. Stromada ve özellikle damar çevresinde ekstravasküler hemorajinin artışı ve bununla birlikte PMNL'nin dokuda yoğunlaştığı görüldü. (Şekil 4.11).



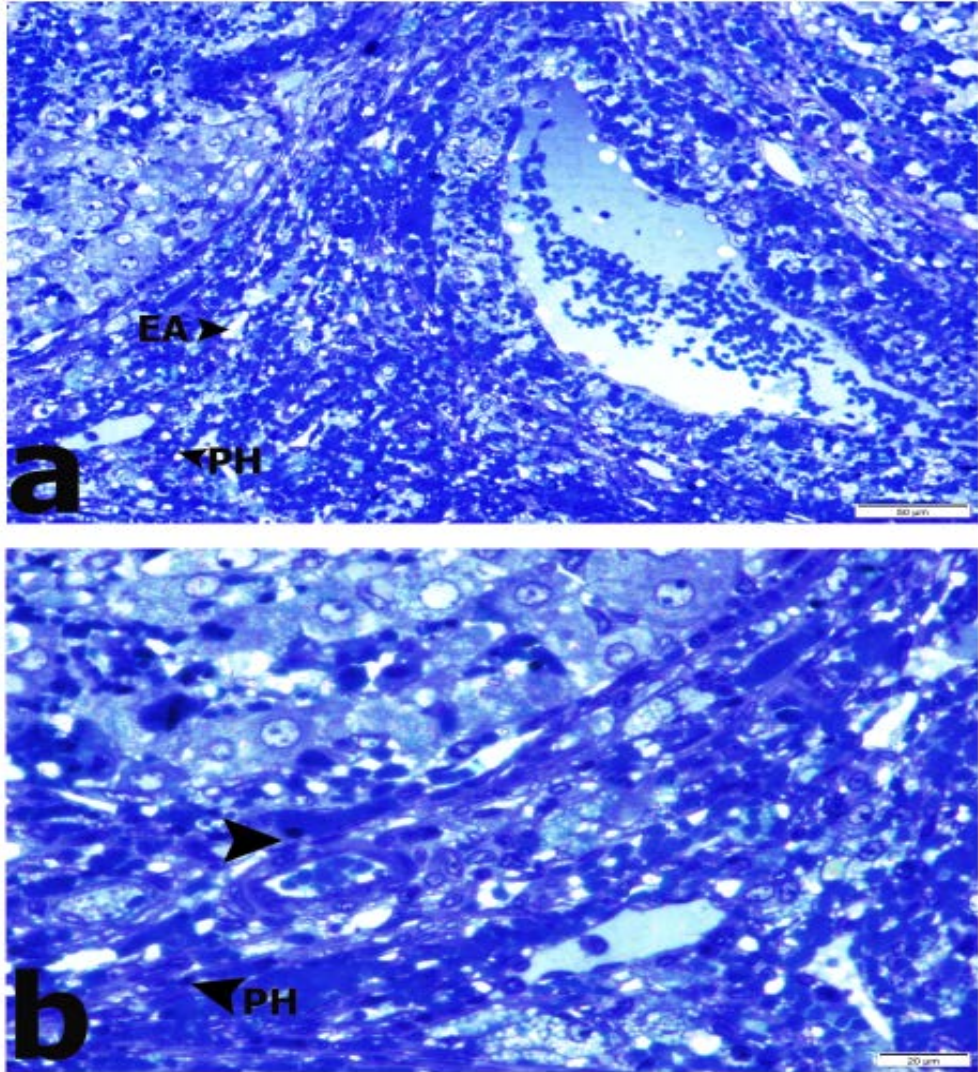
Şekil 4.11. İskemi/reperfüzyon 30 grubuna ait yarı ince kesitlerde vasküler değişimler. **E:** Endotel, **HA:** Hemoraji Alanı, **PMNL:** Polimorfo nükleer lökosit, **LAG:** Lökosit agregasyonu, **LA:** Lökosit adezyonu (Büyütme: a-20X, b-40X)(Boya: Toluidin blue)

IR/60 grubuna ait yarı ince kesitlerin incelenmesinde damar endotelinin değişikliğe uğradığı, endotel hücrelerinin sitoplazma hacminin arttığı, bazı endotel hücrelerinin yapısal değişiklikleri sayesinde sınırlarının düzensizleşmeye başladığı dikkat çekmekteydi. Aynı zamanda endotelin altında yer alan bazal membranın sınırlarının düzensiz şekil aldığı görüldü. Damar duvarını oluşturan tunika media'ya ait düz kas hücrelerinin de hipertrofik görünümü IR/60 grubuna ait bulgular arasındaydı. Doku içindeki PMNL infiltrasyonu daha da belirginleşmekteydi. Stroma içinde hücresel elemanların artışıyla birlikte, özellikle damar çevresinde yerleşen bağ doku içerisindeki hücrelerde kromatinin yoğunlaştığı bariz bir şekilde izlenmekteydi (Şekil 4.12).



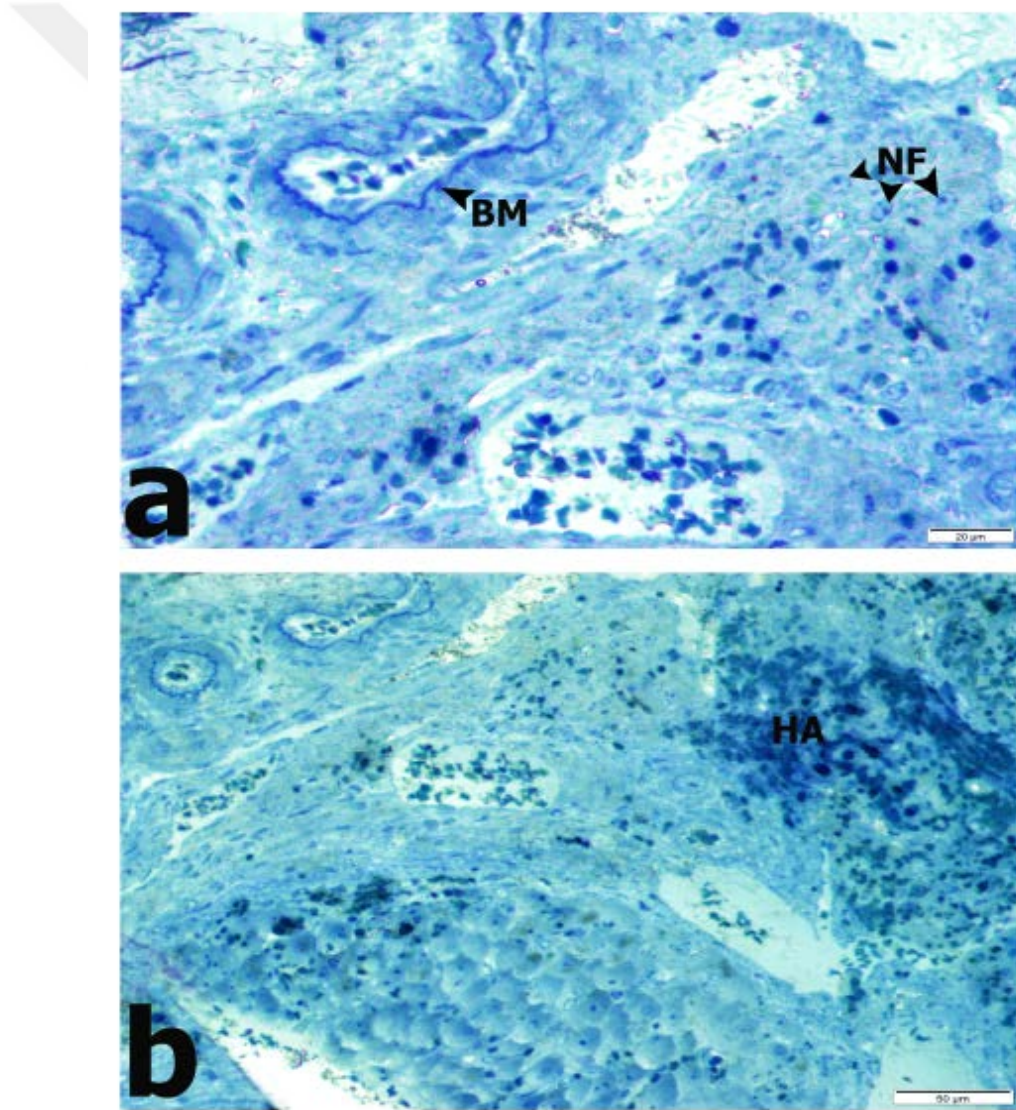
Şekil 4.12. İskemi/reperfüzyon 60 grubuna ait yarı ince kesitlerde vasküler değişimler. E: Endotel, BM: Bazal Membran HD: Hipertrofik Değişimler, KY: Kromatin Yoğunlaşması, PMNL: Polimorfo nükleer lökosit. (Büyütme: a- 20X, b- 40X) (Boya: Toluidin blue)

IR/90 grubunun yarı ince kesitlerinin ışık mikroskopik değerlendirilmesinde over dokusu içerisinde hemorajinin yoğunluğunun arttığı ve buna paralel olarak intravasküler hemorajinin de belirginleştiği görüldü. Bağ dokudaki hücreler arasında ödem artışı, bununla birlikte hücrelerin sitoplazmik hacimlerinin artması sayesinde şişmeye başladığı tespit edildi. Stromadaki bazı hücrelerin piknotik çekirdekleri de dikkat çeken bulgulardandı. Damar endotelinin sınırları irregüler olarak izlenirken, endotelin bütünlüğünü bazı yerlerde kaybettiği, endotel hücrelerindeki dökülmelerin de IR/30 ve IR/60 gruplarında olduğu görüldü (Şekil 4.13).



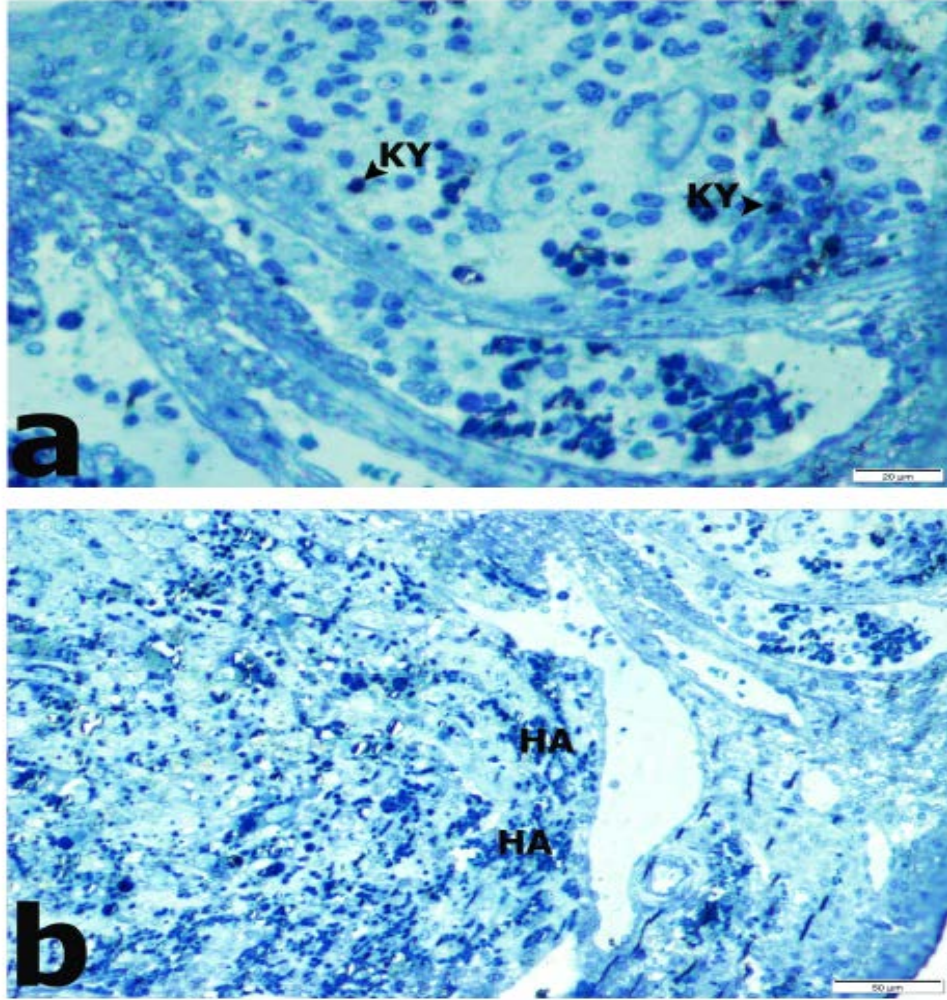
Şekil 4.13. İskemi/reperfüzyon 90 grubuna ait yarı ince kesitlerde vasküler değişimler. EA: Ödem Alanı, PH: Piknotik Hücre. (Büyütme: a-20X, b-40X)(Boya: Toluidin blue)

IR/120 grubundaki hayvanların over dokularının histolojik değerlendirmesinde hem stroma içerisine hemorajinin, hem de bağ dokudaki hücrelerin şişmesinin devam ettiği tespit edildi. Bağ doku içindeki diğer hücrelerden şişkinliği ile farklılaşan bu hücrelerin nükleer kromatinlerinin de yoğunlaştığı görülmekteydi. Damar endotelini oluşturan hücrelerin membranlarının irregüler yapısı dikkat çekerken, endoteli sınırlayan bazal membranın da düzensizliği bulunmaktaydı. Dokudaki PMNL yoğunluğu IR/30, IR/60 ve IR/90 gruplarıyla kısaylandığında oldukça azalmaktaydı (Şekil 4.14).



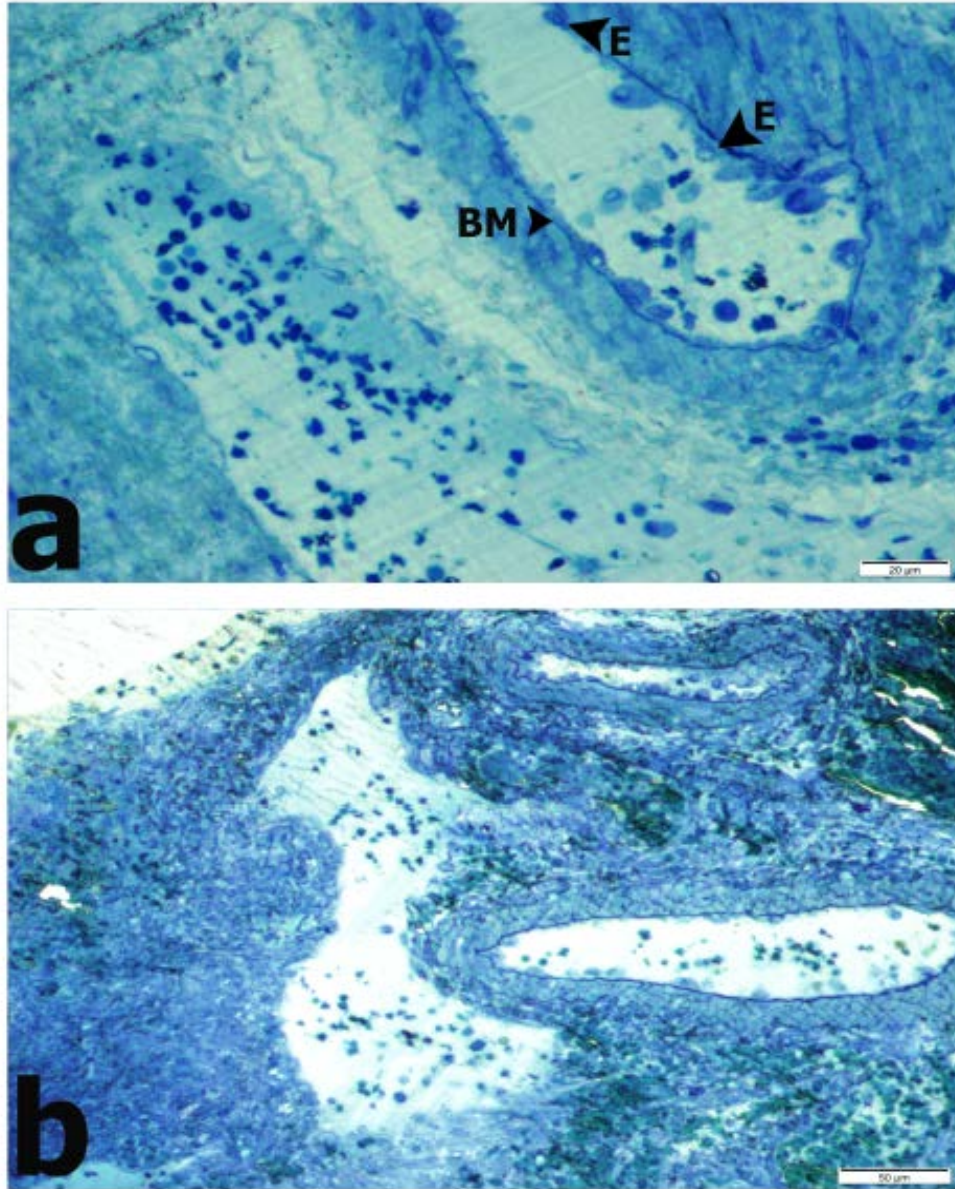
Şekil 4.14. İskemi/reperfüzyon 120 grubuna ait yarı ince kesitlerde vasküler değişimler. **BM:** Bazal Membran, **HA:** Hemoraji Alanı, **NF:** Nükleer Fragmentasyon. (Büyütme: a- 20X, b- 40X) (Boya: Toluidin blue)

IR/150 grubuna ait dokuların yarı ince kesitlerinin ışık mikroskopik incelemesinde hem ekstravasküler hemoraji bulgularının azaldığı, hem de doku içerisinde PMNL yoğunluğunun azaldığı değerlendirildi. Bağ doku içinde nükleer kromatin yoğunluğu bulunan hücrelere rastlansa da, bu hücrelerin miktarı IR/60, IR/90 ve IR/120 gruplarıyla kıyaslandığında giderek azalmaktaydı. Damar endotel hücrelerinin membran yapısının düzensiz olduğu, fakat endotel hücrelerinde IR/60, IR/90 ve IR/120 gruplarına nazaran sitoplazmik şişkinliğin de azaldığı izlenmekteydi. Bazal membranın bazı alanlarında incelmeler görülürken, diğer bölgelerde düzensizlik ve kalınlaşmalar bulunmaktaydı (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. İskemi/reperfüzyon 150 grubuna ait yarı ince kesitlerde vasküler değişimler. **KY:** Kromatin yoğunlaşması, **HA:** Hemoraji Alanı. (Büyütme: a-20X, b-40X)(Boya: Toluidin blue)

IR/180 grubunun over dokularının histolojik incelemesinde diğer I/R gruplarında tespit ettiğimiz hemorajinin önemli derecede azaldığı görülmektedir. Bağ dokuda PMNL sayısı da azalmaktaydı. Damar endotelinin sınırlarının belirginleştiği, hem endotel hem de bazal membran yapısındaki düzensizliğin iyileşmeğe başladığı her ne kadar dikkat çekici bulgular arasında yer alsada, endotel hücrelerinde yapısal değişiklikler hala devam etmekteydi (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. İskemi/reperfüzyon 180 grubuna ait yarı ince kesitlerde vasküler değişimler. **BM:** Bazal Membran, **E:** Endotel. (Büyütme: a- 20X, b- 40X) (Boya: Toluidin blue)

4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

İmmunohistokimyasal değerlendirmede anti-NF- κ B-65 antikoru kullanılarak avidin-biyotin peroksidaz yöntemi ile değerlendirme yapılmış olup, immunoreaktivite şiddetine göre gruplar skorlandı (Tablo 4.2 ve Tablo 4.3). Skorlama hasarın şiddetine göre 0-4 arasında yapıldı. 0; patolojik bulgu yok, 1, 2, 3, 4 ise patolojik bulguların sırasıyla incelenen alanın <%25, %25-50, %50-75 ve >%75 olması şeklinde belirlendi. Skorlama için altı alan değerlendirildi ve toplam skor hesaplandı (Şekil 4.17).

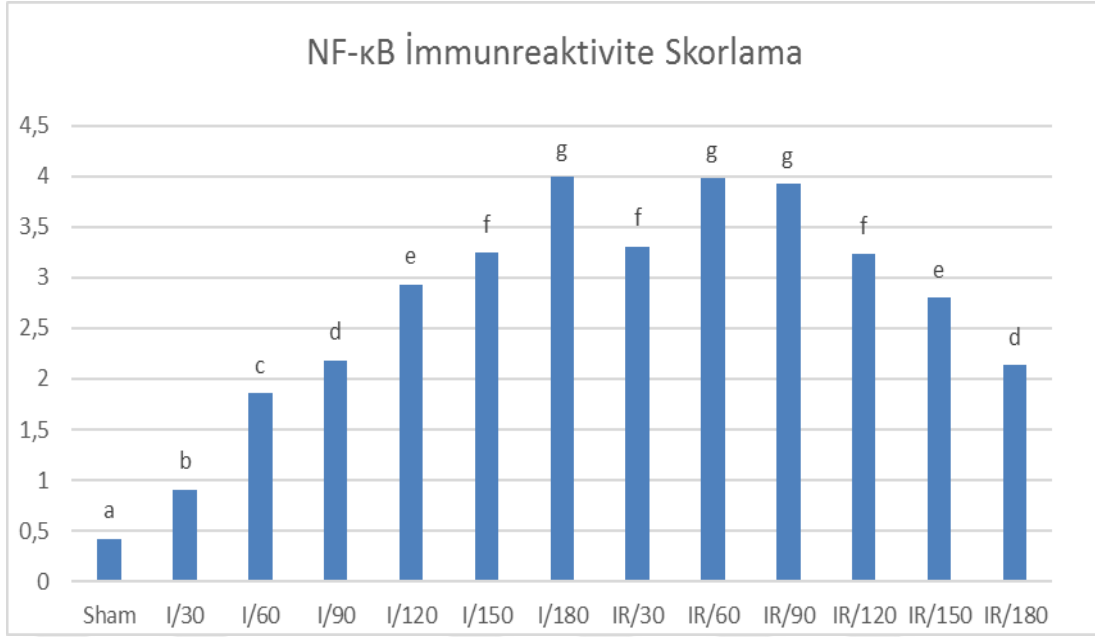
Sham gruplarından alınan over kesitlerinde NF- κ B-P65 immunoreaktivite hafif derecede görüldü.

Tablo 4.2. İskemi gruplarında NF- κ B immunreaktivite skorumu tablosu

Gruplar	Sham	I/30	I/60	I/90	I/120	I/150	I/180
anti-NF- κ B-P65	1	1	2	2	3	3	4

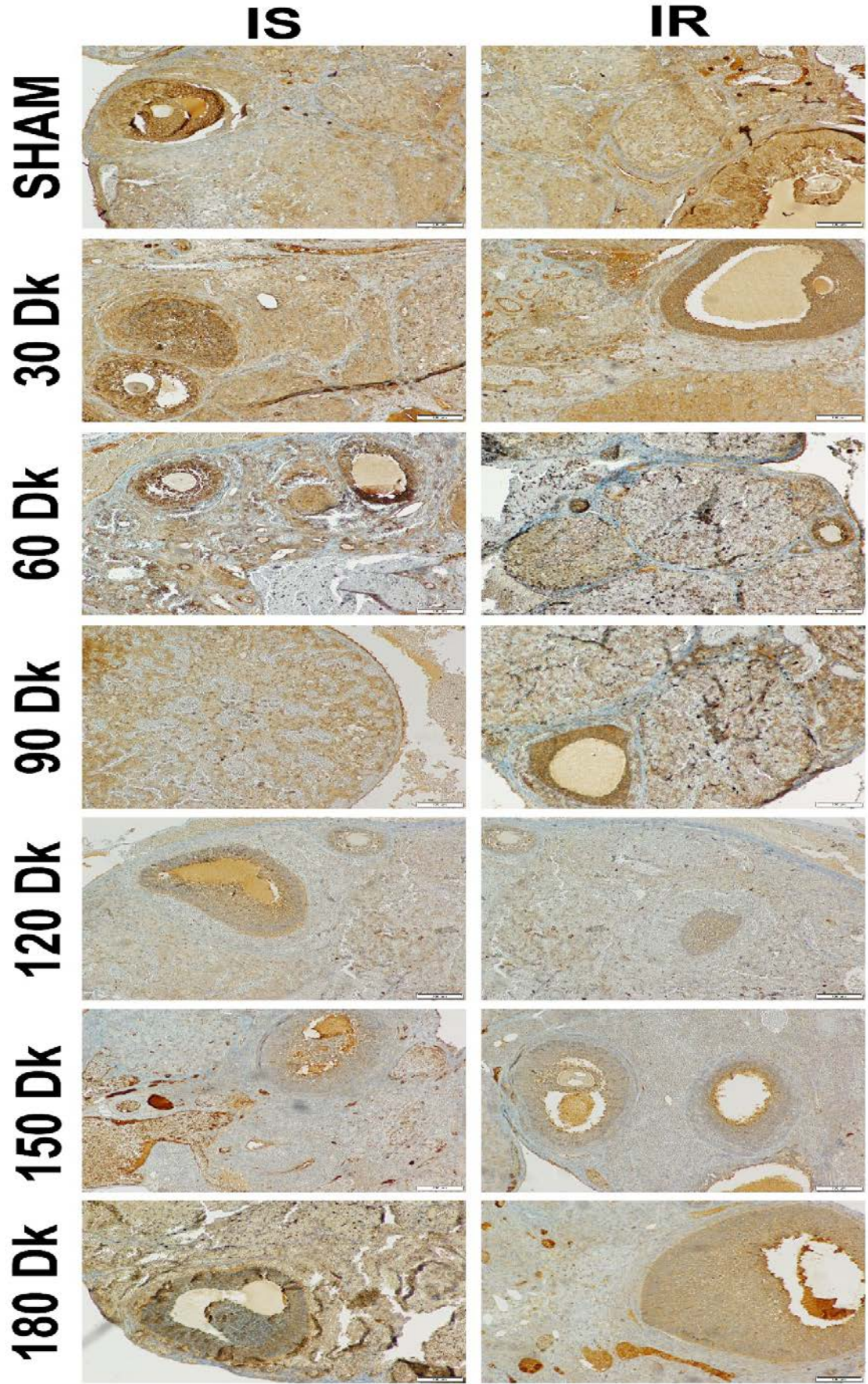
Tablo 4.3. İskemi/reperfüzyon gruplarında NF- κ B immunreaktivite skorumu tablosu

Gruplar	Sham	IR/30	IR/60	IR/90	IR/120	IR/150	IR/180
anti-NF- κ B65	1	3	4	4	3	3	2



Şekil 4.17. NF-κB immünreaktivite skorum grafiği.

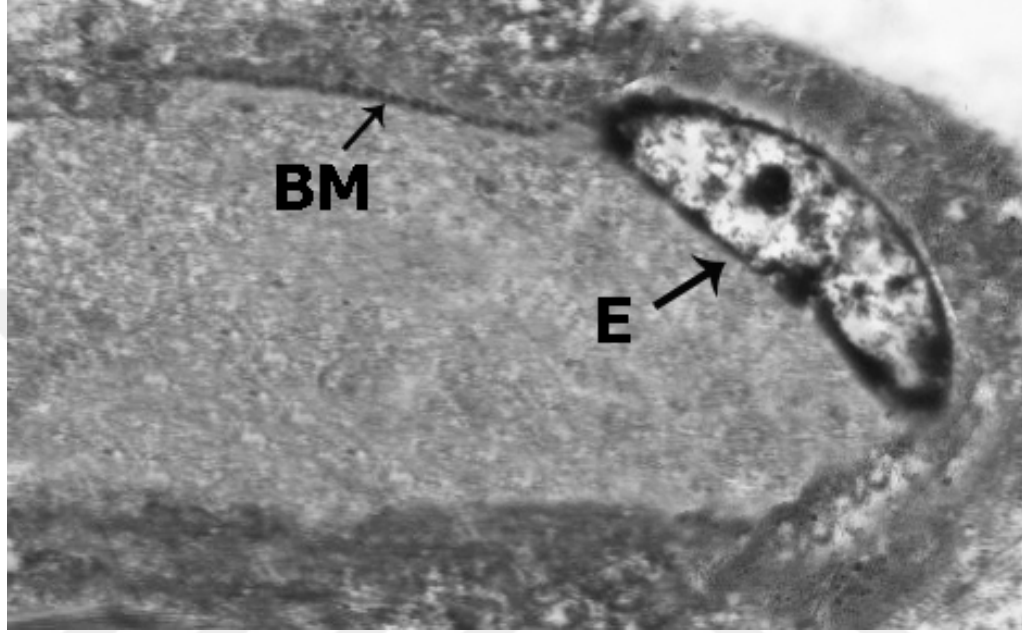
İskemi gruplarına bakıldığında immünpozitifliğin istatistiksel olarak artmakta olduğu görüldü. En fazla artışın I/180 grubunda olduğu izlendi. Ancak sham/kontrol grubunu diğer gruplarla kıyasladığımızda aralarında anlamlı bir farkın bulunduğu görüldü. İskemi/reperfüzyon grupları incelendiğinde en yüksek değerin IR/90 grubunda olduğu, sonrasında istatistiksel olarak düştüğü en düşük değerin de IR/180 grubunda olduğu görüldü. IR/180 grubu sham/kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak yüksek olduğu izlendi.



Şekil 4.18. NF- κ B immünohistokimyasal boya kesitleri. (Büyütme: 4X)

4.3. Elektron Mikroskopik Bulgular

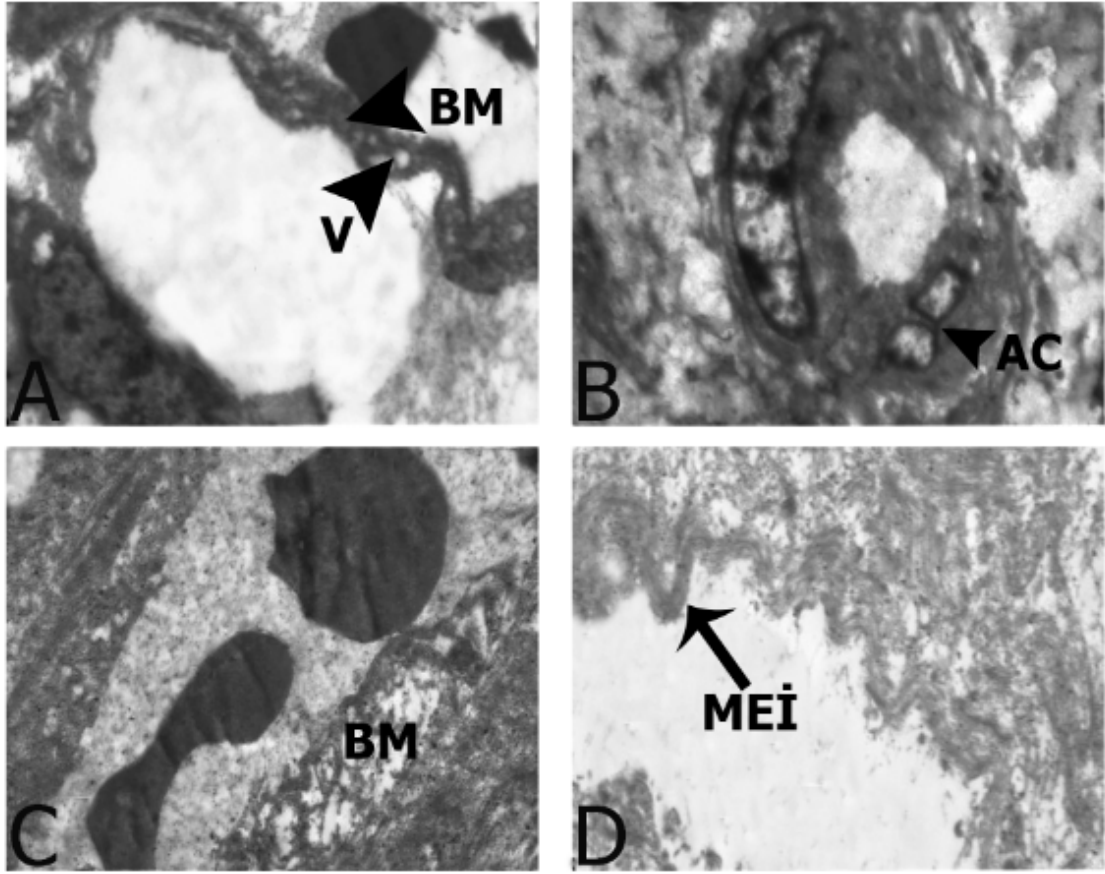
Sham/kontrol grubuna ait elektron mikroskopik kesitler incelendiğinde bazal membranın normal strüktürel yapıda olduğu izlenmekteydi. Endotel hücrleri histolojik olarak normal görünümdeydi (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Sham/kontrol grubuna ait elektron mikroskopik kesitler. **BM:** Bazal Membran, **E:** Endotel (Büyütme: 10000 X) (Boya: Uranil asetat- Kurşun sitrat).

I/30 grubunun elektron mikroskopik bulguları değerlendirildiğinde bazal membranda yer yer vakuolizasyonlar görülmekteydi. Vakuolizasyonların oluşumuyla birlikte bazal membranda kalınlaşma da izlenmekteydi. Endoteli oluşturan bazı hücrelerde ise mitotik figürler dikkat çekmekteydi (Şekil 4.20 A-B).

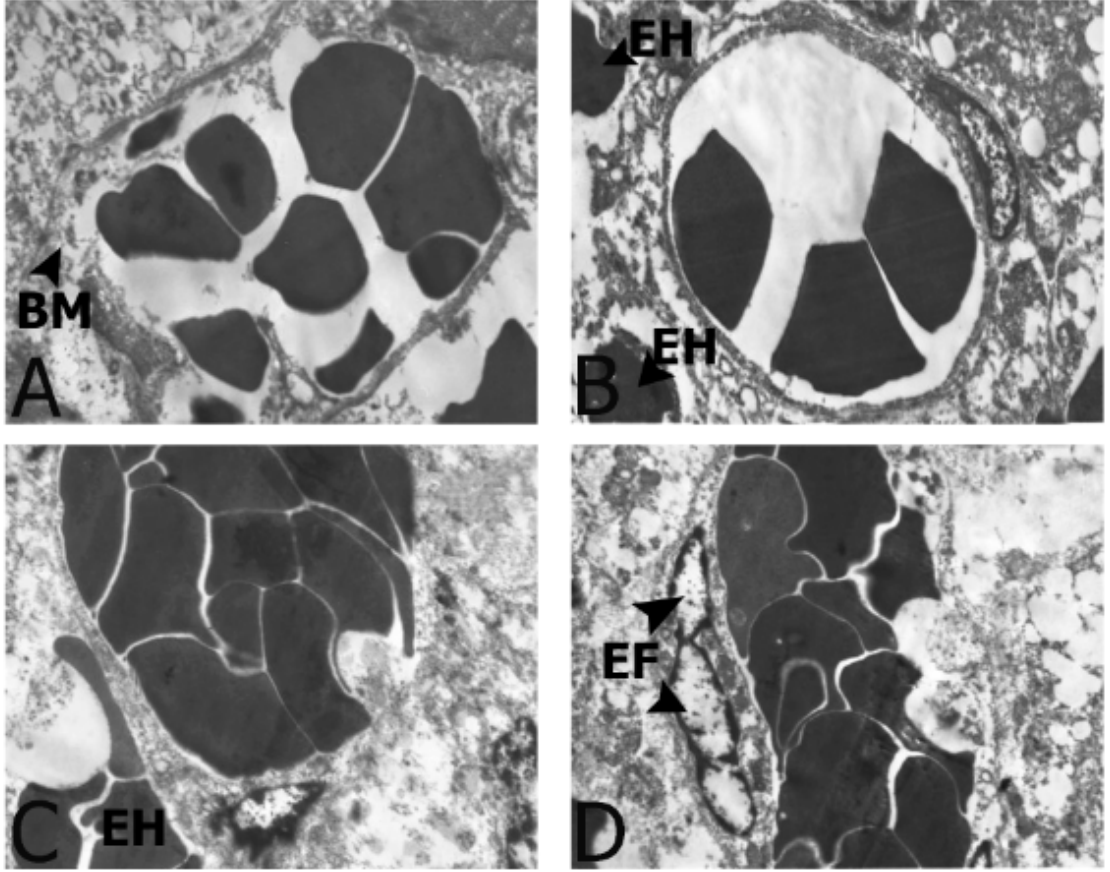
I/60 grubuna ait ince kesitlerin değerlendirilmesinde bazal membranın yapısında düzensizliklerin başladığı ve membran kalınlığının daha da arttığı gözlenmekteydi. Bazal membran kıvrıntılı şekil alırken membran içinde küçük boşlukların (vakuolizasyon) belirginleştiği tespit edildi. Membrana elastika interna da yapı olarak düzensiz şekilde izlenmekteydi (Şekil 4.20 C-D).



Şekil 4.20. İskemi 30 (A, B) ve İskemi 60 (C, D) gruplarına ait elektron mikroskopik kesitler. **V:**Vakuol, **AC:** Apoptotik Cisim, **MEİ:** Membrana Elastika İterna, **BM:** Bazal Membran. (Büyütme: A,B-5000X, C-8000 X, D-10000X) (Boya: Uranil asetat-Kurşun sitrat).

I/90 grubuna ait overlerin ultrastrüktürel incelemesinde bazal membran bütünlüğünde bozulma ve parçalanmaların başladığı görülmektedir. Bazal membran yapısında I/60 grubunda izlediğimiz boşlukların daha da arttığı bariz şekildeydi. Ayrıca stroma içinde homoraji de önemli bulgularandı (Şekil 4.21 A-B).

I/120 grubundaki ince kesitlerin değerlendirilmesinde bazal membranda düzensizliklerin devam ettiği izlenmektedir. Bununla birlikte endotel hücrelerinin çekirdeklerinde fragmantasyonlar önemli bulgu olarak gözlenmektedir. Ekstravasküler hemorajinin artarak devam ettiği de ayrıca fark edilmektedir (Şekil 4.21 C-D).

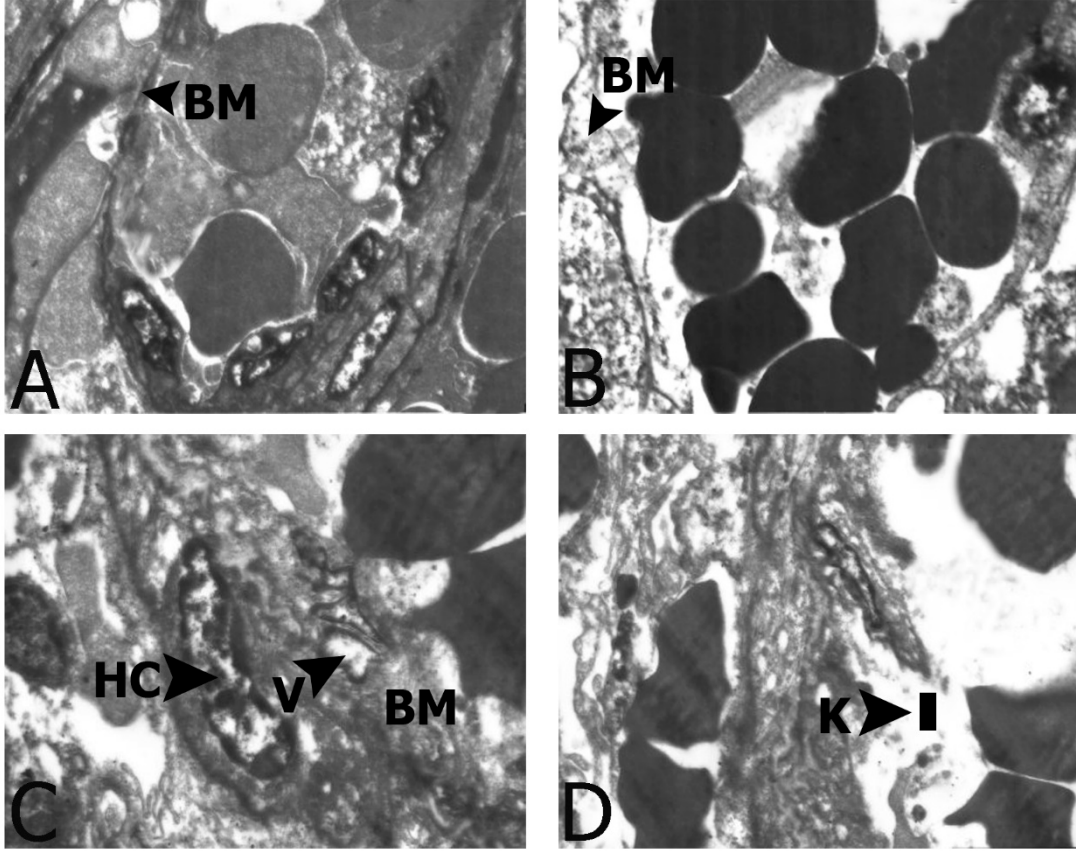


Şekil 4.21. İskemi 90 (A, B) ve İskemi 120 (C, D) gruplarına ait elektron mikroskopik kesitler. EH: Eritrosit Hücresi, BM: Bazal Membran, EF: Endotel Fragmentasyonu. (Büyütme: A, B, C, D: 5000 X) (Boya: Uranil asetat- Kurşun sitrat).

I/150 grubunun overlerine ait kesitlerin elektron mikroskopik incelemesinde endotel hücrelerinin boyutlarında değişikliklerle birlikte, hücre membranının düzensizliği ve buna bağlı olarak endotel hücrelerinin büzülmeye başladığı izlenmekteydi. Bazal membranın bütünlüğünün bozulması, bazı yerlerde kesintiye uğraması ve vakuolizasyon odakları belirgin olarak görülmekteydi. Buna bağlı olarak bazal membranın düzensizliğinde artış olduğu saptanmaktaydı (Şekil 4.22 A-B).

I/180 grubuna ait ince kesitlerin elektron mikroskopik görüntüleri incelendiğinde bazal membranın düzensizliğinin ve kıvrıntılarının arttığı, bazal membranın bütünlüğünün korunamadığı, ayrıca yapı içerisinde vakuolizasyonların belirginleştiği görülmekteydi. Damar endotelinde görülen düzensizlik ve kopmalar da bu gruptaki önemli bulgulardandı. Membran dışında yerleşen perisitlerin çekirdeğinin kondense

olarak daha heterokromatik bir görünüme sahip olduğu ve plazma membranının düzensizliği, bununla birlikte segmental olarak kesintiye uğradığı tespit edildi (Şekil 4.22 C-D).

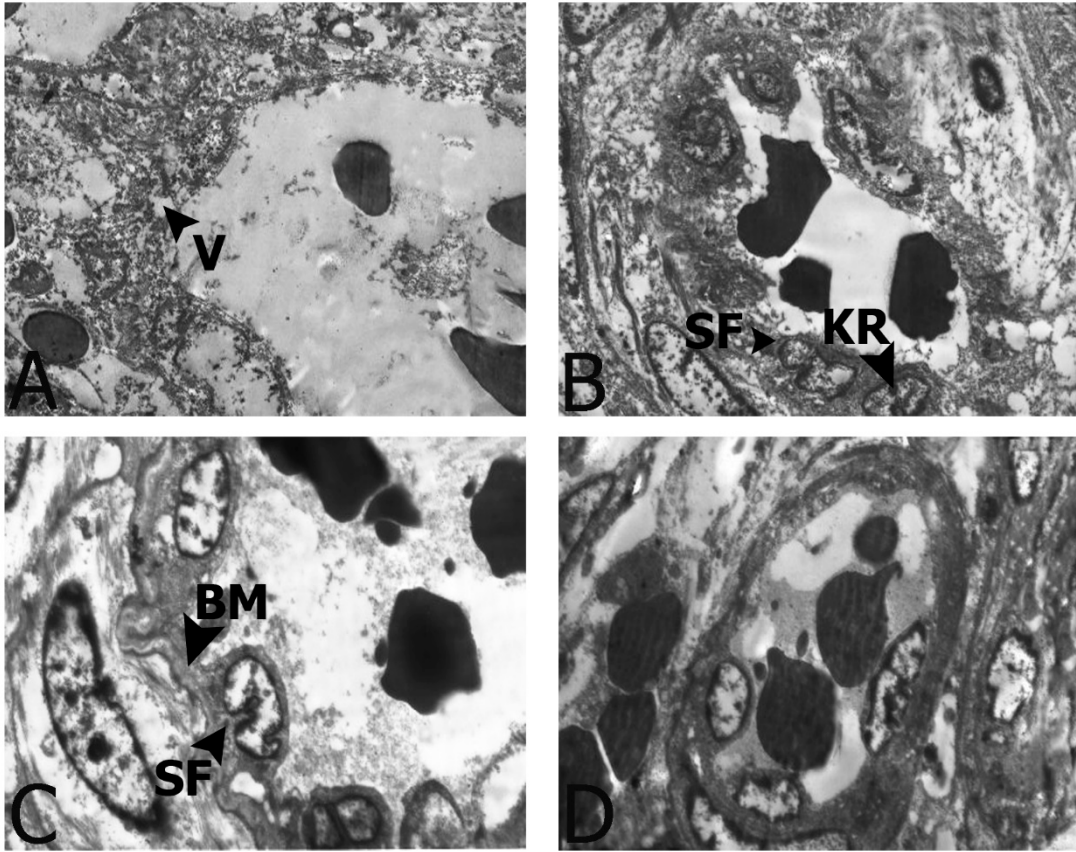


Şekil 4.22. İskemi 150 (A, B) ve İskemi 180 (C, D) gruplarına ait elektron mikroskopik kesitler. **BM:** Bazal Membran, **V:** Vakuol, **HC:** Heterokromatik Hücre. **K:** Kesintili Membran (Büyütme: A,B: 4000X, C: 8000X, D: 6000X) (Boya: Uranil asetat- Kurşun sitrat).

IR/30 grubu over dokularının ultrastrüktürel yapısı değerlendirildiğinde bazal membranda vakuolizasyonların belirgin şekilde arttığı, membranda ayrışmalar olduğu ve bu ayrışmalara bağlı olarak membran kalınlığının da artmış olduğu görülmektedir. Ayrıca endotel hücrelerindeki değişiklikler dikkat çekiciydi. Endotel hücrelerinde hem sitoplazmik fragmentasyonlar, hem de nükleer kromatindeki yoğunlaşmalar barizdi (Şekil 4.23 A-B).

IR/60 grubuna ait kesitlerin elektron mikroskopik incelemesinde endotel hücrelerinde meydana gelen değişimler çok anlamlıydı. Endotel hücrelerinin plazma

membranı düzensizleşerek kıvrıntılar oluşturmaktaydı. Plazma membranının değişimlerine eşlik eden sitoplazma fragmentasyonları shrinkage hücre görünümü oluşturmaktaydı. Endotel hücrelerinin sitoplazmik ve nükleer yoğunlaşmalar da dikkat çekiciydi. Bazal membranın incelemesinde kıvrıntılarının daha da artmasına bağlı membran yapısının iyice düzensiz hal aldığı, bazal membranın kalınlaştığı görülmektedir. Bazal membranın dışında yerleşen perisitlerdeki nükleer değişiklikler endotel hücrelerinde gördüğümüz değişikliklere benzer şekil sergilemekteydi (Şekil 4.23 C-D).

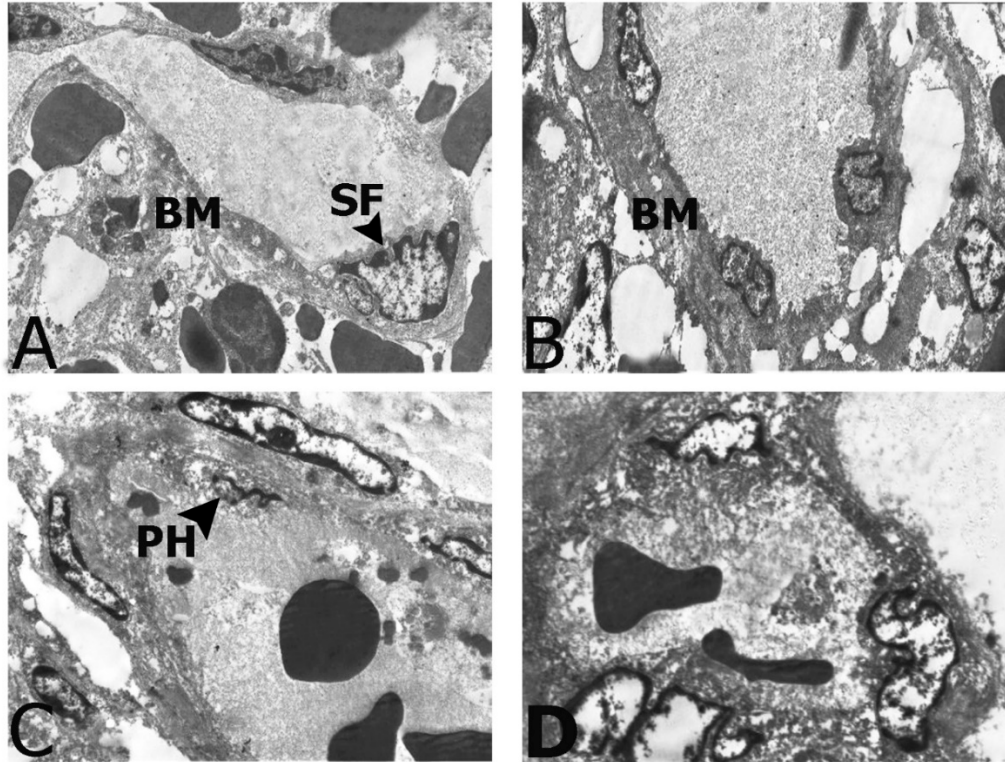


Şekil 4.23. İskemi/reperfüzyon 30 (A, B) ve İskemi/reperfüzyon 60 (C, D) gruplarına ait elektron mikroskopik kesitler. **BM:** Bazal Membran, **SF:** Sitoplazmik Fragmentasyon, **KR:** Kromatin Yoğunlaşması, **V:** Vakuol. (Büyütme: A,B,C,D: 4000 X) (Boya: Uranil asetat- Kurşun sitrat).

IR/90 grubunun over dokuları elektron mikroskopik değerlendirildiğinde doku içerisinde hemorajinin fazla miktarda olduğu tespit edildi. Endotel hücrelerinin plazma

membranlarında düzensizlik ve hücrelerin yapısının bozulduğu izlenmekteydi. Bu hücrelerin nükleer kromatininin yoğunlaşmasıyla çekirdekleri heterokromatik bir görünüm sergiliyordu. Ayrıca endotel hücrelerinin sitoplazmik fragmentasyonu ve yoğunlaşması dikkat çekiciydi. Bazal membranın yer yer kalınlaşma ve incelmeleri de birbirini takip etmekteydi (Şekil 4.24 A-B).

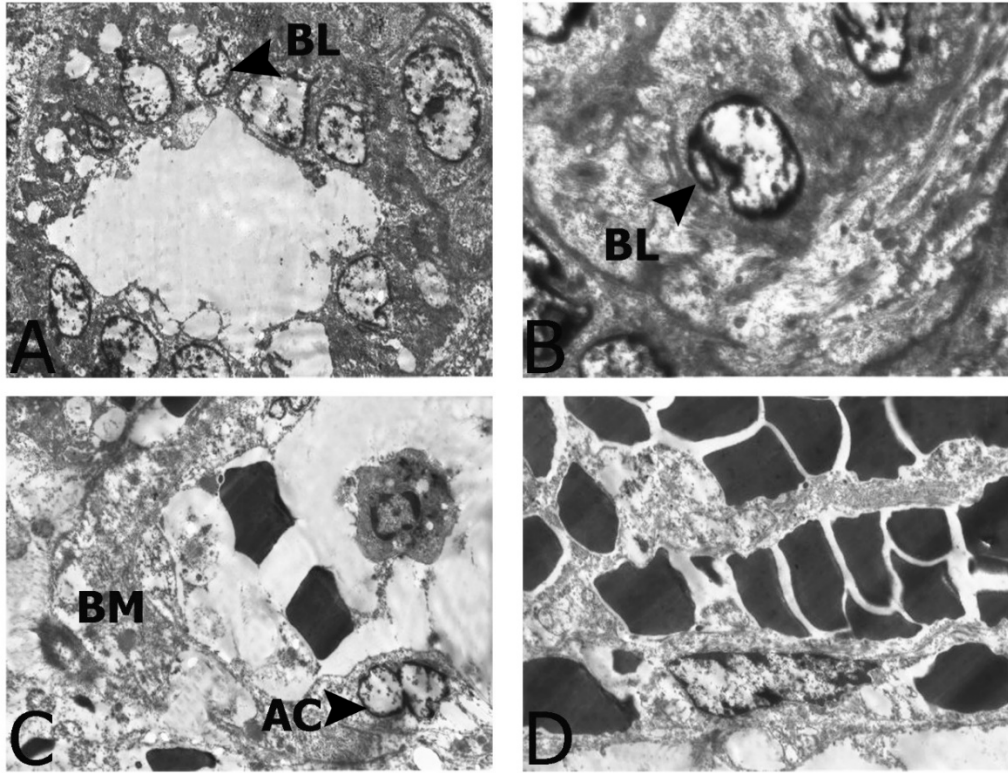
IR/120 grubuna ait kesitlerin ultrastrüktürel değerlendirilmesinde endotel hücrelerinin membranlarında aşırı derecede düzensizlik izlenmekteydi. Plazma membranlarının kıvrıntıları iskemi/reperfüzyon grupları arasında bu grubun ince kesitlerinde en fazla düzeyde iken, bazı çekirdeklerin piknotik görünüm almaya başladığı da gözlenmekteydi. Bazal membranın kalınlaşması ise önceki gruplarda olduğu gibi devam etmekteydi (Şekil 4.22 C-D).



Şekil 4.24. İskemi/reperfüzyon 90 (A, B) ve İskemi/reperfüzyon 120 (C, D) gruplarına ait elektron mikroskopik kesitler. **BM:** Bazal Membran, **SF:** Sitoplazmik Fragmentasyon, **PH:** Piknotik Hücre. (Büyütme: A,B: 4000X, C: 5000X, D: 6000X) (Boya: Uranil asetat- Kurşun sitrat)

IR/150 grubu over dokularının ince kesitlerinde bazal membran düzensizliğinin, endotel hücrelerinin plazma membranının yapısal değişikliğinin devam ettiği izlenmekteydi. Ayrıca endotel hücrelerinin sitoplazmalarının fragmente olduğu, membran kabarcıklanması (blebbing), bu grubun over dokusunda gördüğümüz önemli bulguları arasındaydı (Şekil 4.25 A-B).

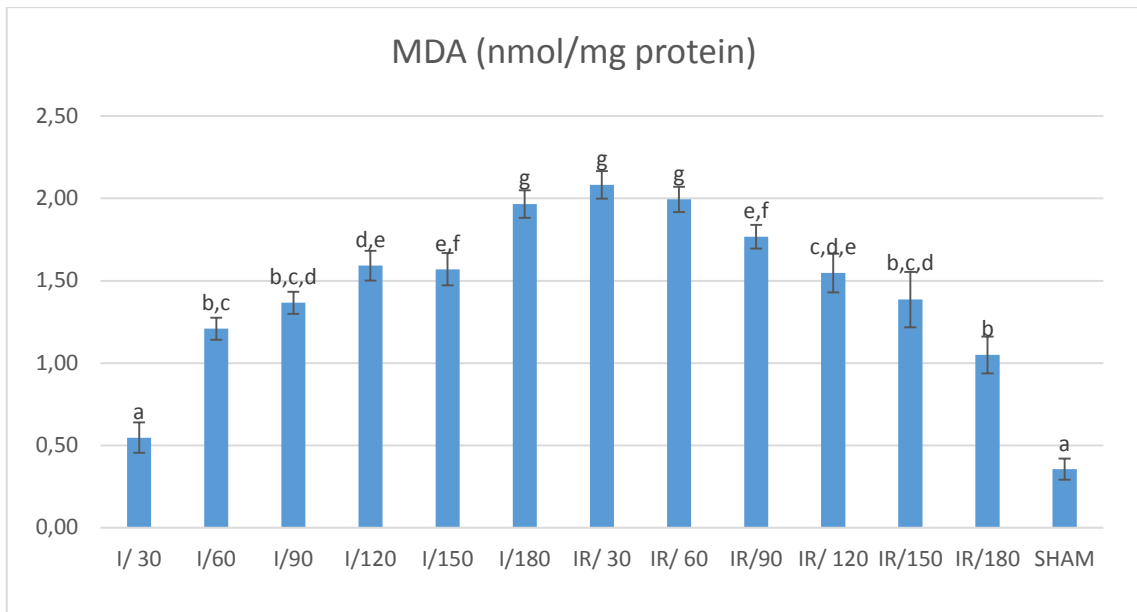
IR/180 grubuna ait dokuların elektron mikroskopik değerlendirilmesinde bazal membranın kalınlaşması damarların bazı kısımlarında devam ederken, diğer alanlarda belirgin incelmeler gözlenmekteydi. Endotel hücrelerinin sınırlarındaki düzensizliklerle birlikte apoptotik cisimlerin oluşumu da dikkat çekmekteydi (Şekil 4.25 C-D).



Şekil 4.25. İskemi/reperfüzyon 150 (A, B) ve İskemi/reperfüzyon 180 (C, D) gruplarına ait elektron mikroskopik kesitler. **AC:** Apoptatik Cisimcik, **BL:** Blebbing, **BM:** Bazal Membran. (Büyütme: A,B: 4000X, C,D: 4000X) (Boya: Uranil asetat- Kurşun sitrat)

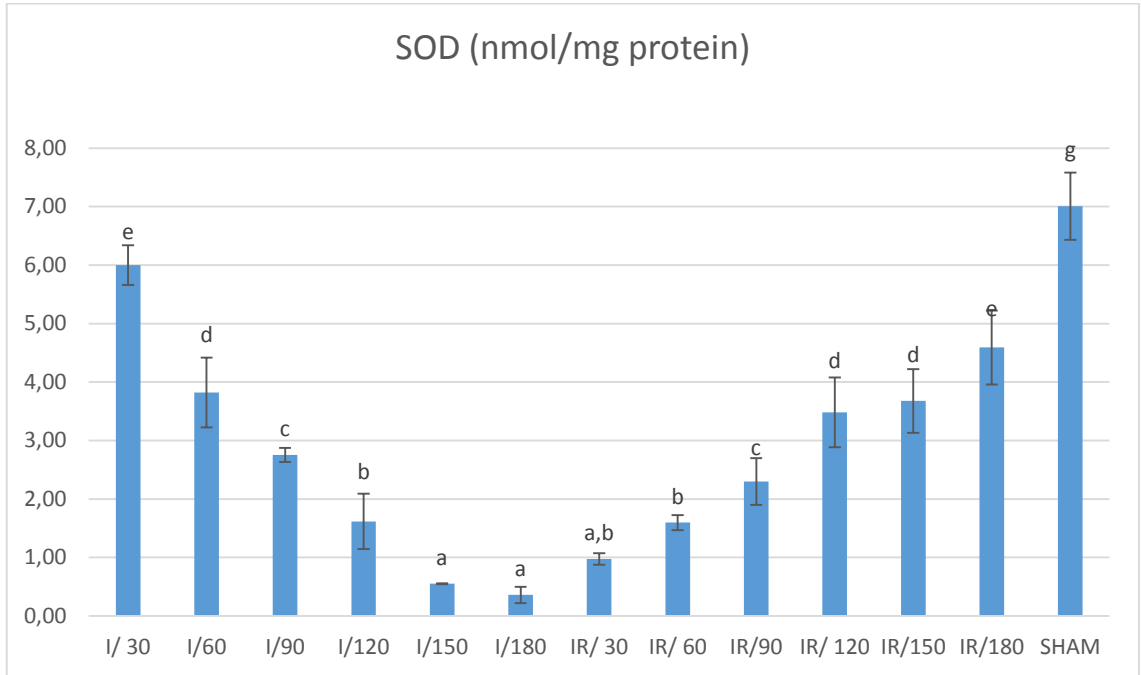
4.4. Biyokimyasal Verilerin Değerlendirilmesi

Sıçan over dokusunda oksidatif stres parametreleri ölçüldü. Oksidatif stresin belirteci olan MDA seviyelerine baktığımız zaman iskemi gruplarında zamana bağlı istatistiksel olarak bir artış olduğu görülmektedir. En yüksek MDA seviyesi I/180 grubunda olmakla birlikte, sham/kontrol ve I/30 grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Ancak sham/kontrol grubunu diğer gruplarla kıyasladığımızda aralarında anlamlı bir fark vardır. İskemi sonrası reperfüzyon uygulanmış gruplarda ise zamana bağlı olarak MDA seviyelerinin istatistiksel olarak düştüğü görüldü. MDA seviyeleri en yüksek iskemi sonrası 30 dk reperfüzyonda (IR/30) görülürken, iskemi sonrası 180 dk reperfüzyon grubunda (IR/180) ise gruplar arasında en düşük seviyede olduğu tespit edildi. Yalnız iskemi 180 dk sonrası 180 dk reperfüzyona bırakılmış sıçan overlerindeki (IR/180) MDA seviyeleri ise sadece sham/kontrol ve iskemi 30 dk (I/30) grubuna göre istatistiksel olarak yüksek olduğu görüldü. Aynı zamanda bu grup iskemi 60 (I/60) ve 90 dk (IR/90) gruplarıyla istatistiksel olarak benzer MDA seviyeleri göstermektedir ($p<0,05$) (Şekil 4.26).



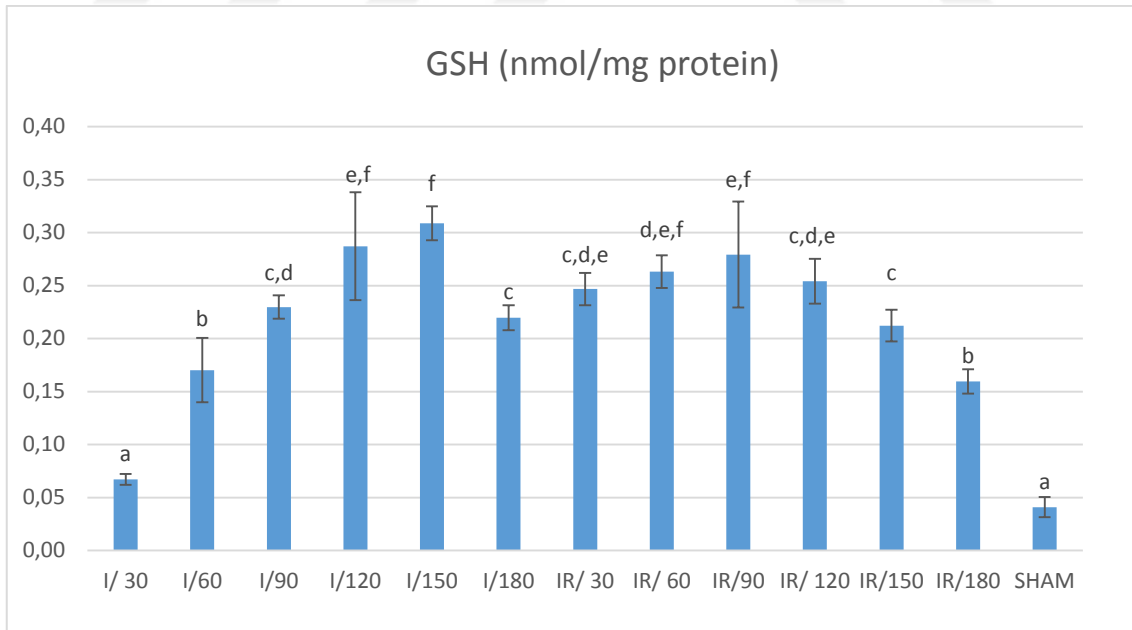
Şekil 4.26. İskemi/reperfüzyon sürecinde MDA miktarının grafikte gösterilmesi ($p<0,05$ oranında anlamlı).

Diğer bir antioksidan enzim olan SOD aktivitesi Şekil 4.27 'de gösterildi. Bu grafik değerlendirildiğinde artan iskemi gruplarında zamana göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğu görülmektedir. En düşük SOD seviyesi iskemi 180 dk'da (I/180) olmakla beraber I/150 ve I/180 grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Ancak sham/kontrol grubunu diğer gruplarla kıyasladığımızda aralarında anlamlı bir fark vardır. İskemi sonrası reperfüzyon uygulanmış gruplarda ise zamana bağlı olarak SOD seviyelerinin istatistiksel olarak yükseldiği görüldü. İskemi sonrası SOD seviyesinin en düşük 30 dk reperfüzyonda (IR/30) görülmüş olup, iskemi sonrası 180 dk reperfüzyonda (IR/180) ise reperfüzyon grupları arasında en yüksek seviyede tespit edildi. Ayrıca IR/120 ve IR/150 grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı. İskemi 180 dk sonrası 180 dk reperfüzyon grubunun (IR/180) SOD seviyeleri ise diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, yalnızca 30 dk iskemi (I/30) oluşturulmuş gruplara göre istatistiksel olarak benzer SOD seviyeleri olduğu gösterdi ($p<0,05$).



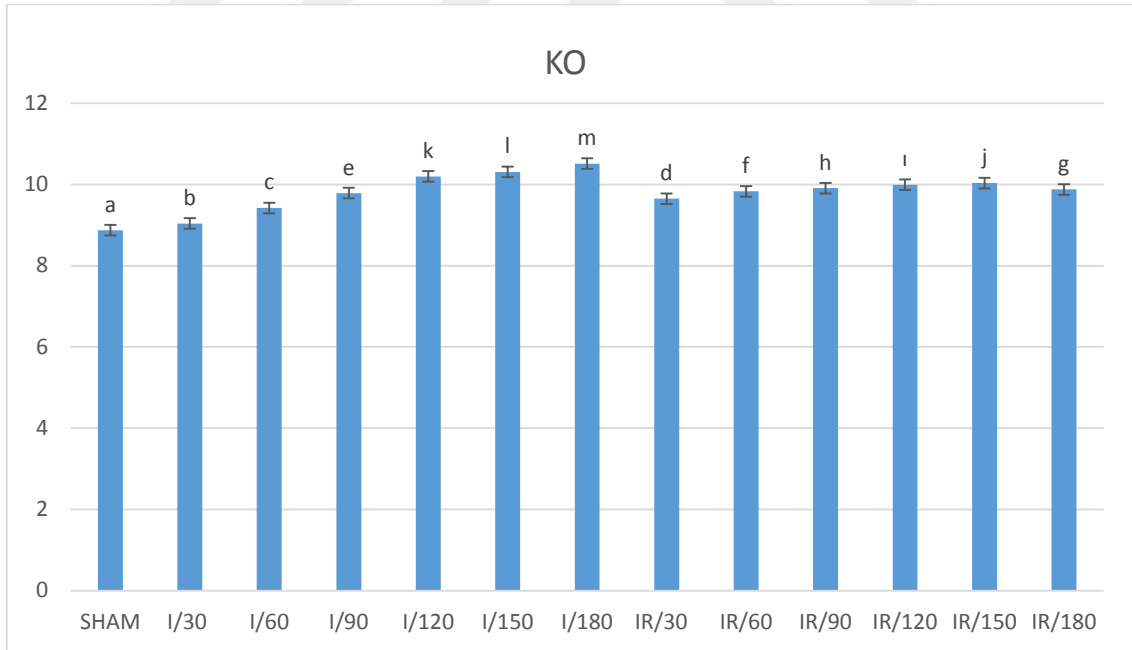
Şekil 4.27. İskemi/reperfüzyon sürecinde SOD miktarının grafikte gösterilmesi ($p<0,05$ oranında anlamlı).

Çalışmamızda önemli bir antioksidan olan GSH seviyeleri Şekil 4.28’de gösterildi. GSH seviyelerine baktığımız zaman iskemi gruplarında zamana göre istatistiksel olarak bir artış olduğu görülmektedir. En yüksek GSH seviyesi iskemi 150 dk’da (I/150) olmakla beraber I/180 grubunda düşüş olduğu görüldü. Ancak sham/kontrol grubunu diğer gruplarla kıyasladığımızda aralarında anlamlı bir fark varken, sadece I/30 grubunda istatistiksel olarak benzer sonuçlar görüldü. İskemi sonrası reperfüzyon uygulanmış gruplarda ise zamana bağlı olarak GSH seviyelerinin I/180 grubuna göre yükseldiği ve IR/ 90 sonrasında istatistiksel olarak düştüğü görüldü. GSH seviyeleri en yüksek iskemi sonrası 90 dk (IR/90) reperfüzyonda görülmüş olup, iskemi sonrası 180 reperfüzyon grubunda (IR/180) bu gruplar arasında en düşük seviye tespit edildi. IR/180 grubundaki GSH seviyeleri diğer gruplara göre istatistiksel olarak düşük kalırken I/60 grubu ile istatistiksel olarak benzer GSH seviyeleri göstermiştir ($p<0,05$).



Şekil 4.28. İskemi/reperfüzyon sürecinde GSH miktarının grafikte gösterilmesi. ($p<0,05$ oranında anlamlı).

Çalışmamızda ölçülen diğer bir parametre KO seviyesidir. KO seviyelerine bakıldığında iskemi gruplarında zamana göre istatistiksel olarak bir artış olduğu görülmektedir. En yüksek KO seviyesi iskemi 180 dk'da (I/180) olmakla beraber sham/kontrol grubuna göre istatistiksel olarak bir yükseliş görülmektedir. Sham/kontrol grubunu diğer gruplarla kıyasladığımızda aralarında anlamlı bir artış olduğu görüldü. İskemi sonrası reperfüzyon uygulanmış gruplarda ise zamana bağlı olarak KO seviyelerinin IR/150 grubuna kadar istatistiksel olarak arttığı görüldü. KO seviyeleri iskemi sonrası en yüksek 150 dk reperfüzyonda görülürken, iskemi sonrası 30 reperfüzyon gruplarında (IR/30) bu gruplar arasında en düşük seviye tespit edildi. Yalnız IR/180 grubunun overlerindeki KO seviyeleri ise sham/kontrol, tüm iskemi oluşturulmuş sıçan gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu görüldü ($p<0,05$) (Şekil 4.29).

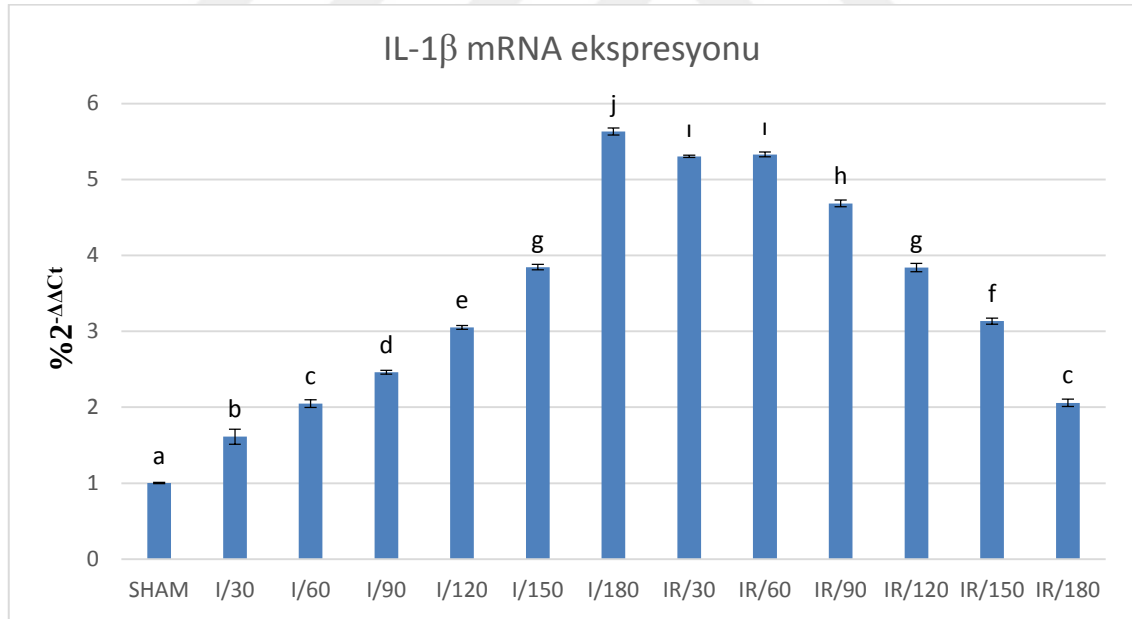


Şekil 4.29. İskemi/reperfüzyon sürecinde KO miktarının grafikte gösterilmesi. ($p<0,05$ oranında anlamlı).

4.5. Gerçek Zamanlı PCR Bulguları

4.5.1. IL-1 β PCR Bulguları

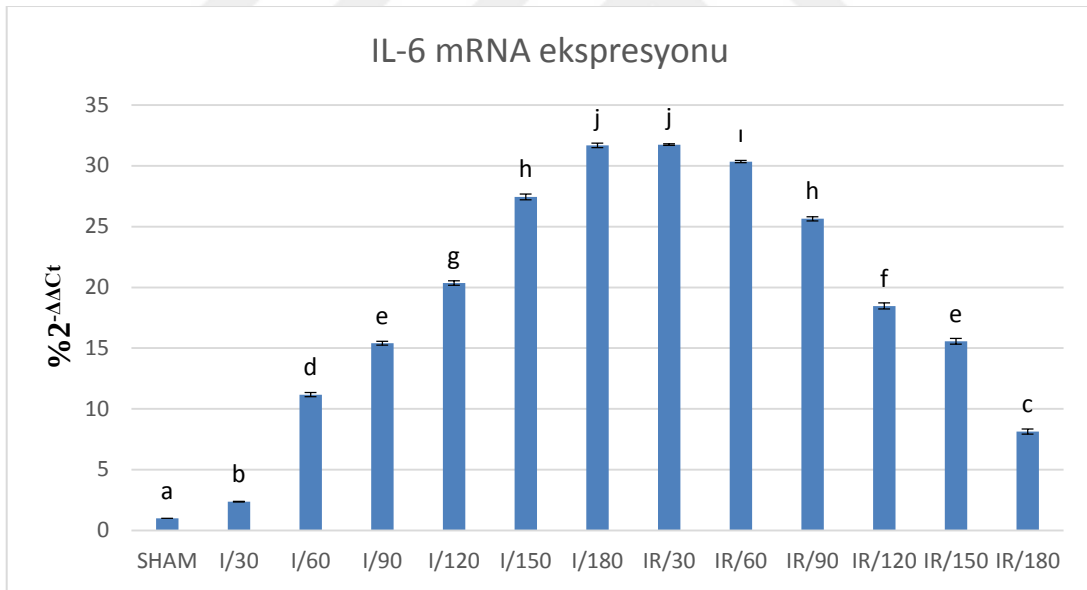
Çalışmamızın IL-1 β değerlerini incelediğimizde Şekil 4. 30'den de görüldüğü gibi iskemi süresinin artışına bağlı olarak IL-1 β seviyelerinin sham/kontrol grubuna göre arttığı görüldü. En yüksek IL-1 β değerleri ise iskeminin en uzun bırakıldığı I/180 gruplarında olduğu tespit edildi. İskemi sonrası değişik sürelerde reperfüzyona bırakılmış IR/30 ve IR/60 gruplarında ise IL-1 β seviyeleri IR grupları arasında en yüksek değere sahip olup, I/180 gruplarına göre istatistiksel olarak düşük kaldığı görüldü. Reperfüzyon süresi arttıkça IL-1 β seviyeleri istatistiksel olarak düşmüş, en düşük seviye ise IR/180 gruplarda tespit edildi. Yalnız IR/180 gruplarının IL-1 β seviyeleri kontrole ve I/30 gruplarına göre istatistiksel olarak yüksek kalmış ve I/60 gruplarına göre ise istatistiksel olarak benzer sonuçlar alındı ($p < 0,05$).



Şekil 4.30. Gerçek zamanlı PCR metodu ile IL-1 β ekspresyonu ($p < 0,05$ oranında anlamlı).

4.5.2. IL-6 PCR Bulguları

Çalışmamızın IL-6 değerlerini incelediğimizde Şekil 4.31 'de görüldüğü gibi iskemi süresinin artışına bağlı olarak IL-6 seviyelerinin sham/kontrol grubuna göre arttığı görüldü. En yüksek IL-6 değerleri ise iskeminin en uzun bırakıldığı I/180 gruplarında olduğu tespit edildi. İskemi sonrası değişik sürelerde reperfüzyona bırakılmış IR/30 ve IR/60 gruplarında ise IL-6 seviyeleri IR grupları arasında en yüksek değere sahiptir. IR/30 grupları I/180 gruplarına göre istatistiksel olarak benzerlik gösterirken, IR/60 grupları I/180 gruplarına göre daha düşük kaldı. Reperfüzyon süresi arttıkça IL-6 seviyelerinin istatistiksel olarak düştüğü, en düşük seviye ise IR/180 gruplarda tespit edildi. Yalnız IR/180 gruplarının IL-6 seviyeleri kontrol ve I/30 gruplarına göre istatistiksel olarak yüksek kaldığı görüldü ($p<0,05$).

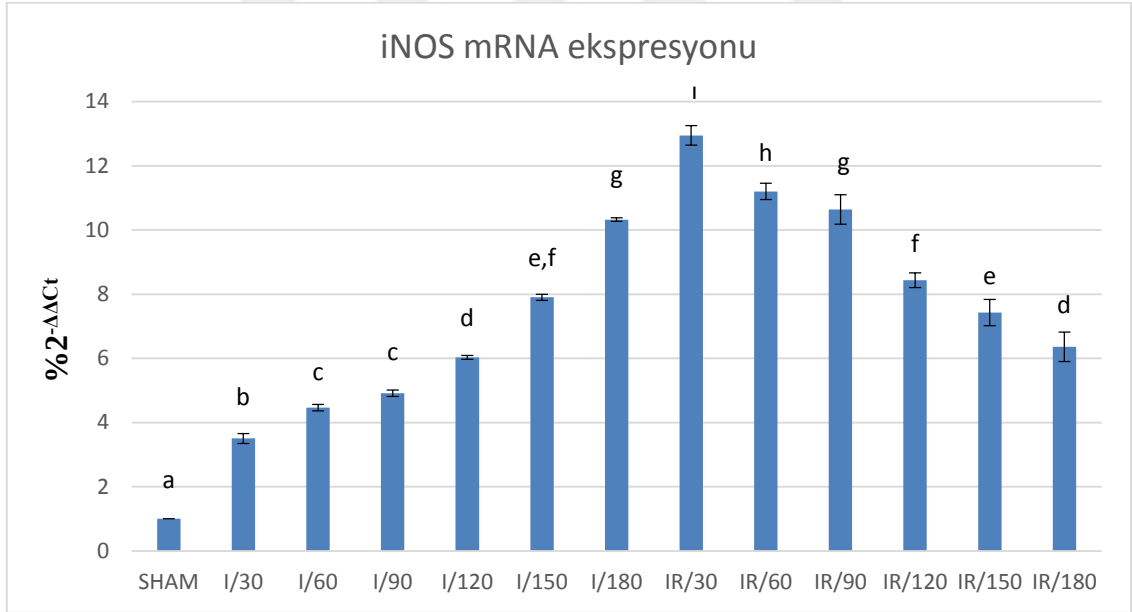


Şekil 4.31. Gerçek zamanlı PCR metodu ile IL-6 ekspresyonu ($p<0,05$ oranında anlamlı).

4.5.3. iNOS PCR Bulguları

Çalışmamızda ölçtüğümüz diğer bir parametre iNOS ekspresyon seviyesidir. iNOS değerlerini incelediğimizde Şekil 4.32'de görüldüğü gibi iskemi süresinin artışına

bağlı olarak iNOS seviyelerinin sham/ kontrol grubuna göre arttığı görüldü. En yüksek iNOS değeri ise iskeminin en uzun bırakıldığı I/180 gruplarında olduğu tespit edildi. I/60 ve I/90 gruplarında istatistiksel olarak benzer sonuçlar alındı. İskemi sonrası değişik sürelerde reperfüzyona bırakılmış IR/30 gruplarında ise iNOS seviyeleri I/R grupları arasında en yüksek değere sahiptir. IR/30 ve IR/60 gruplarında iNOS seviyeleri I/180 gruplarına göre istatistiksel olarak artarken, IR/90 grubu I/180 gruplarına göre istatistiksel olarak benzer iNOS seviyelerine sahip olduğu gösterildi. Reperfüzyon süresi arttıkça iNOS seviyeleri istatistiksel olarak düşmüş, en düşük seviye ise IR/180 gruplarında tespit edildi. Yalnız IR/180 gruplarının iNOS seviyeleri kontrole, I/30, I/60 ve I/90 gruplarına göre istatistiksel olarak yüksek olup, I/120 grubuna göre istatistiksel olarak benzer sonuçlar alındı ($p<0,05$).

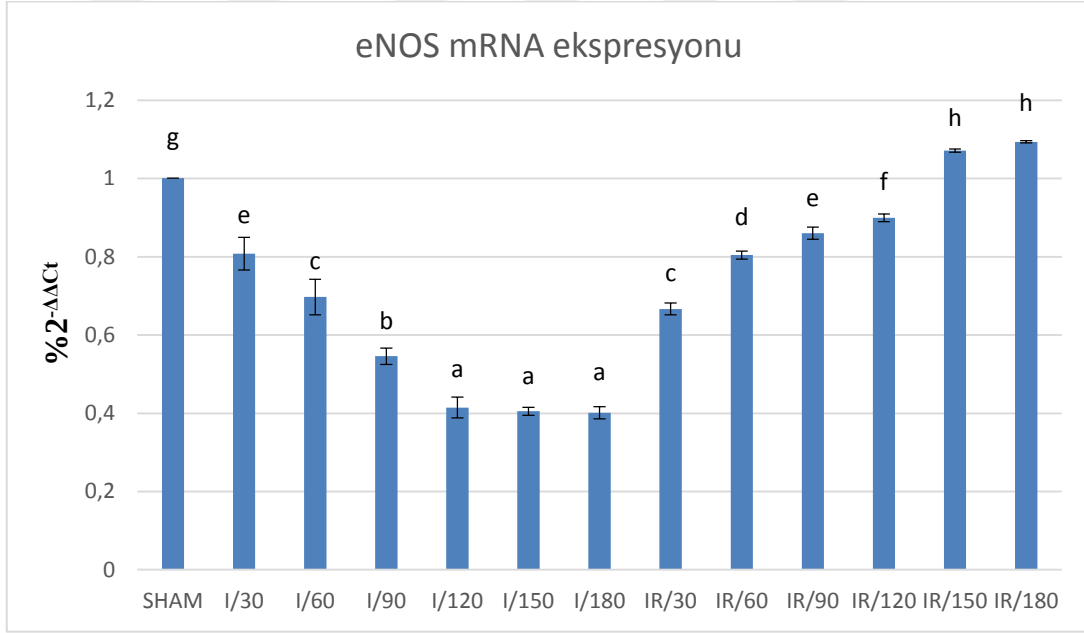


Şekil 4.32. Gerçek zamanlı PCR metodu ile iNOS ekspresyonu. ($p<0,05$ oranında anlamlı).

4.5.4. eNOS PCR Bulguları

Çalışmamızın eNOS değerlerini incelediğimizde Şekil 4.33’de görüldüğü gibi iskemi süresinin artışına bağlı olarak eNOS seviyelerinin sham/kontrol grubuna göre azaldığı görüldü. En düşük eNOS değerlerinin ise iskeminin I/150 ve I/180 gruplarında

olduğu görüldü. I/120, I/150 ve I/180 gruplarında istatistiksel olarak benzer sonuçlar alındı. İskemi sonrası değişik sürelerde reperfüzyona maruz bırakılmış gruplarda reperfüzyon süresinin artışıyla doğru orantılı olacak şekilde artış olduğu görüldü. IR/150 ve IR/180 gruplarında ise eNOS seviyeleri IR grupları arasında en yüksek değere sahip olup istatistiksel olarakta benzer sonuçlar göstermektedir. IR/30 grubunda ise seviyeleri I/180 gruplarına göre istatistiksel olarak arttığı görüldü. Reperfüzyon süresi arttıkça eNOS seviyeleri istatistiksel olarak yükselmiş, en yüksek seviye ise IR/150 ve IR/180 gruplarda tespit edildi. Yalnız IR/180 grubu eNOS seviyeleri kontrole göre istatistiksel olarak düşük olduğu görüldü ($p<0,05$).

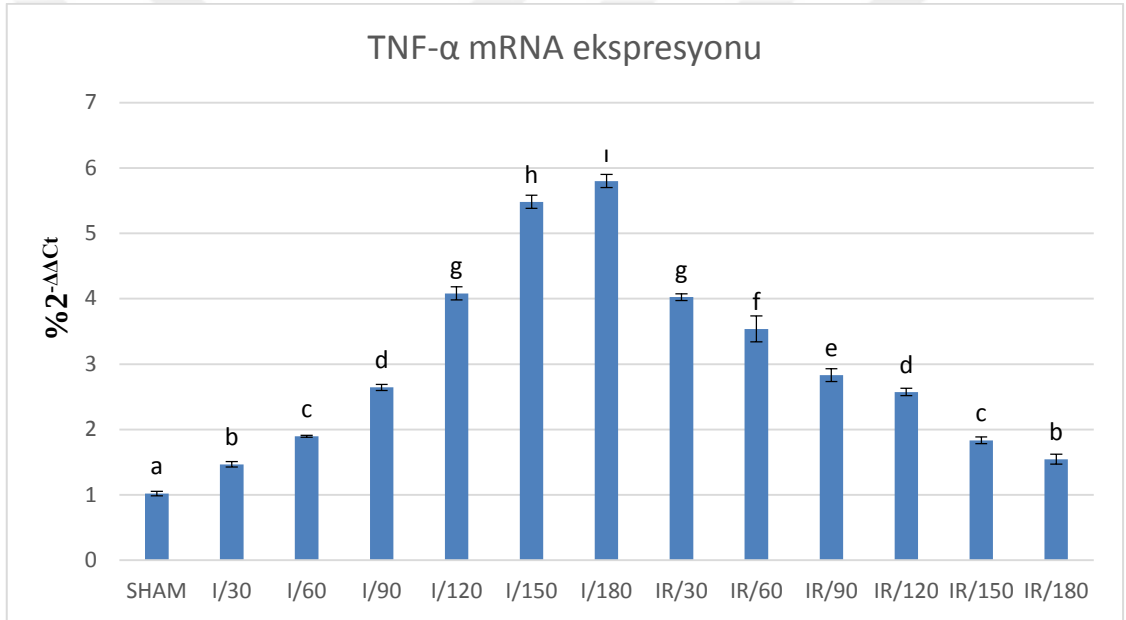


Şekil 4.33. Gerçek zamanlı PCR metodu ile eNOS ekspresyonu.
($p<0,05$ oranında anlamlı).

4.5.5. TNF- α PCR Bulguları

Çalışmamızda ölçülen diğer bir parametre olan TNF- α ekspresyon seviyesidir. TNF- α değerlerini incelediğimizde Şekil 4.34'de görüldüğü gibi iskemi süresinin artmasına bağlı olarak TNF- α seviyelerinin sham/kontrol grubuna göre arttığı görüldü. En yüksek TNF- α değeri ise en uzun iskemi süresi olan I/180 gruplarında olduğu görüldü.

İskemi sonrası değişik sürelerde reperfüzyona bırakılmış IR/30 gruplarında ise TNF- α seviyeleri IR grupları arasında en yüksek değere sahiptir. IR/30 grubunda I/180 gruplarına göre istatistiksel olarak azalırken, I/120 gruplarına göre istatistiksel olarak benzer TNF- α seviyeleri gösterildi. Reperfüzyon süresi arttıkça TNF- α seviyeleri istatistiksel olarak düştüğü, en düşük seviye ise IR/180 gruplarında olduğu tespit edildi. Yalnız IR/180 gruplarının TNF- α seviyeleri kontrole göre istatistiksel olarak yüksek olup, I/30 grubuna göre istatistiksel olarak benzer sonuçlar alındı. Aynı şekilde IR/150 grubu I60 grubu ile IR/120 grubunda I/90 grubu ile benzer sonuçlar gösterildi ($p<0,05$).

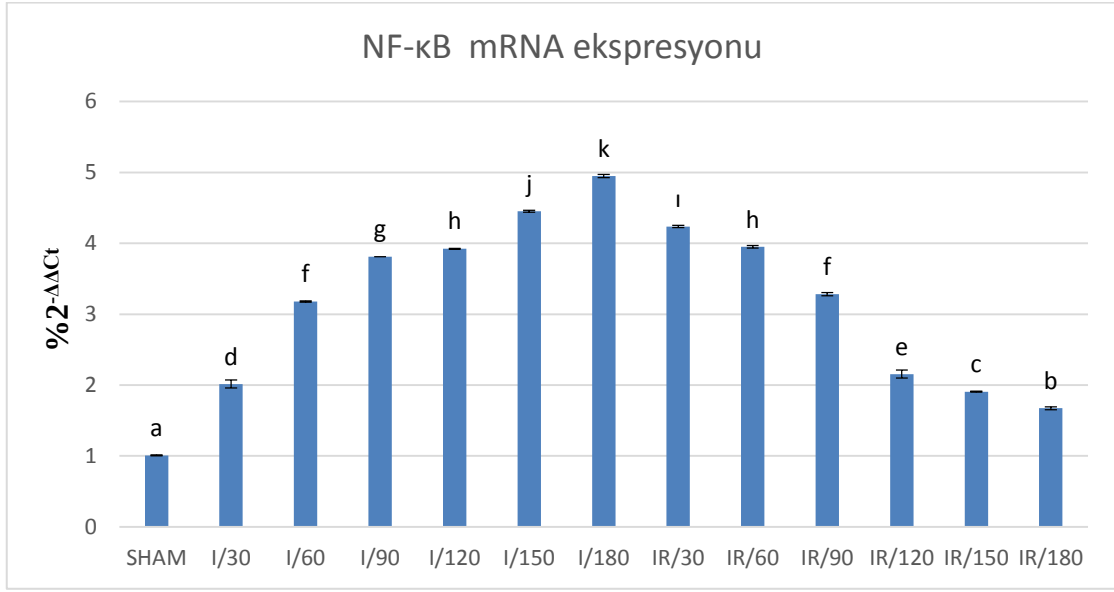


Şekil 4.34. Gerçek zamanlı PCR metodu ile TNF- α ekspresyonu. ($p<0,05$ oranında anlamlı).

4.5.6. NF- κ B PCR Bulguları

Çalışmamızda ölçülen bir diğer parametre NF- κ B ekspresyon seviyesidir. NF- κ B değerlerini incelediğimizde Şekil 4.35’de görüldüğü gibi iskemi süresinin artışına bağlı olarak NF- κ B seviyelerinin sham/kontrol grubuna göre arttığı görüldü. En yüksek NF- κ B değerinin ise en uzun iskemi süresi olan I/180 gruplarında olduğu görüldü. İskemi sonrası değişik sürelerde reperfüzyona bırakılmış IR/30 gruplarında ise NF- κ B

seviyeleri IR grupları arasında en yüksek değere sahiptir. IR/30 grubunda I/180 gruplarına göre istatistiksel olarak azaldığı görüldü. Reperfüzyon süresi arttıkça NF-κB seviyeleri istatistiksel olarak düşmüş, en düşük seviye ise IR/180 gruplarda tespit edildi. Yalnız IR/180 gruplarının NF-κB seviyeleri kontrole göre istatistiksel olarak yüksek olduğu görüldü. Ayrıca IR/90 grubu I/60 grubu ile IR/60 grubu ise I/120 grubu ile benzer sonuçlara sahiptir ($p<0,05$).



Şekil 4.35. Gerçek zamanlı PCR metodu ile NF-κB ekspresyonu. ($p<0,05$ oranında anlamlı).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, hem klinik açıdan önemli olan hem de cerrahi tanısı oldukça zor olan ve ileride infertiliteye neden olabilen over torsiyonunda oluşabilecek iskemik hasarın histopatolojik, elektron mikroskopik, moleküler ve biyokimyasal incelemesi yapıldı. Bununla beraber, cerrahide bir alternatif olan detorsiyon sonrası reperfüzyonun over dokuları üzerine reperfüzyon süresine bağlı gelişen hasarını değerlendirmek için moleküler, biyokimyasal ve histopatolojik incelemelerde bulunduk.

Over torsiyonunda iki farklı cerrahi tedavi seçimi bulunmaktadır. Bunlardan birincisi torsiyone olan overin çıkarılması, diğeri ise torsiyone olan overin detorsiyone edilerek tekrar yerine yerleştirilmesidir. Bu iki cerrahi alternatif arasında düşünce farklılıkları bulunmaktadır. İlkinde detorsiyon sonrası overlerde repfüzyona bağlı doku hasarının devam edeceği, bu nedenle bu over dokusunun cerrahi olarak çıkarılması uygun bulunmakta iken diğesinde ise ne kadar reperfüzyon hasarı olsa da dokunun tekrar tamir ve rejenerasyon yeteneği ile işlevselliğine geri dönebileceği düşünülmektedir. Bu konu ile ilgili birçok klinik çalışma bulunmakla beraber özellikle reperfüzyonu zamana göre inceleyen histopatolojik ve biyokimyasal çalışmalar kısıtlıdır. Biz de çalışmamızda bu konu üzerine eğildik. Çalışmamızda işlemiş olduğumuz iskemi; doku veya organa giden arteriyel ve venöz kan akımındaki yetersizlik sonucu oluşan oksijen eksikliği ve atık ürünlerin yine dolaşım tarafından uzaklaştırılamamasına bağlı olarak meydana gelen geri dönüşümlü ya da dönüşümsüz oluşabilen doku ve hücre hasarıdır.⁵⁶ İskemi sonucu dokuya yeterli O₂ sağlanamaması hücrede fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır. Bunun sonucunda hücre ölümü ve bir dizi kimyasal olay başlatılmaktadır.^{57,58} Bu esnadaki ATP miktarının azalması, anaerobik glikolizin artışı ve glikojen depolarının da tükenmesiyle sonuçlanır. Glikolizin artışı ile fosfat türevleri hidrolize olur. Bu da inorganik fosfat ve laktik asit

birikimi ile sonuçlanır ve bununla birlikte hücre içi pH düşer ve asidoz oluşur. ATP ve pH azalması, protein sentezinde azalmaya neden olur.⁶² İskemi ile birlikte oluşan hipooksijenizasyon neticesinde hücrede ATP sentezi durur.⁶⁴ Ancak mevcut ATP kullanılmaya devam eder ve adenozine parçalanır. Adenozin hücre dışına difüze olur, inozin ve hipoksantin meydana gelir. Oksijen yetersizliğinde ksantin dehidrogenaz enzimi (KD) aktifleşemez, dolayısı ile hipoksantin, ksantin oksidaz (KO) ile metabolize olur ve ksantin oluşur. Bu reaksiyonlar sonucunda serbest oksijen radikalleri açığa çıkar.⁶⁵⁻⁶⁷

Serbest radikal molekülleri, belirli bir seviyede kaldıkları sürece, organizmada yabancı olabilecek maddelere ve bazı enfeksiyöz ajanlara karşı önemli savunma moleküllerdur. Ancak oluşan serbest radikaller karşısında antioksidanlar yetersiz kalırsa bu durumda serbest radikaller hücrenin yapısal elemanları olan lipit, protein, karbohidrat, nükleik asitler ve yararlı olan enzimlerin yapılarını bozarak organizmada zararlı etkilere yol açarlar.⁷⁸

Serbest oksijen radikallerine baktığımız zaman lipit peroksidasyonunun önemli bir markırı olan MDA'yı tartışmalıyız.¹⁵³ MDA hücre membranında bulunan ansatüre yağ asitlerini zarara uğratan bir serbest oksijen ürünüdür. Yapılan çalışmalarda iskemi ve iskemi/reperfüzyon sonucunda MDA seviyelerinin oldukça yükseldiğı gösterilmiştir.^{154,155} Çalışmamızın sonucuna baktığımızda iskemi süresi arttıkça, hipoksik duruma paralel olarak MDA seviyelerinin, iskeminin zamanına bağılı olarak arttığını gördük. Bu sonuç over torsiyonuna bağılı olarak yapılan diğır çalışmaları desteklemektedir. Referfüzyon gruplarına baktığımız zaman ise reperfüzyonun 30, 60 ve 90 dakikalarında (IR/30, IR/60 ve IR/90) oksijen tedarikinin olmasına rağmen MDA seviyelerinin hala daha yüksek kaldığını gördük. Yalnız reperfüzyon sonrası 90. dakika (IR/90) ve sonrasında MDA seviyelerinin anlamlı şekilde azaldığını gördük.

Ayrıca reperfüzyonun 180. dakikalarında da (IR/180) MDA seviyeleri Sham/kontrol grubuna göre yüksek kalmaktadır. Paradoks olarak iskemi sonrası reperfüzyonda da yoğun doku hasarı görülmektedir.¹⁵⁶ Reperfüzyon sırasında moleküler oksijenin hücrenin içerisine girişinin, serbest oksijen radikallerinin üretimine neden olabileceği bilinmektedir. Reperfüzyon hasarı membran lipitleri, proteinler ve nükleik asitlere zarar verebilmektedir.¹⁵⁷ Reperfüzyon esnasında oluşan kontrolsüz oksijen temini özellikle iskemi sırasında azalmış olan hücresel enerji rezervlerini daha da azaltmaktadır.¹⁵⁸ Hipoksinin, endotel hücrelerinde bazı adezyon ve sitokinleri arttırdığı, fakat eNOS'u baskıladığı gösterilmiştir.¹⁵⁹ Reperfüzyonda ise hipoksinin sebep olduğu endotel hücre cevabının artan bir şekilde devamına neden olduğu bilinmektedir.¹⁶⁰ Bu nedenden dolayı reperfüzyon hasarının ilk dönemlerinde hızlıca endotel disfonksiyonuna neden olur¹⁶¹ ve reperfüzyonun erken döneminde iskemik dokulara kontrolsüz bir oksijen salınımını sağlamaktadır. Bu da reaktif oksijen metabolitlerinin üretimini tekrar arttırmaktadır.¹⁶² Çalışmamıza baktığımız zaman özellikle reperfüzyonun ilk zamanlarındaki MDA seviyesinin neden yüksek olduğunu bu şekilde açıklayabiliriz. Yalnız sürenin uzaması ile beraber endotelin tekrar rejenerasyonu ile MDA seviyelerinin düşmeye başladığını düşünmekteyiz.

Organizmada serbest radikallerin hasarını engelleyebilmek için antioksidanlar olarak bilinen savunma sistemleri bulunur. Antioksidanlar oksidasyonu inhibe eden veya geciktiren maddeler olarak da bilinmektedir.¹³⁷ Antioksidanlar da ilk olarak zararın yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonlarının engellenmesini sağlarlar. SOD, süperoksitlerin, moleküler oksijen ve hidrojen peroksite dönüşümünü katalizler. Bu enzimin fizyolojik fonksiyonları lipid peroksidasyonunu inhibe etmektir. Böylece hücrelerce metabolize edilen oksijenin, süperoksit serbest radikallerinin zarar verici etkilerine karşı korumaktadır.^{83,146} İskemi ve iskemi/reperfüzyon olaylarında

SOD aktivitesi düşmektedir.^{163,164} SOD enzimi bir antioksidan olmasına rağmen serbest oksijen radikallerinin arttığı durumda düşmesinin birçok nedeni olabilir. SOD aktivitesinin düşmesinin en önemli nedenlerinden bir tanesi iskemiye bağlı oluşan serbest oksijen radikallerinin DNA hasarına neden olması gösterilebilir.¹⁶⁵ Oluşan DNA hasarı SOD gen ekspresyonunu bozmuş olabilir. Bu çalışmada da iskeminin artan sürelerinde SOD aktivitesinin anlamlı derecede düştüğü gösterildi. Bu bulgularımız daha önce yapılan iskemi ve iskemi/reperfüzyon çalışmalarına paralellik göstermektedir.^{163,164} 180 dakika iskemiye bırakılmış sıçan overlerini çeşitli sürelerde reperfüzyona bıraktığımızda ise reperfüzyonun 30. ve 60. dakikalarında (IR/30 ve IR/60) SOD seviyeleri düşük kalmakla beraber ilerleyen sürelerde SOD aktivitesinin artmaya başladığı görülmektedir. Reperfüzyonun 180. dakikasında (IR/180) SOD seviyesi en yüksek değerine ulaşmasına rağmen sham/kontrol grubuna göre düşük kaldığı görüldü. Bu sonuçlar bize reperfüzyonun erken fazında serbest oksijen radikallerinin artmaya devam ettiğini ve buna paralel olarak DNA hasarının devam ettiğini gösterirken, reperfüzyonun ileri sürelerinde hücresel iyileşmenin başlaması ile DNA hasarının düzeldiği ve SOD aktivitesinin artmaya başladığını söyleyebiliriz. Daha önce yapılan çalışmalarda reperfüzyon sonrası SOD aktivitesinin düşük kalması ile bizim çalışmamızda reperfüzyon sonrası süreye bağımlı olarak SOD aktivitesinin artması aslında bir tezat teşkil etmemektedir. Daha önce yapılan çalışmalar zamana bağımlı yapılmadığı için reperfüzyonda SOD aktivitesindeki değişiklikler tespit edilmemiş olabilir. Sonuçlarımızı dikkatle incelediğimiz zaman IR/180 gruplarındaki SOD aktivitesinin kontrole göre hala daha düşük olduğu görülmektedir.

Glutasyon (GSH) da vücutta önemli antioksidanlardan biridir. Peptid bağı içermesi nedeniyle düşük enerjili bileşiklerden kabul edilen GSH, organik oksitleri ve ya H₂O₂'yi detoksifiye edebilme yeteneğindedir. Hücre proteinlerini indirgemiş biçimde

duran disülfid-sülfidril tepkimelerinde de etkilidir.⁵¹ GSH hücreyel olmayan bileşiklerin detoksifikasyonu ve ayrıca aminoasitlerin membranlardan geçişini sağlar. Glutasyon aktivitesinin azalması, hidrojen peroksit seviyesinin artmasına, bu durum da şiddetli hücre hasarı oluşumuna yol açmaktadır.¹⁶⁶ Glutasyon seviyelerinin incelenmesi iskemi/reperfüzyon çalışmaları doku antioksidan göstergesinin önemli bir markırı olarak kabul edilmektedir.¹⁶⁷ Daha önceki yapılan iskemi/reperfüzyon çalışmaları glutasyon seviyelerinin artmış olduğu gösterilmektedir.^{168,169} Bizim sonuçlarımıza baktığımız zaman iskeminin artan sürelerinde GSH seviyelerinin arttığı görölmektedir. Yalnız dramatik olarak iskemi 180 grubunda (I/180) diğer iskemi gruplarına göre azalma oluşmaktadır. Bunu şöyle açıklayabiliriz: İskemiye bağlı dokuda artan lipit peroksidasyonuna bir cevap olarak antioksidan miktarları artacaktır. Bu da bize iskemi gruplarında neden GSH seviyesinin arttığını göstermektedir. İskemi sonrası 180 dk'da GSH seviyelerinin azalması ise GSH miktarının artan oksidatif strese bağlı olarak tüketildiğini göstermektedir.¹⁶⁸ Reperfüzyon gruplarına baktığımız zaman reperfüzyonun 30., 60. ve 90. dakikalarında (IR/30, IR/60 ve IR/90) glutasyon seviyelerinin tekrar artmaya başladığı gösterildi. Bu sonuçlar bize reperfüzyonla beraber oksidatif stresin artmasına rağmen, kanlanmayla beraber dokuların glutasyon teminine başladığını göstermektedir. IR/120 ve IR/180. dakikalar arasında ise glutasyon seviyeleri düşmeye başladığı göröldü. Bu sonuçlarda bize reperfüzyonun ileri safhalarında doku iyileşmesinin hızlandığını ve serbest oksijen radikallerinin üretiminin azalmış olduğunu gösterdi.

İskemi ile birlikte oluşan hipooksijenizasyon neticesinde hücrede ATP sentezi durur.⁶⁴ Ancak mevcut ATP kullanılmaya devam eder. Bu aşamadan sonra devam eden reaksiyonlar zinciri sonucunda serbest oksijen radikalleri açığa çıkar.⁶⁵⁻⁶⁷ Reperfüzyon sırasında reoksijenizasyonla, iskemide oluşan ksantin oksidaz (KO) enzimi aktive

olarak biriken hipoksantini sırayla ksantin ve ürik aside dönüştürür, bu da süperoksit radikali (O_2^-)ve hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşumuyla sonuçlanır.⁷¹ İskemi/reperfüzyon üzerine yapılan çalışmalarda gerek iskemi, gerekse iskemi/reperfüzyonda KO'nun arttığı gösterilmiştir.^{168, 170} Bizim çalışmamızda da KO aktivitesinin iskemi süresine bağlı olarak arttığı görüldü. İskemi/reperfüzyon sonrasında ise KO aktivitesi, iskemi 180 grubuna (I/180) göre azalmasına rağmen reperfüzyonun ilerleyen sürelerinde KO aktivitesi yükselişini devam ettirmiştir. Bu da bize reperfüzyon sonrası kontrolsüz oksijen temininin KO aktivitesini yüksek tuttuğunu göstermektedir. Belki de reperfüzyon gruplarında süreyi arttırdığımızda KO seviyesini düşük olarak bulmuş olabilirdik. KO değerlerinin IR/180 dakikada hala daha yüksek olması endotel hasarına bağlı kontrolsüz oksijen akımının devam etmiş olabileceğini gösterdi.

İskemi ve iskemi/reperfüzyon sonrası yukardaki parametrelere ek olarak en önemli değişikliklere NO düzeyinde rastlanır.¹⁶² İskemi ve iskemi/reperfüzyon süresinde etkilenen en önemli hücreler endotel hücreleri olup, I/R endotel hücrelerinin NO ve süperoksit arasındaki dengesini değiştirerek endotel bağımlı dilatasyonda bozulmaya ve aynı zamanda akut inflamatuvar yanıtı sebep olmaktadır.¹⁷¹ Normal endotelde nitrik oksit üretimi süperoksit üretiminden fazla olup, NO süperoksit seviyelerinin etkili bir biçimde temizlemesine neden olur. Yalnız iskemik dokularda ve reperfüzyon sonrasında NO ile süperoksit arasındaki denge süperoksit lehine değişir. Bu dengesizlik endotelial NOS bağımlı olarak NO sentezinde bir azalmaya neden olur.¹⁷¹ Yapılan çalışmalarda eNOS' den üretilen NO'nun iskemi/reperfüzyon hasarında koruyucu olduğunu, bununla birlikte iNOS'dan üretilen NO'nun ise zararlı olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır.¹⁷²⁻¹⁷⁴ NO ile süperoksitin reaksiyonu ile peroksinitrit oluşur. Peroksinitritin temizlenmesinin iskemi/reperfüzyon hasarını düzelttiği görülmüştür.¹⁷⁵ Peroksinitritin birçok hücre hasarına neden olmasına rağmen hücre ve

dokular üzerine daha farklı etkileri de bulunmaktadır.¹⁷⁵ Peroksinitritin artması proinflatuar aktiviteyi artırır, mitokondriyal fonksiyon bozukluğunda modülasyona neden olur, ayrıca apopitozis üzerine etkileri de bulunmaktadır.¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ Bizim çalışmamızdaki iNOS ve eNOS sonuçlarına baktığımız zaman eNOS protein ekspresyonu iskeminin süresine bağlı olarak azaldığı görülmektedir. Bu da bize yukarıda belirttiğimiz gibi normal şartlar altında üretilen eNOS miktarındaki azalmanın, artan fazla miktardaki serbest oksijen radikallerine bağlı olabileceğini gösterir. Çünkü normal endotelden üretilen eNOS hasarlı endotelde üretilmemiş olabilir veya bir doku hasarına bağlı üretimi artan iNOS onun yerini almış olabilir. Reperfüzyon gruplarında ise eNOS protein ekspresyon seviyelerinin reperfüzyon süresine bağlı olarak artmaya başladığı görülmektedir. Bu sonuçlarda bize reperfüzyon süresi uzadıkça serbest oksijen radikallerinin azalmasına ve antioksidan miktarının artmasına bağlı olarak endotelial hasarın azalması ve tekrar fizyolojik şartlarda salınan eNOS aktivitesinin görevi yeniden ele almış olabileceğini gösterebilir. iNOS mRNA ekspresyon seviyesine baktığımız zaman ise eNOS ile zıt sonuçlar gördük. İskeminin artan sürelerinde, iNOS mRNA ekspresyonu artmaktadır. Bu sonuç ise iskeminin artan sürelerinde endotel hasarının arttığını göstermektedir. İskemi/reperfüzyon gruplarına baktığımızda iNOS mRNA ekspresyon seviyelerinin iskemi 180 grubuna (I/180) göre daha da yükseldiği görülmektedir. Bu sonuçlarda bize özellik/le reperfüzyonun erken aşamalarında endotel hasarının artmaya devam ettiğini göstermektedir. Yalnız iskemi/reperfüzyon 90 dakika (IR/90) sonrası iNOS mRNA seviyelerinin düşmeye başladığını gördük. Bu sonuçlarda bize iskemi/reperfüzyonda doku hasarının azalamaya başladığını göstermektedir. Bu konu ile ilgili son olarak peroksinitritin SOD’u inaktive ettiğini söylemeliyiz.¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ Bu da daha önce tartıştığımız iskemiye bağlı olarak azalan SOD aktivitesinin başka bir açıklamasıdır. İskemi/reperfüzyon hasarının başka bir komponenti de inflamatuvar

süreçtir. Çeşitli organlarda oluşan iskemi ve reperfüzyon hasarı kompleman kaskadının aktivasyonuna neden olur.^{181,182} Kompleman aktivasyonu ise lökositler için kemotaktik olup aynı zamanda nötrofil aktivasyonuna neden olur.¹⁸³ Yapılan çalışmalarda iskemi reperfüzyonun, sistemik TNF- α salınımına neden olduğu gösterilmiştir.^{184,185} Bu TNF- α 'nın birçok kaynağı bulunmakla beraber temelde aktive olmuş nötrofil ve lökosit aracılı olduğu bilinmektedir. İskemi/reperfüzyon hasarında proinflamatuvar sitokinlerden olan TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve NF- κ B temel rol oynar.^{186,187} Artan TNF- α miktarları da iNOS sentezini arttırmaktadır. IL-1 β ve IL-6'nın sentezlenmesi birbirleri ile ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda bu sitokinlerin iskemi/reperfüzyon hasarında arttığı gösterilmiştir.^{131,188} Serbest oksijen radikallerinin indüklediği TNF- α , IL-1 β ve IL-6'nın ekspresyonunda NF- κ B'nin aktivasyonu sorumludur.¹⁸⁹⁻¹⁹² IL-1 β aktive mononükleer lökositler tarafından oluşturulur. IL-1 β 'nın temel biyolojik etkileri temelde TNF- α 'ya benzemekle beraber etkinliği ve miktarı dolaşımdaki sitokin miktarına bağlı olarak değişir. IL-1 β , IL-6'nın da sentezini tetikler, temel etkisini lökositlerin hasar bölgesinde kümelenmesinde göstererek bu lökositlerin yüzeyinde bulunan çeşitli reseptörlerin ekspresyonlarını artırır. IL-1 β , TNF- α 'nın artmasına bağlı olarak oluşan doku yıkımını potansiyelize eder.¹¹⁴ Çalışmamızdaki sitokin sonuçlarına baktığımızda IL-1 β mRNA ekspresyonu iskemide zamana bağlı olarak artmakta, en yüksek seviyesini iskemi 180 dk (I/180) erişmektedir. İskemi yapılan grupların reperfüzyon sonrasında ise 30. ve 60. dakikalarda (IR/30 ve IR/60) IL-1 β mRNA ekspresyonu iskemi 180 grubuna (I/180) çok yakın bir şekilde yüksek bulunmakla beraber 90, 120, 150 dakikalarda (IR/90, IR/120, IR/150) anlamlı şekilde düşmektedir. Yalnız reperfüzyon sonrası 180. dakikalardaki (IR/180) IL-1 β ekspresyonu düşmesine rağmen kontrol grubuna göre yüksek kalmaktadır. IL-6 mRNA ekspresyon seviyelerine baktığımız zaman ise IL-1 β 'ya benzer sonuçlar aldığımızı gördük. Daha öncede belirttiğimiz gibi IL-1 β ve IL-6

salınımları birbirlerini tetikledikleri için benzer sonuçlar elde ettiğimizi düşündük. İskemi ve iskemi/reperfüzyona bağlı doku hasarından temel sorumlu tutulan TNF- α seviyelerine baktığımız zamanda diğer sitokinlere benzer sonuçlar gördük. Yalnız TNF- α mRNA ekspresyonlarını incelediğimizde reperfüzyonun hemen sonrasında seviyelerinin daha dramatik şekilde düştüğünü gördük. Son olarak tüm bu sitokinlerin salınımından sorumlu olan serbest oksijen radikallerinin de artmasına neden olan NF- κ B ekspresyonlarının yönünü incelediğimizde diğer sitokinlere benzer şekilde iskemi süresi arttıkça ekspresyonun arttığı reperfüzyon süresi uzadıkça miktarının azaldığı görüldü.

Çalışmamızın diğer ve önemli bir bölümü olan histopatolojik ve elektron mikroskopik bulgularını değerlendirdiğimizde, histopatolojik sonuçlarımız daha önce belirttiğimiz gibi gerek oksidan-antioksidan bulgularımızı, gerekse sitokin bulgularımızı destekler niteliktedir. Şöyle ki ödem, vasküler konjesyon, hemoraji ve PMNL değişimlerini incelediğimizde iskeminin artan sürelerinde bu bulguların şiddetinin arttığını, reperfüzyonun genel olarak 30., 60. ve 90. dakikalarında (IR/30, IR/60, IR/90) iskemi 180 grubu (I/180) ile benzer şekilde olduğunu, 120. dakikadan sonra ise bu dört parametrenin doku içinde yoğunluğunun azalmaya başladığını gördük. Yalnız hemoraji ve PMNL sayısının reperfüzyonun 120. dakikalarına (IR/120) kadar şiddetinin devam ettiğini ve 150. dakikadan (IR/150) itibaren düzelmeye başladığı görüldü. Doku hasarında hemorajinin en son düzelmeye başladığını, bununla beraber PMNL'nin de azalmaya başladığını biz de bulgularımızla teyit ettik. Histopatolojik bulgularımızın ikinci kısmında yaptığımız özellikle vasküler alanlardaki değişimleri gösteren Toluidin blue metodu ile boyanmış yarı ince kesitler incelendi. Bu incelemelerde iskemi 30. dakikalarından (I/30) itibaren bazal membran kalınlaşmasının devam ettiği, 60. dakikadan (I/60) itibaren vasküler konjesyonun başladığını 90 ve 120. dakikalarda (I/90

ve I/120) bu histopatolojinin şiddetlendiğini gözlemlenirken, iskemi 120. dakikada (I/120) bazal membran bozukluğunun çok daha belirgin hale geldiğini ve perisit değişikliklerinin başladığı gözlemlendi. İskemi 150 ve 180. dakikalarda (I/150 ve I/180) bu etkiler daha da şiddetlenmiştir. Tüm bu bulgularımız daha önce tartıştığımız iskemi stres parametreleri ve doku sitokin miktarları ile paralellik gösterdiği ortaya çıkmıştır. 180 dakika (I/180) iskemi sonrasında reperfüzyona bırakılmış aynı dokularda özellikle reperfüzyon 60. ve 90. dakikalarda (IR/60 ve IR/90) hasarın devam ettiği ve hatta ilerlediği gözlemlenmiştir.

Serbest oksijen radikallerine ve doku sitokin miktarlarına baktığımız zaman ise bu süreler içinde azalmaya başladıkları görülmektedir. İki sonucu birlikte incelediğimizde özellikle serbest oksijen radikalleri ve sitokinlerin belli bir noktaya kadar azalmaya başlamadan, doku rejenerasyonun başlayamadığını göstermektedir. Reperfüzyon 120, 150 ve 180. dakikalarda (IR/120, IR/150 ve IR/180) ise daha önce belirttiğimiz histopatolojik bulgular düzelmeye başlamıştır. İmmunohistokimyasal değerlendirmede kullandığımız NF- κ B incelemesinde ise moleküler olarak incelediğimiz NF- κ B mRNA ekspresyon ile benzer sonuçlar elde edildi.

Son olarak iskemi ve iskemi/reperfüzyon hasarını elektron mikroskopik bulgularla incelediğimizde histopatolojik bulgularla benzer şekilde iskeminin artan sürelerinde bazal membranda vakuolizasyon ve kalınlaşmanın arttığı, 90. dakikadan (I/90) itibaren ise bazal membranın bütününde bozulmanın ve parçalanmaların başladığı ve ekstrasvasküler hemorajinin başladığı görüldü. 120 dakikadan (I/120) itibaren ise bu bulgulara ek olarak perisitte strüktürel değişimler görülmeye başlandı. 180 dakika (I/180) iskemiden sonra reperfüzyona bırakılmış aynı dokuların elektron mikroskopik incelemesinde IR/30, IR/60 ve IR/90 gruplarında, I/180 grubunda belirtilen hasarların

gözlemlendiği yalnız IR/120, IR/150 ve IR/180 gruplarında bazal membranda oluşan düzensizliklerin düzelmeye başladığı ve hemorajinin azalmaya başladığı görüldü.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma ile sıçanlarda deneysel olarak oluşturulmuş over iskemi/reperfüzyon hasarının mekanizmasına yönelik moleküler, biyokimyasal, histolojik ve ultrastrüktürel yönlerden literatüre katkı sağladığımızı düşünüyoruz. Sıçan overlerinde gelişen iskemi ve reperfüzyon hasarının şiddetini, inflamatuvar sitokinlerle bağlantısını ve reperfüzyon hasarının zamanla olan değişimleri ayrıntıları ile ortaya koyuldu.

Literatüre baktığımızda iskemi/reperfüzyon hasarının zamana bağımlı değişimlerinin ultrastrüktürel bakımdan incelemesine rastlanmamıştır. Bu çalışma ile hem iskemide hemde reperfüzyon hasarında belli aralıklarla oluşturulan grupların ayrıntılı sonuçlarına ilk kez değinildi.

Aynı zamanda iskemi ve iskemi/reperfüzyona bağlı hasarın en önemli sebebi olan oksidatif stresin hangi zaman aralıklarında kritik seviyeye ulaştığını ve bunun klinik açısından önemini MDA, SOD, KO ve GSH gibi önemli biyokimyasal parametrelerle gösterdik. Ayrıca moleküler düzeyde de inflamatuvar sürecin önemli parametreleri olan IL-1 β , IL-6, NF- κ B, TNF- α , eNOS ve iNOS parametrelerinin ekspresyonlarının en kritik zamanlaması ortaya çıkarıldı. Tüm bu bulgulara ek olarak hasarın varlığının kanıtı olan histopatolojik bulgular ile hasar sonrasında ortaya çıkan apoptozisin de bir göstergesi olan NF- κ B düzeyinin immünohistokimyasal olarak gösterilerek desteklendi.

Çalışmamızın tüm sonuçlarını bir arada irdelediğimizde iskeminin artan sürelerinde doku hasarının artarak devam ettiğini, iskemide kalmış dokulara uygulanan reperfüzyonda ise özellikle 30 ve 60. dakikalarda (IR/30 ve IR/60) sitokin seviyelerini ve oksidatif stres parametrelerinin de yüksek kaldığı gösterildi. Yalnız bu yükseklik hiçbir parametremizde iskemi grupları kadar olmadı. Bu sonuçlar bize reperfüzyonun belirli süresinde hasarın devam etmesiyle birlikte hiçbir zaman iskemi kadar hasar

oluşturmadığını göstermektedir.

Ayrıca özellikle reperfüzyonun 90. dakikasından (IR/90) sonra doku rejenerasyonunun başladığı görüldü. Birçok literatürün aksine vücut homeostazisini destekler şekilde reperfüzyonun aslında belli bir süre sonrasında rejenerasyona imkan sağladığını gösteren ilk çalışmadır. Reperfüzyonun belli bir süresinden sonra doku rejenerasyonu sağlıklı doku kadar olmasa da, dokular için önemli olabileceği gösterildi.

Bizim çalışmamıza ek olarak ilerleyen süreçlerde bu mekanizma ile ilgili daha ayrıntılı çalışmalar yapılabileceğini düşünmekteyiz. Altı saatle sınırlandırdığımız bu çalışmanın daha uzun sürelerde denenerek mekanizmanın soru işareti olan bölümlerinin de aydınlatılacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Calis P, Bozdog G, Sokmensuer LK, Kender N. Does ischemia-reperfusion injury affect ovarian reserve and follicle viability in a rat model with adnexal torsion? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2015, 185: 126-130.
2. Taskin MI, Hismiogullari AA, Yay A, Adali E, Gungor AC, Korkmaz GO, Inceboz U. Effect of 2-aminoethoxydiphenyl borate on ischemia-reperfusion injury in a rat ovary model. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2014, 178: 74-79.
3. Sanez HA, Taboada-Perez GC, Hernandez-Arroyo L, Mateo-Madrigal M, Mateo-Madrigal V. Adnexal torsion: three cases. *Ginecol Obstet Mex*, 2013, 81: 272-278.
4. Dolgin SE, Lublin M, Shlasko E. Maximizing ovarian salvage when treating idiopathic adnexal torsion. *J Pediatr Surg*, 2000, 35: 624-626.
5. Celik A, Ergun O, Aldemir H, Ozcan C, Ozok G, Erdener A, Balyk E. Long-term results of conservative management of adnexal torsion in children. *J Pediatr Surg*, 2005, 40: 704-708.
6. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am*, 1992, 72: 65-83.
7. Quesnelle KM, Bystrom PV, Toledo-Pereyra LH. Molecular responses to ischemia and reperfusion in the liver. *Arch Toxicol*, 2015, 89(5):651-7.
8. Li L, Tan J, Miao Y, Lei P, Zhang Q. ROS and Autophagy: Interactions and Molecular Regulatory Mechanisms. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 35(5):615-21.
9. Ozsoy M, Gonul Y, Bal A, Ozkececi ZT, Celep RB, Adali F, Hazman O, Kocak A, Tosun M. Effect of IL-18 binding protein on hepatic ischemia-reperfusion injury induced by infrarenal aortic occlusion. *Ann Surg Treat Res*, 2015, 88: 92-99.

10. Kuroda S, Siesjo BK. Reperfusion damage following focal ischemia: pathophysiology and therapeutic windows. *Clin Neurosci*, 1997, 4: 199-212.
11. Jordan JE, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 1999, 43: 860-878.
12. Siesjo BK. Historical overview. Calcium, ischemia, and death of brain cells. *Ann N Y Acad Sci*, 1988, 522: 638-661.
13. Mangino MJ, Anderson CB, Murphy MK, Brunt E, Turk J. Mucosal arachidonate metabolism and intestinal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol*, 1989, 257: 299-307.
14. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. The molecular events underlying ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc*, 2002, 34: 2518-2519.
15. Carden DL, Smith JK, Korthuis RJ. Neutrophil-mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle. Role of granulocyte adherence. *Circulation Research*, 1990, 66: 1436-1444.
16. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med*, 1989, 320: 365-376.
17. Bagge U, Amundson B, Lauritzen C. White blood cell deformability and plugging of skeletal muscle capillaries in hemorrhagic shock. *Acta Physiologica Scandinavica*, 1980, 108: 159-163.
18. Jassem W, Fuggle SV, Rela M, Koo DD, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *Transplantation*, 2002, 73: 493-499.
19. Ondiveeran HK, Fox-Robichaud A. New developments in the treatment of ischemia/reperfusion injury. *Curr Opin Investig Drugs*, 2001, 2: 783-791.
20. Chensue SW, Remick DG, Shmyr-Forsch C, Beals TF, Kunkel SL. Immunohistochemical demonstration of cytoplasmic and membrane-associated tumor necrosis factor in murine macrophages. *Am J Pathol*, 1988, 133: 564-572.

21. Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, Bressler RB, Mendoza LH, Spengler RN, Smith CW, Entman ML. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation*, 1998, 98: 699-710.
22. Liu CF, Liu C, Yao HH. Review: Building pathways for ovary organogenesis in the mouse embryo. *Curr Top Dev Biol*, 2010, 90:263-290.
23. Schorge JO. *Williams gynecology*, 1st ed. New York, McGraw-Hill, 2008:451-453
24. Saladin K. *Anatomy & Physiology: The Unity of Form and Function* 5th ed. New York, McGraw-Hill, 2010:1078-1081
25. Arifoğlu Y. *Her Yönüyle Anatomi*, 1. Baskı. İstanbul, Medikal Yayıncılık, 2016:413-414
26. Standring S. *Gray's Anatomy*, 39th ed. New York, Elsevier, Churchill Livingstone, 2005:1303-1304
27. Saksouk FA, Johnson SC. Recognition of the ovaries and ovarian origin of pelvic masses with CT. *Radiographics*, 2004, 24: 133-146.
28. Satı L, Dişi Üreme Sistemi. İçinde: *Di Fiore Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle*. Demir R. (Çeviri Editörü). Di Fiore's Atlas of Histology with Functional Correlations. Eroschenko VP. 9. Baskı, Ankara, Palme yayınevi, 2001: 505-517
29. Graaff VD, Strete D, Creek CH. *Van De Graaff: Human Anatomy*, 6th ed. New York, McGraw Hill, 2001:728-729
30. Abrahams P, Craven J, Lumley J. *Illustrated Clinical Anatomy*, 2nd ed. London, Hodder Arnold, 2011:132

31. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. *The Developing Human Clinically Oriented Embryology*, 10th ed. Canada, Harcourt Brace International Edition Saunders, 2016:260
32. Sadler T.W. *Langman's Medical Embryology*, 12th ed. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2006:243.
33. Dudek RW. *BRS: Embriyoloji*, 1. Baskı. İstanbul, Medikal yayıncılık, 2016:169-171.
34. Motta PM, Makabe S, Nottola SA. The ultrastructure of human reproduction. I. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary. *Hum Reprod Update*, 1997, 3: 281-295.
35. Baker TG, Scrimgeour JB. Development of the gonad in normal and anencephalic human fetuses. *J Reprod Fertil*, 1980, 60: 193-199.
36. Gosden RG. Oogenesis as a foundation for embryogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, 186: 149-153.
37. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev*, 2001, 22: 255-288.
38. Espey LL. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol Reprod*, 1994, 50: 233-238.
39. Nishida T, Nishida N. Reinstatement of "germinal epithelium" of the ovary. *Reprod Biol Endocrinol*, 2006, 4: 42.
40. Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M, Upadhyaya NB. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004, 2: 20.

41. Ross MH, Pawlina W. *Histology A Text And Atlas*, 7th ed. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2016:835-843
42. Mescher AL. *Junquiera Basic Histology A Text And Atlas*, 13th ed. New York, McGraw-Hill, 2013:449-454
43. Uzumcu M, Zachow R. Developmental exposure to environmental endocrine disruptors: consequences within the ovary and on female reproductive function. *Reprod Toxicol*, 2007, 23: 337-352.
44. Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update*, 2005, 11: 461-471.
45. Pepling ME, Spradling AC. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Dev Biol*, 2001, 234: 339-351.
46. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev*, 2000, 21: 200-214.
47. Gartner LPH. *Color Textbook of Histology*, 2nd ed. Philadelphia, W.B. Saunders comp, 2001: 405-406
48. Ben-Chetrit A, Gotlieb L, Wong PY, Casper RF. Ovarian response to recombinant human follicle-stimulating hormone in luteinizing hormone-depleted women: examination of the two cell, two gonadotropin theory. *Fertil Steril*, 1996, 65: 711-717.
49. Bercegeay S, Jean M, Lucas H, Barriere P. Composition of human zona pellucida as revealed by SDS-PAGE after silver staining. *Mol Reprod Dev*, 1995, 41: 355-359.
50. Kutlu S. Kadın ve Erkek Gonadları. İçinde: *Lippincott Fizyoloji*, İsoğlu ÜA, Ermutlu MN, Yılmaz B, (Çeviri editörleri). *Lippincott Illustrated Reviews*:

- Physiology*. Preston RR, Wilson TE. 1. Baskı. İstanbul Nobel Tıp Kitabevi, 2014:439-440
51. White BA. Section Eight the Endocrine Reproductive Systems. In: Koeppen BM, Stanton BA (eds). *Berne & Levy Physiology*, 6th ed. Philadelphia, Elsevier 2008:1116-1341
52. Scanlon VC, Sanders T. nlon, Valerie C. *Essentials of Anatomy And Physiology*, 5th ed. Philadelphia, F. A. Davis Company, 2007:247
53. Hall JE, Guyton AC. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*, 13th ed. Philadelphia, Elsevier, 2016:1039-1040
54. Moore KL, Persaude TVN, Torchia MG. *Before We Are Born*, 9th ed. Canada, Saunders Elsevier, 2016:14
55. Barrett KE, Boitano S, Barman SM, Brooks HL. *Ganong's Review of Medical Physiology*, 25th ed. Boston, The McGraw-Hill, 2016:314
56. Tullis MJ, Brown S, Gewertz BL. Hepatic influence on pulmonary neutrophil sequestration following intestinal ischemia-reperfusion. *J Surg Res*, 1996, 66: 143-146.
57. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation*, 2001, 104: 2981-2989.
58. Jennings RB, Murry CE, Steenbergen C, Jr., Reimer KA. Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation*, 1990, 82: II2-12.
59. Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med*, 1991, 42: 225-246.
60. Şener GY, BÇ. İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim*, 2009, 22: 5- 13.

61. Hatanaka N, Kamike W, Shimizu S, Miyata M, Inoue T, Yoshida Y, Tagawa K, Matsuda H. Ca_2^+ release from mitochondria induces cytosolic enzyme leakage in anoxic liver. *J Surg Res*, 1995, 58: 485-490.
62. Tuzlalı S, Güllüoğlu M. Hücre Hasarı, Hücre Ölümü ve Adaptasyonlar. İçinde: *Robins Temel Patoloji*. Çevikbaş U, Tuzlalı S, Güllüoğlu M. (Çeviri editörleri). *Robbins Basic Pathology*. Kumar V, Abbas A, Aster J. 9. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 2013: 1-28
63. Arai M, Tejima K, Ikeda H, Tomiya T, Yanase M, Inoue Y, Nagashima K, Nishikawa T, Watanabe N, Omata M, Fujiwara K. Ischemic preconditioning in liver pathophysiology. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22 Suppl 1: S65-67.
64. Kukan M. Emerging roles of proteasomes in ischemia-reperfusion injury of organs. *J Physiol Pharmacol*, 2004, 55: 3-15.
65. Katori M, Berne RM. Release of adenosine from anoxic hearts. Relationship to coronary flow. *Circ Res*, 1966, 19: 420-425.
66. Mubagwa K, Flameng W. Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview. *Cardiovasc Res*, 2001, 52: 25-39.
67. Strayer DS, Rubin E. Cell Adaptation, Cell Injury and Cell Death. In: Rubin E, Reisner HM (eds). *Essentials of Rubin's Pathology*, 6th ed. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins, 2014:1-24
68. Hagiwara S, Iwasaka H, Hidaka S, Hasegawa A, Noguchi T. Neutrophil elastase inhibitor (sivelestat) reduces the levels of inflammatory mediators by inhibiting NF- κ B. *Inflamm Res*, 2009, 58: 198-203.
69. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull*, 2004, 70: 71-86.

70. Mangino MJA, Murphy CB, Brunt MKE, Turk J. Mucosal arachidonate metabolism and intestinal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol.*, 1998, 275: 1341-1352.
71. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med*, 1985, 312: 159-163.
72. Dorweiler B, Pruefer D, Andradi TB, Maksan SM, Schmiedt W, Neufang A, Vahl CF. Ischemia-Reperfusion Injury : Pathophysiology and Clinical Implications. *Eur J Trauma Emerg Surg*, 2007, 33: 600-612.
73. Piper HM, Meuter K, Schafer C. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg*, 2003, 75: S644-648.
74. Akkoç H. İskemik Önkoşullama Mekanizmaları. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 2007, 27: 165-176.
75. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res*, 2004, 61: 448-460.
76. Das M, Das DK. Molecular mechanism of preconditioning. *IUBMB Life*, 2008, 60: 199-203.
77. Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radic Res*, 1996, 25: 57-74.
78. Tamer LPG, Eskanderi G, Ercen B, Atik U. Serbest radikaller. *Mersin Üniversitesi Tıp Fak. Dergisi*, 2000, 1:52-58.
79. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 2002, 82: 47-95.

80. Oruc O, Inci K, Aki FT, Zeybek D, Muftuoglu SF, Kilinc K, Ergen A. Sildenafil attenuates renal ischemia reperfusion injury by decreasing leukocyte infiltration. *Acta Histochem*, 2010, 112: 337-344.
81. Mckee T, Mckee JR. *Biochemistry: The Molecular Basis of Life*, 3rd ed. New York, The McGraw-Hill, 2004:478
82. Davies SJ, Reichardt-Pascal SY, Vaughan D, Russell GI. Differential effect of ischaemia-reperfusion injury on anti-oxidant enzyme activity in the rat kidney. *Exp Nephrol*, 1995, 3: 348-354.
83. Rosen GM, Pou S, Ramos CL, Cohen MS, Britigan BE. Free radicals and phagocytic cells. *FASEB J*, 1995, 9: 200-209.
84. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev*, 2004, 25: 612-628.
85. Akkuş İ. *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*. 1. Baskı. Konya, Mimoza Yayınları, 1995:85
86. Salway JG. *Medical Biochemistry at a Glance*, 3rd ed. Oxford, Wiley-Blackwell, 2012:38
87. Di Mascio P, Murphy ME, Sies H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am J Clin Nutr*, 1991, 53: 194S-200S.
88. Lieberthal W. Biology of ischemic and toxic renal tubular cell injury: role of nitric oxide and the inflammatory response. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 1998, 7: 289-295.
89. Nath KA, Norby SM. Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med*, 2000, 109: 665-678.
90. Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *J Clin Invest*, 1984, 74: 1156-1164.

91. Batcioglu K, Gul M, Uyumlu AB, Esrefoglu M. Liver lipid peroxidation and antioxidant capacity in cerulein-induced acute pancreatitis. *Braz J Med Biol Res*, 2009, 42: 776-782.
92. Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, 939: 200-215.
93. Torun EBF. Endokrin bir organ olarak endotel ve endotelinin hipertansiyondaki rolü. *Erciyes Tıp Dergisi*, 2004, 26: 126- 131.
94. Özkan MY. Nitrik Oksit ve Akciğerler. *Toraks Dergisi*, 2003, 4: 88- 94.
95. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*, 1992, 6: 3051-3064.
96. Shaul PW, North AJ, Wu LC, Wells LB, Brannon TS, Lau KS, Michel T, Margraf LR, Star RA. Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium. *J Clin Invest*, 1994, 94: 2231-2236.
97. Şan M. *Endotel Hücresinin Genel Yapısı ve Özellikleri*. 1. Baskı. İstanbul, Pirintaş, 2005:84
98. Lin HI, Wang D, Leu FJ, Chen CF, Chen HI. Ischemia and reperfusion of liver induces eNOS and iNOS expression: Effects of a NO donor and NOS inhibitor. *Chin J Physiol*, 2004, 47: 121-127.
99. Shi ZL, Ling YL, Yao YX, Zhou JL. Changes of iNOS genes expression in liver following ischemia and reperfusion of limbs and their significance in rats. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, 2004, 20: 172-175.
100. Hur GM, Ryu YS, Yun HY, Jeon BH, Kim YM, Seok JH, Lee JH. Hepatic ischemia/reperfusion in rats induces iNOS gene transcription by activation of NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 261: 917-922.

101. Hein TW, Zhang C, Wang W, Chang CI, Thengchaisri N, Kuo L. Ischemia-reperfusion selectively impairs nitric oxide-mediated dilation in coronary arterioles: counteracting role of arginase. *FASEB J*, 2003, 17: 2328-2330.
102. Esme H, Fidan H, Koken T, Solak O. Effect of lung ischemia-reperfusion on oxidative stress parameters of remote tissues. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2006, 29: 294-298.
103. Szocs K. Endothelial dysfunction and reactive oxygen species production in ischemia/reperfusion and nitrate tolerance. *Gen Physiol Biophys*, 2004, 23: 265-295.
104. Vaghasiya JD, Sheth NR, Bhalodia YS, Jivani NP. Exaggerated liver injury induced by renal ischemia reperfusion in diabetes: effect of exenatide. *Saudi J Gastroenterol*, 2010, 16: 174-180.
105. Weight SC, Bell PR, Nicholson ML. Renal ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg*, 1996, 83: 162-170.
106. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 2002, 105: 1135-1143.
107. Thrane AS, Skehan JD, Thrane PS. A novel interpretation of immune redundancy and duality in reperfusion injury with important implications for intervention in ischaemic disease. *Med Hypotheses*, 2007, 68: 1363-1370.
108. Suzuki M, Asako H, Kubes P, Jennings S, Grisham MB, Granger DN. Neutrophil-derived oxidants promote leukocyte adherence in postcapillary venules. *Microvasc Res*, 1991, 42: 125-138.
109. Zhang W, Smith C, Shapiro A, Monette R, Hutchison J, Stanimirovic D. Increased expression of bioactive chemokines in human cerebromicrovascular

- endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro. *J Neuroimmunol*, 1999, 101: 148-160.
110. Noronha IL, Niemir Z, Stein H, Waldherr R. Cytokines and growth factors in renal disease. *Nephrol Dial Transplant*, 1995, 10: 775-786.
 111. Bilgehan H. *Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi*. 1. Baskı. İzmir, Barış Yayınları, 1999:74-75
 112. Chapel H, Haeney M, Misbah S, Snowde N. *Essentials of clinical immunology*, 6th ed. Oxford, John Wiley & Son, 2014:13-14
 113. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*, 8th ed. Philadelphia, Saunders Company, 2015:2
 114. Doan T, Melvold R, Viselli S, Waltenbaugh C. *Lippincott's Illustrated Reviews: Immunology*, 2nd ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2013:69
 115. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg*, 1994, 81: 637-647.
 116. Lin ELS, Calvano SE. *The systemic response to injury*, 7th ed. Boston, McGraw Hill, 1999:231-233
 117. Sun Z, Wang X, Lasson A, Bojesson A, Annborn M, Andersson R. Effects of inhibition of PAF, ICAM-1 and PECAM-1 on gut barrier failure caused by intestinal ischemia and reperfusion. *Scand J Gastroenterol*, 2001, 36: 55-65.
 118. Tracey KJ, Vlassara H, Cerami A. Cachectin/tumour necrosis factor. *Lancet*, 1989,1: 1122-1126.
 119. Jaattela M. Biologic activities and mechanisms of action of tumor necrosis factor-alpha/cachectin. *Lab Invest*, 1991, 64: 724-742.
 120. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuna-Castroviejo D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res*, 1995, 18: 1-11.

121. Damas P, Reuter A, Gysen P, Demonty J, Lamy M, Franchimont P. Tumor necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans. *Crit Care Med*, 1989, 17: 975-978.
122. Gabryel B, Labuzek K, Malecki A, Herman ZS. Immunophilin ligands decrease release of pro-inflammatory cytokines (IL-1beta, TNF-alpha and IL-2 in rat astrocyte cultures exposed to simulated ischemia in vitro. *Pol J Pharmacol*, 2004, 56: 129-136.
123. Burne MJ, Elghandour A, Haq M, Saba SR, Norman J, Condon T, Bennett F, Rabb H. IL-1 and TNF independent pathways mediate ICAM-1/VCAM-1 up-regulation in ischemia reperfusion injury. *J Leukoc Biol*, 2001, 70: 192-198.
124. Old LJ. Tumor necrosis factor (TNF). *Science*, 1985, 230: 630-632.
125. Atkins E. Pathogenesis of fever. *Physiol Rev*, 1960, 40: 580-646.
126. Dinarello CA. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood*, 1991, 77: 1627-1652.
127. Arend WPD. *Cytokines and Growth factors*, 1st ed. Philadelphia, Arthritis and Allied Conditions, 1993: 227-247.
128. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol*, 1993, 54: 1-78.
129. Hierholzer C, Kalff JC, Audolfsson G, Billiar TR, Tweardy DJ, Bauer AJ. Molecular and functional contractile sequelae of rat intestinal ischemia/reperfusion injury. *Transplantation*, 1999, 68: 1244-1254.
130. Yao YM, Bahrami S, Redl H, Fuerst S, Schlag G. IL-6 release after intestinal ischemia/reperfusion in rats is under partial control of TNF. *J Surg Res*, 1997, 70: 21-26.

131. Cohen SB, Wattiez A, Stockheim D, Seidman DS, Lidor AL, Mashiach S, Goldenberg M. The accuracy of serum interleukin-6 and tumour necrosis factor as markers for ovarian torsion. *Hum Reprod*, 2001, 16: 2195-2197.
132. Jung JY, Lee SM. The roles of Kupffer cells in hepatic dysfunction induced by ischemia/reperfusion in rats. *Arch Pharm Res*, 2005, 28: 1386-1391.
133. Tsung A, Hoffman RA, Izuishi K, Critchlow ND, Nakao A, Chan MH, Lotze MT, Geller DA, Billiar TR. Hepatic ischemia/reperfusion injury involves functional TLR4 signaling in nonparenchymal cells. *J Immunol*, 2005, 175: 7661-7668.
134. Abraham E. NF-kappaB activation. *Crit Care Med*, 2000, 28: N100-104.
135. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology*, 2006, 43: S31-44.
136. Matsui N, Kasajima K, Hada M, Nagata T, Senga N, Yasui Y, Fukuishi N, Akagi M. Inhibition of NF-kappaB activation during ischemia reduces hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *J Toxicol Sci*, 2005, 30: 103-110.
137. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*, 1995, 41: 1819-1828.
138. Newsholme EA, Leech TR. *Functional Biochemistry in Health and Disease*, 1st ed. Oxford, Wiley-Blackwell, 2010:519
139. Yalçın AS. Serbest radikaller ve patolojik etkileri. *Sendrom*, 1992, 4: 40-43.
140. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J*, 1995, 9: 526-533.
141. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS*, 2007, 115: 81-103.

142. Cherubini A, Ruggiero C, Morand C, Lattanzio F, Dell'aquila G, Zuliani G, Di Iorio A, Andres-Lacueva C. Dietary antioxidants as potential pharmacological agents for ischemic stroke. *Curr Med Chem*, 2008, 15: 1236-1248.
143. Mickle DA, Weisel RD. Future directions of vitamin E and its analogues in minimizing myocardial ischemia-reperfusion injury. *Can J Cardiol*, 1993, 9: 89-93.
144. Virag L, Szabo C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev*, 2002, 54: 375-429.
145. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, 2001, 54: 176-186.
146. Tousoulis D, Andreou I, Antoniadis C, Tentolouris C, Stefanadis C. Role of inflammation and oxidative stress in endothelial progenitor cell function and mobilization: therapeutic implications for cardiovascular diseases. *Atherosclerosis*, 2008, 201: 236-247.
147. Bender DA. Free Radical & Antioxidant Nutrients. In: Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA (eds). *Harper's Illustrated Biochemistry*, 30th ed. New York, McGraw-Hill Medical, 2015:564-568
148. Voet D, Voet JG, Pratt CW. *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level*, 4th ed. United States of America. John Wiley & Sons, Inc, 2013:90
149. Papalambros E, Sigala F, Georgopoulos S, Paraskevas KI, Andreadou I, Menenakos X, Sigalas P, Papalambros AL, Vourliotakis G, Giannopoulos A, Bakoyiannis C, Bastounis E. Malondialdehyde as an indicator of oxidative stress during abdominal aortic aneurysm repair. *Angiology*, 2007, 58: 477-482.
150. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 1979, 95: 351-358.

151. Aksoy H, Ozkan A, Aktas F, Borekci B. Helicobacter pylori seropositivity and its relationship with serum malondialdehyde and lipid profile in preeclampsia. *J Clin Lab Anal*, 2009, 23: 219-222.
152. Oral A, Odabasoglu F, Halici Z, Keles ON, Unal B, Coskun AK, Kilic C, Surer I, Salman AB. Protective effects of montelukast on ischemia-reperfusion injury in rat ovaries subjected to torsion and detorsion: biochemical and histopathologic evaluation. *Fertil Steril*, 2011, 95: 1360-1366.
153. Ozturk A, Baltaci AK, Mogulkoc R, Ozturk B. The effect of prophylactic melatonin administration on reperfusion damage in experimental testis ischemia-reperfusion. *Neuro Endocrinol Lett*, 2003, 24: 170-172.
154. Yildiz H, Durmus AS, Simsek H, Yaman M. Dose-dependent protective effect of sildenafil citrate on testicular injury after torsion/detorsion in rats. *Andrologia*, 2012, 44 Suppl 1: 300-306.
155. Erol B, Tokgoz H, Hanci V, Bektas S, Akduman B, Yencilek F, Mungan G, Mungan A. Vardenafil reduces testicular damage following ischemia/reperfusion injury in rats. *Kaohsiung J Med Sci*, 2009, 25: 374-380.
156. Rabinowitz R, Hulbert WC, Jr. Acute scrotal swelling. *Urol Clin North Am*, 1995, 22: 101-105.
157. Anderson JB, Williamson RC. Fertility after torsion of the spermatic cord. *Br J Urol*, 1990, 65: 225-230.
158. Palmer JS, Cromie WJ, Plzak LF, Leff AR. A platelet activating factor antagonist attenuates the effects of testicular ischemia. *J Urol*, 1997, 158: 1186-1190.
159. Siriussawakul A, Zaky A, Lang JD. Role of nitric oxide in hepatic ischemia-reperfusion injury. *World J Gastroenterol*, 2010, 16: 6079-6086.

160. Kvietys PR, Granger DN. Endothelial cell monolayers as a tool for studying microvascular pathophysiology. *Am J Physiol*, 1997, 273: G1189-1199.
161. Grossini E, Pollesello P, Bellofatto K, Sigaud L, Farruggio S, Origlia V, Mombello C, Mary DA, Valente G, Vacca G. Protective effects elicited by levosimendan against liver ischemia/reperfusion injury in anesthetized rats. *Liver Transpl*, 2014, 20: 361-375.
162. Grisham MB, Granger DN, Lefer DJ. Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Radic Biol Med*, 1998, 25: 404-433.
163. Wang X, Zhou H, Yang J. GSH.Px or SOD encapsulated erythrocytes in the study of cerebral ischemia-reperfusion. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 1997, 77: 43-46.
164. Cadirci E, Oral A, Odabasoglu F, Kilic C, Coskun K, Halici Z, Suleyman H, Nuri Keles O, Unal B. Atorvastatin reduces tissue damage in rat ovaries subjected to torsion and detorsion: biochemical and histopathologic evaluation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2010, 381: 455-466.
165. Salman S, Kumbasar S, Gursan N, Kumtepe Y, Borekci B, Polat B, Hakan Alp H, Talip Sener M, Suleyman H. Investigation of the relationship of some antihypertensive drugs with oxidant/antioxidant parameters and DNA damage on rat uterus tissue. *Int J Fertil Steril*, 2011, 5: 96-103.
166. Polat B, Suleyman H, Alp HH. Adaptation of rat gastric tissue against indomethacin toxicity. *Chem Biol Interact*, 2010, 186: 82-89.
167. Kono T, Saito M, Kinoshita Y, Satoh I, Shinbori C, Satoh K. Real-time monitoring of nitric oxide and blood flow during ischemia-reperfusion in the rat testis. *Mol Cell Biochem*, 2006, 286: 139-145.

168. Duman A, Mogulkoc R, Baltaci AK, Menevse E. 3', 4'-dihydroxyflavonol attenuates tissue damage in unilateral testis ischemia-reperfusion in rats. *Bratisl Lek Listy*, 2015, 116: 735-740.
169. Hekimoglu A, Kurcer Z, Aral F, Baba F, Atessahin A, Sakin F. Effects of 3-aminobenzamide on unilateral testicular ischemia-reperfusion injury: what is the role of PARP inhibition? *Can J Physiol Pharmacol*, 2010, 88: 1123-1129.
170. Bird JE, Milhoan K, Wilson CB, Young SG, Mundy CA, Parthasarathy S, Blantz RC. Ischemic acute renal failure and antioxidant therapy in the rat. The relation between glomerular and tubular dysfunction. *J Clin Invest*, 1988, 81: 1630-1638.
171. Teke ZKB, Özden A. İskemi-Reperfüzyon Hasarının Patofizyolojisi. *Pamukkale Tıp Dergisi*, 2008, 1: 65-72.
172. Mark LA, Robinson AV, Schulak JA. Inhibition of nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res*, 2005, 129: 236-241.
173. Vinas JL, Sola A, Genesca M, Alfaro V, Pi F, Hotter G. NO and NOS isoforms in the development of apoptosis in renal ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med*, 2006, 40: 992-1003.
174. Chatterjee PK, Patel NS, Sivarajah A, Kvale EO, Dugo L, Cuzzocrea S, Brown PA, Stewart KN, Mota-Filipe H, Britti D, Yaqoob MM, Thiemermann C. GW274150, a potent and highly selective inhibitor of iNOS, reduces experimental renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int*, 2003, 63: 853-865.
175. Szabo C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6: 662-680.
176. Brown GC, Borutaite V. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1658: 44-49.

177. Vinas JL, Hotter G, Pi F, Palacios L, Sola A. Role of peroxynitrite on cytoskeleton alterations and apoptosis in renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 292: F1673-1680.
178. Liaudet L, Vassalli G, Pacher P. Role of peroxynitrite in the redox regulation of cell signal transduction pathways. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2009, 14: 4809-4814.
179. Macmillan-Crow LA, Cruthirds DL. Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic Res*, 2001, 34: 325-336.
180. Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobo N, Schopfer F, Boveris A. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys*, 1996, 328: 85-92.
181. Xiao F, Eppihimer MJ, Willis BH, Carden DL. Complement-mediated lung injury and neutrophil retention after intestinal ischemia-reperfusion. *J Appl Physiol* 1985, 1997, 82: 1459-1465.
182. Helliwell TR, Wilkinson A, Griffiths RD, Palmer TE, McClelland P, Bone JM. Microvascular endothelial activation in the skeletal muscles of patients with multiple organ failure. *J Neurol Sci*, 1998, 154: 26-34.
183. Witthaut R, Farhood A, Smith CW, Jaeschke H. Complement and tumor necrosis factor-alpha contribute to Mac-1 (CD11b/CD18) up-regulation and systemic neutrophil activation during endotoxemia in vivo. *J Leukoc Biol*, 1994, 55: 105-111.
184. Colletti LM, Burtch GD, Remick DG, Kunkel SL, Strieter RM, Guice KS, Oldham KT, Campbell DA, Jr. The production of tumor necrosis factor alpha and

- the development of a pulmonary capillary injury following hepatic ischemia/reperfusion. *Transplantation*, 1990, 49: 268-272.
185. Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, Strieter RM. Chemokine expression during hepatic ischemia/reperfusion-induced lung injury in the rat. The role of epithelial neutrophil activating protein. *J Clin Invest*, 1995, 95: 134-141.
186. Chaplin DD, Fu Y. Cytokine regulation of secondary lymphoid organ development. *Curr Opin Immunol*, 1998, 10: 289-297.
187. Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003, 18: 891-902.
188. Li C, Gao Y, Tian J, Shen J, Xing Y, Liu Z. Sophocarpine administration preserves myocardial function from ischemia-reperfusion in rats via NF-kappa B inactivation. *J Ethnopharmacol*, 2011, 135: 620-625.
189. Meldrum DR, Dinarello CA, Cleveland JC, Jr., Cain BS, Shames BD, Meng X, Harken AH. Hydrogen peroxide induces tumor necrosis factor alpha-mediated cardiac injury by a P38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *Surgery*, 1998, 124: 291-296; discussion 297.
190. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*, 2002, 10: 417-426.
191. Moynagh PN. Toll-like receptor signalling pathways as key targets for mediating the anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids. *J Endocrinol*, 2003, 179: 139-144.

192. Lutz J, Thurm K, Heemann U. Anti-inflammatory treatment strategies for ischemia/reperfusion injury in transplantation. *J Inflamm (Lond)*, 2010, 7: 27.



EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Elif POLAT
Doğum tarihi:	01.01.1984
Doğum Yeri:	Eminönü
Medeni Hali:	Bekar
Uyruğu:	T.C.
Adres:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD.
Tel:	--
Faks:	--
E-mail:	elifpol@gmail.com
Eğitim	
Lise	Avcılar 50. Yıl İnsa Lisesi/ İstanbul
: Lisans	Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Biyoloji Bölümü
: Yüksek Lisans	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Biyoloji Bölümü
: Doktora	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	63.75
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği	
İlgi Alanları ve Hobiler	
Fotoğrafçılık, Yüzme, Seyahat, Tiyatro ve Sinema	

EK-2. ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ DENEY HAYVANLARI YEREL ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 75296309-050.01.04-E.1600267214
Konu : HADYEK Kararı.

10.11.2016

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 04.11.2016 tarihli ve 42190979-050.01.04-E.1600262663 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 04.11.2016 tarih ve 7 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 157 no'lu kararı ile söz konusu Doktora Tezi çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna mevcut oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz ederim.

Toplantı Tarihi: 04.11.2016

Toplantı Sayısı : 7

KARAR NO 157: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Büyükanı ÖNAL'ın yürürlüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığının Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı ile Farmakoloji Laboratuvarında yürütülen "İskemik ve Reperfüzyon Sürecinde Zamana Bağlı Moleküller Mekanizmalarının Seyrinin Sıçanlarda Araştırılması" başlıklı araştırma çalışmasının yürütücülüğünün ve çalışma (01.09.2015 tarih ve 7/139 sayılı HADYEK kararı)'nın adının değişikliği ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 04.11.2016 tarih ve 42190979-050.01.04-E.1600262663 sayılı yazısı ile ekleri görüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr.Jale SELLİ tarafından, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığının Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı ile Farmakoloji Laboratuvarında "Dişi Sıçanların Over Dokusunda Deneyel Olarak Oluşturulmuş İskemi ve Reperfüzyon Modelinde Zamana Bağlı Moleküller Mekanizmalarının Seyrinin ve Strüktürel Değişikliklerin Araştırılması" başlıklı Doktora Tezi çalışması olarak yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğunun, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 55240 Erzurum
Tel: +90 442 2317322
Elektronik Adı: <http://www.atauni.edu.tr/fakulteler/veteriner-fakultesi>
Kop Adresi: atauni@etl.kop.tr

Bilgi Mahmut KOCA
Faks: +90 442 2317324
E-Posta: verdik@atauni.edu.tr



1 / 2

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
www.atauni.edu.tr adresinden doğrulama yapılabilir. Doğrulama Kodu: F0C99C8

Prof.Dr. Filizet ÇELEBİ
Kurul Başkanı

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 22040 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Aj: <http://www.atami.edu.tr/Fakulte-veteriner-fakultesi>
Kuy Adresi: atatut@hott.kup.tr

Bilgi: Mehmet KOCAY
Faks: +90 442 2317264
E-Posta: vurfak@atami.edu.tr

