

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANABİLİM DALI

**OVER İSKEMİ – REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE
ANTİOKSİDANLARIN ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Y. Doç. Dr. Ekrem SAPMAZ

Dr. Gül AY

ELAZIĞ – 2001

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANABİLİM DALI**

**OVER İSKEMİ – REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE
ANTIOKSİDANLARIN ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Y. DOÇ. DR. EKREM SAPMAZ**

Dr. GÜL AY

ELAĞIĞ-2001

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. S. Sırrı KILIÇ
Dekan

Bu tez Uzmanlık Tez standartlarına uygun bulunmuştur.

.....

Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

.....

Danışman

Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

.....

.....

.....

.....

.....

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bana yol gösteren değerli hocalarım; başta danışman hocam Yrd. Doç. Dr.Ekrem Salmaz'a, Yrd. Doç. Dr.Mehmet Şimşek'e, Yrd. Doç Dr. Bilgin Gürateş'e, Op. Dr. Muhlise İlhan'a, rotasyonlarım sırasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Prof. Dr. Mehmet Ali Akkuş'a (Genel Cerrahi), Prof. Dr. Reşat Özercan'a (Patoloji), Prof. Dr. Ö. Lütfi Erhan'a (Anesteziyoloji), Doç. Dr.Atilla Semerciöz'e (Üroloji), tez çalışması süresince yardımlarını gördüğüm. Doç Dr.Necip İlhan'a, Uzm. Dr. Nevin İlhan'a, Yrd. Doç. Dr. Nusret Akpolat'a, Yrd. Doç. Dr. Nurullah Bülbüller'e; değerli asistan arkadaşlarım ile hemşire ve hastane personeline, maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan Prof. Dr. Halit ELYAS ve Eşi Handan ELYAS'a eğitimim süresi boyunca hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan aileme teşekkür ederim.

Dr. Gül AY

KISALTMALAR

IR	:	İskemi- reperfüzyon
SOR	:	Serbest oksijen radikali
PAS	:	Periyodik asid- schiff
IVF	:	İnvitrofertilizasyon
ELAM –I	:	Endotel lökosit adezyon molekülü
ICAM-I	:	İnterselüler adezyon molekülü.
VCAM- I	:	Vasküler hücre adezyon molekülü
PID	:	Pelvic Inflamatuary Disease
Pg	:	Prostoglandin
Vit E	:	Vitamin E
H-E	:	Hemotoksilen –Eosin
NAT	:	N-asetil transferaz
HIOMT	:	Hidroksi indol-O-metil transferaz
APUD	:	Amin Prekürsör uptake ve dekarboksilasyon
NES	:	Diffüz nöroendokrin sistem
EC	:	Enterokromaffin hücre
TBA	:	Tiyobarbütirik asit
PTA	:	fosfotungustik asid
INT	:	İyodonitrotetrazolium viyoleto
CAPS	:	3-sikloheksilamino-1-propan sulfonik asit
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
NAD ⁺	:	Okside nikotinamid adenin dinükleotit

NADH	:	redükte nikotinamid adenin dinükleotit
HOCL	:	Hipoklorik asit
ROP	:	Reaktif Oksijen Partikülü
PUFA	:	Poliansatüre Yağ Asidi
OH [•]	:	Hidroksil radikali
RO [•]	:	Alfoksi radikali
ROO [•]	:	Peroksil radikali
NO [•]	:	Nitrik oksit radikali
O ₂ ^{•-}	:	Süperoksit radikali
¹ O ₂	:	Singlet oksijen
OCCO ⁻	:	Peroksinitrit
H ₂ O ₂	:	Hidrojen peroksit
CCl	:	Triklor metil
RS [•]	:	Thiyl radikali
C ₆ H ₂ N:N	:	Fenildiazin
Fe ⁺³	:	Ferri Demir
Fe ⁺²	:	Ferro Demir
Cu	:	Bakır
SOD	:	Süperoksit dismutaz
MDA	:	Malondialdehid
GSH-Px	:	Glutasyon peroksidaz
DNA	:	Deoksiribonükleikasit
PHGSH-Px	:	Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz
GST	:	Glutasyon S transferaz
GSSG	:	Oksitlenmiş glutasyon

GSH	: İndirgenmiş glutatyon
NADPH	: Redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
FAD	: Flavin adenin dinükleotid fosfat
NADP ⁺	: Okside nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
G.6.P.D	: Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
1.ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1.İSKEMİ- REPERFÜZYON HASARI	7
3.1.1.Geri Dönüslü zedelenme.....	7
3.1.2. Geri Dönüßsüz zedelenme.....	7
3.2.OVERDE İSKEMİ-REPERFÜZYON.....	13
3.2.1 Adnex torsiyonu.....	13
3.2.1.a.Hastalığın seyri.....	14
3.2.1.b.Torsiyonun Tanısı.....	15
3.2.1.c.Torsiyonun tedavisi.....	16
3.2.2. Over transplantasyonu.....	18
3.3. SERBEST RADİKALLER VE REAKTİF OKSİJEN TURLERİ	21
3.3.a. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet-}$).....	22
3.3.b. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	23
3.3.c. Hidroksi Radikali ($OH^{\bullet}$).....	24
3.3.d. Singlet Oksijen (1O_2).....	24
3.4. Serbest Radikallerin Kaynakları	25
3.4.a. Serbest radikallerin endojen kaynakları:	25
3.4.b. Serbest radikallerin ekzojen kaynakları:	25
3.5. Serbest Radikallerin Etkileri.....	26
3.5.a. Membran lipidlerine etkisi (Lipid Peroksidasyonu)	26
3.5.b. Proteinlere Etkileri	28
3.5.c. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri.....	28
3.5.d. Karbonhidratlara Etkileri.....	29
3.6. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	29
3.6.a. Endojen Antioksidanlar	29
3.6.a.1. Enzimatik Antioksidanlar	29
3.6.a.1.1. Sitokrom Oksidaz Sistemi	30
3.6.a.1.2.Süperoksit Dismutaz (Superoxide oxido reductase, EC 1.15.1.1).....	30
3.6.a.1.3. Katalaz ($H_2O_2 : H_2O_2$ oxido reductase, EC 1.11.1.6).....	32
3.6.a.1.4.GlutatyonPeroxidaz(Glutathione: H_2O_2 Oxido reductaseEC 1.11.1.9)33	
3.6.a.1.5. Glutatyon S transferazlar (E.C.2.5.1.18).....	34
3.6.a.1.6.Glutatyon Redüktaz (NADPH: Oxidized glutathione oxido reductase EC34 1.6.4.2).....	34
3.6.a.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	35
3.6.a.2.1. E Vitamini.....	35
3.6.a.2.2. Beta Karoten.....	35
3.6.a.2.3. C Vitamini (Ascorbik Asit).....	35
3.6.a.2.4. Glutatyon	35
3.6.a.3. Diğer Enzimatik Olmayan Endojen Ajanlar	36
3.6.b. Eksojen Antioksidanlar	36
3.7.Deneyde kullandığımız antioksidanlar.....	37
3.7.PGE1.....	37
3.7.1.a.Biyosentez.....	38
3.7.1.b.PgE1'in sistemler üzerine farmakolojik ve fizyolojik etkileri.....	38
3.7.1.b.1.Kardiyovasküler sistem.....	38

3.7.1.b.2.Üreme sistemi.....	39
3.7.1.b.3.Gastro intestinal sistem.....	39
3.7.1.b.4.Renal sistem.....	41
3.7.1.b.5.Santral sinir sistemi.....	41
3.7.1.b.6.Endokrin sistem.....	42
3.7.1.b.7.Göz.....	42
3.7.2.Melatonin	43
3.7.2.a.Sentez ve ritmi salınımı.....	43
3.7.2.b.Melatoninin Metabolizması.....	45
3.7.2.c.Melatoninin fizyolojik fonksiyonları.....	46
3.7.2.c.1.Melatoninin antioksidan etkisi.....	48
3.7.3.Vitamin E.....	50
4. GEREÇ VE YÖNTEM	54
4.A.Gereç.....	54
4.A.1.Denek seçimi.....	54
4.A.1a.Deneysel Grupların Oluşturulması.....	54
4.A.2.Operasyonun yapılışı.....	55
4.A.3.Örneklerin alınması.....	56
4.B.Örneklerin Biyokimyasal olarak incelenmesi.....	56
4.B.1.Plasma lipidperoksit (LPölçümü).....	56
4.B.2.Eritrosit Süperoksid dismutaz (SOD) Tayini.....	59
4.B.3.Glutatyon Peroksidaz (GSHPx) enzim aktivitesi.....	64
4.B.4.Hemoglobin Tayini.....	65
4.B.5.Doku MDA Düzeyleri.....	66
4.B.7.Histopatolojik İnceleme.....	67
4.B.8.İstatistik Analizler.....	67
5. BULGULAR	68
5.A.Over Patolojisi.....	68
5.B.Plazma MDA düzeyleri.....	72
5.C.Eritrosit GSHPx düzeyleri.....	72
5.D.Eritrosit SOD düzeyleri.....	73
5.E.Doku MDA düzeyleri.....	74
5.F.Doku histopatolojisi ile diğer parameterler arasındaki Spearman Bağntı analizi.....	76
6.TARTIŞMA.....	77
7.SONUÇLAR.....	85
7. KAYNAKLAR.....	86
8. ÖZGEÇMİŞ.....	93

1. ÖZET

AMAÇ: Ratlarda sol overde deneysel olarak oluşturduğumuz ovarian iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine, antioksidan kullanımının etkisinin incelenmesi.

GEREÇ VE YÖNTEM: Kırk iki adet erişkin Wistar Albino cinsi dişi rat, estrus fazında prospektif, rastgele, tek kör 6 gruba ayrıldı. Grup I: Sham grubu (n=7). Sadece sol over dokusu ve kan örnekleri alınan grup. Grup II: İskemi grubu (n=7). Sol overe 60 dakika iskemi uygulanan grup. Grup III: İskemi-reperfüzyon grubu (n=7). Sol overde 60 dakika iskemi ve 60 dakika reperfüzyon uygulanan grup. Grup IV, V, VI'ya ise iskeminin 45. dakikasında sırasıyla PGE1 25 mcg/kg/im, melatonin 20 mg/kg/im, vitamin E 500 mg/kg/im uygulandı. Sol overin %50'si histopatolojik inceleme için ayrılırken, geri kalanı doku parçası malondialdehit düzeyleri için ayrıldı. Tüm ratlarda biyokimyasal incelemeler (malondialdehit, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz) için, Vena Cava İnferiordan kan örnekleri alındı. İstatistiksel yöntem olarak Kruskall Wallis varyans analizinde $p<0.05$ bulunan parametrelere, Mann Whitney U testi ile gruplar arası ikili karşılaştırmalar yapıldı ve $p<0.02$ anlamlı kabul edildi.

Doku histopatolojisi ile diğer parametreler arasında Spearman bağıntı analizi yapıldı (r, p, n).

BULGULAR: İskemi-Reperfüzyon grubunda over histopatolojisi, doku MDA düzeyleri ve biyokimyasal incelemeler (glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, malondialdehit düzeyleri) en olumsuz etkilenen grup olarak tespit edildi ($p<0.02$, Mann Whitney U testi). Yaptığı zarar iskemi grubuna göre anlamlı olarak fazla idi ($p<0.02$, Mann Whitney U testi). Antioksidanlar içinde en etkili ilaç sırasıyla melatonin, PGE1 ve Vit E bulundu.

Spearman bağıntı analizinde over histopatolojisi ile süperoksit dismutaz arasında (-) bağıntı ($r=-0.8$, $p=0.000$, $n=42$), doku/plazma Malonildialdehit düzeyi arasında (+) bağıntı ($r=+0.7/+0.6$, $p=0.000$, $n=42$), glutatyon peroksidaz arasında (-) bağıntı ($r=-0.5$, $p=0.000$, $n=42$) saptandı.

SONUÇ: Over iskemi-reperfüzyon hasarında antioksidanların, özellikle melatoninin kullanımı overdeki hasarı azaltabilir.

ANAHTAR KELİMELELER: İskemi-Reperfüzyon hasarı, Antioksidan kullanımı, Over.

2.ABSTRACT

OBJECTIVE: The purpose of this study is to assess the effect of antioxidants on the damage of rats ovary created by ischaemia-reperfusion that is experimentally made.

MATERIAL-METHODS: Forty-two female wistar- albino rats at oestrus phase randomly separated in the six groups. This study is prospectively, one side blinded study. Group I: Sham group (n=7) only left ovary tissue sample and blood sample were taken. Group 2: Ischaemia group (n=7) At this group ischaemia is applied to the left ovary for 60 minutes. Group 3: Ischaemia- reperfusion group (n=7). At this group both ischaemia and reperfusion applied to the left ovary for 60 minutes. Group 4,5,6 are exposed to PgE1 25 mcg/kg, i.m; melatonin 20 mg/kg/ i.m; vitamin E 500 mg/kg/i.m at the fortyfifth minute of the ischaemia.

The fifty percent of the left ovary is researched histopathologically; the rest is used for the malondialdehyde level tissue. Blood samples of all rats are taken from inferior vena cava for biochemical parameters (MDA, GPx, SOD)

FINDINGS: At the ischaemia- reperfusion group ovary histopathology, tissue MDA levels and blood chemical parameters (MDA, GPx, SOD) are negatively effected ($p < 0.02$ Mann Whitney U test). The damage is much more at this group than ischaemia group and this is statistically meaningful ($p < 0.02$ Mann Whitney U test). The effect of antioxidants are as follows: melatonin, PgE1, Vitamin E.

There is negative correlation between ovary histopathology and superoxide dismutase ($r = -0.8$, $p = 0.000$, $n = 42$). Positive correlation between tissue and plasma MDA levels and over histopathology and also negative correlation between over histopathology and glutathion peroxidase ($r = -0.5$, $p = 0.000$, $n = 42$) levels according to Spearman's analysis.

RESULTS: The antioxidant medication especially melatonin usage may decrease the ovary damage at ischaemia-reperfusion injury.

KEY WORDS: Ischaemia-reperfusion injury, antioxidants, ovary

3. GİRİŞ:

İskemi, organa gelen kan akımının yetersizliği veya dokunun bozulmuş perfüzyonu olup, uzayan iskemide hücrelerin bütünlüğü kaybolur ve hücreseel ölüm meydana gelir. Buna iskemik doku hasarı denir. Reperfüzyon ise, dokunun kan akımının yeniden başlaması olup, özellikle dokuya gelip yerleşen nötrofiller tarafından salınan serberst oksijen radikalleri (SOR) dokudaki iskemik hasarı artırıcı etki yapar. Buna reperfüzyona bağlı doku hasarı denir(18). Sonuçta dokuda iskemi-reperfüzyon hasarı ortaya çıkar.

Overlerdeki iskemi-reperfüzyon hasarının incelenmesi, özellikle iki konu açısından önemlidir:

I: Adneks torsiyonu

II: Over transplantasyonu ve kriyoprezervasyonu .

I: Adneks Torsiyonu:

Adneks torsiyonu, yaygın olmamasına rağmen kadınlardaki cerrahi acillerin %3'ünü oluşturur. Adneks torsiyonunun tanısı oldukça zordur. Acil tanı ve tedavi hem adneksiyal yapıların hem de fertilitenin korunmasını sağlayabilir (39).

Adneksiyal torsiyon; overi, fallop tüpünü veya her ikisini içerebilir. Torsiyon olgularının %18'ini normal tüp ve overler oluşturur. Hastaların yaklaşık yarısında torsiyon bir adneksiyal neoplazma ile ilişkilidir. Genellikle ilişkili neoplazmalar benign olmasına rağmen, postmenopozal kadınlarda malign tümörler rapor edilmiştir. En yaygın neoplazma, dermoid kist olmasına rağmen paraovaryan kistlerin torsiyon riski göreceli olarak fazladır. Adneksiyal torsiyon aynı zamanda ovaryan hiperstimulasyon sendromunda da görülebilir (39,76,53).

Adneks torsiyonu ovaryan pedikül etrafında overin veya fallop tüpünün rotasyonu ile meydana gelir. İlk olarak venöz ve lenfatik obstrüksiyon oluşur. Bunun sonucunda  dem gelişir ve over boyutları artar. Eğer arteriyel obstrüksiyon oluşursa overlerde iskemi oluşur. Sonuçta overler nekrotik ve gangrene hale gelir (58).

Adneks torsiyonunun tedavisinde overleri iskemi-reperfüzyon hasarından koruma son zamanlarda çalışmaların ilgi odağı olmuştur.  skemi sonrası dönemde reperfüzyon döneminde overlerde polimorfonükleer lökositler, serbest radikaller (süperoksit anyon ve hidroksil radikalleri) birikir(82).

Geleneksel olarak adneksiyal torsiyona yaklaşım, pedikülü detorsiyone etmeden yapının eksizyonudur. Torsiyone pedikülden emboli atması, nekrozun klinik olarak değerlendirilememesi cerrahi bir problemdir (58). Ancak, birçok araştırmacı yayınladıkları raporlarda pedikülü başarılı bir şekilde detorsiyone edip adneksiyal yapıyı korumuştur (58,52,11).

II:Over transplantasyonu ve kriyoprezervasyonu:

Çocukluk dönemi, adolesan ve erişkin dönem kanserlerinin tanı ve tedavisindeki hızlı gelişmeler, kanserli premenopozal kadınların hayat kalitesini etkilemektedir. Bu kadınların büyük bir kısmı, kemoterapi veya radyoterapi sonrası ovaryan hasar nedeniyle prematür menopoza girer (23). Prematür menopoz gelişen kızlarda ve etkilenen genç kadınlarda tek tedavi, hayat boyu östrojen-progesteron verilmesidir. Böylece,  strojen eksiklik semptomlarının ve kardiyovasküler hastalık riskinin giderilmesi ile hayat kalitesi yükseltilir ve pubertal gelişim sağlanır (14).

Hipotalamo-pit tier aksın normal olduğu, otoimmün hastalığın olmadığı olgularda otolog over transplantasyonu sürekli ilaç alımına göre teorik olarak daha etkili, uygun bir seçenektir. Bu basit operasyon steroid hormon sekresyonunun,

ovulasyonun normal olmasını sağlayabilir. Günümüzde bir çok over transplantasyon modeli geliştirilmiştir (14, 27, 55, 57, 31).

Bu hastalarda başka bir yöntem de oosit, embryo veya over dokusunun toplanması ve kriyoprezerve edilerek saklanmasıdır. Böylece hücrelerin biyolojik ritmi korunur. Aynı zamanda kriyoprezervasyon, *in vitro* fertilizasyon (IVF) programlarında embriyo fazında veya pronükleit fazındaki fertilize oositlerde yaygın olarak kullanılır (23).

Gerek taze, dondurulmamış over greftlerinde gerekse kriyoprezerve over dokularında primordiyal foliküllerin %25-30'u greftleme sonrası kayba uğrar. Bu folikül kaybı iskemi-reperfüzyon hasarı sonucu oluşan lipid peroksidasyonu ve diğer serbest radikallere bağlanabilir. Bu problem, kan damarlarının anastomozuyla iskemi periyodu kısaltılarak veya transplantasyon öncesi allopurinol ve antioksidanlar kullanılarak en aza indirilebilir (27, 55, 57).

AMAC: Ratlarda sol overde deneysel olarak oluşturduğumuz ovaryan iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine antioksidan kullanımının etkisinin incelenmesi.

3.1: İSKEMİ VE REPERFÜZYON HASARI:

İskemi; organa gelen kan akımının yetersizliği veya dokunun bozulmuş perfüzyonu olup, uzayan iskemi de hücrelerin bütünlüğü kaybolmakta ve hücrel ölüm meydana gelmektedir. İskeminin süresine ve şiddetine bağlı olarak iki türlü hücrel zedelenme ortaya çıkar.

I: Geri Dönürlü zedelenme

II: Geri Dönürlü Zedelenme

I:Geri Dönürlü zedelenme:

Hipoksinin ilk zarar verdiği yer, hücrenin aerobik solunumudur. Mitokondriyumdaki oksidatif fosforilasyonu engeller. Adenozin trifosfat (ATP)

oluşumu yavaşlar ve durur. ATP kaybı hücre içinde çeşitli sistemleri yaygın olarak etkiler. Özellikle hücre zarının quabain duyarlı adenosin trifosfat aktivitesinin azalması zarda aktif sodyum pompasının yetersizliğine yol açarak hücre içi sodyum birikimi ve hücreden potasyumun dışarı atılımına yol açar. Solid materyalin birikimine izootmotik su birikimi eşlik ederek akut hücrel şişme oluşur (18).

İskeminin ilk dakikalarında aşırı stimüle olan glikolitik yol, ortamda sitrat, laktat, NADH birikimi ve doku asidozunun gelişmesiyle inhibe olur. İskemik dokuda var olan oksijen ise oksidatif fosforilasyonu desteklemek için yetersiz kalır ve glikolizis sonucu oluşan piruvatın Krebs siklusuna değil de laktata dönüşü gerçekleşir. Böylece glikojenden ATP oluşumu ile hücre enerji kaynakları korunur. Glikojenin hızla azaldığı histolojik olarak periyodik asit-schiff (PAS) ile boyamada görülebilir. Glikoliz, laktik asit ve fosfat türevlerinden hidroliz sonucu oluşan inorganik fosfat birikimine neden olur. Sonuçta hücre içi pH'yı düşürür.

Sonraki safha granüllü endoplazmik retikulumlardan ribozomların ayrılması ve polizomların monozomlara parçalanmasıdır. Eğer hipoksi devam ederse, zar geçirgenliği artar ve mitokondriyon fonksiyonları azalır. Hücre yüzeyinde tomurcuklanmalar oluşur. Stoplazmada ya da dışında organel zarları gibi plazmadan köken alan konsantrik laminalı myelin şekiller görülür. Bu sırada mitokondriyonlar normal, şişmiş ya da yoğunlaşmıştır, endoplazmik retikulum genişlemiş ve tüm hücre belirgin olarak şişmiştir.

Yukardaki bozuklukların tümü oksijen verilince geri dönüşlüdür. Buna rağmen eğer iskemi sürerse, geri dönüşsüz zedelenme oluşur (18).

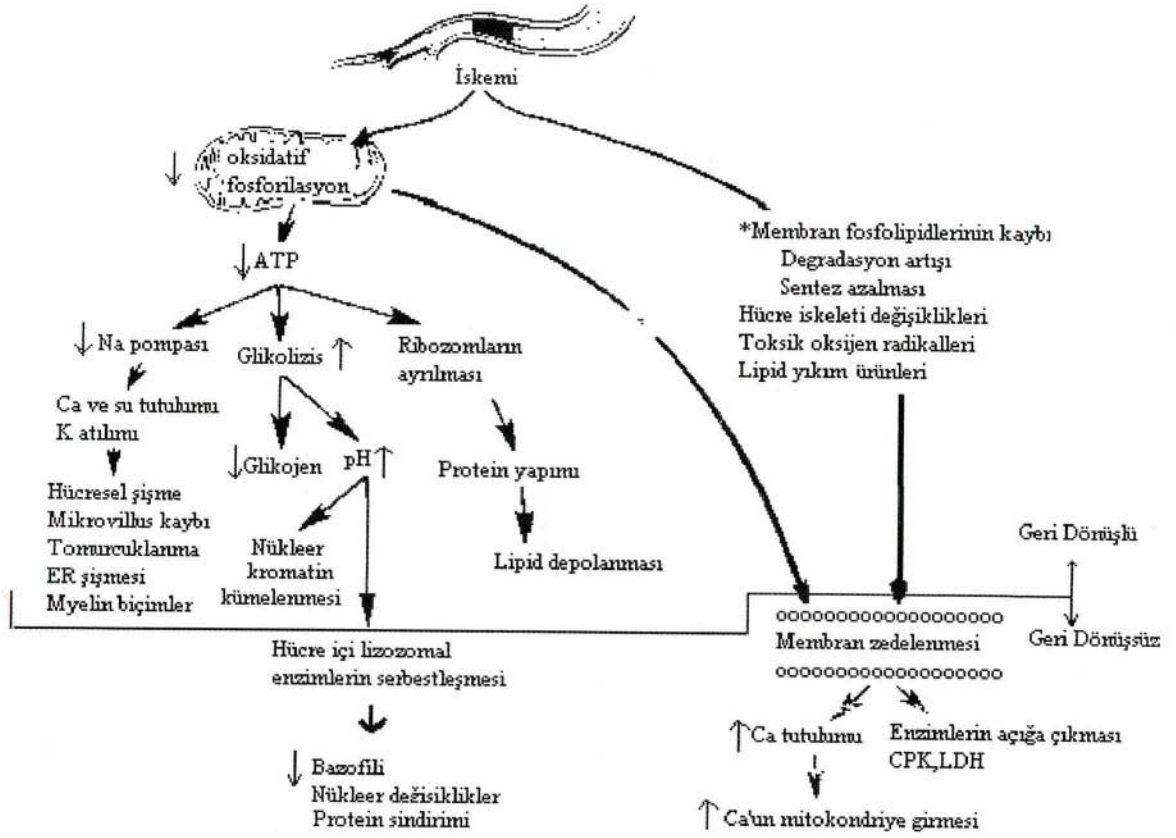
II: Geri Dönüşsüz Zedelenme:

Geri dönüşsüz zedelenme yapısal olarak mitokondriyon ve kristalarında aşırı vakuolizasyon; plazma zarında aşırı zedelenme; lizozomlarda şişme; özellikle

iskemik alan yeniden beslenirse hücre içine yoğun kalsiyum tutulumu ile birlikte dir. Amorf kalsiyumdan zengin yapılar mitokondriyon matriksinde gelişir. Miyokardiyumda geri dönüşsüz zedelenmelerin bu erken bulguları 30-40 dk sonra görülebilir. Proteinler, temel koenzimler, ribonükleik asitler aşırı geçirgen zarlardan sürekli kaybedilir. Hücreler, hücre içi yüksek enerjili fosfatın yapımında kullanılacak ATP'nin yeniden oluşumu için yaşamsal önemi olan metabolitlerini de kaybederler. pH'nın düşmesi lizozom zarlarının zedelenmesiyle enzimlerinin sitoplazmaya geçerek asit hidrolazların aktifleşmesiyle stoplazmik ve çekirdek yapıların sindirimine yol açar.

Hücre ölümünü izleyerek, hücre organelleri devamlı parçalanır ve hücre sel enzimler hücre dışı mesafeye sızarlar. Sonuçta ölü hücreler myelin oluşumlar ve fosfolipidden oluşan büyük kitlelere dönüşürler. Bunlar daha sonra diğer hücreler tarafından fagositte edilirler veya yağ asitlerine parçalanırlar. Bu yağ asitlerinin kalsifikasyonu kalsiyum sabunları oluşur (18).

Hücre içine kalsiyum girişiyle kalsiyumdaki net artış hücrenin iyonik dengesini bozar. Bundan sonra kalsiyum mitokondri içine sızmaya başlar. Mitokondrinin kalsiyumla yüklenmesi ATP üretimi için olmayıp, kalsiyumun varlığıyla proteazlar ve fosfolipazlar aktive olur. Fosfolipazların aktivasyonu, serbest yağ asidi ve lizofosfolipidlerin salınımına bağlı olarak hücre membranında toksik etkiler oluşur. Bu etkilerin yanında araşidonik asit metabolizması başlatılarak, reperfüzyon esnasında sitotoksik ürünler ve radikal türevleri üretilir. Proteazların aktivasyonu, hücre iskeletinin parçalanmasına neden olur. Enzim sisteminde değişmeler meydana gelirken yine reperfüzyon esnasında SOR'nın oluşumu gerçekleşir ve hatta artar. Böylece iskemi esnasında oluşan bir çok olay reperfüzyon esnasında oluşacak olan hasarlara zemin hazırlar. McCord (2,47) tarafından yapılan bir çok çalışmada, iskemi sırasında oluşan hasarların reperfüzyon hasarları için başlangıç teşkil ettiği saptanmıştır.



Şekil-1: İskemik zedelenmedeki olaylar dizisi.

Deneysel çalışmalar, reperfüzyonun akut fazı esnasında önceki iskemik doku üzerine ek bir hasar yüklediğini göstermiştir. Reperfüzyon hasarı olarak bilinen bu ardışık olaylar; intraselüler enzimlerin salınımını potansiyalize eder, Ca^{+2} 'un hücre içine girişi, sarkolemmal fosfolipitlerin bozunumu ve hücre membranlarının dağılması; bütün bunlar tek başına veya kombine olarak sonunda hücre ölümüyle sonuçlanır. Bu değişiklikler, iskemi sırasında değil de, daha çok reperfüzyon esnasında meydana geldiğinden “reperfüzyon hasarı” olarak bilinir(8).

Reperfüzyon hasarının bilinen en az üç bileşeni mevcuttur; mikrovasküler hasar, hücre nekrozu ve hemoraji. İskemiye maruz kalan her organda reperfüzyon hasarı oluşup, iskemi esnasında biyokimyasal olayların oluşumuyla kendini gösterir ve sonuçta süperoksit anyonu (O_2^*), hipoklorik asit (HOCl) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif

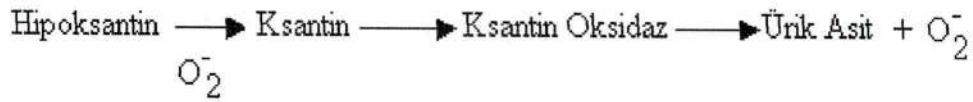
oksijen metabolitleri yanında Ca^{+2} artar ve sarkolemmal fosfolipitlerin kaybı meydana gelir (2,89).

Reperfüzyon hasarında en önemli rolü polimorfonükleer lökositler oynar. İskemik dokuya gelen ve yerleşen poliformonükleer hücreler birçok yoldan etki ederek iskemik dokuyu yok ederler. Polimorfonükleer hücreler, endotel lökosit adezyon molekülü (ELAM-1), intersellüler adezyon molekülü (ICAM-1), vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM-1), L-selectin gibi adezyon moleküllerine tutunarak iskemik dokuya yerleşirler (37,38). Bu hücreler, iskemik dokuyu hem oksidatif (oksijen radikalleri ile) hem de nonoksidatif yolla tahrip ederler. Nötrofil granülleri vasküler yaralanmaya neden olabilen birçok hidrolik enzim ve antimikrobiyal polipeptid içerir(37). İskemik dokudaki polimorfonükleer hücre bağımlı yıkımda, ayrıca fosfolipaz ürünleri (37,38), tromboksan-A2, prostoglandin E2, lökotrien C4, D4, B4 (51), PAF üretilir. Bunlar da çeşitli yollardan doku hasarını artırır (90).

Retiküloendotelyal sistem hücreleri tüm dokularda bulunan lokal makrofaj sistemi olup; karaciğerdeki kuppfer hücresi, böbrekteki mezenşimal hücreler, dendritik hücreler, beyindeki mikroglialar bu grubun üyeleri olup dokudaki mikroorganizmalara karşı ilk harekete geçen savunma hücreleridir. Bunlar bulundukları organa gelen zararlı maddeleri fagosit ederek, lizozomal enzimleri ile lizise uğratırlar. Ancak doku iskemisi sırasında bu hücrelerde de parçalanma ortaya çıkar. Ortama salınan lizozomal enzimler, kendi dokusunu lizise uğratır. Bu durum, iskemik hasarı daha da artırır. Paller ve arkadaşları renal iskemi öncesi anti-nötrofil serumu verilerek nötrofilleri tüketilen ratlarda ve kontrol grubunda iskemi reperfüzyon hasarı üzerinde çalışmışlar, her iki grupta renal hasar oranı açısından bir fark olmadığını bildirmişlerdir. Böylece, renal dokudaki retiküloendotelyal sistem hücreleri olan mezengial/glomerüler epitel hücrelerinin serbest oksijen radikallerinin kaynağı olabileceğini ileri sürmüşlerdir (61).

Nükleik asit yıkımında hız kısıtlayıcı bir enzim olan ksantin oksidaz, tüm pürinlerin terminal oksidasyonunu katalizler. İlk basamak ATP'nin yıkım ve tüketilme işlemi olup, bu da hipoksantin tarafından indirgenir. Normalde hipoksantin, ksantin dehidrogenaz enzimi tarafından okside edilir. Ksantin NAD^+ 'i kullanarak NAD^+ 'nin NADH 'a dönüşümünü sağlayarak oksidasyon işlemini gerçekleştirir (47).

İskemik dokuda süper oksit radikalının ana kaynağının ksantin oksidaz olduğu ileri sürülmekte, hipoksantin ve ksantin oksidasyonu esnasında, süperoksit radikali ve H_2O_2 oluşmaktadır. Bu görüşe göre; iskemik dokuda iskemi ve reperfüzyon sonrası oluşan vasküler permeabilite artmakta ve mukozal lezyonlar bir ksantin oksidaz inhibitörü olan allopurinol kullanılarak inhibe edilmektedir (2).



Reaktif oksijen radikalleri ve lipid peroksitler overlerde de yapılmaktadır. Ovulasyon ve lutealiz için gerekli olan eikazanoidlerin sentezi, enzimatik olarak düzenlenen lipid peroksidasyonu ve reaktif oksijen radikallerinin üretilmesiyle gerçekleştirilir. Ek olarak süperoksit radikali, regrese olan luteal doku membranları ve intakt olan over tarafından üretilir. Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$, luteinize rat overinde, hızla hidrojen peroksit üretimini stimüle eder ve hidrojen peroksid, ovaryan hücrelerde antigonadotropik ve anti streoidojenik etkiler gösterir. Bu bulgular, bize hidrojen peroksidin overdeki siklusda önemli bir rol oynadığını gösterir (4).

Overdeki reaktif oksijenlerin oluşum mekanizması ve hücresel kökenleri bilinmemektedir. Lökosit infiltrasyonu, ovulasyon ve luteal regresyonda gösterilmiştir. Makrofajlar ve öteki lökositler hücre hasarına ve ölümüne neden olan serbest radikalleri üretirler. Endotelyal hücreler, ksantin oksidazın aktivasyonu ile

oluşan oksijen radikallerinin potansiyel bir kaynağıdır. Ovaryan parankimal hücreler ise tiroid bezinde olduğu gibi, önemli bir hidrojen peroksit kaynağıdır (32).

Reaktif oksijen radikallerine karşı korunma, katalaz, süperoksitdismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz gibi enzim sistemleri, antioksidan vitaminlerin verilmesi ve moleküler onarım ile sağlanabilir. Katalaz ve süperoksit dismutazın her ikisi de overde vardır ve hormonlarla kontrol edilir (4).

3.2: Overlerde iskemi-reperfüzyon.

Günümüzde overlerdeki iskemi-reperfüzyon hasarı iki konuda önemlidir:

1. Adneks torsiyonu
2. Over transplantasyonu.

3.2.1: Adneks Torsiyonu.

Kadınlarda akut abdominal ağrının nedenleri arasında pelvik inflamatuvar hastalık, ektopik gebelik, endometrioma, corpus luteum kisti rüptürü veya hemorajisi ve adneksiyal yapıların torsiyonu yer almaktadır (39). Yaygın olmamasına rağmen adneksiyal torsiyon kadınlardaki cerrahi acillerin %3' ünü oluşturmaktadır. Adneksiyal torsiyonun tanısı oldukça zordur. Acil tanı ve tedavi, hem adneksiyal yapıların hem de fertilitenin korunmasını sağlayabilir (39).

Adneksiyal torsiyon overi, fallop tüpünü veya her ikisini içerebilir. Torsiyon olgularının %18'ini normal tüp ve overler oluşturur. Hastaların yaklaşık yarısında torsiyon bir adneksiyal neoplazm ile ilişkilidir (39). Genellikle ilişkili neoplazmalar benign olmasına rağmen, postmenopozal kadınlarda malign tümörler rapor edilmiştir (76). En yaygın neoplazm dermoid kist olmasına rağmen paraovaryan kistlerin torsiyon riski göreceli olarak fazladır. Adneksiyal torsiyon aynı zamanda ovaryan hiperstimulasyon sendromu ile ilişkili olabilir (53).

Adneksiyal torsiyonun klinik bulguları nonspesifiktir. Bir çok olguda ağrı, subfebril ateş, orta derecede lökositoz, bulantı ve kusma vardır. Ağrı başlangıçta akut olabileceği gibi aktivite veya pozisyon değişikliği ile bağlantılı olabilir. Hastanın takibinde nekroz gelişirse yüksek ateş ve belirgin lökositoz görülebilir. Abdominal muayenede rijidite, spazm, hassasiyet, palpasyonda tek taraflı ağrı olabilir. Pelvik muayenede, genellikle unilateral adneksiyal hassasiyet ve palpe edilebilen kitle mevcuttur.

Torsiyon nadiren yalnız fallop tüpünü içerir. Downer ve Brines tarafından yapılan bir çalışmada normal tuba ve overin oldukça mobil olduğu ve 90 derece rotasyonu semptomsuz olarak yapabileceği bildirilmiştir (76). Tubal torsiyon mobil hidrosalpinksde olduğu gibi ağır ve non-adherent tubalarda daha sık oluşur.

Torsiyon, normal veya patolojik adnekslerden birini içerebilir. Ya over tek veya tuba over her ikisi torsiyone olabilir. Parsiyel veya komplet; akut veya kronik; geri dönüşümsüz veya aralıklı olabilir ve sıklıkla doğru tanı konması çok zordur.

3.2.1.a. HASTALIĞIN SEYRİ:

Başlangıçta venöz ve lenfatik sirkülasyon bozulur. Ödem ve ovaryan genişleme yapar. Venöz veya arteriyel trombozis meydana gelene kadar, naturel perfüzyonun hızla restorasyonu organın vitalize olmasına ve iyileşmesine izin verebilir.

Eğer torsiyon devam ederse, tanı konulup tedavi edilemezse, lökositoz ile birlikte subfebril ateş tabloya eklenir. Eritrosit sedimentasyon hızı normal olabilir. Torsiyone organın nekrozu ve enfeksiyonu lökositoz ve yüksek ateşle birlikte olur.

Komplet torsiyon, venöz ve lenfatik obstrüksiyondan hızla arteriyel oklüzyona doğru ilerleyebilir. İskemik ve nekrotik organ, mavi veya siyah renk alabilir. Eğer hala tedavi edilmemişse, enfeksiyon gelişip peritonite yol açabilir. Bu durum oldukça

öldürücüdür. Eğer torsiyon, spontan detorsiyon ile birlikte, parsiyel ve aralıklı ise semptomlar daha hafiftir ve zaman içinde tekrarlayabilir. Gençlerde normal adneksde nekroz meydana gelmişse, torsiyone adneks absorbe olabilir. Unilateral adneksiya yokluk hayatın daha ileri bir döneminde farkedilebilir ve herhangi bir üriner sistem anomalisi eşlik etmez. Alternatif olarak kalsifiye olabilir ve daha geç bir dönemde tanı konulabilir (24).

Torsiyonun devam etmesi sonucu, venöz akımın daha sonra da arteriyel akımın durmasıyla organ koyu mavi veya siyah renk alır. Eğer, arteriyel sirkülasyon olmaksızın venöz basıncın artması sonucu süperfisiyal adneksiya venler rüptüre olursa, hemoperitoneum gelişebilir. Hemoperitoneum şiddetliyse, hastalarda pozitif Cullen belirtisi, sağ omuz ağrısı, abdominal distansiyon ve intestinal atoni gözlenebilir (24). İntermittan veya parsiyel torsiyon kist duvarının bir kısmında dejenerasyonu provoke edebilir. Böylece over diğer pelvik organlara yapışabilir ve bazen over parazitik olabilir (56).

3.2.1.b.TORSİYONUN TANISI :

Genellikle öyküde ani ve keskin, bazen de pozisyonla değişen ağrı vardır. Eğer adneksiya organlarda torsiyon tanısı hemen konulabilir ve tedavi edilirse, fonksiyonları korunabilir. Eğer cerrah yüksek bir şüphe taşıyorsa, kolayca uygulanabilen ultrasonografi, günümüzde popüler olan, nispeten güvenli diagnostik laparoskopi erken tanı ve tedaviyi sağlayabilir (97).

Pek çok hasta ağrının başlamasından itibaren 48 saat içinde görülür ve olguların 2/3'sinde erken dönemde bulantı ve kusma vardır. Ağrı, akut veya komplet torsiyonda sabit bir semptomdur. Komplet torsiyon başlangıcında ağrı birden, keskin ve kolik benzeridir. Oysa intermittan torsiyonda ağrı, birkaç gün ile birkaç ay arasında değişen ataklar halinde periyodik olabilir. Primer ağrı genellikle pelvistedir

ancak iliak fossada da olabilir. Gluteal bölgeye doğru veya T10 dan inerve olan alan boyunca yayılabilir.

Ateş ve nabız, torsiyonun ilerlemesi süresince normal veya hafif yüksektir. Akut apandisit veya PIDnin aksine, hızla ve daha fazla yükselme gözlenir.

Batın muayenesinde, alt kadran palpasyonunda rijidite, rebound ve unilateral ağrı gözlenir. Eğer kitle büyükse, abdominal muayenede palpe edilebilir. Parsiyel torsiyonda daha az abdominal hassasiyet vardır ve kitle daha kolay palpe edilebilir.

Pelvik muayenede unilateral adneksiyal büyüme ve unilateral hassasiyet vardır. Douglas boşluğunun hassasiyeti daha azdır ve endometriyozis veya ektopik gebelikten ayrılmasına yardım eder.

Arteriyel oklüzyon ortaya çıktığında infeksiyon eklenirse, şiddetli ağrı, ateş yükselmesi, titreme gelişebilir. Muayenede rebound hassasiyet bulunabilir.

Ancak, torsiyonun klinik semptomları nonspesifiktir. Hemen tanı koyduracak bir yöntem yoktur. Doppler sonografinin kullanılmasıyla hızlı bir şekilde preoperatif tanı konulabilir. Adneksiyal kitlede akım alınamaması tanı koydurucudur (30, 71). Doppler bulguları, torsiyondaki vasküler değişikliklerle paralellik gösterir. Erken veya kısmi derecedeki torsiyonda, doppler akımının olması bu tanıdan uzaklaştırmamalıdır. Ancak doppler akımının yokluğu, komplet venöz ve arteriyel akım için yüksek bir özgüllüğe sahiptir (30).

3.2.1.c.TEDAVİ:

Adneksiyal torsiyonun geleneksel tedavisi adneksi detorsiyone etmeden ovaryan venden trombotik emboli riskini önlemek amacıyla salpingooferektomi yapmak idi (76). 1946 yılında Way, adneksiyal torsiyon tedavisinde konservatif yaklaşım olarak ovaryan kistektomi sonrası detorsiyon tekniğini uyguladığı 15 olgudan oluşan ve komplikasyon gelişmeyen bir seri açıkladı (39). Ancak bu

konservatif yaklaşım fazla ilgi çekmedi. 1985 yılında Hibbard tarafından 1973-1983 yılları arasında adneksiyal torsiyon tedavisi uygulanmış 225 olgudan oluşan bir seri yayınlandı. Bu hastalardan yalnızca dokuzuna kistektomi yapıldığını ve diğer olgulara ooferektomi uygulandığını belirtmiştir. Son 5 yıl içinde komplikasyon gelişmeden kistektomi, aspirasyon veya fiksasyon sonrası detorsiyon ile tedavisi yapılan dört seri rapor edilmiştir (58,52,11).

Konservatif cerrahi uygulamak için incelenmesi gereken preoperatif faktörler şunlardır:

1. Cerrahi öncesi semptomların süresi,
2. Preoperatif beyaz küre sayısı
3. Ateş
4. Gebeliğin olması.

Zweizig ve arkadaşlarının 94 kadından oluşan serilerinde preoperatif yüksek ateşi olan ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) hasta grubunda ekstirpatif cerrahi tedavi riski daha fazla bulunmuştur. Ayrıca, preoperatif dönemde beyaz küre sayısı yüksek olan hastaların beyaz küre sayısı normal olan hastalara göre ekstirpatif cerrahiye gitme riski iki kat fazla olarak saptanmıştır.

Gebe olan hastalarda ekstirpatif cerrahiye gereksinim azalmıştır. Ancak lökositoz ve ateşi olan hastaların salpingoooferektomi riski iki kat artmıştır (97).

Fluorescein kullanımı, adneksin detorsiyonunda açıklanamayan doku perfüzyonunu aydınlatmada faydalıdır (51). Ancak olguların büyük çoğunluğunda vasküler perfüzyonun gros olarak görülmesi yeterlidir. Adneksiyal torsiyonu olan hastalarda potansiyel olarak canlı olan adnekslerde kistektomi, kist aspirasyonu, kistin detorsiyone edilmesi gibi uygulamalar oldukça güvenilirdir. Bu konservatif yaklaşımlar özellikle reproduktif çağıdaki kadınlarda uygulanmalıdır (11, 52, 87).

Overi ve tubayı besleyen vasküler yapılar tromboze veya organ gangrene ise, organı detorsiyone etmeksizin, pulmoner emboli riskini azaltmak için organ eksize edilmelidir. Eğer over veya tubadan birisi torsiyone ise, bu organlardan yalnızca birisinin ekstirpasyonu daha uygundur.

Torsiyone olan solid ovaryan kitleler arasında disgerminomun da olabileceği unutulmamalıdır. Cerrahi esnasında histopatolojik olarak tanımlanırsa, letal karakterde bir tümör olabileceği akılda tutulmalıdır. Başka bir risk yoksa, hasta reproduktif potansiyelinin korunmasını istiyorsa ve evre 1A disgerminom ise unilateral ooferektomi yapılmalıdır (56).

3.2.2. OVER TRANSPLANTASYONU

Over transplantasyonu, küçük deney hayvanlarında geniş bir şekilde araştırılmıştır (31). Overlerin veya uygun özelliklerini taşıyan parçalarının transplante edildiği hayvanlarda hormon sekresyonu, ovulasyonu, fertilizasyonu içeren normal ovaryan fonksiyonlar yeniden başarılı bir şekilde sağlanır. Overler transplante edildiklerinde, posttransplantasyon iskemi sırasında folikül kaybı olur. Gelişen foliküllerin yaklaşık olarak tamamı hızla atreziye giderek ortadan kaybolurlar. Kortikal bölgedeki primordiyal foliküllerin % 50'den fazlası yok olur (57). Bu problem, kan damarlarının anastomozuyla iskemi periyodu kısaltılarak minimuma indirgenebilir (14). Deneysel olarak fertilitenin sağlanması amaçlanmıyorsa, subkapsüler renal implantasyon gibi ektopik yerleşimlerin kullanımı avantajlıdır. Bu bölgenin vaskülarizasyonu oldukça iyidir ve greftin korunması için güvenli bir cep gibidir (14).

Çocukluk dönemi, adolesan ve erişkin dönem kanserlerinin tanı ve tedavisindeki büyük gelişmeler, kanserli premenopozal kadınların hayat kalitesini etkilemektedir. Bu kadınların büyük bir kısmı, kemoterapi veya radyoterapi sonrası

ovaryan hasar nedeniyle prematür menopoza girecektir (3, 37). Her ne kadar kişisel duyarlılığa göre tedavi değişse de 50 gy dozunda pelvik radyasyon alanlarda %60 oranında; 80 gy dozunda ise %100'lere ulaşan ovaryan yetmezlik ortaya çıkar (37).

Kemoterapiye bağlı gelişen ovaryan yetersizlik, kullanılan ajana ve değişik rejimlere bağlıdır. Mekloretamin, vinblastin, klorambusil, prokarbasin, doksorubisin, vinkristin, etopozid alan hastalarda ovaryal yetersizlik görülür. Özellikle prepubertal hastalarda prevalans yüksektir. Bu arada myeloablasif kemoterapi alanlarda ise ovaryan yetmezlik kaçınılmazdır (14).

Kızlarda ve etkilenen genç kadınlarda tek tedavi, hayat boyu östrojen-progesteron verilmesidir. Böylece, östrojen eksiklik semptomlarının ve kardiyovasküler hastalık riskinin giderilmesi ile hayat kalitesi yükseltilir. Pubertal gelişim sağlanır (14).

Hipotalamo-pitüiter aksın normal olduğu, otoimmün hastalığın olmadığı olgularda otolog over transplantasyonu, kronik ilaç alınımına göre teorik olarak daha etkili ve daha uygun bir seçenektir. Bu basit operasyon, steroid hormon sekresyonu ve ovulasyonun normal olmasını sağlayabilir. Birçok over transplantasyon modeli geliştirilmiştir. Bunlar: vasküler pedikül olsun ya da olmasın yapılan ototransplantasyon, renal kapsül altına yapılan izotransplantasyon germ hücrelerinin ve primordiyal foliküllerin transplantasyonudur. Sonuçlar, over transplantlarının hızlı bir şekilde canlandığını göstermiştir. Ancak bu raporlar kısa dönemli çalışmalardır. İntraperitoneal ve subkutan transplantlarla karşılaştırılmamıştır (14).

Bu hastalarda başka bir fikir de, oosit, embryo veya over dokusunun toplanması ve kriyoprezerve edilerek saklanmasıdır. Böylece hücrenin biyolojik ritmi korunur. Aynı zamanda kiyoprezervasyon, *in vitro* fertilizasyon (IVF) programlarında embriyo fazında veya pronükleit fazındaki fertilize oositlerde yaygın

olarak kullanılır (23). Donmuş oositlerden meydana gelmiş ilk gebelik 1986'da, ilk canlı doğum 1987'de bildirilmiştir (17,86). Kriyoprezerve edilmiş oositlerin fertilizasyonlarından meydana gelen gebeliklerden sadece birkaçı daha ileri gebelik haftalarına ulaşabildiği rapor edilmiştir (23, 83). Oositlerin kriyoprezervasyonunun bu kötü sonucu spindle hasarına, kromozomal anomalilerin kolayca meydana gelmesine, oosit ile zona hasarına ve çözünmeden sonra düşük oosit survey oranlarına bağlı olabilir (10). Oosit kriyoprezervasyonu hala deneysel aşamadır. Henüz kemoterapi ve radyoterapi öncesinde kadın hastalar için rutin kullanımı yoktur. Oysa embriyo kriyoprezervasyonu, tüm IVF ünitelerinde rutin bir prosedür haline gelmiştir (23).

Overde primordiyal foliküller en fazla bulunan foliküldür. Dolayısıyla kriyoprezervasyon için uygun kaynaklardır. Primordiyal folikül üzerinde donmanın etkisi, ileri matürasyon ve kriyoprezervasyondan sonra gelişme hakkında bilinen çok az bilgi vardır. Buz oluşumunu önlemek, dondurma ve çözünmeden sonra over yaşamını garantilemek için bir kriyoprotektana ihtiyaç vardır (83). Newton ve ark. etilen glikol veya dimetil sülfoksil ile oluşturulan kriyopreservasyonda yaşam oranlarını %74 ve %84 arasında bulmuşlardır. Bu oran, propilen glikol ile % 44 ve gliserol ile % 10 dur (55).

Kriyoprezervasyondan sonra primordiyal folikülün matürasyonu ve daha ileri gelişmesi, donmanın bunlar üzerine olan etkisi hakkında çok az şey bilinir. Porcu ve arkadaşları, matür oosit kriyoprezervasyonu kullanarak sağlıklı bir kız bebek dünyaya geldiğini açıklamışlar ve over doku kriyoprezervasyonuna matür oositlerin kriyoprezervasyonunu bir alternatif olarak sunmuşlardır (23,55).

Primordiyal folikül fazında depolamak daha iyidir. Çünkü, primordiyal foliküllerde germ hücreleri daha yaygındır; metafaz II' de daha küçük ve daha az

differentielsidir. Aynı zamanda daha az organeli vardır. Zona pellusida ve kortikal granülleri yoktur (23).

Taze dokuların dondurulmamış greftlerinde primordiyal greftlerin %25-30'u greftleme sonrası kayba uğramaktadır. Jones ve ark. murine greftlerde yaptıkları çalışmada, bu oranı yaklaşık olarak %50 olarak bulmuştur (57). Bu folikül kaybı iskemi-reperfüzyon hasarı sonucu oluşan lipid peroksidasyonu ve diğer serbest radikallere bağlanabilir.

Solid organ transplantasyonunda, transplantasyon öncesi allopurinol ve antioksidanlar kullanılmaktadır Aynı şekilde, kriyoprezerve over dokularında da lipid peroksidasyonu önemli bir problemdir. Bu hasar vitamin E gibi antioksidanlar kullanılarak azaltılabilir (27, 55, 57).

3.3. SERBEST RADİKALLER VE REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ

Serbest radikaller dış orbitallerinde bir veya daha fazla sayıda paylaşılmamış elektron içeren elektrik yüklü veya yüksüz olabilen herhangi bir kimyasal atom veya moleküldür (2, 6, 88). Bu atom veya molekül çiftlenmemiş elektronunu başka bir moleküle vererek veya başka bir molekülden elektron alarak daha stabil hale gelme eğilimindedir. Böylece serbest radikaller son derece reaktif özellik taşırlar (6,7).

Serbest radikallerin zararlı etkileri uzun zamandır bilinmektedir; ancak organizmada fagositoz olayında ve hücre bütünlüğünün korunmasında, mitokondrial oksidasyon ve hemoglobinin oksijen taşıması gibi biyolojik işlevlerde yararlı oldukları gösterilmiştir (8,25).

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Aerobik metabolizması olan memelilerdeki başlıca serbest radikal kaynağı olan oksijenden türeyen partiküllere reaktif oksijen partikülleri (ROP) denir. Oksijenin suya indirgenmesi sırasında yer alan tek elektron aktarmaları sonucunda

oluşan partiküllerdir (2,19,73). Oksijen kaynaklı ve oksijen kaynaklı olmayan serbest radikaller tablo 2’de özetlenmiştir (6,77).

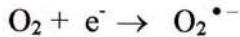
Tablo 2. Serbest Radikaller

Oksijen Kaynaklı Serbest Radikaller		Oksijen Kaynaklı Olmayan Serbest Radikaller
Radikaller	Radikal Olmayanlar	
Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$)	Singlet oksijen (1O_2)	1.Karbon kaynaklı serbest radikaller: Triklor metil (CCl)
Hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)	2.Sülfür kaynaklı serbest radikaller : Thiyl ($RS^{\bullet}$) radikali
Peroksil radikali ($ROO^{\bullet}$)	Peroksinitrit ($OCCO^{\bullet}$)	3.Nitrojen kaynaklı serbest radikaller: Fenildiazin ($C_6H_5N:N$)
Nitrik oksit radikali ($NO^{\bullet}$)		4.Geçiş metal kompleksleri: Fe^{+3}/Fe^{+2} , Cu^{+3} / Cu^{+2}
Alkoksi radikali ($RO^{\bullet}$)		

Reaktif oksijen türlerinden en önemli 3 tanesi; süperoksit ($O_2^{\bullet -}$) , hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil iyonlarıdır ($OH^{\bullet}$) (2).

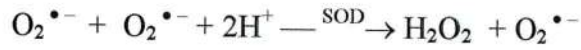
3.3.a. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet -}$)

Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, serbest süperoksit radikal anyonu ($O_2^{\bullet -}$) meydana gelir.



Süperoksit, bir serbest radikal olmakla beraber kendisi organizmaya direkt olarak fazla zarar vermez. Asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (2).

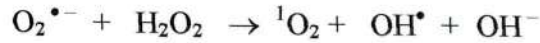
Superoksit radikali birkez oluşursa kendiliğinden yada hızlı olarak süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile inaktive edilir ve hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşur (25).



Süperoksit radikallerinin ortamdan temizlendiği bu tepkimeye dismutasyon tepkimesi denir (2, 18, 46).

Ortamda biriken süperoksit radikallerinin girebileceği başlıca tepkimeler aşağıdaki gibi özetlenebilir.

1. Süperoksit radikali yukarıda verilen tepkimelerle kendiliğinden dismutasyona uğrayabilir.
2. Ortamdan bir proton alarak perhidroksi radikali (HO_2) meydana gelebilir.
3. Hidrojen peroksit ile tepkimeye girerek hidroksil radikali ($OH^\bullet$) ve singlet oksijen (1O_2) meydana gelebilir.

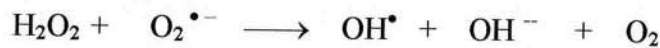


Bu radikaller süperoksidin kendisinden çok daha reaktif ve toksiktir. Bu nedenle süperoksit radikalleri ortaya çıktığı anda ortamdan uzaklaştırılmazsa diğer radikallerinde görülmesi kaçınılmazdır (46). SOD aktivitesi azalacak olursa ortamda süperoksit radikali birikir ve diğer radikaller de ortaya çıkar.

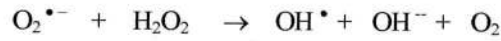
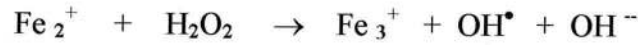
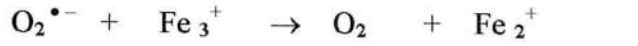
3.3.b. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit, süperoksit radikalının spontan veya SOD ile katalizlenen dismutasyon reaksiyonuyla veya moleküler oksijenden iki elektron alarak indirgenmesiyle meydana gelir (2,7).

Hidrojen peroksit çiftlenmemiş elektron içermez ve bu yüzden gerçekte serbest radikal değildir. Bununla birlikte demir, bakır gibi geçiş metalleri varlığında süperoksit radikali ile reaksiyona girer ve bilinen en etkin oksidan ajan olan hidroksi radikalini ($HO^\bullet$) meydana getirir (2, 7, 25).



Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir. Haber-Weiss reaksiyonu ya katalizör varlığında ya da katalizörsüz cereyan edebilir. Fakat katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerler. Demir ile katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır. Bu reaksiyonda önce ferri demir (Fe^{+3}) süperoksit radikali tarafından ferro demire (Fe^{+2}) indirgenir. Sonra bu ferro demir kullanılarak "Fenton reaksiyonu" ile hidrojen peroksitten $\text{OH}^\bullet$ ve OH^- üretilir. Reaksiyon mekanizması aşağıdaki şekildedir (2,7,18,25).



3.3.c. Hidroksi Radikali ($\text{OH}^\bullet$)

Hidroksi radikali ($\text{OH}^\bullet$), hidrojen peroksidin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesi ile (Fenton reaksiyonu) meydana gelir. Son derece reaktif bir oksijen radikalidir. Yarılanma ömrü çok kısadır. Meydana geldiği ortamda büyük hasara sebep olur. Tioller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak yeni radikallerin ortaya çıkmasına sebep olur (2).

3.3.d. Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$)

Singlet oksijen ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olur. Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle meydana gelir (2).

Serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucu karbon merkezli radikaller ($\text{R}^\bullet$), peroksi radikalleri ($\text{ROO}^\bullet$), alkoksi radikalleri ($\text{RO}^\bullet$), tiyl radikalleri ($\text{RS}^\bullet$) gibi

önemli serbest radikaller de meydana gelir. Bunlardan özellikle poliansatüre yağ asitlerinden (PUFA) meydana gelen peroksi radikali yarı ömrü uzun olan bir radikaldir (2).

3.4: Serbest Radikallerin Kaynakları

Serbest radikaller sürekli olarak endojen ve ekzojen kaynaklar yoluyla üretilmektedir (88, 96).

3.4.a. Serbest radikallerin endojen kaynakları:

- a. Fagositler
- b. Mitokondrial elektron transport sistemi
- c. Mikrozomal elektron transport sistemi
- d. Ksantin oksidaz
- e. Araşidonik asit metabolizması
- f. Endojen ve ekzojen substratların otooksidasyonu
- g. Solubl oksidaz enzimler
- h. Geçiş metalleri

3.4.b. Serbest radikallerin ekzojen kaynakları:

- a. Radyasyon
- b. Hava kirliliği
- c. Sigara dumanı
- d. Hiperoksit çevre
- e. Farmakolojik bazı ilaçlar

3.5: Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller, hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerini etkilerler (34,40).

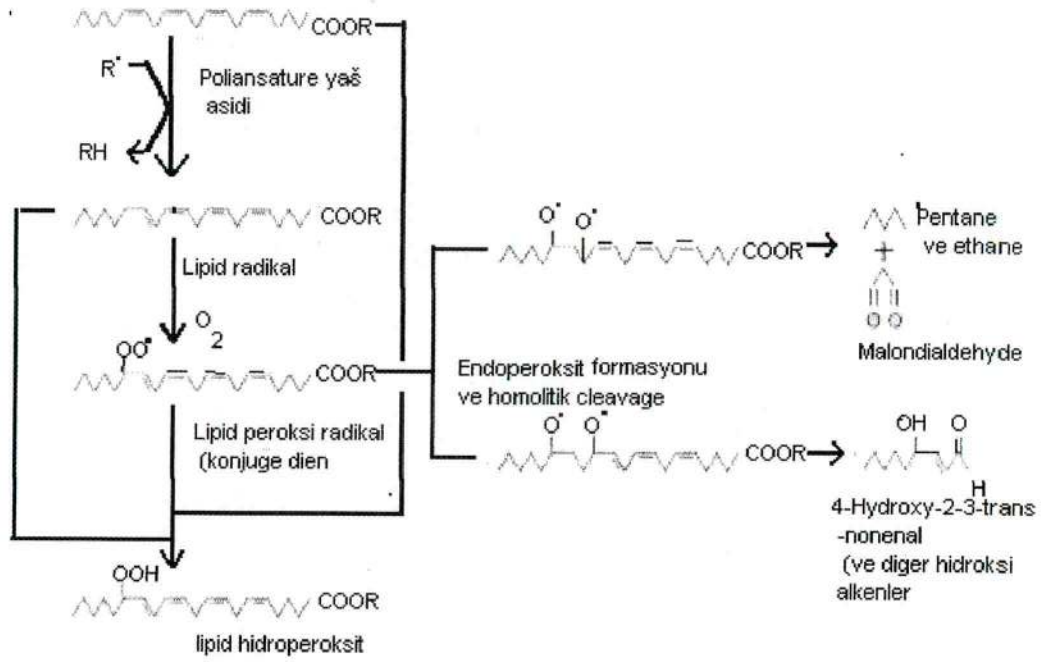
3.5.a. Membran lipidlerine etkisi (Lipid Peroksidasyonu)

Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranlarda oluştukları zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Biyomoleküllerin tüm büyük sınıfları serbest radikallerden etkilenir ama en hassas olanı lipidlerdir (2,25). PUFA'nın oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren otokatalitik bir reaksiyondur ve oluşan hasar geri dönüşümsüzdür (2).

Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan bir serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan PUFA zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar (2,18,45). Bunun sonucu yağ asidi zinciri bir lipid radikali niteliğini kazanır. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Oluşan lipid peroksi radikalleri ($LOO^{\bullet}$), membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksidlerine ($LOOH$) dönüşürler (2). Peroksitlerin kendisi serbest radikal olarak görev yapar ve otokatalitik zincir reaksiyonunu başlatır. Bu da doymamış yağ asitlerinin daha fazla kaybına yol açarak aşırı membran hasarına yol açar (18).

Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiobarbütirik asitle ölçülebilen malondialdehit (MDA) meydana gelir. Bu metod lipid peroksit seviyelerin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir, fakat lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir (2).

Siklik peroksitler yeniden düzenleme ile endoperoksitlere daha ileri oksidasyon ile de MDA'ya dönüşebilirler . Lipid peroksidasyonuna yol açan lipid radikallerinin oluşumu ve artışı şekil 2'de özetlenmiştir (25).



Şekil 2: Lipid peroksidasyonuna yol açan lipid radikallerinin oluşumu ve artışı.

MDA ve 4 hydroxynonenal gibi bazı ürünler membranlardaki deformite ve permeabiliteyi artırır. Membran komponentlerinin polimerizasyonu ve çapraz bağlanmalarına neden olan MDA iç membranın özelliklerini değiştirir. Ayrıca diffüze olabildiğinden DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girmektedir. MDA bu özelliklerinden dolayı, mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşiktir (2, 48).

Lipidlerden, araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine “enzimatik lipid peroksidasyonu” diğer radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna ise “non-enzimatik lipid peroksidasyonu” adı verilir (2).

Membran ilişkili yağ asitleri ve kolesterolün lipid peroksidasyonu hücre membran akıcılığını ve geçirgenliğini değiştirerek hücre membran hasarına yol açar. Plazma lipid peroksidasyon ürünleri, lipid peroksidazlar normal gebelikle karşılaştırıldığında preeklampside artmıştır (54).

Yayılma zincirinin uzunluğu membrandaki lipid/protein oranına, yağ asidi birleşimine, oksijen konsantrasyonuna ve C vitamini gibi zincir reaksiyonlarını kesen antioksidanların varlığına bağlıdır (54).

Demir ve bakır iyonları ya da bu iyonların fosfat esterleriyle oluşturduğu basit kelaatları (Fe^{+2} -ADP), hem, hemoglobin ve myoglobulini de içeren bazı demir proteinleri, lipid hidroksiperoksitlerini bozarak peroksidasyonu sonlandırmaktadır (2).

Ayrıca E vitamininin yaptığı gibi zincir kırıcı etkiye sahip antioksidan maddelerin varlığı da peroksidasyonun sonlandırılmasında önemlidir (2,77).

3.5.b. Proteinlere Etkileri

Proteinler serbest radikal etkisine karşı, PUFA'dan daha az hassastırlar ve başlayan zarar verici zincir reaksiyonlarının hızla ilerleme ihtimali daha azdır. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler (2,6).

Hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin superoksit radikali veya hidrojen peroksit ile reaksiyonu methemoglobin oluşumuna sebep olur (2). Prolin ve lizin; süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler (2).

Fazla miktarda disülfid bağı içeren ekstrasellüler proteinler (IgG, albumin gibi) hidroksil ve peroksi radikal saldırısına daha hassastırlar (2,25).

3.5.c. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri

Nükleik asitler ve deoksiribonükleikasit (DNA) üzerine serbest radikal etkisiyle; DNA zincirinde kopmalar, bazlarda ve deoksiribozlarda kırılmalar ve hasar

oluşur (6,25). Reaktif oksijen tek iplikçikli DNA hasarı yapar ve iplikçiklerin kırılmasına neden olur. Sonuçta mutajenez, karsinojenaz, kromozomal değişimler, hücre büyümesi ve farklılaşmasında değişiklikler görülür (2,6,25).

3.5.d. Karbonhidratlara Etkileri

Karbonhidratların proteinlere bağlanması, proteinleri serbest radikal hasarına daha duyarlı kılar. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelirler (2,6,25).

3.6: ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Belirli bir düzeye kadar olabilen okside molekül artışı yine vücutta daima belirli bir düzeyde bulunan doğal antioksidan moleküller tarafından etkisiz hale getirilmektedirler. Sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların bunları etkisizleştirme gücü bir denge içindedir (19).

Antioksidanlar genel olarak endojen ve eksojen antioksidanlar olmak üzere iki grupta incelenir.

3.6.a. ENDOJEN ANTİOKSİDANLAR

3.6.a1. Enzimatik Antioksidanlar (sitokrom oksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon S transferaz, glutatyon redüktaz).

3.6.a2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar (Vit E, Beta karoten, Vit C, Glutatyon)

3.6.a3. Diğer Enzimatik Olmayan Endojen Ajanlar (ürik asit, sistin, albumin, melatonin, bilürubin vb.).

3.6.b. EKSOJEN ANTİOKSİDANLAR: (propil galate, desferroksamin, kalsiyum antagonistleri vb.).

Vücutta enzimatik ve nonenzimatik çok çeşitli antioksidan savunma sistemleri vardır (2,6,7,41).

3.6a1. Enzimatik Antioksidanlar

Antioksidan savunmada öncelikle etkili olanlar enzim sistemleridir. Bunlar superoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi enzimlerdir (2).

3.6.a1.1. Sitokrom Oksidaz Sistemi

Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz aşağıdaki reaksiyonla süperoksidi detoksifiye eder.



Hücredeki oksijenin % 95-99 kadarını etkisiz hale getirir (6). Ancak süperoksit üretimi çoğu zaman bu enzimin kapasitesini aşar ve diğer antioksidan enzimler devreye girer (2).

3.6.a1.2. Süperoksit Dismutaz (Superoxide oxidoreductase, EC 1.15.1.1)

Serbest radikallere karşı organizmada ilk savunma superoksit dismutaz (SOD) enzimiyle gerçekleşir. SOD, katalaz ve GSH-Px'den farklı olarak serbest radikali substrat olarak kullanır. SOD, süperoksidin H_2O_2 'ye dismutasyonunu katalize eden bir metalo enzimdir (20, 28, 91).



Süperoksit dismutazın 3 major formu vardır. En sık bulunanı bakır-çinko içerir (Cu-Zn SOD), sitozolde bulunur. Mangan içeren ise mitokondride bulunur (Mn SOD). Üçüncü tip ise demir içerir (Fe SOD) ve bakterilerde bulunur (2,6,25). Cu-Zn SOD 21 nolu kromozomda, Mn SOD ise 6 nolu kromozomda lokalizedir (2). Sitozolik Cu-Zn SOD siyanidle inhibe edilirken, mitokondrial Mn SOD inhibe olmaz (2). Her iki SOD'un katalizlediği reaksiyon aynıdır. Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Bu enzim sayesinde

intrase   ler süperoksit düzeyleri düşük tutulur. SOD'un ekstras   ler aktivitesi çok düşüktür (2).

SOD enziminin katalizlediği reaksiyonun son ürünü olan H_2O_2 ; Cu-Zn SOD ve Fe SOD izoenzimlerini inaktif etmektedir, ancak H_2O_2 'nin Mn SOD   zerine etkisi yoktur (93).

SOD enziminin aerobik hücrelerin tümünde bulunduğu ancak anaerobik hücrelerin çoğunda bulunmadığı bilinmektedir (93).

Süperoksit radikalleri spontan olarak dismutasyona uğrayabilirler. SOD enzimi dismutasyon hızını 10 kez artırır. Böylece süper oksitin başka substratlarla reaksiyonla  ması ve daha toksik etkili $OH^\bullet$ radikallerinin oluşumu SOD tarafından engellenir (25).

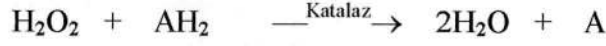
SOD fagosite edilmiş bakterilerin intrase   ler öldürülmesinde de rol oynar (2).

Bugün aerobik canlıların her hücre ve organelinin sürekli olarak süperoksit radikali   retti  i ve bu radikaller ile meydana gelen toksik etkilere kar  şı tek enzimatik koruyucu mekanizmanın SOD olduğu bilinmektedir (2,25).

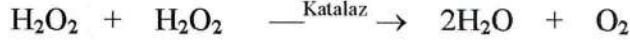
3.6.a1.3. Katalaz ($H_2O_2 : H_2O_2$ oksido reductase, EC 1.11.1.6)

Katalaz tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan bir hem enzimidir. Yüzde 20 oranında sitoplazmada ve % 80 oranında peroksizomlarda lokalizedir. Aktif merkeze bağlı bir hem grubu içeren 4 alt birimden oluşmaktadır. Molek  l  n alt birimlerinin ayrılması enzim aktivitesinin kaybına yol açar. Görevi hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalamaktır (2,6). Ancak katalaz, hidrojen peroksidin   retildi  i tüm hücresel komponentlerde bulunmaz, bu nedenle radikallere kar  şı korumada ikincil derecede önemli olduğu kabul edilir (6,25).

Katalaz, H_2O_2 'in oluşum hızının düşük olduğu veya elektron vericisinin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu durumlarda peroksidatif reaksiyonla;



H_2O_2 'in oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik reaksiyonla;



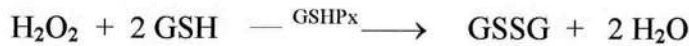
Hidrojen peroksidi suya dönüştürerek temizler (73).

Katalazın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit, metil hidroperoksitleri, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine ise etki etmez (2).

3.6.a1.4. Glutasyon Peroksidaz (Glutathione: H_2O_2 Oxido reductase, EC 1.11.1.9)

Normal koşullarda hücrede bulunan H_2O_2 'nin detoksifikasyonundan esas olarak glutasyon peroksidaz (GSH-Px) sorumludur. GSH-Px, lipid peroksidasyonunun başlamasını ve gelişmesini engelleyici özellikte olan bir enzimdir (13,27,30). Selenyuma bağımlı ve bağımsız olmak üzere 2 farklı tipi vardır. Selenyuma bağımlı olan GSH-Px hem H_2O_2 'yi hem de lipid hidroperoksitlerini (LOOH) metabolize ettiği halde; hücrenin mitokondri (%30) ve sitozol (%70) fraksiyonlarında lokalize olan selenyumdan bağımsız GSH-Px ise yalnızca lipid hidroperoksitlerini metabolize edebilmektedir (73).

GSH-Px aşağıdaki reaksiyonları katalizler (2,18,73).



Fosfolipid Hidroperoksit Glutasyon Peroksidaz (PHGSH-Px): Selenyum atomu ihtiva eden membran fosfolipid hidroperoksidlerini alkole indirgeyen sitozolik bir enzimdir (2,6).

Membranlara bağı en önemli antioksidan olan E vitamini yetersiz olduğu zaman PHGSH-Px membranın peroksidasyona karşı korunmasını sağlar (2,73).

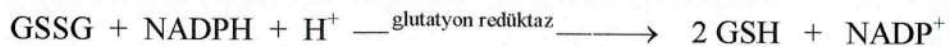
GSH-Px'in fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Eritrositlerde de oksidan sisteme karşı en etkili antioksidandır (2). GSH-Px ve katalaz enzimleri hücrenin farklı bölümlerinde lokalize olmalarından dolayı karaciğerde endojen olarak oluşan H₂O₂ seviyesini düzenlemede birlikte etkinlik gösterir (73).

3.6.a1.5. Glutasyon S transferazlar (E.C.2.5.1.18)

Glutasyon S transferaz (GST) herbiri iki alt birimden oluşmuş (dimerik) bir enzimdir. Başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı GST'ler selenyum bağımsız GSHPx aktivitesi göstererek bir defans mekanizması oluştururlar. GST'ler geleneksel olarak 3 sitozolik bir de mikrozomal olmak üzere dört ana gruba ayrılırlar (2).

3.6.a1.6. Glutasyon Redüktaz (NADPH: Oxidized glutathione oxido reductase EC 1.6.4.2)

Antioksidan savunmanın etkinliğini sürdürebilmesi için oksitlenmiş glutasyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüşmesi gerekir. Glutasyon redüktaz, NADPH (Redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) varlığında oksitlenmiş glutasyonun indirgenme reaksiyonunu katalizler. Bu oksidoredüksiyon enziminin koenzimi NADPH, prostetik grubu ise FAD (Flavin adenin dinükleotid fosfat)'dır. Glutasyon redükyaz sitozol ve mitokondride lokalizedir (73).



NADPH / NADP⁺ ve GSH / GSSG oranlarındaki değişiklikler akut prooksidan stres ile antioksidan savunma arasındaki dengesizliğin belirtisidir. Oluşan

NADP⁺(Okside nikotinamid adenin dinükleotid fosfat)'nin tekrar NADPH'a dönüşebilmesi için G.6.P.D (Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz) enzimine gerek duyulur (73).

3.6.a2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

3.6.a2.1. E Vitamini

E vitamini biyolojik sistemler için önemli bir antioksidandır. α -tokoferol biyolojik membranların lipid tabakalarında mevcuttur ve önemli bir yapısal rol oynar (96).

3.6.a2.2. Beta Karoten

A vitamini ön maddesi olan β karoten etkili bir singlet oksijen ve radikal tutucu antioksidandır (4,8,93,98). Biyolojik kaynaklar arasında en etkin singlet oksijen tutucu ajandır. E vitamini gibi lipoproteinlerde (HDL, LDL) mevcut olduğundan lipofilik antioksidanlar arasındadır (73,77).

3.6.a2.3. C Vitamini (Ascorbik Asit)

Biyolojik ortamların çoğunda askorbat olarak bulunan C vitamini hücre dışı sıvıların en önemli antioksidanıdır. Kornea, lens, adrenal ve hipofiz bezlerinde yüksek konsantrasyonda bulunur. Ayrıca beyin, kalp, karaciğer, dalak, böbrek ve pankreas dokuları yüksek miktarda C vitamini kapsarlar (73,46).

3.6.a2.4. Glutatyon

Glutatyon; glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan, intrasellüler konsantrasyonu daha fazla olan bir tripeptiddir (46,73).

Canlıların yaşayabilmesi için yüksek miktarda redükte glutatyon (GSH) ve düşük miktarda okside glutatyon (GSSG) gereklidir (6,25). Glutatyon organizmanın tüm hücrelerinde bulunan, hücrenin protein yapısı dışındaki sülfidril grubu içeriğinin % 90 kadarını oluşturan bir tripeptiddir. Serbest bir sülfidril grubuna sahip olan

redükte glutatyon hücre içi sülfidril tamponu olarak etkilidir ve hücreleri oksidatif hasara karşı korur (6,73). Eritrositlerde bulunan GSH, hemoglobinin sistein gruplarını ve diğer hücre proteinlerinin tiol gruplarını indirgen şekilde tutar. Böylece hemoglobini oksidasyondan koruyarak hücrenin bütünlüğünü sağlar. Ayrıca nükleofilik bir yapıya sahip olan GSH elektrofilik karakterdeki karbon atomları ve Zn, Cd, Hg, Cu, Pb gibi atomlarla kompleks oluşturarak ağır metallerin vücuttan atılmasına yardımcı olur (73).

Glutatyon, bazı aminoasitlerin hücre içine taşınmasında, biyotransformasyon ile oluşan maddelerin detoksifikasyonunda da görev alır (73).

Glutatyonun peroksitlerle ve disüflitlerle reaksiyonu sonucu GSSG oluşur. GSSG konsantrasyonundaki artış, oksidan stresin bir göstergesidir (73).

GSH serbest radikallere karşı savunma sisteminin anahtar bileşenidir. Gerekli GSH/GSSG oranları glutatyon redüktaz ve G.6.P.D enzimleri tarafından sağlanır (2,25).

3.6.a3. Diğer Enzimatik Olmayan Endojen Ajanlar

Bazı durumlarda ürik asit, sistin, albumin, bilirubin, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, ferritin, kreatinin ve östrojenler de serbest radikallere karşı koruyucu rol oynarlar (2,6).

Ayrıca son zamanlarda üzerinde çok durulan **melatonin** en zararlı radikal olan OH[•] radikalini ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır. Bu yüzden günümüze kadar bilinen antioksidanların en güçlüsü olarak kabul edilmektedir (2).

3.6.b: Eksojen Antioksidanlar

1. Besinlerdeki doğal antioksidanlar. A, C, E vitamini ve Beta karoten.

2. Besinlere eklenen antioksidanlar. Butylated hydroxytoluen, butylated hydroxyanisole, sodyum benzoat, etoksikuin, propil galate, Fe-süperoksit dismutaz.
3. Diğer antioksidanlar (farmakolojik). Beta blokerler, kalsiyum antagonistleri, sülfidril içeren anjiotensin converting enzim (ACE) inhibitörleri ve desferroksamin gibi (2,6).

3.7: Deneylerimizde kullandığımız Antioksidanlar:

3.7.1.PGE1

3.7.2.Melatonin

3.7.3.Vit.E

3.7.1: PROSTAGLANDİN E1

Prostaglandinler (PG'ler), karbon zincirinin ortasında bir siklopentan halkası bulunan eikozanoidlerdir. Halka üzerinde ve ona bağlı iki yan zincir üzerinde keto (okso) ve/veya hidroksil grubu içerirler; ayrıca alifatik zincir üzerinde bir, iki veya üç çift bağ bulunur. Hepsinde bulunan ortak bir çift bağ C-13 ve C-14 arasındaki trans çift bağdır (43).

Siklopentan halkasındaki substituentlerin durumuna göre E,F,D,A,B ve C diye ayrılırlar. Prostaglandin E'ler, F'ler ve D'ler doğrudan doğruya siklik endoperoksid ara ürünlerinden oluşurlar ve bunlara primer (veya stabil) prostaglandinler adı verilir. Primer prostaglandinlerin çeşitli hücre tiplerinde yaygın şekilde dağılmış ve biyolojik yönden önemli olanları E ve F grubu prostaglandinlerdir. PGD'ler insanda sadece trombositlerde ve mast hücrelerinde bulunur. PGA'lar, B'ler ve C'ler, E grubu prostaglandinlerden türerler ve biyolojik önemleri yoktur. Her bir grup içindeki üyeler, alifatik yan zincirler içindeki doymamış bağ sayısını gösteren ve grubu belirleyen harfin alt kısmına konulan 1,2

ve 3 sayıları ile simgelenirler. Halka üzerinde 2 hidroksil grubu içeren prostaglandin F'lerin α ve β izomerleri vardır. Vücutta sadece α izomerler oluşur, β izomerler oluşmaz. PGE'lerde halka üzerinde bir keto ve bir de hidroksil grubu bulunur (43).

3.7.1.a.Biyosentez:

Belirli yağ asitlerinden prostanoid sentezini yapan enzim sistemi vücutta hücre çeşitlerinin tümünde bulunur. Bu nedenle vücutta PGE'ler ve PGF'ler gibi primer prostaglandinlerin sentez edilmediği doku yok gibidir (43).

Prostaglandinlerin biyosentezi üç basamaklıdır:

1-Membran fosfolipidlerinden serbest yağ asitlerinin oluşması.

2-Serbest yağ asitlerinin siklooksijenazlarla siklik endoperoksidlere oksidlenmesi.

3-Siklikendoperoksidlerden prostaglandinlerin oluşması (43).

Prostaglandin biyosentezinde polienoik yağ asidi prekürsörlerinden ilk iki reaksiyon, prostaglandin endoperoksid sentaz ile katalize edilir. Birçok hayvanda mevcut olan bu membrana bağlı hemoprotein (eritrositlerde ve lenfositlerde olmamakla birlikte), tüm vücuda dağılmıştır. Araşidonik asitten prostaglandinlerin sentezi, stabil olmayan bir C 15-hidroperoksi-C9, C11-endoperokside (PGG₂) yol açarak, bir pentan halkasının (siklooksijenaz aşaması) oksijenasyonu ve siklizasyonu ile başlar. Daha sonra aynı enzim tarafından kataliz edilmiş peroksidaz, C 15-hidro peroksi grubunu, endoperoksid PGH₂ oluşturarak, bir hidroksil grubuna indirger. Siklooksijenaz reaksiyonu, aspirin ve indometazin gibi steroidal olmayan antienflamatuar ilaçlarla inhibe edilir (42).

3.7.1.b.PGE₁'İN SİSTEMLER ÜZERİNE FARMAKOLOJİK VE FİZYOLOJİK ETKİLERİ

3.7.1.b1.Kardiyovasküler Sistem:

PGE'ler güçlü vazodilatatör etki gösterirler. Etki güçleri plazma kininlerinkine yakın derecededir. PGE1 burun mukozasında vazokonstriksiyon yapar. Fakat bu maddenin memelilerde damarda oluştuğu kanıtlanmamıştır (43). PGE2 akciğerden geçerken önemli derecede inaktive edildiğinden, intravenöz yoldan verildiğinde hipotansif etki gücü prostasiklininkine göre 4-8 kez daha düşüktür. İntraarteryel olarak verildiklerinde bu iki maddenin vazodilatatör etki gücü birbirine yakındır. Prostrasiklin vazodilatatör etkisi bakımından 6-keto-PGE1 metabolitinden daha güçlüdür (43).

PGE1 ve PGE2 kapiller permeabilitesini artırır. İnsanda cilt içine enjekte edilmeleri halinde Lewis'in üçlü cevabını oluştururlar. Bradikininin aynı yöndeki etkisini potansiyalize ederler. Kapiller permeabilite artması, esas olarak postkapiller venüllerin permeabilitesinin artmasına bağlıdır (43).

3.7.1.b2Üreme Sistemi:

Üreme sisteminin çeşitli kısımlarında bol miktarda prostaglandin oluşur. İnsanda sperm sıvısı içerisinde toplam prostaglandin konsantrasyonu ml'de birkaç yüz µg'dır ve bu değer diğer vücut sıvılarındaki konsantrasyonun yaklaşık bir milyon katıdır. Spermdeki bu prostaglandinlerin blastosit implantasyonunu ya da yumurta naklini kolaylaştırdığı ve prostaglandinlerin uterus salgılanmasının lüteolizise sebep olduğu ileri sürülmüştür. Bazı kısır erkeklerde spermde prostaglandin konsantrasyonunun azaldığı saptanmıştır. Vazodilatatör alprostadil (PGE1) ile intrakavernöz enjeksiyon empotans tedavisinde önemli hale gelmiştir (42,43).

3.7.1.b3.Gastrointestinal Sistem:

PGE1 ve PGE2 insana intravenöz olarak enjekte edildiklerinde mide asit salgısını güçlü bir şekilde inhibe ederler. Gerek bazal salgılanmayı ve gerekse çeşitli faktörler tarafından (yemek, vagal stimülasyon, gastrin, histamin, kafein ve insülin gibi) stimüle edilmiş salgıyı azaltırlar. Mide asit salgısının azaltılmasında prostaglandinlerin iki etkisi rol oynar:

1-Parietal hücrelerdeki siklik AMP oluşumunu inhibe etmeleri (histamin siklik AMP oluşumunu artırarak asit salgısını artırır).

2-G hücrelerinden gastrin salınmasını suprese etmeleri.

PGE1 ve PGE2'nin analogları (rioprostil, misoprostol ve enprostil gibi), asit salgısını PGE1 ve PGE2'den daha güçlü bir şekilde inhibe ederler. Prostaglandinler mide ve barsakta mukus salgısını ve pankreasın dış salgısını artırır (43).

PGE'lerin ilk olarak midede gözlenen ve sonra diğer dokularda da saptanan bir etkisi sitoprotektif (hücre koruyucu) etkidir. Bu etki hücrenin, zedeleyici ve öldürücü etkenlere karşı direncinin artırılmasıdır. Bu etki midede asit ve pepsin salınmasını inhibe edici etkiden bağımsızdır. Prostaglandinlerin antiülserojenik tesirinde her iki etki de rol oynar. Sitoprotektif etki, mide salgısını etkilemeyecek kadar ufak konsantrasyonlarda da gözükür.

Sitoprotektif etki, şu temel etkilere dayanır:

1-Mukus salgısının artması.

2-Mukozal HCO_3 salgısının artması.

3-Mukoza bariyerinin negatif elektrik potansiyelinin artırılması sonucu H^+ nin geri difüzyonunun azaltılması.

4-Mukozadan geçen kan akımının artırılması.

5-Epitel hücrelerinin lizozom membranlarının stabilitesinin pekiştirilmesi.

6-Mukoza epitelinin rejeneratif kapasitesinin artırılması.

Prostaglandinlerin ve bunların analoglarının sitoprotektif etkinliği oldukça yaygın ve kapsamlı bir olaydır; mide dışında da ortaya çıkar. Örneğin bu etkinlik sayesinde miyokard, pankreas, beyin ve lökositler dahil dokuları iskeminin zedeleyici etkisine karşı da koruyabilirler (43).

3.7.1.b4.Renal Sistem:

Hem renal medulla hem de renal korteks prostaglandinleri sentez eder. Fakat medullanın sentez kapasitesi korteksinkinden çok daha büyüktür.

PGE1, PGE2 ve PGI2 vazodilatatör etkileri yoluyla glomerüler filtrasyonu artırır. Bu prostaglandinler aynı zamanda su ve sodyum atılımını da artırır. Su klirensindeki artış muhtemelen, ADH'nın adenil siklaz üzerindeki etkisini hafifletme sebebiyle olur. Natriüretik etkinin, distal tübülde sodyum rezorpsiyonunun doğrudan inhibisyonu ile ya da artmış medüller kan akımı ile olup olmadığı kesin değildir. Kıvrım diüretiği furasemid, etkisinin bir kısmını siklooksijenaz aktivitesini uyararak oluşturur. Normal böbrekte bu, vazodilatatör prostaglandinlerin sentezini artırır. Bu yüzden kıvrım diüretiğine hastanın cevabı, eğer aynı zamanda bir siklooksijenaz inhibitörü verilirse, azalacaktır (42).

3.7.1.b5.Santral Sinir Sistemi:

Prostaglandinler, diğer dokular gibi, santral sinir sisteminde de bulunur. Beyinde en fazla bulunan tür PGE2'dir ve özellikle hipokampus, eminentia media ve pineal bezde yoğunlaşmıştır.

Henüz kan-beyin engeli oluşmamış birkaç günlük civcivlere verildiğinde PGE1 sedatif ve antikonvülsan etkiye neden olur. Kedilerde beyin ventrikülleri

içerisine PGE1 enjeksiyonu uzun süre spontan hareketlerin durmasına ve katatoniye benzer bir durum oluşmasına neden olur.

Mikroiyoforesle lokal uygulanan PGE'lerin beyincikte purkinje hücrelerinde noradrenalinin yaptığı inhibisyonu antagonize ettikleri gösterilmiştir (43).

3.7.1.b6.Endokrin Sistem:

PGE1 yağ dokusunda antilipolitik etki gösterir. Adrenalin ve diğer lipolitik hormonların etkilerini antagonize eder.

TSH, tiroid bezinde tiroid hormonlarının sentezi yanında prostaglandin sentezini de artırır. PGE1 enjeksiyonu, tiroid bezinde TSH'ninkine benzeyen stimulan etkiye neden olur ve hormon sentezi ile ilgili bazı olayları hızlandırır. Prostaglandinler, kemikteki kalsiyum mobilizasyonu üzerinde paratiroid hormonunkine benzeyen artırıcı bir etki yaparlar. Bu etkileri doku kültürlerinde de oluşur.

Prostaglandinler ön hipofizden TSH, ACTH, GH, LH ve FSH salgılanmasını artırabilirler; ancak bu etkilerin adı geçen hormonların salgılanmasında fizyolojik öneminin olup olmadığı belli değildir. Somatostatinin mide asid salgısını inhibe etmesinde hiç olmazsa kısmen prostaglandinler aracılık eder; indometazin bu etkiyi kısmen bloke eder (43).

Kemik kültürlerinde prostaglandin E'ler paratiroid hormonuna yakın bir derecede etkinlik gösterir ve kemik rezorpsiyonunu stimüle ederler. Bu etkiye dokuda siklik AMP düzeyinin artması eşlik eder. Çeşitli solid tümörlerin neden olduğu hiperkalsemiye PGE'lerin aracılık ettiği ileri sürülmüştür. İndometasin'in ve aspirinin bazı olgularda tümöre bağlı hiperkalsemiyi düşürebildiği bulunmuştur (43).

3.7.1.b7.Göz:

İriste önemli derecede PGE2 sentez edilir ve aköz hümör içine salıverilir. PGE'lerin ön kameraya enjeksiyonu miyozis oluşturur. PGE'ler tavşanda göz içi basıncını yükseltirler ancak diğer memelilerde etkisizdirler.

İlginç olarak açık açılı glokomu olan hastalarda aköz hümörde PGE1 düzeyi belirgin şekilde yüksek bulunmuştur. Buna dayanarak anılan hastalığın etiolojisinde PGE1'in rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. Göz içindeki dokuların bazı iltihaplarında da aköz hümörde prostaglandin düzeyi yükselir (43).

3.7.2:MELATONİN

Pineal bez beyin içerisinde lokalize endokrin bir organ olup, yıllardır bu küçük organ üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. 1958 yılında Lerner tarafından yapılan çalışma sırasında pinealden salgılanan ve kurbağlardaki melanofor hücreleri agreste ettiği için melatonin adı verilen hormonun keşfi ile pineal bez daha da önemli bir organ haline gelmiştir (63,85).

Melatonin (N-asetil 5-Metoksitriptamine) bir indolamin türevidir ve vücutta primer olarak pineal bezden salgılanan, bütün vertebralılarda gece en üst seviyelere ulaşan artış ve gündüz azalma şeklinde sirkadiyen salınım ritmi gösteren bir hormondur (68,85). Tüm canlılarda gece daha fazla miktarda salgılanan melatoninin sirkadiyen ritimde salgılandığı kabul edilir. İnsanda normal şartlarda gece serum melatonin düzeyi gündüz değerinden 5 ile 10 kat fazladır (44,67).

3.7.2.a.Sentez ve ritmik salınım:

Melatonin biyosentezi için ilk önce kan dolaşımından triptofan'ın pinealositlere alınması gerekir, daha sonra hidroksilaz enzimi tarafından 5-OH triptofan'a dönüştürülür. 5-OH triptofan ise L-Aromatik amino asit dekarboksilaz tarafından serotonine dönüştürülür. Serotonin pineal bezde vücudun diğer

organlarından daha fazla oranda bulunur (68,63). Serotoninin melatonine dönüşümünde etkili olan N-Asetil transferaz (NAT) ve Hidroksi indol-O-metil transferaz (HIOMT) aktivitelerinin pineal bezde gece daha yüksek olduğu belirlenmiştir. HIOMT enzimi pineal bez dışında melatonin sentezleyen retina kalp gibi dokularda da bulunmaktadır. Melatoninin pineal bezde belirgin bir metabolik ritmik aktivite göstermesinin ilk bulgusu, melatonin sentezi ve salınımının karanlık (gece) ile başlayıp aydınlık (gündüz) ile sonlanmasıdır. Bu siklik salınım hemen daima hipotalamustaki suprakiazmatik çekirdeğin fotik stimulusla nöronal aktivasyonu sonucu oluşur. Bu nöronal aktivasyon ve pinealin bir fotonöroendokrin iletici gibi işlev görmesinde pinealdeki serotonin düzeyinde meydana gelen varyasyonlar da önemli bir yer tutmaktadır. Canlılarda melatonin sentezi periferik sempatik sinir sistemi yolu ile ışık karanlık döngüsünün kontrolü altındadır (21,85).

Melatonin dolaşıma geçtikten sonra plazma albüminine gevşek olarak bağlanır. Bu indole yapı hepatik mikrozomlarda hızlı bir şekilde %70-80'i hidroksile olarak sülfat ile, %5'i glukuronit ile konjuge edilir. Melatoninin yarılanma ömrü 20-40 dakika arasında olup karaciğerden ilk geçişte %90'ı metabolize olur. Başlıca karaciğerde metabolize edilmekle birlikte böbrekte de metabolize edilir ve 6-OH melatonine dönüştürülerek metaboliti idrar yolu ile atılır (21,66,67).

Pineal bezdeki hüморal sentez gece suprakiazmatik çekirdekten gelen adrenerjik uyarımla (norepinefrin) pinealosit membranındaki α ve β reseptörleri aracılığı ile olur. Reseptör uyarımı ile hücre içi adenilat siklaz enzimi aktive olarak cAMP düzeyini artırır, cAMP ise hücre içi melatonin üretiminde etkili bir enzim olan NAT artışına yol açarak melatonin sentezini artırır (21,66). Pineal bezin melatonin üretiminden sorumlu başlıca organ olduğu görüşü, diffüz nöroendokrin sistem (DNES)' in bir bölümü olarak kabul edilen APUD (Amine prekursor uptake and

decarboxilation) hücrelerinde melatoninin dikkat çekici oranda belirlenmesiyle tartışılmaya başlanmıştır. Enterokromaffin hücreler (EC) GİS' in temel serotonin üreten ve depolayan hücreleridir. Melatoninin barsak mukozasında üretildiğini ve EC hücrelerine lokalize olduğunu ilk defa Raikhlin ve arkadaşları (21,69) ileri sürmüşlerdir.

Melatonin pineal bezin yanı sıra retina, tükrük bezleri ve barsakta sentezlenip salgılanır (56). Ayrıca karaciğer, böbrek, adrenal bezler, tiroid, timus, hava yolları, plasenta ve endometriumda, DNES hücrelerinde, mast hücreleri, naturel killer, eozinofilik lökositlerde de belirlenmiştir. Bu bölgelerde sentezlenen melatonin gün boyunca etkili olan kan düzeyini oluştururken, sirkadiyan ritmi ise pineal bezden sentezlenip salınan melatonine bağlıdır (21,68,69). Melatoninin reseptörlerinin otoradyografi ve/veya radyoreseptör çalışması ile barsaklarda, böbrek, akciğer, kalp, vas deferens ve kan damarlarında olduğu tespit edilmiştir (68).

3.7.2.b.Melatoninin metabolizması:

Pineal bezden dolaşıma verilen melatonin, kanda serbest veya albumine bağlı (%70) olarak taşınabilir. Serbest veya albumine bağlı melatonin rahatça BOS'a geçebilir. Melatonin primer olarak karaciğerde ve sekonder olarak ta böbreklerde metabolize olur. Karaciğerden ilk geçişte yaklaşık %90'ı metabolize olur ve mikrozomal enzimler tarafından, 6. konumda hidroksilasyona uğrayarak 6-Hidroksimelatonine dönüşür. Bu madde daha sonra klasik olarak mikrozomal faz 1 ve faz 2 gibi ardışık reaksiyonlar olan deaktivasyon ve detoksifikasyona uğratılarak büyük oranda sülfat veya daha az olarak glukronid konjugatı halinde itrah edilerek idrarla atılır (44,85). Melatoninin beyindeki metabolizması ise periferden farklıdır. Beyinde melatoninin büyük bir kısmı (%12) N-asetil-5-Metoksikinürenamine ve daha sonra N-Gamma asetil-5-Metoksikinürenamine dönüşür. Bu metabolitler

fizyolojik olarak aktiftirler ve özellikle melatoninin sirkadiyen ritmiyle ilgilidirler. Ayrıca prostaglandin sentez inhibitörü oldukları da daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir. Eksojen melatonin demetilasyon ile N-asetil serotonine de dönüşerek hidroksilasyon ve neticesinde konjugasyon ile melatonin haline dönüşür. Burada melatoninin kendi prekürsörüne dönüşmesi melatonin sentezinin kompleks bir feedback mekanizmayla kontrol edildiğini düşündürmektedir (66,44,85).

3.7.2.c.MELATONİNİN FİZYOLOJİK FONKSİYONLARI:

Melatoninin etkileri yalnızca deney hayvanlarında değil, insanda da yaklaşık kırk yıldır yoğun şekilde araştırılmaktadır.Melatoninin en iyi bilinen etkisi üreme fizyolojisi üzerinedir. Bunun yanında pineal bez ve melatoninin çeşitli olay ve süreçlerle ilgili olabileceğini belirten yayınlar mevcuttur (94). İnsanda melatoninin kısmen de olsa ilgili olabileceği olay ve süreçler şöyle sıralanabilir:

A- Üreme

- Menstrüel siklus
- Spermatogenez
- Hipotalamik amenore
- Premenstrüel sendrom
- Puberta prekoks
- Puberta tarda

B- Nöropsikiyatri:

- Uyku bozuklukları
- Anoreksiya nervosa
- Epilepsi
- Mevsimsel affektif bozukluklar
- Şizofreni

-Depresyon

C-Diğer

-Bağıışıklık

-Kanser

-Yaşlanma

-Termoregülasyon

-Antioksidan etki

Tiroid ve adrenal bez üzerine olan etkiler

Melatoninin en iyi bilinen etkileri üreme fizyolojisi ile ilgili olanıdır. Ovulasyon esnasında LH (luteinizan hormon) artışı ile birlikte plazma melatonin düzeyinde azalma meydana gelmesi ve pubertal gelişim sürecinde gece melatonin salgılanmasının giderek azalması, pineal bezin insanda hipotalamus-hipofiz-gonadlar sistemi üzerinde inhibitör bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir (16,29,49). Ayrıca, hipotalamik amenoreli kadınlarda, hipogonadotropik hipogonadizmde, oligoazospermili ve azospermili erkeklerde premenstrüel depresyonlu kadınlarda serum melatonin düzeyinin anormal bulunması bu düşüncayı desteklemektedir (16). Antigonadotropik etkileri nedeniyle melatonin, kadınlarda tek başına veya progestinlerle kombine edilerek oral kontraseptif olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür (5).

Melatonin, immüitenin nöroendokrin kontrolünde önemli bir hormondur. Pineal bezin baskılanması veya çıkarılması immüiteni olumsuz etkiler. Maestroni; T helper tip 2 lenfositler üzerinde melatonin bağlanma bölgelerini tespit etmiştir. Giordano ve Palermo; intravenöz verilen eksojen melatoninin, antikorların eşlik ettiğı hücrel sitotoksisiteyi artırdığını saptamıştır (50,13).

Meme kanserinin etyolojisinde uzamış östrojen fazlalığı olması ve melatoninin overlerde östrojen üretimini olumsuz etkilemesi; meme kanseri gelişimi ile pinealden melatonin salınımının azalması arasında bir ilişki olabileceği görüşünü doğurmuştur (84). Özellikle hormon bağımlı tümör türleri ile gerçekleştirilen çalışmalar; malign hastalıklarla melatonin arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir. Ratlarda meme kanseri oluşumunu eksojen melatonin olumsuz; pinealektomi olumlu yönde etkilemektedir. Bu etkinin, prolaktin salınımının veya kanser hücrelerindeki östrojen reseptörlerinin sayısının veya kanser hücrelerindeki östrojen reseptörlerinin sayısının azalmasının bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Hill ve arkadaşlarına göre melatoninin östrojene duyarlı insan meme kanseri hücreleri üzerine antiproliferatif etkisi vardır; ancak östrojen reseptörü taşımayan meme kanseri hücrelerini etkilememektedir (94,50).

Klasik antitümör tedavinin etkisiz kaldığı ilerlemiş renal hücreli kanser, malign solid tümör, malign melanoma ve benzeri hastalıkların tedavilerine eklenen melatoninin potansiyel bir ajan olduğu belirtilmiştir (94,50). Malign hastalıkların tedavisine eklenen melatoninin belirli ajanların antimitotik etkilerini artırmakta; kemik iliğine toksik etkilerini azaltmaktadır (94).

Antistres etkileri olan melatoninin serum düzeylerinin çeşitli psikiyatrik hastalıklar sırasında tipik değişiklikler gösterdiği ileri sürülmektedir (68). Melatonin uyku-uyanıklık siklusunu düzenler ve uykunun kalitesini artırır. Bazı yazarlar, melatoninin uyku oluşturan faktör olduğuna dair bir teori ileri sürmüşlerdir (5).

3.7.2.c1.Melatoninin antioksidan etkisi:

Melatoninin prekürsörleri olan triptofan ve 5-OH triptaminin antioksidan aktivitesi gösterilmiş bir gerçektir. Bu aktivite oksijen serbest radikallerini yakalayan moleküldeki indol yapısına dayanır (66,67,68). Melatonin hidrofilik olduğu kadar

büyük miktarlarda lipofilik olup organizmanın bütün subsellüler kompartmanlarına ve hücre çekirdeğine ulaşabilir ve kan-beyin bariyeri gibi engelleri de kolayca geçerek geniş bir dağılımda oksidatif koruma sağlayabilir (13,65,76). Melatoninin hücre nükleusuna girerek DNA'yı oksidatif hasardan koruyucu etkisi diğer antioksidanlara üstünlüğü bakımından önemlidir. Antioksidan özelliği, güçlü bir hidroksil ve peroksil radikallerini tutucu aktivitesine dayanır. İndol çekirdeğindeki 5 pozisyonunda metil grubunun OH⁻ soğutma yeteneği için gerekli olduğu ve yan zincirdeki asetil grubunun bir toplayıcı olmamasına rağmen sinerjistik aktivite gösterdiği bir çok araştırmada saptanmıştır (21,66).

Serbest oksijen radikallerinin yüksek seviyeleri kardiyomiyositlerde kalsiyum pompasının aktivitesini baskılar, melatonin ise bu pompanın aktivitesinde artışa neden olur. Melatonin subsellüler kompartmanlara kolayca girmesine rağmen bilinen bir toksik etkiye sahip değildir. Canlılarda endojen olarak üretilen melatoninin aşırı miktarlarını vücuttan uzaklaştıracak mekanizmalar mevcuttur. İnsanlara çok yüksek dozlarda (300 mg/gün) ve uzun periyotlarda (5 yıldan fazla) verildiği zaman dahi yan etki oluşturmadığı, bazı antioksidanların kısmen prooksidan etkisi mevcut iken melatoninin böyle bir etkisinin olmadığı bildirilmektedir (21,66).

Melatoninin antioksidan etkisine en az iki mekanizma aracılık eder. Birinci etkisi reseptörlerden bağımsızdır ve melatoninin toksik radikaller üzerine gösterdiği etkisidir. Direkt olarak hidroksi ve peroksi radikalini önleyici etkisi, melatoninin hidroksi radikaline elektron ilave edince indolil katyon radikal çıkarak süperoksit anyon radikalini önlemektedir (21,93). İkinci etkisi ise genomdaki reseptörler üzerinedir ve reseptör aracılığı ile radikali detoksifiye eden enzimi ortaya çıkarır. Melatoninin oksidatif hasara karşı koruyucu olan başka bir mekanizması ise nitrik

oksit sentaz'ı inhibisyonudur. Nitrik oksit sentaz, nitrik asit üretir ve süperoksit anyon varlığında yüksek toksik etkili hidroksi radikale indirgenmektedir (5).

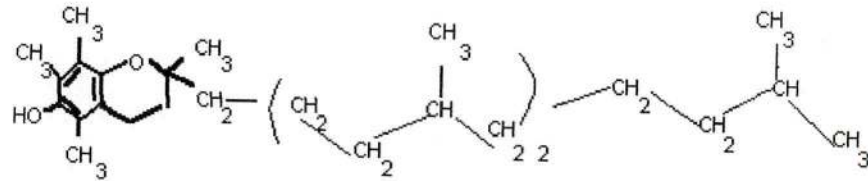
Hidrojen peroksit'in melatonine bağlı NADPH_2 ile enzimatik nötralizasyonu (pentoz yoluyla aktivasyonu) bu hormonun çeşitlendirilmiş metabolik yolunu tanımlar. Genel olarak melatonin hücreye NADPH_2 vererek eşdeğerlerini azaltıcı etki gösterir. Bu özelliği ile OH gibi radikal türleri için bir tuzak oluşturur. Melatonin membranlar ve sitozol üzerine gösterdiği etki için ayrıca membran reseptörüne ihtiyaç duymamaktadır. Bu durum muhtemel hücre içi reseptörün varlığını dışlamamaktadır. Oksidatif stres, radikal atak, hücre proliferasyonu, yaşlanma gibi durumlarda melatoninin faaliyeti nükleer düzeylere ulaşmaktadır. Melatonin direkt olarak Glutasyon peroksidaz'ı ve G_6PD 'yi (pentoz yolunda) aktive ederek H_2O_2 'nin OH^- a dönüşümünü önler (66,67,68).

Melatonin farmakolojik dozlarda GİS'de serotonin antagonisti olarak etki gösterir ve mukozal kan akımını artırır. Kan akımındaki etkiyi norepinefrinin etkisini potansiyelize ederek indirekt olarak gösterir. Düşük dozlarda melatonin intestinal hücre proliferasyonunu azaltırken, yüksek dozlarda artırır (68). Lipit peroksidasyonu esnasında üretilen ve hücre membranında geniş çaplı lipit yıkılmasına öncülük eden peroksi radikalini engellemede vitamin E'den daha etkili olduğu gösterilmiştir (67). İyonize radyasyon ve karsinojen etkili safrole maruz kalan hayvanlarda DNA hasarını büyük ölçüde azaltan melatonin ayrıca bakteriyel endotoksinlerle muhtelif organlarda ortaya çıkan serbest radikallerin hasarını da azaltır (21,67). Fizyolojik melatonin konsantrasyonlarında nitrik oksit sentaz'ı inhibe ederek peroksinitrit ve OH radikallerinin üretimini azaltır. Veya üretilen radikalleri nötralize ederek etkisini azaltır. Melatonin prekürsörleri olan triptofan ve 5-OH triptaminin SOR tutucu

etkileri vardır. Antioksidatif etkinin bir kısmı invivo olarak melatoninin karaciğerde metabolize edilmiş formu 6-hidroksi melatoninini takip edebilir (21,67,68).

3.7.3. E Vitamini

E vitamini biyolojik sistemler için önemli bir antioksidandır. α -tokoferol biyolojik membranların lipid tabakalarında mevcuttur ve önemli bir yapısal rol oynar (95,64). E vitamini terimi yapısal olarak birbiri ile bağlantılı bir grup bileşiği kapsar. Bunlar temelde 2 metil 6 kroman halkası içerirler ve 2.karbona bağlı 16 karbonlu fitil yan zinciri kapsarlar (2,73) (Şekil 3).



Şekil 3. α -tokoferolün yapısı.

D α -tokoferol en geniş doğal dağılımı ve en büyük biyolojik aktiviteyi gösterir. Antioksidan aktivitesi en yüksek olan tokoferol de α -tokoferoldür. α -tokoferol dokularda değişik konsantrasyonlarda bulunur. En yüksek E vitamini konsantrasyonları mitokondri ve mikrozomlar gibi membrandan zengin hücre fraksiyonlarında bulunur (2,43).

Bitkisel yağlar ve tohumlar, E vitamininden zengin kaynaklardır. E vitamini hububatların yağ fraksiyonu, mısır yağı, pamuk yağı, soya yağı, et, hayvansal yağ, karaciğer, balık eti, tavuk eti ve yumurtada bulunur (34,2,43). Diyetle yağda çözünmüş olarak alınır. Yağ sindirimi sırasında açığa çıkar ve emilir. Emilimi için yağ emilimi ve safra asitleri normal olmalıdır (2,43). Önemli bir endojen ve eksojen antioksidan olarak hücrel ve hücrealtı membranların bütünlüğünün korunması α -tokoferolün başlıca fonksiyonlarından biridir (6,43).

Lipid peroksidasyonunu önleyen ve oluştuğunda nötralize eden en güçlü antioksidan faktör E vitamini; vücudun diğer antioksidan sistemleri (C vitamini, glutatyon peroksidaz ve beta karoten gibi) söz konusu olay üzerinde E vitamini kadar etkili değildir (2,43). Bir molekül α - tokoferol 100 molekül PUFA'nın peroksidasyonunu engelleyebilir (2). Lipidde çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle kolayca membran fosfolipidlerine diffüze olabilmekte ve 20 karbonlu doymamış yağ asitlerini indirgeyerek serbest oksijen radikallerinin biyomembranlarda oluşturabileceği lipid peroksidasyonunu önlemektedir (6, 2,77,81).

E vitamini zincir kırıcı bir antioksidan olarak bilinir. Çünkü fonksiyonları lipid peroksi radikallerini ($\text{LOO}^\bullet$) parçalamak ve böylece lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırmaktır (2,77).



Sonuçta oluşan tokoferoksil radikali nisbeten stabildir ve lipid peroksidasyonunu kendi kendine başlatmak için yeterince reaktif değildir (2,25,43,81).

E vitamini radikali parçalanmadan önce askorbik asit ve glutatyon tarafından yeniden indirgenebilmektedir. Glutatyon peroksidaz ile E vitamini serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. Enzim oluşan peroksitleri ortadan kaldırırken, E vitamini peroksitlerin sentezini engeller (34,2). E vitaminini destekleyen glutatyon peroksidaz molekülünde fonksiyonel önemi olan selenyum iyonudur. Selenyum vücutta E vitamininin gereksinimini azaltır (34,43,12).

E vitamininin immun sistem fonksiyonlarını düzenlediği bilinmektedir. Hem humoral hem de hücrel immun sistemi güçlendirir (36,80). E Vitamini, spesifik olarak T helper hücre üretimini stimüle eder (36).

Eritrosit membran stabilitesi için esansiyel olan E vitamininin hemolizi engellediği ve eritrositlerdeki oksidatif hasarı önlediği bilinmektedir (12). Ayrıca iskemi ve reperfüzyon ile ilişkili peroksidatif hasarı engellemede de etkilidir (6,22).

İmmunolojik fonksiyonların bozulduğu ve lökosit membran permeabilitesinin arttığı yanıklı hastalarda, E vitamininin lökosit membran permeabilitesini stabilize ettiği gösterilmiştir. E vitamininin bu etkisi membran lipidlerinde bulunan PUFA'nın oksidasyonunun inhibisyonuna bağlıdır (37).

Bununla beraber E vitamininin insan granülositlerinde NADPH oksidoredüktaz enzim sisteminin selektif bir inhibitörü olarak görev yapabileceği bildirilmiştir. Bu bulgu yoğun E vitamini alımını takiben enfeksiyonların arttığını gösteren çalışmalarla uyumludur (2,64).

Topik veya sistemik olarak verilen E vitamininin yara iyileşme zamanını önemli oranda azalttığı tespit edilmiştir (75,79).

4-GEREÇ VE YÖNTEM

4.A-Gereç

4.A.1- Denek seçimi

Bu deneysel çalışma Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında 1 Kasım- 15 Aralık 2000 tarihleri arasında, 200-250 gr ağırlığındaki erişkin dişi Wistar Albino cinsi 42 rat üzerinde yapıldı. Ratlar 6 gruba bölünerek, deney sonuna kadar yedişerli kafeslerde tutuldu. Hayvanların beslenmesinde standart pellet yemi ve şehir içme suyu kullanıldı. Operasyonda ratlarda sol over iskemisi oluşturmak için estrus fazında, infundibulopelvik ligaman ve ligamentum ovarii proprium seviyesinden olmak üzere 1 no ipek ile bağlandı. Altmış dakikalık iskemiye takiben 60 dakikalık reperfüzyon uygulandı.

4.A.1a.Deneysel grupların oluşturulması:

1.Grup (Sham Grubu, n=7): Batın açıldı. Ooferektomi yapıldı. Over doku ve kan örnekleri alındı.

2.Grup (İskemi Grubu, n=7): Over iskemisi uygulandıktan sonra, reperfüzyon uygulanmayan grup.

3.Grup (İskemi-reperfüzyon Grubu, n=7): Over iskemisi uygulandıktan sonra, reperfüzyon uygulanan grup.

4.Grup (PGE₁ Grubu, n=7): Over iskemisi uygulandıktan sonra reperfüzyondan 15 dk önce 25 µgr/kg dozda PGE₁ verilen grup.

5.Grup (Melatonin Grubu, n=7): over iskemisi uygulandıktan sonra reperfüzyondan 15 dakika önce 20 mgr/kg dozda melatonin verilen grup.

6.Grup (Vitamin E Grubu, n=7): Over iskemisi uygulandıktan sonra reperfüzyondan 15 dk önce 500 mgr/kg vitamin E verilen grup.

4.A.2- Operasyonun Yapılışı:

Ratlara operasyondan 18 saat öncesinden itibaren sadece su içmelerine izin verildi. Vajinal smear takiplerinde estrus fazında olduğu saptanan ratlara genel anestezi oluşturmak amacı ile, herbiri 0.25 ml/100 gr vücut ağırlığı dozunda olmak üzere, 50 mgr/ml konsantrasyonunda Ketamin HCl (Ketalar flk, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ve 20 mgr/ml konsantrasyonunda Xylazine HCl (Rompun flk, Bayer, İstanbul, Türkiye) ratların sağ arka bacaklarından intramüsküler olarak uygulandı. Operasyondan yaklaşık 2 dakika kadar önce karın traşı yapılan hayvanlarda operasyon sahası %10 Povidon İdine ile temizlendi. Yalnızca insizyon uygulanacak saha açık kalacak şekilde steril olarak örtüldü. Steril aletler kullanılarak orta hat karın insizyonu ile laparotomi yapıldı. Sol over, infundibulopelvik ligaman ve ligamentum ovarii proprium seviyesinden 1 no ipek ile bağlanarak 60 dk. iskemi edildi. Altmış dakika iskemiye takiben 60 dakika reperfüzyon uygulandı. Sham grubunda sadece batına girilerek over doku ve kan örnekleri alındı. Grup 2'ye over iskemisi uygulandıktan sonra reperfüzyon ve tedavi uygulaması yapılmadı. Grup 3'de 60 dk.lık over iskemisini takiben 60 dk. reperfüzyon uygulandı ve herhangi bir tedavi verilmedi. Grup 4'de over iskemisi uygulandıktan sonra reperfüzyondan 15 dk önce 25 µgr/kg dozda PGE₁ (prostavasin 20 µgr/ml, Schwarz-Pharma Mainheim, Almanya) intramusküler olarak verildi. Grup 5'de over iskemisi uygulandıktan sonra reperfüzyondan 15 dakika önce 20 mgr/kg dozda melatonin (N-asetil 5-Metoksitriptamine, 1 gr flc, Sigma Chemical Co St. Louis USA) intramüsküler olarak uygulandı. Grup 6'da over iskemisi uygulandıktan sonra reperfüzyondan 15 dk önce 500 mgr/kg vitamin E (Evigen Ampul, Aksu ilaç, İstanbul, Türkiye) intramusküler olarak verildi.

4.A.3- Örneklerin Alınması:

Histopatolojik inceleme ve doku MDA ölçümü için over örnekleri alındı. Sol over dokusunun %50'si %10'luk formaldehit içinde tespit edilerek histopatolojik inceleme için patoloji laboratuvarına gönderildi. Over dokusunun kalan kısmı, doku MDA tayini için alüminyum folyo kağıda sarılarak çalışma yapılınca kadar -20 °C'de derin dondurucuda saklandı.

Biyokimyasal olarak, Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), malonildialdehid (MDA) ve Eritrosit süperoksit dismutaz (SOD) ölçümü için kan örnekleri alındı. Kan örnekleri reperfüzyonu takiben vena cava inferiordan alındı. Elde edilen kan, plazma ve hemolizat hazırlanması için hemoliz olmadan EDTA'lı vakumlu tüplere aktarıldı. Hemolizat hazırlanması her parametrenin çalışılmasında ayrıcalık ifade ettiğinden her parametrenin yöntem kısmında bahsedildi.

4.B-ÖRNEKLERİN BİYOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ

4.B.1- Plazma Lipid Peroksit (LPO) Ölçümü:

Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malonildialdehid (MDA) tayini Satoh (72) ve Yagi'den (92) modifiye edilen bir yöntemle spektrofotometrik olarak Shimadzu UV-1201 spektrofotometresi kullanılarak yapıldı.

Prensip: Plazmada bulunan lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA, aerobik şartlarda, pH:3.4 olduğu bir ortamda tiyobarbitirik asit (TBA) ile 95 °C de inkübasyonu sonucu pembe renkli kompleks oluşturur. Bu pembe rengin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü ile MDA miktarı saptanır.

Ayırıcılar:

1-N/12 sülfürik asit

2-%10 fosfotungustik asit(PTA)

3-Tiyobarbutirik asit (TBA) ayracı: Eşit hacim %0.67 TBA ile glasiyel asetik asit karıştırılır.

4-n-Bütanol

5-Standart (1,1,3,3 tetrametoksipropan)

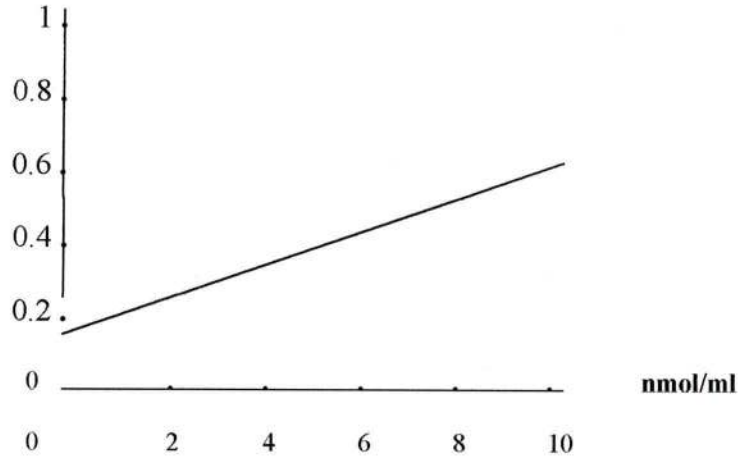
Standart Eğri Çizimi:

Stok standarttan 10 µl alınıp 100 ml'ye tamamlanarak konsantrasyonu 40 mmol/L olan günlük stok standart hazırlandı. Bu stok standarttan belirli oranlarda sulandırmalar yapılarak 2,4,8,10,20 nmol/ml konsantrasyonlarında çalışma standartları hazırlandı. Ayıraçlar tüplere şu şekilde ilave edildi.

	Negatif Kontrol	Std (1)	Std (2)	Std (3)	Std (4)	Std (5)
Distile su(ml)	4	3	3	3	3	3
TBA ayracı(ml)	1	1	1	1	1	1
Standart (ml)	--	1	1	1	1	1
		(2nmol/ml)	(4nmol/ml)	(8nmol/ml)	(10nmol/ml)	(20nmol/ml)

Tüpler iyice karıştırıldı ve cam bilye konularak 90 °C'de 60 dk kaynar su banyosunda kaynatıldıktan sonra soğutuldu ve her tüpe 3ml n-bütanol eklendi. Vorteks edilen tüpler 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Bütün standartların n-bütanol fazı 532 nm'de köre karşı okundu. Belirli oranlarda hazırlanan bu standartlardan eğri çizimi yapıldı ve daha sonra çalışılan tüm örnekler için bu eğri kullanılarak değerlendirmeler yapıldı.

Absorbans



Örnek çalışması için ayraçlar aşağıda tabloda gösterildiği şekilde tüplere konuldu.

	Negatif Kontrol	Standart	Örnek
Plazma (ml)	---	---	0.3
N/12 H ₂ SO ₄ (ml)	---	---	4
%10 PTA (ml)	---	---	0.5

Örnekler iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dk bekletildikten sonra 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, altta kalan presipitat alındı ve üzerine 3 ml distile su konularak vortekslendi. Tekrar 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve yine presipitat alındı.

Distile su (ml)	4	3	4
TBA ayracı (ml)	1	1	1
Standart (ml)	---	1	---

Tüpler vortekslendi ve üzerine cam bilye konularak 90 °C'de 60 dk kaynatıldı. Soğuk su altında soğutulan tüplerin üzerine 3 ml n-bütanol eklendi ve karıştırıldı. Tüpler 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra üstteki organik faz alınarak 532 nm'de negatif kontrollere karşı absorbansları okundu.

Hesaplama: 532 nm'de okunan örnek absorbansları standart eğriden değerlendirildiği gibi, günlük çalışılan belirli konsantrasyondaki standartla oranlanarak aşağıdaki formül yardımıyla değerlendirildi.

Örnek O.D

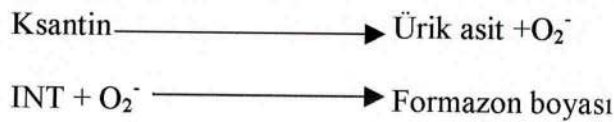
$$\text{MDA (nmol/ml)} = \frac{\text{Örnek O.D}}{\text{Std. O.D}} \times \text{Std. Konsantrasyonu}$$

4.B.2- Eritrosit Süperoksit Dismutaz (SOD) Tayini:

Eritrosit SOD enzim aktivitesi, Randox firmasının enzimatik metotla çalışan RANSOD adlı ticari kiti kullanılarak ölçüldü (65).

Prensip: SOD, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin (O_2^-) hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırır. Bu yöntem, ksantin ve ksantin oksidaz kullanılarak oluşturulan süperoksit radikallerinin, 2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenol]-5-feniltetrazoliyum klorid (p-iyodonitrotetrazoliyum viyole:INT) ile meydana getirdiği kırmızı renkli formozan boyasının 505 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin okunması esasına dayanır. Örnekte bulunan SOD, süperoksidi ortamdan uzaklaştırarak formazon reaksiyonunu inhibe eder. Sonuçta kırmızı renkteki azalmanın belirlenmesiyle SOD aktivitesi ölçülür. Kırmızı rengin şiddeti SOD aktivitesinin büyüklüğü ile ters orantılıdır.

Ksantin oksidaz



Veya, SOD



Ayır  lar:

1-CAPS (3-(sikloheksilamino)-1-propan sülfonik asit) tamponu

CAPS (50 mmol/L), EDTA (0.94 mmol/L). PH, NaOH ile 10.2'ye ayarlanır ve buzdolabında saklanır.

2-Stok Standart Karışımı

Ksantin (0.05 mmol/L), INT (0.025 mmol/L). CAPS tamponu ile hazırlanır.

Bu   zelti buzdolabında saklanmalıdır.

3-Ksantin oksidaz (80   /L)

4-0.01 M Fosfat Tamponu (pH:7.0)

5-Standart (S6)

Her kitin i inden farklı derişimlerde hazır standart SOD (S6)   zeltisi bulunur. Bu liyofilize ayır   10 ml distile su ile sulandırıldı ve SOD derişimleri fosfat tamponuyla aşığıdaki tabloda verildiğı şekilde hazırlanarak standart eğri çizimi için kullanıldı.

N ₀	Kullanılacak standart	0.01 M fosfat tamponu	SOD derişimi (��/ml)
S5	S6 5ml	5 ml	2.8
S4	S5 5ml	5 ml	1.4
S3	S4 5ml	5 ml	0.7
S2	S3 3ml	6 ml	0.23

S1  alıřma negatif kontrolü olup sadece fosfat tamponu konuldu.

Yöntem:

Aşağıdaki tabloda olduğu gibi deney düzeneği kuruldu ve deney yapıldı.

Çözeltiler	Negatif Kontrol	Standart
Standart (ml)	---	0.05
Fosfat tamponu (ml)	0.05	--
Substrat karışımı (ml)	1.7	1.7

İyice karıştırıldı ve ksantin oksidaz eklendi.

Ksantin oksidaz (ml)	0.25	0.25
----------------------	------	------

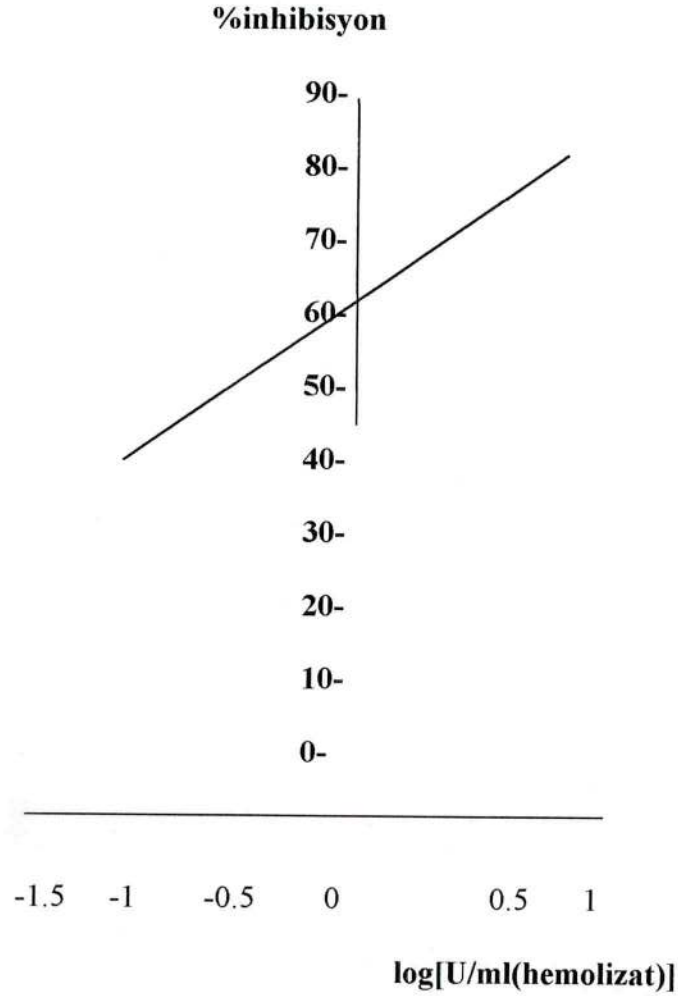
Ksantin oksidaz eklendikten sonra alt üst edildi ve 30 sn sonra 505 nm dalga boyunda havaya karşı ilk okuma yapıldı (A1). 3 dk sonra ikinci absorbans alındı (A2).

Hesaplama:

Çalışma negatif kontrolü SOD içermediği için inhibisyona uğramamış reaksiyon olarak kabul edildi ve değeri %100 olarak alındı. Tüm standartlar için %5 inhibisyon değeri, bunlara ait değerlerin çalışma negatif kontrolü ile oranlanarak 100'den çıkarılması sonucu hesaplandı.

$$\Delta A / \text{dak}_{\text{standart}} = \frac{A_2 - A_1}{3 \text{ dak}}$$
$$\% \text{inhibisyon}_{\text{standart}} = 100 - \frac{\Delta A / \text{dak}_{\text{standart}} \times 100}{\Delta A / \text{dak}_{\text{çalışma körü}}}$$

Hesaplama yapıldıktan sonra X (yatay) eksenine SOD derişimlerinin (Ü/ml) logaritmik dönüşüm değerleri, Y (dikey) eksenine standartlara ait % inhibisyon değerleri yazılarak standart eğri elde edilir.



Örnek çalışması:

Eritrosit hemolizat hazırlama işlemi şöyle gerçekleştirildi; 0.5 ml EDTA'lı kan 3000 rpm'de santrifüj edilerek üstteki plazma kısmı atıldı. Kalan eritrositler 3 ml %0.9'luk NaCl ile 4 kez yıkandı. Her yıkamadan sonra eritrosit süspansiyonu 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Yıkanmış eritrositler soğuk distile su ile 2 ml'ye tamamlandıktan sonra alt üst edilerek +4 °C'de 15 dk bekletildi. Oluşan lizat fosfat tamponuyla yüzde inhibisyonu %30-60 arasına düşürülecek şekilde seyreltildi.

Yöntem:

Ayraçlar, tüplere aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi konuldu.

Çözeltiler	Negatif Kontrol	Standart	Hemolizat
Numune (ml)	--	--	0.05
Standart (ml)	--	0.05	--
Fosfat tamponu(ml)	0.05	--	--
Substrat karışımı	1.7	1.7	1.7

İyice karıştırılır.

Ksantin oksidaz (ml)	0.25	0.25	0.25
----------------------	------	------	------

Tekrar karıştırıldıktan 30 sn sonra 505 nm dalga boyunda havaya karşı başlangıç absorbans (A_1) 0. dakikada okundu. 3 dakika sonra son absorbans (A_2) okundu.

Hesaplama:

Çalışma negatif kontrolü SOD içermediği için inhibisyona uğramamış reaksiyon olarak kabul edildi ve değeri %100 olarak alındı. Tüm standartlar için % inhibisyon değeri bunlara ait değerlerin çalışma negatif kontrolü ile oranlanarak 100'den çıkarılması sonucu hesaplandı.

$$\Delta A/dak_{\text{örnek}} = \frac{A_2 - A_1}{3 \text{ dak}}$$
$$\%inhibisyon_{\text{örnek}} = 100 - \frac{\Delta A/dak_{\text{örnek}} \times 100}{\Delta A/dak_{\text{negatif kontrol}}}$$

Örneğe ait hesaplanan %inhibisyon değerine karşılık gelen SOD değeri standart eğri kullanılarak bulundu. Seyreltme faktörü kullanılarak aktivite bulundu. Bulunan SOD ünitesi Drabkin yöntemiyle elde edilen Hb değerine bölünerek Ü/g. Hb cinsinden aktivite bulundu.

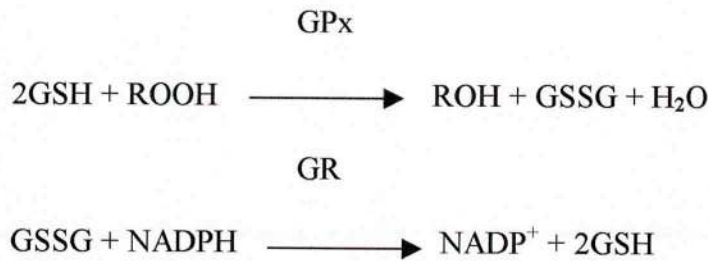
$$\text{SOD aktivitesi (Ü/ml)} \\ \text{SOD aktivitesi(Ü/g.Hb)} = \frac{\text{SOD aktivitesi (Ü/ml)}}{\text{Hemolizat Hb (g/ml)}}$$

4.B.3- Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivitesi:

Eritrosit GSH-Px aktiviteleri, Randox Laboratories Ltd. United Kingdom ticari firmasının enzimatik-UV metotla çalışan RANSEL adlı ticari kiti (Katalog No: RS 504) ile Olympus AU-600 otoanalizöründe ölçüldü. Bu kit Paglia ve Valentine metodu (60) esas alınarak hazırlanmıştır.

Prensip:

GSH-Px, kümen hidroperoksit (ROOH) varlığında redükte glutatyonun (GSH) okside glutatyon (GSSG) yükseltgenmesini katalize eder. Oluşan GSSG, glutatyon redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH'ı indirgenir. GPx aktivitesi, NADPH'ın NADP'e yükseltgenmesi ile oluşan absorbans farkının 340 nm'e okunması ile ölçülür.



Örneğin Hazırlanması:

Taze heparinize tam kanın 0.05 ml'si kit içerisindeki 1 ml dilüsyon ajanı ile dilüe edilip 5 dakika inkübasyona alınır. Daha sonra 1ml çift güçlü drabkin reaktifi eklenir ve iyice karıştırılır. Su negatif kontrolü ölçümünü müteakiben 20 dakika içerisinde örnek ölçümleri yapılır. Örnek absorbanslarından negatif kontrolün absorbansları çıkarılarak GPx düzeyleri Ü/L cinsinden hesaplanır daha sonra Drabkin metoduyla ölçtüğümüz hemoglobin değerine bölünerek Ü/gr Hb cinsinden tanımlanır.

4.B.4- Hemoglobin Tayini:

Hemoglobin miktarı Drabkin yöntemiyle ölçüldü. Bu yöntemle ferrisiyanür hemoglobindeki demiri oksitleyerek iki değerlikli demiri üç değerlikli demire çevirerek methemoglobine dönüşmesini sağlar. Bunu takiben potasyum siyanid ile kararlı bir pigment olan siyanmethemoglobin meydana gelir. Siyanmethemoglobinin absorbansı spektrofotometrik olarak 546 nm'de okunur.(26)

Ayırıcılar:

1- Drabkin çözeltisi: 50 mg KCN

200 mg $K_3Fe(CN)_6$

1 g $NaHCO_3$

distile su ile bir litreye tamamlanan çözelti renkli çözeltide ve oda sıcaklığında bir yıl süre ile saklanabilir.

2- Hemoglobin standartı: 18 g/dl

İşlem:

	NEGATİF KONTROL	STANDART	ÖRNEK
Drabkin çözeltisi(ml)	5.0	5.0	5.0
Hemoglobin standartı(ml)	----	0.02	----
Hemolizat(ml)	----	----	0.02
Distile su(ml)	0.02	----	----

Tüpler iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 20 dk bekletildikten sonra 546 nm de negatif kontrole karşı absorbanları okundu.

Hesaplama:

Örnek absorbanı

Hemoglobin(g/dl): _____ x Standart konsantrasyonu

Standart absorbanı

4.B.5- Doku MDA Düzeyleri:

Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malonildialdehid (MDA) tayini Ohkawa (59) tarafından belirlenen yöntemle spektrofotometrik olarak yapıldı.

Prensip: Dokuda da lipid peroksidasyonunun ölçümü; pH:3.5 ve aerobik şartlar altında, tiyobarbitürik asit (TBA) ile doku homojenatının kaynar su banyosunda 1 saat inkübasyonu sonucu lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA ile TBA'nın oluşturduğu pembe renkli kompleksin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü prensibine dayanır.

Homojenat hazırlanması: Kobaydan alınan over örneği soğuk %0.9'luk NaCl ile yıkandıktan sonra hemen ölçümü yapılmayacak ise -20 °C'de derin dondurucuda saklanabilir. Serum fizyolojik ile yıkama işleminden sonra ıslaklığı iyice alınan dokunun tartımı yapıldı. Her gram başına 9 ml %1.15'lik KCl olacak şekilde cam-cam homojenizatörde homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi.

Ayır  lar:

- 1- %8.1'lik Sodyum Dodesil Sıfat (SDS)
- 2- %20'lik Asetik Asit
- 3- %0.8 Tiyobarbitürik asit (TBA)
- 4- n-Bütanol/Piridin (15:1, v/v)
- 5- Stok standart (1,1,3,3 tetra metoksipropan)

(Stok standarttan günlük standart dil  e edilerek hazırlanabildiği gibi, değişik derişimlerde hazırlanan standart çalışması yapılarak eğri çizilir ve sonuçlar eğriden hesaplanır.)

Yöntem:

	Negatif Kontrol (ml)	Std (ml)	��rnek (ml)
Standart (Kons:4.4 nmol/ml)	----	0.2	----
Homojenat	----	----	0.2
SDS	0.2	0.2	0.2
Asetik asit	1.5	1.5	1.5
TBA	1.5	1.5	1.5
Saf su	0.8	0.6	0.6

95   C'de 1 saat inkübe edildikten sonra soğuk su altında soğutuldu. Tüplere;

Saf su	1.0	1.0	1.0
n-Bütanol/Piridin	5.0	5.0	5.0

eklenerek iyice karıştırıldı. Daha sonra 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edildikten sonra üstteki organik faz alınarak 532 nm’de köre karşı standart ve örnek absorbanları ölçüldü.

Hesaplama:

$$\text{MDA (nmol/gr.yaş doku)} = \frac{\text{Örnek O.D.}}{\text{Std. O.D.}} \times \text{Std. Konsantrasyonu}$$

4.B.7- Histopatolojik inceleme:

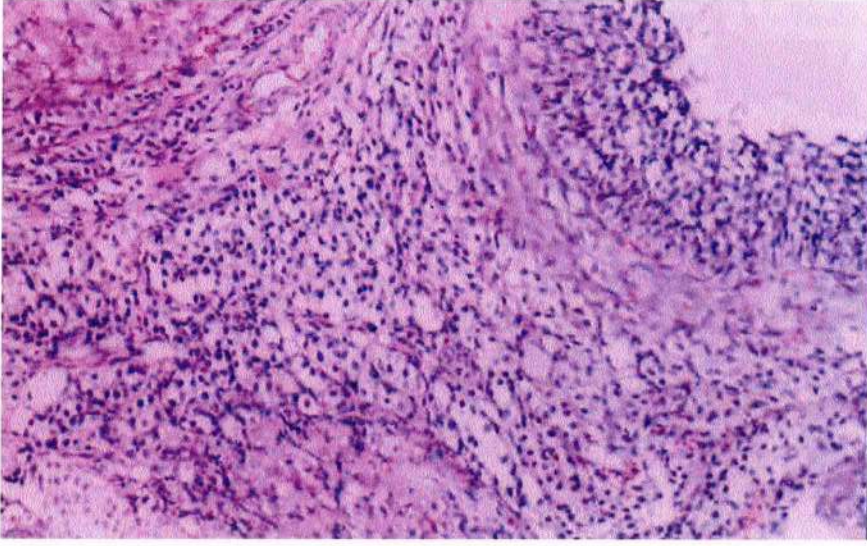
Tüm gruplardan alınan sol overin %50’si %10’luk formaldehit içinde tesbit edilerek rutin takip işlemlerinden geçirildi. Parafin bloklara gömülen dokulardan 4µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler deparafinize edilerek Hematoksilen-Eozin (H-E) ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirildi.

Işık mikroskop altında patolog tarafından over dokusundaki konjesyon, hemoraji, oosit hasarı, stromada polimorfonükler lökosit varlığı, ödem, granüloza ve teka hücre değişiklikleri, folikül içinde materyal birikimi, dokuda pigment varlığı açısından oluşturduğumuz histolojik grade skalasına göre (yok=0p, var=1p, çok var=2p) değerlendirildi . Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi.

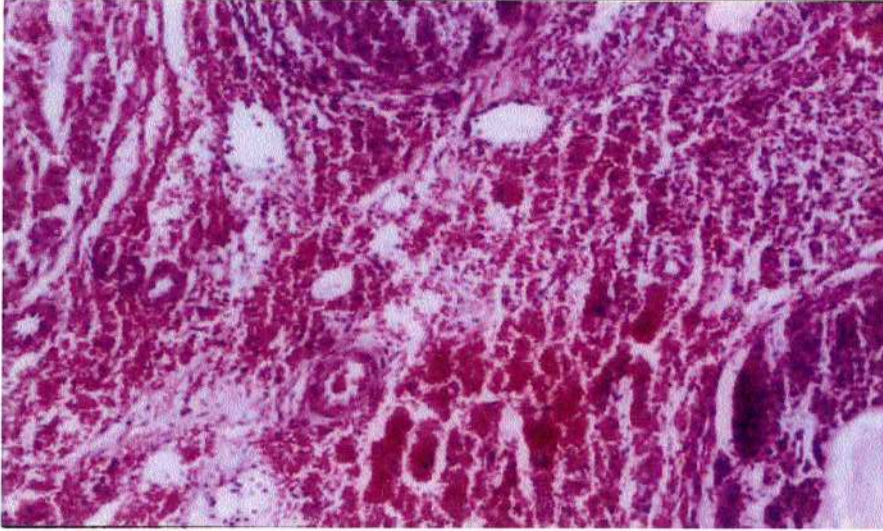
4.B.8- İstatistik Analizler:

Deneysel çalışmalar sonucu bulunan verilere grup sayısı 6, birbirinden bağımsız ve $n < 30$ olduğu için Kruskal wallis varyans analizi yapıldı. $p < 0.05$ bulunması üzerine Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi yapıldı. $p < 0.02$ anlamlı kabul edildi. Doku histopatolojisi ile diğer parametreler arasında Spearman bağıntı analizi yapıldı (r, p, n).

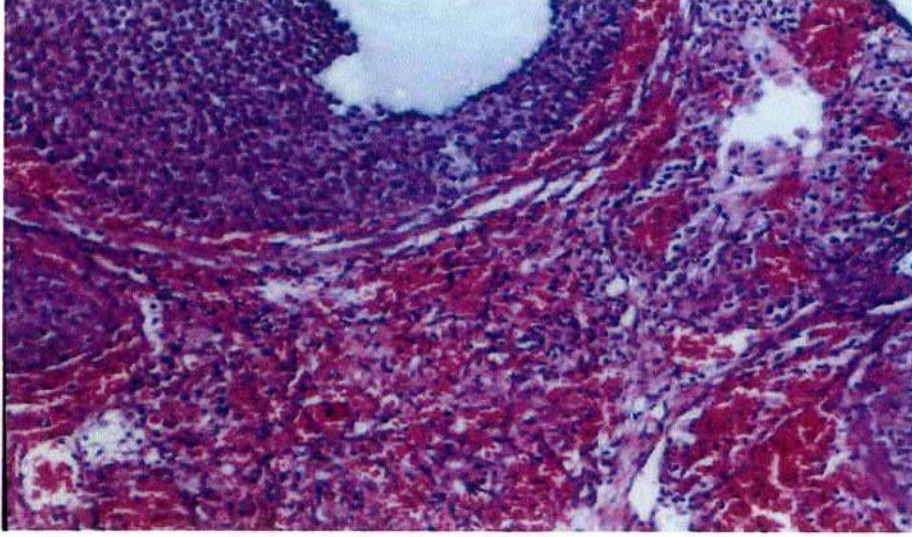
Verilerin istatistiksel analizi ve grafik çizimi için SPSS 9.0 for windows paket programı kullanıldı (1).



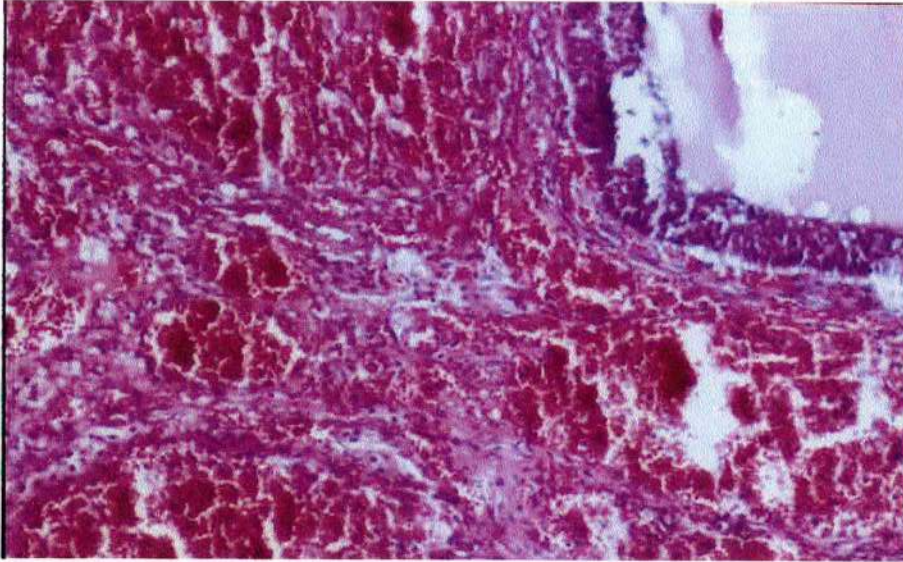
Resim 1(Sham grubu): Sağ üst köşede folikül yapısı izlenen overde normal histolojik görünüm (H.Ex200).



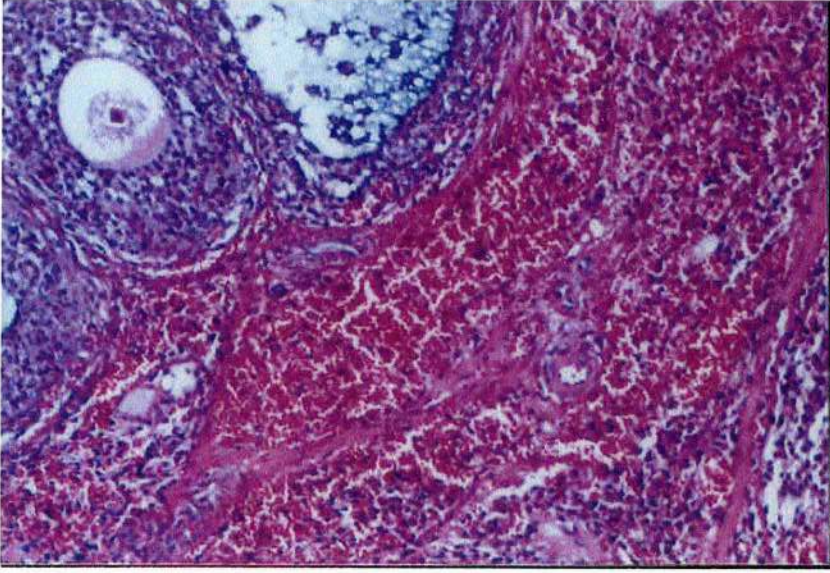
Resim 2 (İskemi grubu) : Yaygın konjesyon ve kanama alanları izlenen over dokusunda stromal ve foliküler hücrelerde yer yer iskemik değişiklikler izlenmekte (H.Ex100).



Resim 3 (Melatonin grubu) : Over dokusundaki konjesyon ve kanama daha hafif şiddette; stromal ve foliküler hücreler sağlam görünümündedir (H.Ex100).



Resim 4 (Prostaglandin E₁) : Aşırı konjesyon ve kanama alanları içeren over dokusunda stromada iskemik değişiklikler izlenmeyip damarlanmada artış mevcut (H.Ex100).



Resim 5 (Vitamin E grubu) : Stromada belirgin konjesyon, kanama ve damarlanmada artış mevcut. Folikül yapılarının korunduğu izlenmektedir (H.Ex100).

5.B. Plazma MDA düzeyleri (nmol/ml):

Tablo II’de plazma MDA düzeylerinin tüm gruplar arasındaki karşılaştırmaları gösterildi. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak belirtildi.

Tablo II: Tüm grupların plazma MDA düzeylerine ait sonuçlar.

Parametre	G1	G2	G3	G4	G5	G6	P
MDA(nmol/L)	1.7 $\pm$ 0.4 ³	2.6 $\pm$ 0.4 ⁴	3.5 $\pm$ 0.5 ⁵	1.2 $\pm$ 0.01 ²	0.7 $\pm$ 0.2 ¹	1.5 $\pm$ 0.2 ²	*

*= $p < 0.05$, Kruskal Wallis Varyans Analizi.

Not: Aynı satırdaki farklı rakamlar, ikili karşılaştırmalarda ortalamalar arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir ($p < 0.02$, Mann Whitney U Testi). Rakamlandırmada ortalamalar küçükten büyüğe doğru sıralandı.

Tabloda görüldüğü gibi plazma MDA düzeyleri G3’ de en fazla G5’de en az bulundu. Tüm antioksidanlar plazma MDA düzeyi üzerine olumlu etki yapmaktadır.

5.C. Eritrosit GSH-Px düzeyleri (IU/gHb):

Tablo III’de eritrosit GSH-Px düzeylerinin tüm gruplar arasındaki karşılaştırmaları gösterildi

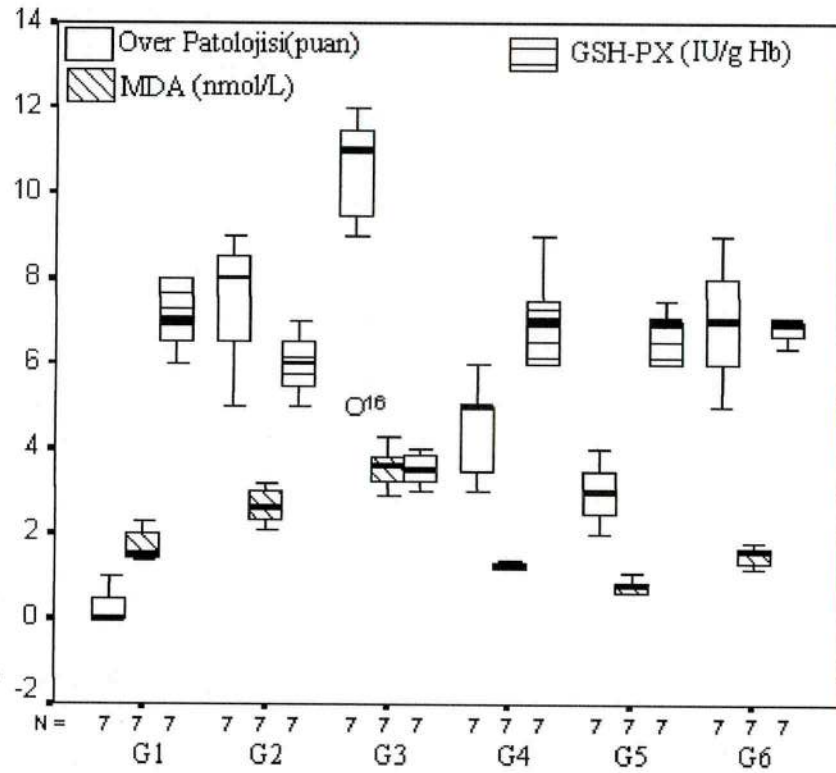
Tablo III: Tüm grupların eritrosit GSH-PX düzeylerine ait sonuçlar. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak belirtildi.

Parametre	G1	G2	G3	G4	G5	G6	P
GSH-Px(IU/g Hb)	7 $\pm$ 0.9 ²	6 $\pm$ 0.8 ²	3.5 $\pm$ 0.4 ¹	7 $\pm$ 1 ²	6.6 $\pm$ 0.6 ²	6.8 $\pm$ 0.3 ²	*

*= $p < 0.05$, Kruskal Wallis Varyans Analizi.

Not: Aynı satırdaki farklı rakamlar, ikili karşılaştırmalarda ortalamalar arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir ($p < 0.02$, Mann Whitney U Testi). Rakamlandırmada ortalamalar küçükten büyüğe doğru sıralandı.

GSH-Px değeri en çok G3’de düşerken, antioksidan kullanılanlarda en fazla PGE1’de artmış bulundu. Ancak diğer antioksidanlarla aralarında istatistiksel anlamlı farklılık saptanamadı ($p>0.02$, Mann Whitney U Testi).



Şekil 1. Over patolojisi, plazma MDA ve eritrosit GSH-Px değerlerine ait saplı kutu grafiği.

5.D.Eritrosit SOD düzeyleri (IU/gHb):

Tablo IV’de eritrosit SOD düzeylerinin tüm gruplar arasındaki karşılaştırmaları gösterildi.

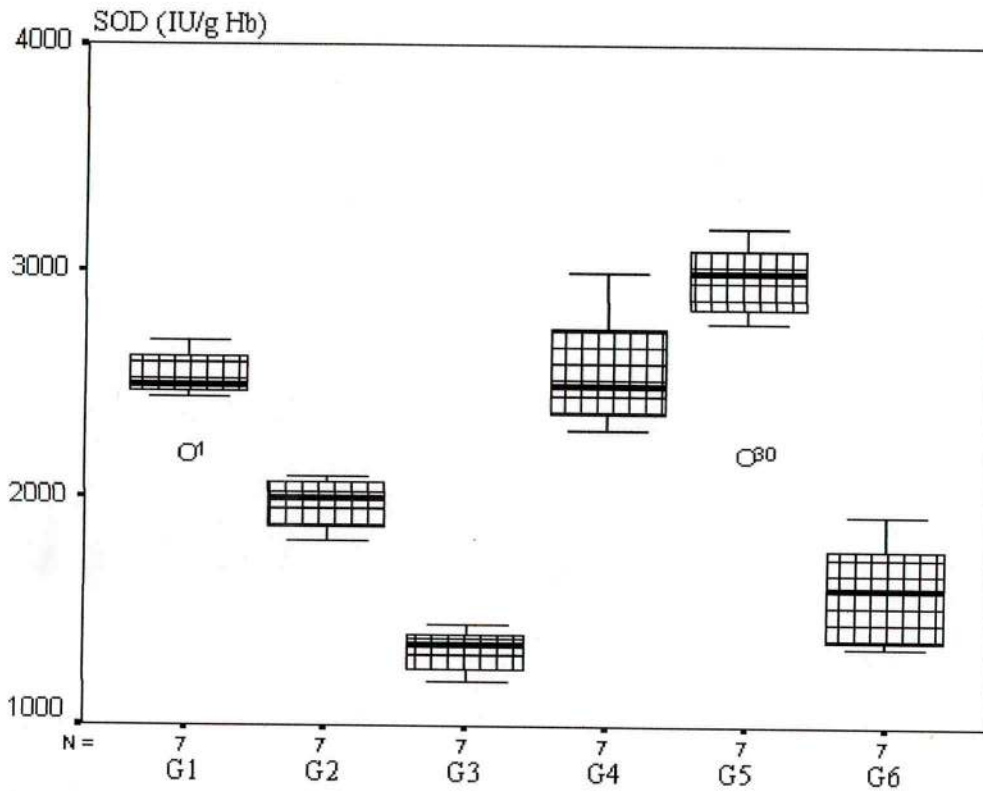
Tablo IV:Tüm grupların eritrosit SOD düzeylerine ait sonuçlar. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak belirtildi.

Parametre	G1	G2	G3	G4	G5	G6	P
SOD (IU/g Hb)	2514 $\pm$ 165 ³	1972 $\pm$ 119 ²	1328 $\pm$ 99 ¹	2578 $\pm$ 264 ³	2879 $\pm$ 338 ³	1597 $\pm$ 240 ¹	*

*= $p<0.05$, Kruskal Wallis Varyans Analizi.

Not: Aynı satırdaki farklı rakamlar, ikili karşılaştırmalarda ortalamalar arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir ($p < 0.02$, Mann Whitney U Testi). Rakamlandırmada ortalamalar küçükten büyüğe doğru sıralandı.

SOD değeri en çok G3'de düşerken, antioksidan kullanılanlarda en fazla melatonin'de artmış bulundu. Ancak PGE1 ile aralarında istatistiksel anlamlı farklılık saptanamadı ($p > 0.02$, Mann Whitney U Testi). Vit E ise etkisiz bulundu ($p > 0.02$,



Mann Whitney U Testi).

Şekil 2: Eritrosit SOD düzeylerine ait saplı kutu grafiği.

5.E. Doku MDA düzeyleri (nmol/l):

Tablo V'de doku MDA düzeylerinin tüm gruplar arasındaki karşılaştırmaları gösterildi.

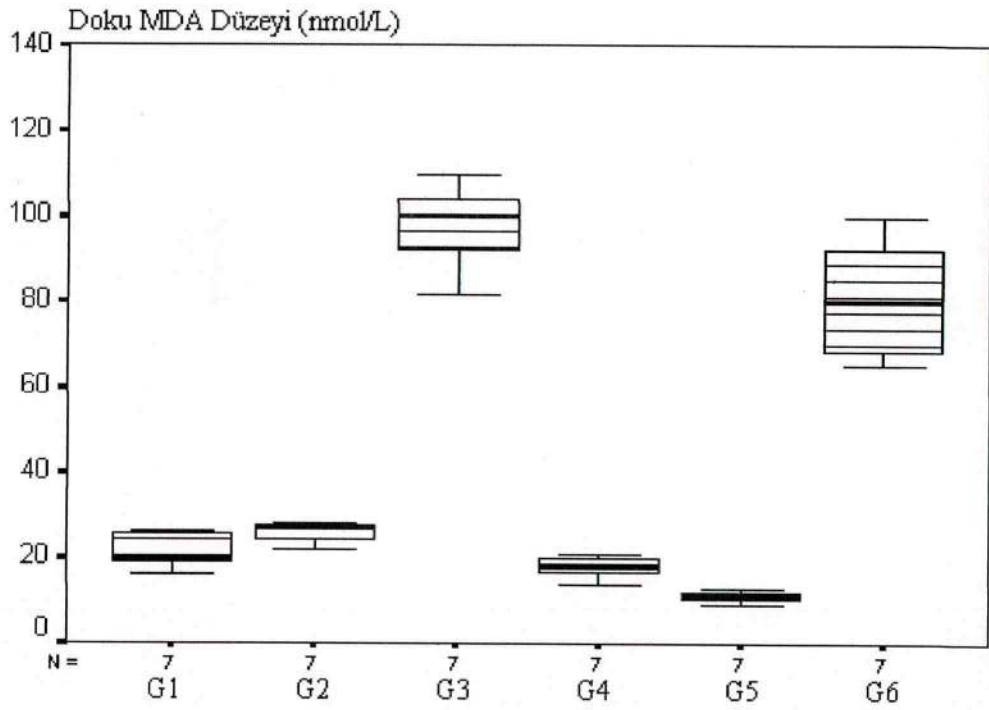
Tablo V: Tüm grupların doku MDA düzeylerine ait sonuçlar. Değerler ortalama $\pm$ SD olarak belirtildi.

Parametre	G1	G2	G3	G4	G5	G6	P
Doku MDA(nmol/L)	21.5±4 ²	25.8±2.2 ²	98±9 ³	18±2.6 ²	11±1.3 ¹	86.7±26 ³	*

*=p<0.05, Kruskall Wallis Varyans Analizi.

Not: Aynı satırdaki farklı rakamlar, ikili karşılaştırmalarda ortalamalar arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir (p<0.02, Mann Whitney U Testi). Rakamlandırmada ortalamalar küçükten büyüğe doğru sıralandı.

Doku MDA değeri en çok G3'de artarken, antioksidan kullanılanlarda en fazla melatonin'de azalmış bulundu. Daha sonra PGE1 ile aralarında istatistiksel anlamlı farklılık saptandı (p<0.02, Mann Whitney U Testi). Vit E ise etkisiz bulundu (p>0.02, Mann Whitney U Testi).

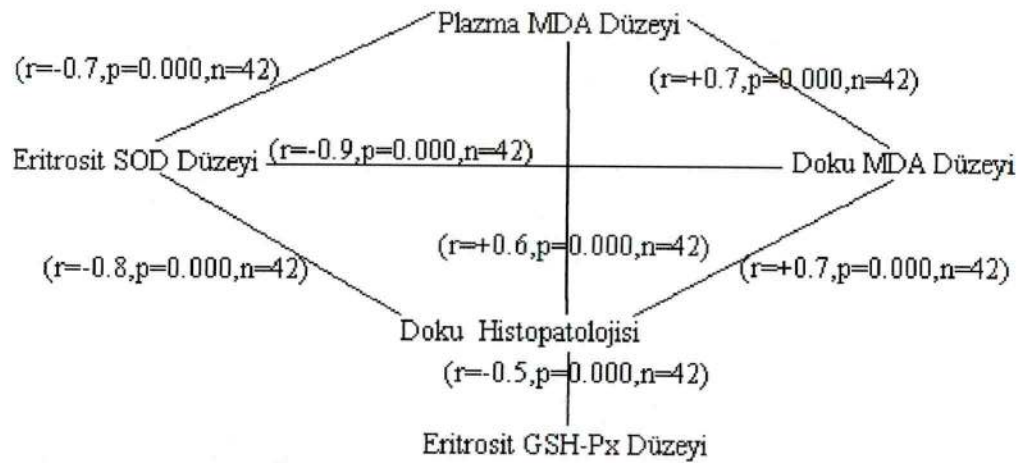


Şekil 3: Doku MDA düzeylerine ait saplı kutu grafiği.

5.F: Doku histopatolojisi ile diğer parametreler arasındaki Spearman

Bağıntı analizi.

Sperman bağıntı analizinde over histopatolojisi ile Süperoksit dismutaz arasında (-) bağıntı ($r=-0.8$, $p=0.000$, $n=42$), doku/plazma Malondialdehit düzeyi arasında (+) bağıntı ($r=+0.7/+0.6$, $p=0.000$, $n=42$), glutatyon peroksidaz arasında (-) bağıntı ($r=-0.5$, $p=0.000$, $n=42$) saptandı. Şekil 4’de gösterildi.



Şekil 4: Doku histopatolojisi ile diğer parametreler arasındaki Spearman bağıntı analizi.

6. TARTIŞMA:

Yaptığımız deneysel çalışmada, iskeminin over dokusunun rengi, histopatolojisi, doku MDA ve kan GSH-Px, SOD ve MDA üzerine olumsuz etkisi saptandı. Ayrıca reperfüzyon uygulanan grupta bu olumsuz etkinin daha da arttığı tespit edildi.

İskeminin 45. dakikasında kullandığımız antioksidanlar içinde en etkilisi sırayla melatonin ve PGE1 grubu olarak tespit edildi. Vit E grubunda ise plazma MDA ve eritrosit GSH-Px düzeylerine olumlu etki saptanırken, over histopatolojisi, kan SOD ve doku MDA düzeyleri üzerine etkisiz olduğu saptandı.

Deneyimizde iskemi grubu oluşturarak, reperfüzyon hasarının, overlerde de iskemik hasar üzerine olan artırıcı etkisini gözledik.

İskemi veya İ-R hasarına uğrayan over dokusunda renk değişikliği ortaya çıkar. Siyah-mavi bir görünüm alır. Özellikle adneksiyal torsiyon olgularında over rengine bakarak, salpingooferektomi önerenler olmuştur (58). Taşkın ve ark. makroskopik görünümün iskemi ve nekrozun doğru bir indikatörü olmadığını belirtmiştir (82). Bulgularımız Taşkın ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın sonuçları ile uyumluk göstermektedir. Çünkü G2-G6'daki overlerin makroskopik görünümü benzer olmasına rağmen, mikroskopik incelemeler, doku ve plazma MDA düzeyleri, eritrosit GSH-Px ve SOD düzeyleri arasında çok büyük farklılıklar saptandı. Sonuçta iskemik dokunun makroskopik görünümünün iskemi ve nekrozun doğru bir endikatörü olmadığı kanaatindeyiz.

İskemi veya İ-R hasarında over histopatolojisi olumsuz yönde etkilenir (82). (Resim1,2) Antioksidan kullandığımız olgularda özellikle melatonin ve PGE1'in bu olumsuz etkiyi azalttığı bulundu (Resim3,4,5). Vit E grubunda ise iskemi grubuna benzer histopatolojik bulgular elde edilmeside bir kazanç olabilir. Over dokusunda

artan SOR'leri follikül kaybına neden olur (57). Gerçektende doku MDA düzeyi en az artan melatonin ve PGE1 grubunda over histopatolojisi en sağlıklı durumda tespit edildi.

İskemi veya İ-R hasarında doku ve plazma MDA düzeyleri artar (57, 74, 78). MDA lipid peroksidasyonunun son ürünü olup belirgin derecede MDA üretimi, reperfüzyon sırasında olmaktadır. MDA seviyelerindeki artış, peroksidasyona uğrayan membranların çokluğunu veya hasara uğrayan hücrelerin yaygınlığını gösterir (2). Doku ve plazma MDA düzeyleri üzerine en etkili ilaç sırasıyla melatonin ve PGE1'dir.

Sugino yaptığı çalışmada 15 günlük gebe ratlarda 30 dk iskemi uygulamış takiben 90 dk reperfüzyon uygulamış, progesteron düzeylerinin azaldığını ve lipid peroksitlerinin arttığını saptamıştır. Sham grubunda, doku MDA düzeyleri 147.4 ± 7.8 iken, İ-R'da 274.3 ± 19.7 bulmuşlardır ($p < 0.01$). Çalışmamızda, tüm gruplarda elde ettiğimiz doku MDA düzeyleri, sham grubunda 21.5 ± 4 , iskemi grubunda 25.8 ± 2.2 , iskemi reperfüzyon grubunda 98 ± 9 , prostoglandin E1 verilen grupta 18 ± 2.6 , melatonin verilen grupta 11 ± 1.3 Vitamin E verilen grupta 86.7 ± 26 bulunmuştur. . Bu sonuçlara göre, MDA düzeylerigrup 3 de grup 1 ile ve grup 2 ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yükselmiştir. Bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur($p < 0.02$). Grup 3 ile grup 4 karşılaştırıldığında istatistiksel oarak anlamlı bir azalma tesbit edildi($p < 0.02$). Grup 3 ile grup 5 karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi($p < 0.02$). Grup 3 ile grup 6 karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tesbit edilemedi($p > 0.02$). Sonuçta en etkili melatonin bulunurken, vit E etkisiz bulundu.

Bizim çalışmamızda da Sugito ve arkadaşlarının çalışmasında olduğu gibi, doku MDA düzeyleri sham grubuna göre iskemi reperfüzyon grubunda daha yüksek

bulunmuştur. Bu farklılık, istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.02$). Bulduğumuz değerlerin düşük olmasının nedenleri iskemi ve reperfüzyon sürelerinin farkına, gebe ratların kullanılmamasına bağlı olabilir.

Aynı çalışmada reperfüzyondan 5 dk önce 50.000U/kg SOD ve 100.000 U/kg katalaz iv verilmiş, bu gruplarda progesteron düzeyinin arttığını ve lipid peroksidasyon ürünlerinin azaldığı tespit edilmiştir. Sham grubunda doku MDA düzeyleri 151.8 ± 35.5 , iskemi reperfüzyon + salin solüsyonu verilen kontrol grubunda 423.6 ± 21.9 , iskemi-reperfüzyon + SOD ve katalaz verilen grupta 210.6 ± 39.8 bulunmuşlardır. Bu sonuçlar, sham ve kontrol grupları $p<0.01$ güven aralığında; tedavi grubu ile kontrol grubu $p<0.05$ güven aralığında karşılaştırıldığında anlamlıdır.

Nugent ve arkadaşları, ovaryan greftlerde iskemi-reperfüzyon hasarından korumak için vitamin E (5 mg/kg) uygulamışlar. Vitamin E verilen ve verilmeyen gruplar arasında greftleme işleminden yedi gün sonra bakılan lipid peroksidasyon düzeyleri ile malonildialdehit düzeyleri arasında belirgin bir farklılık saptayamışlardır ($p>0.05$). Ayrıca vitamin E verilen greftlerde lipid peoksidasyon ve malonildialdehit düzeyleri greftleme işleminin üçüncü günü vitamin E verilmeyen greftlerle karşılaştırıldığında belirgin olarak düşük bulunmuşlardır. Bu çalışmada antioksidan olarak vitamin E kullanımı hasardan korumaya operasyondan üç gün sonra başladığı saptanmıştır. Bu çalışmada düşük doz E vitamini kullanılmıştır ancak yüksek dozda vitamin E verilmesi iskemi reperfüzyon hasarından korumaya yararlı olabilir. Ayrıca akut yüksek doz, sağlıklı insan ve rodent toksikolojik çalışmalarında emniyetli olduğu görülmüştür (57).

Yüksek lipid peroksidasyonu, overde yüksek oranda folikül kaybına neden olur. Nugent ve arkadaşları, ligate edilmiş overlerde yedinci günlerde lipid peroksidasyonunu 9.8 ± 1.1 ve 5.2 ± 0.6 olarak saptamışlardır.

Ligate edilen overe vit E verilen grupta, lipid peroksit ve MDA düzeylerinde anlamlı bir azalma saptamışlardır. Greftlerdeki ve vit E verilen kontrol overlerdeki ortalama folikül sayısı 931 ± 108 ve 1340 ± 48 di. Ancak, vit E verilmeyen gruplarda 642 ± 88 ve 1444 ± 109 du. Bu da vit E desteği alan greftlerde folikül yaşamını anlamlı şekilde artırdığını gösterir ($p < 0.005$). Vit.E alan ve almayan kontrol grupları arasında ortalama folikül sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Greftlerdeki folikül yaşam kontrlateral kontrol overleri ile yüzde olarak karşılaştırılmış.Yaşam oranı, vit E alan ratlarda $\%71 \pm 8$, Vit E almayan ratlarda ise $\%45 \pm 6$ olarak tespit edilmiş. Bu oran istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p < 0.004$). Vit E alan greftlerdeki $\%75 \pm 5$ primordiyal folikül oranı ile almayanlardaki $\%70 \pm 3$ primordiyal folikül oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamış ($p > 0.005$). Bu değerler kontrol grubunda da anlamlı olarak farklı değilmiş ($p > 0.005$) (57).

Çalışmamızda, yüksek doz Vitamin E kullanıldı (500mg/kg). Nugent ve arkadaşlarının çalışmalarında belirttiği gibi, biz de vitamin E verilen grupta lipid peroksidasyon ürünleri ve MDA düzeylerinde azalma bulduk. Ancak bu azalma, melatonin ve prostavasin verilen gruba göre daha az olarak saptandı. Melatonin ve PGE_1 kullanımı, vit E kullanımından daha etkili olabilir.

Literatürde ovaryan iskemi-reperfüzyon hasarında, melatonin ve PGE_1 kullanılmadığı için, çalışmamızdaki değerleri karşılaştıramadık.

Ancak Sewernynek ve arkadaşları karaciğer İR hasarında melatonin uygulayarak bu hasarı önlemeye çalışmışlardır. Bu çalışmada İ-R sonrası lipid peroksidasyon ürünü olan MDA seviyesinde yükselme saptamışlar ve melatonin uygulaması ile hem plazma hem de doku MDA seviyelerinde azalma gözlemişlerdir (74).

Plazma MDA sonuçlarımız, sham grubunda 1.7 ± 0.4 , iskemi grubunda 2.6 ± 0.4 , iskemi-reperfüzyon grubunda 3.5 ± 0.5 , PGE₁ grubunda 1.2 ± 0.01 , melatonin grubunda 0.7 ± 0.2 , vit E grubunda 1.5 ± 0.2 bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, MDA düzeyleri grup 3 de grup 1 ile ve grup 2 ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yükselmiştir. Bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.02$). Grup 3 ile grup 4 karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi ($p < 0.02$). Grup 3 ile grup 5 karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi ($p < 0.02$). Grup 3 ile grup 6 karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilemedi ($p > 0.02$). Sonuçta en etkili melatonin iken, Vit E etkisiz bulundu.

Bu sonuçlara göre, MDA düzeylerib grup 3 de grup 1 ile ve grup 2 ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yükselmiştir. Bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.02$). Grup 3 ile grup 4 karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tesbit edildi ($p < 0.02$). Grup 3 ile grup 5 karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi ($p < 0.02$). Grup 3 ile grup 6 karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tesbit edilemedi ($p > 0.02$). Sonuçta en etkili melatonin bulunurken, Vit E etkisiz bulundu.

Oksijeni metabolize eden tüm hücrelerde bulunan SOD ve GSH-Px enzimleri serbest oksijen radikal toksisitesine karşı önemli defans mekanizmalarını oluştururlar. Reperfüzyon esnasında oluşumu artan serbest radikallerinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırır. Plazmada üretilen ve eritrosit hücre membranını geçebilen hidrojen peroksit ve süperoksit iyonları eritrositlerde toplanır. Eritrositlerde hidrojen peroksidin detoksifikasyonunu sağlayan GSH-Px doğal antioksidan savunma sistemini oluşturur. Bu nedenle kanda ve

homojenize edilmiş dokularda SOD ve GSH-Px düzeylerine bakılarak kan ve dokuların IR hasarından ne düzeyde etkilendiği belirlenebilir.

Sugino ve arkadaşları iskemi–reperfüzyon grubunda SOD aktivitesinin azaldığını belirtmektedirler (78).

Sewerynek ve arkadaşları IR sonrası SOD ve GSH-px düzeylerinde düşme tespit etmişler ve melatonin tedavisi ile kontrol grubuna göre belirgin bir artış olduğunu bildirmişlerdir (74).

Bu çalışmada eritrosit SOD değerleri açısından sham grubuna göre, grup 3'te istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tesbit edilmiştir ($p<0.02$). Grup 3 ile diğer tedavi grupları karşılaştırıldığında eritrosit SOD seviyelerindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0.02$). Bu da bize, uyguladığımız melatonin, PGE₁ ve Vit E tedavisinin antioksidan defans sistemini destekler nitelikte, eritrosit SOD düzeylerini artırdığını göstermektedir.

Eritrosit GSH-Px sonuçlarımız sham grubu ile grup 3 karşılaştırıldığında grup 3 de belirgin orandaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.02$). Grup 3 ile grup 4,5,6 arasındaki karşılaştırmada eritrosit GSH-Px düzeyindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.02$). Bu bulgular uyguladığımız melatonin, PGE₁ ve Vit E tedavisinin antioksidan defans sistemini destekler nitelikte etki göstererek eritrosit GSH-Px aktivitelerini artırdığını göstermektedir.

Doku histopatolojisi ile diğer parametreler arasında yapılan spearman bağıntı analizinde Eritrosit SOD düzeyinin GSH-Px'den daha önemli olduğu tespit edildi. SOD düzeyine en etkili ilaç melatonin olduğu için, kullandığımız ilaçlar içinde melatonin tercih edilebilir.

Adneksiyal torsiyonun geleneksel tedavisi, pedikülü detorsiyone etmeden ve tromboembolik olaydan korunmak için salpingooferektomi yapmaktır (58). Ancak,

reprodüktif yaş grubunda olan hastalarda çeşitli konservatif tedaviler uygulanmaktadır ve konservatif tedavi uygulanan normal over perfüzyonu sağlanan grupta tromboembolik olaylar rapor edilmemiştir (82). Bizim antioksidan kullandığımız olgulardaki histolojik ve biyokimyasal bulgularımız konservatif tedavinin hastalarda uygulanabileceğini düşündürmektedir.

Adnekslerin iskemiye karşı toleransı henüz tam anlamıyla ortaya çıkarılamamıştır. Bununla birlikte overin reperfüzyona olan cevabı da net değildir. Bu bilgiler, adneksiyal torsiyonda konservatif tedavi alan hastalardaki bulgulara dayanır (82).

Organ transplantasyonlarında karşılaşılan sorunların en önemlisi organların bir süre iskemide kalması ve reperfüzyonu sağlandığında ise dokularda oluşan metabolik değişikliklerdir. İskemi ile birlikte hücrelerdeki ATP sentezi azalır, reoksijenasyon ile ksantin dehidrogenaz ksantin oksidaza dönüşür. Bu enzim oksijen varlığında hipoksantini ksantine dönüştürürken süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerini ortaya çıkardığı bilinmektedir (2,18).

Overin iskemiye karşı olan duyarlılığını azaltmak için, dolayısıyla kalıcı yapısal değişikliklere karşı rezistansını artırmak için kullanılacak serbest radikallerden koruyucu tedavinin rolü için çalışmalara ihtiyaç vardır. Ancak, günümüze kadar bu konuyla ilgili yapılmış çok az çalışma vardır. Bu çalışma, kullanılan antioksidanlar yönünden ilk çalışma olarak sayılabilir.

Yapılan bu çalışma sonucunda görülmektedir ki deneysel olarak ratlarda oluşturulan over iskemi-reperfüzyon modeli over hasarına yol açmakta ve lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını başlatarak toksik serbest radikalleri oluşturmaktadır. Bu toksik radikallere karşı, vücut intraselüler antioksidan defans mekanizmalarını işletmeye başlar, fakat hasar defans sisteminin üzerine çıkarsa

hastalık durumu ortaya çıkar. Dışarıdan verilen antioksidanlar, hasarı önlemek ve düzeltmek açısından önemli olsa da uygun ve yeterli dozda antioksidan seçimi şarttır. Overlerdeki İ-R hasarının önlenmesinde melatonin ve PGE₁'in etkili olduğu ancak vit E'nin o kadar etkili olmadığı kanaatine varıldı.

7. Sonuçlar:

1. Ovaryan iskemide, Over histopatolojisi ve rengi olumsuz etkilenir. Doku ve kan MDA düzeyleri artar. GSH-Px, SOD düzeyleri azalır.
2. Ovaryan iskemi-reperfüzyon grubunda, iskemik hasardan daha fazla hasar ortaya çıkar. İskemiden sonra görülen reperfüzyon, over üzerine yıkıcı etki yapmaktadır.
3. İskeminin sonlarına doğru, reperfüzyon başlamadan verdiğimiz antioksidan ajanlar içinde en etkili sırayla melatonin ve PGE1'dir. Vit E ise en az etkili olan antioksidandır. Melatonin ovaryan iskemi-reperfüzyon hasarını önlemek için kullanılabilir.

8.KAYNAKLAR:

1. Akgül A (1997).Tıbbi araştırmalarda istatistiksel analiz teknikleri “SPSS” uygulamaları. 10:320.61
2. Akkuş İ. (1995) Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları Konya. Sayfa 3-95.
3. Apperley JF; Reddy N. (1995). Mechanism and management of treatment – releated gonadal failure in recipients of high dose chemoradiotherapy. Blood Reviews. 9: 93-116.
4. Aten R, Duarte K, Behrman H. (1992). Regulation of ovarian antioksidant vitamins, Reduced Glutathione and lipid peroxidation by luteinizing hormone and prostaglandin F2 α . Biology of reproduction. 401-407.
5. Ateş M. (1998). Diabetik ratlarda retina lipit peroksidasyonu üzerine melatoninin etkisi.. Fırat Üniversitesi Göz Hastalıkları ABD. Elazığ.
6. Aybey B, Tufan H, Ergenekon G. (1996) Serbest radikaller. Türkderm. 30: 116-122.
7. Aydın A, Sayal A, Işimer A. (1997). Oksijen radikalleri ve biyolojik sistemlerdeki rolü. GATA bülteni. 39: 270-274.
8. Babbs C. (1988). Reperfusion injury of postischaemic tissues. Annals of Emergency Medicine. 17: 1148-1157.
9. Bayer AI, Wiskind AK.(1994). Adnexal torsion: Can the adnexa be saved? Am. J. Obstet. Gynecol.171: 1506-11.
10. Bernard A, Fuller BJ. (1996).Cryopreservation of human oocytes. A review of current problems and perspectives. Hum. Reprod. Update 2:193-207.
11. Bider D, Mashiach S, Dulitzky M, Kokia E, Lipitz S,Ben- Rafael Z.(1991). Clinical, surgical and patholojic findings of adnexal torsion in pregnant and nonpregnant women. Surg. Gynecol. Obstet.173: 363.
12. Brown JH, Pollock H. (1972). Stabilization of hepatic lysosomes of rats by vitamin E and selenium in vivo as indicated by thermal labilization of isolated lysosomes. J. Nutr.102: 1413-1420.
13. Bülbüller N.(1998). Melatoninin kesi yaraları ve anastomotik yara iyileşmesi üzerine etkisi. Elazığ. Fırat üniversitesi Genel Cerrahi ABD.
14. Callejo J, Jauregui MT, Valls C, Fernandez ME, Cabre S, Lailla J. (1999). Heterotopic ovarian transplantation without vascular pedicle in syngeneic Lewis rats: six-month control of estradiol and follicle stimulating hormone concentrations after intraperitoneal and subcutaneous implants. Fertil-steril 72: 513-517.
15. Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG. (1997). Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. J. Reprod Fertil 110: 11-19.

16. Cavallo A. (1993). Melatonin and human puberty: current perspectives. *J. Pineal Res.* 15(3):115-21.
17. Chen C.(1986). Pregnancy after human ovocyte cryopresrvation. *Lancet* i: 884-886
18. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. (1995).Robbins Pathologic Basis of Disease. 4 th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 3-12.
19. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. (1997). Hastalıkların patogenezi ve tedavisinde reaktif oksijen partikülleri ve antioksidanlar. *Türk Nefroloji ve transplantasyon Dergisi.* 3-4:96-101.
20. Delabar J. M., Nicole A., D'auriol L., Jacob Y., Meunier-Rotival M., Galibert F., and at all. (1987). Cloning and sequencing of a rat CuZn Superoxide dismutase cDNA. *Eur J. Biochem.* 166: 181-187.
21. Demirbağ M. (1999) Ratlarda intestinal iskemi-reperfüzyon hasarının önlenmesinde melatoninin rolü. *Uzmanlık Tezi, Elazığ.*
22. Demirbaş A, Bozoklu S, Özdemir A, Bilgin N, Haberal M.(1993). Effect of α -tocopherol on the prevention of reperfusion injury caused by free oxygen radicals in the canine kidney autotransplantation model. *Transplant-Proc.* 25 (3): 2274
23. Donnez J, Godin PA, Qu J, Nisolle M. (2000). Gonadal cryopreservation in the young patient with gynaecological malignancy. *Fertil-Steril* 12: 1-9.
24. Dunton CJ.(1994) Torsion of the ovary.Obstetric and Gynecologic Emergencies.Benrubi GL. J.B. Lippincott Company &Philadelphia; 275-281.
25. Erenel G, Erbaş D, Arıcıoğlu A. (1992). Serbest radikaller ve antioksidan sistemler. *Gazi. Medical. Journal.* 3: 243-250.
26. Fairbank, V.F. and Farias,R.N. (1986). Biochemical Aspects of Hematology. P.1506-1507. Ed. N. W. Tietz In: "Textbook of Clinical Chemistry". 2nd ed, W.B. Sounders Company.60
27. Felicio LS, Nelson JF, Gosden RG, Finch CE. (1983). Restoration of ovulatory cycles by young ovarian grafts in aging mice: potentiation by long term ovariectomy decreases with age. *Proceeding National Academy of Science.* 80: 6076-6080.
28. Fridovich I. (1989) Superoxide Dismutases. *The Journal of Biological Chemistry* 264-14: 7761-7764.
29. Giordano M, Palermo Ms. (1991). Melatonin-induced enhancement of antibody dependent cellular cytotoxicity. *J. Pinal. Res.* 10(2): 117-21.
30. Gordon J, Hopkins K, Jeffrey RB, Giudice L.(1994).Adnexal torsion: Doppler diagnosis and laparoscopic treatment. *Fertil Steril.* 61: 383-385.

31. Gosden RG, Boulton MI, Grant K, Webb R.(1994). Follicular development from ovarian Xenografts in SCID mice. J. Reprod. Fertil.101: 619-623.
32. Granger DM, Hoellwarth ME, Parks DA. (1986). Ischemia-reperfusion injury : role of oxygen-derived free radicals. Acta Physiol. Scand Suppl. 548:47-62.
33. Grase PA.(1994). Ischaemia-reperfusion injury. Br.J.Surg.634-647.
34. Gündüz K.(1997). Dermatolojide E vitamini. Türkderm. 31: 151-154.
35. Haberal M, Hamaloğlu E, Bora S, Öner G, Bilgin N.(1988). The effects of vitamin E on immune regulation after thermal injury. Burns.14 (5): 388-393.
36. Haberal M, Mavi V, Oner G.(1987). The stabilizing effect of vitamin E, selenium and zinc on leucocyte membrane permeability: A study in vitro. Burns. 13(2):118-122.
37. Harlan JM. (1987). Neutrophil- mediated vascular injury. Acta Med.Scan. suppl715:123-129.
38. Hellberg PO, Kallskog TO. (1989). Neutrophil- mediated postischemic tubular leakage in the rat kidney. Kidney, 36: 555-561.
39. Hibbard L. (1985). Adnexal torsion. Am. J. Obstet Gynecol 152: 456-61.
40. Jacob R. A., Burr B. J.(1996). Oxidative damage and defense. Am J Clin Nutr 63: 985-90.
41. Karaduman A.(1998). Serbest radikaller ve yaşlanma. T. Klin. J. Cosmetol. 1 : 21-26.
42. Katzung BG. (1995) Temel ve klinik farmakoloji .Özüner Z(çeviri editörü). I. Cilt. Barış Kitabevi Sayfa: 387-407.2
43. Kayaalp SO.(1998). Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji;Sekizinci Baskı, 2. Cilt. Hacettepe-TAŞ. Sayfa:1502-1525.3
44. Keleştimur H.(1996) İnsanda pineal bezin fonksiyonları. F.Ü.Sağlık Bilimleri Dergisi 10:141-147.4
45. Kennedy CT. (1992). Reactions to mechanical and thermal injury. In: Rook A, Wilkinson DS, Ebling FG, eds. Textbook of Dermatology, 5 th ed. Oxford: Blackwell Sci Pub, 777-832.
46. Kılınç K.(1985) Oksijen radikalleri: üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri. Biyokimya Derg.10: 60-89.
47. Köksel O.(1998) İskemi reperfüzyona bağlı akciğer hasarı üzerine α -lipoik asidin etkisi. Uzmanlık tezi, Elazığ.
48. Köse K, Doğan P.(1992). Lipid Peroksidasyonu. Erciyes. Medical. Journal.1: 340-350.

49. Lissoni P, Tancini G, Barni S, Crispino S, Paolorossi F, Rovelli F, Cattaneo G, Frascini F. (1988) Melatonin increase as predictor for tumor objective response to chemotherapy in advanced cancer patients. *Tumori* Jun30; 74(3):339-45.
50. Lissoni P, Barni S, Crispino S, Tancini G. (1989). Endocrine and immune effects of melatonin therapy in metastatic cancer patients. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 1989;25(5):795-98.
51. Lynda L, McHutchison B, Koonings PP, Ballard CA, D'Ablang G. (1993). Preservation of ovarian tissue in adnexal torsion with fluorescein. *Am. J. Obstet. Gynecol* 168: 1386-8.
52. Mage G, Canis M, Manhes H, Pouly J, Bruhat M. (1989) Laparoscopic management of adnexal torsion. *J. Reprod. Med.* 34: 520.
53. Mashiach S, Bider D, Moran O, Goldenberg M, Ben Rafael Z. (1990) Adnexal torsion of hyperstimulated ovaries in pregnancies after gonadotropin therapy. *Fertil Steril* 53: 76-80.
54. Mikhail M.S. Anyaegbunam A, Garfinkel D., Palan P. R., Basu J., Romney S. (1994). L. Preeclampsia and antioxidant nutrients: Decreased plasma levels of reduced ascorbic acid, α -tocopherol, and beta-carotene in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 171: 150-7.
55. Newton H, Aubard Y, Sharma V, Rutherford AJ, Gosden RG. (1996). The low temperature storage and grafting of human ovarian tissue into SCID mice. *Human Reprod.* 11: 1487-1491.
56. Nichols DH, Julian PJ. (1985). Torsion of the adnexa. *Clin. Obstet. Gynecol.* 28: 375-80.
57. Nugent D, Newton H, Gallivan L, Gosden RG. (1998). Protective effect of vitamin E on ischaemia-reperfusion injury in ovarian grafts. *J. Reprod. Fertil.* 114: 341-346.
58. Oelsner G, Bider D, Goldenberg M, Admon D, Mashiach. (1993) Long-term follow up of the twisted ischemic adnexa managed by detorsion. *Fertil Steril* 60: 976-79.
59. Ohawa H, Ohishi N and Yagi. (1979). Assay for Lipid Peroxides in animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal Biochem* 95:351-358.
60. Paglia DE and Valentine WN. (1967). Studies on the Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyte Glutathione Peroxidase. *J Lab Clin. Med* 70(1):158-168.
61. Paller MS (1989) Effect of neutrophil depletion on ischemic renal injury in the rat. *J. Lab. Clin. Med.* 113: 379-386.
62. Petney PT, Bubenik GA. (1995). Melatonin reduces the severity of dextran induced colitis in mice. *J Pineal Res* 19:31-39.

63. Pierpaoli W, Lesnikov V. (1997). Theoretical considerations on the nature of the pineal ageing clock. *Gerontology*; 43:20-25.
64. Prasad JS. (1980). Effect of vitamin E supplementation on leukocyte function. *The Am. J. Clin. Nutr.* 33: 606-608.
65. RANSOD. SOD Tayin Kiti. (1997). Randox Laboratories Ltd. Diamond Road, Crumlin, Co. Antrim, United Kingdom, BT29 +QY.56
66. Reiter R, Tang L, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A. (1997). Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci.* 60(25):2255-71.
67. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek B, et al. (1995). A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res.* 18:1-11
68. Reiter RJ. (1991). Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and its physiological interactions. *Endocr Rev.* 12(2):151-180.
69. Reither RJ, Carneiro RC, Oh CS. (1997). Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm. Metab. Res.* 29(8):363-72.
70. Richard J. (1987). Stock. Clinicopathologic changes resulting from adnexal torsion. *J. Reprod. Med.* 32: 201-7.
71. Righi RV, McComb P, Fluker M. (1995). Laparoscopic oophoropexy for recurrent adnexal torsion. *Human Reprod.* 10: 3136-3138.
72. Satoh K. (1978). Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta.* 90:37-43.54
73. Saygılı Eİ. (1997). Kolorektal kanserli hastalarda lipid peroksidasyonu ve antioksidan sistemler. *Uzmanlık Tezi İstanbul: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı..*
74. Sewerynek E, Reiter RJ, Melchiorri D, Ortiz GG, Lewinski A. (1996). Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: Protection by melatonin. *Hepato-Gastroenterology.* 43:898-905.16
75. Simon GA, Schmid P, Reifenrath WG, Rawenswaay TV, Stuck BE. (1994). Wound healing after laser injury to skin. The effect of occlusion and vitamin E. *J. Pharm. Sci.* 83(8): 1101-1106.
76. Sommerville M, Grimes D, Koonings P, Campbell K. (1991) Ovarian neoplasms and risk of adnexal torsion. *Am. J. Obstet Gynecol.* 164: 577-8.
77. Stahl W, Sies H. (1997). Antioxidant Defense: Vitamins E and C and Carotenoids. *Diabetes.* 46(2): 14-18.
78. Sugino N, Nakamura Y, Nagato Okuno, Ishimoto M, Teyama T, Kato H. (1993). Effect of ovarian ischemia- reperfusion on luteal function in pregnant rats. *Biol. Reprod.* 49:354-358.

79. Svingen BA, Powis G, Appel PL, Scott M. (1981). Protection against Adriamycin-induced skin necrosis in the rat by dimethyl sulfoxide and α -tokopherol. *Cancer. Res.* 41: 3395-3399.
80. Tanaka J, Fujiwara H, Torisu M. (1979). Vit. E and immune response. Enhancement of helper T cell activity by dietary supplementation of vitamin E in mice. *Immunology.* 37: 727-734
81. Tappel AL, Dillard CJ. (1981) In vivo lipid peroxidation: Measurement via exhaled pentane and protection by vitamin E. *Fed- Proc.* 40: 174-178.
82. Taskin O, Birincioğlu M, Aydın A, Buhur A, Burak F, Yılmaz I, Wheeler JM. (1998). The effect of twisted ischaemic adnexa managed by detorsion on ovarian viability and histology: an ischaemia-reperfusion rodent model. *Hum. Reprod.* 13(10): 2823-2827.
83. Tucker MJ, Wright G, Morton PC; Massey JB. (1998). Birth after cryopreservation of immature oocytes with subsequent in vitro maturation. *Fertil steril.* 70: 578-579.
84. Tuncer M. (1997). Deneysel önbeyin iskemi- reperfüzyon hasarında melatoninin antioksidan etkisi. Uzmanlık Tezi Ankara. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı.
85. Üstündağ B, Canatan H. (1999). Melatonin: Güçlü bir antioksidan ve serbest radikal giderici. *Fırat Tıp Dergisi* 1;502-512.51
86. Van Uem JF, Siebzehnrübl ER, Schuh B, Trotnow S, Lang N. (1987). Birth after the cryopreservation of unfertilised ovocyte. *Lancet.*i: 752-753.
87. Vancaillie T, Schmidt E. (1987). Recovery of ovarian function after laparoscopic treatment of acute adnexal torsion. *J. Reprod. Med.* 32: 561.
88. Var A. (1997). Kronik Böbrek Yetmezliğinin Serbest Radikaller ve Antioksidanlarla İlişkisi. Uzmanlık Tezi Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı..
89. Virchows ,Molecular Pathology. (1992). Tissue distrutin of neutrophils in postischemic acute renal failure: 62:237-243
90. Wang J, Dunn MJ: (1987). Platelet- activating faktor mediates endotoxin-induced acute renal insufficiency in rats. *Am. J. Physiol.* 1283-1289.
91. Wisdom S. J., Wilson R., McKillop J. h., Walker J. J. (1994). Antioxidant systems in normal pregnancy and in pregnancy- induced hypertension. *Am J Obstet Gynecol* 171: 150-7.
92. Yagi K. (1984). Assay of blood plasma or serum. methods in enzymology 105:328-331.

93. Yamamoto H, Tang H. (1996). Melatonin attenuates L-cysteine induced seizures and lipid peroxidation in the brain of mice. *J pineal Res.* 21:108-113.13
94. Yaprak M. Melatonin: Fizyolojik etkileri. *Haseki Tıp Bülteni.* (1996). 34(2): 157-113.
95. Yılmaz Ö, Çelik S, Nazıroğlu M, Çay M, Dilsiz N. (1997). The effects of dietary selenium and vitamin E and their combination on the fatty acids of erythrocytes, bone marrow and spleen tissue lipids of lambs. *Cell biochemistry and function.* 15: 1-7
96. Yılmaz Ş. (1999). Yanık oluşturulan kobaylarda serbest radikallerin düzeylerindeki değişiklikler ve e vitaminin tedavideki yeri. *Uzmanlık Tezi.* Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı.
97. Zweizig S, Perron J, Grubb D, Mishell DR. (1993). Conservative management of adnexal torsion. *Am. J.Obstet. Gynecol* 168: 1791-5.

8. ÖZGEÇMİŞ:

1974 yılında Elazığ'da doğdum. İlköğrenimimi İzmir/ Beydağ Atatürk İlköğretim Okulu'nda tamamladım. Ortaokulu Bingöl Lisesi Orta kısımda tamamladım. Liseyi 1990 yılında Elazığ Mehmet Akif Ersoy Lisesi' nde bitirdim. 1990 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne başladım.1996'da mezun oldum. 1996 yılı Eylül TUS sınavını kazanarak Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum bölümüne başladım. Halen aynı bölümde ihtisasıma devam etmekteyim.