

T.C.
ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RATLARDA OVARYUM İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARINA KARŞI CB2
AGONİSTİNİN KORUYUCU ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Buket BİLGİN ŞAHİN
TIBBİ FARMAKOLOJİ

ADYAMAN

2019

T.C.
ADİYAMAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RATLARDA OVARYUM İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARINA KARŞI CB2
AGONİSTİNİN KORUYUCU ETKİSİ

Buket BİLGİN ŞAHİN

Danışman Öğretim Üyesi:
Dr. Öğretim Üyesi Ali PARLAR

ADİYAMAN

2019

KABUL ve ONAY

Anabilim Dalı: FARMAKOLOJİ ve KLİNİK FARMAKOLOJİ

Program: TIBBİ FARMAKOLOJİ

Tez Başlığı: Ratlarda ovaryum iskemi/reperfüzyon hasarına karşı cb2 agonistinin Koruyucu etkisi

Öğrenci Adı-Soyadı: Buket BİLGİN ŞAHİN

Savunma Sınav Tarihi:

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Mehmet Kaya ÖZER

Tez Danışmanı: Dr. Öğrt. Üyesi Ali PARLAR

Üye: Prof. Dr. Seyfullah Oktay ARSLAN

Üye:

Üye:

ONAY

Bu tez Adıyaman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün Yönetim Kurulu kararıyla .../.../2018 tarihinde kabul edilmiştir.

31.10.2019

Prof. Dr.

Prof. Dr. Musa ABEŞ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü V.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER	X
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. OVARYUM	3
2.1.1. Ovaryum Embriyolojisi	3
2.1.2. Ovaryum anatomisi.....	4
2.1.3. Adneksiyal torsiyon.....	5
2.2.1. İskemi	6
2.2.2. Reperfüzyon.....	8
2.3.1. Kannabinoidlerin fizyolojik etkileri	11
2.3.2. Kannabinoid sistem ve reseptörleri	12
3. MATERYAL ve METOT	16
3.1. Kimyasallar.....	16
3.2. Hayvanlar	16
3.3. İskemi ve reperfüzyonun yapılması ve grup adlandırmaları.....	16
3.4. Örneklerin toplanması.....	17
3.5. Doku ve serum sitokin seviyelerin ölçümü.....	17
3.6. Malondialdehit (MDA) ölçümleri	17
3.7. Glutasyon (GSH) seviye ölçümü.....	17
3.8. İstatistik analiz	17
4. BULGULAR	18
4.1. Serum ve ovaryum sitokin seviyelerinin miktarı.....	18
4.2 Serum ve ovaryumda oksidasyon ve antioksidasyon parametreleri.....	19
5. TARTIŞMA.....	22
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	24
KAYNAKÇA.....	25
EKLER	31

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimi sürecinde her türlü olanağı sağlayan, bilimselliği ve kişiliği ile her anlamda örnek oluşturan saygıdeğer danışman hocam Adıyaman Üniversitesi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Ali PARLAR 'a;

Her zaman tüm samimiyetiyle yanımda olan, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam Adıyaman Üniversitesi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mehmet Kaya ÖZER 'e,

Tez çalışması sırasında yardım ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım eczacı Cennet Büşra YILMAZ'a, eczacı teknikeri Ömer Sinan YEŞİLLİ'ye ve annem Hafure BİLGİN'e;

Ve hayatımın her anında ve her konuda bana destek olan eşim Cabir ŞAHİN'e sonsuz sevgi, saygı ve şükranlarımı sunmaktan onur duyarım.

Buket BİLGİN ŞAHİN

ÖZET

Ratlarda ovaryum iskemi/reperfüzyon hasarına karşı CB2 agonistinin koruyucu etkisi

Amaç: Ovaryum iskemi/reperfüzyon hasarı, kadınlarda adet başlangıcından menopoza kadar olan dönemde oluşan akut batın olgularındandır ve bu hasarın en sık nedenlerinden biri over torsiyonudur. Tedavi edilmediği durumlarda yumurtalıklara giden kan akımının azalmasına bağlı olarak nekroz gelişebilir ve hatta organ fonksiyonunu yitirebilir. Tezin amacı over torsiyon hasarında kannabinoidlerin koruyucu etkisini değerlendirmek, sıçan overlerinde deneysel iskemi/reperfüzyon hasarında CB2 reseptörünün rolünün olup olmadığını araştırmaktır.

Materiyal ve metot: Bu çalışmada 28 adet dişi wistar sıçan kullanıldı. Sıçanlar şam kontrol grubu, iskemi/reperfüzyon grubu, CB2 agonist+iskemi/reperfüzyon grubu, CB2 agonist+antagonist+iskemi/reperfüzyon grubu ve iskemi/reperfüzyon+dimetilsülfoksit grubu olarak 5'ye ayrıldı. Sıçanların over dokusu alındı. Doku örneklerinde MDA, GSH, TNF- α ve IL-1 β seviyeleri ölçüldü. Bu seviyeler şam kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

Bulgular: Şam kontrole göre (823,33 $\pm$ 206,56, pg/ml) İ/R grubunda (3066,67 $\pm$ 381,66, pg/ml) serum TNF- α seviyesinin arttığı görüldü. Agonist ovaryum İ/R hasarını, serum TNF- α açısından azalttı (1434,67 $\pm$ 400,91, pg/ml).

IL-1 β seviyesi açısından şam grubu (7,11 $\pm$ 1,87, pg/g) ile İ/R grubu (15,73 $\pm$ 3,23, pg/g) karşılaştırıldığında farklılıklar bulunmuştur (P<0,001). Agonist grup (8,92 $\pm$ 1,33, pg/g) ile antagonist grup (13,01 $\pm$ 2,45, pg/g) karşılaştırıldığında sonuç istatistiksel anlamlı bulundu (P=0,046).

MDA seviyesi şam grubu ile İ/R grubunda karşılaştırıldığında, İ/R'nin MDA seviyesinde artışa neden olduğu (sırasıyla; 77,66 $\pm$ 12,28, 109,06 $\pm$ 11,04, nmol/g, P=0,010), CB2 agonistinin (86,50 $\pm$ 16,32, nmol/g) MDA seviyesinde azalmaya neden olduğu bulunmuştur. Agonistin etkisi antagonistin etkisinden (99,11 $\pm$ 5,07, nmol/g, P=0,39) etkilenmemiştir.

İ/R grubu (24,51 $\pm$ 6,06, mg/100 ml, 0,56 $\pm$ 0,25, μ mol/g) ve şam kontrol grubu (38,06 $\pm$ 5,08, mg/100 ml, 1,33 $\pm$ 0,07, μ mol/g) GSH düzeyi açısından karşılaştırıldığında, serum ve dokuda GSH seviyelerinin azaldığı bulundu.

Sonuç: CB2 reseptörü ovaryum iskemi reperfüzyon hasarında tedaviyi destekleyebilir.

Anahtar kelimeler: CB2 reseptörü, İskemi/reperfüzyon hasarı, Over, Sıçan

ABSTRACT

Protective effect of CB2 agonist against ovarian ischemia/reperfusion injury in rats

Aim: Ovarian ischemia/reperfusion injury is one of the cases of acute abdomen during reproductive period in women and one of the most common causes is ovarian torsion. If left untreated, necrosis may develop due to decreased blood flow to the ovaries and the organ may lose function. The aim of thesis is to evaluate the protective effect of cannabinoids in ovarian torsion injury and to investigate the role of CB2 receptor in experimental ischemia/reperfusion injury in rat ovaries.

Material and method: In this study, 28 female wistar rats were used. The rats were divided into 5 groups as sham control group, ischemia / reperfusion group, CB2 agonist+ischemia reperfusion group, CB2 agonist+antagonist+ischemia/reperfusion group and ischemia/reperfusion+dimethylsulfoxide group. Ovarian tissue removed. MDA, GSH, TNF- α and IL-1 β levels were measured in tissue parts. These levels were compared to sham control group.

Results: I/R group (3066,67 $\pm$ 381,66, pg/ml) compared to sham control (823,33 $\pm$ 206,56, pg/ml) serum TNF- α levels increased. Agonist reduced ovarian I/R damage as to serum TNF- α (1434,67 $\pm$ 400,91, pg/ml).

Differences were found when I/R group was compared to sham group ($P < 0,001$) according to IL-1 β level. When agonist group (8,92 $\pm$ 1,33, pg/g) and antagonist group (13,01 $\pm$ 2,45, pg/g) were compared, the result was statistically significant ($P = 0,046$).

When the MDA level was compared to sham group (77,66 $\pm$ 12,28, nmol/g) and I/R group (109,06 $\pm$ 11,04, nmol/g), it was found that I/R caused an increase in MDA level and CB2 agonist (86,50 $\pm$ 16,32, nmol/g) was found to cause a decrease in MDA level. The effect of agonist was not affected by the antagonist (99,11 $\pm$ 5,07, nmol/g, $P = 0,39$).

When I/R group (24,51 $\pm$ 6,06, mg/100 ml, 0,56 $\pm$ 0,25, μ mol/g) and sham control group (38,06 $\pm$ 5,08, mg/100 ml, 1,33 $\pm$ 0,07, μ mol/g) were compared in terms of GSH levels, GSH levels were found to be decreased in serum and tissue.

Conclusion: CB2 receptor may support treatment of ischemia reperfusion injury in ovary.

Keywords: CB2 receptor, Ischemia/Reperfusion injury, Ovary, Rat

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADP:	Adenozin difosfat
AC:	Adenilat siklaz
AEA:	Anandamide
AMP:	Adenozin monofosfat
ATP:	Adenozin trifosfat
Ca:	Kalsiyum
CB1:	Kannabinoid tip 1 reseptör
CB2:	Kannabinoid tip 2 reseptör
DMSO:	Dimetilsülfoksit
DTNB:	Ellman reaktifi
D9-THC:	Delta 9-tetrahidrokannabinol
eNOS:	Endotelial nitrik oksit sentaz
ET:	Endotel
Fe+2:	+2 değerlikli demir
g:	Gram
GSH:	Glutatyon
H2O2:	Hidrojen peroksit
IL-1 β :	İnterlökin-1 β
IL-6:	İnterlökin-6
İP:	İntraperitoneal
İ/R:	İskemi/reperfüzyon
K:	Potasyum
MAPK:	Mitojenle etkileşen protein kinazı
MDA:	Malondialdehit
mg:	Miligram
mL:	Mililitre
MSS:	Merkezi sinir sistemi
μ g:	Mikrogram
μ L:	Mikrolitre
μ mol:	Mikromol
Na:	Sodyum
NADA:	N-araşidonil dopamin
NADPH:	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

nm: Nanometre
nmol: Nanomol
NO: Nitrik oksit
O₂: Oksijen
O₂⁻: Süperoksit anyonu
OAE: Virodamin
OH: Hidroksit anyonu
PKA: Protein kinaz-A
pg: Piktogram
PMNL: Polimorfonükleer lökositler
ROT: Reaktif oksijen türleri
SOD: Süperoksit dismutaz
Sp: Türler
TBA: Tiyoobarbutirik asit
TCA: Trikloro asetik asit
TNF- α : Tümör öldürücü faktör- α
VGCC: Voltaj duyarlı kalsiyum kanalı
XO: Ksantin oksidaz

ŞEKİLLER

Şekil 1	4
Şekil 2	7
Şekil 3	8
Şekil 4	11
Şekil 5	15
Şekil 6	18
Şekil 7	19
Şekil 8	20
Şekil 9	21



1. GİRİŞ

Ovaryumu besleyen damarlarda iskemi gelişimi özellikle genç kızlarda kısırlığa sebep olması ve psikolojik problemlere yol açmasından dolayı dünyadaki ciddi sağlık problemlerindendir. Over kistleri, gebelik, polikistik over sendromu ve over arterinin geçici veya kalıcı tıkanması iskemiye neden olabilir. Ancak en yaygın patolojik durum over torsiyonudur. Eğer duruma yeterince hızlı ve uygun tıbbi ve cerrahi müdahale edilirse üreme yeteneği korunabilir (1).

Over torsiyonu jinekoloji kliniğinde acil bir durumdur. Üreme döneminde tanı konulduğunda özellikle önemlidir. İskemi/reperfüzyon hasarı yumurtalık dokularına zarar verebilir ve yumurtalık rezervini azaltabilir. Bu sebeple tanı süresi önemlidir. Ancak tanı genellikle biraz zaman alır çünkü spesifik semptomları yoktur (1). Ek olarak, kanın tekrar dokuya ulaşımı over dokusunun iskemik hasarını azaltabilir ancak aynı zamanda reperfüzyon hasarına neden olabilir. İskemi uzadığında, ilişkili hücre hasarı geri dönüşümsüz hale gelir (2). İskemi sırasında ATP üretimi azalır ve glikoliz başlar. ATP seviyesinin düşmesi, sodyum-potasyum pompa kanalının işlevini bozar ve daha sonra hücre içine su girişiyle plazmolize neden olur. Eğer iskemi devam ederse, hücreler hücre zarı hasarı gibi geri dönüşü olmayan bir aşamaya ilerler. Bu aşamada, mitokondride şiddetli şişme görülür ve durum genellikle nekrozla sonuçlanır. İskemik dokudaki kanlanmayı eski haline getirmek, geri dönüşümlü aşamada hücrelerin geri kazanılmasını sağlar. Ancak bu durum reperfüzyon hasarına sebep olur (3). İskemik dokuların tekrar oksijenlenmesi, süperoksit anyonları dahil olmak üzere hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalleri ($-OH$) gibi reaktif oksijen türlerinin üretimine sebep olur. Oluşan reaktif oksijenler fosfolipitlere ve hücre zarının proteinlerine zarar verir. ATP'de azalmaya neden olur ve sonuçta hücre ölümüne yol açabilen mitokondriyal geçirgenliği artırır (4).

Damar geçirgenliğinde inflamasyonla indüklenen gelişmeler endotelial hücrelerde absorbe edebileceğinden fazla sıvının birikmesiyle sonuçlanır (5). Kannabinoid agonistleri üzerinde yapılan çok çeşitli araştırmalar, kannabinoid agonistlerinin antinösetif ve anti-inflamatuar etkileri olduğu bulunmuştur. Bunların özellikle de periferde bulunan kannabinoid 2 (CB2) reseptörleri aracılığıyla anti-ödem ve anti-eksravazasyon etkilerine aracılık ettiği bulunmuştur (6).

Over iskemi/reperfüzyon modelinde ovaryum torsiyon hasarını önlemek amacıyla deneysel olarak tadalafil (7), ghrelin (3), çeşitli antioksidanlar (4), Vaccinium

myrtillus ekstratı (8), nar çekirdeği yağı (1), ginkgo biloba ekstratı (9), curcumin (10) ve magnezyum (11) kullanılmıştır. Ancak kannabinoidler bu amaçla hiç kullanılmamıştır. Anti-inflamatuar etkilerinden dolayı kannabinoidlerin bu amaçla kullanılması teoride mantıklı görülmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. OVARYUM

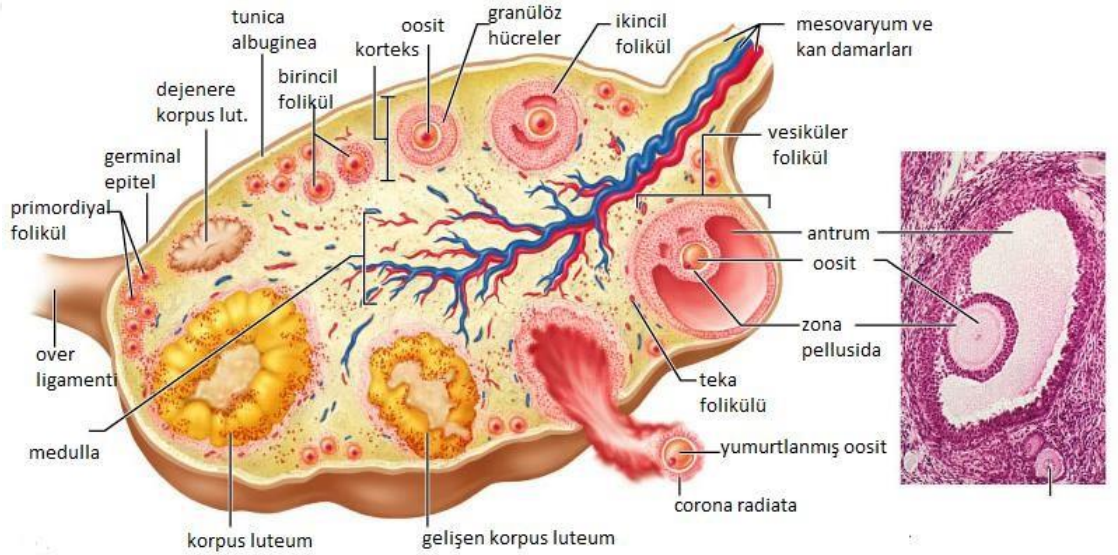
2.1.1. Ovaryum Embriyolojisi

Overin oluşumunda, yolk kesesinden köken alan germ hücreleri, ürogenital katlantıdan gelen germinal epitel hücreleri ve mezenşimal hücreler yer alır. Germ hücreleri oositleri meydana getirir. Germinal epitel oositleri çevreleyen granüloza hücrelerini meydana getirir. Mezenşimal doku granüloza hücrelerini saran teka hücrelerini meydana getirir. Gonadlar başlangıçta bir çift olarak, çöломik epitelin proliferasyonu ve altındaki mezenşim dokunun çoğalması ile oluşmuş genital ve gonadal kabarıklık şeklinde oluşurlar (12). 6. haftaya kadar bu kabarıklıklar içinde germ hücreleri bulunmaz. İnsan embriyosun erken gelişim sürecinde primordiyal germ hücreleri yolk kesesinin allontoise yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında oluşur. Bu hücreler son barsağın mezenteri boyunca ilerleyerek 5. haftanın başında birincil gonadlara ulaşır. 6. haftada ise genital kabarıklıklara yerleşirler (13). Germ hücreleri gonadların over ve testise farklılaşmasında rol alır. Primordiyal germ hücrelerinin birincil gonadlara ulaşma aşamasında, genital kabarıklıktaki çöломik epitel proliferer olur ve epitel hücrelerin altındaki mezenşim içine girerler. Böylece primitif cinsiyet kordonları denilen şekilsiz kordonları oluştururlar. Bu kordonlar yüzey epiteline bağlıdır ve bu dönemde cinsiyet ayırt edilemez. Bu gonad farklılaşmamış gonaddır. Bu aşamadan sonra dişi gonadın yüzey epiteli, erkeklerdekinin aksine çoğalmaya devam eder. Yedinci haftada bu epitellerden yüzeye yakın kalmaya devam eden kortikal kordonlar adı verilen ikincil kordonlar gelişir. XX cinsiyet kromozomuna sahip bir embriyoda gonadın medüller kordonları küçülür ve kortikal kordonlar gelişir. Onaltıncı haftada bu kordonların her biri bir veya daha çok sayıdaki birincil germ hücrelerini içeren bağımsız hücre topluluklarına dönüşürler. Germ hücreleri 15. haftaya kadar çoğalır ve öncelikle oogoniya daha sonra da birincil oositlere dönüşürler. Aynı dönemde yüzey epitelinden aşağıya giden ve germ hücrelerini çevreleyen epitel hücrelerinden de folikül hücreleri meydana gelir. Gonadotropinlerin etkisiyle genişleyen foliküller 36. gebelik haftasında overı tamamen doldurur (14).

2.1.2. Ovaryum anatomisi

Ovaryumlar dişide pelvis duvarına yaslanmış bir çift organdır. Pembemsi beyaz renkli, boyu yaklaşık 3 cm, eni 1,5 cm ve kalınlığı 1 cm olan, 4-8 gram ağırlığında elipse benzer yapılardır. Ovaryumlar hilus bölgesinden mezovaryum ile uterusun geniş ligamentinin arkasına tutunurlar. Üstten ligamentum suspensory ovary aracılığı ile pelvik duvara, alttan ligamentum ovary ile uterusu bağlanmışlardır (13). Ovulasyonun başladığı ergenlik dönemine kadar üzeri düzdür. Ovulasyon başladıktan sonra ise üzerinde girinti ve çıkıntılar oluşur. Menopoz sonrası üzeri yine düzleşir (15)

Ovaryumlar ligamentlerdeki damarlarla kanlanır (16). Ovaryumların esas kan damarı abdominal aortanın kollarından olan ovaryan arterdir. Ovaryan arter ligament içinde ilerleyerek mesovaryuma gelir. Şekil 1’ de görüldüğü gibi (17), ovaryumun kanlanmasını sağlayan bir diğer damar uterin arterin ovaryan dalı olan ramus ovaricusdur. Mezovaryumda, ovaryumlara kan getiren ramus ovaricus ile ovaryan arter bir arada dallanır. Bu hallerine helisin arter denilir. Arterler yumurtalığın kabuğunda plexus meydana getirir. Bu plexustan dağılan kılcal damar ağı foliküllerin etrafını sarar (15).



Şekil 1

2.1.3. Adneksiyal torsiyon

Adneksin, overin ya da nadir olarak fallopi tüpünün tek başına, infundibulopelvik ve tubaovaryan ligamentin kendi eksenini etrafında en az tam bir tur dönmesi adneksiyal torsiyon olarak adlandırılır. Adneksin torsiyonu sonucu dokuda iskemi meydana gelir. İfundibulopelvik ligamentin içersindeki ovaryan damarların torsiyonu ile meydana gelen venöz ve lenfatik engel, yumurtalık parankiminin masif konjesyonuna ve hemorajik infarktına neden olur. Over torsiyonundan hemen sonra oluşan arteriyel engel ise kangren ve hemorajik nekroza sebep olur. Oluşan bu iskemi tedavi edilmediğinde overin, fallopi tüpünün ve tüm adneksin nekrozuna sebep olabilir. Bu durum fertilitenin bozulmasına sebep olur. Daha az sıklıkla da adneksiyal torsiyon, pelvik tromboflebit ve ciddi peritonit gibi ölümcül komplikasyonlara sebep olabilir (18). Adneksiyal torsiyon jinekolojik cerrahi acillerin %3'ünü oluşturmakla beraber kadınlarda akut abdominal ağrının önemli bir nedenidir (18). Adneksiyal torsiyon kadınlarda herhangi bir yaşta görülebilmekle beraber daha sıklıkla menopoza öncesi dönemde görülür ve adnekslerdeki bir ağırlık artışı torsiyonun oluşma riskini artırır (19). Erişkinlerde adneksiyal torsiyonun en sık rastlanan nedeni benign kistik teratomdur. Over kanseri ve endometriozis gibi inflamatuvar kitleler nadiren torsiyone olur (18). Çünkü malign over tümörler çevre dokuya invaze olması ve adhezyonlar oluşturması sebebiyle benign over tümörlerine göre daha az torsiyone olurlar (20). Çocuklarda ise adneksiyal torsiyon olgularında en sık rastlananlar benign kistik teratom, hemorajik kist veya foliküler kist olmakla birlikte daha az olarak paratubal kist, kist adenom ve hidrosalpinx de görülür (21). Paratubal kistler, tüpün tek başına ya da tüm adneksin birlikte torsiyone olmasına neden olabilir. Hematosalpinx, hidrosalpinx ve tubal ektopik gebelik de izole tüp torsiyonu yapabilir (22). Yeni doğan döneminde ise maternal hormonal uyarı nedeniyle ikincil olarak gelişen kistler genellikle kendiliğinden geriler fakat nadiren adneksiyal torsiyona neden olabilir ve hatta kliniği sessiz olduğundan over nekroze olarak otoamputasyona gidebilir (23). Adneksiyal torsiyon ani bebek ölüm sendromunun nedenlerinden sayılmıştır (24).

Sağ ovaryan ligamentin sola göre daha uzun olması, sol adneksin sigmoid kolona yakınlığı ve dar bir alanda mobilize olamaması nedenleri ile sağ taraf sol tarafa göre adneksiyal torsiyon olgularından daha fazla etkilenir (25).

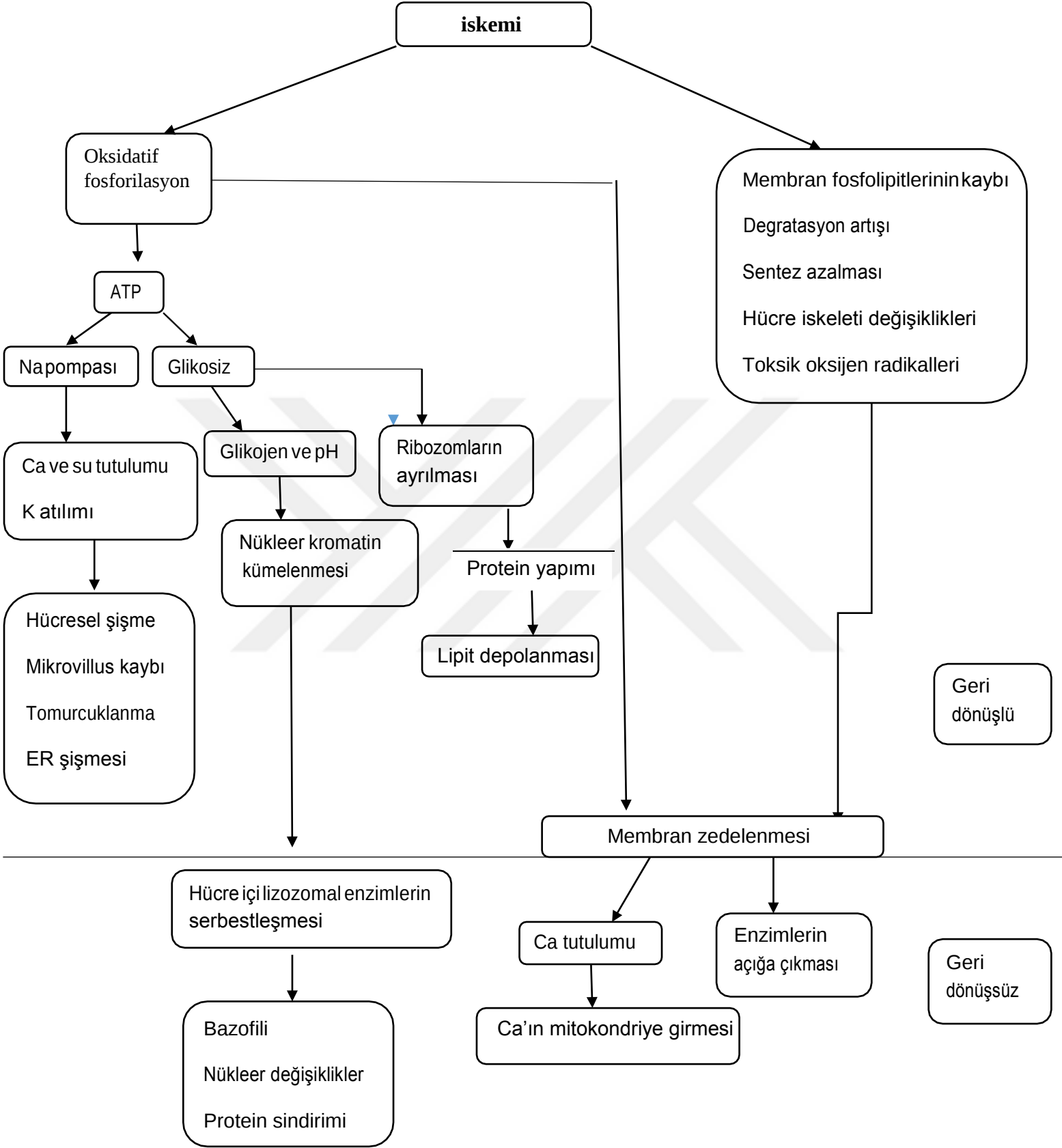
Adneksiyal torsiyonun belirtileri nonspesifiktir ve laboratuvar veya radyolojik tanıda belirgin bir bulgu olmadığından laparoskopi veya laparotomi yapılarak torsiyon durumunun görülmesi ile kesin tanı konulur (26).

Over torsiyonu sonucu nekroze olmuş over dokusunda tedavi net değildir. Cerrahi olarak ooforektomi uygulanmakla birlikte, detorsiyon ile koruyucu tedavi son yıllarda daha fazla önerilmektedir. Torsiyon olgularında şiddetli hasar olsa bile iskemi çok uzamadığı sürece ovaryum fonksiyonları korunur. Çünkü overin kanlanması ovaryan arter ya da uterin arter sayesinde az miktarda olsa da bir süre devam etmektedir. Bundan dolayı erken tanı ve müdahale ile overde oluşabilecek dönüşümsüz hasarın önüne geçilmesi gerekmektedir. Bu durumda ilk yapılması gereken cerrahi müdahale ile detorsiyonu sağlamaktır. Ancak adnekslerin detorsiyonu overlerde reperfüzyona bağlı olarak bazı problemlere neden olur (27). Overin yeniden kanlanması overlerde I/R hasarı yaratır (2). I/R hasarını engellemek için çeşitli anti-inflamatuar ve antioksidan tedaviler denenmiş ve denenmeye devam edilmektedir (3). Ovaryan dokuyu koruyucu tedavi yaklaşımları üreme yeteneğinin devamı için gereklidir (28). Primer foliküllerin bulunduğu bölge detorsiyonun ardından en son hasar gören yer olduğundan malign olmayan olgularda, üreme yeteneği korunmak isteniyorsa konservatif tedavi önemlidir ve konservatif tedavi uygulanan çoğu olguda normal folikül gelişimi gözlenmiştir (29).

2.2. İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI

2.2.1. İskemi

Dokulara gelen kan akımının azalması veya tamamen kesilmesi sonucu doku veya organların oksijenden yoksun kalmasına bağlı ortaya çıkan patolojik değişikliklere iskemik hasar denilmektedir (30). Kan akımının azalması sonucu dokuya ulaşan oksijen de azalacağından hücrelerde ATP, adenosin, fosfokreatin gibi yüksek enerjili fosfatların tüketimi artar. Böylece hücrelerin enerji depoları boşalır ve hücre membranında bulunan iyon pompaları etkisiz hale gelir. İyon pompaları inhibe olduğundan hücre içi sodyum ve kalsiyum konsantrasyonu artar. Hücre içinde sodyumun artması pasif difüzyon ile hücre içine su girişine ve hücrenin şişmesine sebep olur. İskemi sırasında ATP üretimi durur, fakat kullanımı devam eder ve sırası ile ADP, AMP, adenosin, inozin ve hipoksantin oluşur. Sitosolik proteazlar ise hücre içi kalsiyum artışı ile aktive olur ve hücre içi hipoksantin dehidrogenaz enzimini ksantin oksidaza (XO) dönüştürür (31). İskemi olmadığı sürece aerobik metabolizmada hipoksantin hipoksantin dehidrogenazla olan metabolizmasında nikotinamid adenin dinükleotid kullanıldığı için ksantin oksidaz oluşmaz (32). Ancak iskemi uzadıkça oluşan ksantin oksidaz, hücrede geri dönüşümsüz hasarlara sebep olabilir (33).

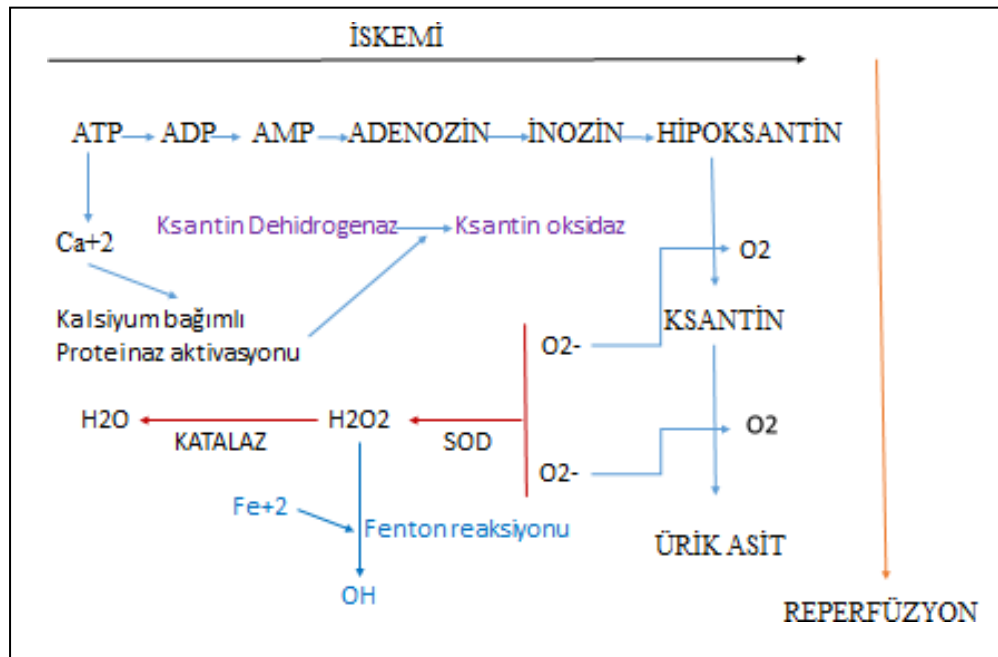


Şekil 2
İskemi sırasında hücrede olanlar

2.2.2. Reperfüzyon

Reperfüzyon dokunun yeniden kanlanması olarak tanımlanmaktadır. İskemi sonrası yapılması gereken; gecikmeden reperfüzyonu sağlamak olmalıdır. Ancak reperfüzyon sonrası dokunun yeniden oksijenlenmesi paradoksal olarak reperfüzyon hasarına sebep olmaktadır. Bu hasar iskemik hasara göre daha çok patolojiktir (33).

Bu iki hasarın hücrede birleşmesi literatürde iskemi/ reperfüzyon (I/R) hasarı olarak tanımlanmaktadır. I/R hasarı birbirleriyle ilişkili, karmaşık, hücresel ve humoral olaylar serisidir. I/R hasarının fizyopatolojisinden başlıca sorumlu dört faktör vardır; serbest oksijen radikalleri, polimorfonükleer lökositler (PMNL), kompleman sistemi ve endotel hücre. Bu dört faktör de reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumundan sorumludur (34). I/R hasarı sonrası ortamda ROT olarak süperoksit, hidroksit, peroksit, nitrik oksit, alkoksi, triklorometil, tiyl, fenildiazin, demir ve bakır radikalleri ve radikal olmayan hidrojen peroksit, singlet oksijen ve peroksinitrit reaktif olarak oluşur (30, 31, 33). İskemi esnasında oluşan XO reperfüzyonla gelen O₂'yi kullanarak hücrede birikmiş olan hipoksantini ksantine dönüştürür ve aşırı ROT oluşumuna da neden olur. Peroksinitrit, süperoksit anyonu (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂), hipoklorik asit ve hidroksil radikalleri (-OH) bu ROT'ları oluşturur. Oluşan bu reaktif oksijenler oldukça kolay şekilde hücre unsurlarıyla reaksiyona girebilir ve patolojik değişimlere sebep olur (30).



Şekil 3

İskemi-reperfüzyon hasarında ksantin oksidaz aracılı reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu.

ROT oluşumundan sorumlu bir diğer neden endotel hücreler ve reperfüzyonla bölgeye gelen inflamatuvar hücreler arasındaki etkileşimlerdir. I/R sırasında dokuya inflamatuvar hücrelerce salınan pro-inflamatuvar mediyatörler, polimorfonükleer lökositlerin bölgeye migrasyonuna ve adhezyonuna yol açar (31). Aktive olmuş polimorfonükleer lökositler (PMNL) ROT üretiminden sorumludur. PMNL oksidan etkili NADPH oksidaz, elastaz ve miyeloperoksidaz gibi enzimler taşır. Miyeloperoksidaz enzimi klorür iyonlarının varlığında hidrojen peroksidi hipoklorik aside indirger. Hipoklorik asit güçlü bir reaktiftir ve hücredeki birçok yapıyla reaksiyona girerek çeşitli patolojilere sebep olur (30). Ayrıca PMNL'den salınan IL-1, IL-6, IL-12, IFN γ ve TNF α gibi sitokin ve kemokinler ile elastaz ve kolajenaz gibi proteazlar bölgeye daha fazla inflamatuvar hücre toplanmasına ve daha fazla ROT üretimine yol açar (35). Ayrıca PMNL damar içinde hücre topluluğu oluşturarak ve aktif trombositlerle endotele yapışarak mikrovasküler tıkanmalara sebep olur (36).

Kompleman sisteminin aktivasyonuna endotel hücrelerinin işlevini kaybetmesi neden olmakla birlikte, bu sistem lökosit aktivasyonu ve kemotaksis uyarımıyla birlikte proinflamatuvar sitokin üretimini de uyarak inflamatuvar yanıtın şiddetini artırır (37).

I/R hasarında nitrik oksit (-NO) de ROT üretiminden sorumlu reaktif bir radikaldır. Hücrede normalde endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) enzimi tarafından çok az miktarda üretilir ve vazodilatasyon, düz kaslarda gevşeme, lökosit adhezyonunu engelleyici, trombosit fonksiyonları ve hücre içi sinyal iletiminde düzenleyici rol oynar (36). I/R de ortamda artan süperoksit endojen olarak bulunan -NO ile reaksiyona girerek oldukça reaktif ve potansiyel olarak toksik peroksinitrit (-ONOO) ve nitrojen trioksit (N₂O₃) oluşumunu sebep olur ve -NO'nin koruyucu etkilerinin azalmasına sebep olur (34). Çünkü normalde endotelin (ET) ve nitrik oksit (-NO) endotel tarafından sentezlenip hemostazdan sorumludur. Reperfüzyonda denge bozulur ve sonucunda arteriyel vazokonstriksiyon ile venöz vazodilatasyon meydana gelir (36).

Oluşan ROT'lar en çok lipit peroksidasyonu ile membran lipitlerine zarar verir. Lipit peroksidasyonu ile, membran üzerinde bulunan poliansatüre yağ asitleri okside olur. O₂⁻, -OH, H₂O₂ ve demir iyonları lipit peroksidasyonunu başlatan önemli radikallerdir. Lipit peroksidasyonunda ilk aşamada yağ asidi oluşur ve oluşan yağ asidi oksitlenerek peroksil radikalini oluşturur. Lipit peroksil radikalleri diğer çoklu doymamış yağ asidi moleküllerinden hidrojen atomlarını çıkararak yeni reaksiyonları başlatırlar ve son ürün olarak malondialdehit (MDA) oluşur. Bu nedenle oksidatif durumun göstergesi olarak MDA yaygın kullanılır. Oluşan MDA toksik olup membran

yapısal ve fonksiyonel zarar verecek yıkımlara sebep olabilir (38). MDA membran komponentlerinin polimerizasyonunu değiştirerek ve çapraz bağlanmalarına sebep olarak iç membran özelliğini değiştirir. Ayrıca hücre çekirdeğinin zarından difüze olarak DNA üzerinde mutajenik etki gösterir (39).

Proteinler ROT'lara yağlara göre daha dayanıklıdır. Ancak doymamış bağ ve sülfür içeren proteinler reaktiflerle kolayca etkileşime girerler. Yine karbonhidratların proteinlere bağlanmaları, proteinleri ROT'lara daha duyarlı kılar (40).

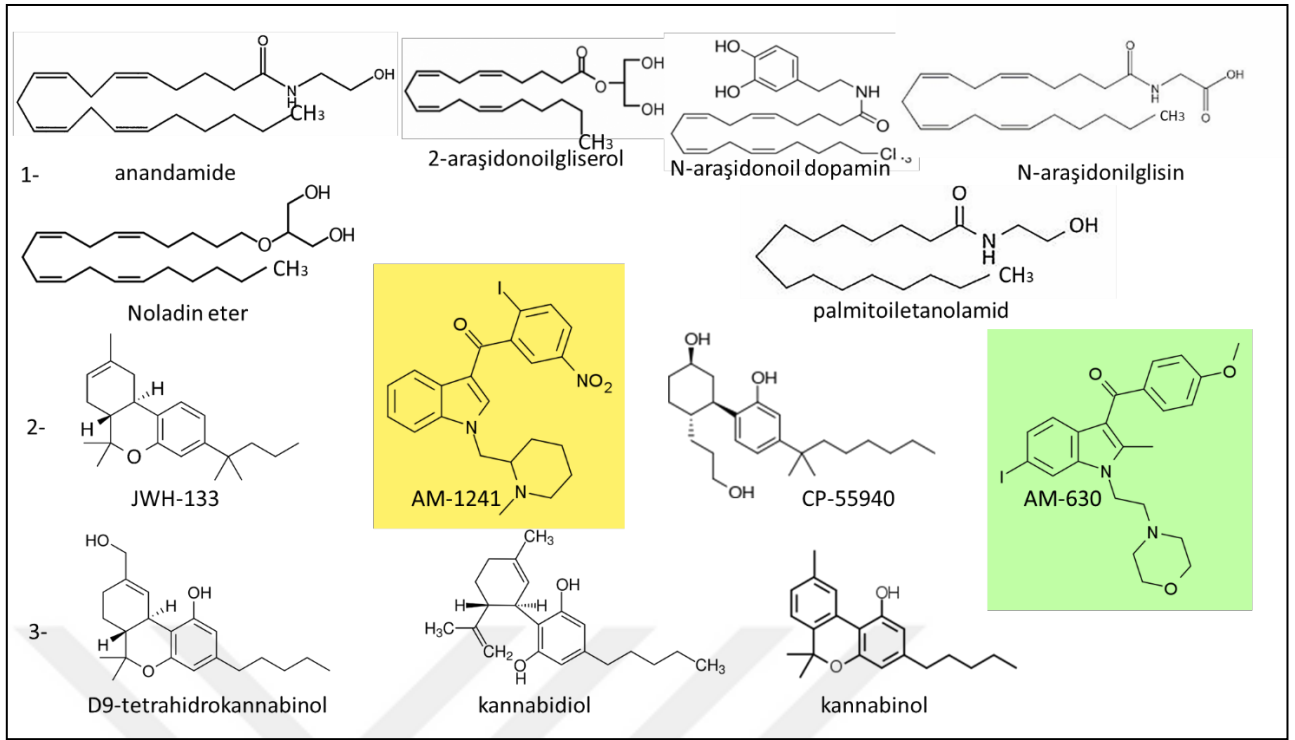
2.3. KANNABİNOİDLER

Kannabinoid reseptörlere bağlanan ligandlaraannabinoidler denmektedir. Kannabinoidler endojen ve eksojen kaynaklı olabilir. Endojen olanlar doğal olarak insan ve hayvan vücudunda sentezlenebilir. Hayvansal dokudan elde edilen ilk endokannabinoid anandamide (AEA) 1992 yılında domuz beyninden izole edilmiştir. Bilinen diğer endokannabinoidler ise; virodamin (OAE), 2-araşidonil gliserol (2-AG), N-araşidonil dopamin (NADA) ve 2-araşidonil gliserol eter'dir. Endokannabinoid medyatörler spesifik uyarıya cevaben hücre membranında lipit prekürsörlerinden sentezlenirler ve salınırlar (40).

Eksojenannabinoidler ise fitokannabinoidler ve sentetikannabinoidlerdir. Fitokannabinoidler Cannabis sp. (Cannabis indica, Cannabis sativa ve Cannabis ruderalis) tarafından üretilirler. Lif ve tohumu için üretilen Cannabis sativa esrar veya marijuana olarak bilinir. C. sativa, iştahsızlık, kusma, karın ağrısı, mide bağırsak yangısı, ishal, bağırsak yangısı ve diyabetik gastroparezis (mide boşalma güçlüğü) gibi hastalık ve semptomların tedavisinde kullanılır (41). Cannabis sp. nin ana aktif maddesi Δ^9 -tetrahidrokannabinol (D9-THC), iki tipannabinoid membran reseptörünü aktive eder. Bunlar CB1 ve CB2 reseptörleridir (42).

Sentetikannabinoidler ise endokannabinoidler ve fitokannabinoidlerden örnek alınarak meydana getirilen analoglardır. Fakat bazı yeni bileşikler endokannabinoidlerden ve fitokannabinoidlerden yapısal olarak farklıdır. Sıklıkla kullanılan sentetik cannabinoidler dronabinol, nabilone, rimonabant, JWH-018, JWH-133, dimetilheptilpiren, HU-210 ve WIN 55,212-2'dir (40).

Bütün bu cannabinoidlerannabinoid reseptörleri ile bağlandıklarında çeşitli biyolojik cevaplar oluştururlar.



Şekil 4

1- Endojen kannabinoidler 2- Sentetik kannabinoidler 3- Bitkisel kannabinoidler

2.3.1. Kannabinoidlerin fizyolojik etkileri

İnsanda kannabinoid alım şekline göre iki tip etki gözlemlenir. Akut alımda kalp atım hızında artma, konjonktival kızarıklık, fiziksel güçte azama, iştahta ve yiyecek alımında artma gibi birtakım akut fizyolojik etkilere yol açar. Marijuhananın insanlar üzerindeki subjektif etkileri; heyecanlanma ve fikir uçuşması, duyuların azalması, zaman ve mekan kavramlarının bozulması, duygulanım bozuklukları, illüzyonlar ve halüsinasyonlar şeklinde ortaya çıkar. Bu etkiler alkol ile beraber alındığında belirginleşir (43). Hayvan çalışmalarında kanabinoidler ‘etki tetradı’ adı verilen, azalmış spontan aktivite, analjezi, azalmış rektal ısı ve rijit immobilite (katalepsi)’yi içeren bazı davranış parametrelerini değiştirir. Bu farmakolojik etkiler kanabimimetik aktivitenin göstergesi olarak bilinir (44).

Kronik alımda ise solunum sistemi üzerinde kronik bronşit benzeri semptomlar ortaya çıkarmaktadır (öksürük, balgam, soluklanmada hışırtı vs.). Uzun süreli maruziyet ayrıca solunum sistemi kanserlerinin insidansını da artırmaktadır (42). İmmün sistem üzerinde rodentlerde hücresel ve humoral immüniteyi bozar ve enfeksiyonlara direnci düşürür. Ancak hayvanlarda bu etkiler çok yüksek dozlarda olduğundan insanlarda bu bulguların geçerli olup olmadığı bilinmemektedir. Üreme sistemi üzerinde hayvanlarda uzun süreli yüksek dozda D9-THC kullanımı düşük testosteron sekresyonu, bozulmuş

sperm üretimi ve motilitesi, bozulmuş ovulatuvar siklus ile sonuçlanır (43). Gebelikte marijuhana kullanımı ise düşük doğum ağırlığı, ileri dönemde davranışsal ve gelişimsel bozukluklar ile sonuçlanır (42). Davranışsal olarak kannabinoid kullanan adolesanlarda diğer bağımlılık yapıcı madde kullanım sıklığının da arttığı gösterilmiştir. Kanabinoidler hafıza, dikkat ve birçok kognitif fonksiyonda kullanım süresiyle orantılı olarak bozulmalara yol açmaktadır (44). Hayvanlar ve insanlar D9-THC'un tekrarlayan dozlarında subjektif ve kardiyovasküler etkilerine tolerans geliştirirler. Maddenin ani kesilmesi ile yoksunluk sendromu geliştiği bildirilmiştir. Yine uzun süreli kullanımda konfüzyon, amnezi, delüsyon, hallüsinasyon, anksiyete ve ajitasyon bildirilmiştir. Ayrıca kanabinoidlerin şizofreniyi şiddetlendirebildiği de bilinmektedir (43).

2.3.2. Kannabinoid sistem ve reseptörleri

Önceleri hidrofobik olmasından dolayı, önceleri D9-THC'in farmakolojik etkilerini tamamen hücre membranlarını nonspesifik yolla geçerek ve membranla bağlantılı enzimleri uyararak veya inhibe ederek ya da iyon kanallarını değiştirerek ortaya çıkardığı düşünülüyordu (45). Ancak D9-THC'in etkilerinin stereoselektif olduğunun anlaşılmasıyla bu hipotez kısmen geçerliliğini kaybetti. Daha sonra D9-THC'in ve diğer kanabinoid bileşiklerinin etki ettiği spesifik kanabinoid reseptörlerinin varlığı kanıtlandı. Bu membran reseptörünün keşfi endokannabinoid sistem olarak adlandırılan yeni bir endojen yolağın anlaşılmasını sağlamıştır. Endokannabinoid sistem kannabinoid reseptörler, endokannabinoidler ve onların sentezi ve inaktivasyonlarında görevli proteinlerden meydana gelmektedir. Endokannabinoidler, kannabinoid reseptörler aracılığıyla onların aktivitelerini arttırırlar (42). Kanabinoidlerin bugün bilinen 2 tip reseptörü vardır; CB1 ve CB2. Bu reseptörler yedi hidrofobik transmembran bölgesi, bir ekstraselüler N-terminali ve bir intraselüler C-terminali içeren karakteristik G proteini ile eşleşmiş reseptör yapısına sahiptirler (46).

Hem CB1 hem CB2 reseptörleri inhibitör G proteinleri (Gi/o) ile eşleşmiş, G protein aracılı reseptörler ailesine aittir (47). Her iki tip reseptör de hücre düzeyinde adenilat siklazı inhibe edip, mitojenle etkileşen protein kinazı (MAPK) aktive ederken, CB1 reseptörleri ayrıca presinaptik N ve P/Q tipi Ca²⁺ kanallarını inhibe edip, içe akımlı rektifiye edici K⁺ kanallarını aktive ederler. MSS'de CB1 reseptörleri bulunurken, periferde hem CB1 hem de CB2 reseptörleri bulunur. Bu nedenle kanabinoidlerin santral etkilerinden yalnızca CB1'in, periferik etkilerinden ise daha çok CB2'nin sorumlu olduğu sanılmaktadır (48).

İlk tanımlanan reseptör CB1 reseptörüdür. Bu reseptör hem MSS’de hem de periferik dokularda bulunan spesifik, yüksek afiniteli kannabinoid bağlanma alanıdır. CB1’in merkezi sinir sisteminde dağılımı gamma-aminobutirik asit ve glutamat-iyon kanalları ile ilişkilidir. CB1, sinyal geçişlerinin nöromodülasyonunda görev alır ve GABA-erjik ve glutamaterjik nöronların üzerinde presinaptik bölgede lokalize olmuştur. Beyinde bu alanlarda homojen olarak dağılmazlar; özellikle hareketin kontrolü, duyu algılanması, bilinç ve kısa süreli hafızadan sorumlu alanlar (serebral korteks ve hipokampus) ile motor fonksiyon ve hareketten sorumlu alanlarda (bazal ganglionlar ve serebellum) en yoğun oranlarda bulunurlar. MSS dışında kalp, akciğer, sindirim sistemi, karaciğer, böbreküstü bezi, idrar kesesi, plesenta, uterus, ovarium, testis, deri ve yağ doku gibi periferik dokularda bulunurlar. Ayrıca, CB1 çevresel sinir sonlarında ve damar endotelyumunda bulunurlar. Spesifik kanabinoid CB1 bağlanma alanları içeren insan ve hayvan dokuları ayrıca reseptör proteinini kodlayan cDNA ve mRNA içerirler. CB1 reseptör geni 6. kromozomun q14- q15 bölgelerinde bulunur ve faredeki CB1 reseptör geni 4. kromozomun proksimalinde, insandaki 6q genlerinin homologlarına yakın bulunur (48). Erişkin rat beyinde CB1 reseptör ekspresyonu normal koşullarda stabildir. Ancak kannabinoid reseptörleri değişen koşullara adapte olabilirler. Adaptasyon özellikle kannabinoid toleransı gelişiminde, gelişme ve yaşlanmada, nörolojik bozukluklarda (huntington hastalığı, parkinson hastalığı, serebral iskemi, nöropatik ağrı, şizofreni vs.) gözlenir. CB1 reseptörlerinin çoğu presinaptik nöronlarda yer alırlar. Ayrıca nöronlarda olduğu kadar astrositlerde de bulunurlar. Astrositlerde CB1 aktivasyonu beyne enerji sağlayan glukoz oksidasyonu ve ketogenezin artmasıyla sonuçlanır (49).

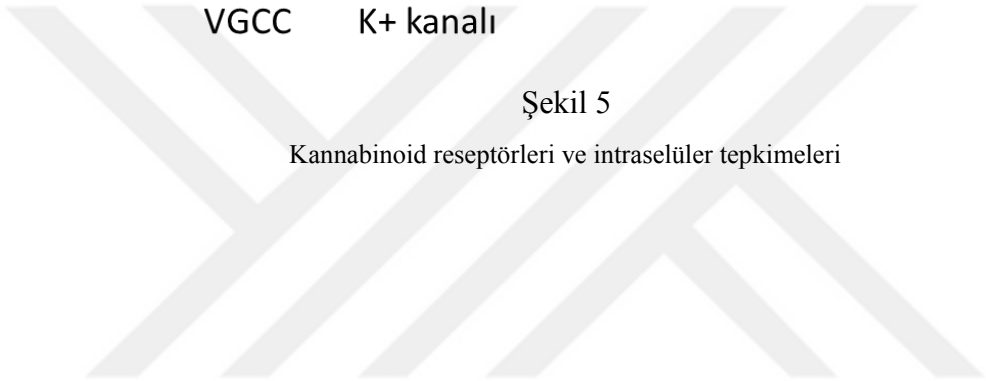
İkinci bir tip kannabinoid reseptörün varlığını gösteren genetik materyal ilk olarak 1993’te elde edilmiştir. Bu CB2 reseptörünün sadece MSS dışında bulunduğu tespit edilmiştir. CB2 reseptörleri kan hücreleri ve immün sistemde bulunur (özellikle B hücreleri, mast hücreleri, T4-T8 hücreleri, natural killer hücreler ve makrofajlar). CB2 reseptörünün aktivasyonu (Gi/o proteininin alt birimi üzerinden) adenilat siklazı inhibe eder ve sonuçta bir çeşit protein kinaz aktive olur. CB1 reseptörlerinin aksine CB2 reseptörü Q tipi Ca^{+2} kanalları veya içe akımlı rektifiye edici K^{+} kanalları ile eşleşmez. CB2 geni kromozom 1 (1p36,11) üzerinde lokalize olur. CB2 reseptör mRNA’sı, hem prenatal hem de postnatal hayatta saptanmıştır. CB2 immün sistem ile ilişkili olan dokularda eksprese edildiği için bu reseptörler immunokannabinoid sistem reseptör olarak da isimlendirilir (48). Ayrıca yapılan yeni çalışmalarda CB1-CB2 reseptörleri

olmayan farelerde kannabinoid aktivitesine dair farmakolojik kanıtlar elde edilmesi henüz klonlanmamış kannabinoid reseptörlerinin varlığına işaret etmektedir (50).

Kannabinoidler tarafından aktive edilen farklı reseptörler de tespit edilmiştir. GPR-55, GPR-18 ve GPR-119 kannabinoid ligandlar ile etkileşebilen ve CB1/CB2 dışındaki mekanizmaları aktive edebilen iki varsayılan reseptördür. GPR-55 çeşitli kannabinoidler tarafından aktive edildiği rapor edilmiştir (50). Ancak, GPR-18 endojen AEA için bir reseptördür (51). Bu reseptörlerin tam rolü bilinmemekle birlikte, çalışmalar GPR-55'in kardiovasküler sistem, inflamasyon ve ağrıda önemli olabileceğini bildirmektedir (50, 51). Kannabinoidler için bir diğer hedef TRPV-1'dir ve TRPV-1 birçok yangısal medyatör, kapsaisin ve endokannabinoid tarafından aktive edilebilir (52, 53).

Genel olarak klasik kannabinoid reseptörleri olan CB1 ve CB2, Gi/o proteinlerine kanonik olarak bağlanan G protein kenetli (GPCR) reseptörlerdir. Bu nedenle CB1, CB2 reseptörlerinin etkisiyle adenilat siklazın aktivitesinde azalmaya, Ca^{+2} kanallarının inaktivasyonuna ve içe akımlı rektifiye edici K^{+} kanallarının ters yönlü çalışarak dışarı K^{+} atımına sebep olur. Bunlar nörotransmitter salımının inhibisyonu ile ilişkili sinyal iletim sistemleridir. Adenilat siklazın (AC) inhibisyonu $G\alpha$ 'ın aktivasyonu ile gerçekleşir ($G\alpha$ 'dan dolayı aracılı sinyallerle). Aktivasyon $\beta\gamma$ alt birimlerinin birleşip açığa çıkmasından dolayı voltaj duyarlı kalsiyum kanallarının (VGCC) inhibisyonu ile sonuçlanır. Ayrıca CB2 reseptörleri CB1 reseptörlerine göre $\beta\gamma$ alt birimleri vasıtasıyla iyonların yer değişiminde etkisizdir. PKA inhibisyonuna ek olarak CB1 ve CB2 reseptör sinyalleri nükleer transkripsiyon faktörlerini ve sonuç olarak gen ekspresyonunu düzenleyen MAPK'nın aktivasyonunun azalmasına sebep olur. GPR-18 Gi/o proteinlerine bağlanır oysa GPR-55 $G\alpha_{12/13}$ aracılı intraselüler Ca^{+2} artışı ile ilişkilidir (51). Şekil 5'te bu reseptörler ve hücre içi yolları gösterilmiştir.

Endokannabinoid sistem inflamatuvar hastalıklarda, kanser türlerinde, metabolik, kardiovasküler, gastrointestinal hastalıklarda ve ürogenital sistem hastalıklarında umut veren yeni bir terapötik hedef olarak ortaya çıkmış ve kannabinoidler bu alanda çalışılmaktadır (5, 6, 46, 49, 41, 48, 53).



Kannabinoid reseptörleri ve intraselüler tepkimeleri

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan AM1241, AM630 ve DMSO Sigma'dan alınmıştır.

3.2. Hayvanlar

Deneyde toplam 28 adet dişi Wistar-albino sıçan kullanıldı (200-250 g ağırlığında). Etik Kurul Belgesinin Adıyaman Üniversitesi Etik Kurulu tarafından sertifikalandırılmasının ardından (2018/024), her grupta 5-6 hayvan olacak şekilde rastgele 5 gruba ayrıldı. Oda sıcaklığında ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), 12 saat aydınlık: 12 saat karanlık döngüsünde tutuldu ve ticari sıçan yemi ve musluk suyu ile beslendi. Cerrahi operasyonlardan bir gece önce aç bırakıldılar ve su içmeleri sınırlandırılmadı.

3.3. İskemi ve reperfüzyonun yapılması ve grup adlandırmaları

Grup 1. Şam kontrol Grubu: Sıçanlar 50 mg/kg IP ketamin ve 5 mg/kg IP xylazine ile uyutulduktan sonra alt karın bölgesine yaklaşık 2 cm cerrahi kesi yapıldı. Her iki over, uterus boynuzları ve adneks 1 dakika boyunca gözlendi ve daha sonra karın duvarı 3-0 ipek dikişlerle kapatıldı. 3 saatlik bir süre sonra tekrar cerrahi operasyon uygulandı ve her iki yumurtalık cerrahi olarak çıkartıldı. Serum sitokin seviyeleri ölçümü için kan alındı.

Grup 2. İskemi/reperfüzyon Grubu: Sıçanlar 50 mg/kg IP ketamin ve 5 mg/kg IP xylazine ile uyutulduktan sonra alt karın bölgesine yaklaşık 2 cm cerrahi kesi yapıldı ve her iki over, uterus boynuzları ve adneks 30 dakika boyunca klemp ile kapatıldı. 2,5 saatlik reperfüzyonun ardından tekrar cerrahi operasyon uygulandı ve her iki yumurtalık cerrahi olarak çıkartıldı.

Grup 3. CB2 agonist+iskemi/reperfüzyon Grubu: CB2 agonisti operasyondan 3 gün önceden başlayarak günde 3 mg/kg dozda İP olarak verildi. 3. uygulamanın ardından sıçanlar anestezide alındı ve Grup 2'deki işlemler uygulandı.

Grup 4. CB2 antagonist+Agonist+İskemi/reperfüzyon: CB2 antagonist ve agonisti 10 dakika arayla operasyondan 3 gün önceden başlayarak günde sırasıyla 1 mg/kg ve 3 mg/kg dozda İP olarak verildi ve grup 2' deki işlemler uygulandı.

Grup 5. İskemi/reperfüzyon+DMSO (CB2 agonist ve antagonist çözmek amacıyla): DMSO operasyondan 3 gün önceden başlayarak günde 0,5 ml İP olarak verildi ve grup 2'deki işlemler uygulandı.

3.4. Örneklerin toplanması

Over dokusu +4 C derecedeki serum fizyolojik ile yıkandıktan ve kurutulduktan sonra tartıldı. Tartım sonrası 4 parçaya bölündükten sonra ependorf tüpleri içine konuldu ve incelenene kadar -86 C derecede saklandı.

3.5. Doku ve serum sitokin seviyelerin ölçümü

Ovaryum dokusu ve serumdaki TNF- α ve IL-1 β seviyeleri, üreticilerin kitlerine göre ELISA yöntemi ile ölçüldü (Thermo Fisher Scientific, Inc). Bu işlem 2 kez gerçekleştirildi. Sonuçlar pg /ml serum ve pg/g doku olarak ifade edildi.

3.6. Malondialdehit (MDA) ölçümleri

Ovaryum dokularında lipit peroksit seviyeleri, MDA konsantrasyonları olarak, daha önce tarif edilen yöntemle göre ölçüldü (54). Kısaca, doku örnekleri bir buz banyosunda homojenize edildi, bir buz banyosunda, bir ultrasonik doku homojenleştiricisi ile g doku başına 10 ml %10 TCA ilave edilerek soğuk TCA homojenleştirildi. Homojen doku 15 dakika boyunca 3000 g santrifüjden sonra, 500 μ l süpernatant eşit hacimde %0.67 TBA ile karıştırılmış ve 15 dakika boyunca 100°C' a ısıtılmıştır. Numunelerin absorpsiyonları daha sonra 535 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Her deney iki defa yapıldı.

3.7. Glutatyon (GSH) seviye ölçümü

Ovaryum dokusu numunelerinin GSH içerikleri, modifiye Elman metodu (55) ile ölçülmüştür. Yukarıda tarif edilenle aynı homojenizasyon prosedürü kullanılarak elde edilen 0.5 ml süpernatana 2 ml 0.3 M Na₂HP0₄ çözeltisi ilave edildi. Karışıma 0.2 ml DTNB çözeltisi ilave edildi ve 412 nm'de absorbans vorteks işleminden hemen sonra ölçüldü. Her deney iki kez tekrarlandı.

3.8. İstatistik analiz

Grup başına 6 hayvan için veriler, ortalama SD değeri olarak ifade edilir. Bu çalışmada tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmış ve çoklu karşılaştırmalar için Bonferroni post hoc testi takip edilmiştir. CB2 reseptörü agonisti ve / veya antagonistin iskemi/reperfüzyon kaynaklı inflamatuvar süreçlerdeki farmakolojik rolleri İ/R gruplarındakilerle karşılaştırıldı. P <0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu düşündürdü.

4. BULGULAR

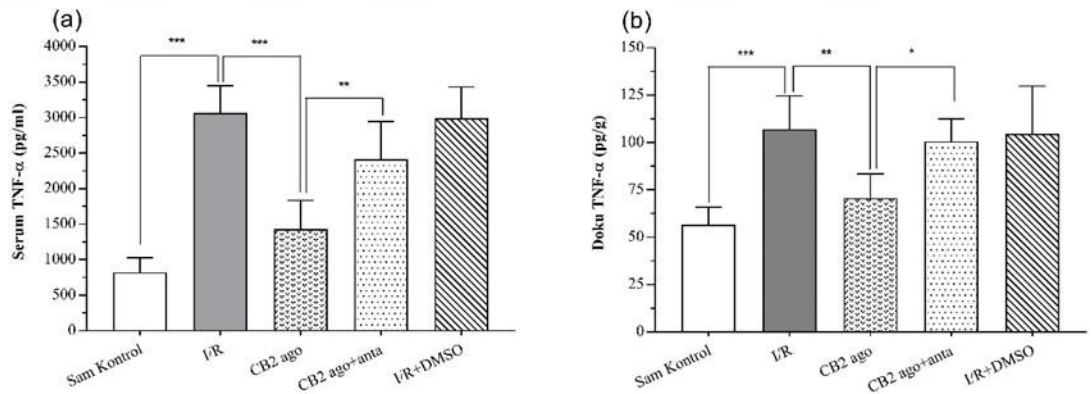
4.1. Serum ve ovaryum sitokin seviyelerinin miktarı

Bu çalışmada hem serum ve hem de ovaryum dokusunun IL-1 β ve TNF- α seviyeleri ölçülmüştür. Şekil 6 (a)'de görüldüğü gibi şam kontrole göre (823,33 $\pm$ 206,56, pg/ml) ovaryumların İ/R ile indüklenmesi serum TNF- α seviyesini önemli derecede artırdığı (3066,67 $\pm$ 381,66, pg/ml) görülmektedir. Agonist ovaryum İ/R hasarını, serum TNF- α açısından, önemli derecede azalttı (1434,67 $\pm$ 400,91, pg/ml).

Sistemik agonist öncesi antagonist verilmesi, agonistin ovaryum İ/R hasarını azaltıcı etkisini tersine çevirmiştir. İstatistiksel olarak İ/R grubu ile hem şam grubu ve hem de agonist grubu karşılaştırıldığında P değeri p<0,001 olarak bulunmuştur. Ayrıca, agonist grubu ile antagonist grupları karşılaştırıldığında P=0,0029 olarak bulunmuştur.

Şekil 6(b)'da görüldüğü gibi, şam grubu (56,02 $\pm$ 9,16, pg/g) ile karşılaştırıldığında ovaryum TNF- α seviyesinin İ/R grubunda (107,01 $\pm$ 17,72, pg/g, P=0,0002) önemli derecede arttığı görülmektedir. Agonist (70,54 $\pm$ 12,82, pg/g), doku TNF- α seviyesini önemli derecede azaltmış ancak antagonist (100,71 $\pm$ 11,07, pg/g, P=0,039) ise agonistin bu azaltıcı etkisine engel olmuştur.

DMSO grubu sonuçları İ/R ile karşılaştırıldığında anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 6

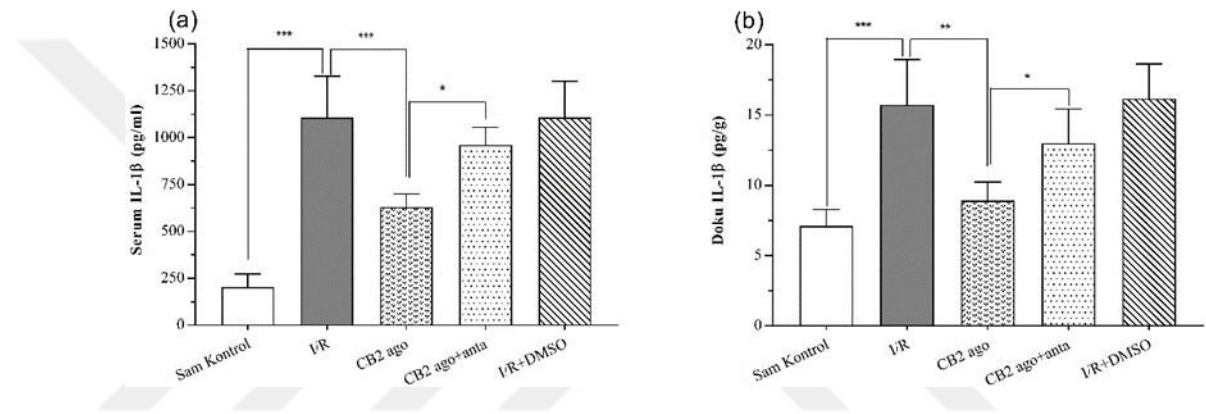
CB2 agonistinin serum (a) ve ovaryum dokusunda TNF- α düzeylerine etkisi. CB2 agonisti dozu 3 mg/kg; CB2 antagonist dozu 1 mg/kg; *P <0,05; **P<0,01, ***P<0,001. İstatistiksel farklılıkları belirlemek için Bonferroni'nin post hoc testi ile takip ettiği tek yönlü ANOVA testi kullanıldı; Ortalama değer $\pm$ SD (n=5-6).

İnflamasyonun önemli belirteçlerinden bir diğeri de IL-1 β 'dir. Bu sitokin hem doku ve hem de serumda seviyelerinin artması inflamasyonun şiddetinin bir ölçüsüdür. Bu bağlamda, ovaryum dokusunda İ/R hasarının boyutunu ölçmek için IL-1 β seviyeleri ölçülmüştür. Serumda, şam grubu ile İ/R grubu karşılaştırıldığında, aralarında

istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur (sırasıyla, $204,33 \pm 68,84$, $1106,81 \pm 222,62$, pg/ml, $P < 0,001$). Agonistin ($631,17 \pm 68,92$, pg/ml, $P 0,0058$), İ/R hasarının neticesinde artmış olan bu IL-1 β seviyesini azaltıcı rol oynadığı ve antagonistin ise agonistin azaltıcı etkisine engel olduğu bulundu (şekil 7(a)).

Ovaryumda IL-1 β seviyesi açısından şam grubu ($7,11 \pm 1,87$, pg/g) ile İ/R grubu ($15,73 \pm 3,23$, pg/g) karşılaştırıldığında, aralarında önemli farklılıklar bulunmuştur ($P < 0,001$)(şekil 7(b)). Agonist grup ($8,92 \pm 1,33$, pg/g) ile antagonist grup ($13,01 \pm 2,45$, pg/g) karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel anlamlılık bulunduğu gözlemlenmiştir ($P = 0,046$).

DMSO grubu İ/R grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 7

CB2 agonistinin serum (a) ve ovaryum dokusunda IL-1 β düzeylerine etkisi. CB2 agonisti dozu 3 mg/kg; CB2 antagonist dozu 1 mg/kg; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. İstatistiksel farklılıkları belirlemek için Bonferroni'nin post hoc testi ile takip ettiği tek yönlü ANOVA testi kullanıldı; Ortalama değer $\pm$ SD (n=5-6).

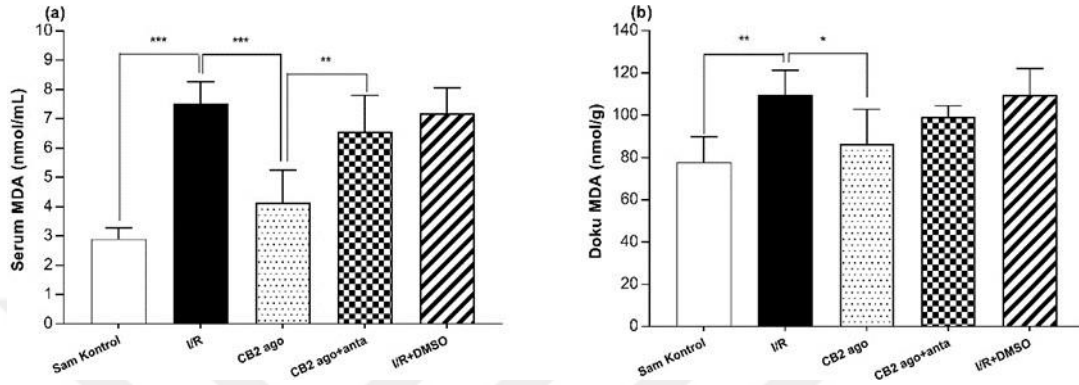
4.2 Serum ve ovaryumda oksidasyon ve antioksidasyon parametreleri

Şam grubu ($2,91 \pm 0,39$, nmol/ml) ile karşılaştırıldığında ovaryumun İ/R ($7,51 \pm 0,75$, nmol/ml) ile indüklenmesinin serum MDA konstantrasyonunu artırdığı bulundu ($P < 0,001$). Agonist ($4,14 \pm 1,11$, nmol/ml) grupta serum MDA konstantrasyonu İ/R, Agonist+Antagonist ($6,56 \pm 1,24$, nmol/ml) ve DMSO ($7,18 \pm 0,87$, nmol/ml) gruplarından önemli derecede daha düşük bulundu. Agonistin faydalı etkisi, antagonist tarafından bloke edildi ($P = 0,001$) (şekil 8 (a)).

Ovaryum MDA seviyesi açısından şam grubu ($77,66 \pm 12,28$ nmol/g) ile İ/R grubu ($109,06 \pm 11,04$, nmol/g) karşılaştırıldığında, İ/R grubunun MDA seviyesinde önemli derecede artışa neden olduğu ($P = 0,010$) bulundu. Ayrıca CB2 agonistinin

(86,50±16,32, nmol/g) MDA seviyesinde önemli derecede azalmasına neden olduğu bulunmuştur. CB2 agonistinin dokudaki MDA seviyesinin bu iyileştirici etkisinin antagonist (99,11±5,07, nmol/g, P=0,39) tarafından etkilenmediği görülmektedir (şekil 8(b)).

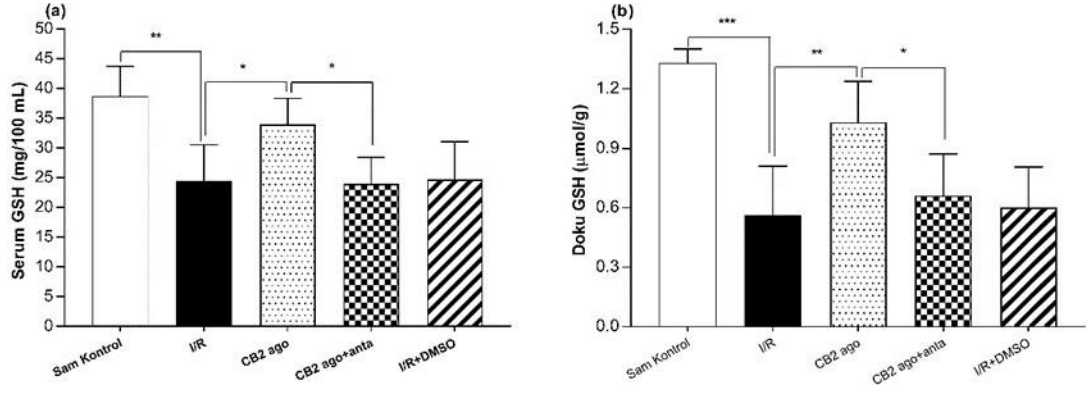
DMSO grubu İ/R grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 8

CB2 agonistinin serum (a) ve ovaryum dokusunda MDA düzeylerine etkisi. CB2 agonisti dozu 3 mg/kg; CB2 antagonist dozu 1 mg/kg; *P < 0,05; **P < 0,01, ***P < 0,001. İstatistiksel farklılıkları belirlemek için Bonferroni'nin post hoc testi ile takip ettiği tek yönlü ANOVA testi kullanıldı; Ortalama değer ±SD (n=5-6).

Ovaryum hasarının derecesini belirlemek için diğer kriter ise, ovaryum dokusunda ve serumda GSH seviyesidir. Şekil 9(a,b) de görüldüğü gibi, İ/R grubu (24,51±6,06, mg/100 ml, 0,56±0,25, µmol/g) ve şam kontrol grubu (38,06±5,08, mg/100 ml, 1,33±0,07, µmol/g), serum ve dokuda GSH seviyelerinin anlamlı derecede azaldığı bulundu. Agonist grup (34,31±4,27, mg/100 ml, 1,07±0,21, µmol/g) ve İ/R grubu GSH düzeyi açısından karşılaştırıldığında, serum ve dokuda GSH seviyelerinin anlamlı olarak arttığı bulundu. DMSO grubu İ/R grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 9

CB2 agonistinin serum (a) ve ovaryum dokusunda GSH düzeylerine etkisi. CB2 agonisti dozu 3 mg/kg; CB2 antagonist dozu 1 mg/kg; *P <0,05; **P<0,01, ***P<0,001. İstatistiksel farklılıkları belirlemek için Bonferroni'nin post hoc testi ile takip ettiği tek yönlü ANOVA testi kullanıldı; Ortalama değer $\pm$ SD (n=5-6).

5. TARTIŞMA

Kendi uzun eksenini etrafında 45° den fazla dönmesi ile oluşan uterus over torsiyonu nadir görülen vakalardan biri olmasına rağmen, tedavi edilmediği takdirde kısırlığa kadar ilerleyebilmektedir (56). Uterus over torsiyonu sonucu oluşan doku hasarı İ/R hasarı ile benzerlik göstermektedir (57). Reaktif oksijen türlerinin (ROT) yanında TNF- α ve IL-1 β gibi sitokinler, malondialdehit, glutatyon da doku patogenezesinde rol oynamaktadır (58). ROT, biyokimyasal reaksiyonların bir sonucu olarak hücreler tarafından oluşturur. Ayrıca, İ/R hasarı nedeniyle nötrofillerin birikmesi oluşan ROT 'un artmasına da neden olur (57).

Bu çalışma, CB2 reseptörünün sıçanlarda ovaryum İ/R hasarına karşı ana terapötik rolünü göstermiştir. Sonuçlar özellikle CB2 reseptörünün ovaryum dokusunun post-iskemik reperfüzyon hasarında ovaryum doku sitokin seviyelerindeki azalışını, doku iyileşmesini ve farmakolojik tepkilerini vurguladı. Ek olarak, iskemi patojenezine ve reperfüzyona bağlı ovaryum hasarı sonuçlarına aracılık eden polimorfonükleer lökositlerin göçü, hücre zarı lipidinin peroksidasyonunun artması, antioksidan savunmaların tükenmesi ve pro-inflamatuar sitokinlerin aşırı ekspresyonu gösterildi. Mevcut sonuçlar CB2 agonist uygulamasının, lipid peroksidasyon üretiminin tüketilen glutatyonu tersine çevirdiğini, TNF- α ve IL-1 β 'nın ekspresyonunu inhibe ettiğini, sıçan ovaryum I/R hasarında MDA oluşumunu önemli ölçüde azalttığını ortaya koydu (59). Yine CB2 agonistin etkileri ovaryum İ/R hasarında CB2 antagonist uygulaması ile birlikte doğrulandı (54, 60, 61).

Bu çalışmada İ/R hasarının, uterus düz kaslarının kasılmasını önemli ölçüde önlediği gösterilmiştir. Bu çalışmanın sınırlılığı, uterus düz kastaki elektrik stimülasyonu büzülmesinin yanıtları olmadan planlama yapmaktır. Çalışmalarımız, CB2 ile kolinerjik veya diğer otonomik kontrol sistemleri arasındaki reseptör mekanizmalarının etkileşimi ile ilgili in vitro çalışmaların deney süreçlerini içermiyordu. CB2 reseptörü agonisti, in vivo olarak sıçanların periton içine uygulandı. Bu in vivo çalışmanın, ovaryum İ/R' da eksojen agonist uygulaması ile CB2 reseptör aktivitesinin terapötik değerini gösterdiği anlamına gelir.

Bu çalışmada CB2 reseptör agonistinin potansiyel etkisinin anti-inflamatuar, antioksidan etkiler olduğu ve savunma sistemleri üzerindeki mikro dolaşım gibi fizyolojik faktörlere faydalı olduğu gösterilmiştir. CB2 reseptör agonistinin önceden uygulanmasıyla, serum ve ovaryum dokusunun MDA miktarı şam gruptaki seviyeye düşmüştür. Önceki bulgular ile tutarlı olarak, mevcut araştırmanın sonuçları; İ/R

grubunda, serum ve ovaryum dokudaki GSH içeriğinin şam gruba kıyasla azaldığını, CB2 agonist uygulamasının serum ve ovaryum dokularındaki GSH seviyesini arttırdığını göstermiştir. Böylece CB2 agonistinin oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (62).

Ovaryumda kan dolaşımının tamamı veya bir kısmının başta sezeryan olmak üzere cerrahi müdahalelerde veya travmatik olaylarda geçici olarak bloke edilmesi İ/R hasarına sebep olabilir (59). Dokulardaki hasarın oluşması, iskemi kaynaklı olarak oksijenin yeniden girişi olan reperfüzyona dayanır. Başka bir deyişle, fizyolojik canlı hücreler için iskeminin ardından reperfüzyon, reperfüzyon olmadan iskemiden daha fazla zarar vermektedir (63). Bu hasarın bir mekanizması, reperfüzyonun aktif nötrofillerin göçü ve ROT oluşumu nedeniyle iskemik hasarın zararlı etkilerini arttırmasıdır (64). Ovaryum dokusunun İ/R indüklü lipid peroksidasyonu, CB2 agonistinin eksojen uygulamasıyla önemli ölçüde tersine çevrilir (54). Sonuçlarımız, CB2 reseptör aktivitesinin İ/R kaynaklı ovaryum hasarını önlediğini ve İ/R' a maruz kalan ovaryum hücrelerinde bulunan glutatyon tükenmesini tersine çevirdiğidir. Glutatyon hemen hemen tüm hücrelerde bulunur ve vücuttaki en önemli enzim olmayan antioksidanlardan biridir. Akademik alanlar çok iyi biliyor ki, endojen antioksidan tiyol rezervuarı GSH, canlı hücrelerin yaralanmasının patogeneğinde, ROT detoksifikasyonunda ve İ/R kaynaklı ovaryum hasarında çok önemli bir rol oynuyor. İskemik hücrelerde artmış lipid peroksidasyonu belirgindir (65). Deneysel İ/R ovaryum hasarının inflamatuvar mediatörlerin etkisini hafifleten antioksidan ajanlarla tedavisi umut verici etkiler göstermiştir (7, 65).

Birçok çalışma CB2 reseptörü aktivasyonunun immünomodülatör etkiler sağladığını göstermiştir (67). Ovaryum hücre hasarındaki uyarılmış sitokinler CB2 aktivasyonu ile azaltılabilir (68). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, CB2 reseptörünün aktivasyonu ile TNF- α ve IL-1 β içeren proinflamatuvar sitokinlerin aşırı üretiminin baskılanmasının, abartılı bağışıklık veya astım, inflamatuvar barsak hastalığı, romatizmal artrit, kolit, nörodejeneratif hastalıklar, koroner ateroskleroz ve hastalık gibi modellerin inflamasyonunda meydana geldiğini ortaya koydu (68, 69). Sonuçlarımız, agonist uygulama yoluyla CB2 reseptörü aktivasyonunun, ovaryum İ/R hasarında hem ovaryum dokusunu ve hem de serum TNF- α ve IL-1 β ekspresyonlarını inhibe ettiğini gösterdi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İ/R'a bağlı hasarlanmada anoksiyi azaltmak için tedavi stratejileri;

1. Reperfüzyon zedelenmesinde periyodu bozulmuş oksidan/antioksidan redoks sisteminin dengesini sağlamak için antioksidan takviyesi vermek,
2. Dokudaki iltihabın akut ve başlangıçtaki tepkilerini engellemek için inflamatuvar polimorfonükleer hücrelerin göçünü kontrol etmek,
3. TNF- α ve IL-1 β gibi provokatif ve pro-enflamatuvar sitokinlerin üretimini inhibe etmek ve son olarak endotel ve indüklenabilir enflamatuvar hücrelerde fizyolojik savunma sistemi yoluyla anti-enflamatuvar rolü olan endojen reseptör aktivasyonlarını desteklemek üzerine kuruludur.

Bu araştırmanın sonuçları bunlara destek olan makalelerin verileri ile birlikte ele alındığında, CB2 reseptörünün agonistik aktivitesi, en azından kısmen yukarıda bahsedilen tedavi stratejileri ve mekanizmalarıyla ilişkili olan ovaryum iskemi reperfüzyon hasarının iyileşmesini sağlar. Bununla birlikte, bu alanda daha fazla araştırma yapılması, ovaryum İ/R hasarında moleküler yolların daha ayrıntılı olarak tartışılması için gereklidir.

Ayrıca, CB1 reseptörü aktivasyonunun birçok doku İ/R hasarındaki rolleri araştırılmasına rağmen bu çalışmada CB1 agonisti araştırılmamıştır. Bu bağlamda gelecekte CB1 reseptör agonistinin ovaryum İ/R hasarı üzerine etkisi araştırılabilir.

BİLGİLENDİRME

Bu tez Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi Tarafından TIPFYL 2019/00001 no ile desteklenmiştir.

KAYNAKÇA

1. Yayla M, Cetin D, Adali Y, Aksu Kilicle P, Toktay E. Potential therapeutic effect of pomegranate seed oil on ovarian ischemia/reperfusion injury in rats. *Iran J Basic Med Sci.* 2018;21(12):1262–8.
2. AĞARTAN ES. Sıçanlarda Ovaryum İskemi-Reperfüzyon Hasarı: 3',4'-Dihidroksiflavanol'un Lipit Peroksidasyonuna Etkisi. Selçuk Üniversitesi; 2017.
3. ERENER AYDIN E. Ratlarda Over Torsiyonunda İntraperitoneal Ghrelin Uygulamasının İskemi/Reperfüzyon Hasarı Üzerine Etkisi. Sağlık Bilimleri Üniversitesi; 2018.
4. AY G. Over İskemi-Reperfüzyon Hasarı Üzerine Antioksidanların Etkileri. Fırat Üniversitesi; 2001.
5. Kumar V, Torben W, Mansfield J, Alvarez X, Vande Stouwe C, Li J, et al. Cannabinoid Attenuation of Intestinal Inflammation in Chronic SIV-Infected Rhesus Macaques Involves T Cell Modulation and Differential Expression of Micro-RNAs and Pro-inflammatory Genes. *Front Immunol.* 2019;10(April):914.
6. Bai J, Ge G, Wang Y, Zhang W, Wang Q, Wang W, et al. A selective CB2 agonist protects against the inflammatory response and joint destruction in collagen-induced arthritis mice. *Biomed Pharmacother.* 2019;116(February).
7. Şahin Ç, Yıldırım N, Hortu İ, Akdemir A, Özşener S, Yiğittürk G, et al. Tadalafil attenuates ischaemic damage as well as reperfusion injury in the rat ovary. *J Turkish-German Gynecol Assoc.* 2019;(xxx):0–0.
8. Ozlem K, Birkan Y, Mustafa K, Emin K. Protective effect of Vaccinium myrtillus on ischemia- reperfusion injury in rat ovary. *Taiwan J Obstet Gynecol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2018;57(6):836–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2018.10.012>
9. Yildirim N, Simsek D, Kose S, Yildirim AGS, Guven C, Yigitturk G, et al. The protective effect of Gingko biloba in a rat model of ovarian ischemia/reperfusion injury: Improvement in histological and biochemical parameters. *Adv Clin Exp Med.* 2018;27(5):591–7.
10. Eser A, Hizli D, Haltas H, Namuslu M, Kosus A, Kosus N, et al. Effects of curcumin on ovarian ischemia-reperfusion injury in a rat model. *Biomed Reports.* 2015;3(6):807–13.
11. Kavak EC, Bulmus FG, Bulmus O, Kavak SB, Kocaman N. Magnesium: Does it reduce ischemia/reperfusion injury in an adnexal torsion rat model? *Drug Des Devel Ther.* 2018;12:409–15.
12. Kurman RJ, Ellenson LH, Ronnett BM. Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract [Internet]. *Gut.* 2011. 1140 LP - 1155 p. Available from: <http://gut.bmj.com/content/57/8/1140.abstract>

13. Sternberg SS. Histology of the Ovary. Histology for pathologists. 2nd ed. New York: Lippincott-Raven; 1997. p. 929–59.
14. Sadler TW (Thomas W. Langman's Medical Embryology, 12th Edition - langmans-medical-embryology-12th-ed.pdf [Internet]. Lippincott Williams & Wilkins; 2012. 10-22 p. Available from: <https://thephilomaths.files.wordpress.com/2013/03/langmans-medical-embryology-12th-ed.pdf>
15. GÖKMEN F. 15. Bölüm. In: GÖKMEN F, editor. SİSTEMATİK ANATOMİ. İZMİR: İzmir Güven Yayınevi; 2003. p. 500–25.
16. Forstner R. Ovaries and fallopian tubes: Normal findings and anomalies. Med Radiol. 2019;225–39.
17. Topography and structure of female reproductive organs [Internet]. Available from: [http://intranet.tdmu.edu.ua/data/kafedra/internal/anatomy/classes_stud/en/nurse/1/adn/ptn/1/16. TOPOGRAPHY AND STRUCTURE OF FEMALE REPRODUCTIVE ORGANS.htm](http://intranet.tdmu.edu.ua/data/kafedra/internal/anatomy/classes_stud/en/nurse/1/adn/ptn/1/16.TOPOGRAPHY%20AND%20STRUCTURE%20OF%20FEMALE%20REPRODUCTIVE%20ORGANS.htm)
18. Huchon C, Fauconnier A. Adnexal torsion: a literature review. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2010;150(1):8–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2010.02.006>
19. Hibbard LT. Adnexal torsion. Am J Obstet Gynecol [Internet]. Elsevier; 1985 Jun 15;152(4):456–61. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(85\)80157-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(85)80157-5)
20. Argenta PA, Yeagley TJ, Ott G, Sondheimer SJ. Torsion of the uterine adnexa. Pathologic correlations and current management trends. J Reprod Med [Internet]. 2000;45(10):831—836. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/11077633>
21. Beaunoyer M, Chapdelaine J, Bouchard S, Ouimet A. Asynchronous Bilateral Ovarian Torsion. J Pediatr Surg. 2004;39:746–9.
22. Krissi H, Shalev J, Bar-Hava I, Langer R, Herman A, Kaplan B. Fallopian tube torsion: Laparoscopic evaluation and treatment of a rare gynecological entity. J Am Board Fam Pract. 2001;14(4):274–7.
23. Ozcan HN, Balci S, Ekinçi S, Gunes A, Oguz B, Ciftci AO, et al. Imaging Findings of Fetal-Neonatal Ovarian Cysts Complicated With Ovarian Torsion and Autoamputation. Am J Roentgenol [Internet]. American Roentgen Ray Society; 2015 Jun 23;205(1):185–9. Available from: <https://doi.org/10.2214/AJR.14.13426>
24. Fitzhugh VA, Shaikh JR, Heller DS. Adnexal Torsion Leading to Death of an Infant. J Pediatr Adolesc Gynecol. 2008;21:295–7.

25. E Peña J, Ufberg D, Cooney N, L Denis A. Usefulness of Doppler sonography in the diagnosis of ovarian torsion. *Fertil Steril*. 2000;73:1047–50.
26. Porpora MG, Gomel V. The role of laparoscopy in the management of pelvic pain in women of reproductive age. *Fertil Steril* [Internet]. 1997;68(5):765–79. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028297001921>
27. Taskin O, Birincioglu M, Aydin A, Buhur A, Burak F, Yilmaz I, et al. The effects of twisted ischaemic adnexa managed by detorsion on ovarian viability and histology: An ischaemia-reperfusion rodent model. *Hum Reprod*. 1998;13.
28. Ji Q, Hui K, Zhang L, Sun X, Li W, Duan M. The Effect of Hydrogen-Rich Saline on the Brain of Rats with Transient Ischemia. *J Surg Res* [Internet]. 2011;168(1):e95–101. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002248041100076X>
29. Oelsner G, Cohen SB, Soriano D, Admon D, Mashiach S, Carp H. Minimal surgery for the twisted ischaemic adnexa can preserve ovarian function. *Hum Reprod* [Internet]. 2003;18(12):2599–602. Available from: <https://doi.org/10.1093/humrep/deg498>
30. Süleyman H, Gül V, Hirik E. İskemi-Reperfüzyon Hasarı. *Erzincan Tıp Dergisi*. Erzincan Üniversitesi; 2018. p. 51–4.
31. Özcan O, Erdal H, Yönden Z. İskemi-Reperfüzyon Hasarı ve Oksidatif Stress İlişkisine Biyokimyasal Bakış. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Derg*. 2015;6(23):27–33.
32. Wicha P, Tocharus J, Janyou A, Jittiwat J, Changtam C, Suksamrarn A, et al. Hexahydrocurcumin protects against cerebral ischemia/reperfusion injury, attenuates inflammation, and improves antioxidant defenses in a rat stroke model. *PLoS One*. 2017;12(12):1–19.
33. Montalvo-jave EE, Escalante-tattersfield T, Ortega-salgado J a, Piña E, Geller D a. Factor in pathphysiology of IRI. *J Surg Res*. 2009;147(1):153–9.
34. Şener G, Yeğen BÇ. İskemi Reperfüzyon Hasarı. *KLİNİK GELİŞİM*. 2009;22(3):5–13.
35. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2012. p. 229–317.
36. Esme H, Fidan H, Koken T, Solak O. Effect of lung ischemia–reperfusion on oxidative stress parameters of remote tissues. *Eur J Cardio-Thoracic Surg* [Internet]. 2006;29(3):294–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2005.12.008>

37. García-Villalón AL, Amezquita YM, Monge L, Fernández N, Salcedo A, Diéguez G. Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascul Pharmacol* [Internet]. 2008;48(2-3):109—114. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vph.2008.01.003>
38. Draper HH, Hadley M. [43] Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *Oxygen Radicals in Biological Systems Part B: Oxygen Radicals and Antioxidants* [Internet]. Academic Press; 1990. p. 421–31. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/007668799086135I>
39. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014.
40. Iversen L. Cannabis and the brain. *Brain* [Internet]. 2003;126(6):1252–70. Available from: <https://doi.org/10.1093/brain/awg143>
41. Izzo AA, Camilleri M. Emerging role of cannabinoids in gastrointestinal and liver diseases: basic and clinical aspects. *Gut* [Internet]. BMJ Publishing Group; 2008;57(8):1140–55. Available from: <https://gut.bmj.com/content/57/8/1140>
42. Ashton CH. Pharmacology and effects of cannabis: A brief review. *Br J Psychiatry*. Cambridge University Press; 2001;178(2):101–6.
43. Ford BM, Tai S, Fantegrossi WE, Prather PL. Synthetic Pot: Not Your Grandfather's Marijuana. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2017. p. 257–76.
44. EROL K. Bonzai Zehirlenmeleri. *OSMANGAZİ J Med* [Internet]. 2017;39(3):130–9. Available from: <https://dergipark.org.tr/download/article-file/356677>
45. Devinsky O, Cilio MR, Cross H, Fernandez-Ruiz J, French J, Hill C, et al. Epilepsy and Other Neuropsychiatric Disorders. *Epilepsia*. 2014;55(6):791–802.
46. Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Gong JP, Tagliaferro P, Brusco A, et al. CNS effects of CB2 cannabinoid receptors. *Open Neuropsychopharmacol J*. 2009;2(1):45–52.
47. Breivogel CS, Griffin G, Di Marzo V, Martin BR. Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol Pharmacol*. 2001;60(1):155–63.
48. Pacher P, Bátkai S, Kunos G. The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* [Internet]. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics; 2006;58(3):389–462. Available from: <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/58/3/389>
49. Baker CL, McDougall JJ. The cannabinomimetic arachidonyl-2-chloroethylamide (ACEA) acts on capsaicin-sensitive TRPV1 receptors but not cannabinoid receptors in rat joints. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2004;142(8):1361–

7. Available from:
<https://bppspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1038/sj.bjp.0705902>
50. Staton PC, Hatcher JP, Walker DJ, Morrison AD, Shapland EM, Hughes JP, et al. The putative cannabinoid receptor GPR55 plays a role in mechanical hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain. *Pain* [Internet]. 2008 Sep 1;139(1):225–36. Available from: <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/58/3/389.abstract>
51. Guerrero-Alba R, Barragán-Iglesias P, González-Hernández A, Valdez-Morales EE, Granados-Soto V, Condés-Lara M, et al. Some prospective alternatives for treating pain: The endocannabinoid system and its putative receptors GPR18 and GPR55. *Front Pharmacol*. 2019;9(JAN):1–20.
52. Rodrigues RS, Lourenço DM, Paulo SL, Mateus JM, Ferreira MF, Mouro FM, et al. Cannabinoid actions on neural stem cells: Implications for pathophysiology. *Molecules*. 2019. 1-59 p.
53. Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2004. p. 771–84.
54. Parlar A, Arslan SO, Doğan MF, Çam SA, Yalçın A, Elibol E, et al. The exogenous administration of CB2 specific agonist, GW405833, inhibits inflammation by reducing cytokine production and oxidative stress. *Exp Ther Med*. 2018 Dec;16(6):4900–8.
55. Parlar A, Arslan SO. Thymoquinone exhibits anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects on allergic airway inflammation. *Arch Clin Exp Med. Archives of Clinical and Experimental Medicine*; 2019 Aug;
56. Kopko J, Stańczak R, Warzecha D, Wielgos M. Uterine torsion in the second trimester of pregnancy. *Neuro Endocrinol Lett*. 2019 Jan;39(6):423–6.
57. Halici Z, Karaca M, Keles ON, Borekci B, Odabasoglu F, Suleyman H, et al. Protective effects of amlodipine on ischemia-reperfusion injury of rat ovary: biochemical and histopathologic evaluation. *Fertil Steril*. 2008 Dec;90(6):2408–15.
58. Saat N, Risvanli A, Dogan H, Onalan E, Akpolat N, Seker I, et al. Effect of melatonin on torsion and reperfusion induced pathogenesis of rat uterus. *Biotech Histochem*. Taylor and Francis Ltd; 2019;
59. Eken MK, Ersoy GS, Kaygusuz EI, Devranoğlu B, Takır M, Çilingir ÖT, et al. Etanercept protects ovarian reserve against ischemia/reperfusion injury in a rat model. *Arch Med Sci*. 2019 Jul;15(4):1104–12.
60. Le Boisselier R, Alexandre J, Lelong-Boulouard V, Debruyne D. Focus on cannabinoids and synthetic cannabinoids. *Clin Pharmacol Ther*. John Wiley & Sons, Ltd; 2017 Feb;101(2):220–9.

61. Bayram S, Parlar A, Arslan SO. The curative effect of cannabinoid 2 receptor agonist on functional failure and disruptive inflammation caused by intestinal ischemia and reperfusion. *Fundam Clin Pharmacol*. 2019 Aug;
62. Yu J, Yang W, Wang W, Wang Z, Pu Y, Chen H, et al. Involvement of miR-665 in protection effect of dexmedetomidine against Oxidative Stress Injury in myocardial cells via CB2 and CK1. *Biomed Pharmacother*. 2019 Jul;115:108894.
63. Gordeeva AE, Sharapov MG, Tikhonova I V., Chemeris NK, Fesenko EE, Novoselov VI, et al. Vascular Pathology of Ischemia/Reperfusion Injury of Rat Small Intestine. *Cells Tissues Organs*. S. Karger AG; 2017 Jun;203(6):353–64.
64. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*. 1982;78(3):206–9.
65. Casini AF, Ferrali M, Pompella A, Maellaro E, Comporti M. Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene-intoxicated mice. *Am J Pathol*. 1986 Jun;123(3):520–31.
66. Noori Hassanvand M, Soleimani Mehranjani M, Shojafar E. Melatonin improves the structure and function of autografted mice ovaries through reducing inflammation: A stereological and biochemical analysis. *Int Immunopharmacol*. 2019 Sep;74:105679.
67. Turcotte C, Blanchet M-R, Laviolette M, Flamand N. The CB2 receptor and its role as a regulator of inflammation. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(23):4449–70.
68. Zhang Q, Bu S, Sun J, Xu M, Yao X, He K, et al. Paracrine effects of human amniotic epithelial cells protect against chemotherapy-induced ovarian damage. *Stem Cell Res Ther*. 2017 Nov;8(1):270.
69. Robinson ES, Alves P, Bashir MM, Zeidi M, Feng R, Werth VP. Cannabinoid Reduces Inflammatory Cytokines, Tumor Necrosis Factor- α , and Type I Interferons in Dermatomyositis In Vitro. *J Invest Dermatol*. Elsevier B.V.; 2017 Nov;137(11):2445–7.
70. Zhu M, Yu B, Bai J, Wang X, Guo X, Liu Y, et al. Cannabinoid Receptor 2 Agonist Prevents Local and Systemic Inflammatory Bone Destruction in Rheumatoid Arthritis. *J Bone Miner Res*. John Wiley and Sons Inc.; 2019 Apr;34(4):739–51.

EKLER

T.C. ADİYAMAN ÜNİVERSİTESİ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı				
Toplantı Tarihi	Oturum Sayısı	Karar No	Protokol No	Proje Yürütücüsü
25.10.2018	10	4	2018/024	Dr. Öğr. Üyesi Ali PARLAR
“Ratlarda Ovaryum İskemi/reperfüzyon Hasarına Karşı CB2 Agonistinin Koruyucu Etkisi” başlıklı araştırma projenizde 28 Adet Wistar Albino Rat kullanılacağı ve hayvanlar üzerinde yapılacak girişimlerde hayvan kullanım etiği ilkelerine uyulacağı tarafınızdan beyan edilmiştir. Bu çerçevede aşağıda ismi bulunan araştırmacılara ait bu çalışmanın “Adıyaman Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesi” yönünden uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir. 1. Yüksek Lisans Öğrencisi Buket Bilgin ŞAHİN				
Prof. Dr. Mehmet Reşat ÖZERCAN Başkan				
Dr. Öğr. Üyesi Zümrüt DOĞAN Başkan Yardımcısı	2. J. K.	Dr. Öğr. Üyesi Gülru ESEN Üye	P. K.	
Dr. Öğr. Üyesi Mevlüt DOĞUKAN Üye	H.	Dr. Öğr. Üyesi Ali PARLAR Üye	Proje Araştırmacısı	
Dr. Öğr. Üyesi Mahmut KOPARAL Üye	Katılmadı	Dr. Öğr. Üyesi Aysel ALKAN UÇKUN Üye	A. U. K.	
Dr. Öğr. Üyesi Hasan AYDIN Üye	H.	Orhan ÖZTÜRK Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi	B. K.	
Dr. Öğr. Üyesi Sebile AZIRAK Üye	J. K.	Veda EYĞİ Sivil Üye	Katılmadı	

