



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIÇAN OVARYUMUNDA OLUŞTURULAN DENEYSEL İSKEMİ
– REPERFÜZYON HASARINDA KUDRETNARI’NIN
(MOMORDICA CHARANTIA) ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Fırat AŞIR

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİMDALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Engin DEVECİ

2022 – DİYARBAKIR



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIÇAN OVARYUMUNDA OLUŞTURULAN DENEYSEL İSKEMİ
– REPERFÜZYON HASARINDA KUDRETNARI’NIN
(MOMORDICA CHARANTIA) ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Fırat AŞIR

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİMDALİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Engin DEVECİ

2022 – DİYARBAKIR



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı** doktora öğrencisi **Fırat AŞIR**'ın hazırladığı “**Sıçan Ovaryumunda Oluşturulan Deneysel İskemi – Reperfüzyon Hasarında Kudret Narı'nın (Momordica charantia) Etkilerinin Araştırılması**” başlıklı tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim- Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 07/04/2022

Danışman:

Jüri üyeleri

İmza

Jüri başkanı

.....

Üye

.....

Üye

.....

Üye

.....

Üye

.....

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../... ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

... /.../...

Dicle Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BEYAN

Bu doktora tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

11/04/2022

Fırat Aşır

İmza

TEŞEKKÜR

Doktora tezimin her aşamasında değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, zaman ayrımı gözetmeksizin kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm kıymetli ve danışman hocam Prof. Dr. Engin DEVECİ'ye;

Doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini bana aktaran, değerli zamanlarını bana ayıran, eş danışmanlarım olarak gördüğüm Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın çok değerli ve kıymetli hocaları Prof. Dr. Yusuf NERGİZ'e, Prof. Dr. Murat AKKUŞ'a, Prof. Dr. Sevda SÖKER'e, Prof. Dr. Ayfer AKTAŞ'a, Prof. Dr. Selçuk Tunik'e, Doç. Dr. Cenap EKİNCİ'ye, Dr. Öğretim Üyesi Ebru GÖKALP ÖZKORKMAZ'a; Anatomi Anabilim Dalı'nın çok değerli ve kıymetli hocası Prof. Dr. Mehmet Cudi TUNCER'e,

Yine çalışmamda konu, kaynak ve yöntem açısından bana sürekli yardımda bulunarak yol gösteren Histoloji ve Embriyoloji'nin Anabilim Dalı Araştırma Görevlileri Dr. Süreyya ÖZDEMİR BAŞARAN'a, Dr. Özge KAPLAN'a, Dr. Siyamet CANGİR'e, Doktora Öğrencilerimiz Eda YILDIZHAN'a ve Fırat ŞAHİN'e, Hayatım boyunca hep yanımda olan ve varlıklarını her zaman hissettiğim, maddi manevi her açıdan desteklerini esirgemeyen Anneme, Babama, Kardeşlerime, eşim Ayşegül AŞIR'a ve oğlum Mıhralı AŞIR'a,

Ve bu tezde emeği geçen ve ismini sayamadığım tüm özel ve tüzel kişiliklere teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Bu tez, Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (DÜBAP) Koordinatörlüğü tarafından **TIP.20.009** proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
KISALTMA ve SİMGELER LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
TABLolar LİSTESİ.....	xv
1. ÖZETLER.....	1
1.1. Türkçe Özet	1
1.2. Abstract.....	3
2. GİRİŞ ve AMAÇ.....	5
3. GENEL BİLGİLER.....	8
3.1. Ovaryum.....	8
3.1.1. Ovaryumun embriyolojisi	8
3.1.2. Ovaryumun anatomisi	9
3.1.3. Gelişim aşamalarında ovaryum	10
3.1.4. Yüzey epiteli	11
3.1.5. Stroma histolojisi.....	12
3.1.6. Primordial foliküller	13
3.1.7. Gelişmekte olan foliküller	14
3.1.8. Atretik foliküller.....	15
3.1.9. Granüloza hücre tabakası	16
3.1.10. Teka hücre tabakaları	17
3.1.11. Korpus luteum	17
3.1.12. Hilar hücreler	19
3.1.13. Rete ovarii.....	19
3.2. Kudret Narı.....	19
3.2.1. Kudret narının bileşenleri	21

3.2.2.	Kudret narının anti-diyabetik aktivitesi.....	22
3.2.3.	Kudret narının anti-inflamatuar ve anti-oksidan aktivitesi	23
3.2.4.	Kudret narının anti-kanser aktivitesi	25
3.2.5.	Kudret narının anti-bakteriyel aktivitesi	26
3.2.6.	Kudret narının anti-viral aktivitesi	27
3.2.7.	Kudret narının doğum ve infertilite üzerindeki etkisi	27
3.2.8.	Kudret narının diğer aktiviteleri	28
3.2.9.	Kudret narının toksisitesi	28
3.3.	İskemi Reperfüzyon Hasarı	29
3.3.1.	İskemi (I)	31
3.3.2.	Reperfüzyon (R).....	31
3.3.3.	IRH’de “No reflow fenomeni”	33
3.3.4.	IRH’de apoptotik hücre ölümü	34
3.3.5.	IRH’de antioksidan sistemi	35
4.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
4.1.	Kudret Narının Özütünün Elde Edilmesi	36
4.2.	Deney Hayvanlarının Temini ve Deney Protokolü	38
4.3.	Biyokimyasal Analiz	41
4.4.	Doku Takibi	42
4.5.	Hematoksilen-Eozin Boyama	42
4.6.	APAF-1 İmmunohistokimyasal Boyama	43
4.7.	Western Blot	44
4.8.	İstatistiksel Analiz	45
5.	BULGULAR.....	46
5.1.	TAS, TOS ve AMH Bulguları	46
5.2.	Histopatolojik Bulgular	54
5.2.1.	Hematoksilen-Eozin boyama bulguları	54
5.3.	APAF-1 İmmunohistokimyasal Bulgular	64
5.4.	ImageJ Bulguları	69
5.5.	Western Blot Bulguları	72
6.	TARTIŞMA.....	73
7.	SONUÇ.....	87

8. KAYNAKÇA.....	88
9. ÖZGEÇMİŞ.....	100
10. EKLER.....	102
10.1. Ek 1 – Mezuniyet Yayını	102
10.2. Ek 2 – Etik Kurul Belgesi	103
11. ORJİNALLİK RAPORU	104



KISALTMA ve SİMGELER LİSTESİ

A	: Antrum
A.	: Arterya
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ADP	: Adenozin Difosfat
AMH	: Anti-Müllerian Hormon
AMP	: Adenosin Monofosfat
APAF-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör 1
ATP	: Adenozin Trifosfat
BAK	: Bcl-2 Homologu Antagonist Öldürücü
BAX	: Bcl-2 İlişkili X Proteini
BCA	: Bicinchoninic Acid
BSA	: Bovin Serum Albumin
CARD	: N-Terminal Kaspaz Recruitment Domein
CAT	: Katalaz
CD18	: Küme Farklılaşması 18
COX-2	: Siklooksigenaz-2
DAB	: Diaminobenzidin
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DÜBAP	: Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
DÜHADEK	: Dicle Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı
DÜSAM	: Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Uygulama ve

Araştırma Merkezi

ECL	: Enhanced chemiluminescence
eNOS	: Endotelyal NOS
eq	: Equivalent
ERK	: Ektstrasellüler Sinyal-Regüle Kinaz
ESM	: Ekstrasellüler Matriks
FSH	: Folikül Stimulan Hormon
g	: Gram
GC	: Granüloza Hücresi
GKL	: Gebelik Korpus Luteumu
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: Glutasyon
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HIV	: İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
HRP	: Horseradish Peroxidase
HSV-1	: Herpes Simpleks Virüs-1
I	: İskemi
IMP	: İnozin Monofosfat
IR	: İskemi-Reperfüzyon
IRH	: İskemi-Reperfüzyon Hasarı
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
iNOS	: İndüklenebilir NOS
JNK	: c-Jun N-Terminal Kinaz
kDA	: Kilo Dalton
KDH	: Ksantin Dehidrojenaz

KN	: Kudret Narı
KO	: Ksantin Oksidaz
KOR	: Ksantin Oksiredüktaz
L	: Litre
LH	: Luteinizan Hormon
Lig.	: Ligamentum
MAP30	: Momordica Anti-Human İmmün Yetmezlik Virüsü Proteini 30
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
MIS	: Müllerian İnhibe Edici Madde
MKL	: Menstrüal Korpus Luteumu
mL	: Militre
mmol	: Milimolar
MODY	: Yetişkin Başlangıçlı Diyabet
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
ng	: Nanogram
nmol	: Nanomolar
nNOS	: Nöronal NOS
NO	: Nitrik Oksit
NO	: Nitrik Oksit
NOD	: Merkezi Nükleotid Bağlayıcı Oligomerizasyon Domein
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
O₂	: Oksijen Molekülü
O₂•-	: Süperoksit Anyonu

OGTT	: Oral Glukoz Tolerans Testi
OH•	: Hidroksil Radikali
OMI	: Oosit Matürasyon İnhibitör
ONOO⁻	: Peroksinitrit
OSI	: Oksidatif Stres İndikatörü
PAS	: Periyodik Asit-Schiff
PBS	: Fosfat-Buffered Saline
PBS-T	: Fosfat-Buffered Solüsyonu- Tween20
pmol	: Pikomolar
PVDF	: Polivinil Diflörür
R	: Reperfüzyon
RIP	: Ribozomu İnaktive Eden Protein
RIPA	: Radioimmunoprecipitation Assay Buffer
RNA	: Ribonükleik Asit
RNT	: Reaktif Nitrojen Türleri
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
sn	: Saniye
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SRY	: Cinsiyet Belirleyici Bölge Y
T2DM	: Tip 2 Diyabetes Mellitus
TAS	: Total Antioksidan Statüsü
TBF	: Testis Belirleyici Faktör
TE	: Teka Eksterna
TI	: Teka Interna
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör Alfa

TOS	: Total Oksidan Statüsü
TRAIL	: TNF-İlişkili Apoptoz İndükleyici Ligand
TUNEL	: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Dntp Nick End Labeling
TWEAK	: Sitokin Tümör Nekroz Faktör Benzeri Apoptozun Zayıf İndükleyici
U	: Ünite
V.	: Vena
WRD	: WD40 Domein
μmol	: Mikrolitre

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Ovaryum kesitinden bir görünüm. Folikül gelişimi, korpus luteum ve damarların olduğu mezovaryum görülmektedir. (4)	14
Şekil 2. Ovaryumdaki foliküllerin ve korpus luteumun histolojik görünümleri (3) ..	15
Şekil 3. Sekonder foliküldeki Granüloza hücreleri (GC), Antrum (A), Teka interna (TI) ve Teka eksterna (TE) tabakaları (4)	16
Şekil 4. Kudret narı bitkisi (5)	21
Şekil 5. Kudret narının farmakolojik özellikleri ve etki mekanizması (53).....	25
Şekil 6. İskemi-Reperfüzyon hasarının mekanizması (84)	35
Şekil 7. Kurutulmuş kudret narı meyvesi.....	37
Şekil 8. Kudret narının alkolik ekstraktı	37
Şekil 9. Kudret narı meyvesinin alkolik özütünün rotari evaporatör ile elde edilmesi	37
Şekil 10. Kudret narı meyvesinin alkolik özütü.....	37
Şekil 11. Deney hayvanlarına orogastrik sondayla kudret narı özütünün verilmesi..	41
Şekil 12. Ovaryum iskemi-reperfüzyon hasarının oluşturulması.....	41
Şekil 13. Eksize edilen ovaryum dokusu	41
Şekil 14. Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama.....	43
Şekil 15. BCA protein assay ile örneklerin spektrofotometreye yüklenmesi	45
Şekil 16. Proteinlerin jelde yürümesi	45
Şekil 17. Ortalama TAS değerlerinin gruplara göre dağılımı	50
Şekil 18. Ortalama TOS değerlerinin gruplara göre dağılımı	51
Şekil 19. Ortalama OSI değerlerinin gruplara göre dağılımı	52
Şekil 20. Ortalama AMH değerlerinin gruplara göre dağılımı	54

- Şekil 21.** Sham grubu ovaryum kesitinin total görünümü. Hematoksilen Eozin, Bar: 400 µm 55
- Şekil 22.** Sham grubu ovaryum kesiti. Preantral foliküller (paf), antral foliküller (af), korpus luteum (cl), zona pellusidalı ovum (sarı ok) ve bağ doku stromal alan (sarı yıldız) düzenli olarak gözlendi. Hematoksilen Eozin, Bar: 60 µm 55
- Şekil 23.** Sham grubu ovaryum kesiti. Graafian folikül (gf), teka hücre tabakası (teca), granüloza hücreleri (gc) ve zona pellusidalı ovum (sarı ok) ve bağ doku stromal alan (sarı yıldız) normal histolojide görüldü. Hematoksilen Eozin, Bar: 60 µm 56
- Şekil 24.** KN grubu total ovaryum kesit. Hematoksilen Eozin, Bar: 400 µm..... 56
- Şekil 25.** KN grubu ovaryum kesiti. Preantral foliküller (paf), antral foliküller (af), zona pellusidalı ovum (sarı ok), stromal alan (sarı yıldız) ve germinal epitelyum (siyah ok) normal histolojik görünümde idi. Hematoksilen Eozin, Bar: 60 µm..... 57
- Şekil 26.** KN grubu ovaryum kesiti. Primordiyal foliküller (prf), antral foliküller , stromal alan (sarı yıldız) ve germinal epitelyum (siyah ok) normal gözlendi. Hematoksilen Eozin, Bar: 60 µm 57
- Şekil 27.** IR grubuna ait ovaryum kesitinin total görünümü. Hematoksilen Eozin, Bar: 400 µm..... 58
- Şekil 28.** IR grubuna ait ovaryum kesiti. Dejenere foliküller (df), dejenere granüloza hücre tabakası (gc) ve vasküler dilatasyon/konjesyon (kırmızı yıldız) izlenmektedir. Hematoksilen Eozin, Bar: 60 µm 58
- Şekil 29.** IR grubuna ait ovaryum kesiti. Stromal alanda dejenerasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu ve vasküler dilatasyon ve konjesyon (kırmızı yıldız) görülmektedir. Hematoksilen Eozin, Bar: 60 µm 59
- Şekil 30.** KN+IR grubuna ait ovaryum kesitinin total görünümü. Hematoksilen Eozin, Bar: 400 µm 59
- Şekil 31.** KN+IR grubuna ait ovaryum kesiti. Bazı alanlarda normal preantral foliküller (paf), antral foliküller (af) ve zona pellusidalı ovum (sarı ok) izlenirken genel olarak yoğun ödem (ed), yaygın vasküler dilatasyon/konjesyon ve mononükleer lökosit infiltrasyonu (kırmızı yıldız) ve dejeneratif stromal alan (sarı yıldız) izlendi. Hematoksilen Eozin, Bar: 60 µm..... 60
- Şekil 32.** KN+IR grubuna ait ovaryum kesiti. Dejeneratif foliküller (df) ve granüloza hücre tabakası (gc), yaygın vasküler dilatasyon/konjesyon ve mononükleer lökosit

infiltrasyonu (kırmızı yıldız) ve dejeneratif stromal alan (sarı yıldız) izlendi. Hematoksilen Eozin, Bar: 60 µm..... 60

Şekil 33. IR+KN grubuna ait total ovaryum kesiti. Hematoksilen Eozin, Bar: 400 µm 61

Şekil 34. IR+KN grubuna ait ovaryum kesiti. Preantral foliküller (paf), dejenere foliküller (df), korpus luteum (cl), azalmış vasküler dilatasyon/konjesyon ve mononükleer lökosit infiltrasyonu (kırmızı yıldız) ve azalmış dejeneratif stroma (sarı yıldız) görünmektedir. Hematoksilen Eozin, Bar: 60 µm..... 61

Şekil 35. IR+KN grubuna ait ovaryum kesiti. Primordiyal foliküller (prf), Graafian folikül (gf), teka hücre tabakası (teca) ve zona pellusidalı ovum (sarı ok), azalmış vasküler dilatasyon/konjesyon ve mononükleer lökosit infiltrasyonu (kırmızı yıldız) ve azalmış dejeneratif stroma (sarı yıldız) görünmektedir. Hematoksilen Eozin, Bar: 60 µm 62

Şekil 36. KN+IR+KN grubuna ait total ovaryum kesiti. Hematoksilen Eozin, Bar: 400 µm 62

Şekil 37. KN+IR+KN grubuna ait bir ovaryum kesiti. Primordiyal folikül (prf), preantral foliküller (prf), antral folikül , teka hücre tabakası (teca), zona pellusidalı ovum (sarı ok), germinal epitelyum (siyah ok) ve stromal bağ doku alanı (sarı yıldız) normal izlendi. Hematoksilen Eozin, Bar: 60 µm..... 63

Şekil 38. KN+IR+KN grubuna ait bir ovaryum kesiti. Normal histolojik yapıda preantral folikül (prf), teka hücre tabakası (teca), germinal epitelyum (siyah ok) ve stromal bağ doku alanı (sarı yıldız) görülmektedir. Vasküler dilatasyon/konjesyon çok hafif izlenmektedir. Hematoksilen Eozin, Bar: 60 µm..... 63

Şekil 39. Sham grubu ovaryum kesiti. APAF-1 ekspresyonu folikül genel olarak negatif izlenirken sadece bağ doku stromal alanda birkaç hücrede pozitif APAF-1 ekspresyonu (yıldız) izlendi. paf: pre-antral folikül, gf: Graafian folikülü, ok: ovum, APAF-1 immün boyama, Bar: 60 µm..... 64

Şekil 40. KN grubu ovaryum kesiti. APAF-1 ekspresyonu sadece ovaryan stromada birkaç hücre sitoplazmasında pozitif olarak izlendi (yıldız). af: antral folikül, APAF-1 immün boyama, Bar: 60 µm..... 65

Şekil 41. IR grubu ovaryum kesiti. APAF-1 ekspresyonu preantral foliküllerde (paf), ovumda (ok), teka hücre tabakasında (teca), granüloza hücrelerinde (gc), damarlarda (ok başı), korpus luteum (cl) ve ovaryum stromasında (yıldız) çok yoğun olarak kaydedildi. APAF-1 immün boyama, Bar: 60 µm 66

- Şekil 42.** KN+IR grubu ovaryum kesiti. Ovaryumun preantral (paf) ve antral (af) foliküllerinde, ovumda (ok), teka hücre tabakasında (teca), ovaryum stromasında (yıldız) ve germinal epitelyumda pozitif APAF-1 ekspresyonu yoğun olarak izlendi. APAF-1 immün boyama, Bar: 60 µm..... 67
- Şekil 43.** IR+KN grubu ovaryum kesiti. Preantral (paf) ve atretik (atf) foliküllerde, teka (teca) ve granüloza (gc) hücre tabakasında çoğunlukla negatif APAF-1 ekspresyonu izlendi. Ovaryum stromasının bazı alanlarında (yıldız) APAF-1 ekspresyonu pozitif olarak izlendi. APAF-1 immün boyama, Bar: 60 µm..... 68
- Şekil 44.** KN+IR+KN grubu ovaryum kesiti. Preantral (paf) ve germinal epitelyumda (ok) negatif APAF-1 reaksiyonu izlendi. Ovaryum stromasının bazı alanlarında (yıldız) hafif düzeyde pozitif APAF-1 reaksiyonu izlendi. APAF-1 immün boyama, Bar: 60 µm..... 69
- Şekil 45.** ImageJ yazılımında yarı nicel immünohistokimya analiz. 70
- Şekil 46.** ImageJ yazılımında APAF-1 ekspresyon yoğunluğu sonuçları. Label: grup ismi, Area: toplam resim alanı, mean: ortalama sinyal yoğunluğu. 70
- Şekil 47.** ImageJ yazılımına göre gruplardaki APAF-1 ortalama sinyal değeri. 71
- Şekil 48.** Gruplara göre Western Blot tekniği ile β-actin ve APAF-1 protein seviyesinin gösterimi. 72

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Gruplara uygulanan işlemlerin özeti	40
Tablo 2. Gruplardaki TAS, TOS, OSI ve AMH değerlerinin tanımlayıcı istatistiksel analizi	47
Tablo 3. Gruplardaki TAS, TOS, OSI ve AMH verilerinin varyans homojenlik dağılım analizi	48
Tablo 4. TAS, TOS, OSI ve AMH değerlerinin ANOVA testi sonuçları.	48
Tablo 5. TAS verileri için post hoc Games Howell test sonuçları	49
Tablo 6. TOS verileri için post hoc Tukey test sonuçları	51
Tablo 7. OSI verileri için post hoc Tukey test sonuçları	52
Tablo 8. AMH verileri için post hoc Tukey test sonuçları	53
Tablo 9. Pozitif APAF-1 ve AMH sinyal ortalamasının gruplara göre dağılımı ve istatistiksel analizi	71

1. ÖZETLER

Sıçan Ovaryumunda Oluşturulan Deneysel İskemi – Reperfüzyon Hasarında Kudret Narı'nın (*Momordica charantia*) Etkilerinin Araştırılması

Öğrencinin Adı ve Soyadı: Fırat AŞIR

Danışmanı: Prof. Dr. Engin DEVECİ

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji

1.1. Türkçe Özet

Amaç: Bu tezin amacı deneysel sıçan ovaryum torsiyon-detorsiyon modelinde oluşan hasara karşı kudret narı (KN) ekstraktının etkisini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: 48 adet Sprague Dawley türü dişi sıçan 6 gruba ayrıldı. Sham grubuna herhangi bir işlem uygulanmadı. İskemi-Reperfüzyon (IR) için 3 saat iskemi ve 3 saat reperfüzyon işlemi uygulandı. IR öncesi ve/veya sonrasında sıçanlara 600 mg/kg KN ekstresi orogastrik sonda ile verildi. Deney sonunda hayvanların serum total antioksidan/oksidan statüleri (TAS/TOS) ve Anti-Müllerian Hormon (AMH) seviyeleri ölçüldü. Ovaryum dokusunda histopatolojik değerlendirme, immün aktivite ve Western Blot (WB) sonuçları analiz edildi.

Bulgular: IR grubunda TAS ve AMH seviyesi en düşük iken, TOS seviyesi ve OSI en yüksek bulundu. KN ekstresi tedavisi verilen gruplarda IR grubuna göre TAS ve AMH seviyeleri daha yüksek ve TOS seviyesi ve OSI daha düşük bulundu. Histopatolojik incelemede sham ve KN gruplarında normal ovaryum histolojisi gözlenirken, IR grubunda foliküler ve granüloza hücre dejenerasyonu, mononükleer hücre infiltrasyonu, stromal hücre dejenerasyonu, vasküler konjesyon ve dilatasyon izlendi. IR hasarı (IRH) sonrası KN ekstresi tedavisi alan gruplarda IRH sonucu gelişen histopatolojinin büyük oranda düzeldiği gözlemlendi. APAF-1 immün reaksiyonu sham ve KN gruplarında genel olarak negatif iken IR ve KN+IR gruplarında yoğun olarak kaydedildi. IRH sonrası KN ekstresi verilen gruplarda

APAF-1 ekspresyon seviyesinin azaldığı gözlemlendi. WB sonuçlarında, KN tedavisinin IRH sonrası APAF-1 protein seviyesinde azalışa neden olduğu gözlemlendi.

Sonuç: KN ekstresinin hem anti-inflamatuar hem de antioksidan özelliğinden dolayı ovaryum IRH sonucu gelişen olumsuz biyokimyasal ve histokimyasal değişimleri restore ettiği ve APAF-1 ekspresyonunu baskılayarak hücre yaşamını desteklediği gözlemlendi.

Anahtar Sözcükler: antioksidan, anti-inflamatuar, iskemi-reperfüzyon, kudret narı, ovaryum



Investigating the Effects of Momordica charantia on Experimental Ischemia - Reperfusion Injury in Rat Ovary

Student's Surname and Name: AŞIR Fırat

Adviser of Thesis: Prof. Dr. Engin DEVECİ, Ph.D.

Department: Histology and Embryology

1.2. Abstract

Aim: The aim of this thesis is to investigate the effect of Momordica charantia (MC) extract against damage in the experimental rat ovarian torsion-detorsion model.

Materials and Methods: Forty-eight Sprague Dawley female rats were divided into 6 groups. No treatment was applied to the sham group. In ischemia-reperfusion (IR) group, 3 hours of ischemia/3 hours of reperfusion was conducted. Before and/or after IR, 600 mg/kg momordica charantia (MC) were introduced to rats via orogastric tube. At the end of the experiment, total serum antioxidant/oxidant status (TAS/TOS) and Anti-Mullerian Hormone (AMH) level were measured. Ovarian histopathologies, APAF-1 immune activity and Western Blot (WB) results were analyzed.

Results: TAS and AMH levels were the lowest while TOS level and OSI were the highest in the IR group. TAS and AMH levels were higher, and TOS levels and OSI were lower in groups treated with MC extract compared to IR group. Normal ovarian histology was observed in sham and MC groups, while follicular degeneration, granulosa and stromal cell degeneration, mononuclear cell infiltration and vascular congestion and dilatation were observed in IR group. Ovarian histopathology was improved in groups that received MC extract. APAF-1 immune activity was intense in IR and MC+IR groups while dramatically decreased in the groups treated with MC extract after IRI. In WB results, MC treatment reduced APAF-1 protein level after IRI.

Conclusion: MC extract restored negative biochemical and histochemical changes caused by ovarian IRI due to its anti-inflammatory and antioxidant properties and supported cell survival by suppressing APAF-1 expression.

Keywords: antioxidant, anti-inflammatory, ischemia-reperfusion, momordica charantia, ovary



2.GİRİŞ ve AMAÇ

Kadın üreme sisteminin organlarından ovaryumların temel görevi kadın germ hücrelerini ve steroid hormonlarını (östrojen ve progesteron) üretmektir. Ovaryumlar karın arka duvarında yer alan ara mezodermin oluşturduğu ürogenital sırttan köken alır. Gebeliğin 5-6. haftasında primordial germ hücreleri sekonder vitellus kesesinin endoderminden ürogenital çıkıntıya göç ederek mezenkim ve intraembriyonik yüzey epiteli ile etkileşerek gonadları oluşturur. İlkel gonadlardaki germ hücreleri oogoniya dönüşürken yüzey epiteli ise foliküler hücrelere dönüşür (1, 2).

Ovaryumlar sert, badem şeklinde, genelde 3 cm uzunluğunda, 2 cm genişliğinde bir çift organdır. Ovaryumun hilusa bağlı bölgesi mezovaryum olarak adlandırılır. Ovaryum, yüzey epiteli ile çevrilmiştir ve sınırları belirgin olmayan dışta korteks ve içte medulladan oluşmuştur. Yüzey epitelinin altında ince bir fibröz bağ dokusu ve tunika albuginea bulunur. Korteksin geri kalan kısmı farklı boyut ve aşamalarda (olgunlaşma, dejenerasyon) primer oosit içeren foliküllerden meydana gelmiştir. Medulla kan damarı, sinir ve lenf damarlarını içeren gevşek bağ dokusundan meydana gelmiştir (2, 3). Doğum esnasında ovaryumlar 600-800 bin primer oosit içerirken bu sayı puberteye kadar dejenerasyon ve atrezi sonucu 40.000'e kadar düşer. Kadınlarda ovulasyon sonucu 28 ± 7 günlük periyotlarla bir yumurta atılır. Doğumdan sonra kadınlarda oogonia bulunmaz, sadece primer oosit içeren primordial foliküller bulunur. Primordial folikül içindeki primer oosit 1. mayozun profazın diploteninde tek katlı yassı foliküler hücreler tarafından salgılanan oosit matürasyon inhibitör (OMI) tarafından arreste uğratılmıştır. Kortekste ise primordial, olgunlaşmakta olan (primer, sekonder), olgun (Graafian) veya preovulatuvar foliküller bulunur. Primordial foliküller etrafı tek katlı yassı epitel ile çevrili, yaklaşık 25 µm çapında primer oosit içeren, eksantrik bir çekirdek ve belirgin bir nükleolusa sahiptir. Foliküller geliştikçe primer oositin boyutu 40-45 µm çapına ulaşır, etrafındaki tek katlı yassı epitel proliferasyon olarak çok katlı küboidal hücrelere dönüşür. Bazal laminaları belirgin ve granüler sitoplazmalara sahip bu hücrelere ise granüloza hücreleri denir. Bu folikülün granüloza hücreleri ile sitoplazması ortak bir membran olan glikoprotein yapısında zona pellusidayı meydana getirir. Foliküle komşu interstisyel alanda bulunan stromal hücreler ise teka interna hücrelerine dönüşür. En

dış bölgede ise stroma hücreleri ile devam eden bir teka eksterna bağ doku tabakası oluşur (2-4).

Ovulasyonda preovulator folikülden sekonder oosit, zona pellusida, 1. kutup cisimciği, korona radiata hücresi ve az miktarda granüloza hücresi ile periton boşluğuna doğru atılır. Daha sonra folikül geçici bir glandüler yapıya yani korpus luteuma (sarı cisim) dönüşür. Folikülün içi fibrin, sıvı ve kanla dolarak koagüle olur. Granüloza hücre tabakasının damarlanması sonucu ön hipofizden salgılanan luteinize edici hormon hem granüloza hem de teka interna hücrelerinin granüloza lutein ve teka lutein hücrelerine dönüşmesini sağlar. Her iki hücre tipi de steroidojenik olup benzer özellikler gösterir. Granüloza lutein hücreleri, endometriyumu implantasyon için hazırlar ve meme bezlerinin büyümesini uyaran progesteronu salgılar. Teka lutein hücreleri ise östrojen salgılar. Gebelik oluşması durumunda 8 hafta daha fonksiyonunu sürdüren korpus luteum gebelik oluşmaması durumunda korpus albicans (beyaz cisim) adı verilen beyaz renkte bir skar dokuya dönüşür (1).

Kudret Narı (KN, Latince *Momordica charantia*) Cucurbitaceae ailesinde ait bir bitki olup yüzyıllardır Asya, Afrika ve Karayiplerde sebze olarak ve de çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Geleneksel Çin tıbbında farmakolojik ve besleyici özelliklerinden dolayı oldukça popülerdir. Bugüne kadar KN, antidiyabetik, anti-inflamatuar, antiviral, antibakteriyel, antelmintik, antikanser gibi aktivitelerinden dolayı araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Bunun dışında dismenore, cilt hastalıkları (eczema, sedef), gastrointestinal sistem hastalıkları (karın ağrısı, peptik ülser) ve düşük doğum tedavisinde kullanılmıştır (5). KN, içeriğinde birçok güçlü biyoaktif bileşik içermekte ve başta diyabet olmak üzere kanser ve diğer inflammatuar hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Literatürde, KN ekstraktının özellikle Tip 2 diyabetten etkilenen hastalarda hipoglisemik etkisi bilinmektedir. Ancak var olan çalışmaların çoğu hücre kültürü ve hayvan modelleri üzerine yapıldığından insan sağlığı üzerindeki etkileri tartışmalıdır. Hem in vitro hem de in vivo çalışmalarda, KN'nin toksik veya olumsuz etkilere de yol açtığı gösterilmiştir. KN bitkisini hazırlama metodu, hasat zamanı, tür çeşitliliği, bitkinin kullanılan kısmı ve literatürdeki farklı veriler KN'nin hem etkinlik hem de güvenlik açısından uygun dozu bulmayı zorlaştırmıştır (6, 7).

İskemi-reperfüzyon hasarı (IRH), miyokardiyal enfarktüs, akut kalp yetmezliği, serebral disfonksiyon, koroner anjiyoplasti, organ nakli, felç, periferik vasküler hastalıklar, hipovolemik şok, gastrointestinal disfonksiyon ve çoklu organ fonksiyon bozukluğu gibi semptomlarda meydana gelen klinik bir komplikasyondur (8). IRH, kalp, akciğer, böbrek, bağırsak, iskelet kası ve beyin dahil olmak üzere birçok organda meydana gelir ve uzak organ hasarına da neden olabilir. Vücutta herhangi bir bölgeye kanın yeterince veya hiç gitmemesi durumu iskemiye ifade ederken, kan akımının tekrar sağlanması reperfüzyonu sağlar. Acil tedavi olmaması durumunda, dokularda hem iskemi hem de iskemi sonrası reperfüzyon sonrası hasar meydana gelmektedir. Lokal inflamasyon, reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimi ve diğer birçok hücresel süreçler sonunda hücre hasarına ve apoptozis veya nekrozis ile hücre ölümüne yol açar. Uzun süreli iskemi, hücre için gerekli olan adenozin trifosfat (ATP) üretiminin oksijensiz yani anerobik metabolizma ile gerçekleşmesine ve ATP miktarında azalmaya neden olur. Böylece, ATP'ye bağlı mekanizmalar işlevsizleşir ve hücrenin ölümü tetiklenir (9). Reperfüzyon sonrası oksijen seviyesi normale döner ancak ROT'nin oluşumunda artış gerçekleşir, kan ile proinflatuar moleküller iskemik dokuya taşınır ve IRH meydana gelir. IRH'de apoptotik hücre ölümü birçok genin aktivasyonu ile indüklenir ve oldukça yaygındır. Apoptozis intrinsik ve ekstrinsik yollara aktive edilir. Buna karşın hücrenin ROT ile mücadelesinde enzimatik ve enzimatik olmayan kendi savunma mekanizmaları mevcuttur. Normal bir hücrede zaten metabolik reaksiyonlar sonucu ROT oluşur ancak IRH sonrası oluşan ROT seviyesi hücrenin antioksidan savunma mekanizmasını aşarsa, hücre yetersiz kalabilir. Bu durumda yüksek antioksidan içeriğine sahip geleneksel tıp ürünlerini tüketmek yararlı olabilir (9, 10).

Bu tezin amacı sıçan ovaryumunda oluşturulan deneysel iskemi-reperfüzyon modelinde, KN'nin ovaryan dokusundaki olası koruyucu etkilerinin araştırılması ve antioksidan özelliğinin biyokimyasal, histokimyasal, immünohistokimyasal, western blot teknikleri ile incelemektedir. Yapacağımız çalışma ile iskemi-reperfüzyon modellerinde KN'nin olası rolünü aydınlatmayı hedeflemekteyiz.

3. GENEL BİLGİLER

3.1. Ovaryum

3.1.1. Ovaryumun embriyolojisi

Cinsiyetin belirlenmesi genetik açıdan fertilizasyonla birlikte belirlenmiş olmasına rağmen, intrauterin yaşamın 6-7. haftalarına kadar ilkel gonadlarda erkek-kadın ayrımı ultrasonografik olarak yapılamaz (genetik testler, amniyosentez ve koryosentez hariç). İlkel gonadlar ara mezoderminden köken alırlar ve fetüste genital ve gonadal sırt halinde gözlenirler. Epiblast hücreleri gelişimin 2-4.haftaları arasında sekonder vitellüs kesesi endodermi içine göç ederek primordial germ hücrelerini meydana getirir. Primordial germ hücreleri gelişimin 5-6. haftalarında dorsal mezenter aracılığıyla ve ameboid hareketlerle ilkel gonadlara doğru göç eder ve 7. haftada ilkel gonadlara ulaşırlar. İlkel gonadlara ulaşan primordial germ hücreleri cinsiyet belirleyici bölge Y (SRY) geni içerirse testisler, etmiyorlarsa ovaryumlar meydana gelir (11, 12).

Primordial germ hücreleri ilkel gonadlara ulaştıktan sonra ilkel gonadlar ovaryumlara farklanır. Primordial germ hücreleri aynı zamanda ovaryumları dışarıdan saran ve intraembriyonik sölomdan köken alan germinal yüzey epitel hücrelerini uyarak primitif (birincil) cinsiyet kordonlarının oluşmasını sağlar. Primitif cinsiyet kordonları ovaryumların medullasına kadar ilerler ve ovaryumun medullasında bir araya gelerek hücre kümelerini oluşturur. Bir süre sonra bu hücre kümelerinin çoğu dejenere olur ve geriye kalanlar ise vasküler bir stromayı (ovaryan medulla) meydana getirir (11, 12).

Primitif cinsiyet kordonlarının ortadan kalkmasının ardından primordial germ hücreleri ovaryumların germinal yüzey epitelyumunu yeniden uyarak kortikal (ikincil) kordonların oluşmasını sağlar. Kortikal kordonlar, primordial germ hücreleri ile birlikte kortekse kadar ilerlerler ve oogoniumlara farklanır. Oogoniumların sayısı 3. aydan itibaren mitozla bağlı hızlı bir şekilde artar, 5. ayda yaklaşık 3 milyon, 7. ayda ise tahmini 7 milyona ulaşır. 7. aydan itibaren oogoniumlarda apoptozis süreci başlar ve oogoniumların büyük bir kısmı dejenere olup atreziye uğrar. Ovaryumların yüzeyine yakın olan oogoniumlar farklılaşarak primer oositlere dönüşürler. Primer

oositler dışarıdan germinal yüzey epitelyumdan köken alan tek katlı yassı epitel ile kuşatılır ve primordial foliküller oluşur. Primordial folikül içindeki primer oosit 1. mayozun profazının diplotenine kadar bölünmeye devam eder ancak intraembriyonik sölomdan köken alan tek katlı yassı epitel hücreleri tarafından kuşatılır ve bu hücrelerden salgılanan OMI sayesinde 1. mayozun tamamlanması engellenmiş olur. Primordial foliküller puberteye kadar inaktif durumdadır. Doğumda primordiyal folikül sayısı 600-800 bin iken bu sayı puberteye kadar apoptozise bağlı olarak 40.000'e düşer. Puberte ile folikül stimulan hormon (FSH)'dan bağımsız olarak 15-25 primordiyal folikül sırasıyla primer, sekonder, graaf ve preovulatuvar foliküle dönüşür. Preovulatuvar folikül içindeki primer oosit ovulasyon anında veya ovulasyona 3 saat kala LH'nin etkisine bağlı olarak 1. mayozu tamamlar 1. kutup cisimciği previtellin boşluğa atılır ve sekonder oosit oluşur. Sekonder oosit, 2. mayoz bölünmeye geçer ancak korona radiata hücrelerinden salgılanan inhibitörlerin etkisi ile 2. mayoz fazında arreste uğrar. Yetişkin bir kadında hayatı boyunca ovulasyonla periton boşluğuna atılan sekonder oosit sayısı yaklaşık 400-500 adettir (12-14).

3.1.2. Ovaryumun anatomisi

Ovaryumlar, erkekteki testislere karşılık gelen ve apertura pelvis superiorun hemen alt kısmında ve pelvis duvarının lateral kısımlarında, tuba uterinanın posterior ve inferior kısmında yerleşmiş bir çift internal kadın genital organı aynı zamanda bir çift endokrin bezdir. Fossa ovarica'da yerleşmişlerdir. Arterya (A.) iliaca externa ve a. iliaca interna arasında yerleşen bu çukuru posteriorda üreter sınırlarken anterior ve inferior komşuluğunda ligamentum latum uteri'nin taban kısmı sınırlar. Çukuru önde oblitere olmuş a. umbilicalis (ligamentum umbilicale medialis) sınırlar. Fossa ovarica'nın dibinde A. obturatoria, vena (V.) obturatoria ve nervus (N.) obturatorius peritonla örtülü bir şekilde yer alır. Ovaryumlar koronal düzlemde pelvis yan duvarlarından uterusu uzanan bağ olan ligamentum latum uteri'nin arka yüzünden mezovaryum ile asılı durumdadırlar. Bu bağ aynı zamanda üst kısımda tuba uterinayı da sarar. Ovaryumları asan mezovaryum ile tuba uterinanın arasında kalan ligamentum latum uteri bölümüne mesosalpinx adı verilir.

Ovaryumların uzun eksenleri dikey yöndedir. Extremitas uterina ve extremitas tubaria adlı iki uçları vardır. Ligamentum (lig.) ovarii suspensorium ve içerisinde yer alan A. ovarica ve v. ovarica, extremitas tubaria'da tutunacak şekilde yer alır.

Fimbria ovarica adı verilen, infundibulum tuba uterinanın en uzun saçağı da bu uca tutunur. Extremitas uterina ise ligamentum ovarii proprium (gubernaculum kalıntısı) ile uterusun cornu uteri kısmına tutunur. Lig. ovarii proprium fibromusküler bir bağdır ve fundus uteri'ye tutunan lig. teres uteri ile devamlılık gösterir. Lig. teres uteri pelvis girişinden geçtikten sonra anulus inguinalis profundus ve canalis inguinalisten geçip perineuma gelir. Labium majus pudendi'nin bağ dokusunda sonlanır.

Ovaryumun iki yüzü ve iki kenarı vardır. Dış yüzüne facies lateralis ve iç yüzüne facies medialis adı verilir. Dış yüzü fossa ovarica'ya bakar. İç yüzü infundibulum tuba uterinaya bakar. Kenarlarından önde olan ve daha ince olanına margo mesovaricus adı verilir. Bu kenarda hilum ovarii bulunur. Bu kenardan damar ve sinirler ovaryuma ulaşırlar veya terk ederler. Ureter ile komşuluk yapan arka kenara ise margo liber adı verilir.

Ovaryumun bölümleri incelendiğinde, en dışta squamoz epitel yapısında periton yer alır (Bu tabaka erişkinde bulunmaz, erişkinde kolumnar hücre tabakası vardır). Daha sonra, tunica albuginea, stroma ovarii, cortex ovarii (foliküllerin yer aldığı bölüm), medulla ovarii olarak sınıflanır. Ovaryuma arteriyal kan akışı aorta abdominalisin çift visseral dallarından olan A. ovaricalardır. A. ovarica iliak damarların üzerinden geçer ve ligamentum suspensorium ovarii içinde ovariuma gider. Ovaryumda venöz drenaj ise ovaryumun venleri hilum ovarii'den çıkıp plexus pampiniformis adlı damar ağını oluşturur. V. ovarica bu ağı oluşturan venlerin birleşmesiyle oluşur. V. ovarica dextra, V. cava inferior'a açılır. V. ovarica sinistra, V. renalis sinistra'ya açılır. Ovaryumda lenf damarları paraaortik ve preaortik lenf nodlarına açılır.

Ovaryumda sinir innervasyonunda, ovaryumun parasempatik sinirleri N. vagus'tan gelir. Sempatik sinirler ise torakal 10-11 seviyesinden gelir. Ovaryumda ağrı duyusu sempatikler içinde taşınır (13-15).

3.1.3. Gelişim aşamalarında ovaryum

Yenidoğanda ovaryum, bronz renkte, uzamış ve yassılaşmış bir yapıda gelecekteki pelvis üzerinde yer almaktadır. Ovaryumun kenarları genelde düzensiz olup çok loblu bir görüntüye içermektedir. Yaklaşık 1,3 cm x 0,5 cm x 0,3 cm

boyutlarında ve 0,3 g'den daha az bir ağırlığa sahiptir. Bebeklik ve çocukluk boyunca, ovaryum gelişir, büyür, şekli değişir ve ağırlık kazanır (yaklaşık 30 kat). Böylece puberte döneminde olması gereken şekil, boyut ve ağırlığa ulaşan yetişkin ovaryumlar pelvis içinde yer alır (1, 16, 17).

Yetişkin ovaryumlar, yaklaşık 3,0-5,0 cm x 1,5-3,0 cm x 0,6-1,5 cm boyutlarında ve 5-8 g ağırlığında oval şekilli pembe-beyaz renkli bir çift organdır. Foliküllerin içeriğine göre boyutları ve ağırlıkları değişkenlik gösterebilir. Erken üreme dönemlerinde dış yüzeyi genellikle pürüzsüz olur ancak ilerleyen zamanlarda kıvrımlı hale gelir. Kaba anatomisinde zor da olsa dışta korteks, içte medulla ve hilus bölgesi gözlemlenebilir. Foliküler yapılar (kistik foliküller, sarı corpora lutea, beyaz corpora albicantia) tipik olarak ovaryan korteks ve medullada görülür (1, 16, 17).

Postmenopozal dönemde ovaryumlar olgun dönemdeki boyutlarının yaklaşık yarısı kadar küçülür ancak ovaryan stromal hücre sayısı ve rezorbe olmamış korpora albicantia açısından değişiklik gösterebilir. Postmenopozal dönemde ovaryumların kaba anatomisinde genellikle küçülmüş, girintili-çıkıntılı, sert ve ağır, soluk renkte kesik bir yüzey izlenir. Kortekse nadiren küçük çapta inklüzyon kistleri ve medullada tipik olarak küçük beyaz yara izleri (corpora albicantia) görülür. Medulla ve hilus bölgesinde kalın duvarlı vasküler yapılar izlenebilir (1, 16, 18).

3.1.4. Yüzey epiteli

Ovaryumun yüzey epiteli tek sıralı kübik hücre tabakasından oluşur. Yüzey epitel hücreleri ve stroma bazal bir membran ile birbirinden ayrılır. Bu epitel tabakası çok ince ve kırılgan olduğundan doku takibi aşamaları sebebiyle preparatlarda görülmeyebilir. Yüzey epitel hücreleri glikojen, asit ve nötr mukopolisakkaritler içermektedir. Epitelyal inklüzyon bezleri yüzey epitelinin kortikal invaginasyonlarından kaynaklanan ve yüzey epiteli ile bağlantısını kaybeden bezlerdir (1, 13, 18).

Ovaryum yüzey epitelinin ultrastrüktürel görünümü taramalı ve geçirimli elektron mikroskobu ile incelendiğinde hücre yüzeyi dallanmış çok sayıda mikrovilluslu, silli ve pinositotik veziküller içeren kubbemsi bir apeksa sahiptir. Hücre sitoplazmasında çok sayıda polizom, serbest ribozom, mitokondri, ara

filament ve tonofilament demetleri içerir. Bazal sitoplazmada bazen lipid damlacıkları bulunur. Hücre çekirdeği girintili nükleer membrana sahip olup çekirdekçik periferde lokalize olmuştur. Düz veya kıvrımlı lateral yüzey özelleşmeleri luminal bağlantı kompleksleri, desmozomlar ve desmozomal-tonofilament kompleksleri ile birbirine bağlıdır. Membranlar, bazı alanlarda birbirinde uzaklaştıklarından hücreler arası boşluklar oluştururlar. Yüzey epiteli altındaki stromadan bazal lamina ile ayrılmıştır (1, 2, 4, 18) .

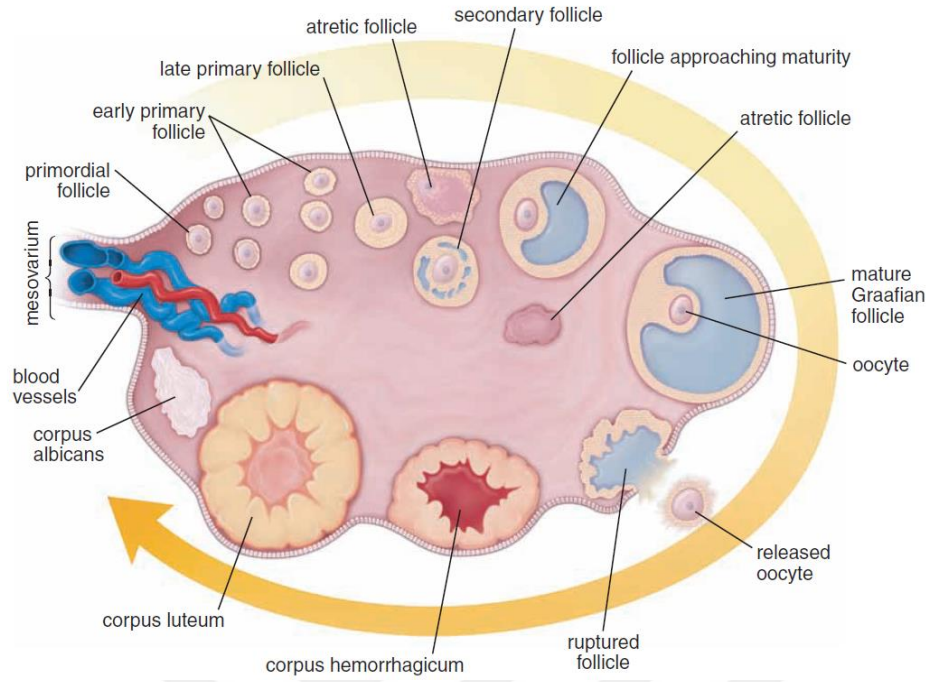
3.1.5. Stroma histolojisi

Korteks ve medullanın stroması birbirinin devamı olduğundan ikisi arasındaki sınır belirgin değildir. Stromal hücreler sitoplazma açısından az olup iç içe bir formda organize olur. Geç üreme dönemi ve menopoza sonrası dönemde bu hücrelerde lipid damlacıkları görülebilir. Stromal hücreler yoğun bir retiküler liflerle çevrilmiştir. Kortikal ve medüller stroma birbirinin devamıdır ve görünüm olarak benzediğinden aralarında kesin bir sınır bulunmamaktadır. Stromal hücreler iğ şeklinde olup sitoplazma açısından fakirdir. İç içe birarada bulunan stromal hücreler retiküler ve kollajen liflerle birbirinden ayrılırlar ve yüzeyel kortekste bu durum oldukça belirgindir. Buradaki kollajen, bazı kaynaklarda tunika albuginea olarak geçer. Stroma, fibroblast benzeri hücrelerden türevlenen farklı tipte hücreler barındırabilir. Stromada bulunan luteinize stromal hücreler lipid içeren, eozinofilik poligonal hücrelerdir. Genellikle medullada tek veya gruplar halinde bulunurlar ve bir çekirdek ve belirgin bir çekirdekçik içerirler. Gebelik esnasında veya menopoza sonrası dönemde luteinize stromal hücreler sayıca artar. Desidual hücreler tek ve nodüler olarak yüzeyel korteksin stroması içinde veya periovaryan yapışıklıklar içinde birleşik tabakalar halinde oluşabilir (4, 18-20).

Ovaryumun stromal hücreleri ultrastrüktürel olarak ince iğ şeklinde çekirdeklere ve karmaşık sitoplazmik uzantılara sahiptir. Kollajen üretimi için gerekli olan organeller açısından zengindir ancak az sitoplazma içerir. Serbest ribozom ve mitokondri gibi organellerce zengindir. Plazma zarında mikropinositotik veziküller ve lateral desmozom benzeri bağlantı kompleksleri bulunabilir. Luteinize stromal hücreler ise steroidogeneizde rol alan düz endoplazmik retikulum (ER), tübüler kristal mitokondri ve Golgi gibi organellerden zengindir. Bu hücrelerde lipid damlacıkları gözlenir ve sitoplazmaları bol miktardadır (1, 13, 17, 19).

3.1.6. Primordial foliküller

Primordial foliküller ovaryumun yüzeyel korteksinde yer alan etrafı mitotik olarak inaktif olan tek katlı yassı granüloza hücresi ile çevrili içinde çapı 40 ila 70 µm olan primer oosit barındıran foliküllerdir. Doğum esnasında sayıları yaklaşık 400.000 iken bu rakam menopozun sonuna kadar folikülogenez ve atrezi gibi süreçler sonunda gittikçe azalır (20). Bazı primordial foliküller nadiren de olsa çok sayıda primer oosit içerebilir ancak bu durum özellikle 20 yaş altı bireylerde görülür. Primordiyal foliküldeki primer oosit mayoz bölünmesini tamamlamış ve profaz I'in diploten aşamasında durmuştur. Ovulasyon sonucu atılmadan önce interfaza girer veya döllenme olmazsa atreziye uğrayarak atılır. Primer oosit büyük ve yuvarlak bir çekirdeğe sahiptir ve çekirdek de granüler homojen dağılan bir kromatine ve bir veya daha fazla yoğun, iplik benzeri çekirdekçiğe sahiptir (4). Primer oosit sitoplazmasında organellerin birbiriyle bağlantı sonucu oluşturdukları paranükleer, eozinofilik, hilal şeklindeki bölgeye Balbiani vitellin cisimciği (BVB) adı verilir. Vitellin cisimciğinin içinde koyu bir nokta (sentrozom) bulunur ve bu noktanın etrafında yoğun mitokondrilerin yer aldığı daha koyu ve Periyodik Asit-Schiff (21) ile boyanan granüler bölge bulunmaktadır. Primordial germ hücre ve embriyonik gonadların oogonya sitoplazmasında bol miktarda glikojen ve yüksek alkalın fosfataz aktivitesi bulunurken primer oosit sitoplazması bunlardan yoksundur (1). Vitellin gövdesi içinde, bir hale ile çevrili karanlık bir nokta (sentrozom) bulunur ve bu nokta, daha koyu, PAS-pozitif, mitokondri açısından zengin granüler bölgelerle çevrilidir. Oositin sitoplazması, bol miktarda glikojenden ve primordial germ hücrelerinin ve embriyonik gonadın oogonia'sının karakteristik özelliği olan yüksek alkalın fosfataz aktivitesinden yoksundur. Primordial folikülün etrafındaki granüloza hücrelerinde organeller ve lateral desmozomlar nadir olup primer oosite ise apikal yüzlerindeki mikrovilluslarla bağlanırlar (1, 13, 22) (Şekil 1 ve 2).

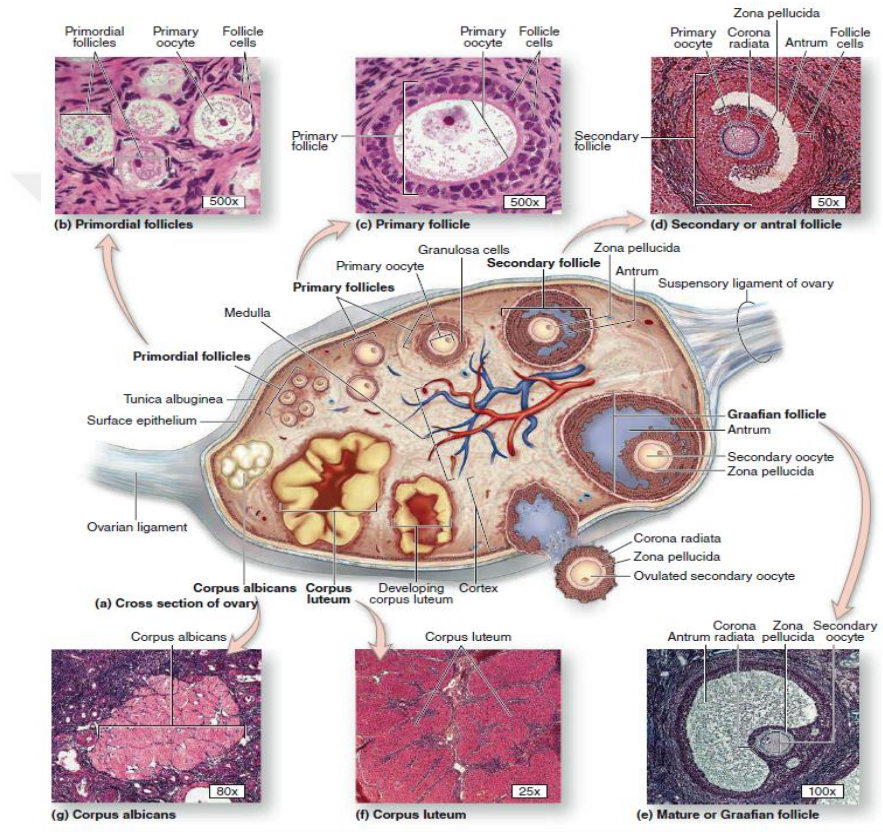


Şekil 1. Ovaryum kesitinden bir görünüm. Folikül gelişimi, korpus luteum ve damarların olduğu mezovaryum görülmektedir. (4)

3.1.7. Gelişmekte olan foliküller

Folikülogenez, kadınların üreme süreci boyunca primordial foliküllerin olgunlaştığı her ay gerçekleşen adet döngüsünü ifade eder. Luteal fazda başlayan foliküler olgunlaşma bir sonraki adet döngüsünün foliküler fazına kadar devam eder. Preovulator yada baskın folikül oositin serbest bırakılmasıyla sonuçlanan tam olgunlaşma evresine ulaşır. Bunun dışındaki foliküller ise gelişimine devam eder ancak erken evrelerde atreziye uğrayarak dejenere olurlar. Primer folikülün granüloza hücreleri küboidalden silindirik şekle geçerek foliküler olgunlaşmanın başladığını gösterir. Bu arada primer oosit de genişler ve etrafındaki granüloza hücreleri mitoz yoluyla 3-5 katlı bir tabaka oluşturur ve sekonder (preantral) folikülü meydana getirir. Tam bu aşamada primer oositi eozinofilik, PAS pozitif, homojen ve hücresiz bir tabaka sarar ve bu tabakaya zona pellusida adı verilir. Tam olgunlaşmış bir folikülde zona pellusida 20-25 μm kalınlığına ulaşır ve asit mukopolisakkartı ve glikoproteinden oldukça zengin hale gelir. Sekonder foliküller 50-400 μm çapında olup onu çevreleyen ovaryan stromal hücreleri, içte birkaç tabakadan oluşan teka folikülü interna ve dışta sınırları belirgin olmayan teka folikülü eksterna hücre katmanına özelleşir (1, 2, 4). Granüloza hücreleri tarafından mukopolisakkartı içeren

bir sıvı granüloza hücrelerini bölgelere ayırır ve bu bölgeler ileride birleşerek birkaç katlı granüloza hücreleri ile kaplanmış tek büyük bir boşluk (antrum) oluştururlar. Bu aşamadaki folikül ise tersiyer (antral veya veziküler folikül) olarak adlandırılır ve oosit folikülün bir kutbunda eksantrik bir pozisyonda yer alır. Oositin merkezde kalacak şekilde granüloza hücreleri antrumun içine doğru bir çıkıntı yapar ve çoğalarak kümülüs ooforus'u oluşturur. Bu aşamadaki folikül ise olgun veya Graafian folikülü olarak adlandırılır (3) (Şekil 1 ve 2).



Şekil 2. Ovaryumdaki foliküllerin ve korpus luteumun histolojik görünimleri (3)

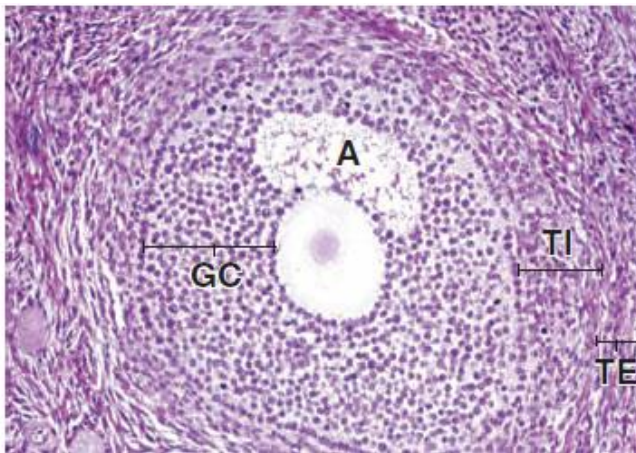
3.1.8. Atretik foliküller

Doğumda mevcut olan 400.000 primordial folikülün yaklaşık 400'ü ovulasyonla atılırken geri kalan %99.9'luk kısım atreziye uğrayarak dejenere olur. Atretik foliküller doğumdan önce başlar ve üreme yaşamı boyunca devam eder, ancak en yoğun olarak doğumdan hemen sonra, ergenlik ve hamilelik sırasında görülür (1, 3). Atreziye neden olan ve atreziye giden folikül seçiliminin patogenezi günümüze kadar aydınlatılamamıştır. Primordial ve preantral foliküllerde atrezin çekirdekte kromatin yoğunlaşması, piknoz ve fragmentasyon ve sitoplazmada vakuol varlığı ve oosit

dejenerasyonu ile kendini gösterir. Son olarak granüloza hücreleri dejenere olur ve folikül iz bırakmadan kaybolur. Daha olgun foliküllerde atretik folikül mekanizması kompleks olup bazen obliteratif atreziye ve bir skar oluşumuna neden olarak korpus fibrozuma yol açar. Bazı foliküller bu aşamada atretik kistik foliküller olarak belirsiz bir süre kalabilirler (4) (Şekil 1 ve 2).

3.1.9. Granüloza hücre tabakası

Granüloza hücreleri kökenleri doğum esnasındaki embriyonik öncül hücrelerinden alırlar. Olgun ve olgunlaşmakta olan foliküllerde yer alan granüloza hücreleri 5-7 μ m çapında olup bazal membran üzerine oturanlar ise genellikle silindriktir. Soluk ve az sitoplazmalı, polihedral, oval görünümlü, hiperkromatik çekirdekli sınırları belirgin olmayan hücrelerdir (3). Gelişen foliküllerdeki granüloza hücreleri yoğun mitoz bölünme geçirdiğinden mitotik figürlere sık rastlanır ancak ovulasyona doğru sayıları azalır. Granüloza hücreleri arasında Call-Exner cisimciği olarak adlandırılan ve yoğun eozinofilik, PAS-pozitif, filamentli bir materyal içeren küçük boşluklar yer alır (4). Olgunlaşan Graafian foliküllerinin granüloza hücre tabakası damarsız olup retikülün içermezken teka hücre tabakaları ise bu yapıları barındırır. Granüloza hücrelerinde protein sentezinde yer alan lameliform kristal mitokondri, granüllü ER, serbest ribozomlar ve Golgi gibi organeller foliküllerin büyümesine paralel olarak sayıca artar. Steroidogeneze rol alan düz ER ve tübüler kristal mitokondri organelleri granüloza hücrelerinde ovulasyondan kısa bir süre öncesine kadar görülmez. Komşu granüloza hücreleri arasında adheren bağlantılar, gap bağlantıları ve desmozomlar bulunur (1, 13) (Şekil 3).



Şekil 3. Sekonder foliküldeki Granüloza hücreleri (GC), Antrum (A), Teka interna (TI) ve Teka eksterna (TE) tabakaları (4)

3.1.10.Teka hücre tabakaları

Teka hücreleri köken olarak gelişen foliküllerin stromal hücrelerinden farklılaşırlar. Antral folikülde teka interna iyi gelişmiştir ancak teka eksterna pek seçilemez. Teka interna üç-dört sıralı hücre tabakasından oluşur ve bir bazal membran ile granüloza hücre tabakasından ayrılır. Granüloza hücrelerinin aksine, teka interna hücreleri luteinize veya kısmen luteinize bir görünüme sahiptir. Olgunlaşan foliküllerde teka interna luteinizasyonu özellikle gebelik sırasında belirginleşir. Teka interna hücreleri yuvarlak veya poligonal şekilli, 12-20 µm çapında, lipid içeren, berrak-eozinofilik ve vakuollü sitoplazmaya sahiptirler. Merkezde yer almayan bir yuvarlak, veziküler çekirdek ve belirgin bir nükleolus içerirler. Olgunlaşan foliküllerde teka hücreleri genelde mitotik figürler içerir. Teka hücre tabakası damar yapısı gelişmiş olup yoğun bir retiküler lif ağı içerir (1, 23) .

Teka eksterna, teka internayı çevreler ve değişken kalınlıkta olabilir. Ovaryan stroma ile belli belirsiz birleşir. Sirkumferal olarak düzenlenmiş kollajen demetleri, kan ve lenf damarları ve steroidojenik histokimyasal özellikleri (granüloza ve teka internada görülür) olmayan iğsi hücrelerden oluşur. İğ hücreleri yoğun mitotik aktivite gösterir. Teka interna hücreleri ultrastrüktürel olarak granüloza-lutein hücrelerindeki benzer şekilde steroidogenez ile ilişkili organelleri içermektedir. Düz kasa farklılaşan teka eksterna hücreleri bu organellerini kaybeder (4, 23) (Şekil 3).

3.1.11.Korpus luteum

Genelde 28 gün süren adet döngüsünün on dördüncü gününde ovulasyonu takiben ve döllenme gerçekleşmediğinde, bozulmuş ovulatuar folikül menstrual korpus luteumu (MKL) haline gelir. Olgun MKL 1.5-2.5 cm, yuvarlak, sarı renkli, gri, fokal hemorajik bir pıhtı ile dolu kistik bir yapıdır. Ovulasyondan sonraki 14 gün boyunca MKL'nin yapısı histolojik olarak değişir. Olgun bir MKL'nin luteinize granüloza hücreleri (yada granüloza lutein hücreleri), bir-iki nükleoluslu, yuvarlak bir çekirdek, soluk ve eozinofilik sitoplazmalı, 30-35 µm boyutlarında poligonal şekilli ve çok sayıda küçük lipid damlacıkları içeren hücrelerdir (1, 24). Birkaç hücre tabakasından oluşan teka interna MKL'nin etrafını düzensiz bir şekilde sarar ancak yer yer kesintiye uğrar. MKL'nin erken gelişim dönemi hariç, diğer evrelerinde lutein hücreleri granüloza lutein hücrelerinin yaklaşık yarısı büyüklüğündedir. Bu

hücreler yuvarlak-oval çekirdekli, belirgin bir nükleolus, genelde granüloza lutein hücrelerinden daha büyük bir steroidojenik lipid damlacıklarına ve koyu sitoplazmaya sahiptirler (1, 4). Üçüncü görülen ve çok sayıda bulunan hücre tipi ise K hücresidir. Menstrüasyona kadar varlığını sürdüren ve sonra dejenere olan bu hücreler olgun folikülün teka internasında görülür. Bu hücreler yıldız şekilli, sudanofilik sitoplazmaya yoğun eozinofilik, hiperkromatik veya piknotik çekirdeklere sahiptir . Ovulasyondan sonraki 8.-9. günde granüloza-lutein hücreleri piknozise girer, biyosentez azalışı, sitoplazmik lipid, hidrolitik enzim ve fibrozis artışı sonucu hücreler fagositozise uğrar ve birkaç ay sonra korpus albicans'a dönüşür. Ultrastrüktürel olarak granüloza lutein hücrelerinde düz ER ve tübüler kristal bol mitokondri (steroidogenez), gelişmiş bir Golgi, serbest ve bağlı ribozomlar, mikrovillus, lipid damlacıkları ve lipofuscin pigmenti görülür. Teka-lutein hücrelerinde ise Golgi, mikrovillus ve katlanmış zarlar bulunmaz (3, 4, 25) (Şekil 1 ve 2).

Gebelik korpus luteumu (GKL) genellikle MKL'den ayırt edilemeyebilir ancak MKL'nin son evresinde sahip olduğu turuncu-sarı renginin aksine daha büyük ve parlak sarı bir renge sahiptir. Bazen ovaryumun hacminin yarısını işgal eder ve merkezi genellikle sıvı ile dolu kistik bir boşluk, fibrin veya kan içerir. Gebelik sonrası lohusa döneminde GKL korpus albicans'a dönüşür. Gebelik gerçekleştiğinde granüloza lutein hücreleri genişler ve maksimum 50-60 µm boyutlarına ulaşır. Hücreler polihedral veya yuvarlak olup eozinofilik sitoplazma, yuvarlak-oval şekilli veziküler çekirdekler ve bir-iki belirgin nükleolus içerir. Ovulasyondan sonraki 15. günde GKL'nin granüloza hücreleri içindeki eozinofilik kolloid veya hyalin damlacıkları ile hamilelik tanımlanabilir (2, 13). MKL'de görülen K hücrelerine benzer hücreler erken GKL'de granüloza tabakasında görülür. GKL'nin teka lutein hücreleri granüloza hücrelerine göre boyut olarak dörtte bir büyüklüğünde, daha koyu bir sitoplazmaya ve daha hiperkromatik bir çekirdeğe sahip olup kolloid inklüzyonlar içermezler. Teka lutein hücreleri şekil olarak polihedral veya yuvarlak olup çekirdekleri sentral yerleşik ve bir-iki nükleolus içerir. GKL'nin erken evrelerinde K hücreleri görülebilir. GKL'nin merkezdeki kistik yapısı fibroblast, kollajen, retiküler lif ve kan damarları ile çevrilmiştir. GKL'nin ultrastrüktürel yapısında genel olarak MKL'nin ultrastrüktürel yapısına benzerdir (1, 4, 25).

MKL dejenere olurken bağ doku tarafından istila edilir ve skar dokuya dönüşür, bu yapıya korpus albicans adı verilir. Korpus albicans, erken dönemlerinde seroid ve hemosiderin yüklü makrofaj içerirken olgun döneminde tamamen kollajen liflerinde ve fibroblastlardan oluşan sınırları belirgin bir yapıya dönüşür. Yer yer fokal kalsifikasyon ve ossifikasyon görülebilir (25) (Şekil 1 ve 2).

3.1.12.Hilar hücreler

Ovaryumdaki hilus hücreleri morfolojik olarak testisin Leydig hücrelerine benzer. Hilus hücreleri çocukluk dönemi hariç diğer dönemlerde (fetal, ergenlik, postmenopozal) görülür. Sayıları, boyutları, şekilleri değişkendir ancak genelde agregat olarak ovaryan hilusu ve komşuluğundaki mezovaryumda bulunur. Hilar hücreler 15-25 µm çapında, yuvarlak-oval şekilli, hafif iğsi, yoğun eozinofilik sitoplazma, veziküler çekirdek ve bir veya iki tane çekirdekçiğe sahiptir. Ultrastrüktürel olarak, hilar hücreler belirgin düz ER ve tübüler kristal mitokondri, gelişmiş Golgi, büyük lizozomlar ve lipid üreten hücrelerdir (2, 26).

3.1.13.Rete ovarii

Rete ovarii, testiküler dokuda bulunan rete testisin ovaryumdaki benzeridir. Hilusta yer alır ve küboidal-silindirik bir epitel ile örtülüdür. Lümeni düzensiz yarıklar, tübüller, kistler ve papilla ağından oluşur. Ultrastrüktürel olarak mikrovilluslu ve mikrovillus içermeyen epitel hücrelerine sahiptir. Sitoplazmasında çok sayıda mitokondri, granüllü ER, serbest poliribozom ve glikojen bulunur. Komşu hücreler arasında lateral özelleşmelerden desmozom bulunur ve bazal membranlar belirgindir (1, 4, 27).

3.2. Kudret Narı

Kudret Narı (KN, Latince *Momordica charantia*) Cucurbitaceae ailesine ait sarmaşık bir bitki olup hem sebze hem de ilaç olarak kullanılır. Hint dilinde karela olarak bilinir ve yaprakları ısırılmış bir görünüm verdiğinden adını momordica (ısırmak) kelimesinden alır. Bu türe ait bitkilerin meyve ve yaprakları besleyici ve içerik açısından zengin olup birçok fitokimyasal barındırmaktadır. KN bitkisinin meyve dahil tüm kısımları acı bir tada sahiptir. KN meyveleri dikdörtgen şeklinde olup küçük salatalık görünümünde iken olgunlaştığında turuncu-sarıya dönüşen

zümürüt yeşili bir renk alır (Şekil 4) (28). Tropikal ve subtropikal bölgelerde yetişen KN özellikle Asya, Amazon, Doğu Afrika ve Karayipler’de yetişen bir bitkidir ve tip 2 diyabetes mellitus (T2DM), hipertansiyon, obezite, kanser, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar gibi birçok tıbbi hastalığın tedavisinde geleneksel tıbbi ilaç olarak kullanılmaktadır (29, 30). Tarihsel olarak KN’nin tohumları, kökleri, yaprakları ve meyvesi birçok rahatsızlıkta kullanılmıştır. Örneğin, KN meyvesinin suyu diüretik, laksatif ve antihelmintik özelliklerinden dolayı eklem ağrısı, kronik ateş, sarılık ve gastrointestinal sistem hastalıklarına karşı kullanılmıştır (31). Geleneksel Türk tıbbında ise KN’nin olgun meyvesi zeytinyağına daldırılıp güneşte kurutularak balla karıştırılır ve yara iyileşmesinde ve peptik ülser tedavisinde kullanılır (32). Hint tıbbında ise antidiyabetik, düşük doğum, antelmintik, kontraseptif, antimalaryal ve laksatif özellikleri olduğu düşünülmekte ve dismenore, egzama, emenagog, galaktagog, gut, sarılık, böbrek (taş), cüzzam, lökor, basur, pnömoni, sedef hastalığı, romatizma ve uyuz tedavisi için kullanılmaktadır. Afrika geleneksel tıbbında solucan enfeksiyonları, ateş, dismenore, inflamasyon, frengi ve cilt hastalıkları için KN bitkisinin farklı kısımlarından yararlanılır. T2DM hastalığının tedavisi için bitki yaprakları kaynatılıp ekstraktı çıkarılır. Aynı şekilde Karayip bölgesinde, yaprak kaynatma veya meyve suyu da yaygın olarak uygulanmaktadır. T2DM’nin dışında yüksek tansiyon, rahim enfeksiyonları, sıtma, dizanteri ve solucan enfeksiyonlarında da yaprak kaynatma tekniği uygulanır. Bazı bölgelerde gonore, kızamık, suçiçeği, uyuz ve sıtma tedavisi için Momordica preparatları verilmektedir (28). Günümüz modern tıbbında, KN antidiyabetik, antiviral, antelmintik, antioksidan, anti-inflamatuar ve immunostimulant özellikleri ile bilinmektedir (33).



Şekil 4. Kudret narı bitkisi (5)

3.2.1. Kudret narının bileşenleri

KN'nin kimyasal bileşenleri genel olarak aşağıdaki gibi 5 farklı maddede sıralanabilir (29):

1. Galaktoz, glukoz, glikozit, arabinoz, ramnoz ve mannozdan oluşan heteropolisakkaritler,
2. Ribozomu inaktive eden protein ailesine (RIP'ler) ait momorcharin, momordenol, momordisilin, momordisin, momordisinin, momordin, momordolol, Momordica anti-insan immün yetmezlik virüsü proteini 30 (MAP30) ve KN lektin gibi proteinler ve peptitler,
3. Kukurbitin, kukurbitanl ve kukurbitasinler gibi terpenoidler ve saponinler (charantin, goyasaponin),
4. Flavonoidler ve fenolik bileşikler (kriptoksantin),
5. Uçucu yağlar, yağ asitleri, amino asitler ve steroller gibi diğer bileşikler (sikloartenol, diosgenin, elaeerostit, eritrodiol gentisik asit).

KN'nin bileşenleri üzerinde yapılan analize göre KN bitkisi yüksek miktarda karbonhidrat, protein, lif, vitamin ve mineral içermektedir. Kendi türleri arasında en yüksek besleyici değerlere sahiptir. Meyvesinin %93.2 oranı sudan oluşurken, kuru

ağırlığının %18.02 protein ve %0.76'sını lipidlerden oluşur. Olgunlaşmamış meyvesinde A, C ve P vitamini, tiamin, riboflavin, fosfor, demir, niasin ve mineraller bulunmaktadır. Tohumunda doymamış yağ asidi, esansiyel yağ, seskiterpen, fenilpropanoid, monotерpen, tokoferoller ve polifenoller gibi bileşikler bulunur. Bitkinin perikarp, aril, gövde ve yaprakları fenolik bileşikler içermektedir (34).

3.2.2. Kudret narının anti-diyabetik aktivitesi

KN bitkisinin bilinen en önemli aktivitesi hipoglisemik özelliğidir ve bitkinin tüm kısımları (meyve özü, tohum, yapraklar ve bütün bitki) bu özelliği gösterir. KN ekstraktını içeren bir bitkisel karışım deneysel diyabetik sıçanlarda kan glukozu ve glikosile edilmiş hemoglobin seviyesinde azalma sağlarken ve plazma insülin ve total hemoglobinde artışa neden oldu. Diyabetik sıçanlara kurutulmuş ve taze KN meyve ekstrakt tozunu diyabetik sıçanlara oral yoldan verildiğinde, sentetik ilaç olan glibenklamid grubu ile karşılaştırıldığında KN meyvesinin sıçanların açlık kan şekerini %50 düşürdüğü gözlemlendi (29, 30). Kar ve arkadaşları alloxan diyabetik sıçanlarda iki hafta boyunca günde üç defa 250 mg/kg KN meyve takviyesinin kan şeker düzeylerini normal açlık kan düzeyi seviyesine indirdiğini kaydetmişlerdir (35). Rathi ve arkadaşları kronik alloxan diyabetik sıçanlarda KN ekstraktının sulu tedavisinin 200 mg/kg/gün dozunda 4. ayda kan glukoz düzeyini %70.53 düşürürken streptozotosin diyabetik sıçanlarda 60. günde plazma glukoz düzeyini %22.86 oranında düşürmüştür (36). KN ekstraktından izole edilen charantin, polipeptid-p, momordin Ic, oleanolik asit 3-O-monodesmosit ve oleanolik asit 3-O-glukuronid gibi kimyasalların plazma glukoz düzeyini düşürdüğü bildirilmiştir. Başka bir çalışmada streptozotosin diyabetik sıçanlarda KN meyve suyu tedavisi verilmiş ve pankreatik beta hücre sayısı incelenmiştir. KN uygulanan diyabetik sıçanlarda, KN tedavisi almayan sıçanlara göre beta hücre sayısının arttığını gözleyen yazarlar, KN tedavisinin beta hücre yenilenmesinde rolü olduğunu ileri sürmüşlerdir (30).

KN'nin antidiyabetik etkisi yapılan klinik çalışmalarda da gösterilmiştir. Leatherdale ve arkadaşları insüline bağımlı olmayan 9 diyabetik hastada KN meyve suyunun ekstraktının 50 gr oral glukoz tolerans testi (OGTT) üzerinde kan şekerini azalttığını göstermişlerdir. Hastalara ayrıca kızarmış KN meyve diyeti verilmiş ve glukoz toleransında küçük bir iyileşme kaydetmişlerdir (37). Ahmad ve arkadaşlarının insüline bağımlı olmayan 100 diyabetik hastada KN sebze

süspansiyonu verilmiş çalışmalarında, 86 hastanın tokluk serum glukoz seviyesinde ve 5 hastanın açlık glukoz seviyesinde azalma meydana geldi (38). Sistemik hastalığı olmayan ve herhangi bir ilaç kullanmayan yetişkin başlangıçlı diyabet (MODY) 18 hastada KN meyve suyunun hipoglisemik etkisi araştırılmış ve hastaların %73'ünde OGTT ile glukoz toleransında iyileşme saptanmıştır (39).

Diyabetik 9 hastada KN meyve suyundan izole edilen insülin benzeri bir proteinin enjeksiyonu sonucu hipoglisemik etki gösterdiği ve kan şekerinde ortalama $45,8 \pm 13,6$ düşüşe neden olduğu ve proteinin etkisinin 30-60 dakika arasında olduğu kaydedildi (40). Benzer bir çalışmayı Khanna ve arkadaşları 19 diyabetik hastada KN'nin meyve ve çekirdeklerinden izole ettikleri polipeptit P proteinin enjekte ederek denemişlerdir. Bu proteinin subkutan olarak insanlara enjekte edildiğinde antihiperglisemik etkiye sahip olduğu ve 4-8 saat arasında etki gösterdiği ifade edilmiştir (41).

3.2.3. Kudret narının anti-inflamatuar ve anti-oksidan aktivitesi

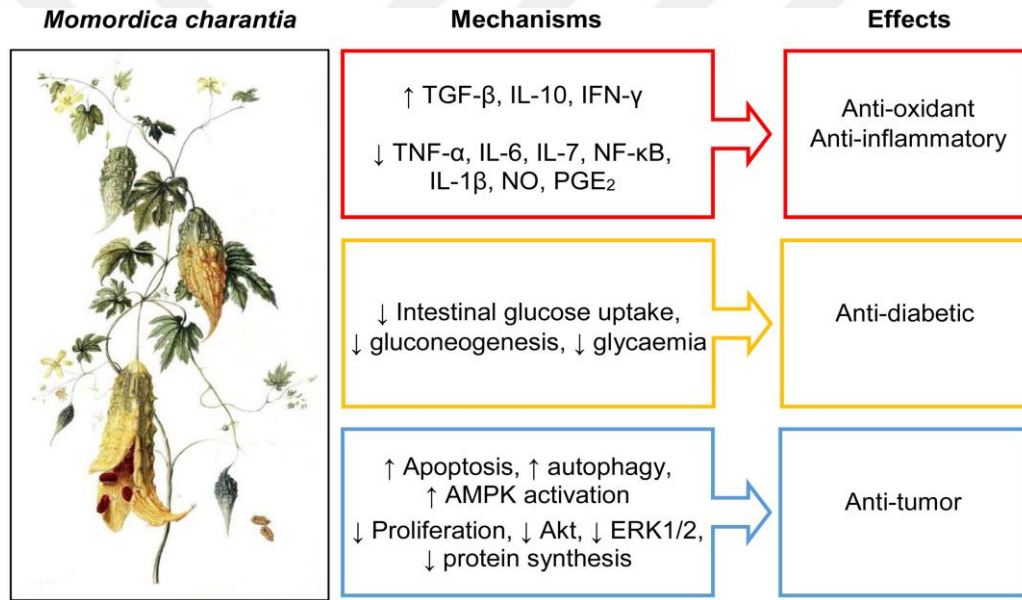
Kronik inflamasyon farklı hastalıklar için bir risk faktörü olup birçok hastalığı tetiklemektedir. Nörodejeneratif hastalıklar, obezite, kardiyovasküler bozukluklar, kanser ve T2DM gibi birçok hastalık kronik inflamasyonla ilişkilendirilmiştir. Diyabetik hastalıklarda kronik inflamasyon hiperglisemik etki göstermektedir. Yapılan çalışmalara göre inflamasyon ve oksidatif stres birbiri ile paralel seyreden süreçlerdir. KN bitkisi üzerinde yapılan çalışmalara göre KN'nin anti-inflamatuar ve antioksidan aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (42).

Hücre kültürü ile yapılan bir çalışmada KN ekstraktlarının lipopolisakkaritler ile indüklenen tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) ekspresyonunu baskımlarken diğer proinflamatuar genler olan interlökin (IL)-1, IL-1 β ve TNF- α ekspresyonunu azalttı. KN ekstraktlarının nükleer faktör kappa B (NF- κ B) sinyal yolağını inhibe ederek inflamasyonu regüle ettiği ve deoksiribonükleik asit (DNA)'ya bağlanma aktivitesini azalttığı kaydedilmiştir. Yine KN'nin p38, c-Jun N-terminal kinaz (JNK), ekstraselüler sinyal-regüle kinaz ve mitojen-aktive protein kinaz (MAPK) aktivasyonunu da engellediği bildirilmiştir (43). Nerurkar ve arkadaşları da KN meyve özütünün nöronal dokularda inflamasyonu azaltarak nörodejeneratif hastalıkları iyileştirdiğini kaydetmişlerdir (44). Benzer şekilde inflamasyon

yolağında rol alan indüklenebilir Nitrik oksit sentaz (iNOs), siklooksigenaz-2 (COX-2), prostaglandin E2 ve nitrik oksit (NO) ekspresyonlarının da KN ekstraktları tarafından baskılandığı kaydedilmiştir ve hücre survivalında rol alan molekülleri de downregüle etmiştir (42). Bir in vitro çalışmada, KN ekstraktından elde edilen triterpenin iNOs, NF- κ B, TNF- α ve IL-1 β proinflatuar markerlerinin ekspresyonu azalttığı gösterilmiştir. Benzer şekilde mutant farelere yüksek yağlı KN içeren diyet takviyesi verilmiş ve sitokin seviyeleri ölçülmüş. Bu farelerde inflamasyon, hiperglisemi ve hiperlipideminin azaldığı, obez farelerde ise insülin direncinin azaldığı, sitokin seviyelerinin normale döndüğü kaydedilmiştir (45). Benzer diyeti kullanan obez farelerde takviye olarak KN tozu verilmiştir ve inflamasyon markerları incelenmiştir. KN tedavisinin, kandaki TNF- α ve IL-6 seviyelerinin azaldığı, inflamatuvar markerlarının ekspresyonlarının regüle edilerek sistemik inflamasyonun ve kolon fonksiyonlarının düzeldiği gözlenmiştir (46).

TNF- α ile tedavi edilen farelerin akciğer dokularında tedavi öncesi KN ekstraktı verilen grup incelenmiş ve KN'nin anti-inflatuar etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada, KN tedavisinin hücre ölümü ve inflamasyondan sorumlu moleküllerinin seviyesinin azaldığı ve bu durumun KN'nin inflamatuvar yolağını baskılayarak yaptığı kaydedilmiştir (47). Kim ve arkadaşları in vitro olarak nöroblastom hücre kültüründe KN ekstraktlarının olası antioksidan aktivitesi araştırmışlardır. KN ekstraktının önceden verilmesi reaktif oksijen türlerinin ortadan kaldırılmasını ve p38 ve ERK1/2 MAPK sinyal yolağı ile sitotoksik oksidatif stresi azalttığını gösterdiler (48). KN bitkisinin gövde ve meyve ekstraktından elde edilen triterpen glikozitlerin inflamasyon ve kanser gibi hastalıklarda rolü olan ksantin oksidaz enziminin aktivitesini inhibe etmiştir. Benzer çalışmalarda KN gövdesinden izole edilen triterpenoidlerin reaktif oksijen türlerini hücreden uzaklaştırdığı, ksantin oksidaz aktivitesini inhibe ettiği, KN'nin tohum ekstraktlarının ise lipid peroksidazı inhibe ederek KN'nin antioksidan özellik gösterdiği ifade edilmiştir (49). Bakterilerin neden olduğu inflamasyona karşı da KN ekstraktı denenmiş ve etkisi araştırılmıştır. Huang ve arkadaşlarının fareler üzerindeki araştırmasında, KN ekstraktının *Propionibacterium acnes*'in neden olduğu dermatolojik inflamasyonu hafiflettiği ve sitokin ve matris metalloproteinaz-9 seviyelerini düşürdüğünü söylemişlerdir. Yazarlar, bu durumu KN'nin anti-inflatuar etkisi ile açıklamışlardır (50). Tsai ve

arkadaşları periodental patojenlerden en yaygın görülen *Porphyromonas gingivalis*'in neden olduğu inflamasyona karşı KN ekstraktının rolünü araştırmışlardır. KN ekstraktından izole edilen kukurbitan triterpenodlerin farelerde *Porphyromonas gingivalis* enfeksiyonlarına karşı artan IL-8, IL-6 ve IL-1b seviyelerini baskılayarak anti-inflamatuar etki göstermiştir (51). Klinik olarak tek kör, randomize bir çalışmada 38 diz osteoartritli hastaya 3 ay boyunca KN takviyesi günlük olarak verildi. 3 ay sonra bu hastalarda plasebo grubuna göre diz osteoartritli hastanın klinik semptomlarının hafiflediği, ağrı şikayetlerinin, açlık kan şekeri ve vücut kitle indeksinin azaldığı kaydedilmiştir. Yazarlar KN'nin anti-inflamatuar aktivitesinin yanında analjezik etkisinin de olduğunu ifade etmişlerdir (52). Kudret narının etki mekanizması Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5. Kudret narının farmakolojik özellikleri ve etki mekanizması (53)

3.2.4. Kudret narının anti-kanser aktivitesi

Birçok kanser tipinde KN antikanser aktivitesini, Akt/mTOR/p70S6K sinyal yolağını, p38MAPK-MAPKAPK-2/HSP-27 sinyal yolağını, Wnt/β-katenin sinyal yolağını ve hücre döngüsü regülatör proteinleri modüle ederek hücre döngüsü inhibe eder ve apoptotik proteinleri aktive ederek gösterir. Yue ve arkadaşları mürin hepatik stellat hücre çalışmasında KN ekstraktından izole edilen üç farklı kukurbitan tipi triterpen glikozidlerin anti-kanser aktivitesini araştırmışlardır. Bu çalışmada yazarlar KN ekstraktındaki kimyasalların hepatik karsinomdan türetilen hücre hattında hepatik karsinom ve fibrozisi önleyerek antitümör aktivitesi gösterdiğini ifade

etmişlerdir (54). KN'nin ekstraktında bulunan bazı proteinlerin ribozom-inaktive edici protein özelliği gösterdiği, bu proteinlerin hücre göçünde yer aldığı ve anti kanser ilaçlarında yaygın olarak kullanıldığı belirtilmiştir. KN sulu ekstraktı, in vitro sıçan adenokarsinom hücrelerinde hücre büyümesi, DNA/RNA (55) sentezi malignitede rol alan guanilat siklazın aktivitesini düşürerek prostat adenokarsinom büyümesini inhibe etti. Lee ve arkadaşları yaptıkları in vitro insan kanser hücre deneyinde, KN ekstraktındaki momordin I'in antikanser özelliği göstererek tümör sinyal yolağında rol alan Jun/Fos aktivasyonunu inhibe ettiği ve Jun/Fos-DNA reaksiyonunu engellediğini belirtmişlerdir (56). İn vitro tümör hücre hattında, alfa-momorcharin koryokarsinom, melanoma, sarkoma hücrelerine karşı antitümör özelliği gösterdi. Alfa-Momorcharin üzerinde yapılan başka bir çalışmada, KN ekstraktının tümörlü mutant farelerde uterin adenomiyozu ilerlemesini durdur. Taketomo ve arkadaşları KN ekstraktının insan lenfosit hücre kültüründe birçok dokuda guanilat siklazı inhibe ettiği ve bununda lösemi ve diğer kanser tiplerinin patogenezi ve replikasyonunu rol almaktadır. Aynı yazarlar KN'nin antikanser özelliğini gösteren klinik çalışma da gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada lökomogeneze rol alan guanilat siklaz enziminin aktivitesini KN ekstraktı tedavisi ile inhibi edildiğini ifade etmişlerdir (57).

3.2.5. Kudret narının anti-bakteriyel aktivitesi

Yapılan deneysel ve klinik çalışmalarda KN ekstraktının antimikrobiyal etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Khan ve arkadaşları 15 farklı patojen üzerinde KN meyvesinin antimikrobiyal etkisini araştırdılar ve KN meyvesinin birçok organizmaya (*Staphylococcus albus*, *Escherichia coli*, *micrococcus roseus* vb.) karşı aktivitesini göstermişlerdir (58). Diğer çalışmalarda KN yaprağının alkolik ekstraktının *Escherichia coli*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella dysenteriae* ve *Streptomyces griseus* kültüründe antimikrobiyal aktivitesi izlendi (59). KN'nin meyve ekstraktının *Helicobacter pylori*-organizmasına karşı minimum inhibitör konsantrasyonu 1.95-250 ug/ml ile üremesini inhibe etmiştir. Fareler üzerinde yapılan klinik faz II çalışmasında, KN'nin *Mycobacterium tuberculosis* inhibitör aktivitesi test edilmiş ve KN bitkisinin *Mycobacterium tuberculosis* büyümesini durduran maddeleri salgılattığı kaydedilmiştir (60).

3.2.6. Kudret narının anti-viral aktivitesi

KN bitkisinden izole edilen bazı fitokimyasalların (momorcharin, lectin ve MAP 30) in vitro deneylerde Epstein–Barr, herpes, insan immün yetmezlik virüsü (HIV), coxsackievirus B3 ve polio virüslere karşı antiviral aktivite gösterdiği belirtilmiştir. KN çekirdeklerinin suyundan izole edilen alfa momorcharin'in düşük doğum, anti-tümör ve anti-HIV aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur. Benzer şekilde, KN meyve ve çekirdeklerinden izole edilen MAP30 proteini HIV-1 integras enzimini bloke ederek HIV enfeksiyonu inhibe etti (61). Cunnick ve arkadaşları KN meyve ve çekirdeklerinin anti-lösemik ve anti-viral etkisini araştırdıkları çalışmada KN ekstraktı farede natural killer hücrelerinin aktivasyonu sağlayarak anti-lösemik aktivite gösterdi (62). KN'nin tohum, meyve ve yapraklarından izole edilen momorcharin HIV enfeksiyonunu akut ve kronik enfekte hücrelerde HIV-1 integras enzimini inhibe ederek engelledi. KN'nin meyve ve tohumlarından izole edilen MRK29 proteini HIV enfekte hücrelerde belirli konsantrasyonda HIV-1 ters transkriptazı inhibe etti. Herpes simpleks virüs-1 (HSV-1) ile enfekte edilen hücrelerde KN'den izole edilen protein inaktive edici proteinlerin ve MAP30'un HSV-1 enfeksiyonunda protein sentezini ve viral replikasyonu inhibe etti. Başka bir viral çalışmada, KN'den izole edilen proteinlerin anti-poliovirus enfeksiyon aktivitesi gösterdi (63).

3.2.7. Kudret narının doğum ve infertilite üzerindeki etkisi

Deneysel çalışmaların bazıları KN ekstraktından izole edilen proteinlerin bazılarının dişilerde düşük doğumlara neden olduğunu bildirmiştir. KN tohumundan izole edilen momorcharinler, erken embriyonik dönemin organogenez aşamasında in vitro hücre kültüründe teratogenik aktiviteye sahiptir. Farelere intraperitoneal olarak verilen Alfa momorcharin'in morula ve blastokist evresinde inaktif olduğu, ancak gebeliğin 4. ve 6. günlerinde embriyonun implante aşamasında düşük doğum aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir (64). İn vitro başka bir çalışmada, beta-momorcharin farelerde stromal hücrelerin desidualizasyonunu ve endometriyum ve miyometriyumda hücre dejenerasyonuna neden oldu. Alfa ve beta momorcharin ile tedavi edilen farelerde ovule oosit azaldı, dejenere folikül sayısı arttı ancak gebe kalan farelerin yavru boyutları tedavi almayan grubun yavruları ile aynı boyutta idi. KN'den izole edilen lektinlerin sıçan Leydig ve adrenal hücre kültüründe testosteron

hormonu ve kortikosteron hormonunun üretimini etkilemedi (65). KN tohumlarının ekstraktı sıçanlara 25 mg/100 g vücut ağırlığında 35 gün boyunca verildi ve spermatosit, spermatid ve spermatozoa sayısını azalttı, steroidogenez ve androgenez süreçlerini inhibe etti. KN'nin antiviral özelliği gösteren MAP30 proteininin maksimum efektif dozda bile spermatosit motilite ve vitalite üzerinde herhangi bir olumlu veya olumsuz etkisi olmadı (66). Deneysel çalışmalardan elde edilen verilere göre sıçan ve farelerde KN'nin düşük doğum aktivitesi olduğu ve sperm sayısını düşürdüğünü göstermiştir, ancak bazı çalışmalara göre hamilelik sırasında KN takviyesinin güvenli olduğu bildirilmiştir. KN bitkisinin gebelik esnasında güvenli tüketimine dair daha fazla veriye ihtiyaç duyulmaktadır.

3.2.8. Kudret narının diğer aktiviteleri

Yapılan birkaç çalışmada KN'nin ülserle karşı iyileştirici özelliği kaydedilmiştir. Matsuda ve arkadaşları sıçan midesinde etanol ile gastrik mukozal lezyon oluşturarak 10 mg/kg momordin 1c takviyesinin gastroprotektif efekt gösterdiğini bildirmişlerdir (67). KN'nin olgun meyveleri etanolün neden olduğu sıçan ülserogenez modelinde antiülser aktivitesi gösterdi. İn vitro bir çalışmada, on farklı yerel bitki antelmantik aktivite açısından değerlendirildi ve KN'nin kuşlardaki *Ascaridia galli* solucanlarına karşı etkili olduğu tespit edildi. KN'nin lipofilik ham ekstraktı in vitro olarak antiplazmodiyal aktivite gösterdi (55). Sekiz hafta boyunca KN ile beslenen sıçanların kan parametre değerleri, besin alımı, büyüme ve organ ağırlıklarında bir değişim saptanmadı ancak serum kolesterol seviyeleri KN takviyesinden sonra KN takviyesi almayan sıçanlara göre düştü. Normal ve diyabetik hayvanlarda yürütülen birkaç deneysel çalışma, KN tarafından hipokolesterolemik etki göstermiştir (68). KN tohumundan izole edilen momorcharinlerin, sitotoksik lenfosit yanıtını bastırdığından ve makrofaj kapasitesi etkilediğinden immünsüpresif aktivite gösterdi. Buna karşın başka bir çalışma KN meyve ve tohumlarının farelerde doğal öldürücü hücre aktivasyonu ve interferon artışını tetiklediğinden immunostimulant aktiviteye sahip olduğunu ifade etmiştir (62).

3.2.9. Kudret narının toksisitesi

Yüzyıllardır geleneksel tıp tedavisinde, özellikle de T2DM hastalarında yaygın kullanımına rağmen KN ekstraktının klinik çalışmalardaki verileri oldukça az

olduğundan KN ekstraktının terapötik etkisinin değeri tartışmalıdır. Çalışmaların çoğunun deneysel hayvan modellerinde olması, klinik hasta üzerindeki etkilerine dair veri azlığı, KN ekstraktının etkinliği ve güvenliğine dair bazı soru işaretlerine yol açmıştır. KN dahil Cucurbitaceae familyasına ait bitkilere alerjisi olan kişilerin KN tedavisinden kaçınmaları gerekmektedir. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği olan hastalarda KN tüketimi favizme neden olabilir (69). Yapılan deneysel hayvan çalışmalarında, KN ekstraktının erkek infertilitesi ciddi derecede düşürdüğünden dolayı KN ekstraktının günlük doz alımına dikkat edilmelidir. Ayrıca, KN ekstraktındaki bazı kimyasalların doğumda düşüğe neden olabileceği bildirildiğinden gebelik esnasında KN ekstraktının tüketilmesinden kaçınmaları gerekir (33).

KN'nin hipoglisemik etkisi bilindiğinden dolayı çocuklarda açlık durumunda KN'nin tüketilmesi kan glukoz seviyesinde ciddi bir düşüşe neden olur. Pediatrik dozlarla ilgili diğer veriler eksiktir. KN'nin 4000 mg/kg veya fazla doz ile uzun süreli tedavinin nefrotoksisiteye neden olduğu bilinmektedir (70). KN'nin 8 haftaya kadar düşük dozlarda takviyesi hayvanlarda herhangi bir organ toksisitesi veya hematolojik parametrelerde olumsuz bir etkiye yol açmamıştır ancak yüksek dozlarda intravenöz veya intraperitoneal verildiğinde hayvanlarda toksisite ve ölüme yol açmıştır. Genel olarak meyve ve tohumların bitkinin diğer kısımlarına göre daha toksik olduğu söylenebilir (33).

3.3. İskemi Reperfüzyon Hasarı

İskemi, dokulara yeterince oksijen gitmemesi durumudur, yani kanın hipoperfüze olmasıdır. Sepsis, akut koroner sendromu, organ nakli ve uzuv yaralanması iskemi-reperfüzyon hasarı (IRH) için birer risk faktörüdür. Reperfüzyon iskemik dokunun yeniden kanlanmasıdır, ancak bu durum klinik olarak her zaman iyi sonuçlar doğurmaz. Yapılan güncel çalışmalara göre, iskemi sonrası reperfüzyon işleminin IRH'ye neden olduğunu göstermiştir. Bu durum klinik olarak organ disfonksiyonuna, morbidite ve mortaliteye bir neden olarak tanımlanmıştır. İskemi süresinin azaltılması, antibiyotik ve vazopressörler gibi tedavi seçenekleri mevcuttur (71). Reperfüzyondan sonra, iskemik dokuya kan akışının yeniden sağlanması, kırmızı kan hücreleri aracılığıyla dokuya yeniden oksijen akışını sağlar. Paralel olarak, iskemik hücrelerde daha düşük antioksidan ajan konsantrasyonu nedeniyle

reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimi artar. ROT, endotel disfonksiyonu, DNA hasarı ve lokal inflamatuvar yanıtları destekleyen oksidatif strese neden olur. İnflamatuvar kaskadlar ve oksidatif stres, daha sonra bir sitokin fırtınasını indükleyebilir ve hücresel yapılara verilen hasarın neden olduğu hücre ölümüyle sonuçlanabilir. Reperfüzyon aşaması dinamiktir ve birkaç gün sürebilir. İskemi-reperfüzyon hasarının ayrıntılı mekanizmasını anlamak, yalnızca yeni terapötik fırsatlar için değil, aynı zamanda yaralanmanın önlenmesi için de güçlü bir temel sağlayabilir (21, 72).

Arteriyel kan akımının kesilmesi dokularda hipoksiye neden olur ve mitokondrideki elektron taşıma zincirinde aksamalar meydana gelir ve bu yolla üretilen ATP miktarında düşüş gerçekleşir. Hücrenin enerji ihtiyacını karşılamak için mitokondri organelinde anaerobik metabolizma daha az ATP ve antioksidan üretirken serbest radikaller de oluşur. Hücresel olarak çok aktif olan bu ürünler bir dizi reaksiyon sonucu kendilerinden daha zararlı türlere dönüşürler ve hücrede oksidatif strese neden olur (73). Oksidatif stres, enzimatik ve enzimatik olmayan yollarla gerçekleşebilir. Enzimatik yollar oksidatif stresin majör nedenidir ve ksantin oksidaz sistemi, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz sistemi, mitokondriyal elektron taşıma zinciri ve eşleşmemiş nitrik oksit sentaz (NOS) sistemlerini içerir. Enzimatik olmayan yollar ise ekstremitelerde yaralanmalarında karşılaşılan hemoglobin ve miyoglobine bağlı gerçekleşir. Ksantin oksidaz sistemi, NADPH oksidaz sistemi, mitokondriyal elektron taşıma zinciri genelde bağırsak, akciğer, kalp, beyin, kas, karaciğer, pankreas, mide ve böbrek gibi organlarda oksidatif strese neden olurken NOS, karaciğer, kalp ve aort endotel hücrelerinde önemli bir oksidatif stres faktörüdür (74).

Hücrelerin normal fizyolojik akışında, serbest radikaller üretilir ve hücrenin savunma sistemi olan antioksidanlar tarafından temizlenir. Ancak iskemi gibi durumlarda hücrenin antioksidan sisteminin üstesinden gelemeyeceği bol miktarda üretilir ve yeterince nötralize edilemediklerinde hücreye zarar verirler. Serbest radikaller reaktif oksijen ve nitrojen türleridir ve bunlar eşlenmemiş (unpaired) elektronlara sahip farklı iyon, molekül ve atom formunda olabilir. Serbest radikaller DNA, proteinler ve lipitler ile kolayca tepkimeye girerek lipit peroksitler gibi zararlı

ürünler üretir ve hücrel hasara neden olur. Bu durum IRH'nin temel karakteristiğidir (75).

3.3.1. İskemi (I)

İskemi (I) bir dokunun normal fonksiyonlarını devam ettirebilmek için ihtiyaç duyduğu kan akımının az olması ve oksijen, glikoz ve metabolik reaksiyonlar için gereken diğer maddelerin alınamaması durumuna verilen addır. İskemik fazda, mitokondri anaerobik reaksiyon ile glikojeni parçalayarak 2 ATP üretirken laktik asit ortaya çıkar ve dokuda pH seviyesi düşer. Düşen pH bir negatif geri besleme ile ATP üretimini durdurur. Üretilen anaerobik ATP daha sonra sırayla adenosin difosfat (ADP), adenosin monofosfat (AMP) ve inozin monofosfata (76) ve daha sonra adenosin, inozin, hipoksantin ve ksantine parçalanır. ATP üretiminin durması hücre yüzeyinde ATP'ye bağlı Na^+ - K^+ -ATPase pompaları ve Ca^{2+} -ATPase pompalarının bozulmasına ve hücre zarı iç-dış iyon dengesinin kaybolmasına neden olur (7). Böylece sitoplazmada sodyum artar ve Na^+ - H^+ pompalarının aktivitesi azalır. Hücrelerde hidrojen, sodyum ve kalsiyum iyonlarının birikmesi hiperosmolariteye neden olur ve osmotik dengeyi korumak için ekstraselüler matriksten (ESM) hücreye su geçer ve hücre şişer. Aynı zamanda iyonik denge için potasyum hücreden ESM'ye geçer. Mitokondrideki kalsiyum sitoplazmaya ve ESM'ye salınır ve mitokondriyal kalsiyuma bağlı sitoplazmadaki birçok proteaz aktifleşerek ksantin dehidrogenazı ksantin oksidaza dönüştürür. Hücrede hidrojen birikmesi hücrel pH'ı düşürür ve enzim aktivitesi bozulur. Aktive olan fosfolipaz enzimleri de hücre zarındaki lipid yapısını bozarak kandaki yağ asit seviyesini artırır (8).

3.3.2. Reperfüzyon (R)

3.3.2.1. Reaktif türler

Reaktif türler, reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif nitrojen türleri (RNT) olmak üzere ikiye ayrılır. Bu türlerin ortak özellikleri en az bir tane eşleşmemiş elektrona sahip olmalarıdır. Bu özelliklerinden dolayı kimyasal tepkimelerde oldukça reaktiftirler ve iyon, atom veya molekül şeklinde olabilirler. Oksijen metabolizması sırasında hücrede reaktif türler normal olarak üretilir ve hücreler arası ve hücre içi sinyal iletimi gibi birçok biyolojik süreçle ilişkilidir (9).

3.3.2.2. Reaktif oksijen türleri (ROT)

Oksijen akışının normal olduğu durumlarda hücrede metabolik reaksiyonlar sonucu peroksizom, mitokondri, endoplazmik retikulum, hücre zarı ve sitozolde ROT üretilir. Reaktif oksijen türleri süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalidir ($OH^{\bullet}$). IRH sırasında ROT'lar enzimatik yollar veya enzimatik olmayan yollarla oluşturulur. Enzimatik yollardan ilki NADPH oksidaz enzimi ile ROT üretimidir. Hücre zarına bağlı bulunan bu enzim fibroblast, düz kas, endotel, monosit, mononükleer lökositler ve makrofajlarda bulunur. Bakteriyel enfeksiyonu önlemek için fagositoz sırasında, NADPH oksidaz enzimi aracılığı ile süperoksit patlaması yaşanır (9,10).

Enzimatik ROT üretiminin en yaygın ve bilinen yolu ksantin oksidoredüktaz (KOR) enzim aracılığıyla gerçekleşir. KOR pürin katabolizmasında önemli bir rol oynayan karmaşık molibdoflavo enzimleridir. Memelilerde KOR'un ksantin dehidrogenaz (KDH) (yaklaşık %90) ve ksantin oksidaz (KO) (yaklaşık %10) olmak üzere iki formu bulunur. Hipoksik dokuda, KDH son elektron alıcısı olarak oksijen molekülünü (O_2) kullanır ve ROT üretme kapasitesi olan KO'ya dönüşür [9,11]. Bu süreç, oksidatif hasarın ana mekanizması olarak kabul edilmiştir. İskemik dokuda ATP yıkılınca hipoksantin üretilir. Yoğun O_2 girişi, KOR enzimlerinin aktivasyonunu başlatır ve bu enzimler önce hipoksantini ksantine ve sonra ksantini ürik aside okside ederek indirger. Bu reaksiyon sırasında açığa çıkan süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$) yüksek reaktif bir radikal olup daha sonra hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) dönüştürülür. Hidroksil radikali inflamasyon yolağını tetikleyerek ve proinflamatuvar eikosanoidlerin üretilmesine ve dışarıya salınmasına neden olur. Eikosanoidler hücre zarındaki lipid peroksidasyonu başlatır ve hücre zarının geçirgenliği bozarak hücre ölümüne neden olurlar. Eikozanoidler araşidonik asitin türevleri olup IRH'de önemli görevler üstlenirler. Araşidonik asit, IR'nin patofizyolojisinde rol alan prostaglandinler, tromboksanlar ve lökotrienlerin üretimi için substrat görevi görür. Enzimatik olmayan ROT üretimi mitokondriyal elektron taşıma zincir reaksiyonları sonucu hücre içine $O_2^{\bullet-}$ radikalinin serbest bırakılmasıdır. IRH sırasında mitokondri kaynaklı ROT üretimi artar (9, 12).

3.3.2.3. Reaktif nitrojen türleri (RNT)

Reaktif nitrojen türleri (RNT), nitrik oksit ($\text{NO}\bullet$), nitrojen dioksit ($\text{NO}_2\bullet$), potent oksidan peroksinitrit (ONOO^-) ve $\text{NO}\bullet$; $\text{O}_2\bullet^-$, $\text{H}\bullet\text{O}\bullet$ ve $\text{RO}\bullet$ ile reaksiyona girdiğinde ortaya çıkan diğer nitrojen oksitleri ve metabolitleri içerir. Nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından L-argininden sentezlenen ve IRH'de önemli görevleri olan bir sinyal molekülüdür. NOS'un üç farklı izoformu vardır: NOS-1 (nNOS, nöronal), NOS-2 (iNOS, indüklenebilir) ve NOS-3 (eNOS, endotelyal). Tüm NOS türleri, L-argininin L-sitrüline dönüştürülmesiyle NO üretir. NO'nun antioksidan ve anti-inflamatuar aktiviteleri mevcut olup koruyucu bir rol oynar (77). İskeminin ilk 15 dakikası içinde eNOS'un aktivasyonu sonucu NO seviyesi artar. eNOS' tan türetilen NO, vasküler tonusun korunması için gereklidir çünkü IRH'de meydana gelen eNOS düzeyindeki azalma, IRH'de görülen yaygın bir yanıt olan vazokonstriksiyona yatkınlık oluşturabilir. Reperfüzyondan üç saat sonra, iNOS sitokoinler aracılığı ile NO ekspresyonunu upregüle eder ve NO seviyesi dokuda ikinci kez artar. NO'nun reperfüzyon sonrası IRH'da rolü oluşumunun doğasına ve dokuya özgü olarak değişkenlik göstermektedir. Bazı durumlarda, NO bir antioksidan görevi görürken bazı durumlarda süperoksit anyonu ile birleşerek peroksinitrit radikalini (ONOO^-) oluşturur. Peroksinitrik hücre membranında lipid peroksidasyonu indükler ve hücre zarının yapısını bozar (78, 79).

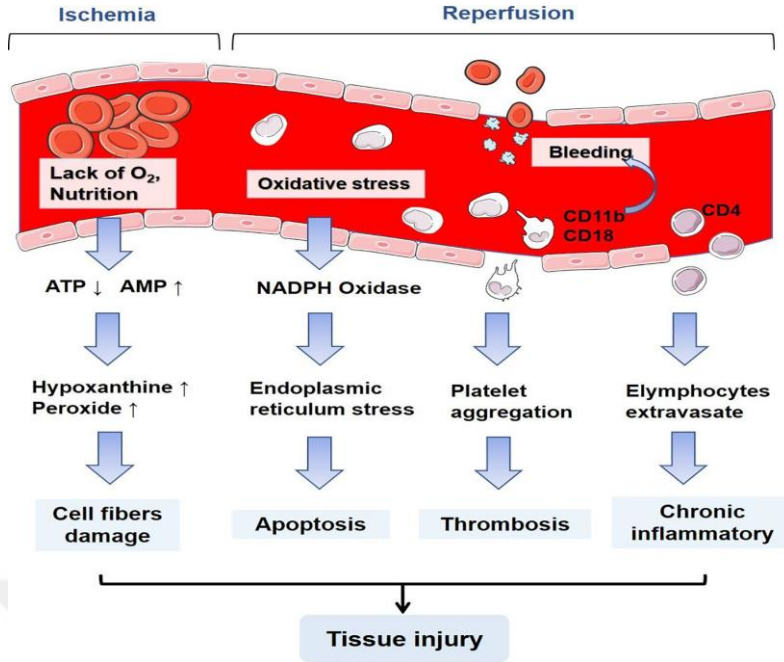
3.3.3. IRH'de “No reflow fenomeni”

No reflow fenomeni, ya da tekrar akış olmaması, iskemik dokunun reperfüze edilmesine rağmen mikrovasküler perfüzyonda işlev bozukluğunu ifade eder. Bu olayın patofizyolojisi tam olarak bilinmemektedir ancak birçok faktörün rol aldığı tahmin edilmektedir. Önerilen bir mekanizmaya göre sitokinler ve nötrofiller birlikte hareket ederek mikrovasküler bariyerin bozukluğuna yol açar. Böylece hücre zarı geçirgenliği bozulur, daha fazla madde geçişine izin verilirken sıvı ve proteinler damar dışına sızar. Hücreler arası basınç artar ancak damar içi basınç azalır. Bu mekanizmaya küme farklılaşması 18 (CD18)'den kaynaklanan lökosit birikimi ve venöz tıkanma da katkı sağlamaktadır. Miyokard, beyin ve iskelet kasında nötrofil tükenmesi “no reflow” mekanizmasını engelleyerek nötrofillerin akış olmaması durumunda ne kadar önemli bir rol oynadıklarını gösterir (80).

3.3.4. IRH'de apoptotik hücre ölümü

IRH'den kaynaklanan doku tahribatı iskemik (primer) hasar ve reperfüzyon (sekonder) hasarı olarak iki kısma ayrılır. İskemik hasar akut olarak hücrelerde oksijen yetersizliğine ve beslenememeye neden olabilir, ancak uzun süreli iskemide hücrelerde biriken metabolik ürünler metabolik asidoza neden olur. Reperfüzyon hasarında ise yeniden kanlanan dokularda lokal inflamasyon ve ROT üretimi artar. Uzun süren IRH'de apoptozis, nekroz, otofaji gibi hücre ölümüne neden olan yollar aktive olur (81).

Apoptozis veya programlanmış hücre ölümü, iskemik hasarda hipoksik stres altında ve reperfüzyon hasarında ROS üretimi sırasında birçok gen ekspresyonunu da barındıran aktif bir hücresel olaydır. Apoptozis intrinsik ve ekstrinsik yollarla gerçekleşebilir. Bu iki yol arasında çapraz-konuşma olabilir. Ekstrinsik yol daha çok ölüm ligandları ve reseptörleri (TNF- α , Fas ligand, sitokin tümör nekroz faktör benzeri apoptozun zayıf indükleyicisi (TWEAK), TNF-ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL)) üzerinden başlatılır ve kaspaz 3 ve 8 rol oynar (82). İntrinsik yol ise mitokondri organeli üzerinden gerçekleşir ve hipoksi, radyasyon veya hücresel toksinler tarafından başlatılır. Bu yolla Bcl-2 gen ailesi aktive edilir ve Bcl-2-ilişkili X proteini (Bax), Bcl-2 homologu antagonist öldürücü (Bak), sitokrom c, kaspaz-9 ve apoptotik proteaz aktive edici faktör 1'e (APAF-1) gibi proapoptotik proteinler rol oynar. Literatürde apoptozis ve IRH ile ilgili son yıllarda birçok çalışma mevcuttur. IRH'nin karakteristik özelliklerinden oksidatif stres ve ROT üretimi serebral IRH'de apoptozisi indüklediği kaydedilmiştir. Böbrek ve kalp gibi organlarda da IRH'de apoptozis varlığı gözlenmiştir. Bu çalışmalara göre IRH'de apoptozisin önemli rol oynadığı söylenebilir (Şekil 6) (83).



Şekil 6. İskemi-Reperfüzyon hasarının mekanizması (84)

3.3.5. IRH'de antioksidan sistemi

IRH'ye karşı hücreler enzimatik ve enzimatik olmayan iki farklı yolla mücadele eder. Antioksidan aktivitesine sahip enzimlerden bir tanesi süperoksit dismutazdır (SOD). SOD süperoksit radikalini hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürür. Diğer önemli enzimler ise katalaz (53) ve glutatyon peroksidazdır (GPx). Bu enzimler ise hidrojen peroksiti önce suya ve sonra O₂ molekülüne dönüştürür. Enzimatik olmayan antioksidan maddeler protein veya düşük moleküler ağırlıklı moleküllerdir ve ROT ve RNT'ye karşı etkili hücre içi ve hücre dışı savunmada rol oynarlar. Glutatyon (GSH) önemli bir antioksidan olup hem enzimatik hem de enzimatik olmayan reaksiyonlarda ROT'u azaltır (85). Diğer enzimatik olmayan antioksidanlar ise albümin, ferritin, seruloplazmin, miyogloblin, metalloproteinler, transferrin, laktoferrin gibi metal bağlayıcı proteinler, ürik asit ve Koenzim Q10 önemli moleküllerdir (85, 86).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada yapılan hayvan deneyleri için Dicle Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığından (DÜHADEK) 26/02/2020 tarih ve 2020/08 protokol numarası ile izin alınmıştır. Bu çalışmaya finans desteği TIP.20.009 protokol numarası ile Dicle üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (DÜBAP) tarafından sağlanmıştır. Çalışmadaki deney hayvanları Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (DÜSAM) temin edilmiştir. Çalışmanın deneysel bölümü DÜSAM hayvan bakım merkezinde; histolojik doku takipleri ve analizler Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Araştırma Laboratuvarında; biyokimyasal çalışmalar Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Biyokimya Laboratuvarında yapılmıştır.

4.1. Kudret Narının Özütünün Elde Edilmesi

Yaklaşık 1.5-2 kg güneşte kurutulmuş kudret narı meyvesi toz halinde yerel bir satıcıdan temin edildi (Şekil 7). Toz karışım bir balon jojeye aktarıldı ve karışımın üzerini geçecek şekilde absolut alkol (%100 ethanol, katalog no: K49284483729, Merck, Germany) eklendi. Bir manyetik balık yardımı ile manyetik karıştırıcı üzerinde karışım 3 saat karıştırıldıktan sonra 8 saat dinlenmeye bırakıldı. 8 saat sonunda karışımın sıvı kısmı alındı ve kalan çökeltiye tekrardan absolut alkol eklendi (Şekil 8). Karışım tekrar 3 saat karıştırılıp 8 saat dinlendirildikten sonra üstte yüzen sıvı kısım alındı. Bu işlem toplamda üç kez arka arkaya tekrarlandı. Daha sonra elde edilen özüt+etil alkol karışımı Dicle Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Araştırma laboratuvarında rotari evaporatör cihazı (katalog no: HEID_31011, Heidolph, Schwabach, Germany) (Şekil 9) ile saf alkol uzaklaştırılarak sadece kudret narının alkolik özütü (Şekil 10) elde edildi.



Şekil 7. Kurutulmuş kudret narı meyvesi



Şekil 8. Kudret narının alkolik ekstraktı



Şekil 9. Kudret narı meyvesinin alkolik özütünün rotari evaporatör ile elde edilmesi



Şekil 10. Kudret narı meyvesinin alkolik özütü

4.2. Deney Hayvanlarının Temini ve Deney Protokolü

Ortalama ağırlıkları 250-300 gr arasında, yaklaşık 10-12 haftalık 48 adet Sprague Dawley türü dişi sıçanlar kullanıldı (grup başına 8 adet sıçan). Sıçanlar paslanmaz çelik kafeslerde 24 ± 2 °C de 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ışık periyodunda, normal diyet ve su ile beslendi. Sıçanların yem ve suya erişimi sınırsız olup sıçanlara herhangi bir kısıtlama uygulanmadı. Deney hayvanlarına yapılan tüm cerrahi işlemler anestezi altında hayvan refahı yüksek tutularak yapıldı. Ovaryum iskemi-reperfüzyon işleminden önce deney hayvanlarına 90 mg/kg intramüsküler ketamin hidroklorür (Ketalar; Pfizer, İstanbul, Türkiye) ve 8 mg/kg ksilazin (Rompun; Bayer, İstanbul, Turkey) uygulanarak genel anestezi sağlandı. Tüm ratlar anestezi uygulamasından sonra operasyon masasına sabitlenerek supin pozisyonunda, batın bölgesi tıraşlanarak %10 povidon-iyot ile temizlendikten sonra abdomenin 2 cm'lik alt orta hat insizyonu ile açıldı. İskemi-reperfüzyon işlemi için atravmatik paslanmaz çelik steril Bulldog forsepsleri (klampları) kullanıldı. Gruplar ve uygulanan işlemler aşağıdaki gibidir:

- 1. Grup (sham):** Hayvanlara herhangi bir işlem uygulanmadı. Sadece batınları cerrahi protokol ile açıldı ve başka müdahale yapılmadan batın katları (cilt ve cilt altı) kapatıldı. 15. günün sonunda intrakardiyak kan alımı ile hayvanlar sakrifiye edilip ovaryumları eksize edildi. Kanlar biyokimyasal analiz için, sağ ovaryum histolojik doku takibi için zinc-formalin solüsyonuna, sol ovaryum ise western blot tekniği için -80°C'de saklandı.
- 2. Grup (kudret narı grubu, KN):** Hayvanlara herhangi bir işlem uygulanmadı. Sadece batınları cerrahi protokol ile açıldı ve başka müdahale yapılmadan batın katları (cilt ve cilt altı) kapatıldı. Hayvanlara 15 gün boyunca orogastrik yoldan (orogastrik sonda ile) 600 mg/kg kudret narı ekstresi verildi (Şekil 11). 15. günün sonunda intrakardiyak kan alımı ile hayvanlar sakrifiye edilip ovaryumları eksize edildi. Kanlar biyokimyasal analiz için, sağ ovaryum histolojik doku takibi için zinc-formalin solüsyonuna, sol ovaryum ise western blot tekniği için -80°C'de saklandı.
- 3. Grup (iskemi-reperfüzyon, IR):** Genel anestezi altında batın bölgesi 2 cm'lik alt orta hat insizyonu ile açıldı. Tuba uterina ve ovaryan dokuları

içeren ovaryan adneksiyalar açığa çıkarılarak ovaryumlar abdominal duvara sabitlendi. Atravmatik vasküler düz paslanmaz Bulldog forsepsi (Smile Inc., Germany) ile 3 saat boyunca iskemi oluşturuldu (Şekil 12). Daha sonra ovaryumlar Bulldog forsepsleri çıkarılarak ovaryumlar eski anatomik lokasyonuna bırakıldı. Cilt ve cilt altı fasyalar dikilerek ovaryumların 3 saat boyunca reperfüze olması sağlandı. Reperfüzyon işleminden sonra intrakardiyak kan alımı ile hayvanlar sakrifiye edilip ovaryumları eksize edildi. Kanlar biyokimyasal analiz için, sağ ovaryum histolojik doku takibi için zinc-formalin solüsyonuna, sol ovaryum ise western blot tekniği için -80°C’de saklandı.

4. **Grup (KN+IR):** Hayvanlara 15 gün orogastrik yoldan 600 mg/kg kudret narı ekstresi verildi. 15. günün sonunda, genel anestezi altında batın bölgesi 2 cm’lik alt orta hat insizyonu ile açıldı. Tuba uterina ve ovaryan dokuları içeren ovaryan adneksiyalar açığa çıkarılarak ovaryumlar abdominal duvara sabitlendi. Atravmatik vasküler düz paslanmaz Bulldog forsepsi (Smile Inc., Germany) ile 3 saat boyunca iskemi oluşturuldu. Daha sonra ovaryumlardan Bulldog forsepsleri çıkarılarak ovaryumlar eski anatomik lokasyonuna bırakıldı. Cilt ve cilt altı fasyalar dikilerek ovaryumların 3 saat boyunca reperfüze olması sağlandı. Reperfüzyon işleminden sonra intrakardiyak kan alımı ile hayvanlar sakrifiye edilip ovaryumları eksize edildi. Kanlar biyokimyasal analiz için, sağ ovaryum histolojik doku takibi için zinc-formalin solüsyonuna, sol ovaryum ise western blot tekniği için -80°C’de saklandı.
5. **Grup (IR+KN):** Genel anestezi altında batın bölgesi 2 cm’lik alt orta hat insizyonu ile açıldı. Tuba uterina ve ovaryan dokuları içeren ovaryan adneksiyalar açığa çıkarılarak ovaryumlar abdominal duvara sabitlendi. Atravmatik vasküler düz paslanmaz Bulldog forsepsi (Smile Inc., Germany) ile 3 saat boyunca iskemi oluşturuldu. Daha sonra ovaryumlar Bulldog forsepsleri çıkarılarak ovaryumlar eski anatomik lokasyonuna bırakıldı. Cilt ve cilt altı fasyalar dikilerek ovaryumların 3 saat boyunca reperfüze olması sağlandı. Reperfüzyon işleminden sonra hayvanlara 15 gün boyunca orogastrik yoldan 600 mg/kg kudret narı ekstresi verildi. 15. günün sonunda,

intrakardiyak kan alımı ile hayvanlar sakrifiye edilip ovaryumları eksize edildi. Kanlar biyokimyasal analiz için, sağ ovaryum histolojik doku takibi için zinc-formalin solüsyonuna, sol ovaryum ise western blot tekniği için -80°C’de saklandı.

- 6. Grup (KN+IR+KN):** Hayvanlara 15 gün orogastrik yoldan 600 mg/kg kudret narı ekstresi verildi. 15. günün sonunda, genel anestezi altında batin bölgesi 2 cm’lik alt orta hat insizyonu ile açıldı. Tuba uterina ve ovaryan dokuları içeren ovaryan adneksiyalar açığa çıkarılarak ovaryumlar abdominal duvara sabitlendi. Atravmatik vasküler düz paslanmaz Bulldog forsepsi (Smile Inc., Germany) ile 3 saat boyunca iskemi oluşturuldu. Daha sonra ovaryumlar Bulldog forsepsleri çıkarılarak ovaryumlar eski anatomik lokasyonuna bırakıldı. Cilt ve cilt altı fasyalar dikilerek ovaryumların 3 saat boyunca reperfüze olması sağlandı. Reperfüzyon işleminden sonra hayvanlara 15 gün daha orogastrik yoldan 600 mg/kg kudret narı ekstresi verildi. İkinci 15. gün sonunda intrakardiyak kan alımı ile hayvanlar sakrifiye edilip ovaryumları eksize edildi. Kanlar biyokimyasal analiz için, sağ ovaryum histolojik doku takibi için zinc-formalin solüsyonuna, sol ovaryum ise western blot tekniği için -80°C’de saklandı (Şekil 13). Gruplara uygulanan işlemlerin özeti Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Gruplara uygulanan işlemlerin özeti

Grupları	Cerrahi işlem	Beslenme
1. grup = Sham	Sadece batin açılıp kapatıldı	Normal diyet – 15 gün boyunca
2. grup = KN	Sadece batin açılıp kapatıldı	Normal diyet + 600 mg/kg KN ekstresi – 15 gün boyunca
3. grup = IR	3 saat iskemi-3 saat reperfüzyon uygulandı	Normal diyet
4. grup = KN+IR	3 saat iskemi-3 saat reperfüzyon uygulandı	Normal diyet + 600 mg/kg KN ekstresi – 15 gün boyunca
5. grup = IR+KN	3 saat iskemi-3 saat reperfüzyon uygulandı	Normal diyet + 600 mg/kg KN ekstresi – 15 gün boyunca
6. grup = KN+IR+KN	3 saat iskemi-3 saat reperfüzyon uygulandı	Normal diyet + 600 mg/kg KN ekstresi – 30 gün boyunca

KN: Kudret narı, **IR:** İskemi-reperfüzyon



Şekil 11. Deney hayvanlarına orogastrik sondayla kudret narı özütünün verilmesi



Şekil 12. Ovaryum iskemi-reperfüzyon hasarının oluşturulması



Şekil 13. Eksize edilen ovaryum dokusu

4.3. Biyokimyasal Analiz

Sıçanlardan alınan kan örneklerinden serum izole edildi ve Total Antioksidan Statüsü (TAS) ve Total Oksidan Statüsü (TOS) parametreleri çalışıldı. Her gruptaki sıçanların kanlarından serum izolesi yapıldı ve TAS ve TOS modifiye Erel yöntemi ve biyokimyasal otoanalizör (AU5800; Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, ABD) kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. TAS ve TOS kitleri ticari olarak satın alındı (Rell Assay Diagnostics, Gaziantep, Türkiye). Serum TAS seviyesi μmol Trolox Equivalent/L ve serum TOS seviyesi μmol H_2O_2 Equivalent /L olarak kaydedildi. Oksidatif Stres İndeksi (OSI) ise TOS değerinin TAS değerine bölünmesiyle elde edildi ve birimsiz olarak kaydedildi (87). Serum örneklerinden tüm gruplar için Anti-Müllerian Hormonu (AMH) ticari olarak satılan sıçan uyumlu enzim-bağılı immunosorbent assay kiti (ELISA) (katalog numarası: MBS2509909, MyBioSource, California, USA) çalışıldı. Serum AMH düzeyleri ng/mL olarak kaydedildi ve minimum seviye 0.05 ng/mL olarak kabul edildi.

4.4. Doku Takibi

Disseke edilen sağ ovaryum dokuları rutin parafin doku takibine alındı. Zinc formalin fiksatif (catalog no: Z2902-3.75L, Sigma, Germany) solüsyonunda 24 saat fikse edildikten sonra dokular 1 gece akar su altında bekletildi. Daha sonra dokular artan alkol serilerinde (%50, %70, %80, %90, %96 ve absölü etil alkol) geçirilip dehidrate edilerek ksilende 3x30 dakika boyunca tutuldu ve alkol uzaklaştırıldı. Parafin inkübasyonuna (58°C) alınan dokular burada 3x45 dakika inkübe edildikten sonra parafin bloklara gömüldü. 5 µm kalınlığında kesitler mikrotom (katalog no: Leica RM2265, Wetzlar, Germany) yardımıyla pozitif şarjlı lam üzerine alınarak histokimyasal ve immünohistokimyasal boyamalar uygulandı.

4.5. Hematoksilen-Eozin Boyama

Parafin bloklardan alınan ovaryan doku kesitleri 58°C'deki etüvde 8 saat boyunca bekletildi. Kesitler etüvden çıkarılıp oda sıcaklığına bırakıldıktan sonra 3x15 dakika boyunca ksilen solüsyonunda deparafinize edildi. Kesitler azalan alkol serilerinden (%100, %96, %90, %70, %50 etil alkol) 10'ar dakika geçirildi ve distile suya getirilerek 5 dakika bekletildi. Harris Hematoksilen boyasında 8 dakika bekletildikten sonra kesitler akar su altında 5 dakika yıkandı. Fazla hematoksilen alınıp kesitler durulandıktan sonra alkolik eozin boyasında 8 dakika boyandı. Kesitler artan alkol serilerinden (%70, %80 %90, %96 etil alkol) hızlı bir şekilde geçirildi ve absölü alkolde 1 dakika bekletildi. Son olarak kesitler 3x45 dakika ksilende şeffaflaştırıldıktan sonra Entellan® (katalog no:107961, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US) kapatma medyumunu ile kapatıldı (Şekil 14). Kesitler Motic EASYSCAN PRO 6 Pathology Slide Scanner (Meyer Instruments Inc, Texas, USA) programı ile analiz edildi.



Şekil 14. Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama

4.6. APAF-1 İmmunohistokimyasal Boyama

Parafin bloklardan alınan ovaryan doku kesitleri 58°C'deki etüvde 8 saat boyunca bekletildi. Kesitler etüvden çıkarılıp oda sıcaklığına bırakıldıktan sonra 3x15 dakika boyunca ksilen solüsyonunda deparafinize edildi. Kesitler azalan alkol serilerinden (%100, %96, %90, %70, %50 etil alkol) 10'ar dakika geçirildi ve distile suya getirilerek 5 dakika bekletildi. Kesitler yıkama solüsyonu olan 1X Phosphate-Buffered Saline with Tween20 (PBST) solüsyonunda 3x5 dakika yıkandı. Kesitlere endojen peroksidaz aktivitesini bloklamak için %3 hidrojen peroksit solüsyonu (katalog no: TA-015-HP, ThermoFischer, Fremont, CA, USA) damlatılıp 20 dakika beklendi. Ardından 1X PBST ile 3x5 dakika yıkama yapıp, non-spesifik bağlanmayı önlemek için 8 dakika boyunca Ultra V Block (katalog no: TA-015-UB, ThermoFischer, Fremont, CA, USA) solüsyonu kesitlerin üzerine döküldü. Kesitler, anti-APAF-1 (katalog no: ab2000, Abcam plc, Cambridge, UK) primer antikoru ile bir gece +4°C'de overnight edildi. Ertesi gün kesitler oda sıcaklığına bırakılarak 30-60 dakika bekletildi. Kesitlerin üzerindeki antikorlar aspire edilerek uzaklaştırıldı ve 1X PBST ile 3x5 dakika yıkandı. Kesitlere biotinli sekonder antikor (katalog no: TP-015-BN, ThermoFischer, Fremont, CA, USA) damlatılıp 14 dakika bekletildi. 1X PBST ile 3x5 dakika yıkandıktan sonra streptavidin-peroxidase solüsyonu (katalog

no: TS-015-HR, ThermoFischer, Fremont, CA, USA) damlatılıp 15 dakika beklendikten sonra 1x PBST ile 3x5 dakika yıkama yapıldı. Protein ekspresyonu görmek için kesitlere kromojen diaminobenzidin (DAB) (katalog no: TA-001-HCX, ThermoFischer, Fremont, CA, USA) damlatılıp reaksiyon mikroskop altında izlendi. Reaksiyonu durdurmak için kesitler 1X PBST ile yıkandı. Zıt boyama için Gill III hematoksilin (katalog no: HX84908574, Merck, Darmstadt, Germany) boyaması 45 saniye yapıldı. Kesitler distile suda yıkandıktan sonra artan alkol serilerinden (%70, %80 %90, %96 etil alkol) hızlı bir şekilde geçirildi ve absolü alkolde 1 dakika bekletildi. Son olarak kesitler 3x15 dakika ksilende şeffaflaştırıldıktan sonra Entellan® (katalog no:107961, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US) kapatma medyumunu ile kapatıldı. Kesitler Motic EASYSCAN PRO 6 Pathology Slide Scanner (Meyer Instruments Inc, Texas, USA) programı ile analiz edildi.

4.7. Western Blot

Sakrifikasyon sonrası -80°C’de bekletilen sol ovaryan dokular içi sıvı azot dolu porselen havanda dövülerek toz haline getirildi. Toz haline getirilen ovaryum dokuları 1.5 ml’lik endorf tüplere alınarak buz üzerinde tutuldu ve sonraki tüm aşamalar buz üzerinde gerçekleştirildi. Toz ovaryum dokularının üzerine 1/100 oranında olacak şekilde proteaz-fosfataz inhibitör kokteyli (katalog numarası:78440, Thermo Scientific, USA) ve nükleaz içeren radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA) buffer (katalog numarası: R0278, Sigma Aldrich, Germany) eklendi. Tüpler parafilm ile kapatılarak homojen bir karışım elde etmek için vortekslenildi. Örnekler lizat bufferda her 15 dakikada bir vortekslenmek üzere toplamda 1 saat buz üzerinde lizis edildi. Dokudaki toplam protein miktarı Smart BCA (Bicinchoninic Acid) protein assay kiti (lot numarası: 201410651, Intron Biotechnology) kullanılarak ölçüldü. Ticari kitin kullanım protokolüne göre BSA (Bovine Serum Albumine) standartları kullanıldı ve 562 nm’ de ölçüm yapılarak µg/ml deki total protein konsantrasyonu belirlendi (Şekil 15). Daha sonra örneklerin içindeki proteinler 95°C’de 5 dakika boyunca denatüre edildi. Örnekleri jelde yürütmek için ticari olarak satılan %10 TGX stain-free fastcast acrylamid jel (Bio-Rad) kullanıldı. Jel, kitin manüeline göre hazırlandı ve Mini Protean Tetra Cell apparatus sistemi (Bio-Rad) kullanıldı. Her gruptan eşit miktarda protein hacmi ve miktarı alınmak şartıyla

proteinler jel kuyucuklarına yüklendi ve proteinler yaklaşık 25 dakika boyunca 300 volt/400 Amper jelde elektroforez edildi (Şekil 16). Ağırlıklarına göre ayrılmış proteinler jelden PVDF (poliviniliden diflorür) membranına transblot edildi (Bio-Rad). Transfer cihazından alınan membranlar PBST içerisinde hazırlanmış %5'lik yağsız süt tozu içerisinde 1 saat oda sıcaklığında bir çalkalayıcı yardımı ile bloke edildi. Bloke edilen membranlar %5'lik süt tozu PBST içerisinde anti-APAF-1 (katalog no: ab2000, Abcam plc, Cambridge, UK) ile hazırlanan primer antikorlar ile çalkalayıcı üzerinde bir gece +4°C'de inkübe edildi. Ertesi sabah membran oda sıcaklığına alınarak 4 saat boyunca çalkalayıcı üzerinde inkübasyona devam ettirildi. Membranlar 3x5 dakika PBST ile yıkandıktan sonra sekonder antikorlar (1/10000 oranında PBS-Tween içerisinde hazırlanmış) ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Membranlar 3x5 dakika PBST ile yıkandıktan sonra, proteinler, ECL (enhanced chemiluminiscent) (Advansta) metoduna göre görüntüleme cihazı (Bio-Rad ChemiDoc MP) kullanılarak görüntülendi.



Şekil 15. BCA protein assay ile örneklerin spektrofotometreye yüklenmesi



Şekil 16. Proteinlerin jelde yürütmesi

4.8. İstatistiksel Analiz

Tüm deney gruplarının TAS, TOS, OSI ve AMH verileri istatistiksel analizi için IBM SPSS Statistics 25 (IBM®, version 25.0.0.0, US) yazılımı kullanıldı. Verilerin normal ve homojen dağılımı analiz edildikten sonra varyansın homojenitesine bağlı olarak ANOVA testi ve post-hoc Tukey ve Games-Howell testleri kullanıldı. İstatistiksel analiz sonucu test sonucu anlamlılık değeri $p < 0.05$ olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR

5.1. TAS, TOS ve AMH Bulguları

Gruplardaki sıçanlardan deney sonucu alınan serum örneklerinden Total Antioksidan Statü (TAS, $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}$) ve Total Oksidan Statü (TOS, $\mu\text{mol Trolox Eq/L}$) değerleri Rel Assay kiti ile çalışıldı. Serumdaki enzimatik olmayan tüm oksidan ve antioksidan moleküller ölçüldü. Oksidatif stres indeksi (OSI), TOS değerlerinin TAS değerlerine bölünmesi ile elde edildi ve birimsiz bir ölçüttür. Yüksek OSI değerleri, oksidasyon veya oksidatif stres için daha büyük bir eğilimi gösterir. AMH değerleri sıçan uyumlu ticari ELISA kiti ile ölçüldü. Gruplardaki TAS, TOS, OSI ve AMH değerlerinin ortalama, standard sapma, minimum ve maksimum değerleri Tablo 2’de gösterilmiştir. Ortalama TAS değeri gruplar arasında birbirine yakın bir aralıkta ölçüldü ve IR grubu en düşük değere sahipti. Ortalama TOS değeri ise en yüksek IR grubunda bulunurken, KN tedavisi alan gruplarda ortalama TOS değeri IR grubuna göre daha düşük tespit edildi. OSI, oksidatif indeksi olarak kabul edilir ve en yüksek değer IR grubunda ölçüldü. KN’nin antioksidan özelliği özellikle IR+KN ve KN+IR+KN gruplarında gözlemlendi çünkü bu gruplarda IR grubuna göre OSI değeri daha düşük kaydedildi (Tablo 2).

Tablo 2. Gruplardaki TAS, TOS, OSI ve AMH değerlerinin tanımlayıcı istatistiksel analizi

		Denek		Standard	Minimum	Maksimum
		Sayısı	Ortalama	Sapma	Değer	Değer
Serum TAS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eq/L)	Sham	8	2.66	0.21	2.32	2.93
	KN	8	2.57	0.21	2.26	2.83
	IR	8	2.20	0.13	2.03	2.46
	KN+IR	8	2.26	0.16	2.09	2.53
	IR+KN	8	2.37	0.09	2.27	2.51
	KN+IR+KN	8	2.34	0.11	2.21	2.57
	Toplam	48	2.40	0.22	2.03	2.93
Serum TOS ($\mu\text{mol Trolox Eq/L}$)	Sham	8	45.75	9.80	30.02	58.38
	KN	8	67.66	13.88	53.14	87.40
	IR	8	105.55	22.88	85.50	151.37
	KN+IR	8	83.04	15.12	57.27	100.38
	IR+KN	8	56.47	16.33	31.78	86.93
	KN+IR+KN	8	57.12	11.30	38.77	70.73
	Toplam	48	69.26	24.85	30.02	151.37
OSI	Sham	8	17.40	4.74	11.64	24.47
	KN	8	26.32	4.97	20.49	34.29
	IR	8	47.76	8.78	39.27	61.53
	KN+IR	8	36.52	5.46	27.27	41.75
	IR+KN	8	23.83	7.16	13.58	38.30
	KN+IR+KN	8	24.51	5.43	15.09	29.91
	Toplam	48	29.39	11.68	11.64	61.53
AMH (ng/mL)	Sham	8	4.15	0.68	3.12	4.90
	KN	8	3.83	0.74	2.85	4.86
	IR	8	1.63	0.48	0.97	2.40
	KN+IR	8	1.85	0.68	1.01	2.85
	IR+KN	8	2.31	0.75	1.53	3.50
	KN+IR+KN	8	3.28	0.98	2.29	4.84
	Toplam	48	2.84	1.20	0.97	4.90

Yapılan tanımlayıcı istatistik, histogram, basıklık ve çarpıklık, eğri analizi sonuçlarına göre veriler normal dağılım gösterdi ve bu veriler parametrik testlerden ANOVA ile analiz edildi. Homojen varyans (Levene) testi sonuçlarına göre TOS, OSI ve AMH değerleri homojen varyans dağılımı gösterirken TAS verilerinin varyansının homojen dağılmadığı gözlemlendi (Tablo 3).

Tablo 3. Gruplardaki TAS, TOS, OSI ve AMH verilerinin varyans homojenlik dağılım analizi

		Levene istatistikleri	Serbestlik derecesi 1	Serbestlik derecesi 2	p değeri
TAS	Ortalamaya göre	2.479	5	42	0.047
	Mediana göre	1.624	5	42	0.175
	Median ve düzeltilmiş df ye göre	1.624	5	31.352	0.183
	Trimlenmiş ortalamaya göre	2.518	5	42	0.044
TOS	Ortalamaya göre	1.403	5	42	0.243
	Mediana göre	0.630	5	42	0.678
	Median ve düzeltilmiş df ye göre	0.630	5	26.809	0.678
	Trimlenmiş ortalamaya göre	1.227	5	42	0.313
OSI	Ortalamaya göre	1.117	5	42	0.366
	Mediana göre	0.755	5	42	0.587
	Median ve düzeltilmiş df ye göre	0.755	5	33.601	0.589
	Trimlenmiş ortalamaya göre	1.023	5	42	0.416
AMH	Ortalamaya göre	1.007	5	42	0.425
	Mediana göre	0.585	5	42	0.712
	Median ve düzeltilmiş df ye göre	0.585	5	34.226	0.712
	Trimlenmiş ortalamaya göre	0.921	5	42	0.477

ANOVA testi sonuçlarına göre TAS, TOS, OSI ve AMH ölçümlerinde gruplar arasında en az bir grupta diğerlerinden farklı bir anlamlılık tespit edildi (Tablo 4).

Tablo 4. TAS, TOS, OSI ve AMH değerlerinin ANOVA testi sonuçları.

ANOVA TESTİ					
		Serbestlik derecesi-1	Ortalamanın resi	F testi	p değeri
TAS	Gruplar Arasında	5	0.255	9.529	<0.001
	Grup içinde	42	0.027		
	Toplam	47			
TOS	Gruplar Arasında	5	3796.915	15.861	<0.001
	Grup içinde	42	239.392		
	Toplam	47			
OSI	Gruplar Arasında	5	954.038	24.340	<0.001
	Grup içinde	42	39.196		
	Toplam	47			
AMH	Gruplar Arasında	5	9.008	16.511	<0.001
	Grup içinde	42	0.546		
	Toplam	47			

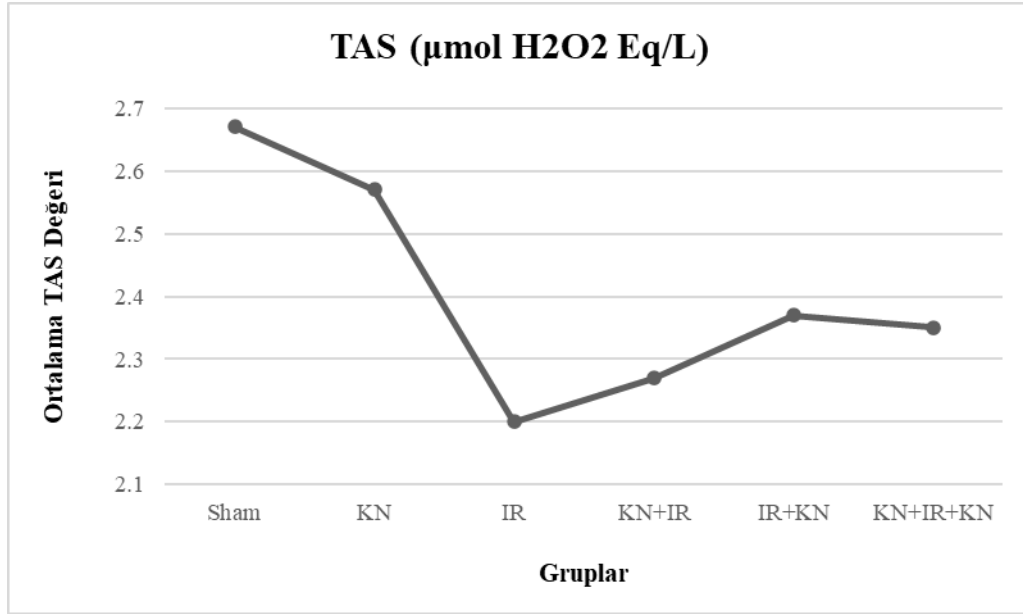
Not: p<0.05 anlamlı olarak kabul edilmektedir.

TAS verilerinin varyansları homojen dağılım göstermediğinden post hoc testlerinden Games-Howell testi uygulandı. IR grubunda ortalama TAS değerlerinde sham ($p=0.003$) ve KN ($p=0.015$) gruplarına göre anlamlı bir düşüş gözlemlendi. KN ekstresi verilen KN+IR, IR+KN ve KN+IR+KN gruplarında IR grubuna göre ortalama TAS değerlerinde yükseliş gözlemlendi ancak bu artma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (sırasıyla $p=0.959$, $p=0.113$, $p=0.296$) (Tablo 5). Gruplardaki ortalama TAS değerlerinin grafik sunumu Şekil 17’de gösterilmiştir.

Tablo 5. TAS verileri için post hoc Games Howell test sonuçları

Gruplar (A)	Gruplar (B)	Ortalama Fark (A-B)	Standard hata	p değeri	95% Güven Aralığı	
					Alt limit	Üst limit
SHAM	KN	0.09375	0.10695	0.946	-0.2570	0.4445
	IR	0.46125*	0.09047	0.003	0.1576	0.7649
	KN+IR	0.39875*	0.09541	0.011	0.0828	0.7147
	IR+KN	0.29125*	0.08268	0.049	0.0015	0.5810
	KN+IR+KN	0.31875*	0.08644	0.032	0.0233	0.6142
KN	SHAM	-0.09375	0.10695	0.946	-0.4445	0.2570
	IR	0.36750*	0.09025	0.015	0.0647	0.6703
	KN+IR	0.30500	0.09519	0.060	-0.0102	0.6202
	IR+KN	0.19750	0.08243	0.247	-0.0912	0.4862
	KN+IR+KN	0.22500	0.08620	0.175	-0.0695	0.5195
IR	SHAM	-0.46125*	0.09047	0.003	-0.7649	-0.1576
	KN	-0.36750*	0.09025	0.015	-0.6703	-0.0647
	KN+IR	-0.06250	0.07623	0.959	-0.3134	0.1884
	IR+KN	-0.17000	0.05952	0.113	-0.3693	0.0293
	KN+IR+KN	-0.14250	0.06464	0.296	-0.3554	0.0704
KN+IR	SHAM	-0.39875*	0.09541	0.011	-0.7147	-0.0828
	KN	-0.30500	0.09519	0.060	-0.6202	0.0102
	IR	0.06250	0.07623	0.959	-0.1884	0.3134
	IR+KN	-0.10750	0.06679	0.609	-0.3348	0.1198
	KN+IR+KN	-0.08000	0.07139	0.864	-0.3176	0.1576
IR+KN	SHAM	-0.29125*	0.08268	0.049	-0.5810	-0.0015
	KN	-0.19750	0.08243	0.247	-0.4862	0.0912
	IR	0.17000	0.05952	0.113	-0.0293	0.3693
	KN+IR	0.10750	0.06679	0.609	-0.1198	0.3348
	KN+IR+KN	0.02750	0.05318	0.995	-0.1482	0.2032
KN+IR+KN	SHAM	-0.31875*	0.08644	0.032	-0.6142	-0.0233
	KN	-0.22500	0.08620	0.175	-0.5195	0.0695
	IR	0.14250	0.06464	0.296	-0.0704	0.3554
	KN+IR	0.08000	0.07139	0.864	-0.1576	0.3176
	IR+KN	-0.02750	0.05318	0.995	-0.2032	0.1482

* $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edilmektedir.



Şekil 17. Ortalama TAS değerlerinin gruplara göre dağılımı

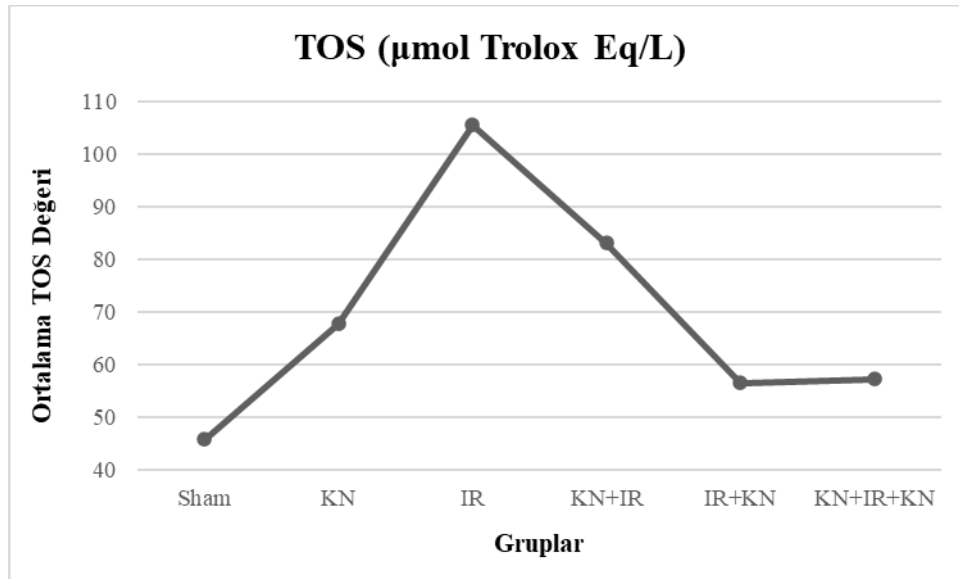
TOS verilerinin varyansı homojen dağıldığından post hoc testlerinden Tukey testi uygulandı. Ortalama TOS değerleri IR grubunda en yüksek olarak ölçüldü ve bu yükseliş sham ($p=0.001$) ve KN ($p=0.001$) gruplarına göre anlamlıydı. IR öncesi verilen KN ekstresinin TOS değerini KN+IR grubunda IR grubuna göre düşürdüğü ancak bu düşüşün anlamlı olmadığı kaydedildi. IR+KN ve KN+IR+KN gruplarında IR grubuna göre ortalama TOS değerlerinde azalma kaydedildi ve bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu hesaplandı (sırasıyla $p=0.001$ ve $p=0.001$) (Tablo 6). Gruplardaki ortalama TOS değerlerinin grafik sunumu Şekil 18’de gösterilmiştir.

OSI verilerinin varyansı normal dağılım gösterdiğinden post hoc testlerinden Tukey testi uygulandı. IR grubundaki ortalama OSI değerleri diğer tüm gruplardaki ortalama OSI değerinden daha büyük kaydedilmiştir. IR grubu ile diğer gruplar arasındaki ortalama OSI farkları istatistiksel olarak anlamlılık göstermiştir (IR-Sham: $p=0.001$, IR-KN: $p=0.001$, IR- IR+KN: $p=0.010$, IR-KN+IR: $p=0.001$, IR-KN+IR+KN: $p=0.001$). IRH öncesi KN ekstresinin verilmesinin oksidatif stresi düşürdüğünü, ancak özellikle IRH sonrası KN ekstresi tedavisinin oksidatif stresi azaltmada etkili olduğu tespit edildi. (Tablo 7). Gruplardaki ortalama OSI değerlerinin grafik sunumu Şekil 19’da gösterilmiştir.

Tablo 6. TOS verileri için post hoc Tukey test sonuçları

Gruplar (A)	Gruplar (B)	Ortalama Fark (A-B)	Standard hata	p değeri	95% Güven Aralığı	
					Alt limit	Üst limit
SHAM	KN	-21.91250	7.73615	0.072	-45.0068	1.1818
	IR	-59.79875*	7.73615	0.001	-82.8931	-36.7044
	KN+IR	-37.29625*	7.73615	0.001	-60.3906	-14.2019
	IR+KN	-10.72025	7.73615	0.735	-33.8146	12.3741
	KN+IR+KN	-11.37375	7.73615	0.685	-34.4681	11.7206
KN	SHAM	21.91250	7.73615	0.072	-1.1818	45.0068
	IR	-37.88625*	7.73615	0.001	-60.9806	-14.7919
	KN+IR	-15.38375	7.73615	0.366	-38.4781	7.7106
	IR+KN	11.19225	7.73615	0.699	-11.9021	34.2866
	KN+IR+KN	10.53875	7.73615	0.749	-12.5556	33.6331
IR	SHAM	59.79875*	7.73615	0.001	36.7044	82.8931
	KN	37.88625*	7.73615	0.001	14.7919	60.9806
	KN+IR	22.50250	7.73615	0.060	-0.5918	45.5968
	IR+KN	49.07850*	7.73615	0.001	25.9842	72.1728
	KN+IR+KN	48.42500*	7.73615	0.001	25.3307	71.5193
KN+IR	SHAM	37.29625*	7.73615	0.001	14.2019	60.3906
	KN	15.38375	7.73615	0.366	-7.7106	38.4781
	IR	-22.50250	7.73615	0.060	-45.5968	.05918
	IR+KN	26.57600*	7.73615	0.016	3.4817	49.6703
	KN+IR+KN	25.92250*	7.73615	0.020	2.8282	49.0168
IR+KN	SHAM	10.72025	7.73615	0.735	-12.3741	33.8146
	KN	-11.19225	7.73615	0.699	-34.2866	11.9021
	IR	-49.07850*	7.73615	0.001	-72.1728	-25.9842
	KN+IR	-26.57600*	7.73615	0.016	-49.6703	-3.4817
	KN+IR+KN	-0.65350	7.73615	0.995	-23.7478	22.4408
KN+IR+KN	SHAM	11.37375	7.73615	0.685	-11.7206	34.4681
	KN	-10.53875	7.73615	0.749	-33.6331	12.5556
	IR	-48.42500*	7.73615	0.001	-71.5193	-25.3307
	KN+IR	-25.92250*	7.73615	0.020	-49.0168	-2.8282
	IR+KN	0.65350	7.73615	0.995	-22.4408	23.7478

*p<0.05 anlamlı olarak kabul edilmektedir.

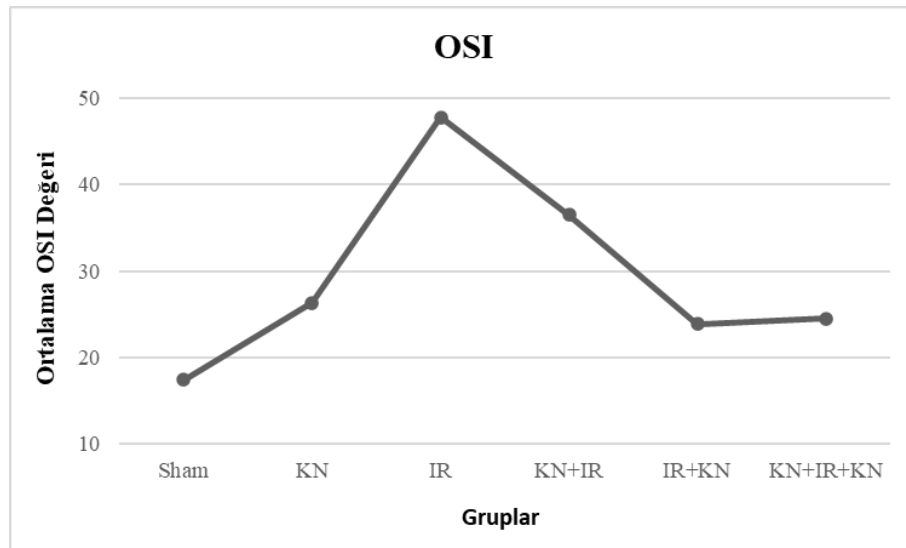


Şekil 18. Ortalama TOS değerlerinin gruplara göre dağılımı

Tablo 7. OSI verileri için post hoc Tukey test sonuçları

Gruplar (A)	Gruplar (B)	Ortalama Fark (A-B)	Standard hata	p değeri	95% Güven Aralığı	
					Alt limit	Üst limit
SHAM	KN	-8.92500	3.13035	0.069	-18.2699	0.4199
	IR	-30.36500*	3.13035	0.001	-39.7099	-21.0201
	KN+IR	-19.12250*	3.13035	0.001	-28.4674	-9.7776
	IR+KN	-6.43875	3.13035	0.329	-15.7836	2.9061
	KN+IR+KN	-7.11250	3.13035	0.228	-16.4574	2.2324
KN	SHAM	8.92500	3.13035	0.069	-0.4199	18.2699
	IR	-21.44000*	3.13035	0.001	-30.7849	-12.0951
	KN+IR	-10.19750*	3.13035	0.025	-19.5424	-0.8526
	IR+KN	2.48625	3.13035	0.967	-6.8586	11.8311
	KN+IR+KN	1.81250	3.13035	0.992	-7.5324	11.1574
IR	SHAM	30.36500*	3.13035	0.001	21.0201	39.7099
	KN	21.44000*	3.13035	0.001	12.0951	30.7849
	KN+IR	11.24250*	3.13035	0.010	1.8976	20.5874
	IR+KN	23.92625*	3.13035	0.001	14.5814	33.2711
	KN+IR+KN	23.25250*	3.13035	0.001	13.9076	32.5974
KN+IR	SHAM	19.12250*	3.13035	0.001	9.7776	28.4674
	KN	10.19750*	3.13035	0.025	0.8526	19.5424
	IR	-11.24250*	3.13035	0.010	-20.5874	-1.8976
	IR+KN	12.68375*	3.13035	0.003	3.3389	22.0286
	KN+IR+KN	12.01000*	3.13035	0.005	2.6651	21.3549
IR+KN	SHAM	6.43875	3.13035	0.329	-2.9061	15.7836
	KN	-2.48625	3.13035	0.967	-11.8311	6.8586
	IR	-23.92625*	3.13035	0.001	-33.2711	-14.5814
	KN+IR	-12.68375*	3.13035	0.003	-22.0286	-3.3389
	KN+IR+KN	-0.67375	3.13035	1.000	-10.0186	8.6711
KN+IR+KN	SHAM	7.11250	3.13035	0.228	-2.2324	16.4574
	KN	-1.81250	3.13035	0.992	-11.1574	7.5324
	IR	-23.25250*	3.13035	0.001	-32.5974	-13.9076
	KN+IR	-12.01000*	3.13035	0.005	-21.3549	-2.6651
	IR+KN	0.67375	3.13035	0.995	-8.6711	10.0186

*p<0.05 anlamlı olarak kabul edilmektedir.

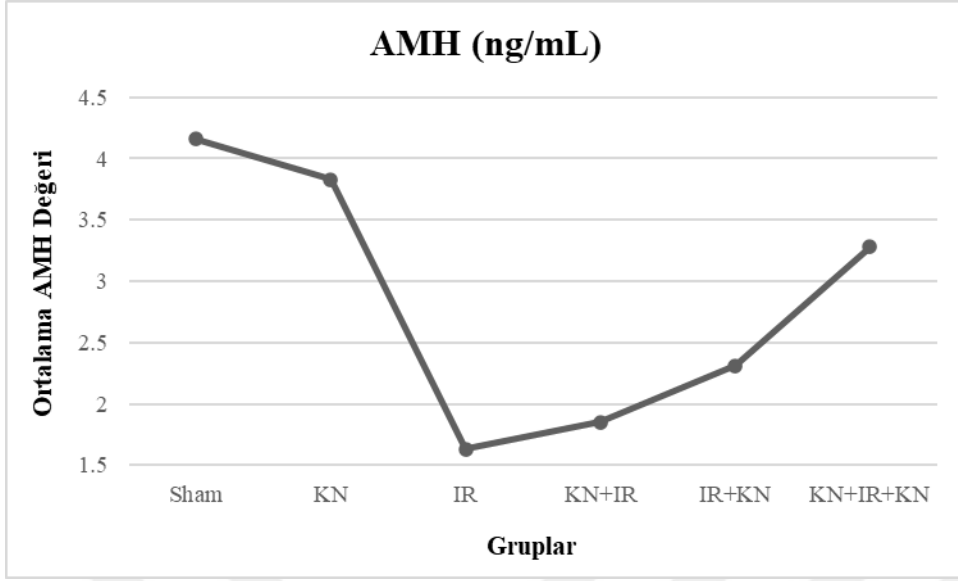
**Şekil 19.** Ortalama OSI değerlerinin gruplara göre dağılımı

AMH verilerinin varyansı normal dağılım gösterdiğinden posthoc testlerinden Tukey testi uygulandı. IR grubundaki ortalama AMH değerleri diğer tüm gruplardaki ortalama AMH değerinden daha düşük kaydedilmiştir. IR grubu ile sham ve KN grupları arasındaki ortalama AMH farkları istatistiksel olarak anlamlılık göstermiştir (IR-Sham: $p=0.001$ ve IR-KN: $p=0.001$). KN ekstresi tedavisi alan gruplardan KN+IR ve IR+KN gruplarında AMH seviyesi IR grubuna göre arttı ancak bu artış istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık göstermedi (sırasıyla, $p=0.991$ ve $p=0.451$). IR ve KN+IR grubuna göre AMH seviyesi KN+IR+KN grubunda anlamlı bir şekilde artış göstermiştir ($p=0.001$ ve $p=0.005$) (Tablo 8). KN tedavisinin IRH’de AMH değerlerini arttırarak ovaryan rezervi restore ettiği, ancak en iyi sonucun IRH öncesi ve sonrası KN ekstresi tedavisinin verildiği grup olduğu gözlemlendi. Gruplardaki ortalama AMH değerlerinin grafik sunumu Şekil 20’de gösterilmiştir.

Tablo 8. AMH verileri için post hoc Tukey test sonuçları

Gruplar (A)	Gruplar (B)	Ortalama Fark (A-B)	Standard hata	p değeri	95% Güven Aralığı	
					Alt limit	Üst limit
SHAM	KN	0.32375	0.36931	0.950	-0.7787	1.4262
	IR	2.52375*	0.36931	0.001	1.4213	3.6262
	KN+IR	2.30750*	0.36931	0.001	1.2050	3.4100
	IR+KN	1.84375*	0.36931	0.001	0.7413	2.9462
	KN+IR+KN	0.87625	0.36931	0.189	-0.2262	1.9787
KN	SHAM	-0.32375	0.36931	0.950	-1.4262	0.7787
	IR	2.20000*	0.36931	0.001	1.0975	3.3025
	KN+IR	1.98375*	0.36931	0.001	0.8813	3.0862
	IR+KN	1.52000*	0.36931	0.002	0.4175	2.6225
	KN+IR+KN	0.55250	0.36931	0.669	-0.5500	1.6550
IR	SHAM	-2.52375*	0.36931	0.001	-3.6262	-1.4213
	KN	-2.20000*	0.36931	0.001	-3.3025	-1.0975
	KN+IR	-0.21625	0.36931	0.991	-1.3187	0.8862
	IR+KN	-0.68000	0.36931	0.451	-1.7825	0.4225
	KN+IR+KN	-1.64750*	0.36931	0.001	-2.7500	-0.5450
KN+IR	SHAM	-2.30750*	0.36931	0.001	-3.4100	-1.2050
	KN	-1.98375*	0.36931	0.001	-3.0862	-0.8813
	IR	0.21625	0.36931	0.991	-0.8862	1.3187
	IR+KN	-0.46375	0.36931	0.807	-1.5662	0.6387
	KN+IR+KN	-1.43125*	0.36931	0.005	-2.5337	-0.3288
IR+KN	SHAM	-1.84375*	0.36931	0.001	-2.9462	-0.7413
	KN	-1.52000*	0.36931	0.002	-2.6225	-0.4175
	IR	0.68000	0.36931	0.451	-0.4225	1.7825
	KN+IR	0.46375	0.36931	0.807	-0.6387	1.5662
	KN+IR+KN	-0.96750	0.36931	0.115	-2.0700	0.1350
KN+IR+KN	SHAM	-0.87625	0.36931	0.189	-1.9787	0.2262
	KN	-0.55250	0.36931	0.669	-1.6550	0.5500
	IR	1.64750*	0.36931	0.001	0.5450	2.7500
	KN+IR	1.43125*	0.36931	0.005	0.3288	2.5337
	IR+KN	0.96750	0.36931	0.115	-0.1350	2.0700

* $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edilmektedir.



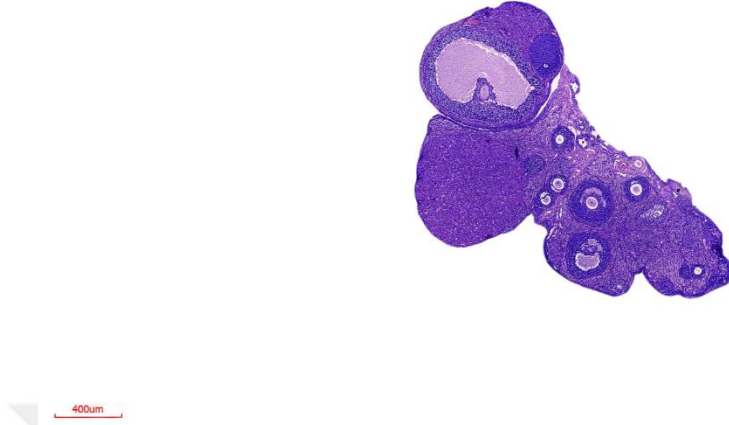
Şekil 20. Ortalama AMH değerlerinin gruplara göre dağılımı

5.2. Histopatolojik Bulgular

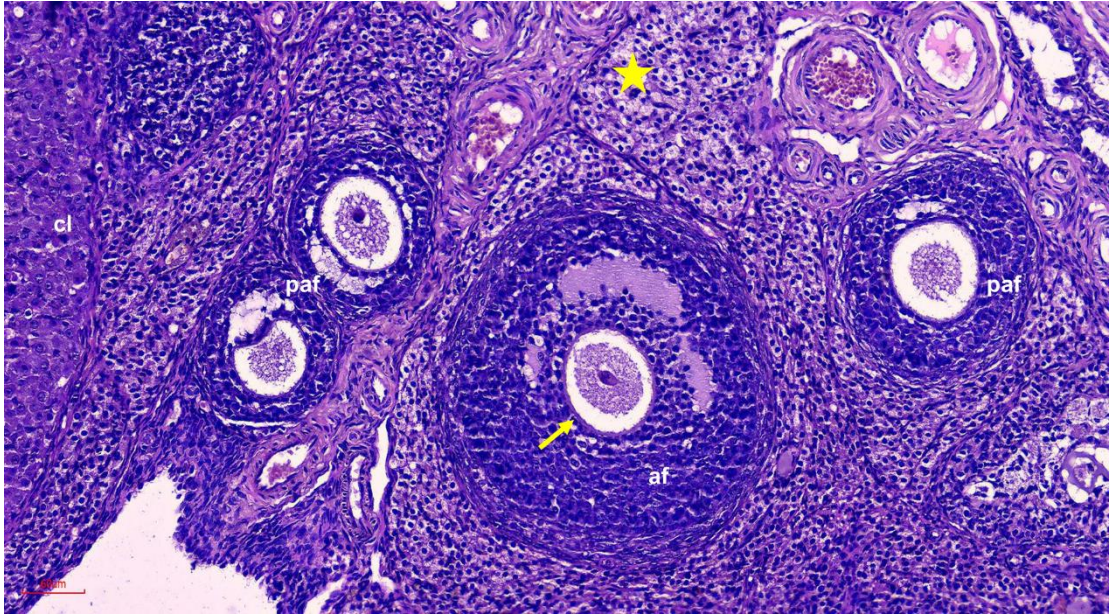
Tüm gruplardaki ovaryum kesitleri histokimyasal boyamalardan Hematoksilen-Eozin boyaması ile boyandı (Şekil 21 – 38).

5.2.1. Hematoksilen-Eozin boyama bulguları

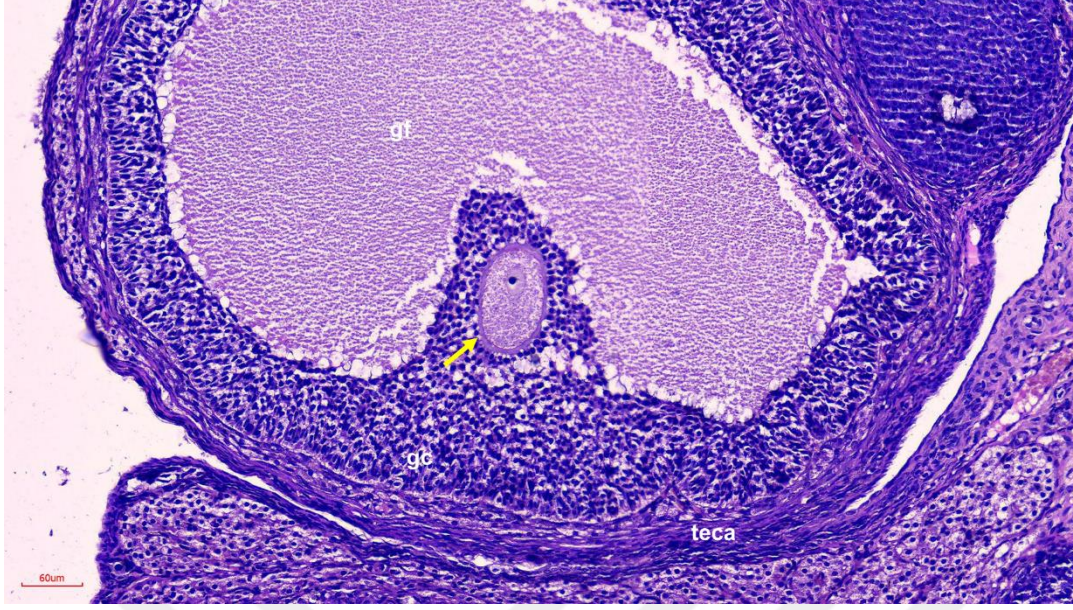
Sham grubu ovaryum kesitlerinde ovaryum histolojisinin normal olduğu izlendi. Preantral foliküller, antral folliküler ve ovumlu Graafian folikülünün yanında korpus luteum ve mezovaryumdaki bağ doku ve damarlar düzenli olarak gözlemlendi (Şekil 21 – 23).



Şekil 21. Sham grubu ovaryum kesitinin total görünümü. Hematoksilen Eozin, Bar: 400 µm

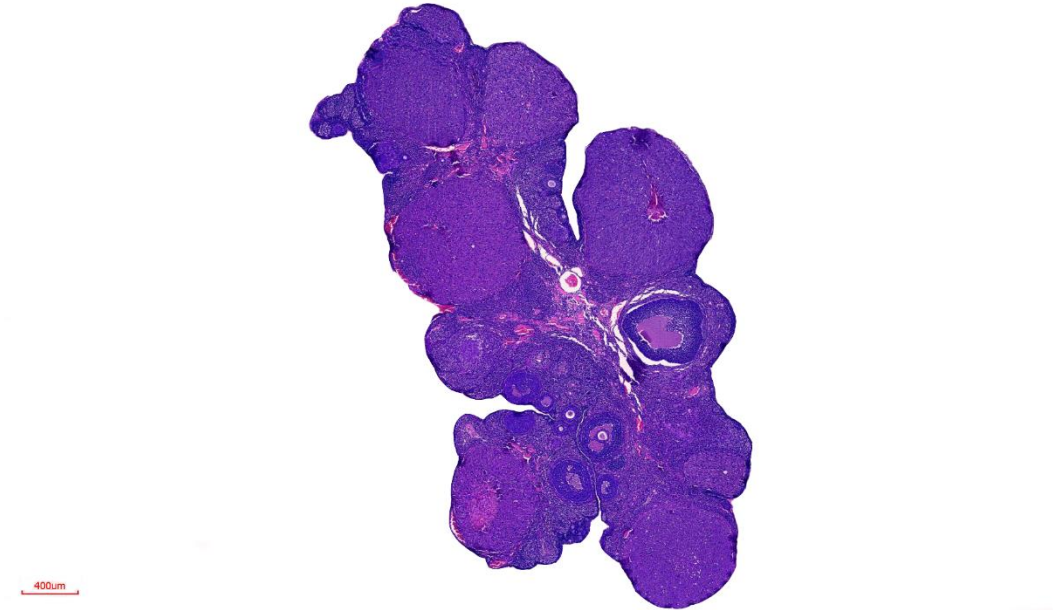


Şekil 22. Sham grubu ovaryum kesiti. Preantral foliküller (paf), antral foliküller (af), korpus luteum (cl), zona pellusidalı ovum (sarı ok) ve bağ doku stromal alan (sarı yıldız) düzenli olarak gözlendi. Hematoksilen Eozin, Bar: 60 µm

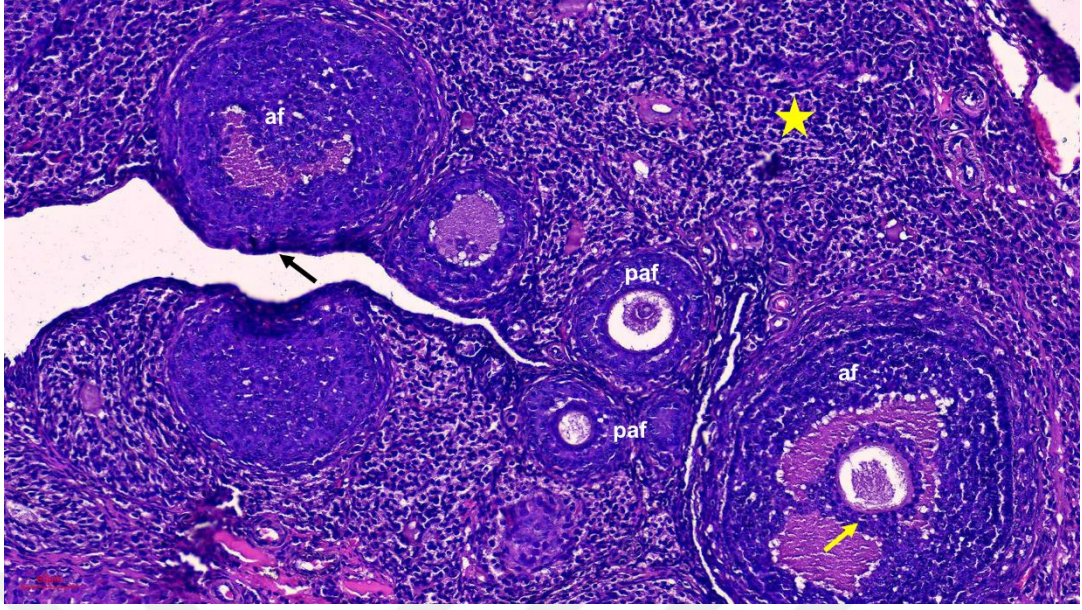


Şekil 23. Sham grubu ovaryum kesiti. Graafian folikül (gf), teka hücre tabakası (teca), granüloza hücreleri (gc) ve zona pellusidalı ovum (sarı ok) ve bağ doku stromal alan (sarı yıldız) normal histolojide görüldü. Hematoksilen Eozin, Bar: 60 µm

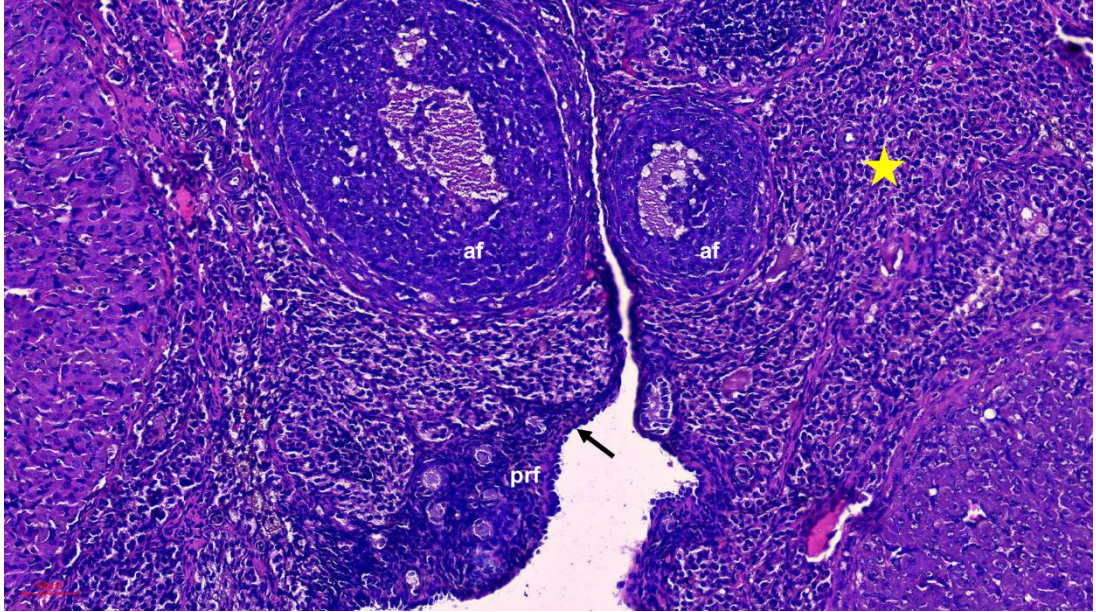
KN grubu ovaryum kesitlerinde ovaryum histolojisinin kontrole benzer ve histolojik olarak düzenli olduğu gözlemlendi. Primordial foliküller, preantral ve antral foliküller, stromal alan, ova ve germinal epitelium histolojik olarak normal izlendi., (Şekil 24 – 26).



Şekil 24. KN grubu total ovaryum kesit. Hematoksilen Eozin, Bar: 400 µm

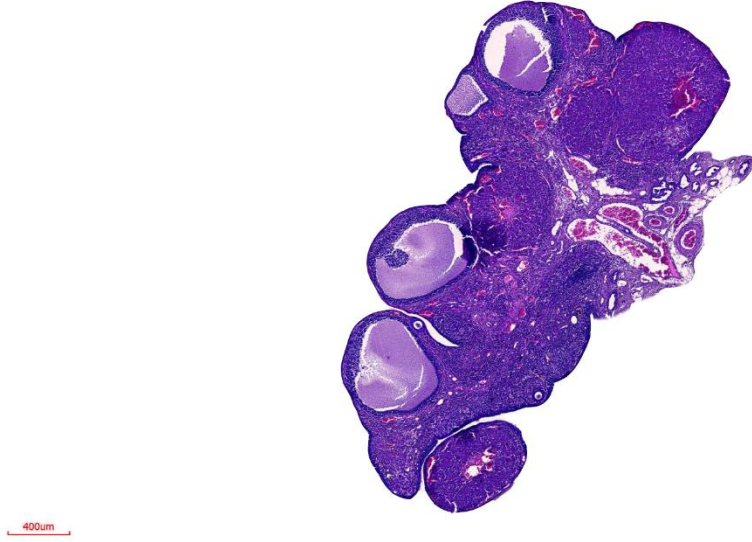


Şekil 25. KN grubu ovaryum kesiti. Preantral foliküller (paf), antral foliküller (af), zona pellusidalı ovum (sarı ok), stromal alan (sarı yıldız) ve germinal epitelyum (siyah ok) normal histolojik görünümde idi. Hematoksilen Eozin, Bar: 60 µm

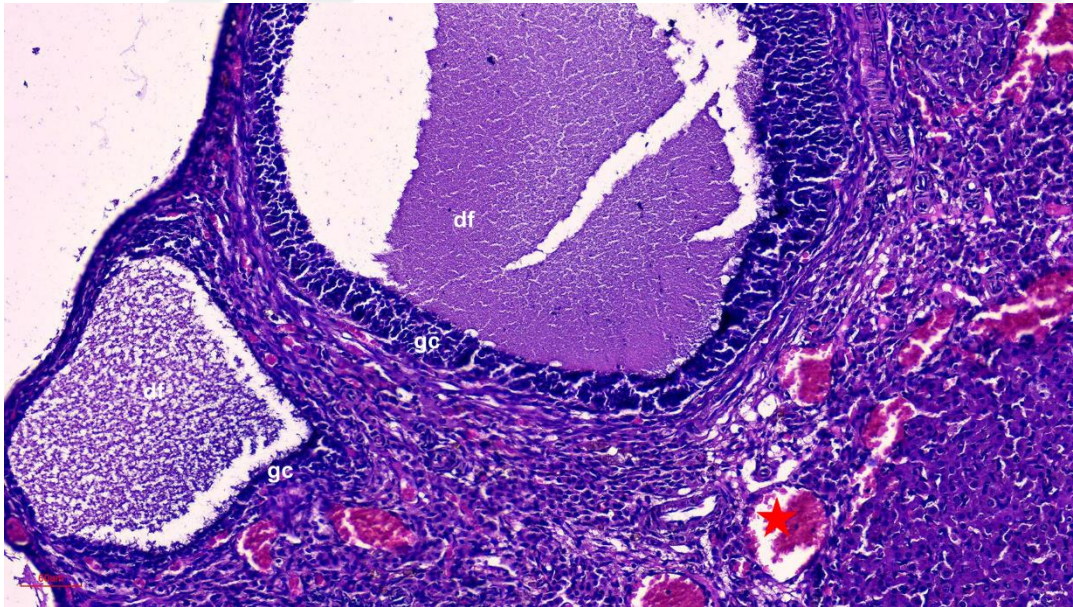


Şekil 26. KN grubu ovaryum kesiti. Primordiyal foliküller (prf), antral foliküller , stromal alan (sarı yıldız) ve germinal epitelyum (siyah ok) normal gözlemlendi. Hematoksilen Eozin, Bar: 60 µm

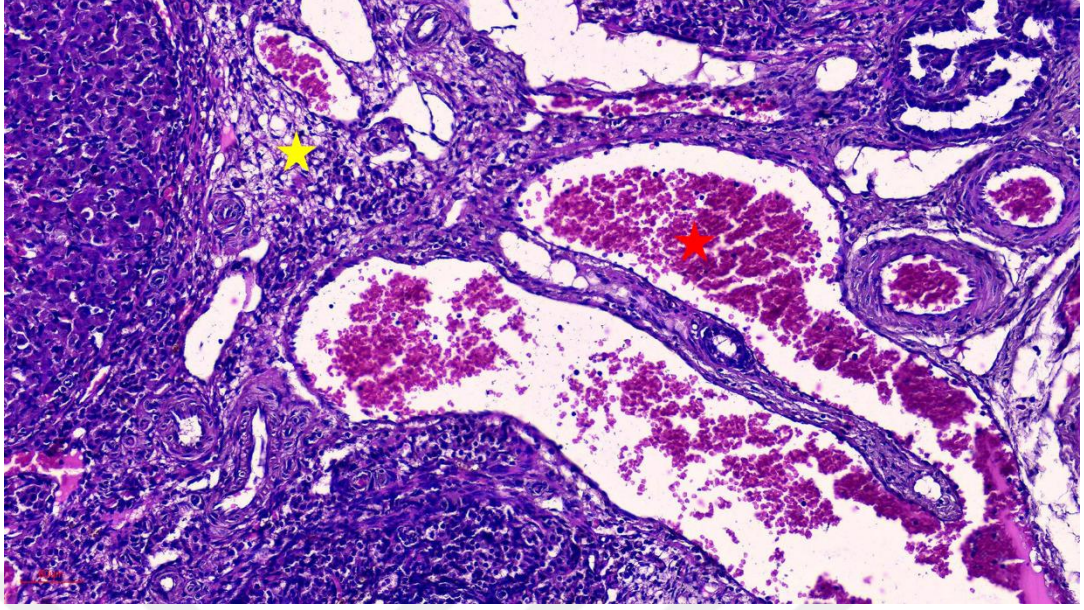
İskemi/reperfüzyon grubu ovaryum kesitlerinde foliküler dejenerasyon, yoğun vasküler konjesyon ve dilatasyon, yoğun mononükleer lökosit infiltrasyonu, bağ doku ve granüloza hücre tabakası dejenerasyonu gözlemlendi (Şekil 27 – 29).



Şekil 27. IR grubuna ait ovaryum kesitinin total görünümü. Hematoksilen Eozin, Bar: 400 µm

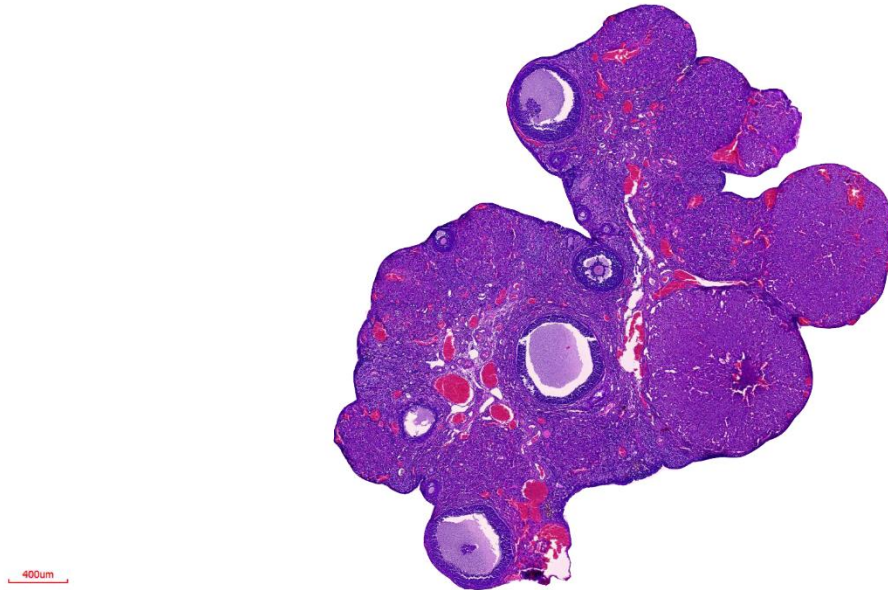


Şekil 28. IR grubuna ait ovaryum kesiti. Dejenere foliküller (df), dejenere granüloza hücre tabakası (gc) ve vasküler dilatasyon/konjesyon (kırmızı yıldız) izlenmektedir. Hematoksilen Eozin, Bar: 60 µm

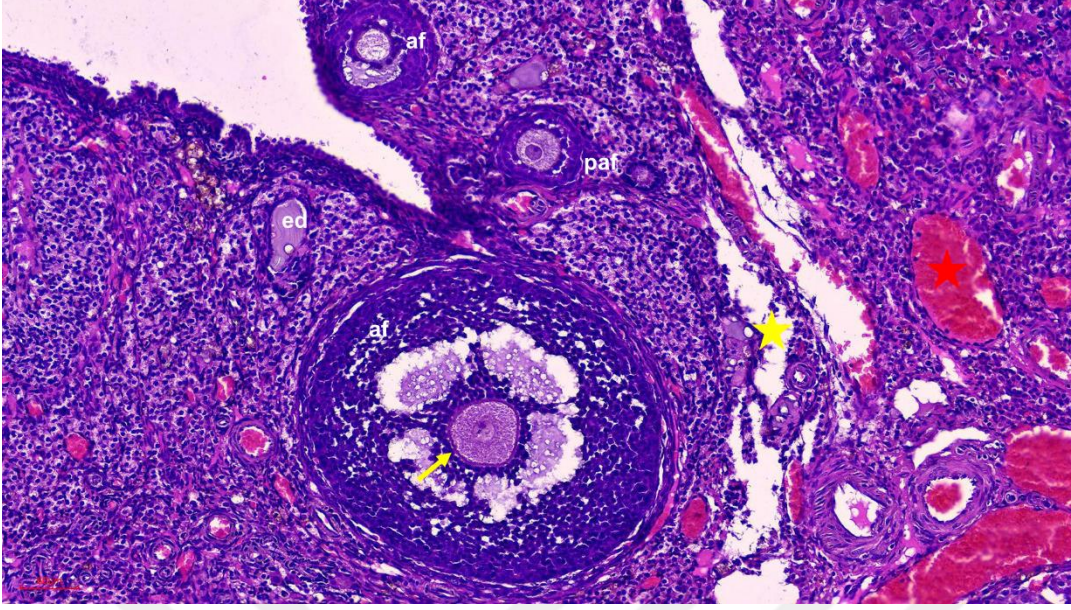


Şekil 29. IR grubuna ait ovaryum kesiti. Stromal alanda dejenerasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu ve vasküler dilatasyon ve konjesyon (kırmızı yıldız) görülmektedir. Hematoksilen Eozin, Bar: 60 µm

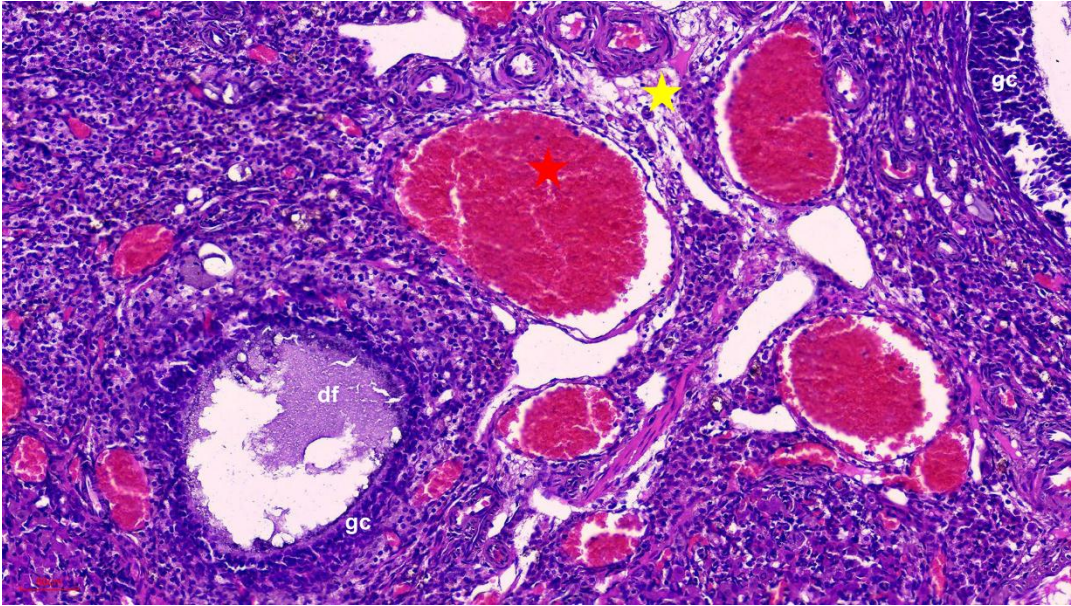
KN+IR grubunda, IR grubuna benzer histolojik görünüm mevcuttu. Ödem, foliküler dejenerasyon, vasküler dilatasyon/konjesyon, mononükleer lökosit infiltrasyonu, bağ doku hücre dejenerasyonu, dejeneratif foliküller ve az sayıda normal foliküler yapı izlendi. KN tedavisinin IR öncesi verilmesinin zayıf etkiye sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 30 – 32).



Şekil 30. KN+IR grubuna ait ovaryum kesitinin total görünümü. Hematoksilen Eozin, Bar: 400 µm

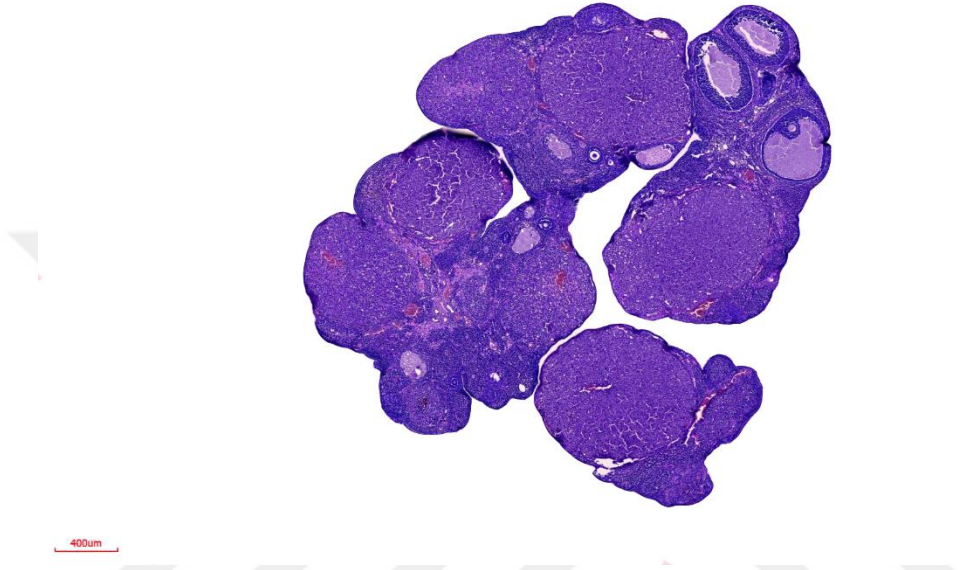


Şekil 31. KN+IR grubuna ait ovaryum kesiti. Bazı alanlarda normal preantral foliküller (paf), antral foliküller (af) ve zona pellusidalı ovum (sarı ok) izlenirken genel olarak yoğun ödem (ed), yaygın vasküler dilatasyon/konjesyon ve mononükleer lökosit infiltrasyonu (kırmızı yıldız) ve dejeneratif stromal alan (sarı yıldız) izlendi. Hematoksilen Eozin, Bar: 60 µm

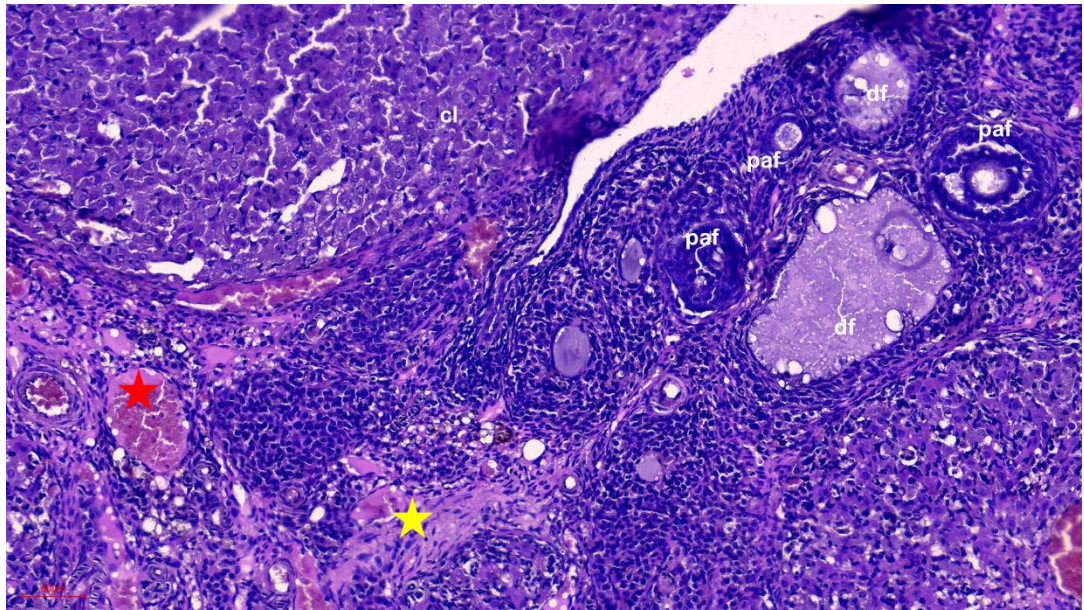


Şekil 32. KN+IR grubuna ait ovaryum kesiti. Dejeneratif foliküller (df) ve granüloza hücre tabakası (gc), yaygın vasküler dilatasyon/konjesyon ve mononükleer lökosit infiltrasyonu (kırmızı yıldız) ve dejeneratif stromal alan (sarı yıldız) izlendi. Hematoksilen Eozin, Bar: 60 µm

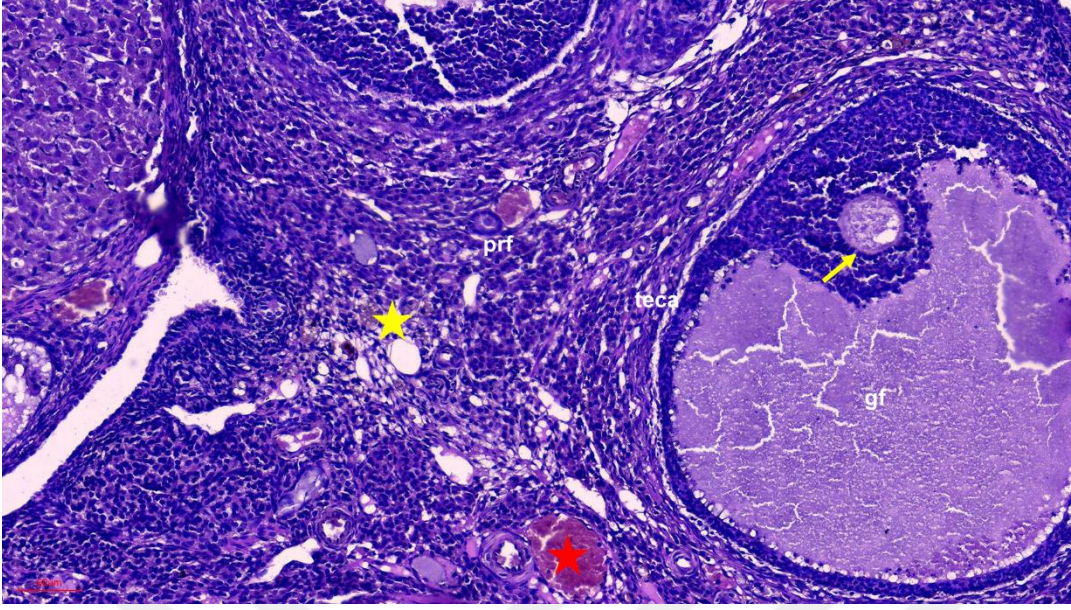
IR+KN grubunda, azalmış foliküler dejenerasyon, mononükleer lökosit infiltrasyonu, vasküler dilatasyon/konjesyon ve stromal bağ doku dejenerasyonu gözlemlendi. Bunun yanında, normal foliküller, teka hücre tabakası, ovum ve korpus luteum (cl) izlendi. IR sonrası KN tedavisinin histolojik yapıyı büyük oranda restore ettiği gözlemlendi (Şekil 33 – 35).



Şekil 33. IR+KN grubuna ait total ovaryum kesiti. Hematoksilen Eozin, Bar: 400 µm

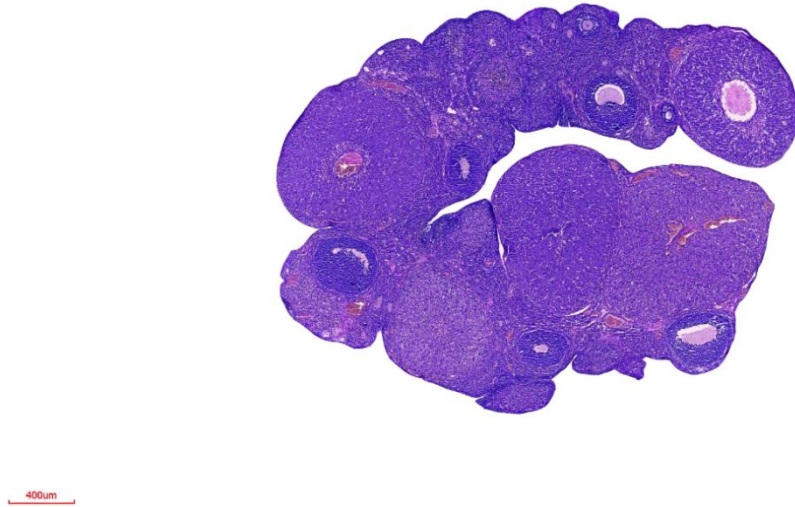


Şekil 34. IR+KN grubuna ait ovaryum kesiti. Preantral foliküller (paf), dejenere foliküller (df), korpus luteum (cl), azalmış vasküler dilatasyon/konjesyon ve mononükleer lökosit infiltrasyonu (kırmızı yıldız) ve azalmış dejeneratif stroma (sarı yıldız) görülmektedir. Hematoksilen Eozin, Bar: 60 µm

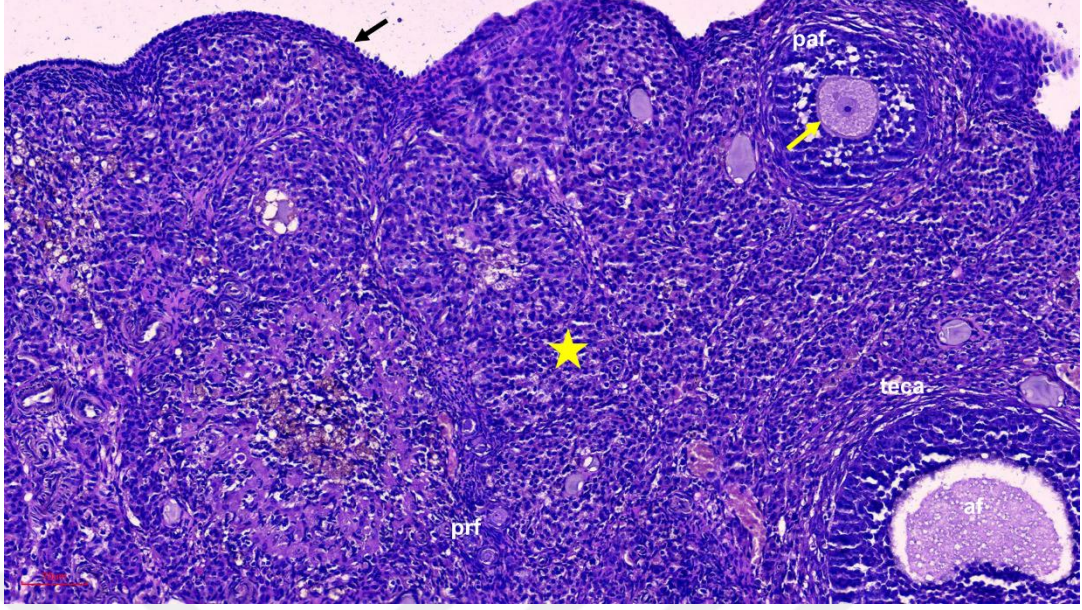


Şekil 35. IR+KN grubuna ait ovaryum kesiti. Primordiyal foliküller (prf), Graafian folikül (gf), teka hücre tabakası (teca) ve zona pellusidalı ovum (sarı ok), azalmış vasküler dila tasyon/konjesyon ve mononükleer lökosit infiltrasyonu (kırmızı yıldız) ve azalmış dejeneratif stroma (sarı yıldız) görünmektedir. Hematoksilen Eozin, Bar: 60 µm

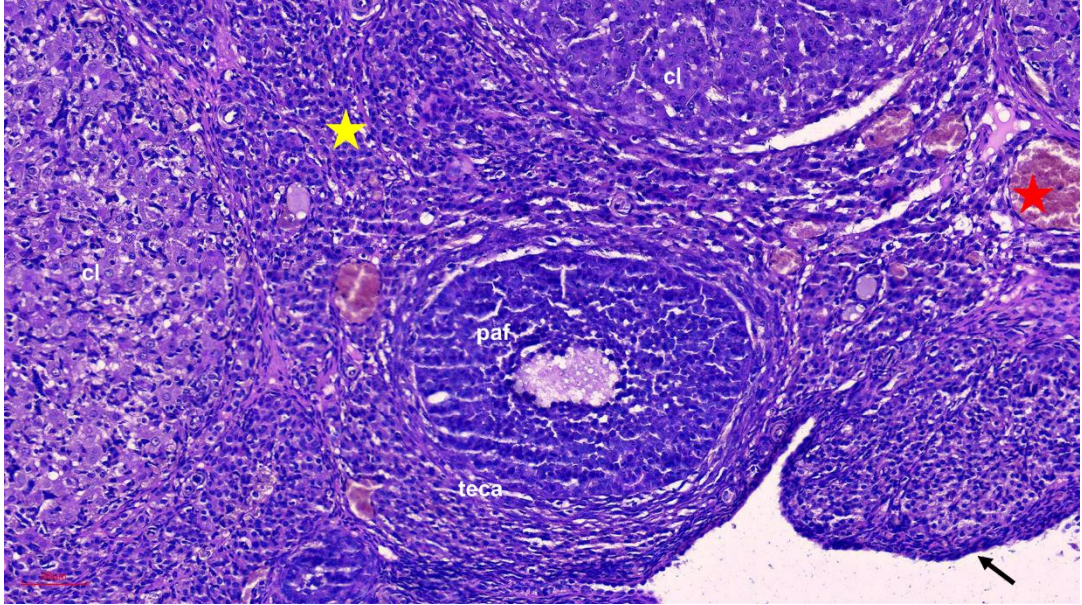
KN+IR+KN grubunda, normal histolojik yapıda primordiyal folikül, preantral foliküller, antral folikül, teka hücre tabakası, zona pellusidalı ovuö, germinal epitelyum ve stromal bağ doku alanı kaydedildi. IR sonrası oluşan ovaryum patolojisini IR öncesi ve sonrası KN tedavisinin etkili bir şekilde iyileştirdiği gözlemlendi (Şekil 36 – 38).



Şekil 36. KN+IR+KN grubuna ait total ovaryum kesiti. Hematoksilen Eozin, Bar: 400 µm



Şekil 37. KN+IR+KN grubuna ait bir ovaryum kesiti. Primordiyal folikül (prf), preantral foliküller (prf), antral folikül , teka hücre tabakası (teca), zona pellusidalı ovum (sarı ok), germinal epitelyum (siyah ok) ve stromal bağ doku alanı (sarı yıldız) normal izlendi. Hematoksilen Eozin, Bar: 60 µm

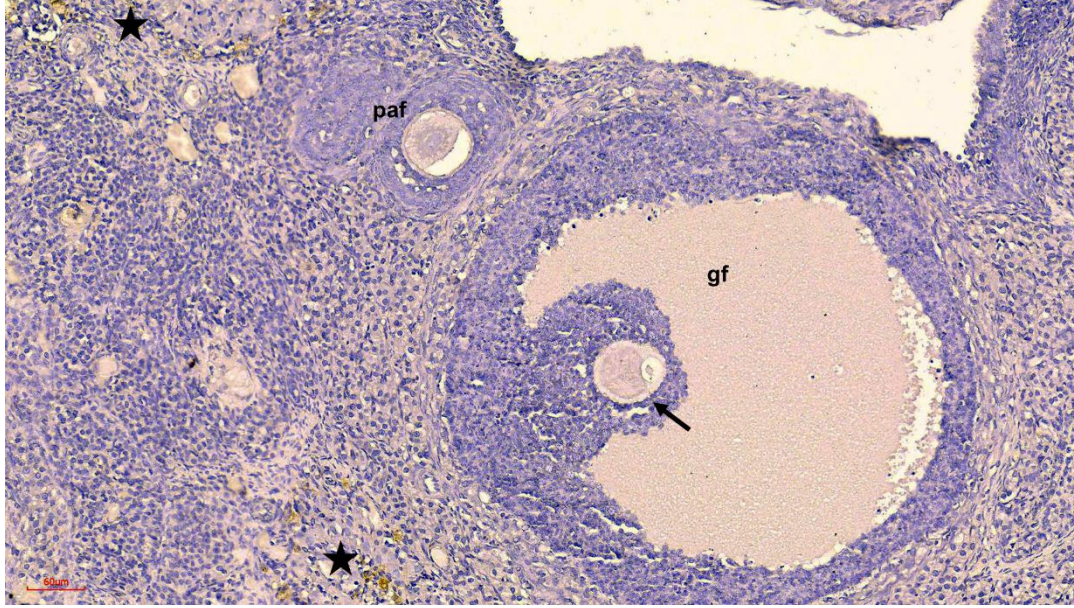


Şekil 38. KN+IR+KN grubuna ait bir ovaryum kesiti. Normal histolojik yapıda preantral folikül (prf), teka hücre tabakası (teca), germinal epitelyum (siyah ok) ve stromal bağ doku alanı (sarı yıldız) görülmektedir. Vasküler dilatasyon/konjesyon çok hafif izlenmektedir. Hematoksilen Eozin, Bar: 60 µm

5.3. APAF-1 İmmünohistokimyasal Bulgular

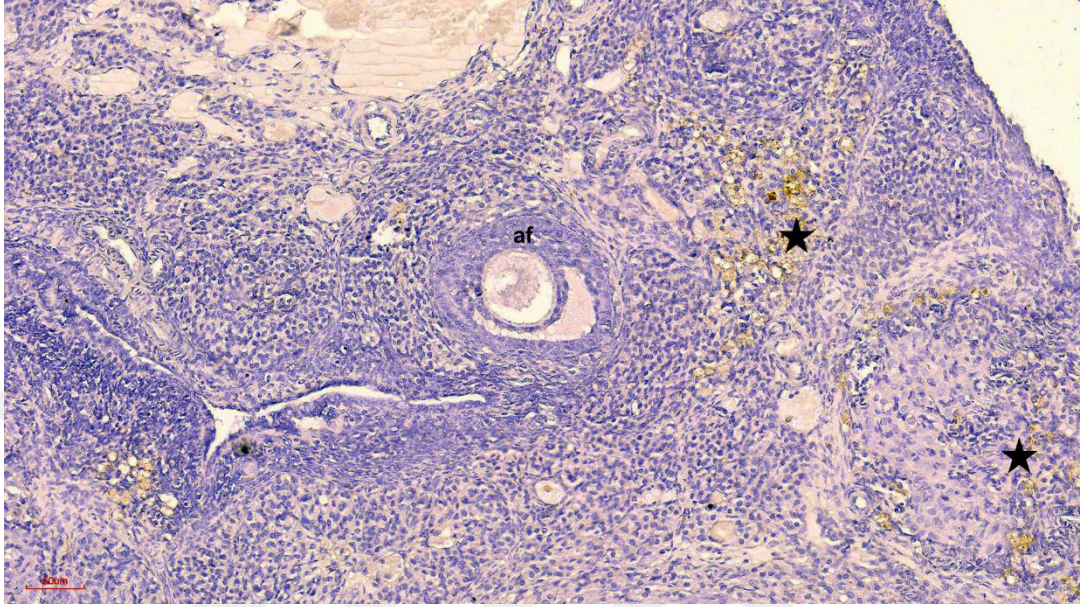
Tüm gruptaki ovaryum kesitleri APAF-1 ekspresyonu yoğunluğunu gözlemlemek için APAF-1 immünohistokimya boyaması ile boyandı (Şekil 39 – 44).

Sham grubu ovaryum kesitlerinde APAF-1 ekspresyonu sadece stromal alanda birkaç bağ doku hücre sitoplazmasında izlendi (Şekil 39).



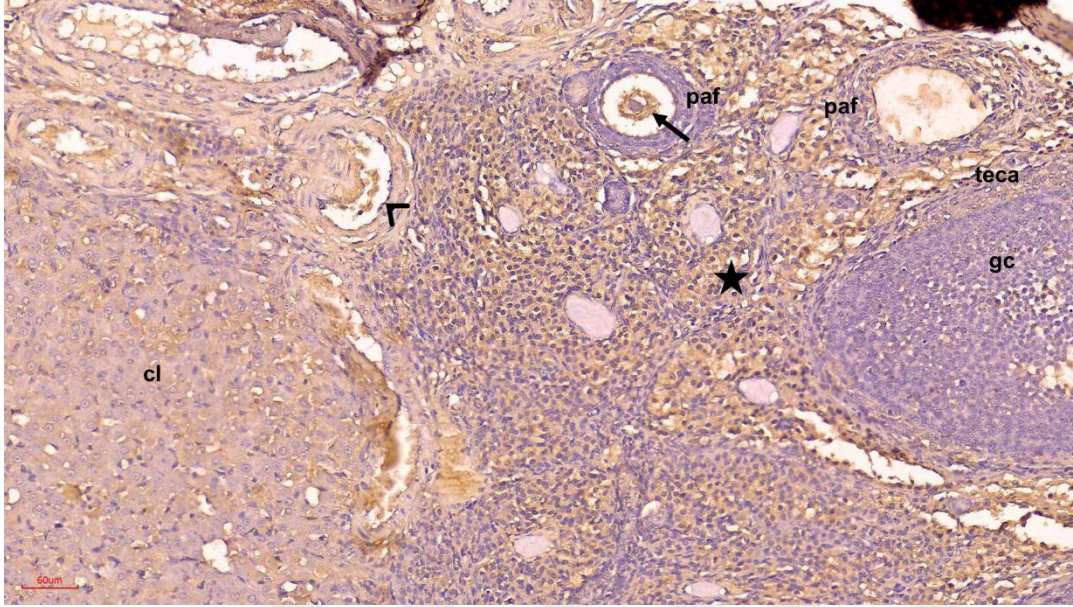
Şekil 39. Sham grubu ovaryum kesiti. APAF-1 ekspresyonu folikül genel olarak negatif izlenirken sadece bağ doku stromal alanda birkaç hücrede pozitif APAF-1 ekspresyonu (yıldız) izlendi. paf: pre-antral folikül, gf: Graafian folikülü, ok: ovum, APAF-1 immün boyama, Bar: 60 µm

KN grubunda, APAF-1 ekspresyonu ovaryan foliküllerde çoğunlukla negatifti ancak ovaryan stromada nadiren birkaç hücrede pozitif APAF-1 ekspresyonu izlendi (Şekil 40).



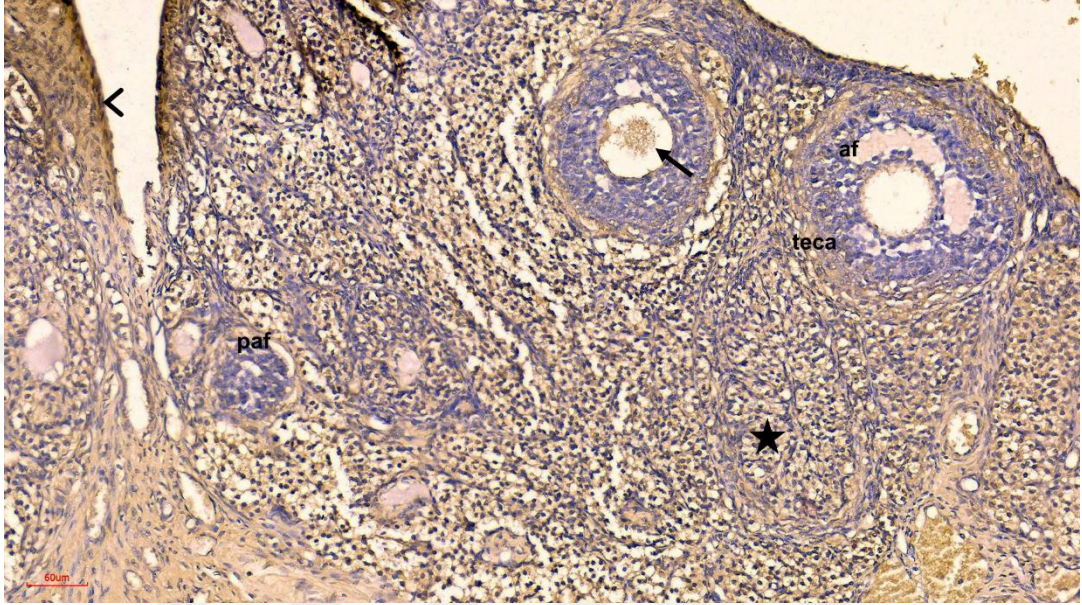
Şekil 40. KN grubu ovaryum kesiti. APAF-1 ekspresyonu sadece ovaryan stromada birkaç hücre sitoplazmasında pozitif olarak izlendi (yıldız). af: antral folikül, APAF-1 immün boyama, Bar: 60 µm

IR grubunda, APAF-1 immün aktivitesi ovaryan foliküllerde, teka hücre tabakasında, granüloza hücrelerinde, vasküler yapılarda, korpus luteum ve ovaryum stromasında yoğun olarak izlendi (Şekil 41). APAF-1 ekspresyonu sham ve KN gruplarına göre IR grubunda artış gösterdi.



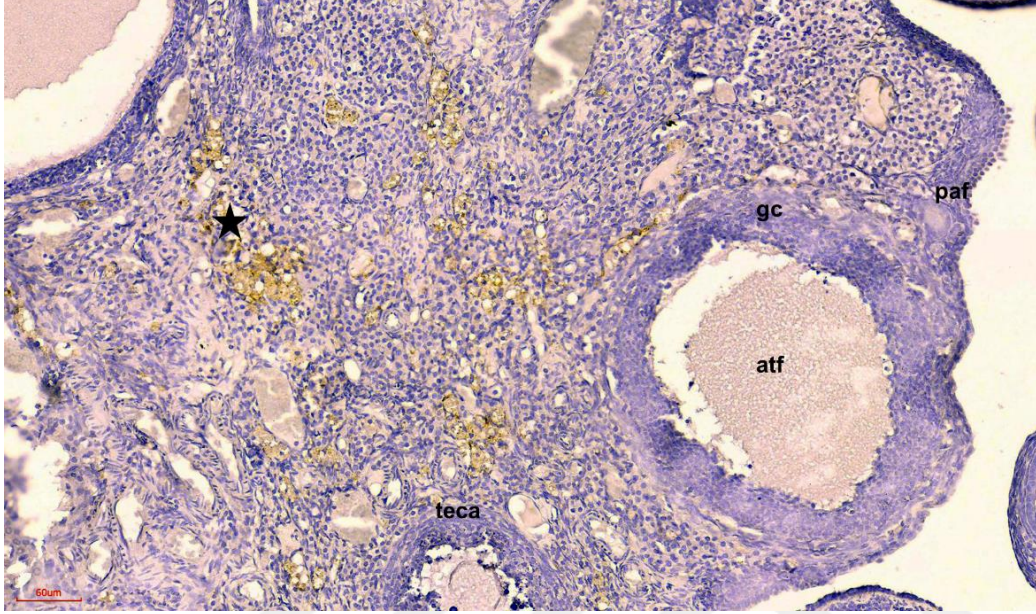
Şekil 41. IR grubu ovaryum kesiti. APAF-1 ekspresyonu preantral foliküllerde (paf), ovumda (ok), teka hücre tabakasında (teca), granüloza hücrelerinde (gc), damarlarda (ok başı), korpus luteum (cl) ve ovaryum stromasında (yıldız) çok yoğun olarak kaydedildi. APAF-1 immün boyama, Bar: 60 µm

KN+IR grubu kesitlerinde ovaryan foliküllerde, teka hücre tabakasında, ovumda, germinal epitelyumda ve bağ doku alanlarında APAF-1 immün aktivitesi yoğun olarak izlendi (Şekil 42). KN+IR grubundaki APAF-1 immün aktivitesi IR grubuna benzer bir yoğunlukta izlendi.



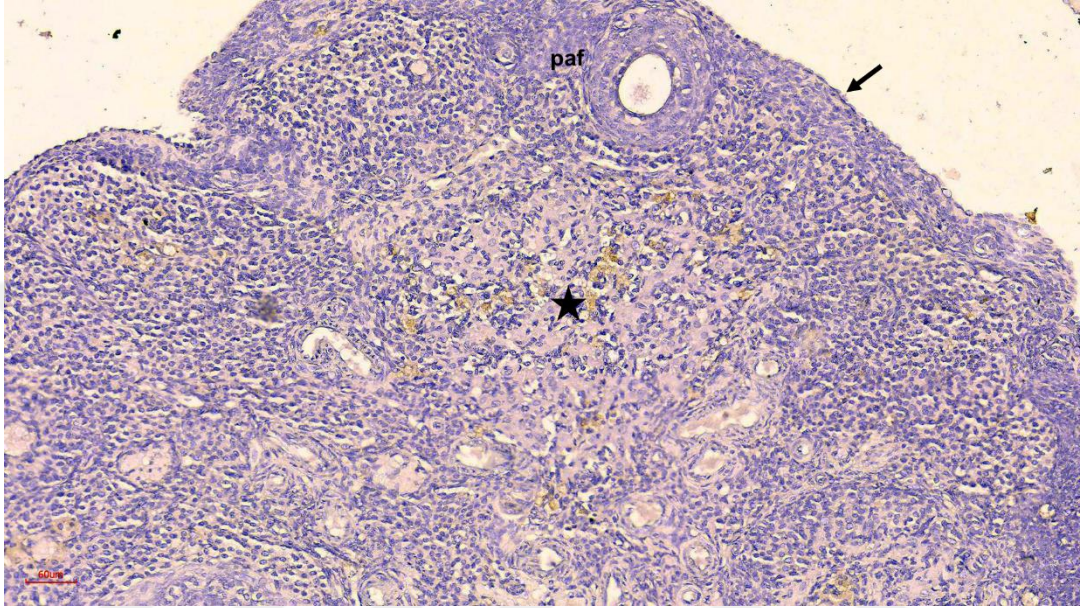
Şekil 42. KN+IR grubu ovaryum kesiti. Ovaryumun preantral (paf) ve antral (af) foliküllerinde, ovumda (ok), teka hücre tabakasında (teca), ovaryum stromasında (yıldız) ve germinal epitelyumda pozitif APAF-1 ekspresyonu yoğun olarak izlendi. APAF-1 immün boyama, Bar: 60 µm

IR+KN ovaryum kesitlerinde ovaryan folliküllerde genel olarak negatif APAF-1 reaksiyonu izlenirken, stromal alanlarda yer yer APAF-1 reaksiyonu pozitif olarak gözlendi (Şekil 43). IR+KN grubunda APAF-1 reaksiyonu, IR ve KN+IR gruplarına göre azaldı.



Şekil 43. IR+KN grubu ovaryum kesiti. Preantral (paf) ve atretik (atf) foliküllerde, teka (teca) ve granüloza (gc) hücre tabakasında çoğunlukla negatif APAF-1 ekspresyonu izlendi. Ovaryum stromasının bazı alanlarında (yıldız) APAF-1 ekspresyonu pozitif olarak izlendi. APAF-1 immün boyama, Bar: 60 μ m

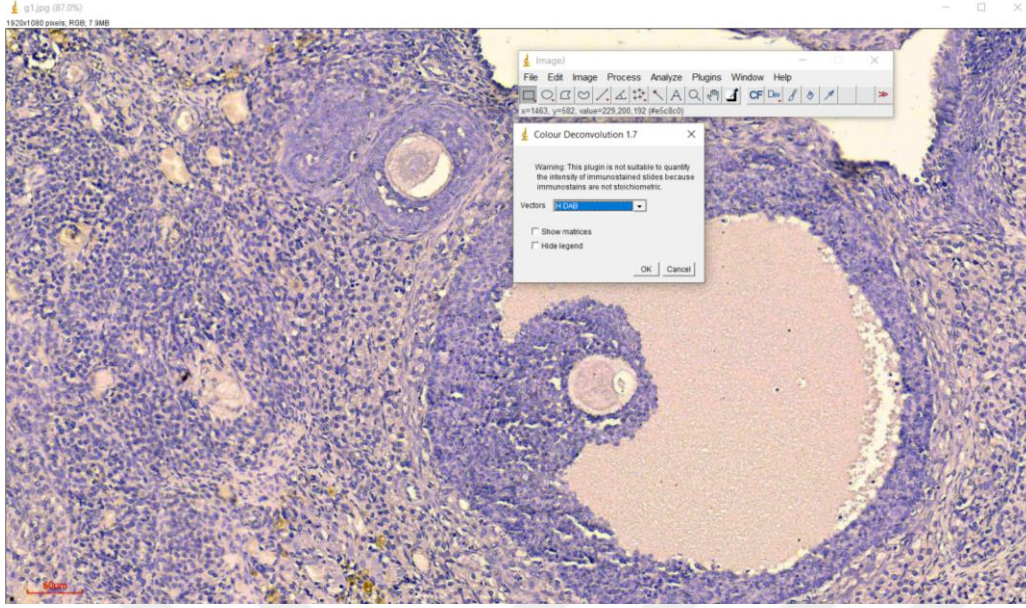
KN+IR+KN grubu ovaryum kesitlerinde, APAF-1 immün reaksiyonu ovaryum dokusunda negatif olarak izlenirken sadece ovaryum stromasında hafif düzeyde APAF-1 immünreaktivitesi izlendi (Şekil 44). KN tedavisinin IR öncesi ve sonrasında APAF-1 ekspresyonu güçlü bir şekilde baskılandığı, ekspresyonun sham grubuna yakın bir seviyede olduğu izlendi.



Şekil 44. KN+IR+KN grubu ovaryum kesiti. Preantral (paf) ve germinal epitelyumda (ok) negatif APAF-1 reaksiyonu izlendi. Ovaryum stromasının bazı alanlarında (yıldız) hafif düzeyde pozitif APAF-1 reaksiyonu izlendi. APAF-1 immün boyama, Bar: 60 µm

5.4. ImageJ Bulguları

Yarı nicel (semi-quantitative) immünohistokimya, dokularda protein ekspresyonunu ve lokalizasyonunu tespit etmek için kullanılan güçlü bir metottur (88). Bu çalışmada Crowe ve arkadaşlarının metodu örnek alınmış olup yarı nicel immünohistokimya analizi için ücretsiz ImageJ Fiji (sürüm 1.5; WS Rasband ve arkadaşları, Ulusal Sağlık Enstitüsü, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>) yazılımı kullanılmıştır (89). Kromojen DAB ve hematoksilen zıt boyaması kontrastına dayanan programda kahve rengi (ekspresyon alanları) yoğunluğu tespit edilerek tüm alandaki renk yoğunluğuna olan oranı tespit edilmektedir. Bu şekilde gruptaki APAF-1 ekspresyonu yarı nicel şekilde ölçüldü (Şekil 45 ve 46).



Şekil 45. ImageJ yazılımında yarı nicel immünohistokimya analiz.

Results

File	Edit	Font	Results
	Label	Area	Mean
1	g1.24.jpg-(Colour_2)	1215780	35.579

Şekil 46. ImageJ yazılımında APAF-1 ekspresyon yoğunluğu sonuçları. Label: grup ismi, Area: toplam resim alanı, mean: ortalama sinyal yoğunluğu.

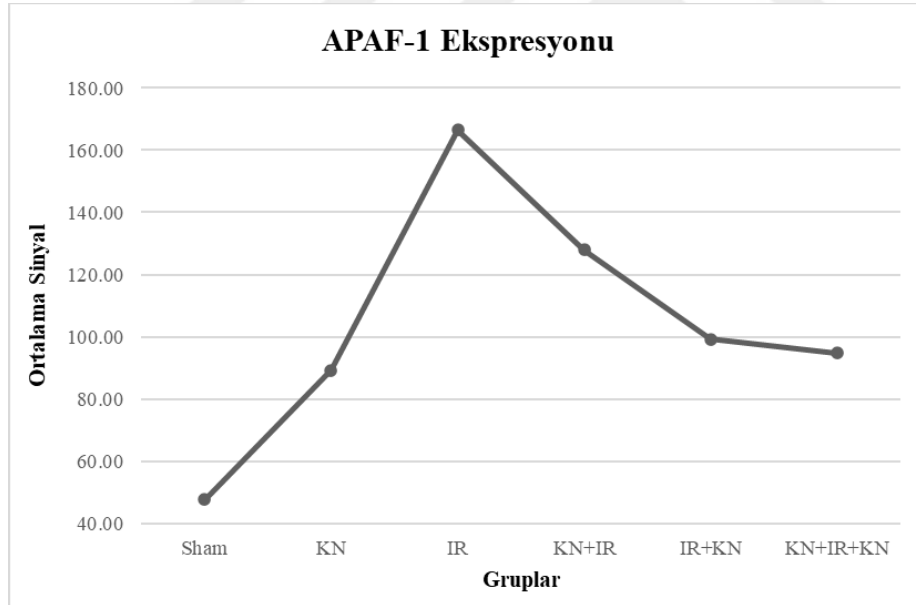
ImageJ yazılım analizi ile ovaryum kesitlerindeki APAF-1 pozitif reaksiyonunun ortalama, standard sapma, minimum ve maksimum değerleri gruplara göre Tablo 9'da gösterilmiştir. ImageJ analizine göre IR grubunda APAF-1 sinyali sham ve KN gruplarına göre artarken, KN tedavisi uygulanan gruplarda ortalama APAF-1 sinyal yoğunluğunun azaldığı izlendi (Tablo 9). KN tedavisinin özellikle IR işlemi sonrası uygulanan gruplarda APAF-1 ekspresyon düzeyini anlamlı bir şekilde düşürdüğü gözlemlendi. Tablo 9'un grafiksel gösterimi Şekil 47'te gösterilmiştir.

Tablo 9. Pozitif APAF-1 ve AMH sinyal ortalamasının gruplara göre dağılımı ve istatistiksel analizi

Pozitif APAF-1 sinyali

Gruplar	Ortalama	Standard Sapma	Minimum değer	Maksimum değer	p değeri
Sham	47.71	50.67	0.07	110.24	IR: 0.001
KN	89.17	39.21	0.10	124.28	IR: 0.005
IR	166.50	33.01	117.66	217.99	Sham: 0.001 KN: 0.005
KN+IR	127.99	19.15	102.91	171.11	Sham: 0.001 IR: 0.017
IR+KN	99.24	21.77	60.33	142.13	Sham: 0.028 IR: 0.001 KN+IR: 0.007 KN+IR+KN: 0.995
KN+IR+KN	94.82	16.39	50.35	112.77	Sham: 0.066 IR: 0.001 KN+IR: 0.002 IR+KN: 0.995

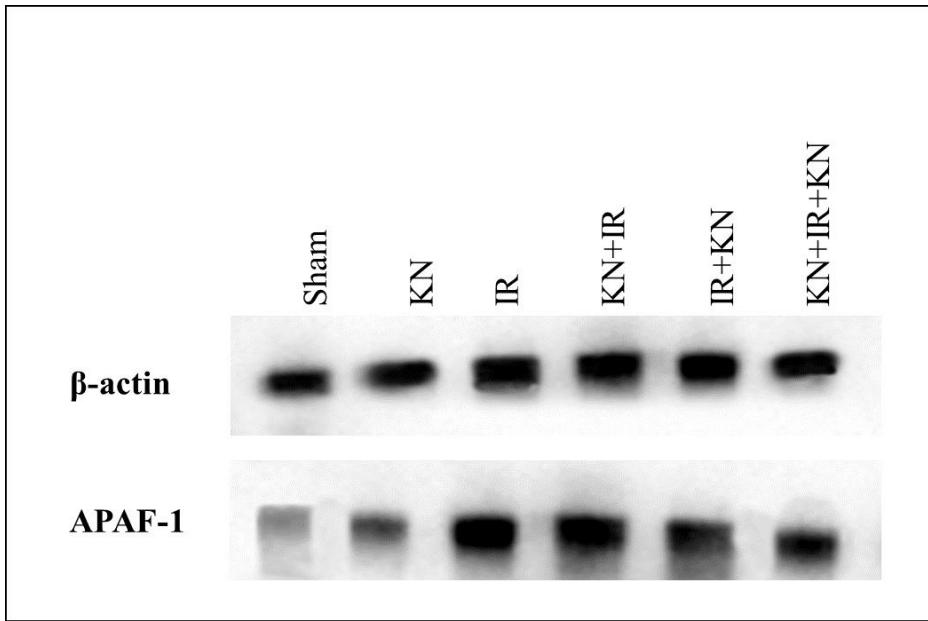
Ortalama: istenilen antikorun ölçülen sinyal (ekspresyon) miktarını temsil eder.



Şekil 47. ImageJ yazılımına göre gruplardaki APAF-1 ortalama sinyal değeri.

5.5. Western Blot Bulguları

Tüm gruplardaki ovaryum doku homojenatlarında spesifik olarak APAF-1 ekspresyonu yoğunluğunu gözlemlemek için Western Blot tekniği kullanıldı. β -Actin protein seviyesi ise pozitif kontrol olarak kullanıldı (Şekil 48). Sham ve KN grubunda IR grubuna göre APAF-1 protein seviyesinin arttığı gözlemlendi. IR öncesi verilen KN tedavisinin APAF-1 protein seviyesinde ciddi bir değişime neden olmazken, IR+KN ve özellikle KN+IR+KN grubunda APAF-1 proteinin downregüle olduğu tespit edildi (Şekil 48).



Şekil 48. Gruplara göre Western Blot tekniği ile β -actin ve APAF-1 protein seviyesinin gösterimi.

6. TARTIŞMA

Ovaryan torsiyonu acil müdahale gerektiren ve beşinci en yaygın jinekolojik komplikasyondur. Tüm yaş grubu kadınlarda görülmesine rağmen özellikle üreme çağı yaş grubundaki kadınlarda insidansı yüksektir. Prevalansı Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık %2.7'dir (90). Ovaryan torsiyonun spesifik semptom ve belirtisi olmadığından tanı ve tedavide gecikmeler yaşanır. Ovaryan iskemi ise ovaryumda torsiyon gelişmesi sonucu oluşur ve bu durumda dokulara az veya hiç kan akışı olmaz ve hücre ölümüne neden olur. İskemik dokunun yeniden kanlanması ise reperfüzyon olarak adlandırılır. Reperfüze olan dokularda genelde iskeminin neden olduğu kötü durumun düzelmesi beklenir ancak reperfüzyon, iskeminin tek başına oluşturduğu hasardan daha fazla doku hasarına sebebiyet verir, bu hasar iskemi-reperfüzyon hasarı (IRH) olarak bilinir (91). IRH'de birçok histopatolojik değişikliklerin yanı sıra reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) üretimi artar. Bunun yanı sıra, oksidatif stres ve lipid peroksidasyonun son ürünü olan malondialdehit (MDA) seviyesi artarken, ortaya çıkan toksik ürünler antioksidan defans sisteminde rol alan süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) (53) enzimlerinin aktivitesi ile hücreden uzaklaştırılır. Serbest oksijen türleri hücrede metabolik bozukluklara ve hücre içi kalsiyum dengesinin bozulmasına, sonuç olarak hücresel hasar veya ölüme neden olur (92).

Hortu ve arkadaşları, 30 adet dişi Sprague Dawley albino rat üzerinde ovaryan iskemi reperfüzyon hasarını incelemiştir. 3 saat iskemi ve 3 saat reperfüzyon uygulaması sonrası ovaryan dokularda MDA, oksidatif stres ve histopatolojik incelemelerde bulunmuşlardır. Yazarlar, MDA değerlerinin kontrol grubu değerlerine göre IR grubunda anlamlı bir şekilde yüksek olduğunu belirtmişlerdir ($p<0.01$). Benzer şekilde, iskemi-reperfüzyon grubunda foliküler dejenerasyon, vasküler konjesyon, ödem, hemoraji ve lökosit infiltrasyonu skorlarının sham grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır ($p<0.05$) (93). IRH'nin ovaryum dokusu üzerinde etkilerinin incelendiği bir çalışmada, IR grubuna 1 saat iskemi ve 2 saat reperfüzyon işlemi uygulandı. Ovaryum dokularında aynı zamanda oksidatif stres indikatörü MDA ve antioksidan enzimleri SOD, CAT ve GPx değerleri de

ölçüldü. IR grubunda, kontrol grubuna göre MDA değeri yüksek iken SOD, CAT ve GPx değerleri düşük olarak ölçüldü ($p<0.05$). IR grubunda, histopatolojik olarak şiddetli vasküler konjesyon, ödem, hemoraji ve foliküler dejenerasyon izlendi (94). Melekoğlu ve arkadaşları benzer olarak dişi ratlarda 3 saat/3 saat ovaryan IR modeli tasarlamışlardır. Yazarlar serum MDA (nmol/g tissue) GSH (nmol/mL tissue) SOD (U/mg protein) GPx (U/mg protein) CAT (kU/mg protein) değerlerinin yanında histopatolojik skorlamada yapmışlardır. Biyokimyasal parametrelerdeki değişim kontrol ve IR grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur: MDA: 6.38 ± 1.12 vs 9.16 ± 0.98 (anlamlı artış), GSH: 55.4 ± 2.66 vs 35.5 ± 2.87 (anlamlı azalış), SOD: 80.1 ± 10.2 vs 57.6 ± 14.7 (anlamlı azalış), GPx: 596.4 ± 45.9 vs 468.9 ± 92.6 (anlamlı azalış), CAT: 0.014 ± 0.001 vs 0.005 ± 0.001 (anlamlı azalış). IR grubunda hemoraji, ödem, vasküler konjesyon, mononükleer lökosit, vasküler proliferasyon ve apoptozis bulguları skorlanmış ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir yükseliş kaydedilmiştir ($p<0.001$) (95). Eken ve arkadaşları 3 saat iskemi ve 24 saat reperfüzyon yapılan ovaryum dokularında GSH, MDA, MPO, SOD ve DNA hasarını ölçmüşlerdir. Doku düzeyinde kontrol grubuna göre, SOD ve GSH değerleri IR grubunda daha düşük bulunurken, en yüksek MDA ve MPO değerleri IR grubunda bulunmuştur. Yazarlar IR grubunda histopatolojik olarak vasküler dilatasyon, hemoraji, foliküler dejenerasyon ve mononükleer lökosit infiltrasyonu kaydetmişlerdir. Doku düzeyinde bakılan apoptozis ölçümünde IR grubu, kontrol grubuna göre daha fragmente DNA sayısına sahiptir. Ovaryan folikül sayısı açısından kontrol grubunda primordial folikül sayısı: 12 ± 4.94 , preantral: 6.83 ± 2.63 , küçük antral: 2.83 ± 0.75 , büyük antral: 1.83 ± 0.40 ve korpus luteum: 4.67 ± 1.03 idi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında IR grubunda ise primordial: 3.50 ± 1.04 ($p=0.001$), preantral: 2.17 ± 0.75 ($p=0.004$), küçük antral: 1.67 ± 0.51 ($p=0.017$), büyük antral: 1.17 ± 0.40 ($p=0.063$) ve korpus luteum: 2.50 ± 0.83 ($p=0.009$) olarak kaydedildi (96). Şahin ve arkadaşları 3 saat iskemi -3 saat reperfüzyon uyguladıkları Sprague Dawley dişi ovaryumlarında biyokimyasal ve histopatolojik değişimler gözlemledi. Kan örneklerinden bakılan MDA değerlerinde sham grubunda 0.06 ± 0.01 nmol/ μ g bulunurken IR grubunda 1.66 ± 0.20 nmol/ μ g kaydetmişlerdir. Yazarlar histopatolojik bulgularda, kontrol grubuna göre IR grubunda foliküler dejenerasyonu (0.16 ± 0.16 - 2.66 ± 0.21), vasküler konjesyonu (0.33 ± 0.21 - 2.5 ± 0.34), ödemi (0.5 ± 0.22 -

2.16±0.30) hemorajiyi (0.16±0.16 - 2.33±0.33), inflamatuvar hücre infiltrasyonunu (0.16±0.16 -1.66±0.21) daha yoğun gözlemlediler (97).

Başka bir ovaryan IR çalışmasında, IR öncesi ve sonrasında hayvanların ağırlıkları kaydedilmiş ancak herhangi bir istatistiksel olarak anlamlılık kaydedilmemiştir. 2 saat iskemi/2 saat reperfüzyon uygulaması sonrasında doku MDA seviyeleri sham grubunda 0.1±0.04 nmol/mg iken IR grubunda 1.8±0.3 nmol/mg olarak ölçülmüş ve artış istatistiksel olarak anlamlı idi ($P<0.001$). Yine CAT, sham grubunda 32.2± 8.1 kg/protein iken IR grubunda ise 4.8±1.3 kg/protein olarak bulundu ve sham grubuna göre IR grubundaki bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.001$) Yazarların yaptığı histopatolojik skorlamada 0: patolojik bulgu yok olarak ifade edilirken en yüksek olan 3 skoru ise yüksek patolojiyi temsil etmiştir. Bu skorlamada konjesyon, hemoraji, ödem ve hücrel dejenerasyon ayrı ayrı olarak skorlanmıştır. IR grubunda histopatolojik skor (9.8±1.1) iken sham grubunda (2.1±0.6) olarak kaydedilmiştir ($P<0.001$) (98). Çaltekin ve arkadaşları ovaryum IRH için 3 saat iskemi/3 saat reperfüzyon uygulamasında, sham grubuna göre IR uygulanan hayvanların serum SOD ve GSH değerleri daha düşük kaydedildi. Ovaryum histopatolojisinde IR grubunda hemoraji ve foliküler dejenerasyon izlendi. Tunel assay sonuçlarında, IR grubunda sham grubuna göre apoptotik hücre sayısında artış izlendi ($p<0.001$) (99). Ovaryan IR hasarı yapılan bir çalışmada 48 adet dişi Sprague Dawley rat kullanılmış ve 3 saat iskemi/3 saat reperfüzyon işlemi uygulanmıştır. Ovaryumda doku MDA (nmol/g) ve glutatyon (GSH, nmol/g) değerleri sırasıyla kontrol grubunda 9.10±0.29 ve 7.40±0.80 iken IR grubunda 14.88±01.06 ve 5.34±0.83 nmol/g idi ($p<0.05$). Histopatolojik incelemede IR grubunda hemorajik dejeneratif folikül, vasküler konjesyon ve ödem izlendi. Tunel assay sonuçlarında da pozitif apoptotik hücre sayısı IR grubunda yüksekti ($p=0.003$) (100). Otuz beş Wistar Albino dişi sıçan 3 saat iskemi/3 saat reperfüzyon işlemine tabi tutulmuş ve ovaryum dokularında SOD, MPO, GSH, DNA hasarının yanında histopatolojik değerlendirme analiz edilmiş. Kontrol grubu ve IR grubunda, MDA 5.7±0.19 - 11.6±0.23 µmol/g protein, MPO 6.5±0.18 - 13.9±0.28 U/g protein, SOD 69.5±0.57 - 57.2±0.21 mmol/min/mg, GSH 9.8±0.33 - 4.9±0.31 nmol/g protein, DNA hasarı (8-OH Gua/Gua) 1.3±0.14- 2.3±0.15 pmol/L olarak bulunmuştur.

Histopatolojik bulgularda IR grubunda yoğun hemoraji, ödem ve vasküler konjesyon izlenmiştir (76).

Osmanağaoğlu ve arkadaşları Sprague Dawley cinsi 32 adet dişi sıçanda 2 saat iskemi-24 saat reperfüzyon hasarını deneysel olarak ovaryum dokusunda uyguladılar. Yazarlar deney öncesi ve sonrası hayvan ağırlıklarında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık kaydetmediler. Serum ve doku düzeyinde MDA değerleri kaydedilmiş, ovaryan dokularda histopatolojik inceleme yapılmıştır. Serum MDA (nmol/ml) ve doku MDA (nmol/ml.g) değerleri kontrol grubunda (1.24 ± 0.67 ve 111.62 ± 37.61) iken IR grubunda (1.18 ± 0.62 ve 112.91 ± 36.30) kaydedilmiştir (anlamlı bir artış, $p < 0.005$). TAS (mmol Trolox equivalent/g), TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/g) ve OSI (birimsiz) değerleri kontrol ve IR grubunda 0.92 ± 0.07 - 0.84 ± 0.40 ; 32.30 ± 0.51 - 41.42 ± 16.71 ve 3.52 ± 0.86 - 5.89 ± 3.49 olarak bulunmuştur ve gruplar arasındaki artış veya azalış istatistiksel olarak anlamlı kaydedilmiştir ($p < 0.05$). Foliküler dejenerasyon, vasküler konjesyon, hemoraji ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu açısından yapılan histopatolojik skorlamada kontrol grubuna göre IR grubunda ortalama değerler istatistiksel olarak daha yüksek çıkmıştır ($p < 0.001$) (101). Kalyoncu ve arkadaşlarının deneysel ovaryum iskemi reperfüzyon modelinde, 56 Wistar albino dişi sıçan kullanılmış, 3 saat iskemi uygulanmış ve 1 hafta ovaryum reperfüzyonu sağlanmıştır. Kontrol grubunda doku TAS (mmol Trolox equivalent/g), TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/g) ve OSI (birimsiz) değerleri sırasıyla 9.25 ± 2.05 , 80.96 ± 10.12 ve 0.91 ± 0.19 iken IR grubunda 9.41 ± 1.33 , 114.00 ± 27.17 , 1.21 ± 0.24 bulunmuştur. Kontrol grubunda serum TAS, TOS ve OSI değerleri 1.16 ± 0.13 , 5.25 ± 0.91 ve 0.46 ± 0.09 iken IR grubunda 1.08 ± 0.06 , 32.34 ± 16.40 , ve 2.99 ± 1.50 bulunmuştur. TOS ve OSI sonuçları IR grubunda yüksek kaydedilirken, TAS grubunda çok büyük farklılık izlenmemiştir. Yazarların yaptığı histopatolojik skorlamada kontrol grubuna göre tüm değerler IR grubunda yüksek çıkmıştır (kontrol grubu: hemoraji: 0.00 ± 0.00 , konjesyon: 1.00 ± 0.00 , dejenerasyon: 0.13 ± 0.35 , inflamasyon: 0.13 ± 0.35 , total folikül sayısı 29.0 ± 8.9 ; IR grubu: hemoraji: 1.88 ± 0.35 , konjesyon: 1.88 ± 0.64 , dejenerasyon: 2.38 ± 0.74 , inflamasyon: 2.75 ± 0.46 , total folikül sayısı 19.3 ± 4.7) (102).

3 saat/3 saat iskemi-reperfüzyon uygulanan bir ovaryum IR çalışmasında, 40 adet dişi Wistar Albino sıçanı kullanılmış, doku ve serum oksidatif stres belirteçleri

ve histopatoloji incelenmiştir. Doku MDA değeri tüm gruplarda birbirine yakın bir değer ölçülürken doku TOS ve OSI değerinin IR grubunda en yüksek olarak hesaplandı. Çalışmada serum oksidatif stres indikatörleri TAS, TOS ve OSI değerlerinin tüm gruplarda deney öncesi ve sonrası ölçümlerde istatistiksel olarak farklılık izlenmedi. Kontrol grubuna göre histopatolojik parametreler hemoraji, konjesyon, ödem ve inflamasyon istatistiksel olarak arttı. IRH'deki hücre ölümleri için Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) metodu kullanılmış ve kontrol grubu TUNEL pozitif hücre sayısı 21.8 ± 7.85 iken IR grubunda bu sayı 53.8 ± 17.13 olarak bulunmuştur (anlamli artış, $p=0.05$) (103). Pınar ve arkadaşları 40 adet Wistar albino sıçanlarında IRH'yi ve bu hasarın TAS, TOS, OSI ve histopatolojik etkilerini ovaryumda incelemişlerdir. Kontrol grubunda TAS (mmol Trolox equivalent/g), TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/g) ve OSI (birimsiz) değerlerini 1.28 ± 0.07 , 35.8 ± 4.06 ve 2.8 ± 0.3 iken IR grubunda ise 1.14 ± 0.04 , 89.5 ± 3.13 ve 7.87 ± 0.32 olarak ölçülmüştür. Yazarlar TOS ve OSI değerlerindeki değişimi istatistiksel olarak anlamlı bulurken ($p<0.001$), TAS değerinde kontrol ve IR grubu arasında anlamlılık bulmamışlardır. Kontrol grubuna göre, IR grubunda histopatolojik olarak ödem ($p=0.001$), vasküler konjesyon ($p=0.001$), hemoraji ($p<0.001$) ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu ($p<0.001$) istatistiksel olarak artmıştır (104). Kalyoncu ve arkadaşlarının 48 hayvan üzerindeki yaptıkları bilateral ovaryan IR çalışmasında, biyokimyasal parametrelerde doku ve serum düzeyinde TAS (mmol Trolox equivalent/g), TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/g) ve OSI (birimsiz) bakılırken histopatolojik skorlama için foliküler hücre dejenerasyonu, vasküler konjesyon, hemoraji, inflamasyon analiz edilmiş ve 0-3 (0: yok, 3: şiddetli) arası skorlama geliştirilmiştir. Doku düzeyinde kontrol grubunda TAS değeri: 8.04 ± 1.36 , TOS değeri: 83.59 ± 14.61 , OSI: 1.08 ± 0.34 iken bu değerler IR grubunda 8.43 ± 1.83 , 114.80 ± 27.07 , 1.41 ± 0.38 olarak kaydedilmiştir. Kontrol grubu serum TAS (mmol Trolox equivalent/L), TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L) ve OSI (birimsiz) değerleri 1.12 ± 0.13 , 10.37 ± 6.80 ve 0.96 ± 0.67 iken IR grubunda ise 1.04 ± 0.07 , 26.64 ± 10.12 ve 2.56 ± 1.01 olarak bulunmuştur (kontrol grubu ve IR grubu karşılaştırılmasında istatistiksel olarak TAS için anlamlı bir farklılık yok, TOS için $p=0.00023$ ve OSI için $p=0.00023$). Histopatolojik skorlamada kontrol grubunda, hemoraji: 0.00 ± 0.00 , konjesyon: 1.00 ± 0.00 , foliküler dejenerasyon: 0.13 ± 0.35 ve

inflamasyon: 0.13 ± 0.35 olarak skorlanırken bu değerler IR grubunda 1.88 ± 0.35 ($p=0.0001$), 1.88 ± 0.64 ($p=0.0002$), 2.38 ± 0.74 ($p=0.0005$), ve 2.75 ± 0.46 (0.0003) ve istatistiksel olarak daha yüksek bulundu (105). Benzer bir çalışmada 3 saat iskemi – 3 saat reperfüzyon bilateral ovaryan modelinde, doku düzeyinde sham grubunda TAS değeri 0.50 ± 0.09 mmol Trolox Eq/g protein, TOS değeri 7.01 ± 0.48 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eq/g protein ve OSI (birimsiz) değeri ise 1.44 ± 0.36 olarak bulunurken IR grubunda sırasıyla 0.35 ± 0.12 ($p<0.05$), 12.71 ± 3.95 ($p<0.001$) ve 3.90 ± 1.67 ($p<0.001$) olarak bulunmuştur. Kontrol grubuna göre ödem, hemoraji ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu IR grubunda oldukça belirgindi (kontrol grubunda: 0.50 ± 0.83 , 0.33 ± 0.51 , 0.83 ± 0.98 ve IR grubunda 2.83 ± 0.40 , 2.66 ± 0.51 , 2.80 ± 0.44 , $p<0.05$) (106). Başka bir ovaryum IRH çalışmasında, 48 adet Sprague Dawley cinsi dişi sıçan kullanılmış ve 3 saat/3 saat iskemi-reperfüzyon uygulanmıştır. Sham grubunda ortalama serum TAS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L), TOS (mmol Trolox equivalent/L) ve OSI değerleri sırasıyla 0.8 ± 0.15 , 16.51 ± 1.50 , 21.74 ± 3.99 olarak kaydedilirken IR grubunda 0.3 ± 0.1 , 31.55 ± 1.24 , 121.75 ± 32.40 olarak bulunmuştur. Sham ve IR grubu arasındaki TAS, TOS ve OSI değişimleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). Aynı çalışmada ovaryum histopatolojisi analiz edilmiş, interstisyel ödem, konjesyon, hemoraji ve kohezyon kaybı değerlendirilmiş ve 0-10 arası bir skora yapılmıştır (0: düşük - 10: yüksek patoloji). Total histopatolojik skor sham grubunda 0.6 ± 0.7 iken IR grubunda 8.4 ± 0.7 olarak kaydedilmiştir (107). Bir ovaryan IR çalışmasında, bazı sıçanlarda 2 saat iskemi/2 saat reperfüzyon yapılırken diğer sıçanlarda 4 saat iskemi/4 saat reperfüzyon uygulanmıştır. 2/2 ve 4/4 saat IR gruplarının TAS değerleri kontrol grubundaki sıçanlarla anlamlı bir farklılık göstermezken, TOS değerleri kontrol grubuna göre yüksek bulundu. 2/2 ve 4/4 saat IR grubunda, şiddetli interstisyel ödem, şiddetli vasküler konjesyon, şiddetli hemoraji ve akut mononükleer lökosit infiltrasyonu kaydedildi (108). Nayki ve arkadaşları deneysel IR ovaryum modelinde IR grubunda hemoraji, vasküler dilatasyon ve konjesyon, dejenere foliküller ve mononükleer lökosit, ödem varlığı tespit etmişlerdir (109).

Çalışmamızda, gruplardaki serum TAS ve TOS seviyeleri deney sonunda ölçülmüş ve OSI hesaplanmıştır. Bu veriler istatistiksel olarak da analiz edilmiştir (Tablo 2). TAS değerleri gruplarda sırasıyla sham: 2.66 ± 0.12 , KN: 2.57 ± 0.21 ,

IR:2.20±0.13, KN+IR:2.26±0.16, IR+KN:2.37±0.09 ve KN+IR+KN:2.34±0.11 µmol H₂O₂ Eq/L olarak ölçüldü. Gruplar arasında TAS değerlerinin paralel seyrettiği ancak en düşük seviyenin IR grubunda olduğu tespit edildi. KN ekstresi tedavisinin IRH uygulanan gruplarda TAS değerini IR grubuna göre arttırdığı ve sham ve KN grubuna yakın bir değere ulaştırdığı gözlemlendi (Tablo 5, Şekil 17). KN ekstresi IRH sonrası antioksidan seviyeyi arttırdı ancak istatistiksel olarak bir artış izlenmedi (Tablo 5). Gruplardaki TOS değerleri ise sırasıyla sham: 45.75±9.80, KN: 67.66±13.88, IR: 105.55±22.88, KN+IR: 83.04±15.12, IR+KN: 56.47±16.33 ve KN+IR+KN: 57.12±11.30 µmol Trolox Eq/L olarak ölçüldü (Tablo 2). Sham ve KN gruplarına göre TOS seviyesinde IR grubunda daha yüksek değerler kaydedildi ve bu artış anlamlı olarak hesaplandı (Tablo 6, Şekil 18). KN ekstresi tedavisinin IR sonrası oluşan yüksek TOS seviyesini sham ve KN gruplarındaki değere yakın istatistiksel olarak anlamlı bir seviyeye yaklaştırdığı izlendi. Gruplara göre OSI değerleri sham: 17.40±4.74, KN: 26.32±4.97, IR: 47.76±8.78, KN+IR: 36.52±5.46, IR+KN: 23.83±7.16 ve KN+IR+KN: 24.51±5.43 olarak hesaplandı (Tablo 2). TOS verilerine paralel olarak OSI verileri de benzer şekilde en yüksek IR grubunda hesaplandı (Yüksek OSI değeri, yüksek oksidasyon veya oksidatif stres potansiyeli demektir). Sham ve KN gruplarına göre IR grubunda anlamlı bir artış izlenirken, KN ekstresi tedavisi alan gruplarda IR grubuna göre anlamlı bir düşüş izlendi (Tablo 7, Şekil 19). TAS, TOS ve OSI verileri göz önüne alındığında KN ekstresi tedavisinin antioksidan seviyesini arttırdığı, oksidan seviyesini düşürdüğü kaydedildi. Çalışmamızın TAS, TOS ve OSI verilerinin literatür ile uyumlu olduğu gözlemlendi.

Çalışmamızda, biyokimyasal parametrelerden TAS, TOS ve OSI değerlerinin yanı sıra gruplarda histopatolojik inceleme de yapıldı. Sham grubu ovaryum kesitlerinde ovaryum histolojisinin düzenli olduğu, folikülogenezin devam ettiği (preantral, antral, Graafian folikülleri), korpus luteum oluşumu ve mezovaryumun normal yapıda olduğu izlendi (Şekil 21 – 23). KN grubu ovaryum kesitleri incelendiğinde sham grubuna benzer histolojik görünüm izlendi. KN grubunda folikülogenezin devam ettiği ve ovaryum histolojisi normal olarak izlendi (Şekil 24 – 26). IR grubunda, sham ve KN grubuna göre histopatolojinin arttığı gözlemlendi. Bu grupta dejeneratif foliküller, damarlarda dilatasyon ve konjesyon, mononükleer lökosit infiltrasyonunda artış, granüloza hücrelerinde ve ovaryumun stromasında

dejenerasyon gözlemlendi (Şekil 27 – 29). IRH öncesi KN ekstresi verilen KN+IR grubunda, IR grubundaki histopatolojinin devam ettiği ve KN etkisinin zayıf olduğu gözlemlendi. Dejeneratif foliküller, damarlarda dilatasyon ve konjesyon, ödem oluşumu, mononükleer lökosit infiltrasyonu, ovaryum stromasında dejenerasyon izlendi (Şekil 30 – 32). IRH sonrası verilen KN ekstresinin IR ve KN+IR gruplarına göre histopatolojik iyileşmeyi IR+KN grubunda arttırdığı kaydedildi. IR+KN grubunda folikülogenezin devam ettiği, damarlardaki dilatasyon ve konjesyonun ve ovaryum stromasındaki bağ doku dejenerasyonunun azaldığı görüldü. Ovaryan foliküllerle beraber teka hücre tabakası ve korpus luteum varlığı da izlendi (Şekil 33 – 35). IRH hem öncesi ve hem sonrası verilen KN ekstresinin histolojik yapısal bozuklukları etkili bir şekilde restore ettiği gözlemlendi. KN+IR+KN grubunda, normal folikülogenez süreci (primordiyal, preantral, antral foliküller) ve teka hücreleri, ovaryum stroması ve germinal epitelyum düzenli olarak izlendi (Şekil 36 – 38). KN ekstresinin özellikle IRH öncesi ve sonrasında verilmesinin ovaryum histopatolojisinin iyileştirmede daha etkili olduğu gözlemlendi. Çalışmamızdaki IRH sonrası oluşan histolojik değişimlerin literatürdeki histopatolojik bulgularla uyumlu olduğu gözlemlenmiştir.

Anti-Müllerian Hormon (AMH), diğer adıyla Müllerian inhibe edici madde (MIS), cinsiyete özgü kanalların farklılaşmasında rol alan bir peptit hormondur. Fetal dönemde testisteki Sertoli hücreleri tarafından üretilir ve dişi üreme sisteminde Müllerian kanallarının regrese olmasında rol alır. Doğum sonrası AMH dimorfik cinsiyet ekspresyon özelliğini kaybeder ve ovaryumda gelişen foliküllerin granüloza hücrelerinde eksprese edilir. AMH ekspresyonu primordiyal folikülün primer foliküle dönüşümü sırasında granüloza hücrelerinde üretilmeye başlar. Dimerik bir glikoprotein olan AMH proteinin konsantrasyonu en yüksek preantral (primer) foliküllerde ve özellikle antral foliküllerde görülür. Boyutları 5 mm'den büyük antral foliküller AMH üretme yeteneklerini kaybederler. Foliküllerin gelişiminin son evresinde AMH görevini folikül stimulan hormon (FSH)'a devreder ve atretik foliküllerde AMH ekspresyonu görülmez. Ovaryan rezerv, ovaryumun başarılı ve sağlıklı bir gebelik için folikül/oosit üretim kapasitesini ifade eder. AMH seviyesi, yaş ilerledikçe azalır ve ovaryumun yaşını da gösteren bir bilimsel kanıt olarak gösterilir. AMH seviyesi ovaryan rezervi ve fertilité açısından bir indikatör olarak

kabul edilmektedir. Ovaryum rezervi ve erken dönemdeki folikülleri göstermek için literatürde AMH seviyesi araştırılmış ve azalmış AMH seviyesi ve IRH hasarı arasında ilişki olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. (110, 111).

Musayeva ve arkadaşları pnömoperitoneum modeli ile oluşturdukları iskemi reperfüzyon modelinde ovaryum üzerindeki etkilerini ve serum AMH değerlerini incelemişlerdir. Yazarlar sham grubunda AMH seviyesini 2.09 ± 0.14 ng/mL ve IR grubunda 1.45 ± 0.21 ng/mL olarak ölçmüşlerdir ($p=0.035$) (112). Eser ve arkadaşları ovaryum iskemi reperfüzyon çalışmalarında, 2 saat iskemi-2 saat reperfüzyon ve 4 saat iskemi-4 saat reperfüzyon olmak üzere iki farklı grup oluşturup ve serum AMH değişimini incelemişlerdir. 2/2 saatlik sham grubunda 2.2 ± 1.7 ng/mL iken IR grubunda 1.9 ± 1.2 ng/mL (düşüş, $p=0.445$); 4/4 saatlik sham grubunda 2.9 ± 0.8 ng/mL iken IR grubunda 2.5 ± 0.2 ng/mL (anlamli düşüş, $p=0.001$) olarak bulunmuştur. Yazarlar IR süresinin AMH seviyesinde önemli olduğunu ifade etmişlerdir (113). Soyman ve arkadaşları 3 saat/3 saat IR çalışmasında, IRH ve serum AMH seviyesini araştırmışlardır. Sham grubunda serum AMH değeri 3.12 ± 0.58 ng/mL iken IR grubunda 1.70 ± 0.43 ng/mL olarak bulunmuş ve sham grubuna göre IR grubundaki AMH değerinin düşüşü istatistiksel olarak anlamli bulunmuştur ($p<0.005$) (114). Sakin ve arkadaşları bir ovaryum IRH çalışmasında, 28 adet Wistar albino cinsi dişi sıçan kullanılmış ve 3/3 saat iskemi-reperfüzyon uygulanmıştır. IRH sonucu sham grubunda AMH değeri 3.12 ± 0.58 ng/mL iken bu değer IR grubunda 1.70 ± 0.43 ng/mL olarak (anlamli azalış, $p<0.05$) (115). Aynı yazarlar yürüttükleri farklı bir ovaryum IR çalışmasında, sham grubunda AMH seviyesini 2.641 ± 0.95 ng/mL ve IR grubunda 1.372 ± 0.66 ng/mL olarak ölçmüşlerdir. IR grubundaki düşük AMH ortalama değeri istatistiksel olarak anlamli bulunmuştur ($p=0.004$) (116). Başka bir ovaryan IR modelinde serum AMH (ng/mL) hormon düzeyi bakılmış ve kontrol grubunda AMH düzeyi 7.54 ± 0.77 ng/ml iken IR grubunda 3.47 ± 0.54 ng/ml olarak ölçülmüş ve bu düşüş istatistiksel olarak anlamli bulunmuştur (95). Deneysel bir ovaryum IR modelinde, 30 dişi Wistar Albino cinsi sıçanda IR öncesi ve sonrası AMH seviyesi ölçülmüştür. Bilateral 3/3 saatlik IRH'de, sham grubunda AMH seviyesinde anlamli bir değişiklik izlenmezken ($p>0.05$), IR grubunda IR öncesi ve sonrası AMH seviyesinde istatistiksel olarak anlamli bir düşüş gözlemlendi ($p<0.05$) (117). Wistar Hannover cinsi 24 adet dişi sıçanda yapılan ovaryum

IRH'de serum AMH değişimi IR öncesi ve sonrası incelenmiştir. IR öncesi ve sonrasında sham grubunda sırasıyla 4.34 ± 1.43 ve 3.22 ± 1.39 ng/mL iken IR grubunda 5.87 ± 1.02 ve 1.78 ± 1.82 ng/mL olarak ölçüldü. IR öncesi ve sonrası AMH ortalama değişimleri IR grubunda anlamlı olarak düşük kaydedildi ($p=0.0001$). IR sonrası sham ve IR grubu arasındaki AMH değişimi anlamlı farklılık gözlemlendi ($p=0.037$) (118). Bir çalışmada ovaryum IR öncesi ve sonrasında serum AMH seviyesindeki değişimler ölçülmüş. IR öncesi ve sonrası değişim farkı sham grubuna göre IR grubunda anlamlı bir şekilde yüksek kaydedildi de sham grubuna göre düşük seviyede kaydedildi ($p<0.05$) (99). Deneysel bir ovaryum IR modelinde, serum AMH seviyesi IR öncesi ve sonrası ölçülmüştür. Bulgularda, kontrol grubunda deney öncesi ve sonrası ortalama fark $+0.02\pm0.49$ artış iken IR grubunda opereasyon öncesi ve sonrasında -4.85 ± 0.76 olarak anlamlı bir düşüş kaydedildi ($p<0.001$) (96).

Çalışmamızda AMH hormonu serum düzeyinde deney bitiminde ölçülmüştür. AMH seviyesinin gruplardaki dağılımı sham: 4.15 ± 0.68 , KN: 3.83 ± 0.74 , IR: 1.63 ± 0.48 , KN+IR: 1.85 ± 0.68 , IR+KN: 2.31 ± 0.75 , KN+IR+KN: 3.28 ± 0.98 ng/mL olarak ölçüldü (Tablo 2). IR sonrası AMH seviyesinde sham ve KN gruplarına göre anlamlı bir düşüş gözlemlendi (sırasıyla, $p=0.001$ ve $p=0.001$). KN ekstresinin IR öncesi veya sonrasında verilmesi AMH seviyesini arttırdı ancak anlamlı bir artış gözlemlenmedi (sırasıyla, $p=0.991$ ve $p=0.451$). KN ekstresinin IR öncesi ve sonrası tedavi olarak verilmesi AMH seviyesini arttırarak ovaryan rezervi normal seviyesine yakın bir düzeye getirmiştir (Tablo 8, Şekil 20). Çalışmamızdaki IRH sonrası AMH seviyesindeki değişimlerin literatürdeki IRH sonrası ölçülen AMH düzeyleri ile uyumlu olduğu gözlemlendi.

Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1, kısaca APAF-1, *Caenorhabditis elegans* organizmasındaki CED-4 genin insan homologudur. APAF-1 geni 12. kromozomun uzun kolunun 2. bölgesinin 3. bandının 1. alt bandında yer alır. Moleküler ağırlığı 133.3-141.8 kDa aralığında olup Y şeklinde bir proteindir. APAF-1 molekülü, N-terminal kaspaz recruitment domain, merkezi nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon domain (NOD) ve WD40 domainin (WRD) 12-13 tekrarından oluşur. Bu gen apoptoziste rol alan sitoplazmik bir proteini kodlamaktadır (10). APAF-1 proteini 6 heliksten oluşan Greek anahtar motifine sahip bir proteindir. Apoptozis intrinsik (mitokondriyal) ve ekstrinsik (ölüm reseptörlerine bağlı) olmak üzere iki farklı sinyal

yolağı üzerinden gerçekleşir. İntrinsik sinyal yolağında, iskemi reperfüzyon sonucu hücre içi oluşan oksidatif stres, endoplazmik retikulum stresi, DNA hasarı gibi hücresel olaylar mitokondriyal dış membran geçirgenliğini etkiler ve proapoptotik moleküllerin salınmasına neden olur. Bu moleküllerden sitozolik APAF-1, sitokrom c ve prokaspaz 9 birleşerek apoptozom denilen oligomer yapıyı oluşturur. Bu etkileşim kaspaz-9'un proteolitik yıkımına ve efektör kaspaz-3'ün aktivasyonuna neden olarak apoptozisi başlangıcını indükler. Mitokondriyal membranın porlarındaki regülasyonun değişmesi, APAF-1 ve sitokrom c gibi proapoptotik faktörlerin mitokondriden sitozole salınmasına izin verir, burada kaspazları aktive eder ve sonunda apoptotik hücre ölümüne neden olur (119, 120). Literatürde IRH'ye bağlı olarak APAF-1 ekspresyonunun arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur.

Lina ve arkadaşları in vitro olarak sıçan embriyonik-kalp kökenli H9C2 hücrelerinde iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturmuşlardır. Yazarlar IRH'nin inflamatuvar yanıtı neden olduğunu, miyokardiyal IRH'de kalp hücre otofaji ve apoptozun düzenlenmesinde APAF-1/Caspase9 sinyal yolağının etkili olduğu belirtilmiştir. Deney sonucunda APAF-1 inhibitörünün kardiyomiyosit apoptozunu yavaşlattığı, inflamasyonu azalttığı ve hücre yaşamını desteklediği bildirilmiştir. Yazarlar ayrıca iskemi/reperfüzyonun neden olduğu inflamasyonu ve apoptozun, APAF-1/Kaspaz 9 sinyal yolu aracılığıyla düzenlenebileceğini ifade etmişlerdir (121).

Benzer bir miyokardiyal iskemi reperfüzyon çalışmasında, embriyonik-kalp kökenli H9C2 hücrelerinde ZYZ-488 bileşiğinin (APAF-1 inhibitörü) APAF-1 proteini ile ilişkisi araştırılmıştır. Çalışmada ZYZ-488 bileşiğinin in vitro hücre kültüründe APAF-1'e bağlanarak kaspaz-9'un çağrılmasını engellediği ve miyokardiyal IRH'de indüklenen apoptozisi engellediği bildirilmiştir. Ayrıca, APAF-1 yolağının inhibe edilmesinin apoptozu belirgin bir şekilde azalttığı belirtilmiştir (122). Zou ve arkadaşları 40 dakika iskemi ve 2 saat reperfüzyon işlemini koroner arter ligasyonu metoduyla farelerde uygulamışlardır. Yazarlar kardiyak IRH'nin kardiyomiyositlerde apoptozise neden olduğunu Tunel assay metodu ile kaydetmişlerdir. Yazarlar IR uygulanan farelerin kardiyak dokularında Apaf-1-sitokrom c kompleksinin arttığını, apoptotik hücre sayısı ve fragmente DNA sayısının arttığını kaydetmişlerdir (123). Kit ve arkadaşları 42 erkek sıçanda

unilateral (sol) renal iskemi-reperfüzyon hasarında, sıçanların böbrek dokularında apoptozisin regülasyonunda yer alan transkripsiyonel değişimleri IRH'nin 1., 3. ve 48. saatinde incelemişlerdir. Sham grubuna göre, IR grubunda iskemi-reperfüzyon işleminden 3 saat sonra, proapoptotik APAF-1 ekspresyonu 11.2 kat artmıştır ($p<0.005$). Aynı grubun IR yapılmayan böbrek dokusunda ise IRH'den 1 saat sonra anlamlı bir şekilde APAF-1 ekspresyonu 7.7 kat artmıştır ($p<0.0005$). Sham grubuna göre, dokulara kan akışının başlamasından 48 saat sonra APAF-1 genindeki değişim IR yapılan böbrekte 12.7 kat ($p<0.0005$) ve IR yapılmayan böbrekte ise 9.3 kat ($p<0.005$) artmıştır. Yazarlar APAF-1 genindeki değişimin çok fazla olduğunu ve bunu apoptozun uyarılması ile beraber intrinsik ve ekstrinsik faktörlerin mitokondriyal membrandaki hasar ile yada membrandaki porların açılması sonucu salınımı ile açıklamışlardır (124).

Bektaş ve arkadaşları 40 adet Wistar albino sıçanları üzerinde yaptıkları karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarında 1.5 saat iskemi ve 2 saat reperfüzyon işlemi uygulayıp karaciğer dokusunda APAF-1 ekspresyonunu 0: yok – 3: yüksek olarak skorlamışlardır. Yazarlar APAF-1 immün aktivite yoğunluğunu sham grubunda 0.6 ± 0.51 olarak saptarken hepatik IR grubunda 2.4 ± 0.51 olarak kaydetmişlerdir. Yazarlar bu durumu IR hasarında reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin üretiminin arttığını, bunun da mitokondride ATP üretimini bozduğunu belirtmişlerdir. Böylece hücre içinde ve organellerde iyonik dengenin bozulmasıyla mitokondriyal membranın hasara uğradığı ve apoptotik hücre ölümünü tetiklediğini ifade etmişlerdir (125). Arab ve arkadaşları yaptıkları çalışmada karaciğerde 60 dakika iskemi ve 2 saatlik reperfüzyon işleminde apoptotik marker olarak APAF-1 ekspresyonunu reperfüzyon işleminin 5., 10., 30., 45., 60. ve 120. dakikasında incelemişlerdir. Yazarlar reperfüzyondan sonraki 5-10. dakikadan itibaren APAF-1 ekspresyonun arttığını ve reperfüzyon başlar başlamaz apoptozisin indüklendiğini ve 30-60 dakika arasında apoptotik cisimciklerin belirmeye başladığını ve reperfüzyon süresi uzadıkça cisimcik sayısında artış meydana geldiğini kaydetmişlerdir (126). Bir serebral iskemi reperfüzyon çalışmasında, farelerde serebral arter oklüzyonu ile 60 dakika iskemi sonrası 24 saatlik reperfüzyon işlemi uygulanmıştır. Apoptotik indeks için TUNEL metodu ve doku apoptozisi için APAF-1 antikoru çalışıldı. TUNEL assay sonuçlarına göre IRH'nin pozitif hücre sayısını arttırdığını ve western blot

tekniki ile APAF-1 ekspresyonunun arttığı kaydedildi (127). Baş ve arkadaşları 1 saat iskemi ve 2 saat reperfüzyon sonrası ovaryan IRH'nin APAF-1 ekspresyonu üzerindeki immunohistokimyasal olarak incelemişlerdir. Yazarlar kontrol grubunda APAF-1 ekspresyonunun zayıf olduğunu ve IR grubunda ise güçlü bir APAF-1 immün aktivite ve birçok apoptotik hücre kaydetmişlerdir (94). Klinik bir çalışmada, 40 sağlıklı ve 45 pulmoner embolizm (akciğer iskemi-reperfüzyon) geçiren hastalarında apoptosiz markerlarından APAF-1 seviyesi incelenmiştir. Akciğer iskemi reperfüzyonun hücre ölümüne neden olduğu ve apoptotik yolağı aktive ettiği öne sürülmüştür. Kan örneklerinden yapılan ölçümlere göre APAF-1 ortalaması sağlıklı bireylerde 0.12 ± 0.01 ng/mL iken hasta grubunda 0.14 ± 0.02 ng/mL olarak ölçülmüş ve sağlıklı bireylere göre hasta grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.001$). Akciğer IR geçiren ancak yaşamını devam ettiren hastalarda APAF-1 ortalaması 0.13 ± 0.02 ng/mL bulunurken ölen hastalarda bu oran 0.16 ± 0.02 ng/mL olarak tespit edilmiştir ($p= 0.006$). Çalışma sonucunda APAF-1 ve mortalite oranları arasında bir ilişki olduğu ve pulmoner IRH'de hücre ölümünün arttığı raporlanmıştır (128).

Çalışmamızda gruplardaki APAF-1 protein immün aktivitesi değerlendirilmiştir. Sham grubu ovaryum kesitlerinde APAF-1 immün reaksiyonu ovaryumun stromasındaki birkaç hücre sitoplazmasında pozitif olarak gözlenirken diğer yapılarda negatif APAF-1 immün reaksiyonu olduğu gözlemlendi (Şekil 39). KN grubu ovaryum kesitlerinde APAF-1 ekspresyonu sham grubuna benzer bir düzey gösterdi. Ovaryum stromasında birkaç hücrede pozitif APAF-1 ekspresyonu kaydedilirken diğer yapılarda APAF-1 ekspresyonu negatifti (Şekil 40). IRH sonrası IR grubunda sham ve KN gruplarına göre APAF-1 ekspresyonunda artış izlendi. Bu grupta ovaryum foliküllerinde, granüloza ve teka hücrelerinde, damarlarda, korpus luteum ve ovaryumun stromal bağ doku hücrelerinde APAF-1 immün aktivitesi oldukça yoğun gözlemlendi (Şekil 41). KN ekstresi IRH öncesi verilen KN+IR grubu ovaryum kesitlerinde IR grubuna benzer bir yoğunlukta APAF-1 immün reaksiyonu izlendi. KN+IR grubu ovaryum kesitlerinde APAF-1 ekspresyonu foliküllerde, teka hücrelerinde, germinal epitel tabakasında ve stromal bağ doku hücrelerinde yoğun olarak pozitif izlendi (Şekil 42). IRH sonrası verilen KN ekstresinin IR+KN grubunda IR ve KN+IR grubuna göre APAF-1 ekspresyonunu azalttığı gözlemlendi.

APAF-1 immün reaksiyonu genel olarak foliküllerde negatif iken ovaryum stromasında yer yer pozitif olarak izlendi ( ekil 43). IR+KN grubunda APAF-1 reaksiyonu, IR ve KN+IR gruplarına göre azaldı. KN+IR+KN grubu ovaryum kesitlerinde ise APAF-1 immün aktivitesi sham ve KN grubundaki APAF-1 immün aktivitesine benzer bir yoğunlukta kaydedildi. Bu grupta ovaryum dokusunda APAF-1 ekspresyonu negatif olarak izlenirken sadece ovaryum stromasında hafif düzeyde APAF-1 ekspresyonu izlendi ( ekil 44). KN ekstresi tedavisinin özellikle IRH sonrası APAF-1 ekspresyonunu baskıladığı izlendi. Ancak IRH  ncesi ve sonrası verilen KN ekstresi tedavisinin en etkili yöntem olduğu saptandı (Tablo 9,  ekil 47).

Western Blot tekniği kullanılarak gruplardaki APAF-1 protein yoğunluğu analiz edildi ve internal kontrol olarak  -Actin kullanıldı ( ekil 48). Western Blot sonuçları da immünohistokimya sonuçlarına paralel bir görüntü oluşturdu. Sham ve KN grubunda IR grubuna göre bant yoğunluğu daha az izlenirken IR ve KN+IR gruplarında bant yoğunluğu daha kalın olarak kaydedildi. Böylece IR sonucu IR ve KN+IR gruplarında APAF-1 protein seviyesinin arttığı gözlendi. IRH sonrası IR+KN ve KN+IR+KN gruplarında IR ve KN+IR gruplarında göre bant yoğunluğunun azaldığı, KN tedavisinin özellikle IRH sonrası etkili olarak APAF-1 protein seviyesini azalttığı kaydedildi ( ekil 48).

7. SONUÇ

Çalışmamızda iskemi-reperfüzyon hasarı (IRH) öncesi ve sonrasında uygulanan Kudret Narı (KN) ekstresinin ovaryum üzerinde terapötik etkisinin olup olmadığı araştırılmış ve bununla ilgili olarak biyokimyasal, histopatolojik, immünohistokimyasal yöntemlere ek olarak western blot uygulaması yapılmıştır. Biyokimyasal, histopatolojik, immünohistokimyasal ve Western blot yöntemleri ile yapılan incelemede KN'nin antioksidan özelliğinin korumaya yönelik olduğu, ancak inflamasyonu önleme açısından etkinliğinin daha fazla olduğu ortaya çıkmıştır.

KN ekstresi tedavisinin mononükleer hücre infiltrasyonunu ve hücre dejenerasyonunu azalttığı, IRH sonrası KN ekstresi verilen gruplarda KN'nin inflamasyonu ve dejenerasyonu azaltmada daha etkili olduğu görülmüştür.

Ayrıca KN ekstresinin pro-apoptotik APAF-1 ekspresyonunu baskıladığı ve böylece apoptozisi engelleyerek hücre yaşamını desteklediği kanıtlanmıştır. Sonuç olarak, KN'nin IRH sonrası ovaryumda meydana gelen inflamasyonu önlemede indükleyici rol oynarak doku hasarını apoptotik sürece ilerlemeden azaltarak doku bütünlüğünü korumada terapötik bir ajan olarak kullanılabileceği düşünülmüştür.

8. KAYNAKÇA

1. Mills SE. Histology for pathologists. 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2012, p: 1119-1148.
2. Kierszenbaum AL. Histology and cell biology : an introduction to pathology. 4th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2012, p: 665-692.
3. Mescher AL. Junqueira's basic histology : text and atlas. 14th ed. United States: McGraw-Hill Education 2013, p: 460-474.
4. Ross MH, Wojciech P. Histology : A Text And Atlas : With Correlated Cell And Molecular Biology. 7th ed; 2011, p: 834-898.
5. Joseph B, Jini D. Antidiabetic effects of *Momordica charantia* (bitter melon) and its medicinal potency. *Asian Pac J Trop Dis*. 2013; 3(2): 93-102.
6. Jia S, Shen M, Zhang F, Xie J. Recent Advances in *Momordica charantia*: Functional Components and Biological Activities. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(12): 2555.
7. Lucas E, Dumancas G, Smith B, Clarke S, Arjmandi B. Health Benefits of Bitter Melon (*Momordica charantia*). *Bioactive Foods in Promoting Health*. 2010: 525-549.
8. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull*. 2004; 70: 71-86.
9. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology*. 2001; 94(6): 1133-8.
10. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*. 2000; 190(3): 255-66.
11. Moore K, Persaud V, Torchia M. The Developing Human. Clinically Oriented Embryology. 10th ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2013, p: 260-282.
12. Sadler TW. Langman's medical embryology. 13th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2015, p: 250-277.
13. Ovalle WK, Nahirney P. Netter's Essential Histology. 2nd ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2013, p: 403-430.

14. Netter FH. Atlas of human anatomy. 6th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2014, p: 331-399.
15. Oktem O, Oktay K. The ovary: anatomy and function throughout human life. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1127: 1-9.
16. Richards JS, Pangas SA. The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Invest.* 2010; 120(4): 963-972.
17. Silva EG, et al. Histology of the normal ovary in premenopausal patients. *Ann Diagn Pathol.* 2020; 46: 151475.
18. Clement PB. Histology of the ovary. *Am J Surg Pathol.* 1987; 11(4): 277-303.
19. Young B. Wheater's functional histology : a text and colour atlas. 6th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone/Elsevier; 2014, p: 351-383.
20. Monget P, et al. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol.* 2002; 23(1-2): 139-54.
21. Beckhauser TF, Francis-Oliveira J, De Pasquale R. Reactive Oxygen Species: Physiological and Physiopathological Effects on Synaptic Plasticity. *J Exp Neurosci.* 2016; 10(Suppl 1): 23-48.
22. Gershon E, Dekel N. Newly Identified Regulators of Ovarian Folliculogenesis and Ovulation. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(12): 4565.
23. Young JM, McNeilly AS. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction.* 2010; 140(4): 489-504.
24. Stocco C, Telleria C, Gibori G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr Rev.* 2007; 28(1): 117-49.
25. Oliver R, Pillarisetty LS. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Ovary Corpus Luteum. [Erişim tarihi: 8 Mart 2022]; Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539704/>.
26. He HL, Lee YE, Chang CC. Hilus cell heterotopia accompanying bilateral ovarian serous cystadenomas: a case report and review of the literature. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014; 7(3): 1246-9.
27. Wenzel JG, Odend'hal S. The mammalian rete ovarii: a literature review. *Cornell Vet.* 1985; 75(3): 411-25.

28. Polito L, Bortolotti M, Maiello S, Battelli MG, Bolognesi A. Plants Producing Ribosome-Inactivating Proteins in Traditional Medicine. *Molecules*. 2016; 21(11): 1560.
29. Grover JK, Yadav SP. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *J Ethnopharmacol*. 2004; 93(1): 123-32.
30. Yadav BS, Yadav R, Yadav RB, Garg M. Antioxidant activity of various extracts of selected gourd vegetables. *J Food Sci Technol*. 2016; 53(4): 1823-33.
31. Scartezzini P, Speroni E. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. *J Ethnopharmacol*. 2000; 71(1-2): 23-43.
32. Gürdal B, Kültür S. An ethnobotanical study of medicinal plants in Marmaris (Muğla, Turkey). *J Ethnopharmacol*. 2013; 146(1): 113-26.
33. Basch E, Gabardi S, Ulbricht C. Bitter melon (*Momordica charantia*): a review of efficacy and safety. *Am J Health Syst Pharm*. 2003; 60(4): 356-9.
34. Nyam KL, Tan CP, Lai OM, Long K, Che Man YB. Physicochemical properties and bioactive compounds of selected seed oils. *Food Sci. Technol*. 2009; 42(8): 1396-1403.
35. Kar A, Choudhary BK, Bandyopadhyay NG. Comparative evaluation of hypoglycaemic activity of some Indian medicinal plants in alloxan diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 2003; 84(1): 105-8.
36. Rathi SS, Grover JK, Vats V. The effect of *Momordica charantia* and *Mucuna pruriens* in experimental diabetes and their effect on key metabolic enzymes involved in carbohydrate metabolism. *Phytother Res*. 2002; 16(3): 236-43.
37. Leatherdale BA, Panesar RK, Singh G, Atkins TW, Bailey CJ, Bignell AH. Improvement in glucose tolerance due to *Momordica charantia* (karela). *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1981; 282(6279): 1823-4.
38. Ahmad N, Hassan MR, Halder H, Bennoor KS. Effect of *Momordica charantia* (Karolla) extracts on fasting and postprandial serum glucose levels in NIDDM patients. *Bangladesh Med Res Counc Bull*. 1999; 25(1): 11-3.
39. Welihinda J, Karunanayake EH, Sheriff MH, Jayasinghe KS. Effect of *Momordica charantia* on the glucose tolerance in maturity onset diabetes. *J Ethnopharmacol*. 1986; 17(3): 277-82.

40. Baldwa VS, Bhandari CM, Pangaria A, Goyal RK. Clinical trial in patients with diabetes mellitus of an insulin-like compound obtained from plant source. *Ups J Med Sci.* 1977; 82(1): 39-41.
41. Khanna P, Jain SC, Panagariya A, Dixit VP. Hypoglycemic activity of polypeptide-p from a plant source. *J Nat Prod.* 1981; 44(6): 648-55.
42. Chao CY, Sung PJ, Wang WH, Kuo YH. Anti-inflammatory effect of *Momordica charantia* in sepsis mice. *Molecules.* 2014; 19(8): 12777-88.
43. Kobori M, et al. Bitter gourd suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses. *J Agric Food Chem.* 2008; 56(11): 4004-11.
44. Nerurkar PV, et al. *Momordica charantia* (bitter melon) attenuates high-fat diet-associated oxidative stress and neuroinflammation. *J Neuroinflammation.* 2011; 8: 64.
45. Cheng HL, Kuo CY, Liao YW, Lin CC. EMCD, a hypoglycemic triterpene isolated from *Momordica charantia* wild variant, attenuates TNF- α -induced inflammation in FL83B cells in an AMP-activated protein kinase-independent manner. *Eur J Pharmacol.* 2012; 689(1-3): 241-8.
46. Bai J, Zhu Y, Dong Y. Obese rats supplemented with bitter melon display marked shifts in the expression of genes controlling inflammatory response and lipid metabolism by RNA-Seq analysis of colonic mucosa. *Genes Genomics.* 2018; 40(6): 561-567.
47. Sung HC, et al. The effects of wild bitter gourd fruit extracts on ICAM-1 expression in pulmonary epithelial cells of C57BL/6J mice and microRNA-221/222 knockout mice: Involvement of the miR-221/-222/PI3K/AKT/NF- κ B pathway. *Phytomedicine.* 2018; 42: 90-99.
48. Kim KB, Lee S, Kang I, Kim JH. *Momordica charantia* Ethanol Extract Attenuates H₂O₂-Induced Cell Death by Its Antioxidant and Anti-Apoptotic Properties in Human Neuroblastoma SK-N-MC Cells. *Nutrients.* 2018; 10(10): 1368.
49. Liu C-H, Yen M-H, Tsang S-F, Gan K-H, Hsu H-Y, Lin C-N. Antioxidant triterpenoids from the stems of *Momordica charantia*. *Food Chem.* 2010; 118(3): 751-756.

50. Huang WC, et al. Inhibitory effects of wild bitter melon leaf extract on *Propionibacterium acnes*-induced skin inflammation in mice and cytokine production in vitro. *Food Funct.* 2015; 6(8): 2550-60.
51. Tsai TH, et al. Wild Bitter Melon Leaf Extract Inhibits *Porphyromonas gingivalis*-Induced Inflammation: Identification of Active Compounds through Bioassay-Guided Isolation. *Molecules.* 2016; 21(4): 454.
52. Soo May L, Sanip Z, Ahmed Shokri A, Abdul Kadir A, Md Lazin MR. The effects of *Momordica charantia* (bitter melon) supplementation in patients with primary knee osteoarthritis: A single-blinded, randomized controlled trial. *Complement Ther Clin Pract.* 2018; 32: 181-186.
53. Bortolotti M, Mercatelli D, Polito L. *Momordica charantia*, a Nutraceutical Approach for Inflammatory Related Diseases. *Front Pharmacol.* 2019; 10: 486.
54. Yue J, et al. Cucurbitane triterpenoids from the fruit of *Momordica charantia* L. and their anti-hepatic fibrosis and anti-hepatoma activities. *Phytochemistry.* 2019; 157: 21-27.
55. Köhler I, et al. In vitro antiparasmodial investigation of medicinal plants from El Salvador. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2002; 57(3-4): 277-81.
56. Lee DK, et al. Momordins inhibit both AP-1 function and cell proliferation. *Anticancer Res.* 1998; 18(1a): 119-24.
57. Takemoto DJ, Dunford C, Vaughn D, Kramer KJ, Smith A, Powell RG. Guanylate cyclase activity in human leukemic and normal lymphocytes. Enzyme inhibition and cytotoxicity of plant extracts. *Enzyme.* 1982; 27(3): 179-88.
58. Khan MR, Omoloso AD. *Momordica charantia* and *Allium sativum* : Broad Spectrum Antibacterial Activity. *Korean J Pharmacogn.* 1998; 29(3): 155-158.
59. Omoregbe RE, Ikuebe OM, Ihimire IG. Antimicrobial activity of some medicinal plants extracts on *Escherichia coli*, *Salmonella paratyphi* and *Shigella dysenteriae*. *Afr J Med Med Sci.* 1996; 25(4): 373-5.

60. Frame AD, Ríos-Olivares E, De Jesús L, Ortiz D, Pagán J, Méndez S. Plants from Puerto Rico with anti-*Mycobacterium tuberculosis* properties. *P R Health Sci J*. 1998; 17(3): 243-52.
61. Lee-Huang S, Huang PL, Huang PL, Bourinbaier AS, Chen HC, Kung HF. Inhibition of the integrase of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 by anti-HIV plant proteins MAP30 and GAP31. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(19): 8818-22.
62. Cunnick JE, Sakamoto K, Chapes SK, Fortner GW, Takemoto DJ. Induction of tumor cytotoxic immune cells using a protein from the bitter melon (*Momordica charantia*). *Cell Immunol*. 1990; 126(2): 278-89.
63. Pongthanapisith V, Ikuta K, Puthavathana P, Leelamanit W. Antiviral Protein of *Momordica charantia* L. Inhibits Different Subtypes of Influenza A. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013; 2013: 729081.
64. Law LK, Tam PP, Yeung HW. Effects of alpha-trichosanthin and alpha-momorcharin on the development of peri-implantation mouse embryos. *J Reprod Fertil*. 1983; 69(2): 597-604.
65. Ng TB, Tam PP, Hon WK, Choi HL, Yeung HW. Effects of momorcharins on ovarian response to gonadotropin-induced superovulation in mice. *Int J Fertil*. 1988; 33(2): 123-8.
66. Schreiber CA, Wan L, Sun Y, Lu L, Krey LC, Lee-Huang S. The antiviral agents, MAP30 and GAP31, are not toxic to human spermatozoa and may be useful in preventing the sexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. *Fertil Steril*. 1999; 72(4): 686-90.
67. Matsuda H, Li Y, Yoshikawa M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by momordin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. *Life Sci*. 1999; 65(2): P127-32.
68. Platel K, Shurpalekar KS, Srinivasan K. Influence of bitter gourd (*Momordica charantia*) on growth and blood constituents in albino rats. *Nahrung*. 1993; 37(2): 156-60.
69. Raman A, Lau C. Anti-diabetic properties and phytochemistry of *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae). *Phytomedicine*. 1996; 2(4): 349-62.

70. Mardani S, Nasri H, Hajian S, Ahmadi A, Kazemi R, Rafieian-Kopaei M. Impact of *Momordica charantia* extract on kidney function and structure in mice. *J Nephropathol*. 2014; 3(1): 35-40.
71. Tasoulis MK, Douzinas EE. Hypoxemic reperfusion of ischemic states: an alternative approach for the attenuation of oxidative stress mediated reperfusion injury. *J Biomed Sci*. 2016; 23: 7.
72. Allen DG, Xiao XH. Activity of the Na⁺/H⁺ exchanger contributes to cardiac damage following ischaemia and reperfusion. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000; 27(9): 727-33.
73. Gourdin M, Dubois P. Impact of Ischemia on Cellular Metabolism. in Aronow W. Ed. *Artery Bypass*. Belgium: InTech; 2013, p: 3-17.
74. Nishino T, Okamoto K, Eger BT, Pai EF, Nishino T. Mammalian xanthine oxidoreductase – mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *FEBS J*. 2008; 275(13): 3278-3289.
75. Weidinger A, Kozlov AV. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules*. 2015; 5(2): 472-84.
76. Behrooz-Lak T, Ebrahimpour M, Zarei L, Pourjabali M, Farhad N, Mohaddesi H. Systemic administration of curcumin nanoparticles protects ischemia-reperfusion injury in ovaries: An animal model study. *Rev Assoc Med Bras*. 2018; 64(1): 22-31.
77. Adams L, Franco MC, Estevez AG. Reactive nitrogen species in cellular signaling. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2015; 240(6): 711-7.
78. Patel RP, et al. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1411(2-3): 385-400.
79. Martínez MC, Andriantsitohaina R. Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2009; 11(3): 669-702.
80. Kloner RA, King KS, Harrington MG. No-reflow phenomenon in the heart and brain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018; 315(3): H550-h562.
81. Gottlieb RA. Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2011; 16(3-4): 233-8.

82. Lopez-Neblina F, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH. Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion. *J Invest Surg.* 2005; 18(6): 335-50.
83. Venardos KM, Perkins A, Headrick J, Kaye DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury, antioxidant enzyme systems, and selenium: a review. *Curr Med Chem.* 2007; 14(14): 1539-49.
84. Jia J-y, et al. Flavonoids in myocardial ischemia-reperfusion injury: Therapeutic effects and mechanisms. *Chin Herb Med.* 2021; 13(1): 49-63.
85. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2012; 298: 229-317.
86. Volotovska N, Kashchak TV. Antioxidant Enzymes Activity in Experimental Ischemia-Reperfusion Injury. *Int J Med Med Sci Res.* 2019; 5(1): 84-90.
87. Altaany Z, Alkaraki A, Abu-siniyeh A, Al Momani W, Taani O. Evaluation of antioxidant status and oxidative stress markers in thermal sulfurous springs residents. *Heliyon.* 2019; 5(11): e02885.
88. Cregger M, Berger AJ, Rimm DL. Immunohistochemistry and quantitative analysis of protein expression. *Arch Pathol Lab Med.* 2006; 130(7): 1026-30.
89. Crowe AR, Yue W. Semi-quantitative Determination of Protein Expression using Immunohistochemistry Staining and Analysis: An Integrated Protocol. *Bio Protoc.* 2019; 9(24).
90. Cass DL. Ovarian torsion. *Semin Pediatr Surg.* 2005; 14(2): 86-92.
91. Huang C, Hong MK, Ding DC. A review of ovary torsion. *Tzu Chi Med J.* 2017; 29(3): 143-147.
92. Huchon C, Fauconnier A. Adnexal torsion: a literature review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010; 150(1): 8-12.
93. Hortu I, Ilgen O, Sahin C, Akdemir A, Yigitturk G, Erbas O. Losartan ameliorates ovarian ischaemia/reperfusion injury in rats: an experimental study. *J Obstet Gynaecol.* 2020; 40(8): 1148-1154.
94. Bas H, Kara O, Kara M, Pandir D. Protective effect of vardenafil on ischemia–reperfusion injury in rat ovary. *Turk J Med Sci.* 2013; 43: 684-689.
95. Melekoglu R, Ciftci O, Eraslan S, Alan S, Basak N. The Protective Effects of Glycyrrhetic Acid and Chrysin against Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Ovaries. *Biomed Res Int.* 2018; 2018(1): 1-7.

96. Eken MK, et al. Etanercept protects ovarian reserve against ischemia/reperfusion injury in a rat model. *Arch Med Sci.* 2019; 15(4): 1104-1112.
97. Şahin Ç, et al. Tadalafil attenuates ischemic damage as well as reperfusion injury in the rat ovary. *J Turk Ger Gynecol Assoc.* 2020; 21(1): 35-40.
98. Kurt RK, et al. Protective effect of colchicine on ovarian ischemia-reperfusion injury: an experimental study. *Reprod Sci.* 2015; 22(5): 545-50.
99. Demir Çaltekin M, et al. The protective effect of JZL184 on ovarian ischemia reperfusion injury and ovarian reserve in rats. *J Obstet Gynaecol Res.* 2021; 47(8): 2692-2704.
100. Colak S, Gurlek B, Topcu A, Tumkaya L, Mercantepe T, Yilmaz A. Protective effects of nebivolol on ovarian ischemia-reperfusion injury in rat. *J Obstet Gynaecol Res.* 2020; 46(11): 2407-2416.
101. Osmanağaoğlu MA, Kesim M, Yuluğ E, Menteşe A, Karahan SC. Ovarian-protective effects of clotrimazole on ovarian ischemia/reperfusion injury in a rat ovarian-torsion model. *Gynecol Obstet Invest.* 2012; 74(2): 125-30.
102. Kalyoncu S, et al. Octreotide and lanreotide decrease ovarian ischemia–reperfusion injury in rats by improving oxidative and nitrosative stress. *J Obstet Gynaecol Res.* 2020; 46(10): 2050-2058.
103. Beyazıt F, Büyük B, Turkon H, Elmas S, Uzun M. Adalimumab mitigates ovarian ischemia-reperfusion injury in rats by regulating oxidative stress, apoptosis and resolution of inflammation. *J Obstet Gynaecol Res.* 2019; 45(2): 358-367.
104. Pınar N, Soylu Karapınar O, Özcan O, Atik Doğan E, Bayraktar S. Protective effects of tempol in an experimental ovarian ischemia-reperfusion injury model in female Wistar albino rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2017; 95(7): 861-865.
105. Kalyoncu Ş, et al. Melatonin attenuates ovarian ischemia reperfusion injury in rats by decreasing oxidative stress index and peroxynitrite. *Turk J Med Sci.* 2020; 50(6): 1513-1522.

106. Celik Kavak E, Gulcu Bulmus F, 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: 409-415.
107. Bostancı MS, et al. The protective effect of G-CSF on experimental ischemia/reperfusion injury in rat ovary. *Arch Gynecol Obstet.* 2016; 293(4): 789-95.
108. Eser A, et al. Effects of curcumin on ovarian ischemia-reperfusion injury in a rat model. *Biomed Rep.* 2015; 3(6): 807-813.
109. Nayki C, et al. The effect of rutin on ovarian ischemia-reperfusion injury in a rat model. *Gynecol Endocrinol.* 2018; 34(9): 809-814.
110. Dayal M, Sagar S, Chaurasia A, Singh U. Anti-mullerian hormone: a new marker of ovarian function. *J Obstet Gynaecol India.* 2014; 64(2): 130-3.
111. Moolhuijsen LME, Visser JA. Anti-Müllerian Hormone and Ovarian Reserve: Update on Assessing Ovarian Function. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020; 105(11): 3361-73.
112. Musayeva İ, et al. Ratlarda oluşturulan pneumoperitoneum modelinde iskemi reperfüzyon hasarının over dokusu üzerine etkileri. *Ege Tıp Dergisi.* 2021; 60: 6-12.
113. Eser A, et al. Protective effect of curcumin on ovarian reserve in a rat ischemia model: an experimental study. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2017; 44(3): 453-457.
114. Soyman Z, Kelekçi S, Sal V, Şevket O, Bayındır N, Uzun H. Effects of Apigenin on Experimental Ischemia/Reperfusion Injury in the Rat Ovary. *Balkan Med J.* 2017; 34(5): 444-449.
115. Sakin O, Anğın AD, Akalın EE, Cıkman MS, Basak K, Kaptanagasi AO. Comparison of the protective effects of sildenafil, vardenafil and tadalafil treatments in ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *Ginekolo Pol.* 2019; 90(9): 513-519.
116. Sakin O, Angin AD, Koyuncu K, Cıkman MS, Basak K, Kaptanagasi AO. Protective Effects of Imatinib and Ginkgo Biloba on Cisplatin-induced Ovarian Damage in Rats. *Istanbul Med J.* 2020; 21: 281-289.

117. Ozler A, et al. The biochemical and histologic effects of adnexal torsion and early surgical intervention to unwind detorsion on ovarian reserve: an experimental study. *Reprod Sci.* 2013; 20(11): 1349-55.
118. Karakaş S, et al. Effect of metformin and detorsion treatment on serum anti-Müllerian hormone levels and ovarian histopathology in a rat ovarian torsion model. *Turk J Med Sci.* 2020; 50(2): 455-463.
119. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010; 11(9): 621-32.
120. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med.* 2000; 6(5): 513-9.
121. Bai L, Yang J, Zhang H, Liao W, Cen Y. PTB domain and leucine zipper motif 1 (APPL1) inhibits myocardial ischemia/hypoxia-reperfusion injury via inactivation of apoptotic protease activating factor-1 (APAF-1)/Caspase9 signaling pathway. *Bioengineered.* 2021; 12(1): 4385-4396.
122. Wang Y, et al. Apoptotic Protease Activating Factor-1 Inhibitor Mitigates Myocardial Ischemia Injury via Disturbing Procaspase-9 Recruitment by Apaf-1. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017: 9747296.
123. Zou Y, et al. Heat shock transcription factor 1 protects cardiomyocytes from ischemia/reperfusion injury. *Circulation.* 2003; 108(24): 3024-30.
124. Kit OI, et al. The activity of proapoptotic genes increases after renal ischemia/reperfusion. *Mol Biol.* 2017; 51(3): 502-511.
125. Bektas S, et al. The effects of tadalafil and pentoxifylline on apoptosis and nitric oxide synthase in liver ischemia/reperfusion injury. *Kaohsiung J Med Sci.* 2016; 32(7): 339-47.
126. Arab HA, Sasani F, Rafiee MH, Fatemi A, Javaheri A. Histological and biochemical alterations in early-stage lobar ischemia-reperfusion in rat liver. *World J Gastroenterol.* 2009; 15(16): 1951-7.
127. He M, et al. Deletion of mitochondrial uncoupling protein 2 exacerbates mitophagy and cell apoptosis after cerebral ischemia and reperfusion injury in mice. *Int J Med Sci.* 2020; 17(17): 2869-2878.

128. Aydın H, Tekin YK, Korkmaz İ, Eker Z, Demirtaş E. Apoptosis biomarkers (Apaf-1, sFa s, sFa s-L, and caspase-9), albumin, and fetuin-A levels in pulmonary thromboembolic patients. *Disaster Emerg Med J*. 2020; 5(1): 1-6.



9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	FIRAT	Soyadı	AŞIR
Doğum Yeri		Doğum Tarihi	
Uyruğu	TC	Tel	
E-posta			

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD	2018
Lisans	İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Fakültesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (ingilizce)	2014
Lise	Mersin Atatürk Lisesi (Y.D.A.L.)	2004

İş Deneyimi

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
	Araştırma Görevlisi	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve embriyoloji Anabilim Dalı	(2015 Ekim – Halen)

Yabancı Dil Sınav Notu								
YDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
71.25 (2021/Güz)								

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı (2017/Bahar)	78.73368	62.48937	76.19697

10.EKLER

10.1. Ek 1 – Mezuniyet Yayını



Journal of Biosciences and Medicines, 2021, 9, 8-14
<https://www.scirp.org/journal/jbm>
ISSN Online: 2327-509X
ISSN Print: 2327-5081

The Effect of *Momordica charantia* on Ovarian Ischemia-Reperfusion

Asir Firat, Deveci Engin, Gokalp Ozkorkmaz Ebru, Şahin Fırat, Ermiş Işıl Sezen

Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Dicle University, Diyarbakır, Turkey
Email: firatasir@gmail.com

How to cite this paper: Firat, A., Engin, D., Ebru, G.O., Fırat, Ş. and Sezen, E.I. (2021) The Effect of *Momordica charantia* on Ovarian Ischemia-Reperfusion. *Journal of Biosciences and Medicines*, 9, 8-14.
<https://doi.org/10.4236/jbm.2021.912002>

Received: October 30, 2021
Accepted: November 29, 2021
Published: December 2, 2021

Copyright © 2021 by author(s) and Scientific Research Publishing Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Ovarian torsion is one of the gynecological emergencies that affect ovarian tissue integrity and fertility. In this study, we aim to investigate the effects of *Momordica charantia* (MC) on ovarian tissue injury induced by ovarian ischemia-reperfusion. Twenty-four rats were assigned to three groups: control group, ischemia-reperfusion (I/R) group and IR + MC group. 600 mg/kg MC extract were given rats via orogastric route. 3-hour ischemia and 3-hour reperfusion were performed for IR protocol. At the end of experiment, ovarian tissues were excised, fixed in zinc-formalin and processed for routine paraffin wax tissue embedding. Sections were stained with hematoxylin and eosin. Ovarian sections of control group showed regular histological appearance. In ovarian sections of I/R group, hemorrhage, fibrin accumulation, mononuclear cell infiltration and degenerated follicles were observed. I/R + MC group showed improved histopathology caused by I/R injury. We think that MC extract may protect ovarian tissue integrity and its histological structures.

Keywords

Follicles, Histology, Ischemia, *Momordica charantia*, Ovary, Reperfusion

1. Introduction

Ovarian torsion is the rotation of the peduncle with arteries and veins of the ovary on its axis by partially or full turn, preventing blood flow. As a result of torsion, ischemia develops in tissues and tissue damage occurs. Ovarian torsion is seen in 2.7% of gynecological emergencies. Although it affects all age groups from female fetuses to menopause, it is more common in women of reproductive age [1] [2]. The etiology of ovarian torsion is not known exactly, but most cases have functional cysts or neoplasms of the ovary. Delay or mistake in the

10.2. Ek 2 – Etik Kurul Belgesi



T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
PROF.DR. SABAHATTİN PAYZIN SAĞLIK BİLİMLERİ
ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (DÜHADEK)

ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ	26/02/2020	KARAR NO	5	TOPLANTI SAYISI	2
--------------------	------------	-------------	---	--------------------	---

KARAR:

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embr. A.D. Prof. Dr. Engin Deveci'in yürütücüsü olduğu, Arş. Gör. Fırat Aşır, Dr. Öğr. Üyesi Nurullah Peker'in yardımcı araştırmacı olarak yer aldığı, "Sıçan Ovaryumunda Oluşturulan Deneysel İskemi-Reperfüzyon Hasarında Kudret Narı'nın(Momordicacharantia) Etkilerinin Araştırılması" başlıklı ve 2020/08 protokol numaralı çalışma; Etik kurulumuzca görüşülmüş olup, etik açıdan uygun olup eksiklikler tamamlanıp raportör ve başkanın kontrolünden sonra araştırmanın desteklenmesine oy birliği ile karar verilmiştir.

1-) Kaynaklar doğrultusunda deney grubunun tasarlanırken özellikle ilaç grubundaki sürenin dikkate alınarak daha önceden başlanması ve deney süresinin revize edilmesi önerilmektedir.

Deney Hayvanının	Türü	Cinsiyeti	Sayısı	Yaşı
	Sıçan (Sprague-Dawley)	Dişi	40	12 Hafta, 250+3000 gr

KATILIMCILARIN

ÜNVANI	ADI SOYADI	GÖREVİ
Prof. Dr.	Beran YOKUŞ	(BAŞKAN)
Prof. Dr.	Ayşe MEŞE	(ÜYE)
Doç. Dr.	Selçuk TUNİK	(ÜYE)
Doç. Dr.	Hasan AKKOÇ	(ÜYE)
Doç. Dr.	Ramazan DEMİREL	(ÜYE)
Doç. Dr.	Mehmet Erdem AKBALIK	(ÜYE)
Doç. Dr.	Mehmet Hüseyin ALKAN	(ÜYE)
Doç. Dr.	Ulaş ALABALIK	(ÜYE) Raportör
Dr.Öğr. Üyesi	Feray ALTAN	(ÜYE)
Dr.Öğr. Üyesi	Ersin UYSAL	(ÜYE)
Dr.Öğr. Üyesi	Elif VARHAN ORAL	(ÜYE)
Dr.Öğr. Üyesi	Akın KOÇHAN	(ÜYE)
Öğr. Gör.	Uğur UÇAR	(ÜYE)
Avukat	Abdullah YAVUZ	(ÜYE)
Öğretmen	M. Yavuz KAHRAMAN	(ÜYE)

KYK-FRM-387/00

İletişim: DÜBTAM binası, Zemin Kat, DÜSAM laboratuvarları (İlahiyat Fak. Karşısı) 21280 Sur /DİYARBAKIR
E-posta: dusam@dicle.edu.tr**Sekreteryası:** 0 412 248 8431 (3956) **Vet.Hekim:** 0 412 2488001-16 hat (4423)

