T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇANLARDA OVARYUM İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI: 3',4'-DIHYDROXYFLAVONOL'UN LİPİD PEROKSİDASYONUNA ETKİSİ

Elif Sena AĞARTAN

Yüksek Lisans Tezi

TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Rasim MOĞULKOÇ

KONYA-2017

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇANLARDA OVARYUM İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI: 3',4'-DIHYDROXYFLAVONOL'UN LİPİD PEROKSİDASYONUNA ETKİSİ

Elif Sena AĞARTAN

Yüksek Lisans Tezi

TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Rasim MOĞULKOÇ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 16202011 proje numarası ile desteklenmiştir

KONYA-2017

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında sentetik bir flavonoid olan 3',4'-dihydroxyflavonol'un (DiOHF) sıçanlarda ovaryum iskemi reperfüzyonunda lipid peroksidasyon ile doku histopatolojisine olan etkilerini ve ayrıca IL-6 düzeylerine olan etkisini belirlemek amaçlanmıştır.

Tez çalışmalarım boyunca desteği ve ilgisiyle yanımda olan danışmanım Sayın Rasim MOĞULKOÇ'a

Yüksek Lisans eğitimim süresince bana emeği geçen ve her koşulda desteğini gördüğüm hocam Sayın Prof. Dr. Abdülkerim Kasım BALTACI'ya

Biyokimyasal Analizlerimizde bize yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Esma MENEVŞE, asistanı Mutahire Tok, Fizyoloji Anabilim Dalı araştırma görevlisi Dr.Derviş Daşdelen'e

Histopatolojik değerlendirmede yardımcı olan N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi Patoloji Anabilimdalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Mustafa Cihat Avunduk'a

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve bugünlere gelmemde maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen anneme, babama, kardeşlerime, tez yazım sürecim boyunca her türlü desteği gösteren sevgili eşime

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmamızı maddi anlamda destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE VE KISALTMALAR v

1. GİRİŞ 1

1.1. Ovaryumlar.....1

1.1.1. Over Arterleri.....1

1.1.2. Over Venleri 2

1.1.3. Over Histolojisi.....2

1.1.4. Over Fizyolojisi 2

1.2. Adneksiyal Torsiyon 3

1.2.1. Adneksiyal Torsiyonun Risk Faktörleri 3

1.2.2. Adneksiyal Torsiyonda Tedavi Yaklaşımları 4

1.3. İskemi-Reperfüzyon Hasarı.....4

1.3.1. İskemi Mekanizması.....4

1.3.2. Reperfüzyon Mekanizması 7

1.4. Antioksidan Savunma Sistemleri 18

1.4.1. Endojen Antioksidanlar 18

1.4.2. Eksojen Antioksidanlar.....19

1.4.3. Flavonoidler.....25

2. GEREÇ VE YÖNTEM.....28

2.1. Deney Hayvanları 28

2.2. DiOHF Uygulaması 29

2.3. Kan ve Dokuların Alınması 29

2.4. Doku Homojenizasyonunun Yapılması 29

2.5. Biyokimyasal Analizler.....30

2.5.1. Protein Tayini 30
2.5.2. Doku MDA Düzeylerinin Belirlenmesi 30
2.5.3. Plazma MDA Düzeylerinin Belirlenmesi 31
2.5.4. Doku GSH Düzeylerinin Belirlenmesi 31
2.5.5. Eritrosit GSH Düzeylerinin Belirlenmesi 31
2.5.6. Eritrosit ve Dokuda SOD Düzeylerinin Belirlenmesi 32
2.5.7. Plazma ve Dokuda 8-OHdG Düzeylerinin Belirlenmesi 33
2.5.8. Plazmada IL-6 Düzeylerinin Belirlenmesi 34
2.5.9. Eritrosit Hemoglobin Düzeylerinin Belirlenmesi 34
2.6. Histopatolojik Değerlendirme 34
2.7. İstatistiksel Değerlendirme 35
3. BULGULAR 36
4. TARTIŞMA 44
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 50
6. ÖZET 51
7. SUMMARY 52
8. KAYNAKLAR 53
9. EKLER 60
EK A: Etik Kurul Kararı 60
10. ÖZGEÇMİŞ 61

SİMGE VE KISALTMALAR

AMP: Adenozin monofosfat

ATP: Adenozin trifosfat

CAT: Katalaz

cGMP: Siklik guanozin monofosfat

DiOHF: Dihydroxyflavonol

DNA: Deoksiribo nükleik asit

GPx: Glutatyon peroksidaz

GR: Glutatyon redüktaz

GSH: Glutatyon

GSSG: Okside glutatyon

GST: Glutatyon s -transferaz

H_2O_2: Hidrojen peroksit

HOCl: Hipokloröz asit

ICAM-1: İntrasellüler adhezyon molekülü-1

IL-1: İnterlökin-1

IL-6: İnterlökin-6

I/R: İskemi/Reperfüzyon

KCL: Potasyum klorür

L^-: Lipid serbest radikalleri

LOO^-: Lipid peroksit radikalleri

LOOH: Lipid peroksit

MDA: Malondialdehid

MPO: Miyeloperoksidaz

NAD^+: Nikotinamid adenin dinükleotid

NaOH: Sodyum hidroksit

NO: Nitrik oksit

O_2^-: Süperoksit radikali

O_2: Oksijen

OH^-: Hidroksil radikalleri

$ONOO^-$: Peroksinitrit

PMNL: Polimorf nüveli lökosit

ROT: Reaktif oksijen türleri

SOD: Süperoksit dismutaz

SOR: Serbest oksijen radikalleri

TNF-α: Tümör nekroz faktör-α

VCAM: Vasküler hücre adhezyon molekülü

VSCC: Voltaja duyarlı kalsiyum kanalları

XO: Ksantin oksidaz

8-OHdG: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin

1. GİRİŞ

1.1. Ovaryumlar

Overler uterusun her iki yanında yerleşmiş bir çift organdır. Overler yetişkin bayanlarda 1.5-2 cm genişliğinde, 3-4 cm uzunluğunda ve 1 cm kalınlığındadırlar. Overlerin ağırlıkları yaklaşık 45 gramdır. Overlerin iç ve dış olmak üzere iki yüzü, ön (mezoovaryan) ve arka (serbest) olmak üzere iki kenarı, tubal (üst) ve uterin (alt) olmak üzere iki ucu vardır. Overlerin yüzeyi tunika albuginea bağ dokusu ile örtülü olması sebebiyle pembe-beyazımsı renktedir (Gökmen 2003).

Overler, uteroovaryan ve infindubulopelvik ligamentlerle uterusun her iki yanında asılı halde yerleşmişlerdir (Standring 2005). Uteroovaryan ligament overi iç kenarından uterusa bağlarken infindubulopelvik ligament overi dış kenarından pelvik duvara asar. Her iki ligament de uterusa ait broad ligament içerisinde bulunurlar. İnfindubulopelvik ligamentin içinde ovaryumun damar ve sinirleri bulunmaktadır (Saksouk 2004).

1.1.1. Over Arterleri

Overlere kanı getiren esas damar ovaryan arterdir. Ovaryan arter abdominal aortanın dallarındandır. Birinci lumbal vertebra seviyesinde, renal arter altında aortadan ayrılır (Waugh ve Grant 2001). Ovaryan arter suspansör ligament içinde ilerleyerek mesoovaryuma gelir (Standring 2005). Overlerin kanlanmasını sağlayan diğer damar da uterin arterin ovaryan dalıdır (ramus ovaricus).

1.1.2. Over Venleri

Overin venleri ovaryan arterlerle birlikte yükselir ve pampiniform pleksusu oluşturur. Karın boşluğunda sağ ovaryan ven inferior vena kavaya, sol ovaryan ven ise sol renal vene açılır (Saksouk 2004).

1.1.3. Over Histolojisi

Over tek katlı, yassı ve kübik olarak değişiklik gösteren yüzey epiteli ve yüzey epitelinin altında overi saran tunika albuginea denilen bağ dokusu ile çevrilmiştir (Auersperg ve ark 2001). Overin diğer parankim hücresi olan granüloza hücreleri ile folikül hücresi arasında karşılıklı sinyal iletimini sağlayan özel gap-junctionlar bulunmaktadır (Liu 2010). Granüloza hücreleri bu gap-junctionlar aracılığıyla folikül hücresinin beslenmesini sağlamaktadır. Granüloza hücreleri bazal membran içinde yer aldıklarından folikül hücrelerinden kolaylıkla ayırt edilebilirler (Nishida ve Nishida 2006). Overin stroma hücresi olan teka hücreleri, overin endokrin hücreleridir ve steroid hormon üretme fonksiyonu vardır (Bukovsky ve ark 2004).

1.1.4. Over Fizyolojisi

Overlerin steroid hormonlarının sentezi ve salgılanması, dişi üreme hücresi oositin üretimi ve atılması olmak üzere temel iki görevi vardır (Espey 1994, Hassa 2003). Overler tarafından salgılanan steroid hormonlar östrojen ve progesterondur (Hardy ve ark 2000). Bu hormonların fonksiyonu memelilerde üreme hücrelerinin gelişip olgunlaşmalarını, ovülasyonu, gebeliğin başlamasını, devamını sağlamaktır. Ayrıca sekonder seks karakterlerinin ve meme bezlerinin gelişme ve büyümelerini kontrol etmektir (Shier ve ark 2001, Hawkins ve Matzuk 2008).

1.2. Adneksiyal Torsiyon

Adneksiyal torsiyon; adneksin, overin ya da fallop tüpünün tek başına, infundibulopelvik ve tuboovaryen ligamanın ekseni etrafında en az 360^{o} dönmesi sonucu oluşur (Graif ve Itzehak 1988). Torsiyon durumunda ovaryen ve infindibulopelvik ligamanlar parsiyel olarak strangüle olur ve kan akımı engellenir (Breech ve Hillard 2005). Adneksiyel torsiyon, sık görülmemekle birlikte akut abdominal ağrının önemli bir nedenidir ve ağır morbidite ile sonuçlanmaktadır. Adneks torsiyonu kadınlarda herhangi bir yaşta görülebilmekle birlikte genelde premenarş ve reprodüktif yıllarda görülmektedir. Adneksiyel torsiyon belirtileri sıklıkla alt abdomende ani, devamlı ve nonspesifik bir ağrıdır. Gecikmiş tanı ya da tanı alamayan olgular oldukça sıktır ve bu gibi durumlar overin, fallopian tüpün ya da her ikisinin kaybı ile sonuçlanmaktadır (Nissen ve ark 1977, Cass 2005).

1.2.1. Adneksiyal Torsiyonun Risk Faktörleri

Sağ uteroovaryen ligaman solda olduğu ve solda sigmoid kolon, torsiyon için gereken bölgeyi doldurduğu için adneksiyal torsiyon vakalarının çoğu sağ tarafta görülmektedir (Pena ve ark 2000).

Adneksteki herhangi bir ağırlık artışı torsiyon riskini arttırmaktadır. Over kistleri ve özellikle de dermoid kist adneksiyal torsiyonunun asıl sebeplerinden birisi olarak öne çıkar (Hibbard 1985). Normal boyutlarda olan bir overde torsiyon mümkün olmakla birlikte oldukça nadir görülen bir durumdur. Gebelik de torsiyon için risk faktörleri içerisinde sayılmaktadır (Comerci ve ark 1994). Torsiyon; kan ve lenf akımında bozulma, ovaryum dokusunda iskemi, gangrenleşme ve nekroza kadar gidebilen bir durum ortaya çıkarır (Graif ve Itzehak 1988). Sonuç olarak da üreme kaybına yol açar. Bununla birlikte pelvik tromboflebit veya ciddi peritonit gibi ölümcül durumlara da yol açabilir (Hibbard 1985).

1.2.2. Adneksiyal Torsiyonda Tedavi Yaklaşımları

Over torsiyonunun tedavisinde geleneksel yaklaşım torsiyone olmuş adneksin rezeksiyonu iken son zamanlarda konservatif tedavi daha fazla uygulanmaktadır. Tanının doku nekrozu gelişmeden önce konulması ve konservatif tedaviye olanak verilmesi gerekmektedir (Oelsner ve ark 1993).

1.3. İskemi-Reperfüzyon Hasarı

1.3.1. İskemi Mekanizması

Bir organa gelen kan akımının pıhtı veya mekanik etkenlerle yetersiz hale gelmesine veya durmasına iskemi denir. İskemi sırasında dokuda hipoksi meydana gelir ve oksijenli solunum mekanizması sekteye uğrar (Mallick ve ark 2004). Hücre aerobik metabolizma yoluyla yaşamsal fonksiyonlarına yetecek kadar adenozin trifostat (ATP) enerjisi üretemez ve hücrede var olan ATP de hızla tükenir. İskemik dokunun ATP yetersizliğine verdiği cevaplardan ilki glikojen yıkım hızının ve glikolizin artmasıdır (Lieberthal ve Nigam 1998). Hücresel ATP'de azalma ile birlikte adenozin monofosfat (AMP)'taki artma fosfofruktokinaz enzimini uyarır. Glikojenden ATP üretimi ile hücrenin enerjisini temin amacıyla gelişen anaerobik glikoliz hızını artırır. Glikoliz sonucu hücrede fosfat esterlerinin hidrolizi ile laktik asit ve inorganik fosfatların birikimi meydana gelir ve hücre içi pH düşmeye başlar. Sonuç olarak glikojen hızla tükenir. Hipoksi neticesinde hücresel oksidatif fosforilasyon azalır. Hücresel enerji depolarının azalması sonucunda hücre zarında bulunan Na-K ATPaz pompası inhibe olur ve sodyum ve kalsiyum hücre içinde birikmeye başlar ve potasyum hücre dışına çıkar. Hücre içerisinde sodyum iyonunun net artışı, suyun izoozmotik artışı ile birlikte olup akut hücresel şişmeye neden olur. Bu şişme inorganik fosfatlar, laktik asit ve pürin nükleozitleri gibi diğer metabolitlerin birikimi ile artan ozmotik yükle daha da artmaktadır (Kumar ve ark 2000).

İskemi reperfüzyon hasarının gelişmesinde meydana gelen hücre içi kalsiyum miktarındaki artış üç yoldan gerçekleşmektedir:

I. Dışarıdan hücreye kalsiyum girişi.

II. Hücre içi kalsiyum depolarından Ca^{2+} salınımı.

III. Hücre içinde Ca^{2+} seviyesini düzenleyen mekanizmaların bozulması.

Dışarıdan hücreye kalsiyum girişi

Hücrenin asıl enerji kaynağı ATP'nin bitmesi neticesinde aktif sodyum transport pompaları (Na^+/K^+ ATPaz, $3Na^+$ /Ca^{2+} antiporter ve Na^+/H^+ antiporter) bozulur ve sodyumun hücrede birikmesiyle başlayan presinaptik depolarizasyon sinir ucuna ulaşır. Bu durum presinaptik membrandaki voltaja duyarlı kalsiyum kanallarını (VSCC-N tipi) açarak hücre içine kalsiyum girmesine neden olur. Sonrasında başta glutamat olmak üzere uyarıcı aminoasitlerin hücre membranından sinaps aralığına salınması gerçekleşmektedir.

Hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyum salınımı

Hücrelerde belli uyarılara cevap olarak hücre içi depolardan hücre membranı reseptörü aracılı kalsiyum salınımı gerçekleşmektedir. Asetilkolin ve bazı peptidler hücre membranında bulunan özel reseptörler için uyarıcı eşlenmiş reseptöre bağlanarak fosfotidil inozitol bifosfatın diaçilgliserol ve inozitol trifosfata ayrılmasına neden olmaktadır. İnozitol trifosfat, endoplazmik retikulumdan kalsiyum salınımını gerçekleştirmektedir. Bazı hücrelerde ise glutamat, kuiskalat yapısındaki reseptörlere etki ederek hücreden kalsiyum salımına yol açabilir. Artmış kalsiyum düzeyi hücrede diaçilgliserol ile birlikte protein kinaz C'yi aktive eder ve reseptörlerin agonist uyarısına yanıtını artırması yoluyla kalsiyum salınması için bir uyarı oluşturur.

Hücre içinde Ca^{2+} seviyesini düzenleyen mekanizmaların bozulması.

Normal koşullarda VSCC ve reseptör agonisti ile işleyen kalsiyum kanalları ile hücre içine giren veya intraselluler olarak salgılanan kalsiyum iki şekilde tamponlanmaktadır:

1. Kalmodilin gibi efektör bir proteine veya kalsibindin gibi özel bağlayıcı proteine bağlanarak tamponlanır. Kalsiyumun negatif gruplara bağlanarak tamponlanması, hidrojen iyonunun tamponlanması ile benzerlik gösterdiğinden Ca^{2+} ve H^{+} aynı tampon bölgeleri için yarışa girerler. Bu nedenle iskemi sonucu gelişen asidozda kalsiyum, bu bağlanma bölgelerinden salınmaktadır.

2. Hücre içi organeller tarafından tutularak tamponlanır. Kalsiyumun endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi organellerce tutulması enerji gerektiren bir olaydır. Normal koşullarda mitokondrinin tutulmaya katkısı çok azdır. Hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonu hızla artınca mitokondri büyük miktarlarda kalsiyumu tutar. Bunun için mitokondri iç membranının elektriksel potansiyeli gerekmektedir. Bu potansiyel de sadece O_2 ve ATP varlığında oluşabilmektedir. Mitokondrinin patolojik miktarda Ca^{2+} tutması mitokondriyal hasarı oluşturmaktadır (Siesjo 1992). Artan sitoplazmik kalsiyum sıra ile çeşitli fosfolipazları, proteazları, ATPazları ve endonükleazları aktive eder.

Fosfolipazlar; membran hasarını ilerletir.

Proteazlar; yapısal ve membran proteinlerini katabolize eder.

ATPazlar; ATP kaybını hızlandırır.

Endonükleazlar; genetik materyali parçalar.

Sonrasında ribozomların granüllü endoplazmik retikülumdan ayrılması ve polizomlardan monozomların oluşumu ile protein sentezinin azalması görülür. Hipoksi düzelmez ise mitokondrial fonksiyon daha da kötüleşir ve membran permeabilitesi artar. Bu durum daha fazla morfolojik bozulmaya neden olur. Ozmotik regülasyon kaybından dolayı tüm hücreler şişmiş gibi görünür. Eğer oksijen eski haline dönerse tüm bu bozukluklar reverzibldır. Bununla beraber iskemi devam ederse irreverzibl zedelenme gelişir.

İrreverzibl zedelenmede mitokondrilerin daha şiddetli vakuolizasyonu ve mitokondri matriksinde şekilsiz ve kalsiyumdan zengin yoğunlukların birikimi, plazma membranlarının geniş hasarı ve lizozomların şişmesi görülür (Kumar ve ark 2000). Hücrede iyon miktarının değişimi yangısal süreçleri aktive ederken antioksidan enzimlerin üretimini baskılar. Bu durum hücreyi reperfüzyon sırasında oluşabilecek hasara karşı duyarlı hale getirir (Parks ve ark 1988).

Normal koşullarda;

Hipoksantin, ksantin dehidrogenaz yardımıyla ksantine oksidize edilir. Bu reaksiyonda elektron alıcı NAD^+dır.

Hipoksantin→ ksantin + ürik asit

İskemi sırasında;

Hipoksinin etkisiyle ksantin dehidrogenaz, ksantin oksidaza (XO) dönüştürülür. XO iskemi sürecinde hipoksantinin, ksantine dönüşümünü kataliz edemez dokuda aşırı miktarda hipoksantin ve ksantin oksidaz birikimi olur ve substrat olarak oksijeni kullandığı reperfüzyonda çok fazla miktarda serbest oksijen radikali (SOR) oluşumu meydana gelir (Toyokuni 1999). Özetle iskemi sırasında hücresel düzeyde aşağıdaki olaylar gelişir.

Sellüler ATP→ AMP + Adenozin

Adenozin→ inozin + hipoksantin

AMP→ hipoksantin

Ksantin dehidrogenaz→ ksantin oksidaz

1.3.2. Reperfüzyon Mekanizması

Doku kanlanmasının ilaçlarla veya mekanik müdahalelerle yeniden sağlanması reperfüzyondur (Sasaki ve John 2007). Reperfüzyon, iskemik dokudaki normal fonksiyonları büyük ölçüde eski haline getirmesine karşın dokuda reperfüzyon hasarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Yazıhan 2007). Reperfüzyon hasarından iki mekanizma sorumludur;

1-İnflamatuar yanıt

- Nötrofil-endotel etkileşimi.

- Kompleman aktivasyonu.

2-Süperoksit radikali oluşumu.

İnflamatuar yanıt

Reperfüzyon sonucu oluşan inflamatuar yanıt, kompleman ve polimorf nüveli lökosit (PMNL)-endotel aktivasyonu ile ilişkilidir. İnflamatuar yanıt, reperfüzyonla ilişkili vücut bölgesini ya da vücudun temel bir organını etkilerse birçok sitokinin, kemokinin ve proinflamatuar metabolitlerin dolaşıma geçmesi durumunda inflamasyon tüm vücuda yayılabilir (Gourdin ve ark 2009).

Nötrofil-endotel etkileşimi: Nötrofiller inflamatuar yanıtta ve reperfüzyonla ilişkili lezyonların oluşumunda merkezi bir role sahiptir (Gourdin ve ark 2009). I/R'de aktive olan ilk hücre nötrofildir ve hasarın en önemli hücrelerindendir (Siemionow ve Arslan 2004). Nötrofillerin dolaşımdan inflamasyon bulunan bölgeye geçişi üç basamakta gerçekleşir:

1-Endotele nötrofillerin zayıf adhezyonu

2-Endotele nötrofillerin sıkı adhezyonu

3-Nötrofil göçü

Bu olayda adhezyon moleküllerinin üç grubu sorumlu tutulmaktadır: selektinler, β_2 integrinler ve immünglobulinler.

1-Nötrofillerin endotele zayıf adhezyonu: Endoteldeki E ve P-selektin ile PMNL yüzeyindeki P-selektin glikoprotein-1 molekülü etkileşme göstererek lökositin endotele bağlanması olayı gerçekleşir (Rolling).

2-Nötrofillerin endotele sıkı adhezyonu: Nötrofillerin üzerindeki β_2 integrinler ile endotelyal intrasellüler adhezyon molekülü (ICAM)-1 reseptörlerinin etkileşimi sonucunda endotel-nötrofil sıkı adhezyonu gerçekleşir. SOR, platelet aktive edici

faktör ve leukotrien B4 gibi moleküller nötrofillerin hücre içi granüllerinde β_2 integrinlerin ekspresyonunu artırırken tümör nekroz faktör-α (TNF-α), interlökin-6 (IL-6) ve interlökin-1 (IL-1) gibi sitokinler endotelyal ICAM-1 ekspresyonunu artırır (Gourdin ve ark 2009).

3-Nötrofil göçü: İmmünoglobülin süperfamilyasına ait adhezyon molekülleri olan ICAM-1 ve platelet endotel adhezyon molekülü-1, nötrofillerin interstisyuma doğru transferini düzenler ve yönlendirir. Nötrofillerin inflamasyon bölgesine göçüne 'transmigrasyon' adı verilir. İnterstisiyuma ulaşan aktive nötrofiller zaten hipokside olan dokuda belirgin hasara neden olur. Bu hasar esas olarak, nötrofil granüllerin içeriğinden ve araşidonik asidin metabolitlerinden ve fazla miktarda salınan reaktif oksijen türleri ile ilgilidir. Nötrofillerden salınan proteazlar, kollajenazlar, elastazlar, lipooksigenazlar, fosfolipazlar ve miyeloperoksidazlar ekstrasellüler matriksin protein ağını sindirip parçalamaktadır (Kumar ve ark 2000).

Kompleman aktivasyonu: Kompleman sistemi doğal bağışıklıkta önemli rol oynayan yaklaşık 30 proteinden oluşur. Bu proteinler karaciğerde sentezlenir ve serumda bulunmaktadır. Plazmada inaktif halde bulunan enzimlerin inflamasyona bağlı olarak kademeli aktivasyonu ile kompleman sistem proteinleri aktive olarak anaflatoksine, inflamasyon bölgelerinde vazodilatasyona, vasküler permeabilitede artışa ve fagositlerin endotele yapışmasının uyarılmasına neden olmaktadır (Roos ve ark 2003). Kompleman sisteminin aktive olmasıyla C3a, C5a, C3bi ve C5b-9 gibi proinflamatuar komponentler oluşmakta ve bu komponentler lökosit aktivasyonuna ve kemotaksisin uyarılmasına neden olmaktadır. Kompleman sisteminin aktivasyonu endotelyal nükleer faktör-kappa beta'yı aktive eder ve endotel ve nötrofillerin yüzeyinde bulunan P-selektin, L-selektin, ICAM-1, vasküler hücre adhezyon molekülü (VCAM)-1 gibi adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırır. C3bi endotel yüzeyindeki nötrofillerin adhezyonunda rol oynar. C5b-9 endotelde monosit kemoatraktan protein-1 ve IL-8 sentezini uyararak lökosit aktivasyonunu ve kemotaksisi aktive etmektedir. C5b-9 endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe ederek ve endotel hücrelerinde siklik guanozin monofosfat (cGMP)'ı azaltarak vasküler tonusun bozulmasına neden olur (Eltzschig ve Collard 2004).

Serbest oksijen radikali oluşumu

İskemi döneminde dokuda biriken ksantin oksidaz reperfüzyonla dokuya aniden sunulan oksijeni kullanarak hipoksantini ksantine ve ürik asite çevirirken bu reaksiyon esnasında bol miktarda SOR oluşumuna neden olur (D'angelica ve ark 2004).

Hipoksantin→ ksantin+ O_2

Ksantin + $2O_2$ + H_2O→ Ürik asit + O_2+ H_2O_2

Ksantin oksidaz enzim aktivitesi ile O_2 ve hipoksantinin birbirleriyle olan etkileşimi sonucu O_2^- üretilir. Oluşan O_2^-, H_2O_2 için kaynak oluşturur.

$2\ O_2^- + 2H^+ \rightarrow\ H_2O_2 + O_2$

H_2O_2 geçiş metalleriyle (genellikle serbest demir) reaksiyona girerek OH^-'ı oluşturur.
$Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + OH^- + OH\bullet$

O_2^- ve H_2O_2 çok fazla reaktif moleküller değildir, H_2O_2' nin en önemli toksik etkisi OH^-'ın oluşumudur. Cl^- varlığında nötrofildeki lizozomlarda bulunan miyeloperoksidaz (MPO) enzimi H_2O_2'yi hipokloröz asit (HOCl)'e dönüştürür. HOCl ise kuvvetli bir oksidan ajandır.

$$H_2O_2 + Cl^- + H^+ \xrightarrow{MPO}\ HOCl + H_2O$$

Aynı zamanda O_2^-'nin NO ile reaksiyonu sonucu peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşur ki bu da doku hasarına neden olan bir başka radikaldir (Kumar ve ark 2000).

Serbest radikaller tek ve serbest elektron numaralı, belirli moleküllerle oksijen reaksiyonuna giren atomlardır (Ujang 2008). Serbest radikaller ortaklaşmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktif moleküllerdir (Serafini ve Del Rio 2004). Hücreler reaktif oksijen türlerinin (ROT) hasarına bağışıklık kazanmamakla birlikte genellikle glutatyon ve katalaz ile oksijen hasarına karşı korunmaktadır (Koc ve ark 2014).

İskemide dokularda, ROT üreten hücre içi mekanizmalar daha aktiftir. Ancak oksijen sağlanamamasından dolayı görevlerini yapamazlar. Kan akımı ve yeniden oksijen sağlanması ile büyük miktarda serbest oksijen radikalleri üretilerek reperfüzyon hasarı görülür (Lin ve ark 1999). Özellikle iskemik dokunun reperfüze edildiği ilk 10-30 saniyelik zaman diliminde reaktif oksijen türleri üretiminde ani ve aşırı bir artış olmaktadır (Halliwell 1989).

Fizyolojik şartlarda serbest radikallerin oluşumu ile yıkımı arasında bir denge bulunmaktadır. Bu duruma oksidatif denge adı verilmektedir. Denge hali devam ettiği sürece oluşan serbest radikallerin canlı üzerinde herhangi bir etkisi bulunmamaktadır. Bu denge halindeki durum herhangi bir nedenle bozulur veya bu bileşiklerin oluşum hızı yıkım hızını aşarsa oksidatif stres meydana gelir ve serbest radikallere bağlı hücre hasarı ortaya çıkar (Serafini ve Del Rio 2004). Bu yüksek reaktif radikallerin biri bir kez zincir reaksiyonu başlattıktan sonra etki, domino etkisi olarak devam eder. Bunların esas tehlikesi, bu yapıların hücre membranı ve DNA gibi önemli hücresel komponentlerle reaksiyona girmeleriyle meydana gelir. Hücreler bu durumda ya fonksiyon kaybına uğrar ya da ölür (Ujang 2008).

Reaktif Oksijen Türleri

Süperoksit: O_2^-

Hidroksil: OH^-

Peroksil: ROO^-

Alkoksil: RO^-

Nitrik oksit: NO

Hidrojen Peroksit: H_2O_2

Hipokloröz asit: HOCl

Ozon: O_3

Singlet Oksijen: O_2

Peroksinitrit: $ONOO^-$

Serbest O_2 radikallerinin kaynakları

Endojen kaynakları;

Ksantin oksidaz,

Mitokondriyal elektron transport sistemi,

Mikrozomal elektron transport sistemi,

Kloroplast elektron transport sistemi,

Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemi,

Oksidan enzimler,

Triptofan dioksijenaz,

Galaktoz oksidaz,

Siklooksijenaz,

Lipooksijenaz,

Fagositik hücreler,

Nötrofiller,

Monosit ve makrofajlar,

Endotelyal hücreler,

Eozinofiller,

Otooksidasyon reaksiyonları.

Eksojen kaynakları;

İlaç oksidasyonları (parasetamol, karbontetraklorür),

Redoks potansiyelli maddeler (paraquat, doksarubisin, alloksan),

Güneş ışığı,

Sigara,

İyonize radyasyon,

Isı şoku,

Okside glutatyon (Freeman ve Crapo 1982).

Serbest radikallerin etkileri

Serbest radikaller özellikle proteinler, polisakkaritler, nükleik asitler ve çoklu doymamış yağ asitleri olmak üzere tüm biyolojik maddelerle reaksiyona girerler.

Lipidler

Biyomoleküller içerisinde serbest radikallere karşı en hassas olanlar lipidlerdir. Hücre dışında meydana gelen serbest radikaller hücre içi diğer komponentlere ulaşabilmek için hücre membranından geçer ve bu sırada hücre membranında toksik reaksiyonları başlatır. H_2O_2 membranları su molekülü gibi geçer, süperoksit radikali ise hücreye transmembran anyon kanallarından geçer. Hücre yüzeyi yüksek miktarda hidrojen iyonu içerdiği için süperoksit radikali hidrojen iyonu ile birleşerek perhidroksil radikali (HO_2^-) oluşturur. HO_2^- radikali süperoksit radikalinden daha kuvvetli bir oksidandır. Lipidlere ve proteinlere hidrofobik uçlardan bağlanarak toksik etki gösterirler (Erenel ve ark 1992).

Lipid peroksidasyonu serbest radikaller tarafından tetiklenen ve membrandaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir süreçtir. Lipid peroksidasyonu başladıktan sonra otokatalitik zincir reaksiyonları şeklinde devam etmektedir (Sinclair ve ark 1990). Lipid peroksidasyonu üç aşamada oluşur;

1) Başlangıç: Hidroksil radikali (OH^-) ve süperoksit radikali (O^-**)** gibi primer bir serbest radikalin doymamış yağ asidinin yan zincirindeki metilen karbonundan bir hidrojen atomu çıkarmasıyla başlar ve lipid radikalleri (L^-) oluşur. Lipid radikalleri O_2 ile tepkimeye girerek lipid peroksit radikallerini (LO^-) oluşturur.

2) İlerleme: Lipid peroksit radikalleri çevredeki bir doymamış yağ asidi molekülünden bir hidrojen atomu alarak başka bir lipid radikali reaksiyonu gerçekleştirir ve kendisi lipid hidroperokside indirgenir (LOOH).

3) Sonlanma: İki lipid radikalinin birbiriyle tepkimeye girmesi veya lipid radikalinin bir antioksidanla tepkimeye girmesi ile gerçekleşir (Gutteridge 1995).

Lipid peroksidasyonunda oluşan peroksitler kendileri de serbest radikal olarak görev yaparak otokatalitik reaksiyonu devam ettirir. Bu da doymamış yağ asitlerinin daha fazla kaybına neden olarak aşırı membran hasarına sebep olur (Akkuş 1995).

Oksijen radikallerinin ölçümü; yüksek reaktiviteleri, yarı ömürlerinin kısa oluşu ve düşük konsantrasyonda bulunmaları nedeni ile zordur. Lipid peroksidasyonuna bağlı doku yıkımını ölçmek için lipid hidroperoksitlerin, konjuge dienlerin ve peroksi radikaller gibi öncüllerin, lipid hidroperoksitlerin, alkanlar ve aldehitler gibi yıkım ürünlerinin ölçümü yapılmaktadır. Malondialdehit (MDA) bu yıkım ürünlerinden biridir (Del Rio ve ark 2005).

Malondialdehid

Lipid peroksidasyonunun en önemli sonuçlarından birisi artan MDA üretimidir. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonuyla MDA meydana gelir (Harborne ve Williams 1992). MDA'nın en önemli öncülleri hidroperoksi epidioksitler (endoperoksitler) ve 1,3 dihidroperoksitlerdir (Tanrıverdi 2005). Lipid peroksidasyonuyla oluşan MDA, membran yapılarının çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur. Bu olay deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrensek membran özelliklerini değiştirmektedir. MDA, diffüze olabildiginden DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girmektedir (Akkuş 1995). Aldehit yapılı bileşimler uzun bir yaşam süresine sahiptir. Böylelikle hücre membranlarına doğru geçebilirler ve bu sayede lipit peroksidasyonunun etkileri kan, organ ve dokularda da görülebilir (Cobanoglu ve ark 2011).

MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir fakat lipid peroksidasyon derecesi ile iyi korelasyon göstermektedir ve lipid peroksidasyonunun son ürünü olması açısından güvenilir bir göstergedir.

Lipid peroksidasyonuna bağlı MDA birikimi daha çok reperfüzyon fazında gerçekleşmektedir Lipid peroksitlerin ölçülmesinde sıklıkla MDA'nın tiyobarbütirik asitle ölçülmesi kullanılmaktadır (Aka ve ark 1997).

İskemi reperfüzyon hasarının derecesini belirlemek ve teyit etmek için over dokusunda MDA düzeyleri ölçülmüştür ve iskemi reperfüzyon gruplarındaki over doku MDA düzeylerinin kontrol gruplarına göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu sonuç iskemi reperfüzyonun over dokusunda oksidatif hasara neden olarak lipid peroksidasyonuna yol açtığını göstermektedir (Çelik 2014).

Cadirci ve ark (2010)'nın yaptığı over I/R hasarında atorvastatinin etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada iskemi reperfüzyon grubunda, over dokusunda MDA'nın arttığı bulunmuştur.

Proteinler

Serbest radikaller, yapısal proteinlerin fonksiyonunu ve enzim aktivitesini etkileyerek birçok proteinin yapısında bozulmaya neden olabilir (Devasagayam ve ark 2004). Serbest radikallerden etkilenme derecesini amino asit içerikleri belirler. Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküller serbest radikaller ile daha yüksek reaktiviteye sahip olduğundan serbest radikallerle daha kolay reaksiyona girer (Devasagayam ve ark 2003).

DNA

Serbest radikaller DNA ile reaksiyona girerek molekülün yapısında bulunan şeker parçasındaki hidrojen atomlarının değişimine sebep olabilir. Pürinlere serbest radikal saldırıları sonucu 8-hidroksi deoksiguanozin (8-OHdG) ve 8-hidroksi deoksiadenozin formamidopirimidin ürünleri oluşmaktadır. Serbest radikal atakları ayrıca polisentetaz enziminin (ADP-riboz) aktivasyonuna neden olur.

Bu enzimin aktivasyonu programlanmış hücre ölümüne ve DNA'nın parçalanmasına yol açar (Devasagayam ve ark 2004).

Tüm pürin ve pirimidin bazları arasında, oksidasyona en eğilimli baz, en düşük iyonizasyon potansiyeline sahip olduğu için guanindir (Wu ve ark 2004). Birçok karbonhidrat gibi 2-deoksiriboz da Fe^{+2} bağlama özelliğine sahip olduğundan Fenton reaksiyonu ile oluşan OH^- radikallerinden özellikle etkilenmektedir. Buna karşın Cu^{+2} iyonları özellikle DNA'nın guanin-sitozince zengin bölgelerine bağlanır ve guaninin H_2O_2 ile reaksiyonu sonucunda guanin baz hasarı oluşmaktadır (Burçak ve Andican 2004). Bu nedenle oksidatif hasara en fazla maruz kalan baz guanin olup en yaygın olarak ölçülen baz hasarı 8-OHdG'dir ve oksidatif DNA hasarının belirteci olarak kabul edilir (Eken 2012). OH^-'nin guanin ile etkileşimi C8-hidroksiguanin veya bunun nükleosit formu olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozinin oluşumuna yol açar. Başlangıçta hidroksil radikali eklenme reaksiyonu radikal katkılarının üretimine yol açar, sonra bir elektron soyutlaması ile 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) oluşur (Gökmen 2003).

8-OHdG

Oksidatif hasarın bir belirteci olan 8-OHdG'nin buluşu ilk defa 1984'te Kasai ve Nishimura tarafından pişirilmiş gıdaların modeli olarak ısıtılmış glikozda mutajenleri izole etme ve çalışma girişimlerinde bildirilmiştir (Burçak ve Andican 2004). Modifiye bir baz olan 8-OHdG, reaktif oksijen türlerinin DNA'da yaptığı oksidatif baz hasar ürünlerinden birisi olup oksijen radikali atakları sonucu oluşan, oksidatif DNA hasarının duyarlı bir göstergesidir.

DNA replikasyonu sırasında Guanin-Sitozinden Adenin-Timine dönüşüme neden olarak mutasyona eğilimi artırır. Bu nedenle 8-OHdG ölçümü, DNA'daki oksidatif hasarın doğrudan göstergesi olarak kabul edilir ve oksidatif DNA hasarını belirlemede en sık kullanılan yöntem olarak uygulanır (Atmaca ve Aksoy 2009).

Daha önce yapılan bir çalışmada ovaryumda iskemi-reperfüzyona bağlı olarak 8-hidroksiguanin düzeylerinin önemli şekilde arttığı rapor edilmiştir (Demiryilmaz ve ark. 2013). Yine Kurt ve ark (2013) tarafından gerçekleştirilen bir araştırmada ovaryum iskemi-reperfüzyonu sonucu DNA hasarının göstergesi olan 8-hidroksi-2-deoksiguanin/guanin düzeylerinin önemli oranda yükseldiği gösterilmiştir. İskemi reperfüzyon tarafından üretilen oksijen serbest radikallerinin DNA'ya saldırdığı ve gebe ratlarda fetus beyninde baz modifikasyonlarına neden olduğu belirlenmiştir ve iskemi-reperfüzyon 8-OHdG seviyesinde artışla sonuçlanmıştır (Wakatsuki ve ark 1999). Rat ovaryumunda iskemi reperfüzyonla oluşan oksidatif stresin araştırıldığı bir çalışmada iskemi reperfüzyon grubunda DNA hasar ürünü olan 8-OHdG seviyesi anlamlı ölçüde fazla bulunmuştur (Yapca ve ark 2014).

Benzer şekilde Sahin Ersoy ve ark (2016) yaptıkları çalışmada ratlarda ovaryum torsiyon modelinde 8-OHdG konsantrasyonunu iskemi reperfüzyon grubunda anlamlı ölçüde fazla bulmuşlardır.

IL-6

IL-6 21-28 kDa ağırlığında ve 212 aminoasitten oluşmuş bir sitokindir (Park ve Pillinger 2007). IL-6; antijen ya da mitojen aktive T hücreleri, B hücreleri, monosit ve/veya makrofaj, fibroblastlar, endotel hücreleri, epitel hücreleri ve mast hücreleri gibi birçok hücre tarafından üretilmekte olup B hücreleri aracılığıyla immünglobülin üretimini uyarmaktadır. IL-6 akut faz yanıtında rol oynayan plazma proteinlerinin sentezi için hepatositleri uyarmaktadır. IL-6; ICAM-1, VCAM-1 ve E-selektin gibi adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırarak lökositlerin endotel hücre yüzeyine yapışmasına neden olarak adhezyonu artırırlar. IL-6, PMNL'lerin kemotaksisini artırmaktadır (Burtis ve ark 2006).

Travma veya stres sırasında IL-6 kan düzeylerinin yükselmesi nedeni ile sistemik inflamatuar cevabın göstergesi olarak kullanılmaktadır (Yao ve ark 1997). Kan dolaşımında sitokin üretimi kinetiğini araştırmak için iskemi reperfüzyon modeli

oluşturulan bir rat çalışmasında IL-6 seviyelerinin reperfüzyonda kan akımı sağlandıktan sonra 4 saatte pik yaptığı görülmüştür (Seekamp ve ark 1993). Abdominal ağrı ile gelen ve ultrasonografik yöntemlerle over kisti olduğu tespit edilen hastalarda over torsiyonu tanısını koymada serum IL-6 seviyeleri %85.7 duyarlılıkta kullanılmaktadır (Christopoulos ve ark 2013). IL-6 düzeyinin over torsiyonu tanısının konulmasında spesifik bir test olabileceği de belirlenmiştir (Cohen ve ark 2001). Over torsiyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda serum IL-6 düzeylerinin arttığı ve over torsiyonu ile IL-6 düzeyleri arasında önemli bir ilişkinin bulunduğu gösterilmiştir (Cohen ve ark 2001). IL-6 travmadan sonraki ilk saatlerde TNF-α ve IL-1 tarafından indüklenmesi sonucu salınmaktadır. Yarı ömru her iki sitokinden daha uzundur. 60 dakikada dolaşımda belirlenmeye başlar, 4-6 saatte pik yaparak 10 gün dolaşımda kalır. IL-6 serumda daha uzun süreli yüksek kaldığından IL-1 veya TNF-α'ya göre daha kolay bir şekilde ölçülebilmektedir (Dinarello 1997).

1.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

Hücrenin kendini korumak için geliştirdiği mekanizmalara antioksidan mekanizmalar denir. Antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklı olabilir.

1.4.1. Endojen Antioksidanlar

Süperoksit dismutaz (SOD), Glutatyon peroksidaz (GPx), Glutatyon S-Transferaz (GST), Katalaz (CAT), Hidroperoksidaz, Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi (Valko ve ark 2007), Melatonin, Seruloplazmin, Transferrin, Hemoglobin, Bilirubin, Miyoglobin, Ferritin, Glutatyon (GSH), Sistein, Metiyonin, Ürat, Laktoferrin, Albümindir (Sener ve ark 2002).

1.4.2. Eksojen Antioksidanlar

Eksojen antioksidanlar arasında A vitamini, C vitamini, E vitamini, β-karoten, butile hidroksitoluen, propil galate, butile hidroksianisol, sodyum benzoat, etoksiquin, Fe-süperoksitdismutaz, β-blokerler, kalsiyum antagonistleri, sülfidril içeren anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri sayılabilir (Akkuş 1995).

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler:

1. Toplayıcı etki: Serbest oksijen radikallerini tutma ya da çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine "toplayıcı etki" denilmektedir. Bilirubin bunun önemli örneklerinden birisidir.

2. Bastırıcı etki: Serbest oksijen radikallerine bir hidrojen aktararak aktivitelerini etkileyerek baskılayıcı bir etki oluştururlar. Vitaminler, bu tarz bir etkiye sahiptir (Collard ve Gelman 2001).

3. Zincir kırıcı etki: Serbest oksijen radikallerine bağlanarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki zincir kırıcı etkidir. Bilirubin, hemoglobin, serüloplazmin ve mineraller bunun örneklerini oluşturur (Ozkan ve ark 2009).

4. Onarıcı etki: Onarıcı etki üzerindeki mekanizmalar tam açıklanmamıştır. Hasar görmüş DNA molekülünü tamir eden enzimler bunun örneğini oluşturmaktadır (Burkitt ve Duncan 2000).

Antioksidanlar enzimatik ve non enzimatik olarak iki kategoriye ayrılır. Savunmada daha etkili olanlar enzimatik antioksidan sistemlerdir. Bunlar; SOD, CAT, GPx ve glutatyon redüktazdır (GR) (Halliwell 1995). Enzimatik olmayan antioksidanlar ise E vitamini, C vitamini, β-karoten, glutatyon, ürik asit, sistin, albumin, bilirubin, seruloplazmin, transferin, laktoferrin, ferritin, kreatinin ve östrojendir (Akkuş 1995). Enzimatik antioksidanlar SOR oluşumunu önlerken, α-tokoferol, ubiquinone, β-karoten, ürat, sistein, askorbat zincir kıran ajanlardır.

Antioksidanlar yerleşim yerlerine göre hücre içi, membran, hücre dışında bulunur.

Hücre içi antioksidanlar

Glutatyon

Glutatyon peroksidaz

Glutatyon S-Transferaz

Süperoksit dismutaz

Katalaz

Sitokrom oksidaz

Glutatyon S-transferaz

Glutatyon S-transferaz ailesi hücre stoplazmasında ve endoplazmik retikulumunda bulunan, selenyum bağımlı olmayan bir enzim grubudur. GST'ler, araşidonik asit ve lineolat hidroperoksidleri gibi yapılara karşı savunma oluştururlar (Akkuş 1995).

Glutatyon

GSH tüm vücut organlarında özellikle de karaciğerde glutamat, sistein ve glisinden sentezlenir ve tüm memeli dokularında bulunmaktadır. Glutatyon hücrede antioksidan savunmada görev alır. Aktif grubu sistein kalıntısındaki tiyol (-SH) grubudur. Serbest radikallerin ortaklanmamış elektronu ile bağlanarak radikal oluşumunu azaltmaktadır (Meister ve Larsson 1989).

Hücrelerde total glutatyon, serbest veya proteinlere bağlı şekildedir. Serbest glutatyon çoğunlukla indirgenmiş yapıdadır ve oksidatif streste okside forma dönüştürülür (Chai ve ark 1994).

Glutatyon, reaktif oksijen türlerine karşı baskılayıcı role sahiptir. Görevi gereği serbest radikalleri süpürür ve H_2O_2'yi azaltır. Hücrelerde oksidatif stresin etkisiyle oluşan H_2O_2, GPx enzimi ve GSH'ın etkisiyle suya dönüştürülür. Ancak indirgenmiş glutatyon (GSH), okside glutatyona (GSSG) dönüşür. GSSG daha sonra GR ile yeniden GSH'a dönüştürülür.

$$2GSH + H_2O_2 \xrightarrow{GPx} GSSG + 2H_2O$$

$$GSSG + NADPH \xrightarrow{GR} 2GSH + NADP$$

Glutatyon bağımlı enzimler, hücrelerin korunmasındaki ikinci basamağı oluştururlar. Bunlar serbest radikallerin yayılmasını engellemenin yanısıra reaktif oksijen türleri tarafından üretilen ürünlerin detoksifikasyonunu da sağlarlar (Hayes ve McLellan 1999). Hücre içerisinde belirli miktarlarda bulunan GSH'ın, protein ve DNA sentezi, transport, enzim aktivitesi, metabolizma ve oluşan oksidatif strese karşı hücre savunması gibi çok önemli biyolojik fonksiyonları olduğu bilinmektedir (Meister ve Anderson 1983). Glutatyonun organizmada üstlendiği biyolojik görevler şunlardır;

Endojen peroksitler ve serbest radikallerin yıkımını sağlar.

Zararlı bazı bileşiklerin detoksifikasyonunu sağlar.

Aminoasitlerin membran transportunda yer alır.

Proteinlerdeki tiyol grubunu korur.

Bazı enzimler için koenzim görevi yapar.

Disulfit değişim reaksiyonlarına katılır (Yazıhan 2007).

GSH, oksidatif stresin neden olduğu zararlara karşı korunmada yer alan ana enzimlerdendir ve iskemi durumunda GSH miktarının önemli oranda azaldığı görülmektedir (Cadirci ve ark 2010). Yapca ve ark (2014) yaptığı çalışmada iskemi reperfüzyon uygulanan sıçanlarda over dokusu GSH konsantrasyonlarının anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir.

Glutatyon peroksidaz

Glutatyon peroksidaz (GPx), H_2O_2'yi suya dönüştürerek etkisiz hale getiren bir enzimdir. GPx bu reaksiyon için indirgenmiş glutatyonu substrat olarak kullanır ve reaksiyon sonucunda su molekülü ile oksitlenmiş glutatyon (GSSG) oluşur.

$H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$

$LOOH + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O + LOH$

Aktivitesi için Se mineraline ihtiyaç duyar (Kaminski ve ark 2002).

Süperoksit dismutaz

Patolojik ya da fizyolojik süreçte, metabolizma sırasında ya da hipoksi sonrasında ortamdaki O_2 miktarındaki ani artışla birlikte O_2'den ksantin oksidaz enzimiyle süperoksit (O_2^-) sentezlenmektedir. Süperoksit dismutaz, süperoksitin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlar. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe etmektedir (Bozkurt 2009).

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2^-$$

Bu reaksiyon "oksidatif strese karşı ilk savunma" şeklinde adlandırılmaktadır. Bu sistemle hücrenin bölümlerindeki süperoksit düzeyleri kontrol altında tutulmaktadır (Collard ve Gelman 2001). Bu reaksiyon spontan olarak da meydana gelebilirken SOD ile katalizlendiğinde reaksiyon hızı 4000 kat artar (Manfred 2000).

SOD oksijen tüketen tüm organizmalarda bulunurken oksijen kullanımı yüksek olan dokularda SOD aktivitesi artmaktadır. SOD enziminin hücre dışı aktivitesi oldukça düşük seviyededir (Ceballos ve ark 1992).

Süperoksit dismutaz fagosite edilmiş bakterilerin hücre içinde öldürülmesini de sağlar (Barber ve Harris 1994).

SOD'un 3 alt tipi bulunur;

Sitozolik Cu/ZnSOD: Sitozolde ve az miktarda da mitokondride membranlar arası boşlukta bulunmaktadır. Sitozolik Cu/ZnSOD enzimi 32 kDa molekül ağırlığında olup iki alt birimden oluşmaktadır. Alt birimler disülfür bağları ile bağlanmışlardır. Enzimin aktivitesinden Cu, stabilitesinden ise Zn sorumludur (Furukawa ve ark 2004).

Ekstraselüler SOD (EC-SOD): EC-SOD, Cu ve Zn içermesine karşın sitozolik SOD'dan farklıdır. EC-SOD sadece fibroblast ve endotel hücreleri gibi bir kaç hücre tipi tarafından sentezlenir. EC-SOD ekstrasellüler sıvılarda tespit edilen major SOD'dur.

Mn-SOD: 40 kDa molekül ağırlığında olup, her biri bir Mn içeren dört alt birimden oluşmaktadır (Young ve Woodside 2001). Mitokondride elektron transport zincirinde oluşan O_2^- mitokondriyal matrikste yüksek miktarda bulunan Mn-SOD ile H_2O_2'ye dönüştürülür (Tyler 1975).

Yapılan çalışmalarda deneysel over I/R modellerinde torsiyon/detorsiyon grubunda plazma SOD aktivitesinin önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur (Sahin Kir ve ark 2008). Cadirci ve ark (2010) yaptığı çalışmada ovaryumda 3 saatlik iskemi ve bunu takiben 3 saatlik reperfüzyon süresi sonunda SOD aktivitesinde azalma meydana geldiği gözlemlenmiştir.

Deniz ve ark (2004)' nın yaptıkları çalışmada iskemiden 24 saat sonra bütün gruplarda serebral SOD aktivitesi yaklaşık %17 oranında azalırken iskemiden 72 saat sonra enzim aktivitesi önemli ölçüde artmıştır. SOD aktivitesinin iskemiden sonra ilk 24 saatte azalması ve daha sonra 72 saatte artması SOR'daki artışa karşı beyin antioksidan savunma sisteminin tepkisi olarak değerlendirilmektedir.

Katalaz

Katalaz hücrede; glikolat oksidaz, ürat oksidaz gibi birçok enzim içeren peroksizomlarda bulunur. Katalaz hidrojen peroksiti, suya indirgemek ile görevlidir. Elektron verici olarak bazı organik molekülleri ya da H_2O_2'nin kendisi kullanılır. Katalaz, H_2O_2 oluşum hızının düşük olduğu durumlarda peroksidatif tepkimeyle H_2O_2 oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkimeyle hidrojen peroksiti su ve oksijene dönüştürür.

$H_2O_2 + AH_2 \rightarrow 2H_2O + A$ (peroksidatif)

$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ (katalitik)

Sitokrom oksidaz

O_2'nin H_2O'ya indirgenmesi esnasında üretilen O_2^-, OH^- ve H_2O_2 gibi reaktif O_2 moleküllerin oluşumunun önlenmesini sağlar (Guttridge 1995).

Çizelge 1.4.1: Membran Antioksidanları (Guttridge 1995).

Membran Antioksidanları	**Özellikleri**
ß-karoten	Radikal tutucu ve singlet oksijen giderici
Vitamin E	Zincir kırıcı
Koenzim Q	Mitokondriyel enerji metabolizmasında bir antioksidan olarak rol alır.

Çizelge 1.4.2: Hücre dışı Antioksidanlar ve Özellikleri (Guttridge 1995).

Hücre dışı Antioksidanlar	**Özellikleri**
Transferin	Ferrik iyonları bağlar.
Laktoferrin	Düşük pH'da ferrik iyonları bağlar.
Haptoglobin	Hemoglobini bağlar.
Hemopeksin	Hemi bağlar.
Albumin	Cu^{2+} ve hemi bağlar.
Seruloplazmin	Cu^{2+}'yi bağlar ve O_2^{-}'yi nötralize eder.
Bilirübin	ROO^{-}'ları yıkar.
Ürik asit	Radikalleri yıkar ve metalleri bağlar.
Glukoz	OH^{-}'ı yıkar.
Askorbik asit	OH^{-}'ı yıkar.

Oksidatif stres, serbest radikal üretiminin artışı ve antioksidan savunmanın azalması sonucu oluşur (Blumberg 2004).

1.4.3. Flavonoidler

15 C atomlu 2-fenil benzopiron (difenil propan) yapısından (C6-C3-C6) dolayı polifenoller olarak değerlendirilir (Bors ve ark 1990). Flavonoidlerin karakteristik özelliklerini bu heterosiklik halka belirler. Günümüzde bilinen 4000'den fazla değişik flavonoid bulunmaktadır. Birçok alt grupları olmakla birlikte, heterosiklik oksijen halkalarının yapısal farklılığına göre 6 temel flavonoid grubu vardır:

Flavononlar, flavonlar, flavonoller (kateşinler), isoflavonoidler, antosiyaninler ve flavanlar. Kersitrin, rutin ve kamferol flavonol yapısındaki flavonoidlerdir. Flavonoidlerin aktivitelerinin çeşitliliği çoğunlukla bu yapısal farklılıklardan ortaya çıkmaktadır (Peterson ve Dwyer 1995).

Flavonoidler çoğunlukla meyve, sebze, tıbbi ve aromatik bitkiler, fındık, fıstık gibi sert kabuklular, kırmızı şarap, çay ve bitkilerin kök, gövde, yaprak gibi kısımlarında bulunurlar (Cooray ve ark 2004). Havuç, narenciye, çilek, elma, frambuaz, brokoli, ginko bloba, siyah ve yeşil çay, maydanoz, soya fasulyesi, tahıllar, lahana, kabak, patates, domates, salatalık gibi sebze ve meyveler de flavonoidlerin zengin kaynaklarındandır (Fidan ve Dündar 2007).

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda flavonoidler için vitaminlerde olduğu gibi günlük alınması tavsiye edilen standart bir doz belirlenmemiştir (Itagakia ve ark 2010). Ancak normal diyetle beslenen bir yetişkinin günde ortalama 500mg/kg flavonoid aldığı çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (Williamson ve Holst 2008).

Flavonoidler antioksidan aktivitelerini; doğrudan radikal ürünleri yakalayarak, demir veya bakır gibi metalleri bağlayarak ya da ksantin oksidaz enzimini inhibe ederek gösterirler (Hanasaki ve ark 1994). Bu bileşikler, lipitlerin ve diğer biyomoleküllerin serbest radikallerce okside olmalarını engellemek amacıyla yapısında bulunan hidrojeni verebilmektedirler (Önenç ve Zümrüt 2005). Hemen her flavonoid radikal yakalayıcı özellik gösterirken, farklı flavonoidler farklı radikal tiplerini yakalamada daha başarılıdır. Örneğin, rutin ve epikateşin süperoksit radikalini yakalarken, luteolin hidrojen peroksit radikali için, antosiyanin grubu flavonoidler ise özellikle NO için yakalayıcı özellik göstermektedir (Hanasaki ve ark 1994).

Flavonoidlerin bir diğer etkisi enzim inhibisyonudur. Kamferol ve rutinin kuvvetli birer ksantin oksidaz enzimi inhibitörü olduğu bilinmektedir. Flavonoidler ksantin oksidaz dışında yangı cevabının oluşmasında görevli siklooksijenaz ve

lipooksijenaz enzimlerini de inhibe etmektedir. Flavonoidler araşidonik asit metabolizmasındaki enzimleri inhibe eder ve komplement aktivasyonunu azaltarak genel yangısal cevabı da hafifletirler (Cotelle 2001).

Lökosit infiltrasyonu, reaktif oksijen türleri üretimine katkıda bulunduğu için I/R hasarı gibi birçok patolojik olayın gelişiminde rol oynar. Flavonoidler lökosit hareketliliğini ve degranülasyonunu azaltarak lökositlerden kaynaklanan reaktif oksijen türleri oluşumunu engellemektedir (Harborne ve Williams 2000). Flavonoidlerin çoğu GST'yi aktive etme yeteneğine de sahiptir (Coşkun 2005).

Flavonoidlerin antioksidan özelliklerinden başka antitümör, antiviral, antitrombotik, antihipertansif, antialerjik, antiinflamatuar, antiapoptik ve antikanserojen etkileri rapor edilmiştir (Nandave ve ark 2004). Tüm flavonoidler 3'-4'dihidroksi konfigürasyonu ile antioksidan aktiviteye sahipken 5' pozisyonda ek OH- grubuna sahip olmalarında ise antioksidan aktiviteleri daha güçlü hale gelmektedir (Fidan ve Dündar 2007).

Çalışmamızın amacı sentetik flavonoid olan 3',4'-dihydroxyflavonol (DiOHF)'un deneysel ovaryum iskemi reperfüzyon hasarında lipid peroksidasyonuna karşı oluşturacağı etkiyi belirlemektir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Deney Hayvanları

Mevcut çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinin etik kurul onayı (19.04.2016 tarih ve Karar sayısı: 2016-18) ile aynı merkezden temin edilen ortalama olarak 250 gr ağırlığında olan 44 adet dişi sıçan üzerinde gerçekleştirildi. Sıçanlar randomize olarak eşit sayıda iki tane altışarlı, dört tane de sekizerli olmak üzere toplam altı gruba ayrıldı. Bütün sıçanlara ısı ve ışık miktarları kontrol edilen odalarda su ve yemleri ad libitum olarak verildi. Çalışmada hayvanlar ketamin hidroklorür (60 mg/kg) ve Xylasine (5 mg/kg) kullanılarak anestezi edildi. Çalışmada deney grupları aşağıda belirtildiği şekilde oluşturuldu:

1-Genel kontrol grubu (n=6): Bu gruptaki hayvanlara herhangi bir uygulama yapılmadan periton içi (i.p) olarak anestezi edildikten sonra öldürülen hayvanlardan kan ve over dokuları alındı.

2-Sham grubu (n=6): Deney hayvanları anestezi edildikten sonra ovaryum bölgesi cerrahi olarak açıldı ve kapatıldı. Daha sonra yüksek doz anestezik verilerek öldürülen hayvanların kan ve over dokuları alındı.

3-İskemi-reperfüzyon grubu (n=8): Anestezi verilen hayvanların ovaryum bölgesi cerrahi olarak açıldı sol ovaryumları bağlanarak iskemi sağlandı. 2 saat iskemiyi takiben yeniden kan akımına izin verilerek 2 saat reperfüzyon uygulandı. Daha sonra yüksek doz anestezik verilerek öldürülen hayvanların kan ve over dokuları alındı.

4-İskemi-reperfüzyon+DiOHF grubu (n=8): Anestezi verilen hayvanların ovaryum bölgesi cerrahi olarak açıldı sol ovaryumalarına 2 saat iskemi yapıldı. 2 saat iskemiyi takiben yeniden kanlanmayla 2 saat reperfüzyon uygulandı. Reperfüzyon sonrası 1 ml DiOHF çözeltisi i.p. olarak verildi ve 2 saat sonra öldürülerek kan ve doku örnekleri alındı.

5-İskemi+DiOHF+reperfüzyon grubu (n=8): Anestezi verilen hayvanların ovaryum bölgesi cerrahi olarak açıldı sol ovaryumaları bağlanarak iskemi sağlandı. 2 saat iskemiyi takiben 1 ml DiOHF çözeltisi i.p. olarak verildi ve kanlanmayla 2 saat reperfüzyon sağlandı. Daha sonra öldürülen hayvanların kan ve over dokuları alındı.

6-DiOHF+iskemi-reperfüzyon grubu (n=8): Anestezi verilen hayvanlara iskemiden iki saat önce 1 ml DiOHF çözeltisi i.p. olarak verildi. Sonra ovaryum bölgesi cerrahi olarak açıldı sol ovaryumlarında 2 saat iskemiyi takiben 2 saat reperfüzyon sağlandı. Daha sonra öldürülen hayvanların kan ve over dokuları alındı.

2.2. 3',4' DiOHF Uygulaması

DiOHF (Indofine Chemical Co. U.S.A.) 4 ml dimethil sülfoksitte çözdürülmesini takiben 200 ml olarak polietilen glikol ve su ile karıştırıldı. 30 mg/kg dozunda i.p. olarak hayvanlara uygulandı (Wang ve ark. 2004).

2.3. Kan ve Dokuların Alınması

Anestezi edilen hayvanlardan kardiyak ponksiyonla 3-4 ml kadar kan tüplere alındı. Deney sürelerinin sonunda anestezi etkisindeki ratlar kalplerinden kan alındıktan sonra servikal dislokasyon ile öldürüldü. Hayvanlardan alınan ovaryum doku örnekleri histopatolojik değerlendirme için %10'luk formol çözeltisine konulup +4ºC de muhafaz edidi. Ovaryum dokusu, eritrosit ve plazma örnekleri analiz yapılıncaya kadar -80ºC'de muhafaza edildi. Hayvanlardan alınan kan ve ovaryum dokusu örneklerinde GSH, SOD, MDA, 8-OHdG ve ayrıca alınan plazma örneklerinde IL-6 düzeyleri belirlendi.

2.4. Doku Homojenizasyonunun Yapılması

Analizi için doku tartıldıktan sonra tüplere konuldu ve +4ºC'de Misonix's Microscan ultrasonic doku parçalayıcısında 150 mM potasyum klorür (KCL)'de %10'luk homejenat oluşacak şekilde parçalandı. Elde edilen homojenatlar 3000 devirde 15 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra süpernatant ayrılıp tüplere konuldu.

2.5. Biyokimyasal Analizler

2.5.1. Protein Tayini

Protein tayini biüret metoduyla yapıldı. Doku tartıldıktan sonra tüplere konuldu ve 4ºC'de Misonix's Microscan ultrasonic doku parçalayıcısında 150 mM KCl'de %10'luk homejenat oluşacak şekilde parçalandı. Elde edilen homojenatlar 3000 devirde 15 dakika süreyle santrifüj edildi. 50µl süpernatant üzerine 1ml sodyum sülfat ilave edilmesinin ardından 1ml biüret ayıracı eklendi ve 5 dakika sonra 50µl distile su, 1ml sodyum sülfat ve 1ml biüret ayıracının ilave edilmesiyle hazırlanan köre karşı okutuldu.

Biüret ayıracı için 2,5gr bakır sülfat ile 10gr sodyum potasyum tartarat bir miktar distile suda çözülüp üzerine 2.5N sodyum hidroksit (NaOH)'ten 350 ml ilave edilip bu karışım distile suyla 1lt'ye tamamlandı. 2.5N NaOH için 50gr NaOH distile su ile 500ml'ye tamamlandı. Sodyum sülfat için 20gr sodyum sülfat alınarak 100ml distile suyla seyreltildi.

Değerler gr/dl olarak ifade edildi. Nmol/gram protein cinsinden aşağıda gösterildiği gibi hesaplandı.

HESABI: A = a x b x c

c = A / a x b

c = [A / 1.56 x 105 cm-1 M-1 x 1 cm] x dilüsyon faktörü

c = (A / 1.56 x 105 M-1) x 17

c= A x 108.9 nmol/mol şeklindedir.

2.5.2. Doku MDA Seviyelerinin Belirlenmesi

Doku MDA düzeyi Uchiyama ve Mihara metoduyla yapıldı. Dokular +4ºC'de doku parçalayıcısında 150 mM KCl'de %10'luk homojenat oluşacak şekilde parçalandı. Homojenize dokudan 2 ml alınarak üzerine sırasıyla 2 ml %8'lik $HClO_4$ ilave edilerek 3000 devirde 15 dakika santrifüj yapıldı. 0,5 ml süpernatant'a 3ml %1'lik H_3PO_4 ve 1 ml % 0,675'lik TBA ilave edilerek +90ºC'lik su banyosunda

45 dakika inkübasyon yapıldı. Karışımın soğutulmasından sonra üzerlerine 4 ml n-bütanol ilave edildi ve n-bütanole karşı 532 nm'de okundu. Konsantrasyon c=108.9A olarak sağlandı. Sonuç nmol/g protein şeklinde verildi (Mihara ve Uchiyama 1978).

2.5.3. Plazma MDA Düzeylerinin Belirlenmesi

EDTA'lı tüpe alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi ve sonrasında plazmaları ayrıldı. Bir deney tüpüne 2,5 ml %10'luk TCA (tricholoroessigaure krist., Merck katalog no: 818 K02907810) üzerine 0,5 ml plazma numunesi alındı. Vortekslenip tüplerin ağızları kapatıldı. +90^{o}C'lik su banyosunda 15 dakika inkübasyon uygulandı. Soğuk su altında soğutulup spektrofotometrede 532 nm'de, köre karşı absorbansları okundu. Sonuçlar nmol/ml olarak verildi. Kör, deney başlangıcından itibaren kör tüpüne plazma yerine aynı miktarda distile su konulup aynı işlemlerin yapılmasıyla hazırlandı. Değerler nmol/ml olarak verildi.

2.5.4. Doku GSH Düzeylerinin Belirlenmesi

GSH tayini için doku +4^{o}C'de 150 mm KCl'de %10'luk homojenat oluşacak şekilde homojenizasyon yapılarak 3000 devirde 15 dakika süreyle santrifüj edildi. Örneklerin GSH miktarları Ellman's metoduyla ölçüldü. Değerler mg/gr protein şeklinde verildi (Ellman 1959).

2.5.5. Eritrosit GSH Düzeylerinin Belirlenmesi

Eritrosit GSH ölçmek amacıyla EDTA'lı tüplere alınan kan numuneleri 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Sonrasında plazmaları ayrıldı. Eritrosit numunelerimiz 3 kez %0,9'luk serum fizyolojikle yıkandı. Elde edilen yıkanmış eritrosit numunelerinden 50µl alındı ve üzerlerine sırasıyla 450µl distile su, %10'luk sülfosalisilik asitten 500µl eklendi. Karışım 1 saat buzda bekletildi ve 4000 devirde 3 dakika santrifüj edildi. Sonra süpernatantın 200µl'si üzerine sırasıyla fosfat buffer (8 ml), 1 N NaOH (78 µl) ve Ellman solüsyonu (100µl) eklendi.. 5 dakika sonra spektrofotometre cihazında 412nm'de reagant tüpünde distile suya karşı absorbansları okundu. GSH standardı 15.34mg/100 ml olarak ve 15.34 mg

indirgenmiş glutatyonun (Sigma, katalog no: G-4251) 1 nm sodyum EDTA'nın 100 ml'sinde çözdürülmesiyle hazırlandı (Atroshi ve ark 1981). Sonuçlar Mmol/gr Hb olarak verildi.

2.5.6. Eritrosit ve Dokuda SOD Düzeylerinin Belirlenmesi

SOD düzeyleri Cayman marka ticari kit kullanılarak ölçüldü (Katalog No: 706002).

Reaktiflerin Hazırlanması

*Assay Buffer: 3 ml assay buffer 27 ml distile su ilave edilerek 10 katına dilüe edildi. +4C'de muhafaza edildi.

*Sample Buffer: 2 ml sample buffer 18 ml distile su ilave edilerek 10 katına dilüe edildi. +4C'de muhafaza edildi.

*Radikal Detector: 50µl tetrazolium salt çözeltisine 19.95 ml Assay Buffer ilave edildi (2 saat stabildir).

*Ksantin Oksidaz: 50 µl enzime 19.5 ml sample buffer ilave edildi. (Buzda 1 saat stabildir).

Standart Hazırlanması

Şişe 100 µl bovine eritrosit SOD içermektedir.

	SOD	BUFFER
Standart A	0	1000
Standart B	20	980
Standart C	40	960
Standart D	80	920
Standart E	120	880
Standart F	160	840
Standart G	200	800

Çalışma Prensibi

Herbir kuyucuğa 200 µl radikal detektör konuldu. Daha sonra 10 µl standart veya numune konuldu. 20 µl enzim ilave edildi. 30 dakika oda sıcaklığında shakerda

bekletildi. 440 nm' okutuldu. Eritrosit SOD değerleri U/gr Hb, doku SOD değerleri U/gr protein olarak verildi.

2.5.7. Plazma ve Dokuda 8-OHdG Düzeylerinin Belirlenmesi

8-OHdG düzeyleri Cayman marka ticari kit kullanılarak ölçüldü (Katalog No: 589320).

Reaktiflerin Hazırlanması

*Elisa Buffer: 90 ml distile su ilave edilerek 10 katına dilue edildi. +4ºC'de muhafaza edildi.

*Yıkama tamponu hazırlanışı: 5 ml şişe üzerine distile su ilave edilerek 2 lt'ye tamamlandı. 1 ml polisorbat 20 ilave edildi. +4ºC'de muhafaza edildi.

Standart Hazırlanması

100 µl standart çözeltiye 900 µl distile su ilave edildi. Bu çözeltinin konsantrasyonu 30ng/ml.(BULK STANDART) +4ºC'de 6 hafta stabildir.

		Konsantrasyonları
standart 1	100 µl bulk standart + 900 µl distile su	3,000 pg/ml
standart 2	400 µl standart 1 + 500 µl elisa buffer	1,333 pg/ml
standart 3	400 µl standart 2 + 500 µl elisa buffer	502,6 pg/ml
standart 4	400 µl standart 3 + 500 µl elisa buffer	263,4 pg/ml
standart 5	400 µl standart 4 + 500 µl elisa buffer	117,1 pg/ml
standart 6	400 µl standart 5 + 500 µl elisa buffer	52,0 pg/ml
standart 7	400 µl standart 6 + 500 µl elisa buffer	23,1 pg/ml
standart 8	400 µl standart 7 + 500 µl elisa buffer	10,3 pg/ml

*Tracer: 100 dtn DNA oxidatif damage AChE Tracer + 6 ml elisa buffer ilave edildi.

*DNA antibody: 100 dtn antikor + 6 ml elisa buffer ilave edildi

Çalışma Prensibi

Kör kuyucuk: Boş bırakıldı.

NSB: 100 µl elisa buffer ilave edildi.

Bo: 50 µl elisa buffer ilave edildi.

Standart kuyucukları: 50 µl standart ilave edildi.
Numune kuyucukları: 50 µl numune alınıp ilave edildi.
50 µl tracer TA ve kör kuyucuk hariç kuyucuklara ilave edildi.
Antibody'den 50 µl alınır ve TA, NSB ve kör kuyucuk hariç kuyucuklara ilave edildi.
Plate kapatılıp +4ºC'de 18 saat inkübe edildi.
Yıkama solusyonu ile 5 kez yıkandı.
Tüm kuyucuklara 200 µl Elleman ilave edildi.
5 µl tracer TA kuyucuğa ilave edildi.
Plate kapatılıp shakerda 90 dakika bekletildi.
420 nm'de okutuldu. Plazma 8-OHdG değerleri pg/ml, doku 8-OHdG değerleri ng/ml olarak verildi.

2.5.8. Plazmada IL-6 Düzeylerinin Belirlenmesi

Plazma İnterlökin-6 düzeyleri SunRed Elisa ticari test kiti (cat no: 210-11-0136) kullanırarak gerçekleştirildi. Analizlerde RAYTO trade mark elisa yıkayıcısı (Indian) kullanıldı ve 450 nm dalga boyunda BMG-LABTECH marka SPECTROstar Nano Elisa cihazında (Germany) okutuldu. Değerler pg/ml olarak verildi.

2.5.9. Eritrositte Hemoglobin Düzeylerinin Belirlenmesi

Hemoglobin tayini, Abcam marka Rat ELISA test Kiti (katalog no: ab157733) kullanılarak gerçekleştirildi.

2.6. Histopatolojik Değerlendirme

Hematoksilen eosin ile boyanan preparatlar Nicon Eclipse E400 ışık mikroskobu ile incelendi. Her preparatta uygun alanlar mikroskoba bağlı Nikon Coolpix 5000 fotograf makinası ile fotograflandı. Preparatlar fotograflanırken uzunluk kalibrasyonu Nikon micrometer microscope slide (Stage Micrometer Type A, MBM11100) görüntüsü de alındı. Tüm fotograflar PC ortamına aktarılarak Clemex Vision Lite 3.5 Görüntü Analizi Programı (Longueuil, Canada) kullanılarak incelendi. İlk olarak Nikon micrometer microscope slide görüntüsü ile uzunlık kalibrasyonu yapıldı. 239154,2 μm^2 lik alan seçilerek bu alandaki genişlemiş damar

yapıları ve lenfositler sayıldı. Ayrıca ödem de 1, 2, 3 pozitiflik olarak (subjektif) belirlendi.

2.7. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistik analiz SPSS istatistik programı kullanılarak gerçekleştirildi. Sonuçlar ortalama±standard sapma olarak tanımlandı. Gruplar arası karşılaştırma için Kruskal-Wallis variyans analizi kullanıldı ve $p<0.05$ seviyesi için Mann-Whitney U testi uygulandı. $p<0.05$ seviyesi istatistik olarak önemli kabul edildi.

3. BULGULAR

Deney gruplarına ait eritrosit GSH değerleri Çizelge 3.1'de verilmiştir. Gruplar arasındaki bu değerler karşılaştırıldığında DiOHF uygulanan grupların kontrol, sham ve iskemi-reperfüzyon gruplarına göre daha yüksek değerlere sahip olduğu görüldü ($p<0.001$).

Doku GSH seviyeleri incelendiğinde ise 4. ve 5. grupların en yüksek doku GSH düzeylerine sahip olduğu tespit edildi ($p<0.01$; Çizelge 3.1). Altıncı grupta doku GSH değerleri artmasına rağmen 4. ve 5. gruplarla önemli bir farklılığa sahip değildi. İskemi-reperfüzyun grubunda bu parametre kontrol ve sham gruplarına göre azalma göstermesine rağmen istatistik düzeyde önemli bir farklılık yoktu (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Eritrosit ve Ovaryum Doku GSH Düzeyleri.

Gruplar	**Eritrosit GSH (Mmol/gr Hb)**	**Doku GSH (mg/gr protein)**
1-Genel kontrol grubu (n=6)	2.67±0.96 B	6.94±2.09 B
2-Sham-Kontrol(n=6)	2.32±0.88 B	6.56±1.90 B
3-İskemi-reperfüzyon grubu (n=8)	2.05±0.96 B	5.34±2.59 B
4-İskemi-reperfüzyon+DiOHF grubu (n=8)	4.04±1.45 A	10.50±1.59 A
5-İskemi+DiOHF+reperfüzyon grubu (n=8)	4.87±0.27 A	10.75±2.75 A
6-DiOHF+iskemi-reperfüzyon grubu (n=8)	4.65±0.67 A	9.46±1.41 A

*****Aynı sütündaki farklı harfler istatistik öneme işaret etmektedir. Eritrosit ve doku GSH değerlerinin DiOHF uygulaması yapılan gruplarda arttığı görüldü ($p<0.001$).

Plazma MDA seviyeleri incelendiğinde iskemi-reperfüzyon uygulamasının gerçekleştirildiği 3. grupta bu değer en yüksek oranda belirlendi ($p<0.001$) (Çizelge 3.2). Bu parametre açısından kontrol ve sham grubu arasında bir farklılık yoktu. Ancak iskemi öncesi/sonrası ve iskemi+DiOHF+reperfüzyonun gerçekleştirildiği

gruplarda bu parametre plazmada önemli oranda bir düşme gösterdi ($p<0.001$). (Çizelge 3.2)

Ovaryum dokusundaki MDA seviyeleri değerlendirildiğinde yüksek değerin plazmaya benzer şekilde iskemi-reperfüzyonun yapıldığı 3. grupta olduğu tespit edildi. DiOHF uygulamasının yapıldığı gruplarda ise (grup 4, 5 ve 6) bu parametre önemli oranda düzelme göstererek kontrol değerleriyle benzerlik gösterdi ($p<0.001$). (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Plazma ve Ovaryum Doku MDA Seviyeleri.

Gruplar	**Plazma MDA (nmol/ml)**	**Doku MDA (nmol/gr protein)**
1-Genel kontrol grubu (n=6)	15.41±3.64 B	5.66±1.57 B
2-Sham-Kontrol (n=6)	16.31±1.75 B	5.37±1.77 B
3-İskemi-reperfüzyon grubu (n=8)	25.13±3.66 A	15.48±3.19 A
4-İskemi-reperfüzyon+DiOHF grubu (n=8)	8.92±3.42 C	7.65±3.24 B
5-İskemi+DiOHF+reperfüzyon grubu (n=8)	11.47±3.87 C	6.56±2. 53 B
6-DiOHF+iskemi-reperfüzyon grubu (n=8)	9.74±2.74 C	5.03±1.64 B

*****Aynı sütündaki farklı harfler istatistik önemi göstermektedir. Plazma ve doku MDA değeri iskemi-reperfüzyon grubunda diğer grupların tamamından yüksek olarak belirlendi ($p<0.001$). Plazma ve dokuda iskemi-reperfüzyona bağlı olarak artan MDA seviyeleriyle DiOHF uygulamasıyla önemli şekilde baskılandı ($p<0.001$).

Araştırmada antioksidan aktiviteyi belirlemek için önemli belirteçlerden olan SOD değerleri yine eritrosit ve ovaryum dokusunda belirlendi. Bu parametre eritrositte incelendiğinde iskemi-reperfüzyon grubunda önemli şekilde baskılanırken ($p<0.001$), 4. grupta (iskemi-reperfüzyon+DiOHF) önemli oranda arttığı görüldü ($p<0.001$). Grup 5 ve 6'da bu parametre kontrol ve sham gruplarıyla benzerlik gösterdi (Çizelge 3.3).

Doku SOD değerlerinin de 4. grupta en yüksek olduğu görüldü ($p<0.01$). Grup 3 ovaryum dokusu SOD seviyeleri ise en düşük oranda tespit edildi ($p<0.01$).

Yine 5. ve 6. gruplar iskemi-reperfüzyon grubuna göre artmış doku SOD değerlerine sahipti ($p<0.01$) (Çizelge 3.3)

Çizelge 3.3. Plazma ve Ovaryum Doku SOD Düzeyleri.

Gruplar	**Eritrosit SOD (U/gr Hb)**	**Doku SOD (U/g Protein)**
1-Genel kontrol grubu (n=6)	5.12±1.90 B	11.55±3.85 AB
2-Sham-Kontrol (n=6)	5.01±1.80 B	10.01±3.90 AB
3-İskemi-reperfüzyon grubu (n=8)	2.56±0.88 C	6.05±2.23 B
4-İskemi-reperfüzyon+ DiOHF grubu (n=8)	8.31±1.95 A	13.66±3.40 A
5-İskemi+DiOHF+reperfüzyon grubu (n=8)	5.16±1.82 B	11.64±3.80 AB
6-DiOHF+iskemi+reperfüzyon grubu (n=8)	6.02±2.58 B	13.36±3.31 AB

*Aynı sütündaki farklı harfler istatistik önemi göstermektedir. Eritrosit SOD seviyelerinin 3. grupta önemli şekilde baskılandığı ($p<0.001$) ancak DiOHF uygulamasının özellikle iskemi-reperfüzyon sonrası eritrosit SOD değerlerini büyük oranda artırdığı tespit edildi ($p<0.001$). Ovaryum dokusunda da iskemi-reperfüzyonu takiben oluşan baskılanmış SOD değerlerinin DiOHF takviyesiyle tekrar düzeldiği görüldü ($p<0.001$).

Çalışmada DNA hasarının göstergesi olarak ele alınan 8-hidroksi guanozin incelendiğinde bu parametrenin plazmada iskemi-reperfüzyon grubunda (grup 3) diğer gruplara oranla rakamsal bazda artış göstermesine rağmen istatistik oranda önemli bir farklılık yoktu ($p<0.56$) (Çizelge 3.4).

Ancak doku düzeyinde DNA hasarı incelendiğinde iskemi-reperfüzyon grubunda önemli bir artış belirlenirken ($p<0.001$), DiOHF uygulamasının DNA hasarını dokuda önemli şekilde baskıladığı tespit edildi ($p<0.001$) (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Plazma ve Ovaryum Doku 8-OHdG Düzeyleri.

Gruplar	**8-OHdG (pg/ml)**	**Doku 8-OHdG (ng/ml)**
1-Genel kontrol grubu (n=6)	19.07±4.66 B	1.47±0.47 B
2-Sham-Kontrol (n=6)	19.80±3.27 B	1.38±0.37 B
3-İskemi-reperfüzyon grubu (n=8)	24.02±3.82 AB	2.13±0.47 A
4-İskemi-reperfüzyon+ DiOHF grubu (n=8)	19.05±2.95 B	0.92±0.22 C
5-İskemi+DiOHF+reperfüzyon grubu (n=8)	19.08±4.07 B	0.83±0.31 C
6-DiOHF+ iskemi-reperfüzyon grubu (n=8)	18.15±2.71 B	0.68±0.29 C

*Aynı sütündaki farklı harfler istatistik önemi göstermektedir. Plazma 8-OHdG değerleri diğer gruplara göre iskemi-reperfüzyon grubunda rakamsal bir artış göstermesine rağmen istatistik önemlilik yoktu (0.56). Ancak doku 8-OHdG seviyeleri iskemi reperfüzyon grubunda önemli şekilde yüksekti ($p<0.001$). DiOHF uygulaması yapılan gruplarda (grup 4, 5, 6) artan hasar oranı önemli şekilde baskılandı ($p<0.001$).

Ayrıca çalışmada yangısal durumun göstergelerinden birisi olarak da plazma IL-6 değerleri incelendi. Bu parametre gruplar arasında karşılaştırıldığında en yüksek sitokin değerlerinin iskemi-reperfüzyon grubunda olduğu görüldü ($p<0.003$). DiOHF uygulamasının yapıldığı gruplarda iskemi-reperfüzyona bağlı olarak artan IL-6 düzeyleri önemli şekilde baskılanarak kontrol ve sham grubu değerleriyle benzerlik gösterdi ($p<0.003$) (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. Plazma IL-6 Seviyeleri.

Gruplar	**Plazma IL-6 (pg/ml)**
1-Genel kontrol grubu (n=6)	40.78±4.51 B
2-Sham-Kontrol (n=6)	42.63±4.53 B
3-İskemi-reperfüzyon grubu (n=8)	54.71±5.35 A
4-İskemi-reperfüzyon+DiOHF grubu (n=8)	41.76±4.00 B
5-İskemi+DiOHF+reperfüzyon grubu (n=8)	37.68±5.40 B
6-DiOHF+iskemi-reperfüzyon grubu (n=8)	44.08±4.54 B

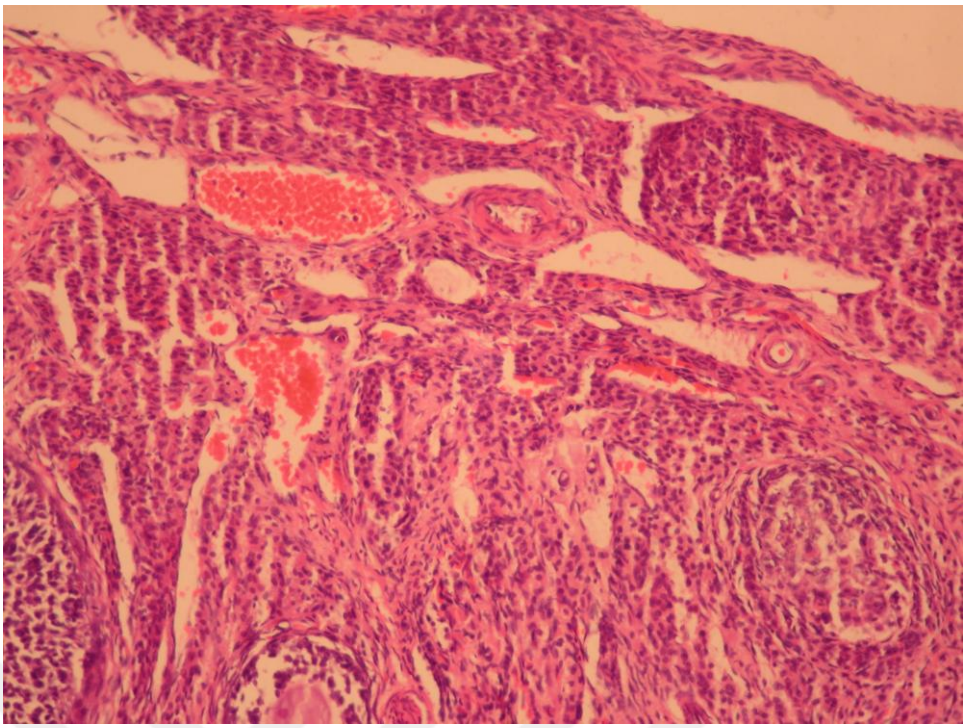
*Aynı sütündaki farklı harfler istatistik önemi göstermektedir. İskemi-reperfüzyon sonucu plazma IL-6 düzeyleri önemli şekilde artarken, DiOHF takviyesi artmış IL-6 değerlerini kontrol seviyelerine getirdi ($p<0.003$).

Ovaryum dokusu histopatolojik olarak incelendiğinde bu dokuda iskemi-reperfüzyona bağlı olarak damar genişlemesi, ödem ve iltihap oluşumunun arttığı belirlendi. Ancak DiOHF uygulaması iskemi-reperfüzyona bağlı olarak oluşan bu değişimleri düzeltmiştir ($p<0.001$) (Çizelge 3.6).

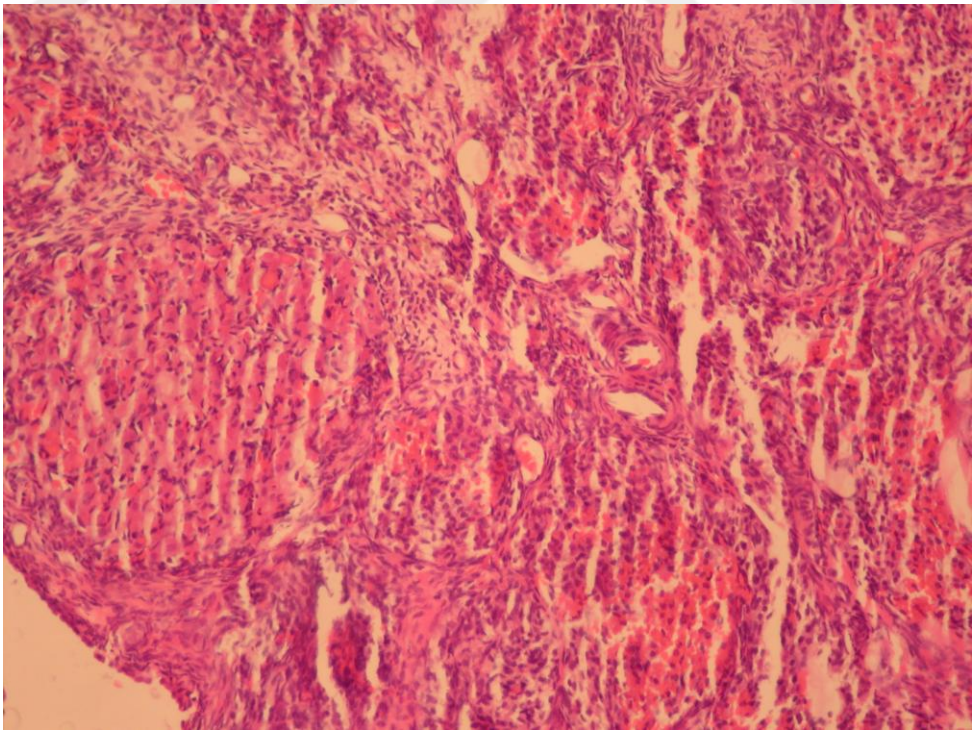
Çizelge 3.6. Ovaryum Dokusu Histopatolojik Skorlama.

Gruplar	**Damar Genişlemesi**	**Ödem**	**İltihap**
1-Genel kontrol grubu (n=6)	0.33±0.06 D	0.51±0.18 C	4.33±1.63 D
2-Sham-Kontrol (n=6)	0.50±0.04 D	0.40±0.16 C	3.83±1.72 D
3-İskemi-reperfüzyon grubu (n=8)	6.00±0.75 A	3.00±0.75 A	15.75±1.38 A
4-İskemi-reperfüzyon+DiOHF grubu (n=8)	5.12±0.35 B	2.25±0.46 B	13.25±1.28 B
5-İskemi+DiOHF+reperfüzyon grubu (n=8)	4.87±0.64 BC	2.12±0.35 B	11.75±1.75 C
6-DiOHF+iskemi-reperfüzyon grubu (n=8)	4.5±0.53 C	1.87±0.35 B	11.87±1.95 C

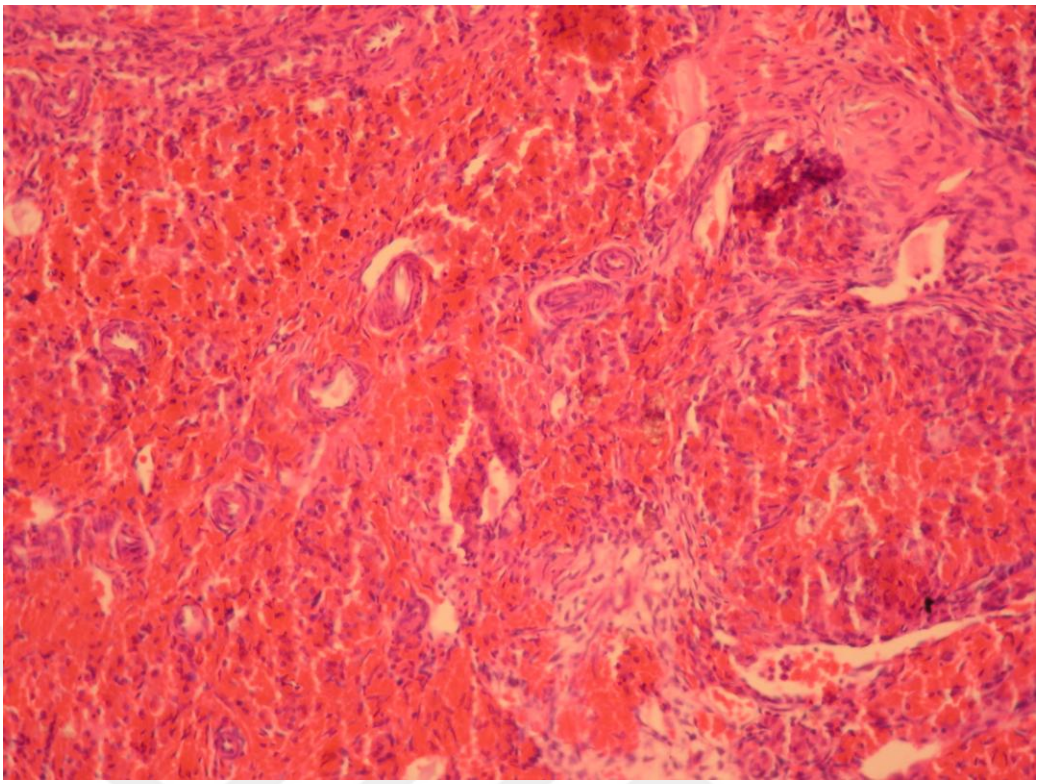
*Aynı sütündaki farklı harfler istatistik önemi göstermektedir. İskemi-reperfüzyon gruplarında artan damarlanma, ödem ve iltihap DiOHF uygulamarıyla önemli şekilde baskılandı ($p<0.001$).



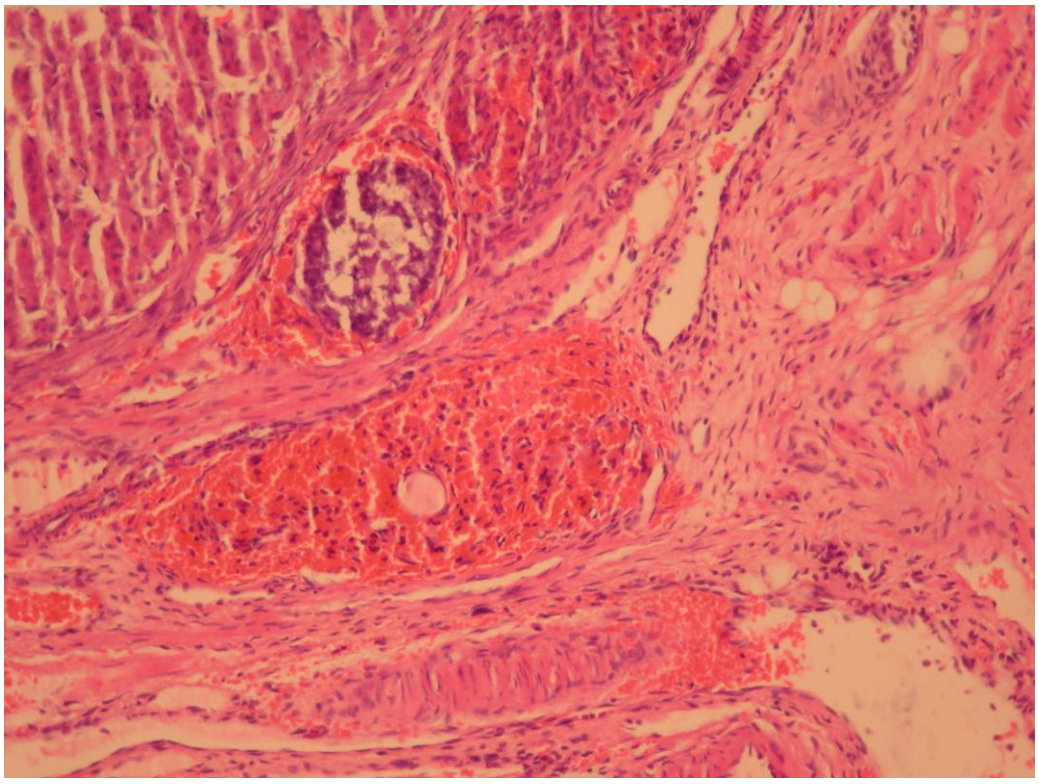
Şekil 3.1: Kontrol ovaryum x100; HxE



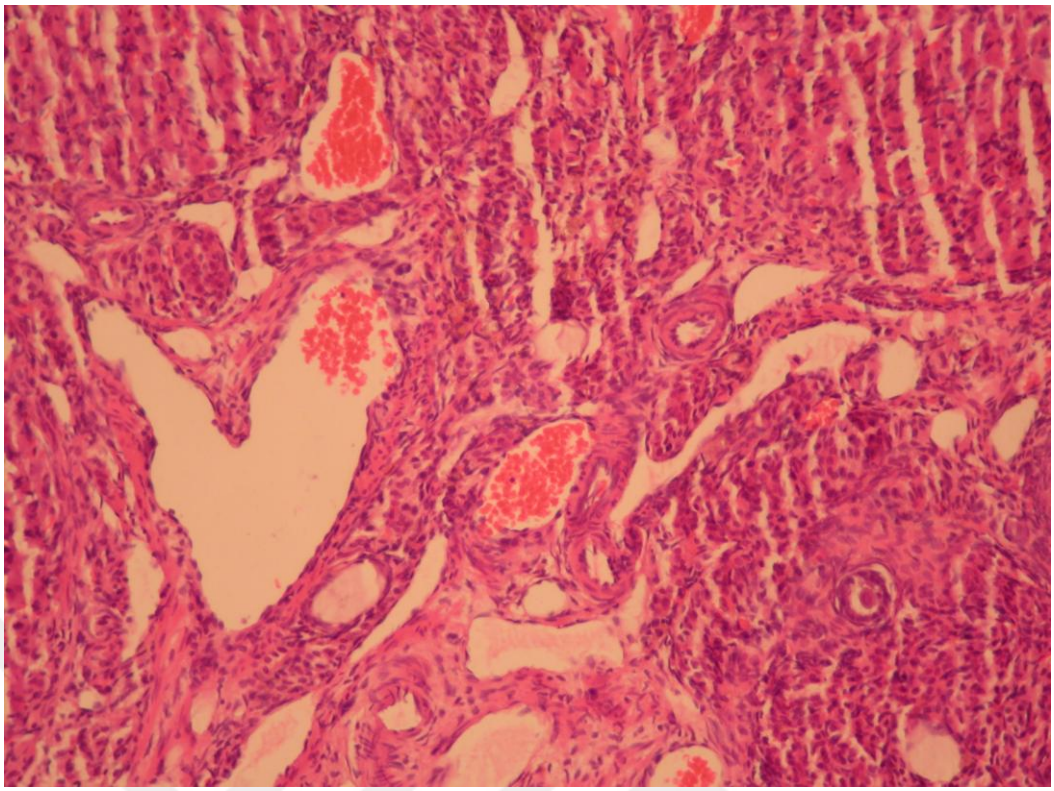
Şekil 3.2: Sham ovaryum, x100; HxE



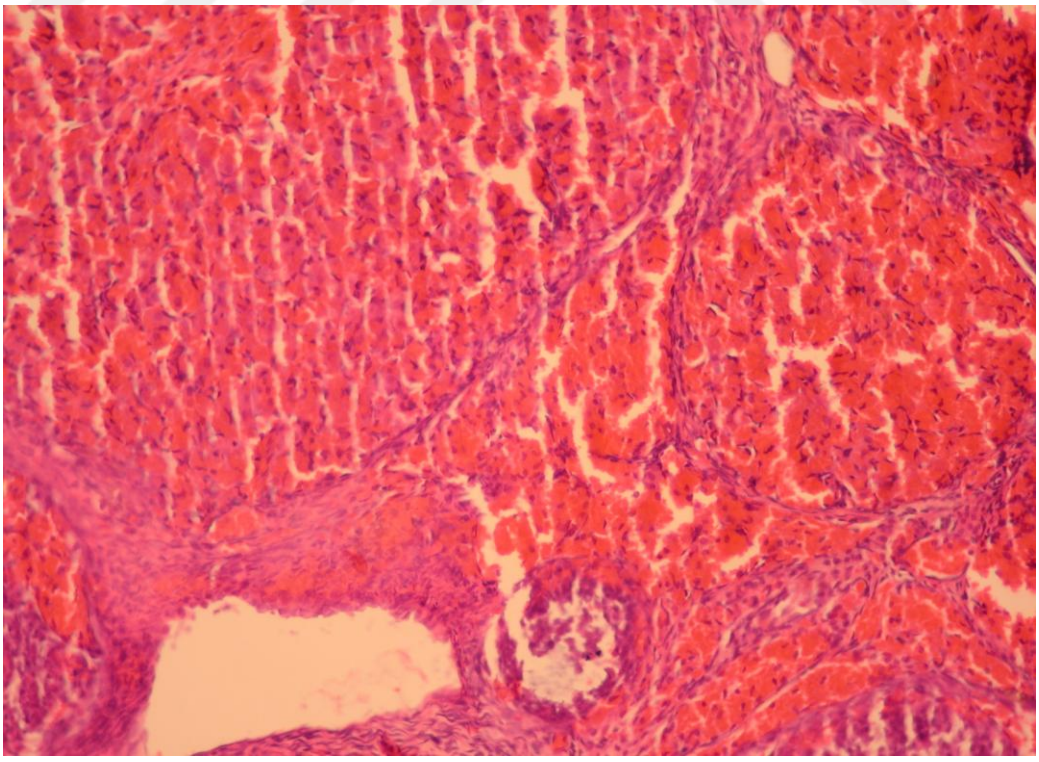
Şekil 3.3: İskemi+reperfüzyon ovaryum, x100; HxE



Şekil 3.4: İskemi+reperfüzyon+DiOHF ovaryum, x100; HxE



Şekil 3.5: İskemi+DiOHF+reperfüzyon ovaryum, x100; HxE



Şekil 3.6: DiOHF+iskemi+reperfüzyon ovaryum, x100; HxE

4. TARTIŞMA

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada dişi sıçanlarda ovaryum iskemi reperfüzyonu ve DiOHF uygulamasının ilgili doku ve kanda (eritrosit/plazma) oksidan-antioksidan sistem aktiviteleri ile DNA hasarı değerlendirildi. Ayrıca ilgili deneysel modelin ovaryum dokusunda oluşturduğu histopatolojik değişim incelendi.

Dokuda iskemi-reperfüzyon hasarının önemli göstergelerinden olan malondialdehid değerlerinin hem plazma hem de ovaryum dokusunda ciddi oranda artış göstermesi, öncelikle hedeflenmiş olan iskemi-reperfüzyonun gerçekleştiğini göstermektedir.

Farklı deneysel modellerde iskemi-reperfüzyona bağlı olarak ortaya çıkan lipid peroksidayonu belirlemek için değişik parametreler kullanılmaktadır (Duman ve ark. 2015, Yilmaz ve ark. 2015, Caliskan ve ark. 2016).

İskemi-reperfüzyon süresi ve şekline bağlı olarak organlarda hasar oluşturmak suretiyle fonksiyon kaybına da götürebilir (Hearse ve ark 1993, Sobey ve Woodman 1993). Reperfüzyonla birlikte oluşan serbest oksijen radikalleri lökositlerin aktivasyonu ve yapışmasına yol açar. Sonuçta reperfüzyona uğrayan doku azalmış kanlanma ve hipoksiden ciddi bir şekilde etkilenir. İskemi-reperfüzyon yaralanması bir seri toksik olayların sonucunda lipidler, protein ve DNA'da hasar oluşturan oldukça reaktif moleküllerin fazla miktarda üretimine yol açar (Aruna Devi ve ark 2010). Oksidatif stres beyin dâhil birçok organın iskemi-reperfüzyon yaralanmasının patogenezinde büyük bir rol oynar (Abd-Elsameea ve ark 2014).

MDA lipid peroksidasyonunun güvenilir parametrelerinden birisi olarak değerlendirilmiştir (Abdel Salam ve ark 2012; Akil ve ark 2015). Önceki çalışmalarda ovaryum torsiyon ve detorsiyonuna bağlı olarak artan MDA değerleri değişik çalışmalarda rapor edilmiştir (Celik ve ark 2004, Bayir ve ark 2012, Bayir ve ark 2016). Bizim gerçekleştirdiğimiz çalışmada iskemi-reperfüzyona bağlı olarak

plazma ve ovaryum dokusunda elde ettiğimiz artmış MDA değerleri yukarıda bahsedilen çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Ayrıca deneysel modelde farklı zamanlarda DiOHF uygulaması; iskemi-reperfüzyon öncesi/sonrası ve iskemi sonrası-reperfüzyon öncesi (Grup 5) hem plazma hem de dokuda artan MDA düzeylerini önemli şekilde baskılamıştır. Mevcut literatür incelendiğinde yakın zamandaki pubmed kayıtlarına göre 3',4'-Dihydroxyflavonol (DiOHF) ve iskemi-reperfüzyonla ilgili toplam 17 adet kayıt bulunup bunların büyük oranda bizim çalışmamızda kullandığımız flavonoid ve kalp iskemi reperfüzyonu konusunda olduğu görülmektedir. Doğrudan 3',4'-Dihydroxyflavonol ve MDA ilişkisini konu alan iki adet çalışma olup (Duman ve ark 2015, Caliskan ve ark 2016), bahsedilen çalışmalarda beyin ve testis iskemi-reperfüzyonunda artan MDA seviyelerinin 3',4'-Dihydroxyflavonol kullanımıyla baskılandığı rapor edilmiştir. Araştırmamızda ovaryum iskemi-reperfüzyonu ve DiOHF kullanımının önceki bahsedilen çalışmalara benzer şekilde artan malondialdehid değerlerini önemli şekilde baskıladığı tespit edildi.

İskemi-reperfüzyona bağlı olarak kan ve dokudaki hasarın başka bir göstergesi olarak da 8-OHdG değerleri belirlendi. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin, reaktif oksijen türlerinin DNA'da yaptığı 20'den fazla oksidatif baz hasar ürününden birisidir. Bu nedenle 8-OHdG ölçümü, DNA'daki oksidatif hasarın doğrudan göstergesi olarak kabul edilir ve oksidatif DNA hasarını belirlemede en sık kullanılan yöntem olarak uygulanmıştır (Atmaca ve Aksoy 2009). Daha önce yapılan bir çalışmada ovaryumda iskemi-reperfüzyona bağlı olarak 8-hydroxyguanine düzeylerinin önemli şekilde arttığı rapor edilmiştir (Demiryilmaz ve ark 2013). Yine Kurt ve ark (2013) tarafından gerçekleştirilen bir araştırmada ovaryum iskemi-reperfüzyonu sonucu DNA hasarının göstergesi olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanin/guanin düzeylerinin önemli oranda yükseldiği belirlenmiştir. Başka bir araştırmada ise iskemi reperfüzyon tarafından üretilen oksijen serbest radikallerinin DNA'ya saldırdığı ve gebe ratlarda fetus beyninde baz modifikasyonlarına neden olduğu belirlenmiştir ve iskemi-reperfüzyon 8-OHdG seviyesinde artışla sonuçlanmıştır. (Wakatsuki ve ark 1999). Rat ovaryumunda iskemi reperfüzyonla oluşan oksidatif stresin araştırıldığı bir çalışmada iskemi reperfüzyon grubunda DNA hasar ürünü olan 8-OHdG seviyesi anlamlı ölçüde fazla bulunmuştur. (Yapca ve ark 2014). Benzer şekilde Sahin Ersoy ve ark (2016) yaptıkları çalışmada ratlarda

ovaryum torsiyon modelinde 8-OHdG konsantrasyonu iskemi reperfüzyon grubunda anlamlı ölçüde fazla bulunmuştur.

Gerçekleştirdiğimiz araştırmada ise sıçanlarda 2 saat iskemi ve takiben aynı süredeki reperfüzyonun özellikle ovaryum dokusunda 8-OHdG miktarını önemli oranda artırdığını belirlememiz bahsedilen araştırmalardaki artan DNA hasarıyla benzerlik göstermektedir. Plazmada da kısmi de olsa bu parametrede artış olmasına rağmen bu istatistik olarak önemli düzeyde değildi. Araştırmamızın önemli bir bulgusu ovaryum dokusunda artan 8-OHdG düzeyinin iskemi-reperfüzyonla birlikte DiOHF uygulamasıyla birlikte önemli şekilde baskılanmış olmasıdır. Kullanılan DiOHF dozuna bağlı olarak elde edilen değerler kontrol seviyelerinden bile düşük olarak elde edilmiştir. Kurt ve ark (2013) gerçekleştirdiği çalışmada ovaryan iskemi-reperfüzyon hasarının deksmetetomidin ve famotidin uygulamasıyla önlendiği rapor edilmiştir. Ancak daha önceden 3',4'-Dihydroxyflavonol ve DNA hasarı veya 3',4'-Dihydroxyflavonol ve 8-OHdG parametresini inceleyen araştırmanın olmadığı görülmüştür. Bizim araştırmada elde ettiğimiz artan DNA hasarının mevcut flavonoid ile baskılanması da vurgulanması gereken önemli bir bulgudur.

Çalışmada incelenen diğer bir parametre IL-6 olup, özellikle yangısal süreçlerde önemli olduğu kabul edilmektedir. Travma veya stres sırasında IL-6 kan düzeylerinin yükselmesi nedeni ile sistemik inflamatuar cevabın göstergesi olarak kullanılmaktadır (Yao ve ark 1997). Over kisti olduğu tespit edilen hastalarda over torsiyonu tanısını koymada serum IL-6 seviyeleri %85.7 duyarlılıkta kullanılmıştır (Christopoulos ve ark 2013). Over torsiyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda serum IL-6 düzeylerinin arttığı ve over torsiyonu ile IL-6 düzeyleri arasında önemli bir ilişkinin bulunduğu gösterilmiştir (Cohen ve ark 2001). Aksak Karamese ve ark (2015) tarafından gerçekleştirilen bir araştırmada da sıçan ovaryum dokusunda iskemi-reperfüzyon sonucu IL-6 düzeylerinin arttığı belirlenmiştir. Yine Bayir ve ark (2016)'nın gerçekleştirdiği bir araştırmada ovaryum iskemi-reperfüzyonunda artan IL-6 değerleri elde edilmiştir. Başka bir araştırmada ise rat ovaryumlarındaki iskemi-reperfüzyon sonucu artmış serum IL-6 düzeyleri rapor edilmiştir (Sengul ve ark 2013).

Ovaryum iskemi-reperfüzyonunda DiOHF kullanımı ve IL-6 ilişkisini doğrudan araştıran çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak kardiyak iskemi-reperfüzyonla ilgili bir çalışmada bizim araştırmamızda kullanmış olduğumuz preperatın (DiOHF) bir öncülü olarak kabul edilen NP202 isimli maddenin inflamasyonu önleyici etkisi rapor edilmiştir (Thomas ve ark 2011). Ancak farklı flavonoid türlerinin yangısal süreçte baskılayıcı rollere sahip olduğu ifade edilmektedir (Yang ve ark 2017, Zhang ve ark 2017). Araştırmamızda ovaryum iskemi-reperfüyonunda artan yangısal cevabın DiOHF uygulamasıyla baskılandığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda antioksidan sistemin önemli bir üyesi olan GSH değerleri hem eritrosit hem de ovaryum dokusunda incelendi. İlgili parametre plazma ve ovaryum dokusunda çok küçük de olsa azalma gösterdi ama bu istatistik olarak önemli boyutta değildi. Ancak iskemi-reperfüzyonla birlikte DiOHF uygulaması bu parametreyi büyük oranda artırdı. GSH organizmada antioksidan savunmanın önemli elemanlarından birisi olarak kabul edilir (Oztekin ve ark 2007). Ovaryum iskemi-reperfüzyon çalışmalarında GSH değerlerinin incelendiği araştırmalarda farklı bulgular elde edilmiştir. Aksak Karamese ve ark (2015)'nın çalışmasında 3 saatlik iskemi süresi ve takiben aynı süre reperfüzyon uygulaması yapıldığında GSH seviyelerinin önemli oranda baskılandığı rapor edilmiştir. Yine Bayir ve ark (2012, 2016)'nın araştırmasında bir önceki deneysel modelle aynı süreli iskemi-reperfüzyon uygulamasının GSH düzeylerini azalttığı belirlenmiştir. Celik ve ark (2004)'nın araştırmasında da 360^{o}lik 3 saat süreli ovaryum torsiyonuna bağlı olarak GSH değerleri azalma göstermiştir. Benzer şekilde Yapca ve ark (2014) yaptığı çalışmada iskemi reperfüzyon uygulanan sıçanlarda over dokusu GSH konsantrasyonlarının anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Bizim araştırmamızda ise deney hayvanlarında 2 saatlik iskemiyi takiben aynı süreli reperfüzyon uygulaması yapıldı. Gerçekleştirilen çalışmalarda farklı deneysel modeller kullanılmaktadır. Ovaryum iskemisinde 3',4'-Dihydroxyflavonol ve GSH ilişkisini inceleyen doğrudan çalışmalar mevcut değildir. Ancak daha önceden gerçekleştirlen çalışmalarda hem testis-iskemi reperfüzyonunda hem de beyin iskemi-reperfüzyonunda 3',4'-Dihydroxyflavonol plazma ve ilgili dokularda GSH değerlerini önemli şekilde artırmış olması elde ettiğimiz bulguları destekler boyuttadır. Burada vurgulanması gereken önemli bulgu

3',4'-Dihydroxyflavonol uygulamasının sadece iskemi-reperfüzyonda değil aynı zamanda iskemi reperfüzyon sonrası ve aynı zamanda iskemi sonrası ve reperfüzyon öncesi (grup 5) mevcut doz kullanımının antioksidan sistemi GSH parametresi üzerinden güçlü bir şekilde uyarmış olmasıdır.

Araştırmamızda çalışılan başka bir parametre ise süperoksit dismutaz (SOD)'dur. Süperoksitin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlar. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe etmektedir (Bozkurt 2009). Yapılan çalışmalarda deneysel over I/R modellerinde torsiyon/detorsiyon grubunda plazma SOD aktivitesinin önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur (Sahin Kir ve ark 2008). Yine Isaoglu ve ark (2012)'nın araştırmasında ovaryum iskemi-reperfüzyon hasarının SOD değerlerini önemli oranda azalttığı belirlenmiştir. Cadirci (2010) ve ark yaptığı çalışmada ovaryumda 3 saatlik iskemi ve bunu takiben 3 saatlik reperfüzyon süresi sonunda SOD aktivitesinde azalma meydana geldiği gözlemlenmiştir. Ozsoy ve ark (2016)'nın araştırmasında ise ovaryum iskemi-reperfüzyonu sonucunda serum ve ilgili dokuda SOD seviyelerinin önemli şekilde baskılandığı rapor edilmiştir. Bizim araştırmamızda ise SOD değerleri yukarıda belirtilen çalışmalara benzer şekilde plazma ve ovaryum dokusunda önemli oranda azalma göstermiştir. Çalışmamızda iskemi-reperfüzyonla birlikte DiOHF uygulaması ise bu parametreyi önemli oranda artırmıştır. Daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda genellikle farklı deneysel model ve dokularda DiOHF kullanımının süperoksit üretimini baskılamak suretiyle arter ve kalp gibi dokularda koruyuculuk sağladığı rapor edilmiştir (Wang ve ark 2004, Leo ve ark 2011). Bizim araştırmamızda ise ovaryum iskemi-reperfüzyonu sonucu eritrosit ve ovaryum dokusunda baskılanmış olan SOD düzeylerinin DiOHF uygulamasıyla önemli şekilde arttığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla farklı dokularda DiOHF uygulamasıyla elde edilmiş olan artmış SOD aktivitesi bizim ovaryum dokusu ve eritrositlerde sağladığımız sonuçları desteklemektedir.

Araştırmamızda ayrıca ovaryum iskemi-reperfüzyonu ve DiOHF uygulamasının bu dokuda oluşturduğu histopatolojik değişimler de incelendi. İskemi-reperfüzyonun yapıldığı 3. grupta damar genişlemesi, iltihap ve belirgin ödem oluştuğu belirlendi. Ancak ilgili kimyasal maddenin iskemi-reperfüzyon öncesi ve sonrası verilmesi oluşan histopatolojik değişimi önemli şekilde baskıladı. Daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda rat ovaryum torsiyon ve detorsiyonuna bağlı olarak

ilgili dokuda patolojik değişim olduğu belirlenmiştir (Bayir ve ark 2012). Demiryilmaz ve ark (2013)'nın gerçekleştirdiği bir araştırmada ise ovaryum dokusunda damar genişlemesi, ödem ve endotele polimorfonükleer hücre birikimi belirlenmiştir. Başka deneysel çalışmalarda da yukarıda belirtilenlere benzer histolojik değişimler tespit edilmiştir (Isaoglu ve ark 2012, Mete Ural ve ark 2016). Soylu Karapinar ve ark (2017) tarafından yapılan bir araştırmada 3 saatlik iskemi veya 3 saat iskemi/3 saatlik reperfüzyona bağlı olarak ovaryum dokusunda vasküler konjesyon, ödem, hemoraji ve yangısal hücre infiltrasyonu belirlenmiştir. Bizim araştırmamızda elde ettiğimiz histopatolojik değişimler yukarıda bahsedilenlerle paralellik göstermektedir. Mevcut literatürde DiOHF kullanımı ve iskemi-reperfüzyonla ovaryum dokusundaki histopatolojik değişime olan etkisi konusunda direkt bir çalışma yoktur. Ancak yapılan çalışmalarda DiOHF uygulamasıyla özellikle beyin, kalp dokusunda ve damar endotelinde yangısal cevaba karşı koruyucu etki sağladığı rapor edilmiştir (Lim ve ark. 2013, Mosawy ve ark 2013, Thomas ve ark 2015, Caliskan ve ark 2016). Araştırmamızda DiOHF kullanımına bağlı olarak elde ettiğimiz damar genişlemesi, ödem ve iltihap oluşumundaki baskılanma bu maddenin ovaryum dokusunda iskemi-reperfüzyonla oluşan yapısal bozulmaya karşı belirli bir düzeyde koruma sağladığını göstermektedir.

Mevcut çalışmanın sonuçları değerlendiriliğinde sıçanlarda 2 saatlik iskemi ve aynı süredeki reperfüzyonun kan ve ilgili dokuda oksidatif hasarı artırdığı ve antioksidan sistemleri baskıladığı belirlenmiştir. Ayrıca özellikle ovaryum dokusunda DNA hasarı, yangısal cevapta artış (IL-6), yapısal bozulma görülmüştür. Ancak DiOHF kullanımı iskemi-reperfüzyona bağlı olarak ortaya çıkan hasarı antioksidan sistemleri artırmak ve yangısal cevabı baskılamak suretiyle önlemiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmanın sonucunda sıçanlarda iskemi-reperfüzyona bağlı olarak oksidan göstergeler olan MDA ve DNA hasarı artmıştır. Bunun mevcut çalışmada değerlendirilen antioksidan sistemlerden olan GSH ve SOD aktivitesindeki baskılanma sonucu ortaya çıktığı görülmüştür. Yine yangısal cevabın göstergesi olarak IL-6 düzeyleri de kanda önemli şekilde yükselmiştir. Ayrıca ovaryum dokusunda iskemi-reperfüzyonun yapısal bozulmaya yol açtığı ancak kullanılan DiOHF dozunun bu yapısal bozulmayı belirli oranda önlediği tespit edilmiştir.

Gelecekteki çalışmalarda deney süresi ve kullanılan ilacın doz farklılığına bağlı olarak oluşan etkinin daha detaylı değerlendirilmesi için moleküler düzeyde çalışmalar yapılması önerilebilir.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Sıçanlarda Ovaryum İskemi-Reperfüzyon Hasarı: 3',4'-Dihydroxyflavonol'un Lipid Peroksidasyonuna Etkisi

Elif Sena AĞARTAN

Fizyoloji (Tıp) Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2017

İskemi, doku veya organı besleyen kan akımının yetersizliğine bağlı olarak hücre veya doku hasarına neden olmaktadır. Mevcut çalışmanın amacı sıçanlarda deneysel ovaryum iskemi-reperfüzyon hasarında 3',4'-Dihydroxyflavonol uygulamasının lipid peroksidasyonuna etkisini belirlemekti.

Araştırma toplam 44 adet Wistar-albino türü dişi sıçan üzerinde gerçekleştirildi. Çalışmada deney grupları aşağıda şu şekilde oluşturuldu.1-Kontrol; 2-Sham; 3-İskemi-reperfüzyon (I/R); 4-İskemi-Reperfüzyon+DiOHF; 5-İskemi+DiOHF+Reperfüzyon; 6-DiOHF+İskemi-Reperfüzyon. İskemi-reperfüzyon 2+2 saat olarak, DiOHF 30 mg/kg olarak uygulandı. Deney sonunda hayvanlardan anestezi altında kardiyak ponksiyon ile kan örnekleri alındıktan sonra öldürülerek doku örnekleri alındı.

Alınan kan ve doku örneklerinde GSH (eritrosit, doku), MDA (plazma ve doku), 8-hidroksiguanozin (8-OHdG) (plazma-doku), SOD (eritrosit, doku) ve IL-6 (plazma) da belirlendi. Ayrıca ovaryum dokusu histopatolojik olarak değerlendirildi.

I/R gruplarında MDA, 8-OHdG ve IL-6 seviyeleri artarken, GSH ve SOD aktivitesi baskılandı ($p<0.001$). I/R gruplarında dokuda damarlaşma, ödem ve iltihap arttı ($p<0.001$). DiOHF uygulaması ise değişen bu parametreleri düzeltti.

Çalışmanın sonuçları sıçanlarda ovaryum ve kanda I/R hasarıyla oluşan oksidan/antioksidan sistem aktivitesinin bozulmasının 30 mg/kg DiOHF uygulamasıyla düzeldiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: IL-6; GSH; MDA; Ovaryum; Sıçan; SOD; 8-OHdG.

7. SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Ovarian-Ischemia-Reperfusion Damage in Rat: The effect of 3',4'-Dihydroxyflavonol on Lipid Peroxidation

Elif Sena AĞARTAN

Department of Physiology

MASTER THESIS / KONYA-2017

Ischaemia is lead to damage in cell or tissue damage due to insufficient blood flow stream in tissue or organ. The aim of present study was to determine the effect of 3',4'-Dihydroxyflavonol on lipid peroxidation experimental ovarium ischaemia-reperfusion in rats.

Research was performed on the total 44 Wistar-albino female rats. Groups were design as 1-Control; 2-Sham; 3-İschaemia-reperfusion (I/R); 4-I/R+DiOHF; 5-ischaemia+DiOHF+reperfusion; 6-DiOHF+I/R. Ischaemia-reperfusion 2+2 hours, DiOHF 30 mg/kg supplied. The end of experiments blood samples were obtaion under the general anesthesia, following animals were killed and tissue samples were taken.

Blood and tissue samples were analized for GSH, MDA, 8-OHdG, SOD and IL-6. Ovarian tissue was examined as histopathological.

I/R groups have increased MDA, 8-OHdG and IL-6, but reduced GSH and SOD activity. Ovarian tissue has vascularisation, eodema and inflamation ($p<0.001$). DiOHF supplementation was corrected occured changes.

The finding of present study show that occured deterioted oxidan/antioxidant system activity corrected by 30 mg/kg DiOHF supplementation in rats with ovarian ischaemia-reperfusion.

Anahtar Kelimeler: IL-6; GSH; MDA; Ovarium; Rat; SOD; 8-OHdG.

8. KAYNAKLAR

Abdel-Salam OM, Youness ER, Mohammed NA, Abd-Elmoniem M, Omara E, Sleem AA, 2012. Neuroprotective and hepatoprotective effects of micronized purified flavonoid fraction in lipopolysaccharide-treated rats. Drug Discov Ther, Dec, 6(6), 306-14.

Abd-Elsameea AA, Moustaf AA, Mohamed AM, 2014. Modulation of the oxidative stress by metformin in the cerebrum of rats exposed to global cerebral ischemia and ischemia/ reperfusion. Eur Rev Med Pharmacol Sci, Aug, 18(16), 2387-92.

Aka N, Kuscu NK, Tuzcular VEZ, Yazıcıoglu E, 1997. Preeklampside fibronektinin degeri. Jinekoloji ve Obstetrik Dergisi, 11: 96-97.

Akil M, Gurbuz U, Bicer M, Halifeoglu I, Baltacı AK, Mogulkoc R, 2015. Selenium prevents lipid peroxidation in liver and lung tissues of rats in acute swimming exercise, Bratisl Lek Listy, 116(4), 233-5.

Akkuş İ, 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza yayınları, s. 1-26.

Aksak Karamese S, Toktay E, Unal S, Selli J, Karamese M, Malkoc I, 2015. THA protective effects of beta carotene against ischemia/reperfusion injury in rat ovarian tissue. Acta Histocem, 117(8), 790-7.

Aruna Devi R, Lata S, Bhadoria BK, Ramteke VD, Kumar S, Sankar P, Kumar D, Tandan SK, 2010. Neuroprotective effect of 5,7,3',4',5'-pentahydroxy dihydroflavanol-3-O-(2''-O-galloyl)-beta-D- glucopyranoside, a polyphenolic compound in focal cerebral ischemia in rat. Eur J Pharmacol, 626(2-3), 205-12.

Atmaca E, Aksoy A, 2009. Oksidatif DNA hasarı ve kromatografik yöntemlerle tespit edilmesi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 20 (2), 79-83.

Atroshi F, Sankari S, Osterberg S, Sandholm M, 1981. Variation of erythrocyte glutathione peroxidase activity in Finn sheep. Res Vet Sci, 31(3), 267-71.

Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC, 2001. Ovarian surface epithelium, biology, endocrinology, and pathology. Endocrine Reviews, 22, 255-288.

Barber DA, Harris SR, 1994 Oxygen free radicals and antioxidants: a review. Am Pharm, NS 34, 26-35.

Bayir Y, Cadirci E, Polat B, Kilic Baygutalp N, Albayrak A, Karakus E, Un H, Keles MS, Kocak Ozgeris FB, Toktay E, Karaca M, Halici Z, 2016. Aliskiren- a promising strategy for ovarian ischemia/reperfusion injury protection in rats via RAAS. Gynecol Endocrinol, 32(8), 675-683.

Bayir Y, Karagoz Y, Karakus E, Albayrak A, Sengul O, Can I, Yayla N, Kuskun U, Keles MS, 2012. Nigella sativa reduces tissue damage in rat ovaries subjected to torsion and detorsion: oxidative stress, proinflammatory response and histopathological evaluation. Gynecol Obstet Invest, 74(1), 41-9.

Blumberg J, 2004. Use of biomarkers of oxidative stres in research studies. J Nutr, 134, 3188S-3189S.

Bors W, Heller W, Michel C, Saran M, 1990. Flavonoid as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies Methods in Enzimology, 186:343 355.

Bozkurt S, 2009. Hepatik İskemi-Reperfüzyon Modelinde Adrenomedullin ve Adrenomedullin Bağlayıcı Protein–1 Kombinasyonunun Akut Akciğer ve Karaciğer Hasarı Üzerine Etkilerinin Araştırılması, Genel Cerrahi uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta.

Breech LL, Hillard PJ, 2005. Adnexal torsion in pediatric and adolescent girls. Curr Opin Obstet Gynecol, 17(5), 483-9.

Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M, Upadhyaya NB, 2004. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. Reproductive Biology and Endocrinology, 2, 20.

Burçak G, Andican G, 2004. Oksidatif DNA Hasarı ve Yaşlanma, Cerrahpaşa Tıp Dergisi, 35 (4), 159-169.

Burkitt MJ, Duncan J, 2000. Effects of trans-resveratrol on copper-dependent hydroxyl-radical formation and DNA damage: evidence for hydroxyl-radical scavenging and a novel, glutathione-sparing mechanism of action. Arch Biochem Biophys, Sep 15, 381(2), 253-63.

Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, 2006. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 4th ed. St. Louis, Missouri. Elsevier Saunders, 671-675, 702-708.

Cadirci E, Oral A, Odabasoglu F, Kılıc C, Coskun K, Halici Z, Suleyman H, Keles ON, Unal B, 2010. Atorvastatin reduces tissue damage in rat ovaries subjected to torsion and detorsion: biochemical and histopathologic evaluation. Naunyn-Schmied Arch Pharmacol, 381, 455-466.

Caliskan M, Mogulkoc R, Baltaci AK, Menevse E, 2016. The Effect of 3',4'-Dihydroxyflavonol on Lipid Peroxidation in Rats with Cerebral Ischemia Reperfusion Injury. Neurochem Res, 41(7), 1732-40.

Cass DL, 2005. Ovarian torsion. Semin Pediatr Surg, 14(2), 86-92.

Ceballos-Picot I, Trivier JM, Nicole A, Sinet PM, 1992. Thevenin M. Agecorrelated modifications of copper-zinc superoxide dismutase and glutathione-related enzyme activities in human erythrocytes. Clin Chem, 38, 66-70.

Celik O, Turkoz Y, Hascalık S, Hascalık M, Cigremis Y, Mızrak B, Yologlu S, 2004. The protective effect of caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1, 117(2), 183-8.

Chai YC, Ashraf SS, Rokutan K, Johnston Jr.RB, Thomas, JA, 1994. S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. Arch Biochem Biophys, 310, 273– 281.

Christopoulos G, Goubet S, Kelly T, 2013. Interleukin-6 for the diagnosis of ovarian torsion: a systematic review and meta-analysis. J Obstet Gynaecol, 33, 5, 438-441.

Cobanoglu U, Demir H, Cebi A, Sayır F, Alp HH, Akan Z, Gur T, Bakan E, 2011. Lipid peroxidation, DNA damage and Coenzyme Q10 in lung cancer Patients - Markers for Risk Assessment? Asian Pacific J Cancer Prev., 12, 1399-1403.

Cohen SB, Wattiez A, Stockheim D, Seidman DS, Lidor AL, Mashiach S, Goldenberg M, 2001. The accuracy of serum interleukin-6 and tumour necrosis factor as markers for ovarian torsion. Hum Reprod, 16, 2195-2197.

Collard CD, Gelman S, 2001. Pathophysiology, clinical manifestations and preventations of ischemia-reperfusion injury. Anesthesiology, 94, 1133-8.

Comerci JT Jr, Licciardi F, Bergh PA, Gregori C, Bren JL, 1994. Mature Cystic Teratoma: a clinicopathologic evaluation of 517 cases and review of the littrerature. Obstet Gynecol, 84(1), 22-8.

Cooray HC, Janvilisri T, Veen HW, Hladky SB, Barrand MA, 2004. Interaction of the breast cancer resistance protein with plant polyphenols. Biochemical and Biophysical Research Communications, 317, 269–275.

Coşkun T, 2005. Fonksiyonel besinlerin sağlığımız üzerine etkileri. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi, 48, 69-84.

Cotelle N, 2001. Role of flavonoids in oxidative stress. Current Topics in Medicinal Chemistry, 1, 569-590.

Çelik M, 2014. Sildenafilin sıçan overlerinde oluşturulan iskemi reperfüzyon hasarındaki etkisinin biyokimyasal ve histopatolojik olarak araştırılması. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilimdalı, Erzurum.

Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N, 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 15(4), 316-328.

Demiryilmaz I, Sener E, Cetin N, Altuner D, Akcay F, Suleyman H, 2013. A comparative investigation of biochemical and histopathological effects of thiamine and tthiamine pyrophosphate on ischemia- reperfusion induced oxidative damage in rat ovarian tissue. Arch Pharm Res, 36, 9, 113-9.

Deniz BO, Şermet A, Tümer C, Koçyiğit Y, Taşdemir N, Atmaca M, Kelle M, 2004. Geçici Serebral İskemide Antioksidan Savunma Sistemindeki Değişiklikler E ve C Vitaminlerinin Koruyucu Etkisi. Dicle Tıp Dergisi, 31,3, 29-36.

Devasagayam TPA, Boloor KK, Ramsarma T, 2003. Methods for estimating lipid peroxidation: Analysis of merits and demerits (minireview). Indian J. Biochem. Biophys, 40(5), 300-308.

Devasagayam TPA, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD, 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. J Assoc Physicians India, 52, 794- 804.

Dinarello CA, 1997. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis or septic shock. Chest, 112, 321-9.

Duman A, Mogulkoc R, Baltaci AK, Menevse E, 2015. 3', 4'-dihydroxyflavonol attenuates tissue damage in unilateral testis ischemia-reperfusion in rats. Bratisl Lek Listy, 116(12), 735-40.

D'Angelica M, Fong Y, 2004. The liver. Ed. Townsend CM Jr, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL. Sabiston Textbook of Surgery. 17. edition. Philedelphia: Elsevier Saunders, 1513-69.

Eken A, 2012. Rat Kan ve Doku Örneklerinde Oksidatif Stres Parametreleri, Journal of Clinical and Analytical Medicine, 69-73.

Ellman GL, 1959. Tissue sulfhydryl groups. Archives of Biochemistry and Biophysics, 82, 1, 70–77.

Eltzschig HK, Collard CD, 2004. Vascular ischaemia and reperfusion injury. Br Med Bull, 70, 71-86.

Erenel G, Erbaş D, Ancıoğlu A, 1992. Serbest radikaller ve antioksidan sistemler. Gazi Medical Journal 3: 243-250.

Espey LL, 1994. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. Biology of Reproduction 50, 233- 238.

Fidan AF, Dündar Y, 2007. Yucca schidigera ve içerdiği saponinler ile fenolik bilesiklerinin hipokolesterolemik ve antioksidan etkileri. Lalahan Hay Aras Enst Derg, 47 (2), 31-39.

Freeman BA, Crapo JD, 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. Lab Invest; 47, 412-26.

Furukawa Y, Torres AS, O'Halloran TV, 2004. Oxygen-induced maturation of SOD1: a key role for disulfide formation by the copper chaperone CCS. EMBO J, 23, 2872-2881.

Gourdin MJ, Bree B, De Kock M, 2009. The impact of ischaemia-reperfusion on the blood vessel. Eur J Anaesthesiol, 26, 537-547.

Gökmen G, 2003. Sistemik Anatomi, İzmir Güven Yayınevi.

Graif M. Itzehak Y, 1988. Sonographic evaluation of ovarian torsion in childhood and adolescence. AJR, 150, 647-9

Gutteridge JMC, 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Biochem, 41(12), 1819-1827.

Halliwell B, 1989. Free radicals, reactive oxygen species and human disease a critical evaluation with special reference to atherosclerose. Br. J. Exp. Pathol., 70, 737-757.

Halliwell B,1995. Antioxidant characterization, methodology and mechanism. Biochem Pharmacol, 49(10), 1341-1348.

Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S, 1994. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. Free Radic Biol Med, 16, 845-850.

Harborne JB, Williams CA, 2000. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry, 55 (6), 481-504.

Hardy K, Wright CS, Franks S, Winston RM, 2000. In vitro maturation of oocytes. Br Med Bull, 56, 588-602.

Hassa H, 2003. İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuvar Uygulamaları, Osmangazi Üniversitesi Yayınları, 9, 84-91.

Hawkins SM, Matzuk MM, 2008. The menstrual cycle: basic biology. Ann N Y Acad Sci, 1135, 10-8.

Hayes JD, McLellan LI, 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. Free Radic Res, 31, 273– 300.

Hearse DJ, Maxwell L, Saldanha C, Gavin JB, 1993. The myocardial vasculature during ischemia and reperfusion: a target for injury and protection. J Mol Cell Cardiol, 25(7), 759-800.

Hibbard LT, 1985. Adnexal torsion. Am J Obstet Gynecol, 152, 456–61.

Isaoglu U, Yilmaz M, Calık M, Polat B, Bakan E, Kurt A, Albayrak Y, Suleyman H, 2012. Biochemical and histopathological investigation of the protective effect of disulfiram in ischemia-induced ovary damage. Gynecol Endocrinol, 28(2), 143-7.

Itagakia S, Oikawaa S, Oguraa J, Kobayashia M, Hirano T, Iseki K, 2010. Protective effects of quercetin- 3- rhamnoglucoside (rutin) on ischemia-reperfusion injury in rat small intestine. Food Chemistry, 118, (2), 426-429.

Kaminski KA, Bonda TA, Korecki J, Musial WJ, 2002. Oxidative stres and neutrophil activation- the two keystones of ischemia/reperfusion injury. International Journal of Cardiology, 86, 41-59.

Koc S, Isgor BS, Isgor YG, Shomali Moghaddam N, Yıldırım O, 2014. The potential medicinal value of plants from Asteraceae family with antioxidant defense enzymes as biological targets. Pharm Biol, 1-6.

Kumar V, Cotran RS, Robbins SL, 2000. Basic Pathology. Çev. Ed: Çevikbaş U. Temel Patoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 6. Baskı, 28-33.

Kurt A, Ingec M, Isaoglu U, Yilmaz M, Cetin N, Calık M, Polat B, Akcay F, Gundogdu C, Suleyman H, 2013. An investigation about the inhibition of acute ischemia/reperfusion damage by dexmedetomidine in rat ovarian tissue. Gynecol Endocrinol, 29, 3, 222-225.

Leo CH, Hart JL, Woodman OL, 2011. 3',4'-Dihydroxyflavonol reduces superoxide and improves nitric oxide function in diabetic rat mesenteric arteries. PLoS One, 6(6), e20813.

Lieberthal W, Nigam SK, 1998. Acute renal failure-I.relative importance of proximal vs. distal tubular injury. American Journal of Physiology, 275, F623-F631.

Lim NR, Thomas CJ, Silva LS, Yeap YY, Yap S, Bell JR, Delbridge LM, Bogoyevitch MA, Woodman OL, Williams SJ, May CN, Ng DC, 2013. Cardioprotective 3',4'-dihydroxyflavonol attenuation of JNK and p38(MAPK) signalling involves CaMKII inhibition. Biochem J, 456(2), 149-61.

Lin E, Lowry SF, Calvano SE, 1999. The systemic response to ınjury. Schwartz SI, Principles of Surgery. Mc Graw-Hill 7th Edition, I, 13-32.

Liu JP, Li H, 2010. Telomerase in the ovary. Reproduction, 140, 215-222.

Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM, 2004. Ischemiareperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. Digestive Diseases and Sciences, 49,1359-1377.

Manfred K, 2000. Reaktive oxygen metabolites. Boca Raton, Florida, CRC press.

Meister A, Anderson ME, 1983. "Glutathione", Ann Rev Biochem, 52, 711-760.

Meister A, Larsson A, 1989. Glutathione synthetase deficiency and other disorders of the γ-glutamyl cycle. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The metabolic basis of inherited disease. 6th ed. New York: McGraw-Hill, 855–68.

Mete Ural U, Bayoglu Tekin Y, Sehitoglu I, Kalkan Y, Cumhur Cure M, 2016. Biochemical, Histopathological and Immunohistochemical Evaluation of the Protective and Therapeutic Effects of Thymoquinone against Ischemia and Ischemia/Reperfusion Injury in the Rat Ovary. Gynecol Obstet Invest, 81(1), 47-53.

Mihara M, Uchiyama M, 1978. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Anal Biochem, 86, 1, 271-8.

Mosawy S, Jackson DE, Woodman OL, Linden MD, 2013. Inhibition of platelet-mediated arterial thrombosis and platelet granule exocytosis by 3',4'-dihydroxyflavonol and quercetin. Platelets, 24(8), 594-604.

Nandave M, Ojha SK, Arya DS, 2005. Protective role of flavonoids in cardiovascular diseases. Natural Product Radiance, 4, 166-76.

Nishida T, Nishida N, 2006. Reinstatement of "germinal epithelium" of the ovary. Reprod Biol Endocrinol, 4, 42.

Nissen ED, Kent DR, Nissen SE, Feldman BM, 1977. Unilateral tuboovarian auto amputation. J Reprod Med, 19(3), 151-3.

Oelsner G, Admon D, Bider D, Mashiach S, Goldenberg M, 1993. Long term follow-up of the twisted ischemic adnexa managed by detorsion. Fertil Steril 60(6): 976-979.

Ozkan OV, Yuzbasioglu MF, Ciralik H, Kurutas EB, Yönden Z, Aydın M, Bülbüloğlu E, Semerci E, Göksu M, Atlı Y, Bakan V, Duran N, 2009. Resveratrol, a natural antioxidant, attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. Tohoku J Exp Med, 218(3), 251-8.

Ozsoy AZ, Nursal AF, Arıcı A, Butun I, Uysal M, Irmak Sapmaz H, Kunt Isguder C, Yilmaz Dogru H, Tas U, 2016. Effects of carvedilol on an ischemia/reperfusion model: Biochemical, histopathological and immunohistochemical evaluation. J Obstet Gynaecol Res, Sep, 42(9), 1132-40.

Oztekin E, Baltaci AK, Tiftik AM, Mogulkoc R, 2007. Lipid peroxidation in ovariectomized and pinealectomized rats: the effects of estradiol and progesterone supplementation. Cell Biochem Funct, 25(5), 551-4.

Önenç SS, Zümrüt A, 2005. Aromatik bitkilerin hayvansal ürünlerde antioksidan etkileri. Hayvansal Uretim, 46 (1), 50-55.

Park JY, Pillinger MH, 2007. Interleukin-6 in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. Bulletin of the NYU Hospital for Joint Disease, 65(1), 4-10.

Parks DA, Williams TK, Beckman JS, 1988. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. Am J Physiol, 254(5 Pt 1), G768-74.

Pena JE, Ufberg D, Cooney N, Denis AL, 2000. Usefulness of doppler sonography in the diagnosis of ovarian torsion. Fertil Steril, 73(5), 1047-50.

Peterson J, Dwyer J, 1995. Flavonoids: dietary occurence and biochemical activity. Nut. Res. 18 (12), 1995-018.

Roos A, Bouwman LH, Munoz J, Zuiverloon T, Faber-Krol MC, Fallaux-van den Houten FC, Mohamad NK, Hack CE, Tilanus MG, Mohamed RD, 2003. Functional characterization of the lectin pathway of complement in human serum. Mol Immunol, 39, 655-668.

Sahin Ersoy G, Eken M, Tal R, Oztekin D, Devranoglu B, Kaygususz EI, Cevik O, 2016. N-acetylcysteine leads to greater ovarian protection than enoxaparin sodium in a rat ovarian torsion model. Reproductive BioMedicine Online, 33, 93–101

Sahin Kir F, Cosar E, Koken G, Toy H, Basaralı K, Büyükbas S, 2008. Protective effect of aprotinin on ischemia–reperfusion injury in rat ovary. J Obstet Gynaecol Res, 34(5), 794–800.

Saksouk FA, Johnson SC, 2004. Recognition of the ovaries and ovarian origin of pelvic masses with CT. Radiographics, 1, 133-146.

Sasaki M, Joh T, 2007. Oxidative stress and ischemia-reperfusion injury in gastrointestinal tract and antioxidant, protective agents. J Clin Biochem Nutr, 40(1), 1-12.

Seekamp A, Warren JS, Remick DG, Till G, Ward PA, 1993. Requirements for Tumor Necrosis Factor-a and Interleukin-1 in Limb Ischemia/Reperfusion Injury and Associated Lung Injury. Am J Pathol, 143, 453-463.

Sener G, Sehirli AO, Keyer-Uysal M, Arbak S, Ersoy Y, Yegen BC, 2002. The protective effect of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in the rat. J Pineal Res, 32(2), 120-6.

Sengul O, Ferah I, Polat B, Halici Z, Bayir Y, Yilmaz M, Kilic N, Keles ON, 2013. Blockade of endothelin receptors with bosentan limits ischaemia/reperfusion-induced injury in rat ovaries. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 170(2), 458-63.

Serafini M, Del Rio D, 2004. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the Total Antioxidant Capacity the right tool? Redox Rep, 9, 145-152.

Shier D, Butler J, Lewis R, 2001. Human Anatomy and Physiology, 9th edition, The McGraw-Hill, 9, 34-39.

Siemionow M, Arslan E, 2004. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. Microsurgery, 24, 468-475.

Siesjo BK, 1992. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia part I: Pathophysiology. J Neurosurg; 77, 169-84.

Sinclair AJ, Barnett AH, Lunec JL, 1990. Free radicals and antioxidant systems in health and diseases. British J Hosp Med 43, 334-344.

Sobey CG, Woodman OL, 1993. Myocardial ischaemia: what happens to the coronary arteries? Trends Pharmacol Sci, 14(12), 448-53.

Soylu Karapinar O, Pinar N, Ozcan O, Atik Dogan E, Bayraktar S, Sahin H, Dolapcioglu K, 2017. The effect of dexpanthenol on experimentally induced ovarian ischaemia/reperfusion injury: a biochemical and histopathological evaluation. Arch Gynecol Obstet, 295(3), 777-784.

Standring S, 2005. Gray's Anatomy, The Anatomical Basis of Clinical Practice, 39th edition, Elsevier Churchill Livingstone, 39, 134-137.

Tanriverdi EC, 2005. Plasenstal yetmezlikli gebeliklerde maternal kan, kord kanı ve plasental dokuda antioksidan aktivite ve oksidatif stress markerlarının fetomaternal doppler degerleriyle korelasyonu. Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Uzmanlık Tezi. Zonguldak

Thomas CJ, Lim NR, Kedikaetswe A, Yeap YY, Woodman OL, Ng DC, May CN, 2015. Evidence that the MEK/ERK but not the PI3K/Akt pathway is required for protection from myocardial ischemia- reperfusion injury by 3',4'-dihydroxyflavonol. Eur J Pharmacol, 758, 53-9.

Thomas CJ, Ng DC, Patsikatheodorou N, Limengka Y, Lee MW, Darby IA, Woodman OL, May CN, 2011. Cardioprotection from ischaemia-reperfusion injury by a novel flavonol that reduces activation of p38 MAPK. Eur J Pharmacol, 658(2-3), 160-7.

Toyokuni S, 1999. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. Pathol Int, 49, 91-102.

Tyler DD, 1975. Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver. Biochem J, 147, 493-504.

Ujang T, 2008. Selenium: its role as antioxidant in human health. Environ health prev Med, 13, 102–108- review.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J, 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol, 39, 44–84.

Wakatsuki A, Okatani Y, Izumiya C, Ikenoue N, 1999. Melatonin protects against ischemia and reperfusion- induced oxidative lipid and DNA damage in fetal rat brain. J Pineal Res, 26, 147-152.

Wang S, Dusting GJ, May CN, Woodman OL, 2004. 3',4'-Dihydroxyflavonol reduces infarct size and injury associated with myocardial ischaemia and reperfusion in sheep. Br J Pharmacol, 142(3), 443-52.

Waugh A, Grant A., Ross and Wilson, 2001. Anatomy and Physiology in Health and Illness, 9th edition, Churchill Livingstone, 9, 121-126.

Williamson G, Holst B, 2008. Dietary reference intake (DRI) value for dietary polyphenols: are we heading in the right direction? British Journal of Nutrition, 99 (3), S55–S58.

Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT, 2004. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stres to DNA and risk factor for cancer, artherosclerosis and diabetics, Clinica Chimica Acta, 339, 1-9.

Yang J, Kim CS, Tu TH, Kim MS, Goto T, Kawada T, Choi MS, Park T, Sung MK, Yun JW, Choe SY, Lee JH, Joe Y, Choi HS, Back SH, Chung HT, Yu R, 2017. Quercetin Protects Obesity - Induced Hypothalamic Inflammation by Reducing Microglia-Mediated Inflammatory Responses via HO-1 Induction. Nutrients. Erişim tarihi, 23 Haziran 20017, 9(7), E650. Erişim adresi, http://www.mdpi.com/2072-6643/9/7/650.

Yao YM, Bahrami S, Redl H, Fuerst S, Schlag G,1997. IL-6 release after intestinal ischemia/reperfusion in rats is under partial control of TNF. J Surg Res, 70, 21- 26.

Yapca OE, Borekci B, Turan MI, Gulapoglu M, 2014. The Effect of Agomelatine on Oxidative Stress Induced with Ischemia/Reperfusion in Rat Ovaries Adv Clin Exp Med, 23, 5, 715–721.

Yazıhan N, 2007. Deneysel İskemi Reperfüzyon Hasarında Eritropoietinin Koruyucu Etkisine K-Kanallarının Katılımı, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 122s.

Yilmaz M, Mogulkoc R, Baltaci AK, 2015. Effect of three-week zinc and melatonin supplementation on the oxidant- antioxidant system in experimental renal ischemia- reperfusion in rats. Acta Clin Croat, 54(4), 395-401

Young IS, Woodside JV, 2001. Antioxidants in health and disease. J Clin Pathol, 54, 176-186.

Zhang X, Wang Y, Shen W, Ma S, Chen W, Qi R, 2017. Rosa Rugosa Flavonoids Alleviate Myocardial Ischemia Reperfusion Injury in Mice by Suppressing JNK and p38 MAPK. Microcirculation. Erişim tarihi, 9 Haziran 2017. Erişim adresi, http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/micc.12385/abstract.

9. EKLER

EK A: Etik Kurul Kararı

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ DENEYSEL TIP UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ

HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

Karar Sayısı: 2016-18	Toplantı Tarihi:19.04.2016

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Rasim Moğulkoç ve Elif Sena Özdemir tarafından sunulan **"Sıçanlarda Ovaryum İskemi-Reperfüzyon Hasarı: 3',4'-Dihydroxyflavonol'un Lipid Peroksidasyonuna Etkisi"** başlıklı Yüksek Lisans Tezi projesi kurul tarafından değerlendirildi.

Projede belirtilen anestezik maddenin (Xylazine 5 mg/kg. Ketamin 60 mg/kg) kullanılması uygun görülmüştür. Projede belirtilen ve istatistiksel olarak en güvenilir sonuç elde edilebilecek asgari sayıda kullanılacak olan (44 adet sıçan) hayvan sayısı uygun görülmüştür.

Projenin hayvan deneylerine ilişkin yönlerinin Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesinde belirtilen "Etik Kurallar'' dikkate alınarak hazırlandığı belirlenmiştir.

Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesinde yer alan kurallar ve belirtilen "Hayvan Deneyleri İle İlgili Etik İlkeler'' saklı kalmak koşulu ile projenin hazırlanmasında "Etik Kurul Yönergesi İlkelerine Uyulduğuna'', çalışmanın deneysel kısmını yapacak çalışmacının "Deney Hayvanları Kullanım Sertifikasına'' sahip olduğu dikkate alınarak projenin hayvan kullanım etiği açısından **"uygun"** olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Nilsel OKUDAN
Başkan (Katıldı)

Prof. Dr. Zekeriya TOSUN
Üye (Katıldı)

Doç. Dr. Yasemin ÖZNURLU
Başkan v. (Katıldı)

Prof. Dr. Ercan DURMUŞ
Üye (Katılmadı)

Prof. Dr. Banu BOZKURT
Üye (Katıldı)

Doç. Dr. Muaz BELVİRANLI
Üye (Katıldı)

Doç. Dr. Kamil ÜNEY
Üye (Katıldı)

Doç. Dr. Güler YAVAŞ
Üye (Katıldı)

Yrd. Doç. Dr. Fatih KARA
Üye (Katıldı)

Yrd. Doç. Dr. Zafer SAYIN
Üye (Katıldı)

Vet. Hekim S. Metin GÖKYAPRAK
Üye (Katıldı)

Burhan YILMAZ
Üye (Katıldı)

Murat SABAN
Üye (Katıldı)

10. ÖZGEÇMİŞ

12.08.1992 tarihinde Konya'da doğdu. İlkokulu Özel İsmail Kaya İlkokulu, ortaokulu Özel Armağan Koleji, liseyi Meram Anadolu Lisesinde okudu. 2010 yılında Ege Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik bölümünde başladığı lisans öğrenimini 2014 yılında tamamladı. 2014 yılında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. Halen Konya Halk Sağlığı Müdürlüğü Meram Toplum Sağlığı Merkezi'nde diyetisyen olarak çalışmalarını sürdürmektedir.