



T.C.

RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM

ANABİLİM DALI

**RATLARDA OLUŞTURULAN OVER İSKEMİ- REPERFÜZYON HASARI
ÜZERİNE TENOKSİKAMIN ETKİSİ**

Dr. İlknur Merve AYAZOĞLU

UZMANLIK TEZİ

Rize-2019



T.C.

RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM

ANABİLİM DALI

RATLARDA OLUŞTURULAN OVER İSKEMİ- REPERFÜZYON HASARI
ÜZERİNE TENOKSİKAMIN ETKİSİ

Dr. İlknur Merve AYAZOĞLU

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Doç. Dr. Gülşah BALIK

Rize-2019

İÇİNDEKİLER

Özet.....	vii
İngilizce Özet.....	ix
Giriş.....	1
Genel Bilgiler.....	2
1. Over Anatomisi.....	2
a. Arterial Beslenmesi ve Venöz Drenajı.....	3
b. Over İnervasyonu.....	4
2. Over Embriyolojisi.....	4
3. Over Torsiyonu.....	5
4. Torsiyonda Tedavi Seçenekleri.....	6
5. İskemi.....	7
6. İskemi-Reperfüzyon Hasarı.....	9
7. Oksidatif Stres.....	10
8. İnflamasyon.....	10
9. Tenoksikam.....	11
Gereç ve Yöntem.....	12
1. Cerrahi İşlemler.....	13
2. Sakrifikasyon.....	14
3. Histopatolojik Değerlendirme.....	15
a. Semikantitatif Analiz.....	15
b. İstatistiksel Analiz.....	16
4. Biyokimyasal Değerlendirme.....	17

a. Rat TNF- α Düzeylerinin Belirlenmesi.....	17
b.TBARS Tayini.....	20
c. GSH Tayini.....	20
d. Protein Tayini.....	21
e. İstatistiksel Analiz.....	21
Bulgular.....	22
1. Histopatolojik Bulgular.....	22
2. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	26
3. Biyokimyasal Bulgular.....	30
Tartışma ve Sonuç.....	35
Kaynaklar.....	40
Teşekkür.....	44
Özgeçmiş.....	45

KISALTMALAR

A : Arter

AA : Askorbik Asit

AMH : Anti Müllerian Hormon

ATP : Adenozin Tri Fosfat

Ca²⁺ : Kalsiyum

CAT : Katalaz

COX : Siklooksijenaz

ELISA: Enzime Bağlı İmmnosorban Yöntem

GPx : Glutasyon Peroksidaz

GSH : Glutasyon

H&E : Hemotoksilen- Eozin

HOCl : Hidroklorür

H₂O₂ : Hidrojen Peroksit

HRP : Horseradish Peroksidaz

I : İskemi

IHC : İmmünohistokimya

IL-1 : İnterlökin- 1

I/R : İskemi- Reperfüzyon

L : Lumbal

LDH : Laktat Dehidrojenaz

MDA : Malondialdehit

MPO : Miyeloperoksidaz

NF- κ B : Nükleer Faktör-kappaB

NSAİİ : Nonsteroid Antiinflatuar İlaç

O₂- : Süperoksit

OD : Optik Yoğunluk

OH- : Hidroksil

OHHS : Over Histopatolojik Hasar Skoru

PG : Prostoglandin

PMNLs : Polimorfonükleer Lökosit

RO- : Alkoksil

ROS : Reaktif Oksijen Radikalleri

S : Sakral

SOD : Süperoksit Dismutaz

T : Torakal

TBA : Tiobarbitürik Asit

TBARS : Tiobarbitürik Asit ile Reaksiyona Giren Maddeler

TNX : Tenoksikam

V : Ven

TABLolar DİZİNİ

Tablo-1: Over histopatolojik hasar skoru

Tablo-2: Kaspaz- 3 pozitivite skoru

Tablo-3: Semikantitatif over histopatolojik hasar skoru analiz sonuçları

Tablo-4: İmmunohistokimyasal analiz sonucu

Tablo-5: Grupların Tümör Nekroz Faktör- a değerleri

Tablo-6: Grupların tiobarbitürik asit ile reaksiyona giren maddelerin değerleri

Tablo-7: Grupların glutatyon değerleri

Tablo-8: Biyokimyasal sonuçların analizi

RESİMLER DİZİNİ

Resim-1: H&E ile boyanmış over dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskobik görüntüleri.

Resim-2: Apoptoz biyobelirteci olan kaspaz-3 primer antikoru ile inkube edilen over dokularına ait kesitlerin ışık mikroskobundaki temsili görüntüsü.



ÖZET

AMAÇ: Bu çalışmamızda ratlarda deneysel over torsiyonunda, detorsiyon sırasında düşük ve yüksek doz tenoksikam (TNX) kullanılan ve kullanılmayan gruplarda iskemi/reperfüzyon(I/R) hasarını önlemede TNX'in rolünü doza bağımlı olarak, histolojik ve biyokimyasal analizlerle göstermeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM: Çalışmada toplam 60 adet 12 haftalık, 260-305 gram (ortalama 277 gram) ağırlığında Wistar albino cinsi dişi denek kullanıldı. 8 ayrı grup oluşturuldu. Grup-1 (sağlıklı, n=4), Grup-2 (sham, n=8), Grup-3 (iskemi, n=8), Grup- 4 (iskemi+ TNX 10 mg/kg, n=8), Grup- 5 (iskemi+ TNX 20 mg/kg, n=8), Grup-6 (iskemi/reperfüzyon, n=8), Grup-7 (iskemi/reperfüzyon+ TNX 10 mg/kg, n=8), Grup- 8 (iskemi/reperfüzyon+ TNX 20mg/kg, n=8) olarak tanımlandı. Anestezi altındaki ratların overlerine ulaşılarak vasküler klips ile 3 saat iskemi, 3 saat reperfüzyon yapıldı. Sadece iskemi(I) uygulanan tedavi gruplarında iskemiden 30 dakika önce belirtilen dozlarda TNX intraperitoneal verildi. I/R uygulanan tedavi gruplarında ise reperfüzyondan 30 dakika önce TNX intraperitoneal uygulandı. Over dokuları ve kalplerinden alınan kan örneklerinden biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler yapıldı.

BULGULAR: İskemi grubunda kontrol ve sham grubuna göre over histopatolojik hasar skoru (OHHS) ve kaspaz-3 aktivitesi artmış olarak bulunurken, I-10 ve I-20 gruplarında, I grubuna göre ve I/R-10 ve I/R-20 gruplarında I/R grubuna göre OHHS ve kaspaz-3 seviyelerini anlamlı derecede düşük bulundu. MDA düzeyini TNX kullanılan gruplarda diğer gruplara kıyasla daha düşük konsantrasyonda saptanırken, GSH miktarını TNX kullanılan gruplarda artmış olarak saptandı. İskemi grubuna göre, I-10

ve I/R-10 gruplarında ve I/R grubuna göre I/R-10 grubunda TNF-a anlamlı derecede düşük konsantrasyonda bulunmuştur.

SONUÇ: Ratlarda deneysel olarak oluşturulmuş over I/R hasarında TNX' in koruyucu etkisi, hem histopatolojik hem de biyokimyasal parametreler ile gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Over torsiyonu, İskemi-Reperfüzyon Hasarı, Tenoksikam



ABSTRACT

AIM: This study aimed to demonstrate the role of tenoxicam (TNX) in the prevention of ischemia/ reperfusion (I/R) injury in experimental ovarian torsion in rats, on which low and high dose TNX was used during detorsion, in dose-dependent, histological, and biochemical analyses.

METHODS: A total of 60 Wistar albino female subjects, which were 12-week old and weighed 260-305 grams (mean 277 grams), were used in the study. 8 different groups were formed, which were Group-1 (healthy, n = 4), Group-2 (sham, n = 8), Group-3 (ischemia, n = 8), Group-4 (ischemia + TNX 10 mg/kg, n = 8), Group-5 (ischemia + TNX 20 mg/kg, n = 8), Group-6 (ischemia / reperfusion, n = 8), Group-7 (ischemia / reperfusion + TNX 10 mg/kg, n = 8), Group-8 (ischemia / reperfusion + TNX 20 mg/kg, n = 8). The ovaries of the anesthetized rats were reached with vascular clips. They were exposed to ischemia and reperfusion for 3 hours. In the ischemia-treated treatment groups, TNX intraperitoneal was given at the indicated doses 30 minutes before the ischemia. In the ischemia/ reperfusion treatment groups, TNX intraperitoneal was applied 30 minutes before reperfusion. Biochemical and histopathological examinations were performed from blood samples taken from their hearts and ovary tissues.

RESULTS: Ovarian histopathological damage score (OHDS) and caspase-3 activities were increased in the ischemia group compared to the control and sham groups, while OHHS and caspase-3 levels were significantly lower in the I-10 and I-20 groups compared to the I group and in the I/R-10 and I/R-20 groups compared to the I/R group. We found MDA levels to be lower in the TNX treated groups than in the other groups, whereas GSH levels were increased in the TNX treated groups. There was a significant decrease in TNF- α in the I-10 and I/R-10 groups and in the I/R-10 group compared to the I/R group.

CONCLUSION: The protective effect of tenoxicam in experimental ovarian I/R injury in rats was indicated by both histopathological and biochemical parameters.

Keywords: Ovarian torsion, Ischemia-Reperfusion Injury, Tenoxicam



GİRİŞ

Over torsiyonu % 2,7 prevalansı ile 5. en sık görülen jinekolojik acildir (1). İn utero hayattan menapozaya kadar tüm yaş gruplarında görülmele birlikte, üreme çağındaki kadınlarda daha yüksek oranda izlenir (2). Infundibulopelvik ligament ve uteroovaryen ligamentin her ikisinin kendi etrafında dönmesi sonucu, başlangıçta venöz kan akımının azalması, devamında arteriyel kan akımının azalması ile iskemi ve infarkta ilerleyebilmektedir (3). Normal bir tüp ve overin torsiyonuna nadiren rastlanırken, en sık torsiyone olan neoplazm benign kistik teratomdur (4). Over torsiyonu için özel bir büyüklük kriteri yoktur fakat bir çalışmada torsiyonların % 83'ünün 5 cm veya daha büyük overlerde olduğu bildirilmiştir (4). Over kanseri, endometrioma ve abse gibi inflamatuvar kitleler ise adezyonlar nedeni ile nadiren torsiyone olur (4).

Over torsiyonunda en sık semptom akut başlangıçlı pelvik ağrıyı takip eden bulantı ve kusmadır. Bu nonspesifik bulgu ve semptomlar tanı ve tedavide gecikmeye neden olmaktadır (3). Bu gecikme ise hastanın overini kaybetmesine ve üretim kapasitesinin azalmasına neden olmaktadır (5).

Over torsiyonunda geleneksel cerrahi tedavi salpingooferektomi iken yapılan çalışmalar detorsiyonu alternatif tedavi modeli olarak desteklemiş ve günümüzde standart tedavi haline getirmiştir (6). Diğer yandan iskemi tedavisindeki amaç yalnızca kan akımını sağlamak değil, doku reperfüzyonunu da restore etmek olmalıdır (1). Çünkü iskemik dokunun reperfüzyonu, dokuya iskeminin verdiği zarardan daha ciddi zararlara sebep olabilmektedir (7). Bu süreç iskemi-reperfüzyon(I/R) hasarı olarak bilinmektedir (7). I/R hasarının patogeneğinde nötrofil ve trombosit aktivasyonu, reaktif oksijen radikalleri(ROS) ve sitokinlerin salınımı, inflamasyon gibi pek çok faktörün rol aldığı düşünülmektedir (7).

Prostoglandinler(PG) I/R ile ilişkili inflamasyonda ana rol oynamaktadırlar (7). Siklooksijenaz(COX), bu PG'lerin sentezi için anahtar enzimdir. COX-2 patolojik durumlarda hızla indüklenir ve proinflamatuvar PG'leri arttırarak inflamasyona yol açar (7). Ayrıca ROS, reperfüzyondan sonra çok miktarda üretilmekte ve I/R hasarında önemli bir rol oynamaktadır (7).

TNX; antipiretik, analjezik etkilerinin yanında nonselektif COX-2 inhibisyonu ile bir nonsteroid antiinflamatuvar ilaçtır. Yapılan bazı çalışmalarda beyin ve kas dokusundaki I/R hasarını önlediği gösterilmiştir (8,9). Over torsiyonunun tedavisinde hem klinik semptomlarından olan ağrının giderilmesi hem de detorsiyon sonrası oluşacak I/R hasarının önlenmesi açısından umut vadeden bir molekül olabilir.

Biz bu çalışmamızda ratlarda deneysel over torsiyonunda, detorsiyon sırasında düşük ve yüksek doz TNX kullanılan ve kullanılmayan gruplarda I/R hasarını önlemede TNX' in etkisini doza bağımlı olarak, histolojik ve biyokimyasal analizlerle göstermeye çalıştık.

GENEL BİLGİLER

1. Over Anatomisi

Overler arka karın duvarının üst lumbal bölgesinde gelişir ve pelvisin lateral duvarına göç eder (10). Overle primordial uterusu geliştirmekte olan labium majusa bağlayan fibröz bir şerit olan gubernaculum ovarinin erişkindeki derivelere, overle uterus arasındaki ligamentum ovarii proprium ve uterus ile labium majus arasındaki ligamentum teres uteridir (10).

Overler; badem şeklinde ve büyüklüğünde, içerisinde oositlerin geliştiği, dişi cinsiyet organlarıdır. Ayrıca üreme hormonlarının üretildiği endokrin bezlerdir. Her bir over kısa bir peritoneal katlantı-mezoovarium ile asılı haldedir. Mezoovarium, uterusun daha geniş bir mezenteri olan ligamentum latum uterinumun alt bölümüdür (10).

Puberte öncesi kızlarda, over yüzeyini örten bağ dokusundan kapsül (tunica albuginea ovarii), ovaryan mezotelyum veya yüzey (germinal) epitel ile kaplıdır. Tek tabaka küboidal hücreli bu epitel overe, parlak yüzeyli komşu mezotelyum yüzeyine tezat oluşturacak şekilde donuk, gri renkte bir görünüm kazandırır. Puberte sonrası over yüzey epitel, ovulasyon sırasında over foliküllerinin tekrarlayan yırtılmaları ve oositlerin atılması nedeni ile giderek skarlı ve biçimsiz bir hal alır (10).

Over damarları, lenfatikleri ve sinirleri pelvis girişini geçerek, bir peritoneal katlantı olan ve ligamentum latum uterinumun mezoovariumu ile devam eden ligamentum suspensorium ovarii içinde üst dış taraftan overe ulaşır. Mezoovarium içinde iç tarafta kısa bir ligamentum ovarii proprium, overi uterusu bağlar. Sonuçta, overler elle veya ultrasonik pelvik muayene sırasında, tipik olarak uterus ile pelvis yan duvarı arasında bulunur (10).

a. Arteriyel Beslenmesi ve Venöz Drenajı

Arteria (A) ovarica, aorta abdominalisten ayrılır ve karın arka duvarı boyunca aşağıya iner. Pelvis girişinde a.-vena(V) iliaca externaları çaprazlar ve ligamentum suspensorium ovarii içine girerek overlerin dış yüzeyine ulaşır. A. uterinumun dalları uterus kenarı boyunca ilerleyerek overin iç tarafına ulaşır. Bu iki arter ovaryan ve tubal dallarına ayrılarak bu yapıları farklı uçlarından besler. Bu dallar birbirleriyle anastomoz yaparak her iki yapı için abdominal ve pelvis kaynaklı bir kollateral dolaşım sağlar (10).

Overi drene eden venler, ligamentum latum uteri içinde over ve tuba uterina kenarında, sarmaşık benzeri görünümüne sahip pleksus pampiniformisi oluşturur. Pleksustaki venler genellikle tek bir vena ovaricayı oluşturmak üzere birleşir. V. ovarica pelvis minörü a. ovarica ile birlikte terk eder. Sağ v. ovarica v. cava inferiorla birleşmek üzere yukarı doğru ilerlerken, sol v. ovarica v. renalis sinistraya drene olur. Tuba uterina venleri v. ovarica ve pleksus venosus uterinusa drene olur (10).

b. Over İnervasyonu

Sinirler kısmen overle ilgili damarlarla birlikte seyreden pleksus ovaricustan, kısmen de pleksus uterovajinalisten köken alır. Overler ve tuba uterinalar intraperitonealdir ve bu nedenle pelvik ağrı çizgisinin üzerindedir. Visseral afferent ağrı lifleri, pleksus ovaricus ve lomber splanknik sinirlerle Torakal(T)11- Lumbal(L)1 seviyesindeki spinal duyu ganglionlarındaki hücre gövdelerine girer. Bu seyrini sempatik liflerle birlikte ancak onlarla ters yönde yukarı doğru ilerleyerek gerçekleştirir. Visseral afferent refleks lifler parasempatik lifleri pleksus uterinus, pleksus hipogastricus inferior ve pelvik splanknik sinirler boyunca ters yönde takip ederek S(Sakral)2- S4 spinal duyu ganglionlarındaki hücre gövdelerine ulaştırır (10).

2. Over Embriyolojisi

Dişi embriyolarda gonadal gelişim daha yavaş olur. X kromozomları ovaryan gelişim için genler taşıırken, ovaryan organogenezde otozomal bir genin de rol oynadığı ortaya çıkmıştır (11). 10. haftaya kadar, overler histolojik olarak ayırt edilemezler. Primer seks kordonları belirgin değildirler, medulla içerisine doğru sokulurlar ve rudimenter bir yapı olan rete ovariiyi

oluştururlar. Bu oluşan yapı ve primer seks kordonları (kortikal kordonlar), erken ftal periyotta overin yüzey epitelinden köken olarak altta bulunan mezenşim içerisine doğru girerler. Bu epitel mezotelden gelişmektedir. Kortikal kordonların boyutları arttığında, primordial germ hücreleri, onların ilerine girer. Yaklaşık 16. haftada, bu kordonlar izole hücre kümelerine parçalanırlar, oluşan primordial foliküllerin her biri, primordial germ hücrelerinden köken alan bir oogonium içerir. Oogoniumlar, primer seks kordonlarından gelişen, tek tabakalı yassı foliküler hücreler ile sarılmışlardır. Ftal yaşam sırasında, overlerde, oogoniumlarda oluşan aktif mitoz sonucu, binlerce primordial folikül meydana gelir (11).

Postnatal dönemde oogonium meydana gelmez. Her ne kadar doğumdan önce pek çoğu dejenere olsa da, doğumdan sonra iki milyon civarında primer oosit kalmaktadır. Doğumdan sonra overin yüzey epiteli düzleşir ve tek tabakalı hale geçen hücreler, over hilusunda, periton mezoteli ile devamlılık kazanırlar. Yüzey epiteli, korteksteki foliküllerden, tunika albuginea adı verilen, ince bir fibröz kapsülle ayrılır. Overler, gerileyen mezonefrozdaki ayrıldıktan sonra, mezenterisi olan, mezoovarium ile bağlanırlar (11).

3. Over Torsiyonu

Adneksiyal torsiyon ilk olarak 1890 yılında Sutton tarafından kaydedilmiştir (12). Over kisti, fallop tüpü, paratubal kist, ya da nadiren saplı uterin myom nedeni ile bir overin vasküler pedikülünün torsiyonu, burulan sapın distalindeki yapılarda iskemiye ve ani başlayan akut ağrıya neden olur. Over torsiyonunda olguların üçte ikisinde patoloji sağ overdedir. Bunun nedeni muhtemelen sol adneksin sigmoid kolona yakınlığı ve dolayısıyla dar bir alanda mobilize olamamasıdır (13).

Over torsiyonu gelişiminde predispozan faktörler; kist veya neoplazi nedeni ile overin büyümesi, adneksial mezoonun aşırı uzun olması(mobilitesinin artması), adneksial venöz konjesyona yol açan durumlar ve tubal hastalıklardır (2). Benign kistik teratom en sık torsiyone olan neoplazmdır. Adezyonlar nedeni ile over kanseri ve endometriomalar ya da abse gibi inflamatuvar kitleler nadiren torsiyone olur. Polikistik over torsiyone olabilirken, normal bir tüp ve overin torsiyonuna nadiren rastlanır.

Adneksial torsiyon tanısı zordur. Klinisyen tanısı hikaye, klinik muayene, pelvik ultrasonografi gibi ek tetkiklere dayandırılmalıdır (4). Ultrasonografide over torsiyonunu düşündüren bulgular; tek taraflı büyümüş over(>4 cm), periferik dizilimli foliküller, over içerisinde fonksiyonel ya da neoplazik kitle, serbest sıvı (over etrafında ya da douglasta) ve dönmüş vasküler pediküldür (girdap işareti). Ayrıca over orta hatta ve uterus fundusun üzerinde yerleşmiştir (2).

Torsiyon ağrısı genellikle şiddetli ve sürekli, ya da torsiyon parsiyel ve intermitant ise ağrı artıp azalabilir. Torsiyon ve sonraki batın ağrısı başlangıcı sıklıkla bir şey kaldırma, egzersiz veya cinsel ilişki gibi aktiviteler ile birlikte. Otonomik refleks yanıtlar (örneğin; bulantı, kusma, taşikardi ve endişe) genellikle mevcuttur. Hafif ateş yükselmesi, taşikardi ve lökositoz doku nekrozuna eşlik edebilmektedir. Eş zamanlı gebelik mevcut olmadıkça, gebelik testi negatiftir. Akut ağrısı ve tek taraflı adneksial kitlesi olan her kadında adneksial torsiyondan şüphelenilmelidir. Muayenede alt kadranslarda lokalize direk ve rebound hassasiyet bulunabilir. Diğer önemli bir bulgu bimanuel muayenede büyük pelvik kitle bulunmasıdır (4).

Torsiyon işlemi ilgili adneksin lenfatik ve venöz drenajını tıkar; bu nedenle, torsiyone organın hızla boyutu artar ve muayenede kolayca palpe edilebilir ya da ultrasonografi ile görüntülenebilir. Ancak, doppler ultrasonografide overe kan akımı varlığı kesinlikle torsiyonu ekarte ettirmez.

4. Torsiyonda Tedavi Seçenekleri

Over torsiyonunda reproduktif fonksiyonların korunması için erken müdahale gereklidir. Torsiyon şüphesinde cerrahi müdahale geciktirilmemelidir.

Geçmişte over torsiyon hastalarında tromboembolizm korkusundan dolayı radikal cerrahi yöntemler-salpingooferektomi tercih edilirdi. Yapılan çalışmalarda, torsiyon olgularında pulmoner emboli insidansı %0,2 olarak bildirilmiş olup, bu oranda detorsiyon sonrası farklılık bildirilmemiştir (14).

Günümüzde iskemik overin detorsiyonu sonrası organ koruyucu yaklaşımların hem erişkin hem de çocuklarda güvenli ve etkili olduğu düşünülmektedir. Ama malignite şüphesi olan postmenapozal hastalarda, dokunun gangrenöz olduğu hastalarda veya ailesini tamamlamış hastalarda radikal cerrahi düşünülmelidir. Postmenapozal ve yaşlı kadınlarda ooferektomi tedavi seçeneği olarak önerilir.

Laparoskopik detorsiyon laparotomik detorsiyona göre daha az postoperatif ağrı, daha fazla hasta memnuniyeti ve daha az hastanede kalış süresiyle ilişkilidir (13). Laparoskopi over torsiyonunun değerlendirilmesi ve yönetiminde altın standarttır. Fertilitasını korumak isteyen genç hastalarda tercih edilir.

Rekürren torsiyon olguları literatürde bildirilmiştir. Bu hastaların tedavisinde utero-ovaryan ligamentin plikasyonu, ovaripeksi ve ooferopeksi gibi cerrahi yöntemler mevcuttur (14).

Over torsiyonunda yapılan cerrahi tedaviler kanlanmayı yeniden sağlamakta fakat detorsiyon sonrası oluşacak I/R hasarını önlememektedir. Bu I/R hasarını önlemeye yönelik literatürde pek çok çalışma yapılmıştır. Bunlardan biri olan on-off metotta kademeli reperfüzyonun I/R hasarını azalttığı görülmüştür (14). Yapılan pek çok çalışmaya rağmen I/R hasarını engellemek için rutin uygulamaya girecek bir tedavi bulunamamıştır.

5. İskemi

İskemi kelimesi, Yunanca "iskho" (engelleme anlamında) ve "hàima" (kan anlamında) kelimelerinin birleşmesi ile oluşmuştur. İskemi, başka bir deyişle dokuya gelen kan miktarının azalması, klinik tıpta en sık görülen hücre zedelenmesi nedenidir. Anaerobik glikoliz ile enerji üretiminin devam edebildiği hipoksinin aksine; iskemide, glikoliz için gerekli maddelerin ortama getirilmesinde de sorun vardır. Bu yüzden, iskemik dokularda potansiyel substratlar tükendiğinde veya normalde kan akımıyla uzaklaştırılacak metabolitler glikolizi inhibe ettiğinde anaerobik enerji üretimi de durur. Dolayısıyla iskemi, dokuları hipoksiden daha hızlı zedeler (15).

Hipoksik hücrelerde hücre zedelenmesine neden olan asıl biyokimyasal anormallik, azalan oksijen nedeni ile hücre içinde adenozin trifosfat(ATP) üretiminin düşmesidir. ATP'nin kaybı; aralarında iyon pompaları (hücrenin şişmesine ve tüm olumsuz sonuçlarıyla hücre içine kalsiyum (Ca²⁺) geçişine neden olur), histolojik olarak karbonhidrat boyaları ile boyanmanın azalması biçiminde kendini gösteren glikojen depolarının boşalması ve laktik asit birikimi ile hücre içi pH azalması ve protein sentezinin azalması da bulunan çok sayıda enerjiye bağımlı hücre sisteminin yetmezliğine neden olur (15).

Bu dönemde fonksiyonel sonuçlar ağır olabilir. Hipoksi devam ederse; derinleşen ATP eksikliği, bozuklukların daha da artmasına, mikrovillusların kaybına ve kabarcıklar oluşmasına neden olur. Bu dönemde, hücrenin tümü organelleri ile (mitokondri, endoplazmik retikulum) birlikte belirgin olarak şişmiş; su, sodyum ve klor konsantrasyonları artmış; potasyum konsantrasyonu azalmıştır. Yeniden oksijen sağlanırsa, tüm bu değişiklikler geri dönüşlüdür (15).

İskemi devam ederse, geri dönüşsüz zedelenme ve nekroz meydana gelir. Geri dönüşsüz zedelenmede mitokondrilerin ileri derecede şiştiği, lizozomların şiştiği, plazma membranlarında ağır hasar olduğu görülür. Hücre

içine yoğun olarak kalsiyum girişi görülebilir. Ölüm genellikle nekroz yoluyla ancak apoptozun da katkısı vardır. Apoptotik yola, muhtemelen yapısı bozulan mitokondrilerden sızan pro-apoptotik moleküller tarafından aktive edilir. Hücre bileşenleri ilerleyici biçimde parçalanır ve hücre içi enzimler hücreler arası alana yayılır. En sonunda, ölü hücrelerin yerini fosfolipidlerden oluşan büyük kitleler halindeki myelin figürleri alır. Bunlar daha sonra lökositler tarafından fagosite edilir veya kalsifiye olabilecek yağ asitlerine parçalanır (15).

6. İskemi- Reperfüzyon Hasarı

Hücreler geri dönüşlü biçimde hasarlanmışsa; kan akımının yeniden sağlanması, hücrenin iyileşmesi ile sonuçlanabilir. Ancak; belli bazı durumlarda, iskemik fakat canlı olan dokuda kan akımının yeniden sağlanması, paradoksal olarak hasarın artması ve hızlanması ile sonuçlanır. Bunun sonucunda, dokularda iskemik dönemin sonunda geri dönüşsüz olarak hasarlananlara ek olarak hücre kaybı yaşanır. I/R hasarı olarak adlandırılan ve klinik olarak önemli olan bu süreç, özellikle kalp ve beyin infarktüslerinde doku hasarlanmasının artmasında önemli rol oynayabilir (15).

İskemik dokunun yeniden perfüzyonunun hücre hasarını artırmasında birkaç mekanizmanın rolü olabilir:

- Yeni hasar, reoksijenizasyon sırasında parankimal ve epitelyal hücrelerden ve infiltrate olan lökositlerden daha çok ROS üretilmesi ile oluşabilir. Gelen oksijen miktarı arttığında; özellikle, mitokondri zedelenmesi oksijenin tam olarak redükte edilememesine neden olduğundan ve oksidazların lökositler, endotel hücreleri ve parankimal hücreler üzerindeki etkilerinden dolayı ROS miktarında da buna karşılık bir artış olabilir. Hücrenin antioksidan savunma sistemleri de iskemiden olumsuz etkilenmiş olabileceğinden, serbest radikallerin birikimi kolaylaşır (15).

- İskemik hasara eşlik eden inflamasyon, ortama daha çok lökosit ve plazma proteini geleceğinden, reperfüzyonla artabilir. Aktifleşen lökositlerin ürünleri, daha fazla hücre hasarına neden olabilir. Kompleman sisteminin aktivasyonu da I/R hasarına katkı yapabilir. Bilinmeyen nedenlerle, bazı antikolar iskemik dokulara çökmeye yatkındırlar. Kan akımı yeniden sağlandığında, kompleman proteinleri biriken antikolara bağlanır, aktifleşir ve hücre hasarı ile inflamasyonu artırır (15).

7. Oksidatif Stres

Reperfüzyon boyunca iskemik dokulara kan tarafından taşınan proinflamatuvar polimorfonükleer lökositler(PMNLs)'in sayısının I/R hasarının meydana gelmesinden sorumlu olan inflamasyon ve oksidatif stresin her ikisinin de oluşumunda rol aldığı düşünülmektedir. Reperfüzyondan sonra fazla miktarda ROS salgılanmaktadır. ROS'un özellikle lipit peroksidaz aracılığı ile I/R hasarında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Hücrel membran lipitlerini okside ederler ve hücrenin hem membran yapısını hem de fonksiyonlarını değiştirebilen malondialdehit (MDA) gibi toksik ürünlerin oluşumuna yol açarlar (7).

Oksidatif hasara karşı hücrel savunma, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzimler veya glutatyon (GSH), askorbik asit (AA) ve a-tokoferol gibi enzimatik olmayan bileşiklerle sağlanır. Artan ROS üretimi ve antioksidanların tüketimi oksidatif stres lehine oksidatif-antioksidatif dengeyi bozar (7).

8. İnflamasyon

İnflamasyon, I/R hasarının patogeneze katkıda bulunduğu düşünölen bir diğer önemli bileşendir. PG'ler I/R ile ilişkili inflamasyonda önemli bir rol oynar (7).

Siklooksijenaz (COX) bu PG'lerin sentezindeki kilit enzimdir. COX-1 ve COX-2 en yaygın izoenzimlerdir. COX-1 hem normal hücre aktivitesi regölasyonundan hem de dokulardaki sitoprotektif aktiviteden temel olarak sorumludur. Öte yandan COX-2, patolojik durumlarda hızla indüklenir ve proinflamatuvar PG'leri artırarak inflamasyona yol açar (7).

Son zamanlarda, proinflamatuvar interlökin-1 beta (IL-1) ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF-a)'nın, I/R'a maruz kalan dokularda arttığı gösterilmiştir (7).

9. Tenoksikam

Nonsteroid antiinflamatuvar ilaç (NSAİİ)'lar, tüm dünyada analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar etkilerinden dolayı çok sık kullanılan ilaçlardandır (16). Klinik olarak iskelet-kas sisteminin inflamatuvar, dejeneratif ve mekanik hastalıklarında, postoperatif ağrılı durumlarda, ağrı ve inflamasyonla seyreden respiratuvar, jinekolojik ve ürolojik hastalıklarda da kullanılmaktadır (17).

Tenoksikam, oxicam grubundan tionetiyazin türevi bir NSAİİ'dir. Eliminasyonu karaciğer yolu ile olur. Eliminasyon yarı ömrü 72 saattir. Yıkım ürünleri olan 5'-hidroksil ve 6-0 glukuronidatin, 2/3 'ü safra ve 1/3 'ü üriner yol ile atılır (16). Diğer NSAİİ'ler gibi siklooksijenazı inhibe ederek prostaglandinlerin sentezini baskılar. Nonselektif COX-2 inhibitörüdür. COX-

2, inflamasyon olan bölgede indüklenir; mitojenler, sitokinler ve endotoksinlerce stimüle edilir, inflamasyonu artırır.

Tenoksikam ile yapılan çalışmalar genel olarak ağrı ve inflamasyon başlıklarını içeren çalışmalardır (17,18).

Paino M ve ark.'ı (18) , ratlarda diklofenak, indometazin, naproksen, piroksikam ve tenoksikamın SOR oluşumu üzerine etkilerini karşılaştırmışlardır. Çalışmada ilaçların bu etkilerini miyeloperoksidaz (MPO), hipoklorür (HOCl), hidrojen peroksit (H₂O₂) aktivitesi ve Laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyi ile değerlendiren araştırmacılar, çalışmada kullanılan tüm NSAİ'nin terapötik dozlarda lökosit aktivitesini baskıladığı sonucuna varmışlardır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Ratlarda oluşturulan over I/R hasarı üzerine tenoksikamın etkisi adlı çalışmanın, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulunun, 29/ 06/ 2018 tarih ve 2018/ 39 sayılı kararıyla, etik kurallara uygun bir çalışma olduğuna karar verilmiştir. Çalışmada kullanılan toplam 60 adet 12 haftalık, 260-305 gram (ortalama 277 gram) ağırlığında Wistar albino cinsi dişi denek, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilerek kullanılmıştır. Kullanılan tüm hayvanlarını deney hayvanları ünitesinde, hijyenik koşullar altında, 12 saatlik aydınlık ve karanlık döngü sağlanan ortamda, %55-60 nem oranı ve 22,3 °C ortam sıcaklığında, sınırsız musluk suyu ve pellet yem ile ad-libitum olarak beslenmeleri ve yaşamaları sağlandı.

Çalışmada; 8 ayrı grup oluşturuldu. Oluşturulan gruplar sırasıyla aşağıdaki gibi adlandırıldı.

- 1.Grup (4 hayvan):** Sağlıklı
- 2.Grup (8 hayvan):** Sham operasyonu
- 3.Grup (8 hayvan):** İskemi (I)
- 4. Grup (8 hayvan):** İskemi (I)+ 10 mg TNX
- 5. Grup (8 hayvan):** İskemi (I)+ 20 mg TNX
- 6. Grup (8 hayvan):** İskemi ve reperfüzyon(I/R)
- 7. Grup (8 hayvan):** İskemi ve reperfüzyon(I/R) + 10 mg TNX
- 8. Grup (8 hayvan):** İskemi ve reperfüzyon(I/R) + 20 mg TNX

1. Cerrahi İşlemler

Tüm cerrahi prosedürler steril koşullar altında gerçekleştirildi. Hayvanlar 50 mg/kg ketamin (Ketalar, Pfizer, Türkiye) + 5 mg/kg ksilazin (Rompun, Bayer, ABD) enjeksiyonu ile anestezi altına aldı. Anestezide oldukları anlaşıldığında uygun cerrahi alan temizliği yapılarak alt karın orta hat alanında 2.5 cm uzunlamasına bir kesik oluşturuldu. Bu küçük kesiden uterin boynuzlar ve adneksler bulunarak overlere ulaşıldı. Çalışma 8 grup olacak şekilde düşünüldü, gruplar aşağıdaki gibi planlandı:

- 1.Grup:** Sağlıklı grup olup, sadece örnekler alındı. Ratların birinde tubalar hidropik görünümde olup biyokimyasal testler için örnek alınmadı.
- 2.Grup:** Sham grubuydu ve ratlarda sadece laparotomi yapıldı ve kapatıldı.
- 3.Grup:** Yalnız iskemi grubuydu. Bilateral overlere yukarıda anlatıldığı gibi ulaşıp vasküler klipsler ile 3 saat boyunca iskemi uygulandı. İskemiden 30

dakika önce herhangi bir ilaç verilmeden yalnızca salin(%0,9 NaCl) intraperitoneal uygulandı. İskemi sonrasında örnekler alınarak ratlar sakrifiye edildi.

4.Grup: I+10 mg/kg Tenoksikam(Tilcotil, Deva, Türkiye) grubu ratlarda iskemi indüklenmeden 30 dakika önce intraperitoneal olarak 10 mg/kg TNX uygulandı. Yarım saatin sonunda yukarıda belirtildiği gibi bilateral overlerde iskemi indüklendi. 3 saat iskemi sonrasında örnekler alınarak ratlar sakrifiye edildi.

5.Grup: I+20 mg/kg TNX grubu ratlarda iskemi indüklenmeden 30 dakika önce intraperitoneal olarak 20 mg/kg TNX uygulandı. Yarım saatin sonunda yukarıda belirtildiği gibi bilateral overlerde iskemi indüklendi. 3 saat iskemi sonrasında örnekler alınarak ratlar sakrifiye edildi.

6.Grup: I/R grubu bilateral overlerde iskemi ve sonrasında reperfüzyon yapıldı. Vasküler kelepçe yardımı ile overlerde 2,5 saat boyunca iskemi indüklendi. 2,5 saat sonrasında yalnız salin(%0,9 NaCl) intraperitoneal olarak uygulandı ve toplam 3 saat sonunda vasküler kelepçeler alınarak doku toplam 3 süresince reperfüze edildi. Sonrasında örnekler alınarak ratlar sakrifiye edildi.

7.Grup: I/R+10 mg/kg TNX grubu over dokusunda iskemi yukarıda belirtildiği gibi indüklendikten 2,5 saat sonra 10 mg/kg TNX intraperitoneal olarak uygulandı. İlaç uygulamasından yarım saat sonra vasküler kelepçeler kaldırılarak doku reperfüze edildi ve toplam 3 saat reperfüzyonun ardından ratlar sakrifiye edildi. Bu grupta 2 rat ex olduğu için örnek alınamadı.

8.Grup: I/R+20 mg/kg TNX grubu over dokusunda iskemi yukarıda belirtildiği gibi indüklendikten 2,5 saat sonra 20 mg/kg TNX intraperitoneal olarak uygulandı. İlaç uygulamasından yarım saat sonra vasküler kelepçeler kaldırılarak doku reperfüze edildi ve toplam 3 saat reperfüzyonun ardından ratlar sakrifiye edildi.

Tüm grupların over dokuları ve kalplerinden alınan kan örnekleri antikoagülansız tüplere konularak 4000 RPM'de +4°C'de 10 dakika santrifüj

edildi ve elde edilen serum üzerinde biyokimyasal parametreler incelendi. Over dokuları soğuk zinciri bozmamak kaydı ile bir sonraki aşama gerçekleştirilinceye kadar -80°C 'de saklandı. Her bir gruptan alınan over dokuları, biyokimyasal ve histopatolojik olarak değerlendirildi.

2. Sakrifikasyon

Örneklemlerin yapılmasından sonra tüm denekler yüksek doz ketamin inhalasyonu ile sakrifiye edildiler.

3. Histopatolojik Değerlendirme

a. Semi-kantitatif Analiz

Hemotoksilen&Eozin(H&E) boyanmış kesitler daha önce yapılan çalışmalara uygun olarak tasarlanarak over histopatolojik hasar skoru (OHHS) hesaplandı (19,20). OHHS'de vasküler konjesyon, hemoraji, ödem, infiltrasyon ve hemorajik foliküller değerlendirilerek skorlama yapıldı (Tablo-1). Gruplardaki her bir preparattan 20 farklı alan iki kör histopatolog tarafından ölçülmüştür.

Preparatları inceleyen histopatologlar çalışmanın gruplarını göremeyecek şekilde preparatlar kodlanarak OHHS'yi hesaplamıştır.

Tablo-1:Over histopatolojik hasar skoru

	Skor			
	<25%	≥25%	≥50%	≥75%
Vasküler konjesyon	1	2	3	4
Hemoraji	1	2	3	4
Ödem	1	2	3	4
İnfiltrasyon	1	2	3	4
Hemorajik foliküller	1	2	3	4

İmmunohistokimyasal (IHC) ile boyanmış preparatlar Tablo-2’de gösterildiği gibi iki kör histopatolog tarafından ölçülmüştür. Her bir over dokusuna ait preparatta rastgele olarak seçilmiş on beş farklı alan ölçülmüştür. Histopatologlar çalışmanın gruplarını göremeyecek şekilde preparatlar kodlanarak OHHS’yi hesaplamıştır.

Tablo-2: Kaspaz-3 pozitivite skoru

Yüzde	Skor
<%5	1
%6-%25	2
%26-%50	3
≥%51	4

b. İstatistiksel Analiz

Semi-kantitatif analizler sonucu elde edilen veriler SPSS 18.00 (IBM Corp., NY, USA) istatistik programı kullanılarak hesaplanmıştır. Veriler normallik testleri ardından parametrik olmayan veriler median ve %25'lik ve %75'lik çeyrek dilimler olacak şekilde hesaplanmıştır. Gruplar arasında farklar Kruskal Wallis ve Post Hoc Tamhane T2 testi kullanılarak analiz edilmiştir. $P \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.

5. Biyokimyasal Değerlendirme

Antikoagülansız tüplere alınan kan örnekleri fibrin oluşumunun gerçekleşmesi için yaklaşık 1 saat oda sıcaklığında bekletildi ve ardından 2-8°C 1000×g 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen kan serumları (süpernatantlar) ependorf tüplere koyularak Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'nda -80°C'de dondurucuda numunelerin çalışıldığı güne kadar muhafaza edildi. Numunelerin çalışılacağı günden 24 saat önce ependorflar -80°C derin dondurucudan çıkartıldı ve kademeli olarak sırasıyla -20°C ve ardından +4°C'de çözünmeye bırakıldı. Numunelerin hepsi aynı gün ve tek seferde çalışıldı.

a. Rat TNF- α Düzeylerinin Belirlenmesi

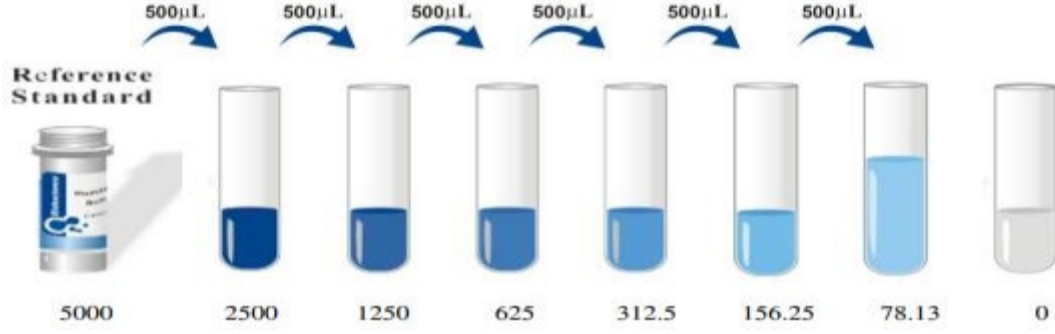
Numunelerin düzeylerinin ölçümleri Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Araştırma ve Uygulama Laboratuvarında enzime bağlı immünosorban yöntem (ELISA) ile TNF- α

ticari kiti (Elabscience Rat TNF- α kiti, katalog no: E-EL-R0019) kullanılarak gerçekleştirildi.

- i) **Testin Prensipleri:** Bu ELISA kiti, Sandwich-ELISA ilkesini kullanır. Kit içinde bulunan mikro ELISA plakası, Rat TNF- α 'ya özgü bir antikora önceden kaplanmıştır. Standartlar veya numuneler, mikro ELISA plakanın kuyucuklarına ilave edilir ve spesifik antikora ile birleştirilir. Daha sonra Rat TNF- α ve Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) konjugatına özgü bir biyotininle edilmiş tespit antikoru, mikro plakaya art arda eklenir ve inkübe edilir. Serbest bileşenler yıkanır. Substrat çözeltisi her kuyucuğa eklenir. Sadece Rat TNF- α , biyotininle edilmiş tespit antikoru ve Avidin-HRP konjugatı içeren kuyucuklar mavi renkte görünür. Enzim-substrat reaksiyonu, durdurma çözeltisi ilave edilerek sonlandırılır ve renk sarıya döner. Optik yoğunluk (OD), 450 nm \pm 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. OD değeri, Rat TNF- α 'nın konsantrasyonu ile orantılıdır. Numunelerin OD'unu standart eğriyle karşılaştırarak numunelerdeki Rat TNF- α konsantrasyonu hesaplanır.

- ii) **Reaktif Hazırlama:** Tüm reaktifler oda sıcaklığına (18-25°C) getirildi.

- **TNF- α Standardı:** Kit içerisindeki standart 1 dakika 10.000 \times g'de santrifüj edildi ve 1 ml "Reference Standard&Sample Diluent" eklenerek 5000 pg/mL stok standart oluşturuldu. Hazırlanan 20 ng/mL standarttan seri dilüsyon yapılarak sırasıyla 5000, 2500, 1250, 625, 312.5, 156.25, 78.13, 0 pg/mL standartları hazırlandı ve "Reference Standard&Sample Diluent" solüsyonu 0 ng/mL standardı olarak kullanıldı.



- **Yıkama Solüsyonu:** 750 mL yıkama tamponu hazırlamak için 30 mL konsantre yıkama tamponu 720 mL distile su ile seyreltildi.
- **Biotinylated Detection Ab Diluent:** Kullanmadan önce stok tüpü santrifüjlendi ve "100 × Concentrated Biotinylated Detection Ab" solüsyonu "1 × Biotinylated Detection Ab Diluent" ile seyreltilerek hazırlandı.
- **Concentrated HRP Conjugate working solution:** "100 × Concentrated HRP Conjugate", solüsyonu "1 × HRP Conjugate Diluent" ile seyreltilerek hazırlandı.

iii) Ölçüm Prosedürü

1. Plaka üzerindeki kuyucuklara 100 µl standart veya 100 µl numune ilave edildi plakanın üstü kapatıldı ve 37°C'de 90 dakika inkübe edildi. Mikro ELISA plakasına pipetleme yapılırken standart ve numuneler plakanın tabanına eklendi, iç duvara dokunmaktan ve mümkün olduğunca köpüklenme olmasından kaçınıldı.

2. İnkübasyon bitiminde kuyucuklarda bulunan sıvı, yıkama yapmadan her bir kuyucuktan uzaklaştırıldı. Ardından her bir kuyucuğa 100 µL

Biotinylated Detection Ab working çözeltisi eklendi. Plakanın üstü kapatıldı, yavaşça karıştırıldı ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.

3. İnkübasyon bitiminde plakalar hazırlanan yıkama solüsyonu ile Biotek marka otomatik yıkayıcıda her birinde kuyucuklara 350 µl eklenerek 3 kez yıkandı.

4. Her bir kuyucuğa 100 µL HRP Konjugat working çözeltisi eklendi ve plakanın üstü kapatılarak 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.

5. Üçüncü basamakta gerçekleştirilen yıkama işlemi 5 kez olacak şekilde tekrarlandı.

6. Her bir kuyucuğa 90 µL Substrat Reaktifi eklendi, üstü kapatıldı ve karanlıkta 37°C'de 15 dakika inkübe edildi.

7. Bütün kuyucuklara 50 µl "Stop Solution" eklendi ve plaka 450 nm dalga boyunda Thermo Multiscan Go markalı mikroplate okuyucu cihazında okutularak, absorbanslar belirlendi.

iv) Doku Homojenizasyonu: 20 mM 1L sodyum fosfat + 140 mM potasyum klorür hazırlandı (pH 7,4) (21). 100 mg doku üzerine 1 ml homojenizasyon çözeltisi konularak homojenize edildi ve homojenatlar 4°C'de 800 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant ile GSH ve tiobarbitürik asit ile reaksiyona giren maddeler (TBARS) tayini yapıldı.

a. TBARS Tayini

Ohkawa ve ark.'nın (22) yöntemine göre yapıldı. 200 µL doku süpernatantı; 50 µL 8.1% SDS (sodium dodecylsulphate); 375 µL % 20'lik asetik asit (v/v) pH 3.5; 375 µL % 0.8'lik tiobarbitürik asit(TBA) eklendi. Karışım vortekslenildi ve reaksiyon 1 saat kaynar su banyosunda inkübasyona

bırakıldı. İnkübasyon sonrasında 5 dakika buzlu suda soğutuldu ve 750 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Oluşan pembe renk 532 nm'de spektrofotometrede okutuldu. Sonuçlar pmol/ mg protein olarak hesaplandı.

b. GSH Tayini

Ellman ayıracı kullanılarak –SH grupları tayin edildi. 25 µL süpernatant üzerine 100 µL 3M Na₂HPO₄ ve 25 µL DTNB konuldu (4mg DTNB %1'lik 10 mL sodyum sitrat çözeltisinde hazırlandı) ve hafif bir çalkalama sonrasında oluşan sarı renk 412 nm'de spektrofotometrede okutuldu. Sonuçlar hazırlanan 1000 µM- 62,5 µM'lık redükte glutatyon standart grafiği ile belirlendi ve µM/mg protein olarak hesaplandı.

d. Protein Tayini

BCA kiti kullanılarak protein tayini yapıldı. 25 µL numune pipetlendikten sonra üzerine BCA working ilave edildi ve 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. 562 nm'de okuma yapıldı. Sonuçlar hazırlanan BSA standart grafiği ile belirlendi ve mg/ml olarak hesaplandı.

Bulunan TBARS sonuçları, dokuda bulunan protein miktarlarına bölünerek pmol/mg protein, toplam tiyol grubu sonuçları ise yine dokuda bulunan protein miktarlarına bölünerek µM/mg protein olarak hesaplanmış ve sonuçlar mg protein başına verilmiştir.

e. İstatistiksel Analiz

Analizler sonucu elde edilen tüm veriler SPSS 18.0 (IBM, Armonk, NJ, USA) istatistik programı kullanılarak hesaplandı. Normal dağılıma uygunlukları Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edildi. Normal dağılıma uyan ikiden fazla bağımsız grupların değerlendirilmesinde One Way ANOVA ve bunu takiben LSD testi uygulanarak analizler yapıldıktan sonra, grupların sayısal verileri analize tabi tutuldu. Elde edilen değerler aritmetik ortalama±standart sapma ($\bar{x}\pm S.D$) olarak ifade edildi. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda p değeri <0.05 anlamlı olarak seçildi.

Çalışma gruplarının TNF- α , TBARS ve GSH miktarları analiz edildikten sonra kontrol, sham, iskemi, iskemi-10, iskemi-20, I/R, I/R-10 ve I/R-20 sonuçları Anova testine göre değerlendirildi ve hangi gruplar arasında farklılık olduğunu belirlemek için LSD testi yapıldı.

BULGULAR

1. Histopatolojik Bulgular

Kontrol grubuna ait over dokusuna ait kesitler ışık mikroskop ile incelendiğinde overin stromasının normal yapıda olduğu ve over korteksinde normal yapıdaki preantral folikülleri izledik. (Resim 1a-b; Tablo 3;OHHS median: 2(1- 2.5)).

Sham grubuna ait over kesitlerinde primer ve sekonder foliküllerin tipik yapıda olduğunu gözlemledik. (Resim 1c-d; Tablo 3;OHHS median: 1.5 (1-2)).

İskemi grubuna ait over dokusunda yaygın vasküler konjesyonlar ve hemorajik alanlar mevcuttu. Bunlarla beraber orta düzeyde hemorajik foliküller ve ödematöz alanlar gözlemledik. (Resim 1e-f; Tablo 3;OHHS median: 6(5-8)).

İskemi-10 tedavi grubuna ait over kesitlerinde ise vasküler konjesyonların, ödematöz ve hemorajik alanların azaldığını gözlemledik. Bunun yanında tipik preantral foliküllerin varlığı dikkat çekiciydi. (Resim 1g-h; Tablo 3;OHHS median: 2.5 (2-3.5)).

İskemi-20 tedavi grubuna ait over kesitlerinde vasküler konjesyonların, hemorajik alanların ve foliküllerin sayısında belirgin azalma gözlemlenerek ile beraber yaygın tipik primer ve sekonder foliküller mevcuttu. (Resim 1g-h; Tablo 3;OHHS median: 2 (1-2)).

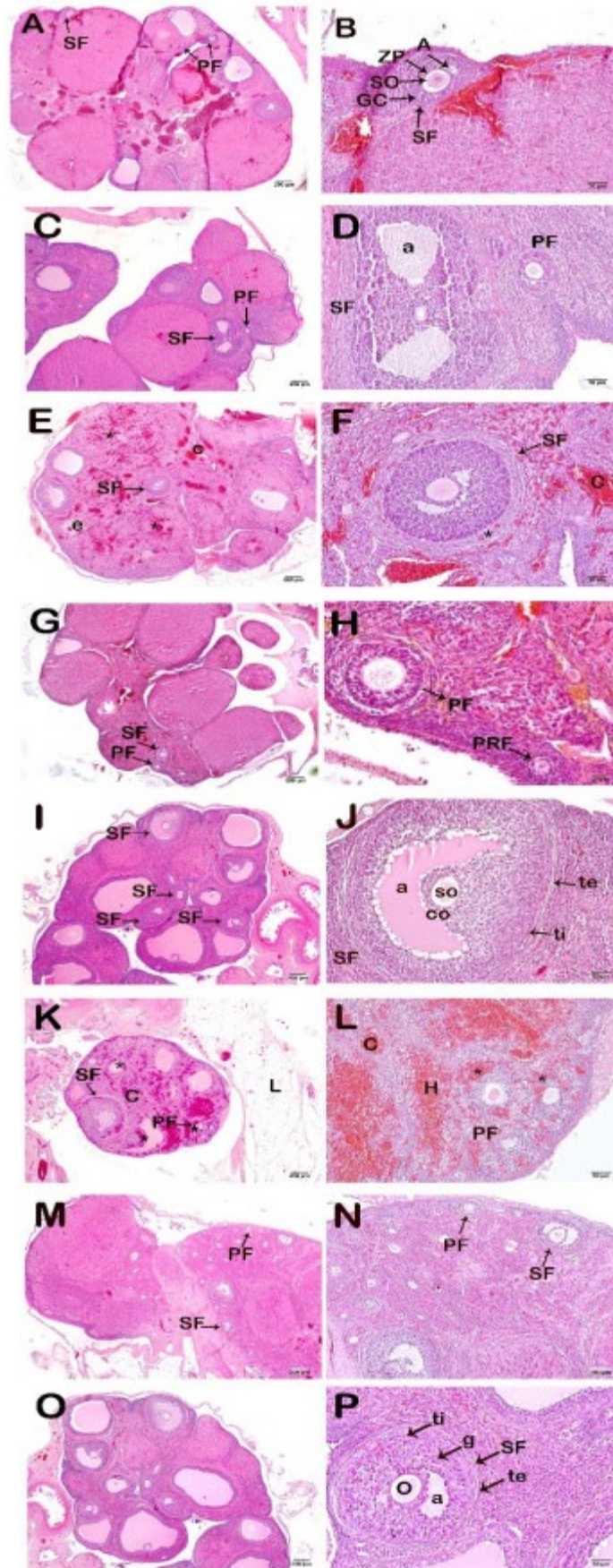
Bunun aksine, I/R uygulama grubuna ait over kesitlerinde oldukça yaygın hemorajik alanlar ve hemorajik foliküller izlendi. Bunun yanında ödematöz alanlar ve vasküler konjesyonlar gözlemlendi. (Resim 1i-j; Tablo 3;OHHS median: 10(9-10. 5)).

I/R-10 tedavi grubuna ait over dokusu kesitlerinde tipik primer foliküller(PF) ve sekonder foliküller(SF) izlenmekle beraber ödematöz ve hemorajik alanlarda azalma olduğunu saptadık. ((Resim 1m-n; Tablo 3;OHHS median:4(3-4)).

I/R-20 tedavi grubuna ait over dokusu kesitlerinde vasküler konjesyonda, ödematöz, hemorajik alanlarda ve hemorajik foliküllerde azalma olduğunu saptadık. Bununla beraber yaygın tipik yapıdaki primer ve sekonder foliküller gözlemlendi. ((Resim 1o-p; Tablo 3;OHHS median:3(3-3)).

Tablo-3: Semikantitatif over histopatolojik hasar skoru analiz sonuçları (mediyan(%25-%75'lik dilim aralıkları)).

Grup	Vasküler konjesyon	Hemoraji	Ödem	Hemorajik folikül	OHHS
Kontrol	1(1-1)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	2(1-2,5)
Sham	1(0-1)	0(0-0)	0(0-1)	0(0-0.5)	1.5(1-2)
İskemi	2(2-2.5) ^{a,b}	2(2-2.5) ^{a,b}	1(1-1.5) ^{a,b}	2(1-2) ^{a,b}	6(5 - 6) ^a
İskemi + 10 mg	1(0-1) ^c	0.5(0-1)	0.5(0-1) ^c	1(1-1)	2.5(2 - 2.5)
İskemi + 20 mg	0(0-1) ^c	0.5(0-1) ^c	0(0-0.5) ^c	1(0-1)	2(1-2) ^c
İskemi + Reperfüzyo	3(2.5-3) ^{a,b,c}	3(2-3) ^{a,b}	2(1-2) ^{a,b}	3(2-3) ^{a,b}	10(9-10.5) ^{a, b}
I/R+ 10 mg	1(1-1) ^d	1(1-1.5) ^d	1(0-1) ^d	1(1-1) ^d	4(3-4) ^d
I/R+ 20 mg	1(0.5-1) ^d	1(1-1) ^d	1(0-1) ^d	0.5(0-1) ^d	3(3-3) ^d
^a $p \leq 0.05$ kontrol grubuna kıyasla, ^b $p \leq 0.05$ sham grubuna kıyasla, ^c $p \leq 0.05$ iskemi grubuna kıyasla, ^d $p \leq 0.05$ I/R grubuna kıyasla, Kruskal Wallis/Tamhane T2					



Resim-1: H&E ile boyanmış over dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskopik görüntüleri. Kumulus ooforus hücreleri (co). Antrum (a). Primer folikül (PF). Sekonder folikül (SF).Teka interna (ti). Teka eksterna (te).

A (x4)-B (x40) : Kontrol grubu; over dokusunun ve preantral kortikal foliküllerin normal yapıda olduğu izlenmekte. Primer (PF) ve sekonder foliküllerde (SF) oositin (o), granüloza hücreleri (GC) ve Zona Pellucida'nın (ZP) normal yapıda olduğu izlenmekte. Antrum (a). Sekonder folikülün Primer oositi (so), , Granüloza hücreleri (g), Teka interna (ti) ve teka eksterna (te)'ların normal yapıda olduğu izlenmekte (OHHS median: 2(1-2. 5)).

C (x4)-D (x40) : Sham grubu; over dokusunda yaygın tipik yapıdaki primer ve sekonder foliküller gözlemlenmekte (OHHS median:1. 5 (1-2)).

E (x4)-F(x40): İskemi grubu; over dokusunda yaygın hemoraji (yıldız) ve vasküler konjesyonlar (c) izlenmekte. Bunun yanında orta düzeyde hemorajik foliküller ve ödematöz alanlar izlenmekte (OHHS median:6(5-8)).

G(x4)-H(x40): İskemi-10 mg grubu; over dokusunda ödematöz alanların, hemorajinin azaldığı ve kortikal preantral foliküllerin tipik yapıda olduğu gözlemlenmekte. Bununla beraber vasküler konjesyonda azalma izlenmekte (OHHS median: 2. 5 (2-3. 5)).

I(x4)-J(x40): İskemi-20 mg grubu; over stromasında ödematöz ve hemorajik alanların azaldığı izlenmekte. Bunun yanında vasküler konjesyonların azaldığı gözlemlenmekte. Over stromasında preantral foliküllerin tipik yapıda olduğu gözlenmekte (OHHS median:2(1-2)).

K(x4)-L(x40): İskemi/Reperfüzyon grubu; over stromasında yaygın hemoraji(h) ve over korteksinde hemorajik preantral foliküller (yıldız) izlenmekte. Bunun yanında vasküler konjesyon (c) ve ödematöz alanlar izlenmekte (OHHS median:10(9-10. 5)).

M(x4)-N(x40): İskemi/Reperfüzyon-10 mg grubu; over korteksinde tipik primer (PF) ve sekonder (SF) foliküller izlenmekle beraber ödematöz alanlarda azalma olduğu izlenmekte (OHHS median:4(3-4)).

O(x4)-P(x40): İskemi/Reperfüzyon-20 mg grubu; over korteksinde tipik preantral foliküller izlenmekte. Over stromasında ödematöz ve hemorajik alanlarda belirgin azalma ile beraber vasküler konjesyonda azalma olduğu izlenmekte (OHHS median:3(3-3)).

2. İmmunohistokimyasal Bulgular

Kontrol ve sham grubunda over dokusunda preantral foliküllerin normal yapıda olduğunu izledik. (Resim 2a-b; Table 4; Kaspaz-3 pozitivite skoru sırası ile 0(0-0); 0(0-0. 5)).

Bunun aksine, iskemi grubuna ait preantral foliküllerin granüloza hücrelerinde kaspaz-3 pozitivitesi gösteren apoptotik hücreler mevcuttu. (Figures 2c; Table 4; Kaspaz-3 pozitivite skoru mediyanı:2(2-2. 5)).

İskemi grubunun 10 mg ve 20 mg tedavi gruplarında ise preantral foliküllerin granüloza hücrelerinde kaspaz-3 pozitivitesinde azalma olduğunu saptadık. (Figures 2d-e; Table 4; Kaspaz-3 pozitivite skoru sırası ile 1(1-1. 5);0(0-0. 5)).

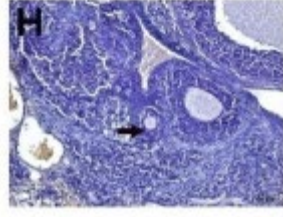
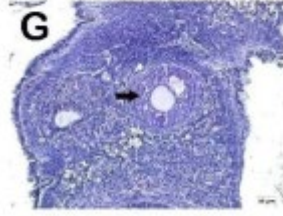
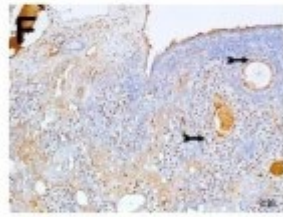
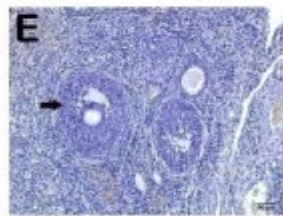
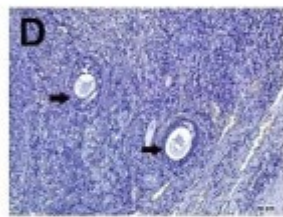
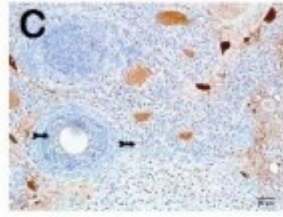
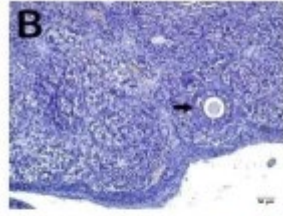
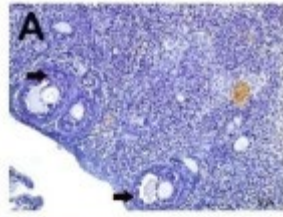
I/R grubu over dokusu kesitlerinde ise preantral foliküllerin apoptotik granuloza hücrelerinde yaygın kaspaz-3 pozitivitesi mevcuttu. (Figures 2f; Table 4; Kaspaz-3 pozitivite skoru mediyanı:3(2.5-3)).

I/R grubunun 10 mg ve 20 mg tedavi gruplarında ise preantral foliküllerin apoptotik granüloza hücrelerinde azalma olduğunu saptadık. (Figures 2g-h; Table 4; Kaspaz-3 pozitivite skoru sırası ile 1(0. 5-1);0(0-0. 5)).

**Tablo-4: İmmunohistokimyasal analiz sonucu
(mediyan±standartsapma).**

Grup	Kaspaz-3 pozitivite Skoru
Kontrol	0(0-0)
Sham	0(0-0.5)
İskemi	2(2-2.5) ^{a,b}
İskemi + 10 mg	1(1-1.5) ^c
İskemi + 20 mg	0(0-0.5) ^c
İskemi+Reperfüzyon(I/R)	3(2.5-3) ^{a,b}
I/R+ 10 mg	1(0.5-1) ^d
I/R+ 20 mg	0(0-0.5) ^d

^a $p \leq 0.05$ kontrol grubuna kıyasla,
^b $p \leq 0.05$ sham grubuna kıyasla,
^c $p \leq 0.05$ iskemi grubuna kıyasla,
^d $p \leq 0.05$ I/R grubuna kıyasla,
Kruskal Wallis/Tamhane T2



Resim-2: Apoptoz biyobelirteci olan kaspaz-3 primer antikoru ile inkube edilen over dokularına ait kesitlerin ışık mikroskobundaki temsili görüntüsü.

A(x40): Kontrol grubuna ait kesitlerde normal yapıdaki granuloza hücreleri izlenmekte (ok) (Kaspaz-3 pozitivite skoru medyan değeri: 0(0-0)).

B(x40): Sham grubuna ait over kesitlerinde granuloza hücrelerinin normal yapıda olduğu gözlenmekte (ok) (Kaspaz-3 pozitivite skoru medyan değeri: 0(0-0.5)).

C(x40): İskemi grubuna ait over dokusuna ait kesitlerde apoptotik granuloza hücreleri izlenmekte (kuyruklu ok) (Kaspaz-3 pozitivite skoru medyan değeri: 2(2-2.5)).

D(x40): İskemi-10 mg tedavi grubuna ait kesitlerde granuloza hücrelerinde kaspaz-3 ekspresyonunda azalma izlenmekte. (Kaspaz-3 pozitivite skoru medyan değeri: 1(1-1.5)).

E(x40): İskemi- 20 mg tedavi grubuna ait kesitlerde apoptotik granuloza hücrelerinde azalma izlenmekle beraber yaygın tipik granuloza hücreleri izlenmekte (ok) (Kaspaz-3 pozitivite skoru medyan değeri: 0(0-0.5)).

F(x40): I/R grubuna ait over dokusuna ait kesitlerde apoptotik granuloza hücrelerinde yoğun kaspaz-3 ekspresyonu gözlenmekte (kuyruklu ok) (Kaspaz-3 pozitivite skoru medyan değeri: 3(2.5-3)).

G(x40): I/R-10 mg tedavi grubuna ait over dokusuna ait kesitlerde preantral foliküllerin apoptotik granuloza hücrelerinde kaspaz-3 ekspresyonunda azalma izlenmekte (Kaspaz-3 pozitivite skoru medyan değeri: 1(0.5-1)).

H(x40): I/R- 20 mg tedavi grubuna ait kesitlerde kortikal preantral foliküllerin granuloza hücrelerinde kaspaz-3 ekspresyonunda azalma izlenmekle beraber yaygın tipik granuloza hücreleri gözlemlenmekte (ok) (Kaspaz-3 pozitivite skoru medyan değeri: 0(0-0.5)).

3. Biyokimyasal Bulgular

TNF için; $p < 0,05$ ($p = 0,008$) olduğundan gruplar arasında farklılık olduğu tespit edildi.

Kontrol grubunun TNF-a değeri; 2269 ± 237 pg/mL ölçülmüş olup iskemi grubunun TNF-a düzeyi; 3356 ± 260 pg/mL ($p = 0,001$), iskemi-20 grubunun TNF-a düzeyi; 3054 ± 442 pg/mL ($p = 0,013$), I/R grubunun TNF-a düzeyi; 3567 ± 69 pg/mL ($p = 0,000$) ve I/R-20 grubunun TNF-a düzeyi; 3631 ± 138 pg/mL ($p = 0,000$) olarak ölçülmüş olup gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlendi. (Tablo- 5, Tablo- 8)

Sham grubunun TNF-a düzeyi; 2431 ± 746 pg/mL ile iskemi grubunun TNF-a düzeyi; 3356 ± 260 pg/mL ($p = 0,001$), iskemi-20 grubunun TNF-a düzeyi; 3054 ± 442 pg/mL ($p = 0,019$), I/R grubunun TNF-a düzeyi; 3567 ± 69 pg/mL ($p = 0,000$) ve I/R-20 grubunun TNF-a düzeyi; 3631 ± 138 pg/mL ($p = 0,000$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlendi. (Tablo- 5, Tablo- 8)

İskemi grubunun TNF-a düzeyi; 3356 ± 260 pg/mL ile iskemi-10 grubunun TNF-a düzeyi; 2787 ± 420 pg/mL ($p = 0,035$) ve IR-10 grubunun TNF-a düzeyi; 2492 ± 786 pg/mL ($p = 0,004$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlendi. (Tablo- 5, Tablo- 8)

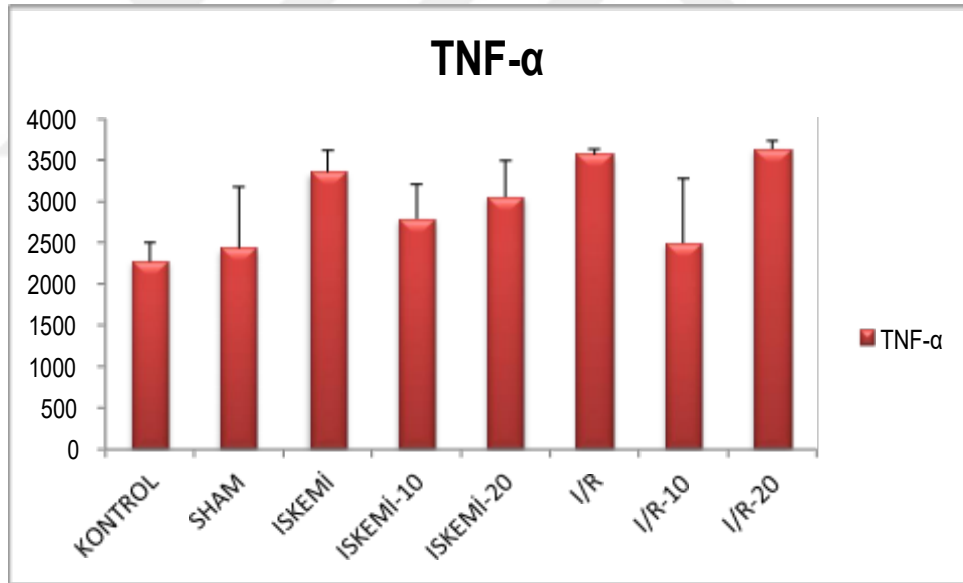
İskemi-10 grubunun TNF-a düzeyi; 2787 ± 420 pg/mL ile I/R grubunun TNF-a düzeyi; 3567 ± 69 pg/mL ($p = 0,005$) ve I/R-20 grubunun TNF-a düzeyi; 3631 ± 138 pg/mL ($p = 0,002$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlendi. (Tablo- 5, Tablo- 8)

İskemi-20 grubunun TNF-a düzeyi; 3054 ± 442 pg/mL ile I/R-20 grubunun TNF-a düzeyi; 3631 ± 138 pg/mL ($p = 0,030$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlendi. (Tablo- 5, Tablo- 8)

I/R grubunun TNF-a düzeyi; 3567±69 pg/mL ile I/R-10 grubunun TNF-a düzeyi; 2492±786 pg/mL (p=0,001) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlendi. (Tablo- 5, Tablo- 8)

I/R-10 grubunun TNF-a düzeyi; 2492±786 pg/mL ile I/R-20 grubunun TNF-a düzeyi; 3631±138 pg/mL (p=0,000) arasında anlamlı bir fark olduğu belirlendi. (Tablo- 5, Tablo- 8)

Tablo-5: Grupların Tümör Nekroz Faktör- a değerleri



TBARS için; $p < 0,05$ ($p = 0,000$) olduğundan gruplar arasında farklılık olduğu tespit edildi.

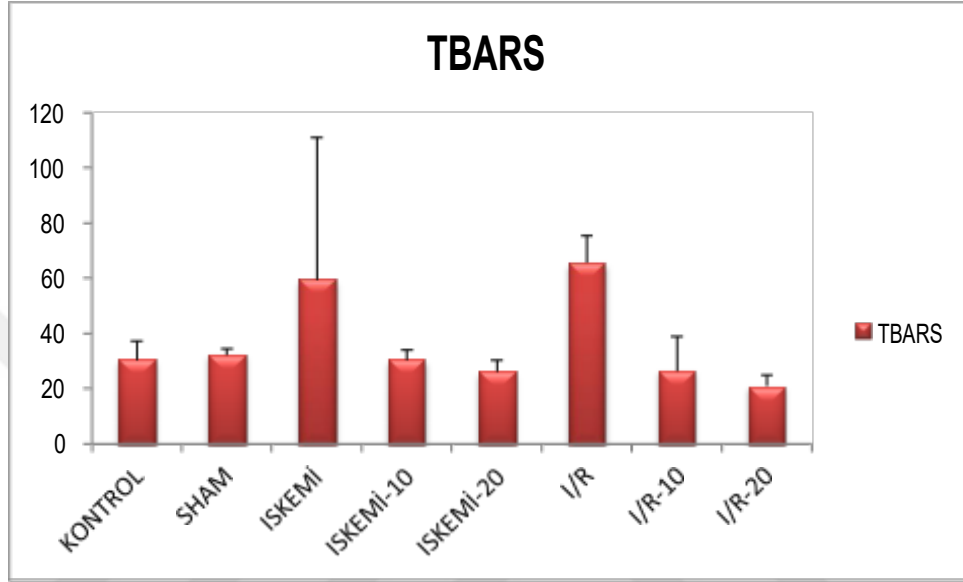
Kontrol grubunun TBARs değeri; $30,32 \pm 6,8$ pmol/mg protein ile I/R grubunun TBARs değeri; $65,44 \pm 9,94$ pmol/mg protein ($p = 0,000$) arasında anlamlı bir fark olduğu belirlendi. (Tablo-6, Tablo- 8)

Sham grubunun TBARs değeri; $32,10 \pm 2,2$ pmol/mg protein ile I/R grubunun TBARs değeri; $65,44 \pm 9,94$ pmol/mg protein ($p = 0,000$) arasında anlamlı bir fark olduğu belirlendi. (Tablo-6, Tablo- 8)

İskemi grubunun TBARs değeri; $59,38 \pm 51,44$ pmol/mg protein ile I/R grubunun TBARs değeri; $65,44 \pm 9,94$ pmol/mg protein ($p = 0,030$), I/R-10 grubunun TBARs değeri; $26,29 \pm 12,50$ pmol/mg protein ($p = 0,013$), I/R-20 grubunun TBARs değeri; $20,84 \pm 4,13$ pmol/mg protein ($p = 0,003$), iskemi-10 grubunun TBARs değeri; $30,25 \pm 3,8$ pmol/mg protein ($p = 0,009$) ve iskemi-20 grubunun TBARs değeri; $26,11 \pm 4,19$ pmol/mg protein ($p = 0,006$) arasında anlamlı bir fark olduğu belirlendi. (Tablo-6, Tablo- 8)

I/R grubunun TBARs değeri; $65,44 \pm 9,94$ pmol/mg protein ile I/R-10 grubunun TBARs değeri; $26,29 \pm 12,50$ pmol/mg protein ($p = 0,000$), I/R-20 grubunun TBARs değeri; $20,84 \pm 4,13$ pmol/mg protein ($p = 0,000$), iskemi-10 grubunun TBARs değeri; $30,25 \pm 3,8$ pmol/mg protein ($p = 0,000$) ve iskemi-20 grubunun TBARs değeri; $26,11 \pm 4,19$ pmol/mg protein ($p = 0,000$) arasında anlamlı bir fark olduğu belirlendi. (Tablo-6, Tablo- 8)

Tablo-6: Grupların tiobarbitürik asit ile reaksiyona giren maddelerin değerleri



GSH(Toplam Tiyol Grubu) için; $p < 0,05$ ($p = 0,002$) olduğundan gruplar arasında farklılık olduğu tespit edildi.

Kontrol grubunun GSH değeri; $13,20 \pm 1,2$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein ile sham grubunun GSH değeri; $18,9 \pm 3,68$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein ($p = 0,035$), I/R-20 grubunun GSH değeri; $30,7 \pm 7,62$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein ($p = 0,003$), iskemi-10 grubunun GSH değeri; $30,8 \pm 6,62$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein ($p = 0,001$) ve iskemi-20 grubunun GSH değeri; $28,5 \pm 5,38$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein ($p = 0,000$) arasında farklılık olduğu tespit edildi. (Tablo- 7, Tablo- 8)

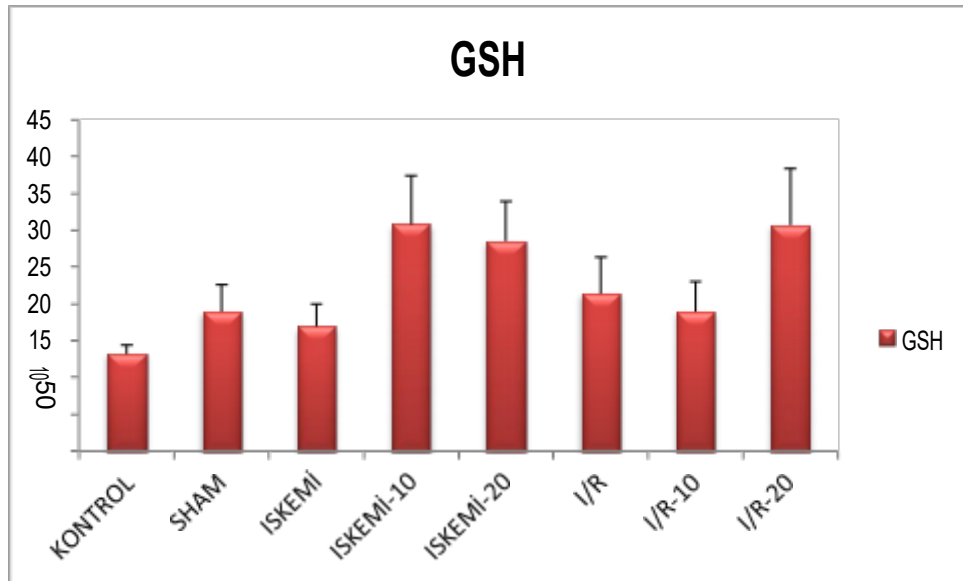
Sham grubunun GSH değeri; $18,9 \pm 3,68$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein ile iskemi-20 grubunun GSH değeri; $28,5 \pm 5,38$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein ($p = 0,037$) arasında farklılık olduğu tespit edildi. (Tablo- 7, Tablo- 8)

İskemi grubunun GSH değeri; $16,9 \pm 3,05$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein ile iskemi-10 grubunun GSH değeri; $30,8 \pm 6,62$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein ($p=0,019$) ve iskemi-20 grubunun GSH değeri; $28,5 \pm 5,38$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein ($p=0,007$) arasında farklılık olduğu tespit edildi. (Tablo- 7, Tablo- 8)

I/R grubunun GSH değeri; $21,41 \pm 4,96$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein ile iskemi-10 grubunun GSH değeri; $30,8 \pm 6,62$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein ($p=0,018$) ve iskemi-20 grubunun GSH değeri; $28,5 \pm 5,38$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein ($p=0,006$) arasında farklılık olduğu tespit edildi. (Tablo- 7, Tablo- 8)

I/R-10 grubunun GSH değeri; $18,9 \pm 4,14$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein ile I/R-20 grubunun GSH değeri; $30,7 \pm 7,62$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein ($p=0,043$), iskemi-10 grubunun GSH değeri; $30,8 \pm 6,62$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein ($p=0,015$) ve iskemi-20 grubunun GSH değeri; $28,5 \pm 5,38$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ protein ($p=0,006$) arasında anlamlı bir fark olduğu belirlendi. (Tablo- 7, Tablo- 8)

Tablo-7: Grupların glutatyon değerleri



Tablo-8: Biyokimyasal sonuçların analizi

	TNF-α(pg/mL)	TBARS(pmol/mg protein)	GSH(μM/mg protein)
KONTROL	2269 \pm 237	30,32 \pm 6,8	13,20 \pm 1,2
SHAM	2431 \pm 746	32,10 \pm 2,2	18,9 \pm 3,68
İSKEMİ	3356 \pm 260	59,38 \pm 51,44	16,9 \pm 3,05
İSKEMİ-10	2787 \pm 420	30,25 \pm 3,8	30,8 \pm 6,62
İSKEMİ-20	3054 \pm 442	26,11 \pm 4,19	28,5 \pm 5,38
I/R	3567 \pm 69	65,44 \pm 9,94	21,41 \pm 4,96
I/R-10	2492 \pm 786	26,29 \pm 12,50	18,9 \pm 4,14
I/R-20	3631 \pm 138	20,84 \pm 4,13	30,7 \pm 7,62

TARTIŞMA VE SONUÇ

Over torsiyonu over ligamentlerinin dönmesi sonucu oluşur. Over kanlanmasının bozulması ile sonuçlanan bu durum %2,7 oranı ile sık görülen jinekolojik acillerden biridir. Genellikle normal bir overde görülmekte iken predispozan faktörlerle görülme oranı artmaktadır. Her yaş grubunda görülebilir. Üreme çağında artan sıklığı fertilitenin korunması ve devamı açısından tedavinin önemini arttırmaktadır. Bununla birlikte, klinik nonspesifik bulgular ve kesin tanı kriterlerinin olmaması tanı ve tedavide geçikmelere neden olabilmektedir. Cerrahi detorsiyon yöntemi, günümüzde kabul edilen tedavi olmakla birlikte, detorsiyon esnasındaki I/R hasarını önleyici bir tedavi seçeneği halihazırda bulunmamaktadır. Güncel çalışmaların, reperfüzyon esnasındaki hasarın over dokusuna iskemiden daha fazla zarar verdiğini

göstermesi, I/R hasarına yönelik tedavi arayışlarına neden olmuştur (7). TNX'in I/R hasarına etkisi ile ilgi yapılmış çalışmalar kısıtlıdır. Galvao ve ark.'nın serebral iskemi üzerine yaptığı çalışmasında serebral dokunun histolojik incelemesinde TNX'in anlamlı derecede koruyucu etkisi görülmüştür (8). Bu bilgilerden yola çıkarak, bu çalışmada bir antioksidan ve antiinflamatuvar ilaç olan TNX'in ratlarda geliştirilen over torsiyonu modellerinde I/R hasarı üzerine etkisini biyokimyasal ve histolojik olarak araştırmayı amaçladık.

I/R hasarı ile ilgili çalışmalarda, iskemik dokunun reperfüzyonu ile fazla miktarda serbest oksijen radikalleri üretildiği gösterilmiştir (23). Serbest oksijen radikallerinin hücredeki en zararlı etkisi lipid peroksidasyonudur (23). Bu reaksiyon, lipid radikal oluşumuyla başlar ve daha zararlı olan MDA oluşumu ile tamamlanır (23).

Farag ve ark. 2016 yılında, renal I/R' da tenoksikam gibi bir COX-2 inhibitörü olan celecoxib ve pentofilinin hepatorenal koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmada, tedavi gruplarında I/R gruplarına göre MDA miktarında anlamlı bir düşüş olduğunu göstermişlerdir (24). Yapılan bir başka çalışmada ise, ratlarda over I/R hasarında COX-2 inhibitörü olan etoricoxibin etkilerini incelenmiş, MDA düzeyinin etoricoxibin ile tedavi grubunda anlamlı derecede düşük olduğu bulunmuştur (25). Bizim çalışmamızda ise I/R grubunda, kontrol ve sham gruplarına göre MDA konsantrasyonu anlamlı derecede artmış olarak bulunmuştur. Bununla birlikte, çalışmamızda I/R grubunda I grubuna göre MDA konsantrasyonu artmış olarak saptandı. Literatürle uyumlu olan bu sonucumuz iskemik dokunun reperfüzyonunun, iskemiden daha fazla zarar verdiği görüşünü desteklemektedir (7). Diğer taraftan, iskemi grubuna göre I-10, I-20, I/R-10, I/R-20 gruplarında anlamlı derecede düşük MDA konsantrasyonu olduğu gösterildi. I/R grubu ile I/R-10, I/R-20, I-10 ve I-20 grupları karşılaştırıldığında da benzer şekilde MDA düzeyini tedavi gruplarında anlamlı derecede düşük olduğu bulundu. Literatürde diğer COX-2 inhibitörleri ile farklı dokularda I/R modeli kullanılarak yapılan araştırmaların sonuçlarında MDA düzeyini doz bağımsız bir şekilde

azaltması bizim çalışmamızdaki over torsiyonunda I/R modeli uygulanan ratlarda TNX' in etkisi ile örtüşmektedir (23,26-28).

Literatürde canlı dokularda oluşturulan çeşitli hasar modellerinde oksidan/antioksidan dengenin oksidanların lehine değiştiği ve oksidan seviyelerinde artış, antioksidan seviyelerinde azalma olduğu rapor edilmektedir (29). Bu sonuçlar dokularda sürekli bir şekilde oksidan mekanizmalara karşı enzimatik ve non-enzimatik antioksidan mekanizmaların kontrollü bir şekilde üretildiğini göstermektedir.

Oksidatif hasara karşı hücre savunmasında non-enzimatik endojen antioksidanların en önemlilerinden biri tGSH'dir. GSH canlı dokularda H₂O₂, hidroksil (OH⁻), süperoksit (O₂⁻), alkoksil (RO[·]) radikalleri ile direkt olarak etkileşime girer ve hücreyi serbest radikallerin hasar oluşturucu etkisinden korur. Yüksek GSH miktarı, hücre fonksiyon ve canlılığının bir göstergesidir (30). GSH miktarının düşmesi ise hücre içi savunma sisteminin zayıflaması ve hasar belirteçleri olarak kabul edilir (31).

Bahadır Süleyman ve ark.'nın ratlarda yaptığı, böbrek I/R'inde etoricoxibin etkisi ile ilgili çalışmalarında tedavi grubunda I/R grubuna göre anlamlı bir şekilde GSH miktarı fazla ölçülmüştür (23). Literatürde GSH'nin I/R hasarında COX-2 inhibitörleri tarafından arttığına dair yapılmış pek çok çalışma mevcuttur (24,25,26,28). Bizim çalışmamızda; iskemi grubu ile kıyaslandığında I-10 ve I-20 gruplarında GSH miktarında anlamlı olarak artış izlenmiştir. Çalışmamızda I/R grubuyla kıyaslandığında I-10, I-20 gruplarında GSH miktarında anlamlı olarak artış izlenmiştir. I/R-20 gruplarında, I/R-10 ile kıyaslandığında GSH miktarında anlamlı olarak artış izlenmiştir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar literatürü destekler niteliktedir.

TNF-a, makrofaj, nötrofil ve endotel hücreleri dahil olmak üzere çok çeşitli hücreler tarafından üretilir ve lokal olarak parakrin tarzda, uzak bölgelerde ise hormon şeklinde etki ederler (24). TNF-a, ROS üretimine katılır, diğer inflamatuvar mediatörlerin sentezini uyarır, endotel disfonksiyonuna eden olur ve nekroz ve / veya apoptoz yoluyla nihai olarak hücre ölümüne yol açan nötrofillerin aktivasyonunu ve sekresyonunu indükler (24). Kumar ve ark.'nın yaptığı serebral I/R araştırmalarında nimesulid,

ibuprofen ve celecoxib gibi COX-2 inhibitörlerinin kullanımı TNF-a seviyelerini anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir (32). Zhang ve ark.'nın araştırmalarında bir selektif COX-2 inhibitörü olan parecoxib ile yaptıkları hepatik I/R modelinde parecoxibin hepatik histolojik yapıyı koruduğu ve TNF-a'yı azaltarak inflamatuvar kaskatı baskıladığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada inflamatuvar kaskatın önemli bir bileşeni olan IL-6 seviyesinde de azalma tespit edilmiştir (33). Güncel çalışmalarda gösterildiği gibi COX inhibitörleri pek çok farklı dokuda I/R hasarı uygulanan araştırma modellerinde TNF-a seviyelerini azaltmaktadır (24,27). Çalışmamızda ise TNF-a düzeyleri iskemi ve I/R gruplarında kontrol ve sham gruplarına göre daha fazla ölçülmüştür. Bu sonuçlar çalışmamızda oluşturulmak istenen inflamatuvar ve oksidan sürecin oluştuğunun bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. İskemi grubuna göre, I-10 ve I/R-10 gruplarında ve I/R grubuna göre I/R-10 grubunda TNF-a konsantrasyonlarında anlamlı derecede azalma olmuştur. Bu da literatürde farklı dokularda farklı COX inhibitörlerinin çalışıldığı diğer çalışmalarda olduğu gibi, over I/R hasarında COX inhibitörlerinden tenoksikamın I/R hasarı sürecindeki inflamatuvar kaskatı TNF-a'yı azaltarak baskıladığının bir göstergesidir.

S A. Abdel ve ark.'nın COX inhibitörü olan celecoxibin ratlarda hepatik I/R hasarı oluşturularak yaptığı çalışmada histopatolojik olarak hasar skorlaması ve kaspaz-3 aktivitesi incelenmiş ve I/R grubuna göre celecoxib verilen grubun hem histopatolojik skorlamada hem de kaspaz-3 aktivitesinde anlamlı derecede azalma izlenmiştir (27). COX inhibitörlerinden başka antiinflamatuvar ve antioksidan etkileri bilinen bazı maddeler de I/R çalışmalarında kullanılmıştır. Liu FH ve ark.'nın renal I/R üzerine antiinflamatuvar özelliklere sahip kurkumin-zerdeçalın etkilerini araştıran bir çalışmada tedavi grubunda kaspaz-3 seviyelerinin anlamlı derecede azaldığı görülmüştür (34). K Özlem ve ark.'nın ratlarda yaptığı çalışmada over I/R modelinde yaban mersininin I/R hasarına etkisi araştırılmıştır. Overde histopatolojik olarak konjesyon, hemoraji, lökosit infiltrasyonu, ödem ve folikül dejenerasyonuna göre skorlama yapılmıştır. Çalışmada tedavi

grubunda histopatolojik skorlama parametrelerinin hepsinde anlamlı derecede iyileşme gösterilmiştir (35).

Literatürde, farklı antioksidan ve antiinflamatuvar maddelerin farklı dokulardaki I/R hasarı üzerine koruyucu etkilerini gösteren pek çok çalışma bulunmakla birlikte, bildiğimiz kadarıyla COX inhibitörü olup antiinflamatuvar özelliklere sahip TNX' in over I/R hasarı üzerine etkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda COX inhibitörü olan TNX'in ratlarda over I/R hasarına olan etkisini histopatolojik olarak hemoraji, ödem, infiltrasyon ve hemorajik folikül kriterleri ile skorlama sistemi oluşturarak (OHHS) ve kaspaz- 3 aktivitesi ile değerlendirdik. İskemi grubunda kontrol ve sham grubuna göre OHHS ve kaspaz-3 aktivitesi artmış olarak bulunurken, I-10 ve I-20 gruplarında I grubuna göre ve I/R-10 ve I/R-20 gruplarında I/R grubuna göre OHHS ve kaspaz-3 seviyelerini anlamlı derecede az tespit ettik. Çalışmamız, TNX' in overde I/R hasarını önleyici etkisini biyokimyasal ve histopatolojik olarak gösteren ilk hayvan çalışması olması açısından literatüre önemli katkı sağlamaktadır. Ancak çalışmamızda belli limitasyonlar bulunmaktadır. Bunlardan ilki çalışmamızda oksidan mekanizmalar ve antioksidan etkileri gösterebilmek için COX aktivitesi ve Nükleer faktör-kappa β (NF-K β) seviyelerine bakılmamıştır. Ali FF. ve ark. anjiotensinin rat overinde I/R hasarı üzerine etkisini araştırdığı bir çalışmada NF-K β bakılmış ve tedavi gruplarında ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (36). O.E. Yapca ve ark. etoricoxibin over I/R hasarına etkisini gösterdikleri çalışmalarında COX-1 ve COX-2 aktivitelere bakmışlar ve sham grubuyla kıyaslandığında anlamlı olarak azalmış olduğu görülmüştür (25). Bununla birlikte, overin steroidogenez fonksiyonları hakkında bilgi vermesi açısından anti müllerian hormon (AMH) seviyelerine bakılmamış olması çalışmamızın bir diğer limitasyonudur. Eser ve ark.' nın kurkumin-zerdaçalın over iskemi modelindeki etkisini araştırdığı bir çalışmada AMH seviyeleri de değerlendirilmiş ve tedavi verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmiştir (37).

Sonuç olarak; alışmamızda TNX'in ratlarda over I/R hasarı üzerine antiinflamatuvar ve antioksidan koruyucu etkisini gösterdik. Analjezik özelliği de olan TNX' in over torsiyonu tanısı konulan hastalarda hem preop analjeziyi sağlamak hem de operasyon esnasındaki I/R hasarını engelleyebilmesi için klinik kullanımına yönelik daha geniş çaplı prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Sagsoz, N., Kisa, U. & Apan, A. Ischaemia-reperfusion injury of rat ovary and the effects of vitamin C, mannitol and verapamil. *Hum. Reprod.***17**, 2972–2976 (2002).
2. Kavak, S. B., Kavak, E., Kurkut, B., Ilhan, R. & Baspinar, M. The Importance of Clinical, Radiologic and Laboratory Parameters in the Diagnosis of Ovarian Torsion: Retrospective Study. *İstanbul Kanuni Sultan Süleyman Tıp Derg.***6**, 20–22 (2014).
3. Eser, A. *et al.* Effects of curcumin on ovarian ischemia-reperfusion injury in a rat model. *Biomed. Reports***3**, 807–813 (2015).
4. Berek, S. J. *Berek & Novak Jinekoloji.* (2017).
5. Emmanuel Damigos Ptychio Iatrikes [MBBS], a Jemma Johns MBBS MD MRCOG, b, J. R. M. F. & C. An update on the diagnosis and management of ovarian torsion. *Obstet. Gynaecol.* (2012).
6. Oelsner, G. *et al.* Minimal surgery for the twisted ischaemic adnexa can preserve ovarian function. *Hum. Reprod.***18**, 2599–2602 (2003).
7. Nayki, C. *et al.* The effect of rutin on ovarian ischemia-reperfusion injury in a rat model. *Gynecol. Endocrinol.***34**, 809–814 (2018).
8. Galvão, R. I. M. *et al.* Tenoxicam exerts a neuroprotective action after cerebral ischemia in rats. *Neurochem. Res.***30**, 39–46 (2005).
9. Mol, Y. Rat Alt Ekstremité İskemi Reperfüzyon Modelinde Tenoksikamın Antioksidan Etkinliğinin Araştırılması. (2008).
10. Keith L. Moore, Arthur F. Dalley, A. M. R. A. *Kliniğe Yönelik ANATOMİ.* (2007).
11. Keith L. Moore T. V. N. Persaud Mark G. Torchia. *Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi.* (2016).
12. Bowman ' s. 1890 (1890).

13. Lu, U. K. Ğ. 239 Çocuklarda Nad İ R B İ R Akut Batin Neden İ : Over Tors İ Yonu*. 239–242 (2000).
14. Ingec, M. *et al.* Prevention of ischemia-reperfusion injury in rat ovarian tissue with the on-off method. *J. Physiol. Pharmacol.***62**, 575–582 (2011).
15. Harvey, F. *Lippincott Biyokimya.* (2019).
16. Nilsen, O. G. Clinical Pharmacokinetics of Tenoxicam. *Clin. Pharmacokinet.***26**, 16–43 (1994).
17. O'Hanlon, D. M., Thambipillai, T., Colbert, S. T., Keane, P. W. & Fred Given, H. Timing of pre-emptive tenoxicam is important for postoperative analgesia. *Can. J. Anesth.***48**, 162–166 (2001).
18. Paino, I. M. M. *et al.* Effect of therapeutic plasma concentrations of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the production of reactive oxygen species by activated rat neutrophils. *Brazilian J. Med. Biol. Res.***38**, 543–551 (2005).
19. Saber M, Eimani H, Soleimani Mehranjani M, *et al.* The effect of Verapamil on ischaemia/reperfusion injury in mouse ovarian tissue transplantation. *Biomed Pharmacother* (2018).
20. Aksoy AN, Aydin F, Topdagl Yllmaz EP, *et al.* The effect of controlled reperfusion in the prevention of infertility caused by ischemia induced in the contralateral ovary in rats with unilateral ovariectomy. *Gynecol Obs. Invest* (2015).
21. Denise Bertin Rojas *et al.* Administration of Histidine to Female Rats Induces Changes in Oxidative Status in Cortex and Hippocampus of the Offspring. *Neurochem Rev.* (2012).
22. Ohkawa H, Ohishi N, Y. K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* (1979).
23. Suleyman, B. *et al.* The effect of etoricoxib on kidney ischemia-reperfusion injury in rats: A biochemical and immunohistochemical assessment. *Int. Immunopharmacol.***23**, 179–185 (2014).
24. Farag, M. M., Khalifa, A. A., Elhadidy, W. F. & Rashad, R. M. Hepatorenal

protection in renal ischemia/reperfusion by celecoxib and pentoxifylline. *J. Surg. Res.***204**, 183–191 (2016).

25. Yapca, O. E. *et al.* Benefits of the antioxidant and anti-inflammatory activity of etoricoxib in the prevention of ovarian ischemia/reperfusion injury induced experimentally in rats. *J. Obstet. Gynaecol. Res.***40**, 1674–1679 (2014).
26. Kunak, C. S. *et al.* The Effect of Etoricoxib on Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Oxid. Med. Cell. Longev.***2015**, (2015).
27. Abdel-Gaber, S.A. *et al.* Effect of selective versus non-selective cyclooxygenase inhibitors on ischemia-reperfusion-induced hepatic injury in rats. *Life Sci.***134**, 42–48 (2015).
28. Demiryilmaz, I. *et al.* Protective effect of nimesulide against hepatic ischemia/reperfusion injury in rats: Effects on oxidant/antioxidants, DNA mutation and COX-1/COX-2 levels. *Pharmacol. Reports***66**, 647–652 (2014).
29. Kisaoglu, A., Borekci, B., Yapca, O. E., Bilen, H. & Suleyman, H. Tissue Damage and Oxidant/Antioxidant Balance. *Eurasian J. Med.***45**, 47–49 (2013).
30. Ballatori, N., Hammond, C. L., Cunningham, J. B., Krance, S. M. & Marchan, R. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: Role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. *Toxicol. Appl. Pharmacol.***204**, 238–255 (2005).
31. Santa, T. Recent advances in analysis of glutathione in biological samples by high-performance liquid chromatography: a brief overview. *Drug Discov. Ther.* (2013) doi:10.5582/ddt.2013.v7.5.172.
32. Gaur, V. & Kumar, A. Effect of nonselective and selective COX-2 inhibitors on memory dysfunction, glutathione system, and tumor necrosis factor alpha level against cerebral ischemia reperfusion injury. *Drug Chem. Toxicol.***35**, 218–224 (2012).
33. Zhang, T., Ma, Y., Xu, K. Q. & Huang, W. Q. Pretreatment of parecoxib attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *BMC Anesthesiol.***15**, 1–8 (2015).

34. F-H. Liu, W-J. Ni, G-K. Wang, J.-J. Z. Cellular and Molecular Biology inflammatory mediators and Caspase-3. **62**, 95–99 (2016).
35. Kara, Ö. Sıçan Overindeki İskemi-Reperfüzon Hasarında Yaban Mersininin Koruyucu Etkisi. (2016).
36. Ali, F. F., Ahmed, A. F. & Elroby Ali, D. M. Underlying mechanisms behind the protective effect of angiotensin (1–7) in experimental rat model of ovarian ischemia reperfusion injury. *Life Sci.***235**, 116840 (2019).
37. Eser A , Hizli D , Namuslu M , Haltas H , Kosus N , Kosus A, K. H. Protective effect of curcumin on ovarian reserve in a rat ischemia model: an experimental study. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* (2017).

TEŞEKKÜR

Eğitim ve öğretim hayatım boyunca sadece ilim değil irfanı da öğreten pek değerli hocalarıma; başta kendisinden her alanda pek çok şey öğrendiğim tez danışmanım Doç. Dr. Gülşah BALIK'a, Dr. Öğr. Üyesi Şenol ŞENTÜRK'e, bu mesleğe severek devam etmeme katkı sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Beril GÜRLEK ve Dr. Öğr. Üyesi Sabri ÇOLAK'a özellikle akademik anlamda gelişmemde emeği olan Doç. Dr. Ülkü METE URAL ve Doç. Dr. Yeşim BAYOĞLU TEKİN'e teşekkürlerimi sunarım.
Çok severek başladığım kadın hastalıkları ve doğum asistanlığında bana eşlik eden bütün asistan arkadaşlarım ve tüm yardımcı personele teşekkür ederim.
Varlığımın ve buralara kadar gelmemin en önemli müsebbipleri olan anneciğim, babacığim ve canım kardeşlerime beni her zaman destekledikleri için, asistanlık sürecimin zor bir döneminde bana eşlik edip, bu süreci olabildiğince kolaylaştıran sevgili eşime teşekkür ederim.
Dr. İlknur Merve AYAZOĞLU
Kasım 2019, RİZE

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Artvin'in Borçka ilçesinde doğdu. İlkokulu Artvin Çoruh İlkokulunda, ortaokulu Ardeşen Alparslan Ortaokulunda tamamladı. 2006 yılında Trabzon Yomra Fen Lisesinden mezun olarak, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesine başladı. Üniversite eğitiminden sonra zorunlu hizmetini Rize Devlet Hastanesi acil serviste tamamlayarak 2016 yılı ocak ayında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalında asistan doktor olarak göreve başladı.