

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
BEZMİÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇAN OVERİNDE
İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA DİAZOKSİDİN KORUYUCU
ETKİSİNİN İNCELENMESİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. ELİF ASLI SARIOĞLU YARDIMCI
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

DANIŞMAN
PROF. DR. RAMAZAN DANSUK

İSTANBUL-2017

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
BEZMİÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇAN OVERİNDE İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA DİAZOKSİDİN
KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. ELİF ASLI SARIOĞLU YARDIMCI
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

DANIŞMAN
PROF. DR. RAMAZAN DANSUK

Bu araştırma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi Tarafından
Desteklenmiştir.

İstanbul, Nisan 2017

Kurum : Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Tıpta Uzmanlık

Anabilim Dalı : Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

Tez Sahibi : Elif Aslı Sarıoğlu Yardımcı

Tez Başlığı : Sıçan Overinde İskemi Reperfüzyon Hasarında Diazoksidin Koruyucu Etkisinin İncelenmesi

İmza

Jüri Bşk. (Danışman)

Prof. Dr. Ramazan DANSUK

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Üye

Üye

Üye

Üye

Bu tez, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıda belirtilen jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../.....tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mukaddes EŞREFOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Imza

İsim ve soyisim : Elif Aslı Sarıoğlu Yardımcı

Tarih

X X X X

ÖNSÖZ

Tıpta uzmanlık eğitimim süresince değerli bilgi, deneyim ve tecrübeleri ile her zaman güler yüzü ve sabrı ile yanımda olan, tez çalışmamın her aşamasında desteğini gördüğüm, yetişmemde çok büyük katkıları olan, saygı değer hocam Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Ramazan Dansuk'a;

Derin bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, yakın ilgi ve desteğini hissettiğim, dikkatine, sabrına ve üretkenliğine hayran olduğum sayın hocam Doç. Dr. Pakizer Banu Kılıçoğlu Dane'ye ;

Asistanlık eğitimim süresince büyük yardım ve desteklerini gördüğüm; meslek hayatım boyunca desteklerini hissedeceğim değerli hocalarım Prof. Dr. Sefa Kelekçi, Doç. Dr. Osman Şevket, Yrd. Doç. Dr. Nilay Karaca, Op.Dr. Gökhan Kılıç, Op.Dr. Seda Ateş, Op. Dr. Sinem Sudolmuş, Op. Dr. Serdar Aydın, Op. Dr. Pınar Özcan, Op. Dr. İlknur Adanır, Op. Dr. Ayşe Filiz Karasu'ya;

Tezimin hazırlanması yanısıra, her zaman mesleki bilgi, tecrübe ve desteğiyle yanımda olduğunu bildiğim değerli uzmanım ve ablam Op. Dr. Nadiye Köroğlu'na;

Asistanlığım süresince birçok şeyi paylaştığımız asistan arkadaşlarıma, doğumhanede, ameliyathanede ve serviste desteklerini esirgemeyen hemşire, ebe ve personel arkadaşlarıma;

Ayrıca bu günlere gelmemde en büyük paya sahip olan, hayatımın her anında sevgi ve desteklerini yanımda hissettiğim, her koşulda yanımda olan canım annem Ayten Sarıoğlu'na ve canım ağabeylerim Fatih Sarıoğlu ve Levent Sarıoğlu'na;

Varlığını hep hissettiğim, iyi ve kötü günümde yanımda olan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, en büyük desteğim, sevgili eşim Dr. Erkan Yardımcı'ya en içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. E. Aslı SARIOĞLU YARDIMCI

ÖZET

Sıçan Overinde İskemi Reperfüzyon Hasarında Diazoksidin Koruyucu Etkisinin İncelenmesi

Amaç: Deneysel olarak over torsiyonu modeli oluşturduğumuz sıçanlarda, diazoksidin iskemi /reperfüzyon doku hasarını önlemedeki etkinliğini araştırmaktır.

Gereç ve yöntem: Bu randomize kontrollü deneysel çalışmada, 35 adet reproduktif dönemde, dişi Wistar Albino cinsi sıçan kullanıldı. Her grupta 5 adet olacak şekilde rasgele 7 eşit gruba ayrıldı. Grup 1 (S): sham grubu, sadece laparotomi yapılan grup. Grup 2 (İ): 3 saat iskemi yapılan grup. Grup 3 (İ/R3): 3 saat iskemi sonrası 3 saat reperfüze edilen grup. Grup 4 (İ/R3+D): 3 saat reperfüzyon sonrası diazoksid verilen grup. Grup 5 (İ/R24): 3 saat iskemi sonrası 24 saat reperfüze edilen grup. Grup 6 (İ/R24+D): 24 saat reperfüzyon sonrası diazoksid verilen grup. Grup 7 (DMSO): Standardizasyonu sağlamak için, diğer gruplarda diazoksid dimetil sülfoksid (DMSO) ile çözüldüğünden, sadece DMSO verilen grup. Bütün gruplardan işlem sonrası kan alındı ve bilateral ooferektomi yapıldı. Comet assay yöntemi ile DNA hasarı değerlendirildi. Oksidatif stres parametrelerinden doku TAS, TOS, OSI, katalaz, plazma TAS, TOS ve OSI çalışıldı. Ayrıca, western blot yöntemi ile apoptozis değerlendirildi.

Bulgular: İskemi grubuna göre, 3 saat reperfüzyon sonrası diazoksid verdiğimiz grupta DNA hasarının anlamlı derecede azaldığını gözlemledik ($p=0,04$). Oksidatif stres parametrelerine baktığımızda, doku TOS'un 3 saat reperfüzyon sonrası ilaç verdiğimiz grupta ve 24 saat reperfüzyon sonrası ilaç verdiğimiz grupta, iskemi grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak azalmış olduğunu değerlendirdik ($p=0,04$, $p=0,04$). Doku OSI'yi, diazoksidin çözünmesi için DMSO verdiğimiz kontrol grubunda 3 saat reperfüzyon sonrası diazoksid verdiğimiz gruba göre anlamlı olarak yüksek bulduk ($p=0,05$). Plazma TOS ve plazma OSI'yi, kontrol grubunda, 3 saat iskemi reperfüzyon grubuna ve 24 saat iskemi reperfüzyon grubuna göre anlamlı derecede düşük bulurken ($p=0,01$; $p=0,03$), kontrol grubu ile 3 saat reperfüzyon sonrası ilaç grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark saptadık ($p=0,00$). Ayrıca; 3 saat reperfüzyon sonrası diazoksid verdiğimiz grupta, 3 saat reperfüzyon grubuna göre anlamlı olarak azalmış olarak değerlendirdik ($p=0,01$). 3 saat reperfüzyon grubu ile diazoksidin çözünmesi için DMSO verdiğimiz kontrol grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulduk ($p=0,03$). 3 saat iskemi sonrası diazoksid verdiğimiz grupta, 24 saat reperfüzyon grubuna ($p=0,00$)ve 24 saat reperfüzyon sonrası diazoksid verdiğimiz gruba göre

anlamli derecede dusek saptadik (p=0,03). Aynı zamanda plazma TOS ve OSI'nin, ilacsiz 24 saat reperfuzyon grubunda, DMSO grubuna gore anlamli derecede yuksek oldugunu gozlemledik (p=0,01). Plazma TAS, doku TAS, doku katalaz acısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamli fark bulamadik. Ayrıca, western blot yöntemi ile ölçülen bax, bcl-2 ve kaspaz 3 gen ekspresyonlarında, gruplar arasında anlamli fark bulamadik.

Sonuç: Bulgularımız diazoksidin, over iskemi reperfuzyon hasarında, süre ile bağlantılı olarak, kısmen oksidatif stresi azalttığını göstermektedir. Diazoksidin etkisinin, reperfuzyon süresi ile ters orantılı olarak daha iyi olduğu söylenebilir. Klinik olarak, over torsiyonunda etkin tedavinin cerrahi girişimle torsiyonun düzeltilmesi olmasına rağmen, cerrahi müdahaleye ek olarak bu safhada uygulanacak olan diazoksid gibi antioksidan maddelerle detorsiyonla oluşabilecek hasar azaltılabilir.

ABSTRACT

Investigation of Diazoxidine Protective Effect in Rat Ovary Ischemia Reperfusion Injury

Objective: To investigate the efficacy of diazoxidine to prevent ischemia / reperfusion tissue damage in rats that we experimentally modeled as ovary-torsion.

Materials and Methods: In this randomized controlled experimental study, Wistar Albino type of female rats in 35 reproductive cycles were used. It was divided into 7 groups randomly, as each group with 5 people. Group 1 (S): sham group, only laparotomy group. Group 2 (I): group with ischemia for 3 hours. Group 3 (I / R3): group that was reperfused 3 hours after ischemia for 3 hours. Group 4 (I / R3 + D): group given diazoxide after 3 hours reperfusion. Group 5 (I / R24): group reperfused 24 hours after ischemia for 3 hours. Group 6 (I / R24 + D): group given diazoxide after 24 hours reperfusion. Group 7 (DMSO): group only treated with DMSO because diazoxide dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as solvent in the other groups, in order to provide standardization. After the procedure, the blood samples were taken from all groups and bilateral oophorectomy was performed. DNA damage was assessed via the Comet assay method. Tissue TAS, TOS, OSI, catalase, plasma TAS, TOS and OSI from the oxidative stress parameters were studied. In addition, apoptosis was assessed via western blot method.

Results : According to the ischemia group, we observed that the DNA damage decreased significantly in the group that we gave diazoxide after 3 hours reperfusion ($p = 0.04$). When we looked at the oxidative stress parameters, we evaluated that tissue TOS in the group that gave the drug after 3 hours of reperfusion and in the group that gave the drug after 24 hours of reperfusion was statistically significantly lower than the ischemic group ($p = 0.04$, $p = 0.04$). We found that the tissue OSI was significantly higher in the control group that we gave DMSO for diazoxidine dissolution compared to the group that gave diazoxide after 3 hours reperfusion ($p = 0.05$). While plasma TOS and plasma OSI were significantly lower in the control group than in the ischemia reperfusion group for 3 hours and the ischemia reperfusion group for 24 hours ($p = 0.01$, $p = 0.03$), we found a statistically significant difference between the control group and the drug group after 3 hours reperfusion ($P = 0.00$). In addition, we deduced the 3-hour reperfusion-induced diazoxide group as significantly lower than the 3-hour reperfusion group ($p = 0,01$). We also found a statistically significant

difference between the 3 hour reperfusion group and the control group that gave DMSO for dissolution of diazoxide ($p = 0.03$). After 3 hours of ischemia, diazoxide was found to be significantly lower than that of group given diazoxide 24 hours after reperfusion ($p = 0,00$) and 24 hours after reperfusion ($p = 0.03$). At the same time, we observed that plasma TOS and OSI were significantly higher in the 24 hour reperfusion group without drug than in the DMSO group ($p = 0.01$). We could not find any statistically significant difference between the groups in terms of plasma TAS, tissue TAS, tissue catalase.

Conclusion: Our findings show that diazoxidine partially reduces oxidative stress in relation to time in ovary ischemia reperfusion injury. It can be said that the diazoxidine effect is better as inversely proportional to the duration of reperfusion. Although clinically, the effective treatment of ovary-torsion is surgical correction of the torsion, damage can be reduced by the addition of antioxidant substances such as diazoxide, which will be applied in this phase in addition to surgical intervention.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	i
ŞEKİLLER DİZİNİ	iii
TABLolar DİZİNİ	iv
RESİMLER DİZİNİ	v
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. OVER	3
2.1.1. OVERLERİN ANATOMİSİ	3
2.1.2. OVERİN DAMARSAL YAPILARI	4
2.1.3. OVERİN SİNİRSEL YAPILARI	5
2.1.4. OVERİN HİSTOLOJİSİ:	5
2.1.5. OVERİN EMBRİYOLOJİSİ:	5
2.1.6. OVERİN FİZYOLOJİSİ	6
2.2. ADNEKSİYEL TORSİYON:	9
2.2.1. KLİNİK BULGULAR	10
2.2.2. ADNEKSİYEL TORSİYONDA TANI	10
2.2.3. ADNEKSİYAL TORSİYONDA TEDAVİ	12
2.3. İSKEMİ REPERFÜZYON:	13
2.3.1. SERBEST RADİKALLER:	14
2.3.2. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ:	14
2.3.3. ANTİOKSİDAN SİSTEMLER	16
2.3.4. TOTAL ANTİOKSİDAN SEVİYE (TAS)	18
2.3.5. TOTAL OKSİDAN SEVİYE (TOS)	18
2.3.6. OKSİDATİF STRES İNDEKSİ	19
2.3.7. COMET ASSAY	19
	vi

2.3.8. APOPTOZİS	20
2.3.9. WESTERN BLOT	22
2.3.10. DİAZOKSİD	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. CERRAHİ İŞLEMLER	24
3.2. DENEY GRUPLARI	25
3.3. DENEYİN SONLANDIRILMASI	26
3.4. ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI VE ÖLÇÜMLER	26
3.4.1. MONONÜKLEER LÖKOSİTLERİN SEPERASYONU	27
3.4.2. COMET ASSAY (ALKALİ MONONÜKLEER TEK HÜCRE ELEKTROFOREZİ) YÖNTEMİ İLE DNA HASAR TAYİNİ	28
3.4.3. TOTAL ANTİOKSİDAN SEVİYE (TAS)	29
3.4.4. TOTAL OKSİDAN SEVİYE (TOS):	29
3.4.5. OKSİDATİF STRES İNDEKSİ (OSİ):	30
3.4.6. WESTERN BLOT YÖNTEMİ	30
3.5. İSTATİKSEL ANALİZ	31
4. BULGULAR	32
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇ	40
7. KAYNAKLAR	41

KISALTMALAR

AMH: antimüllerien hormon

ATP: adenzin trifosfat

CYP17: sitokrom P-450 17 alfa

DHT: dihidrotestesteron

DMSO: dimetil sülfoksid

DNA: Deoksiribonukleik asit

E1: östron

E2: östrodiol

EDTA: etilendiamin tetraasetik asit

ETS: elektron transport zinciri

FSH: folikül stimüle edici hormon

GnRH: gonadotropin serbestleştirici hormon

GPx: Glutasyon peroksidaz

GR: Glutasyon redüktaz

H₂O₂: hidrojen peroksit

IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü

K: potasyum

LH: luteinizan hormon

LMP: düşük erime noktası

MDA: malondialdehit

O₂⁻ : süperoksit anyonları

OH: hidroksil radikali

OSI: Oksidatif Stres İndeksi

PVDF: poliviniliden diflorid

RDUS: Renkli Doppler Ultrasonografi

ROM: reaktif oksijen metabolitleri

SDS-PAGE: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SOA: serum oksidan aktivitesi

SOD: Superoksit dismutaz

SRY: seks belirleyici bölge

TAS: Total Antioksidan Seviye

TDF: testis belirleyici faktor

TOS: Total Oksidan Seviye

TP: total peroksid

VEGF: vasküler endotelyal büyüme faktörü



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil-1: Tail intensitynin gruplar arasındaki dağılımı

Şekil-2: Doku TOS'un gruplar arasındaki dağılımı

Şekil-3: Doku OSİ'nin gruplar arasındaki dağılımı

Şekil-4: Plazma TOS'un gruplar arasındaki dağılımı

Şekil-5: Plazma OSİ'nin gruplar arasındaki dağılımı



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo-1: Deney gruplarında Comet Assay yöntemi ile gösterilen DNA hasarı

Tablo-2: Deney gruplarında dokudaki oksidatif stres parametreleri

Tablo-3: Deney gruplarında plazmadaki oksidatif stres parametreleri

Tablo-4: Deney gruplarında gen ekspresyonları



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Overin ligamentleri

Resim 2: Comet assay de normal DNA

Resim 3: Comet assay de DNA hasarı

Resim 4: Sıçan overinin torsiyone edilerek batın ön duvarına sabitlenmesi

Resim 5: 3 saatlik iskemi sonrası overin görünümü

Resim 6: 24 saat reperfüzyon sonrası overin görünümü



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Over torsiyonu tanı ve tedavide gecikildiğinde organ kaybı ile sonuçlanabilecek önemli jinekolojik acillerden biridir. Adneksiyel komponentlerin kendi etrafında dönerek kanlanması bozulması ve devamı halinde iskemi ve nekroz gelişmesidir. Prevelansı %2,7 dir. Genellikle reproduktif çağda görülür ancak postmenapozal döneme kadar herhangi bir dönemde görülebilir (1).

Ani başlangıçlı karın ağrısı şikayetiyle acil servise başvuran hastaların ayırıcı tanısında, over torsiyonu dışında apandisit, dış gebelik, over kist rüptürü, pelvik enflamatuvar hastalık, , kolit, nefrolitiazis gibi pek çok hastalık düşünülmelidir. Klinik bulgularının net olmaması nedeniyle tanı gecikebilir. Over torsiyonunda fertilizasyonu koruyabilmek için erken tanı ve tedavi önemli rol oynamaktadır. Tedavide, torsiyone uğramış overin cerrahi olarak alınması gelecek dönemde bu kadınların hem fertilizasyonunu hem de menapoz yaşını olumsuz yönde etkilediğinden son yıllarda konservatif tedavi yani overin detorsiyone edilmesi ön plana çıkmıştır (2).

Dokulara kan sağlayan damarların, bir pıhtı veya mekanik etkenle tıkanması sonucu dokunun beslenmesinin bozulmasına ve oksijensiz kalmasına iskemi ve devamında bu olayın düzenlenmesinde tekrar dokunun oksijenlenmesi ve beslenmesinin düzeltilmesi durumuna ise reperfüzyon denilmektedir. Detorsiyone edilen overde, iskemi sonrası reperfüzyonun sağlanması, organ ve doku hasarını artırır ve bu iskemi reperfüzyon hasarı olarak adlandırılır. Dokudaki toplam hasar iskemi ve reperfüzyonun her ikisinin de yol açtığı hasar olarak kabul edilmektedir (3,4). Detorsiyon işleminde iskemik dokuların oksijenlenmesi reaktif oksijen moleküllerin üretilmesine neden olmaktadır. Patogeneizde hasarlanan dokunun reperfüzyonu esnasında aktive olmuş nötrofiller ile superoksit anyon, hidrojen peroksit, ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen moleküllerinin salınması yer almaktadır. Reaktif oksijen moleküllerinin, hücre membranındaki poliunsatüre yağ asitlerini parçalayarak nekroz ve apopitoz yolu ile hücrel hasara neden olduğu bilinmektedir (5-7).

İskemi reperfüzyon hasarı paradoksal olarak iskemik hasardan daha fazla bir şekilde dokuları etkilemektedir. Bundan dolayı iskemi reperfüzyon modeli çeşitli çalışmalarda kullanılmakta ve reperfüzyon hasarının azalmasına yönelik çeşitli farmakolojik ajanlar denenmektedir.

Diazoksid, mitokondrial ATP duyarlı K kanalları üzerinden etki gösteren, antioksidan ve antiapoptotik etkili bir ilaçtır ve aynı zamanda vazodilatasyon etkisi de bulunmaktadır. Diazoksid, antioksidan ve antiapoptotik etkileri ile farklı dokularda reperfüzyona bağlı serbest oksijen radikalleri ile meydana gelen hasarı, vazodilatasyon etkisi ile de iskemiye bağlı oluşan hasarı azalttığı birçok çalışmada gösterilmiştir (8-12). Diazoksidin over iskemi/reperfüzyon modelinde bu etkiler ile doku hasarını azaltabileceği hipotezi ile bu çalışmada diazoksidin iskemi reperfüzyon doku hasarını önlemedeki etkinliğini araştırmayı amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Over

2.1.1. Overlerin Anatomisi

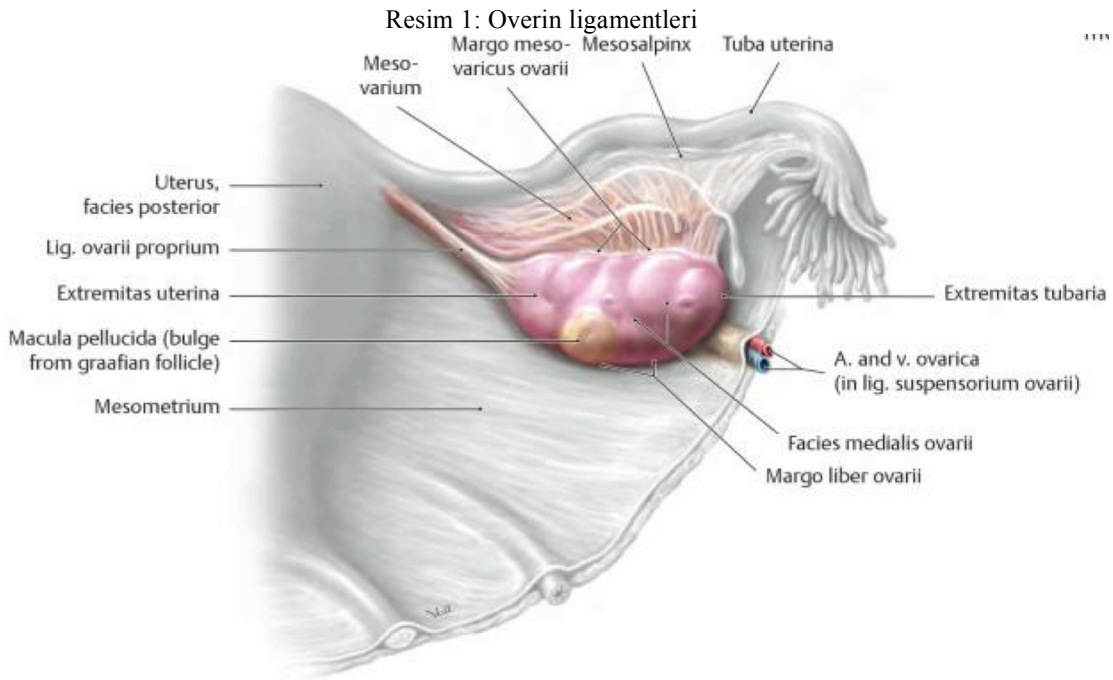
Overler, uterusun her iki yanında bulunan bir çift gonadal organdır. Boyutları, reproduktif dönemde genellikle 2.5-5 cm uzunluğunda, 1.5-3 cm genişliğinde, 0.7-1.5 cm kalınlığında ve 4-8 gr ağırlığındadır. Endojen hormonal durumuna göre boyutları değişebilir. Bu durumu da yaş, menstrual siklus, dışarıdan alınan oral kontraseptifler, ovulasyon indüksiyonu gibi durumlar etkileyebilir (13).

Embriyonal hayatın başlangıcında intraabdominal yerleşimli iken, embriyonal hayatın ikinci ayından itibaren pelvik boşluğa doğru inmeye başlarlar. Pelvis minoranın yan duvarlarında, fossa ovarica denilen çukurlara yerleşirler. Fossa ovaricayı üstten arteria iliaca externa, arkadan arteria iliaca interna ve üreter, aşağı ön taraftan ise ligamentum latum uterinum tabanı sınırlar. Fossanın dibinde ve peritonun altında arteria ve vena obturatoria ve nervus obturatorius bulunur.

Overlerin, anatomik olarak lateral ve medial olmak üzere iki yüzü, anterior (mezoovaryan) ve posterior (serbest) olmak üzere iki kenarı, tubal (üst) ve uterin (alt) olmak üzere iki ucu vardır. Lateral yüzü, pelvis duvarına bakan yüzdür, fossa ovaricayı örten parietal peritona oturur. Medial yüzü, uterus ve pelvis boşluğuna bakan yüzdür. Ön kısmı mesosalpinksle, orta kısmı ince barsak ve sigmoid kolonla, arka kısmı ise tuba uterinanın infundibulum parçasıyla komşudur. Anterior kenar mezoovaryan kenar olarak da isimlendirilir. Bu kenara, mezoovaryum denilen ve ovaryumu ligamentum latum uteriye bağlayan bir periton katlantısı tutunur. Bu tutunma çizgisine Waldeyer çizgisi adı verilir. Posterior kenar, serbest ve hareketlidir. Ön kenardan daha kalın ve konvektir. Arteria iliaca interna, vena iliaca interna ve üreter ile komşuluk yapar. Tubal uç, overin üst ucudur. Tuba uterinanın infundibulum parçası ile ve fimbria tuba ile komşudur. Ayrıca ve ligamentum suspensorium overi adı verilen içinde ovaryuma ait arter, ven ve sinirlerin yer aldığı periton kıvrımı ile de pelvik duvara bağlanır. Uterin uç, overin alt ucudur. Ovaryumlar bu uçtan ligamentum ovarii proprium ile uterusu bağlanır. (13,14)

Overlerin mobilitesini 3 önemli bağ belirler. Bunlar mezoovaryum, infundibulopelvik ligament (ligamentum suspensorium ovarii) ve ovaryen ligamenttir (ligamentum ovarii proprium). Overin epitelyal tabakası ve broad ligamentinin posterosuperior yaprağı tarafından

olusturulan mezovaryum, iki tabakalidir. Overin ön kenarina tutunur. Overyan ve uterin arterin dallarını, sinir pleksuslarını ve pampiniform venöz pleksusu ve overyan ligamentin lateral sonlanmalarını içerir. Peritonun üçgen bir katlantısı olan infundibulopelvik ligament, overi üst uçtan, pelvik yan duvara sabitler. Broad ligamentinin üst dış köşesini oluşturur. Elastik ve düz kas lifleri içerir. Bu bağın içerisinde overin arterleri, venleri ve sinirleri bulunur. Broad ligamentinin iki yaprağı arasında bulunan overyan ligament ise overin alt ucunu, uterusun lateral duvarına bağlar. Çok sayıda kas lifleri içerir (15).



2.1.2. Overin Damarsal Yapıları

Overyen arter, overlerin beslenmesini sağlayan esas arterdir. Birinci lumbar vertebra seviyesinde, renal arter seviyesinin altında, abdominal aortanın ön yüzünden kaynaklanır. Posterior abdominal duvarda, retroperitoneal olarak aşağıya doğru seyrederek Ligamentum suspensorium ovarii içerisinde ilerleyerek mezoovaryuma gelir ve hilus bölgesinden overe girer. Uterin arterin overyen dalı da overi besleyen diğer bir damardır.

Over venleri hilusta birleşerek pampiniform pleksusu oluşturur ve overyan arterle beraber retroperitonda seyrederek. Sağ overyan ven inferior vena kavaya, sol overyan ven sol renal vene boşalır.

Overlerin lenfatik damarları da, retroperitonda seyrederek alt abdominal aortadaki paraaortik lenf nodlarına drene olur (14).

2.1.3. Overin Sinirsel Yapıları

Overlerin hem sempatik, hem de parasempatik innervasyonu vardır. Sempatik innervasyonu overyan pleksustan gelir ve renal pleksustan kaynaklanır. Overyan arter ile birlikte aşağıya doğru iner ve hilus bölgesinden overe girer. Overlerin esas çoğunlukta olan sinirleri sempatik sistemden kaynaklanır ve bunlar T₁₀₋₁₂ segmentlerinden çıkarlar. Parasempatik innervasyonu ise nervus vagustan gelir. Duyusal affarent sinirleri T₁₀ spinal kord düzeyinden girer (15).

2.1.4. Overin Histolojisi:

Overler, dışta korteks, içte medulla ve hilus olmak üzere 3 major kısımdan oluşur. Hilus mezoovaryuma bağlanma yeridir, sinir ve damarları içerir. en dışta, germinal epitel denilen tek katlı kübik epitel ile kaplıdır. Bu hücreler, mezoovaryumun mezotel hücreleri ile devamlılık gösterir. Germinal epitelin altında tunica albuginea adı verilen sıkı bağ dokusu vardır. Bu tabaka altında korteks onun da altında medulla vardır. Korteks, overin esas fonksiyon gören kısmıdır. İnce areolar bir stromadan oluşmuştur. Çeşitli gelişme ve gerileme evrelerinde oositler içeren folliküller ve birçok damar bulunur. Medulla, büyük oranda mezonefrik hücrelerden gelişmiştir. Bağ dokusundan zengindir, çok sayıda damar, sinir, lenfatik damar ve elastik lif içerir (16).

2.1.5. Overin Embriyolojisi:

Gonadlar çölemik epitel, mezenşim ve mezonefrik dokudan köken alan somatik hücrelerle beraber germ hücrelerini içerir. Primordiyal germ hücreleri, yolk sak, allantoyis ve embriyonun arka bağırsağının endoderm tabakasından köken alır. (17,18). Gonadal çıkıntı, germ hücrelerinin canlı kalabileceği tek yerdir. Sperm ve ovumun direkt öncülü olan primordiyal germ hücreleri gebeliğin 4. ve 6.haftaları arasında aktif ameboid hareketler ile , gonadal bölgeye göç ederler(19,20). Göç sırasında prolifer olmaya başlarlar. Bu haftalarda over ve testis histolojik olarak ayırt edilemez ve bu evre farklanmamış evre olarak adlandırılır. 6. gebelik haftasında farklanmamış evre tamamlanır.

Gebeliğin 6-9. Haftaları farklanma evresidir.Bu haftalarda testiküler gelişimin olmaması, over varlığının en önemli göstergesidir. Farklanmamış gonadın, testis olmasını belirleyen Y kromozomu üzerinde bulunan seks belirleyici bölgede (SRY) bulunan testis belirleyici faktördür (TDF). Kabul edilen görüş, testis gelişiminin aktif gen kontrolünde olduğu, over gelişiminin ise bu genlerin yokluğunda oluşan pasif bir süreç olduğu idi. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar, over gelişimi için WNT4, RSPO1 ve DAX1 gibi bir takım

genlerin aktivasyonu gerektiğini göstermiştir (21,22). 7. Haftanın başında, müllerien kanalın gelişimini engelleyen antimüllerien hormon (AMH), sertoli hücrelerinden salınarak uterus, fallop tüpleri ve vajinanın 2/3 üst kısmının gelişimini önler. Eğer AMH salınmazsa dişi yapılar gelişir. 8. Haftadan sonra leydig hücreleri belirir ve testesteron salgılamaya başlar. Wolf kanal yapıları gelişir. Erkek dış genital organları da testesteronun 5 alfa redüktaz ile dihidrotestosterona (DHT) dönmesi ile gelişir.

6-8. haftalarda, ovaryen farklanmanın ilk işareti, germ hücrelerinin mitozla çoğalmaya başlamasıdır. 16-20. haftalarda oogonyum sayısı 6-7 milyona ulaşır. Bu ulaşabileceği maksimum sayıdır. Bu haftadan sonra giderek azalır. Doğumda 1-2 milyon, pubertede ise 400.000 civarındadır. Yani oogonyumların çoğu atreziye uğrar. Bu atrezinin apoptosis ile olduğu düşünülür. Sadece 300-400 tanesi ovulasyon aşamasına kadar ilerleyebilir.

Oogonialar ya primer oosite ilerler ya da atreziye uğrar. 12. haftada oogoniaların bir kısmı mayoz bölünmeye başlayarak primer oositleri oluşturur. Gebeliğin 20. haftasına kadar mitoz bölünme devam eder ve oogonia sayısı maksimuma ulaşır. Yaklaşık 6-7 milyon kadardır. Doğumda 1-2 milyon, pubertede ise 400.000 civarındadır. Yani oogoniaların çoğu atreziye uğrar. Bu atrezinin apoptosis ile olduğu düşünülür. Sadece 300-400 tanesi ovulasyon aşamasına kadar ilerleyebilir.

Oogoniaların primer oosite dönmek için başladığı mayoz bölünme, granüloza hücrelerinden üretilen oosit maturasyon inhibitörü nedeniyle 1. mayoz bölünmenin profaz 1 fazında durur. Ovulasyondan hemen önce dominant follikül içindeki primer oosit LH artışına bağlı 1. mayoz bölünmeyi tamamlar. 23 kromozomlu iki hücre oluşur. Sitoplazması büyük olan sekonder oosit, sitoplazma içermeyen ise 1. polar cisim adını alır. Oluşan sekonder oositte 2. mayoz bölünme başlar ve metafaz evresinde duraklar. Bu duraklamadan ise oositte kodlanan pp39mos proteini sorumludur. Ancak döllenme olursa, bu protein parçalanır ve 2. mayoz tamamlanır. 23 kromozomlu matür oosit ve 2. Polar cisim oluşur (23).

2.1.6. Overin Fizyolojisi

Overlerin 2 temel görevi vardır. Bunlardan biri steroid hormon üretimi (steroidogenez), ikincisi ise oositlerin periyodik olarak atılmasıdır (folikülogenez).

2.1.6.1. Overde Folikülogenez

18-20. haftalarda korteksin, medullar bölgeden kaynaklanan vasküler kanallar tarafından yavaş yavaş delinmesi, follikül oluşmasının başladığını gösterir. (24)

Foliküler gelişim primordiyal foliküllerden başlar ve sırasıyla primer (preantral), sekonder (antral) ve tersiyer (preovulatuvar - graaf) folikül oluşur. Sekonder foliküle kadar gelişim gonadotropinlerden bağımsızdır. Ancak maturasyonun tamamlanması gonadotropin bağımlıdır, FSH ve LH gereklidir.

Herhangi bir siklusta ne kadar ve hangi folüküllerin büyümeye başlayacağını belirleyen mekanizma henüz bilinmemektedir. Ancak büyüyecek folikül sayısı rezidüel inaktif primordial folikül sayısına bağlıdır. Örneğin unilateral oofektomi yapıp rezidüel havuz küçültülürse, kalan folüküllere göre yeniden bir düzenleme olur. (25,26)

Primordiyal folikül, doğumda ovaryumda bulunan tek folikül türüdür. Birinci mayotik bölünmede durmuş primer oosit etrafı tek katlı yassı granüloza tabakası ile çevrelenmiştir. Primer oosit çapı 30 mikrometredir. Bu foliküller damarsızdır ve gerekli besinleri sağlamak, metabolitleri temizlemek için düffuzyon bağımlıdır.

Primer oositi çevreleyen tek katlı yassı granüloza hücrelerinin, küboidal granüloza hücre tabakasına dönüşmesi ile primer follikül oluşur. Primer oosit çapı biraz daha büyüyerek 50-80 mikrometreye ulaşır. Granüloza hücreleri arasında besinlerin, iyonların ve düzenleyici faktörlerin geçişine izin veren gap junctionlar bulunur. Granüloza hücrelerinin tek katlı kübik epitele dönüşmesi ile birlikte oosit tarafından yapılan mukopolisakkarit tabaka olan zona pellusida oluşur. Başta kesintili olan zona pellusida birleşerek primer oositin etrafını çepeçevre sarar ve foliküller hücreleri oositten ayırır. Bu dönemde çevredeki stromal hücreler teka hücreleri denilen dış sınırı belirgin olmayan bir tabakaya dönüşür (27,28).

Preantral evreye kadar granüloza hücrelerinde spesifik FSH reseptörü yoktur. Preantral foliküller, östrojenik mikroçevresini oluşturmak üzere androjenleri aromatize edebilmek için FSH'a ihtiyaç duyarlar. Bu folüküllerin granüloza hücreleri, östrojen fazla olmak üzere, androjen ve progesterinleri de sentez edebilirler (29). FSH ve östrojen birlikte, follikülün FSH reseptör içeriğini de artırır.

Sekonder follikül, primer oosit çevresindeki granuloza hücrelerinin sayısının daha da fazla artması ve oositin daha da büyümesi ile oluşur. Primer oosit çapı 125 mikrometredir. Granüloza hücreleri arasında berrak, hyaluronik asitten zengin bir sıvı birikmeye başlar. Bu sıvı, granüloza hücrelerinden salgılanan faktörler ve plazma sıvısından oluşur. Folikül sıvısı olarak adlandırılır. FSH varlığında, follikül sıvısındaki ana madde östrojen, yokluğunda ise androjendir (30,31). Normalde midsiklusa kadar follikül sıvısında LH bulunmamaktadır. Plazma ve antral sıvıda LH erken olarak yükselirse granüloza hücrelerindeki mitotik aktivite

azalır, follikül içinde androjen miktarı artar, dejeneratif değişiklikler başlar. Sıvının miktarı arttıkça, tek bir yarımaya şeklinde boşluk oluşur ve bu boşluğa antrum adı verilir. Ovarian stromal hücrelerden farklılaşan teka hücreleri iki tabakaya ayrılır. Bazal laminaya komşu olan teka interna, çevreleyen stromaya bitişik olan ise teka eksterna adını alır. (32) Folikülün kalın granuloza hücre tabakası folikül gelişmesi boyunca damarsızdır ve teka interna kapillerinden diffüzyon ile beslenir. Sekonder follikülü oluşturan granuloza hücrelerinde FSH, östrojen, androjen reseptörleri ve teka interna hücrelerinde ise LH reseptörleri mevcuttur (33,34). Folikülün çapı 0.2-10mm dir. Sekonder foliküller ya büyümeye devam ederek graaf folikülü oluşturacaklardır ya da %99'unda olduğu gibi atreziye uğrayacaklardır (32).

Tersiyer folikül, baskın olan bir antral folikülün büyümeye devam etmesi ile oluşur. Granuloza hücrelerinde antruma doğru yöresel bir kalınlaşma olur, oositi çepeçevre sarar ve kumulus ooforusu oluşturur. Bunun en içteki, zona pellusida ile komşu olan katı ise korona radiatadır. Ovulasyon sırasında oosit, korona radiatasıyla birlikte kümülüs ooforustan ayrılır ve atılır.

Her ay bir folikül grubu yarı eş zamanlı bir büyüme fazına girer. Bu folikül grubuna kohort adı verilir. Preovulatuvar konuma gelebilmek için gereken toplam süre yaklaşık 85 gündür. Belli sayıda antral folikülden oluşan kohort, FSH etkisi ile büyüyerek, dominant folikül seçimi için yarışa girerler (35). Uygun bir gelişim evresinde olmayan foliküllerin çoğu atreziye gider. Bir folikül kohortunun atreziden kurtulmasında FSH artışı çok önemlidir. Foliküler evrenin sonlarındaki FSH artışıyla östrojen seviyeleri yükselir. Bunun sonucunda foliküllerde büyüme meydana gelir.

Folikülün gelişimin devamlılığı için mikroçevredeki androjen hakimiyetinin östrojenler lehine dönüşmesi gerekmektedir. Androjenlerin düşük konsantrasyonları aromatzasyonu uyarır. Ancak, granuloza hücrelerindeki aromatzasyon, teka hücrelerinde androjen yapımının gerisinde kalırsa androjen miktarı artar ve 5 α androjenlere dönüşür. 5 α androjenler aromatzasyonu inhibe eder ve FSH aracılıklı LH reseptör yapımı azalır (14,36). Yeterli FSH reseptörü ve granuloza hücresi bulunmayan foliküller androjenik mikroçevre içerisinde kalarak atreziye uğrar. Böylece dominant folikül seçilmiş olur. İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) artışının da dominant folikül seçimine etkisi olduğu saptanmıştır (37).

2.1.6.2. Ovaryen steroidogenez

Hipotalamusta sentezlenen gonadotropin serbestleştirici hormona (GnRH) yanıt olarak ön hipofiz bezinden salgılanan gonadotropinler (folikül stimüle edici hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH)), overden seks steroidlerinin (östrojen, progesteron ve androjen) sentezlenip salgılanmasını sağlar.

Overler tarafından salgılanan iki temel steroid hormon, östrodiol ve progesterondur. Ayrıca östron, androstenedion, testosteron ve 17 hidrokspirogesteron da salgılanır. Folliküler gelişim sürecinde, follikülün teka hücrelerinde LH etkisi ile androstenedion ve testosteron üretilir. Granüloza hücrelerinde FSH etkisi ile östron (E1) ve östrodiol(E2) üretilir. Ancak teka hücreleri bu üretim için gerekli olan genlerin tümünün bulundururken, granüloza hücreleri östrojen üretimi için gerekli öncülleri üretemez. Teka hücreleri, granüloza hücrelerinden farklı olarak sitokrom P-450 17 alfa (CYP17) gen ekspresyonu ile 17-hidroksilaz enzimini katalize ederler. Bu enzim progesteronun androjenlere dönüşümde görev alır. Granüloza hücreleri, bu enzimi bulundurmadıkları için östrojen biyosentezinde gerekli olan öncül molekülleri teka hücrelerinden temin eder ve ona bağımlı olarak çalışır. Bunun için, LH etkisi ile teka hücrelerinden sentezlenen androjenler ekstrasellüler sıvıya salgılanır ve granüloza hücrelerinin bazal membranlarından geçerek granüloza hücrelerinde FSH etkisi ile aromotaz aktivitesi meydana gelir ve androstenediondan östron, testosterondan ise östradiol elde edilir. Buna iki hücre iki gonadotropin teorisi denir. Buna göre ovaryen steroidogenez büyük ölçüde LH kontrolü altındadır (14,23,38).

2.2. Adneksiyel Torsiyon:

Torsiyon, adneksiyel komponentlerin kendi etrafında dönerek kanlanması bozulması ve devamı halinde iskemi ve nekroz gelişmesidir. Genellikle (%67) over ve tubal yapılar ile birlikte infundibulopelvik ligament ve ovariproprium ligament de içererek kendi etrafında döner. Daha seyrek olarak, over yalnız başına mezovaryum etrafında dönebilir. Daha da nadir olarak sadece tuba mezosalpinks etrafında dönebilir.(14, 39) İlk olarak venöz kan akımı, sonrasında arteriyel kan akımı da bozulur. Bunun sonucunda arteriyel dolaşımın bozulmasına bağlı iskemi, venöz dönüşün bozulmasıyla da ödem gelişir.

Over torsiyonu tanı ve tedavide gecikildiğinde organ kaybı ile sonuçlanabilecek önemli jinekolojik acillerden biridir. Prevelansı %2,7 dir (1).

En sık reproduktif dönemde görülebildiği gibi postmenapozal döneme kadar her dönemde görülebilir. Gebelik sırasında görülen torsiyon ise bütün torsiyon vakalarının %20-25 i gibi yüksek bir oranını oluşturur(40,41)

Genellikle sağ adneks daha fazla torsiyone olur. Bunun sebebi sağ infundibulopelvik ligament fizyolojik olarak soldan daha uzundur. Ayrıca sigmoid kolon solda yer kaplayarak torsiyon riskini azaltır. En önemli risk faktörlerinden biri ovaryen kitlelerdir. Daha çok benign ovaryan kistler torsiyone olur. Malign neoplazmlarda benign kitlelere göre torsiyon insidansının daha düşük olmasının nedeni, kitlenin enflamasyonuna, adezyonlara, lokal invazyona ve dolayısıyla kitlenin çevredeki yapılara yapışık olması ile açıklanmaktadır (42,43). Torsiyon olgularının sadece %2'sinde malignite saptanmıştır (44).

Over stimülasyonuna bağlı over boyutlarının artması, overlerin mezovaryum ve ligamentum suspensorium ovarinin normalden uzun olmasına bağlı aşırı mobil olması, geçirilmiş torsiyon öyküsü, gebelik, polikistik over sendromu da risk faktörleri arasındadır (45). Ayrıca paratubal kistlerin varlığı, hidrosalpinks, hematosalpinks varlığı da izole tuba torsiyonuna neden olabilir (46,47).

2.2.1. Klinik Bulgular

Akut batın nedenleri arasında yer alan torsiyonun bulguları non spesifiktir. Klinik olarak genellikle ani başlayan şiddetli ağrı vardır. Torsiyon olan tarafa lokalizedir. Pozisyona ve harekete bağlı şiddeti değişebilir. Ağrının şiddeti klinik tablonun ciddiyetini göstermeyebilir. Genellikle ağrıya eşlik eden bulantı, kusma, iştahsızlık vardır. Bulantı, kusma adneksiyel torsiyonda %70 oranında görülür ve genellikle yoğun ağrı ve peritoneal irritasyona bağlı vagal refleksle ilişkilidir. Yaklaşık %20 oranında ateş de eşlik edebilir (48,49,50). Batın muayenesinde ağrılı, hassas kitle ele gelebilir. Moore ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada olguların % 75' inde ele gelen kitle saptanmamıştır (51).

Semptomları non spesifik olduğundan pelvik inflamatuvar hastalık, dış gebelik, nekroze myom gibi jinekolojik hastalıklarla ya da apandisit, kolit, nefrolitiazis gibi non jinekolojik hastalıklarla karışabilir. Bu nedenle tanı gecikebilir.

2.2.2. Adneksiyel Torsiyonda Tanı

Torsiyona spesifik bir kan testi yoktur. Tam kanda lökositoz görülebilir. Ancak Oelsner ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada doku nekrozu ile lökositoz arasında korelasyon izlenmemiştir (52).

Torsiyon suresi, prognozda ve tedavi yönetiminde önemli bir faktördür. Erken tanı, over kaybını önleyebilir ve bu özellikle reproduktif çağda fertilité açısından önemlidir.

Jinekolojik acilerin değerlendirilmesinde genellikle ilk görüntüleme aracı ultrasonografidir. Ultrasonografi non invaziv, diğer yöntemlere göre daha ucuz ve kolay ulaşılabilir ama subjektif bir yöntemdir. Ağrıya beraber ultrasonografik olarak overde kitle izlenmesi, tek taraflı over boyutunda artış olması ve overde tek tip periferik kistik yapıların görülmesi torsiyon düşündürülebilir ancak torsiyon için patognomonik değildir. Diğer kistik oluşumlardan ayırt edilmesinde faydalı değildir(53). Torsiyon, %9 ile %26 arasında normal overde de olabilir ve sonografik olarak hiçbir bulgu vermeyebilir. Normal overlerin torsiyonunda en sık görülen sonografik bulgu over boyutunun artmasıdır (44,53,54). Over stroması, hemoraji ve ödeme sekonder, heterojen izlenebilir. Çoğu vakada solid, kistik veya hem solid hem kistik komponenti olan pelvik bir kitle bulunmaktadır .Ayrıca ultrasonda, boyutları artmış overin periferinde yerleşimli, multipl, 25mm'den küçük, sayıları artmış folliküller ve interfolliküler dokuda kalınlaşma izlenebilir. Bu durumun ciddi ödem ve hemorajiye bağlı olduğu düşünülmüştür (55).

Renkli Doppler Ultrasonografi (RDUS) ile kan akımının olmadığını göstermek tanıda yardımcıdır. Ancak pozitif prediktif değerinin %100 olmasına rağmen, Pena ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada %60 torsiyon vakasının doppler ile tanısının konulamadığı görülmüştür. Torsiyonda öncelikle venöz akım bozulur. Over dokusunda şişme ve ödem meydana gelir. Daha sonra arterial akım etkilenir. Doppler sadece arterial kan akımındaki kesilmeleri gösterebilir. Venöz akımdaki bozulmaları göstermediğinden normal doppler bulguları adneksiyel torsiyonu dışlamaz. Klinik olarak torsiyon olduğu düşünülen vakalarda, doppler bulguları normal olsa dahi cerrahi geciktirilmemelidir. Dopplerde kan akım bozuklukları her olguda görülmeyebilir. Kan akımı bozuklukları mevcutsa tanı koyma süresini kısaltır (56).

Günümüzde bilgisayarlı tomografi akut batının değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır ancak torsiyon tanısına çok katkı sağlamaz. Adneksiyel kitleyi gösterir ancak iskemiyle ilgili herhangi bir bulgu göstermez. Özellikle ultrasonografik bulgular yetersiz ise kullanılabilir. Adneksiyel torsiyonun tomografik tanı kriterleri kesin olarak tanımlanmamıştır. Sık görülen tomografik bulgular; adneksiyel kitle, pelvisin karşı tarafına kaymış ovaryan yapılar ve batın içi serbest mayi bulunmasıdır. Magnetik rezonans görüntüleme özellikle diğer tanı araçlarının yetersiz kaldığı subakut vakalarda kullanılmaktadır. Sık görülen bulgular

uterusun etkilenen tarafa deviasyonu, tromboze damarlar, yağlı planların obliterasyonu ve batın içi serbest mayidir(14,45).

Torsiyonun kesin tanısı laparaskopi ya da laparotomi ile yani cerrahi olarak torsiyone olan adneksin gösterilmesi ile konulur. Aynı zamanda tedaviyi de sağlar (57).

2.2.3. Adneksiyal Torsiyonda Tedavi

Over torsiyonunda, eğer kontrendikasyon yoksa, önerilen cerrahi yaklaşım laparaskopidir. Hem tanı konulamadığında, tanıda gecikmeleri önler hem de konservatif tedavi şansını artırır (45). Tedavide konservatif yaklaşım ya da radikal tedavi uygulanır. Bu tedavi seçeneklerinden hangisinin seçileceği hastanın yaşına, fertilitate isteğine, menapoz durumuna ve eşlik eden overyan bir patolojinin varlığına göre belirlenir. Konservatif tedavide torsiyone overi detorsiyone edilir, beraberinde eşlik eden bir kist varsa kistektomi yapılır. Radikal tedavide ise, tubanın da torsiyona katılıp katılmamasına bağlı olarak ooforektomi, salpinjektomi ya da salpingooforektomi yapılır. Bu tedavi genellikle fertilitate isteği olmayan, postmenapozal hastalarda tercih edilmektedir (58).

Laparoskopik olarak öncelikli tercih edilen yaklaşım adneksin detorsiyonudur. Önceki yıllarda, hem altta yatan malignitenin atlanmaması hem de iskemik dokunun sadece detorsiyone edilip bırakılması ile oluşabilecek tromboembolik komplikasyonlardan korkulduğu ve iskeminin geri dönüşümsüz olduğuna inanıldığı için radikal tedavi yani salpingooforektomi önerilmekteydi (59). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar, fertilitateyi korumak için ön planda konservatif tedavi önermektedir. McGovern ve arkadaşlarının adneksiyal torsiyon sonrası tromboemboli riskini araştırmak için yaptığı çalışmada, 981 hastadan sadece 2 hastada pulmoner tromboemboli saptanmış. Rapor edilen 2 vakanın da salpingooforektomi grubunda olduğu görülmüş. Pulmoner emboli insidansının detorsiyondan sonra artmadığı yapılan çalışmalarda gösterilmiş (14).

Torsiyone overde ödem, konjesyon, inflamasyon, iskemiye bağlı over mavimsi siyah bir renk alır. Bu görüntü operasyon sırasında karar verirken, daha agresif yaklaşıma neden olarak radikal tedavi ile sonuçlanabilir. Ancak son çalışmalar, overin makroskobik olarak mavimsi siyah görünmesinin iskemi derecesini ve overin canlılığını belirlemede doğru işaret olmadığını, operasyon sırasında bu rengin değişmemesi bile nekroz için kanıt olmadığını göstermiştir (60,61,62). Yapılan bazı çalışmalar ise, nekrozun göstergesi olarak overin renginden daha çok ağrının başlangıcı ile tedavi arasında geçen zamanın daha önemli olduğunu bildirmişlerdir (63,64).

Konservatif tedavi sonrası klinik ve sonografik takiplerde follikül varlığı görülerek over fonksiyonunu geri kazandığı, boyutlarının normale döndüğü görülebilir. Nadir de olsa over atrofiye de gidebilir. Çelik ve arkadaşlarının 14 hasta üzerinde yaptığı çalışmada, takip süresinde 13 hastada over boyutlarının normale döndüğü ve folikülogenezin olduğu, sadece 1 hastada overin atrofiye gittiği görülmüş (29).

Özellikle tekrarlayan veya bilateral olan vakalarda, radikal tedavi fertilitiyi olumsuz etkileyebileceğinden, detorsiyon sonrası, overin tekrar torsiyone olmasını engellemek için eriyemeyen bir sütür ile over lateral pelvik duvara, uterusun arka duvarına ya da common iliak damarların altında posterior peritona fikse edilebilir. Buna ooferopeksi denir. Ooferopeksi, iki taraflı torsiyon olduğunda, tekrarlayan tek taraflı torsiyon olduğunda ya da uzun uteroovaryen ligament gibi yapısal bir malformasyon olduğunda tedavide fayda sağlar ancak gelecekte fertilitiyi nasıl etkilediği bilinmemektedir (45,65,66).

Cohen ve arkadaşlarının, torsiyon tedavisinde laparaskopi ve laparotomiye karşılaştırdığı çalışmada over fonksiyonu açısından ya da overlerin makroskopik görünümü açısından anlamlı bir fark bulunamamış. İki grup arasındaki tek fark, laparaskopide hastanede kalma süresi daha az olarak bulunmuştur (67).

2.3. İskemi Reperfüzyon:

İskemi, kan akımının dokuya ya da organlara gitmesinin, pıhtı veya mekanik etkenlerle engellenmesine bağlı, dokunun oksijensiz kalması olarak tanımlanır (68,69). İskemiye bağlı olarak dokularda ATP sentezlenemez. Mevcut olan ATP kullanılır ve adenozine parçalanır. Adenozin hücre dışına çıkar, inozin ve hipoksantine parçalanır. Hipoksantin ise, ksantin oksidaz ile metabolize olur ve ksantin oluşur. Bu reaksiyonlar sonucunda, dokular için toksik olan serbest oksijen radikalleri oluşur.

Ayrıca ATP sentezlenemediği için Na-K pompaları durur ve hücre içi elektrolit dengeleri bozular. Sitoplazmik kalsiyum, normalde ATP bağımlı kalsiyum taşıyıcıları ile hücre içinde düşük yoğunlukta tutulur. Ancak ATP sentezi bozulduğundan hücre dışından hücre içine kalsiyum akışı başlar (70,71). Artan kalsiyum; fosfolipaz, proteaz, endonükleaz ve ATPazları aktifleştirir. Bu enzimler de sırası ile lipid, protein, nükleik asit ve ATPleri parçalayarak hücre ölümünü hızlandırır.

Reperfüzyon ise iskemi sonrası dokunun, tekrar kan akımını sağlamak amacı ile geliştirdiği mekanizmalar sonucu dokudaki oksijen miktarının artmasıdır. (68,72)

Reperfüzyon hasarının büyük bölümünden serbest oksijen radikalleri sorumlu tutulmaktadır. Bunun dışında, reperfüzyona bağlı, endotel hücreleri hasarlanır, kompleman sistemi aktifleşir ve polimorfonükleer lökositlerin göçü başlar. Reperfüzyon hasarının, iskemi hasarından daha fazla olduğu düşünülür (73,74).

İskemi, oksijen metabolitlerinin atılamayıp birikmesine yol açar. Reperfüzyon ile biriken bu metabolitler ve bunların yol açtığı reaksiyonlar ile oksijen radikallerinde hızlı bir artış olur. Bu artış, kontrolsüz oksidasyona yol açarak hücrenin savunma mekanizmalarını baskılar. Buna ek olarak inflamatuvar sitokin salınımını da tetikler ve mevcut hasarı artırır. Oksidasyona yol açan serbest radikaller temel olarak oksijen kaynaklı metabolitler (süperoksit anyonları O_2^- , hidrojen peroksit H_2O_2 , hidroksil radikali OH^-); hipoklorik asit; kloraminler; azot dioksit; ozon ve lipid peroksitlerdir.

2.3.1. Serbest radikaller:

Serbest radikaller, atom çekirdeklerinde, dış yörüngelerinde eşlenmemiş bir elektronu bulunan ileri derecede aktif molekül ya da molekül gruplarıdır (75). Pozitif yüklü, negatif yüklü veya yüksüz olabilirler. Çevrelerindeki nükleik asit, protein, lipid, karbonhidrat gibi moleküllerden elektron alarak dengeli hale gelirler ve zincirleme reaksiyonları başlatırlar (76). Asıl tehlikesi, hücre membrane, DNA gibi önemli hücrenel komponentlerle reaksiyona girerek hücrenin fonksiyon kaybına ya da ölümüne neden olurlar. Yaşam süreleri çok kısadır. Çok yüksek reaksiyon hızları vardır (77).

Başlıca iki tip serbest radikal mevcuttur. Bunlar serbest oksijen radikalleri ve serbest nitrojen radikalleridir. Biyolojik sistemde en önemli radikaller serbest oksijen radikalleridir (78).

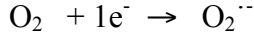
2.3.2. Serbest Oksijen Radikalleri:

Moleküler oksijene elektron transferi ile serbest oksijen radikalleri oluşur. Metabolik veya fizyolojik süreçlerde oluşur ve antioksidan sistemlerle uzaklaştırılan moleküllerdir. Antioksidan sistem ve serbest oksijen radikali üretimi arasında hassas bir denge vardır. Bu denge serbest oksijen radikalleri lehine bozulursa oksidatif stres meydana gelir ve birçok hastalığa neden olur (79,80).

Oksidan moleküller, elektron transport zinciri (ETS) ve ksantin oksidaz, glikolat ve monoamine oksidaz gibi oksidatif enzimler tarafından endojen üretilmediği gibi, ultraviyole ışınları, sigara, radyasyon, zehirli gazlar gibi eksojen olarak da alınabilir.

Bunların en önemlileri; süperoksit radikali, hidrojen peroksit radikali ve hidroksil radikali.

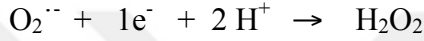
Oksijene 1 elektron transferiyle süperoksit radikali oluşur.



Süperoksit radikali kendisi direk olarak zarar vermez ancak hidrojen peroksit kaynağı olması nedeniyle önemlidir. Çok kısa yarı ömre sahiptir. Süperoksit dismutaz (SOD) enziminin katalizlediği dismutasyon reaksiyonu ile hidrojen peroksit döner. Bu fagositlerin bakterisit etkisinin temel mekanizmasıdır.



Süperoksit radikale bir elektron daha verilirse hidrojen peroksit oluşur.



Hidrojen peroksit, güçlü bir oksidandır, serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen ürünleri kapsamına girer. Çünkü hidrojen peroksit 1 elektron ilave edilirse en güçlü serbest radikal olan hidroksil radikali meydana gelir. Yarı ömrü çok kısadır.



Hidroksil radikali, en reaktif radikal olarak bilinir. Fagositoz ve çeşitli enzimatik katalizlerde üretilen, normal biyolojik reaksiyonlarda da kullanılan reaktif bir ajandır. Hidroksil radikalının meydana getirdiği en önemli biyolojik reaksiyon, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur (75,81).

2.3.2.1. Serbest Radikallerin Etkileri:

Serbest radikaller, birçok hastalığın patogeneğinde rol alır. Ancak fazla miktarda olmadığı sürece etkileri başlamaz (82). Metabolizmanın normal seyirindeki sürekli serbest radikal üretimine ek olarak radyasyon, havadaki, yiyecekteki zehirler, sigara gibi birçok oksidatif faktörün oluşturduğu aşırı miktardaki serbest radikaller, antioksidanlar tarafından nötralize edilemez ve denge oksidatif tarafa kayar. Buna oksidatif stres denir.

Serbest radikaller; lipid, protein, DNA, karbonhidrat, enzim gibi hücrelerin bütün önemli bileşiklerini etkileyerek hücrelerde fonksiyon bozukluğu yaparlar (75)

2.3.2.1.1. Serbest Radikallerin Lipidler Üzerine Etkileri

Serbest radikallerin en önemli etkisi, lipidler üzerine yaptığı etkidir ki buna lipid peroksidasyonu denir. Bu reaksiyonda serbest radikaller çoklu doymamış yağ asitlerine, membranlardaki kolesterol ve lipoproteinlere saldırır. Kontrolsüz lipid

peroksidasyonu hücre disfonksiyonuna neden olmaktadır. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen hasar geri dönüşümsüzdür (81). Hücre membranındaki lipit peroksidasyonu direkt etki ile hücre membran akışkanlığını, geçirgenliğini ve bütünlüğünü bozar, hücre içindeki organellerin hasarına yol açar. Serbest oksijen radikalleri poliansatüre yağ asidi moleküllerini okside ederek aldehitlerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Aldehitler uzun ömürlü oldukları için hücre hasarının yayılmasına yol açarlar. Bunlar içinde en iyi bilineni malondialdehit (MDA)'dir. MDA lipit peroksidasyonunun derecesiyle korelasyon göstermektedir (75,83).

2.3.2.1.2. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerine Etkileri

Proteinler serbest oksijen radikallerine maruz kaldıklarında aminoasit yan zincirlerinde modifikasyonlar oluşur ve protein yapısı bozulur, denature olur. Bu da fonksiyonel değişikliğe yol açarak hücre metabolizmasını bozmaktadır. Enzim veya reseptör fonksiyonuna sahip membran proteinlerinin oksidasyonu ile önemli hücresel ve membran fonksiyonları bozulmaktadır (75).

2.3.2.1.3. Serbest Radikallerin DNA Üzerine Etkileri

Oksijen radikalleri, oksidatif yarılma ile DNA hasarına yol açabilmektedir. Serbest radikallerin etkisi DNA mutasyonlarına ve hücre ölümlerine yol açmaktadır.

Hidroksil radikali, pürin ve pirimidin bazları ve deoksiribozlarla kolayca reaksiyona girerek, baz delesyonları ve zincir kırılmaları neden olabilmektedir. Hidrojen peroksit ise membranlardan kolayca geçerek hücre çekirdeğindeki DNA'ya ulaşır ve hücre ölümüne yol açabilir (75). Oksidatif DNA hasarları da denilen bu tip hasarlar mutageneze, kanserogeneze ve yaşlanmaya yol açmaktadır.

DNA hasarı, bizim de çalışmada kullandığımız ve ileride bahsedilecek olan comet assay olarak bilinen tek hücre elektroforez yöntemi ile ölçülebilir.

2.3.3. Antioksidan Sistemler

Vücutta oluşan serbest oksijen radikallerini metabolize eden, serbest oksijen radikali oluşumunu önleyen, temizlenmesini arttıran, oluşabilecek hasarı onaran veya önleyen savunma maddeleri vardır. Savunma yapan bu maddelere antioksidan madde denir. Ekzojen veya endojen kaynaklı olabilmektedir (75). Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz, glutatyon transferaz, mitokondriyal oksidaz sistemi gibi enzimatik veya bilirubin, albumin, ürik asit, α -tokoferol, seruloplazmin, transferin, ferritin, glutatyon gibi non enzimatik olabilir. Bunlar oksijen radikallerine karşı ilk savunma sistemidir (84,85). Ekzojen

olanlara ise; C vitamini, E vitamini, folik asit, N-asetilsistein, mannitol, adenozin, demir şelatörleri, sayılabilir (75,85).

Antioksidanlar işlevlerine göre primer, sekonder ve tersiyer olarak üçe ayrılır. Primer antioksidanlar (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, ferritin, seruloplazmin, haptoglobulin, metal bağlayıcı proteinler, hemopeksin), yeni serbest radikal oluşumunu önler. Sekonder antioksidanlar (vitamin-C, vitamin-E, ürik asit, bilirubin), zincir kırıcı reaksiyonlar sayesinde serbest radikalleri uzaklaştırırlar. Tersiyer antioksidanlar (DNA onarımı yapan enzimler) ise serbest radikaller tarafından hasar gören biyomolekülleri onarırlar (75).

2.3.3.1. Enzimatik Antioksidanlar

Süperoksit dismutaz (SOD): Hücre içinde mitokondride doğal olarak bulunur. SOD, süperoksit radikallerini daha az reaktif olan hidrojen peroksite çeviren bir metalloenzimdir. Lipit peroksidasyonunu inhibe etmektedir. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanan dokularda fazladır. Hücre dışı aktivitesi düşüktür(86).

Katalaz: Yapısında 4 tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. SOD enzimi faaliyeti sonucunda meydana gelen toksik hidrojen peroksit, katalaz enzimi ile su ve oksijene ayırmaktadır. Esas olarak peroksizomlarda bulunur. Daha az olarak sitozolde de bulunur. Bulunduğu hücreyi oksidatif strese karşı korumaktadır (87).

Glutatyon peroksidaz (GPx): Hücre sitozolünde bulunan bu enzim, hidrojen peroksit ve yağ asiti peroksitlerini inhibe eder. Fagositik hücrelerin ve eritrositlerin oksidatif strese karşı korunmasında rol alır (75). Kofaktör olarak selenyum kullanır.

Glutatyon redüktaz (GR): Glutatyon peroksidaz tarafından hidrojen peroksit ve diğer lipit peroksitlerin yükseltgenmesi sırasında oluşan okside glutatyonun tekrar indirgenmesini katalize eder.(75).

Mitokondriyal sitokrom oksidaz: Solunum zincirinin son enzimidir. Süperoksit radikalini suya çevirir.

2.3.3.2. Non-enzimatik Antioksidanlar

Vitamin E: Çok güçlü bir antioksidandır. Hücre membrane fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini serbest radikallerin etkisinden koruyan ilk savunma sistemidir.

Vitamin C: Lipit peroksidasyonunu başlatan radikallerin etkilerini yok ederek, lipitleri oksidasyona karşı korur. Süperoksit radikali ve hidroksil radikali ile reaksiyona girerek onları ortamdan yemizler. Fagositozda oksidatif parçalanma ürünlerinin zararlı etkilerini önler.

Vitamin A: Serbest radikalleri biyolojik hedeflerle etkileşime girmeden önce direkt olarak onları yakalayabilir ve aynı zamanda zincir kıran bir antioksidan olarak da etki ederek peroksit radikallerinin oluşumunu önler.

Bilirubin: Lipit peroksidasyonunda zincirleme gelişen reaksiyonu engeller. Yüksek serum düzeylerinde toksik bir bileşiktir.

Ürik Asit: Lipit peroksidasyonunu inhibe eder ve radikalleri temizler

Albümin: Albümin kuvvetli şekilde bakır ve zayıf olarak da demiri bağlar. Oluşan OH- radikali albumin tarafından temizlenir.

Seruloplazmin: Demir ve bakır bağımlı lipit peroksidasyonu inhibe eder. Daha az olarak süperoksit radikali ile reaksiyona da girer (75).

2.3.4. Total Antioksidan Seviye (TAS)

Total antioksidan seviyesinin ölçümü, antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli bilgi vermektedir. Antioksidanların tek tek ölçülmesi, zaman alıcı ve pahalıdır. Bu nedenle total antioksidan seviye (TAS) bakılması giderek yaygınlaşmaktadır. Bu yöntem Erel (88,89) tarafından geliştirilen tam otomatik bir yöntem olup, güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen bir metoddur. Çalışma prensibi; Fe²⁺-o-dianisidin kompleksi hidrojen peroksid ile Fenton tipi reaksiyona girer ve OH radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen türü indirgenir düşük pH'da renksiz o-dianisidin molekülüyle reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidil radikallerini oluşturur. Dianisidil radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak renk oluşumunu artırır. Ancak örneklerdeki antioksidanlar bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu durdurmaktadırlar. Bu reaksiyon otomatik analizörde spektrofotometrik olarak ölçülerek sonuç verilmektedir.

2.3.5. Total Oksidan Seviye (TOS)

Kimyasal reaksiyonlar sonucu oluşan serbest radikallerin ömrü oldukça kısadır. Bundan dolayı laboratuvar şartlarında ölçülmesi zordur.

TOS, total peroksid (TP), serum oksidan aktivitesi (SOA),

reaktif oksijen metabolitleri (ROM) eş anlamda kullanılan tanımlamalardır.

Erel (88) tarafından geliştirilen tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir. Numunede bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidin kompleksini ferrik iyona oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar

asidik ortamda “xylenol orange” ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti

spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equivalent/ L olarak ifade edilir.

2.3.6. Oksidatif Stres İndeksi

Oksidatif Stresin bir göstergesi olarak gösterilen Oksidatif Stres İndeksi (OSI), Total Oksidan Seviye (TOS) düzeylerinin Total Antioksidan Seviye (TAS) düzeylerine oranının yüzde derecesi olarak ifade edilir. (90,91)

$$\text{OSI} = \frac{\text{TOS, } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv. / L.}}{\text{TAS, mmol trolox Equiv. / L.}} \times 100$$

2.3.7. Comet Assay

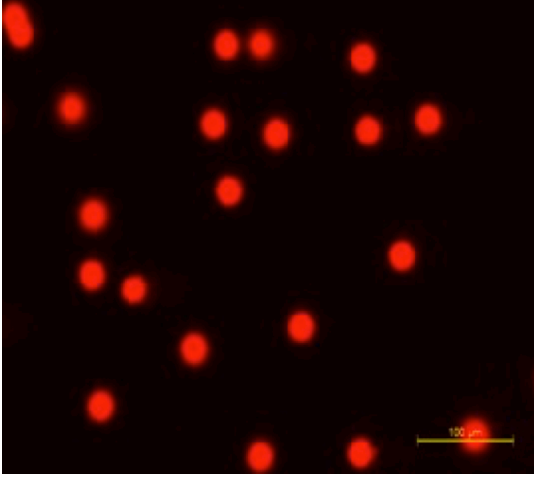
Hücre düzeyinde DNA hasarını saptamak ve miktarını belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. İlk olarak 1984 yılında Östling ve Johansson (92) tarafından temelleri oluşturulmuştur. Geliştirdikleri mikrojel elektroforez yönteminde nötr pH ortamında elektroforez uygulanmıştır. Ancak nötral koşullarda çift sarmal kırıkları tespit edilirken tek sarmal kırıkları tespit edilememiştir. 1988 yılında Singh ve arkadaşları elektroforezi kuvvetli alkali ortamda uygulayarak bu sorunu çözmüşlerdir ve günümüzde de uygulanan, tek ve çift sarmal kırıklarının tamamının tanımlanmasına olanak sağlayan metodolojiyi geliştirmişlerdir.

Tek hücreli jel elektroforezi de denilen comet assay yöntemi; kimyasal ve fiziksel etmenlerin canlılar üzerinde yol açtığı genotoksik ve sitotoksik etkilerin bir göstergesi olan DNA hasar seviyesinin ölçülmesini sağlayan floresan mikroskopik yöntemdir. Uygulaması kolay, non-invaziv, hızlı ve hassas olması bakımından son yıllarda yaygın olarak kullanılır. Bir diğer önemli özelliği ise radyoaktif işaretleme gerektirmemesidir.

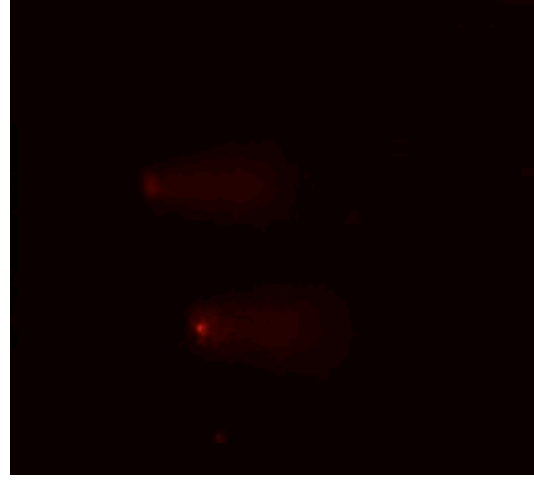
Genel olarak, canlı dokulardan izole edilen çekirdek içindeki DNA, ince bir agaroz jel içine fikse edilir ve elektroforetik ortamda yürütülür. Mikroskop lamı üzerindeki agaroz jel içine gömülen hücreler, zarların parçalanıp çekirdekte bulunan

süperkoil DNA'nın serbestleşmesi için lizis işlemine tabi tutulur. Alkali ortamda süperkoil yapının gevşeyerek açılması ve kırıklar ortaya çıktıktan sonra elektroforez uygulanır. Eğer çeşitli genotoksik ajanlarla hasarlanan DNA'lar tamir mekanizmaları ile tamir edilememiş, tek veya çift DNA zincirlerinde kırılmalar oluşmuş ise kırılan farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip kırılmış DNA molekülleri elektroforetik ortamda farklı hızlarda göç ederler. DNA molekülleri ethidium bromid gibi DNA spesifik boyalarla

Resim 2: Comet assay de normal DNA



Resim 3: Comet assay de DNA hasarı



boyanıp floresan mikroskop altında incelendiğinde hasarın derecesine göre DNA'lar dairesel formdan kuyruklu yıldız benzer forma kadar çeşitli derecelerde görüntüler oluşturduklarından yöntem İngilizce "kuyruklu yıldız" anlamına gelen "Comet Assay" adı verilmiştir. Lizisten sonra serbestleşen DNA ışığa duyarlı olduğundan ilave kırıklar oluşmaması için işlemler karanlık odada yapılmalıdır ve çalışma boyunca aynı kişi tarafından yapılmalıdır (93,94).

DNA hasarının belirlenmesi ya görsel analize göre ya da bilgisayarlı görüntü analizine göre yapılır. Görsel değerlendirmeye göre cometler DNA göç uzunluğuna göre 5 kategoride toplanır. Sadece baş varsa kuyruk yoksa 0, çok küçük baş ve uzun dağınık kuyruk 4. kategoridedir. Çok az hasarlanmış DNA lar 1, az hasarlı DNA lar 2, hasarlı DNA lar 3. kategoridedir. Her lamdan 100 comet seçilir ve kategorisine göre numaralandırılarak DNA hasarı belirlenir. Bilgisayarlı görüntüleme ise kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti gibi çeşitli parametreler kullanılarak DNA hasarı hesaplanır. Kuyruk uzunluğu piksel cinsinden kuyruğun sonu ile kafanın tam uzayan kısmı arasındaki mesafedir. Comet uzunluğu ise piksel cinsinden kuyruğun sonu ile kafanın tam kenarı arasındaki kısımdır. Head intensity (baş yoğunluğu) kafadaki ortalama renk dağılımı iken, tail intensity (kuyruk yoğunluğu) kuyruktaki ortalama renk dağılımıdır. Kuyruktaki DNA yüzdesi ile kuyruk uzunluğunun çarpılması ile tail moment (kuyruk momenti) bulunur (95).

2.3.8. Apoptozis

Organizma sürekli bir denge halindedir. Yeni hücreler sentez edilirken, varolan hücrelerin bir kısmı hücre ölümü ile ortadan kaldırılmakta ve böylece denge korunmaktadır.

Hücre ölümünün iki tipi vardır, bunlar apoptozis ve nekrozdur (96,97). Her ikisinde de düzenli olarak birbirini izleyen biyokimyasal ve morfolojik olaylar sonucu hücre ölümü meydana gelir (98). Hücre çoğalması mitoz ile olurken, belirli bir dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptoz ile belirlenmektedir (92,99). Yani apoptozis ve mitozis dokuda sürekli bir denge halindedir (100).

Apoptozis, yunanca yaprak dökümü anlamına gelir. Biyolojik görevini tamamlamış veya hasara uğramış hücrelerin, zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür (101,102)

İlk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie adındaki patologlar tarafından kullanılmıştır. 1983 yılında Duke ve arkadaşları, jel elektroforezi ile apoptozda endonükleazların aktif hale gelerek DNA kırıklarına neden olduğunu göstermiştir. Böylece apoptik hücre ölümünün ilk biyokimyasal kanıtı elde edilmiştir (103,104).

Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre olumu apoptozis ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir. Apoptozis genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla regüle edilir. Nekrozda hücre şişer, mitokondri genişler, organeller çözünür, plazma membranı yırtılır. Sitoplazma materyali hücre dışına geçerek inflamasyona neden olur. Apoptozis sırasında ise plazma membranı yırtılmaz. Apoptozisin gerçekleşebilmesi için yüksek adenozin trifosfat (ATP) seviyelerine ihtiyaç vardır. Hücre içi ATP seviyesi hücrenin apoptozis veya nekroz ile öleceğine yön verir. Bu da mitokondrinin önemini apoptozisin erken fazında göstermektedir. Eğer hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir. Apoptozis, hücre intihar şeklidir ve hücre kendi kendisini aktif olarak yok eder. Bu olay nükleer büzülme ve DNA fragmantasyonu ile karakterizedir (105).

Apoptozis özellikle doku homeostatisi ve istenmeyen etkilere karşı doku bütünlüğünün sağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Çok hücrelilerde bir hücre diğerlerini olumsuz yönde etkiliyorsa bu hücrenin tahrip edilmesi gerekir. Ayrıca bir hücre komşu hücrelerden uygun sinyali alamıyorsa yine yok olur. DNA hasarının oluşması durumunda hasarın meydana geldiği hücre, apoptozise yönlendirilerek ortadan kaldırılmaktadır. Bu şekilde DNA yapısında zararlı mutasyonları bulunduran hücrelerin, kanserleşme potansiyeli ortadan kaldırılmış olur (104).

2.3.8.1. Apoptotik Markerlar

Kaspazlar, başlatıcı ve efektör kaspazlar olarak ikiye ayrılır. Sistein proteazlar olarak da adlandırılırlar, hücrede sitozolde lokalize olmuşlardır. Temel görevleri DNA polimeraz enzim aktivitesini önleyip hücrenin apoptozise uğrayarak yok olmasını sağlamaktır. Herhangi bir patolojik durumda hücre içerisinde gelen uyarılara bağlı olarak kaspazlar (kaspaz-8, kaspaz-9) aktif hale gelir, kaspaz aktivasyonuna bağlı olarak apoptozis aktive edici faktör-1 (apaf-1) aktifleşir ve mitokondriden sitokrom c serbest hale gelir. Sonrasında ise apaf-1, sitokrom c, kaspaz-9 birleşerek apoptozom oluşturur ve bu oluşuma bağlı olarak da kaspaz-3 aktif hale gelerek hücrenin apoptozise uğrayarak yok edilmesi gerçekleşir. (106,107).

Bcl-2, mitokondri zarı üzerinde lokalize olmuştur. Mitokondri porlarının geçirgenliğinin kontrolünü yapar. Antiapoptotik bir etkiye sahiptir ve apoptozisin baskılanmasında rol alır.

Bax proteini, proapoptotik bir proteindir. Mitokondri üzerinde yer alır ve apoptozisin gerçekleşmesinde önemli bir rolü vardır (108).

2.3.9. Western Blot

Western blotlama ya da immunoblotlama denilen yöntem, bir protein karışımı içindeki belirli bir proteini ve büyüklüğünü saptamak için kullanılan nicel bir yöntemdir. Bu metot istenilen bir protein karşı yönlendirilen yüksek kalitede bir antikor kullanımına bağlıdır. Bu antikor prob olarak kullanılarak ilgili protein bir karışımın içinden saptanabilir. Western blot hücrede ne kadar protein biriktiğini gösterir. Bu metot yardımıyla apoptoza özgü bcl-2 gibi bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının saptanması mümkündür (109).

2.3.10. Diazoksid

Diazoksid bir benzotiyadiazin derivesidir. Selektif potasyum bağımlı ATP kanal aktivatörü ve kalsiyum kanal blokörü olarak etki eder. Özellikle mitokondriyal potasyum bağımlı ATP kanalları üzerine yüksek afinitesi vardır. Ekstrasellüler boşlukta kalsiyum yüklenmesini azaltır. Ama asıl etkisini mitokondriyal hemostazı düzenleyerek gösterdiği düşünülür (110).

Yapılan çalışmalarda diazoksidin antioksidan ve antiapoptotik etkileri olduğu gösterilmiş (111-113). Örneğin, Wang ve arkadaşlarının serebral iskemi reperfüzyon hasarında diazoksidin etkisini araştırdığı çalışmada, diazoksidin reaktif oksijen metabolitlerini ve DNA' daki oksidatif hasarı azaltarak antioksidan etkisi olduğunu göstermiş (111). Aynı

şekilde; Roseborough ve arkadaşlarının yaptığı spinal korddaki iskemi reperfüzyon hasarına diazoksidin etkisini araştırdığı hayvan çalışmasında, diazoksidin antioksidan etkisi gösterilmiş (112). Ayrıca, Teshima ve arkadaşlarının çalışmasında, diazoksidin oksidatif stres ile indüklenen apoptotik yolları inhibe ederek nöroprotektif etki gösterdiği bulunmuş (113).

Domoki ve arkadaşlarının yaptığı bir domuz çalışmasında ise serebral iskemi sonrası, diazoksidin nöroprotektif etkisinin arteriolar vazodilatasyona bağlı olduğu düşünülmüş (114).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu' nun 19.12.2013 tarih ve 2013/274 sayılı onayı alındıktan sonra yapılmıştır.

Çalışmada 35 adet, 200-260 gr ağırlığında, reproduktif dönemde, Bezmialem Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda üretilen, dişi Wistar Albino sıçan (rat) kullanılmıştır. En az 7 gün, 12 saatlik ışık döngüsü, uygun sıcaklık ve nem koşulları altında, yeterli sıvı ve besin sağlanarak standardize edilmiş ve %90 power ve %95 güven düzeyi için n=5 olacak şekilde rasgele 7 eşit gruba ayrılmıştır. Stres yaratılmadan, sert ve ani hareketlerden kaçınılarak çalışılmıştır.

Çalışmadaki amacımız, deneysel torsiyon sonrası, diazoksidin iskemi reperfüzyon hasarını azaltıp azaltmadığını saptamaktır. 7 gruptan ilkinde sadece laparotomi yapılarak batın kapatıldı. 2. grupta 3 saat iskemi yapıldı. 3. grupta 3 saat iskemi sonrası 3 saat reperfüzyon yapılırken 4. grupta 3 saat iskemi reperfüzyon sonrası diazoksid verildi. 5. grup 3 saat iskemi sonrası 24 saat reperfüze edilen grup iken 6. grup ise 24 saat reperfüzyon sonrası diazoksid verdiğimiz gruptu. 7. grup da standardizasyonu sağlamak amacı ile DMSO vererek batını kapattığımız gruptu.

Çalışmamızda Santa Cruz tarafından üretilen cam şişede toz halinde 1gr diazoksid içeren etken madde kullanılmıştır. Ratlara verilmeye uygun hale getirmek için serum fizyolojik ile eritilemediğinden 0,1 ml dimetil sülfoksid (DMSO) kullanılmıştır.

Deneyler, Bezmialem Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, Biyokimyasal çalışmalar , Bezmialem Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında yapılmıştır.

3.1. Cerrahi İşlemler

Ratlar, her bir grupta 5 denek olacak şekilde randomize edilerek 7 grup oluşturuldu. Her gruba Ketamine 40mg/kg (Ketalar® Flakon 50 mg/ml Pfizer) ve Xylazine 10 mg/kg (Rompun®) ile sedasyon yapıldı. Bütün ratlara anestezi altında ve dorsal pozisyonda insizyon saha temizliği uygulandı. 3 cm'lik orta hat kesisi yapılarak laparotomi ile batına girildi. Her iki over vizualize edildi. Torsiyon gruplarında her iki over saat yönünde 7200 döndürülerek 5/0 vicryl ile batın ön duvarına sabitlendi. Reperfüzyon gruplarında bu sütur alınıp overler detorsiyone edildi. Batın 3/0 ipek ve cilt 2/0 ipek sütur ile kapatıldı.

3.2. Deney Grupları

Grup 1 (S): Bu grupta yani sham grubunda laparotomi sonrası, her iki over izlendikten sonra ek bir işlem yapılmadan batın kapatıldı. 3 saat beklendikten sonra tekrar laparotomi ile bilateral ooforektomi yapıldı.

Grup 2 (İ): İskemi grubunda bilateral overler torsiyon yapılarak batın kapatıldı. 3 saat iskemi sonrası tekrar laparotomi yapılarak bilateral ooforektomi yapıldı. 2. laparatomiden yarım saat önce intraperitoneal olarak 0.1 ml DMSO verildi.

Grup 3 (İ/R3): Bu grupta 3 saat iskemi sonrası overler detorsiyone edilerek 3 saat reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyondan yarım saat önce 0.1 ml DMSO verildi.

Grup 4 (İ/R3+D): Bu grupta ise 3. gruptan farklı olarak diazoksid verildi. 3 saat iskemi sonrası 3 saat reperfüzyon yapıldı. Reperfüzyondan yarım saat önce 40mg/kg diazoksid 0.1 ml DMSO ile çözündürülerek intraperitoneal olarak verildi.

Grup 5 (İ/R24): 5. grupta 3 saat iskemi sonrası 24 saat reperfüzyon sağlandı. Detorsiyondan yarım saat önce 0.1 ml DMSO intraperitoneal olarak verildi.

Grup 6 (İ/R24+D): Bu grupta da 3 saat iskemi takiben 24 saat reperfüzyon sağlandı. Detorsiyondan yarım saat önce 40 mg/kg diazoksid 0.1 ml DMSO ile çözündürülerek intraperitoneal olarak verildi.

Grup 7 (DMSO): 7. grupta ise batın açılıp hiç bir ek işlem yapılmadan batın kapatıldı. Standardizasyonu sağlamak için, diğer gruplarda diazoksid DMSO ile

Resim 4: Sıçan overinin torsiyone edilerek batın ön duvarına sabitlenmesi



çözündüğünden, 2. laparatomiden yarım saat önce 0.1 ml DMSO intraperitoneal olarak verildi.

3.3. Deneyin sonlandırılması

Tüm gruplarda overler alındıktan hemen sonra serumda çalışılacak olan biyokimyasal analizler için de intrakardiyak kan örneği alındı. Sonrasında tüm ratlara anestezi altında dekapitasyon ile ötenazi uygulandı.

Alınan kan örnekleri +4 °C'de 10 dakika 3000 rpm devirde santrifüjlenerek (Eppendorf, 5804 R) serumlar elde edildi. Deney sonunda, alınan dokuların bir kısmı ve serum örnekleri biyokimyasal analizler yapıncaya kadar -80°C'de saklandı.

Resim 5: 3 saatlik iskemi sonrası overin görünümü



3.4. Örneklerin Hazırlanması ve Ölçümler

Araştırmaya dâhil edilen ratlardan lenfosit DNA hasar seviyesinin ölçümü için heparinli tüpe venöz kan alındı. Hemen biyokimya laboratuvarına ulaştırılarak çalışması sağlandı.

Oksidatif stres parametreleri için plazma kullanıldı. Venöz kan örnekleri en kısa zamanda biyokimya laboratuvarında bulunan NÜVE NF1200R marka santrifüj cihazında 3000 devir/dakika hızda 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Serumlar -80°C derin

Resim 6: 24 saat reperfüzyon sonrası overin görünümü



dondurucuda depolanarak muhafaza edildi. Ölçümlerin yapılacağı zaman tüm serum örnekleri oda ısısına getirildikten sonra çalışıldı.

Dokulardan oksidatif stres parametrelerinin çalışılması için dokulara ağırlıklarının 10 katı kadar izotonik 0,15M'lık KCl eklenerek homojenize edildi. 14000 devirde 20 dakika +4 °C de santrifüj edildi. Süpernatanttan bradford yöntemiyle proteinlerine bakıldı. Kalan süpernatant da -80 °C de depo edildi. Ölçümlerin yapılacağı zaman tüm serum örnekleri oda ısısına getirildikten sonra çalışıldı. Çıkan sonuçlar dokuların ağırlıklarına bölünerek gr protein başına sonuç verildi.

3.4.1. Mononükleer Lökositlerin Seperasyonu

Bir ml histopaque -1077 üzerine bir ml taze heparinize kan yavaşça ilave edilip 2100 rpm ve 25 °C'de 30 dakika santrifüj edildi. Orta tabakada biriken mononükleer lökositler pipet yardımıyla alınıp bir ml tuzlu fosfat tamponu (Ph: 7.4) ile karıştırıldıktan sonra 1600 rpm ve 25 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki süpernatant atılıp pellet tuzlu fosfat tamponu ile 10^6 mononükleer lökosit / μ l olacak şekilde dilüe edildi

3.4.2. Comet Assay (Alkali mononükleer tek hücre elektroforezi) Yöntemi ile DNA Hasar Tayini

Comet assay yöntemi, alkali Ph'da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüke sahip DNA moleküllerinin, elektriksel alanda farklı hızda göç etmeleri esasına dayanmaktadır. Tek hücreler veya çekirdekçikler agar jel içine yerleştirilir ve lizisten sonra açığa çıkan DNA moleküllerinde herhangi bir hasar oluşmamış ise göç esnasında tek moleküle ve yüke sahip olduklarından elektroforetik göç esnasında birlikte hareket edeceklerinden comet (kuyruk) oluşturmazlar. Eğer hasara uğramış, kırılmış DNA varsa farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüklerine sahip olacaklarından elektriksel alanda farklı hızlarda hareket ederek kuyruk şeklinde bir görüntü oluştururlar.

3.4.2.1. Yöntemin Uygulanışı:

A. Slaytların Hazırlanması: %1.0'lik normal erime noktasına (NMP) sahip agaroz jel hazırlanarak pipetle 55°C sıcaklıkta 120µl kadar alınıp, kenarları kumlanmış lam üzerine damlatıldı ve üzeri hemen lamel ile kapatılarak buzdolabında (2-4°C) 5 dakika bekletildikten sonra lamelleri kaldırıldı. Hazırlanan normal erime noktasına sahip jel kaplı lamalar nemli kutularda bekletildi. Kaplı lamalar üzerine PBS (Fosfat buffered saline) ile mm³'te 10⁴ hücre olacak şekilde dilüe edilmiş mononükleer hücrelerden 10µl alınarak 85µl %0.7'lik düşük erime noktasına (LMP) sahip agaroz jel (37°C) ile karıştırılarak tabakalandırıldı ve tekrar lamel ile kapatılarak buzdolabında 5 dakika bekletildi. Üçüncü aşamada da aynı konsantrasyonda düşük erime noktasına sahip agaroz jel hazırlanarak ikinci tabakanın üzerine ince bir tabaka halinde tabakalandırılarak slaytların hazırlanması sağlandı.

B. Lizis Aşaması: Agaroz jel donduktan sonra slaytlar yaklaşık bir saat süre ile yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içeren (100Mm EDTA, 2.5M NACI, 10Mm trizma baz, %1 triton X-100, Ph10) soğuk lizis solüsyonunda bekletilerek hücre ve çekirdek zarı lizise uğratıldı.

C. Elektroforez Tamponu: Elektroforezde yürütmeden önce, DNA zincirlerinin ayrılması için slaytlar, alkali elektroforez tamponunda (1mM EDTA ve 300Mm sodyum hidroksit (pH<13) 40 dakika inkübasyona bırakıldı.

D. Elektroforezde Yürütme: Alkali elektroforez tamponunda inkübasyon tamamlandıktan sonra DNA'lar bu tampon çözeltisi içerisinde 300Ma, elektriksel alanda ve 4°C'de 20 dakika yürütüldü.

E. Nötralizasyon: Elektroferez yürütme işlemi tamamlandıktan sonra alkali tampon çözeltisini ortamdaki uzaklaştırmak için slaytlar 3 dakika süre ile 2 kez PBS (Fosfat buffered saline) ile, 1 kez distile su ile yıkandı. Slaytların kurumması için beklendi.

F. Boyama: Nötralizasyon tamamlandıktan sonra floresan DNA boyası olan etidyum bromit ile (5µg/ml) her bir slayt için 80µl boya kullanılarak boyandı. Lamların üzeri lamel ile kapatılarak 20 büyütme floresan mikroskop ile (Eksitasyon DB: 546 nm, Emisyon DB: 580 nm) değerlendirildi.

G. Analiz: Bu yöntemde DNA migrasyonu COMET Assay IV programıyla değerlendirildi.

3.4.3. Total Antioksidan Seviye (TAS)

Serbest oksijen radikallerine karşı vücudun toplam antioksidan kapasitesini ölçen bir metoddur (88,89).

Reaktif 1: 75 mM Clark tamponu (pH: 1.8) içerisinde, 10mM o-Dianisidine ve 45µmol (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O çözülerek hazırlandı.

Reaktif 2: 7.5mM hidrojen peroksit, 75 mM Clark tamponu (pH: 1.8) içerisinde karıştırılarak hazırlanır.

Prensip: Fe²⁺-o-dianisidine kompleksi, hidrojen peroksit ile Fenton tipi reaksiyon oluşturarak OH•radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen türü indirgenerek düşük pH'da, renksiz o-dianisidine molekülü ile reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidyl radikallerini oluştururlar. Dianisidyl radikalleri, ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak renk oluşumu artmaktadır. Ancak örneklerdeki antioksidanlar bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu durdurmaktadırlar. Bu reaksiyon otomatik analizörde spektrofotometrik olarak ölçülerek sonuç verilmektedir. Birim: µmol Trolox Eqv./L

3.4.4. Total Oksidan Seviye (TOS):

Erel tarafından geliştirilen tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir (88,89).

Reaktif 1: 140 mM'lık NaCl çözeltisi içerisinde, 25 mM H₂SO₄ çözülerek ana solüsyon hazırlanır. Ana solüsyonda önce %10 oranında gliserol çözülüp daha sonra total volümde 250µM Xlenol orange çözülerek hazırlanır.

Reaktif 2: Ana solüsyon içerisinde, önce 10mM o-Dianisidine dihidrochloride çözülüp sonra 5 mM amonyum ferröz sülfat çözülerek reaktif hazırlanır.

Prensip: Örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon -o-dianisidine kompleksini ferik iyonla oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol, bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına

çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda xylenele orange ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Birim; $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{Eqv./L}$ (115).

3.4.5. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ):

Toplam Oksidan Seviye (TOS) / Toplam Antioksidan Seviye (TAS)*10 şeklinde bölünerek, Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) hesaplandı (88).

3.4.6. Western Blot Yöntemi

Western blot için ratlardan alınan over dokuları $-80\text{ }^\circ\text{C}$ buzdolabında muhafaza edildi. Dokuların homojenizasyonu yapıldıktan sonra Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ile proteinlerin elektrofrez tamamlandı. Elektrofrez işlemini takiben aşağıdaki dört aşama gerçekleştirildi.

Jeldeki proteinlerin polivinylidene difluoride (PVDF) membrana (Life, Inc., USA) aktarımı (blotlama):

SDS-PAGE tamamlandıktan sonra poliakrilamid jel blotlanmak üzere alındı. PVDF membrana transferin gerçekleşmesi için poliakrilamid jel ile PVDF membran yüzeyleri arasında boşluk kalmayacak biçimde karşı karşıya getirildi. Anot ve katot arasına konularak elektriksel alanda geçişler sağlandı. Bu şekilde proteinlerin transferi sağlanmış oldu.

Spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için PVDF membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama):

Blotlama işlemi bittikten sonra petri kutularına alınan PVDF membranlar tampon solüsyonla [$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,025 M), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0,075 M), NaCl (1,45 M)], çalkalayıcı üzerinde 3 kez 5 dakika olacak şekilde yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmalar, 100 mM NaCl, 20 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4 (pH: 7,2) tamponunda % 5 'lik yağsız süt tozu ile $37\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 60 dakikalık inkübasyonla bloklandı.

Özgül antikolarla tepkime: Primer antikor olarak Bax, Bcl-2, Caspase 3 antikoları kullanıldı. Primer antikolar % 0,05 oranında Tween-20 bulunan tamponda 1:1000 oranında hazırlanarak kullanıldı. PVDF membranlar Bax, Bcl-2 ve Caspase 3 antikoları ile $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Daha sonraki safhada PVDF membranlar 5 kez 5 dakika tampon solüsyonuyla yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra nitroselüloz membranlar % 0,05 oranında Tween-20 bulunan tamponda 1:1000 oranında hazırlanan, peroksidazla konjuge edilmiş goat-anti-rabbit immünoglobulinle $37\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 60 dakika süreyle inkübasyona

bırakıldı. Sonraki aşamada nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika tampon solüsyonuyla yıkandı.

Bantların görüntülenmesi: Bantların görüntülenmesi için chemiluminesans solüsyonları kullanıldı (Immunoruz sc 2048 Santa Cruz). Membran muamele edilen solüsyonlar sayesinde görüntüleme kabini kullanılarak bantlar görüntüledi. Bantların rölatif yoğunlukları Image Analyses System (Image J; National Institute of Health, Bethesda, USA) yazılım programı kullanılarak analiz edildi.

3.5. İstatiksel analiz

Verilerin değerlendirilmesi SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, United States) for Windows 22.0 paket programı ile yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler ortalama \pm standart sapma olarak gösterildi.

Gruplardaki parametrelerde standart sapma/ortalama oranı, bazılarında daha yüksek izlense de genel olarak %20 civarında bulunmuştur. Yapılan Koglomorov-Smirnov normallik testinde verilerin normal dağılıma uygun olduğu izlendi. Homojenlik testleriyle değerlendirildiğinde, gruplar genel olarak homojen bulunmuştur. Bu nedenle, verileri parametrik olarak değerlendirip, gruplar arasında ortalamalar yönünden farkın önemliliği ANOVA (analysis of variance) ile karşılaştırıldı. Tek Yönlü Varyans Analizi sonucunun anlamlı bulunduğu durumlarda posthoc Tuckey HSD çoklu karşılaştırma testi kullanılarak gruplar arası farklar değerlendirildi. $p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya alınan 7 grupta comet assay yöntemi ile ölçülen ve DNA hasarını gösteren tail intensity (kuyruk yoğunluğu) ve tail moment (kuyruk momenti) Tablo 1’de gösterilmiştir.

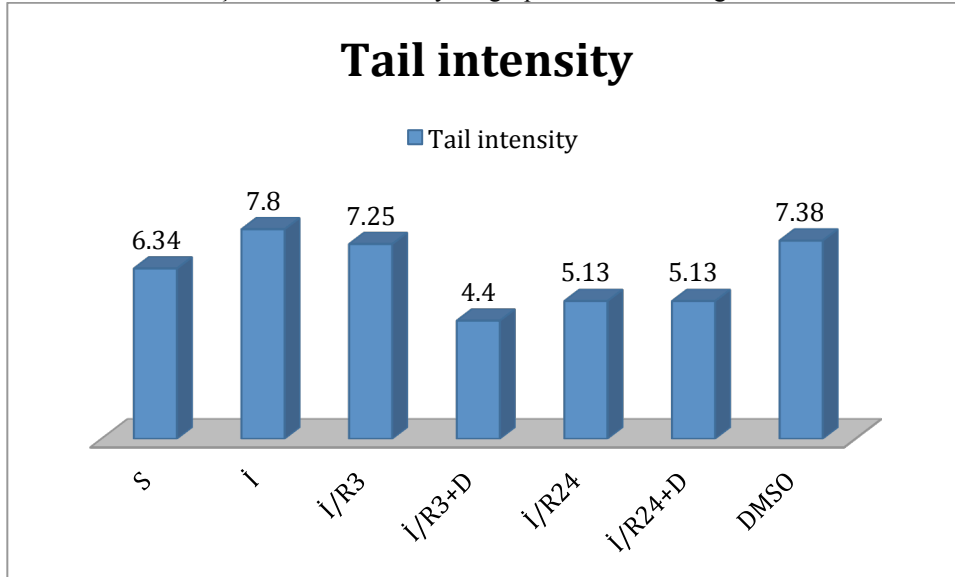
Tablo 1: Deneysel gruplarında Comet Assay yöntemi ile gösterilen DNA hasarı

	Grup 1 (S)	Grup 2 (İ)	Grup 3 (İ/R3)	Grup 4 (İ/R3+D)	Grup 5 (İ/R24)	Grup 6 (İ/R24+D)	Grup 7 (DMSO)	P
Tail intensity	6.34 ± 1.14	7.80 ± 1.59	7.25 ± 2.42	4.40 ± 2.20	5.13 ± 0.53	5.13 ± 1.59	7.38 ± 1.56	0.018
Tail moment	10.28 ± 4.78	19.51 ± 10.84	14.94 ± 7.66	8.65 ± 6.77	9.25 ± 4.78	9.18 ± 7.04	19.79 ± 11.78	0.119

Comet assay yöntemi ile DNA hasarı göstermede yapılan varyans analizinde, tail intensity için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p=0.018). Gruplar arasında tail moment için istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır.

Anlamlı bulunan tail intensity, gruplar arası farkı göstermek için posthoc tuckey testi ile değerlendirildiğinde; İ/R3+D grubu ile (4, 40 ± 2,20), İ grubuna (7,80 ± 1,59) göre anlamlı şekilde azaldığı bulundu (p<0,05). Diğer gruplar arasında anlamlı fark izlenmemiştir.

Şekil 1: Tail intensitynin gruplar arasındaki dağılımı



Oksidatif stresi gösteren doku TAS (total antioksidan seviye), doku TOS (total oksidan seviye), doku OSİ (oksidatif stres indeksi), doku katalazın ortalama, standart sapma değerleri Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2: Deney gruplarında dokudaki oksidatif stres parametreleri

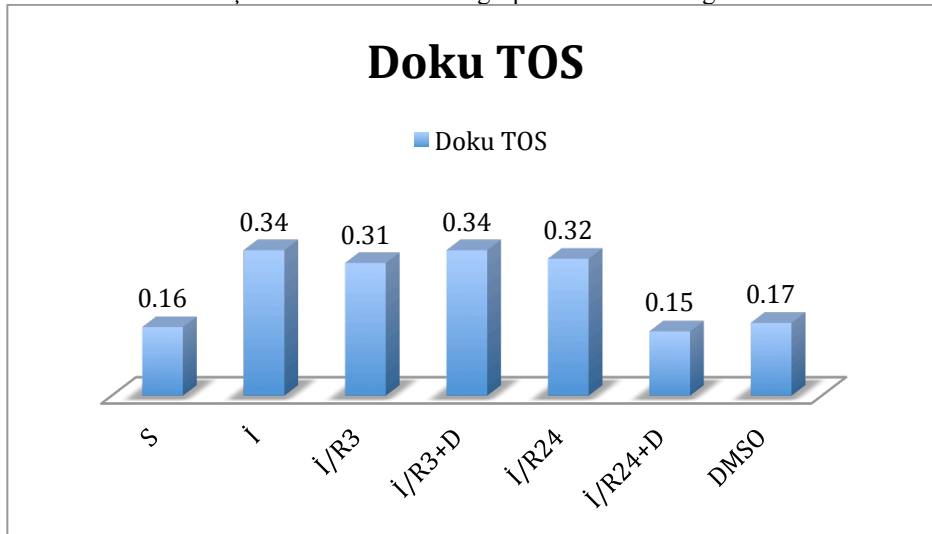
	Grup 1 (S)	Grup 2 (İ)	Grup 3 (İ/R3)	Grup 4 (İ/R3+D)	Grup 5 (İ/R24)	Grup 6 (İ/R24+D)	Grup 7 (DMSO)	P
Doku TAS	0.08 ± 0.03	0.07 ± 0.03	0.07 ± 0.03	0.06 ± 0.04	0.10 ± 0.03	0.07 ± 0.02	0.10 ± 0.03	0.435
Doku TOS	0.16 ± 0.05	0.34 ± 0.06	0.31 ± 0.15	0.34 ± 0.06	0.32 ± 0.15	0.15 ± 0.05	0.17 ± 0.05	0.002
Doku OSİ	2.06 ± 0.53	6.11 ± 2.61	6.18 ± 4.32	6.53 ± 2.51	3.83 ± 2.84	2.02 ± 0.37	1.76 ± 0.26	0.004
Doku Katalaz	0.55 ± 0.20	0.56 ± 0.22	0.56 ± 0.20	0.57 ± 0.27	0.73 ± 0.18	0.54 ± 0.15	0.64 ± 0.21	0.761

Oksidatif stres doku parametreleri arasında yapılan varyans analizinde gruplar arasında, doku TOS, doku OSİ için anlamlı fark bulunmuştur. Doku TAS ve doku katalaz için gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır.

Anlamlı bulunan doku TOS ve doku OSİ için gruplar arası farkı araştırmak için posthoc tuckey testi kullanıldı.

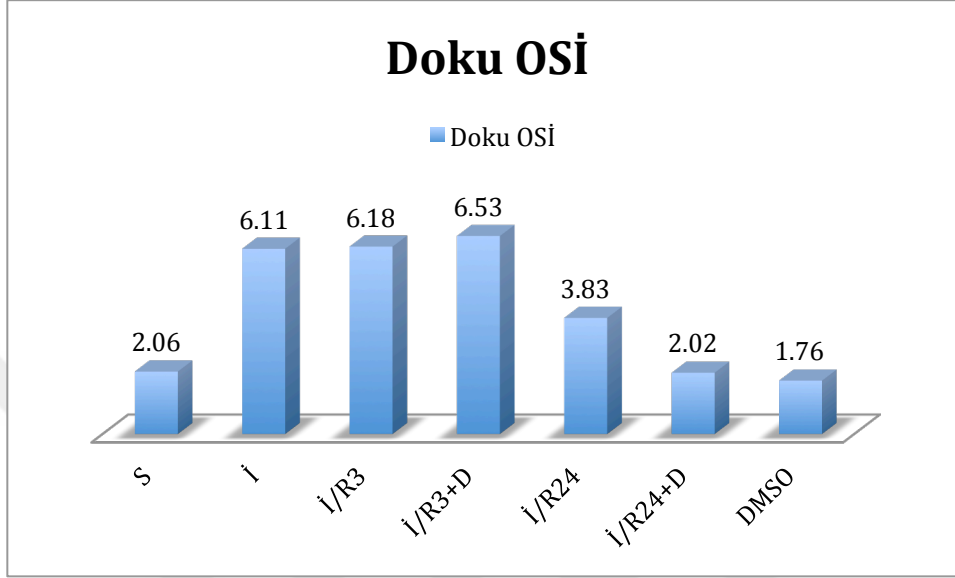
Yapılan tuckey analizine göre; İ grubu ($0,34 \pm 0,06$) ve İ/R24+D grubu ($0,15 \pm 0,05$) arasında ve İ/R3 +D grubu ($0,34 \pm 0,06$) ile İ/R24+D grubu ($0,15 \pm 0,05$) arasında , doku TOS için anlamlı derecede fark bulundu ($p<0,05$).

Şekil 2: Doku TOS’un gruplar arasındaki dağılımı



Doku OSİ için ise, İ/R3 +D grubu ($6,53 \pm 2,51$) ile DMSO grubu ($1,76 \pm 0,26$) arasında anlamlı derecede farklı bulunmuştur ($p < 0,05$). Diğer gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır.

Şekil 3: Doku OSİ'nin gruplar arasındaki dağılımı



Oksidatif stresi gösteren plazma TAS, plazma TOS, plazma OSİ nin ortalama, standart sapma değerleri ise Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3: Deney gruplarında plazmadaki oksidatif stres parametreleri

	Grup 1 (S)	Grup 2 (İ)	Grup 3 (İ/R3)	Grup 4 (İ/R3+D)	Grup 5 (İ/R24)	Grup 6 (İ/R24+D)	Grup 7 (DMSO)	P
Plazma TAS	2.54 ± 0.25	2.41 ± 0.20	2.33 ± 0.23	2.40 ± 0.30	2.31 ± 0.23	2.36 ± 0.27	2.38 ± 0.24	0.826
Plazma TOS	0.73 ± 0.86	2.48 ± 3.62	5.28 ± 2.55	0.70 ± 0.79	5.67 ± 2.00	4.97 ± 0.44	1.07 ± 1.78	0.000
Plazma OSİ	0.31 ± 0.41	0.98 ± 1.35	2.31 ± 1.13	0.31 ± 0.39	2.50 ± 1.08	2.14 ± 0.40	0.42 ± 0.70	0.000

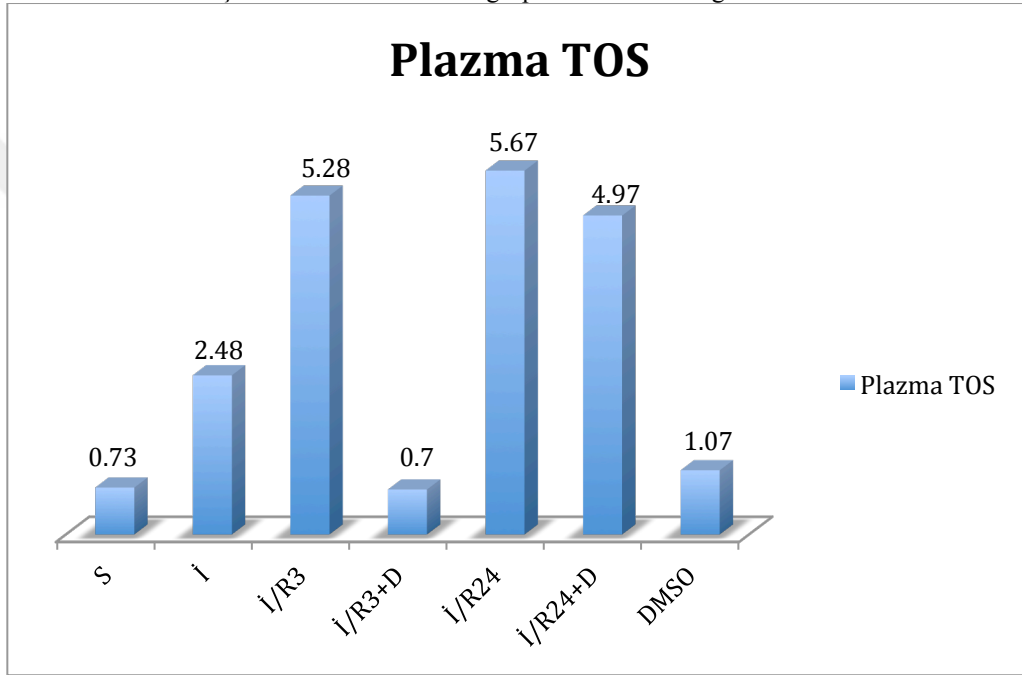
Oksidatif stres plazma parametreleri arasında yapılan varyans analizinde gruplar arasında, plazma TOS ve plazma OSİ için anlamlı fark bulunmuştur. Plazma TAS için gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır.

Anlamlı bulunan plazma TOS ve plazma OSİ için gruplar arası farkı araştırmak için posthoc tuckey testi kullanıldı.

Yapılan posthoc tuckey testi ile gruplar kendi arasında kıyaslandığında; plazma TOS için, sham grubu (0.73 ± 0.86) ile İ/R3 grubu (5.28 ± 2.55) arasında ($p < 0,05$), sham grubu

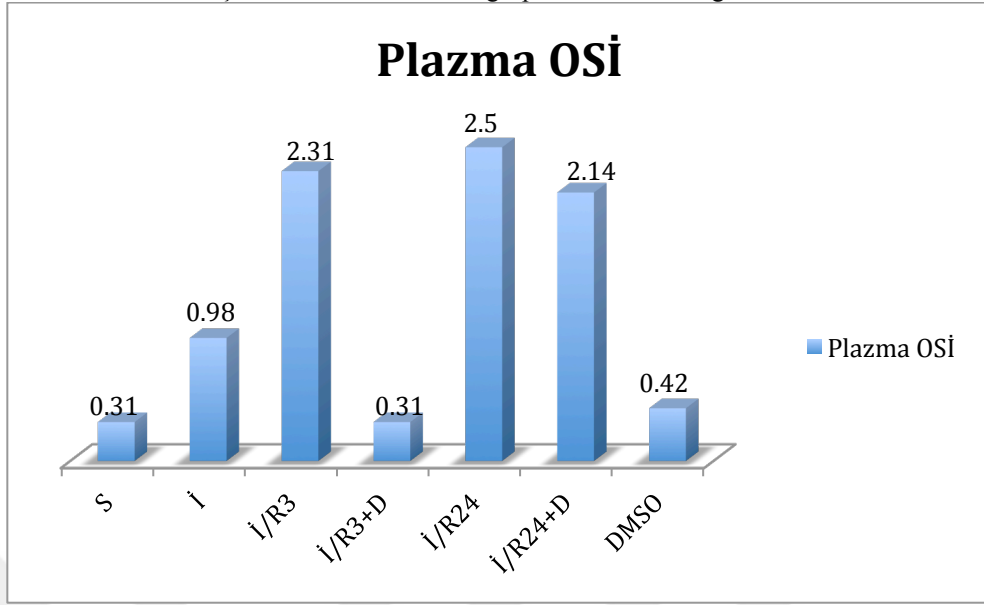
(0.73 ± 0.86) ile İ/R24 grubu (5.67 ± 2.00) arasında ($p < 0,01$) ve sham grubu (0.73 ± 0.86) ile İ/R3+D grubu ($0,70 \pm 0,79$) arasında ($p < 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. İ/R3 grubu (5.28 ± 2.55) ile İ/R3+D grubu ($0,70 \pm 0,79$) arasında ($p < 0,05$) ve İ/R3 grubu (5.28 ± 2.55) ile DMSO (1.07 ± 1.78) grubu arasında anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$). Ayrıca, İ/R3+D grubunda ($0,70 \pm 0,79$), İ/R24 grubuna (5.67 ± 2.00) ($p < 0,01$) ve İ/R24+D (4.97 ± 0.44) grubuna göre ($p < 0,05$) anlamlı derecede düşük bulunurken; İ/R24 grubu (5.67 ± 2.00) ve DMSO grubu (1.07 ± 1.78) arasında anlamlı fark saptandı ($p < 0,05$).

Şekil 4: Plazma TOS'un gruplar arasındaki dağılımı



Posthoc tuckey testi ile gruplar kendi arasında plazma OSİ açısından kıyaslandığında; plazma TOS ile orantılı olarak, sham grubu (0.31 ± 0.41) ile İ/R3 grubu (2.31 ± 1.13) arasında ($p < 0,05$), sham grubu (0.31 ± 0.41) ile İ/R24 grubu (2.50 ± 1.08) arasında ($p < 0,01$) ve sham grubu (0.31 ± 0.41) ile İ/R3+D grubu (0.31 ± 0.39) arasında ($p < 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. İ/R3 grubu (2.31 ± 1.13) ile İ/R3+D grubu (0.31 ± 0.39) arasında ($p < 0,05$) ve İ/R3 grubu (2.31 ± 1.13) ile DMSO (0.42 ± 0.70) grubu arasında anlamlı fark saptandı ($p < 0,05$). Ayrıca, İ/R3+D grubunda (0.31 ± 0.39), İ/R24 grubuna (2.50 ± 1.08) ($p < 0,01$) ve İ/R24+D (2.14 ± 0.40) grubuna göre ($p < 0,05$) anlamlı derecede düşük bulunurken; İ/R24 grubu (2.50 ± 1.08) ve DMSO grubu (0.42 ± 0.70) arasında anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$).

Şekil 5: Plazma OSİ'nin gruplar arasındaki dağılımı



Gruplarda western blot yöntemi ile ölçülen, apoptozisi gösteren bax, bcl-2 ve kaspaz 3 gen ekspresyonlarının ortalama, standart sapma değerleri Tablo 4'te gösterilmiştir.

Tablo 4: Deneş gruplarında gen ekspresyonları

	Grup 1 (S)	Grup 2 (İ)	Grup 3 (İ/R3)	Grup 4 (İ/R3+D)	Grup 5 (İ/R24)	Grup 6 (İ/R24+D)	Grup 7 (DMSO)	P
Bax	16.90 ± 11.04	14.72 ± 8.87	9.91 ± 5.79	12.43 ± 4.61	12.18 ± 3.77	17.25 ± 7.97	17.10 ± 8.71	0.634
Bcl-2	16.42 ± 6.61	13.81 ± 7.44	11.15 ± 3.72	13.54 ± 2.96	10.97 ± 7.24	16.75 ± 1.85	17.37 ± 4.99	0.333
Kaspaz 3	12.98 ± 5.41	17.26 ± 8.84	16.78 ± 3.04	12.72 ± 2.53	13.73 ± 8.69	16.53 ± 6.32	10.01 ± 4.92	0.475

Yapılan varyans analizinde, apoptozisi gösteren, western blot yöntemi ile ölçülen bax, bcl-2 ve kaspaz 3 gen ekspresyonlarında, gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır.

5. TARTIŞMA

Over torsiyonunda, over dokusunda hem torsiyona bağlı olarak hem de detorsiyon sonrası oluşan reperfüzyona bağlı olarak hasar oluşmaktadır. İskemik periyodun süresi de overde oluşacak hasarın şiddeti ile ilişkilidir. Uzamış iskemi, hücre ölümüne, geri dönüşümsüz organ disfonksiyonuna neden olurken geçici iskeminin etkileri reperfüzyonla düzeltilebilir (116). Normal koşullar altında, hücre oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki dengeyi korur. Denge bozulup, oksidanların artması ya da antioksidanların azalması ile oksidatif stres lehine kaydığında hücre, iskemi reperfüzyon hasarı gibi hasarlanmalara karşı daha duyarlı hale gelir. Hipoksik dokunun reperfüzyonu da, serbest oksijen radikallerinin üretimi ile ilişkili olarak daha ileri doku hasarına neden olabilir. Hipoksik dokuya tekrar kan akımının sağlanması ile dokunun yeniden oksijenlenmesi büyük miktarda serbest oksijen radikalleri üretilmesine sebep olur. Bu da reperfüzyon hasarına yol açar (117).

İskemik hasardan sorumlu olan serbest oksijen radikallerinin etkisini azaltmak için antiinflamatuvar ve antioksidan etkileri olan birçok medikal tedavi denenmiştir (117, 118). Biz de çalışmamızda, antioksidan ve antiapoptotik etkisi olan diazoksidin, rat overlerindeki iskemi reperfüzyon hasarında koruyucu etkisini göstermeyi amaçladık. İskemi reperfüzyon sonucu meydana gelen oksidatif stresi gösteren plazma TAS, TOS, OSI, doku TAS, TOS, OSI, katalaz ve reperfüzyon sonucu oluşan apoptotik süreçte rol oynayan bcl2, bax ve kaspaz-3 çalışıldı. Ayrıca tek jel hücre elektroforezi yöntemi ile DNA hasarı incelendi. İskemi grubuna göre, 3 saat reperfüzyon sonrası diazoksid verdiğimiz grupta DNA hasarının anlamlı derecede azaldığını gözlemledik. Oksidatif stres parametrelerine baktığımızda, doku TOS'un 3 saat reperfüzyon sonrası ilaç verdiğimiz grupta ve 24 saat reperfüzyon sonrası ilaç verdiğimiz grupta, iskemi grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak azalmış olduğunu değerlendirdik. Doku OSI'yi, diazoksidin çözünmesi için DMSO verdiğimiz kontrol grubunda 3 saat reperfüzyon sonrası diazoksid verdiğimiz gruba göre anlamlı olarak yüksek bulduk. Plazma TOS ve plazma OSI'yi, kontrol grubunda, iskemi reperfüzyon gruplarına göre anlamlı derecede düşük bulurken, kontrol grubu ile 3 saat reperfüzyon sonrası ilaç grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark saptadık. Ayrıca; 3 saat reperfüzyon sonrası diazoksid verdiğimiz grupta, 3 saat reperfüzyon grubuna göre anlamlı olarak azalmış olarak değerlendirdik. 3 saat reperfüzyon grubu ile diazoksidin çözünmesi için DMSO verdiğimiz

kontrol grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulduk. 3 saat iskemi sonrası diazoksit verdiğimiz grupta, 24 saat reperfüzyon grubuna ve 24 saat reperfüzyon sonrası diazoksit verdiğimiz gruba göre anlamlı derecede düşük saptadık. Aynı zamanda plazma TOS ve OSI'nin, ilaçsız 24 saat reperfüzyon grubunda, DMSO grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu gözlemledik. 3 saatlik reperfüzyon hasarı oluşturulan grupta diazoksitin 24 saatlik reperfüzyon hasarına göre daha etkili olduğunu ve oksidatif stresi anlamlı oranda azalttığını saptadık.

Diazoksitin iskelet kasında, karaciğerde, kalpte, serebral kortekste ve pankreas gibi diğer dokularda iskemi reperfüzyon hasarındaki koruyucu etkisi olduğu daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (12, 119-122). Moghtadaei ve arkadaşlarının yapmış olduğu diazoksitin iskelet kasındaki iskemi reperfüzyon hasarına etkisini incelediği çalışmada, reperfüzyon başlangıcında diazoksit verildiğinde, anlamlı olarak antioksidan enzimlerin arttığı, akut fazda diazoksitin oksidatif stresi azalttığını göstermişlerdir. Ayrıca diazoksitin, bir pro-apoptotik protein olan bax ekspresyonunu azalttığı, antiapoptotik bir protein olan bcl-2 ekspresyonunu ise arttırdığı gösterilmiştir (119). Buna benzer şekilde, Xu ve arkadaşları iskemi reperfüzyon ile indüklenen kardiyomyosit apoptozisine fentanilin etkisini araştırdığı hayvan modelinde; iskemi reperfüzyon grubunda kontrol grubuna kıyasla bax proteininin anlamlı olarak yükseldiği, Bcl-2 proteininin anlamlı olarak azaldığını göstermişlerdir. (123) Ancak, biz çalışmamızda proapoptatik bax, kaspaz-3 ve antiapoptotik bcl-2 gen ekspresyonlarında gruplar arasında anlamlı fark bulamadık. Bu moleküllerin folikül seçimi, folikülün gelişimi, foliküler atrezi ve luteogenez üzerinde etkileri olduğu birçok çalışmada gösterilmekle birlikte (124, 125) ovaryan torsiyonda foliküller üzerindeki etkilerini ortaya koyabilmek için moleküler düzeyde çalışmalara ihtiyaç vardır.

Over torsiyonunda primer patofizyolojik süreç iskemi sonrası oluşan reperfüzyondur. Hipoksik dokulardaki reperfüzyon daha fazla doku hasarına yol açan fizyopatolojik bir süreçtir (5). Ayrıca, iskemi reperfüzyon hasarı reaktif oksijen radikallerinin aşırı üretimi ve dokuda active nötrofillerin toplanması ile oluşmaktadır (126). Bu oluşan reaktif oksijen radikallerinin etkileri dokudan üretilen çok sayıda antioksidan enzimler ve bileşenlerle ortadan kaldırılmaya çalışılmaktadır. Oksidatif stres ve antioksidan durumun değerlendirilmesi için birçok belirteç ve bunları ölçen farklı yöntemler bulunmaktadır. Ancak, bu belirteçlerin ayrı ayrı ölçülmesi hem zaman alıcı hem de masraflıdır (127, 128). Bu nedenle son yıllarda total oksidan durum ve total antioksidan durum ölçülmekte ve oksidatif

stress indeksi (OSİ) hesaplanmaktadır (88, 89, 129). Dokuyucu ve arkadaşlarının, overin iskemi reperfüzyon hasarında erdosteine ve alfa lipoik asitin etkisini araştırdığı hayvan modelinde plazma TAS, TOS ve OSI değerleri karşılaştırıldığında; iskemi reperfüzyon grubunda, sham grubuna göre plazma TOS ve OSI değerlerini anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır. (130). Benzer şekilde, Karapinar ve arkadaşlarının da ovaryen iskemi reperfüzyon hasarında dekspantenolün etkisini araştırdığı çalışmasında, plazma TOS ve OSI, iskemi grubu ve iskemi-reperfüzyon grubunda sham grubuna göre yüksek bulunurken, TAS ise sham grubu ile karşılaştırıldığında iskemi ve iskemi-reperfüzyon grubunda düşük bulunmuştur (131). Biz de çalışmamızda plazma TOS ve OSI' yi, iskemi reperfüzyon grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulduk. Ancak, plazma TAS seviyeleri açısından gruplar arasında anlamlı fark saptamadık.

Over iskemi reperfüzyon hasarını önlemek için literatürde çalışılmış ve etkinliği gösterilmiş olan çok sayıda çalışma vardır. Örneğin; amlodipin, infliximab, selenyum, tadalafil, curcumin, gibi ilaçları antioksidan özellikleri ile oksidatif stresi azalttığı ve iskemi reperfüzyon hasarında etkili olduğu gösterilmiş (117, 132-135) . Vitamin E' nin ise antiapoptotik ve antioksidan etkisi ile over iskemi reperfüzyon hasarını azalttığı gösterilmiş (118). Biz de antioksidan ve antiapoptotik etkileri olan diazoksidi over iskemi reperfüzyon hasarında süre ile bağlantılı olarak kısmen etkili olarak bulduk.

6. SONUÇ

Biz çalışmamızda, comet assay yöntemi ile, diazoksidin, iskemi/ 3 saat reperfüzyon sonrası DNA hasarını anlamlı derecede azalttığını gözlemledik. Ayrıca, dokuda ve plazmada oksidatif stres parametrelerine baktığımızda, oksidatif stresin etkileri plazmada 3 saatlik reperfüzyon sonrası görülürken, dokuda bu etkileri 24 saatte gözlemledik. Dokuda reperfüzyon hasarına bağlı etkilerin daha uzun sürede ortaya çıktığını düşünmekteyiz. Diazoksidin, 3 saat reperfüzyon grubunda, oksidatif stresi plazmada anlamlı olarak azalttığını gözlemlerken, diazoksidin antioksidan parametreler üzerine etkisi olmadığını izledik.

Sonuç olarak, bulgularımız diazoksidin, over iskemi reperfüzyon hasarında, süre ile bağlantılı olarak, kısmen oksidatif stresi azalttığını göstermektedir. Diazoksidin etkisinin reperfüzyon süresi ile ters orantılı olarak daha iyi olduğu söylenebilir. Klinik olarak, over torsiyonunda etkin tedavinin, cerrahi girişimle torsiyonun düzeltilmesi olmasına rağmen, cerrahi müdahaleye ek olarak bu safhada uygulanacak olan diazoksid gibi antioksidan maddelerle detorsiyonla oluşabilecek reperfüzyon hasarının azaltılabileceği görüşünderiz.

Diazoksidin klinikte hipertansiyon krizinde ve hipoglisemide 5-20 mg/kg olarak kullanımı mevcuttur. Biz, sıçanlarda 40 mg/kg dozunda kullanarak reperfüzyon hasarını azalttığını gösterdik. Bu dozda veya daha değişik dozlarda insanlarda kullanılabilmesi için klinik çalışmalar gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Hibbard LT: Adnexial torsion. *Am J Obstet Gynecol* 1985;152:456-461.
2. McGovern PG, Noah R, Koenigsberg R, Little AB. Adnexal torsion and pulmonary embolism: case report and review of the literature. *Obstet Gynecol Surv* 1999; 54:601–8.
3. Rangan U. And Bulkley G.B. Prospects for treatment for free radical-mediated tissue injury. *Br. Med. Bull.* 1993; 49:700-18.
4. Zimmerman B J and Granger D N. Mechanisms of reperfusion injury. *Am. J. Med. Sci.*1994; 307:284-292.
5. Bulkley, G. B.,“ Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review”, *Br J Cancer Suppl.*, 8: 66-73, (1987).
6. Meyer JS, Harman CM, Harty MP, Markowitz RI, Hubba AM, Bellah RD. Ovarian torsion: Clinical and imaging presentation in children. *J Pediatr Surg* 1995; 30: 1433–6.
7. Celik O, Turkoz Y, Hascalik S, Hascalik M, Cigremis Y, Mizrak B, Yologlu S. The protective effect of caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury in rat ovary *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2004; 117:183–8.
8. Aran T, Guven S, Unsal MA, et al. : Serum ischemia-modified albumin as a novel marker of ovarian torsion: an experimental study. *Eur J Obster Gynecol Reprod Biol* 2010; 150:72-75.
9. McCord JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312:159-163.
10. Tian YS, Rong TZ, Hong YL, et al. Pharmacological postconditioning with diazoxide attenuates ischemia/ reperfusion-induced injury in rat liver. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2013; 5:1169-1173.
11. Ichinose M, Yonemochi H, Sato T, et al. Diazoxide triggers cardioprotection against apoptosis induced by oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284:H2235-H2241.
12. Zhang L, Gao X, Yuan X, et al. Mitochondrial calcium uniporter opener spermine attenuates the cerebral protection of diazoxide through apoptosis in rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2013; 1052:273-5.

13. Standring S. Gray's Anatomy, The Anatomical Basis of Clinical Practice, 39th edition, Elsevier Churchill Livingstone 2005; 39: 134-137.
14. Schorge JO, Schaffer JI, Halvorson LM, Hoffman BL, Bradshaw KD, Cunningham FG. Williams Gynecology. New York, NY: McGraw-Hill; 2008.
15. DeCherney AH, Nathan L, Goodwin TM, Lauger N. Current Diagnosis and Treatment Obstetrics and Gynecology. New York, NY: McGraw Hill; 2012
16. Berek JS. Berek & Novak's Gynecology. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
17. Baker TG, A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries, Proc Roy Soc Lond 158:417, 1963.
18. Wylie C, Germ cells, Cell 96:165, 1999.
19. Pereda M, Zorn T, Soto-Suazo M, Migration of human and mouse primordial germ cells and colonization of the developing ovary: an ultrastructural and cytochemical study, Microscopy Res Technique 69:386, 2006.
20. Motta PM, Nottola SA, Makabe S, Natural history of the female germ cell from its origin to full maturation through prenatal ovarian development, Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 75:5, 1997.
21. Smith M, The year in human and medical genetics. Highlights of 2007–2008, Ann N Y Acad Sci 1151:1, 2009.
22. Sekido R, Lovell-Badge R, Sex determination and SRY: down to a wink and a nudge, Trends Genet 25:19, 2009.
23. Fritz MA, Speroff L. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. Lippincott Williams & Wilkins; 2014.
24. Ammini AC, Pandey J, Vijayaraghavan M, Sabherwal U, Human female phenotypic development: role of fetal ovaries, J Clin Endocrinol Metab 79:604, 1994.
25. Magner LN, A History of Medicine, Marcel Dekker, Inc., New York, 1992.
26. Short RV, The discovery of the ovaries, In: Zuckerman S, Weir BJ, eds. The Ovary, 2nd ed, Vol. 1, Academic Press, New York, 1977, p 1.
27. Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M, Upadhyaya NB.: Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. Reproductive Biology and Endocrinology, 2:20, 2004.
28. Eşrefoğlu M. 2004, Genel ve Özel Histoloji, Pelikan Yayıncılık.

29. Wilson JD, Griffin JE, George FW, Leshin M, The role of gonadal steroids in sexual differentiation, *Recent Prog Horm Res* 37:1, 1981.
30. Speed RM, The possible role of meiotic pairing anomalies in the atresia of human fetal oocytes, *Hum Genet* 78:260, 1988.
31. Pasquino AM, Passeri F, Pucarelli I, Segni M, Municchi G, Spontaneous pubertal development in Turner's syndrome. Italian Study Group for Turner's Syndrome, *J Clin Endocrinol Metab* 82:1810, 1997.
32. Russel DL, Doyle KMh and Gonzales RI et al. Egr-1 induction in rat granulosa cells by FSH and luteinizing hormone: combinatorial regulation by transcription factors cyclic adenosine 3,5-monophosphate regulatory binding protein, serum response factor, spl, and early growth response factor-1. *Mol Endocrinol*, 2003; 17: 520-33
33. Cha KY and Chian RC. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Hum Reprod. Update*, 1993; 4; 103-20.
34. Sriraman V, Sharma SC and Richards Js Transactivation of progesterone receptor gene in granulosa cells: evidence that Pp1/Sp3 binding sites in the proximal promoter play a key role in LH inducibility. *Mol Endocrinol*, 2003; 17: 436-49.
35. Wrobel KH, Hees I, Schimmel M, Stauber E, The genus *Acipenser* as a model system for vertebrate urogenital development: nephrostomial tubules and their significance for the origin of the gonad, *Anat Embryol* 205:67, 2002.
36. Hillier SG, van den Boogaard AM, Reichert LE Jr, van Hall EV. Intraovarian sex steroid hormone interactions and the regulation of follicular maturation: aromatization of androgens by human granulosa cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 1980; 50:640-7.
37. Ravindranath N, Little-Ihrig L, Phillips HS, Ferrara N, Zeleznik AJ. Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid expression in the primate ovary. *Endocrinology*. 1992; 131:254-60.
38. Thomas GB, McNeilly AS, Gibson F, Brooks AN, Effects of pituitary- gonadal suppression with a gonadotrophin-releasing hormone agonist on fetal gonadotrophin secretion, fetal gonadal development and maternal steroid secretion in the sheep, *J Endocrinol* 141:317, 1994.
39. Albayram F, Hamper UM. Ovarian and adnexal torsion: spectrum of sonographic findings with pathologic correlation. *J Ultrasound Med* 2001; 20(10):1083–1089.

40. Bouguizane S, Bibi H, Farhat Y, et al. Adnexal torsion: a report of 135 cases. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2003; 32(6):535–540.
41. Graif M, Itzchak Y. Sonographic evaluation of ovarian torsion in childhood and adolescence. *AJR Am J Roentgenol* 1988; 150(3):647–649.
42. Bernardus RE, Van der Slikke JW, Roex AJ, Dijkhuizen GH, Stolk JG. Torsion of the fallopian tube: some considerations on its etiology. *Obstet Gynecol* 1984;64(November (5)):675–8.
43. Sommerville M, Grimes DA, Koonings PP, Campbell K. Ovarian neoplasms and the risk of adnexal torsion. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164(February (2)):577–8.
44. Oltmann S, Fischer A, Barber R, Huang R, Hicks B, Garcia N. Cannot exclude torsion: a 15-year review. *J Pediatr Surg.* 2009; 44:1212-7.
45. Huchon C, Fauconnier A, Adnexal torsion: a literature review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010; 150:8-12.
46. Antoniou N, Varras M, Akrivis C, Kitsiou E, Stefanaki S, Salamalekis E. Isolated torsion of the fallopian tube: a case report and review of the literature. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2004; 31(3):235–8.
47. Krissi H, Shalev J, Bar-Hava I, Langer R, Herman A, Kaplan B. Fallopian tube torsion: laparoscopic evaluation and treatment of a rare gynecological entity. *J Am Board Fam Pract* 2001; 14(July–August (4)):274–7.
48. Lomano JM, Trelford JD, Ullery JC. Torsion of the uterine adnexa causing an acute abdomen. *Obstet Gynecol* 1970; 35:221–5.
49. Chiou SY, Lev-Toaff AS, Masuda E, Feld RI, Bergin D. Adnexal torsion: new clinical and imaging observations by sonography, computed tomography, and magnetic resonance imaging. *J Ultrasound Med* 2007;26(October (10)):1289–301
50. Shadinger L, Andreotti R, Kurian R. Preoperative sonographic and clinical characteristics as predictors of ovarian torsion. *J Ultrasound Med.* 2008; 27:7-13.
51. Moore C, Meyers AB, Cpotasto J, Bokhari J. Prevalence of abnormal CT findings in patients with proven ovarian torsion and a proposed triage schema. *Emerg Radiol.* 2009; 16:115-20.
52. Oelsner G, Shashar D. Adnexal torsion. *Clin Obstet Gynecol* 2006; 49: 459–63.
53. Chang H, Bhatt S. Pearls and pitfalls in diagnosis of ovarian torsion. *Radiographics.* 2008; 28:1355-68.

54. Graif M, Shalev J, Strauss S, Engelberg S, Mashiach S, Itzhak Y. Torsion of the ovary: sonographic features. *AJR* 1984; 143:1331–4.
55. Stark JE, Siegel MJ. Ovarian torsion in prepubertal and pubertal girls: sonographic findings. *AJR Am J Roentgenol* 1994; 163(6):1479–1482.
56. Pena JE, Ufberg D, Cooney N, Denis AL. Usefulness of Doppler sonography in the diagnosis of ovarian torsion. *Fertil Steril* 2000; 73(5):1047–50.
57. Porpora MG, Gomel V. The role of laparoscopy in the management of pelvic pain in women of reproductive age. *Fertil Steril* 1997; 68(November (5)):765– 79.
58. Pansky M, Smorgick N, Herman A, Schneider D, Halperin R. Torsion of normal adnexa in postmenarchal women and risk of recurrence. *Obstet Gynecol.* 2007; 109:355-59.
59. Tosetto A, Iorio A, Marcucci M, et al: Predicting disease recurrence in patients with previous unprovoked venous thromboembolism: a proposed prediction score (DASH). *J Thromb Haemost* 10: 1019-1025, 2012.
60. Göçmen A, Karaca M, Sari A. Conservative laparoscopic approach to adnexal torsion. *Arch Gynecol Obstet* 2008; 277:535–538.
61. Celik A, Ergun O, Aldemir H, Ozcan C, Ozok G, Erdener A, Balýk E. Long-term results of conservative management of adnexal torsion in children. *J Pediatr Surg* 2005; 40:704–708.
62. Oltmann SC, Fischer A, Barber R, Huang R, Hicks B, Garcia N. Pediatric ovarian malignancy presenting as ovarian torsion: incidence and relevance. *J Pediatr Surg* 2010; 45:135–139.
63. Chen M, Chen C, Yang Y. Torsion of the previously normal uterine adnexa. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2001; 80:58-61.
64. Emonts M, Doornewaard H, Admiraal J. Adnexal torsion in very young girls: diagnostic pitfalls. *Eur J Obstet Gynecol Biol.* 2004; 116:207-10.
65. Weitzman VN, DiLuigi AJ, Maier DB, Nulsen JC. Prevention of recurrent adnexal torsion. *Fertil Steril.* 2008; 90:2018.e1-3.
66. Djavadian D, Braendle W, Jaenicke F. Laparoscopic oophoropexy for the treatment of recurrent torsion of the adnexa in pregnancy: case report and review. *Fertil Steril.* 2004; 82:933-6.
67. Cohen SB, Wattiez A, Seidman DS, et al. Laparoscopy versus laparotomy for detorsion and sparing of twisted ischemic adnexa. *Jsls* 2003;7(October–December (4)):295–9.

68. Stokes KY, Granger DN. Hypercholesterolemia, its impact on ischemia reperfusion injury. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2005; 3: 1061-70.
69. Dorweiler B, Pruefer D, Andradi TB, Maksan SM, Schmiedt W, Neufang A, Vahl CF. Ischemia-Reperfusion Injury Pathophysiology and Clinical Implications. *Eur J Trauma Emerg Surg* 2007; 33: 600-612.
70. Mubagwa K, Flameng W. Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection, an updated overview. *Cardiovasc Res* 2001; 52: 25-39, 2001.
71. Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Cellular mechanisms of hypoxic injury in the developing brain. *Brain Res Bull* 1999; 48: 233-238.
72. Kukan M. Emerging roles of proteasomes in ischemia-reperfusion injury of organs. *J Physiol Pharmacol* 2004; 55: 3-15.
73. Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cir Bras* 2005; 20: 336-343.
74. Piper HM, Meuter K, Schafer C. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg.* 2003; 75: 644-648.
75. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri.
76. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 3: 28-48, 2005.
77. Sinclair AJ, Barnett AH, Lunec JL. Free radicals and antioxidant systems in health and diseases. *British J Hosp Med* 43: 334-344, 1990.
78. Çavdar C, Sifil A, Çamsan T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji ve Transplantasyon Dergisi* 3(1): 92-95, 1997.
79. Harma M, Harma M, Erel O. Oxidative stress in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 192: 656-657.
80. Yanık M, Erel O, Kati M. The relationship between potency of oxidative stress and severity of depression. *Acta Neuropsychiatr.* 2004; 16: 200-203.
81. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp dergisi* 2002; 33:2,110-8.
82. Jurcau A. Acute cerebral ischemia and oxidative stress. *Ro j Neurol* 2008; 2: 45-56.
83. Hubel CA. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222 (3): 222-235.

84. Buhimschi IA, Buhimschi CS, Pupkin M, Weiner CP. Beneficial impact of term labor: nonenzymatic antioxidant reserve in the human fetus. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189:181-8.
85. Hung JH. Oxidative stress and antioxidants in preeclampsia. *J Chin Med Assoc* 2007; 70(10):430-2.
86. Scandalios JG. The rise of ROS. *TRENDS in Biochemical Sciences* 2002; 27:483-6.
87. Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *TIBS* 2000; 25:502-7.
88. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005; 38(12):1103-11.
89. Erel O.; A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical Biochemistry* 2004; 37; 112– 9.
90. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry.* 3 2004; 277–85.
91. Aycicek A., Varma M., Koc A. et al. Maternal active or passive smoking causes oxidative stress in placental tissue. *Eur. J Pediatr.* 2011; 170:645–51.
92. CO. Bellamy, RD. Malcomson, DJ. Harrison, AH. Wyllie: Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Cancer Biology* (1995);6: 3-16,
93. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. *Mol Biotechnol* 2004; 26(3):249-61.
94. Gedik CM, Ewen SW, Collins AR. Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int J Radiat Biol* 1992;62(3):313-20.
95. Ozcagli E, Sardas S, Biri A. Assessment of DNA damage in postmenopausal women under hormone replacement therapy. *Maturitas* 2005; 51(3):280-5.
96. Ameisen JS. The origin of programmed cell death. *Science* 1996; 272:1278.
97. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267:1456-1462.
98. Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death apoptosis. *Eur J Endocrin* 1998; 18: 482-491.

99. MC. Cummings, CM. Winterford, NI. Walker: Apoptosis. *Am J Surg Pathol.* (1997); 21: 88-101.
100. Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Cancer Biology* 1995; 6: 3-16.
101. M. Bijl, PC. Limburg, CGM Kallenberg. New insights into the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE): the role of apoptosis *Neth J Med.* 2001 Aug;59(2):66-75.
102. F. Öztürk, Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 9(2) 2002:143-148
103. AH. Wyllie, E. Duvall. Cell death. In: McGee JO'D, PG. Issacson, N. Wright, eds. *Oxford Textbook of Pathology*, vol 1. USA, Oxford University Press 1992: 142-147.
104. CB. Thompson. Apoptosis. In: Paul WE, ed. *Fundamental Immunology*. Lippincott-Raven Publishers. 1999.
105. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119:493-501.
106. Lüleyap, H.Ü., 2008, *Moleküler Genetiğin Esasları*, Nobel Kitabevi, Ankara.
107. Abedin, M.J., Wang, D., McDonnell, M.A., Lehmann, U., Kelekar, A., 2007, *Autophagy Delays Apoptotic Death in Breast Cancer Cells Following DNA Damage, Cell Death and Differentiation*, 14, 500-510.
108. Mousavia, S.H., Afshari, J.T., Brook, A., Anarkooli, I.J., 2009, *Role of Caspases and Bax Protein in Saffron-Induced Apoptosis in MCF-7 Cells*, *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1909-1913.
109. F Bardakci, *Yenidunya A F* (2007): *Moleküler biyoloji teknikleri 1:Nükleik asit analiz teknikleri* (in) *Moleküler Biyoloji*, 519-553, Nobel Yayın, Ankara.
110. Ashcroft FM, Ashcroft SJ, Harrison DE (1988) Properties of single potassium channels modulated by glucose in rat pancreatic beta-cells. *J Physiol* 400: 501– 527.
111. Wang L, Zhu QL, Wang GZ, Deng TZ, Chen R, et al. (2011) The protective roles of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels during hypoxia- ischemia-reperfusion in brain. *Neurosci Lett* 491: 63–67.
112. Roseborough G, Gao D, Chen L, Trush MA, Zhou S, et al. (2006) The mitochondrial K-ATP channel opener, diazoxide, prevents ischemia-reperfusion injury in the rabbit spinal cord. *Am J Pathol* 168: 1443–1451.

113. Teshima Y, Akao M, Li RA, Chong TH, Baumgartner WA, et al. (2003) Mitochondrial ATP-sensitive potassium channel activation protects cerebellar granule neurons from apoptosis induced by oxidative stress. *Stroke* 34: 1796– 1802.
114. Domoki F, Perciaccante JV, Veltkamp R, Bari F, Busija DW. Mitochondrial potassium channel opener diazoxide preserves neuronal-vascular function after cerebral ischemia in newborn pigs. *Stroke*. 1999 Dec; 30(12):2713-8.
115. Yesilkaya A, Altinayak R, Korgun DK. The antioxidant effect of free bilirubin on cumene-hydroperoxide treated human leukocytes. *Gen Pharmacol*. 2000; 35(1): 17-20.
116. Onishi I, Tani T, Hashimoto T, Shimizu K, Yagi M, Yamamoto K, Yoshioka K. Activation of c-Jun N-terminal kinase during ischemia and reperfusion in mouse liver. *FEBS Lett*. 1997 Dec 29; 420(2-3):201-4.
117. Halici Z1, Karaca M, Keles ON, Borekci B, Odabasoglu F, Suleyman H, Cadirci E, Bayir Y, Unal B. Protective effects of amlodipine on ischemia-reperfusion injury of rat ovary: biochemical and histopathologic evaluation. *Fertil Steril*. 2008 Dec; 90(6):2408-15.
118. Sapmaz-Metin M1, Topcu-Tarladacalisir Y, Uz YH, Inan M, Omurlu IK, Cerkezayabekir A, Kizilay G, Akpolat M. Vitamin E modulates apoptosis and c-jun N-terminal kinase activation in ovarian torsion-detorsion injury. *Exp Mol Pathol*. 2013 Oct; 95(2):213-9.
119. Moghtadaei M, Habibey R, Ajami M, Soleimani M, Ebrahimi SA, Pazoki-Toroudi H. Skeletal muscle post-conditioning by diazoxide, anti-oxidative and anti-apoptotic mechanisms. *Mol Biol Rep*. 2012 Dec; 39(12):11093-103.
120. Nogueira MA, Coelho AM, Sampietre SN, Patzina RA, Pinheiro da Silva F, D'Albuquerque LA, Machado MC. Beneficial effects of adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channel opener on liver ischemia/reperfusion injury. *World J Gastroenterol*. 2014 Nov 7; 20(41):15319-26.
121. Facundo HT, de Paula JG, Kowaltowski AJ. Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels prevent oxidative stress, permeability transition and cell death. *J Bioenerg Biomembr*. 2005 Apr; 37(2):75-82.
122. Wang Y, Wang S, Harvat T, Kinzer K, Zhang L, Feng F, Qi M, Oberholzer J. Diazoxide, a K(ATP) channel opener, prevents ischemia-reperfusion injury in rodent pancreatic islets. *Cell Transplant*. 2015; 24(1):25-36.

123. Xu Q, Li QG, Fan GR, Liu QH, Mi FL, Liu B. Protective effects of fentanyl preconditioning on cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia-reperfusion in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2017 Feb 16; 50(2):e5286.
124. Van Nassauw L, Tao L, Harrisson F. Distribution of apoptosis-related proteins in the quail ovary during folliculogenesis: BCL-2, BAX and CPP32. *Acta Histochem.* 1999 Feb; 101(1):103-12.
125. Fenwick MA, Hurst PR. Immunohistochemical localization of active caspase-3 in the mouse ovary: growth and atresia of small follicles. *Reproduction.* 2002 Nov; 124(5):659-65.
126. Gillham B, Papachristodoulou DK, Thomas JH. *Wills' biochemical basis of medicine.* 3rd ed. London: Butterworth-Heinemann, 1997:343-354.
127. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002 Nov-Dec; 30(6):620-50.
128. Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004 Mar; 286(3):R431-44.
129. Harma M, Harma M, Erel O. Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. *Swiss Med Wkly.* 2003 Nov 1; 133(41-42):563-6.
130. Dokuyucu R, Karateke A, Gokce H, Kurt RK, Ozcan O, Ozturk S, Tas ZA, Karateke F, Duru M. Antioxidant effect of erdosteine and lipoic acid in ovarian ischemia-reperfusion injury. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2014 Dec; 183:23-7.
131. Soylu Karapinar O, Pinar N, Özcan O, Atik Doğan E, Bayraktar S, Şahin H, Dolapçioğlu K. The effect of dexpanthenol on experimentally induced ovarian ischaemia/reperfusion injury: a biochemical and histopathological evaluation. *Arch Gynecol Obstet.* 2017 Mar; 295(3):777-784.
132. Abali R, Tasdemir N, Yuksel MA, Guzel S, Oznur M, Nalbantoglu B, Tasdemir UG. Protective effect of infliximab on ischemia/reperfusion injury in a rat ovary model: biochemical and histopathologic evaluation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013 Dec; 171(2):353-7.

133. Bozkurt S, Arikan DC, Kurutas EB, Sayar H, Okumus M, Coskun A, Bakan V. Selenium has a protective effect on ischemia/reperfusion injury in a rat ovary model: biochemical and histopathologic evaluation. *J Pediatr Surg.* 2012 Sep;47(9):1735-41.
134. Arikan DC, Bakan V, Kurutas EB, Sayar H, Coskun A. Protective effect of tadalafil on ischemia/reperfusion injury of rat ovary. *J Pediatr Surg.* 2010 Nov; 45(11):2203-9.
135. Sak ME, Soydinc HE, Sak S, Evsen MS, Alabalik U, Akdemir F, Gul T. The protective effect of curcumin on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *Int J Surg.* 2013; 11(9):967-70.

