



T.C
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINA UĞRATILAN RATLARDA
ANTİMÜLLERİAN HORMON İLE OVER REZERVİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ VE OVER HASARININ
AZALTILMASINDA SELENYUMUN ETKİSİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Mehmet Adıyeke

Danışman

Prof. Dr. Semra Oruç KOLTAN

MANİSA - 2011



T.C
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINA UĞRATILAN RATLARDA
ANTİMÜLLERİAN HORMON İLE OVER REZERVİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ VE OVER HASARININ
AZALTILMASINDA SELENYUMUN ETKİSİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Mehmet Adıyeke

Danışman

Prof. Dr. Semra Oruç KOLTAN

MANİSA - 2011

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇİNDEKİLER.....	II
KISALTMALAR.....	III
RESİM VE TABLO LİSTESİ.....	IV
TEŞEKKÜR.....	VI
ÖZET.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Overin Yapısı ve Fonksiyonları.....	4
2.2. Over Rezervi.....	10
2.3. Anti-Müllerian Hormon.....	13
2.4. Adneksiyel Torsiyon.....	16
2.5. İskemi Reperfüzyon.....	19
2.6. Serbest Radikaller.....	24
2.7. Antioksidanlar.....	29
2.8. Bir Antioksidan Olan Selenyum.....	32
2.9. Apoptozis.....	34
3. MATERYAL METOD.....	42
4. BULGULAR.....	49
4.1. Histolojik Bulgular.....	49
4.2. Histolojik Bulguların İstatistiksel Değerlendirilmesi.....	56
4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	57
4.4. TUNEL Bulguları.....	71
4.5. Biyokimyasal Bulguların İstatistiksel Değerlendirilmesi.....	76
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	79
6. TABLOLAR.....	85
7. KAYNAKLAR.....	91

KISALTMALAR

AMH	AntiMüllerian Hormon
ATP	Adenozin Tri Fosfat
ART	Yardımcı Üreme Teknikleri
CAT	Katalaz
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
EPO	Eritropoietin
FSH	Folikül Stimule Edici Hormon
Fas-L	Fas Ligand
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
GST	Glutasyon S Transferaz
H ₂ O ₂	Hidroksil Radikali
H&E	Hemotoksilen Eosin
IVF	In vitro Fertilizasyon
LH	Luteinizan Hormon
MDA	MalonilDialdehid
MPO	Myeloperoksidaz
iNOS,eNOS	NitrikOksit Sentetaz(i:indülenebilir, E:endotelial)
Se	Selenyum
SOD	SüperoksitDismutaz
ROS	Reaktif Oksijen Ürünleri
PMNL	Poli Morfo Nukleer Lenfosit
TUNEL	Terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP Nick-End Labeling)
3T/D (+Se)	3 saat torsiyon, 3 saat detorsiyon uygulanan (Detorsiyon öncesi Selenyum tedavisi uygulanan)
24T/D (+Se)	24 saat torsiyon, 24 saat detorsiyon uygulanan (Detorsiyon öncesi Selenyum tedavisi uygulanan)

RESİM VE TABLO LİSTESİ

Şekil 2.1.2	Fetal dönemden menopoza dek süren granuloza hücre apoptoz- folliküler atrezi	sf5
Şekil 2.1.3	Overdeki folüküllerin gelişimi	sf7
Şekil 2.1.5	Rodentler ve insanlarda prepuberte ve puberte aşamasında folikül gelişimi süreleri	sf9
Şekil 2.5.1	İskemide membran hasarının mekanizmaları.	sf21
Şekil 2.5.2	İskemide pürin metabolizmasının gelişimi ve ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza çevrilmesi	sf22
Şekil 2.6.1	Antioksidan-serbest radikal dengesi	sf25
Şekil 2.7.1	İskemideki serbest radikal mekanizması	sf31
Şekil 2.9.1	Apoptosis'in çok basamaklı kontrolü	sf35
Şekil 2.9.2	Apoptozis-nekrozis	sf36
Resim 2.1.3	Overin histolojik yapısı	sf6
Resim 3.1	Ratların cerrahi prosedür için hazırlığı.	sf43
Resim 3.2	Ratların adneksinin torsiyone edilişi.	sf44
Resim 4.1.1	Kontrol grubu (grup 1) h&e boyama	sf51
Resim 4.1.2	Grup 2, h&e boyama	sf52
Resim 4.1.3	Grup 3, h&e boyama	sf53
Resim 4.1.4	Grup 4, h&e boyama	sf54
Resim 4.1.5	Grup 5, h&e boyama	sf55
Resim 4.3.1	Grup 1, ihk boyama	sf58
Resim 4.3.2	Grup 2 , ihk boyama	sf60
Resim 4.3.3	Grup 3, ihk boyama	sf62
Resim 4.3.4	Grup 4, ihk boyama	sf64
Resim 4.4.1	Grup 1, tunel boyama	sf71

RESİM VE TABLO LİSTESİ

Resim 4.4.2	Grup 2, tunel boyama	sf72
Resim 4.4.3	Grup 3, tunel boyama	sf73
Resim 4.4.4	Grup 4, tunel boyama	sf74
Tablo 3.3.1	Parafin doku takip protokolü	sf85
Tablo 3.3.2	Hematoksilen-eozin boyama protokolü	sf85
Tablo 3.3.3	Avidin-biyotin peroksidaz yöntemi ile indirek immunohistokimya boyama protokolü	sf86
Tablo 4.1.1	Histolojik grade skoruması	sf50
Tablo 4.1.2	Deney gruplarından elde edilen h&e boyama değerlendirme (grade) sonuçları	sf87
Tablo 4.1.3	Deney gruplarından elde edilen h&e boyama değerlendirme (follikül sayısı) sonuçları	sf88
Tablo 4.2.1	Grupların Histolojik Grade sonuçlarına göre karşılaştırılması.	sf56
Tablo 4.2.2	Grupların Follikül Sayıları sonuçlarına göre karşılaştırılması	sf57
Tablo 4.3	Deney gruplarından elde edilen ihk boyama sonuçları	sf88
Tablo 4.3.1	GruplarınAnti-eNOS sonuçlarına göre karşılaştırılması	sf68
Tablo 4.3.2	Grupların Anti-iNOS sonuçlarına göre karşılaştırılması	sf68
Tablo 4.3.3	GruplarınAnti-Apaf1 sonuçlarına göre karşılaştırılması	sf69
Tablo 4.3.4	Grupların Anti-Caspase 3 sonuçlarına göre karşılaştırılması	sf69
Tablo 4.3.5	Grupların Anti-Fas-L sonuçlarına göre karşılaştırılması	sf70
Tablo 4.4.1	Deney gruplarından elde edilen TUNEL boyama sonuçları	sf90
Tablo 4.5.1	Grupların MDA sonuçlarına göre karşılaştırılması	sf76
Tablo 4.5.2	Grupların SOD sonuçlarına göre karşılaştırılması	sf77
Tablo 4.5.3	Grupların GSH-Px sonuçlarına göre karşılaştırılması	sf77
Tablo 4.5.4	Grupların AMH sonuçlarına göre karşılaştırılması	sf78

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, hazırlanması ve tamamlanmasında olmak üzere her aşamasında bana rehberlik eden, tıpta uzmanlık eğitimi boyunca desteğini esirgemeyen, danıŐmanım Sayın Prof. Dr. Semra ORUÇ KOLTAN hocama,

Tıpta uzmanlık eğitimimde gostermiŐ olduğu özveri, emek ve değerli katkıların ötesinde, karşılaŐtıđım problemlerin çözümlünde desteğini esirgemeyen, eğitimimde emeği geçen ve önderlik eden başta Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Faik Mümtaz KOYUNCU ve tüm hocalarıma,

Tezimin laboratuvar çalışmaları, verilerin değerlendirmeleri aşamasında özverili mesai harcayan ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Aslı GÖKER, Prof. Dr. Sevinç İNAN ve Prof. Dr. Ahmet VAR hocama,

Tıpta uzmanlık eğitim boyunca birlikte çalıŐtıđım, dostum Dr. M. AfŐın TURHAN'a ve desteğini her zaman hissettiğim Dr. Özer BİRGE'ye ve hepsi birbirinden değerli çalışma arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca sonsuz özveri ve sevgiyle tüm emeklerini harcayarak, beni her konuda destekleyen anne ve babama, bu süreçte hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan ve beni cesaretlendiren canım eŐime,

Sonsuz TeŐekkürler...

İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINA UĞRATILAN RATLARDA ANTİMÜLLERIAN HORMON İLE OVER REZERVİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ VE OVER HASARININ AZALTILMASINDA SELENYUMUN ETKİSİ

ÖZET

Amaç: Over torsiyonunun ve detorsiyonunun over rezervine etkisinin araştırılması, AMH'nin over rezervi ile ilişkisi ve iskemi reperfüzyon hasarının biyokimyasal ve histolojik parametreler ile tespit edilmesi ve hasarın azaltılmasında antioksidan olan selenyumun etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışma, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul'unun onayı alındıktan sonra yapılmıştır. Çalışmada 50 adet, 200-250 gr. ağırlığında, genç erişkin, dişi Wistar Albino sıçan (rat) kullanılmıştır. Grup1:Kontrol(Sham grubu), Grup2(3T/D), Grup3(3T/D+Se), Grup4(24T/D), Grup5(24T/D+Se) olmak üzere 5 gruptan oluşmaktadır. İntraperitoneal yol ile Selenyum, Grup3 ve 5' e detorsiyon işleminden 20 dk önce uygulanmıştır. Overler iskemi-reperfüzyon hasarsı açısından, biyokimyasal parametrelerden; MDA, SOD, GSH-Px ve immunohistokimyasal apoptozis parametrelerinden eNOS, iNOS, Caspase 3, Cytochrom c, Apaf-1, Fas-L, TUNEL ile değerlendirilmiştir. Ayrıca over rezervini değerlendirmek amacıyla follikül sayıları, histolojik grade ve AMH kullanılmıştır.

Bulgular: İskemi-reperfüzyon uygulanan gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; over hasarı biyokimyasal (MDA, SOD, GSH-Px) ve immunohistokimyasal (eNOS, iNOS, Caspase 3, Cytochrom c, Apaf-1, Fas-L, TUNEL) ile tespit edilmiş ve elde edilen veriler artan iskemi-reperfüzyon süresi ile artan over hasarını desteklemektedir ($p<0,01$). Over hasarının önlenmesinde Selenyum tedavisinin etkinliği ise Fas-L (3 saatlik uygulamada), SOD (3 ve 24 saatlik uygulamada) ($p>0,05$) verileri hariç diğer tüm veriler değerlendirildiğinde ise istatistiksel olarak anlamlı $p<0,01$ bulunmuştur. AMH' nin gruplar arasındaki değişimi over hasar derecesine ve artan iskemi-reperfüzyon sürelerine göre değerlendirildiğinde $p>0,05$ bulunmuştur.

Sonuç: Over hasarının, artan iskemi-reperfüzyon sürelerine bağlı olarak arttığı ve Selenyum uygulamasının over hasarını önlemede etkin olduğu bulunmuştur. Ayrıca AntiMüllerian Hormonun, artan over hasarını göstermede anlamlı olmadığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: AntiMüllerian Hormon, Over Rezervi, İskemi-Reperfüzyon

BY ANTIMÜLLERIAN HORMONE ASSESMENT OF OVARIAN RESERVE AND EFFECT OF SELENIUM TO OVARIAN DAMAGE REDUCTION WITH ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY IN RATS

ABSTRACT

Aim: Investigation of ovarian reserve effected by ovarian torsione-detorsione. Determinining the relationship between ovarian reserve and AMH. And evaluating biochemical and histological parameters to ovarian ischemia-reperfusion and effect of Selenium

Material and Methods: This study made in Ege University Medicine Faculty after receiving approval from ethical committee This study contains young adult, approximately in 200-250gr weight, 50-female Wistar Albino rats. There are five groups in research. Group1:Sham, Group2(3T/D), Group3(3T/D+Se), Grup4(24T/D), Grup5(24T/D+Se). Selenium was administered intraperitoneally to rats (to Group 3 and 5) twenty minutes before detorsion operation. Ovarian ischemia-reperfusion injury evaluated by using biochemical (MDA, SOD, GSH-Px) and immunohistochemical parameters (eNOS, iNOS, Caspase 3, Cytochrom c, Apaf-1, Fas-L, TUNEL). In addition the number of follicles, histologic grade, AMH used to determine ovarian reserve.

Results: Ischemia-reperfusion groups compared with sham group, using biochemical (MDA, SOD, GSH-Px) and immunohistochemical parameters for apoptosis (eNOS, iNOS, Caspase 3, Cytochrom c, Apaf-1, Fas-L, TUNEL). Prolonged time of ischemia-reperfusion associated with increasing ovarian damage ($p < 0,01$). The data are evaluated, the prevention of ovarian damage, the efficacy of selenium, statistically significant at the $p < 0,01$ was. But there was not statistically significant about Fas-L (in Group 3), and SOD (in Group 3 and 5). AMH changes between the groups was evaluated. According to degree of ovarian damage, and to duration of ischemia-reperfusion, $p > 0,05$ was found.

Conclusion: Biochemical and immunohistochemical analysis showed that, prolonged time of ischemia-reperfusion associated with increasing ovarian damage. And also Selenium treatment was effective in preventing ovarian damage. In addition the using AntiMüllerian hormone, were not significant in detecting of increased ovarian damage ($p > 0,05$).

Key words: AntiMüllerian Hormone, Ovarian Reserve, İschemia-Reperfusion

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Bilindiği gibi over rezervi doğumdan itibaren yaşla birlikte azalmakta, 35 yaşından sonra oosit kalitesi de bozulmaktadır. Rezerv azalmasının mekanizması tam bilinmemektedir. Fakat çevresel faktörleri *oksidatif hasar* ve hormonal dengesizliğin follükülleri atreziye götürdüğü düşünülmektedir. Zarar goren yaşlı oositin hücre siklusu bozulmakta, mayotik ayrılmama, anoploid oositler, mozaizm ve bunların sonucunda gebelik kayıpları meydana gelmektedir (1).

Günümüzde çocuk sahibi olma isteğinin geç yaşlara ertelenmesi, azalmış over rezervinin, infertilite nedenleri arasında önemli bir yere sahip olmasına neden olmaktadır. Over rezervi, overlerde follükülogenez ve steroidogenez fonksiyonunu yerine getirecek follüküllerin sayısını, kalitesini ve yeterliliğini tanımlamaktadır. Kadının yaşı arttıkça over rezervi primordiyal follüküllerin apoptotik kaybına bağlı olarak azalmaktadır (2). Overin yaşlanması over rezervindeki yaşa bağlı azalmada anahtar rol oynamaktadır; primordiyal follükül sayısı azalır, oosit kalitesi bozulur, implantasyon oranı azalır, embriyoda kromozomal anomali oranı ve bunun sonucunda düşük oranı artar. Zahmetli ve pahalı bir infertilite tedavi programına girmeden önce over rezervinin bir tarama testi ile değerlendirilmesinin önemi giderek artmaktadır (3).

Over rezervinin iki yeni belirteci olan plazma Anti-Müllerian hormon (AMH) ve overyan antral follükül sayısı, over rezervinin en sensitif ve invaziv olmayan belirteçleri olarak görünmektedir (36,37). AMH, büyüyen follüküller tarafından üretildiği için AMH'nin over rezervinin belirteci olabileceği düşünülmüştür (50,51,52,53). AMH, antral follükü sayısı ve toplanan oositler arasında ilişki olduğu gösterilmiş, bu yüzden serum AMH seviyelerinin antral follükül havuzunu yansıtabileceği düşünülmüştür.

Adneksiyel torsiyon, sık görülmemekle birlikte akut abdominal ağrının önemli bir nedenidir ve ağır morbidite ile sonuçlanmaktadır. Jinekolojik cerrahi aciller içerisinde beşinci sırada olup, %2,7'sini oluşturmaktadır (59). Adneks torsiyonu kadınlarda herhangi bir yaşta görülebilir. Ancak genelde premenarş ve reproduktif yıllarda görülmektedir. Adneksiyel torsiyon sıklıkla alt abdomene ani, devamlı ve nonspesifik bir ağrı şeklinde kendini göstermektedir. Gecikmiş tanı ya da tanı alamayan olgular oldukça sıktır ve bu gibi durumlar overin, fallopian tüpün ya da her ikisinin kaybı ile sonuçlanabilmektedir. Uzamış iskemiler dışlandığında, overde şiddetli hasar

izlenen adneksiyel torsiyon olgularında bile takipte overin fonksiyonlarını koruduğu izlenmiştir ki bu da bu olgularda arteriyel kan akımının tam olarak kesilmediğini göstermektedir. Düşük seviyede de olsa ovaryen arter ya da uterin arter yoluyla overin arteriyel akımı bir süre devam etmektedir. Bu nedenle overi koruyabilmek için erken tanı ve müdahale ile en erken dönemde overde gelişebilecek irreversibl hasarın önüne geçilmesi gerekmektedir (67).

İskemi oluşmuş dokunun kan akışının tekrar sağlanmasına reperfüzyon denilmektedir. İskeminin kritik süresi dolmadan, doku reperfüze edilirse hücreler ölümden kurtulabilmektedir. İskemi süresinin uzaması reperfüzyona rağmen ölüm riski olan hücrelerin sayısını artırmaktadır. Bu hücreler geri dönüşümsüz doku hasarı fazına girdikleri için reperfüze edilseler de nekroz oluşmaktadır. Reperfüzyon hasarının büyük bölümünden serbest radikaller sorumlu tutulmaktadır. Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunların başlıcaları, süperoksitdismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) , katalaz (CAT)...vs enzimatik aktiviteleri ve bunların fonksiyon görmelerinde etkili vitamin ve elementler (Selenyum, E, C Vitamini...vs) 'dir.

Daha önce yapılmış birçok hayvan çalışmasında adneksiyel torsiyonda ovaryen hasarın (reperfüzyon hasarının) azaltılması için E ve C vitamini, mannitol, DHEAS, melatonin, cafeic asit, eritropoietin gibi birçok madde kullanılmıştır (146, 148, 149, 150). Bu çalışmalarda over hasarının belli oranlarda azaltıldığı öne sürülmüştür.

Biz de çalışmamızda iskemi, reperfüzyon hasarına uğratılan ratların serbest radikal (reperfüzyon) hasarını azaltmada Selenyum (Se) elementini kullanmayı amaçladık. Daha önce yapılan çalışmalarda testis, barsakta oluşturulan iskemi reperfüzyon hasarını önlemede Selenyumun etkinliği gösterilmiş ancak overlere olan etkisi çalışılmamıştır. Ayrıca çalışmamızda ovaryen hasarı gösteren önemli belirleyiciler de bulunmaktadır. Bunlar apoptozis belirteçleri, glutatyon peroksidaz(GPx), superoksit dismutaz(SOD) ve lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden olan malonildialdehid (MDA) seviyeleridir.

Overyan torsiyon çalışmalarında torsiyon süreleri değerlendirildiğinde 24 saate kadar torsiyonların; reversibl, 24 saati aşan torsiyonları ise geri dönüşümsüz olduğu belirlendiğinden çalışmamızda bu süreler dikkate alınarak planlama yapılmıştır (146).

Ayrıca ovaryen hasarın belirlenmesinde biyokimyasal, immunohistokimyasal yaklaşımların haricinde overde oluşan hasarın, over rezervini ne oranda etkilediğine

yönelik antimüllerian hormon (AMH) araştırılması da planlanmıştır.

Çalışmamızın amacı adneksiyel torsiyonun, erken ve geç reversibl dönemde yapılan cerrahi yaklaşımın (detorsiyon), overe ne ölçüde hasar verdiğini, oluşan bu hasarın azaltılmasında selenyum tedavisinin etkinliğini ve oluşabilecek rezerv kaybının antimüllerian hormon ile korelasyonunun ne ölçüde olduğunu saptamaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 OVERİN YAPISI ve FONKSİYONLARI

2.1.1 Overin Genel Yapısı

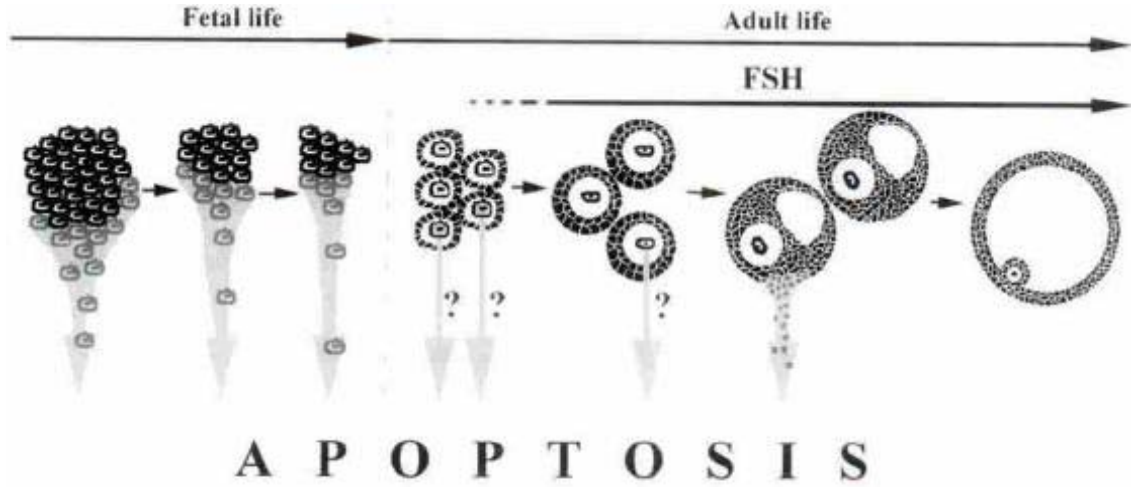
Kadın üreme sisteminde badem şeklinde olan ve uterusun her iki yanında lateral pelvik duvara yakın yerleşmiş olan overler, gametlerin üretilmesi (gametogenez) ve steroid yapıdaki hormonların (östrojen ve progesteron) sentezlenip salgılanmasından sorumludur. Puberteden başlayarak, üreme yaşamı boyunca kadınlar devamlı olarak aylık üreme sikluslarına girerler. Bu olaylarda hipotalamus, hipofiz bezi, overler ve uterus işlevleri önemlidir. Hipotalamustaki nörosekretuar hücreler, gonadotropin salgılatıcı Hormon (GnRH) sentezler ve bu hormonu hipofiz bezinin ön lobuna hipofizyal portal sistem aracılığıyla iletir. GnRH hipofizde üretilen ve overler üzerine etkili iki hormonun salınmasını uyarır. Bunlar; over folikülünün gelişimini ve folikül hücrelerinden östrojen salınımını uyararak Follikül stimüle eden hormon (FSH) ve ovulasyonu tetikleyen, follikül hücreleri ve korpus luteumu uyararak progesteron üretimini sağlayan Luteinleştirici hormon (LH)'dur (4,5).

2.1.2. Over Embriyolojisi ve Oogenez

Oogenez, oogonia olarak bilinen primitif germ hücrelerinin olgun oositlere dönüşmesi sırasında gerçekleşen olaylar dizisidir. Bu süreç, doğum öncesi dönemde başlar, pubertede tamamlanır ve menopoza kadar devam eder (4-7). Erken fetal dönemde, vitellus kesesi duvarından köken alan primitif germ hücreleri çoğalarak ameboid hareketlerle gelişmekte olan gonadlara doğru göç ederler. Overlere ulaşan oogoniumlar mitoz bölünme ile çoğalarak primer oositleri oluşturmak üzere büyürler. Primer oositler, over stromal hücreleri ile çevrilerek, kortekste tek sıralı epitelyum hücreleri ile çevrelenmiş primordial follikülleri oluşturur. Her iki overde yaklaşık 500 bin primordial folikül içinde primer oosit 1.mayozun profaz aşamasına girer ve diktiat fazda bekler. Primer oositi çevreleyen folliküler hücrelerin oosit olgunlaşma inhibitörü (OMİ) salgılayarak oositin mayoz bölünme sürecini durdurduğu düşünülmektedir. Cinsel olgunluk dönemi içinde bir kısım folliküller atreziye ve apoptozise giderken bir bölümü de bu oosit havuzundan ayrılıp gelişimlerini sürdürürler.

Yenidoğan bir kız çocuğun overlerinde yaklaşık 2 milyon primer oosit vardır.

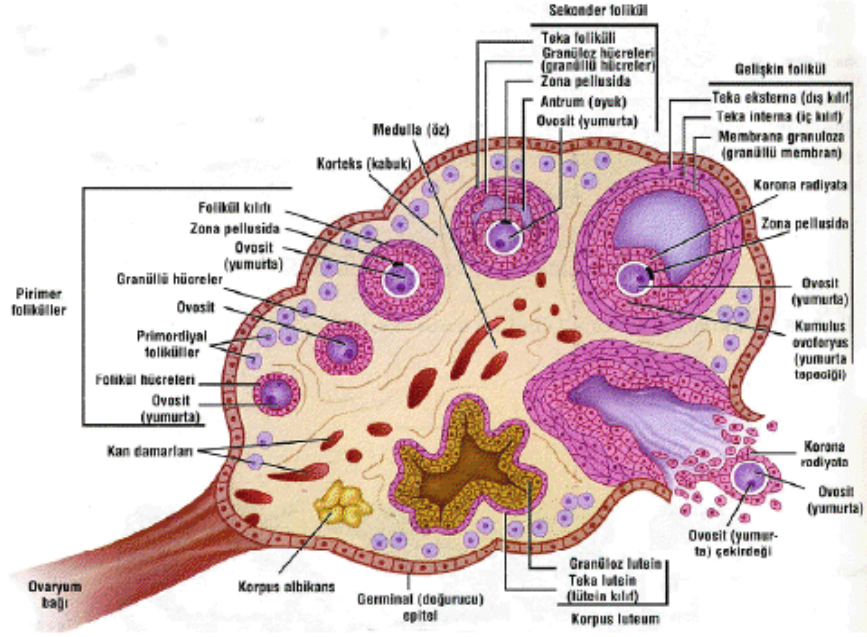
Ancak gittikçe azalır ve pubertede 400 bin kadar kalır, bunlardan ancak 400 tanesi sekonder oosit olarak ovulasyonla atılır (5,8) (Şekil 2.1.2).



Şekil 2.1.2: Fetal dönemde maximum 7 milyon'a ulaşabilen germ hücreler fetal dönemde başlayan oosit apoptoz'u ve doğumdan itibaren menopoza dek süren granuloza hücre apoptoz- folliküler atrezi ile tükenmektedirler (9).

2.1.3. Over Histolojisi

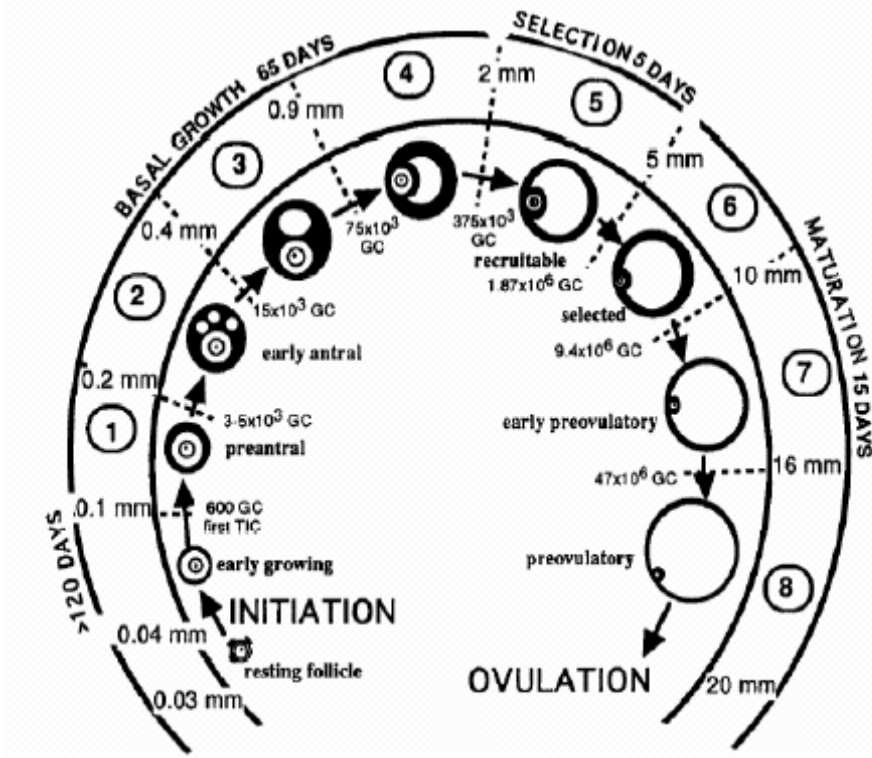
Overlerin yüzeyi tek katlı yassı ya da kübik epitelyum ile kaplıdır; bu epitel germinal epitelyum olarak adlandırılır. Germinal epitelin altında, overin beyazımsı rengini veren ve tunika albuginea olarak adlandırılan sıkı bir bağ dokusu tabakası bulunur. Tunika albugineanın altında oositleri içeren over folliküllerinin bol miktarda bulunduğu korteks yer alır. Folliküller, korteksin bağ dokusu (stroma) içinde gömülürler. Bu stroma tipik iğ biçiminde fibroblast içerir ve bu fibroblastlar, hormonal uyarılara diğer organların fibroblastlarından farklı yanıt verir. Overin en iç kısmı gevşek bağ dokusu içinde zengin bir damar yatağı içeren medüller bölgedir (Resim 2.1.3). Korteks ile medulla bölgeleri arasında kesin bir sınır yoktur.(10).



Resim 2.1.3 : Overin Histolojik Yapısı (7)

2.1.3.1 Pre-antral folükül popülasyonu

'Non-growing' folükül popülasyonu 4 tip folükülden oluşur; (I) iğsi granuloza hücreleriyle çevrelenmiş primer oositten oluşan primordiyal folükül (35.0 μm çapta), (II) iğsi ya da küboidal granuloza hücreleriyle çevrelenmiş primer oositten oluşan intermediyer folükül (38.0 μm çapta), (III) tek tabaka granuloza hücresiyle çevrelenmiş primer oositten oluşan primer folükül (46.0 μm çapta) ve (IV) Tek kattan fazla granuloza hücresiyle çevrelenmiş primer oositten oluşan sekonder folükül (77.0 μm çapta)(11). Gerçek folüküler büyüme sekonder folükül içerisinde oluşan germinal vezikül'ün 19 μm 'yi geçmesiyle başlar (12). 35 yaşına kadar her ay bekleme evresindeki folüküllerin, 'resting follicle', yaklaşık olarak 1000 tanesi büyüme sürecine geçmek üzere aktive olur ve 35 yaş üzerinde bu sayı gitgide artar ve sonunda resting follicle 100–1000 arası kalınca menopozal dönem başlar (13.14). Folüküler büyüme-gelişme şekil 2.1.3'de gösterilmiştir(11).



Şekil 2.1.3: Overdeki folüküllerin gelişimi (Gougeon, 1996)

2.1.3.2 Folliküler gelişimin başlaması

Doğumla birlikte overlerdeki folliküllerin hemen hemen tamamı primordial folliküldür. Folliküler gelişimi başlatan mekanizma net olarak anlaşılacakla birlikte bir grup faktör'ün folliküler gelişimi başlattığı tesbit edilmiştir. Bu faktörler epidermal growth factor, insulin-like growth factor, transforming growth factor, fibroblast growth factor ve siklik adenozin monofosfat (cAMP) salgılanmasını arttıran vazoaktif intestinal peptid, pituiter adenilat siklaz active eden peptid ve neurotropinlerdir (15).

Diğer taraftan **Anti-Müllerian Hormon (AMH)** ve somatostatin'in follikül büyümesini engellediği tesbit edilmiştir. Bekleme evresindeki 'resting follicle' folliküllerin ne kadar miktarlar ile aktive olacağı; bekleme havuzunda kalan follikül sayısına, testosteron seviyesine, hastanın yaşına, beslenmeye ve timus aktivitesi ile opioid peptidlere bağlıdır (16,17).

2.1.3.3 Preantral büyüme evresi veya bazal folüküler büyüme

Preantral büyüme evresine geçiş fetal dönemde başlar ve bu süreç menopoza kadar devam eder (12,15). Bu evre iğsi yapıdaki pregranuloza hücrelerinin (primordial

follikül-35.0 µm), tek katlı kübik granuloza hücrelerine (primer follikül-46.0 µm), dönüşmesiyle başlar. Bu dönüşüm ile birlikte granuloza hücreleri ve/veya oosit tarafından yapılan mukopolisakkarit tabaka olan zona pellucida oluşur(18). Primer oosit çevresindeki granuloza tabakasının 2 katı geçmesi ve ovarian stromal hücrelerin granuloza hücrelerini saran bazal lamina'nın etrafına lokalize olmasıyla primer folliküller sekonder follikül'e dönüşür (19). Sekonder follikülü oluşturan granuloza hücrelerinde FSH, östrojen ve androjen reseptörleri mevcut olmakla birlikte tam fonksiyonel değildir (19,20). Bazal lamina etrafındaki ovarian stromal hücreler theca interna ve theca externa olmak üzere 2 ayrı tabakaya farklılaşacaklardır. Theca interna hücreleri LH reseptörleri taşımaktadır. Sekonder folüküller ya büyümeye devam edeceklerdir ya da %99'unda olduğu gibi atreziye uğrayacaklardır (21).

2.1.4 Oositlerde apoptoz

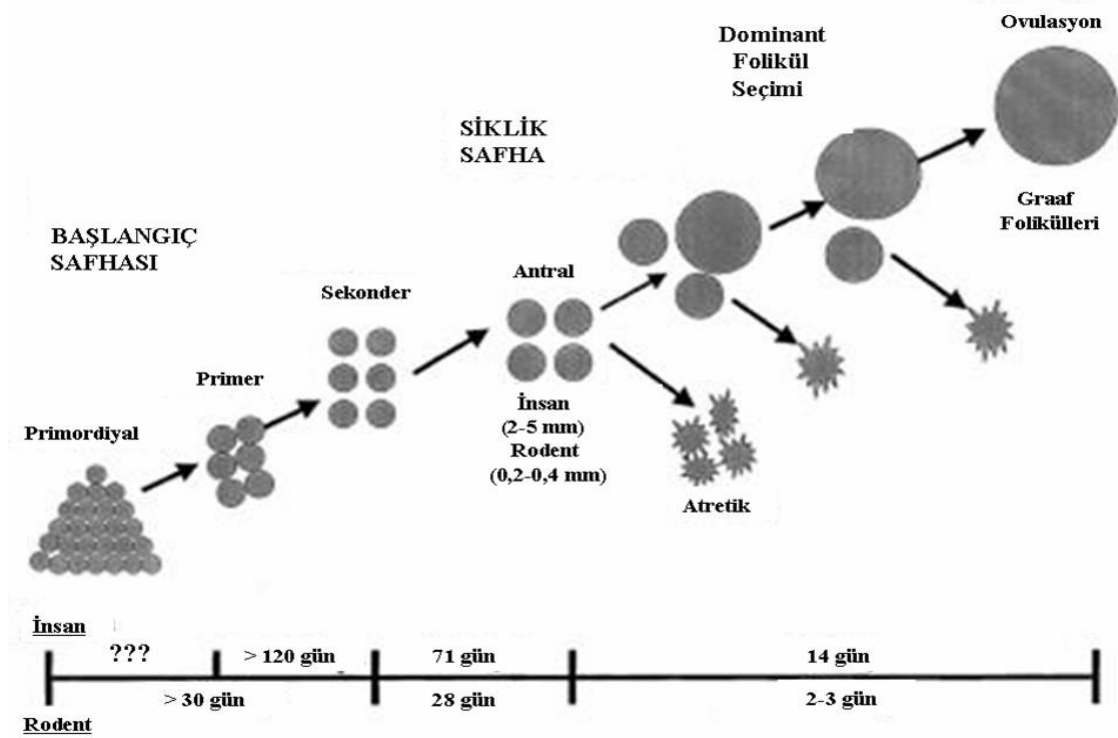
Oositlerdeki gelişim ve atrezi, apoptoz birçok moleküler mekanizma ile kontrol edilmektedir. Fizyolojik koşullar altında apoptoz, ovarian follikül'de 3 hücre tipinde görülür. *Granuloza hücrelerinde ve luteal hücrelerdeki* apoptoz sıklıkla erişkin dönemde olurken oositlerdeki apoptoz fetal hayatta gözlenir. Oositlerde apoptoz 13.haftadan başlar ve 14-20. haftalar arasında maximum seviyeye (%11-17) ulaşır (22). Bu dönemden sonra doğuma dek gitgide azalır ve postnatal oositlerde apoptoz izlenmemektedir.

Çevresel faktörler, genetik yapı, ilaç toksikasyonu, ovaryen iskemi, adneksiyel torsiyon gibi durumlarda ise overlerde hasar ve apoptoz görülebilmektedir.

2.1.5. Rodentlerde Follikül Gelişiminin Kronolojisi

Rodentlerdeki ovaryan gelişim insanlardakine benzer ancak zamanlama farklıdır. Primordiyal germ hücreleri ileri embriyonik gelişimde oogonya oluşturmak üzere gonadlara göç eder. Doğumda, rat ovaryumu kordonlardan ve oogonyalardan oluşur. Primordiyal foliküller doğumdan sonra, üçüncü günün sonunda oluşurlar (23). İlk folikül dalgasının antral foliküle kadar gelişimi üç haftayı bulur (24). İyi gelişmiş sekonder foliküller yedinci günde gözlenir. Minimal ovaryan hücre apoptozisi ancak 18. günde oluşur (23,25). Bu dönemde erken antral foliküller de gözlenir. Puberte ya da ilk östrus 34. gün civarında meydana gelir. Düzenli östrus siklusu, 10-12. aylarda düzensiz siklusların oluşumuna kadar devam eder. 12-15. ayların sonunda hayvanlar persistent siklusa girerler ve bunu persistent diöstrus ve ardından anöstrus takip eder. Folikül

gelişimi 25 µm'den (primordial folikül) 500 -800 µm (preovulatar folikül) çapa kadar, 60 günden fazla bir sürede ulaşır (yaklaşık 15 östrus siklusu). Primordiyal folikülün sekonder foliküle gelişim aşaması 30 günden uzun olabilir. Sekonder aşamadan ovulasyona kadar olan gelişim süresi $28 \pm 2-3$ gün olabilir (24). Bu durumda erken folikül gelişimi, insanlardakine benzer şekilde rodentlerde de oldukça uzundur (Şekil 2.1.5).



Şekil 2.1.5 : Rodentler ve insanlarda prepuberte ve puberte aşamasında folikül gelişimi süreleri (24).

2.1.6. Östrus Siklusu

Farelerde genital siklus (östrus siklusu) post-natal 28-42. günlerde (23,24,26) vajinal açıklığın gözlenmesiyle, vajinal smear yöntemi kullanılarak takip edilmektedir. Östrus siklusu yaklaşık 4-5 gün sürer (26-28). Fare ve ratlarda, insanlardakine benzer olarak, genital siklus çeşitli hormonlar ile kontrol edilmektedir. Östrus siklusu, proöstrus (P), östrus (Ö), metöstrus (M) ve diöstrus (D) olmak üzere başlıca 4 fazdan oluşur. Proöstrus fazı 12 saat, östrus fazı 12-24 saat, metöstrus fazı 6-8 saat, diöstrus fazı ise 52-60 saat sürmektedir (29,30,31).

Östrus siklusu boyunca cinsiyet hormonlarının siklik değişimleri vajinal epitelin histolojik görünümünde belirgin değişiklikler meydana getirir. İlk defa 1917'de

Stockard ve Papanicolou tarafından, *guinea pig*'lerde başlayan östrus siklusu çalışmalarından bugüne kadar, farklı memeli türlerinde östrus aşamalarını belirlemek için kabul edilen yöntem 'vajinal smear'dir (31,33). Bu yöntem, vajinal duvardan sürüntü alınması ya da vajinal yıkama sonucu elde edilen preparatlar üzerinde, her bir faz ile ilintili hücre tiplerinin (epitelial hücre, kornifiye hücre, lökositler) histolojik olarak tanınması esasına dayanır. Bu yöntem canlı hayatta iken, tekrarlayan sikluslara ait gözlemler için güvenilir bir kayıt sağlamaktadır. Ayrıca hayvanlarda ovulasyon zamanı, kızgınlık dönemi (davranışsal östrus) ve gebeliğin tespiti için de kullanılan pratik bir yöntemdir (29,32,34,35).

2.2. OVER REZERVİ

Over rezervi bilindiği gibi doğumdan itibaren yaşla azalmakta, 35 yaşından sonra oosit kalitesi de bozulmaktadır. Rezerv azalmasının mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Fakat çevresel faktörlerin etkisiyle oluşan *oksidatif hasar* ve hormonal dengesizliğin folikülü atreziye götürdüğü düşünülmektedir. Zarar gören yaşlı oositin hücre siklusu bozulmakta, mayotik ayrılmama, anoploid oositler, mozaisizm, gebelik kayıpları meydana gelmektedir (1).

Azalmış over rezervi, infertilitenin giderek artan önemli bir sebebidir. Over rezervi, overlerde follikülogenez ve steroidogenez fonksiyonunu yerine getirecek folliküllerin sayısını, kalitesini ve yeterliliğini tanımlamaktadır. Kadının yaşı arttıkça over rezervi primordiyal folliküllerin apoptotik kaybına bağlı olarak azalır. Aslında over rezervindeki azalma intrauterin dönemde, 20. gebelik haftasından itibaren başlayan bir süreçtir. Bu döneme kadar hızlı mitoz ile çoğalan oogoniyaların çoğalması durmakta, daha sonra sayıları azalmaya başlayarak yenidoğanda 1-2 milyona, puberte başlangıcında 300-400 bin civarına inmektedir. Bunlar arasından her ay ortalama 1000 tanesi follikülün ovulasyona gidişinin farklı aşamalarında atreziye uğramaktadır. Ancak oositlerin kayıp hızı popülasyonlara göre farklılık göstermektedir. Bu yüzden overin biyolojik yaşı kronolojik yaşını yansıtmayabilir. Over rezervi azalmış olan çoğu kadın, oositlerin prematür kaybı için risk faktörü taşımamaktadır ve menstruel siklusları düzenli olmaktadır (36,37) Çocuk sahibi olma yaşının geciktirilmesi, kadının üretkenlik potansiyelinde azalmaya sebep olmaktadır. Overin yaşlanması over rezervindeki yaşa bağlı azalmada anahtar rol oynamaktadır. Sonuç olarak primordiyal follikül sayısı azalmakta, oosit kalitesi bozulmakta, implantasyon oranı azalmakta, embriyoda

kromozomal anomali oranı ve bunun sonucunda düşük oranı artmaktadır. Zahmetli ve pahalı bir infertilite tedavi programına girmeden önce over rezervinin bir tarama testi ile değerlendirilmesi giderek önem kazanmaktadır (3).

Son yıllarda over rezervini saptamaya ve rezerv korunmasını sağlayarak menopoz yaşını artırmaya yönelik birçok çalışma yapılmaktadır. Özellikle infertilite tedavisi yapılacak hastalarda tedavi şeklinin belirlenmesi ve elde edilecek başarı şansının tahmini için over ve testislerin değerlendirilmesi gerekmektedir. Over rezervinin tayini gebelik olasılığı hakkında bilgi vermekte, tedavinin gecikmemesi, doğru planlanması ve gerekiyorsa iptal edilerek maddi ve manevi zararların önlenmesi sağlanabilmektedir. Ayrıca ovulasyon induksiyonu ve kontrollü ovarian hiperstimulasyon uygulamalarında amaçlanan sayıda folikül gelişiminin sağlanması ve ovaryan hiperstimulasyon sendromu gelişmesinin önlenmesi için uygun tedavi şeklinin, ilaç dozunun belirlenmesinde kullanılmaktadır.

Oosit fonksiyonunun regülasyonu, parakrin ve endokrin faktorlerin kontrolü ile sağlanmaktadır. Oosit gelişimini sağlayan temel endokrin hormonlar FSH ve LH'tır. Bunlar, sitokinler (interkolin A), inhibin, aktivin, büyüme faktorleri, steroidler, oosit maturasyon inhibitörü gibi lokal faktörlerin oluşumunu da içeren çeşitli mekanizmalarla etki göstermektedirler. Oositler üzerinde gonadotropin reseptörü olduğu gösterilememiştir. Bu etkinin oositler üzerine olan daha büyük olasılıkla granuloza ve teka hücrelerinden kaynaklanan mediatorler ile sağlandığı düşünülmektedir. Over fonksiyonları steroidojenik ortamdan da ileri derecede etkilendiğinden. intrafolikuler androjen ve östrojen oranı özellikle önemli olmaktadır. Örneğin androjen/östrojen oranı düşük olduğunda germinal vesikül yıkımı olmakta, oran yüksek ise de follikül dejenerasyonu meydana gelmektedir (38).

Prematür over yetmezliği etyolojisinde birçok teori öne sürülmüştür. Granuloza hücrelerine karşı oluşan otoantikolar, bozulmuş anjiogenesis, *patolojik apoptotik aktivite*, otokrin ve parakrin faktörlerin etkisi bunlardan bazılarıdır. Ayrıca ailesel yatkınlık önemlidir ve genetik temeli de olabilmektedir. Gerçekten de prematür over yetmezliği olanlarda sayısal ve yapısal kromozomal anomali görülme sıklığı artmış olarak saptanmaktadır (1).

Over rezervini etkileyen başlıca parametreler şunlardır:

1-Yaş

2-Geçirilmiş over cerrahisi

3-Şiddetli endometriosis

- 4-Obesite
- 5-Sigara icimi
- 6-Çevresel Faktörler (*Oksidatif Hasar*)
- 7-Anatomik bozukluklar (adezyon gibi)
- 8-Latent veya prematur over yetmezliği
- 9-Daha önce yardımcı üreme tekniklerine kötü yanıt

Literatürde over rezervinin prognostik olarak değerlendirilmesi için yaş, klomifen sitrat testi, bazal FSH, FSH/LH oranı, bazal E2, over volümü, Antimüllerian hormon gibi over fonksiyonlarını indirekt olarak gösteren çeşitli parametrelerle birçok çalışma bulunmaktadır.

2.2.1 Yaş:

Over rezervi yaşla direkt ilişkili olmasına rağmen çeşitli varyasyonlar olabilmektedir. Çalışmalar göstermiştir ki < 25 yaşta gebe kalamayan hastaların oranı %6 iken 36-40 yaşında bu oran %43'e çıkmaktadır. Yaş ile reproduktif potansiyel azalmasına rağmen sınırlı bir prediktif değeri bulunmaktadır (39).

2.2.2 FSH:

FSH, over folliküllerinin gelişimini uyaran gonadotropik bir hormondur. Over rezervinin azalması sonucu folliküler gelişim bozulmakta ve buna yanıt olarak kan FSH düzeyi yükselmektedir. Siklusun 2 veya 3. günü bakılan FSH değeri 12 mIU/ ml ve üzerinde ise overin ovulasyon indüksiyonu veya kontrollü ovaryan hipertimulasyona cevabı zayıf olacaktır. Bu üst sınır merkezlere göre değişebilmekle beraber en yüksek değer 25 mIU/ml kabul edilmektedir. FSH değeri sikluslar arasında dalgalanmaktadır, bununla beraber en az bir kez yüksek bulunması zayıf over rezervi yönünden anlamlıdır ve sikluslar arası farklarla over cevabında değişiklik olmamaktadır (40,41).

2.2.3. E2:

Siklusun 2 veya 3. günü bakılan E2 değerlerinin <20 pg/ml nin üzerinde olması siklus iptali riskinin yüksek olduğunu göstermektedir (42). E2 düzeyi FSH ile birlikte değerlendirildiğinde anlamlıdır ve ideal değeri <45 pg/ml'dir. Sadece bazal E2 düzeyi ile tedavi sonuçları arasında anlamlı korelasyon bulunmamaktadır. Yüksek E2, FSH üzerinde negatif feedback etkili olduğundan FSH'ın yanlış olarak düşük saptanmasına neden olmaktadır.

2.2.4. Klomifen sitrat testi :

Bu test için siklusun 3. günü FSH ve E2 ölçümü yapılır. 5-9. günlerde 100 mg/gün klomifen sitrat uygulanır, 10. günde bakılan FSH değerinin bazal değerlere göre

artmış olması, E2 değerlerinde ise anlamlı bir yükselme olmaması over rezervlerinin kötü olduğu göstermektedir.

2.2.5. Gonadotropin stimülasyonuna cevap testi (EFORT) :

Siklusun 3. günü 300 IU FSH IM uygulanır. Önce ve 24 saat sonra E2, FSH değerlerine bakılır. İyi cevap olarak değerlendirmek için artış oranları sırasıyla > 25-30 pg/ml, <9 IU/l olmalıdır (44).

2.2.6. GnRH analogu stimülasyon testi (GAST) :

GnRH analogu uygulanmasından sonra ilk 4-6. gün içinde FSH, LH ve bunlara bağlı olarak E2'de artış olur. Siklusun 2. günü 1 mg leuprolide asetat SC uygulanarak 3. gün E2 düzeyine bakılır (45). Buna flare etki denir. Uygulama zorluğu ve pahalı bir test olması nedeniyle pratik olarak kullanılmamaktadır.

2.2.7. Over volümü ve antral folikül sayısı :

Halen over rezervinin belirlenmesinde güvenilirliği yüksek testler bulunmaya çalışılmaktadır. Bu konu araştırılırken overlerin ultrasonografik görünümü ile indüksiyona verdikleri cevap arasında bağlantı olduğu görülmüştür. Over hacmi ve antral folikül sayısı artıkça over rezervinin de arttığı öne sürülmektedir. Antral folikül sayısı 6'dan az olan hastalar kötü yanıtı olarak değerlendirilmektedir (1). Lass ve arkadaşlarının 140 IVF hastasında yaptıkları çalışmada ortalama over hacmi <3 ml olan hastalarda, ≥ 3 ml olanlara göre yaş, bazal FSH düzeyleri siklus toplam oranı, kullanılan ilaç dozu anlamlı olarak artmış, toplanan oosit sayısı ise azalmış olarak bulunmuştur (46).

2.3. ANTIMÜLLERIAN HORMON (AMH)

Erken folliküler fazda yapılan FSH, östradiol ve inhibin B gibi testlerin, over rezervinin azalmasının erken evrelerinde duyarlılıkları düşüktür. Ancak over rezervindeki azalma kritik bir değere ulaştığında ve gebelik şansı önemli derecede azaldığında anormal değerlerde saptanmaktadır. Artan yaşla birlikte AMH 'deki azalma yaşla ilişkili diğer değişkenlerden daha erken ortaya çıkmaktadır. Bu da serum AMH seviyelerinin overyan yaşlanma ve menopozal geçiş için en iyi belirteç olabileceğini gösteren bir bulgudur. Over rezervinin iki yeni belirteci olan plazma Anti-Müllerian hormon ve overyan antral follikül sayısı over rezervinin en sensitif ve invaziv olmayan belirteçleri olarak görünmektedir (36,37).

Antimüllerian Hormon (Müllerian İnhibing Faktor), dimerik bir glikoproteindir.

72 kDa ağırlığında, disulfid bağlarıyla bağlanmış iki monomerden oluşmaktadır (48). AMH, inhibin, aktivin glikoproteinlerinin dahil olduğu Transforming Growth Faktor-B ailesindedir (49). Bu ailenin üyeleri mezankimal epitelyal etkileşimlerde, hücre büyümesinde, ekstra sellüler matriks üretiminde ve doku yeniden yapılanmasında önemli rol oynamaktadır. Testisten salınan AMH, erkek seksual farklılaşması boyunca Müllarian kanalların gerilemesinden sorumlu olmaktadır. Kadınlarda AMH, müllerian kanalların hormona duyarlılığını kaybetmesinden çok sonra overlerden salınır. İnsan overinde AMH, fetusta 36. gebelik haftasından sonra üretilmektedir. Kadınlarda serum AMH seviyeleri erkeklerle karşılaştırıldığında daha düşüktür. Puberte ve menstruel siklusların başlamasından sonra serum AMH seviyeleri giderek azalmakta ve menopoza civarında tamamen kaybolmaktadır. **Kadınlarda AMH sadece overlerden salınmakta** ve mRNA ile proteini küçük, büyüyen nonatretik folliküllerin (preantral ve küçük antral) **granuloza hücrelerinde** bulunmaktadır. Primordiyal folliküllerin pregranuloza hücreleri AMH salgılamamakta, ancak primordiyal folliküller büyüme havuzuna alındığında granuloza hücreleri AMH üretmeye başlamaktadır. En fazla AMH ekspresyonu büyük preantral ve küçük antral folliküllerin granuloza hücrelerinde bulunmaktadır. Follikül atretik olduğunda AMH ekspresyonu kaybolmakta, AMH ekspresyonu teka hücrelerinde, oositlerde ve overin interstisyel hücrelerinde bulunmamaktadır.

Temel çalışmalar AMH'nun folliküler hormon yapımında etkili olduğunu göstermiştir. Hayvanlardaki çalışmalar AMH'nun aromataz aktivitesini, granuloza hücrelerinde FSH'ın stimule ettiği LH reseptör sayısını azalttığı saptanmıştır. Teke hücrelerinde de testesteron yapımını azaltmaktadır. AMH'nun büyüme sırasında, preantral ve erken antral foliküllerden salındığı gösterilmiştir. AMH'nin overde follikül gelişimine etkileri çalışılmış; AMH'nin primordiyal follikül alımını inhibe ettiği, böylece overdeki folikül havuzunun erken tükenmesini engellediği ve büyük preantral ve küçük antral folliküllerin FSH duyarlılığını azalttığı, böylece büyümeye devam ederek preovulatar evreye ulaşabilecek büyük preantral ve küçük antral follikül sayısını kontrol edebildiği bulunmuştur.

Oosit kalitesi dışında, overlerde kalan primordiyal follikül sayısı da over rezervi için önemli bir parametredir. Bununla birlikte, büyüyen folliküllerin sayısı alındıkları primordiyal follikül deposunun büyüklüğü ile uyumlu görünse de, kadınlardaki primordiyal follikül deposunun büyüklüğünü direkt olarak ölçmede zorluklar bulunmaktadır. Bu sebeple, primordiyal follikül havuzundan büyüme havuzuna geçiş

yapan tüm follükülleri yansıtan bir belirteç, over rezervinin nicel olarak iyi bir indirekt belirteci olabileceği öngörölmüştür. AMH, büyüyen follüküller tarafından üretildiği için AMH'nin over rezervinin belirteci olabileceği düşünölmüştür (50, 51, 52, 53).

AMH, antral follükü sayısı ve toplanan oositler arasında ilişki olduğu gösterilmiş, bu yüzden serum AMH seviyelerinin antral follükül havuzunu yansıtabileceği düşünölmüştür. Bu ayrıca, kontrollü overyan stimulasyon sonrasında toplanması beklenen oosit sayısı ile ilişkili bir belirteç olabilmektedir. Erken follüküler faz AMH seviyeleri intrauterin dönemde üretilmeye başlanan follükül havuzundan kaynaklanmakta ve bu üretim, over rezervinin gonadotropin bağımlı belirteçlerinden bağımsız olmaktadır. Bu da AMH'yi halen kullanılan serum belirteçleri ve ultrason kullanımı ile elde edilmesi mümkün olmayan bir perspektif sağlamada önemli kılmaktadır (50,54).

Fanchin ve ark.'nın çalışmasında AMH'nin, follüküler durumun diğer belirteçleri ve izlenen gelişimi ile karşılaştırıldığında, erken antral follükül sayıları ile daha uyumlu olduğu gösterilmiştir. Bunun AMH'nin inhibin B, E2 ve FSH ile karşılaştırıldığında olası farklı regölasyonu ile ilişkili olabileceği öne sürölmektedir (54).

La Marca ve ark, serum AMH seviyelerinin menstruel siklus boyunca önemli derecede değışmediğini göstermiştir Halbuki overden salgılanan diğer tüm steroidler ve peptid (inhibin B) siklus boyunca önemli değışkenlik göstermektedir. Bu, overyan AMH salınımının endojen gonadotropinlerden bağımsız olması ile açıklanabilmektedir. Ayrıca AMH, seçilme evresine kadar olan (4-6 mm) antral follüküllerden üretilmekte ve siklusa girmeyen küçük follükül havuzunu yansıtmaktadır. Sonuç olarak, serum AMH seviyelerinin daha sabit ve tutarlı olması nedeniyle, AMH'nin over yaşlanması ve kontrollü overyan stimulasyona over cevabı için bir belirteç olarak kullanılabilmesi ve diğer over testleri ile karşılaştırıldığında, AMH'nin oosit/follükül havuzunu yansıtmada en iyi belirteç olduğu öne sürölmektedir (53).

La Marca ve ark.'nın diğer bir çalışmasında AMH serum seviyeleri, overyan stimulasyona kötü cevap veren kadınlarda normal cevap gösterenlere göre daha düşük bulunmuştur. AMH siklus iptalini tahmin etmede FSH ya da inhibin B'ye kıyasla daha iyi bir belirteç olduğu bulunmuştur. Ayrıca yüksek serum AMH seviyelerinin yüksek implantasyon ve gebelik oranları ile korelasyon gösterdiği bulunmuştur. AMH ile gonadotropinlere over cevabı arasında kuvvetli bir ilişki olduğu, AMH'nin yardımcı üreme tekniklerinde (ART) over cevabının en ayırt edici hormonal belirteci olduğu sonucuna varılmıştır (55).

Hazout ve ark., 3.gün bakılan serum AMH değeri ve IVF başarısı arasında kuvvetli ilişki olduğunu göstermiş, daha yüksek AMH konsantrasyonlarının daha fazla sayıda matur oosit, fazla sayıda embriyo ve daha yüksek klinik gebelik oranları ile ilişkili olduğunu öne sürmüştür. Çalışmaya göre, bazal AMH seviyelerinin >1.1 ng/mL olması IVF başarısına katkıda bulunmaktadır. Aksine AMH değerinin ≤ 1.1 ng/mL olması başarısızlık ile ilişkili görülmüştür. Ayrıca AMH ölçümü, ART sonucu açısından yaş, serum FSH, inhibin B ya da E2'ye göre daha yüksek prognostik değere sahip bulunmuştur (51).

Muttukrishna ve ark.'nın çalışmada kötü cevap gösteren hastalarda AMH, FSH ya da inhibin B ile karşılaştırıldığında toplanan yumurta sayısı ile en anlamlı ilişkiye sahip belirteç olarak bulunmuştur. Kötü cevabı olanlarda tek belirteç olarak AMH, over cevabının en iyi göstergesidir. FSH, inhibin B ve AMH'nin birleştirilmesi ise tahmin değerini çok az artırmaktadır (56).

Meduri ve ark., prematür overyan yetmezliği olan kadınlarda serum AMH ekspresyonunu değerlendirmiş, daha önceki çalışmalarla tutarlı şekilde, bu hastalarda overyan follikül varlığının göstergesi olarak AMH kullanılabileceğini belirtmiştir (57).

Laven ve ark., üretken çağıdaki normoovulatuvar ve anovulatuvar kadınlarda AMH serum konsantrasyonlarını değerlendirmiş, normogonadotropik anovulatuvar infertil kadınlarda erken antral follikül sayısının genellikle arttığı, bu hastalarda özellikle polikistik over sendromu (PCOS) olanlarda serum AMH konsantrasyonlarının önemli derecede yükseldiği belirtilmiştir. Bu da özellikle polikistik over sendromu olan hastalarda artmış olan küçük preantral ve erken antral follikül sayısı ile ilişkili olabildiği düşünülmüştür. AMH konsantrasyonları, bu hastalarda over disfonksiyonunun göstergesi olan LH değerleri, testosteron seviyeleri, ortalama over hacmi ve overyan follikül sayısı gibi diğer klinik, endokrin ve ultrason parametreleri ile uyumlu olduğu için AMH'nin hastalığın derecesinde yeni bir belirteç olabileceği öne sürülmüştür. Ayrıca PCOS'lu hastalarda artmış AMH seviyelerinin artmış over rezervini gösterebileceği belirtilmiştir (58).

2.4 ADNEKSİYEL TORSİYON

Adneksiyel torsiyon, sık görülmemekle birlikte akut abdominal ağrının önemli bir nedenidir ve ağır morbidite ile sonuçlanmaktadır. Jinekolojik cerrahi aciller içerisinde beşinci sırada olup, %2,7'sini oluşturmaktadır (59). Adneks torsiyonu

kadınlarda herhangi bir yaşta görülebilmektedir. Ancak genelde premenarş ve reproduktif yıllarda görülmektedir. Adneksiyel torsiyon sıklıkla alt abdomene ani, devamlı ve nonspesifik bir ağrı şeklinde kendini göstermektedir. Gecikmiş tanı ya da tanı alamayan olgular oldukça sıktır ve bu gibi durumlar overin, fallopian tüpün ya da her ikisinin kaybı ile sonuçlanabilmektedir. İzole falloian tüp ya da ooverin izlenmediği olguların tanı alamamış bir adneksiyel torsiyon sonucu gelişmiş olabileceği akılda tutulmalıdır (60,61). Ultrasonografi (USG) değerlendirmeleri ve renkli Doppler akım çalışmaları klinik semptomlar ve muayene bulgularının yanı sıra tanıda yardımcı olabilmektedir. Adneksiyel torsiyon tanısının konulması durumunda ise acil cerrahi müdahale gerekmektedir (62).

Adneksiyel torsiyonun etiyolojisi net olarak belli değildir. Olguların büyük çoğunluğunda overde bir kitle bulunmaktadır. Normal boyutlarda bir overde torsiyon mümkün olmakla birlikte oldukça nadir bir durumdur. Benign kistik teratom gibi büyük ve ağır ovaryen kitleler ve polikistik overler özellikle torsiyona meyilli olmaktadır. Ayrıca gebelik de risk faktörleri içerisinde sayılmaktadır. 5 cm'nin altındaki kistlerde torsiyon nadir görülmektedir (63).

İzole fallopian tüp torsiyon olgularında da hematosalpenks, hidrosalpenks, gebelik ve paraovaryen kistler risk faktörleri arasında sayılabilmektedir. Pelvik inflamatuvar hastalık ve pelvik endometriozis gibi durumlarda yaygın pelvik yapışıklıklara bağlı olarak torsiyon pek mümkün olmamakta ise de overde endometrioma mevcudiyatında mümkün gözükmektedir (64). Adneksiyel torsiyon destekleyici bağlar olan ovaryen ve infundibulopelvik ligamanların mobilitesi nedeniyle meydana gelmektedir. Torsiyon durumunda her iki bağ da parsiyel olarak strangüle olmakta ve bu şekilde kan akımı engellenmektedir. İlk olarak venöz kan akımı bozulmakta ve sonra arteriyel kan akımı da durmaktadır. Sonuç olarak adneksiyel ödem, renk değişikliği iskemik ve nekroz gelişmektedir. Adneksiyel hasar irreversibl olabilmektedir (65).

Uzamış iskemiler dışlandığında, overde şiddetli hasar izlenen adneksiyel torsiyon olgularının bile takipte overin fonksiyonlarını koruduğu izlenmiştir ki bu da bu olgularda arteriyel kan akımının tam olarak kesilmediğini göstermektedir. Düşük seviyede de olsa ovaryen arter ya da uterin arter yoluyla overin arteriyel akımı bir süre devam etmektedir. Bize yanlış yol gösterebilen adneksin iskemik-hemorajik, siyahımsı-mavimsi kötü görüntüsü gangrenden ziyade adneksadaki lenfatik ve venöz stazın sonucu oluşmaktadır. İnsanlarda iskeminin irreversibl hasara yol açabileceği süre konusunda bir

bilgi bulunmamaktadır (66).

Hastaların önemli bir oranında tanıda gecikilmektedir. Semptomların başlamasından tanı konulmasına kadar geçen süre saatlerden günlere kadar uzayabilmektedir. Diğer akut batın yaratan nedenlerin ayrımı güç olabilmekteyse de erken tanı ve müdahale ile en erken dönemde overde gelişebilecek irreversibl hasarın önüne geçilmesi gerekmektedir (67).

Adneksiyel torsiyonun klasik bulguları akut alt abdominal ağrı, peritoneal irritasyon ve palpabl bir adneksiyel kitle varlığından oluşmaktadır. Bulantı ve kusma oldukça sık olup %70'inde görülebilmektedir. Ateş yüksekliği de bulgu olarak karşımıza çıkabilmektedir (67). Bouguizane ve ark, hastaların sadece %57,8'inin ilk muayene sırasında tanı alabildiklerini bildirmişlerdir.

Cohen ve ark, ise adneksiyel torsiyon ön tanısıyla yapılan 66 laparoskopiyi değerlendirmişlerdir. Adneksiyel torsiyon 29 (%44) olguda tespit edilmiştir. Bu yüksek yanlış pozitifliğe rağmen şüphelenilen her olguya laparoskopi yapılmasını önermektedirler. Çünkü tanıda gecikme de overin kaybı ile sonuçlanabilmektedir. Şunu da belirtmekte fayda vardır; gözleme alınan hastalarda ilerleyici sinir ve doku hasarı sonucu ağrı kaybolabilmektedir (67).

Adneksiyel torsiyonda spesifik bir laboratuvar bulgusu bulunmamaktadır. Beyaz küre sayısında artış izlenebilmekte ise de lökosit sayısı ile doku nekrozu arasında bir ilişki bulunmamaktadır. Ultrason değerlendimesi adneksiyel torsiyonda önemlidir ve tanıda genellikle ilk başvuru yöntem olmaktadır. Ultrasonografik olarak, tomografide ya da manyetik rezonans görüntüleme (MRG)'de spesifik bir görüntü olmasa da nerdeyse tüm olgularda pelvik bir kitle izlenebilmektedir (65). Bilgisayarlı tomografi ve MRG'de adneksiyel torsiyon düşündürülecek bazı bulgular vurgulanmıştır. Bunlar, fallopian tüpte kalınlaşma, torsiyone adneksiyel kitle duvarında hafif kalınlaşma, asit ve uterusun torsiyone tarafa deviyi olmasıdır (68).

Doppler akım çalışmaları yaygın olarak çalışılmıştır. Azalmış ya da kayıp adneksiyel kan akımı, adneksiyel torsiyon için uyarıcı olabilmekteyse de sadece Doppler USG'de kan akımının kaybı ya da azalmasının izlenmesiyle tanı konulamamaktadır (69).

Operasyon esnasında reperfüzyonu görebilmek amacıyla operasyonu uzatmanın bir faydası bulunamamıştır. Salpingooferektomi sadece adneksiyel bozulmanın çok bariz olarak izlenebildiği ligamanlarda ayrılmanın gözlemlendiği ya da overin parçalandığı ve dağıldığı olgularda yapılması önerilmiştir.

İskemik ve ödemli adneks detorsiyon yapmanın yanlış ve tehlikeli olduğu tromboembolik hadiselerle neden olabileceği şeklinde yanlış bir inanış bulunmaktadır. Fakat bu literatürde de gösterilememiştir. 1909'dan bu yana detorsiyon sonrası emboli olduğunu bildiren rapor bulunmamaktadır (70). Adneksiyel torsiyon sonrası pulmoner emboli insidansı % 0.2'dir ve detorsiyon sonrası bu riskte bir artış gözlenmemektedir (66).

Ovaryen torsiyonun tekrarlanması nadir bir durumdur; bu nedenle ovaryen fiksasyon rutin bir prosedür olarak uygulanmamaktadır. Zaten oöferopeksinin fertilité üzerine etkisi konusunda henüz yeterli bir bilgi bulunmamaktadır. Fakat eğer torsiyon tekrarlırsa özellikle polikistik overlerde olduğu gibi ovaryen fiksasyon önerilmektedir (71). Fonksiyonel over kistleri nedeniyle torsiyone olan olgulara bu tip kistlerin tekrarını önlemek için oral kontraseptifler verilmektedir (72).

2.5. İSKEMİ REPERFÜZYON

İskemi kelimesi ilk defa Yunanca "iskho" (engelleme anlamıyla) ve "hàima" (kan anlamında) olarak kullanılmıştır. İskemi, kan akımının dokuya gitmesinin engellenmesi veya kan basıncındaki düşme sonucu glikoz ve oksijenin dokuya dağıtımındaki ve metabolik artıkların dokudan uzaklaştırılmasındaki zayıflama ile meydana gelen patolojik bir durumdur (73).

İskemik hasarın giderilmesi için bu kritik zaman dilimi içinde dokunun tekrar oksijen ile beslenmesi gerekmektedir. İskemi oluşmuş dokunun kan akışının tekrar sağlanmasına reperfüzyon denilmektedir. İskeminin kritik süresi dolmadan, doku reperfüze edilirse hücreler ölümden kurtulabilmektedir. İskemi süresinin uzaması reperfüzyona rağmen ölüm riski olan hücrelerin sayısını artırmakta ve bu hücreler geri dönüşümsüz doku hasarı fazına girdikleri için reperfüze edilseler bile nekroza gitmektedirler. Reperfüzyon hasarının büyük bölümünden serbest radikaller sorumlu tutulmaktadır.

İskeminin ilk etkisi mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyon üzerine olmaktadır. İskemik dokuda en büyük hasar reperfüzyondan sonra meydana gelmektedir (74). Oksijen basıncının azalması sonucu oksidatif fosforilasyon ile ATP üretimi azalmakta ve hücre içi ATP miktarı belirgin olarak düşmektedir. ATP miktarındaki azalmanın hücre içindeki birçok sisteme etkisi olmaktadır. Örneğin sitoplazmik serbest kalsiyum normalde ATP bağımlı kalsiyum taşıyıcıları ile hücre içinde oldukça düşük

yoğunlukta tutulmaktadır. İskemiden kaynaklanan ATP miktarındaki azalma sonucu, ATP bağımlı kalsiyum taşıyıcıları görevini yapamamakta ve hücre dışı kalsiyum plazma membranından geçerek hücre içinde kalsiyum yoğunluğunun artmasına neden olmaktadır. Bunu hücre içi stoklardan kalsiyumun serbest bırakılması izlemektedir. Artan sitoplazmik kalsiyum sıra ile fosfolipazları, proteazları, ATPazları ve endonükleazları aktifleştirmektedir. Bu enzimler de lipit, protein, ATP ve nükleik asitleri parçalayarak hücrenin ölümünü (apoptozis) hızlandırmaktadır (76).

Yine iskemi sırasında ATP'nin yıkımı sonucu hipoksantin ve ksantin gibi pürin metabolitleri birikirken ksantin dehidrojenaz enzimi ksantin oksidaza çevrilmiştir. Reperfüzyon esnasında sisteme ani O₂ girişi, birikmiş pürinlerin çok süratli bir şekilde oksidlemesine ve sonuç olarak urat ve süperoksit anyonu oluşumuna neden olmaktadır. Oluşan süperoksit anyonu, endotelde demir tarafından katalize edilen reaksiyonlar ile toksisitesi yüksek hidroksil radikali üretimine neden olmaktadır (76).

Hücrel ATP de azalma ile birlikte adenozin monofosfattaki (AMP) artma da fosfofruktokinaz enzimini uyararak glikojenden ATP üretimi ile hücrenin enerjisini temin amacıyla gelişen anaerobik glikoliz hızını artırmaktadır. Sonuç olarak glikojen hızla tükenmekte, artan glikoliz de fosfat esterlerinin hidrolizi ile laktik asit ve inorganik fosfatların birikimine neden olarak hücre içi pH'nın düşmesine yol açmaktadır (77). Daha sonra ribozomlar, granüllü endoplazmik retikulumdan ayrılmakta ve polizomlardan monozomların oluşumu ile protein sentezi de azalmaktadır. Bu aşamadan sonra iskemi hala devam ederse irreversibl zedelenme gelişmektedir. Morfolojk olarak irreversibl zedelenmeye mitokondrilerin daha şiddetli vakuolizasyonu ve mitokondri matriksinde şekilsiz, kalsiyumdan zengin yoğunlukların birikimi eşlik etmektedir (77).

Bir veya daha çok sayıda eşleşmemiş elektron içeren serbest radikaller biyomolekülleri okside edip hücre ölümüne sebep olabilmektedirler (78,79). Hücrelerde serbest radikallerin birikimi sonucu lipit peroksidasyonunun bir ürünü olan malondialdehit (MDA) birikmektedir. MDA proteinler ile birleşir ve onlar da yüksek moleküllü protein oluşumu (agregasyon), disülfid köprülerinin oluşumu, deamidasyon ve nonenzimatik glikozilasyon gibi postsentetik değişimlere neden olmaktadır.

Organizmada serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere antioksidan savunma sistemleri bulunmaktadır. Bu sistemin düzenli işlemesi organizmanın sağlıklı yaşamını sürdürmesi bakımından önemli olduğu bilinmektedir. Ancak, iskemi sonrasında yüksek miktarda oksijenin süratli bir şekilde sisteme dahil olması sonucunda serbest radikal miktarındaki artış doğal savunma sistemini aşmakta ve sonuçta hücre

hasarına (nekroz, apoptozis) kadar giden bir çok patolojik durum ortaya çıkmaktadır (80,73).

Hücre apoptozisinden sorumlu önemli bir enzim Kaspaz-3 (apopain), 13 farklı üyesi bulunan interlökin β grubundan olup sistenin proteaz enzimi olarak bilinmektedir. Kaspaz-3, 17 ve 12 kDa molekül ağırlığına sahip iki alt birimden oluşmaktadır. Aktif kaspaz-3 enzimi özellikle DNA tamir ve regülasyonunda görev alan enzimler ve nükleer lamin gibi moleküllerin parçalanması ve sonuçta apoptozis (programlanmış hücre ölümü) olayında önemli rol oynamaktadır (80).

Membran hasarının birçok potansiyel nedeni bulunmaktadır (şekil 2.5.1).

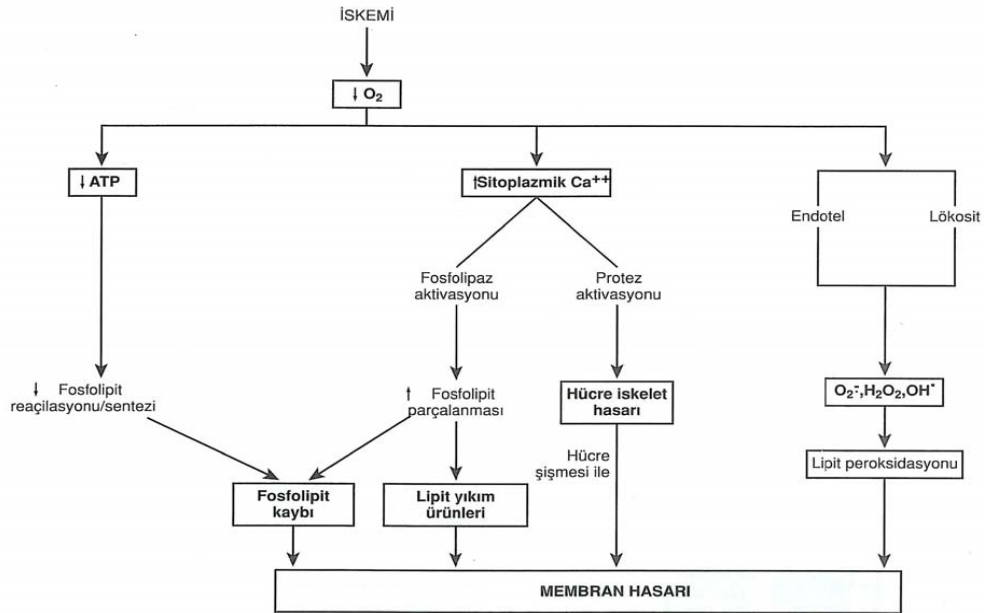
1-Membran fosfolipitlerinin ilerleyici kaybı

2-Hücre iskelet anormallikleri

3-Toksik oksijen radikalleri: Toksik oksijen türevlerinin büyük ölçüde reperfüzyon sırasında zedelenme alanına gelen polimorf nüveli lökositler (PMNL) tarafından oluşturulduğu düşünülmektedir.

4- Lipit yıkım ürünleri:

Membran hasarının mekanizmaları ne olursa olsun sonuç, yukarıda tanımlanan olaylarla kalsiyumun bol miktarda hücre içine girmesidir (77).

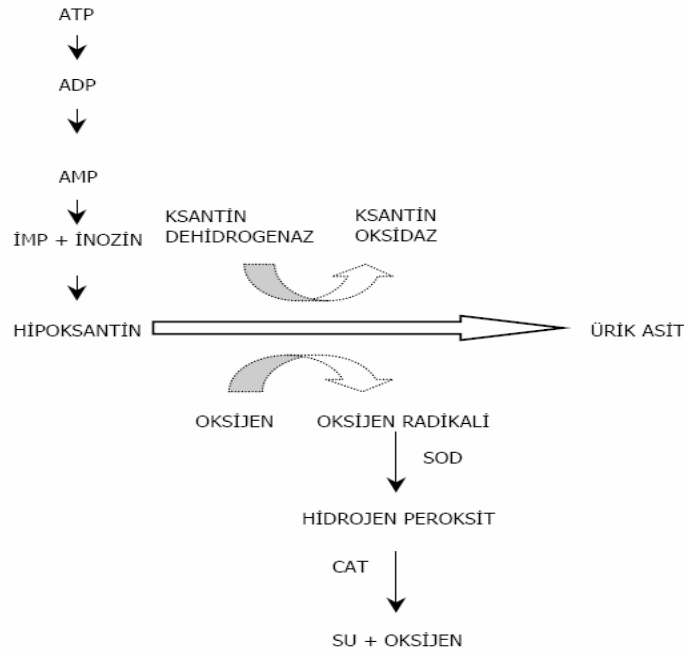


Şekil 2.5.1: İskemide membran hasarının mekanizmaları.

Reperfüzyon ile moleküler oksijenin dokuya gelmesiyle hipoksantin, ksantin oksidaz enzimi ile ürik aside çevrilirken serbest oksijen radikali oluşmaktadır. Serbest oksijen radikali süperoksit dismutaz (SOD) enzimi etkisiyle hidrojen peroksit ve

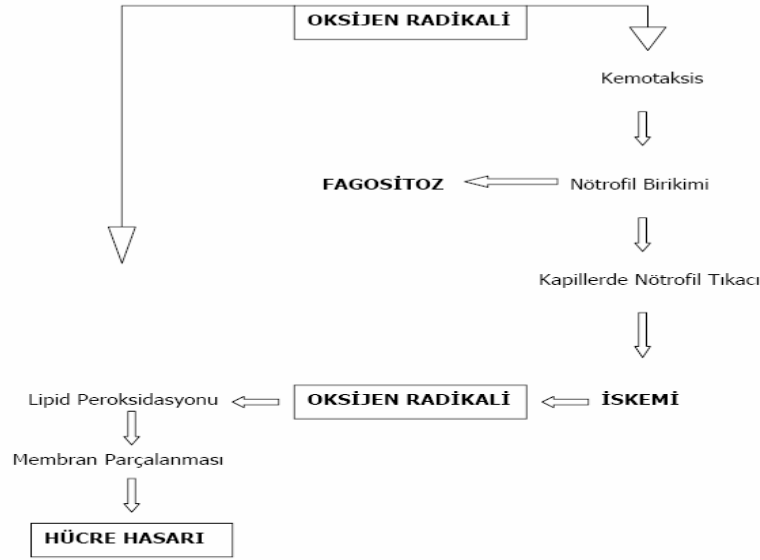
oksijene dönüşmektedir. Hidrojen peroksit ise katalaz enzimi etkisiyle su ve oksijene çevrilmektedir (81) (şekil 2.5.2). Serbest oksijen radikalleri hem dokuya doğrudan zarar vermekte hem de PMNL'lerin hasarlı dokuda birikmesini sağlamaktadır. Dokuya gelen aktive PMNL'ler myeloperoksidaz, elastaz, proteaz, kollajenaz, laktoferrin ve katyonik proteinler gibi enzimlerini açığa çıkarmaktadır. Bu enzimler hem dokudaki hasarı artırır, hem de daha fazla radikal oluşmasına neden olmaktadır (81,82) (şekil 2.5.3).

İskemik dokuda nötrofil infiltrasyonun stimüle olduğu ve nötrofil infiltrasyonu sonucunda O_2^- , H_2O_2 , OH^- gibi serbest oksijen türevlerinin açığa çıkararak doku hasarına sebep olduğu bilinmektedir. Hücrelerin membranlarının lipid ve protein yapıları hasara uğramazsa hücrelerin normal fonksiyonları devam ettiği bilinmektedir (84).



Şekil 2.5.2: İskemide purin metabolizmasının gelişimi ve ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza çevrilmesi, reperfüzyonda oksijen radikalinin oluşumu.

Serbest oksijen radikalleri (ROS), proteinler, polisakkaridler, nükleik asitler ve doymamış yağ asitleri gibi tüm biyolojik maddeler ile reaksiyona girebilmektedir. Oksijen radikalinin en karakteristik özelliği hücre membranındaki doymamış yağ asitlerinden metilen hidrojen atomunu ayırmasıdır. Bu reaksiyon hücre membranında lipid peroksidasyonunu başlatmakta ve ortaya konjuge dienler, lipid hidroperoksid radikalleri ve lipid hidroperoksidler gibi lipid türevi radikaller çıkmaktadır. Lipid peroksidasyonunun son ürünlerinin **malondialdehit(MDA)** ve diğer aldehydler, hidrokarbon gazlar ve konjuge dienler olduğu bilinmektedir (84,85).



Şekil 2.5.3: Serbest oksijen radikalinin dokudaki doğrudan ve dolaylı etkileri.

İskemi ve reperfüzyon hasarında ayrıca platelet aktive edici faktör (PAF) ve komplemanlar da rol oynamaktadır. ROS'nin endotel hücrelerini PAF üretimi yapma üzere stimüle ettiği de gösterilmiştir. PAF potent bir nötrofil agonisti olarak görev yapmaktadır. İskemi reperfüzyon hasarında PAF, nötrofil adezyonunu artırmakta ve lökositlerin ekstrasvazasyonuna katkıda bulunmaktadır.

Poliansatüre yağ asitleri serbest radikal etkilerine duyarlı olmalarına karşın protein ve nükleik asitler bu zararlı etkilere karşı daha dirençli olmaktadır. Bunun başlıca sebebi, şiddetli hasar oluşturucu zincirleme reaksiyonların protein ve nükleik asid moleküllerinde gerçekleşme ihtimalinin çok zayıf olmasıdır. Serbest radikaller DNA molekülüne çok yakın bir bölgede meydana geliyorsa, okside edici radikaller tarafından DNA molekülü kolaylıkla hasara uğratılabilmektedir (86).

Endotel hücreleri tarafından oluşturulan 3 önemli koruyucu ajan prostasiklin, nitrik oksit ve adozin olduğu bilinmektedir (87). Prostrasiklin vazodilatasyon yapan, nötrofil adherensini önleyen, trombosit agregasyonunu inhibe eden ve lizozomal membranları stabilize eden potent bir eikosanoiddir (88). Yarı ömrü 1-2 dakikadır ve etkilerini adenilat siklazı aktive edip böylece cAMP yapımını artırarak göstermektedir.

Nitrik Oksit (NO), endotel hücrelerinde kalsiyum ve calmoduline bağımlı bir enzim olan NOS ile oluşturulmaktadır (87). NO'nin etkileri guanilat siklazın aktivasyonu ve böylece cGMP oluşumu ile düzenlenmektedir (89). Biyolojik yarı ömrü prostasiklinden daha kısa olup 10-20 saniyedir. NO endotel hücreleri tarafından oluşturulan süperoksit radikallerini nötralize etmekte, vazodilatasyon yapmakta,

trombosit adherensini inhibe etmektedir (87, 89, 90). Bir serbest radikal olan (NO^\bullet) hem fizyolojik hem patofizyolojik süreçlerde önemli rolü oynamaktadır. Nitrik oksit sentaz (NOS) sinir dokuda, vasküler endotelde, trombositlerde ve diğer dokularda bulunmaktadır. Nitrik oksit sentazın (NOS), nöronal NOS (tip I, nNOS), endotelial NOS (tip III, eNOS) ve indüklenebilir NOS (tip II, iNOS) olmak üzere farklı lokalizasyon ve düzenlenmeye sahip üç izoenzimi bulunmaktadır.

Nöronal NOS (tip I, nNOS) ve **endotelial NOS (tip III, eNOS)**, Ca^{2+} ve kalmodulin bağımlı esas izoformlardır. Nöronal NOS (tip I, nNOS), nöral iletide foksiyon görmektedir.

Endotelial NOS (tip III, eNOS) böbreklerde bulunmaktadır. Endotelial NOS (tip III, eNOS) vasıtasıyla oluşturulan nitrik oksit (NO^\bullet), vasküler düz kas hücrelerinin relaksasyonu için en önemli sinyal olmaktadır.

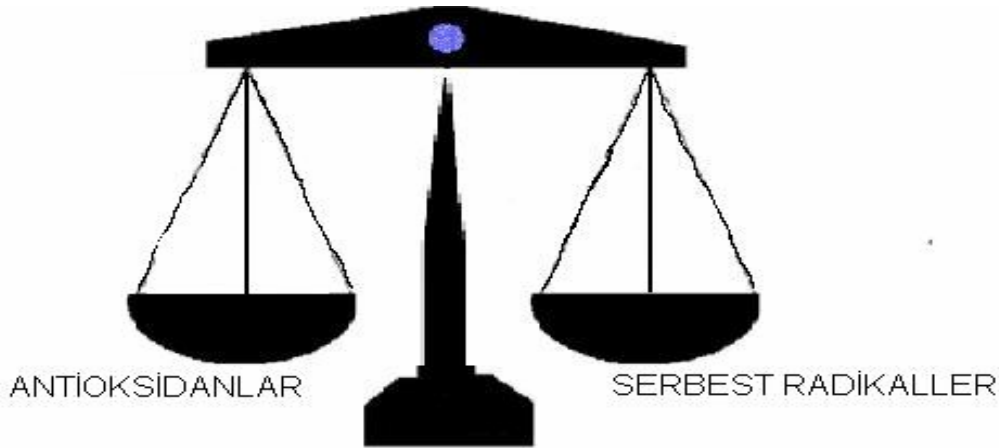
İndüklenebilir NOS (tip II, iNOS) normal şartlar altında bulunmamaktadır. İnflamasyon veya enfeksiyon durumlarında sitokinler veya endotoksinler tarafından indüklenir ve uzun dönemde bol miktarda üretilmektedir.

Nitrik oksit (NO^\bullet) Fe-S proteinlerinden demiri çıkararak yerine kendisi bağlanmakta, böylece Fenton reaksiyonunu stimüle etmekte ve bu mekanizma ile karsinogeneziste rol oynamaktadır. Nitrik oksitin süperoksit dismutaz (SOD) enzimiyle yarışmaya girmesi ve süperoksit ($\text{O}_2^{\bullet-}$) radikaliyle etkileşmesi sonucu peroksinitrit (ONOO^-) oluşmaktadır. Böylece nitrik oksitin fizyolojik etkisi inhibe edilmekte, oksidatif etkisi ortaya çıkmaktadır. Vasküler tonüsün düzenlenmesi için süperoksit ($\text{O}_2^{\bullet-}$) ve nitrik oksit (NO^\bullet) arasındaki fizyolojik dengenin önemli olduğu ileri sürülmektedir.

2.6. SERBEST RADİKALLER

Serbest radikaller son yörüngelerinde eşleşmemiş elektron bulunması sebebiyle kolayca elektron alışverişi yapabilmektedirler. Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transportu sırasında oluşmaktadır. Serbest radikaller organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilmektedirler. Cu^{+2} , Fe^{+3} , Mn^{+5} ve Mo^{+5} gibi geçiş metallerinin de ortaklanmamış elektronları olduğu halde bu metaller serbest radikal

olarak kabul edilmemektedirler. Fakat bunlar serbest radikal oluşum reaksiyonlarında katalizör olması sebebi ile önemlidir.



Şekil 2.6.1: Antioksidan-serbest radikal dengesi

Serbest radikal reaksiyonları, normal metabolik yolların işleyişlerinin doğal bir sonucu oluşmaktadır. Oksidan moleküller organizmada başlıca glikozun oksidasyonu olmak üzere tüm anabolik ve katabolik reaksiyonlar sırası ve sonrasında sürekli oluşmaktadır. Endojen antioksidanlar adı verilen moleküller tarafından sürekli etkisiz hale getirilmektedirler. Bu oluşum ve etkisizleştirme olayları organizmalarda bir denge halinde olmaktadır (Şekil 2.6.1) (91).

Serbest radikal molekülleri, belirli düzeyde kaldıkları sürece, organizmanın yabancı maddelere ve enfeksiyöz ajanlara karşı savunmasındaki önemli moleküllerdir. Ancak, serbest radikaller belirli düzeyin üzerinde oluşmakta ve antioksidanlar yetersiz kalırsa söz konusu serbest radikaller hücrenin yapı elemanları olan protein, lipit, karbohidrat, nükleik asitler ve yararlı enzimlerin yapılarını bozarak zararlı etkilere yol açmaktadırlar (92). Bunlardan özellikle lipitler, serbest radikal hasarına karşı en hassas yapı olmaktadır. Serbest radikaller yağ asitlerindeki doymamış bağlarla kolayca reaksiyona girerek lipitlerin peroksidasyonuna neden olmaktadır (93).

Serbest radikal moleküller; organizmadaki bir çok olağan hücresel tepkimenin (enerji üretimi, lipitlerin ve proteinlerin paçalanması ile inflamatuvar süreçler bunlar arasında yer almakta) yan ürünü şeklinde sürekli oluşmaktadır. Hücrelerin çoğunluğu, olağan koşullar altında kendilerini serbest radikallerin hasar verici etkilerine karşı koruyacak hücre içi ve hücre dışı kimyasal mekanizmalarla donatılmışlardır. Radikal moleküller, antioksidan savunma gücü ile dinamik bir denge içinde bulunduğu sürece organizma için yararlı olmaktadır. Örneğin; fagositik hücreler tarafından

mikroorganizmaların öldürülmesinin ana mekanizması serbest radikal üretimidir.

Serbest radikaller apoptozisin tetikleyicisi, habercisi ve efektörü olarak görev yapmaktadırlar. Bu şekilde aşırı hücre poliferasyonunu önleyerek homeostaziste yer almaktadırlar. Antioksidan savunmanın çökmesi de apoptozisi tetiklemektedir. Serbest radikaller ikinci haberci olup, transkripsiyon faktörlerini aktive etmektedirler. Hücreler arası haberleşmede görev almakta, hücrenin büyümesini sağlayan olayları düzenlemektedirler. Sitozolda ve mitokondride üretilen serbest oksijen radikali, protein sistein kalıntılarının redoksunu düzenleyerek proteinlerin yapı ve işlevinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Serbest oksijen radikalleri üretimi ve antioksidatif savunma mekanizması arasındaki denge bozulduğunda, serbest oksijen radikalleri düzeyi artmaktadır. Radyasyon, oksijen toksisitesi, *postiskemik reperfüzyon hasarı*, enfeksiyonlar, enflamasyonlar yanı sıra yaşlanma ile ilgili hastalıklardan ateroskleroz, karsinogenez, diyabet ve nörolojik hastalıklar serbest oksijen radikalleri üretimini arttırmaktadır (91, 94).

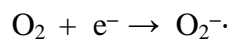
Serbest oksijen radikalleri, hücrenin önemli komponentleri olan lipit, karbohidrat, protein ve DNA'yı oksitleyerek biyolojik sistemlerde ağır hücre zedelenmelerine neden olmaktadır (94,95). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan serbest radikallerdir. Serbest oksijen metabolizmasındaki anahtar maddeler şunlardır.

1. Süperoksit anyonu (O_2^-)
2. Hidrojen peroksit (H_2O_2)
3. Hidroksil radikali (OH^-)
4. Oksijenin kendisi (O_2)
5. Geçiş metallerinin iyonları (Cu^{+2} , Fe^{+3} , Mn^{+2} vb.)

2.6.1. Reaktif Oksijen Türleri

2.6.1.1. Süperoksit Radikali (O_2^-) :

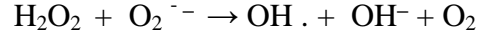
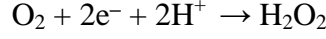
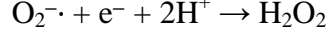
Doğal oksijen molekülünün bir elektron alması ile oluşmaktadır. En büyük kaynağı elektron transport zinciridir (96).



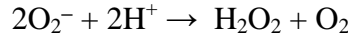
Süperoksit radikali bir serbest radikal olmakla birlikte hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metallerini indirgemesi bakımından da önemlidir.

2.6.1.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) :

Moleküler oksijenin iki elektron veya süperoksidin bir elektron alması sonucu oluşan hidrojen peroksit, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikaline kolayca yıkılmaktadır.



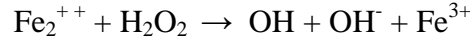
Hidrojen peroksit genellikle biyolojik sistemlerde süperoksidin dismutasyonu ile spontan olarak veya **Süperoksit Dismutaz (SOD)** katalizörlüğünde oluşmaktadır.



Hidrojen peroksit süperoksida benzer, reaksiyondaki ortama bağlı olarak hem oksidan hem de redüktan gibi davranabilmektedir.

2.6.1.3. Hidroksil Radikali (OH[·]):

Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucu veya hidrojen peroksitin geçiş metalleri varlığında indirgenmesi ile (Fenton Reaksiyonu) oluşmaktadır. Yarılanma ömrü çok kısa olup son derece reaktiftir.



2.6.1.4. Singlet Oksijen

Ortaklanmamış elektron olmadığından radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonu sonucu gelişebileceği gibi serbest radikal reaksiyonunun başlamasına da yol açabilmektedir. Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde dönmesi sonucu oluşmaktadır.

2.6.2. Hücredeki Serbest Radikal Kaynakları

2.6.2.1. Endojen Kaynaklar

1. Mitokondrial elektron transportu
2. Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri (sitokrom p-450, sitokrom b5)
3. Peroksizomlar: Oksidazlar, flavoproteinler
4. Aktive fagositler ve makrofajlar
5. Otooksidasyon reaksiyonları: Fe⁺⁺, adrenalin
6. Plazma membranı: Lipoksigenaz, prostoglandin sentetaz, fagositlerde NADPH

oksidaz, lipid peroksidasyonu

7. Yaşlanma

2.6.2.2. Ekzojen Kaynaklar:

1. Aşırı oksijen konsantrasyonu (Hiperoksi)
2. Alışkanlık yapan maddeler: Alkol, uyuşturucu, sigara
3. Çevresel etkiler: Radyasyon, hava kirliliği
4. Stres: Katekolaminlerin oksidasyonu ise serbest radikal kaynağıdır.
5. Antineoplastik ilaçlar: Bleomisin, Doxorubicine, Adriamicine

2.6.3. Reaktif Oksijen Türevlerinin Rolü:

Günümüzde serbest oksijen radikalleri terimi yerine, daha kapsamlı olan ve hem süperoksit, hidroksil gibi oksijen içeren radikallere hem de aslında radikal olmayan ancak reaksiyonları ile oksijen içeren radikallerin oluşumuna neden olabilen peroksit, singlet oksijen, hipoklorik asit gibi molekülleri içine alan reaktif oksijen ürünleri (ROS) terimi daha yaygın olarak kullanılmaktadır (97).

Yukarıda da belirttiği gibi iskemik dokuların reperfüzyonu toksik ROS oluşumuna yol açmaktadır. Bunlar süperoksit anyonlar (O_2^-), hidroksil radikalleri(OH \cdot), hipoklorik asit (HOCl), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve nitrik oksitten derivate peroksinitrittir (98) . Oksijen kökenli serbest radikaller aracılığı ile oluşan hücre hasarında başlangıç olay ksantin oksidaz kökenli süperoksit anyonlarının üretilmesidir (99) . İskemi sırasında sellüler ATP hipoksantin oluşturmak üzere degrade edilmektedir. Normal koşullarda hipoksantin, ksantin dehidrogenaz yardımıyla ksantine oksidize edilmekte, bununla birlikte iskemi sırasında ksantin dehidrogenaz ksantin oksidaza dönüştürülmektedir. Substrat olarak nikotinamid adenin dinükleotid kullanan ksantin dehidrogenazın tersine ksantin oksidaz oksijeni kullanmakta ve bundan dolayı iskemi sırasında hipoksantin ksantine dönüşümünü katalize edememekte ve bu da hipoksantin dokuda aşırı seviyelere çıkmasına yol açmaktadır. Reperfüzyonla oksijen tekrar sunulduğunda fazla miktardaki hipoksantin ksantin oksidaz ile reaksiyona girmesi toksik ROS oluşumu ile sonuçlanmaktadır (98) (Şekil 2.5.2).

Sellüler ve subsellüler membranların lipid peroksidasyonu da oksijen kökenli serbest radikallerin artırdığı hücre hasarında önemli bir mekanizmadır (100). Hücre membranları içerisinde poliansatüre yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu, hücresel bütünlük ve fonksiyon kaybı ile sonuçlanabilmektedir. Bu durum tek başına hidroksil

radikalleri ile başlatılabileceği gibi, uygun bir şelatör varlığında O_2^- ile de başlatılabilmektedir. Lipid peroksidasyonu, bitişik yağ asiti moleküllerinde otokatalitik bir zincir reaksiyonu suretiyle lipid peroksil radikallerinin oluşumuna neden olabilmektedir. OH radikalleri ilave olarak proteinler ve DNA'nın direk oksidasyonuna neden olabilmektedir. Bu aşamada enzim inaktivasyonu ve DNA ipliklerinin kırılması söz konusudur (100). Bu gibi DNA hasarı hem hücre ölümü hem de hücrelerin malign değişiminde rol almaktadır. Serbest radikaller ayrıca sülfidril aracılı protein çapraz bağları oluşturarak parçalanmanın artmasına veya enzimatik aktivitenin kaybolmasına neden olmaktadır.

2.7. ANTIOKSİDANLAR

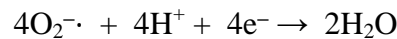
Aerobik canlılarda serbest oksijen radikalleri, normal metabolik olaylar esnasında oluşmaktadır. Serbest radikaller, aşırı miktarlarda üretildikleri zaman serbest radikallere bağlı hasarlar ortaya çıkmaktadır. Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir.

2.7.1. Doğal (Endojen) Antioksidanlar

2.7.1.1. Enzimler

2.7.1.1.a Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi:

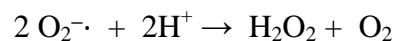
Solumun zincirinin son enzimi sitokrom oksidaz aşağıdaki reaksiyonla süperoksidi detoksifiye etmektedir.



Bu reaksiyon normalde sürekli devam etmekte, böylece yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol enerji üretimi sağlanmaktadır. Ancak süperoksid üretimi çoğu zaman bu enzimin kapasitesini aşmakta bu durumda diğer antioksidanlar devreye girmektedir.

2.7.1.1.b Süperoksid dismutaz (SOD):

Süperoksid dismutaz, süperoksidin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen enzim olup üç formu bulunmaktadır.



1. Cu-Zn SOD: Cu ve Zn içeren dimerik tip sitozolde bulunur, siyanidle inhibe olur.

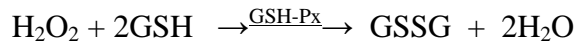
2. Mn-SOD: Mn içeren tetramerik tip mitokondride bulunur, siyanidle inhibe olmaz.

3. Ekstrasellüler CuZn SOD (101,102).

Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda özellikle eritrositlerde fazladır. Normal metabolizma sırasında süperoksit üretimi fazla olmasına rağmen SOD sayesinde intrasellüler süperoksit düzeyi düşük tutulmaktadır.

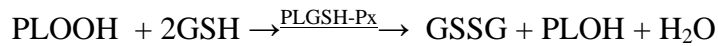
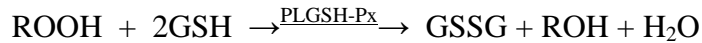
2.7.1.1.c Glutatyon Peroksidaz(GSH-Px) :

Glutatyon peroksidaz hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir.



GSH-Px; tetramerik, dört **selenyum** atomu içeren sitozolik bir enzimdir.

Membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirgemektedir.



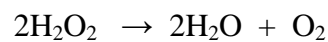
Membrana bağlı en önemli antioksidan olan vitamin E yetmezliğinde PLGSH-Px membranı peroksidasyona karşı korumaktadır. Hidroperoksitlerin redükte olmasıyla meydana gelen GSSG, glutatyon redüktazın katalizlediği reaksiyonla tekrar GSH' ye dönüşmektedir (103).



GSH-Px solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engellemektedir. Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı antioksidandır. GSH-Px aktivitesinde azalma hidrojen peroksitin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açmaktadır (103).

2.7.1.1.d Katalaz (CAT):

Dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Görevi hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalamaktır. Eritrositler yüksek oranda katalaz içermekte olup, katalaz aktivitesinin %98'den fazlasını sağlamaktadır.

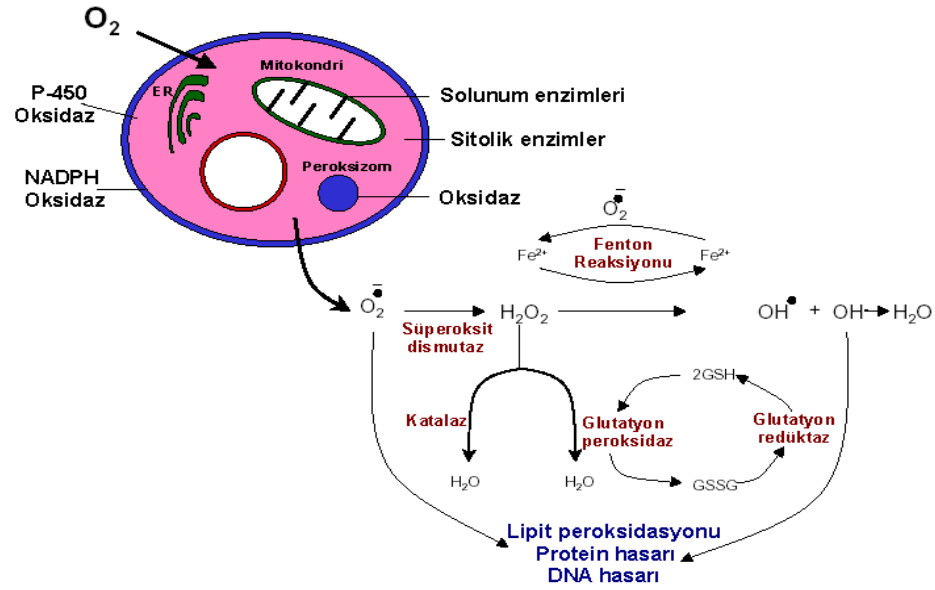


Peroksidaz aktivitesi yanında bir hidrojen peroksiti elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan ve elektron alıcısı olarak kullanabilmektedir.

2.7.1.1.e Glutasyon-S-transferaz (GST) :

Özellikle araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı GST'lar selenyum bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek bir savunma mekanizması oluşturmaktadırlar. GST'lar antioksidan fonksiyonları yanında karaciğerde sitokrom p-450 enzim sistemi ile detoksifikasyona katkıda bulunmaktadır. Ayrıca hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcısı, prostoglandin izomeraz etkisi, LTC₄(Lökotrien C₄) sentezi ve genotoksik ajanların detoksifikasyonu gibi rolleri bulunmaktadır (104).

2.7.1.1.f Hidroperoksidad



Şekil 2.7.1. İskemideki serbest radikal mekanizması (75).

2.7.1.2 Enzim Olmayanlar

2.7.1.2.1. Lipid fazda bulunanlar : α-tokoferol ve β-karoten

2.7.1.2.2. Sıvı fazda (hücre sitozolünde veya kan plazmasında bulunanlar):

Askorbik asit, melatonin, ürat, sistein, seruloplazmin, transferin, laktoferrin, myoglobin, hemoglobin, ferritin, metiyonin, albümin, bilirubin, glutasyon.

2.7.2. Diğer Antioksidanlar

Karotenoidler, Melatonin, Glutasyon, Ürat, Sistein, *Selenyum*, Albümin, Serüloplazmin

2.7.3 Ekzojen Antioksidanlar

İlaçlar:

-Ksantin Oksidaz İnhibitörleri:

- Soya fasulyesi inhibitörleri:
- NADPH Oksidaz inhibitörleri:
- Rekombinant Süperoksid dismutaz
- Trolox-C: E vitamini analogudur.
- Endojen antioksidan aktiviteyi arttıran maddeler: GSH-Px aktivitesini arttıranlar (**Selenyum** ve asetilsistein)
- Diğer nonenzimatik serbest radikal toplayıcıları: Mannitol, albümin
- Demir redoks döngüsü inhibitörleri: Desferroksamin, seruloplazmin
- Demir şelatörleri
- Nötrofil adhezyon inhibitörleri

2.8. BİR ANTIOKSIDAN OLAN SELENYUM

2.8.1 Selenyum

Selenyum, insan ve hayvanların normal gelişimini sürdürebilmeleri için gerekli olan, toprak, bitkiler ve suda farklı bileşimlerin yapısına giren esansiyel iz elementlerden biridir (108). Vücudun en önemli antioksidan enzimi olan glutatyon peroksidazın (GSH-Px) bir komponentidir. Selenyum (Se) biyolojik bir siklusla topraktan bitkilere, hayvanlara, insanlara geçmektedir. Organizmada eser miktarda bulunduğu için dışardan alınması gerekmektedir (108). Asıl kaynağı toprak olduğu için besin ve yemlerdeki selenyum düzeyi topraktaki miktarlarıyla doğru orantılı olarak değişmektedir (109). Şayet topraktaki selenyum miktarı yeterli düzeyde ise bu toprakta yetişen bitkilerle beslenen hayvan ve insanlarda selenyum düzeyi yeterli olurken, toprakta selenyum yetersizliği olan bölgelerde ise, yetersizlik belirtileri ortaya çıkmaktadır.

Selenyum, bitkilerde selenometionin, Se-metil-selenometionin, selenosistin ve selenosistein (109, 110), hayvan dokularında ise genellikle selenometiyonin ve selenosistein olarak bulunmaktadır (111). Böbrek, karaciğer, iskelet kasları, et, deniz ürünleri ve tüm tahıllar genel olarak iyi bilinen selenyum (>0,2 ppm Se) kaynaklarıdır. Meyve ve sebzeler selenyum açısından zayıf (0,01 ppm Se) kaynaklardır (108, 111).

2.8.2 Selenyumun Emilim, Dağılım ve Atılımı

Selenyum ince bağırsaklarda duodenum-ileum ve ileum-sekum arasındaki bölgelerden emilmektedir. Ruminantlarda abomasum ve rumenden de emilmektedir (112). Emilen selenyum plazma proteinlerine bağlanarak taşınmakta ve ulaştığı

dokuların yapısına girmektedir. Plazma proteinlerine bağlanarak kemik, saçları içine alan tüm vücut dokularına özellikle de böbrek, karaciger, kalp, pankreas dokularına ayrıca süt proteinlerine, eritrosit ve lökositlere taşınmaktadır (108, 113). Selenyum ruminantlarda dışkıyla, tek mideli hayvanlarda ise idrarla atılmaktadır. Vücuttaki atılım oranları besinlerdeki selenyum miktarı, hayvan türü ve veriliş yoluna göre değişiklik göstermektedir (114). Selenyum ağız yoluyla alındığında dışkı ile enjeksiyon şeklinde verildiğinde idrar ile, toksik dozlarda alındığında ise fazla miktarları solunum yoluyla atılmaktadır (115).

2.8.3 Selenyumun Fizyolojik Fonksiyonları

Selenyum, vücudun en önemli antioksidan enzimi olan GSH-Px'in bir komponenti olması nedeniyle, lipidlerin oksidasyonu sonucunda oluşan peroksitlerin yıkılmasında önemli rol oynamaktadır. Böylece, hücre zarlarının bütünlüğünün sağlanması ve korunmasında etkin fizyolojik bir görev üstlenmektedir (116, 117, 118). Bir selenoprotein olan GSH-Px en fazla karaciğer ve eritrositlerde, daha az düzeyde ise kalp, mide, adrenal bezler, akciğer, böbrek, adipoz doku, beyin, lens, iskelet kası ve testislerde aktivite göstermektedir (118, 119). Eritrosit hemolizini ve serbest radikaller tarafından oksidasyonunu önlemektedir (121, 121). Selenyum immunolojik olarak nonspesifik hümmoral ve hüccesal bağışıklıkta da etkili olmaktadır (119, 122, 123).

Selenyumun fizyolojik görevlerinden biri de, E vitamini taşıyıcısı olmasıdır. E vitaminin bozulmasının önlenmesinde, emiliminde rolü olduğu ve buna bağlı olarak da selenyumun biyolojik etkinliğini arttırmasında etkili olabileceği belirtilmektedir (108). Genel olarak seleno-enzimlerin oksijen metabolizması, detoksifikasyon olayları, kanser hücrelerindeki apoptozisin indüklenmesi ve hücre bölünmesinin kontrolünde görev aldıkları bilinmektedir (124). Selenyum ile kanser arasındaki ilişkiler araştırıldığında, insanlarda fizyolojik düzeylerdeki selenyumun kanserojen olmadığı, hatta antikanserojen etki gösterdiği, kanserli hastaları ölüm oranı ile kan selenyum düzeyleri arasında negatif önemli bir ilişki bulunduğu belirtilmiştir (108).

2.8.4 Selenyum Yetersizliği ve Fazlalığı

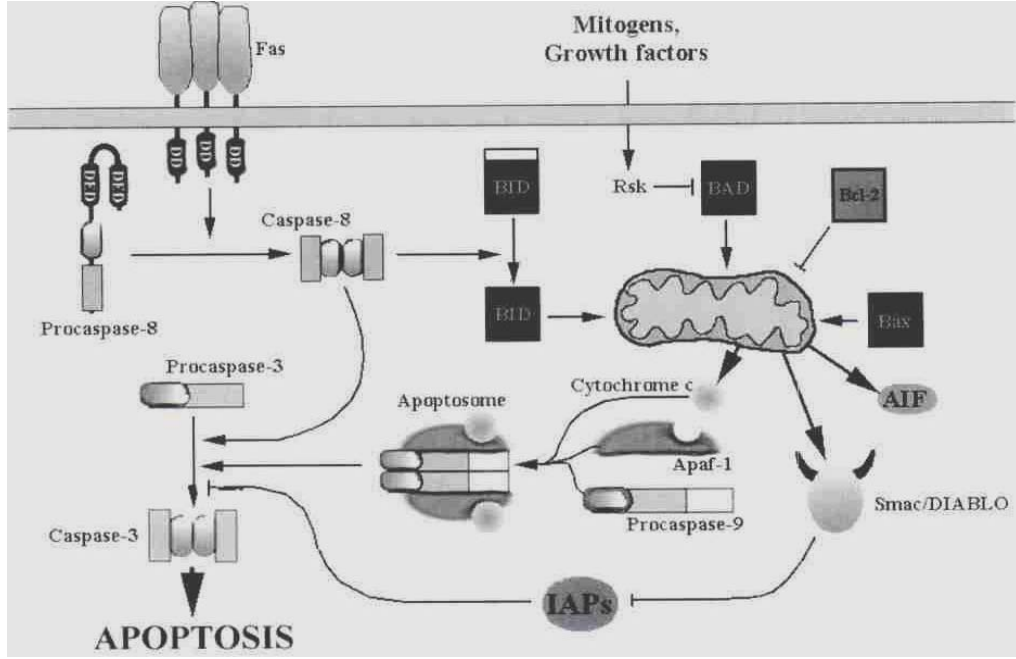
Selenyumun fizyolojik dozları immunolojik cevabı arttırdığı, yetersizliği durumda ise immun yetmezliklere neden olduğu ifade edilmektedir. Selenyum yetersizliği durumunda mikrobiyal ve viral enfeksiyonlara karşı direncin, antikor üretiminin, fagositik hücre fonksiyonlarının ve mitojenlere karşı B ve T lenfositlerin

proliferasyonlarının azaldığı belirtilmektedir (123). Selenyum yetersizliği olan hayvanlarda oluşturulan deneysel enfeksiyonlarda, bu hayvanların enfeksiyonlara karşı dirençsiz oldukları, hayvanlara selenyum verilmesi halinde ise enfeksiyonlara karşı daha dirençli hale geldikleri kaydedilmiştir (125). Selenyum yetersizliğine bağlı olarak evcil hayvan ve insanların çoğu dokusunda dejeneratif bozukluklar, üreme ve büyümede aksaklıklar ve kardiovasküler hastalıklara karşı hassasiyet artışı gözlenebilmektedir (125). Sığırlarda karaciğer nekrozu, testislerde dejenerasyon, gelişmede yavaşlama, böbreklerde tubüler dejenerasyonlar şekillenmektedir. Dokularda en uygun GSH-Px etkinliğinin oluşabilmesi için alınan besinlerdeki selenyum düzeyinin 0.10-0.20 µg/g değerleri arasında olması gerektiği açıklanmaktadır. Ratlarda selenyumun toksik dozu, oral 4.8-6.0 mg/kg, intravenöz 5.7 mg/kg, intraperitoneal 3.-3.5 mg/kg olarak belirtilmiştir (118).

İnsanlarda selenyum zehirlenmesinde; nefesin sarımsak kokusu vermesi, iştahsızlık, durgunluk, bulantı gibi belirtiler görülmektedir. Selenyumun toksik dozlarının alınmasıyla hayvanlarda kronik seyirli veya akut öldürücü etkiler görülmektedir. Akut selenyum zehirlenmesinde körlük, karın ağrısı, salivasyon, dış gıcirtısı ve değişik derecelerde felçler meydana gelmekte ve hayvan solunum yetmezliğinden ölmektedir (108, 111).

2.9. APOPTOZİS

Hücre ölümünün, farklı morfolojik özellikli iki tipi vardır; birincisi nekroz diğeri ise apoptozistir. Apoptozis, patolojik ya da çevreden gelen fizyolojik uyarılara karşı hücrel bir cevap olarak ortaya çıkmaktadır. Embriyonik gelişim sürecinde hücrelerin lokal olarak ortadan kaldırılmasından sorumlu olduğu ve normal hücre döngüsünde fizyolojik bir olay olduğu bilinmektedir. Apoptozis dokuda tek tek hücrelerin azalmasıyla gözlenen bir hücre ölümüdür. Bu deyim Yunanca APO (ayrı) ve PZOTİS (düşmek) kelimelerinden oluşmuştur. “*Sonbaharda ağaç yapraklarının tek tek düşmesi ve ağacı terk etmesi* “ anlamındadır (127). Apoptozis uzun yıllardan beri bilinmesine rağmen, nekrozdan farklı özgün ve önemli bir hücre ölüm şekli olarak değerlendirilmesi son yıllara dayanmaktadır. Özellikle 1990’dan sonra apoptozisi pozitif veya negatif yönde düzenleyen proteinlerin belirlenmesindeki hızlı gelişmeler apoptozisi moleküler biyolojinin popüler konularından biri haline getirmiştir (127). Şekil 2.9.1.



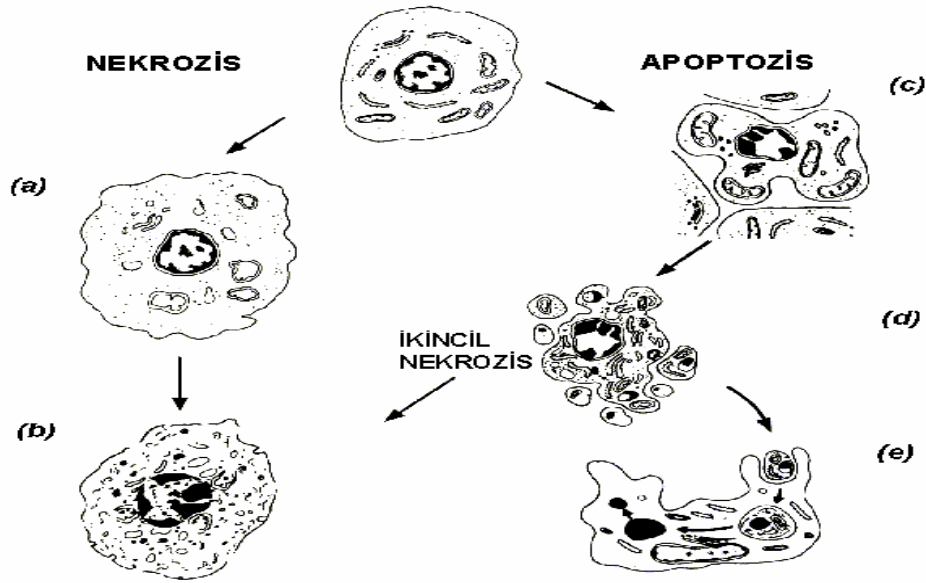
Şekil 2.9.1: Apoptosis'in çok basamaklı kontrolü

Apoptozis vücutta aşağıdaki olaylarda görülmektedir:

1. Embriyogenez ve metamorfoz (implantasyon ve organogenez)
2. Bağırsak kripta hücreleri gibi sürekli çoğalan hücre gruplarında hücrelerin azaltılması
3. İmmün hücrelerin seçimi
4. Tümör hücrelerinin regresyon aşamasındaki ölümü
5. Hormon bağımlı dokularda hormonun kesilmesinden sonra oluşan atrofi
6. Viral hepatit gibi bazı viral hastalıklarda hücre hasarı oluşması
7. T hücresi ile oluşan sitotoksik hücre ölümü
8. Yaşlanma sırasında
9. Radyasyon ve antikanser ilaçların sitotoksik etkisinin gerçekleşmesi (128, 129).

Yaşayan organizmada iki temel hücre ölümü vardır: Apoptozis ve nekrozis. Apoptozis'te çok odaklı, tek tek hücre ölümü olmaktadır. Bu, programlanmış hücre ölümüdür ve geriye dönüşümü olmamaktadır. Fizyolojik ya da patolojik uyarılar ile düzenlenmektedir. Oluştugu bölgede diğer hücre yapılara zarar vermemekte, herhangi bir inflamasyona neden olmamaktadır. Apoptozis'te çekirdek kromatini yoğunlaşmış, hücre büzülerek küçülmüş, çekirdek içi DNA kırılmıştır. Sitoplazmadaki organellerin bütünlüğü korunurken, bunların bir araya gelerek yoğunlaştıkları gözlenmektedir. Mitokondrilerin yapısı sağlamdır. Büzülen hücre parçalanmakta, apoptotik cisimler açığa çıkmaktadır. Apoptotik cisimler membranlarla korunmuş DNA parçalarını içermektedir. Bu cisimler makrofajlarca ya da komşu epitel hücrelerince

yutulmaktadır (Şekil 2.9.2.) (131).



Şekil 2.9.2 : Apoptozis-Nekrozis (www.critpath.org/aric/library/art006.htm)

Canlı dokuda nekroz, patolojik hücre ölümüdür ve hücre yaralanmalarında ortaya çıkmaktadır. Nekroza genel örnek olarak dokuların anoksik kalması ve CCl₂ ile ölümleridir. İlerleyen yapısal ve metabolik değişiklikler görülmekte, sonuçta hücrelerin membran bütünlüğü bozulmakta ve hücre parçalanmaktadır. Koagülasyon nekrozu, yapısal ve enzimatik proteinlerin koagülasyonu ile karakterlidir. Hüresel proteinlerin denatürasyonuna (iskemi, hipoksi, anoksi, travma, kimyasal etkenler) bağlı gelişmektedir. Kollikasyon nekrozu ise protein denatürasyonundan önce hidrolitik enzimlerin etkisi ile dokuda erimenin olduğu nekrozdur. Nekroz geriye dönüşü olmayan bir olaydır. Nekrozda enerji ve madde metabolizmasında düzensizlik bulunmaktadır. Metabolik değişikliklere yapısal değişiklikler eşlik etmektedir. Nekrozun ortaya çıktığı bölgede inflamatuvar olaylar bulunmaktadır (131).

2.9.1. Apoptozisin özellikleri

Ölümcül bir uyarıdan sonra apoptozisin başlama süresi, hücre tiplerine göre değişiklik göstermektedir. Bununla birlikte bütün hücre tiplerinde, apoptozise ait morfolojik değişiklikler benzer olup oldukça hızlıdır (2-4 saat). Çekirdek, sitoplazma ve hücre yüzeyinde meydana gelen değişiklikler birbiri ile uyumlu görünmektedir. Bu değişiklikler üç aşamada gerçekleşmektedir. Birinci aşamada, çekirdek ve hücre yoğunlaşması, ikinci aşamada, hücre tomurcuklanmasını takiben “apoptotik cisimciklerin” oluşumu ve son safha ise bu cisimciklerin fagositozudur (131). Apoptotik

hücrelerde meydana gelen karakteristik morfolojik değişiklikler en iyi elektron mikroskopunda (EM) belirlenebilmektedir. Apoptoziste EM incelemede yapısal değişiklikler iki evrede incelenmektedir. Apoptotik cisimlerin oluşması ve bunların makrofajlar ya da diğer komşu hücreler tarafından fagosite edilmesidir. Başlangıçta apoptozise gidecek olan hücreler komşu hücrelerden ayrılmakta, yüzey organelleri kaybolmaktadır. DNA, endonükleaz enzimlerinin aktive olmasıyla 180-200 baz çifti uzunluğunda, internükleozomal bağlantı noktalarından kırılmaya başlamaktadır. DNA'nın bu kırılması agar jel elektroforezinde tipik merdiven görünümü vermektedir. Parçalanmaya bağlı olarak çekirdek kromatini dağılmakta ve bu çekirdek kromatini, çekirdek zarındaki porları kapatacak şekilde yerleşim göstermektedir. Çekirdek zarı parçalanmakta, sitoplazmik proteinlerin yoğunlaşması ve hacmin azalmasına bağlı olarak hücrede büzülme ortaya çıkmaktadır. Hücre zarında çıkıntılar ve kıvrımlar oluşmaktadır. Buna karşılık mitokondrilerin yapısında önemli bir değişiklik görülmemektedir. Endoplazmik Retikulum (ER) genişlemekte ve hücre zarı ile birleşerek yüzeyde kraterler oluşturmaktadır. İkinci evrede hücre zarında büzüşmenin artması ve bunu takiben hücre parçalanması görülmektedir. Parçalanmış, zarla çevrili yuvarlak konumdaki bu yapılara "apoptotik cisim" denilmektedir (131).

Apoptotik cisimlerin bir kısmı yoğun olarak hücre organellerini içerirken, bir kısmında çekirdek kalıntıları yer almaktadır. Apoptotik cisimler genellikle hücreler arası alanlarda gözlenmektedirler. Apoptotik cisimler hızlıca makrofajlar tarafından fagosite edilmektedirler. Fagosite edilmeyen apoptotik cisimler daha sonra şişmekte ve dejenere olmaktadır. Bu olay nekroz ile aynıdır. "Sekonder nekroz olarak" olarak isimlendirilmektedir. Apoptozis sırasında hücre içi makromoleküller dışarı çıkmadığından herhangi bir inflamatuvar cevaba neden olmamakta ve komşu hücrelerde zarar oluşturmamaktadır (132).

Apoptozis olan hücrelerde bir gen ya da genlerin aktivasyonu söz konusudur. Apoptotik olayları yöneten genlerdeki mutasyon bir takım hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (133). Apoptozisin başlaması için çekirdek onkoproteinlerinin uyarılması gerekmektedir. Onkoproteinlerden c-fos ve c-jun ekspresyonuna bağlı olarak lenfoid hücrelerde apoptozis açığa çıkmaktadır. Normal hücre ölümünde görev yapan iki gen; Ced-3 (interleukin -1 β converting enzim) ve Ced-4'ün apoptoziste çok önemli işlevleri olduğu bilinmektedir. Apoptoziste bu genlerin birbirlerinden bağımsız hareket ettiği gözlenmiştir (sgmhs.ac.uk/depts/immunology/rudsh/apoptosis/intro.html).

Tümör baskılayıcı bir diğer gen 17. kromozomun kısa kolunda yer alan p53 genidir.

Kanserli hastaların %80'inde mutasyona uğradığı bilinmektedir. Normal işlev gören p53 geni hücrede apoptozisin açığa çıkmasını kolaylaştırmaktadır. (131).

2.9.2. Apoptozis morfolojisi

Aşağıdaki yapısal değişiklikler apoptozise uğrayan hücreler için karakteristiktir:

- 1. Hücre büzüşmesi:** Apoptotik hücre diğerlerinden daha küçük, sitoplazma yoğun, organeller normal olmalarına rağmen daha sıkışık bulunmaktadır.
- 2. Kromatin yoğunlaşması:** Apoptoziste en karakteristik olaydır. Çekirdek zarının altında kromatin yoğunlaşarak, çepere değişik şekil ve büyüklükte yapılar halinde yapışmaktadır. Çekirdeğin kendisi parçalanarak iki veya daha çok bölüme ayrılabilir. (77).
- 3. Sitoplazmik balonlaşmanın ve apoptotik cisimciklerin oluşumu:** Apoptotik hücre ilk olarak yüzeyde ileri derecede balonlaşma yapmakta ve ardından sitoplazma, yoğun organel, çekirdek parçası içeren veya içermeyen, apoptotik cisimcikler olarak adlandırılan parçalara ayrılmaktadırlar. (77).
- 4. Apoptotik hücreler ve cisimciklerin fagositozu:** Çevredeki parankim hücreleri veya makrofajlar tarafından meydana gelmektedir. Apoptotik cisimcikler hızla lizozom içerisinde parçalanmaktadır. Çevredeki hücreler ortadan kaybolan apoptotik hücrenin yerini almak üzere yer değiştirmekte ve çoğalmaktadır (77).
- 5. Plazma membranı apoptozis sırasında son evrede geçirgen hale gelinceye kadar sağlam kalmaktadır (77).**

Bu yapısal değişiklikler embriyogenez ve immün hücrelerin yok olması sırasındaki apoptozis olayı göz önüne alınarak tanımlanmıştır (134, 136). Uyarının derecesi hücre ölümünün hangi tipte gerçekleşeceğini belirlemektedir. Nekrotik etki baskınsa, erken dönemde plazma membranı hasarı ile sitoplazmada büzüşme yerine şişme görülmektedir (77).

Hematoksilen eozin ile boyanan dokularda yapılan histolojik incelemede apoptozisin tek hücreyi veya hücreler topluluğunu tuttuğu görülmektedir. Apoptotik hücre eozinofilik sitoplazma ve yoğun çekirdek kromatini parçaları içeren yuvarlak veya oval kitleler halindedir (135).

Hücre büzüşmesi ve apoptotik cisimciklerin oluşumu çabuk geliştiği, parçalar hızla fagosite edildiği, bölündüğü ve lümene atıldığı için, histolojik kesitlerde görülmeyen oranda apoptozis meydana gelmektedir. Ek olarak apoptozis, nekrozdan farklı olarak inflamasyona yol açmamakta, bu nedenle tespit edilmesi güçleşmektedir.

2.9.3. Apoptozis mekanizması

Apoptozis hücre ölümünü tetikleyen pek çok sinyal tarafından başlatılabilmektedir. Örneğin; büyüme faktörü ve hormon yokluğu, pozitif ligand-reseptör etkileşimi, spesifik hasara yol açan ajanlar bunların içindedir (131). Hücre büyümesi ile apoptozis arasında koordinasyonlu, fakat sıklıkla ters bir ilişki mevcuttur. Apoptozis normal hücre sayısının yoğunluğunu düzenlemede önemli rol oynamakta, hücre ölümünün baskılanması kanser gelişimine yol açabilmektedir. Apoptozis belli uyaranlar sonucu oluşan, enerjiye bağımlı moleküler olaylar döngüsünün son noktasıdır ve dört aşamadan oluşmaktadır (131).

1. Apoptozisi başlatan sinyal yolları

2. Kontrol ve integrasyon: İntraselüler pozitif ve negatif düzenleyici moleküller, apoptozisi inhibe ve stimüle etmek yoluyla hücrenin akibetini belirlemektedir.

3. Ortak infaz fazı: “caspase” ailesinden proteazlar tarafından yönetilen ölüm programını içerir (“caspase”: “c” sistein proteaz mekanizmasını, “aspase” aspartik asit amino asitinden ayırma kabiliyetini belirtir).

4. Ölü hücrenin fagositoz yoluyla ortadan kaldırılması

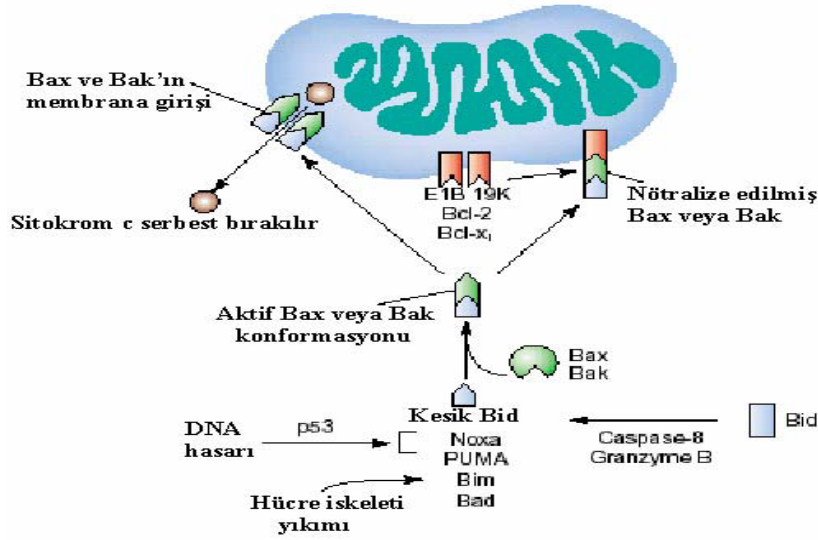
2.9.5. Apoptoziste rol alan proteinler

2.9.5.1. p53

Bir tümör supresör geni olan p53, insan kanserlerinde en fazla mutasyon görülen genidir. p53 geni karsinojen, sitostatik ajan, radyasyon, ultraviyole ışığı, *hipoksi* veya onkogenler gibi çeşitli uyaranlar ile indüklenebilmektedir. Bunun sonucu olarak, transkripsiyon faktörü olan p53 proteini, hücre siklusunun durdurulmasında ve apoptoziste rol oynayan birtakım genlerin ekspresyonunu arttırmaktadır (138).

2.9.5.2. Bcl-2

Apoptozis döngüsü işlevini iki esas mekanizma ile görmektedir. Birincisi “caspase” yolu, ikincisi ise mitokondrium disfonksiyonu ile tanımlanan organel disfonksiyonu yoludur. Bcl-2 ailesi ve üyeleri, mitokondri düzeyinde işlev gören ve apoptoziste çok önemli rol oynayan moleküllerdendir(Şekil 10.5.2) (139).



Şekil 2.9.5.2. Bcl'nin apoptoziteki

2.9.5.3. Kaspazların ve Apoptoz

Bir düzineden fazla proteazı içeren, aktif bölgelerinde sistein (Cys) içerdiği ve substratı olan proteinleri aspartik asitten (Asp) sonra kestiği için **kaspazlar** olarak bilinen aile, apoptozda önemli rol oynamaktadır. Kaspazlar programlı hücre ölümünün en son efektörleridir. Kaspazların ana hedefleri arasında bir DNAaz inhibitörü yer almakta ve aktive edildiği zaman DNA'nın parçalanmasından sorumlu olmaktadır. Ek olarak nükleer laminleri keserek, çekirdeğin parçalanmasına yol açmakta ve hücre iskeleti proteinlerini keserek hücre iskeletinin bozulmasına, hücre zarının tomurcuklanmasına ve hücre parçalanmasına neden olmaktadır (139).

Kaspazlar, inaktif öncüller olarak sentezlenmekte ve genellikle diğer kaspazlar tarafından katalizlenen proteolitik kesim ile aktif şekle dönüşmektedir. Başlatıcı kaspazın aktivasyonu böylece aşağı yöndeki diğer prokaspaz aktivasyonunu ve hücre ölümünü sağlayan bir zincirleme reaksiyonu başlatmaktadır. Bu nedenle kaspazların düzenlenmesi hücre sağ kalımının belirlenmesi için yaşamsaldır. **Apaf-1** kaspazlara bağlanmakta ve onların aktivasyonunu uyarmaktadır. **Bcl-2** ailesi olarak adlandırılan bir protein kodlanmakta. Bcl-2 ailesinin bazı üyeleri, Bcl-2 de dahil, kaspaz aktivasyonu ve programlanmış hücre ölüm inhibitörleri olarak işlev görmektedirler. Bcl-2 ailesinin diğer üyeleri kaspaz aktivasyonunu uyarmakta ve programlanmış hücre ölümünü başlatmaktadır. Kaspazlarda **apoptoz protein inhibitörleri (IAP)** denilen, apoptozu baskılayan bir protein ailesi tarafından düzenlenmektedir.(140).

Apoptozu Başlatanlar; C-2, C-8, C-9, C-10 iken

Apoptozu Yürütenler; C-3, C-6, C-7 'dir.

Sitokin Aktivasyonu Yapanlar; C-1, interleukin-1 beta converting enzim (ICE), C-4, C-14, C-5, C-11, C-12 'dir.

Başlatıcı kaspazlardan birisi olan **kaspaz-9** aktive edilmektedir. **Apaf-1** ile kompleks oluşturmakta ve bu kompleksin oluşumu, apoptozu tetikleyen uyarılar ile mitokondriden salınan **sitokrom-c**'ye ihtiyaç duymaktadır. Hücre sağ kalımının normal koşullar altında, sitokrom c mitokondri zarları arasında boşlukta yerleşmiş iken **apaf-1** ve **kaspaz-9** sitozolde bulunmakta, böylece **kaspaz-9** inaktif kalmaktadır. **Bax proteinleri** sitoplazmada bulunmaktadır. Apoptotik sinyalin alınmasından sonra, Bax proteinleri, mitokondri zarının '*permeabilite geçiş poru*'na doğru yönelmekte ve buraya bağlanmaktadır. Ancak hücre ölümünü tetikleyen DNA hasarı, büyüme faktörü yoksunluğu gibi birçok uyarı, mitokondride hasara yol açmakta ve **sitokrom c** ve **AIF (Apoptosis Inducing Factor)**, sitozolde salınmaktadır. AIF doğrudan kromatin yoğunlaşmasının ve nükleer fragmentasyonun meydana geldiği çekirdeğe doğru yönelirken, sitoplazmadaki **sitokrom c** apoptozun en son basamağında görev almaktadır. **Sitokrom c** bir sitoplazma proteini olan **Apaf-1**'e bağlanması **kaspaz-9**'u aktive etmekte ve oluşan bu kompleks '**apoptozom**' olarak isimlendirilmektedir. Aktif kaspaz-9 efektör kaspazlardan **kaspaz-3**'ü aktive etmektedir. Aktif kaspaz-3, kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (**ICAD**) inaktifleştirmekte, böylece ICAD'ünün bağladığı kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz (**CAD**) serbestleşmekte ve bu da apoptozun karakteristik bulgularından biri olan kromatin yoğunlaşmasına ve DNA fragmentasyonuna neden olmaktadır (140).

Bcl-2 ailesi üyeleri programlanmış hücre ölümünün kontrolünde merkezi bir rol oynamaktadır. **Bcl-2 ailesi** üyeleri, mitokondri zarında, mitokondrinin bütünlüğünü ve sitokrom c salınımının düzenleyici rol oynamaktadırlar. Bcl-2 ailesinin apoptozu baskılayan üyeleri sitokrom c salınımını engellemekte, buna karşı Bcl-2 'nin hücre ölümünü uyaran üyeleri, mitokondri hasarını, sitokrom c salınımını ve kaspaz aktivasyonunu uyarak etki göstermektedirler. Mitokondri hasarı yalnızca sitokrom c'nin değil, apoptozu uyaran diğer moleküllerin de salınımı ile sonuçlanabilmektedir. Bu moleküller **second mitochondria-derived activator of caspases (Smac/Diablo)** denilen Apoptoz Protein İnhibitörleri IAP 'lerin etkisini engelleyerek, kaspaz aktivitesini uyaran bir proteini içermektedir (Şekil 2.9.1).

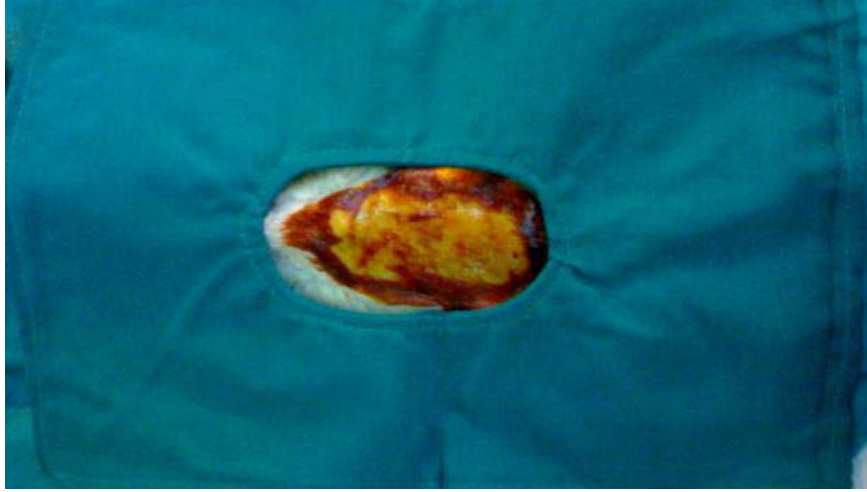
3. MATERYAL VE METOD

Çalışma, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul'unun 29/01/2010 tarih, 2010-07 sayılı onayı alındıktan sonra yapılmıştır. Çalışmada 50 adet, 200-250 gr. ağırlığında, genç erişkin, dişi Wistar Albino sıçan (rat) kullanılmıştır. Deney hayvanları, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Deney hayvanları ele alıştırma (handling) sürecinden geçirilerek deney yapan kişiye alışmaları sağlanmıştır. Deney hayvanları 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık ortamda, 21-22 ° C ısıda, devamlı yem ve su verilerek (*ad libitum*) bakılmışlardır. Stres yaratılmadan, sert ve ani hareketlerden kaçınılarak çalışılmıştır. Gürültüden uzak, sessiz ortamda çalışmalar yapıp, deneyin yapıldığı alanın deney hayvanlarının bulunduğu ortamdaki uzak olması sağlanmıştır.

Deney 50 deney hayvanı ile yürütülmüştür (n: 10, her biri).

1. Kontrol (Sham grubu)
2. 3 saat torsiyon, 3 saat detorsiyon uygulanan grup
3. 3 saat torsiyon, 3 saat detorsiyon uygulama öncesi(20 dk) Selenyum uygulanan grup
4. 24 saat torsiyon,24 saat detorsiyon uygulanan grup
5. 24 saat torsiyon,24 saat detorsiyon uygulama öncesi(20 dk)Selenyum uygulanan grup

Deney grupları ratlara Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda uygulamalar yapılmıştır. Seçilen ratların aynı menstruel siklusta olmaları göz önünde bulundurulmuş ve bunun için vajinal duvardan yapılan sürüntü örneklerine göre aynı fazda (Östroz) olmaları sağlanmıştır. Uygulamaların sonunda her gruptaki ratlara anestezi intraperitoneal ketamin 75 mg/kg (Ketalar® Flakon 50 mg/ml Pfizer) ve intraperitoneal xylazin 10 mg/kg (Xylazin® 20mg/ml Flakon Kepro) uygulanmıştır. Ratlar dorsal rekümbent pozisyonunda iken insizyon alanı tıraşlanıp, povidon iyot (Batticon® solusyon %10, Adeka) uygulanarak cerrahi işlem yapılmıştır (Resim 3.1). 2 cm'lik ortahat insizyonla laparotomi yapılmış ve kontrol grubu hariç tüm ratların sağ adneksleri 3 ve 24 saat sürelerince torsiyone edilmiştir. Torsiyon-detorsiyon prosedürü sağ adneksin 360 derece saat yönünde çevrilmesi ile uygulanmıştır (Resim 3.2). Torsiyon yapılan adneks 5/0 vicryl ile abdominal kasa fikse edilmiş ve cilt de 3/0 vicryl ile sütüre edilmiştir. Grupların sürelerine göre 3 ve 24 saat sonra ratlara tekrar anestezi uygulanarak aynı insizyon hattından laparotomi uygulanmıştır.



Resim 3.1 : Ratların cerrahi prosedür için hazırlığı.

3.1. Cerrahi Prosedür

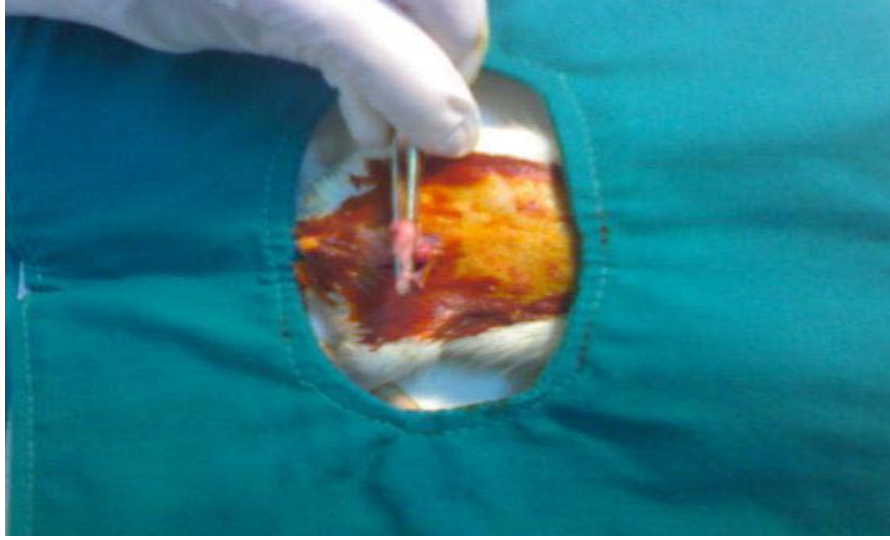
Grup 1 (Sham Grubu): Sadece laparotomi uygulandı. Laparotomiden 3 saat sonra ratlar feda edildi.

Grup 2 (3 saat Torsiyon/Detorsiyon 3T/D): İlk laparotomi ile rat overi torsiyone edildi ve 3 saat süreyle torsiyonda kaldıktan sonra tekrar anestezi ile detorsiyon uygulandı, 3 saat süreyle detorsiyonda kalan rat feda edildi.

Grup 3 (3 saat Torsiyon/Detorsiyon+Selenyum 3T/D+Se): İlk laparotomi ile rat overi torsiyone edildi ve 3 saat süreyle torsiyonda kaldıktan sonra tekrar anestezi verilmeden 20 dakika önce intraperitoneal 0,2 mg/kg % 0,9 NaCl ile sulandırılan NaSelenat (Sodium Selenate, Aldrich USA) uygulandı. Uygulama sonrası detorsiyon uygulandı, 3 saat süreyle detorsiyonda kalan rat feda edildi.

Grup 4 (24 saat Torsiyon/Detorsiyon 24T/D): İlk laparotomi ile rat overi torsiyone edildi ve 24 saat süreyle torsiyonda kaldıktan sonra tekrar anestezi ile detorsiyon uygulandı, 24 saat süreyle detorsiyonda kalan rat feda edildi.

Grup 5 (24 saat Torsiyon/Detorsiyon+Selenyum 24T/D+Se): İlk laparotomi ile rat overi torsiyone edildi ve 24 saat süreyle torsiyonda kaldıktan sonra tekrar anestezi verilmeden 20 dakika önce intraperitoneal 0,2 mg/kg % 0,9 NaCl ile sulandırılan NaSelenat (Sodium Selenate, Aldrich USA) uygulandı. Uygulama sonrası detorsiyon uygulandı, 24 saat süreyle detorsiyonda kalan rat feda edildi.



Resim 3.2 : Ratların adneksinin torsiyone edilişi.

Cerrahi prosedür devam ederken grup 4 ve grup 5'teki ratlardan birer tanesi ilk laparotomi sonrası ölmüşlerdir. Grup 4 ve 5 'te dokuz rat çalışmaya dahil edilmiştir. Belirtilen saatlerde ovaryen torsiyon ve detorsiyon uygulanan ratlarda ve kontrol grubunda feda edilmeden hemen önce intrakardiyak kan örneği alınmış ve feda edilmesini takiben overleri çıkarılmıştır.

3.2. Biyokimyasal Analiz

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında numunelerin hazırlanışı:

EDTA'lı 2 adet tüpe kan örnekleri alınmıştır. Kan örnekleri 3000 rpm'de 5 dakika santrifüje tabi tutularak plazmaları ependorf tüplere aktarıldı. Bu plazmalardan Anti Mülllerian Hormon ve Malonildialdehit düzeyleri tayin edildi. EDTA'lı tüplerde kalan örneklerden SOD ve GSH-Px enzim düzeylerinin tayininden kullanılmak üzere yıkanmış eritrosit süspansiyonu hazırlandı. Bu işlemde eritrosit süspansiyonlarına serum fizyolojik (% 0.9 NaCl) eklenerek eritrositlerin alt-üst edilerek yıkanması ve sonra santrifüj edilerek eklenen SF'in atılması uygulandı. SF ile yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. En son elde edilen eritrosit paketi hemoliz edilerek ölçüm gününe kadar plazmalarla birlikte -80 C' de derin dondurucuda saklandı. Materyallerin çalışılmasında **Malonildialdehid assay CELL BIOLABS (STA-332 USA), Superoksidismutaz Assay Enzo Life, 5X96 AMB (ADI-900-157 USA), Glutatyonperoksidaz Assay Enzo Life, 5X96 AMB (ADI-900-158 USA), AntiMülllerian Hormon Assay USCN (E90228Ra, CHINA)** kullanılmıştır.

Superoksitdismutaz Enzim ölçümü

Deneyin prensibi: Ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin, nitro blue tetrazoliumu (NBT) indirgemesi esasına dayanmaktadır (141, 142). Oluşan süperoksit radikalleri (O₂.) ortamdaki NBT' yi indirgeyerek renkli formazon bileşiği oluşturmakta ve bu kompleks 560 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermektedir. Enzimin olmadığı ortamda bu indirgeme maksimum olup, mavi-mor renk oluşumu belirgin izlenmektedir. Ortamda SOD bulunması, süperoksit radikalini dismute edeceğinden NBT' nin indirgenmesi azalmakta ve renkli formazon oluşumu enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak inhibe olmaktadır. Enzim bulunmayan (kör) değer ile enzim bulunan numune absorbans değerleri hesaba katılmaktadır. Kullanılan kimyasal maddeler: Ksantin, EDTA, nitroblue tetrazolium(NBT), Na₂CO₃, bovine serum albumin, (BSA), CuCl₂, ksantin oksidaz.

Kullanılan reaktifler:

1. Ölçüm Reaktifi: 0.3 mmol/L ksantin, 0.6mmol/L EDTA, 150µmol/L NBT, 400mmol/L Na₂CO₃, 1gr/L bovine serum albumin koyu renk cam şişede köpürtülmeden birleştirildi.
2. 0.8 mmol/L CuCl₂
3. 400 Ü/L Ksantin oksidaz

Numuneler 560nm' de spektrofotometrede okundu. Elde edilen değerler hemoglobinin değerine bölünerek sonuçlar U/gr hemoglobin olarak ifade edildi.

Glutasyon Peroksidaz (GSH-PX) enziminin aktivite tayini

Deneyin Prensibi: Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksit (H₂O₂) varlığında redükte glutasyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG) yükseltgenmesini katalizlemektedir. Hidrojen peroksidin bulunduğu ortamda GSH-Px' in oluşturduğu GSSG, glutasyon redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH' a indirgenmektedir. GSH-Px aktivitesi NADPH'ın NADP⁺'ye yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının okunması ile hesaplanmaktadır (143).

Kullanılan reaktifler:

1. GSH-Px Tamponu: PH 7, 50 mM Fosfat tamponu ve 5 mM EDTA içerir
2. 150 mM redükte Glutasyon (GSH)
3. 8 mM redükte NADPH
4. GSH-Redüktaz enzimi
5. 2 mM Hidrojen peroksit

Dalga boyu 340 nm' ye ayarlanmış spektrofotometrede numunelerin absorbans değerleri kaydedildi. Lineer aktivite azalışının olduğu 2-3. dakikalardaki absorbans değişikliği esas alınarak hesap yapıldı. Elde edilen değerler hemoglobin değerine bölünerek sonuçlar U/gr Hb olarak verilmiştir.

Anti-Müllerian Hormon ölçümü

Anti-Müllerian Hormon tayini ELISA yöntemi ile rat kanına uygun üretilen ticari kit kullanılarak ölçülmüştür. (Uscn Life Science Inc., Çin, Katalog No: E90228Ra). Kitin ölçüm limitleri 0.78-50 ng/ml, sensitivitesi ise 0.27ng/ml olarak bildirilmiştir.

Malondialdehid (MDA) ölçümü

Deneyin prensibi: Plazma MDA düzeyleri Hammouda ve arkadaşlarının geliştirdiği metod ile tayin edildi (144). Bu metotta, asidik ortamdaki tiobarbitürik asit ile 95 °C'de reaksiyona giren malondialdehit pembe renkli bir kromojen oluşturmaktadır. Bu rengin şiddeti ortamdaki MDA ile orantılıdır. Kromojenin n-butanol ekstraktı spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda ölçüldü. Standart olarak 1,1,3,3-tetramethoxypropane kullanıldı. MDA miktarları hesaplanırken standart grafiği eğimi kullanılarak numune MDA miktarları plazmada tayin edildi. Sonuçlar nmol/ml olarak verildi.

Kullanılan reaktifler: 1. TCA: % 10 W/V, 2. Tiobarbitürik asit (TBA): % 0.675 W/V

3.3. İmmunohistokimyasal Analiz

Overyan doku örnekleri % 10 formalin solüsyonu içerisine alınarak, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında rutin parafin doku takibine alındı. 24-48 saat %10 formalin solüsyonu ile tespit edilen doku örnekleri bir gece akan su altında yıkandı. Derecesi giderek artan etil alkol serileri ile (%50-60-70-80-90-95-100) dehidratasyon işlemi uygulandı. İki değişim ksilen ile şeffaflaştırmaları yapıldıktan sonra, parafine emdirme aşamasından sonra parafine gömüldü (**Tablo 3.3.1**). Elde edilen parafin bloklardan mikrotomla polilizin ile kaplı lamlara 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler, Hematoksilen-Eosin boyaması ile boyanarak histopatolojik olarak değerlendirildi (**Tablo 3.3.2**).

Kısaca, kesitler bir gece 60°C etüvde tutulduktan sonra, 1 saat ksilen ile kimyasal parafinden uzaklaştırma işlemi uygulandı. Derecesi giderek azalan alkol serilerinden

geçirilerek suya getirilen kesitler önce Hematoksilen solusyonu ile 5 dakika boyandı. Akan su altında yıkanan kesitler asit- alkol solüsyonu ile diferansiye edildikten sonra Eozin boyası ile 3 dakika boyandı. Kesitler alkol serilerinden geçirilerek ksilen içine alındı. Ksilen içinde 30 dakika bekletilen kesitler entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskop altında (Olympus X-40) incelendi ve fotoğrafları çekildi. Örnekler aşağıda belirtilen Tablo: 4.1.1 kriterlerine göre Grade'lendirildi.

Ek kesitler avidin-biyotin-peroksidaz yöntemi ile anti-eNOS (NOS-2), anti i-NOS (NOS-3), anti-Caspas 3, anti-Fas L, anti- Apaf-1, anti-Cytochrom C primer antikoları ile indirek immunohistokimyasal yöntemle (**Tablo 3.3.3**). ve TUNEL yöntemi (**Tablo 3.3.4**). ile değerlendirildi.

İndirek immunohistokimyasal uygulama için deparafinizasyon işlemi yapılan kesitler rehidratasyon işlemi ile su aşamasına getirildi. Dako pen ile çevrelenerek tripsinize edilen kesitlere, dokuda bulunan peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için % 3'lük hidrojen peroksidaz uygulandı. Fosfat tamponu (PBS) ile yıkanan kesitlere spesifik boyanma sağlamak için bloklama solüsyonu uygulandı. Kesitler yıkanmadan bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı ve **anti-eNOS (NOS-2, sc-7927, rabbit polyclonal Santa Cruz, USA), anti-iNOS (NOS-3, sc-654 rabbit polyclonal Santa Cruz, USA), anti-Caspase 3 (Caspase-3, clone E87 04-1090 lot:JBC1787326, Millipore, USA), anti-Fas-L (sc-73970 mouse monoclonal Santa Cruz, USA), anti-Apaf-1 (sc-65890 mouse monoclonal Santa Cruz, USA) ve anti-Cytochrom C (sc-18825 mouse monoclonal, Santa Cruz, USA)**, (caspase-3 ve sitokrom-c'nin 1/50, diğerlerinin 1/100 dilüsyonlarında) primer antikoları ile 18 saat 37°C'de nemli ortamda inkübe edildi.

Sekonder kit olarak avidin-biotin-peroksidaz sistemi (Invitrogen, Histostain plus kit, anti-mouse, anti-rabbit, Camarillo, CA, USA) kullanıldı. PBS ile yıkanan kesitler biotinle işaretlenmiş hidrojen peroksidaz sekonder antikoru ile 30 dakika inkübe edildi. PBS ile yıkanan kesitlere 30 dakika streptavidin uygulandı. İmmunoreaktivitenin görünür hale gelebilmesi için DAB (diaminobenzidine, Kromojen) uygulanan kesitler, Mayer's hematoksilen ile artalan boyaması yapılarak alkolden geçirilip, ksilen ile şeffaflaştırma yapılarak entellan ile kapatıldı. İmmunoreaktivitelerin spesifik olup olmadığını test etmek amacı ile birer kesit kontrol boyaması için ayrıldı ve primer antikor ile aynı olan IgG, primer antikor uygulanmadan boyama gerçekleştirildi. İmmunoreaktivitenin şiddetine göre yok (0), hafif (1), orta (2), şiddetli (3) ve çok şiddetli (4) olarak skorlandı. Sonuçlar gruplar arasında karşılaştırmalı olarak ANOVA istatistik testi ile değerlendirildi.

Ek kesitler, DNA fragmantasyonunu göstermek amacıyla TUNEL (Terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP Nick-End Labeling) yöntemi ile değerlendirildi. Preparatlar Millipore TUNEL protokolüne uygun olarak tespit edildikten sonra PBS ile 3X5 dakika yıkandı. Yıkama işlemi sonrasında Pap-Pen ile belirlenen kuyucuklara % 0.3 'lük H₂O₂ 5 dakika uygulanıp, 2 kez 5 dakika PBS ile yıkandıktan sonra, dengeleme (equilibration) tampon solüsyonu ile 10 saniye yıkanan örnekler TdT-enzimi solüsyonu ile 37°C de 1 saat inkübe edildi. 10 dakika Working-Strength, Stop/Wash tampon solüsyonu uygulanan preparatlar 3 kez 1 dakika PBS ile yıkama yapıldıktan sonra, anti-digoxigenin conjugate ile 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 4 değişim 2 dakika PBS ile yıkandıktan sonra, preparatlar diaminobenzidine (DAB) ile boyandı. Distile su ile yıkandıktan sonra Mayer's hematoksilin ile artalan boyaması sağlanan örnekler distile su ile yıkanarak %80 ve %95' lik alkollerde dehidratasyon ve 15 dk. ksilen ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı. TUNEL pozitif boyanan hücre sayıları belirlenerek sonuçlar % olarak belirtildi.

İstatistiksel Yöntemler: Araştırmada elde edilen veriler, SPSS (Statistical Package For Social Sciences) 15.0 programında oluşturulan veri tabanına girildi ve verinin istatistiksel analizleri yine aynı program ile yapıldı. Sürekli değişkenlerin alt gruplarına ait; ortalama, standart sapma, medyan, min ve max değerleri sunuldu ve bu değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu araştırıldı. Gerek grafiksel araştırma gerekse normallik testleri ve örnek çapı göz önünde bulundurularak değişkenlerin tümünde normal dağılıma uygunluk koşulları sağlanmadığına karar verildi. Dolayısıyla sürekli değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmalarında non-parametrik bir yöntem olan Mann-Whitney testinden yararlanıldı. Tüm testler %95 güven düzeyinde çift taraflı olarak yapıldı, alfa hata payı 0,05 olarak belirlenip, p değeri 0,05 değerinden küçük olduğu durumlarda gruplar arası fark anlamlı olarak kabul edildi. Alt gruplara ait değişkenlerin medyan, min, max değerleri ve çeyreklikler halindeki dağılımını gösteren box-pilot yöntemi ile grafikler sunulmuştur.

4. BULGULAR

Çalışmada, sıçanlara 3 saat ve 24 saat ovaryum torsiyon ve detorsiyonu uygulamaları ile, uygulamalardan 20 dk. önce selenyum verilmesi sonucunda oluşan histopatolojik değişiklikler ışık mikroskop altında karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen ovaryum örnekleri, histokimyasal olarak Hematoksilen & Eozin (H&E) boyaması ile, immunohistokimyasal olarak anti e-NOS (NOS-2), anti iNOS (NOS 3), anti-Caspase-3, anti-Fas-L, anti-Apaf-1, anti-Cytochrom C primer antikorları kullanılarak avidin-biyotin peroksidaz yöntemi ile incelenmiştir. DNA fragmantasyonunu belirlemek amacı ile de TUNEL yöntemi kullanılmıştır. Sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

4. 1. Histokimyasal Bulgular

Çalışma, **Grup 1:** Kontrol grubu; **Grup 2:** 3 saat torsiyon ve 3 saat detorsiyon uygulanan grup; **Grup 3:** 3 saat torsiyon ve 3 saat detorsiyon uygulama öncesi Selenyum uygulanan grup; **Grup 4:** 24 saat torsiyon ve 24 saat detorsiyon uygulanan grup; **Grup 5:** 24 saat torsiyon ve 24 saat detorsiyon uygulama öncesi Selenyum uygulanan grup olarak (n:48) 5 grup altında yürütülmüştür.

Deney grupları makroskopik olarak değerlendirildiğinde, kontrol grubu dışındaki overlerin (özellikle Grup 4 ve 5) kanamalı, nekrotik görünümünde olduğu izlendi.

Deney hayvanlarından alınan ovaryum örneklerinin H&E boyaması ile değerlendirilmesinde aşağıda belirtilen tabloya (Tablo 4.1.1) göre skorlama yapılmıştır.

Elde edilen histopatolojik değerlendirme sonuçları **Tablo 4.1.2'**de gösterilmiştir.

Gruplarda gelişen ve Graff follikül sayımı yapılarak sonuçlar **Tablo 4.1.3.'**de gösterilmiştir.

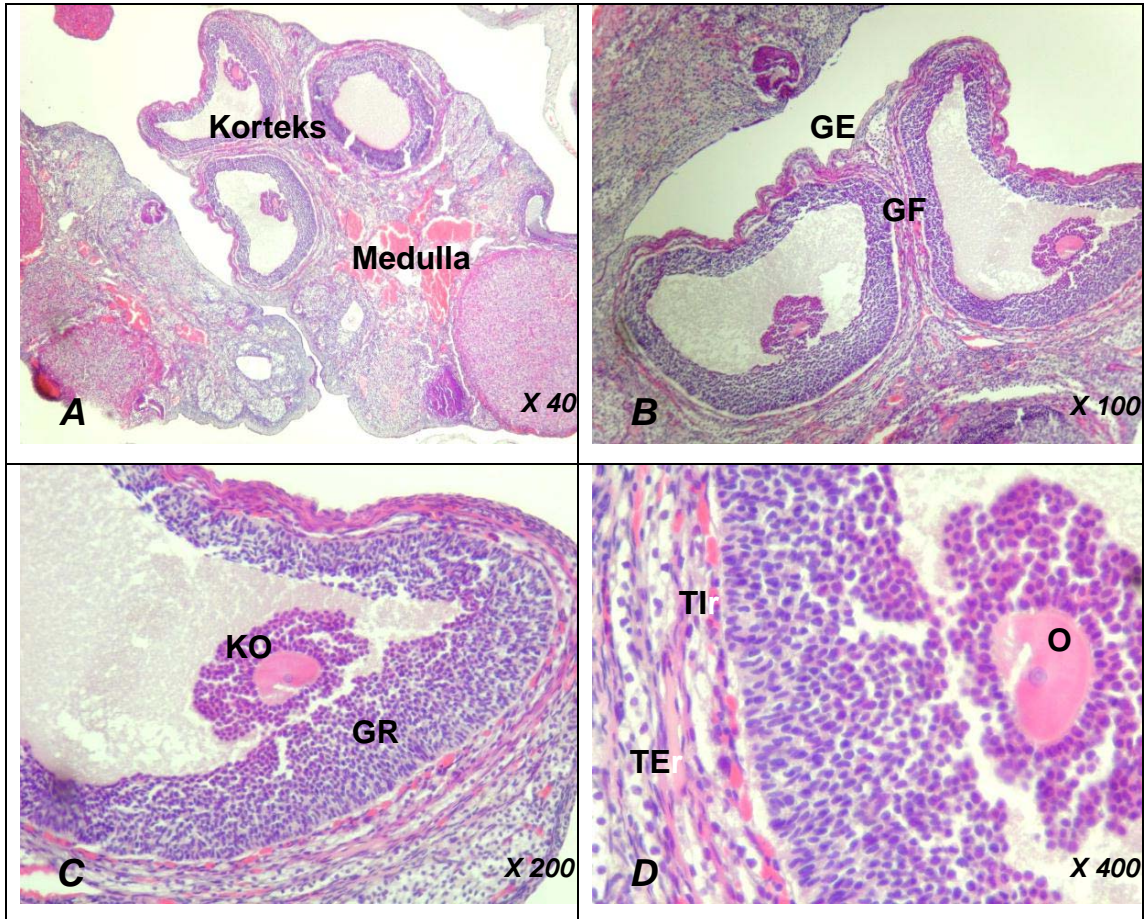
Tablo: 4.1.1: Overin Histolojik Grade’i için kullanılan skorlama tablosu

Grade	Ödem	Vasküler Konjesyon	Hemoraji	Polimorf Nüveli Lökosit(PMNL)
Grade 0	Normal histolojik görünüm			
Grade 1	Hafif	Hafif	Yok	Yok
Grade 2	Orta	Orta	Yok	Yok
Grade 3	Şiddetli	Şiddetli	Minimal	Minimal
Grade 4	Şiddetli	Şiddetli	Şiddetli	Şiddetli

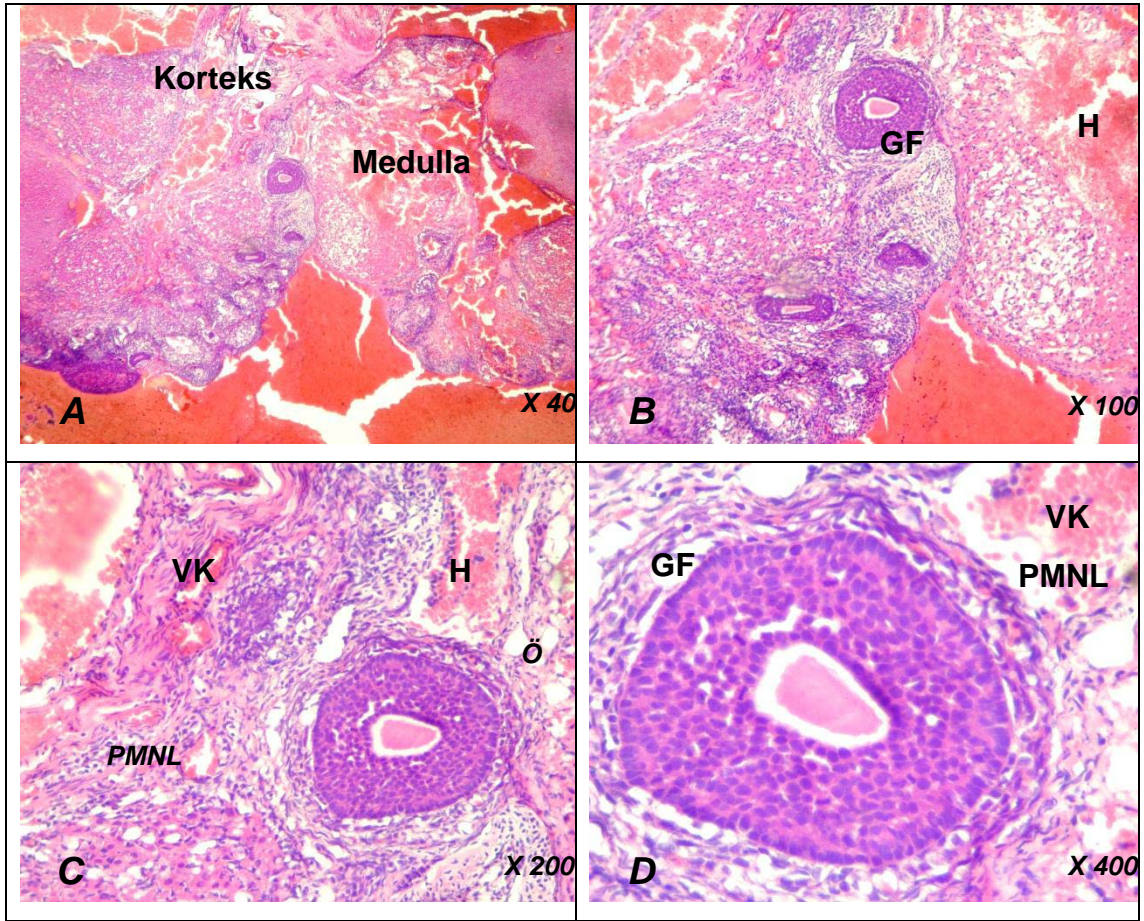
Torsiyon ve detorsiyon yapılan gruplarda (Grup 2 ve 4), ödem, konjesyon, hemoraji ve PMNL artışı bulgularının Selenyum uygulanması yapılan gruplarda (Grup 3 ve 5) gerilediği gözlenmiştir.

Kontrol grubuna (Grup 1) ait sıçanlardan elde edilen ovaryum örneklerinden alınan 5µm’lik kesitlerin, Hematoksilen&Eozin (H&E) ile boyanarak ışık mikroskop altında değerlendirilmesinde, en dışta tek sıralı kübik epitel yapısında germinal epitel ve epitelin hemen altında yer alan bağ dokusu yapısında tunika albuginea tabakası izlendi. Ovaryumun dış kısmında farklı gelişim aşamasında gelişmekte olan follikülleri içeren korteks ve içte gevşek bağ dokusu yapısında, kollajen ve retiküler lifleri içeren, damar ve sinir dokudan zengin medulla olmak üzere iki kısımdan oluştuğu gözlemlendi. Germinal epitelin ve tunika albugineanın hemen altında, yassı follikül epitel hücreleri ile çevrili, ortasında primer oositin gözlemlendiği primordiyal folliküller izlendi. Gelişmekte olan primer oositlerde follikül epitel hücrelerinin kübik şekilde gözlemlendiği, oositin büyümekte olduğu ve çok tabakalı primer oosit yapısında oosit etrafında asidofilik homojen yapıda zona pellusidanın şekillenmiş olduğu izlendi. Antrumun belirmesi ile oluşan sekonder follikül (antral follikül) ve Graff follikülü (Tersiyer follikül) izlendi. Büyüyen oositin etrafında zona pellusida yapısı, granuloza hücrelerinin oositi çevrelemesiyle oluşan korona radiata hücreleri, granuloza hücreleri ile devam eden kumulus ooforus yapısı ve gelişmekte olan büyük antrum izlendi. Follikülün bağ dokusuna komşu kısmında gevşek bağ dokusu yapısında, kan damarlarından zengin teka interna yapısı ve bunun dışında daha yoğun ve sıkı bir bağ dokusu yapısında teka eksterna yapısı gözlemlendi (**Resim 4.1.1**). 3 saat torsiyon, 3 saat detorsiyon yapılan gruptan (Grup 2) alınan sıçan ovaryum örneklerinde normal histolojik yapının bozulduğu, ödem, vasküler konjesyon, hemoraji ve PMNL infiltrasyonu gözlemlendi

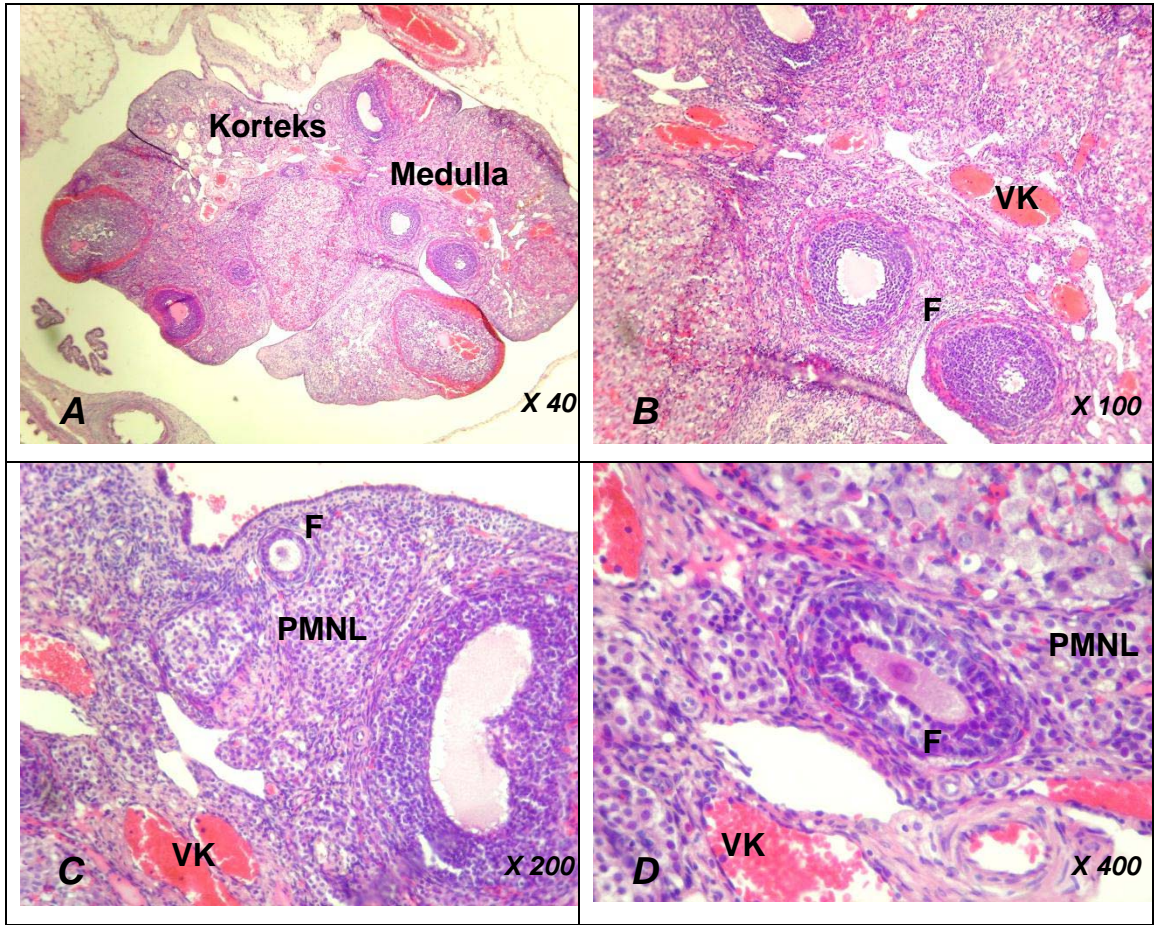
(Resim 4.1.2). 3 saat torsiyon, 3 saat detorsiyon uygulamasından 20 dakika önce selenyum verilen gruptan (Grup 3) alınan sıçan ovaryum örneklerinde histolojik yapının Grup 2'ye göre korunduğu, ödem, vasküler konjesyon ve PMNL infiltrasyonunun azaldığı, yeni gelişmekte olan folliküller olduğu gözlemlendi (Resim 4.1.3). 24 saat torsiyon, 24 saat detorsiyon yapılan gruptan (Grup 4) alınan sıçan ovaryum örneklerinde normal histolojik yapının bozulduğu, şiddetli ödem, vasküler konjesyon, hemoraji ve PMNL infiltrasyonu gözlemlendi (Resim 4.1.4). 24 saat torsiyon, 24 saat detorsiyon uygulamasından 20 dakika önce selenyum verilen gruptan (Grup 5) alınan sıçan ovaryum örneklerinde histolojik yapının Grup 4'e göre korunduğu, ödem, vasküler konjesyon ve PMNL infiltrasyonunun azaldığı, yeni gelişmekte olan folliküller olduğu gözlemlendi (Resim 4.1.5).



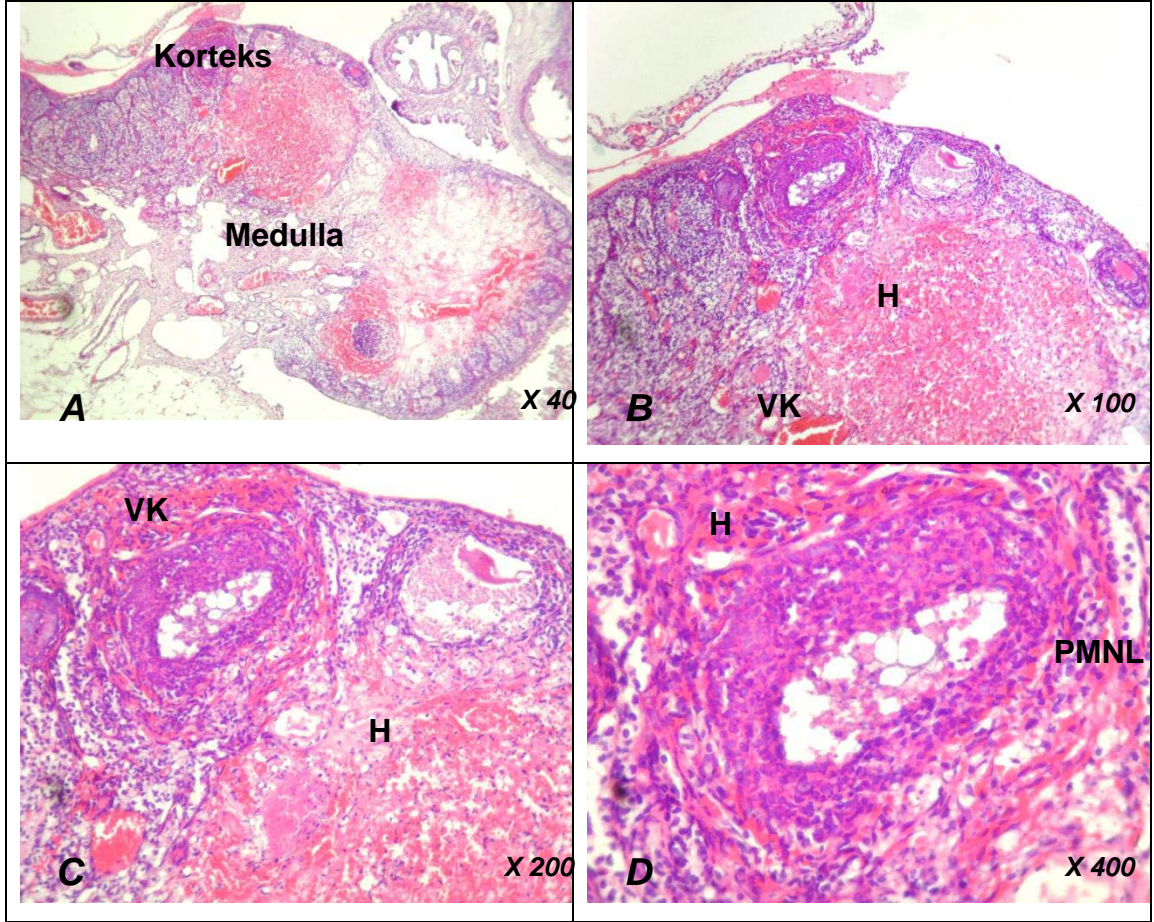
Resim 4.1.1. Kontrol grubundan alınan sıçan ovaryum örneklerinde normal histolojik yapı izlenmektedir. GE : Germinal Epitel, GF: Graff Follikülü, KO: Kumulus Ooforus, GR: Granuloza Hücreleri, O: Oosit, TI: Teka İnterna, TE: Teka Eksterna, H&E.



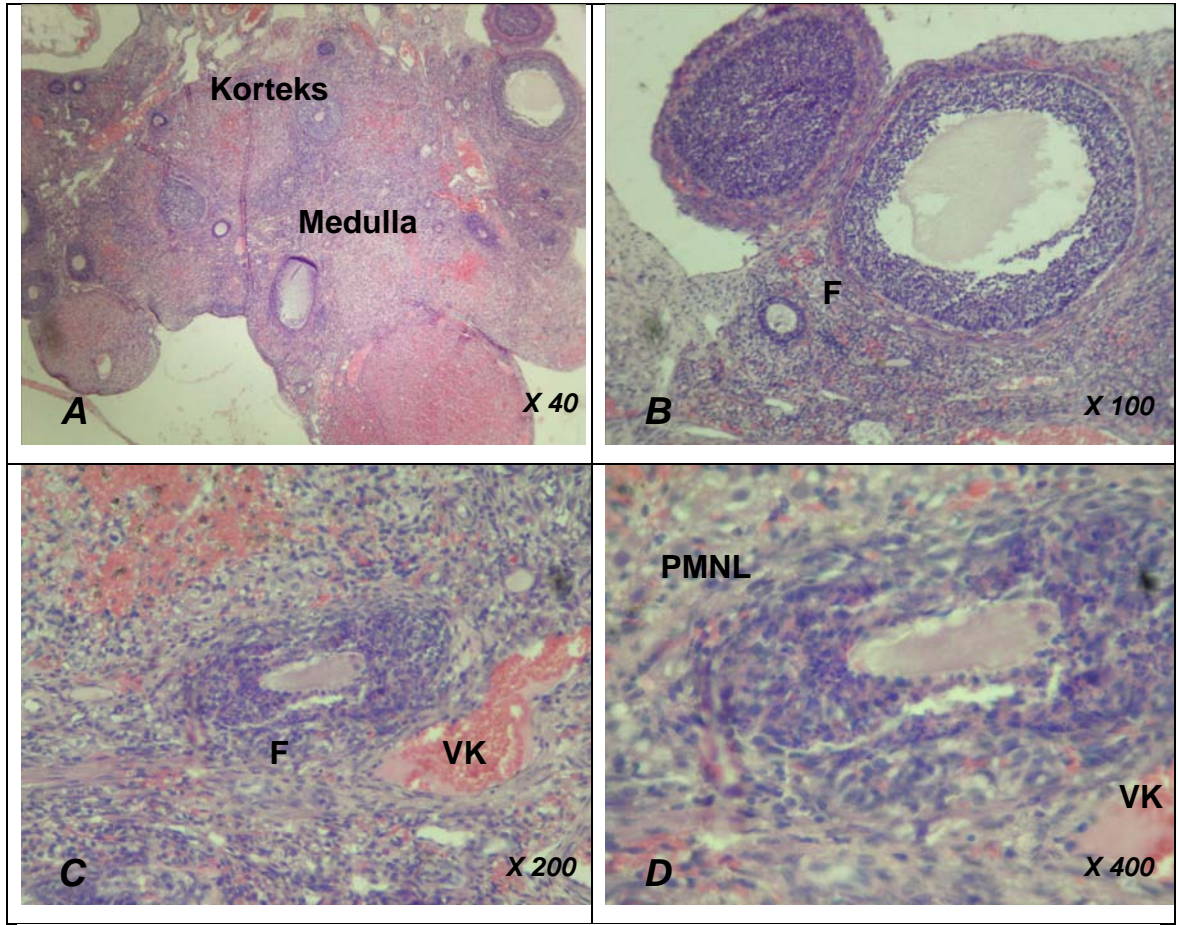
Resim 4.1.2. 3 saat torsiyon, 3 saat detorsiyon yapılan gruptan (Grup 2) alınan sıçan ovaryum örneklerinde normal histolojik yapının bozulduğu, ödem, vasküler konjesyon, hemoraji ve PMNL infiltrasyonu izlenmektedir. Ö. Ödem, VK: Vasküler Konjesyon, H: Hemoraji, PMNL: Poli Morfo Nükleer Lökosit infiltrasyonu, H&E



Resim 4.1.3. 3 saat torsiyon, 3 saat detorsiyon uygulamasından 20 dakika önce selenyum verilen gruptan (Grup 3) alınan sıçan ovaryum örneklerinde histolojik yapının Grup 2'ye göre korunduğu, ödem, vasküler konjesyon ve PMNL infiltrasyonunun azaldığı, yeni gelişmekte olan folliküller olduğu izlenmektedir. F: Follikül, VK: Vasküler Konjesyon, PMNL: Poli Morfo Nükleer Lökosit infiltrasyonu, H&E



Resim 4.1.4. 24 saat torsiyon, 24 saat detorsiyon yapılan gruptan (Grup 4) alınan sıçan ovaryum örneklerinde normal histolojik yapının bozulduğu, şiddetli ödem, vasküler konjesyon, hemoraji ve PMNL infiltrasyonu izlenmektedir. Ö. Ödem, VK: Vasküler Konjesyon, H: Hemoraji, PMNL: Poli Morfo Nükleer Lökosit infiltrasyonu, H&E.



Resim 4.1.5. 24 saat torsiyon, 24 saat detorsiyon uygulamasından 20 dakika önce selenyum verilen gruptan (Grup 5) alınan sıçan ovaryum örneklerinde histolojik yapının Grup 4'e göre korunduğu, ödem, vasküler konjesyon ve PMNL infiltrasyonunun azaldığı, yeni gelişmekte olan follüküller olduğu izlenmektedir. F: Follükül, VK: Vasküler Konjesyon, PMNL: Poli Morfo Nükleer Lökosit infiltrasyonu, H&E .

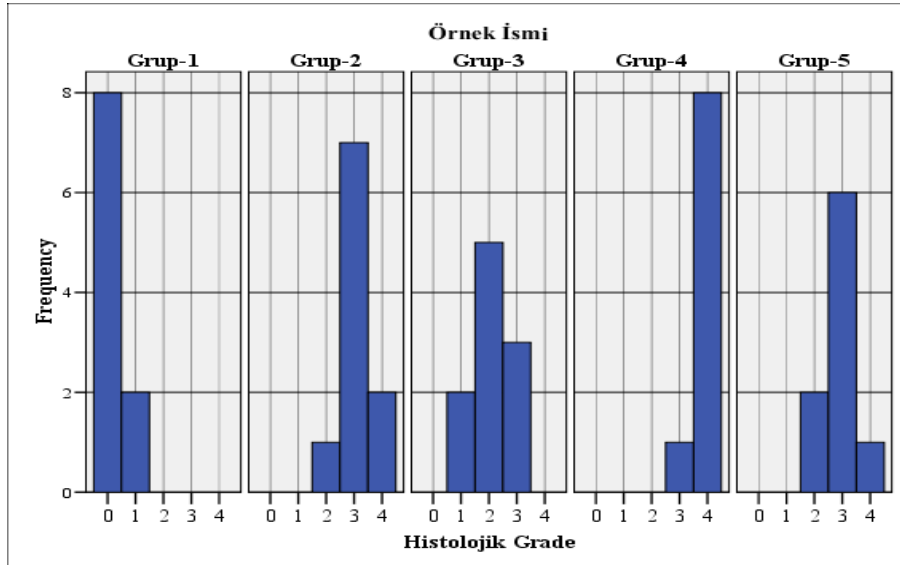
4.2. Gruplara ait Histokimyasal Bulguların İstatistiksel Değerlendirmeleri

Gruplara ait over örneklerinin H&E boyaması ile değerlendirilmesinde kullanılan; ‘ödem, vasküler konjesyon, hemoraji, polimorfo nükleer lökosit infiltrasyonu’ unu içeren ve Tablo 4.1.1’e göre hazırlanan Histolojik Grade sonuçları ve Follükül sayıları Tablo 4.1.2 ve Tablo 4.1.3 ‘te belirtilmiştir.

Gruplardan elde edilen Histolojik Grade skorları ve Follükül sayıları Kruskal Wallis varyans analizi ile karşılaştırıldığında her gruptaki histolojik grade değişimleri istatistiksel olarak oldukça anlamlı ($p<0,001$) bulunmuştur.

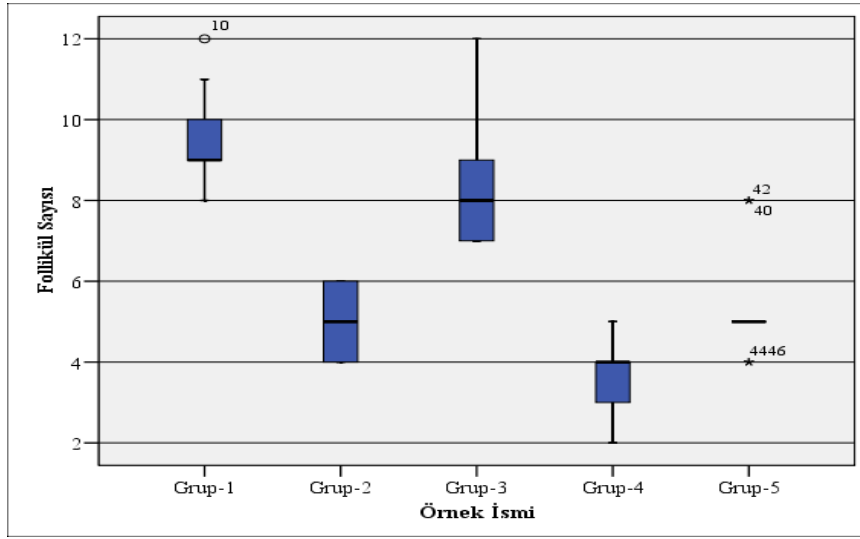
Histolojik Grade skorları 2’li gruplar kendi aralarında Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılmış, istatistiksel olarak;

Histolojik Grade için gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı farklılık ($p<0,05$) saptanırken, yalnızca Grup 2 ve 5 karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulunamamıştır. Özellikle Selenyum uygulanan gruplardaki (Grup 3 ve 5) histolojik yapının tedavisiz gruplara (Grup 2 ve 4) göre korunmuş olduğu dikkati çekmektedir ($p<0,005$).



Tablo 4.2.1 : Gruplar saptanan Histolojik Grade sonuçlarına göre karşılaştırılmıştır.

Follükül Sayıları için Grup 1 ile 3 ve Grup 2 ile 5 karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulunamamıştır. Grup 2 ile 4 karşılaştırıldığında $p=0,05$ saptanmış olup diğer gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanmıştır. Özellikle Grup3(3T/D+Se), Grup2(3T/D) ile ve Grup5(24T/D+Se), Grup4(24T/D) ile karşılaştırıldıklarında Selenyumun etkisiyle olumlu yönde değişim gösteren follükül sayıları istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,005$) bulunmuştur.



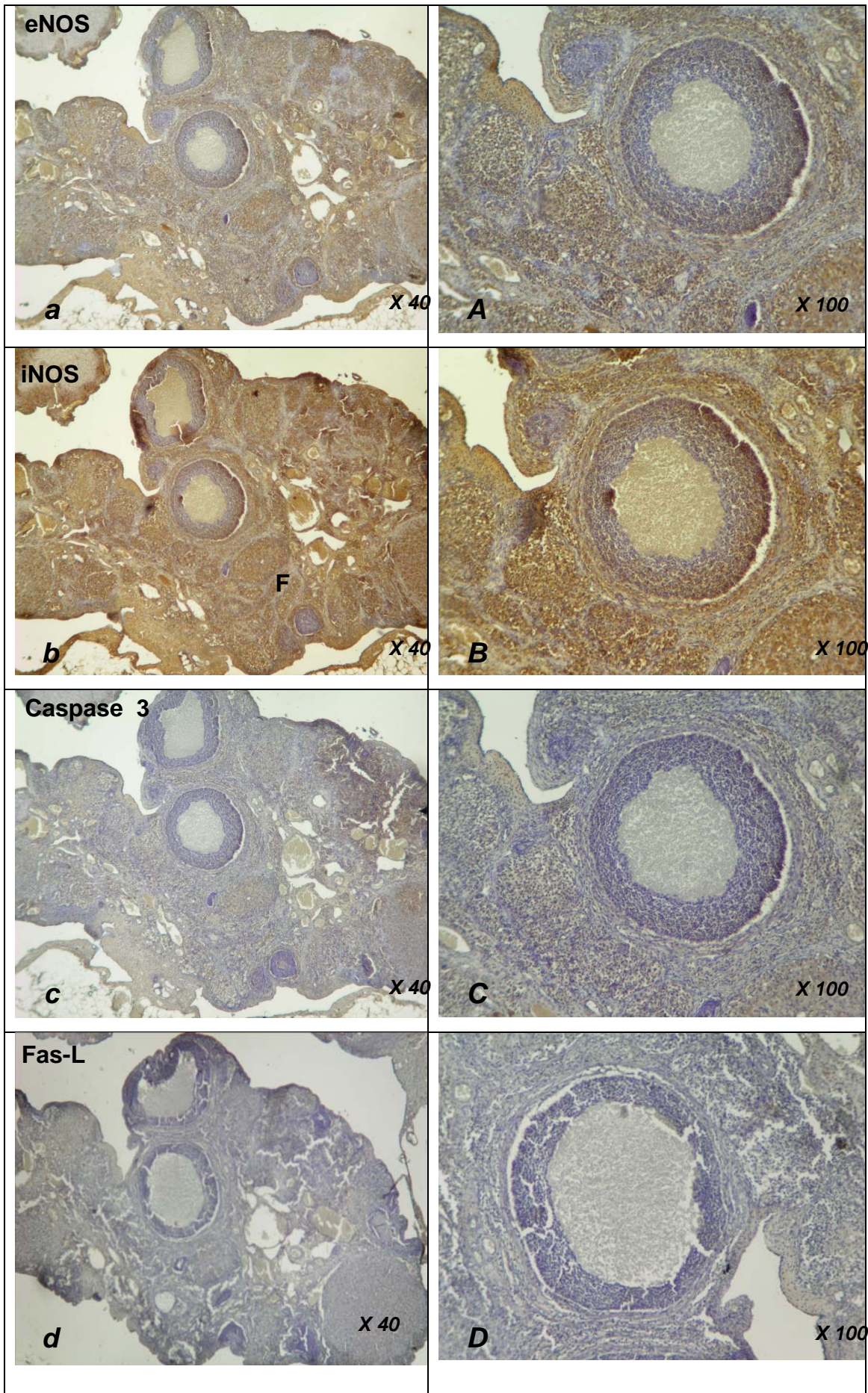
Tablo 4.2.2: Gruplar saptanan Follikül Sayıları sonuçlarına göre karşılaştırılmıştır.

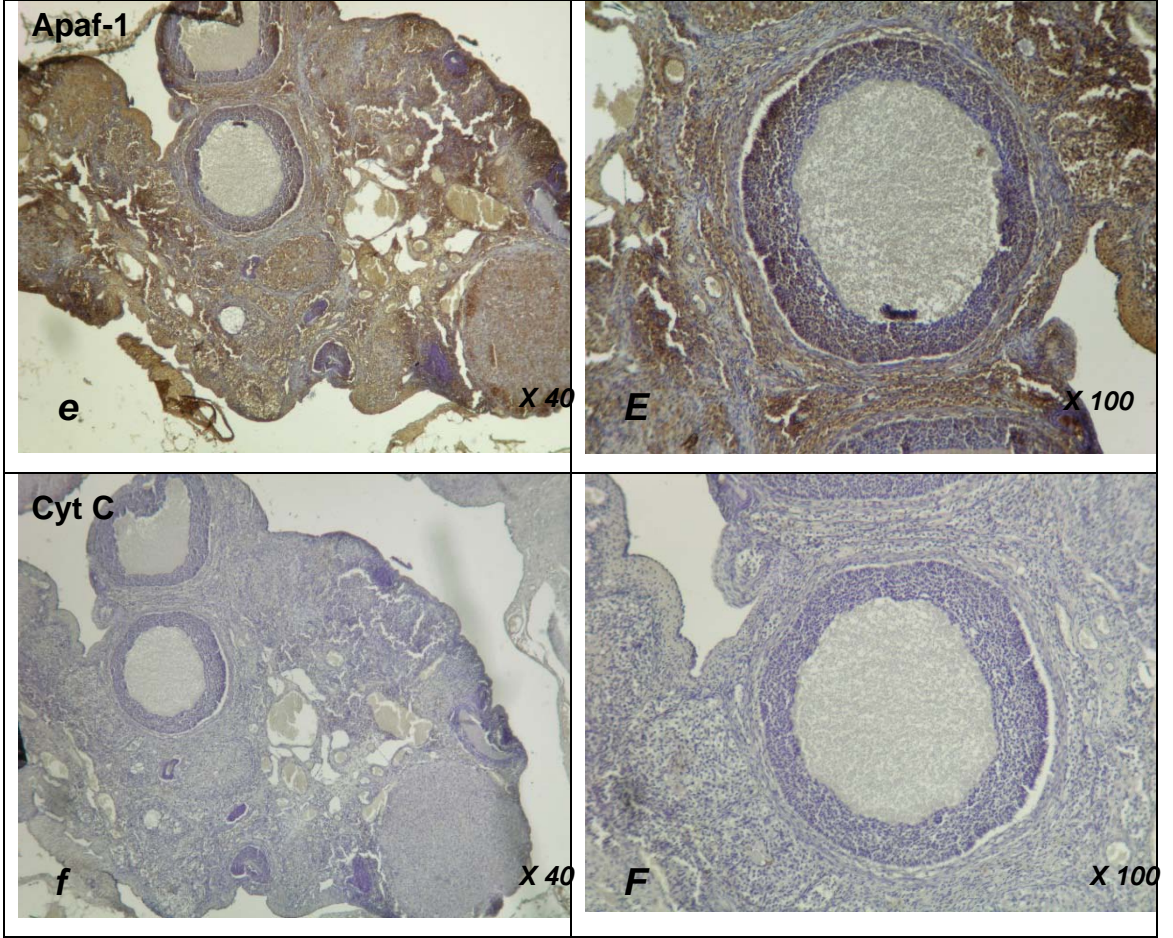
4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular :

Gruplarda, anti e-NOS (NOS-2), anti iNOS (NOS 3), anti-Caspase-3, anti-Fas-L, anti-Apaf-1, anti-Cytochrom C primer antikoları kullanılarak avidin-biyotin peroksidaz yöntemi ile değerlendirme yapılmıştır. İmmunoreaktivite boyanma şiddetleri yok(0), hafif (1), orta (2), şiddetli (3) ve çok şiddetli (4) olarak skorlanmıştır.

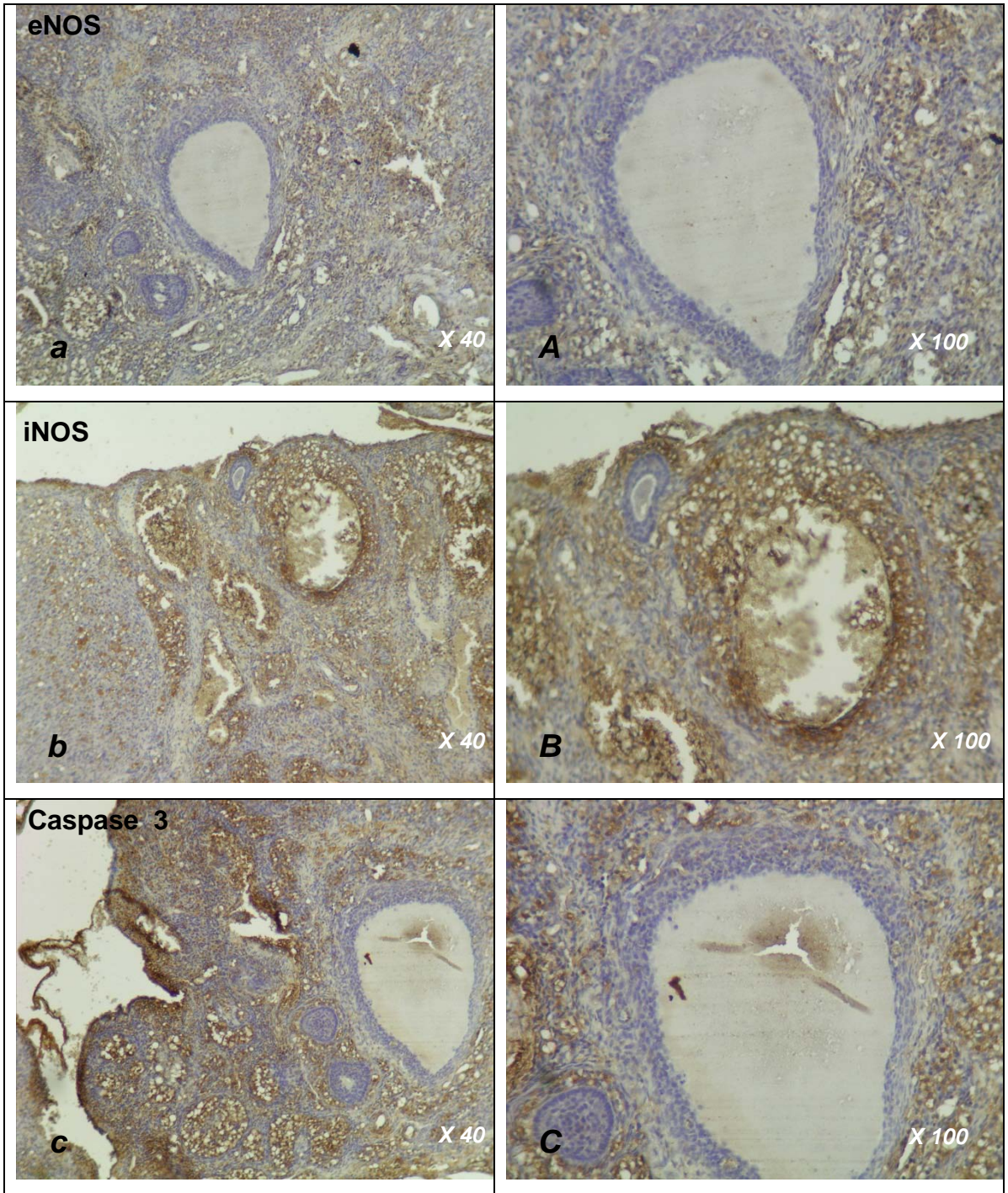
Kontrol grubundan alınan ovaryum örneklerinde, eNOS ve Apaf-1 immunoreaktiviteleri orta, iNOS immunorektivitesi ise şiddetli olarak izlendi. Apoptotik yollardan anti-Caspase-3, anti Fas-L ve anti- Cytochrom-C immunoreaktiviteleri ise hafif olarak gözlemlendi (**Resim 4.3.1**).

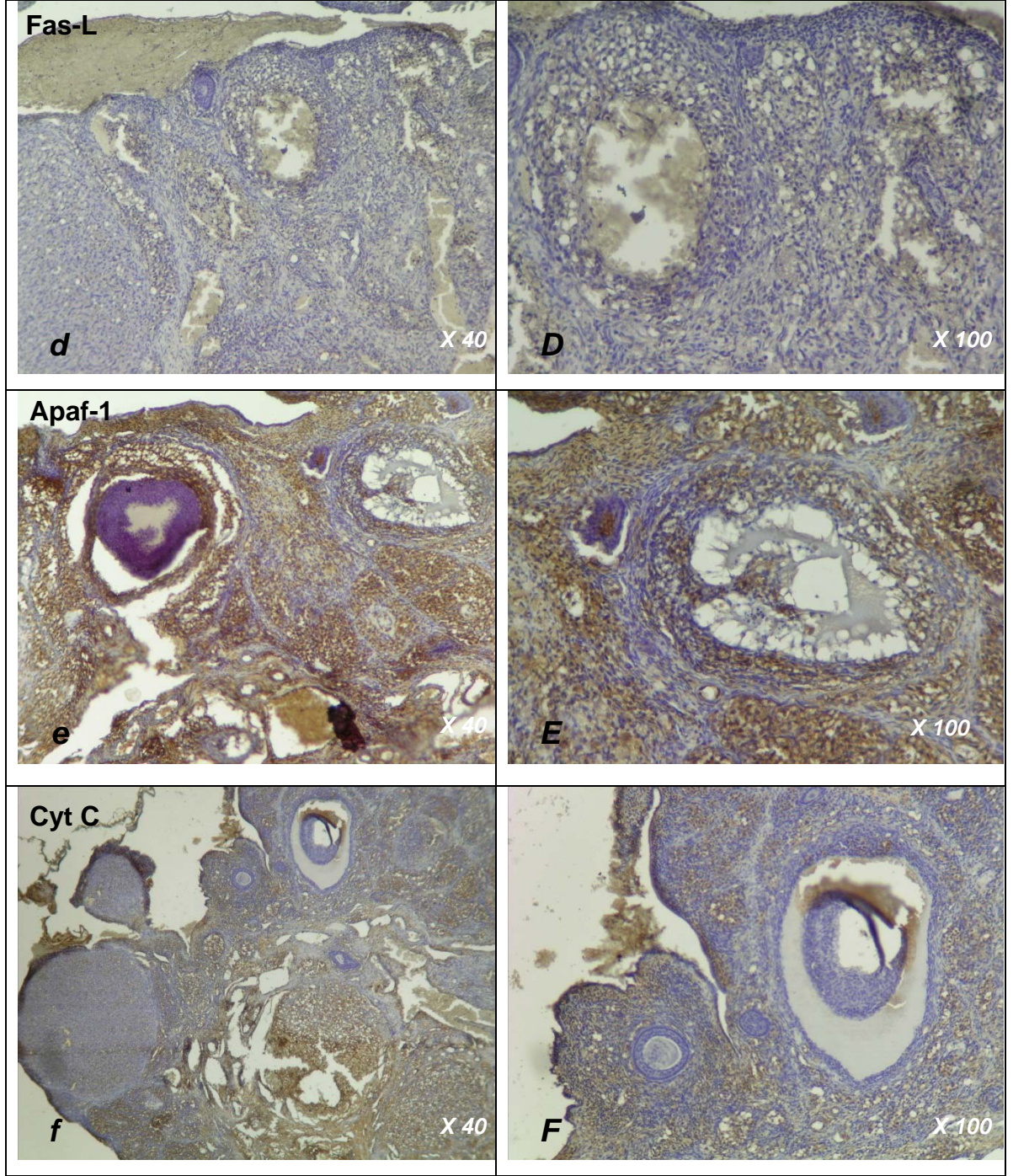
Torsiyon ve detorsiyon yapılan gruplarda (Grup 2 ve grup 4), Grup 4’de daha fazla olmak üzere immunoreaktivitelerde artış olduğu belirlenmiş ve Selenyum uygulamaları ile (Grup 3, Grup 5) immunoreaktivitelerin azalmış olduğu ve kontrole yakın immun boyanma olduğu izlendi (**Resim 4.3.2- 4.3.5**). Gruplardan elde edilen immunohistokimyasal değerlendirmeler **Tablo 4.3.**’de gösterilmiştir.



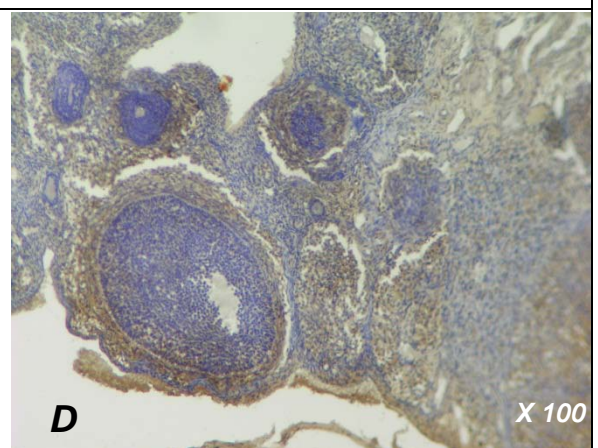
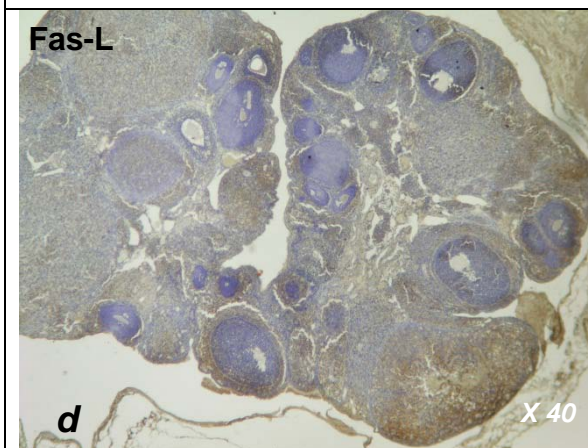
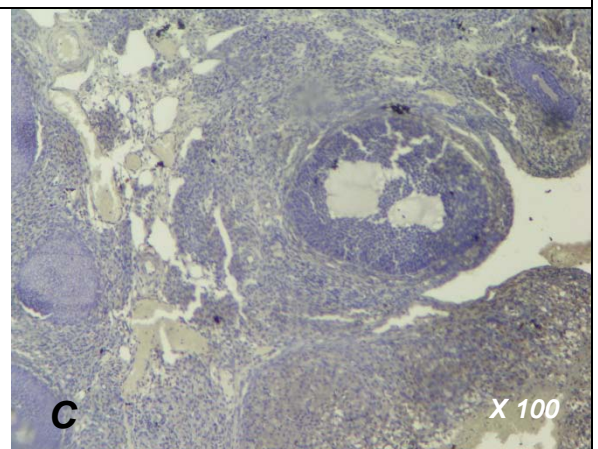
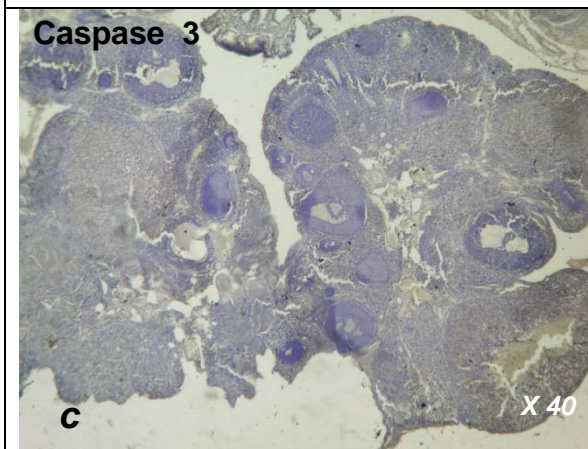
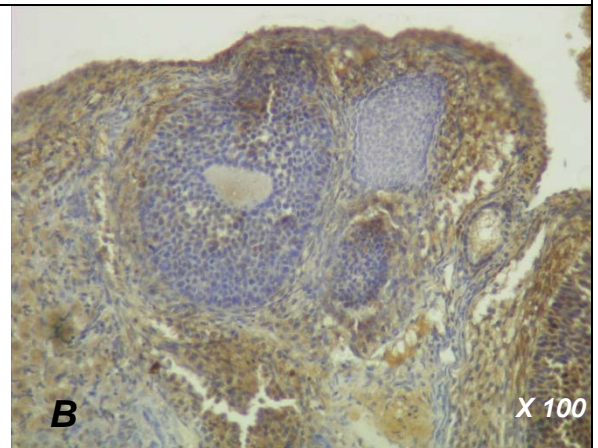
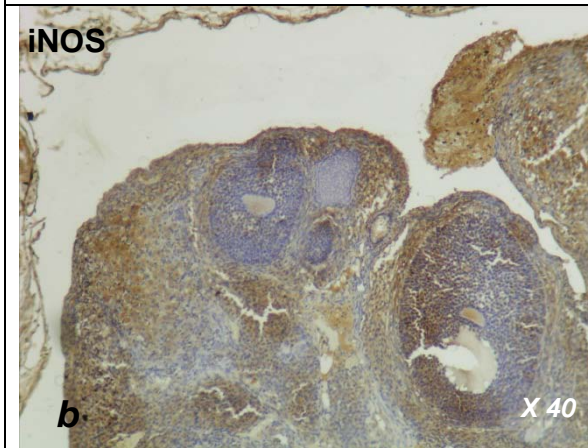
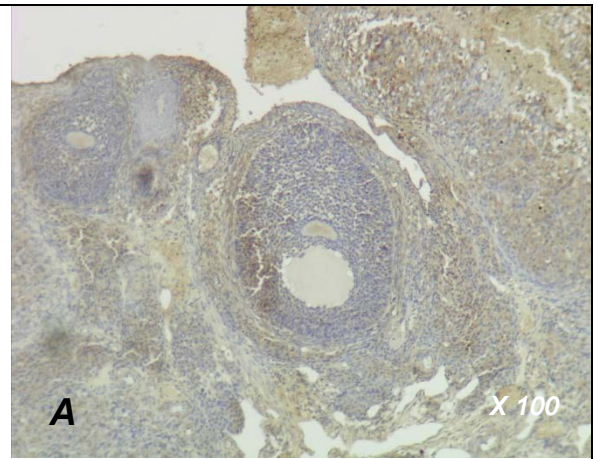
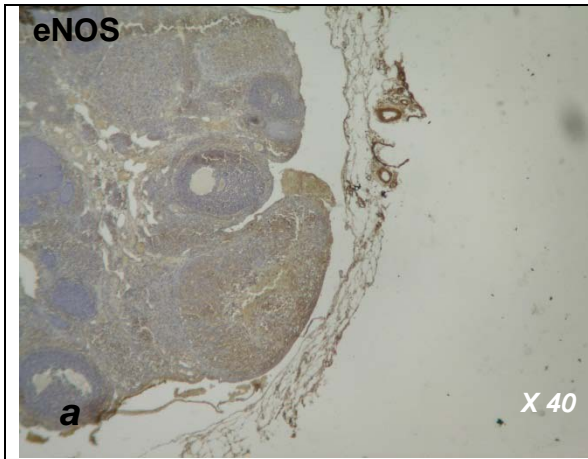


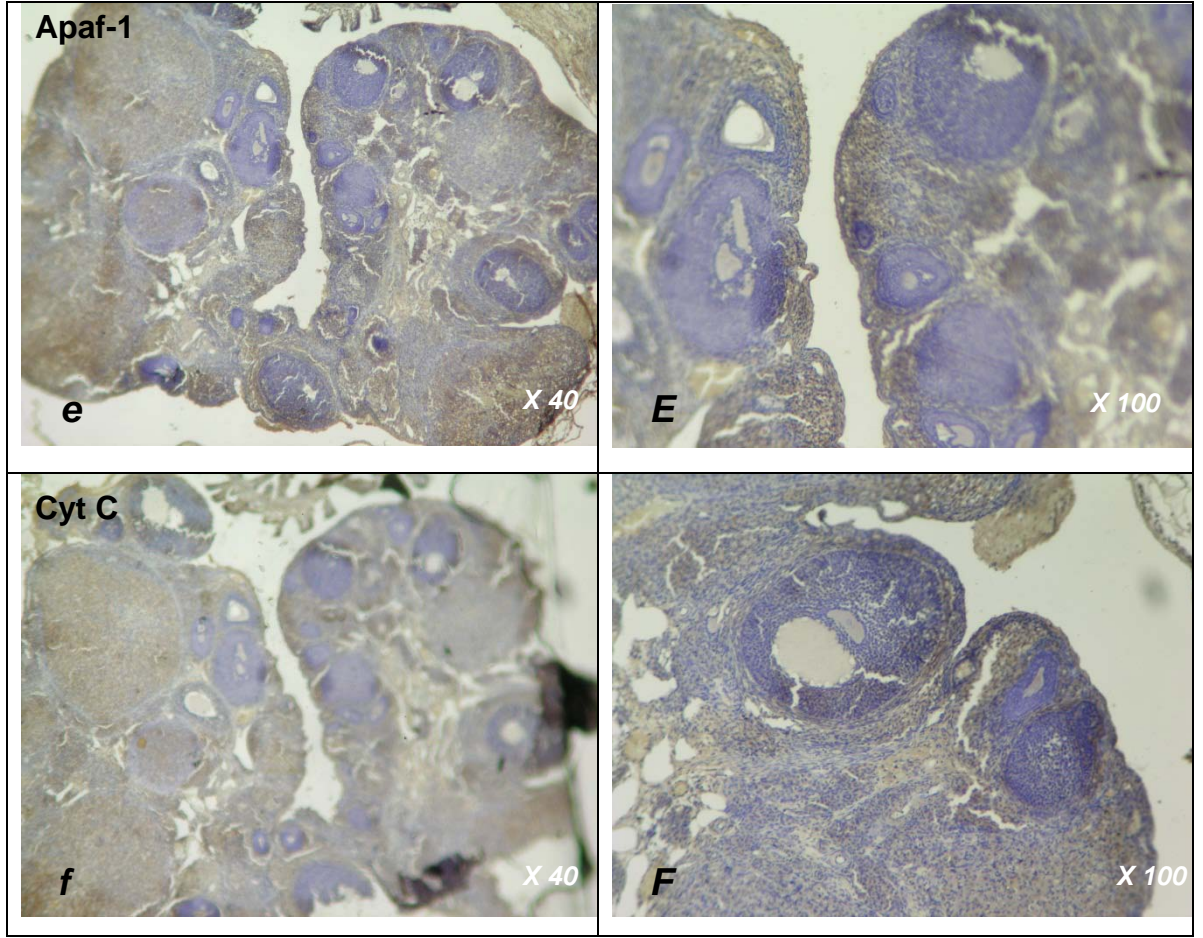
Resim 4.3.1. Kontrol grubundan alınan ovaryum örneklerinde, eNOS (a,A) ve Apaf-1 (e,E) immunoreaktiviteleri orta, iNOS immunoreaktivitesi (b,B) şiddetli olarak izlenmektedir. Apoptotik yollardan anti-Caspase-3 (c,C), anti Fas-L (d,D) ve anti-Cytochrom-C (f,F) immunoreaktiviteleri ise hafif olarak izlenmektedir.



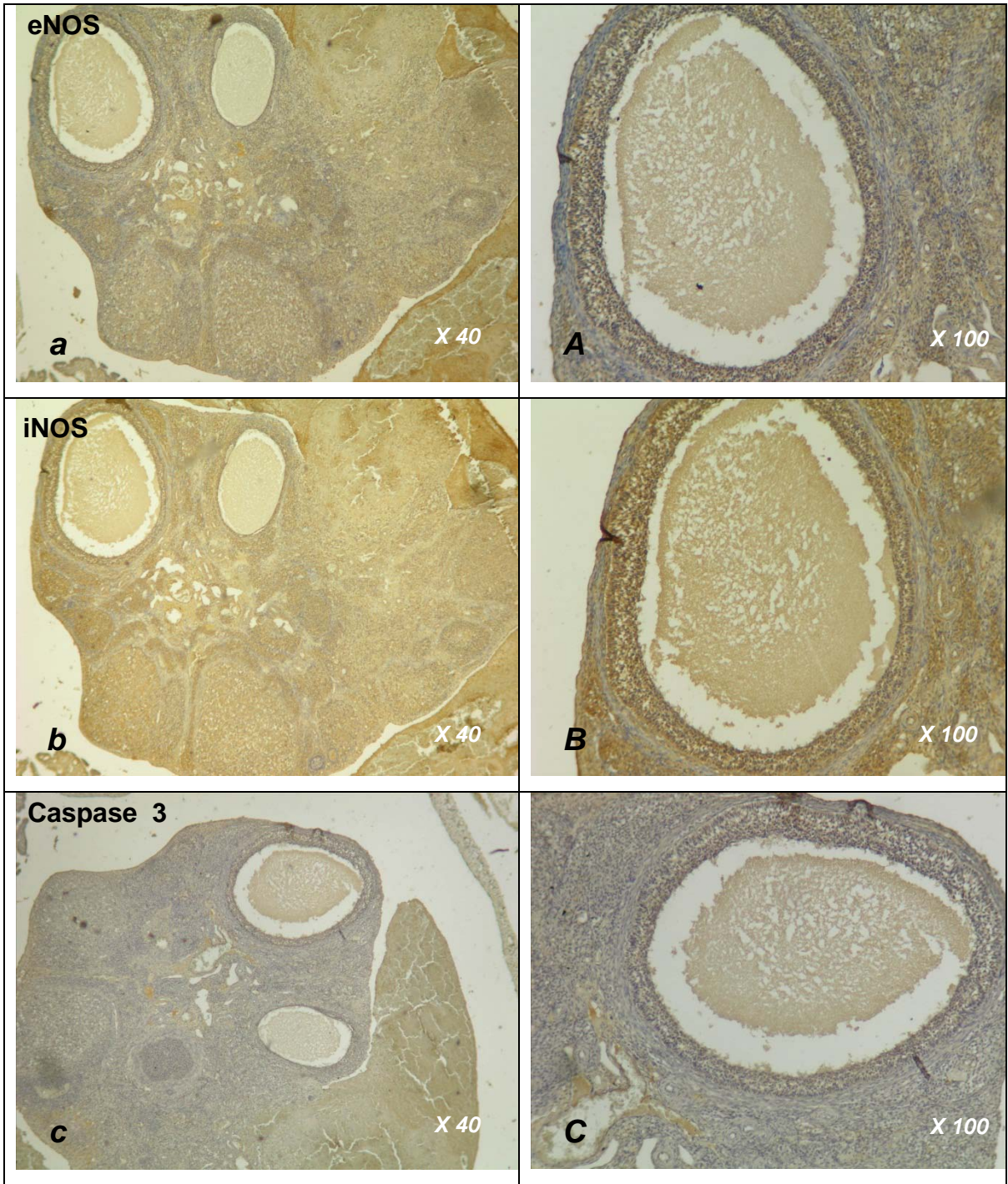


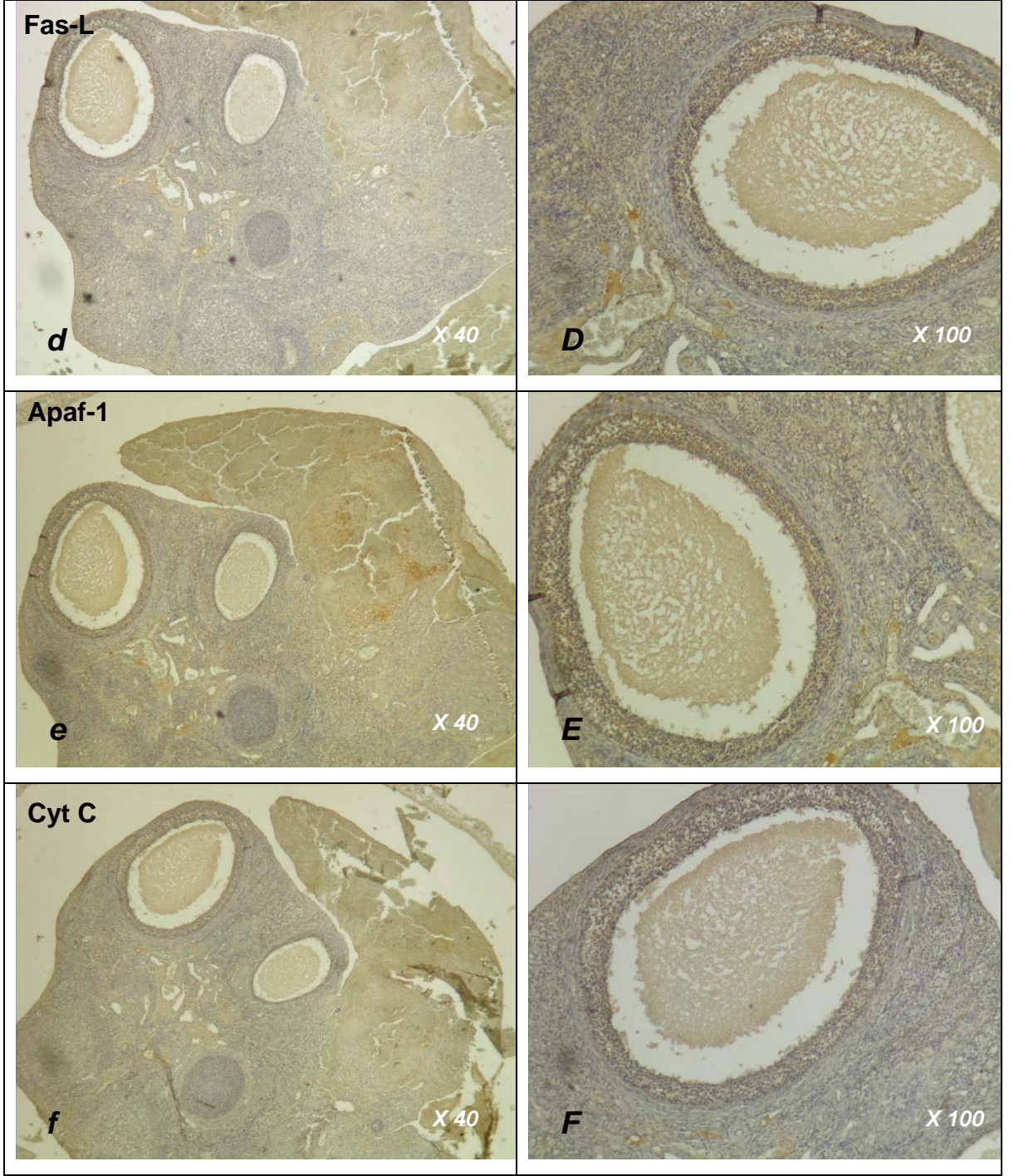
Resim 4.3.2. Grup 2'den alınan ovaryum örneklerinde, eNOS (a,A), iNOS (b,B) immunoreaktiviteleri ve apoptotik yollardan anti-Caspase-3 (c,C), anti Fas-L (d,D) ve anti- Cytochrom-C (f,F) ve Apaf-1 (e,E) immunoreaktiviteleri artmış olarak izlenmektedir.



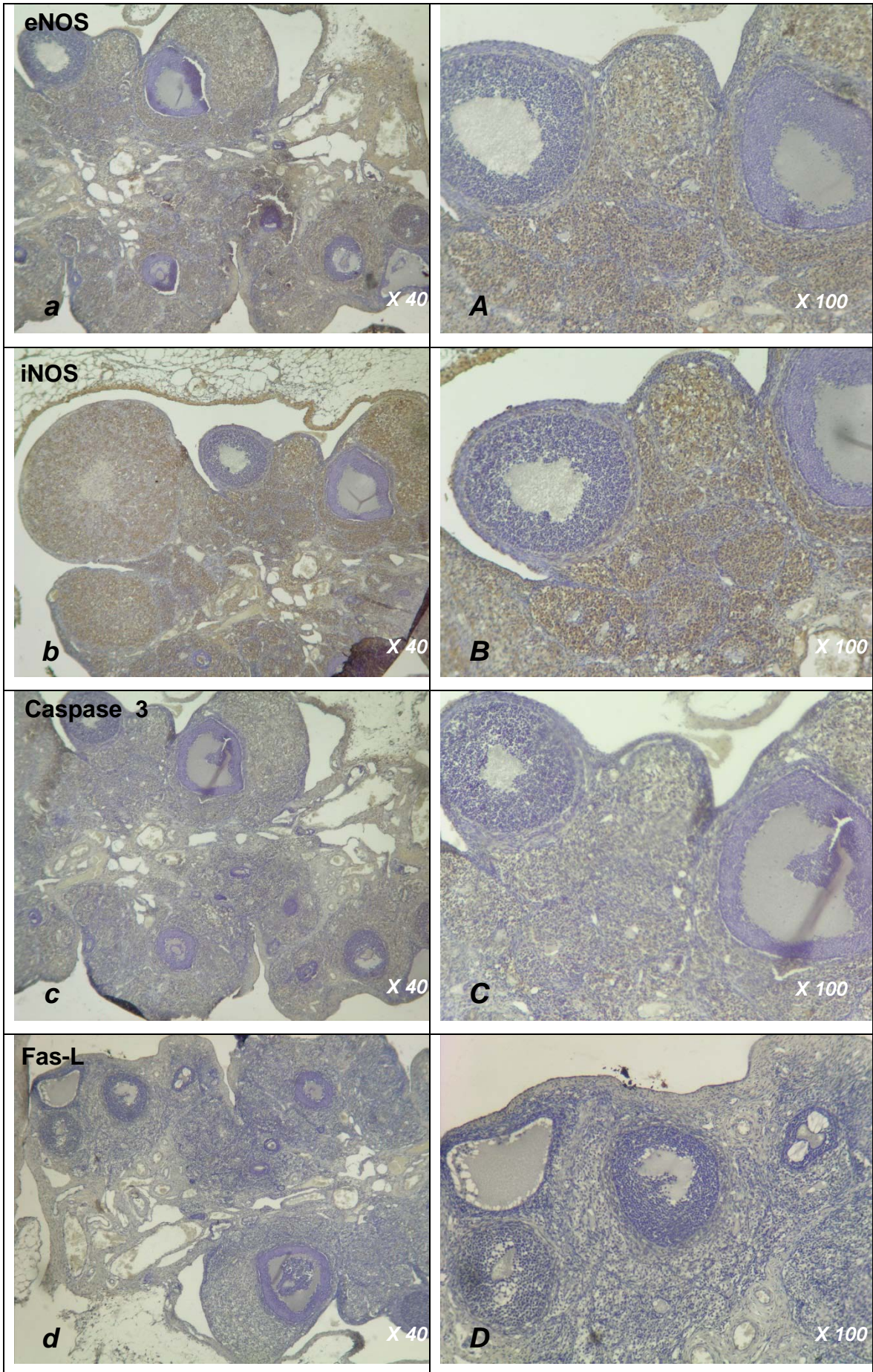


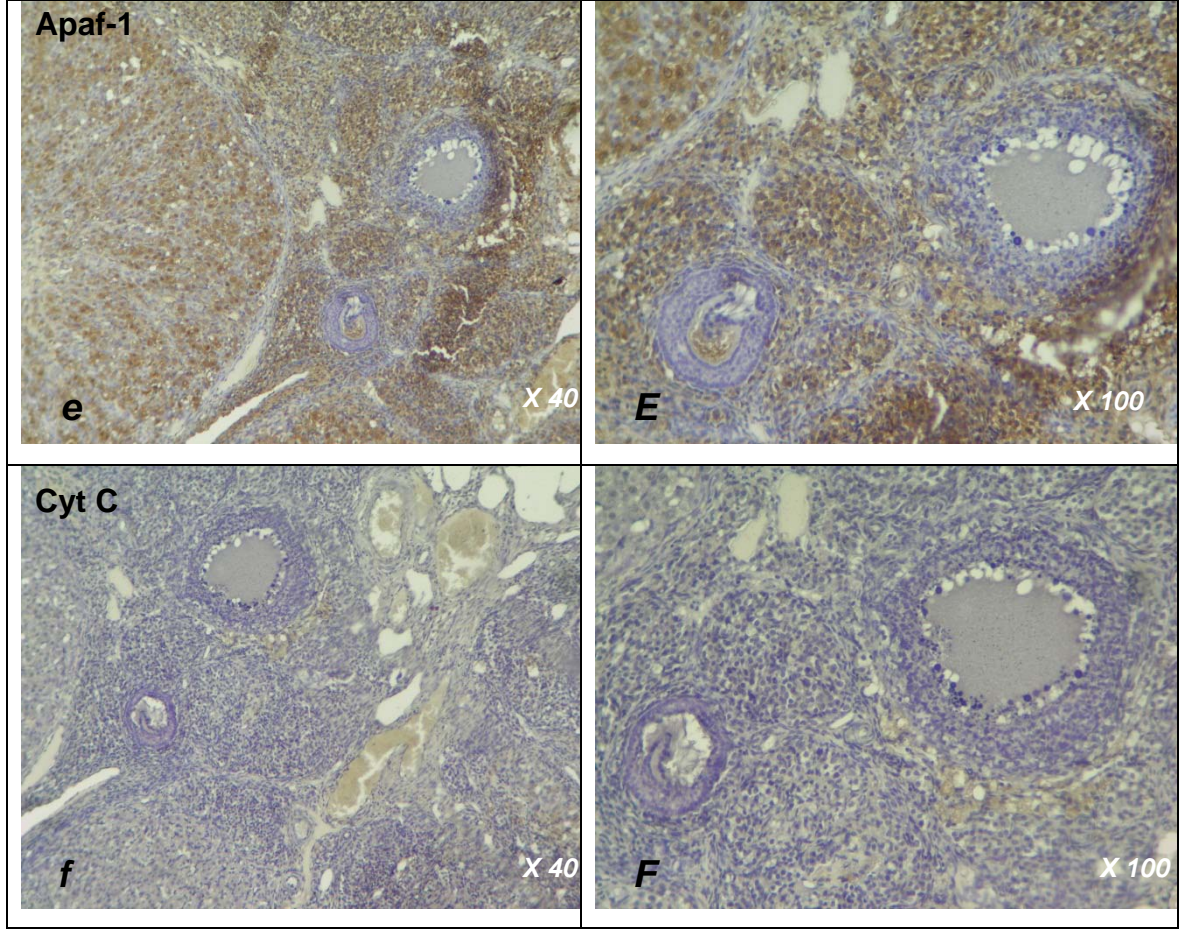
Resim 4.3.3. Grup 3'den alınan ovaryum örneklerinde, eNOS (a,A), iNOS (b,B) immunoreaktiviteleri ve apoptotik yollardan anti-Caspase-3 (c,C), anti Fas-L (d,D) ve anti- Cytochrom-C (f,F) ve Apaf-1 (e,E) immunoreaktiviteleri azalmış olarak izlenmektedir.





Resim 4.3.4. Grup 4'den alınan ovaryum örneklerinde, eNOS (a,A), iNOS (b,B) immunoreaktiviteleri ve apoptotik yollardan anti-Caspase-3 (c,C), anti Fas-L (d,D) ve anti- Cytochrom-C (f,F) ve Apaf-1 (e,E) immunoreaktiviteleri artmış olarak izlenmektedir.



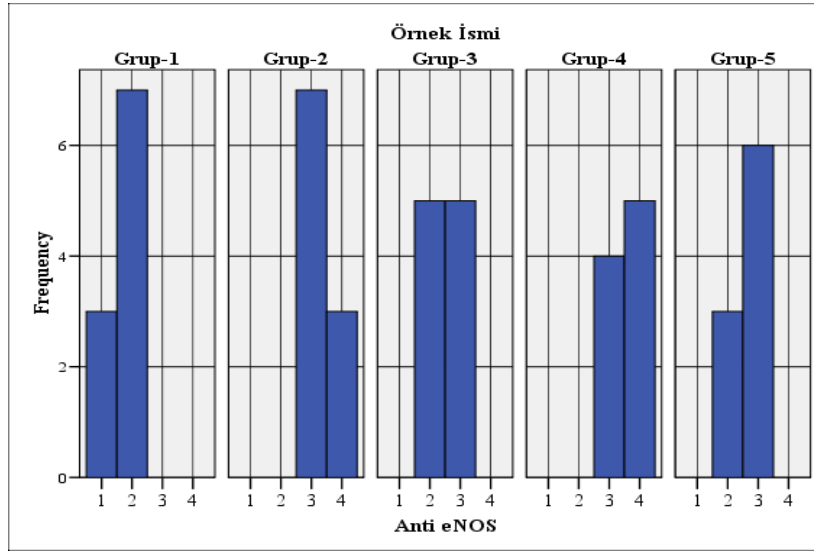


Resim 4.3.5. Grup 5'den alınan ovaryum örneklerinde, eNOS (a,A), iNOS (b,B) immunoreaktiviteleri ve apoptotik yollardan anti-Caspase-3 (c,C), anti Fas-L (d,D) ve anti- Cytochrom-C (f,F) ve Apaf-1 (e,E) immunoreaktiviteleri kontrol grubuna yakın olarak izlenmektedir.

Gruplardan elde edilen ovaryen dokunun immunohistokimyasal boyanma skorlamaları **Kruskal Wallis varyans analizi** ile karşılaştırıldığında her gruptaki histolojik grade değişimleri istatistiksel olarak oldukça anlamlı ($p < 0,001$) bulunmuştur.

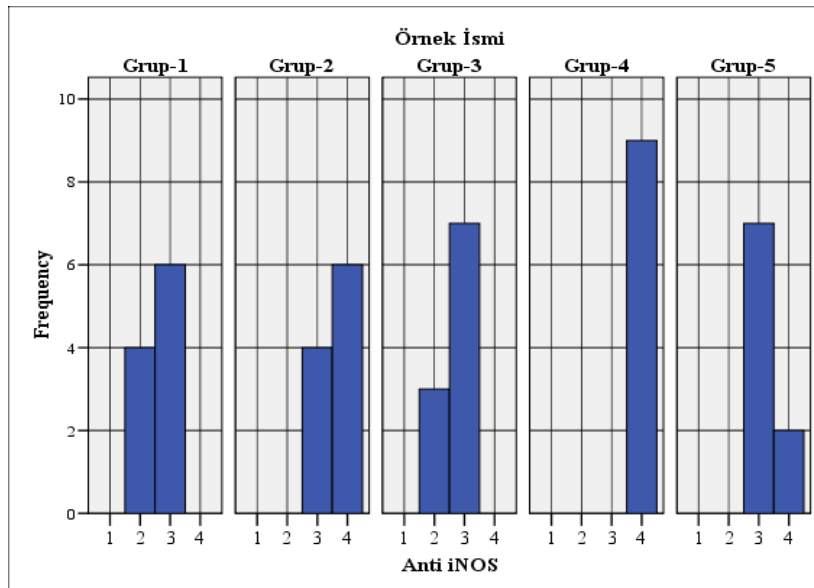
İmmunohistokimyasal boyanma skorlamaları için 2'li gruplar kendi aralarında **Mann-Whitney U testi** ile karşılaştırılmış, istatistiksel olarak;

eNOS için Grup 1 (kontrol); Grup 2 ve 4 ile karşılaştırıldığında ($p < 0,001$), Grup 3 ve 5 ile karşılaştırıldığında ($p < 0,01$) anlamlı farklılık saptanmıştır. Grup 2 (3T/D); Grup 1, 3 ve 5 ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık ($p < 0,05$) saptanırken, Grup 4 ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulunamamıştır. Grup 4 (24T/D); Grup 3 ve Grup 5 (24T/D+Se) ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık ($p < 0,01$) saptanmıştır.



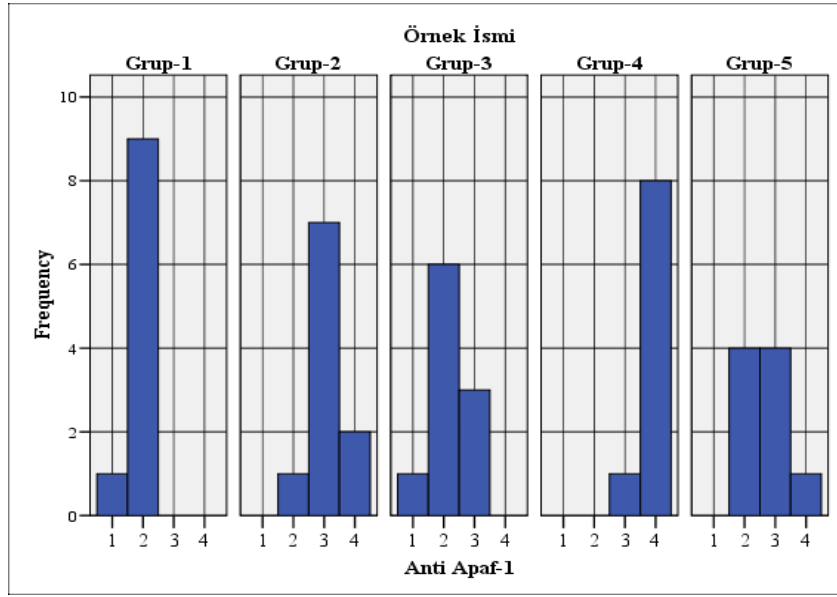
Tablo 4.3.1 : Grupların Anti-eNOS sonuçlarına göre karşılaştırılması

iNOS için Grup 1 (kontrol); Grup 4 ile karşılaştırıldığında ($p<0,001$), Grup 2 ve 5 ile karşılaştırıldığında ($p<0,01$) anlamlı farklılık saptanırken, Grup 3 ile karşılaştırıldığında ise anlamlı fark bulunamamıştır. Grup 2 (3T/D); grup 3 ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık ($p<0,05$) saptanmıştır.

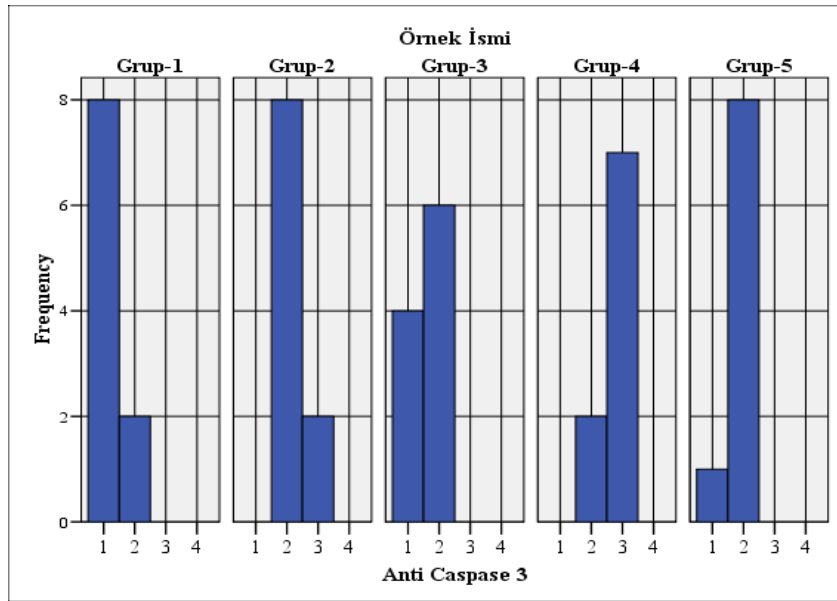


Tablo 4.3.2 : Grupların Anti-iNOS sonuçlarına göre karşılaştırılması

Apaf-1 ve Caspase-3 için Grup 1 (kontrol); Grup 2 ve 4 ile karşılaştırıldığında ($p<0,001$), Grup 5 ile karşılaştırıldığında ($p<0,01$) anlamlı farklılık saptanırken, Grup 3 ile karşılaştırıldığında ise anlamlı fark bulunamamıştır. Grup 4 (24T/D); Grup 3 ve Grup 5 (24T/D+Se) ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık ($p<0,01$) saptanmıştır.

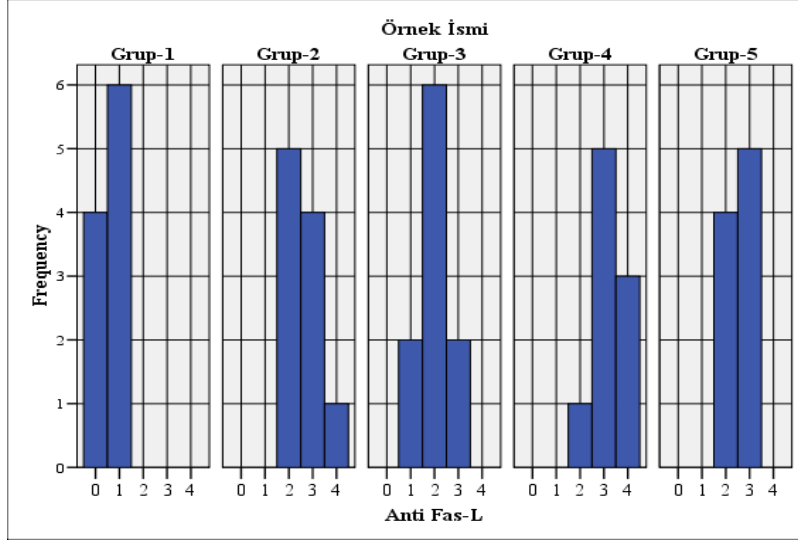


Tablo 4.3.3 : Grupların Anti-Apaf-1 sonuçlarına göre karşılaştırılması



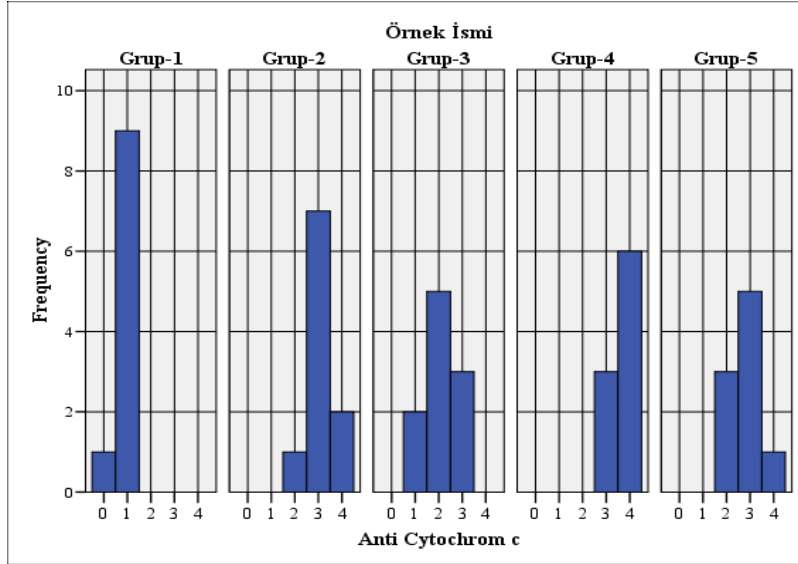
Tablo 4.3.4 : Grupların Anti-Caspase 3 sonuçlarına göre karşılaştırılması

Fas-L ve Cytochrom c için Grup 1 (kontrol); tüm gruplarla karşılaştırıldığında ($p < 0,001$) saptanırken, Cytochrom c için Grup 3 ile karşılaştırıldığında ($p < 0,01$) anlamlı farklılık saptanmıştır.



Tablo 4.3.5 : Grupların Anti Fas-L sonuçlarına göre karşılaştırılması

Fas-L için Grup 2 (3T/D); Grup 1 ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık ($p<0,001$) saptanırken, Grup 3, 4, ve 5 ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulunamamıştır



Tablo 4.3.6 : Grupların Anti Cytochrom c sonuçlarına göre karşılaştırılması

iNOS, Cytochrom c, Apaf-1 ve Caspase-3 için Grup 2 (3T/D); Grup 1, 3 ve 4 ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık ($p<0,05$) saptanırken, Grup 5 ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulunamamıştır.

eNOS, iNOS, Caspase 3, Fas-L, Apaf-1, Cytochrom c için Grup 3 (3T/D+Se); Grup 4 ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık ($p<0,01$) saptanırken, Grup 5 ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanamamıştır.

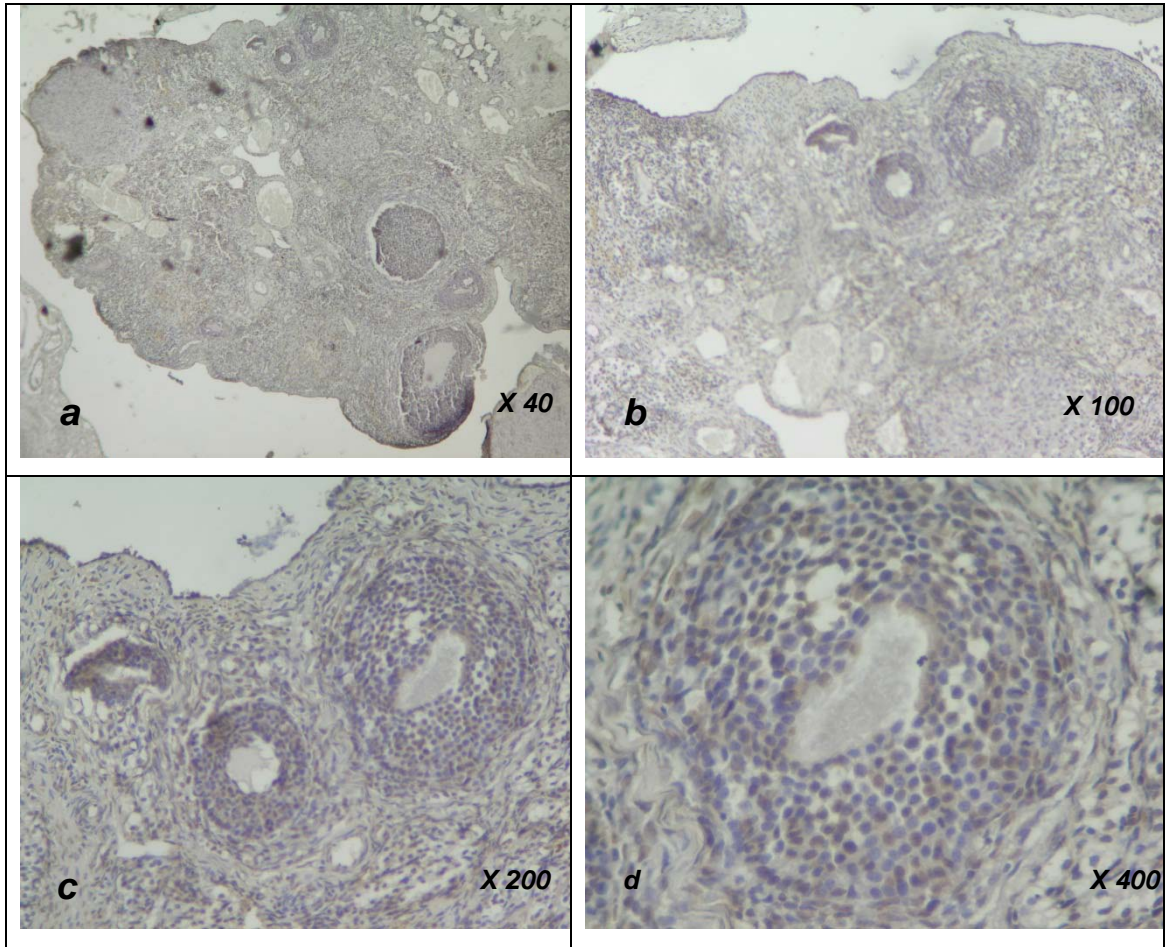
eNOS, iNOS, Caspase 3, Fas-L, Apaf-1, Cytochrom c için Grup 4 (24T/D); Grup 3 ve Grup 5 (24T/D+Se) ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık ($p<0,01$) saptanmıştır.

Grup 4 (24T/D), Grup 2 ile karşılaştırıldığında iNOS, Caspase 3, Apaf-1, Cytochrom c

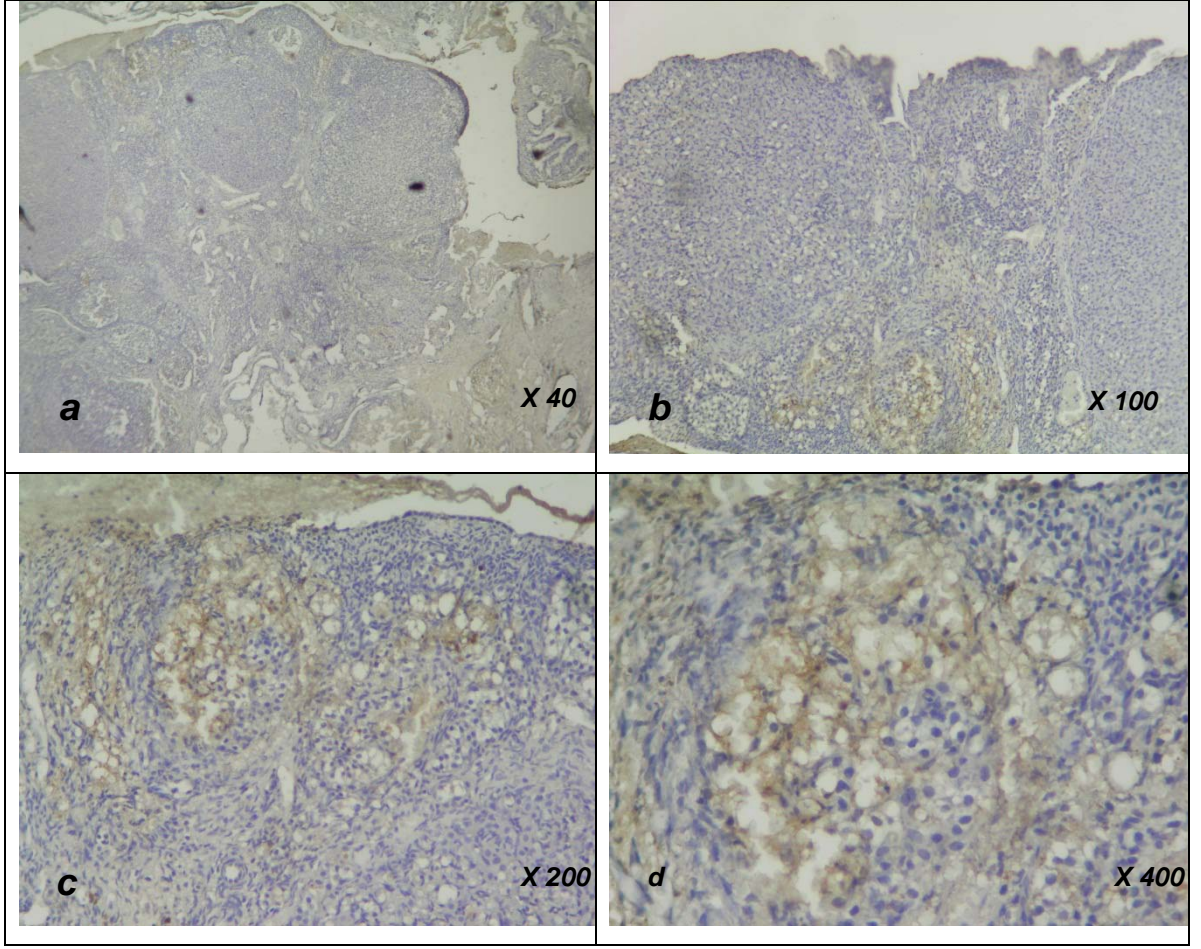
için anlamlı farklılık ($p<0,05$) saptanırken, eNOS ve Fas-L için anlamlı farklılık bulunamamıştır.

4.4. TUNEL Bulguları:

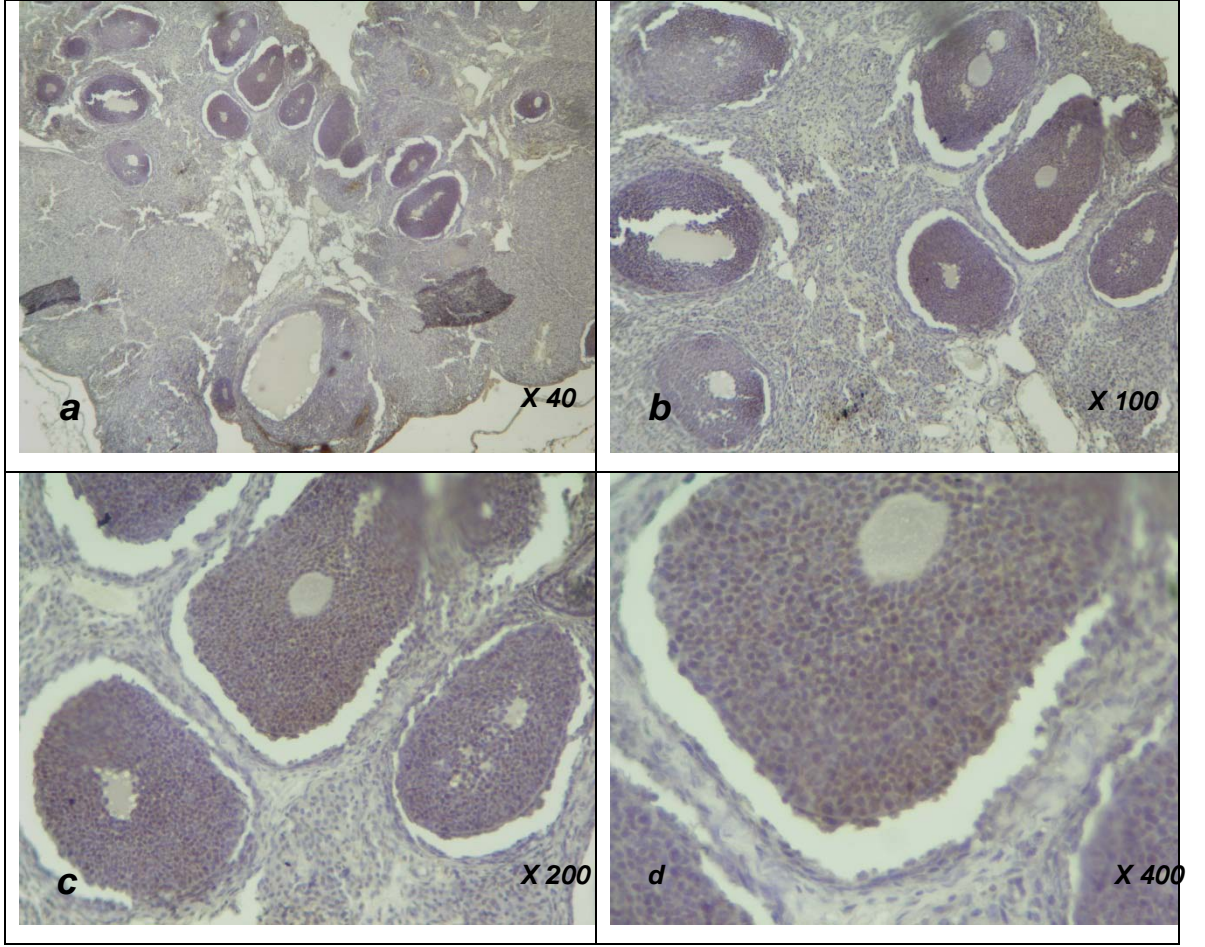
DNA fragmentasyonunu belirlemek amacı ile de TUNEL yöntemi kullanılmıştır. Grup 2’de apoptotik yolların minimal aktivasyonu gözlenirken, 24 saat torsiyon ve detorsiyon yapılan grupta TUNEL pozitif hücrelerin artmış olduğu izlenmiştir. Gruplardan elde edilen TUNEL değerlendirme sonuçları **Tablo 4.4**’te gösterilmiştir.



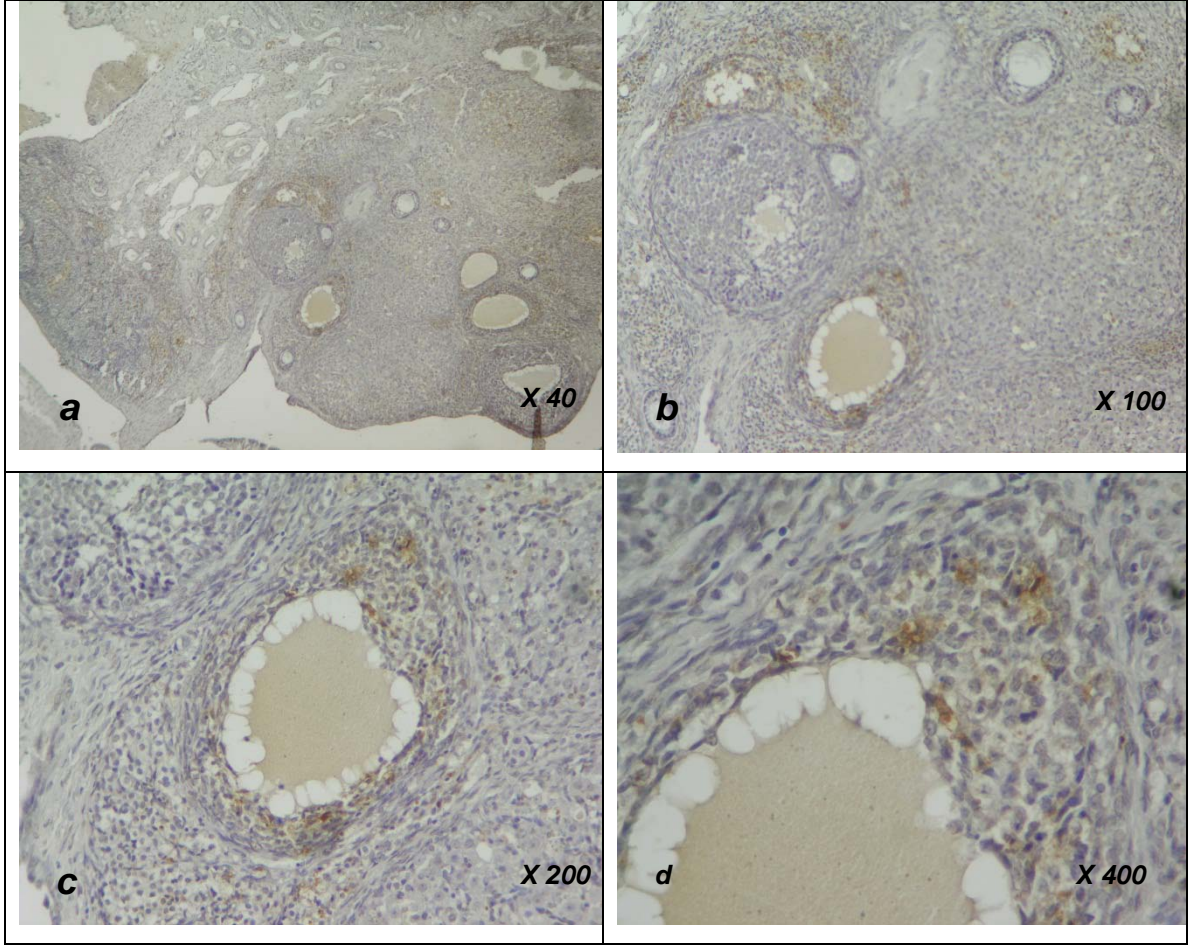
Resim 4.4.1 Kontrol grubundan alınan ovaryum örneklerinde, TUNEL boyama izlenmektedir.



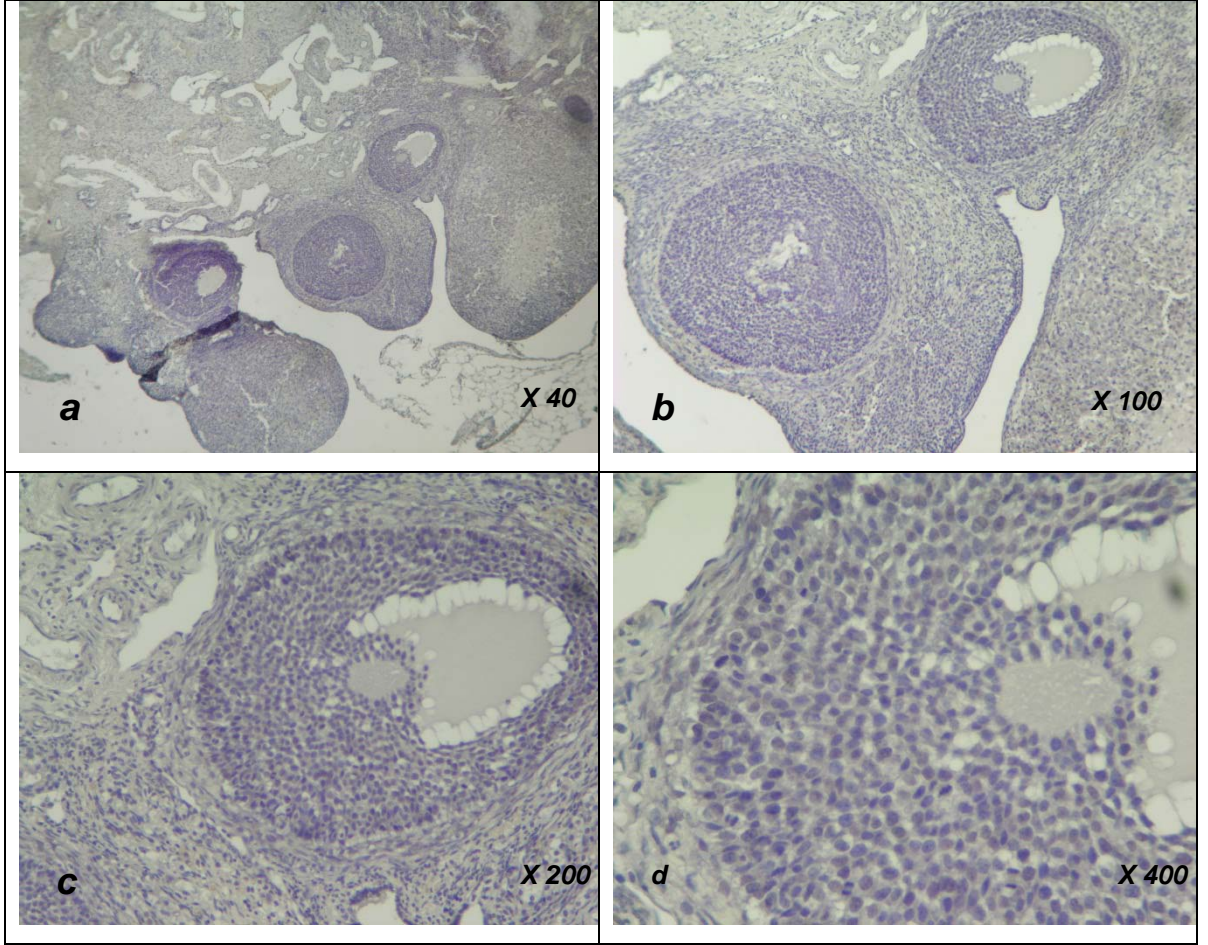
Resim 4.4.2. Grup 2'den alınan ovaryum örneklerinde, TUNEL pozitif hücrelerin artmış oldukları izlenmektedir.



Resim 4.4.3. Grup 3'den alınan ovaryum örneklerinde, TUNEL pozitif hücrelerin azalmış oldukları izlenmektedir.

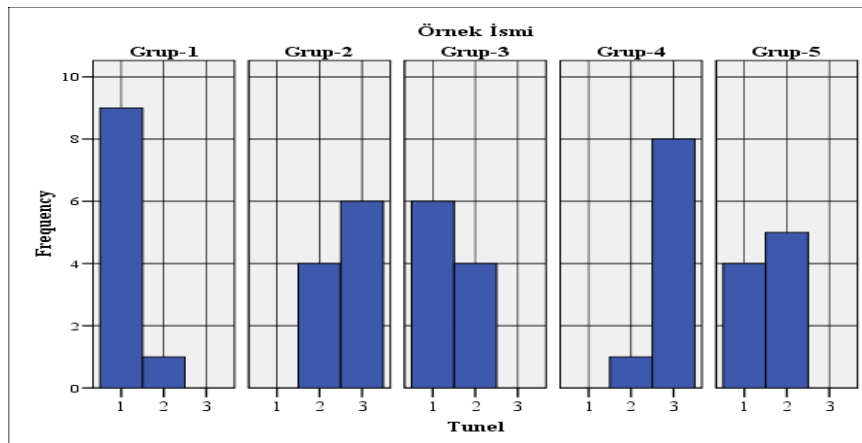


Resim 4.4.4. Grup 4'den alınan ovaryum örneklerinde, TUNEL pozitif hücrelerin artmış oldukları izlenmektedir.



Resim 4.4.5. Grup 5'den alınan ovaryum örneklerinde, TUNEL pozitif hücrelerin azalmış oldukları izlenmektedir.

İstatistiksel olarak; Grup 1 ile 3, Grup 1 ile 5, Grup 2 ile 4 karşılaştırıldıklarında anlamlı farklılık bulunamamış olup, diğer gruplar birbirleriyle karşılaştırıldıklarında (Grup 2 ile 3 ve Grup 4 ile 5 arasında) anlamlı farklılık ($p < 0,01$) saptanmıştır.



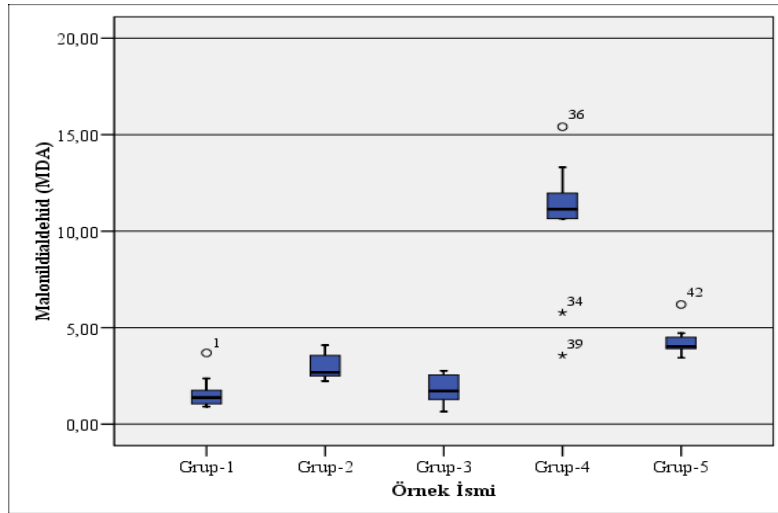
Tablo.4.4.2: Grupların DNA Fragmentasyon (TUNEL) sonuçlarına göre karşılaştırılması

4.5. Biyokimyasal Bulguların İstatistiksel Değerlendirilmesi

Gruplardan elde edilen şıçan kanlarının biyokimyasal analizleri **Kruskal Wallis varyans analizi** ile karşılaştırıldığında her gruptaki Süperoksitdismutaz (SOD), Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px), Malonildialdehid (MDA) değerleri için istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p<0,001$) saptanmış olup, AntiMüllerian Hormon (AMH) değerleri için gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır.

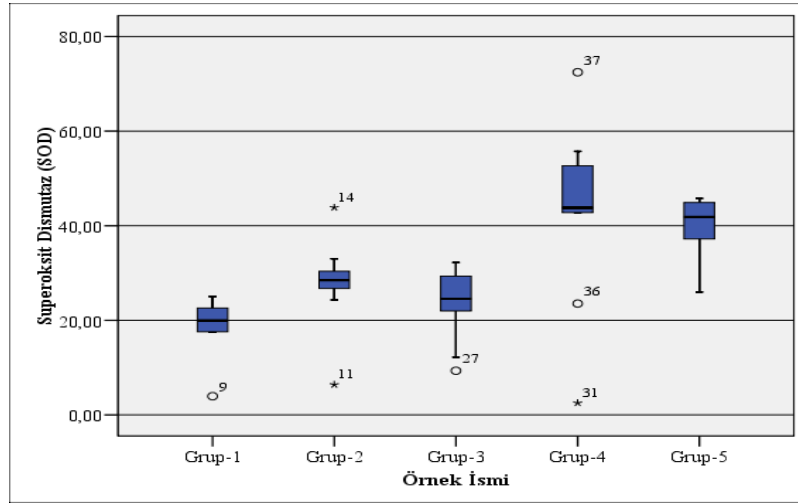
Biyokimyasal değerler için 2'li gruplar kendi aralarında **Mann-Whitney u testi** ile karşılaştırılmış, istatistiksel olarak;

MDA için Grup 1, Grup 3 ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulunamamış olup, diğer tüm gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında (Grup 2 ile 3 ve Grup 4 ile 5 arasında) istatistiksel anlamlı farklılık ($p<0,01$) saptanmıştır.



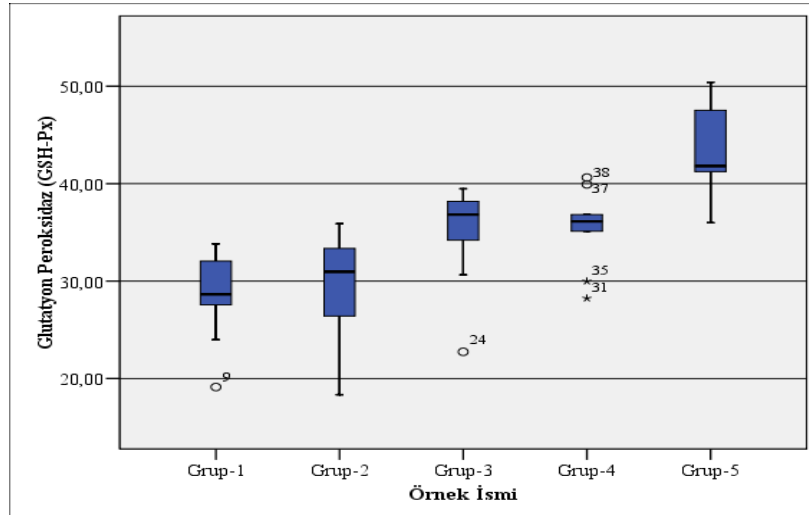
Tablo 4.5.1: Grupların MDA sonuçlarına göre karşılaştırılması

Süperoksitdismutaz (SOD) için Grup 1 ile 3, Grup 2 ile 3, Grup 2 ile 4 ve Grup 4 ile 5 birbirleriyle karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulunamamış olup, diğer gruplar arasında anlamlı farklılık ($p<0,05$) saptanmıştır. (SOD' un 3 saatlik ve 24 saatlik gruplarda Selenyum uygulamasıyla olan değişiklikleri anlamlı bulunmamıştır.)



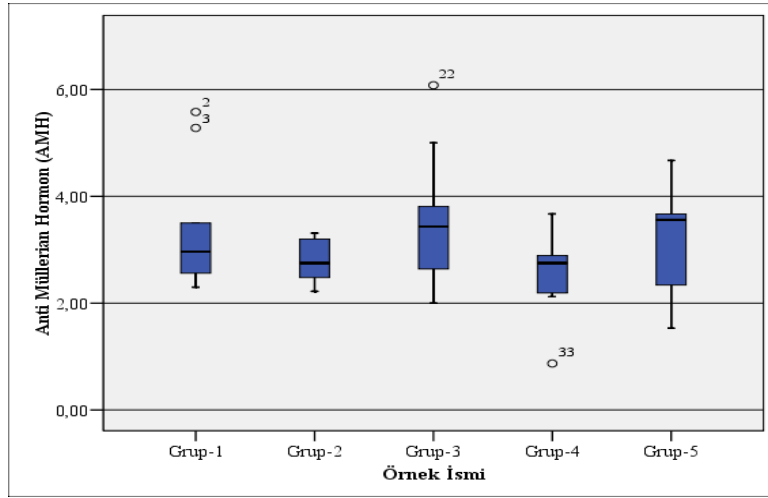
Tablo 4.5.2 : Grupların SOD sonuçlarına göre karşılaştırılması

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) için Grup 1 ile 2 ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulunamamış olup, diğer tüm gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında (özellikle Grup 2 ile 3 ve Grup 4 ile 5 arasında) anlamlı farklılık ($p < 0,05$) saptanmıştır.



Tablo 4.5.3 : Grupların GSH-Px sonuçlarına göre karşılaştırılması

AntiMüllerian Hormon (AMH) için tüm gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulunamamıştır ($P>0,1$).



Tablo 4.5.4 : Grupların AMH sonuçlarına göre karşılaştırılması

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada iskemi ve reperfüzyon sonucu rat overlerinde oluşan histolojik ve immunohistokimyasal değişiklikler üzerine bir antioksidan olan Selenyumun etkisi moleküler düzeyde araştırılmıştır. İskemi ve reperfüzyon sonucu oluşan apoptotik süreçte rol oynayan faktörler karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

İskemi ve reperfüzyon sonucu dokuda meydana gelen hasar, bu hasarda serbest oksijen radikallerinin rolü ve antioksidanların bu hasarı gidermede etkileri konusunda son yıllarda çok sayıda araştırma yapılmıştır. İskemi süresi arttıkça doku hasarının büyüklüğü de artmaktadır. Dokulara göre farklılık göstermekle beraber iskeminin belirli bir süresine kadar doku, geri dönüşebilen doku hasarı fazına, iskemi süresi arttıkça doku geri dönüşümsüz doku hasarı fazına girmektedir. Bu aşamadaki doku yeniden perfüzyon sağlansa bile doku hasarı geri dönmemektedir (145). Sıçan overlerinde yapılan bir çalışmada geridönüşümsüz evrenin 36 saatte meydana geldiği, 24. saatte ise uygulanan tedavi ile overin hasarının geri döndüğü belirlenmiştir (146). Dokuya tekrar oksijen desteğinin sağlanmasıyla sisteme aniden aşırı miktarda giren oksijen, serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olmaktadır. Böylece doku hasarı daha da artmaktadır (148). Reperfüzyonla birlikte dokuya gelen lökositlerin serbest radikal oluşumuna neden olarak oksidatif hasarı arttırdığı bilinmektedir. Lökosit toplanmasının inhibe edildiği bir çalışmada hasarın azaltıldığı gösterilmiştir (148). İskemi reperfüzyon hasarını azaltmak ve önlemek için birçok farmakolojik ajanla değişik çalışmalar yapılmıştır (146, 148, 149, 150).

Graff follikülünde hücre ölümü ilk olarak tavşan overlerinde tanımlamıştır. İnsanlarda fetal hayatta primordial folliküller oluşurken doğum öncesi bunların üçte ikisi kontrollü hücre ölümü olan apoptotik hücre ölümü ile yok olmaktadır. Apoptozisin günümüzde artık oogeneziste, folikülogeneziste, oosit kaybı ve oosit seçiminde ve atrezide rol aldığı bilinmektedir. Folliküler hücrelerdeki yaşamsal ve apoptotik moleküller bir denge içinde bulunmaktadırlar ve hücrenin akıbetini belirlemektedirler (151).

Çalışmamızda apoptozis belirteçlerinden Apaf-1, Cytochrom c, Caspase 3, Fas-L ve iNOS ile eNOS immunoreaktiviteleri değerlendirilmiş ve DNA fragmentasyonlarının belirlenmesinde ise TUNEL yöntemi kullanılmıştır.

Gruplardan elde edilen veriler sonucuna göre; kontrol grubu olan Grup 1'in torsiye olmuş gruplara göre morfolojik yapısı, histolojik grade'i, follikül sayıları korunmuş ve normal fizyolojik düzeyde olduğu izlenmiştir. Yine torsiye gruplarından Grup 2 (3T/D) ile Grup 3 (3T/D+Se) birbirleriyle, Grup 4 (24T/D) ile Grup 5 (24T/D+Se) birbirleriyle istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Histolojik grade ve follikül sayıları karşılaştırıldıklarında Selenyum verilen gruplarda değişikliklerin olumlu yönde olduğu ve bunun da istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$) olduğu bulunmuştur. Ancak Grup 5 (24T/D+Se)' te saptanan hasar her ne kadar Grup 4 (24T/D)' e göre önlenmişse de Grup 2 (3T/D) ve Grup 3 (3T/D+Se)' e göre iskemi reperfüzyon hasarının daha fazla olduğu anlaşılmıştır. Yine de Grup 2 (3T/D) ve Grup 5 (24T/D+Se) karşılaştırıldığında artan hasarın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0,1$) görülmüştür. Bu da overin iskemi-reperfüzyona karşı morfolojik yapısının, histolojik grade'inin ve follikül sayısının Selenyum etkisiyle korunduğunu göstermektedir.

Gruplar arasında apoptoz belirteçlerinden; iNOS, Caspase 3, Apaf-1 için elde edilen immunoreaktivite sonuçları benzer bulunmuştur. Grup 3 (3T/D+Se) ile kontrol grubu karşılaştırıldığında bu verilerdeki değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı bulunmaması, yine Selenyumun 3 saatlik torsiye hasarının etkilerini büyük oranda geri döndürdüğü izlenimini vermektedir. Ayrıca aynı saatlerde (3 ve 24 saat) torsiye uğratılan ratların Selenyum verilen grubunda, verilmeyenlere oranla apoptotik belirteçlerin (iNOS, Caspase 3, Apaf-1) immunoreaktivitelerinin anlamlı oranda ($p<0,05$) düşük olduğu saptanmıştır. Bu üç belirteç için değerlendirildiğinde apoptotik hasarın önlenmesinde Selenyumun etkinliğinin yüksek olduğu anlaşılmaktadır.

Gruplar arasında Fas-L immunoreaktivitesi için elde edilen sonuçlarda ise, 3 saatlik grupta Selenyumun olumlu etkisinin yine görüldüğü ancak bununla beraber Fas-L değişiminin anlamlı olmadığı ($p>0,05$) bulunmuştur. Ancak 24 saatlik torsiye de ise Selenyum verilen Grup 5 (24T/D)' in Grup 4 (24T/D)' e göre Fas-L değişiminin istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu bulgu uzun süren hasarda Selenyumun etkinliğinin daha fazla olduğunu düşündürmektedir.

Gruplar arasında Cytochrom c ve eNOS immunoreaktiviteleri için elde edilen sonuçlarda, torsiye gruplarından Grup 2 (3T/D) ile Grup 3 (3T/D+Se) birbirleriyle,

Grup 4 (24T/D) ile Grup 5 (24T/D+Se) birbirleriyle karşılaştırıldığında Selenyumun koruyucu etkinliği anlamlı ($p<0,001$) olarak tespit edilmiştir.

DNA fragmantasyonlarının tespiti amacıyla değerlendirilen TUNEL için elde edilen sonuçlarda, DNA fragmantasyonunun 3 ve 24 saatlik torsiyon grubunda istatistiksel olarak anlamlı arttığı ($p<0,001$) tespit edilmiştir. Yine Selenyum verilen 24 saatlik gruptaki (Grup5) değişim Grup 4 (24T/D)' e göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Aynı şekilde Grup 3(3T/D+Se)'ün Grup 2(3T/D)'e göre Selenyumun etkisiyle korunduğu da istatistiksel olarak desteklenmiştir. Bu da DNA fragmantasyonunu uzun süren dönemde bile önlemede Selenyumun etkin olduğunu göstermektedir.

Taskın ve ark, yaptıkları çalışmada, rat overlerini 4 saatten 36 saate kadar torsiyon ve detorsiyon hasarına uğratmışlar ve 24 saate kadar olan over hasarları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik saptamamışlardır (146). Ancak bizim çalışmamızdan farklılığı, detorsiyonun bir haftaya uzatılmış olmasıdır. Bizim çalışmamızda ise detorsiyon süresinin kısa olması nedeniyle, akut dönemdeki değişimler değerlendirilmiştir. Yine uygulanan Selenyum tedavisinin etkinliğinin değerlendirilebilmesi için çalışmamız geri dönüşebilir dönem olan 24 saat sınırında tutulmuştur. Yine bu akut dönemde bile Selenyum uygulamasının overlere olumlu etkisi, Taşkın ve ark. 'nın uzun dönem sonrası over değişikliklerine benzer bulunmuştur (146).

Ergun ve ark. 2010 çalışmasında 3 saat süreyle torsiyon yapılan rat overlerinin detorsiyonu öncesi EPO ve dimethylsulfoxide uygulamışlardır (149). Kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında lipid peroksidasyon ürünlerinin torsiyon grubunda arttığı görülürken EPO ve dimethylsulfoxide verilen grupların tedavi etkinliğinin anlamlı olduğunu saptamışlardır. Bulgular bizim çalışmamızdaki 3 saat süreyle torsiyon-detorsiyon uygulanan grupta Selenyum uygulamasının etkinliği ile benzer bulunmuştur.

Selenyum, insan ve hayvanların normal gelişimini sürdürebilmeleri için gerekli olan, toprak, bitkiler ve suda farklı bileşimlerin yapısına giren esansiyel iz elementlerden biridir (108). Vücudun en önemli antioksidan enzimi olan glutatyon peroksidazın (GSH-Px) bir komponenti olması nedeniyle çalışmamızda biyokimyasal parametreler arasına GSG-Px dahil edilmiştir. Diğer parametrelerden, yine antioksidan enzim görevi alan süperoksitdismutaz (SOD), lipid peroksidasyon ürünü olan malonildialdehid (MDA) de çalışmamızda kullanılmıştır.

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) için elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, 3 saat ile 24 saat torsiyon yapılan gruplar arasındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Selenyum verilen gruplardaki (Grup 3 (3T/D+Se), Grup 5 (24T/D+Se)), Glutasyon peroksidaz aktivite artışı da tedavi etkinliğinin güçlü bir göstergesi olmuştur. Enzim yapısında bulunan ve aktivite artışına neden olan Selenyum elementinin dışarıdan verilmesinin, reperfüzyon hasarını önlemede güçlü bir etkinliğe sahip olan GSH-Px enzim aktivitesini artırarak etki gösterdiği düşünülmüştür.

Superoksitdismutaz (SOD) enzim aktivitesi değerlendirildiğinde, 3 saat ile 24 saatlik gruplar karşılaştırıldığında aktivitesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, Selenyum uygulanması sonucu olan enzim aktivite artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu da bize Selenyum uygulamasının superoksitdismutaz aktivitesi ile direkt ilişkisinin bulunmayıp, geçirilen sürenin uzunluğu ve serbest radikal artışı ile daha orantılı bir ilişkinin bulunduğunu göstermektedir.

Lipid peroksidasyon ürünü Malonildialdehid (MDA) ise torsiyon sürelerine bağlı olarak artış göstermiş olup bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Grup 3 (3T/D+Se)'te selenyum uygulanması ile 3 saatlik torsiyonda beklenen MDA değerlerinden daha düşük saptanmış ve Selenyum uygulanmasıyla lipid peroksidasyonunun büyük oranda azaltıldığı görülmüştür. Benzer şekilde 24 saatlik torsiyona selenyum eklenmesiyle MDA seviyelerindeki değişiklik ($p<0,01$) de tedaviden fayda görüldüğü anlamına gelmektedir.

KırŞahin ve ark. 2008 çalışmasında, 3 saat süreyle torsiyon ve detorsiyon yapılan ve torsiyon öncesi salin ve aprotinin(plazmin ve doku kallikrein inhibitörü) uygulanan ratların sonuçları değerlendirilmiş; aprotinin uygulamasının salin uygulamasına oranla daha faydalı olduğu, salin grubuna oranla aprotinin uygulanan grupta hasarın daha az olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuşken, superoksitdismutaz aktiviteleri arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Aynı çalışmada MDA seviyelerinin aprotinin grubuna oranla salin grubunda istatistiksel olarak arttığı saptanmıştır (150). Bizim çalışmamızda da benzer sonuçlarla karşılaşmıştır. Tedavi gruplarındaki (Grup3 ve 5) koruyucu etkinlik MDA seviyeleri ile desteklenirken SOD aktivitelerindeki değişikliklerin tedavi sonrası değişimleri anlamlı bulunmamıştır.

Bakan ve ark, 2009 çalışmasında 1 ve 4 saatlik torsiyon, 1 ve 48 saatlik detorsiyon çalışmasında overlere ilişkin hasarların. MDA, NO, SOD değişimlerinin anlamlı olduğu ve uygulanan Eritropoietin tedavisinin akut dönemde etkilerinin çalışmamızdaki Selenyum etkinliği gibi anlamlı olduğu görülmüştür (148). Bu yayınl

olan farklılığımız ise; SOD değişimlerinin, Selenyum verilmesinden beklendiği faydayı göstermemesidir.

Overlerde meydana gelen iskemi, reperfüzyon hasarı histolojik ve biyokimyasal birçok parametre ile değerlendirilmiş ve 24 saate kadar olan torsiyon hasarının hiçbirinde rat overlerinde geri dönüşümsüz durumla karşılaşılmamıştır. Bu geridönüşümlü dönemler kendi aralarında karşılaştırıldıklarında ise genel olarak uzamış iskeminin overlere yapısal, fonksiyonel birçok hasara neden olduğu gözlenmiştir. Tedavi süreci de değerlendirilmiş ve gruplara Selenyum uygulanmıştır. GSH-Px, histolojik yapı, over folikül sayıları, MDA seviyeleri başta olmak üzere, apoptotik belirteçlerin değerlendirilmesinde selenyum uygulamasının faydaları tespit edilmiştir. Bu faydalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Bu değerlendirmeler dışında iskemi-reperfüzyon hasarının over rezervine verebileceği hasar da son zamanlarda over rezerv göstergesinde çok önemli olan AntiMüllerian Hormon ile değerlendirilmiştir. AMH, Selenyum uygulaması yapılmayan gruplarda Selenyum uygulanan gruplara göre daha düşük saptanmıştır. Ayrıca 24 saatlik torsiyon ile 3 saatlik torsiyon karşılaştırıldığında iskeminin uzamasına bağlı AMH'nin azaldığı da görülmüştür. Ancak sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde grupların tümünde ve kendi aralarındaki karşılaştırmalarda anlamlı farklılık saptanamamıştır. Bu durumun sebeplerinden birisi daha önce de belirtildiği gibi çalışmamızda uygulanan torsiyon-detorsiyon sürelerinin hiçbirinin geri dönüşümsüz döneme ulaşmaması ve bu nedenle overlerin, hasar derecelerine ve uygulanan Selenyum tedavisine bağlı olarak kendi-kendine onarım sürecine girmeleri ile açıklanabilir. Diğer bir sebep olarak ise yeniden fonksiyon kazanma potansiyeline sahip over dokusunun rezervinin korunduğu da düşünülmüştür. Ancak örneklem büyüklüğünün artırılmasıyla, iskemi sürelerinin uzatılmasıyla veya bu konuda klinik çalışmaların yapılmasıyla AMH'nin torsiyon-detorsiyon hasarını saptamada ve buna bağlı over rezervini değerlendirmede belirleyici bir faktör olduğunun saptanabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak; over hasarı ve buna bağlı gelişebilecek over rezerv kayıplarının önlenmesinin reproduktif dönemde büyük öneme sahip olduğu bilinmektedir. Özellikle bu dönemde daha sık karşılaşılan ve overe belirli derecelerde hasar veren over torsiyonuna yaklaşımda cerrahiye ek olarak Selenyum tedavisinin etkinliği araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda, Selenyum tedavisinin cerrahiye (detorsiyon) ek olarak kısa ve uzun dönem iskemiye önlemede, over hasarının azaltılmasında etkin

olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmanın öngördüğü over torsiyonunda Selenyumun tedavi etkinliğinin klinik çalışmalarla da desteklenmesi ile insanlar üzerinde kullnılması uygun olabilecektir.

Ayrıca tüm bu ovaryen iskemi-reperfüzyon ve Selenyum tedavisi uygulanan gruplarda değerlendirilen AMH'nin ise over hasarının derecesine göre olan değerimlerinin göz ardı edilmemesi gerekmektedir. AMH'nin ovaryen hasar derecelerine göre azaldığı ve Selenyum tedavi uygulamasıyla arttığı tespit edilmiştir. Bu bulgu da AMH'nin over hasarı tespitinde kullanılmasının nn açmaktadır. Çalışmada kullanılan örneklemin büyütülmesi ve bu konuda klinik çalışmaların yapılmasıyla AMH'nun ovaryen hasarı tespit etmedeki belirleyicininin artırılabilceği dşnlmştir.

6. TABLOLAR

Tablo 3.3.1. : Parafin Doku Takip Protokolü

İŞLEM	KULLANILAN MADDE	SÜRE
A. TESPİT	% 10 FORMALİN	24-48 SAAT
	AKAR SU	1 GECE
B. DEHİDRATASYON	% 50 ALKOL	½ SAAT
	% 60 ALKOL	½ SAAT
	% 70 ALKOL	½ SAAT
	% 80 ALKOL	½ SAAT
	% 90 ALKOL	½ SAAT
	% 95 ALKOL	½ SAAT
	% 100 ABSOLÜ ALKOL	1 SAAT
C. ŞEFFAFLAŞTIRMA	ALKOL:KSİLEN (1:1)	½ SAAT
	KSİLEN I	1 SAAT
	KSİLEN II	1 SAAT
D. İNFİLTRASYON (60°C)	KSİLEN-PARAFİN (1:1)	½ SAAT
	PARAFİN I	1 SAAT
	PARAFİN II	1 SAAT
E. GÖMME	PARAFİN	

Tablo 3.3.2: Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON	60°C etüvde	1 GECE
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN I	30 DAKİKA
	KSİLEN II	30 DAKİKA
REHİDRATASYON	% 95 ALKOL	2 DAKİKA
	% 80 ALKOL	2 DAKİKA
	% 70 ALKOL	2 DAKİKA

	% 60 ALKOL	2 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
BOYAMA	HEMATOKSİLEN	5 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
DİFERANSİYASYON	ASİT-ALKOL	1-2 SANİYE
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
BOYAMA	EOZİN	3 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
	% 80 ALKOL	1 DAKİKA
	% 95 ALKOL	1 DAKİKA
KURUTMA	HAVADA VEYA ETÜVDE	
	KSİLEN	1 SAAT
KAPAMA	ENTELLAN	

Tablo 3.3.3: Avidin-biyotin Peroksidaz Yöntemi ile İndirek İmmunohistokimya Boyama Protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON	60°C etüvde	1 GECE
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN I	30 DAKİKA
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN II	30 DAKİKA
REHİDRATASYON	% 95 ALKOL	2 DAKİKA
	% 80 ALKOL	2 DAKİKA
	% 70 ALKOL	2 DAKİKA
	% 60 ALKOL	2 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	10 DAKİKA
	FOSFAT TAMPON SOLÜSYONU (PBS)	10 DAKİKA
HAVUZCUK OLUŞTURMA	DAKO PEN	
	TRİPSİN 37°C etüvde	10 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
PEROKSİDAZ BLOK	% 3 HİDROJEN PEROKSİT	5 DAKİKA

YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
BLOCKING	Non-immun bloklama solüsyonu	1 SAAT
PRİMER ANTİKORLAR	Anti-eNOS, anti-iNOS, anti-Caspase-3, anti-Fas-L, anti-Apaf-1, anti-Cytochrom-C,	18 SAAT +4°C nemli
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
SEKONDER ANTİKOR	BIOTINLE İŞARETLİ SEKONDER ANTİKOR	30 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
	STREPTAVİDİN	30 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
BOYAMA	DAB (diamino benzidine)	10 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	3×5 DAKİKA
ARTALAN BOYAMA	MAYER'S HEMATOKSİLEN	3 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	10 DAKİKA
KAPAMA	ENTELLAN	
İNCELEME	BX40 OLYMPUS MARKA IŞIK MİKROSKOBU	

Tablo 4.1.2: Deney Gruplarından H&E Boyama Değerlendirme (Grade) Sonuçları

GRADE	GRUP 1	GRUP 2	GRUP 3	GRUP 4	GRUP 5
1. örnek	0	3	2	4	3
2. örnek	0	3	2	4	3
3. örnek	0	3	2	4	2
4. örnek	0	3	3	4	3
5. örnek	0	2	1	4	4
6. örnek	0	3	2	4	3
7. örnek	1	3	1	4	2
8. örnek	0	3	2	4	3
9. örnek	0	4	3	3	3
10. örnek	1	4	3		

Tablo 4.1.3: Deney Gruplarından H&E Boyama Değerlendirme (Folikül Sayısı) Sonuçları

FOLLİKÜL SAYISI	GRUP 1	GRUP 2	GRUP 3	GRUP 4	GRUP 5
1. örnek	8	4	9	4	8
2. örnek	9	6	7	5	5
3. örnek	10	5	8	4	8
4. örnek	11	5	7	2	5
5. örnek	9	6	9	4	4
6. örnek	8	4	8	3	5
7. örnek	9	6	10	3	4
8. örnek	9	5	7	4	5
9. örnek	10	6	12	4	5
10. örnek	12	4	8		

TABLO 4.3. Deney Gruplarından Elde Edilen İHK Boyama Sonuçları

Anti-eNOS	GRUP 1	GRUP 2	GRUP 3	GRUP 4	GRUP 5
1. örnek	2	3	2	4	3
2. örnek	2	3	2	4	2
3. örnek	2	3	2	4	2
4. örnek	2	3	2	4	3
5. örnek	2	3	2	4	3
6. örnek	2	3	3	3	2
7. örnek	2	3	3	3	3
8. örnek	1	4	3	3	3
9. örnek	1	4	3	3	3
10. örnek	1	4	3		
Anti-iNOS	GRUP 1	GRUP 2	GRUP 3	GRUP 4	GRUP 5
1. örnek	2	3	3	4	3
2. örnek	2	3	3	4	3
3. örnek	3	3	3	4	3
4. örnek	3	3	2	4	3
5. örnek	3	4	2	4	4

<i>6. örnek</i>	3	4	2	4	3
<i>7. örnek</i>	2	4	3	4	4
<i>8. örnek</i>	3	4	3	4	3
<i>9. örnek</i>	3	4	3	4	3
<i>10. örnek</i>	2	4	3		
<i>Anti-Cas 3</i>	<i>GRUP 1</i>	<i>GRUP 2</i>	<i>GRUP 3</i>	<i>GRUP 4</i>	<i>GRUP 5</i>
<i>1. örnek</i>	1	2	2	2	2
<i>2. örnek</i>	1	2	2	3	2
<i>3. örnek</i>	1	2	2	3	2
<i>4. örnek</i>	1	2	2	2	2
<i>5. örnek</i>	1	3	2	3	2
<i>6. örnek</i>	1	2	2	3	2
<i>7. örnek</i>	1	2	1	3	2
<i>8. örnek</i>	1	3	1	3	2
<i>9. örnek</i>	2	2	1	3	1
<i>10. örnek</i>	2	2	1		
<i>Anti-Fas-L</i>	<i>GRUP 1</i>	<i>GRUP 2</i>	<i>GRUP 3</i>	<i>GRUP 4</i>	<i>GRUP 5</i>
<i>1. örnek</i>	1	3	2	3	3
<i>2. örnek</i>	1	3	2	4	2
<i>3. örnek</i>	1	2	2	2	3
<i>4. örnek</i>	1	3	2	4	3
<i>5. örnek</i>	1	2	2	3	3
<i>6. örnek</i>	1	3	2	3	3
<i>7. örnek</i>	0	2	1	3	2
<i>8. örnek</i>	0	2	1	3	2
<i>9. örnek</i>	0	4	3	4	2
<i>10. örnek</i>	0	2	3		
<i>AntiApaf-1</i>	<i>GRUP 1</i>	<i>GRUP 2</i>	<i>GRUP 3</i>	<i>GRUP 4</i>	<i>GRUP 5</i>
<i>1. örnek</i>	2	3	2	4	3
<i>2. örnek</i>	2	3	2	4	2
<i>3. örnek</i>	2	3	2	4	2
<i>4. örnek</i>	2	3	2	4	3
<i>5. örnek</i>	2	3	2	4	4

6. örnek	2	3	1	4	3
7. örnek	2	3	3	4	2
8. örnek	2	2	2	4	2
9. örnek	2	4	3	3	3
10. örnek	1	4	3		
Anti-Cyt-C	GRUP 1	GRUP 2	GRUP 3	GRUP 4	GRUP 5
1. örnek	1	3	2	4	3
2. örnek	1	3	2	4	2
3. örnek	1	3	2	4	2
4. örnek	1	3	2	4	3
5. örnek	1	2	2	4	4
6. örnek	1	3	1	4	3
7. örnek	1	3	1	3	2
8. örnek	1	3	3	3	3
9. örnek	1	4	3	3	3
10. örnek	0	4	3		

TABLO 4.4.1 Deney gruplarından elde edilen TUNEL boyama sonuçları

TUNEL	GRUP1	GRUP2	GRUP3	GRUP4	GRUP 5
1. örnek	1	3	2	2	1
2. örnek	1	3	1	3	1
3. örnek	1	3	1	3	1
4. örnek	1	3	1	3	2
5. örnek	1	3	2	3	2
6. örnek	1	3	2	3	1
7. örnek	1	2	2	3	2
8. örnek	1	2	1	3	2
9. örnek	1	2	1	3	2
10. örnek	2	2	1		

Not: Büyük büyütme alanında, 1-5 tunel pozitif hücre: 1, 5-10 TUNEL pozitif hücre: 2, >10 TUNEL pozitif hücre: 3 olarak skorlandı.

7. KAYNAKLAR

1. Kahraman S, Yakın K. Ovulasyon İndüksiyonu.2000:24-32,101
2. Durdağ G, Berker B. Over Rezervinin Değerlendirilmesi Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst 2008;18 254-265
3. Hendriks Dj, Broekmans Fj, Bancsi LF, Looman W, de Jong FH, te Velde ER. Single and repeated GnRH agonist stimulation tests compared with basal markers of ovarian reserve in the prediction of outcome in IVF. j Assist Reprod Genet 2005;22:65-73.
4. Sadler TW, Langman's Medikal Embriyolojisi (Çev.A.C Başaklar, K Sönmez) 7. Basım, Palme Yayıncılık İstanbul, 2007; 1-20
5. Karabulut o, Delilbaşı L, Oogenezis, Oosit Toplama Prosedürü, Oosit Morfolojisi in vitro Maturasyon, In: Delilbaşı L.(Ed). IVF laboratuvar Yöntemleri, 2007, 85-86
6. Picton H, Briggs D, Gosden R. The molecular basis of oocyte growth and development, Mol Cell Endocrinol, 1998; 145; 27-37
7. Eroschenko VP. Di Fiore Histoloji atlası; Fonksiyonel ilişkileriyle, 9. Baskıdan çeviri, (Çev. Ed. Prof. Dr. Ramazan Demir), 2001; 300-309
8. Gosden RG, Oogenesis as a foundation for embryogenesis, Mol Cell Endocrinol, 2002, 186; 149-153
9. Telfer E. Natural history of the mammalian oocyte. Reproductive BioMedicine Online. 2007;15:288-295.
10. Kierszenbaum A L (Ed) : Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Follikül gelişimi ve Menstrual Döngü (siklus) (Çev. R. Demir), Palme Yayıncılık, Ankara, 2006; 566-572
11. http://scienceblogs.com/neurotopia/2010/02/basic_set_femalereproduction.php
12. Russel DL and Robker RL. Molecular mechanism of ovulation; coordination through the cumulus complex. Human Reproduction Update,i 2007; 13(3); 289-312
13. <http://www.endotext.org/female/female/femaleframe1.htm>
14. De La Fuente R, Eppig JJ. Transcriptional activity of Mouse oocyte genom: companion granulosa cell modulate transcription and chromatin remodeling. Dev Biol, 2001; 229; 224-236
15. Wu YL, Chuang H, Kou YR et. Al. Regulation of LH Receptor and PGF2 α Receptor Signaling by the Regulator of G Protein Signaling 2 (RGS2) ,n Human and

- Mouse Granulosa Cells. *Chinese Journal of Physiology*, 2008; 51(5); 282-291
16. Sela AS, Chorev E et al. Mitogen-activated protein kinase mediates luteinizing hormone-induced breakdown of communication and oocyte maturation in rat ovarian follicles, *Endocrinology*, 2005; 146; 1236-1244
 17. Cottom J, Slavador LM and Maizels ET et al. Follicle-stimulating hormone activates extracellular signal-regulated kinase but not extracellular signal-regulated kinase kinase through a 100-kda phosphotyrosine phosphatase. *J Biol Chem*, 2003; 278; 7167-7179.
 18. MacLean JA, Wilkinson MF. The RhoX genes. *Ann NY Acad Sci*, 2010; 1120:72-83.
 19. Cha KY and Chian RC. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Hum Reprod. Update*, 1993; 4; 103-120
 20. 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: 436-449
 21. 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*, 2003b; 17: 520-533
 22. Ohnishi J, Ohnishi E and Shibuya H, Takahashi. Functions for proteinases in the ovulatory process. *Biochim Biophys Acta, Protein Proteomics*, 2005; 10: 119-133
 23. Mazaud S, Guigon C.J, Lozach A, Coudouel N, Forest M.G, Coffigny H. et.al. Establishment of the reproductive function and transient fertility of female rats lacking primordial follicle stock after fetal gamma-irradiation. *Endocrinology* 2002;143(12):4775-87.
 24. McGee E.A. , Hsueh A.J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000; 21(2): 200-14.
 25. Gaytan F, Morales C, Bellido C, Aguilar E, Sanchez-Criado J.E. Ovarian Follicle Macrophages: Is Follicular Atresia in the Immature Rat a Macrophage-Mediated Event? *Biol Reprod* 1998; 58: 52-9.
 26. Allen E. The oestrous cycle in the Mouse. *Amer J Anat* 1922; 30: 297-371.
 27. Nelson J.F, Felicio L.S, Randall P.K, Sims C, Finch C.H. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J Mice: I. Cycle frequency, Length and vaginal cytology. *Biol Reprod* 1982; 27:327-39.
 28. Safranski T.J, Lamberson W.R, Keisler D.H. Correlations among three measures of puberty in mice and relationships with estradiol concentration and ovulation. *Biol*

Reprod 1993; 48:669-73.

29. Snell GD. Reproduction. In: Snell GD(Ed). Biology of Mouse. Second edition. USA. Dover Publications; 1956: 55-89.

30. Petroianu A, Vasconcellos L.S, Alberti L.R, Nunes M.B. The influence of venous drainage on autologous ovarian transplantation. J Surg Res 2005; 124:175-9

31. Champlin A.K., Dorr D.L. Determining the stage of the estrous cycle in the Mouse by the appearance of the vagina. Biol Reprod 1973, 8:491-4.

32. Campbell CS, Ryan KD, Schwartz NB. Estrous cycles in the Mouse: relative influence of continuous light and the presence of male. Biol. Reprod 1976; 14: 292-9.

33. Rao R.P, Kaliwal B.B. Monocrotophos induced dysfunction on estrous cycle and follicular development in mice. Ind Health 2002; 40:237-44.

34. Spornitz U.M., Socin C.D. , Dravid A.A. Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. Anat Rec 1999; 254:116- 26.

35. Mandl M. M. Cyclical changes in the vaginal smear of adult ovariectomized rats. J Exper Biol 1951; 28:585-92.

36. Tremellen Kp, Kolom, Gilmore A, Iekam ge DN. Anti-mullerian hormone as a marker of ovarian reserve. Aust Nz j Obstet Gynaecol 2005;45:20-4.

37. Cevrioğlu S. Ovaryan Rezerv Testleri. In: Çiçek MN, Akyürek C, Çelik Ç, Haberal A, eds. Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. 2. baskı. Ankara-İstanbul: Güneş Kitabevi ltd. Şti; 2006. p.1427-32.

38. Filicori M, Flamigni C. The Role of Luteinizing Hormon in Folliculogenesis and Ovulation Induction. 1999:37-49

39. Speroff L, Glass N. H, Kase R. G. Clinical Gynaecologic Endocrinology and Infertility. 6 th edition. 1999:84,171,213,236,1013,1075,1097,1133.

40. Tanbo T, Dale P. O, Lunde O, Norman N. Prediction of response to controlled ovarian hyperstimulation: a comparison of basal and clomiphene citrate-stimulated folliclestimulating hormone levels. Fertil Steril. 1992;57(4):819-824.

41. Scott R. T, Hofmann G. E, Oehninger S, Muasher S. J. Intercycle variability of day 3 FSH levels and its effect on stimulation quality in in vitro fertilization. Fertil Steril. 1990;54:297-302.

42. Toner J. P, Philput C. B, Jones G. S, Muasher S. J. Basal FSH level is a better predictor of in vitro fertilization performance than age. Fertil Steril. 1991;55:784-791

43. Tanbo T, Dale P. O, Abyholm T, Stokke K. T. FSH as a prognostic indicator in

- clomiphene citrate/human menopausal-stimulated cycles for in vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1989;4:647-650.
44. Bongso A. *Handbook on Blastocyst Culture.* 1999:13,21
45. Winslow K. L, Toner J. P, Brzyski R. G, Oehninger S. The gonadotropinreleasing hormone agonist stimulation test-a sensitive predictor of performance in the flare up in vitro fertilization cycle. *Fertil Steril.* 1991;56:711-717.
46. Lass A, Skull J, Mc Veigh E, Margara R. Measurement of ovarian volume by transvaginal sonography before ovulation induction with human menopausal gonadotropin for in vitro fertilization can predict poor response. *Hum Reprod.* 1997;12(2):294-297.
47. Seifer D. B, Lambert-Messerlian G, Hogan J.W, Gardiner A.C. Day 3 serum inhibin B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. *Fertil Steril.* 1997;67(1):110-114.
48. Picard J.Y., Josso N. Purification of testicular anti-Müllerian hormone allowing direct visualization of the pure glycoprotein and determination of yield and purification factor. *Mol Cell Endocrinol.* 1984;34(1):23-29.
49. Teixeira J, Maheswaran S, Donahoe PK. Müllerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr. Rev.* 2001;22(5):657-674.
50. Fiçicioglu C, Kutlu T, Baglam E, Bakacak Z. Early follicular antimüllerian hormone as an indicator of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2006;85:592-6.
51. Hazout A, Bouchard P, Seifer DB, Aussage P, junca Am, Cohen-Bacri ep. Serum antimüllerian hormone/müllerian inhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of assisted reproductive technology outcome than follicle-stimulating hormone, inhibin B, or estradiol. *Fertil Steril* 2004; 82:1323-9.
52. Gruijters MJ, visser JA, Durlinger Al, Themmen AP. Antimüllerian hormone and its role in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol* 2003;211:85-90.
53. La Marca A, volpe A. Anti-müllerian hormone (AmH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool? *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;64:603-10.
54. Fanchin R, Schonäuer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J. Serum antimüllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod* 2003;18:323-7.
55. La Marca A, Giulini S, Tirelli A, Bertucci E, Marsella T, Xella S, et al. Anti-müllerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts

- ovarian response in assisted reproductive technology. *Hum Reprod* 2007;22:766-71.
56. Muttukrishna S, Suharjono H, McGarrigle H, Sathanandan M. Inhibin B and anti-müllerian hormone: markers of ovarian response in IVFF/ICSI patients? *BjOG* 2004;111:1248-53.
57. Méduri G, Massin N, Guibourdenche J, Bachelot A, Fiori O, Kuttenn F, et al. Serum antimüllerian hormone expression in women with premature ovarian failure. *Hum Reprod* 2007;22:117-23.
58. Laven JS, Mulders AG, Visser JA, Themmen Ap, Dejong FH, Fauser BC. Anti-müllerian hormone serum concentrations in normoovulatory and anovulatory women of reproductive age. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:318-23
59. Bayer AI, Wiskind AK. Adnexal Torsion: can the adnexa be saved? *Am J Obstet Gynecol* 1994;171(6):1506-10.
60. Nissen ED, Kent DR, Nissen SE, Feldman BM. Unilateral tuboovarian auto amputation. *J Reprod Med* 1977;19(3):151-3.
61. Cass DL. Ovarian torsion. *Semin Pediatr Surg* 2005;14(2):86-92.
62. Mazouni C, Bretelle F, Ménard JP, Blanc B, Gamerre M. Diagnosis of adnexal torsion and predictive factors of adnexal necrosis]. *Gynecol Obstet Fertil* 2005;33(3):102-6.
63. Comerchi JT Jr, Licciardi F, Bergh PA, Gregori C, Bren JL. Mature Cystic Teratoma: a clinicopathologic evaluation of 517 cases and review of the literature. *Obstet Gynecol* 1994;84(1):22-8.
64. 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.
65. Breech LL, Hillard PJ. Adnexal torsion in pediatric and adolescent girls. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005;17(5):483-9
66. Oelsner G, Cohen SB, Soriano D, Admon D, Mashiach S, Carp H. Minimal surgery for the twisted ischaemic adnexa can preserve ovarian function. *Hum Reprod* 2003; 18 (12): 2599-602.
67. Houry D, Abbott JT. Ovarian Torsion:a fifteen year review. *Ann Emerg Med* 2001;38(2):156-9.
68. Kimura I, Togashi K, Kawakami S, Takakura K, Mori T, Konishi J. Ovarian Torsion: CT and MR imaging appearances. *Radiology* 1994; 190(2):337-41.
69. Albayram F, Hamper UM. Ovarian and adnexal torsion: spectrum of sonographic

- findings with pathologic correlation. *J Ultrasound Med* 2001;20(10):1083-9.
70. Zweizig S, Perron J, Grubb D, Mishell DR Jr. Conservative management of adnexal torsion. *Am J Obstet Gynaecol* 1993;168(6):1791-5.
71. Köse F, Turan T. [Pelvic masses and adnexal torsion]. *Türkiye Klinikleri J Surg Med Sci* 2006;2(24):78-82.
72. Oelsner G, Shashar D. Adnexal torsion. *Clin Obstet Gynecol* 2006;49(3):459-63.
73. Aydemir, O, ve Çelebi, S., 2002. Deneysel retinal iskemi ve reperfüzyon oluşturulan kobaylarda vitamin E türevlerinin glutatyon düzeyine etkisi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 16(3-4): 257-261.
74. Ishihara, M., and Nacano, T., 2000. Postischemic reperfusion in the eye of young and aged rats. *Jpn J Physiol*, 50; 125-132.
75. Osborne, N.N., Casson, R.J., Wood, J.P.M., Chidlow, G., Graham, M, and Melena, J, 2004. Retinal ischemia: mechanism of damage and potential therapeutic strategies. *Prog. in Retinal and Eye Research* 23: 91-147.
76. Barry, M.C, and Grace, P.A., 1997. Ischemia-reperfusion injury. *Surgery*, 11:68-72.
77. Kumar V, Cotran R., Robbins .L. *Basic Pathology*. 6th edition. P:6-10, 30-36 2000
78. Çelebi S., Dilsiz, N., Yılmaz T., ve Kukner, A.S., 2002. Effects of melatonin, vitamin E and octreotide on lipid peroxidation during ischemia- reperfusion in the guinea pig. *Eur J*, 12(2): 77-83.
79. Baykal, Y, ve Kocabalkan F., 2000. Serbest radikaller ve hücre hasarı yapma mekanizmaları. *Sendrom*, s.31-38.
80. Poli, G, Albano E, and Dianzani M.U, 1993. *Free Radicals: From Basic Science to Medicine*. Birkhauser, Basel (Switzerland), p.47.
81. Otamiri T. Oxygen radicals, lipid peroxidasyon, and neutrophil infiltration after small intestinal ischemia and reperfusion. *Surgery* 105:593-597,1989.
82. Musemeche CA, Henning SJ, Baker L. İnflammatory enzyme composition of the neonatal rat intestine: İmplications for susceptibility to ischemia. *J PedSurg* 28:778- 791
83. Koltuksuz U., Özen S., Uz E., Aydınç M., Karaman A., Gültek A., Akyol Ö., Gürsoy MH., Aydın E. CAPE prevents reperfusion injury in rats. *J Ped Surg*. 34:10, 1458- 1462, 1999.
84. Schoenberg MH. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 21:1376- 1386.1993
85. Van Ye TM., Roza AM., Pieper GM. İnhibition of intestinal lipid peroxidation does not minimize morphologic damage. *J Surg Res*. 55:553-558.1993.

86. Kayalı R., Çakatay U. Basic mechanisms of protein oxidation. *Cerrahpaşa J med* 35:83- 89, 2004
87. Lefer AM., Lefer DJ. Pharmacology of the endothelium in ischemia reperfusion and circulatory shock. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1993; 33: 71-90
88. Moncado S., Vane JR., Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood vessel walls. *N Engl J Med* 1979; 300: 1142-7
89. Murad F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J Clin Invest* 1986; 78,1-5.
90. Palmer RMJ., Ferrige AG., Moncado S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-6
91. Halliwell B, 1996 Oksidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *eFree Radical Res.*25:57-74.
92. Tamer L, Polat G, Eskanderi G., Ercen B., ve Atik U, 2000. Serbest radikaller. *Mersin Üniversitesi Tıp Fak. Dergisi*, 1: 52-58.
93. Bruckdorfer K.R, 1987. Lipids and Cancer. *Procx. Roy. Soc. Med.* 80: 713-714.
94. Uysal M., 1998. Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidan antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim*, 11: 336-341.
95. Halliwell B, 1991. Reactive Oxygen Species in Living System: Source, Biochemistry and Role in Human Disease. *The Am. J. Med.* 91: 145-215.
96. Erden M. Serbest Radikaller. *T.Klin. Tıp Bilimleri Dergisi.*12:201-207, 1992.
97. Beckman JS., Chen J., Ischiropoulos H., Crow JP. Oxidative chemistry of peroxynitrite *Meth Enzymol* 233:229-40, 1994.
98. Carden D.L., Granger D.N. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol* 190:255-66, 2000
99. Collard C.D, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations and preventations of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 94: 1133-1138, 2001.
100. Cantürk N.Z., Sayek İ. Cerrahi araştırma kitabı. Nobel tıp kitabevleri 2005.
101. Ohno H, Matsuura N, İshikawa M. Serum Mn-SOD in patients with Diabetes Mellitus/Thyroid Dysfunction Judged by an ELISA. *Horm.Metab.Res.*23: 449-451,1991.
102. Sugawara M., Kita T. Deficiency of Superoxide Dismutase endemic goiter Tissue. *J Clin Endoc and Metabol.* 67(6): 1156-1161, 1988.
103. Wheeler CR., Salzman JA. Automated Assay for Superoxide Dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase and Glutathione Reductase Activity. *Anal Biochem.* 184:193-199,1990.

104. Fernandez V., Simitzu K. Effects of hyperthyroidism on rat liver Glutathione Metabolism. 129(1):85-91, 1991.
105. Özbal Y. Temel immünoloji. I. Baskı. İstanbul. Nobel tıp kitabevleri 2000
106. Kellog EW. Superoxide, hydrogen peroxide and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. J Biol Chem 1975; 250: 8812-17
107. Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. Biochemistry 1984; 22:1-5
108. Karakılçık, A.Z.,Aksakal,M. (1993): Selenyumun Bazı Fizyolojik islevleri, Metabolizması ve E vitamini ile Arasındaki İlişkileri.: Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 4: 283- 291.
109. Cousin FB. Cairney IM. (1961). Some effects of selenium in sheep. Aust. J. Agric. Res. 12: 927-943.
110. Tietz NW. (1986). Nutrition, vitamins and trace elemnts. In: textbook of clinical chemistry. WB. Saunders Company. Philadelphia
111. Ullery DE. (1992). Basis for regulation of selenium supplements in animal diets. J. Anim. Sci. 70: 3922-3927.
112. Akkus İ, Sekeroglu R, Üner A. (1991). Selenyum: dağılışı, metabolizması ve fizyopatolojisi. S.Ü. Tıp Fak. Derg. 7 (4): 547-551.
113. Ricciarelli R, Zingg JM, Azzi A. (2001). Vitamin E: protective role of a Janus molecule. Faseb J. 15: 2314-2325.
114. Allison JM. (1984). Dukes' Physiology of Domestic Animals. Ed. By Melvin J. Swenson. Tenth edition. Vail-Ballow Pres Inc. USA.
115. Spallholz JE. (1990). Selenium and glutathione peroxidase: essential nutrient and antioxidant component of the immune system. Adv. Exp. Med. Biol. 58: 145-262.
116. Sies H, Stahl W and Sundquist AR (1992): Antioxidant Functions of Vitamins. Annals New York Academy of Sciences, 669; 7-15.
117. Raymond JS. (1986). Selenium metabolism and function. J. anim. Sci. 4: 42-49.
118. Combs GF and Combs SB (1986): The Role of Selenium in Nutrition. Academic pres. Inc. Ltd. London. 415-484.
119. Boyne R, Arthur JR and Wilson AB. (1986). An invivo and study of selenium deficiency and infection in rats. J. Comp. Path. 96:380-386.
120. Cousin FB. Cairney IM. (1961). Some effects of selenium in sheep. Aust. J. Agric. Res. 12: 927-943.
121. Desai ID, Scott ML. (1965). Mode of action of selenium in relation to biological activity of tocopherols. Arch. Biochem. Biophys. 110: 309-315.

122. Dhur A, Galon P, Hercberg S. (1990). Relationship between selenium and resistance against infection. *Comp. Biochem. Physiol.* 96 (2): 271-280.
123. Kremidjian-Schmacher L and Stotzky G (1987). Selenium and immune responses. *Environ. Res.* 42: 277-303.
124. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160. 1-40.
125. Rames A, Inyoung F, Hood DB, Archibong AE, Knuckles ME, 2001. Metabolism, bioavailability, and toxicokinetics of benzo(a)pyrene in F-344 rats following oral administration. *Exp. Toxicol Pathol.* 53: 275-290.
126. Keen CL and Graham TW (1989). Trace elements. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Kaneko JJ (ed). Academic Press. New York, 753-795.
127. Honig, S.L, and Rosenberg R.N., 2000. Apoptosis and neurologic disease. *The American J. of Medicine.* 180:317-330.
128. Pole R.J, Qi, B.Q, and Beasley S.W. 2002. Patterns of apoptosis during degeneration of the pronephros and mesonephros. *J Urol* 167(1):269-71.
129. Afford S, Randhawa, Demystified S, 2000. Apoptosis. *Mol Pathol* 53(2):55-63.
130. Reme C.E., Grimm C., Hafezi F., Marti A., and Wenzel A., 1998. Apoptotic Cell Death Degenerations. *Progress in Eye Research.* 17: 443-464.
131. Mountz J D, and Zhou T, 2001 Apoptosis and Autoimmunity Koopman WJ ed. *A Textbook of Rheumatology Arthritis and Allied Conditions*. Lippincott Williams & W.
132. Willingham M.C, 1999. Cytochemical Methods for the Detection of Apoptosis. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 47(9):1101-1109.
133. Kannan K., and Jain S.K., 2000. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology.* 7:153-163.
134. Martimbeau S., and Tilly J, 1997. Physiological cell death in endocrine dependent tissues: an ovarian perspective. *Clin. Endocrinol.* 46: 241-254.
135. Dane P.B.K, 1999. İntrauterin gelişme geriliği olan bebeklerin plasentalarında programlı hücre ölümü (Apoptozis). Uzmanlık tezi. İstanbul Üniv. Cerrahpaşa Tıp Fak. Kadın Hast.ve Doğum A.B.D. İstanbul.
136. Leake 1996. *Cell Cycle. Basic Sciences.* Chapter 3: 26-31.
137. Lowe SW, and Lin W, 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis.* 21(3):485-495.
138. Gastman B.R., Apoptosis and its clinical impact. *Head Neck.* 2001; 23: 409-25.
139. Akşit H, Bildik A, Apoptozis, İnfertilite YYü Vet. Fak. Dergi 2008; 19(1):55-63

140. Cooper GM, Hausman RE, Çev. Ed. Sakızlı M, Atabey N, Hücre moleküler yaklaşımlar, İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, 2006, 3. Baskı, 579-584
141. Sun Y, Oberly LW, Ying L. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem 1988; 34: 497-500.
142. Durak I, Yurtaslan Z, Canbolat O, Akyol O. A methodological approach to superoxide dismutase activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium reduction. Clin Chem Acta 1993; 214: 103-104.
143. Paglia E, Walentine N. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erithrocyte glutatione peroxidse. J Lab & Clin Med 1967;70:158-169.
144. Hammouda A el-R, Khalil MM, Salem A. Lipid peroxidation products in pleural fluid for seperation of transudates and exudates. Clin Chem 1995; 41: 1314-5
145. Cotran R.S, Kumar V, and Robins S.L., 1989. Cellular injury and adaptasion In: robins pathologic basis of desease. WB Saundes Company, p38.
146. Taskin O, Birincioğlu M, et al, The effects of twisted ischemic adnexa managed by detorsion on ovarian viability and histology: an ischemia-reperfusion rodent model, Hum. Reprod. 1998; 13: 2823-2827
147. Matsubara A, Tomida K, Matsuda Y, and et al., 2000. Protective effect of selectin ligands /inhibitor (SKK 60060) against retinal ischemiareperfuzyon injury. Academic pres. Exp. Eye Res. 71: 283-293.
148. Bakan V, Çıralık H, Tolun F, Protective effect of erythropoietin on torsion/detorsion injury in rat model Journal of Pediatric Surgery (2009) 44, 1988–1994
149. Ergun Y, Koç A, Dolapçioğlu K, The protective effect of erythropoietin and dimethylsulfoxide on ischemia-reperfusion injury in rat ovary, European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 152 (2010) 186–190
150. KırŞahin F, Coşar E, Koken G, Protective effect of aprotinin on ischemia–reperfusion injury in rat ovary, J. Obstet. Gynaecol. Res. 2008; 34, No. 5: 794–800
151. Mahmoud R.Hussein, Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms, Human Reproduction Update, Vol.11, No.2 pp. 162–178, 2005