

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİMDALI

RAT OVERİNDE OLUŞTURULAN İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE
SİLİMARİNİN KORUYUCU ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
Dr. Seyithan ELÇEOĞLU

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Aysun CAMUZCUOĞLU

ŞANLIURFA

2014

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

RAT OVERİNDE OLUŞTURULAN İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE
SİLİMARİNİN KORUYUCU ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
Dr. Seyithan ELÇEOĞLU

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Aysun CAMUZCUOĞLU

Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 18.06.2014 tarih ve 14094 protokol numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA

2014

TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresince yetişmemde emekleri olan, sayın hocalarım Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Hakan Camuzcuoğlu, Doç. Dr. Mehmet Vural, Yrd. Doç. Dr. Neşe Gül Hilali, Yrd. Doç. Dr. Aysun Camuzcuoğlu ve Yrd. Doç. Dr. Adnan İncebıyık'a teőkükür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında benden anlayış ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Aysun Camuzcuoğlu'na, tezin deney aşamasında ve istatistiksel olarak değerlendirilmesinde her türlü desteği esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Adnan İncebıyık'a, deneyin yapılmasında büyük emekleri olan Uzm. Dr. Evren Büyükfırat'a ve patolojik incelemede yardımcı olan Doç. Dr. Muhammed Emin Güldür'e, biyokimyasal parametrelerin değerlendirilmesinde yardımcı olan Dr. Abdullah Taşkın'a Őükran duygularımı arz ederim.

Asistanlık yıllarımı birlikte geçirdiğim tüm mesai arkadaşlarıma ve klinik çalışanlarına teőkükür ederim.

Dr. Seyithan ELÇEOĞLU

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLO LİSTESİ	V
ŞEKİLLER	VI
RESİMLER	VII
GRAFİKLER	VIII
KISALTMALAR	IX
ÖZET	XI
ABSTRACT	XIII
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. Overin Yapısı ve Fonksiyonları	2
2.1.1. Over Embriyolojisi ve Oogenez	2
2.1.2. Over Histolojisi	3
2.1.3. Pre-antral folükül popülasyonu	4
2.1.4 Folliküler gelişimin başlaması	5
2.1.5. Preantral büyüme evresi veya bazal folüküler büyüme	6
2.1.6. Oositlerde apoptoz	6
2.1.7. Rodentlerde Follikül Gelişiminin Kronolojisi	6
2.1.9. Östrus Siklusu	8
2.2. Adneksiyal Torsiyon	8
2.3. İskemi Reperfüzyon	11
2.4. Serbest Radikaller	18
2.4.1. Reaktif Oksijen Türleri	20
2.4.1.1. Süperoksid Radikali	20

2.4.1.2. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	20
2.4.1.3. Hidroksil Radikali (OH ⁻):	21
2.4.1.4. Singlet Oksijen	21
2.4.2. Hücredeki Serbest Radikal Kaynakları	21
2.4.2.1. Endojen Kaynaklar	21
2.4.2.2. Ekzojen Kaynaklar	22
2.4.3. Reaktif Oksijen Türevlerinin Rolü	22
2.5. Antioksidanlar	23
2.5.1. Doğal Antioksidanlar	23
2.5.1.1. Enzimler	23
2.5.1.2. Enzim Olmayanlar	26
2.5.1.2.1. Lipid fazda bulunanlar	26
2.5.1.2.2. Sıvı fazda (hücre sitozolünde veya kan plazmasında) bulunanlar:	26
2.5.2. Diğer Antioksidanlar	26
2.5.3 Ekzojen Antioksidanlar	26
2.5.4. Silimarin	27
3.MATERYAL VE METOD	29
3.1.Cerrahi İşlemler	29
3.2. Biyokimyasal İnceleme	32
3.3.Patolojik İnceleme	32
3.4.Verilerin Değerlendirilmesi ve Analizi	33
4. BULGULAR	34
4.1. Biyokimyasal Verilerin Değerlendirilmesi	34
4.1.1.Gruplar arasında HSP70 Değerlerinin Karşılaştırılması	35
4.1.2.Gruplara Göre Süperoksit dismutaz (SOD) Değerlerinin Karşılaştırılması:	36
4.1.3.Gruplara Göre Malondialdehit (MDA) Değerlerinin Karşılaştırılması	36

4.1.4.Gruplara Göre TNF-alfa Değerlerinin Karşılaştırılması	37
4.2. Patolojik Verilerin Değerlendirilmesi	41
4.3. Gruplara ait Histokimyasal Bulguların İstatistiksel Değerlendirmeleri	50
5.TARTIŞMA ve SONUÇ	52
KAYNAKLAR	56

TABLolar

SAYFA NO

Tablo-1: Çalışmaya alınan grupların ortalama Heat shock protein (HSP70), Süperoksit dismutaz(SOD),Malondialdehit(MDA),Tümör nekrotizan faktör- alfa(TNF-a) değerleri 34

Tablo-2: Gruplara göre HSP 70 değerinin karşılaştırılması 35

Tablo-3: Gruplara göre TNF-alfa değerinin karşılaştırılması 37

Tablo-4: Deney Gruplarının H&E ile Boyama Değerlendirme (Grade) Sonuçları 42

Tablo-5: Histopatolojik hasarın gruplara göre dağılımı 50

ŞEKİLLER

SAYFA NO

- Şekil-1:** 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 tükenenlerdir 3
- Şekil-2:** Overdeki foliküllerin gelişimi (Gougeon, 1996) 5
- Şekil-3:** Rodentler ve insanlarda prepuberte ve puberte aşamasında folikül gelişimi süreleri 7
- Şekil-4:** İskemide membran hasarının mekanizmaları. 13
- Şekil-5:** İskemide pürin metabolizmasının gelişimi ve ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza çevrilmesi, reperfüzyonda oksijen radikalının oluşumu. 15
- Şekil-6:** Serbest oksijen radikalının dokudaki doğrudan ve dolaylı etkileri. 16
- Şekil-7:** İskemideki serbest radikal mekanizması 26
- Şekil-8:** Silimarin kimyasal formülü 28

RESİMLER

SAYFA NO

- Resim-1:** Overin Histolojik Yapısı (16) 4
- Resim-2:** Silybum marianum bitkisi 28
- Resim-3:** Rat overinin ortaya konması 30
- Resim-4:** İskemi oluşturulan rat overi 31
- Resim-5:** Üstte(sağ) iskemi oluşturulan ve aşağıda(sol) normal rat overi 31
- Resim-6:** Reperfüzyon sonrası görüntü 32
- Resim-7:** Sham grubundan alınan sıçan ovaryum örneklerinde normal histolojik yapı izlenmektedir.H&E. 45
- Resim-8:** 2 saat torsiyon, 2 saat detorsiyon yapılan gruptan (Kontrol Grubu) alınan sıçan ovaryum örneklerinde normal histolojik yapının bozulduğu, şiddetli ödem, vasküler konjesyon, hemoraji ve PMNL infiltrasyonu izlenmektedir. H&E. 46
- Resim-9:** 2 saat torsiyon, 2 saat detorsiyon uygulamasından 30 dk önce intraperitoneal 2 cc SF verilen gruptan (Grup III) alınan sıçan ovaryum örneklerinde normal histolojik yapının bozulduğu, ödem, vasküler konjesyon, hemoraji ve PMNL infiltrasyonu izlenmektedir. 47
- Resim-10:** 2 saat torsiyon, 2 saat detorsiyon uygulamasından 30 dakika önce 100mg/kg silimarin verilen gruptan (Grup IV) alınan sıçan ovaryum örneklerinde histolojik yapının Grup 2'ye göre korunduğu, ödem, vasküler konjesyon ve PMNL infiltrasyonunun azaldığı izlenmektedir.H&E 48
- Resim-11:** 2 saat torsiyon, 2 saat detorsiyon uygulamasından 30 dakika önce önce 200mg/kg silimarin verilen gruptan (Grup V) alınan sıçan ovaryum örneklerinde histolojik yapının Grup 2'ye göre korunduğu, ödem, vasküler konjesyon ve PMNL infiltrasyonunun azaldığı, yeni gelişmekte olan folliküller olduğu izlenmektedir. H&E 49

GRAFİKLER

SAYFA NO

Grafik-1: HSP70 değerlerinin grafiksel görünümü	38
Grafik-2: MDA değerlerinin grafiksel görünümü	39
Grafik-3: SOD değerlerinin grafiksel görünümü	40
Grafik-4: TNF-alfa değerlerinin grafiksel görünümü	41

KISALTMALAR

ATP	: Adenozin tri-fosfat
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
cGMP	: Siklik Guanozin Monofosfat
eNOS	: Endotelyal NO Sentaz
Gr	: Gram
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GSH-R	: Glutasyon redüktaz
GSSG	: Glutasyon disülfit
GST	: Glutasyon S-Transferaz
GTP	: Guanozin 5'-trifosfat
H&E	: Hemotoksilen Eozin
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HOCL	: Hipoklorik asit
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz enzimi
2T/DT	: İki saat torsiyon iki saat detorsiyon yapılan grup
2T/DT + SF	: İki saat torsiyon iki saat detorsiyondan 30 dk önce intraperitoneal 2cc SF verilen grup
2T/DT + 100 mg Silimarin:	İki saat torsiyon iki saat detorsiyondan 30 dk önce intraperitoneal 100 mg silimarin verilen grup
2T/DT + 200 mg silimarin:	İki saat torsiyon iki saat detorsiyondan 30 dk önce intraperitoneal 200 mg silimarin verilen grup
KO	: Ksantin oksidaz
LİP	: Lipit peroksidasyonu
LOOH	: Lipithidroperksit

MAD	: Malondialdehit
Mg	: Miligram
ml	: Mililitre
MPO	: Myeloperoksidaz
NAD+	: Okside nikotinamid adenin dinükleotit
NADH	: Redükte nikotinamid adenin dinükleotit
NO	: Nitrikoksid
O-	: Süperoksid
OH-	: Hidroksil
PAF	: Platelet aktive edici faktör
PDE	: Fosfodiesteraz
PG	: Prostaglandin
PMNL	: Polimorfo nüveli lökosit
SNR	: Reaktif nitrojen radikalleri
SOD	: Süperoksid dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
TNF-alfa	: Tümör nekroz faktör alfa
TxA2	: Tromboksan A2

ÖZET

RAT OVERİNDE OLUŞTURULAN İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE SİLİMARİNİN KORUYUCU ETKİSİ

Dr. Seyithan ELÇEOĞLU

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi

Amaç: Over torsiyonunda, overin korunması için yapılan detorsiyon işlemi sonrasında reperfüzyona bağlı olarak iskemik dokularda serbest oksijen moleküllerinde artış görülmektedir. Bunun sonucunda da doku hasarı meydana gelmektedir. Çalışmamızın amacı, sıçan overinde iskemi-reperfüzyona bağlı doku hasarı üzerine silimarin'in etkisini değerlendirmektir.

Yöntem: Çalışma, DOLLVET A.Ş. Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun onayı alındıktan sonra yapılmıştır. Çalışmada 35 adet, 200-250 gr. ağırlığında, genç erişkin, dişi Wistar Albino sıçan (rat) kullanılmıştır. GrupI(Sham grubu), GrupII(Kontrol grubu;2T/DT), GrupIII(2T/D+SF), GrupIV(2T/D+100mg Silimarin), GrupV(2T/D+200 mg Silimarin) olmak üzere 5 gruptan oluşmaktadır. İntraperitoneal yol ile Silimarin, GrupIV ve V' e detorsiyon işleminden 30 dk önce uygulanmıştır. Overlerde iskemi-reperfüzyon hasarı açısından, biyokimyasal parametrelerden; MDA, SOD, TNF-alfa ve HSP-70 düzeyleri çalışıldı. Over dokusundan patolojik inceleme için doku örnekleri alındı.

Bulgular: Serum HSP-70 düzeyleri kontrol grubuna kıyasla silimarin verilen gruplarda yüksek bulundu($p<0,001$).Malondialdehit ve SOD düzeyi gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada anlamlı bir ilişki bulunamadı.TNF-alfa düzeyleri kontrol grubuna göre Grup IV ve V'te düşük belirlendi($p=0,006$).

Kontrol grubunun patolojik skoru tüm gruplara kıyasla yüksek bulundu. Silimarin verilen gruplarda over patolojik lezyon skoru düşük gözlemlendi. Torsiyon ve detorsiyon yapılan gruplardan Kontrol grubu ve Grup III'e göre; ödem, konjesyon, hemoraji, ve PMNL artışı

bulgularının Silimarin uygulanması yapılan gruplarda (Grup IV ve V) gerilediği gözlendi (P<0,001).

Sonuç: Bulgularımız silimarinin , over iskemi-reperfüzyon hasarında, anti enflamatuar ve kısmen antioksidan etkisinin olduğunu göstermektedir. İskemiden sonra verilen silimarinin doza bağımlı olarak 200 mg verildiğinde, 100 mg verilen gruba göre etkisinin daha iyi olduğu söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Silimarin, over iskemi, iskemi-reperfüzyon hasarı

ABSTRACT

Protective Effect of Silymarin on Ischemia-Reperfusion Model That Made on Rat Ovary

Seyithan Elceoglu, Md

Specialty Thesis, Department Of Obstetrics and Gynecology

Aim: After detortion process for ovarian torsion, free oxygen molecules elevate at ischemic tissues. As a result of this tissue injury forms. The aim of our study is to evaluate effect of silymarin on tissue damage due to ischemia reperfusion at rat ovary.

Method: Study was made after getting allowance of DOLLVET A.Ş. Board of Experimental Animal Ethic. At study 35 wistar albino rat nearly 200-250 gr. Young adult, female were used. Study consists of five groups that group I (Sham group), group II (control group 2T/DT), group III (2T/DT+SF), group IV (2T/DT+100 mg Silymarin), group V (2T/DT+200 mg Silymarin). Silymarin was administered to group IV and V 30 minutes before detortion process. From biochemical parameters; MDA, SOD, TNF-alpha and HSP-70 levels were studied for ischemia reperfusion damage on ovaries. Samples were taken from ovaries for pathological assessment.

Results: Serum HSP-70 levels were found high at groups that silymarin was given, when compared to control group ($p < 0,001$). It was not found a statistically significant association. Between groups for malondialdehyde and SOD levels. At group IV and V TNF-alpha levels were determined lower than control group ($p = 0,006$).

Pathologic score of control group was higher than all other groups. Ovarian pathologic lesion score was seen lower at groups that silymarin was given. At groups that torsion and detortion made, findings like edema, congestion, hemoraggy and elevation of PMNL were regressed at silymarin given groups (group IV and V) in comparison to control group and group III ($p < 0,001$).

Conclusions: Our findings show that silymarin has an anti-inflammatory and particularly antioxidant effect on ovarian ischemia and reperfusion. It is possible to say effect of silymarin is better when it is given dose dependent 200 mg after ischemia, than 100 mg given group.

Key Words: Silymarin, ischemia, ischemia-reperfusion injury

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Over torsiyonu, %2.7 oranında görülen ve ciddi komplikasyonlara neden olabilen jinekolojik acil cerrahi nedenlerinden biridir (1). Fertilizasyonu koruyabilmek için erken tanı ve tedavi önemli rol oynamaktadır. Bununla birlikte torsiyone uğramış overin cerrahi olarak alınması gelecek dönemde bu kadınların hem fertilizasyonunu hem de menapoz yaşını olumsuz yönde etkilemektedir. Koruyucu tedavi torsiyone (T) uğramış segmentin detorsiyone (DT) edilmesini içermektedir. Bununla birlikte torsiyone adnekslerin detorsiyone edilmesi ile overlerin reperfüzyonuna bağlı lokal ve sistemik etkiler meydana gelmektedir. Detorsiyon işlemi iskemik dokuların oksijenlenmesi reaktif oksijen moleküllerin üretilmesine neden olmaktadır. Patogenezde hasarlanan dokunun reperfüzyonu esnasında aktive olmuş nötrofiller ile superoksit anyon, hidrojen peroksit, ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen moleküllerinin (ROM) salınması yer almaktadır. ROM'ların hücre membranındaki poliunsatüre yağ asitlerini parçalayarak nekroz ve apoptoz yolu ile hücre hasara neden olduğu bilinmektedir (2-3).

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 (4,5,6,7). Bu çalışmalarda over hasarının belli oranlarda azaltıldığı öne sürülmüştür.

Silimarin, Latince adı silybum marianum olarak bilinen bitkiden elde edilen doğal bir maddedir. Deneysel çalışmalarda silimarin maddesinin, karaciğer iskemisi reperfüzyon hasarında(8), böbrek iskemisi reperfüzyon hasarında(9-10), beyin iskemisi reperfüzyon hasarında(11), kalp iskemisi reperfüzyon hasarında(12), mezenter iskemisi reperfüzyon hasarında(13) kullanılmıştır. Genel olarak TNF-alfanın indüklenmesini ve serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşmasını engelleyerek ve SOR ların atılımlarını arttırıp , lipid peroksidasyonunu inhibe ederek etki gösterdiği rapor edilmiştir.

Bugüne kadar silimarinin over iskemisi-reperfüzyon modelinde koruyucu etkisinin olup olmadığını gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızın amacı, rat overinde iskemisi-reperfüzyona bağlı doku hasarı üzerine silimarin'nin etkisini değerlendirmektir.

2.GENEL BİLGİLER

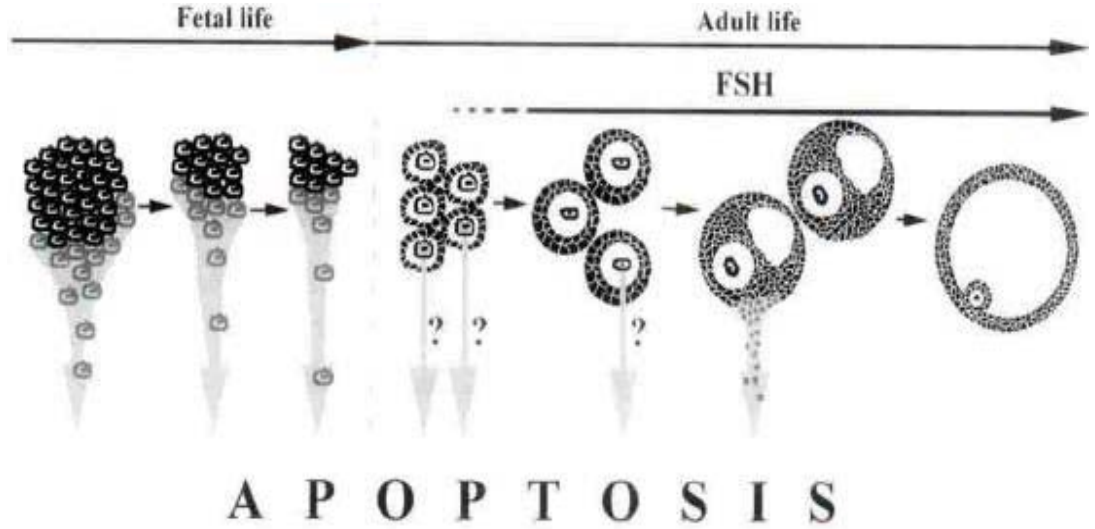
2.1. Overin Yapısı ve Fonksiyonları

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 uyan Follikül stimüle eden hormon (FSH) ve ovulasyonu tetikleyen, follikül hücreleri ve korpus luteumu uyararak progesteron üretimini sağlayan Luteinleştirici hormon (LH)'dur (14,15).

2.1.1. 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 (14-16). 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.

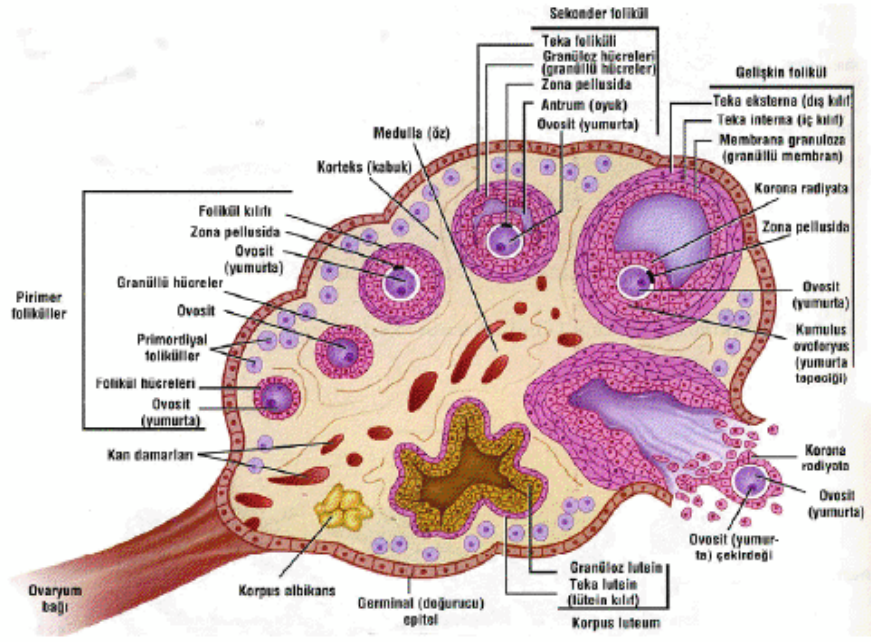
Yenidoğan bir kız çocuğun overlerinde yaklaşık 2 milyon primer oosit vardır. Ancak gittikçe azalır ve pubertede 400 bin kadar kalır, bunlardan ancak 400 tanesi sekonder oosit olarak ovulasyonla atılır (15,17) (Şekil 1).



Şekil-1: Fetal dönemde maximum 7 milyon'a ulaşabilen germ hücreler fetal dönemde başlayan oosit apoptoz'u ve doğumdan itibaren menopoz'a dek süren granuloza hücre apoptoz- folliküler atrezi ile tükenenlerdir (18).

2.1.2. Over Histolojisi

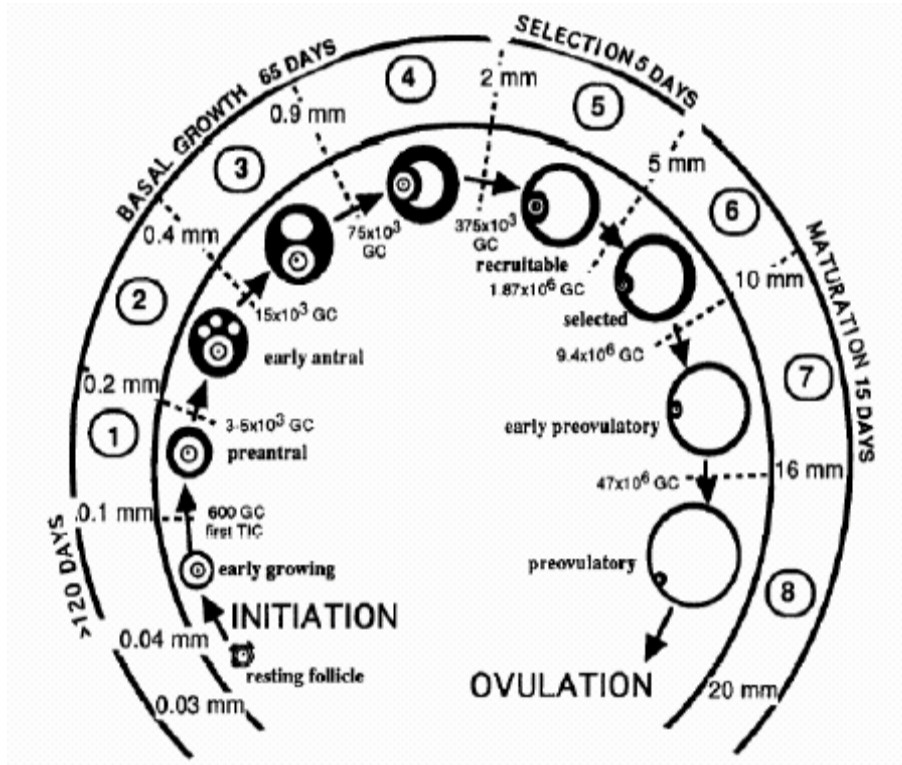
Overlerin yüzeyi tek katlı yassı ya da kübik epitelyum ile kaplıdır; bu epitel germinal epitelyum olarak adlandırılır. Germinal epitelin altında, overin beyazımsı rengini veren ve tunika albuginea olarak adlandırılan sıkı bir bağ dokusu tabakası bulunur. Tunika albugineanın altında oositleri içeren over 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 1). Korteks ile medulla bölgeleri arasında kesin bir sınır yoktur (19).



Resim-1: Overin Histolojik Yapısı (16)

2.1.3. Pre-antral folükül popülasyonu

‘Non-growing’ folükül popülasyonu 4 tip folükülden oluşur; (I) iğsi granuloza hücreleriyle çevrelenmiş primer oositte oluşan primordiyal folükül (35.0 μm çapta), (II) iğsi ya da küboidal granuloza hücreleriyle çevrelenmiş primer oositte oluşan intermediyer folükül (38.0 μm çapta), (III) tek tabaka granuloza hücresiyle çevrelenmiş primer oositte oluşan primer folükül (46.0 μm çapta) ve (IV) Tek kattan fazla granuloza hücresiyle çevrelenmiş primer oositte oluşan sekonder folükül (77.0 μm çapta)(20). Gerçek folüküler büyüme sekonder folükül içerisinde oluşan germinal vezikül’ün 19 μm ’yi geçmesiyle başlar (21). 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 (22.23). Folüküler büyüme- gelişme şekil 2.’de gösterilmiştir(20).



Şekil-2: Overdeki folüküllerin gelişimi (Gougeon, 1996)

2.1.4. Follüküler gelişimin başlaması

Doğumla birlikte overlerdeki follüküllerin hemen hemen tamamı primordial follüküldür. Follüküler gelişimi başlatan mekanizma net olarak anlaşılamamakla birlikte bir grup faktör'ün follüküler 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 (24).

Diğer taraftan Anti-Müllerian Hormon (AMH) ve somatostatin'in follükül büyümesini engellediği tesbit edilmiştir. Bekleme evresindeki 'resting follicle' follüküllerin ne kadar miktarlar ile aktive olacağı; bekleme havuzunda kalan follükül sayısına, testosteron seviyesine, hastanın yaşına, beslenmeye ve timus aktivitesi ile opioid peptidlere bağlıdır (25,26).

2.1.5. Preantral büyüme evresi veya bazal foliküler büyüme

Preantral büyüme evresine geçiş fetal dönemde başlar ve bu süreç menopoza kadar devam eder (21,24). 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(27). 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 (28). Sekonder follikülü oluşturan granuloza hücrelerinde FSH, östrojen ve androjen reseptörleri mevcut olmakla birlikte tam fonksiyonel değildir (28,29). Bazal lamina etrafındaki ovarian stromal hücreler theca interna ve theca externa olmak üzere 2 ayrı tabakaya farklılaşacaklardır. Theca interna hücreleri LH reseptörleri taşımaktadır. Sekonder foliküller ya büyümeye devam edeceklerdir ya da %99'unda olduğu gibi atreziye uğrayacaklardır (30).

2.1.6. Oositlerde apoptoz

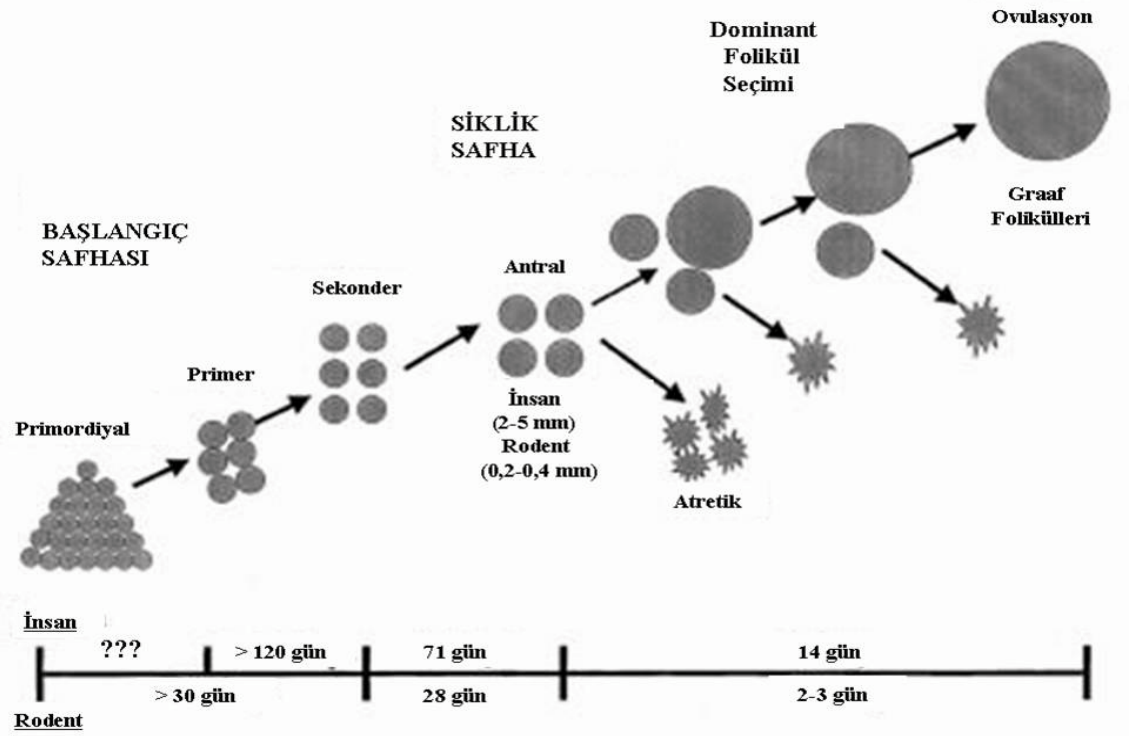
Oositlerdeki gelişim ve atrezi, apoptoz birçok moleküler mekanizma ile kontrol edilmektedir. Fizyolojik koşullar altında apoptoz, ovarian follikül'de 3 hücre tipinde görülür. *Granuloza hücrelerinde ve luteal hücrelerdeki* apoptoz sıklıkla erişkin dönemde olurken oositlerdeki apoptoz fetal hayatta gözlenir. Oositlerde apoptoz 13.haftadan başlar ve 14-20. haftalar arasında maximum seviyeye (%11-17) ulaşır (31). 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.

2.1.7. 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 (32). İlk folikül dalgasının antral foliküle kadar gelişimi üç haftayı bulur (33). İyi gelişmiş sekonder foliküller yedinci günde gözlenir. Minimal ovaryan hücre apoptozisi ancak 18. günde oluşur (32,34). 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 (preovulatuvar 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±2-3 gün olabilir (33). Bu durumda erken folikül gelişimi, insanlardakine benzer şekilde rodentlerde de oldukça uzundur (Şekil 3).



Şekil-3: Rodentler ve insanlarda prepuberte ve puberte aşamasında folikül gelişimi süreleri (33).

2.1.9. Östrus Siklusu

Farelerde genital siklus (östrus siklusu) post-natal 28-42. günlerde (32,33,35) vajinal açıklığın gözlenmesiyle, vajinal smear yöntemi kullanılarak takip edilmektedir. Östrus siklusu yaklaşık 4-5 gün sürer (35,36,37). 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 (38,39,40).

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 (40,42). 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 siklusa ait gözlemler için güvenilir bir kayıt sağlamaktadır. Ayrıca hayvanlarda ovulasyon zamanı, kızgınlık dönemi (davranışsal östrus) ve gebeliğin tespiti için de kullanılan pratik bir yöntemdir (38,41,43,44).

2.2. Adneksiyal Torsiyon

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 (44). 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 siktir ve bu gibi durumlar overin, fallopiyan tüpün ya da her ikisinin kaybı ile sonuçlanabilmektedir. İzole fallopiyan tüp ya da overin izlenmediği olguların tanı alamamış bir adneksiyel torsiyon sonucu gelişmiş olabileceği akılda tutulmalıdır (45,46). 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 müdehale gerekmektedir (47).

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 (48).

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 (49). Adneksiyel torsiyon destekleyici bağlar olan ovaryen ve infundibulopelvik ligamanların mobilitesi nedeniyle meydana gelmektedir. Torsiyon durumunda her iki bağ da parsiyel olarak strangle 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 iskemi ve nekroz gelişmektedir. Adneksiyel hasar irreversibl olabilmektedir (50).

Uzamiş 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 (51).

Hastaların önemli bir oranında tanıda gecikilmektedir. Semptomların başlamasından tanı konulmasına kadar geçen süre saatlerden günlere kadar uzayabilmektedir. Diğer akut batın yaratan nedenlerin ayrımı g olabilmekteyse de erken tanı ve müdehale ile en erken dönemde overde gelişebilecek irreversibl hasarın önüne geçilmesi gerekmektedir (52).

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 (52). 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 (52).

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 (50). 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 deviyedir (53).

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 (54).

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

İskemik ve ödemli adneksiyel torsiyon 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 (55). Adneksiyel torsiyon sonrası pulmoner emboli insidansı % 0.2'dir ve detorsiyon sonrası bu riskte bir artış gözlenmemektedir (51).

Ovaryen torsiyonun tekrarlanması nadir bir durumdur; bu nedenle ovaryan fiksasyon rutin bir prosedür olarak uygulanmamaktadır. Zaten oöferopeksinin fertilité üzerine etkisi konusunda henüz yeterli bir bilgi bulunmamaktadır. Fakat eđer torsiyon tekrarlırsa özellikle polikistik overlerde olduğu gibi ovaryen fiksasyon önerilmektedir (56). Fonksiyonel over kistleri nedeniyle torsiyone olan olgulara bu tip kistlerin tekrarını önlemek için oral kontraseptifler verilmektedir (57).

2.3. İskemi 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 (58).

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 (59). 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 (60).

Yine iskemi sırasında ATP'nin yıkımı sonucu hipoksantin ve ksantin gibi pürin metabolitleri birikirken ksantin dehidrojenaz enzimi ksantin oksidaza çevrilmektedir. Reperfüzyon esnasında sisteme ani O₂ girişi, birikmiş pürinlerin çok süratli bir şekilde oksidlemesine ve sonuç olarak ürat ve süperoksit anyonu oluşumuna neden olmaktadır. Oluşan süperoksit anyonu, endotelde demir tarafından katalize edilen reaksiyonlar ile toksisitesi yüksek hidroksil radikali üretimine neden olmaktadır (61).

Hücresele 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 (62). Daha sonra ribozomlar, granüllü endoplazmik retikulumdan ayrılmakta ve polizomlardan monozomların oluşumu ile protein sentezi de azalmaktadır. Bu aşamadan sonra iskemi hala devam ederse irreversible zedelenme gelişmektedir. Morfolojik olarak irreversible zedelenmeye mitokondrilerin daha şiddetli vakuolizasyonu ve mitokondri matriksinde şekilsiz, kalsiyumdan zengin yoğunlukların birikimi eşlik etmektedir (62).

Bir veya daha çok sayıda eşleşmemiş elektron içeren serbest radikaller biyomolekülleri okside edip hücre ölümüne sebep olabilmektedirler (63,64). 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(65,58).

Hücre apoptozisinden sorumlu önemli bir enzim Kaspaz-3 (apopain), 13 farklı üyesi bulunan interlökin β grubundan olup sistein 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 (65).

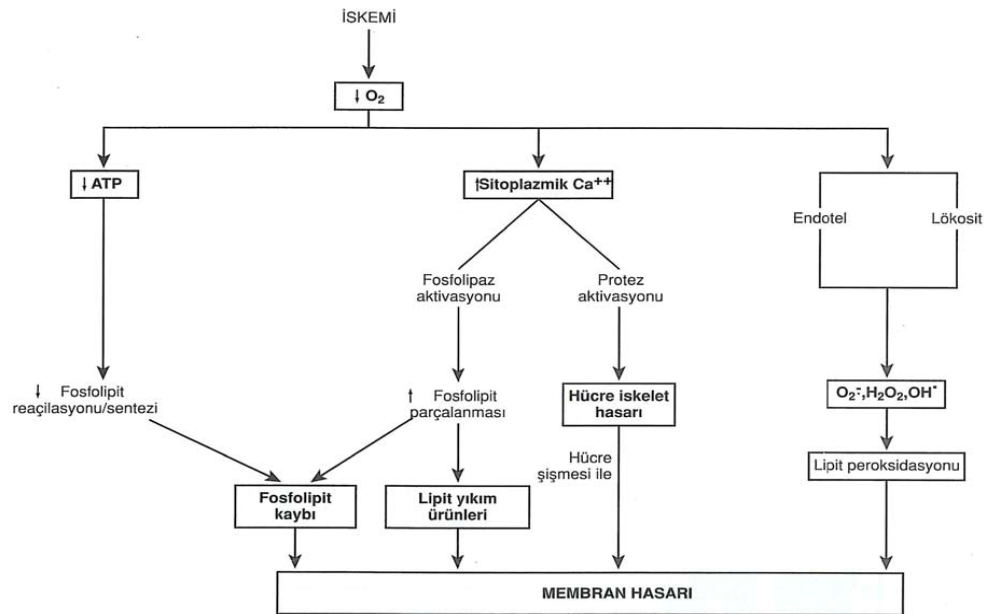
Membran hasarının birçok potansiyel nedeni bulunmaktadır (şekil 4).

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 (62).



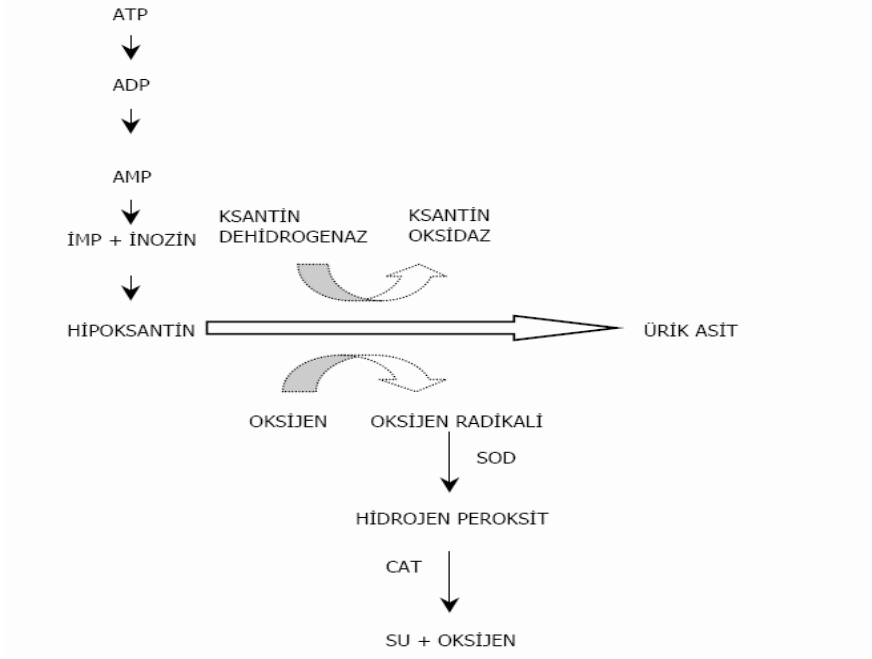
Şekil-4: İskemide membran hasarının mekanizmaları.

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 (66) (şekil 5). 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 (67,68) (şekil 6).

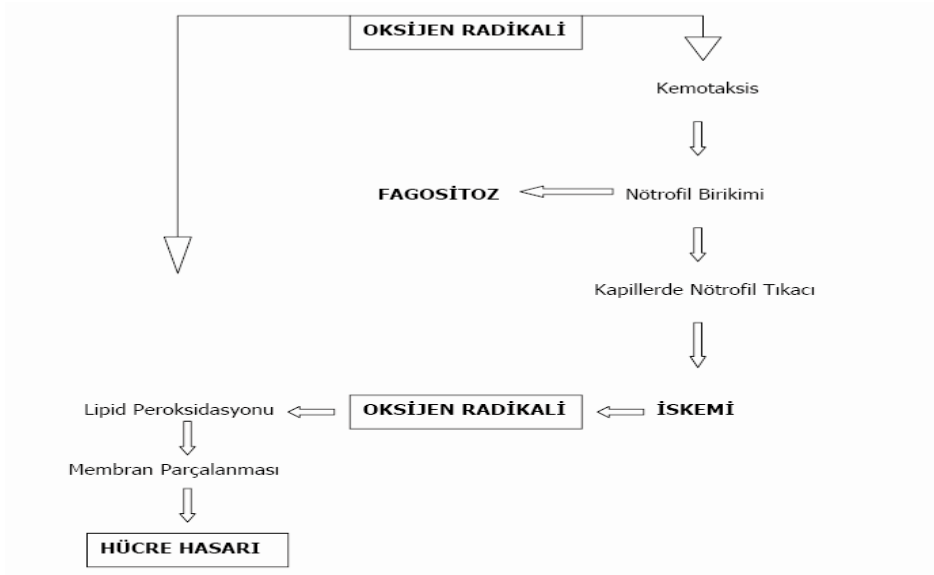
İskemik dokuda nötrofil infiltrasyonun stimüle olduğu ve nötrofil infiltrasyonu sonucunda O^- , $H O_2$, OH^- gibi serbest oksijen türevlerinin açığa çıkarak doku hasarına

sebebi olduğu bilinmektedir. Hücrelerin membranlarının lipid ve protein yapıları hasara uğramazsa hücrelerin normal fonksiyonları devam ettiği bilinmektedir (69).



Şekil-5: 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 aldehidler, hidrokarbon gazlar ve konjuge dienler olduğu bilinmektedir (69,70).



Şekil-6: 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 yapmaya 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 oluşturan zincirleme reaksiyonların protein ve nükleik asit 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 (71).

Endotel hücreleri tarafından oluşturulan 3 önemli koruyucu ajan prostasiklin, nitrik oksit ve adenozin olduğu bilinmektedir (72). Prostrasiklin vazodilatasyon yapan, nötrofil adherensini önleyen, trombosit agregasyonunu inhibe eden ve lizozomal membranları stabilize eden potent bir eikosanoiddir (73). 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 (72). NO'in etkileri guanilat siklazın aktivasyonu ve böylece cGMP oluşumu ile düzenlenmektedir (74). 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 (72,73,75). Bir serbest radikal olan (NO) hem

fizyolojik hem patofizyolojik süreçlerde önemli rol 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 + ve kalmodulin bağımlı esas izoformlardır. Nöronal NOS (tip I, nNOS), nöral iletide fonsiyon görmektedir.

Endotelial NOS (tip III, eNOS) böbreklerde bulunmaktadır. Endotelial NOS (tip III,

•

eNOS) vasıtasıyla oluşturulan nitrik oksit (NO), 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) 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

yanışmaya girmesi ve süperoksit (O_2^-) radikaliyle etkileşmesi sonucu peroksinitrit

($ONOO^-$) oluşmaktadır. Böylece nitrik oksitin fizyolojik etkisi inhibe edilmekte,

oksidatif etkisi ortaya çıkmaktadır. Vasküler tonüsün düzenlenmesi için süperoksit

(O_2^-) ve nitrik oksit (NO) arasındaki fizyolojik dengenin önemli olduğu ileri sürülmektedir.

2.4. Serbest Radikaller

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 metallerrinin de ortaklanmamış elektronları olduğu halde bu metaller serbest radikal olarak kabul edilmemektedirler. Fakat bunlar serbest radikal oluşum reaksiyonlarında katalizör olması sebebi ile önemlidir.

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 (76).

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, lipid, karbohidrat, nükleikasitler ve yararlı enzimlerin yapılarını bozarak zararlı etkilere yol açmaktadırlar (77). Bunlardan özellikle lipitler, serbest radikal hasarına karşı en hassas yapı olmaktadır. Serbest radikaller yağ asitlerindeki doymamış bağlarla kolayca reaksiyona girerek lipitlerin peroksidasyonuna neden olmaktadır (78).

Serbest radikal moleküller; organizmadaki bir çok olağan hücrel 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 (76,79).

Serbest oksijen radikalleri, hücrenin önemli komponentleri olan lipit, karbohidrat, protein ve DNA'yı oksitleyerek biyolojik sistemlerde ağır hücre zedelenmelerine neden olmaktadır (79,80). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan serbest radikallerdir. Serbest oksijen metabolizmasındaki anahtar maddeler şunlardır.

1. Süperoksit anyonu ($O^{\cdot -}$)
2. Hidrojen peroksit (H_2O_2)
3. Hidroksil radikali (OH^{\cdot})

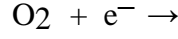
4. Oksijenin kendisi (O₂)

5. Geçiş metallerinin iyonları (Cu⁺², Fe⁺³, Mn⁺² vb.)

2.4.1. Reaktif Oksijen Türleri

2.4.1.1. Süperoksid Radikali (O₂⁻) :

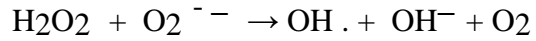
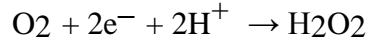
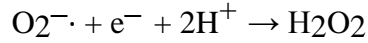
Doğal oksijen molekülünün bir elektron alması ile oluşmaktadır. En büyük kaynağı elektron transport zinciridir (81).



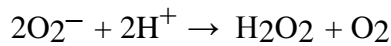
Süperoksid radikali bir serbest radikal olmakla birlikte hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metallerini indirgemesi bakımından önemlidir.

2.4.1.2. 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.



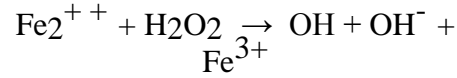
Hidrojen peroksit genellikle biyolojik sistemlerde süperoksidin dismutasyonu ile spontan olarak veya **SüperoksidDismutaz(SOD)** katalizörlüğünde oluşmaktadır.



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

2.4.1.3. 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.



2.4.1.4. 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.

2.4.2. Hücredeki Serbest Radikal Kaynakları

2.4.2.1. 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

2.4.2.2. Ekzojen Kaynaklar

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

2.4.3. 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 (82).

Yukarıda da belirtildiği gibi iskemik dokuların reperfüzyonu toksik ROS oluşumuna yol açmaktadır. Bunlar süperoksit anyonlar (O_2^-), hidroksil radikalleri (OH^-), hipoklorik asit ($HOCl$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve nitrik oksitten derive peroksinitrittir (83). Oksijen kökenli serbest radikaller aracılığı ile oluşan hücre hasarında başlangıç olayı ksantin oksidaz kökenli süperoksit anyonlarının üretilmesidir (84). 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 (83) (Şekil 5.).

Sellüler ve subsellüler membranların lipid peroksidasyonu da oksijen kökenli serbest radikallerin artırdığı hücre hasarında önemli bir mekanizmadır (85). Hücre membranları içerisinde poliansatüre yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu, hücresel bütünlük ve fonksiyon kaybı ile sonuçlanabilmektedir. Bu durum tek başına hidroksi 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 (85). 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.

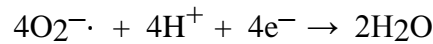
2.5. Antioksidanlar

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.

2.5.1. Doğal Antioksidanlar

2.5.1.1. Enzimler

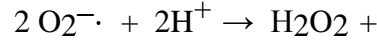
a) **Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi:** Solumun zincirinin son enzimi sitokrom oksidaz aşağıdaki reaksiyonla süperoksidi detoksifiye etmektedir.



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.

b) Süperoksid dismutaz (SOD): Süperoksid dismutaz, süperoksidin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen enzim olup üç formu bulunmaktadır.



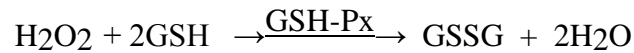
1. Cu-Zn SOD: Cu ve Zn içeren dimerik tip sitozolde bulunur, siyanidle inhibe olur.

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

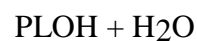
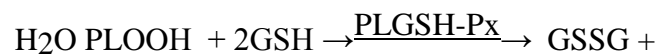
3. Ekstrasellüler CuZn SOD (86,87).

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

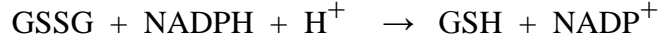
c) Glutasyon Peroksidaz(GSH-Px) : Glutasyon peroksidaz hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir.



GSH-Px; tetramerik, dört selenyum atomu içeren sitozolik bir enzimdir. Membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirgemektedir.

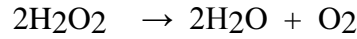


Membrana bağlı en önemli antioksidan olan vitamin E yetmezliğinde PLGSH-Px membranı peroksidasyona karşı korumaktadır. Hidroperoksitlerin redükte olmasıyla meydana gelen GSSG, glutatyon redüktazın katalizlediği reaksiyonla tekrar GSH' ye dönüşmektedir (88).



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 (88).

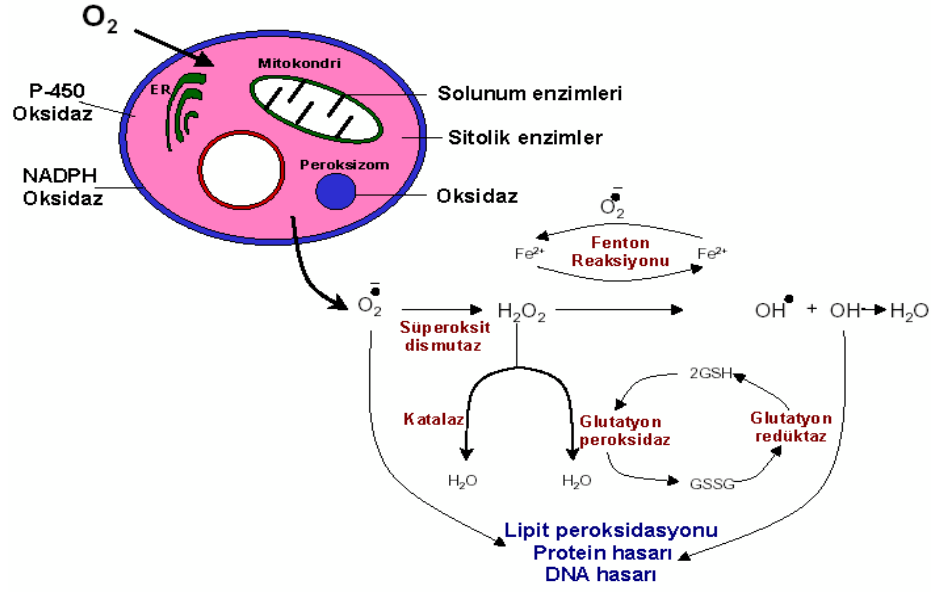
d) Katalaz (CAT): Dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Görevi hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalamaktır. Eritrositler yüksek oranda katalaz içermekte olup, katalaz aktivitesinin %98'den fazlasını sağlamaktadır.



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

e) Glutatyon-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 (89).

f) Hidroperoksidaz



Şekil-7: İskemideki serbest radikal mekanizması (60).

2.5.1.2 Enzim Olmayanlar

2.5.1.2.1. Lipid fazda bulunanlar

α - tokoferol ve β -karoten

2.5.1.2.2. Sıvı fazda (hücre sitozolünde veya kan plazmasında) bulunanlar

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

2.5.2. Diğer Antioksidanlar

Karotenoidler, Melatonin, Glutatyon, Ürat, Sistein, Selenyum, Albümin, Serüloplazmin

2.5.3 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

2.5.4. Silimarin

Silybum marianum gaertn (yabani enginar, devedikeni), asteraceae familyasına ait bir bitkidir. Silybum marianum tohumları, karaciğer ve safra kesesi hastalıkları ile toksin zehirlenmelerine karşı karaciğeri korumada, aynı zamanda mantar zehirlenmesi, yılan sokması, böcek ısırıkları gibi durumların tedavisinde 2000 yıldan beri kullanılmaktadır. Silybum marianum tohumlarından elde edilen ekstraktları bol miktarda silimarin içermektedir. Kimyasal olarak silimarin; silibin (silibinin), izosilibin, silikristin, silidianin ve dehidrosilibinin adı verilen izomer avanolignanlardan oluşmaktadır (90).

Canlıda serbest radikallerin zararlı etkileri antioksidan maddeler tarafından azaltılır veya tamamen ortadan kaldırılır. Flavanoidler, bitkilerde yaygın olarak bulunan ve antioksidan özellik taşıyan polifenolik bileşiklerdir. Tüm avonoidlerin antioksidan etkileri, kimyasal yapılarında bulunan fenolik hidrojenler ile ilgilidir. Silimarinin biyolojik aktivitesinden sorumlu olduğu düşünülen temel bileşeni "silibin"dir ancak yapısında bulunan diğer avano-lignanların da bu biyolojik aktivitede rolü olabileceği düşünülmektedir (91). Fakat silimarinin asıl aktivitesi, içerdiği avano-lignanlar ve diğer polifenolik bileşikler ile antioksidan özellik göstermesi ve buna bağlı olarak serbest radikal tutucu işlevinin bulunmasıdır (92). Silimarinin hücre Glutasyon seviyesinde artışa neden olduğu (93), süperoksit dismutaz aktivitesini arttırdığı (94) ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır (95).

3. MATERYAL VE METOD

Çalışma, Dollvet A.Ş. Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu(DOLLVET-HADYEEK)'nun 07.05.2014 tarih ve 2014/23 sayılı onayı alındıktan sonra yapılmıştır. Çalışmada 35 adet, 200-250 gr ağırlığında, genç erişkin, dişi Wistar Albino sıçan (rat) kullanılmıştır. Deney hayvanları Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. 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.

Çalışmamızda SIGMA Life Science tarafından üretilen cam şişede toz halinde 10gr silimarin içeren etken madde kullanılmıştır. Ratlara verilmeye uygun hale getirmek için serum fizyolojik ile eritilmiştir.

Deneyleer; Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında; Biyokimyasal çalışmalar, Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında; Patolojik değerlendirmeler ise Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında yapıldı.

3.1.Cerrahi İşlemler

Ratlar, her bir grupta 7 denek olacak şekilde randomize edilerek 5 grup oluşturuldu.

Her gruba Ketamine 40mg/kg (Ketalar® Flakon 50 mg/ml Pfizer) ve Xylazine 5 mg/kg (Xylazin® 20mg/ml Flakon Kepro) ile sedasyon yapıldı. Bütün ratlara anestezi altında ve dorsal pozilyonda insizyon saha temizliği uygulandı. 2 cm'lik orta hat kesisi ile laparotomiyi takiben sağ adneksler ortaya çıkarıldı. Sağ over, sham grubu hariç saat yönünde 360 derece döndürülerek torsiyone edilip ve 5.0 ipek sütün ile abdominal kaslara fikse edildi. Batın ve cilt 5.0 ipek sütün ile kapatıldı. 2 saatlik iskemi sonrasında ratlara anestezi altında eski insizyon yerinden laparotomi uygulanıp, sütünler alınarak overler detorsiyone edildi ve normal anatomik lokalizasyonuna yerleştirildi.

Sham grubu: Orta hat laparotomi sonrasında sağ overler insizyon bölgesine çıkarılıp tekrar yerine yerleştirildi ve serozasına 5.0 ipek sütün atıldı. 2 saat sonra diğer gruplar ile birlikte batın açılıp kapatıldı.

Kontrol (T-DT) grubu: 2 saat iskemi sonrası overler detorsiyone edildi.

Grup III (T-DT-serum fizyolojik grubu): Reperfüzyondan 30 dk önce intraperitoneal olarak 2 ml serum fizyolojik enjekte edildi.

GrupIV (T-DT-100 mg/kg silymarin grubu): Reperfüzyondan 30 dk önce intraperitoneal 100 mg/kg silymarin enjekte edildi.

Grup V (T-DT-200 mg/kg silymarin grubu): Reperfüzyondan 30 dk önce intraperitoneal 200 mg/kg silymarin enjekte edildi. 2 saatlik reperfüzyon sonrasında sağ overler cerrahi olarak çıkarıldı ve kan örnekleri alındı. Sonrasında tüm ratlara anestezi altında dekapitasyon ile ötenazi uygulandı.



Resim-3:Rat overinin ortaya konması



Resim-4: İskemi oluşturulan rat overi



Resim-5: Üstte(sağ) iskemi oluşturulan ve aşağıda(sol) normal rat overi



Resim-6: Reperfüzyon sonrası görüntü

3.2. Biyokimyasal İnceleme

Kan örnekleri serumlarına ayrılıp -40 decede saklandı, daha sonra 4 ayrı parametre değerlendirildi:

Bunlar:

- 1-Malondialdehit(MDA)
- 2-Süperoksid Dismutaz(SOD)
- 3-TNF-alfa
- 4-HSP-70

3.3.Patolojik İnceleme

Histopatolojik analiz: Histopatolojik inceleme için ratlardan çıkarılan ovarian dokular %10'luk tamponlu formalin solusyonu içerisinde 48 saat boyunca fikse edildi. Ardından solusyandan çıkarılan dokular parafin bloklar içerisinde gömüldü. Parafin bloklar 4 µm microtomlar kullanılarak kesildi ve hematoxylin and eosin ile boyandı. Histolojik kesitleri değerlendirmek için ışık mikroskopu (Olympus® Inc. Tokyo, Japan) kullanıldı ve fotoğrafları çekildi. Doku hasarının varlığını ve şiddetini belirlemek amacıyla en az beş mikroskopik alan incelendi. Histopatolojik değişiklikler ödem, konjesyon, hemoraji, lokosit

infiltrasyonu ve folikül dejenerasyonu şeklinde tanımlandı. Hasarın şiddetine göre 0 – 4 arasında skorlama yapıldı. 0; patolojik bulgu yok, 1, 2, 3, 4 ise patolojik bulguların sırasıyla incelenen alanın <%25, %25-50, %50-75 ve >%75 olması şeklinde belirlendi. Her parametre için elde edilen skorlar toplanarak toplam skor hesaplandı.

3.4.Verilerin Değerlendirilmesi ve Analizi

İstatistiksel analiz için SPSS 16.0 software (SPSS for Windows Chicago, IL) programı kullanıldı. Tüm veriler ortalama ve standart sapma olarak sunuldu. Verilerin dağılımını analiz etmek amacıyla Kolmogorov-Smirnov testi uygulandı. Gruplar arasında karşılaştırmalar için Oneway ANOVA, posthoc test olarak Bonferroni kullanıldı. Veriler arasında korelasyon testi olarak Pearson's correlation test kullanıldı. “p” değeri 0.05'den küçük olanlar istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Verilerin Değerlendirilmesi

Gruplara göre biyokimyasal sonuçlar Tablo-1 de gösterilmiştir.

Tablo-1: Çalışmaya alınan grupların ortalama Heat shock protein (HSP70), Süperoksit dismutaz(SOD),Malondialdehit(MDA),Tümör nekrotizan faktör- alfa(TNF-a) değerleri

Parametre	Sham	Kontrol	Grup3	Grup4	Grup5	p
TNF-alfa(ng/ml)	9,20±2,66b*	15,87±10,46	13,15±23,10i*	11,86±5,76	10,07±5,10	0,006
SOD(U/L)	1,04±0,24	1,82±0,11	1,54±0,53	1,12±0,31	1,13±0,60	0,114
MDA(μmol/L)	239,37±33,25	251,18±51,18	241,05±17,76	241,78±26,94	247,89±25,55	0,810
HSP-70(ng/ml)	179.38±43.68d**	182.62±40.45g**	182,62±45,30i**	224,24±82,20	269,98±171,49	<0,001

*:p<0,050

** :p<0,010

***:p<0,001

a. Sham Grubu ile Kontrol Grubu arasında fark vardır

b. Sham Grubu ile Grup 3 arasında fark vardır

c. Sham Grubu ile Grup 4 arasında fark vardır

d. Sham Grubu ile Grup 5 arasında fark vardır

e. Kontrol Grubu ile Grup 3 arasında fark vardır

f. Kontrol Grubu ile Grup 4 arasında fark vardır

g. Kontrol Grubu ile Grup 5 arasında fark vardır

h. Grup 3 ile Grup 4 arasında fark vardır

i. Grup 3 ile Grup 5 arasında fark vardır

k. Grup 4 ile Grup 5 arasında fark vardır

4.1.1.Gruplar arasında HSP70 Değerlerinin Karşılaştırılması:

HSP 70 değerleri için tek yönlü varyans analizi testi kullanıldı.

Test	P değeri	Sonuç
Tek yönlü varyans analizi	<0,001	Gruplara göre HSP70 değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır.

Hangi gruplar arasında farklılığın olduğunu belirlemek için Bonferroni testi kullanıldı. Aşağıdaki tabloda ikili karşılaştırmalara ilişkin değerler verilmiştir:

Tablo-2: Gruplara göre HSP 70 değerinin karşılaştırılması

Gruplar	P değeri	Sonuç
Kontrol Grubu ile Sham Grubu	0,91	Kontrol grubu ile sham grubunun HSP70 değerleri arasında anlamlı farklılık yoktur.
Kontrol Grubu ile Grup III	0,92	Kontrol grubu ile Grup III'ün HSP70 değerleri arasında anlamlı farklılık yoktur.
Kontrol Grubu ile Grup IV	0,065	Kontrol grubu ile Grup IV'ün HSP70 değerleri arasında anlamlı farklılık yoktur.
Kontrol Grubu ile Grup V	0,002	Kontrol grubu ile Grup V'in HSP70 değerleri arasında anlamlı farklılık vardır. Grup V'in HSP70 değerleri daha yüksektir.
Sham Grubu ile Grup III	0,91	Sham grubu ile Grup III'ün HSP70 değerleri arasında anlamlı farklılık yoktur.
Sham Grubu ile Grup IV	0,464	Sham grubu ile Grup IV'ün HSP70 değerleri arasında anlamlı farklılık yoktur.
Sham Grubu ile Grup V	0,001	Sham grubu ile Grup V'in HSP70 değerleri arasında anlamlı farklılık vardır. Grup V'in HSP70 değerleri daha yüksektir.
Grup III ile Grup IV	0,87	Grup III ile Grup IV'ün HSP70 değerleri arasında anlamlı farklılık yoktur.
Grup III ile Grup V	0,003	Grup III ile Grup V'in HSP70 değerleri arasında anlamlı farklılık vardır. Grup V'in HSP70 değerleri daha yüksektir.
Grup IV ile Grup V	0,24	Grup IV ile Grup V'in HSP70 değerleri arasında anlamlı farklılık yoktur.

Kısaca HSP 70 değerleri: Kontrol Grubu<Sham Grubu<Grup III<Grup IV<Grup V

Isı şok proteinleri intaselüller proteinler olup, stres altında başka hücre içi proteinlerin parçalanması ile ortaya çıkan artıkların temizlenmesinde görev alan protein olduğundan yüksek olması iskeminin etkilerinin ortadan kaldırılması yönünde anlamlı olarak değerlendirilebilir.

4.1.2. Gruplara Göre Süperoksit dismutaz (SOD) Değerlerinin Karşılaştırılması:

Değerlendirmede parametrik testlerden tek yönlü varyans analizi testi kullanıldı,

Test	P değeri	Sonuç
Tek yönlü varyans analizi	0,114	Gruplara göre SOD değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Çalışmamızda süperoksit dismutaz değerleri arasında istatistiksel bir farklılık tesbit edilmemiş ve literatür aksine silimarin verilen Grup IV ve Grup V’te, Kontrol grubu ve Grup III’e göre daha düşük değerler tesbit edilmiştir.

Kısaca SOD değerleri: “Sham Grubu <Grup IV<Grup V<Grup III<Kontrol Grubu” şeklinde formüle edilebilir.

4.1.3. Gruplara Göre Malondialdehit (MDA) Değerlerinin Karşılaştırılması:

Gruplara göre MDA değerleri normal dağılım gösterdiğinden tek yönlü varyans analizi testi kullanıldı.

Test	P değeri	Sonuç
Tek yönlü varyans analizi	0,810	Gruplara göre MDA değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir

MDA değerleri: “Sham<Grup III<Grup IV<Grup V<Kontrol Grubu” şeklinde formüle edilebilir.

4.1.4. Gruplara Göre TNF-alfa Değerlerinin Karşılaştırılması

Veriler normal dağılım gösterdiğinden tek yönlü varyans analizi testi kullanıldı.

Test	P değeri	Sonuç
Tek yönlü varyans analizi	0,006	Gruplara göre TNF-alfa değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır.

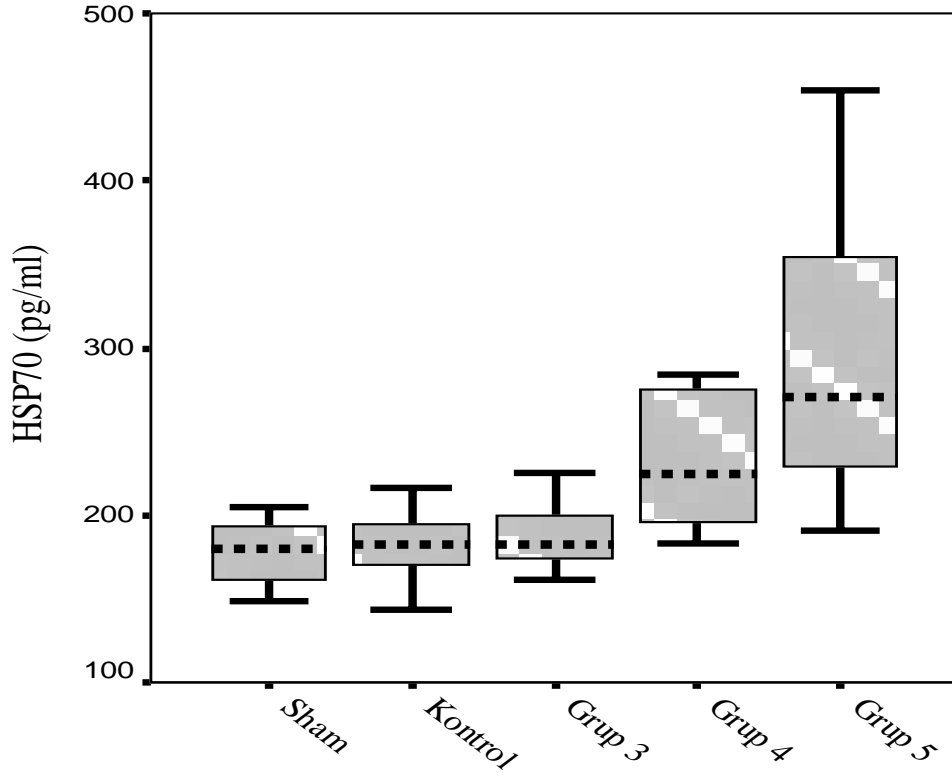
Gruplar arasında ikili karşılaştırmalar yapıldığında, aşağıdaki tablo elde edilmiştir.

Tablo-3: Gruplara göre TNF-alfa değerinin karşılaştırılması:

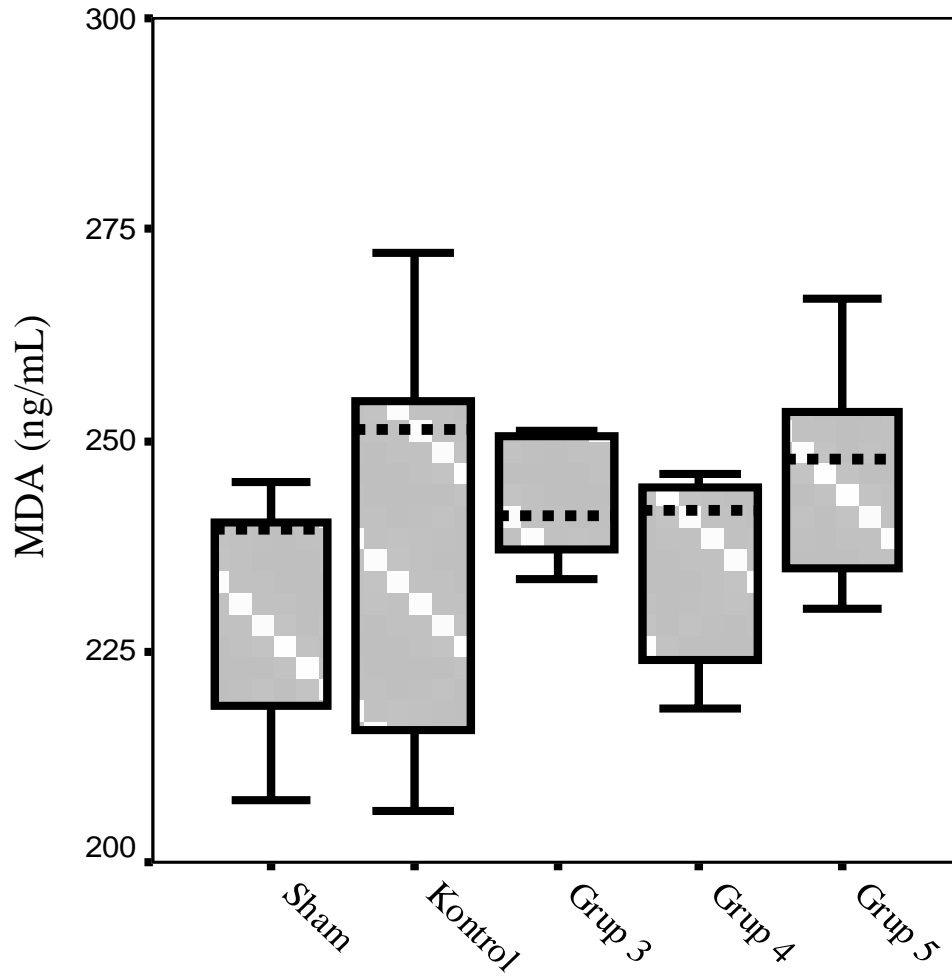
Gruplar	P değeri	Sonuç
Kontrol Grubu ile Sham Grubu	0,136	Kontrol grubu ile sham grubunun TNF alfa değerleri arasında anlamlı farklılık yoktur.
Kontrol Grubu ile Grup III	0,86	Kontrol grubu ile Grup III'ün TNF alfa değerleri arasında anlamlı farklılık yoktur.
Kontrol Grubu ile Grup IV	0,618	Kontrol grubu ile Grup IV'ün TNF alfa değerleri arasında anlamlı farklılık yoktur.
Kontrol Grubu ile Grup V	0,175	Kontrol grubu ile Grup V'in TNF alfa değerleri arasında anlamlı farklılık yoktur.
Sham Grubu ile Grup III	0,029	Sham grubu ile Grup III'ün TNF alfa değerleri arasında anlamlı fark vardır. Grup III'ün TNF alfa değerleri daha yüksektir.
Sham Grubu ile Grup IV	0,81	Sham grubu ile Grup IV'ün TNF alfa değerleri arasında anlamlı farklılık yoktur.
Sham Grubu ile Grup V	0,92	Sham grubu ile Grup V'in TNF alfa değerleri arasında anlamlı farklılık yoktur.
Grup III ile Grup IV	0,156	Grup III ile Grup IV'ün TNF alfa değerleri arasında anlamlı farklılık yoktur.
Grup III ile Grup V	0,038	Grup III ile Grup V'in TNF alfa değerleri arasında anlamlı fark vardır. Grup III'ün TNF alfa değerleri daha yüksektir.
Grup IV ile Grup V	0,84	Grup IV ile Grup V'in TNF alfa değerleri arasında anlamlı farklılık yoktur.

Özet olarak: “Sham<Grup V<Grup IV <Grup III<Kontrol Grubu” şeklinde formüle edilebilir.

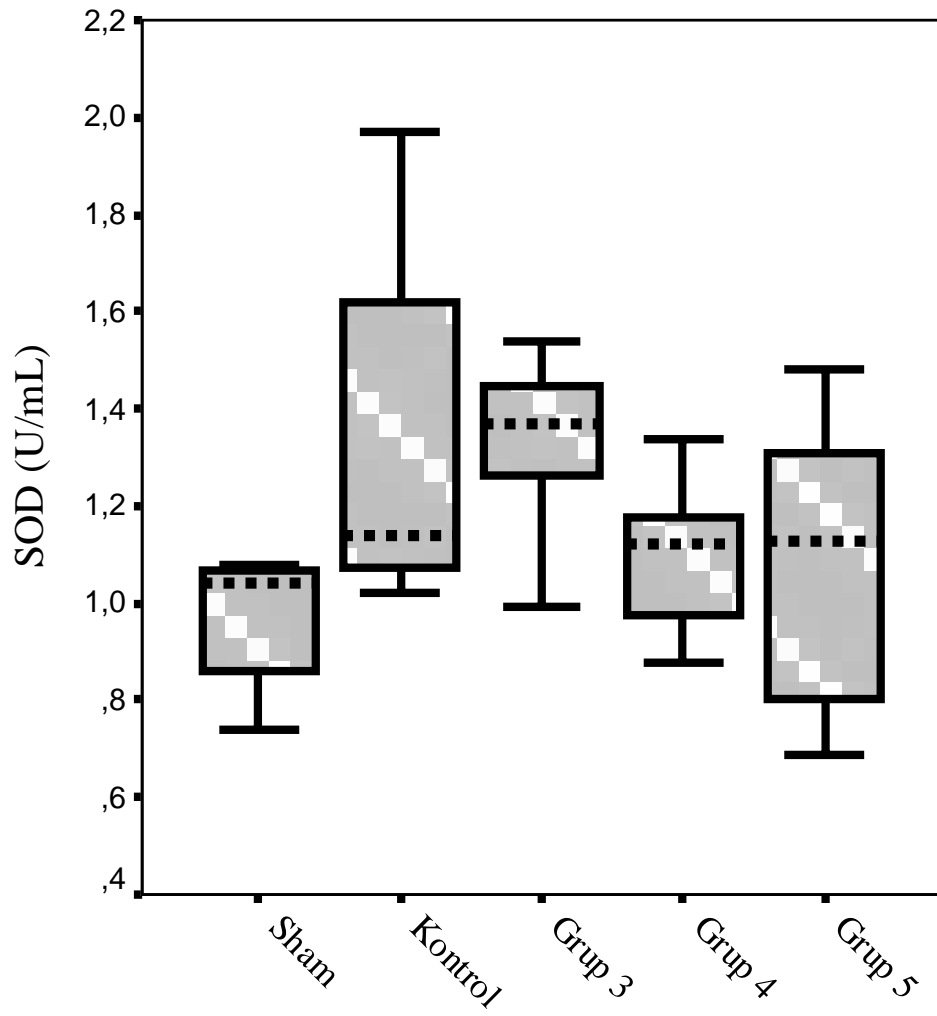
Grafik-1: HSP70 değerlerinin grafiksel görünümü



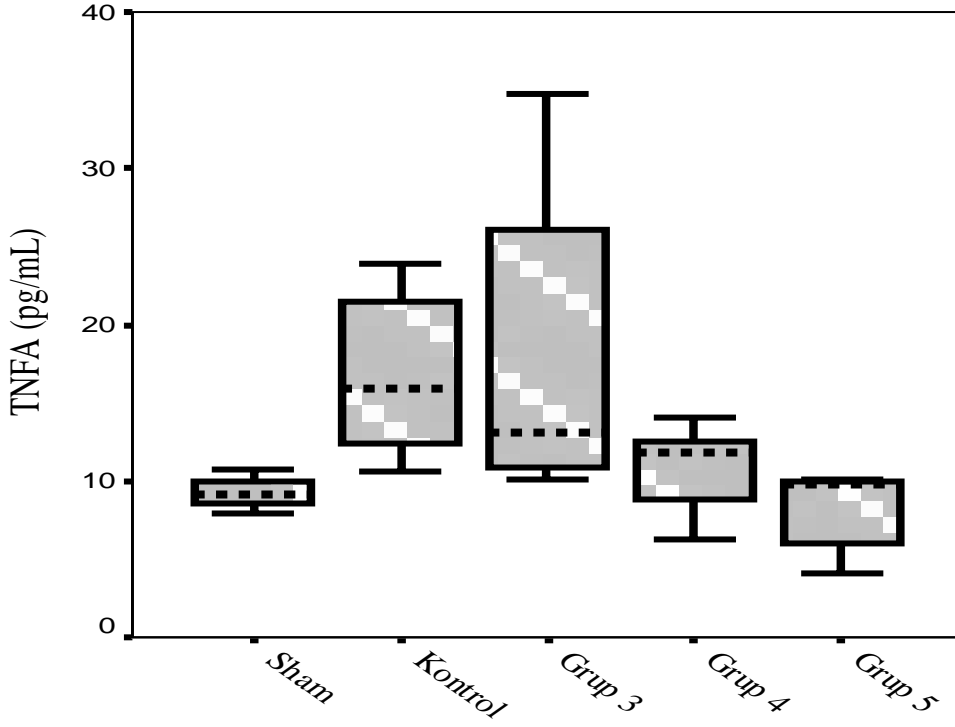
Grafik-2: MDA değerlerinin grafiksel gorunumu



Grafik-3: SOD değerlerinin grafiksel görünümü



Grafik-4:TNF-alfa değerlerinin grafiksel görünümü



4.2. Patolojik Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışma;

Grup 1: Sham grubu;

Grup 2: Kontrol grubu; 2 saat torsiyon ve 2 saat detorsiyon uygulanan grup;

Grup 3: 2 saat torsiyon ve 2 saat detorsiyon uygulama öncesi intraperitoneal 2 cc Serum fizyolojik uygulanan grup;

Grup 4: 2 saat torsiyon ve 2 saat detorsiyon uygulama öncesi intraperitoneal 100 mg/kg silimarin verilen grup;

Grup 5: 2 saat torsiyon ve 2 saat detorsiyon uygulama öncesi intraperitoneal 200 mg/kg silimarin uygulanan grup olarak 5 grup altında yürütülmüştür.

Deney grupları makroskopik olarak değerlendirildiğinde, Sham grubu dışındaki overlerin (zellikle Kontrol grubu ve Grup III) kanamalı, nekrotik grnmmde olduğu

izlendi. Torsiyon ve detorsiyon yapılan gruplarda (Grup 2 ve 3), ödem, konjesyon, hemoraji ve PMNL artışı bulgularının Silimarin uygulanması yapılan gruplarda (Grup 4 ve 5) gerilediği gözlenmiştir. Deney hayvanlarından alınan ovaryum örneklerinin H&E boyaması ile elde edilen histopatolojik değerlendirme sonuçları *Tablo 6* 'da gösterilmiştir.

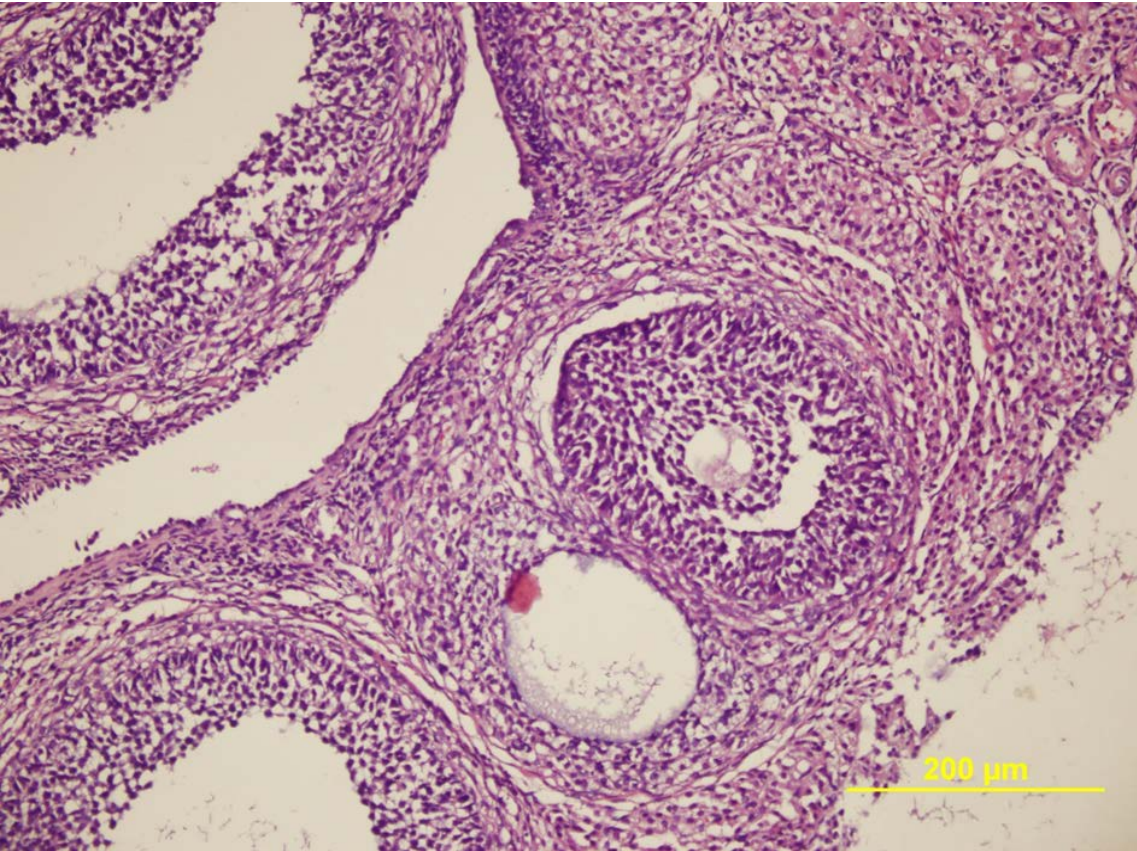
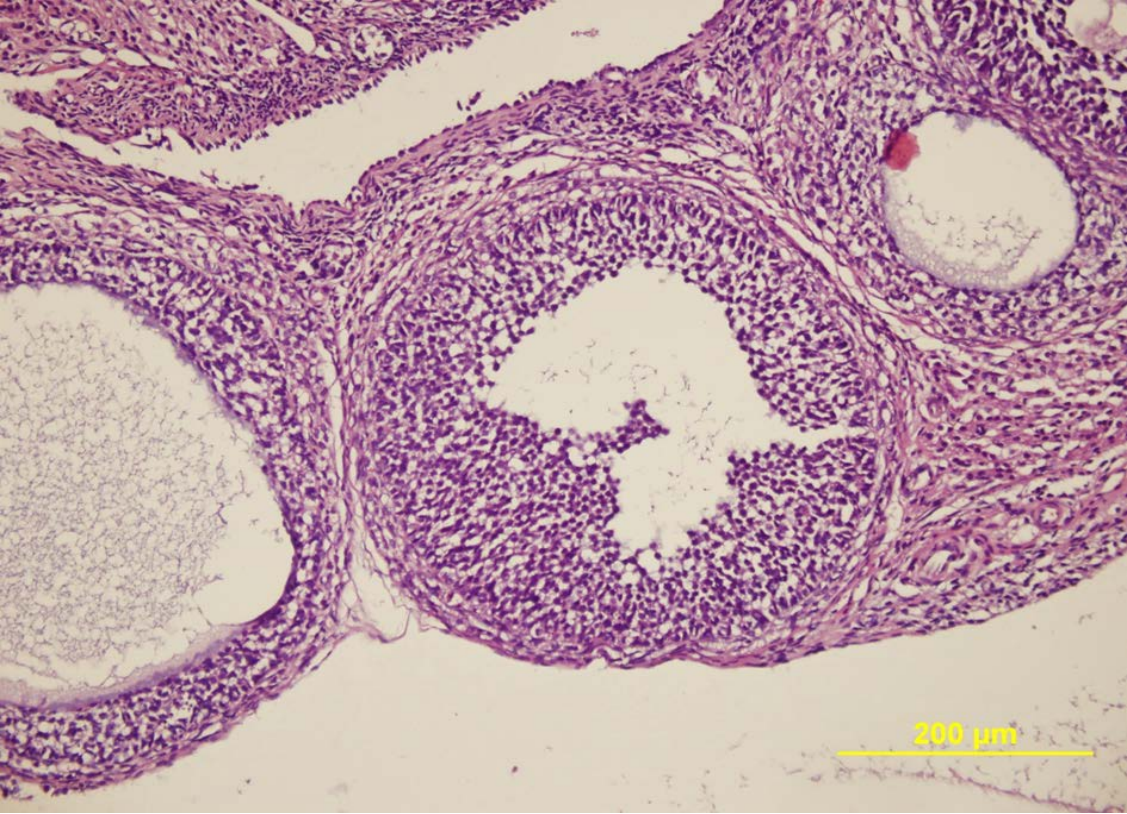
Tablo 4: Deney Gruplarının H&E ile Boyama Değerlendirme (Grade) Sonuçları

	Hemoraji	Lökosit İnfiltrasyonu	Vasküler Konjesyon	Ödem	Folikül Dejenerasyonu
Sham-1	grade 0	grade 0	grade 0	grade 1	grade 0
Sham-2	grade 0	grade 0	grade 0	grade 0	grade 1
Sham-3	grade 1	grade 0	grade 0	grade 1	grade 0
Sham-4	grade 0	grade 1	grade 0	grade 0	Grade 0
Sham-5	grade 0	grade 0	grade 0	grade 0	Grade 0
Sham-6	grade 0	grade 0	grade 0	grade 1	Grade 0
Sham-7	grade 0	grade 1	grade 0	grade 0	grade 0
Kontrol-1	grade 3	grade 3	grade 3	grade 4	grade 1
Kontrol-2	grade 3	grade 3	grade 2	grade 4	grade 0
Kontrol-3	grade 4	grade 3	grade 4	grade 3	grade0
Kontrol-4	grade 3	grade 4	grade 3	grade 3	grade 1
Kontrol-5	grade 4	grade 3	grade 3	grade 3	grade 2
Kontrol-6	grade 4	grade 3	grade 3	grade 4	grade 0
Kontrol-7	grade 3	grade 4	grade 4	grade 3	grade 0
Grup III-1	grade 4	grade 3	grade 2	grade 4	grade 1
Grup III-2	grade 3	grade 3	grade 3	grade 3	grade 0
Grup III-3	grade 3	grade 2	grade 4	grade 3	grade 0
Grup III-4	grade 3	grade 3	grade 3	grade 4	grade 0
Grup III-5	grade 3	grade 3	grade 2	grade 3	grade 1
Grup III-6	grade 4	grade 4	grade 3	grade 3	grade 0
Grup III-7	grade 4	grade 3	grade 3	grade 3	grade 1
Grup IV-1	grade 3	grade 2	grade 2	grade 3	grade 0
Grup IV-2	grade 3	grade 3	grade 3	grade 3	grade 0
Grup IV-3	grade 2	grade 2	grade 2	grade 2	grade 1

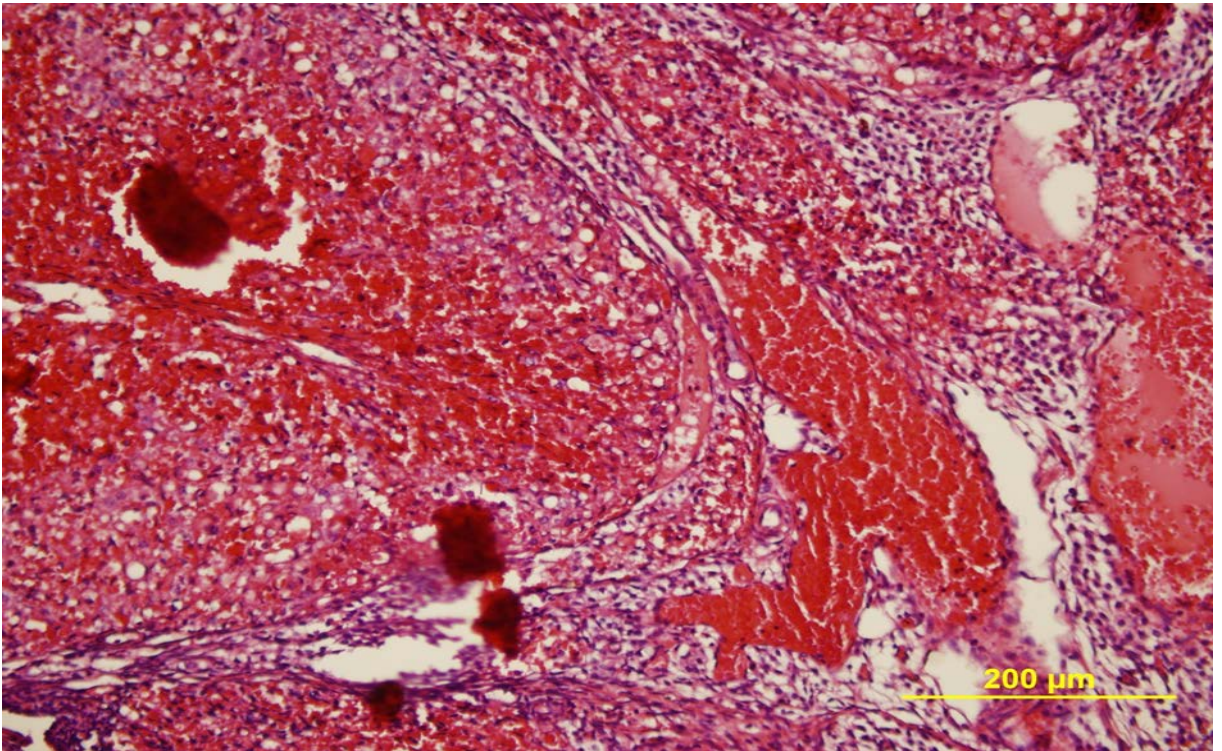
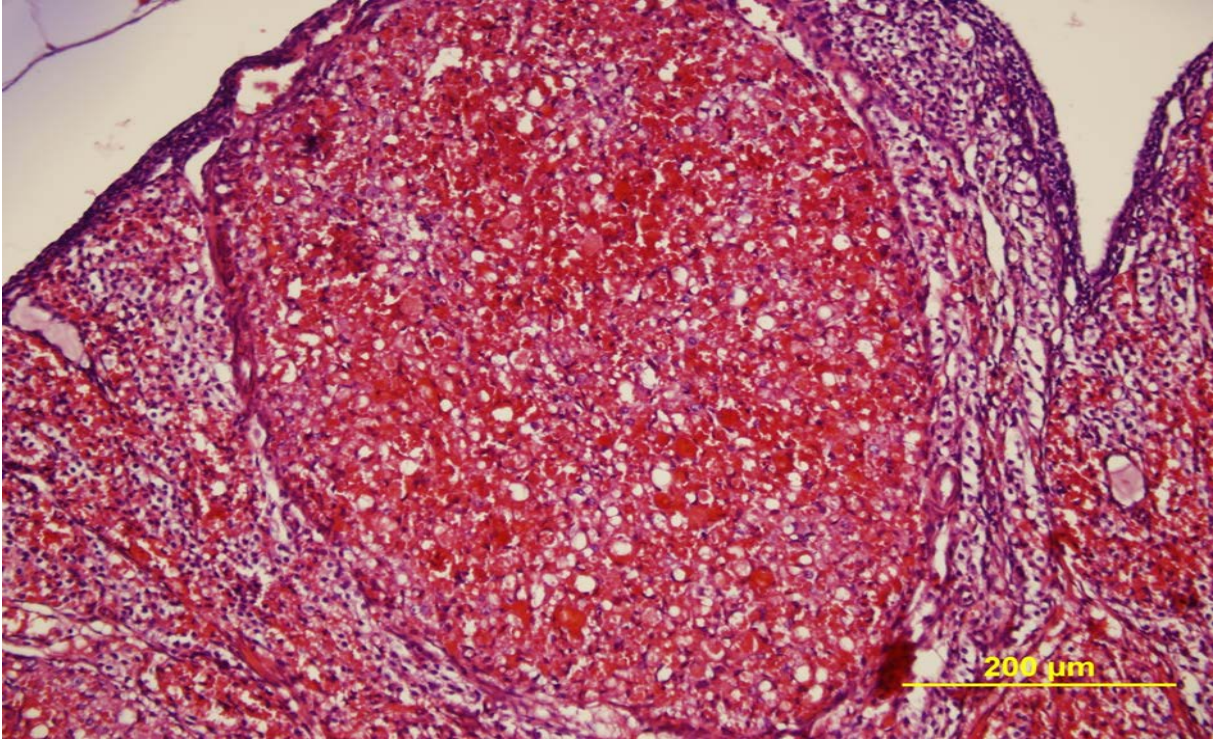
Grup IV-4	grade 3	grade 3	grade 3	grade 3	grade 0
Grup IV-5	grade 3	grade 3	grade 3	grade 3	grade 0
Grup IV-6	grade 3	grade 3	grade 2	grade 2	grade 0
Grup IV-7	grade 4	grade 3	grade 2	grade 3	grade 1
Grup V-1	grade 3	grade 2	grade 2	grade 2	grade 0
Grup V-2	grade 2	grade 2	grade 1	grade 3	grade 0
Grup V-3	grade 2	grade 2	grade 2	grade 2	grade 1
Grup V-4	grade 3	grade 3	grade 1	grade 2	grade 0
Grup V-5	grade 3	grade 3	grade 1	grade 3	grade 0
Grup V-6	grade 2	grade 2	grade 1	grade 1	grade 0
Grup V-7	grade 3	grade 3	grade 3	grade 3	grade 1

Kontrol grubuna (Grup 2) ait sıçanlardan elde edilen ovaryum örneklerinden alınan 4µm'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 bulunduğu 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 7). 2 saat torsiyon, 2 saat detorsiyon yapılan grup (Kontrol grubu) ve 2 saat torsiyon, 2 saat detorsiyon uygulamasından 30 dk önce serum fizyolojik verilen gruptan(Grup III) alınan sıçan ovaryum örneklerinde normal histolojik yapının bozulduğu, ödem, vasküler konjesyon, hemoraji ve PMNL infiltrasyonu gözlemlendi (Resim 8 ve Resim 9). 2 saat torsiyon, 2 saat detorsiyon uygulamasından 30 dakika önce 100 mg/kg silimarin

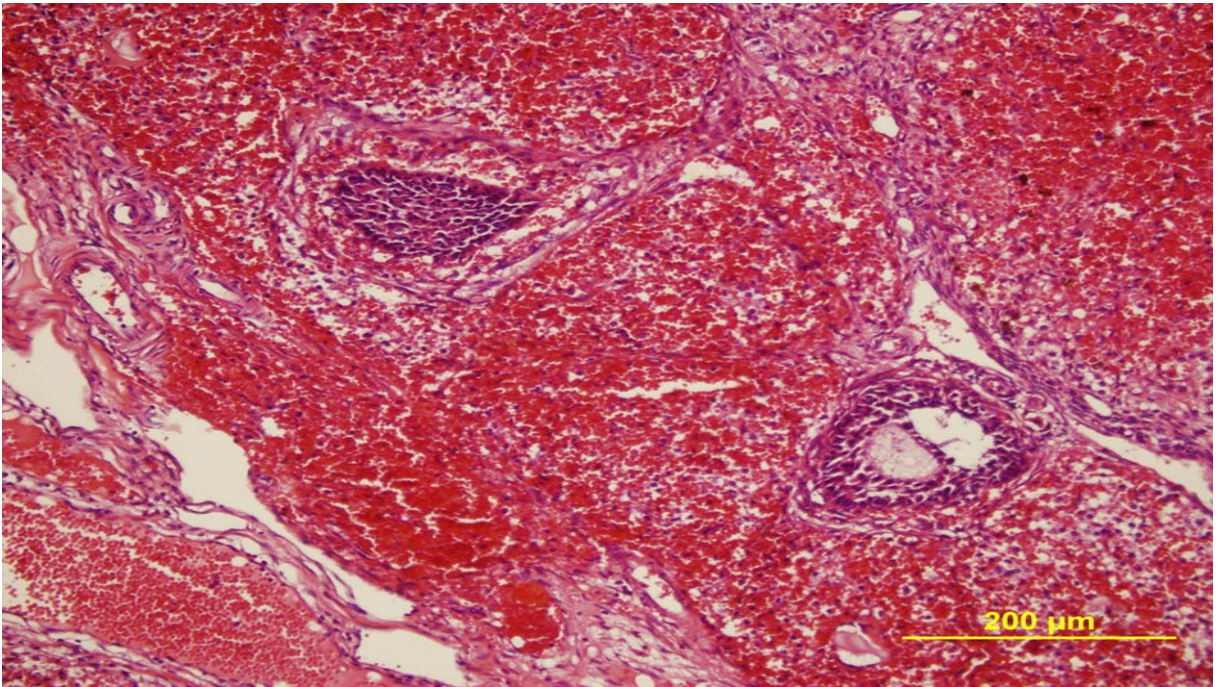
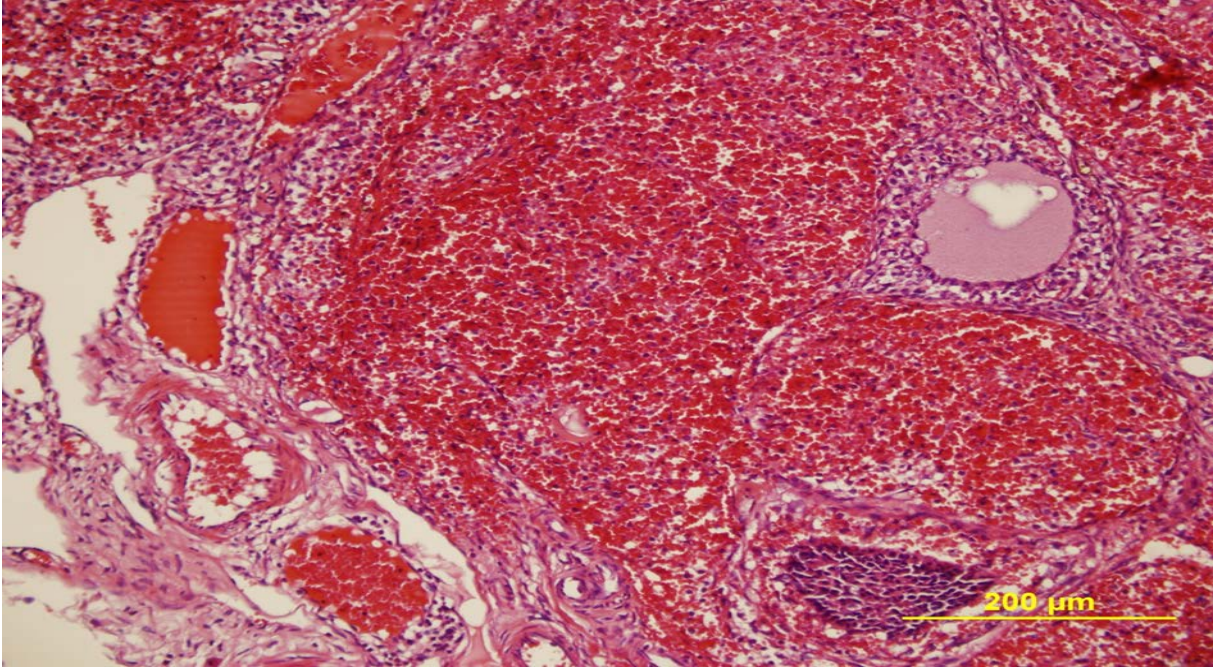
verilen gruptan (Grup IV) alınan sıçan ovaryum örneklerinde histolojik yapının Kontrol Grubu'na göre korunduğu, ödem, vasküler konjesyon ve PMNL infiltrasyonunun azaldığı gözlemlendi (Resim 10). 2 saat torsiyon, 2 saat detorsiyon uygulamasından 30 dakika önce 200 mg/kg silimari verilen gruptan (Grup V) alınan sıçan ovaryum örneklerinde histolojik yapının Kontrol grubu ve Grup III'e göre korunduğu, ödem, vasküler konjesyon ve PMNL infiltrasyonunun azaldığı, yeni gelişmekte olan folliküller olduğu gözlemlendi (Resim 11).



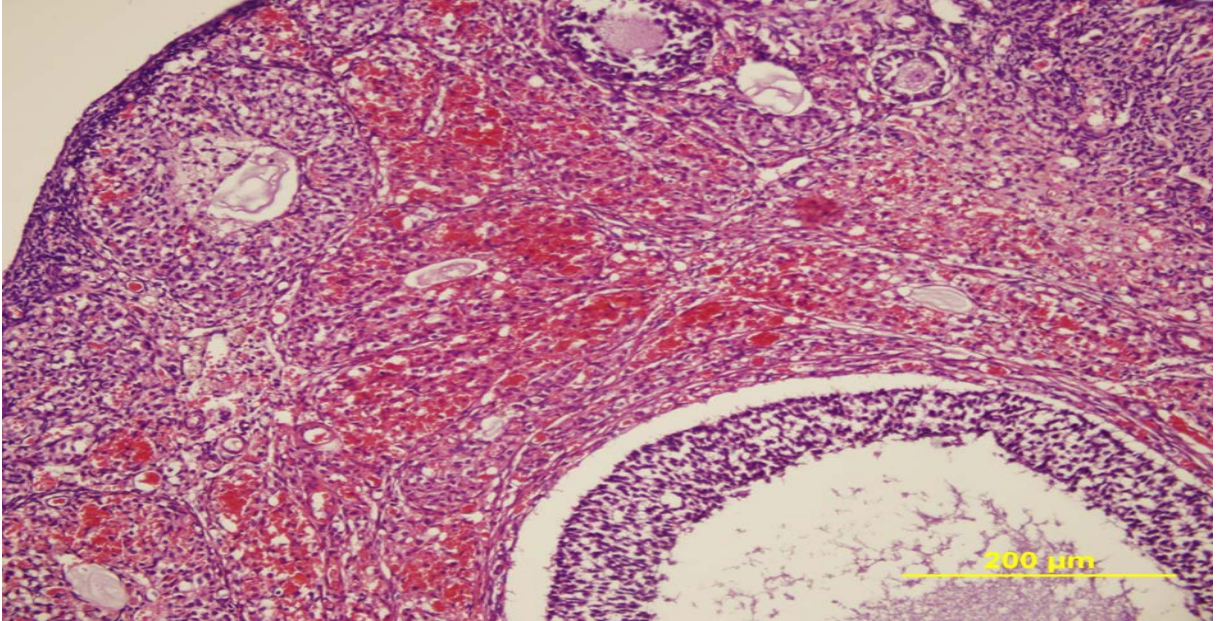
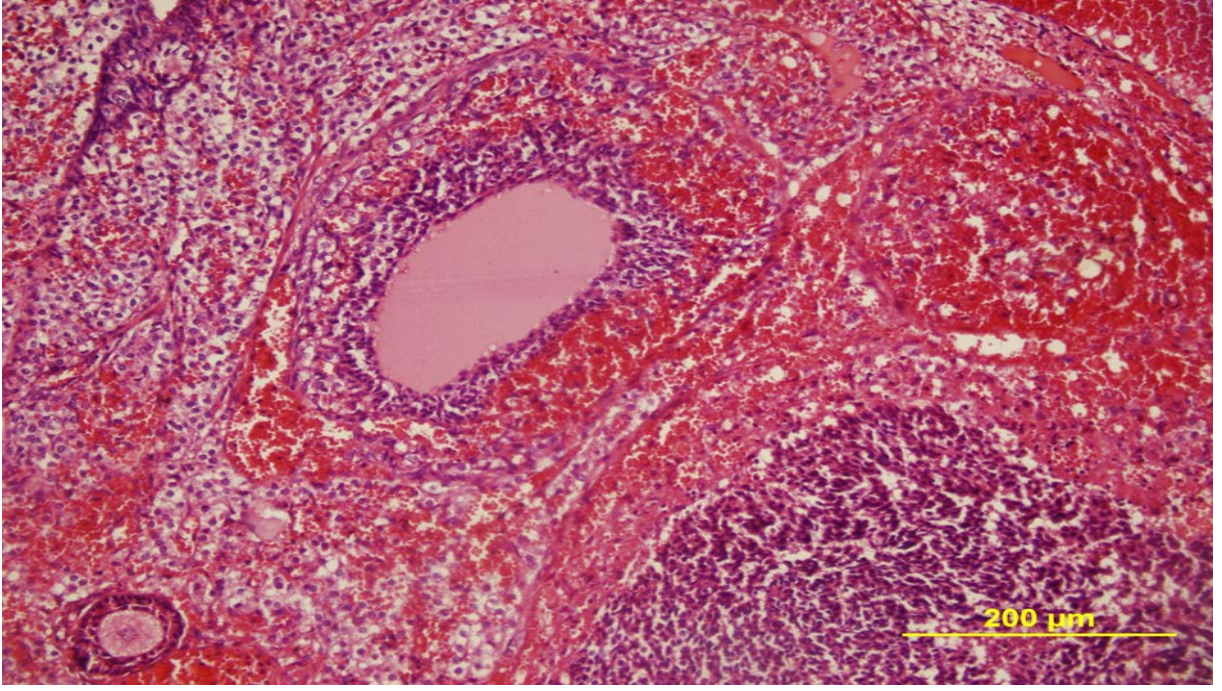
Resim 7. Sham grubundan alınan sıçan ovaryum örneklerinde normal histolojik yapı izlenmektedir.H&E.



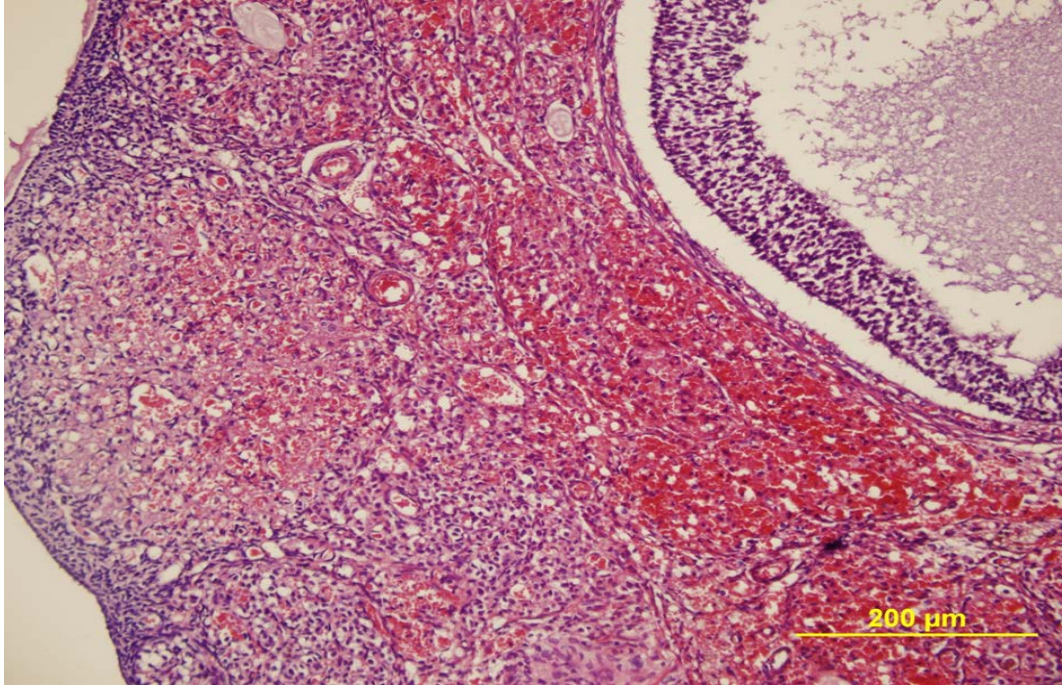
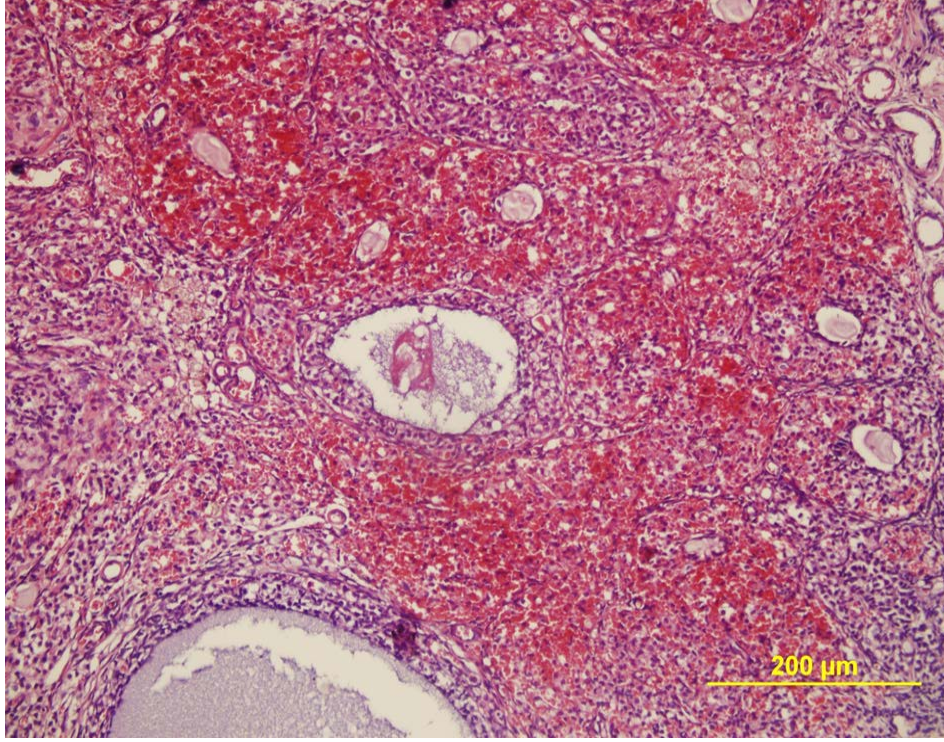
Resim 8. 2 saat torsiyon, 2 saat detorsiyon yapılan gruptan (Kontrol Grubu) alınan sıçan ovaryum örneklerinde normal histolojik yapının bozulduğu, şiddetli ödem, vasküler konjesyon, hemoraji ve PMNL infiltrasyonu izlenmektedir. H&E.



Resim 9. 2 saat torsiyon, 2 saat detorsiyon uygulamasından 30 dk önce intraperitoneal 2 cc SF verilen gruptan (Grup III) alınan sıçan ovaryum örneklerinde normal histolojik yapının bozulduğu, ödem, vasküler konjesyon, hemoraji ve PMNL infiltrasyonu izlenmektedir. H&E



Resim 10. 2 saat torsiyon, 2 saat detorsiyon uygulamasından 30 dakika önce 100mg/kg silimarin verilen gruptan (Grup IV) alınan sıçan ovaryum örneklerinde histolojik yapının Grup 2'ye göre korunduğu, ödem, vasküler konjesyon ve PMNL infiltrasyonunun azaldığı izlenmektedir.H&E



Resim 11. 2 saat torsiyon, 2 saat detorsiyon uygulamasından 30 dakika önce önce 200mg/kg silimarin verilen gruptan (Grup V) alınan sıçan ovaryum örneklerinde histolojik yapının Grup 2'ye göre korunduğu, ödem, vasküler konjesyon ve PMNL infiltrasyonunun azaldığı, yeni gelişmekte olan follüküller olduğu izlenmektedir. H&E

4.3. Gruplara ait Histokimyasal Bulguların İstatistiksel Değerlendirmeleri

Tablo 5: Histopatolojik hasarın gruplara göre dağılımı (mean, range)

	Sham	Kontrol	Grup 3	Grup 4	Grup 5	P değeri
konjesyon	0,14±0,37	3,00±0	3,14±0,37	2,57±0,53	2,14±0,69	0,001
hemoraji	0,14±0,37	3,42±0,53	3,42±0,53	3,00±0,57	2,57±0,53	0,001
Lök. İnf.	0,28±0,48	3,28±0,48	3,00±0,57	2,71±0,48	2,42±0,53	0,001
Fol. Dej.	0,0	0,28±0,48	0,28±0,48	0,14±0,37	0,000	0,351
İnt. ödem	0,28±0,48	3,42±0,53	3,28±0,48	2,71±0,48	2,28±0,75	0,001
Total skor	1,00±0,81	13,71±0,75	13,14±1,06	11,14±1,34	9,4±2,142	0,001

Histopatolojik olarak değerlendirildiğinde konjesyon hasar skoru en düşük sham grubunda(0,14±0,37), en yüksek ise T-DT-SF(Grup 3) grubunda(3,14±0,37) olduğu gözlemlendi(p<0,001).

Silimarin 200 grubunda verilen tedavinin T-DT ve T-DT-SF grupları ile kıyaslandığında konjesyon hasarını anlamlı ölçüde azalttığı tesbit edildi(2,14±0,69; 3,00±0,001; 3,14±0,14; p=0,015; p=0,003; sırasıyla).

Buna karşın silimarin 100 ile silimarin 200 verilen gruplar arasında konjesyon açısından anlamlı bir farklılık tesbit edilmedi(p=0,966).

Histopatolojik olarak değerlendirildiğinde hemoraji skoru en az sham grubunda(0,14±0,37), en yüksek T-DT(3,42±0,53) ve T-DT-SF (3,42±0,53) grubunda olduğu tesbit edildi.

Yine lökosit infiltrasyonu açısından bakıldığında silimarin verilen gruplar diğer gruplar ile kıyaslandığında lökosit infiltrasyonunu azalttıkları, buna karşın kendi aralarında karşılaştırıldıklarında birbirlerine üstünlük sağlamadıkları tesbit edildi.

Folikül dejenerasyonu açısından değerlendirildiklerinde gruplar arasında istatistiksel bir fark tesbit edilmedi(p=0,351).

Doku örnekleri ödem açısından değerlendirildiğinde en az hasar skorunun sham grubunda olduğu($0,28\pm 0,48$), buna karşın en yüksek hasarın T-DT grubunda olduğu görüldü($3,42\pm 0,53$).

Silimarin 200 grubu T-DT ve T-DT-SF grupları ile karşılaştırıldığında dokudaki ödem hasarını anlamlı ölçüde azalttığı tesbit edildi($2,28\pm 0,75$; $3,42\pm 0,53$; $3,28\pm 0,48$),($p=0,006$; $p=0,023$).

Total doku hasar skoru beklendiği gibi en düşük sham grubunda tesbit edildi($1,00\pm 0,81$),($p<0,001$). En yüksek total hasar skoru ise T-DT grubunda izlendi($13,71\pm 0,75$).

Silimarin 100 tedavisinin T-DT grubu ile kıyaslandığında total hasar skorunu anlamlı ölçüde azalttığı ($p<0,011$); silimarin 200 tedavisinin ise T-DT ve T-DT-SF grupları ile kıyaslandığında total hasar skorunu anlamlı ölçüde azalttığı görüldü($p<0,001$; $p<0,001$).Her iki silimarin dozu birbiri ile kıyaslandığında ise anlamlı bir farklılık tesbit edilmedi($p=0,220$).

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada iskemi ve reperfüzyon sonucu rat overlerinde oluşan histolojik değişiklikler üzerine bir antioksidan olan Silimarinin etkisi 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. Dokuya tekrar oksijen desteğinin sağlanmasıyla sisteme aniden aşırı miktarda giren oksijen, serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olmaktadır. Böylece doku hasarı daha da artmaktadır (5). Reperfüzyonla birlikte dokuya gelen lökositlerin serbest radikal oluşumuna neden olarak oksidatif hasarı arttırdığı bilinmektedir. Lökosit toplanmasının inhibe edildiği bir çalışmada hasarın azaltıldığı gösterilmiştir (5). İskemi reperfüzyon hasarını azaltmak ve önlemek için birçok farmakolojik ajanla değişik çalışmalar yapılmıştır (5, 4, 6, 7).

Gruplardan elde edilen veriler sonucuna göre; Sham grubunun, torsiyone olmuş gruplara göre morfolojik yapısı, histolojik grade'i, follikül sayıları korunmuş ve normal fizyolojik düzeyde olduğu izlenmiştir. Yine torsiyone gruplarından Kontrol grubu ile Grup IV ve Grup V; Grup III(T/DT-SF) ile Grup IV ve Grup V birbirleriyle istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Histolojik grade ve follikül sayıları karşılaştırıldıklarında Silimarin verilen gruplarda değişikliklerin olumlu yönde olduğu ve bunun da istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,001$).

Bitkisel kaynaklı flavanoidler antioksidan özellik taşıyan polifenolik bileşiklerdir (96). Silimarin, polifenolik bileşik tabiatında antioksidan özellik gösteren bir maddedir (92). Silimarin hücrede redükte glutatyon (GSH) seviyesinde artışa neden olur (93) ve anti-inflamatuvar (9) etkilidir.

Over iskemi-reperfüzyon hasarı modelimiz, silimarinin etkisine dair ilk deneysel çalışmadır. Turgut ve arkadaşları (97) silimarinin böbrekte iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada ratlara 7 gün boyunca günde bir kez 100 mg/kg oral silimarin verilmiş, her iki böbrekte 45 dakika iskemi oluşturulduktan sonra 24 saat reperfüzyon yapılmıştır. Biyokimyasal parametrelerden süperoksit dismutaz (SOD), malondialdehit (MDA) ve protein karbonil düzeyleri değerlendirilmiştir. Süperoksit

dismutaz değerlerinin silimarin verilen grupta iskemi yapılan gruba göre anlamlı oranda yükseldiği tespit edilmiştir, Malondialdehit ve protein karbonil değerlerinin anlamlı oranda düştüğü görülmüştür.

Bizim çalışmamızda oksidatif stres belirteci olan malondialdehit düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı. İskemi-reperfüzyon, serbest radikal artışı, çevresel toksinlere maruziyet, devam eden inflamasyon ve diğer doku injurisi yapan nedenler sonucunda da hücresel proteinleri koruyucu bir molekül olarak hsp70 ekspresyonu artmaktadır (98,99). Benzer şekilde over iskemi-reperfüzyon durumunda, silimarin verilen deneysel gruplarda (Grup IV ve Grup V) kontrol grubuna kıyasla artış tespit edildi. Bu artış en olasılıkla doku iskemi-reperfüzyon hasarı, inflamasyon ve doku tamiri (mitojenik aktivite artışı) nedeniyle olabilir. Bu durum over iskemi-reperfüzyon hasarında dokunun endojen antioksidan kapasitesinin yeterli olduğunu düşündürmektedir.

şentürk ve arkadaşları (9) böbreklerde iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine yaptıkları çalışmada, iskemi reperfüzyondan önce deneklere 50 ve 100 mg/kg 7 gün oral silimarin vermişlerdir. Kırk beş dakika iskemiden sonra 6 saat reperfüzyon yapılmıştır. Silimarin verilen deneklerin böbreğinde kontrol grubuna göre tübüler dilatasyon, tübüler vakuolizasyon, pelvik inflamasyon, interstisyel inflamasyon ve perirenal adipoz dokudaki infiltrasyonun önemli derecede az hasarlandığı gözlemlenmiştir. Sonuçların 50 mg/kg' a göre 100 mg/kg verilenlerde daha iyi olduğu rapor edilmiştir. Çalışmamızda, overdeki patolojik bulgulara bakıldığında, en iyi sonuçlar reperfüzyondan önce 200 mg/kg silimarin verdiğimiz grupta elde edildi. şentürk ve arkadaşları silimarinin anti-inflamatuvar etkisine işaret etmiş olup, çalışmamızın patolojik bulguları inflamasyon yönüyle yukarıdaki çalışmaya benzerdir. Over iskemi-reperfüzyon hasarında silimarinin anti-inflamatuvar etkisinin dominant olduğu söylenebilir.

Olivera ve arkadaşları (10) yaptıkları deneysel çalışmada verapamil ve silimarinin karaciğerde iskemi referfüzyon hasarı üzerine etkilerini araştırmışlardır. Karaciğere iskemi-reperfüzyon yapılmadan 45 dakika önce intra peritoneal 100 mg/kg silimarin verilmiş 40 dakika iskemi yapıp 20 dakika reperfüzyon sağlandıktan sonra AST/ ALT değerlerinin anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir.

Rao ve arkadaşları (12) ise albino ratlarda miyokardial iskemi-reperfüzyonda silimarinin etkisini araştırmışlardır. Yedi gün boyunca 100-250 ve 500 mg/kg oral yoldan silimarin verilmiş, sol anterolateral arter (LAD) 30 dakika oklüze edilmiştir. Dört saat

reperfüzyondan sonra malondialdehit (lipit peroksidasyon) değerleri ölçülmüş, doz artışıyla birlikte malondialdehit değerlerinin anlamlı oranda düştüğü görülmüştür. Bizim çalışmamızda malondialdehit değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ancak, Rao ve arkadaşlarının çalışması ile uygun olarak en yüksek değeri kontrol grubunda tesbit ettik. Aynı çalışmada süperoksit dismutaz değerlerinin ise doza bağlı orantılı olarak arttığı tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda süperoksit dismutaz değerleri kontrol grubunda en yüksekti. Sonrasında yüksekten en düşük değere doğru sırasıyla Grup III(salin verilen), Grup V(200 mg/kg silimarin verilen), Grup IV(100 mg/kg silimarin verilen) ve Sham grubu gelmekteydi.

Hou YC ve arkadaşları (11) sağ orta beyin arteri bağlanarak beyindeki infarkt üzerine silimarinin etkisini araştırmışlardır. Sağ orta serebral arter 1 saat bağlanarak kortikal infarkt oluşturmuşlardır. İskemiden 15 dakika önce ve 1 saat sonra olmak üzere 1-5-10 µgr/kg olarak 3 farklı dozda intravenöz silimarin verilmiş ve 24 saat sonra sonuçlar değerlendirilmiştir. Patolojik veriler ışığında, iskemiden 15 dakika önce verilen deneklerde dozla orantılı olarak infarktın daha az olduğu gözlemlenmiştir. iL-1 B ve TNF-a gibi proinflamatuvar sitokinler iskemik modellerde 24 saat sonra yüksek bulunurken iskemiden önce verilen modellerde dozla orantılı olarak düşük tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise TNF-a'nın en düşük değeri Sham grubunda tesbit edildi. Sonra 200mg/kg silimarin verdiğimiz grup V gelmekteydi. Kontrol grubunda ve Grup III'te ise en yüksek değerler bulundu. Grup III ile Grup V arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı.

Sonnenbichler ve arkadaşları (10) deney hayvanlarında parasetamol, cisplatin ve vincristin ile kimyasal hasar oluşturmuşlar, silimarin ve silistrinin böbrek üzerinde koruyucu etkisi olup olmadığını incelemişlerdir. Bu çalışmada hücrelerde, protein- DNA biyosentezinde ve laktat dehidrogenaz aktivitesinde artış görülmüş ayrıca oluşturulan kimyasal hasarın belirgin derecede azaldığı tesbit edilmiştir. Bizim çalışmamızda da patolojik incelemelerde dikkat çekici olarak iskemi-reperfüzyondan 30 dk önce 200mg/kg silimarin verdiğimiz Grup V de, alınan sıçan ovaryum örneklerinde histolojik yapının Kontrol Grubu'na göre korunduğu, ödem, vasküler konjesyon ve PMNL infiltrasyonunun azaldığı, yeni gelişmekte olan folliküller olduğu gözlemlendi. Aynı zamanda Hsp70 değeri en yüksek grup V'teydi. Hut ve arkadaşları (104) hücrede mitotik aktivite arttığında Hsp70 değerinde arttığını ve artan Hsp70 değerlerinin hücreyi bölünme anomalilerinden koruduğunu rapor etmişlerdir.

Ligeret ve arkadaşları (101) sıcak-soğuk karaciğer yaralanmalarında silibinin antioksidan ve mitokondriyal koruyucu etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada ratların

karaciğer dokusu üç gruba ayrılarak incelenmiştir. Birinci grup sadece Wiskonsin Üniversitesi solüsyonunda bekletilmiş, ikinci gruba solüsyon içine 100 mikrogram silibin ilave edilmiş, üçüncü gruba ise etanol ilave edilmiştir. Yirmidört saat +4 derecede beklenmiş ve 37 dereceye ısıtılmıştır. Kontrol grubuna göre soğuk saklama-sıcak reperfüzyon lipid peroksidasyonunu % 40, süperoksidasyon oluşumunu % 147 artırmıştır. Glutasyon oluşumunu % 25 azaltmıştır. Mitekondri içeriğini % 17 ye düşürmüştür. Silibinin soğuk koruma-sıcak reperfüzyonda karaciğeri koruduğu sonucuna varılmış ve organ nakli sürecinde kullanılabileceği yönünde önerileri olmuştur. Bizim çalışmamızda kontrol grubuyla diğer gruplar arasında malondialdehit değerleri açısından anlamlı bir fark tesbit edilmedi. Ancak fark istatistiki olarak anlamlı olmasada en yüksek malondialdehit değeri kontrol grubunda tesbit edildi.

Bu çalışmamızda silimarinin overlerde iskemi reperfüzyon hasan üzerine etkisini araştırdık. Sonuçlarımızı daha önce silimarin ile yapılmış iskemi-reperfüzyon hasarı çalışmalarıyla karşılaştırdığımızda TNF-a, HSP70 ve malondialdehit değerleri açısından literatürle uyumlu değerler bulundu. Süperoksidismutaz değerleri literatürde yüksek rapor edilirken bizim çalışmamızda, silimarin verilen gruplarda düşük çıkmıştır. Bu durum, silimarinin anti enflamatuvar etkiyle enflamasyonu baskılayıp, serbest oksijen radikallerinin oluşmasını azaltmasıyla olabilir. Az miktarda oluşan serbest oksijen radikalini nötralize etmek için oluşan süperoksit dismutaz miktarı da düşük olmalıdır kanısındayız. Patolojik veriler açısından başka organlar üzerine yapılmış çalışmalarla uyumlu olarak iskemi reperfüzyon hasarından korunma yönünde faydalı etkisinin olduğunu tesbit ettik.

Sonuç olarak bulgularımız silimarinin, ratların over iskemi-reperfüzyon hasarında, anti enflamatuvar ve kısmen antioksidan etkisinin olduğunu göstermektedir. Silimarinin, etkisinin doz orantılı olarak (100 mg/kg verilen gruba göre 200 mg/kg verilen grupta) daha iyi olduğu söylenebilir. Konunun daha ileri çalışmalarla araştırılması gerektiğini düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. Hibbard L. Adnexal torsion. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 152:456–61.
2. Meyer JS, Harman CM, Harty MP, Markowitz RI, Hubba AM, Bellah RD. Ovarian torsion: Clinical and imaging presentation in children. *J Pediatr Surg* 1995; 30: 1433–6.
3. Celik O, Turkoz Y, Hascalik S, Hascalik M, Cigremis Y, Mizrak B, Yologlu S. The protective effect of caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury in rat ovary *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2004; 117:183–8.
4. 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
5. 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
6. 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* 2010; (152) 186–190
7. Kır Şahin 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
8. Canbek M, Uyanoglu M, Bayramoglu G, Senturk H, Erkasap N, Koken T, Uslu S, Demirustu C, Aral E, Can H, Baser K. Effects of carvacrol on defects of ischemia – reperfusion in the rat liver. *Phytomedicine.* 2008; 15: 447-52.
9. Senturk H, Kabay S, Bayramoglu G, Ozden H, Yaylak F, Yucel M, Olgun EG, Kutlu A. Silymarin attenuates the renal ischemia/reperfusion injury –induced morphological changes in the rat kidney. *World J Urol.* 2008; 26: 401-8
10. Sonnenbichler J, Scalera F, Sonnenbichler I, Weyhenmeyer R. Stimulatory effects of silibinin and silicristin from the milk thistle *silybum marianum* on kidney cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999; 290:1375-83.

- 11.Hou YC, Liou KT, Chern CM, Wang YH, Liao JF, Chang S, Chou YH, Shen YC. Preventive effects of silymarin in cerebral ischemia –reperfusion induced brain injury in rats possibly through impairing NF-Kb and STAT-1activation Phytomedicine.2010;17:963-73.
- 12.Rao PR, Viswanath RK. Cardioprotective activity of silymarin in ischemia –reperfusion induced myocardial infarction in albino rat. Exp Clin Cardiol.2007;12:179-87
- 13.Demir M, Amanvermez R, Kamalı Polat A, Karabıçak İ, Çınar H, Kesicioğlu T, Polat C.The effects of silymarin on mesenteric ischemia-reperfusion injury.Med Princ Pract 2014;23:140-144.
14. Sadler TW, Langman’s Medikal Embriyolojisi (Çev.A.C Başaklar, K Sönmez) 7. Basım, Palme Yayıncılık İstanbul, 2007; 1-20
15. Karabulut o, Delilbaşı L, Oogenezis, Oosit Toplama Prosedürü, Oosit Morfolojisi in vitro Maturasyon, In: Delilbaşı L.(Ed). IVF laboratuvar Yöntemleri, 2007, 85-86
16. Eroschenko VP. Di Fiore Histoloji atlası; Fonksiyonel ilişkileriyle, 9. Baskıdan çeviri, (Çev. Ed. Prof. Dr. Ramazan Demir), 2001; 300-9
17. Gosden RG, Oogenesis as a foundation for embryogenesis, Mol Cell Endocrinol, 2002, 186; 149-53
18. Telfer E. Natural history of the mammalian oocyte. Reproductive BioMedicine Online. 2007; 15: 288-95.
19. Kierszenbaum A L (Ed): Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Follikül gelişimi ve Menstrual Döngü (siklus) (Çev. R. Demir), Palme Yayıncılık, Ankara, 2006; 566-72
20. http://science blogs.com/neurotopia/2010/02/basic_set_femalereproduction.php
21. Russel DL and Robker RL. Molecular mechanism of ovulation; coordination through the cumulus complex. Human Reproduction Update, 2007; 13(3); 289-312
22. <http://www.endotext.org/female/female/femaleframe1.htm>
23. De La Fuente R, Eppig JJ. Transcriptional activity of Mouse oocyte genom: companion granulosa cell modulate transcription and chromatin remodeling. Dev Biol, 2001;229; 224-36

24. Wu YL, Chuang H, Kou YR et al. Al. Regulation of LH Receptor and PGF2 α Receptor Signaling by the Regulator of G Protein Signaling 2 (RGS2) in Human and Mouse Granulosa Cells. *Chinese Journal of Physiology*, 2008; 51(5); 282-91
25. 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; 1236-44
26. 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; 7167-79.
27. MacLean JA, Wilkinson MF. The RhoX genes. *Ann NY Acad Sci*, 2010; 1120: 72-83.
28. Cha KY and Chian RC. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Hum Reprod. Update*, 1993; 4; 103-20
29. Sriraman V, Sharma SC and Richards Js Transactivation of progesterone receptor gene in granulosa cells: evidence that Pp1/Sp3 binding sites in the proximal promoter play a key role in LH inducibility. *Mol Endocrinol*, 2003; 17: 436-49
30. Russel DL, Doyle KMh and Gonzales RI et al. Egr-1 induction in rat granulosa cells by FSH and luteinizing hormone: combinatorial regulation by transcription factors cyclic adenosine 3,5-monophosphate regulatory binding protein, serum response factor, spl, and early growth response factor-1. *Mol Endocrinol*, 2003; 17: 520-33
31. Ohnishi J, Ohnishi E and Shibuya H, Takahashi. Functions for proteinases in the ovulatory process. *Biochim Biophys Acta, Protein Proteomics*, 2005; 10: 119-33
32. 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.
33. McGee E.A. , Hsueh A.J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000; 21(2): 200-14.
34. 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.

35. Allen E. The oestrous cycle in the Mouse. *Amer J Anat* 1922; 30: 297-371.
36. 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.
37. 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.
38. Snell GD. Reproduction. In: Snell GD(Ed). *Biology of Mouse*. Second edition. USA. Dover Publications; 1956: 55-89.
39. 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
40. 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.
41. 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.
42. Rao R.P, Kaliwal B.B. Monocrotophos induced dysfunction on estrous cycle and follicular development in mice. *Ind Health* 2002; 40:237-44.
43. 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.
44. Bayer AI, Wiskind AK. Adnexal Torsion: can the adnexa be saved? *Am J Obstet Gynecol* 1994;171(6):1506-10.
45. Nissen ED, Kent DR, Nissen SE, Feldman BM. Unilateral tuboovarian auto amputation. *J Reprod Med* 1977;19(3):151-3.
46. Cass DL. Ovarian torsion. *Semin Pediatr Surg* 2005;14(2):86-92.
47. 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):1026-7.

48. Comerci 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.
49. 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.
50. Breech LL, Hillard PJ. Adnexal torsion in pediatric and adolescent girls. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005;17(5):483-9
51. 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.
52. Houry D, Abbott JT. Ovarian Torsion: a fifteen year review. *Ann Emerg Med* 2001;38(2):156-9.
53. 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.
54. Albayram F, Hamper UM. Ovarian and adnexal torsion: spectrum of sonographic findings with pathologic correlation. *J Ultrasound Med* 2001;20(10):1083-9.
55. Zweizig S, Perron J, Grubb D, Mishell DR Jr. Conservative management of adnexal torsion. *Am J Obstet Gynaecol* 1993;168(6):1791-5.
56. Köse F, Turan T. [Pelvic masses and adnexal torsion]. *Turkiye Klinikleri J Surg Med Sci* 2006;2(24):78-82.
57. Oelsner G, Shashar D. Adnexal torsion. *Clin Obstet Gynecol* 2006;49(3):459-63.
58. Aydemir, O, ve Çelebi, S., 2002. Deneysel retinal iskemi ve reperfüzyon oluşturulan kobaylarda vitamin E türevlerinin glutasyon düzeyine etkisi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 16(3-4): 257-61.
59. Ishihara, M., and Nacano, T., Postischemic reperfusion in the eye of young and aged rats. *Jpn J Physiol*, 2000: 50; 125-32.

60. Osborne, N.N., Casson, R.J., Wood, J.P.M., Chidlow, G., Graham, M, and Melena, J, Retinal ischemia: mechanism of damage and potential therapeutic strategies. Prog. in Retinal and Eye Research 2004: 23: 91-147.
61. Barry, M.C, and Grace, P.A., Ischemia-reperfusion injury. Surgery, 1997: 11: 68-72.
62. Kumar V, Cotran R., Robbins .L. Basic Pathology. 6th edition. 2000:6-10, 30-36
63. Çelebi S., Dilsiz, N., Yılmaz T., ve Kukner, A.S., Effects of melatonin, vitamin E and octreotide on lipid peroxidation during ischemia- reperfusion in the guinea pig. Eur J, 2002: 12(2): 77-83.
64. Baykal, Y, ve Kocabalkan F., Serbest radikaller ve hücre hasarı yapma mekanizmaları. Sendrom, 2000: 31-38.
65. Poli, G, Albano E, and Dianzani M.U, Free Radicals: From Basic Science to Medicine. Birkhauser, Basel (Switzerland), 1993: 47.
66. Otamiri T. Oxygen radicals, lipid peroxidasyon, and neutrophil infiltration after small intestinal ischemia and reperfusion. Surgery 1989:105:593-7,
67. Musemeche CA, Henning SJ, Baker L. İnflammatory enzyme composition of the neonatal rat intestine: İmplications for susceptibility to ischemia. J PedSurg 28: 778- 91
68. Koltuksuz U., Özen S., Uz E., Aydinç M., Karaman A., Gültek A., Akyol Ö., Gürsoy MH., Aydın E. CAPE prevents reperfusion injury in rats. J Ped Surg. 1999: 34(10) 1458- 62,
69. Schoenberg MH. Reperfusion injury after intestinal ischemia. Crit Care Med 1993: 21: 1376- 86.
70. Van Ye TM., Roza AM., Pieper GM. İnhibition of intestinal lipid peroxidation does not minimize morphologic damage. J Surg Res. 1993: 55: 553-8.
71. Kayalı R., Çakatay U. Basic mechanisms of protein oxidation. Cerrahpaşa J med 2004: 35: 83-9,
72. Lefler AM., Lefler DJ. Pharmacology of the endothelium in ischemia reperfusion and circulatory shock. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1993; 33: 71-90

73. Moncado S., Vane JR., Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood vessel walls. *N Engl J Med* 1979; 300: 1142-7
74. Murad F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J Clin Invest* 1986; 78,1-5.
75. Palmer RMJ., Ferrige AG., Moncado S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-6
76. Halliwell B, Oksidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *eFree Radical Res.* 1996: 25:57-74.
77. Tamer L, Polat G, Eskanderi G., Ercen B., ve Atik U, Serbest radikaller. *Mersin Üniversitesi Tıp Fak. Dergisi*, 2000: 1: 52-58.
78. Bruckdorfer K.R, Lipids and Cancer. *Procx. Roy. Soc. Med.* 1987: 80: 713-4.
79. Uysal M., Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidan antioksidan dengeneyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim*, 1998: 11: 336-41.
80. Halliwell B, Reactive Oxygen Species in Living System: Source, Biochemistry and Role in Human Disease. *The Am. J. Med.* 1991: 91: 145-215.
81. Erden M. Serbest Radikaller. *T.Klin. Tıp Bilimleri Dergisi.* 1992: 12: 201-7,
82. Beckman JS., Chen J., Ischiropoulos H., Crow JP. Oxidative chemistry of peroxynitrite *Meth Enzymol* 1994: 233:229-40,.
83. Carden D.L., Granger D.N. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000: 190:255-66,
84. Collard C.D, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations and preventations of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 2001: 94: 1133-8,
85. Cantürk N.Z., Sayek İ. Cerrahi araştırma kitabı. Nobel tıp kitabevleri 2005.
86. Ohno H, Matsuura N, Ishikawa M. Serum Mn-SOD in patients with Diabetes Mellitus/Thyroid Dysfunction Judged by an ELISA. *Horm. Metab.Res.* 1991: 23: 449-51,
87. Sugawara M., Kita T. Deficiency of Superoxide Dismutase endemic goiter Tissue. *J Clin Endoc and Metabol.* 1988: 67(6): 1156-61,

88. Wheeler CR., Salzman JA. Automated Assay for Superoxide Dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase and Glutathione Reductase Activity. *Anal Biochem.* 1990; 184:193-9,
89. Fernandez V., Simitzu K. Effects of hyperthyroidism on rat liver Glutathione Metabolism. 1991; 129(1):85-91,
90. Ding T, Tian S, Zhang Z, Gu D, Chen Y, Shi Y, and Sun Z, Determination of active component in silymarin by RP-LC and LC/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001; 26:155-61.
91. Nencini C, Giorgi G, and Michelli L. Protective effect of silymarin on oxidative stress in rat brain. *Phytomedicine.* 2007; 14:129-35.
92. De Groot H, Rauen U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effect of antioxidants. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 1998; 12:249-55.
93. Valenzuela A, Aspillaga M, Vial S, Guerra R. Selectivity of silymarin on the increase of the glutathione content in different tissues of the rat. *Planta Med.* 1989; 55: 420-2.
94. Zhao J, Lahiri-Chatterjee M, Sharma Y, Agarwal R. Inhibitory effect of an antioxidant silymarin on benzoyl peroxide-induced tumor promotion, oxidative stress and inflammatory responses in Sencar Mouse skin. *Carcinogenesis.* 2000; 21: 811-6.
95. Bosisio E, Benelli C, Pirola O. Effect of antioxidants of *Silybum marianum* L. on lipid peroxidation in rat liver microsomes and freshly isolated hepatocytes. *Pharmacol. Res.* 1992; 25: 147-54.
96. Dac Silva L, Piskula M, Terao J. Enhancement of antioxidative ability of rat plasma by oral administration of epicatechin. *Free Radical Biology & Medicine.* 1998; 24:1209-16.
97. Turgut F, Bayrak O, Catal F, Bayrak R, Atmaca A, Koc A, Akbas A, Akcay A, Unal D. Antioxidant and protective effects of silymarin on ischemia and reperfusion injury in the kidney tissue of rats. *Int. Urol. Nephrol.* 2008; 40: 453-60.
98. Hut HM, Kampinga HH, Sibon OC. Hsp70 protects mitotic cells against heat-induced centrosome damage and division abnormalities. *Mol Biol Cell.* 2005; 16:3776-85.
99. De Maio A. Heat shock proteins: Facts, thoughts, and dreams. *Shock* 1999; 11:1-12.

100. Oliveira CP, Lopasso FP, Laurindo FR, Leitao RM, Laudanna AA. Protection against liver ischemia-reperfusion injury in rats by silimarin or verapamil. *Transplant Proc.*2001;33:3010-4.

101. Ligeret H, Brault A, Vallerand D, Haddad Y, Haddad PS. Antioxidant and mitochondrial protective effects of silibinin in cold preservation-warm reperfusion liver injury. *J Ethnopharmacol.*2008;115:507-14.