

**T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TAVŞANLARDA OVARYUM TORSİYON/DETORSİYON MODELİNDE
KAFEİK ASİT FENETİL ESTER'İN (CAPE) KORUYUCU ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

**Orhan DOĞAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Danışman
Yard. Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ**

**MAYIS-2009
KARS**

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Orhan DOĞAN'ın Yard.Doç.Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ'in danışmanlığında yüksek lisans tezi olarak hazırladığı “**Tavşanlarda Ovaryum Torsiyon/Detorsiyon Modelinde Kafeik Asit Fenetil Ester'in (CAPE) Koruyucu Rolünün Araştırılması**” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy ile kabul edilmiştir.

...../...../2009

Adı Soyadı

İmza

Başkan :

.....

Üye :

.....

Üye :

.....

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/...../2009 tarih ve/..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Abdullah DOĞAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu araştırma Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır. Çalışmada Tavşanlarda Ovaryum Torsiyon/Detorsiyon Modelinde Kafeik Asit Fenetil Ester'in (CAPE) koruyucu rolü araştırılmıştır.

Tez çalışmam boyunca bana her türlü desteği sağlayan, çalışmamın her aşamasında yakın ilgisini esirgemeyen, bilgi ve önerileri ile beni her konuda yönlendiren danışman hocam, Sayın Yard. Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ'e, çalışmalarım esnasında ve tezin hazırlanması sürecinde yine katkılarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Müslüm AKGÖZ'e ve Sayın Yard. Doç. Dr. Asım KART'a, Doç. Dr. Sabri ULUKANLI'ya, Yard. Doç. Dr. Musa KARAMAN'a ve Yard. Doç. Dr. Hasan ÖZEN'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Kars-2009

Orhan DOĞAN

İÇİNDEKİLER	<u>Sayfa No</u>
İÇİNDEKİLER	I
ÖZET	III
ABSTRACT	V
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	VII
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	VIII
RESİMLERİN LİSTESİ	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	X
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. Ovaryum Torsiyon ve Detorsiyonu	4
2.2. Serbest Radikaller ve Antioksidan Sistem	5
2.3. İskemi-Reperfüzyon'un Biyokimyası	8
2.4. CAPE	11
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	13
3.1. Gereç	13
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	13
3.1.2. Kullanılan Alet ve Gereçler	13
3.1.3. Tavşanların Temini ve Bakımı	14
3.2. Yöntemler	14
3.2.1. Torsiyon/Detorsiyon Modelinin Yapılması	14
3.2.2. Deneyde Kullanılan CAPE'nin Hazırlanışı	14
3.2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması	15
3.2.4. Doku Biyokimyasal Analizleri	17
3.2.4.1. GSH analizi	17
3.2.4.2. MDA analizi	17

3.2.4.3. GSH-Px analizi	18
3.2.4.4. CAT analizi	19
3.2.4.5. Protein tayini	20
3.2.5. Histopatolojik İncelemeler	20
3.2.6. İstatistiki Analiz	21
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	22
4.1. Biyokimyasal Bulgular	22
4.2. Histopatolojik Bulgular	27
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	31
6. KAYNAKLAR	38
7. ÖZGEÇMİŞ	47

ÖZET

TAVŞANLARDA OVARYUM TORSİYON/DETORSİYON MODELİNDE KAFEİK ASİT FENETİL ESTER'İN (CAPE) KORUYUCU ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Bu Yüksek Lisans Tezinde; kafeik asit fenetil ester'in (CAPE) ovaryum torsiyon/detorsiyon hasarında muhtemel koruyucu rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Adneksal torsiyon tubal ve ovaryum damarlarının saat yönünde 360 derece döndürülerek clip turcica ile 3 saat boyunca bağlanmasıyla yapıldı. Detorsiyon ise adneksanın tekrar açılarak kan dolaşımının 3 saat boyunca sağlanmasıyla başarıldı. Yeni Zelanda ırkı dişi tavşanlar, her bir grupta 6 tavşan olmak üzere; sadece laparotomi yapılan taklit grubu (S); 8,5 mg/kg dozunda karın içi yolla tek doz olarak %1'lik etanolde çözölen CAPE uygulanan grup (CAPE); Torsiyondan 1 saat önce 8,5 mg/kg doz CAPE'nin karın içi yolla verildiği ve daha sonra torsiyon/detorsiyon yapılan grup (C+I/R) ve CAPE'nin hazırlandığı taşıt madde uygulama grubu (E+I/R) olmak üzere 4 gruba ayrıldılar. Uygulamadan sonra hayvanlardan ovaryum dokuları alındı. Deney sonunda hayvanlardan alınan ovaryum dokularından katalaz (CAT), glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktiviteleri ve glutasyon (GSH), malondialdehit (MDA) seviyeleri spektrofotometreyle analiz edildi. Ayrıca dokudan histopatolojik incelemelerde yapıldı. Dokulardan yapılan biyokimyasal ve histopatolojik incelemelerin neticesinde, S grubuyla karşılaştırıldığında, E+I/R grubunda, ovaryum GSH seviyesinin anlamlı olarak düştüğü gözlemlendi ($P<0,05$). Torsiyon öncesi CAPE uygulamasının, torsiyon/detorsiyon sonrası azalan doku GSH seviyesini anlamlı olarak yükselttiği bulundu ($P<0,05$). E+I/R grubunda CAT aktivitesi ve MDA seviyesi, S grubuna göre anlamlı bir yükseliş gösterdi ($P<0,05$). CAPE uygulamasının, torsiyon/detorsiyonla yükselen CAT aktivitesi ve MDA seviyesini düşürdüğü tespit edildi ($P<0,05$). E+I/R grubunda ovaryum GSH-Px aktivitesi, S grubuna göre anlamlı bir düşüş gösterdi ($P<0,05$) Torsiyon/detorsiyon öncesi CAPE uygulaması yapılan grupta, GSH-Px aktivitesinin torsiyon/detorsiyon

grubuna göre anlamlı olarak yükseldiği bulundu ($P<0,05$). Yapılan patolojik incelemelerde torsiyon/detorsiyon grubunda Şiddetli konjesyon, kanama, ödem ve lökosit infiltrasyonu gözlemlendi ve CAPE verilmesinin bütün uygulama gruplarında bu hasarları iyileŐtirici yönde etki yaptığı tespit edildi. CAPE'nin, ovaryum dokusunda torsiyon/detorsiyon sonucu oluşan serbest radikal kaynaklı hasara karşı antioksidan aktivite göstererek koruyucu bir etki gösterdiği tespit edildi.

Anahtar kelimeler; Ovaryum torsiyon/detorsiyonu, CAPE, serbest radikal, GSH, MDA, CAT, GSH-Px

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE ROLE OF CAFFEIC ACID PHENYL ETHYL ESTER (CAPE) ON OVARY ISCHEMIA/REPERFUSION INSURY IN RABBITS

The aim of this master thesis is to investigate possible protective effects of caffeic acid phenyl ethyl ester (CAPE) on ovary torsion/detorsion injury. Adnexal torsion was created by rotating tubal and ovarian vessels in a 360° clockwise direction for 3 hours via clip turcica while detorsion was carried out by untwisting the adnexa. Following detortion, blood supply was allowed for 3 hours. 24 Female New Zealand rabbits were allocated to following study groups each containing 6 rabbits: Sham group was subjected to laparatomy only (S). In group CAPE (8.5 mg/kg) was administered 1 hour before torsion via intraperitoneal route (CAPE) in 1% ethanol; In group C+IR, CAPE (8.5 mg/kg) was given 1 hour before adnexal torsion/detorsion and then tortion/detortion was performed. Last group were introperitonealy injected with the vehicle 1 hour before torsion/dtorsion was performed. At the end of the treatments, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) activities and malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) levels from the tissue samples were analyzed using a spectrophotometer. In addition, histopathological examinations were performed from the tissue samples. Ovarian GSH levels in torsion/detorsion groups were found to be significantly decreased compared to that of control ($P<0.05$). Treatment of CAPE applied 1 hour before torsion and detorsion significantly increased the tissue GSH level ($P<0.05$). CAT activity and MDA level in torsion/detorsion group were found to be significantly elevated compared to those of control ($P<0.05$). GSH-Px activity in torsion/detorsion group was lower than in control group ($P<0.05$). CAPE treatment applied before torsion/detorsion significantly increased GSH-Px activity compared to that of torsion/detorsion group ($P<0.05$). In histopathological examinations, severe congestion, hemorrhage, edema and

leukocyte infiltration were observed in torsion/detorsion group, while CAPE treatments alleviated IR induced the injury in the treatment groups.

In conclusion, CAPE could protective effects against ovarian torsion/detorsion induced free radical injury by showing antioxidant activity.

Keywords: Ovarium torsion/detorsion, CAPE, free radical, antioxidant capacity, GSH, MDA, CAT, GSH-Px

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. GSH Analizi	17
Çizelge 3.2. MDA Analizi	18
Çizelge 3.3. GSH-Px Analizi	19
Çizelge 3.4. CAT Analizi	19
Çizelge 3.5. Ovaryum Hasarının Histopatolojik Derecelendirme Kriterleri	21
Çizelge 4.1. Torsiyon/detorsiyondan 1 saat önce CAPE (8,5 mg/kg v.a) Uygulamasının Ovaryum Dokusu İndirgenmiş Glutasyon (GSH) Seviyesine Etkisi.	23
Çizelge 4.2. Torsiyon/detorsiyondan 1 saat önce CAPE (8,5 mg/kg v.a) Uygulamasının Ovaryum Dokusu Malondialdehit (MDA) Seviyesine Etkisi.	24
Çizelge 4.3. Torsiyon/detorsiyondan 1 saat önce CAPE (8,5 mg/kg v.a) Uygulamasının Ovaryum Dokusu Katalaz (CAT) seviyesine etkisi.	25
Çizelge 4.4. Torsiyon/detorsiyondan 1 saat önce CAPE (8,5 mg/kg v.a) Uygulamasının Ovaryum Dokusu Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Seviyesin Etkisi	26
Çizelge 4.5. Ovaryumlarda Uygulama Sonrası Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları	27

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Dişi üreme sisteminin genel görünüşü	4
Şekil 2.2. Serbest radikal kaynaklı hasar ve oluşan ürünler	6
Şekil 2.3. Hücrede oksidatif ve antioksidan sistemin basit bir şeması	7
Şekil 2.4. CAPE'nin kimyasal yapısı	12
Şekil 4.1. Torsiyon/detorsiyondan 1 saat önce CAPE (8,5 mg/kg v.a) uygulamasının ovaryum dokusu indirgenmiş glutatyon (GSH) seviyesine etkisi.	23
Şekil 4.2. Torsiyon/detorsiyondan 1 saat önce CAPE (8,5 mg/kg v.a) uygulamasının ovaryum dokusu Malondialdehit (MDA) seviyesine etkisi.	24
Şekil 4.3. Torsiyon/detorsiyondan 1 saat önce CAPE (8,5 mg/kg v.a) uygulamasının ovaryum dokusu Katalaz (CAT) seviyesine etkisi.	25
Şekil 4.4. Torsiyon/detorsiyondan 1 saat önce CAPE (8,5 mg/kg v.a) uygulamasının ovaryum dokusu glutatyon peroksidaz (GSH-Px) seviyesine etkisi	26

RESİMLERİN LİSTESİ

Sayfa No

Resim 3.1. Taklit grubu	16
Resim 3.2. Torsiyon oluşturulması	16
Resim 3.3. İskemik over	16
Resim 3.4. İskemi sonrası reperfüzyona maruz kalan over	16
Resim 4.1. Taklit grubundaki bir tavşanın normal ovaryum morfolojisi	28
Resim 4.2. Etanol + Torsiyon/Detorsiyon uygulanan bir tavşanın ovaryumunda şiddetli konjesyon kanama ile ödem ve lökosit infiltrasyonu	29
Resim 4.3. Torsiyondan 1 saat önce CAPE uygulaması yapılan ve daha sonra torsiyon/detorsiyon yapılan bir tavşan ovaryumunda hafif derecede konjesyon ve ödem	30

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ROT	:	Reaktif Oksijen Türleri
GSH	:	İndirgenmiş Glutatyon
O₂⁻	:	Süperoksit Anyonu
OH[·]	:	Hidroksil Radikali
¹O₂	:	Singlet (Tekil) Oksijen
NO[·]	:	Nitrik Oksit
iNOS	:	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
SOD	:	Süperoksit Dismutaz
CAT	:	Katalaz
GSH-Px	:	Glutatyon Peroksidaz
GR	:	Glutatyon Redüktaz
H₂O₂	:	Hidrojen Peroksit
TBARM	:	Tiyobarbutirik Asit Reaktif Maddeleri
MDA	:	Malondialdehit
TCA	:	Triklor Asetik Asit
CAPE	:	Kafeik Asit Fenil Etil Ester
SPSS	:	Sosyal Bilimler için istatistik paketi
g.y.d.	:	gram yaş doku
µmol	:	mikromol
nmol	:	nanomol
v.a.	:	vücut ağırlığı
H&E	:	Hematoksilen-Eozin
XO	:	Ksantin Oksidaz

1. GİRİŞ

Dokulara kan sağlayan damarların, bir pıhtı veya mekanik etkenle tıkanması sonucu dokunun beslenmesinin bozulmasına ve oksijensiz kalmasına iskemi ve devamında bu olayın düzenlenmesinde tekrar dokunun oksijenlenmesi ve beslenmesinin düzeltilmesi durumuna ise reperfüzyon denilmektedir. Tıbbın pek çok dalında iskemi ve reperfüzyonun yer aldığı olgular karşımıza çıkabilmektedir. Yanık, sepsis, şok gibi durumlarda ortaya iskemik hasar ve bu durumların geriye döndürülmesinde ise reperfüzyon hasarı oluşabilmektedir. Ovaryum torsiyonu (veya adneksal torsiyon) nadir bir durum olup Amerika'da insanlarda % 2,7 görülme sıklığı ile beşinci sırada yer alan jinekolojik acil bir durumdur. Üretken çağda olan kadınlarda yüksek sıklıkla görülebilmektedir. Spesifik bir belirti ve işaret içermemesi nedeniyle adneksal torsiyonun tedavisi gecikebilmektedir [1]. Adneksal torsiyon oksijenin azalmasına neden olarak dokuda laktik asit ve hipoksantin ile lipid peroksidlerin artışına neden olarak iskemik hasara neden olabilir. Koruyucu uygulama olarak ovaryumda birbirine dolanmış segmentlerin detorsiyon yapılması uygulaması vardır ki bu da reperfüzyon benzeridir. Hipoksik dokunun oksijenlenmesi çok daha ciddi doku hasarına yol açar. Detorsiyon, hasarın ileri derecede artmasına sebep olan diğer bir işlemdir. İskemik dokuda kan akımının tekrar düzenlenmesi reperfüzyon süresince ksantin oksidaz (XO) enzimiyle hipoksantinin ürik aside dönüştürülmesine yol açar ki bu esnada oldukça fazla oksijen radikali oluşur. Bu radikaller protein, nükleik asit ve lipitlerle etkileşirler; lipid peroksidasyonuna ve diğer makromoleküllerde oksidan hasarlara neden olurlar, bu duruma da reperfüzyon hasarı denir. Dokuda meydana gelen hasar, iskemi ve reperfüzyon sonucu meydana gelen hasarların toplamıdır [2,3].

Serbest radikallerin zarar verici etkileri birçok hastalığın nedeni olarak gösterilmektedir. Kardiyovasküler, akciğer ve karaciğer rahatsızlıkları ile kanser ve yaşlanma, dokularda oluşan lipit peroksit ürünlerinin büyüklüğü ile doğru orantılıdır. Lipitler serbest radikal hasarına karşı en hassas yapılardır. Serbest radikaller, yağ asitlerindeki doymamış bağlarla kolayca reaksiyona girerek lipitlerin peroksidasyonuna neden olurlar. Çoklu

doymamış yağ asitlerinin oksidatif hasarı kendi kendini devam ettiren zincirleme bir reaksiyon olup, geri dönüşümsüz membran hasarlarına neden olmaktadır [4]. İskemi ve reperfüzyon beyin, kalp, kas gibi dokularda reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumuna yol açar [5]. ROT ve onların ürünleri hücre membranlarında hasara neden olmaktadır [6]. Süperoksit radikali, hidroksil radikali gibi ROT, iskemi/reperfüzyon boyunca doku hasarının patogenezinde işe karışmaktadır [7].

Birçok biyomolekül ile reaksiyona girerek, fizyolojik dengeye hasar veren ve patolojik durumların oluşmasına yol açan serbest radikallere karşı, vücutta birçok savunma mekanizması vardır. Sağlığı sürdürmede canlı organizmaların yapısında bulunan enzim yapıda veya enzimatik olmayan savunma bileşiklerine antioksidanlar denilir. Antioksidanlar özellikle, oksidasyon sonucu oluşan serbest oksijen radikalleri adı verilen bileşiklerin zararlı etkilerine karşı hücrelerin hasarlanmasını önleyen moleküllerdir. Antioksidan savunma sistemi; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimleri ve glutatyon (GSH), vitamin A, C ve E gibi enzim olmayan antioksidanları içine alır. Dokularda antioksidan sistemlerce kaldırılamayacak kadar aşırı serbest radikal üretiminin olduğu her patolojik durumda, oksidatif stres meydana gelmektedir [8].

Serbest radikalleri içine alan araştırmalar kardiyovasküler, kanser, nörodejeneratif hastalıklar gibi hastalıkların önlenmesinde, antioksidanlarca zengin olan besinlerin önemli rol oynadığını göstermiştir [9]. Bu açıdan bakıldığında hasarın yan etkilerinin ortadan kaldırılması için güçlü radikal süpürücü antioksidan özelliğine sahip maddeler önem kazanmaktadır. Ovaryum torsiyon ve detorsiyonunda, reperfüzyonla oluşabilecek hasarın önlenmesinde melatonin, kafeik asit fenil etil ester (CAPE), C vitamini gibi antioksidan özelliği olan maddelerle deneysel araştırmalar yapılarak hasarın önüne geçilmeye çalışılmıştır [10-12].

CAPE, arı kovanlarında propolis içerisinde bol miktarda bulunan bir flavonoiddir. CAPE'nin anti-inflamatuvar, anti-karsinojenik ve antioksidan özellikleri olduğu tespit

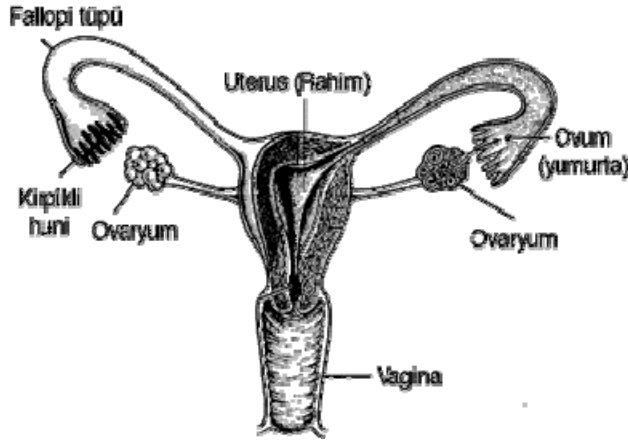
edilmiş ve birçok dokuda oluşabilen hasarlara karşı koruyucu rolü bulunduğu bildirilmiştir [13,14]

Bu tezde, iskemi/reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisi birçok araştırmada test edilip gösterilen ve antioksidan özelliği literatürde bildirilen CAPE'nin ovaryum torsiyon/detorsiyon öncesi verilmesiyle oluşacak muhtemel koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Ovaryum Torsiyon ve Detorsiyonu

Overler hafifce yassılaşımiş, yüzeyi girintili çıkıntılı oval şekle sahip organlardır. Graf folikülleri oositleri içerirler, bunlar olgunlaşmayla yeteri derecede büyürler ve yüzeyden görünür şekilde çıkıntı oluştururlar (Şekil 2.1). Tamamen olgunlaşınca, ovum serbestleşir ve folikül korpus luteuma dönüşür. Overlerin temel fonksiyonları hormon üretimi ve gebelik oluşması için ovumun gelişmesini sağlamaktır. Bu fonksiyonlar birçok faktör tarafından kesintiye uğrayabilir. Torsiyon oluşabilir ve vasküler yetmezlikle nekroza neden olabilir.



Şekil 2.1. İnsan dişi üreme sisteminin genel görünüşü [15].

Adneksal torsiyon iskeminin sebebidir ve cerrahi yöntemle düzeltilmesi gerekir. İskeminin tedavisinde ana hedef dokunun kan dolaşımını tekrar sağlamakla birlikte, aynı zamanda dokunun oksijenlenmesini de düzeltmeyi amaçlar. Cerrahi yaklaşımda önceleri tercih edilen yöntem, adneksal pedikülün açılmasını sağlamaksızın adneksanın kesilip alınmasını içermekteydi. Böylece ovaryum venlerinden bir trombotik embolinin oluşmasının önüne geçilmesi amaçlanıyordu [16,17].

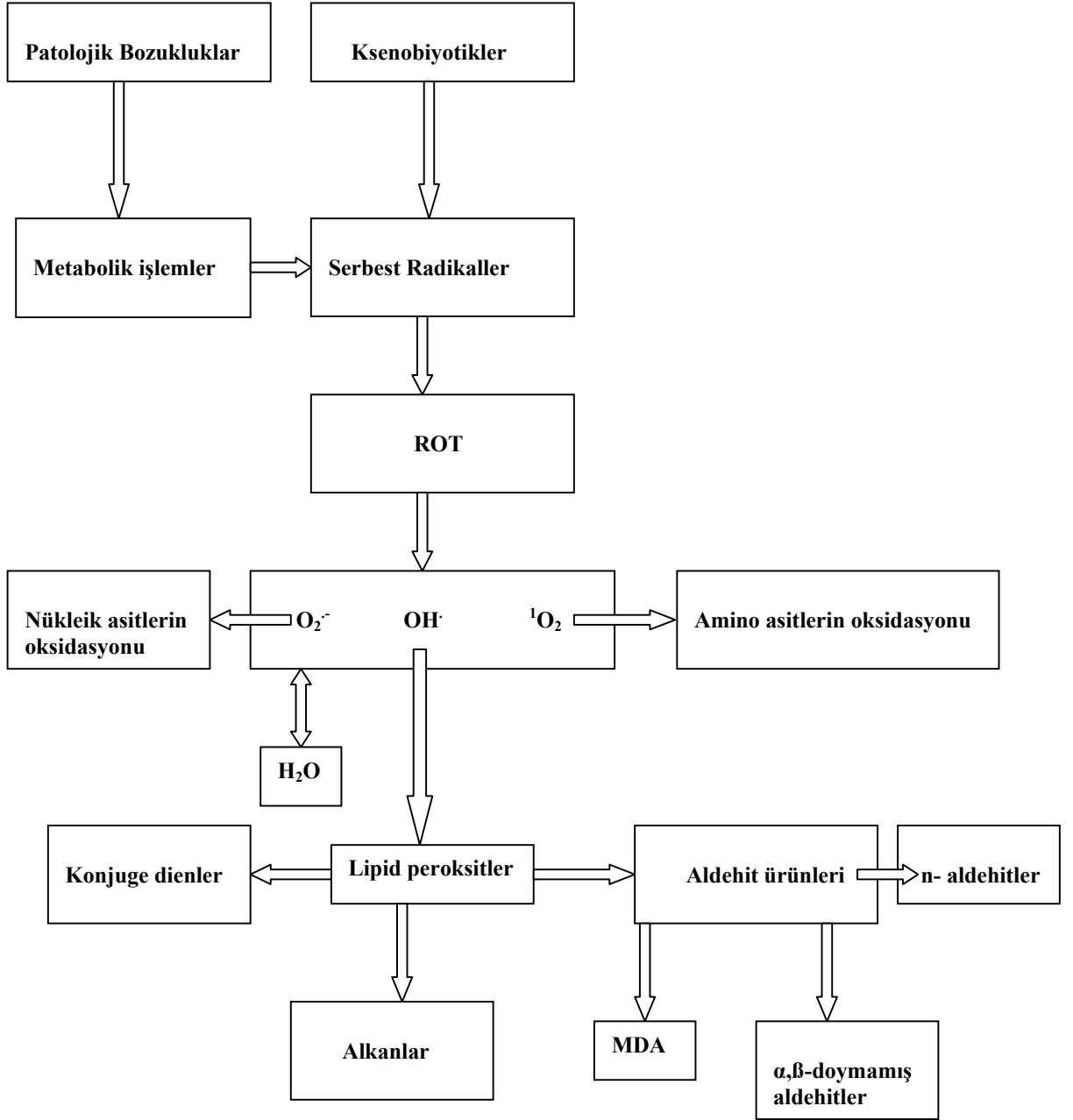
Bununla birlikte son 20 yıldan bu yana, adneksal pedikülün dolaşımının açılarak dokunun tekrar oksijenlendirilmesi güvenilir ve koruyucu alternatif bir yaklaşım olarak uygulanmaktadır [7,18,19].

Torsiyon sonucu siyah-morumsu renge dönüşen overlerin yaşamsal fonksiyonlarının bu nedenden dolayı etkilenmediği ve dolanan overlerin tekrar detorsiyonu yapıldığında trombo embolizm riskinin artmadığı bildirilmiştir [19,20]. Adneksal torsiyon jinekolojik acil bir durumdur. Erken teşhis ve cerrahi tedavi doğurganlığın devamı için önemlidir ve adneksanın bükümünün çözülmesi tercih edilen tedavi yöntemidir [7,21].

2.2. Serbest Radikaller ve Antioksidan Sistem

Serbest radikaller; biyokimyasal redoks tepkimeleri ile ortaya çıkan, dış yörüngelerinde çok az bir süre için bile olsa bir çiftlenmemiş elektron bulunduran atom ya da moleküllere denir. Aşırı derecede reaktiftirler ve bu nedenle diğer moleküller ile hızla reaksiyona girebilirler. Bu radikaller hücre içinde, aerobik metabolizma sırasında sürekli oluşmakta ve belli patolojik durumlarda üretimleri artmaktadır. Serbest oksijen radikalleri; süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali (OH^\cdot), singlet (tekil) oksijen (1O_2) ve nitrik oksit (NO^\cdot) gibi radikal türleridir.

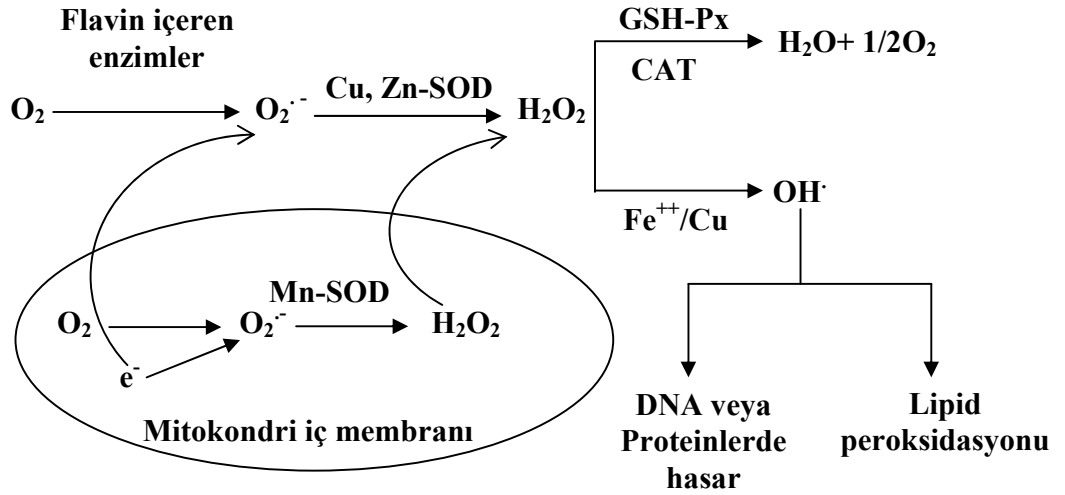
Serbest radikaller, canlılarda iç ve dış kaynaklı olarak üretilebilirler. İç kaynak olarak, mitokondrial elektron taşıma sistemi, oksidan enzimler, fagositik hücreler, otooksidasyon reaksiyonları, yaşlanma gibi kaynaklar ile ortaya çıkarlar [22]. İlaçlar, sigara, alkol, uyuşturucu kullanımı, ksenobiyotikler, kirli hava, nitrojen dioksit, benzen, kükürt dioksit, karbon monoksit gibi maddeler önemli dış radikal kaynaklarıdır. Serbest radikaller, aşırı reaktiviteleri nedeniyle canlılarda bulunan her çeşit biyomoleküle hasar verebilirler. Serbest radikallerin hasar verdiği biyomoleküller arasında nükleik asitler, lipidler, proteinler, serbest amino asitler, lipoproteinler, karbohidratlar ve bunlardan türeyen kompleks moleküller sayılabilir [23] (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Serbest radikal kaynaklı hasar ve oluşun ürünler [23].

Normal fizyolojik şartlarda oksijenin %2-5'i ROT'a dönüşmekte ve antioksidan sistem ile ortadan kaldırılmaktadır. Reaktif oksijen türleri eğer antioksidan savunma sistemleri

ile ortadan kaldırılmazsa, protein, karbohidrat, lipid ve nükleik asitler gibi makromoleküllere saldırıp onların yapılarında bozulmalar meydana getirirerek hücre hasara neden olabilmektedir. O_2^- , H_2O_2 , OH^\cdot gibi ROT'lar, insan hastalıklarının bir çoğunun patogenezinde işin içine karışmaktadır. Bununla birlikte fizyolojik şartlarda oluşan ROT, antioksidan savunma sistemi ile ortadan kaldırılmaktadır. O_2^- radikalleri SOD ile H_2O_2 'ye, oluşan bu H_2O_2 ise, GSH-Px ve CAT ile su ve oksijene dönüştürülerek detoksifiye edilmektedir (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Hücrede oksidatif ve antioksidan sistemin basit bir şeması [25].

Süperoksit (O_2^-) başlıca, solunum zincirinden elektron kaçaklarından dolayı sitozolde flavin içeren enzimler ile, mitokondride ise hücre içinde anlamlı miktarda üretilmektedir. Süperoksit, ya süperoksit dismutaz (SOD) ile ya da kendiliğinden hidrojen peroksiti (H_2O_2) oluşturur. Hidrojen peroksit, değişik enzimler ile (GSH-Px= Glutasyon peroksidaz, CAT=Katalaz) su ve dioksijene enzimatik olarak metabolize olabilir veya transisyon metal iyonlarıyla ve kimyasal bir reaksiyonla (Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları) çok aşırı reaktif olan hidroksil radikale (OH^\cdot) dönüşebilir. OH^\cdot radikali ise lipid peroksidasyonuna, DNA veya proteinlerde hasara neden olur [25].

2.3. İskemi/Reperfüzyon'un Biyokimyası

Doku kanlanmasının ilaçlar veya mekanik müdahaleler kullanılarak tekrar sağlanmasına reperfüzyon denir. Reperfüzyon işlemi boyunca kanın akışı ile reperfüzyon hasarından sorumlu süperoksit radikallerinin yüksek miktarı ve hipoksantinden ürik asit oluşumu XO tarafından meydana getirilir. Hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri, süperoksit anyonları, nitrik oksit formasyonları ve peroksinitrit gibi oksijen radikalleri iskemik dokunun reperfüzyonu esnasında oluşurlar. Bu serbest radikaller mitokondrial ve hücre membranlarındaki lipidlerin peroksidasyonu boyunca hücresel hasara neden olurlar. Lipidlerin peroksidasyonu ile zar permabilitesi veya membran ve hücre bütünlüğü bozulabilir [2,7]. XO, birçok dokuda ROT'un başlıca kaynaklarından sayılmakta ve hücresel hasarın oluşumunda anahtar bir enzim olduğu düşünülmektedir [26].

İskemi/reperfüzyon gibi hipoksik durumlarda, reperfüzyonu takiben doku hasarının meydana gelme mekanizmasının, ksantin dehidrogenaz'ın (XDH), XO'ya dönüşümüyle olduğu rapor edilmiştir [27]. Özellikle bu dönüşümün hipoksik şartlarda hızlandığı bildirilmiştir [28].

XO'nun iskemi/reperfüzyon hasarındaki rolü çok dikkat çekicidir. XO ile üretilen O_2^- ve H_2O_2 bir taraftan XDH'nin XO'ya dönüşümünü hızlandırmakta ve böylece devamlı ROT üreten kör bir döngü meydana gelmektedir [29]. Doku reperfüzyonu sırasında oluşan süperoksit anyonu barsak, deri, iskelet kası, beyin, kalp, akciğer, böbrek ve karaciğeri içine alan çeşitli dokularda iskemi sonrası hasarın kritik bir parçası olarak işe karışmaktadır. XO inhibitörleri ve antioksidan enzimler, iskemi sonrası hasarın alanını önemli derecede sınırlarlar.

Enzim olmayan antioksidan maddelerden en önemlisi GSH'tır. GSH, iç ve dış kaynaklı toksik kimyasallara karşı hücresel savunma sisteminde önemli bir rol oynar. Ksenobiyotiklerin ve ROT'un detoksifikasyonunda hücre içi GSH'ın rolü çok önemlidir. Ayrıca GSH, GSH-Px gibi çeşitli enzimler için bir koenzimdir. GSH, özellikle dış toksinlere şiddetli şekilde maruz kalan karaciğer gibi organlarda önemlidir. Karaciğer,

GSH sentezinin yapıldığı başlıca organdır [30]. Hücre içi bir antioksidan olan GSH'ın azlığı, hücrel sistemlerin birçoğunun serbest radikal hasarına karşı hassasiyetini artırır [25]. GSH, iki farklı mekanizmayla hücrenin antioksidan aktivitesine katılır. Birincisi, GSH bir enzimin aracılığı olmaksızın oksidanlara doğrudan hidrojenleri transfer ederek antioksidan etki gösterir. İkincisi GSH, GSH-Px katalizine enzimin koenzimi olarak katılır ve H₂O₂'nin, suya ve oksijene dönüşümünü sağlar [31]. GSH'ın hücre içi seviyesinin herhangi bir şekilde azalması, lipid peroksidasyonuna veya diğer hücrel hasarlara yol açabilmektedir. İskemi/reperfüzyon hasarı birçok dokuda GSH'ın düşüşünde önemli etken olarak karşımıza çıkmaktadır. Örneğin, Hasçalık ve ark. [32], rat ovaryumlarında iskemi/reperfüzyon hasarına karşı resveratrolün koruyucu rolünü araştırdıkları çalışmalarında, iskemi/reperfüzyona maruz kalmanın ovaryumların GSH seviyesini düşürürken, malondialdehit (MDA) seviyesinde ve XO enzim aktivitesinde yükselişe yol açtığını bildirmişlerdir. Yine, rat ovaryumunda melatoninin torsiyon-detorsiyon hasarına karşı koruyucu rolünün araştırıldığı bir başka çalışmada, iskemi/reperfüzyona maruz kalan rat ovaryumlarında artan XO aktivitesi ve MDA düzeyleri bulunurken, düşen GSH seviyesinin tespit edildiği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir [12]. Çelik ve ark. [11], CAPE'nin rat ovaryumunda iskemi-reperfüzyon kaynaklı hasarın önlenmesine yönelik araştırmalarında, rat ovaryumlarını 3 saat boyunca torsiyona ve 3 saat boyunca da detorsiyona maruz bırakarak, dokuda MDA, GSH seviyelerini ve XO aktivitesini araştırmışlardır. Araştırmacılar, torsiyon-detorsiyona maruz kalmanın rat ovaryumlarında GSH seviyesini düşürdüğünü, MDA düzeyini ve XO aktivitesini ise yükselttiğini bildirmişlerdir. Uğuralp ve ark. [33], GSH için benzer bulguları testis torsiyon-detorsiyonu yapılan ratlarda da bildirmişlerdir.

¹O₂ ve OH radikali, lipid peroksidasyonuna neden olan en önemli radikallerdir. Lipid peroksidasyonu sonucunda, özellikle doymamış yağ asitlerinin çift bağlarının oksidasyonu, membran akışkanlığında azalmaya, membran salınım fonksiyonlarında düzensizliğe, membran geçirgenliğinde bozulmaya neden olur [22]. Aldehitler, lipid hidroperoksitlerinin yıkımı sırasında daima oluşurlar ve pek çoğu biyolojik olarak aktiftir. Bunlardan en iyi bilinenleri MDA ve 4-hidroksinonenal'dir [34]. Bu maddeler

oluşum yerlerinden kolayca difüze olur ve hücrenin diğer bölümlerinde hasara yol açarlar. Oluşan bu aldehidlerden MDA, membran doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunun işareti olup, lipid peroksidasyonunun en önemli göstergesi olarak kabul edilir [35].

İskemi/reperfüzyon hasarı MDA seviyesinin önemli derecede yükselmesine neden olmaktadır. Usta ve ark. [36], torsiyon ve detorsiyona maruz bırakılan rat ovaryumlarında doku hasarında L-karnitin ve N-asetil sistein'in koruyucu rolünü araştırmışlar ve bu amaçla ratlara 3 saat boyunca adneksal torsiyon ve adneksal torsiyonu takiben 24 saat boyunca detorsiyon uygulamışlardır. Koruyucu amaçla ratlara iskemi bitimine 30 dakika kala karın içi olarak L-karnitin ve N-asetil sistein'in verildiği bu araştırmada, rat ovaryumlarında iskemi ve iskemi/reperfüzyon sonrası MDA seviyesinde yükselme tespit edilmiştir. Histopatolojik bulgu olarak araştırmacılar, ovaryum dokularında torsiyona uğramanın ciddi kanama ve ödem oluşturduğunu, detorsiyon uygulanan grupta ise kanama olmaksızın ödem oluşumunun devam ettiğini bildirmişler, L-karnitin ve N-asetil sistein'in reperfüzyon kaynaklı hasarda önleyici rolüne dikkat çekmişlerdir. Rhoden ve ark. [37], ratlarda deneysel böbrek iskemi/reperfüzyonu oluşturarak yaptıkları araştırmada, böbrek MDA düzeyinin, iskemi/reperfüzyon grubunda yükseldiğini tespit etmişlerdir. Yine ratlarda testislerin torsiyon-detorsiyona maruz bırakıldığı bir başka araştırmada, torsiyon-detorsiyon sonrası MDA seviyesinin testislerde yükseldiği bildirilmiştir [38].

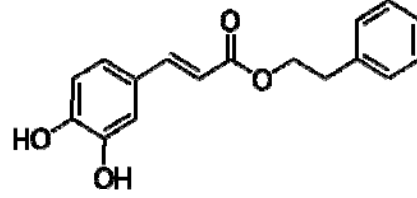
CAT, SOD ve GSH-Px enzimleri antioksidan savunma enzimleri olup iskemi/reperfüzyon bu enzimlerin aktivitelerini önemli bir şekilde etkileyerek antioksidan savunma sistemini bozmaktadır [39]. Somuncu ve ark. [40], Yeni Zelanda ırkı tavşanların overlerinde, iskemi/reperfüzyon hasarı gerçekleştirerek trapidilin koruyucu etkisini araştırmışlar ve ovaryum dokusunda SOD, CAT, GSH-Px ve MDA seviyelerini incelemişlerdir. Araştırmacılar, iskemi/reperfüzyonun MDA seviyesini ovaryum dokusunda oldukça yükselttiğini, CAT, SOD ve GSH-Px aktivitelerini ise düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Özerol ve ark. [41], ratlarda kısa süreli beyin iskemi

reperfüzyonunda erdostein'in koruyucu rolünü araştırmışlardır. Araştırmacılar iskemi-reperfüzyon ile etkilenmiş olan dokuda SOD, CAT ve GSH-Px gibi endojen antioksidanların oksidatif hasarın önlenmesinde önemli bir role sahip olduklarını ifade ederek, beyin dokusunda antioksidan aktivitelerindeki bir artışın iskemi reperfüzyon hasarında nöronal iyileştirme için potansiyel olarak faydalı olabileceğini vurgulamışlardır. Araştırmacılar bu çalışmalarında, serebral iskemi reperfüzyon uygulanan ratların eritrositlerinde CAT aktivitesini değişmemiş bulurlarken, SOD ve GSH-Px aktivitesinde bir düşüş tespit etmişler ve yükselen MDA seviyesine dikkat çekmişlerdir.

2.4. CAPE

Bazı sentetik ilaçların yan etkilerinin olması, insanları daha az yan etkiye sahip olduğunu düşündükleri ve antioksidan kapasiteye sahip olabilecek bitkilerle tedaviye yöneltmiştir. Biyokimyasal ara ürünler ve stres sonucu oluşan serbest radikallerin birçok hastalıkla ilişkili olduğunun tesbit edilmesi, antioksidanlara karşı olan ilgiyi arttırmıştır [42]. Serbest radikallerin kanser, miyokard enfarktüsü gibi birçok hastalığa neden olduğu günümüzde ortaya konmuş ve doğal antioksidanların günlük olarak diyetle birlikte alınmasının bu hastalıkların oluşum riskini önemli ölçüde azalttığı, özellikle bitkisel organizmalarda metabolizma ürünleri olarak ortaya çıkan uçucu yağların bileşiminde yer alan terpen bileşiklerinin kimyasal yapılarından dolayı potansiyel antioksidan aktiviteye sahip oldukları rapor edilmiştir [43].

Flavanoidler, kafeik asit ve esterleri propoliste en fazla bulunan ve propolis'in biyolojik olarak aktif bileşenidir [44]. Yapısal olarak flavanoidlere benzeyen CAPE'nin iki halkasal yapısı vardır (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. CAPE'nin kimyasal yapısı [45].

Halkalardan bir tanesinde molekülün hemen hemen bütün kimyasal özelliklerini gösteren ve fonksiyonel olan iki -OH grubu vardır. Hidroksil grupları, aktif bir şekilde elektron alıp vererek oksitleyici ve redükleyici özellik gösterirler. Çok uzun aromatik ve alifatik yapıda karbon grupları taşıdığı için aynı zamanda lipofilik özelliktedir. Böylece molekülün hücre membran yapılarından geçmesi ve etki edeceği bölgeye ulaşması kolaylaşır. CAPE'nin 10 mikromolar konsantrasyonunun insan nötrofillerinde ve ksantin/ksantin oksidaz sisteminde ROT'un üretimini tamamiyle bloke ettiği gösterilmiştir [46].

Çelik ve ark. [11], rat ovaryum iskemisi/reperfüzyon modelinde CAPE'nin koruyucu rolüne dikkat çekmişlerdir. İlhan ve ark. [47], yaptıkları bir araştırmada, tavşanlarda iskemisi/reperfüzyon kaynaklı deneysel spinal kord hasarı meydana getirmişler ve metilprednizolon ve CAPE'nin bu hasara karşı koruyucu etkisini karşılaştırarak incelemişlerdir. Sonuçta spinal kord hasarında CAPE'nin metilprednizolon'dan çok daha yüksek koruyucu etkiye sahip olduğunu gözlemişler ve CAPE'nin bu etkisinin, reperfüzyon hasarı ile oluşan serbest radikalleri ortamdaki temizlemesinden dolayı olduğu sonucuna varmışlardır.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Enzim ve enzimatik olmayan antioksidan sistemlerin aktivite tayinlerinde;

Analitik saflıkta Sigma marka, glutatyon (GSH), 5,5'-ditiyobis-2 nitrobenzoik asit (DTNB), 2-tiyobarbutirik asit (TBA), potasyum klorür (KCl), 1,1,3,3, tetramethoksiopropan, n-butanol, triklor asetik asit (TCA), sodyum hidroksit (NaOH), tri sodyum sitrat, fosforik asit (H_3PO_4 , %85'lik), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4), etilendiamintetraasetik asit (EDTA), hidrojen peroksit (H_2O_2), Na-K-tartarat, bakır sülfat ($CuSO_4$), nikotin amid adenin dinükleotit fosfat (NADPH), glutatyon redüktaz (GR), sodyum azid (NaN_3) ve CAPE kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan Alet ve Gereçler

Araştırmada distile su cihazı (GFL marka), ceketli ısıtıcı, mikrogram hassasiyetli (Denver Marka hassas terazi, karıştırıcı olarak (Yellow Line marka) vorteks kullanıldı. pH ölçümleri (HANNA marka) pH metre ile yapıldı. Bazı kimyasal reaksiyonlar için (Mommert marka) su banyosu kullanıldı. Spektrofotometrik okumalar (PG Instruments Ltd T60U Spectrometer marka) spektrofotometre ile yapıldı. Karıştırma işlemlerinde (M221 elektromag) manyetik karıştırıcı kullanıldı. Santrifüj işlemleri için, (EBA 20 Hettich marka) santrifüj cihazı ile soğutmalı (MİKRO 22R Hettich marka) santrifüj cihazları, numune hazırlanması ve enzim analizlerinde (Hierschman marka 10 µl, 100 µl, 1000 µl'lik) otomatik pipetler, (Labor teknik marka) homojenizatör, (Leica RM2125) mikrotom, (Olympus BX51) mikroskop kullanıldı.

3.1.3. Tavşanların Temini ve Bakımı

Araştırmada kullanılan Yeni Zelanda ırkından tavşanlar 6 aylık ve ağırlıkları yaklaşık olarak 3500-4000 gr arasında, Kafkas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Araştırma Laboratuvarı'ndan elde edildi. Hayvanlar, her grupta 6 tane olmak üzere 4 gruba ayrıldılar ve paslanmaz çelik kafeslerde, sessiz, sıcaklığın 17 ± 2 °C ve nemin % 60-65 arasında kontrol altında tutulduğu, ayrıca 12 saat ışık, 12 saat karanlık ışık döngüsünün sağlandığı bir odada barındırıldılar. Standart pellet yem ve içme suyu ile beslendiler.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Torsiyon/Detorsiyon Modelinin Yapılması

Torsiyon/detorsiyon işleminin uygulanmasında Hasçalık ve ark.'nın [48], yöntemi kullanıldı. Hayvanlara uygulanan bütün cerrahi işlemler kas içi 50 mg/kg vücut ağırlığı (v.a.) ketamin HCl ve (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) 10 mg/kg v.a ksilazin HCl (Rompun, Bayer, Türkiye) kombinasyonu anestezi altında gerçekleştirildi. Taklit grubu (grup S) haricinde diğer gruptaki hayvanlara anestezi altında laparotomi yapıldıktan sonra overler, tubal ve over damarlarını da içine alacak şekilde saat yönünde 360 derece döndürülerek 3 saat boyunca clip Turcica ve ipele bağlandı ve torsiyon oluşturuldu. Detorsiyon ise bağlamalar açılarak kan dolaşımının 3 saat boyunca sağlanmasıyla başarıldı. Laparotomi işleminde yaklaşık olarak 2,5 - 3 cm boyunda küçük bir kesi kullanıldı. Taklit grubunda ise sadece laparotomi yapıldı ve açık alan dikildi, 6 saat sonra overler alındı (Resim 3.1, 3.2, 3.3, 3.4).

3.2.2. Deneyde Kullanılan CAPE'nin Hazırlanışı

Deneyde, CAPE 8,5 mg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde tavşanlara uygulandı. CAPE günlük olarak hazırlandı. Öncelikle, hayvanların vücut ağırlıklarına göre deney gruplarına günlük ne kadar toplam CAPE özütünün verileceği hesaplandı. Daha sonra toplam günlük ihtiyaç dozu şeklinde hesaplanan CAPE %100'lük etanolde çözüldü ve

stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden her hayvanın vücut ağırlığına göre ilgili olan miktar otomatik pipetle alındı. Pipetle alınan çözeltilerin etanol yüzdesi, serum fizyolojik ile %1'e seyreltildi. Seyreltmeyle CAPE özütünde oluşan az miktardaki çökeltiler, 10 dakika vortekslelendikten sonra homojen bir solüsyon haline getirilerek hayvanlara karın içi enjekte edildi. Bu çalışmada kullanılan CAPE Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Sabri Ulukanlı'nın Organik Kimya laboratuvarında sentezlenmiştir.

3.2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Her grupta 6 dişi tavşan olmak üzere aşağıdaki deney grupları oluşturuldu:

Taklit grubu (S); Bu gruptaki hayvanlara sadece diğer gruplardakine benzer şekilde cerrahi operasyon yapıldı. Overlerde herhangi bir şekilde torsiyon/detorsiyon yapılmadı. Kontrolde farklı olarak bu gruptaki hayvanların operasyon yaraları dikişle kapatılarak 6 saat sonra overler alındı.

8,5 mg/kg v.a dozunda CAPE uygulanan grup (CAPE); Bu gruba karın içi yolla tek doz %1'lik etanolde çözülen CAPE, 8,5 mg/kg v.a doz uygulandı. Uygulamanın 1 saat sonrasında hayvanlardan ovaryum, kan, karaciğer ve böbrek örnekleri alındı.

8,5 mg/kg v.a CAPE+Torsiyon/detorsiyon uygulanan grup (CAPE+I/R); Torsiyondan 1 saat önce 8,5 mg/kg v.a doz CAPE karın içi yolla verildi. Daha sonra torsiyon/detorsiyon yapıldı ve ovaryum dokuları alındı.

%1'lik etanol+Torsiyon/detorsiyon uygulanan grup (E+I/R); CAPE'nin hazırlandığı taşıyıcı madde uygulama grubudur. Benzer gruplar gibi işlem yapıldı.

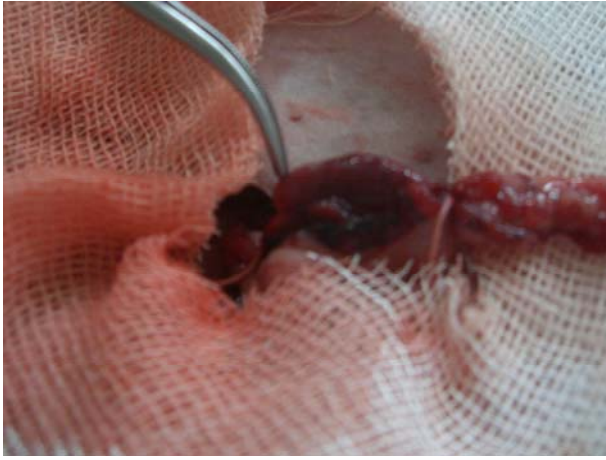
Deney sonunda, alınan dokuların bir kısmı biyokimyasal analizler yapılincaya kadar -35°C'de saklandı. Dokuların diğer kısmı ise histopatolojik analizler için %10'luk fosfat tamponlu formalin içinde saklandı.



Resim 3.1. Taklit grubu



Resim 3.2. Overler clip Turcica ve ipliklerle bağlanarak torsiyon oluşturuldu



Resim 3.3. İskemik over



Resim 3.4. İskemi sonrası reperfüzyona maruz kalan over

3.2.4. Doku Biyokimyasal Analizleri

3.2.4.1. GSH analizi

GSH, Ellman'ın [49] yöntemine göre tayin edildi. Tavşan ovaryum numunesi, 1-2 dakika 12000 devir/dakikada, % 10'luk homojenat oluşturacak şekilde, distile su ilave edilerek buz üzerinde homojenize edildi. Daha sonra, homojenat 3000 devir/dakikada, +4°C derecede, 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanta TCA çözeltisi ilave edildi, karıştırıldı ve tekrar santrifüj edilerek numune GSH analizine hazır hale getirildi (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. GSH Analizi

	Numune	Kör
%10'luk homojenat	500 µl	---
Na ₂ HPO ₄ (0,3 M)	4 ml	4 ml
DTNB	500 µl	500 µl
Distile su	-----	500 µl

Hazırlanan çözeltiler deney tüplerine eklendi, vortekslendi ve 5 dakika sonra oluşan rengin şiddeti spektrofotometrede 410 nm'de okundu ve sonuçlar glutasyon standart grafiğinden değerlendirilerek nmol /gram yaş doku (gyd) olarak gösterildi.

3.2.4.2. MDA analizi

Lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA, Ohkawa ve ark.'nın [50] yöntemine göre çalışıldı. Tavşan ovaryum numunesi, % 1,15'lik KCl çözeltisi içinde, % 10'luk homojenat oluşturacak şekilde, 15000 devir/dakikada, 1 dakika süreyle buz üzerinde homojenize edildi. Bu homojenat doğrudan MDA analizinde kullanıldı (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. MDA Analizi

	Numune	Kör
Homojenat	100 µl	----
%8,1 SDS	200 µl	200 µl
%20'lik asetik asit	1500 µl	1500 µl
%0,8'lik TBA	1500 µl	1500 µl
Distile su	700 µl	800 µl

Hazırlanan çözeltiler deney tüplerine eklendi, vortekslendi ve tüpler kaynar suda (en az 95 derecede) 1 saat bekletildi. Çeşme suyunda soğutulan tüpler 3000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantın absorbansı 532 nm'de okunarak, numunelerin MDA konsantrasyonları 1,1',3,3' tetrametoksiopropan ile hazırlanan standart grafikten değerlendirildi ve nmol/gyd olarak gösterildi.

3.2.4.3. GSH-Px analizi

Doku GSH-Px aktivitesi Paglia ve ark.'nın [51] yöntemine göre ölçüldü. Tavşan ovaryum numunesi, % 10'luk homojenat oluşturacak şekilde, 15000 devir/dakikada, 1 dakika süreyle buz üzerinde homojenize edildi. 10000 rpm de bu homojenat 20 dakika santrifüj edildi ve supernatant GSH-PX analizinde kullanıldı (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. GSH-Px Analizi

	Numune tüpü (ml)
Fosfat tamponu (50 mM, pH:7, 5 mM EDTA'lı)	2.650
Redükte GSH (5 mM)	0.100
NADPH (1 mM)	0.100
GSH Redüktaz (1 IU)	0.010
NaN ₃ (1 mM)	0.010
Numune	0.020

Tüpler iyice karıştırıldı ve 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. Sürenin sonunda her tüpe 0.100 ml hidrojen peroksit çözeltisi (1 mM) ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Dalga boyu 340 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede ilk önce alet distile suya karşı sıfırlandı, daha sonra numunelerin absorbansları 5 dakika süreyle takip edildi. İlk absorbans değerinden son absorbans değeri çıkartılarak 5 dakikalık net değişim tespit edildi. Daha sonra bulunan değer 5'e bölünerek dakikadaki absorbans değişimi bulundu. Enzim aktivitesi U/gr protein olarak verildi.

3.2.4.4. CAT analizi

Doku CAT aktivitesi Luck'ün [50] yöntemine göre ölçüldü. GSH-Px analizi için hazırlanan süpernatandan CAT analizi yapıldı (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. CAT Analizi

	Numune (ml)	Kör (ml)
Fosfat tamponu (50 mM, pH=7)	-----	2.99
H ₂ O ₂ 'li fosfat tamponu	2.99	0.01
Süpernatant	0.01	----

Spektrofotometre 240 nm'ye getirildi ve körle sıfır absorbansa ayarlandı. Numune tüplerine süpernatant ilavesinden hemen sonra 240 nm'de absorbans okundu. Daha sonra her 15 sn'de bir okuma yapmak süretiyle 90 sn süre ile absorbans azalması takip edildi. Sürenin sonunda okunan absorbans değeri kaydedildi. Doğrusal absorbans azalmasının olduğu zaman aralığı değerlendirilmeye alındı. Enzim aktivitesi K/mgr protein olarak verildi.

3.2.4.5. Protein tayini

Dokudaki protein tayini, sığır serum albuminin standart olarak kullanıldığı Lowry protein analizi ile yapıldı [53].

3.2.5. Histopatolojik İncelemeler

Uygulama sonrası alınan ovaryum doku örnekleri % 10'luk tamponlu formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Tespit edilen dokular, sırasıyla dereceli alkol, ksilol ve parafizasyon işlemlerinden geçirilerek parafin bloklar elde edildi. Hazırlanan parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitler hematoxilen ve eozin (H&E) ile boyanarak oluşan lezyonlar ışık mikroskopunda değerlendirildi. Ovaryum kesitlerinin histopatolojik değerlendirilmesinde intersitisyel ödem, vasküler dilatasyon, kanama, yangısal hücre infiltrasyonu gibi değişiklikler dikkate alındı. Bu amaçla, Çelik ve ark. [11] tarafından belirtilen derecelendirme kriterlerinden (Çizelge 3.5) yararlanıldı. Ayrıca gerekli görülen olgulardan mikroskopik resimler çekildi.

Çizelge 3.5. Ovaryum Hasarının Histopatolojik Derecelendirme Kriterleri

Derece	Kriter
0	Normal
I	Hafif derecede ödem, vasküler konjesyon, kanama ve lökosit infiltrasyonu yok
II	Orta derecede ödem, vasküler konjesyon, kanama ve lökosit infiltrasyonu yok
III	Şiddetli derecede ödem, vasküler konjesyon, hafif derecede kanama ve lökosit infiltrasyonu
IV	Şiddetli derecede ödem, vasküler konjesyon, kanama ve lökosit infiltrasyonu

3.2.6. İstatistiki Analiz

Bütün gruplarda veriler, ortalama \pm standart sapma olarak verildi. Verilerin öncelikle normal dağılıma sahip olup olmadıkları test edildi. Bütün gruplardaki verilere one-sample Kolmogorov-Smirnov testi uygulandı ve verilerin normal dağılıma sahip olduğu bulundu ($P>0,05$). Daha sonra verilere tek yönlü Varyans analizi uygulandı ve gruplar arasındaki farklar Duncan testi ile belirlendi. P'nin 0,05 den küçük olduğu değerler istatistiki olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiki analizler, SPSS 9.05 programıyla yapıldı.

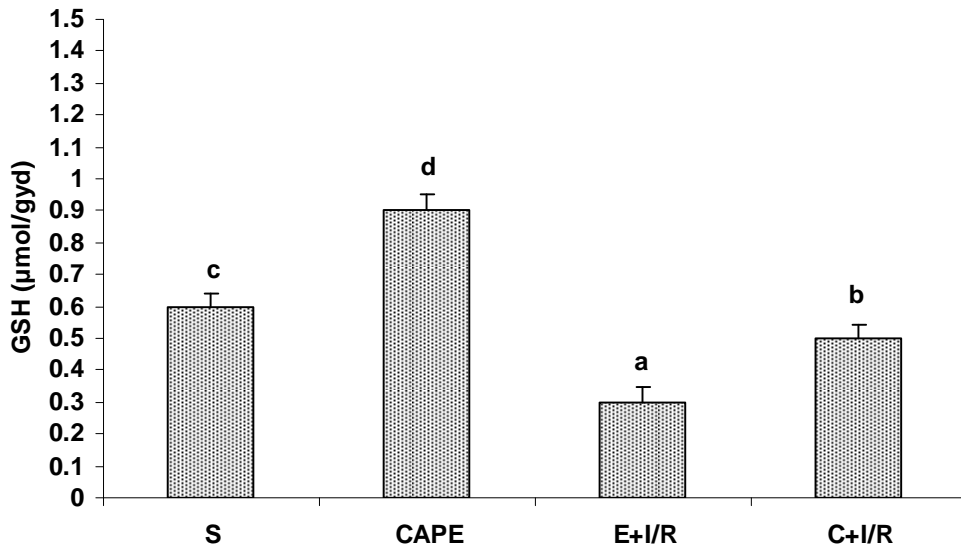
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Biyokimyasal Bulgular

Yapılan analizler neticesinde, E+I/R ($0,28\pm0,05$ $\mu\text{mol/gyd}$) ovaryum GSH düzeyinin, S grubu ($0,61\pm0,04$ $\mu\text{mol/gyd}$) ovaryum GSH seviyesine göre anlamlı şekilde düştüğü bulundu ($P<0,05$). E+I/R grubunda azalan ovaryum doku GSH seviyesi, CAPE uygulamasıyla C+I/R ($0,5\pm0,04$ $\mu\text{mol/gyd}$) grubunda anlamlı şekilde yükseldi fakat bu yükselme S grubu GSH seviyesine kadar olmadı ($P<0,05$) (Şekil ve Çizelge 4.1). E+I/R grubu ovaryum MDA seviyesi ($163,0\pm25,4$ nmol/gyd), S grubu ovaryum MDA seviyesine göre ($69,2\pm7,9$ nmol/gyd) anlamlı şekilde yükseldiği tespit edildi ($P<0,05$). CAPE uygulamasıyla yükselen MDA seviyesinin C+I/R grubunda ($125,0\pm4,3$) aşağı çekildiği bulundu ($P <0,05$) (Şekil ve Çizelge 4.2). İskemi/reperfüzyonla E+I/R grubu ($4,0\pm1,7$ K/gr protein) CAT aktivitesinin S grubuna ($1,8\pm0,2$ K/gr protein) göre yükseldiği gözlemlendi ($P <0,05$). Yükselen CAT aktivitesi C+I/R ($2,4\pm0,4$ K/gr protein) grubunda düşerek tekrar S grubuyla aynı aktiviteye geldi ($P<0,05$) (Şekil ve Çizelge 4.3). E+I/R grubu ($193,5\pm25,3$ U/gr protein) GSH-Px aktivitesi, S grubu ($474,6\pm82,2$ U/gr protein) GSH-Px aktivitesine göre anlamlı şekilde düştü ($P<0,05$). C+I/R grubu ($314,7\pm42,6$ U/gr protein) GSH-Px aktivitesinin E+I/R grubuna göre anlamlı olarak yükseldiği bulundu ($P<0,05$) (Şekil ve Çizelge 4.4).

Çizelge 4.1. Torsiyon/detorsiyondan 1 saat önce CAPE (8,5 mg/kg v.a) uygulamasının ovaryum dokusu indirgenmiş glutatyon (GSH) seviyesine etkisi. Gruplar: Taklit (S); CAPE; Etanol + İskemi / Reperfüzyon (E+I/R); CAPE + İskemi / Reperfüzyon (C+I/R). ($P<0,05$).

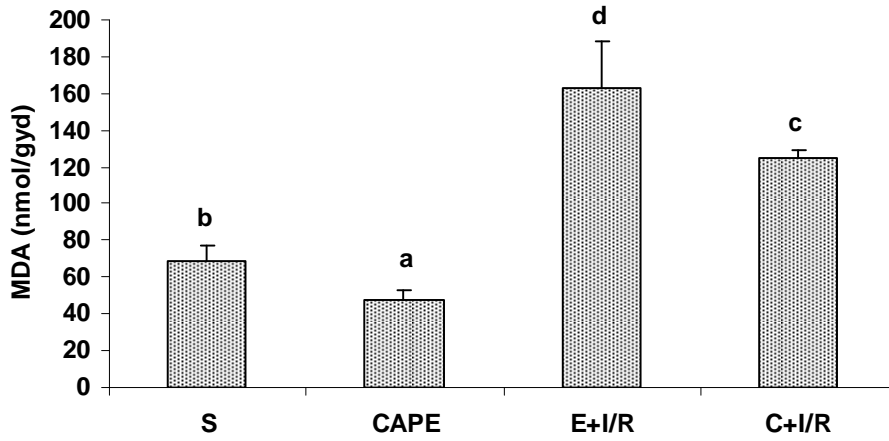
Uygulama Grupları (n=6)	GSH ($\mu\text{mol/gyd}$)
S	0,61 \pm 0,04
CAPE (8,5 mgr/kg v.a)	0,91 \pm 0,05
E+I/R	0,28 \pm 0,05
C+I/R	0,50 \pm 0,04



Şekil 4.1. Torsiyon/detorsiyondan 1 saat önce CAPE (8,5 mg/kg v.a) uygulamasının ovaryum dokusu indirgenmiş glutatyon (GSH) seviyesine etkisi. Gruplar: Taklit (S); CAPE; Etanol + İskemi / Reperfüzyon (E+I/R); CAPE + İskemi / Reperfüzyon (C+I/R). Sütünlarda farklı olan harfler istatistiki olarak birbirinden anlamlıdır ($P<0,05$).

Çizelge 4.2. Torsiyon/detorsiyondan 1 saat önce CAPE (8,5 mg/kg v.a) uygulamasının ovaryum dokusu MDA seviyesine etkisi. Gruplar: Taklit (S); CAPE; Etanol + İskemi / Reperfüzyon (E+I/R); CAPE + İskemi / Reperfüzyon (C+I/R) ($P<0,05$).

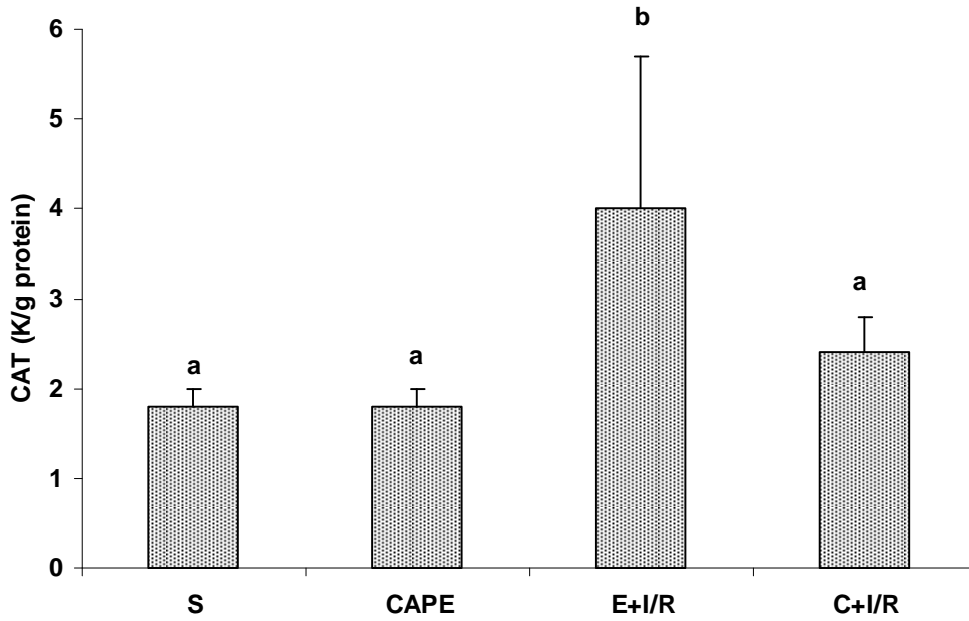
Uygulama Grupları (n=6)	MDA (nmol/gyd)
S	69,2±7,9
CAPE (8,5 mgr/kg v.a)	47,7±5,6
E+I/R	163,0±25,4
C+I/R	125,0±4,3



Şekil 4.2. Torsiyon/detorsiyondan 1 saat önce CAPE (8,5 mg/kg v.a) uygulamasının ovaryum dokusu MDA seviyesine etkisi. Gruplar: Taklit (S); CAPE; Etanol + İskemi / Reperfüzyon (E+I/R); CAPE + İskemi / Reperfüzyon (C+I/R). Sütünlarda farklı olan harfler istatistiki olarak birbirinden anlamlıdır ($P<0,05$).

Çizelge 4.3. Torsiyon/detorsiyondan 1 saat önce CAPE (8,5 mg/kg v.a) uygulamasının ovaryum dokusu (CAT) seviyesine etkisi. Gruplar: Taklit (S); CAPE; Etanol + İskemi / Reperfüzyon (E+I/R); CAPE + İskemi / Reperfüzyon (C+I/R) ($P<0,05$).

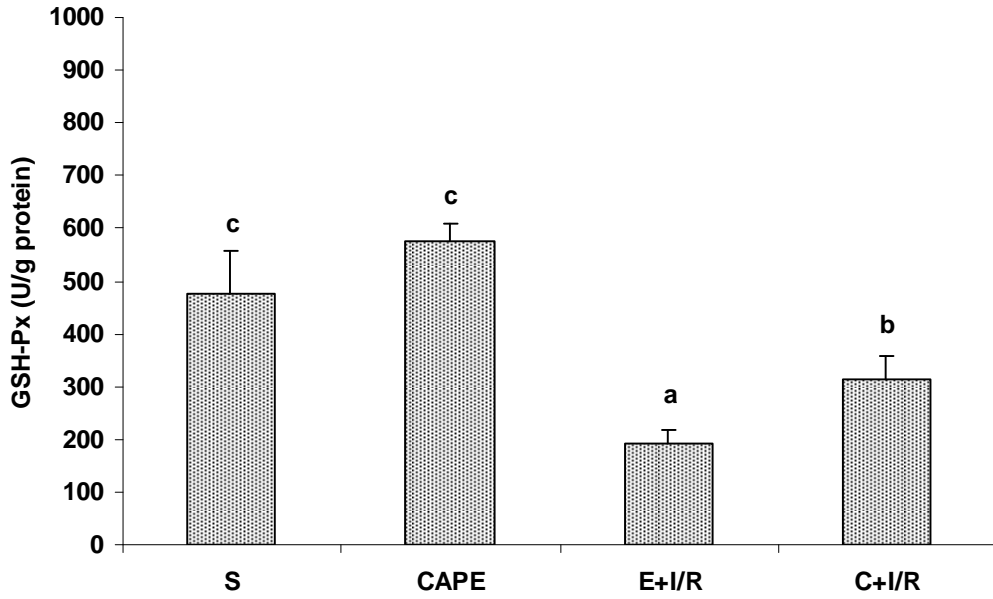
Uygulama Grupları (n=6)	CAT (K/gr protein)
S	1,8±0,2
CAPE (8,5 mgr/kg v.a)	1,8±0,2
E+I/R	4,0±1,7
C+I/R	2,4±0,4



Şekil 4.3. Torsiyon/detorsiyondan 1 saat önce CAPE (8,5 mg/kg v.a) uygulamasının ovaryum dokusu (CAT) seviyesine etkisi. Gruplar: Taklit (S); CAPE; Etanol + İskemi / Reperfüzyon (E+I/R); CAPE + İskemi / Reperfüzyon (C+I/R). Sütünlarda farklı olan harfler istatistiki olarak birbirinden anlamlıdır ($P<0,05$).

Çizelge 4.4. Torsiyon/detorsiyondan 1 saat önce CAPE (8,5 mg/kg v.a) uygulamasının ovarium dokusu (GSH-Px) seviyesine etkisi. Gruplar: Taklit (S); CAPE; Etanol + İskemi / Reperfüzyon (E+I/R); CAPE + İskemi / Reperfüzyon (C+I/R) ($P<0,05$).

Uygulama Grupları (n=6)	GSH-Px (U/gr protein)
S	474,6±82,2
CAPE (8,5 mgr/kg v.a)	574,3±35,1
E+I/R	193,5±25,3
C+I/R	314,7±42,6



Şekil 4.4. Torsiyon/detorsiyondan 1 saat önce CAPE (8,5 mg/kg v.a) uygulamasının ovarium dokusu (GSH-Px) seviyesine etkisi. Gruplar: Taklit (S); CAPE; Etanol + İskemi / Reperfüzyon (E+I/R); CAPE + İskemi / Reperfüzyon (C+I/R). Sütünlarda farklı olan harfler istatistiki olarak birbirinden anlamlıdır ($P<0,05$).

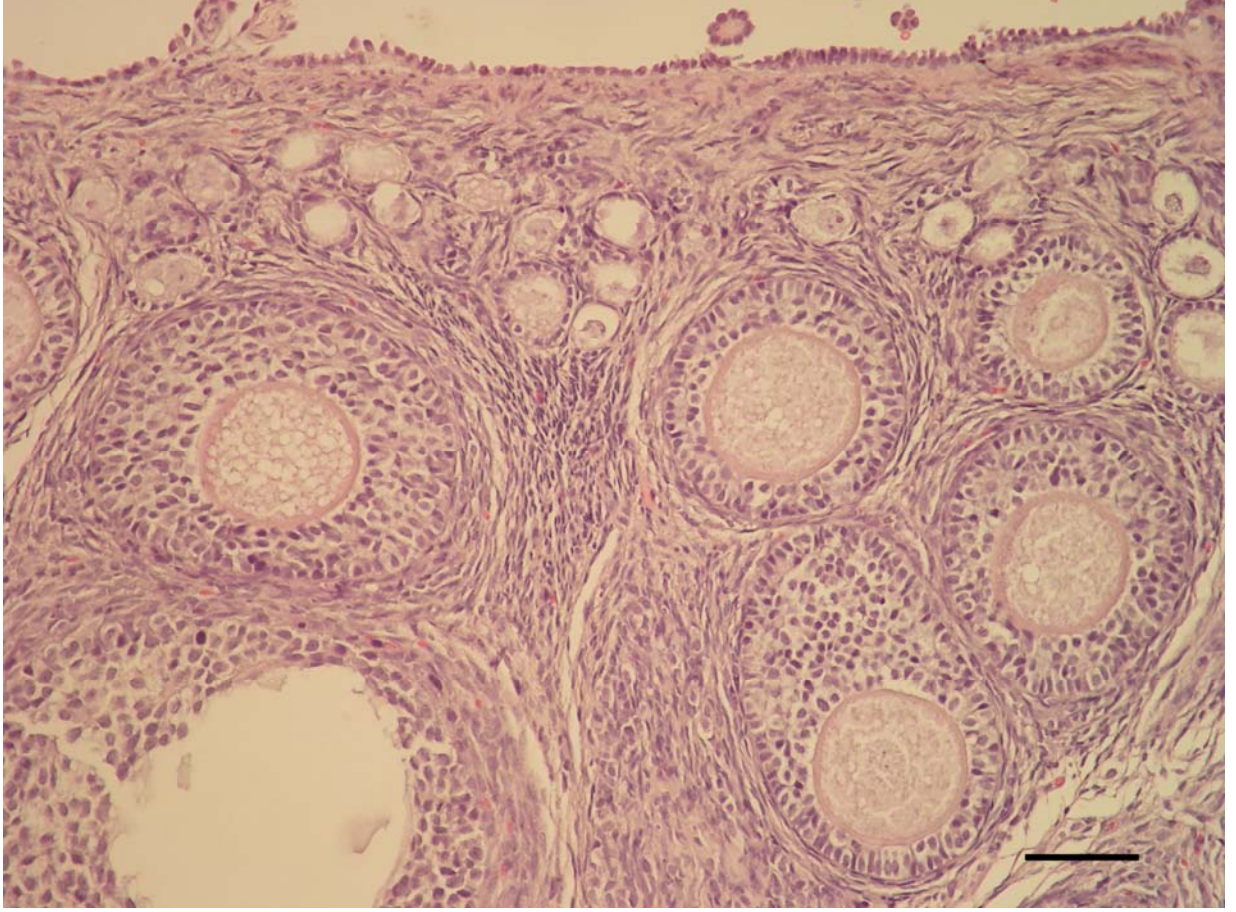
4.2. Histopatolojik Bulgular:

Histopatolojik incelemeler için çalışma gruplarından alınan ovaryum dokuları Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden iki ayrı patolog tarafından körlemesine ışık mikroskopunda değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5.'de sunuldu. T grubu ovaryumları normal histolojik görüntüye sahipti (Resim 4.1). Materyal ve metot kısmında açıklanan derecelendirmeye göre E+I/R grubunda III derecelerde doku hasarı olduğu ancak IV. derecedeki hasarın daha yaygın olduğu gözlemlendi (Resim 4.2). C+I/R grubunda, sadece I. dereceden III. dereceye kadar hasar olduğu buna karşın IV. derecede hasarın hiçbir denekte mevcut olmadığı gözlemlendi (Resim 4.3).

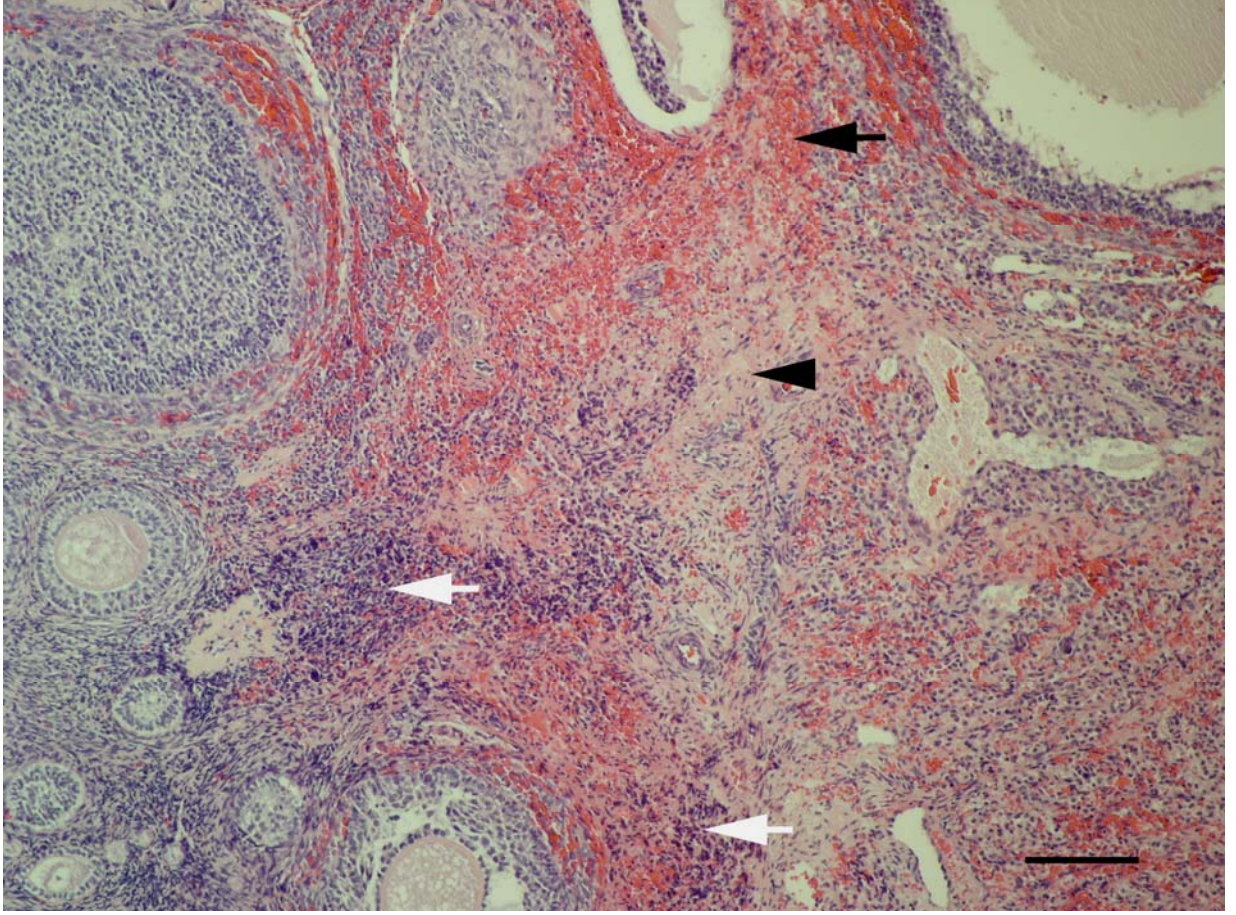
Çizelge 4.5. Ovaryumlarda Uygulama Sonrası Hayvan Sayılarına Göre Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

Uygulama Grupları (n=6)	Histopatolojik Derece				
	0	I	II	III	IV
S	6				
CAPE	5	1			
E+I/R				1	5
C+I/R	1	1	3	1	

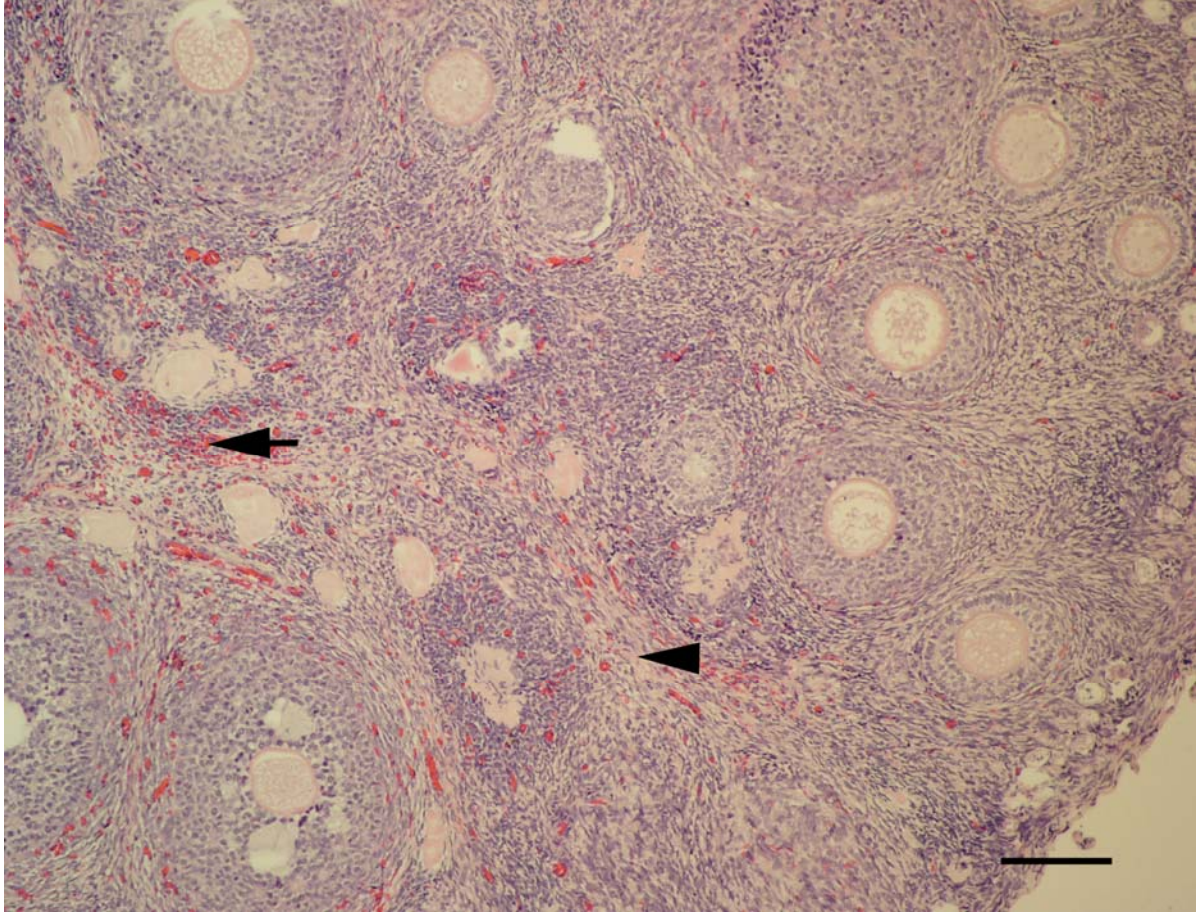
Gruplar: Taklit (S); CAPE; İskemi/Reperfüzyon (I/R); Etanol + İskemi/Reperfüzyon (E+I/R); CAPE + İskemi/Reperfüzyon (C+ I/R)



Resim 4.1. Taklit grubundaki bir tavşanın normal ovaryum morfolojisi, H&E, Bar = 115 μ m.



Resim 4.2. E+I/R grubundaki bir tavşan ovaryumunda şiddetli konjesyon kanama (siyah ok) ile ödem (ok başı) ve lökosit infiltrasyonu (beyaz oklar), H&E, Bar = 230 μ m.



Resim 4.3. Torsiyondan 1 saat önce CAPE uygulaması yapılan ve daha sonra torsiyon/detorsiyon yapılan bir tavşan ovaryumunda hafif derecede konjesyon (ok) ve ödem (ok başı), H&E, Bar = 230 μ m.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Torsiyon/detorsiyonuna bağlı biyokimyasal ve patolojik değişiklikler iskemi-reperfüzyon hasarına benzer özelliklerle ortaya çıkan bir durumdur. Yapılan birçok çalışmada iskemi/reperfüzyon hasarında dokularda oluşan hipoksik etkiye ve yeniden oksijenin ortama girmesine (reoksijenasyon) bağlı olarak oluşan serbest radikal ve reaktif oksijen türleri ile lipid peroksidasyonunun doku hasarında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir [54]. Bu çalışmada, tavşan ovaryumlarında cerrahi yöntemle torsiyon-detorsiyon uygulanarak oluşturulan iskemi-reperfüzyon sonucu meydana gelen lipid peroksidasyonu, MDA düzeyi ölçülerek değerlendirildi. %1'lik etanol iskemi-reperfüzyon (E+I/R) uygulanan overlerde MDA seviyelerinin, S ve CAPE uygulanan gruplara göre yüksek olduğu gözlemlendi. MDA dokularda lipid peroksidasyonunun önemli bir göstergesi olarak değerlendirilen ve bu amaçla lipid peroksidasyonunun tayininde yaygın şekilde kullanılan bir parametredir. Lipid peroksidasyonuna sebep olan ROT başlıca hücre içi moleküler oksijenin redüksiyonu sırasında oluşan reaksiyonlarda üretilen moleküllerdir. Moleküler oksijenin hücre içi redüksiyonu sonucu oluşan en önemli reaktif oksijen türleri $O_2^{\cdot-}$, ve OH^{\cdot} tır [55]. İskemi/reperfüzyonla ilgili yapılan birçok çalışmada, ROT'un arttığı doğrudan ve dolaylı olarak gösterilmiştir. ROT'un oluşumu reperfüzyon sonrası dokuda doğrudan elektro paramagnetik rezonans ve spin trapping metodları kullanılarak gösterilmiştir [56]. Aynı şekilde, hipoksi-reoksijenasyonu takiben *in vitro* ortamda hücre içi serbest oksijen radikallerinin akciğer arter endotel hücrelerinde [57] ve sinir hücrelerinde arttığı bildirilmiştir [58]. *In vivo* deneysel çalışmalarda, iskemi/reperfüzyon kaynaklı lipid peroksidasyonunun meydana gelişi testislerde [59], böbreklerde [60], beyinde [61], karaciğerde [62], barsaklarda [63] ve ovaryumlarda [10] gösterilmiştir. Dış kaynaklı antioksidanların serbest radikal kaynaklı hasarı, aynı iç kaynaklı antioksidanlar gibi önleyebildiği bilinmektedir. Bu olay muhtemel birkaç mekanizma ile olabilmektedir.

Antioksidan özellikle ajanların uygulanması, oksijen kaynaklı serbest radikallerin üretiminin önlenmesi, ortamda var olan radikallerin yok edilmesi ve endojen antioksidanların etkilerinin artırılması şeklinde olabilmektedir [64]. Çalışmamızda, CAPE'nin, MDA düzeyini iskemi/reperfüzyona maruz kalmış overlerde anlamlı bir şekilde düşürdüğü gözlemlendi. Birçok çalışmada elde ettiğimiz bulgulara paralel olarak, CAPE uygulamasının iskemi/reperfüzyon sonucu oluşan yüksek MDA seviyelerini anlamlı şekilde düşürdüğü gösterilmiştir. Örneğin, iskemi/reperfüzyon sonrası barsaklarda [65], beyinde [66] ve overlerde de [11] benzer etki bildirilmiştir.

Reperfüzyon öncesi, iskemi olayında dokuda hasara yol açan bir takım değişiklikler olduğu bilinmektedir. Becker ve ark. [67], kalp kası hücrelerinde reperfüzyondan önce iskemi sırasında mitokondriyal elektron transportu sırasında önemli miktarda O_2^- üretimi olduğunu bildirmişlerdir. Bunun yanında, iskemi sırasında hücre ATP seviyesi azalarak ortamda bulunan ATP depoları büyük oranda hipoksantin ve AMP'ye çevrilirken, XDH'nin, XO'ya çevrimi başlamaktadır. Hipoksantin hücrede ksantin oksidaz (XO) tarafından ürik aside çevrimi sırasında, reperfüzyonla ortama giren O_2 molekülleri önemli miktarda (başlıca süperoksit radikali olmak üzere) ROT üretimine aracılık eder [56,58]. Spesifik XO inhibitörü olan allopurinolün, iskemi/reperfüzyon sırasında oluşan oksidatif stresi önleyici etkisinin gösterilmesi, bu enzimin ve ROT'un, iskemi/reperfüzyon hasarında önemli bir rolü olduğunu göstermektedir [68]. Endotelial hücrelerin yüksek oranda ksantin oksidoredüktaz içerdiği bilinmektedir. İskemi sırasında oluşan ATP kaynaklarındaki tükenme, ATP'ye bağımlı iyon kanallarının regülasyonunu bozarak hücre içi Ca^{++} miktarında artışa sebep olur. Bu da hücre için zararlı olan Ca^{++} konsantrasyonunda artış ile Ca^{++} 'a bağlı proteazların aktivasyonuna ve ksantin dehidrogenaz (XDH)'in, XO'ya dönüşümüne neden olmaktadır [69]. CAPE, hücre içi Ca^{++} girişini engellemektedir. CAPE'nin ovaryum iskemi/reperfüzyon hasarında etkin bir şekilde rol alıp hücre içi Ca^{++} girişini engelleyerek XO kaynaklı süperoksit radikali oluşumunu önleyebilmesi mümkündür. Reperfüzyondan sonra hasarın olduğu bölgede hızlı bir nötrofil birikmesi gözlenir. Nötrofiller, vasküler endotele yapışarak damar dışına göç eder ve burada nötrofil kaynaklı aşırı bir ROT oluşumu gözlenir [70].

Nötrofillerden dolayı oluşacak ek hasar CAPE uygulaması ile azaltılabilir. Bu etki, NADPH oksidaz ve nötrofil yapışmasının önlenmesi ile ilgili olabileceği gibi [64], CAPE'nin inflamasyon oluşumunda rol alan araşidonik asit metabolitlerinden 5-lipoksijenazı inhibe etmesi ile de ilgili olabilir [46]. Ayrıca CAPE'nin indüklenebilir nitrik oksit sentaz'ın (iNOS) katalitik aktivitesini ve/veya gen ekspresyonunu ve nükleer faktör kappa B (NF-kB) aktivasyonunu engelleyerek yangı önleyici etkisi olduğu da bildirilmiştir [71]. Buna ilaveten, NF-kB'nin yangıda rol oynayan araçlar dahil, sitokin, nötrofil kemoatraktanlar ve gen ekspresyonunda regülatör olarak rol aldığı ve CAPE'nin NF-kB inhibitörü olması sebebiyle nötrofil aktivasyonu ve yangıya bağlı iskemi-reperfüzyon hasarını önlediği tahmin edilmektedir [62]. CAPE'nin apoptosisi önleyerek iskemi/reperfüzyon hasarında koruyucu etki göstermesi de muhtemeldir, çünkü apoptosisle ilgili CAPE'nin hücrel birçok yapıyı etkilediği bilinmektedir [72].

İskemi ve iskemi/reperfüzyon sonucu oluşan ovaryum hasarı çalışmamızda ayrıca histopatolojik olarak da desteklenmiştir. CAPE uygulanan gruplarda gözlenen lipid peroksidasyonundaki azalmaya bağlı düşük doku hasarı histopatolojik olarak gözükmemektedir. Benzer etkiler önceki diğer çalışmalarda da rapor edilmiştir [11,62].

Oksijen radikallerinin zararlı etkileri normal fizyolojik sınırlarda hücre içi antioksidan sistemler tarafından etkili bir şekilde bertaraf edilerek engellenir [73]. Hücre içi bu antioksidan mekanizmalar, enzimatik olarak SOD, CAT, GSH-Px ve non-enzimatik olarak da GSH tarafından düzenlenmektedir. Dokularda oluşan superoksit radikali, SOD tarafından daha az zararlı H_2O_2 'e çevrilerek süperoksitin zararlı etkileri azaltılır. H_2O_2 ise CAT enzimi tarafından H_2O ve moleküler oksijene çevrilir. GSH-Px ise hem GSH'ın oksidasyonunda hemde peroksitlerin (H_2O_2 ve hidroperoksitler) indirgenmesinde görev alır [60]. Araştırmamızda E+I/R uygulanan overlerde GSH seviyesinin, S grubuna göre daha düşük olduğu gözlemlendi. Bazı çalışmalarda, reperfüzyona maruz bırakılmayan ve sadece iskemi uygulanmış dokularda geçici kısa süreli bir oksidatif stresin görülebileceği belirtilmiştir. Reperfüzyondan önce iskemi sırasında oluşan oksidatif stresin temelinde, mitokondriyel kaynaklı ROT'un, iskemiye takiben elektron transport

zincirindeki olaylar sırasında olduğu bildirilmektedir [67]. E+I/R uygulanan overlerde, iskemi reperfüzyona maruz kalmanın, GSH seviyelerinde S ve CAPE gruplarına göre anlamlı düşümlere sebep olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte, iskemi/reperfüzyona karşı CAPE verilen grupta (C+I/R), GSH seviyelerinde, % 1'lik E+I/R grubundaki GSH düzeyleriyle karşılaştırıldığında anlamlı bir artışın olduğu görülmektedir. CAPE uygulaması, iskemi/reperfüzyon sonucu overlerde oluşan GSH seviyelerindeki düşümü önlemekte, bu etkinin CAPE'de çok daha fazla olduğu görülmektedir. GSH, hücrede serbest radikallerle reaksiyona girerek tekil oksijen, hidroksil radikali ve süperoksit radikalleri aracılığıyla oluşan hasara karşı koruyucudur [74]. GSH seviyesinde düşüm, oksidatif stres kaynaklı hasarı artırmaktadır [75]. Yapılan bir araştırmada, deneysel olarak hücresel GSH seviyesinin artırılmasının iskemi/reperfüzyon hasarını azalttığı gösterilmiştir [76]. İskemi/reperfüzyon, dokularda GSH seviyesini azaltabilmektedir [11]. Çelik ve ark. [11], iskemi/reperfüzyon uygulanan ovaryum dokusunda MDA düzeyinin ve XO aktivitesinin yükseldiğini buna karşın GSH miktarında önemli düşümler olduğunu, CAPE uygulamasının ise bu olumsuz etkileri önemli derecede engellediğini göstermişlerdir.

Araştırmamızda, E+I/R grubunun overlerinin antioksidan enzim sisteminin önemli temsilcilerinden CAT aktivitesinde, S ve CAPE gruplarıyla karşılaştırıldığında önemli bir artışa neden olduğu gözlemlendi. CAT aktivitesi, E+I/R grubunda en yüksek seviyededir. Barnard ve ark. [60] da, benzer şekilde iskemi ve iskemi/reperfüzyon sonrası dokuda CAT aktivitesinde keskin bir artış olduğunu bildirmiştir. Tavşanlara CAPE uygulaması CAT aktivitesini normal değerlere çekerek, S ve CAPE grupları düzeyine getirmiştir. İskemi ve reperfüzyon hasarından sonra dokularda CAT aktivitesindeki değişimler, çalışmalarda farklılıklar göstermektedir. Somuncu ve ark. [40], tavşan overlerinde yaptıkları iskemi-reperfüzyon hasarında, trapidil'in koruyucu rolünü araştırmışlar, çalışmada CAT aktivitesinin I/R sonucu düştüğünü, buna karşın antianjinal, damar daraltıcı ve lipid peroksidasyonunu azaltıcı etkiye sahip olan trapidil uygulamasının, overlerde I/R grubuna göre CAT aktivitesini artırdığını rapor etmişlerdir. Yazarlar, I/R sonrası antioksidan enzim aktivitelerinde meydana gelen düşümü,

antioksidan savunma mekanizmasının bozulmasına dayandırmışlardır. Fakat şu da bilinmektedir ki hücreler oksidatif strese maruz kaldıklarında, savunma mekanizması olarak antioksidan enzimlerinin hem aktivitelerinde hem de gen ifadelerinde bir artışa gitmektedir. Literatürde bildirildiğine göre, çok aşırı miktarda oksidatif strese maruz kalan hücrelerde bu mekanizma bozularak hücrelerin antioksidan enzim aktivitesinde ve bu enzimlerin gen ifadelerinde bir azalma görülebilmekte iken, orta şiddetdeki oksidatif stres hücrelerde, antioksidan enzim aktiviteleri ve gen ifadelerini artırmaktadır [77]. Nitekim çalışmamızdaki sonuçlara çok benzer şekilde İşlekel ve ark.'nın [78], fare beyin dokusunda antioksidan enzim aktivitelerindeki değişimleri araştırdıkları bir çalışmada, iskemi-reperfüzyon sonrasında GSH-Px aktivitesinde bir düşüş bulurlarken, CAT aktivitesinde dramatik bir artışla karşılaşmışlardır. Diğer taraftan, iskemi-reperfüzyonu takiben antioksidan enzim aktiviteleriyle ilgili yapılan değişik çalışmalarda, antioksidan enzim aktivitelerinin farklılık gösterdiği de bildirilmektedir. Örneğin, Koltuksuz ve ark.'nın [65], barsak iskemi ve iskemi/reperfüzyonu ile ilgili kurguladıkları model çalışmalarında, farklı ve ilginç olarak, iskemi/reperfüzyon sonrası CAT aktivitesinde düşüş gözlerlerken, iskemi sonrası CAT aktivitesinde bir artış bulmuşlar, CAPE uygulamasıyla iskemi sonrası artan CAT aktivitesinde bir düşüş olduğunu bildirmişlerdir. İlhan ve ark. [47], omurilik iskemi/reperfüzyon uygulama sonrası bu dokudaki CAT aktivitesinde bir düşüş olduğunu ve bunun CAPE uygulaması ile normal seviyelere çekildiğini bildirmişlerdir. CAT ve diğer antioksidan enzim aktivitelerindeki düşüşün, ortamdaki ROT tarafından bu enzimlerin inaktivasyonu ile ilgili olabileceği belirtilmektedir. Araştırma sonuçlarımıza paralel olarak Filho ve ark. [59], testis torsiyon/detorsiyonunda, lipid peroksidasyonu ile birlikte testislerde, SOD ve CAT aktivitelerinde farklı şekilde değişimler olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, CAT aktivitesinin iskemi/reperfüzyon sonrası arttığını bulurlarken, SOD aktivitesinde herhangi bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir. Altuğ ve ark. [66], lokal beyin iskemisinin CAT aktivitesinde önemli olmayan bir artışa sebep olduğunu, CAPE uygulamasının ise artan beyin CAT aktivitesini azalttığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar CAPE'nin bu etkisini, antioksidan ve radikal süpürücü etkisine bağlamışlardır. Aynı şekilde oksidatif strese ve ROT üretimine yol açan florid zehirlenmesinde CAT

aktivitesinin yükseldiği, bu yükselişin CAPE ile önlendiği bildirilmiştir. CAPE'nin, antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkisi tam olarak bilinmemekle beraber etki mekanizmasına yönelik değerlendirmelerde, CAPE'nin toksik oksidatif ürünleri önleyerek, bu ürünlerin neden olacağı enzim indüksiyonunu önleyebileceği gibi, doğrudan bu antioksidan enzimlerin gen seviyelerinde transkripsiyonel veya translasyonel safhalarda etkili olabileceği belirtilmiştir [79].

Çalışmamızda, torsiyon/detorsiyona maruz kalmış over grubundaki GSH-Px aktivitesinin, hem S hem de CAPE grubuna göre düştüğü gözlendi. C+I/R grubunda, Tavşanlara CAPE uygulaması, düşen GSH-Px enzim aktivitesini S veya CAPE grubundaki değerler düzeyine getirmiştir. Benzer şekilde, rat derisinde oluşturulan iskemi/reperfüzyon hasarında CAPE'nin bu enzim aktivitesini yükselttiği bildirilmektedir [80]. Bir başka çalışmada ise, karaciğerde oluşturulan iskemi ve iskemi/reperfüzyon hasarına bağlı olarak selenyum bağımlı-GSH-Px ve selenyum bağımsız GSH-Px aktivitelerinde düşme olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada böbreklerde yapılan iskemide, selenyum bağımlı GSH-Px aktivitesinde ilk 2 ve 8. saatlerde değişim olmazken, 4. saatde bir artma görülmüştür. Bununla birlikte, selenyum bağımsız GSH-Px aktivitesi yine böbreklerde ilk 4 saatde değişmezken 8. saatte bir artış göstermiştir [60]. Tavşan ovaryumlarında oluşturulan iskemi/reperfüzyon modeli sonrası ovaryum GSH-Px aktivitesinde düşme olduğu ve bu düşüşün trapidil ile engellenerek kontrol seviyesine yükseltildiği bildirilmiştir [40]. Araştırmamızda, CAPE uygulamasıyla gözlenen GSH-Px aktivitesindeki artış, CAPE'nin GSH seviyesi üzerindeki yükseltici etkisi ile ilgili olabilir. Çünkü GSH-Px koenzim olarak GSH'a ihtiyaç duyar. GSH miktarındaki artış muhtemelen GSH-Px enzim aktivitesindeki artışı desteklemiş olabilir [81].

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen veriler ışığı altında tavşan overlerinde oluşturulan iskemi/reperfüzyonun bu organda ROT kaynaklı bir oksidatif strese ve lipid peroksidasyonuna neden olduğu gösterildi. Bu modelde, CAPE'nin uygulanması, oksidatif stresi ve lipid peroksidasyonunu önleyerek doku hasarını azaltmıştır. Klinik

olarak ovaryum torsiyonunda etkin tedavi, cerrahi girişimle torsiyonun dzltilmesi olmasına rağmen, cerrahi müdahaleye ek olarak bu safhada uygulanacak olan CAPE gibi antioksidan maddelerle detorsiyonla oluşabilecek hasar azaltılabilir. Sonuç olarak, ovaryum torsiyon/detorsiyon hasarına karşı CAPE'nin iyileştirici etkiye sahip olduğu tespit edildi.

6. KAYNAKLAR

1. Hibbard, L. T., “Adnexal torsion”, *Am J Obstet Gynecol*, 152: 456-461, (1985).
2. Bulkley, G. B., “Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review”, *Br J Cancer Suppl.*, 8: 66-73, (1987).
3. Zimmerman, B. J. and Granger, D. N., “Mechanisms of reperfusion injury”, *Am J Med Sci*, 307: 284-292, (1994).
4. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M., “Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts”, *Arch Biochem Biophys*, 246: 501-514, (1986).
5. McCord, J. M., “Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury”, *N Engl J Med*, 312: 159-163, (1985).
6. Fridovich, I., “Superoxide radical: an endogenous toxicant”, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 23: 239-257, (1983).
7. Bayer, A. I. and Wiskind, A.K., “Adnexal torsion: can the adnexa be saved?”, *Am J Obstet Gynecol.*, 171: 1506-1510; discussion 1510-1501, (1994).
8. Kilinc, K., “Oksijen radikalleri: üretilmeleri, fonksiyonlari ve toksik etkileri”, *Biyokimya Dergisi*, X: 60-89, (1985).
9. Kumaran, A. and Karunakaran, R. J., “Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*”, *Food Chem*, 97: 109-114, (2006).
10. Sagsoz, N *et al.* “Ischaemia-reperfusion injury of rat ovary and the effects of vitamin C, mannitol and verapamil”, *Hum Reprod*, 17: 2972-2976, (2002).

11. Celik, O *vd.* “The protective effect of caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury in rat ovary”, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 117: 183-188, (2004).
12. Turkoz, Y *vd.* “Melatonin reduces torsion-detorsion injury in rat ovary: biochemical and histopathologic evaluation”, *J Pineal Res*, 37: 137-141, (2004).
13. Elmali, N *vd.* “Effect of caffeic acid phenethyl ester on cartilage in experimental osteoarthritis”, *Rheumatol Int*, 22: 222-226, (2002).
14. Ozen, S *vd.* “Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats”, *J Appl Toxicol*, 24: 27-35, (2004).
15. www.nuveforum.net/attachments/6921d1220349965-resim14-jpeg (Şubat 2009).
16. Stock, R. J., “Clinicopathologic changes resulting from adnexal torsion”, *J Reprod Med*, 32: 201-207, (1987).
17. Zweizig, S *et al.* “Conservative management of adnexal torsion”, *Am J Obstet Gynecol*, 168: 1791-1795, (1993)
18. Mage, G *et al.* “Laparoscopic management of adnexal torsion. A review of 35 cases”, *J Reprod Med*, 34: 520-524, (1989).
19. Oelsner, G *et al.* “Long-term follow-up of the twisted ischemic adnexa managed by detorsion”, *Fertil Steril*, 60: 976-979, (1993).
20. Wagaman, R. and Williams, R. S., “Conservative therapy for adnexal torsion. A case report”, *J Reprod Med*, 35: 833-834, (1990).
21. Yazici, G *et al.* “Genistein attenuates postischemic ovarian injury in a rat adnexal torsion-detorsion model”, *Fertil Steril*, 87: 391-396, (2007).

22. Southorn, P. A. and Powis, G., "Free radicals in medicine. I. chemical nature and biologic reactions", *Mayo Clin Proc*, 63: 381-389, (1988).
23. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M., "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview", *Methods Enzymol*, 186: 1-85, (1990).
24. de Zwart, L. L *et al.* "Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans", *Free Radic Biol Med*, 26: 202-226, (1999).
25. Nordberg, J. and Arner E. S., "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system", *Free Radic Biol Med*, 31: 1287-1312, (2001).
26. Lee, C. I *et al.* "Regulation of xanthine oxidase by nitric oxide and peroxynitrite", *J Biol Chem*, 275: 9369-9376, (2000).
27. Chung, H. Y *et al.* "Xanthine dehydrogenase xanthine oxidase and oxidative stress", *Age*, 20: 127-140, (1997).
28. Battelli, M. G *et al.* "Effects of hypoxia and ethanol on xanthine oxidase of isolated rat hepatocytes - conversion from D to O form and leakage from cells", *Chem Biol Interact.*, 83: 73-84, (1992).
29. Parks, D *et al.* "Multiple organ dysfunction syndrome: role of xanthine oxidase and nitric oxide", *Pathophysiology*, 5: 49-66, (1998).
30. Vina, J *et al.* "Effect of ethanol on glutathione concentration in isolated hepatocytes", *Biochem J.*, 188: 549-552, (1980).
31. Fernandez-Checa, J. C *et al.* "Oxidative stress and alcoholic liver disease", *Alcohol Health Res World*, 21: 321-324, (1997).
32. Hascalik, S *vd.* "Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, protects from ischemia-reperfusion damage of the ovaries", *Gynecol Obstet Invest*, 57: 218-223, (2004).

33. Uguralp, S *vd.* “Resveratrol reduces ischemia reperfusion injury after experimental testicular torsion” , *Eur J Pediatr Surg*, 15: 114-119, (2005).
34. Machlin, L. J. and Bendich, A., “Free-Radical Tissue-Damage - Protective Role of Antioxidant Nutrients”, *Faseb Journal*, 1: 441-445, (1987).
35. Slater, T. F., “Free radical mechanisms in tissue injury”, *Biochem J*, 222: 1-15, (1984).
36. Usta, U *vd.* “Tissue damage in rat ovaries subjected to torsion and detorsion: effects of L-carnitine and N-acetyl cysteine”, *Pediatr Surg Int*, 24: 567-573, (2008).
37. Rhoden, E. L *et al.* “Effects of L-arginine on the kidney levels of malondialdehyde in rats submitted to renal ischaemia-reperfusion”, *BJU Int*, 88: 273-277, (2001).
38. Yurtcu, M *vd.* “Effects of melatonin on spermatogenesis and testicular ischemia-reperfusion injury after unilateral testicular torsion-detorsion”, *J Pediatr Surg*, 43: 1873-1878, (2008).
39. Pompella, A., “Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation”, *Int J Vitam Nutr Res*, 67: 289-297, (1997).
40. Somuncu, S *vd.* “Ischemia-reperfusion injury of rabbit ovary and protective effect of trapidil: an experimental study”, *Pediatr Surg Int*, 24: 315-318, (2008).
41. Özerol, E *vd.* “ The protective effect of erdosteine on short-term global brain ischemia/reperfusion injury in rats”, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, (2008).
42. Cheeseman, K. H. and Slater, TF., “An introduction to free radical biochemistry”, *Br Med Bull.*, 49: 481-493, (1993).

43. Prieto, P *et al*, "Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E", *Anal Biochem.*, 269: 337-341, (1999).
44. Russo, A *et al*, "Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin", *Fitoterapia*, 73: 21-29, (2002).
45. Wang, X *et al*, "Stability of caffeic acid phenethyl ester and its fluorinated derivative in rat plazma", *Biomed Chromatogr*, 21: 243-350 (2007).
46. Sudina, G. F *et al*, "Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties", *Febs Letters*, 329: 21-24, (1993).
47. Ilhan, A *vd*. "The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits", *Eur J Cardiothorac Surg.*, 16: 458-463, (1999).
48. Hascalik, S *vd*. "Clip Turcica: a new apparatus for experimental ovarian ischemia and reperfusion model in rats", *Fertil Steril*, 84: 219-220, (2005).
49. Ellman G. L., "Tissue sulfhydryl groups", *Arch Biochem Biophys*, 82: 70-77, (1959).
50. Ohkawa, H *et al*, "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction", *Anal Biochem*, 95: 351-358, (1979).
51. Paglia, D. and Valentine, W., "Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase" , *J Lab Clin Med*, 70: 158-169, (1967).
52. Luck, H., "Catalase in Methods of Enzymatic Analysis", *Acad. Press. New York*, X: 885-888, (1963).
53. Lowry, O. H *et al*, "Protein measurement with the Folin phenol reagent", *J Biol Chem*, 193: 265-275, (1951).

54. Anaya-Prado, R *et al*, “Ischemia/reperfusion injury”, *J Surg Res.*, 105: 248-258, (2002).
55. Werns, S. W. and Lucchesi BR., “Free radicals and ischemic tissue injury”, *Trends Pharmacol Sci.*, 11: 161-166, (1990).
56. Li, C. and Jackson, R. M., “Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury”, *Am J Physiol Cell Physiol.*, 282, C227-241, (2002).
57. Terada, L. S., “Hypoxia-reoxygenation increases O₂⁻. efflux which injures endothelial cells by an extracellular mechanism”, *Am J Physiol*, 270: H945-950, (1996).
58. Abramov, A. Y *et al*, “Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation”, *J Neurosci.*, 27: 1129-1138, (2007).
59. Filho, D. W *et al*, “Spermatoc cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury”, *Mol Aspects Med*, 25: 199-210, (2004)
60. Barnard, M. L *et al*, “Antioxidant enzyme status of ischemic and postischemic liver and ischemic kidney in rats”, *Free Radic Biol Med.*, 15: 227-232, (1993).
61. Wei, X *et al*, “Caffeic acid phenethyl ester prevents neonatal hypoxic-ischaemic brain injury”, *Brain*, 127: 2629-2635, (2004).
62. Saavedra-Lopes, M *et al*, “The protective effect of CAPE on hepatic Ischemia/Reperfusion injury in rats”, *J Surg Res*, (2008).
63. Sasaki, M. and Joh, T., “Oxidative stress and ischemia-reperfusion injury in gastrointestinal tract and antioxidant, protective agents”, *J Clin Biochem Nutr*, 40: 1-12, (2007).
64. Reilly, P. M *et al*, “Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites”, *Am J Surg*, 161: 488-503, (1991).

65. Koltuksuz, U *vd.* “Caffeic acid phenethyl ester prevents intestinal reperfusion injury in rats”, *J Pediatr Surg*, 34: 1458-1462, (1999).
66. Altug, M. E *vd.* “Caffeic acid phenethyl ester protects rabbit brains against permanent focal ischemia by antioxidant action: a biochemical and planimetric study”, *Brain Res.*, 1201: 135-142, (2008).
67. Becker, L. B *et al.*, “Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion”, *Am J Physiol.*, 277: H2240-2246, (1999).
68. Parks, D. and Granger, D., “Ischemia-induced vascular changes: role of xanthine oxidase and hydroxyl radicals”, *Am J Physiol*, 245: G285-289, (1983).
69. Cicala, C *et al.*, “Vascular effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on isolated rat thoracic aorta”, *Life Sci*, 73: 73-80, (2003).
70. Park, J. L. and Lucchesi, B. R., “Mechanisms of myocardial reperfusion injury”, *Ann Thorac Surg*, 68: 1905-1912, (1999).
71. Song, Y. S *et al.*, “Caffeic acid phenethyl ester inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity”, *Cancer Lett*, 175: 53-61, (2002).
72. Tan, J *et al.*, “Caffeic acid phenethyl ester possesses potent cardioprotective effects in a rabbit model of acute myocardial ischemia-reperfusion injury”, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289: H2265-2271, (2005).
73. Fridovich, I., “The biology of oxygen radicals”, *Science*, 201: 875-880, (1978).
74. Wu, G *et al.*, “Glutathione metabolism and its implications for health”, *J Nutr*, 134: 489-492, (2004).
75. Gilmont, R. R *et al.*, “Effects of glutathione depletion on oxidant-induced endothelial cell injury”, *J Surg Res*, 80: 62-68, (1998).

76. Fukuzawa, K *et al*, “N-acetylcysteine ameliorates reperfusion injury after warm hepatic ischemia”, *Transplantation*, 59: 6-9, (1995).
77. Rodriguez, C *et al*, “ Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin”, *J Pineal Res*, 36: 1-9, (2004).
78. Islekel, S *vd*. “Alterations in superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in experimental cerebral ischemia-reperfusion”, *Res Exp Med (Berl)*, 199: 167-176, (1999).
79. Guney, M *vd*. “Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on fluoride-induced oxidative stress and apoptosis in rat endometrium”, *Environ Toxicol Pharmacol*, 24: 86-91, (2007).
80. Aydogan, H *vd*. “Beneficial effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on the ischaemia-reperfusion injury in rat skin flaps”, *J Plast Reconstr Aesthet Surg.*, 60: 563-568, (2007).
81. James, L. P *et al*, “Acetaminophen-induced hepatotoxicity”, *Drug Metab Dispos*, 31, 1499-1506, (2003).

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Orhan DOĞAN

Doğum Yeri : Kayseri

Doğum Tarihi : 13.01.1985

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Melikgazi Lisesi–2002

Lisans : Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü–2007

Yüksek Lisans : Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü–2009