



**OVER İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİ OLUŞTURULAN
SIÇANLARDA VİTEKSİN'İN ETKİSİNİN HİSTOKİMYASAL,
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL VE BİYOKİMYASAL
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Özlem ÖZGÜL ABUÇ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Tuba DEMİRCİ**

Doktora Tezi-2020

**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OVER İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİ
OLUŞTURULAN SIÇANLARDA VİTEKSİN'İN
ETKİSİNİN HİSTOKİMYASAL,
İMMUNOHİSTOKİMYASAL VE BİYOKİMYASAL
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Özlem ÖZGÜL ABUÇ

**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Tuba DEMİRCİ**

**ERZURUM
2020**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**OVER İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİ OLUŞTURULAN
SIÇANLARDA VİTEKSİN'İN ETKİSİNİN HİSTOKİMYASAL
İMMUNOHİSTOKİMYASAL VE BİYOKİMYASAL
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Özlem ÖZGÜL ABUÇ

Tez Savunma Tarihi : 23.01.2020

Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Tuba DEMİRCİ (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Osman Nuri KELEŞ (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Nurinnisa ÖZTÜRK (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Nurhan ERKAYA (Aksaray Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Tolga MERCANTEPE (Recep Tayyip
Erdoğan Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Duygu ARIKAN
Enstitü Müdürü

Doktora Tezi
ERZURUM - 2020

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. Over Anatomisi ve Fizyolojisi.....	7
2.1.1. Over Anjiyogenezi.....	8
2.2. Over Embriyolojisi	8
2.3. Over Histolojisi.....	10
2.4. Ovaryum Torsiyon ve Detorsiyonu	11
2.5. İskemi ve Reperfüzyon (İR)	12
2.5.1. İskemi.....	12
2.5.2. Reperfüzyon.....	13
2.5.2.1. İnflamatuar Yanıt.....	14
2.5.2.2. Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistemler	17
2.5.3. Apoptozis: Programlı Hücre Ölümü	20
2.5.3.1 Apoptotik Marker Kaspaz-3	20
2.5.4. Otofaji	21
2.5.4.1. Beclin-1.....	23
2.5.4.2. BNIP-3	24
2.5.4.3. Bcl-2.....	25

2.5.5. Viteksin.....	25
3. MATERYAL VE METOD	28
3.1. Etik Kurul Onayı.....	28
3.2. Deneklerin Temin Edilmesi ve Deney Gruplarının Oluşturulması	28
3.2.1. Deneklerin Temin Edilmesi	28
3.2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	28
3.3. Cerrahi İşlemler ve Deney Modelinin Oluşturulması.....	28
3.4. Histolojik Analiz.....	30
3.4.1. Doku takibi ve Hematoksilen-Eozin Boyama Prosedürü	30
3.4.2. İmmunohistokimyasal Analizler	31
3.5. Biyokimyasal Analiz.....	33
3.6. İstatistiksel Analiz.....	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. Işık Mikroskopik Bulgular	35
4.1.1. H-E Boyama ile Elde Edilen Bulgular.....	35
4.1.2. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	38
4.2. Biyokimyasal Bulgular	54
4.2.1. Malondialdehit (MDA)	54
4.2.2. Süperoksid Dismutaz (SOD)	56
4.2.3. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG).....	58
5. TARTIşMA.....	61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	68
KAYNAKLAR	69
EKLER	99
EK-1. ÖZGEÇMİş	99

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU 100

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU 101



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi, beceri ve deneyimleriyle bana yol gösteren, her zaman yanımda olan saygı değer hocam, tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Tuba DEMİRCİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte bana her zaman destek olan Anabilim Dalı Başkanı hocam; sayın Doç. Dr. Osman Nuri KELEŞ'e, tez çalışmamın deney aşamasında yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Erdem Toktay, Arş. Gör. Muhammet Ali Gürbüz, Arş. Gör. Elif Erbaş, Arş. Gör. Tuğba BAL, Arş. Gör. Raziye Alaca, Arş. Gör. Merve Kaygısız ve Fatma Aksoy'a, biyokimyasal analizleri yapan sayın hocam Doç. Dr. Nurinnisa Öztürk'e teşekkür ederim. Bu çalışmayı **TDK-2019-7433 BAP** numarasıyla destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne, katkıları ve desteklerinden ötürü Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli yönetici ve personeline, tüm hayatım boyunca sevgilerini ve desteklerini benden esirgemeyen aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Özlem Özgül ABUÇ

ÖZET

Over İskemi-Reperfüzyon Modeli Oluşturulan Sıçanlarda Viteksin'in Etkisinin Histokimyasal, İmmünohistokimyasal ve Biyokimyasal Yöntemlerle Araştırılması

Amaç: Over İR hasarı dişilerde üreme yeteneğini etkileyen önemli bir sağlık sorunu sorunudur. Bu yüzden erken tanı konulması ve tedaviye en kısa sürede başlanması önemli rol oynamaktadır. Viteksin, antioksidan, anti-kanser ve anti-inflamatuar etkileri olan bir flavonoidtir. Bu çalışmada; dişi sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan over İR modelinde viteksinin olası etkilerinin histolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle araştırılması amaçlandı.

Materyal ve Metot: Çalışmada, 40 adet Sprague-Dawley cinsi dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar, sham, 3 saat over iskemi+3 saat reperfüzyon, 3 saat over iskemi+3 saat reperfüzyon (1 ml serum fizyolojik i.p), 3 saat over iskemi+3 saat reperfüzyon (15mg/kg viteksin i.p) ve 3 saat over iskemi+3 saat reperfüzyon (30mg/kg viteksin i.p) şeklinde beş gruba ayrıldı. Sıçanlara over İR modeli uygulandı ve belirlenen dozlarda viteksin uygulamaları gerçekleştirildi. Deney sonunda, sıçanlardan alınan over dokularında histokimyasal, immünohistokimyasal ve biyokimyasal incelemeler yapıldı.

Bulgular: İR gruplarına ait overlerin H-E ile boyanmış kesitleri ışık mikroskopik olarak incelendiğinde vasküler konjesyon ve yoğun hemoraji alanları belirlendi, viteksin uygulanan gruplarda konjesyon belirgin şekilde azalmıştı ve hemoraji minimal düzeydeydi. İmmünohistokimyasal olarak, İR gruplarında IL-6, Beclin-1, BNIP-3 ve kaspaz-3 immunreaktivitesinin belirgin şekilde arttığı, Bcl-2 immunreaktivitesinin azaldığı gözlemlendi. Viteksin uygulanmasının kaspaz-3, IL-6, BNIP-3 ve Beclin-1 ekspresyonunu azalttığı ve Bcl-2 ekspresyonunu artırdığı belirlendi. Biyokimyasal parametreler değerlendirildiğinde, MDA ve 8-OHdG seviyesinin İR hasarında anlamlı derecede arttığı, SOD seviyesinin azaldığı saptandı. Viteksin uygulanmasının ise bu değerleri sham grubundaki değerlere yaklaştırdığı belirlendi.

Sonuç: Elde ettiğimiz bulgular ışığında, viteksinin inflamasyon, oksidatif stres, otofaji ve apoptozu azaltarak sıçan over İR hasarında tedavi edici etkisinin olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, İskemi-reperfüzyon hasarı, Otofaji, Over, Viteksin

ABSTRACT

Investigation of the Effect of Vitexin on Rats with Ovarian Ischemia-Reperfusion Model via Histochemical, Immunohistochemical and Biochemical Methods

Aim: Ovarian IR damage is a significant health problem that affects the reproductive ability in females. Therefore, early diagnosis and treatment as soon as possible play an important role. Vitexin is a flavonoid with antioxidant, anti-cancer and anti-inflammatory effects. In this study, it was aimed to investigate the possible effects of vitexin on histological, immunohistochemical and biochemical methods in ovarian IR model experimentally created in female rats.

Materials and Methods: Forty Sprague-Dawley rats were used in this study. Rats were divided into five groups as sham, 3 hours ovarian ischemia + 3 hours reperfusion, 3 hours ovarian ischemia + 3 hours reperfusion (1 ml saline), 3 hours ovarian ischemia + 3 hours reperfusion (15mg/kg vitexin) and 3 hours ovarian ischemia + 3 hours reperfusion (30 mg/kg intraperitoneal vitexin). Rats were applied ovarian IR model, and vitexin applications were performed at determined doses. At the end of the experiment, histochemical, immunohistochemical and biochemical examinations were performed on taken ovarian tissues.

Results: When H-E stained sections of the ovaries of the IR groups were examined microscopically, the areas of vascular congestion and severe hemorrhage were determined. Congestion was significantly reduced, and hemorrhage was minimal in the groups which vitexin was applied. Immunohistochemically, it was observed that IL-6, Beclin-1, BNIP-3 and caspase-3 immunoreactivity increased significantly, and Bcl-2 immunoreactivity decreased in IR groups. It was determined that administration of vitexin reduced IL-6, Beclin-1, BNIP-3 and caspase-3 expression and Bcl-2 expression increased. When biochemical parameters were evaluated, it was found that MDA and 8-OHdG levels increased and SOD levels decreased significantly in IR damage. It was detected that the application of vitexin brought these values closer to the values in the sham group.

Conclusion: In the light of our findings, it was concluded that vitexin might have a therapeutic effect on rat ovarian IR damage by reducing inflammation, oxidative stress, autophagy and apoptosis.

KeyWords: Apoptosis, Autophagy, Ischemia-reperfusion injury, Ovary, Vitexin

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATADEM	: Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi
ATG	: Otofaji ile ilgili protein
Ca⁺²	: Kalsiyum
CASPAS	: Sistein aspartat spesifik proteaz
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
GnRH	: Gonadotropin Serbestleştirici Hormon
H-E	: Hematoksilen ve Eozin
HSP	: Isı Şoku Proteini
IR	: İskemi-reperfüzyon
LH	: Luteinizan Hormon
MCP	: Monosit Kemoatraktan Protein
MDA	: Malondialdehit
MEF	: Embriyonik Fibroblast Hücreleri
HSG	: Homeobox A 10
mTOR	: Rapamisin Memeli Hedefi
Na-K	: Sodyum-potasyum
NO	: Nitrik Oksit
PMNL	: Polimorf Nüveli Lökositler
PI3K	: Fosfotidilinositol-3 kinaz
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
8-OHdG	: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin
USG	: Ultrasonografi
ULK	: Unc5-benzeri kinaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 4.1. Sham grubundaki sıçanlardan elde edilen over kesitinin ışık mikrografı	35
Şekil 4.2. İR grubundaki sıçanlardan elde edilen over kesitinin ışık mikrografı	36
Şekil 4.3. İR-SF grubundaki sıçanlardan elde edilen over kesitinin ışık mikrografı.....	36
Şekil 4.4. İR-15V grubundaki sıçanlardan elde edilen over kesitinin ışık mikrografı ...	37
Şekil 4.5. İR-30V grubundaki sıçanlardan elde edilen over kesitinin ışık mikrografı ...	37
Şekil 4.6. Sham grubundaki sıçanların over dokusunda IL-6 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrograf.	38
Şekil 4.7. Sham grubundaki sıçanların over dokusunda Beclin-1 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrograf	39
Şekil 4.8. Sham grubundaki sıçanların over dokusunda BNIP-3 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrograf	39
Şekil 4.9. Sham grubundaki sıçanların over dokusunda Bcl-2 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrograf	40
Şekil 4.10. Sham grubundaki sıçanların over dokusunda kaspaz-3 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrograf	40
Şekil 4.11. İR grubundaki sıçanların over dokusunda IL-6 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrograf.....	41
Şekil 4.12. İR grubundaki sıçanların over dokusunda Beclin-1 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrograf	42
Şekil 4.13. İR grubundaki sıçanların over dokusunda BNIP-3 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrograf.	42
Şekil 4.14. İR grubundaki sıçanların over dokusunda Bcl-2 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrograf.....	43

Şekil 4.15. İR grubundaki sıçanların over dokusunda kaspaz-3 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrograf.	43
Şekil 4.16. İR-SF grubundaki sıçanların over dokusunda IL-6 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrograf	44
Şekil 4.17. İR-SF grubundaki sıçanların over dokusunda Beclin-1 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrograf.	45
Şekil 4.18. İR-SF grubundaki sıçanların over dokusunda BNIP-3 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrograf	46
Şekil 4.19. İR-SF grubundaki sıçanların over dokusunda Bcl-2 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrograf.	46
Şekil 4.20. İR-SF grubundaki sıçanların over dokusunda kaspaz-3 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrograf	47
Şekil 4.21. İR-15V grubundaki sıçanların over dokusunda IL-6 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrograf	48
Şekil 4.22. İR-15V grubundaki sıçanların over dokusunda Beclin-1 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrograf.	48
Şekil 4.23. İR-15V grubundaki sıçanların over dokusunda BNIP-3 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrograf.	49
Şekil 4.24. İR-15V grubundaki sıçanların over dokusunda Bcl-2 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrograf	50
Şekil 4.25. İR-15V grubundaki sıçanların over dokusunda kaspaz-3 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrograf.	50
Şekil 4.26. İR-30V grubundaki sıçanların over dokusunda IL-6 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrograf.	51

Şekil 4.27. İR-30V grubundaki sıçanların over dokusunda Beclin-1 immün pozitifliğini gösteren ışık mikroskop.	51
Şekil 4.28. İR-30V grubundaki sıçanların over dokusunda BNIP-3 immün pozitifliğini gösteren ışık mikroskop.	52
Şekil 4.29. İR-30V grubundaki sıçanların over dokusunda Bcl-2 immün pozitifliğini gösteren ışık mikroskop.	53
Şekil 4.30. İR-30V grubundaki sıçanların over dokusunda kaspaz-3 immün pozitifliğini gösteren ışık mikroskop.	53
Şekil 4.31. Over dokusu MDA seviyelerini gösteren grafik. * kontrol ve diğer gruplar arasındaki farklılıkları belirtir	55
Şekil 4.32. Serum MDA seviyelerini gösteren grafik	56
Şekil 4.33. Over dokusu SOD seviyelerini gösteren grafik.....	57
Şekil 4.34. Serum SOD seviyelerini gösteren grafik.....	58
Şekil 4.35. Over dokusu 8-OHdG seviyelerini gösteren grafik.....	59
Şekil 4.36. Serum 8-OHdG seviyelerini gösteren grafik.....	59

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No

Sayfa No

Tablo 4.1. İmmünohistokimyasal boyama sonuçları skorlama tablosu 54

Tablo 4.2. Gruplara ait biyokimyasal parametreler (ortalama±standart sapma)..... 60



1. GİRİŞ

Over torsiyonu, doğurganlık çağındaki kadınlarda sık görülen ve cerrahi işlem gerektiren bir problemdir.¹ Overin etrafında bulunan, içinde overin arteriyel ve venöz damarlarının bulunduğu destekleyici ligamentlerin bükülmesi veya kendi etrafında dönüşleri sonucu, over arterinin tıkanmasına bağlı olarak meydana gelen ve iskemi ile sonuçlanan bir durumdur.² Bu durum kan akışındaki azalmaya bağlı olarak hayatı tehdit eden kalıcı doku hasarına neden olur.¹ Over torsiyonu sonucu, bükülmüş adneksin detorsiyonu ve doku reperfüzyonunun değerlendirilmesi, kısırlığın önlenmesi açısından büyük önem taşır.³ Over torsiyon-detorsiyon işlemi, iskemi-reperfüzyon (İR) hasarı olarak adlandırılır.⁴

Schwartz ve Merker'in hücre ölümünü yapısal olarak ele alan çalışmalarına ek olarak Clarke, doğal olarak gelişen hücre ölümü ve toksine maruz kalma sonucu oluşan üç tip hücre ölümü varlığından bahsetmiştir. Clarke; apoptozu tip I hücre ölümü, otofajiyi tip II hücre ölümü, lizozoma bağlı olmayan hücre ölümünde tip III programlı hücre ölümü şeklinde tanımlamıştır.^{5, 6} Otofaji, tip II programlı hücre ölümü olup; organogenezde, metabolizmada, hücre farklılaşması ve ölümünde, yaşlanmada, bağışıklık sisteminde ve hücre içi patojenlerin yok edilmesinde önemli bir rol oynamaktadır.^{7,8} Otofajiye bağlı hücre ölümünde, iki veya daha fazla sayıda zarla çevrili sitoplazma parçaları ile endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi organelleri içeren keseciklerin oluşması en belirgin morfolojik değişikliktir.^{9, 10} Otofajinin farklı aşamalarında, 30'a yakın gen rol oynar ve bu genler, otofajik veziküllerin lizozomlarla birleşmesini ve parçalanmasını sağlar. Ayrıca vezikül oluşumunda ve genişlemesinde de görev alırlar.¹¹ Son yıllarda yapılan çalışmalarda, otofaji başlatma sürecinde ULK1 ve Beclin 1'in iki anahtar kompleks olarak otofajiye aracılık ettiği gösterilmiştir.¹² Mayada filogenetik olarak otofajik fonksiyonları korunmuş ATG genleri üzerinde yoğun olarak

alışılmıştır.^{13, 14} Bu ailenin en önemli üyelerinden biri ATG 6'nın memelilerdeki homoloğu Beclin 1'dir.^{15, 16} Moleküler düzeyde apoptoz ve otofaji arasındaki karşılıklı etkileşim anlaşılmaya başlanmış ve bazı faktörler her iki yolun ortak düzenleyicileri olarak tanımlanmıştır. Anti-apoptotik yapıda Bcl-2 ve Bcl-XL proteinleri hem apoptoz hemde otofaji mekanizmasını baskılayabilmektedirler. Beclin-1 üzerindeki BH3 alanına, Bcl-2 ya da Bcl-XL bağlanabilmekte ve Beclin-1'in otofaji üzerindeki etkisini yok edebilmektedir.^{17, 18} Apoptoz ve hipokside rol alan Bcl-2 protein ailesinden olan BNIP-3'ün otofajiyi aktive ettiği ve çoğu sistemde Beclin-1 ile etkileştikleri ortaya konmuştur.¹⁹ Ayrıca otofaji mekanizmasının düzenlenmesinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) etkili olduğu gösterilmiştir.²⁰ Buna ek olarak hücrede çok fazla ROS birikimi, katalaz denilen ROS yakalayıcı enzimin otofaji sonucu yok olmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak otofaji ile katalazın yok edilmesi ile ROS birikiminin hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir.²¹ Bazal otofaji seviyelerinin varlığı, hücrelerin açlık veya hipoksi gibi stres dönemlerinde enerji taleplerini karşılamak için hücre içi materyalleri sindirebileceklerini gösterir. Akut organ yaralanmasında ve reperfüzyon gibi ağır koşullar altında hücrelerin ölümüne neden olabilecek otofajik vakuol birikimi görülür. Yapılan bir çalışmada otofajinin; nöronal iskemi sonrası protein agregatlarının veya hasarlı organellerin yok edilmesinde etkili olduğu bildirilmiştir. Otofajinin yetersiz olması durumunda hücrede, protein agregatı ve hasarlı organellerin birikimi gözlenmiştir.²² Sıçan akciğerinde deneysel İR modeli kullanılarak yapılan bir çalışmada; 3-metil adenin (3-MA) otofajiyi inhibe edebileceği, akciğer dokusunda otofaji ile apoptozu azaltabileceği ve akciğer fonksiyonunu iyileştirebileceği ortaya konmuştur. Buna bağlı olarak İR, akciğer dokusunda otofaji seviyesini arttırdığını, aşırı otofajinin hücre içi homeostazı tahrip edip apoptozu indüklediğini ve İR'yi ağırlaştırdığını gösterir.²³ Bununla birlikte, Suzuki ve arkadaşları, otofajiyi inhibe etmek için 3-MA kullanımının böbrek tübül hücrelerinde

apoptozu ve İR hasarını arttırdığını bulmuşlardır.²⁴ İn vivo ve in vitro olarak yapılan çalışmalarda, otofajinin kardiyak İR üzerindeki koruyucu etkileri rapor edilmiştir^{25, 26} Ancak yapılan bir diğer çalışmada da yüksek düzeyde otofaji seviyesinin kardiyak İR hasarını artırabileceği gösterilmiştir.²⁷ Beyin, karaciğer, kalp ve böbrek gibi dokularda deneysel olarak oluşturulan İR hasarında, belirli otofaji seviyesinin apoptozu başarıyla düzenleyerek akut İR hasarını azalttığı gözlemlenmiştir.^{28, 29}

Bcl-2 etkileşimli protein olan Beclin 1, otofajinin regülasyonunda rol oynayan memeli proteinidir.³⁰ Beclin 1 ayrıca Bcl-2 ve Bcl-xL veya Mcl-1 gibi diğer Bcl-2 homologları ile etkileşime giren BH3 alanına sahip proteindir.³¹ Yapılan bir çalışmada Beclin 1'in BH3 bölgesinin veya Bcl-2'nin BH3 reseptör alanının mutasyonu sonucu Beclin 1'e bağlı otofaji engelinin ortadan kalktığı görülmüştür. Ayrıca Bcl-2 protein ailesinden olan BNIP-3'ün hipoksi ve apoptozda rol oynadığı, Beclin-1 ile etkileşerek otofajiyi aktive ettiği ortaya konmuştur.¹⁹ Yapılan bir çalışmada hipoksi durumunda BNIP-3'ün; Beclin 1'i Bcl-2 / Beclin 1 kompleksinden uzaklaştırarak Beclin 1'i serbest bırakarak otofajiyi başlattığı ortaya konmuştur.^{32, 33}

Özellikle apoptotik hücre ölümünün inhibe edildiği durumlarda otofaji aktive olarak, hücrelerin ölümüne yol açabilir. Ayrıca, otofaji ve apoptoz arasında üç farklı ilişki ortaya konmuştur. Otofaji ile apoptoz beraber hücre ölümüne neden olabileceği gibi, otofaji apoptozu inhibe ederek hücrenin yaşamasını sağlayabilir veya apoptoz için ön durum olabilir.³⁴ Otofaji ve apoptoz arasındaki bağlantıyı içeren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Etopositin; apoptozu artırarak fare embriyonik fibroblast hücrelerinde (MEF), seramidin ise kolon ve meme karsinomalarında ve TRAIL reseptörü-2' nin; kanser hücrelerinde, apoptoz ile otofajinin birlikte aktivasyonuna neden olduğu ortaya konmuştur.^{35, 36}

Otofaji ve apoptoz bazı durumlarda hücrede, birbirine ters etkiler yapabilmektedir. Bu durumda, otofaji zıt mekanizma olarak çalışarak, apoptozun durdurulmasına neden olmaktadır.³⁷ Beyin, karaciğer, kalp ve böbrek gibi dokularda yapılan iskemi reperfüzyon hasarında, otofaji mekanizmasının apoptozu başarıyla düzenleyerek akut iskemi reperfüzyon hasarını azalttığı gözlemlenmiştir.^{28, 29}

Literatürde, İR hasarının oluşumunda oksidan/antioksidan maddelerin, proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinlerin de rolü olduğu rapor edilmiştir.³⁸ İskemi-reperfüzyon hasarı, nekroz, hücre apoptozu, iltihap hücrelerinin çoğalması, doku ve hücre hasarına yol açan aktif maddelerin salınımını içeren hücresel olayları takiben ortaya çıkar.³⁹ Yapılan bir çalışmada detorsiyon işlemi sonrasında over dokusunda, serbest oksijen radikallerin ve TNF- α gibi çeşitli sitokinlerin arttığı izlenmiştir.⁴⁰ Artmış serbest radikallerin, mitokondrial lipit ve hücre membranı peroksidasyonuna neden olarak, iskemik doku hasarını artırdığı ortaya konmuştur.⁴¹ Son çalışmalarda, over İR hasarında over dokusunda LPO ve kaspaz 3 düzeylerinin belirgin bir şekilde arttığı, oksidatif stresin biyo belirteçlerinden olan malondialdehitin (MDA) salındığı gösterilmiştir.⁴² Yuan ve ark'ının yaptığı deneysel bir çalışmada; hepatik İR hasarı oluşturulan gruplarda oksidatif stres belirteçlerinden olan MDA düzeylerinin yükseldiği, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz aktivitelerinin azaldığı gösterilmiştir.⁴³ İskemi-reperfüzyon hasarının giderilmesine yönelik antioksidan, anti-inflamatuvar ve kalsiyum kanallarını inhibe eden ilaçların kullanıldığı birçok çalışma bulunmaktadır.⁴⁴ Dolayısıyla İR hasarından korunmak amacıyla antioksidan ve anti-inflamatuvar farmakolojik ajanların reperfüzyon sırasında veya öncesinde kullanımının yararlı olabileceği düşünülmektedir.⁴⁵

Viteksin; mimoza, alıç, bambu, maş fasulyesi, buğday yaprakları ve hayat ağacı gibi çeşitli şifalı bitkilerin tohumlarında, meyvelerinde, çiçeklerinde, yapraklarında ve köklerinde bulunan, antitümör, antioksidan, antivirüs, antienflamatuvar ve antibakteriyel

etkiler gibi birçok farmakolojik etkileri olan doğal olarak elde edilmiş bir flavonoiddir.⁴⁶

⁴⁷ Yapılan bir çalışmada solucanlarda, viteksin maddesinin süperoksit dismutaz-3 (SOD-3) ve ısı şoku proteini (HSP) gibi bazı oksidan strese dirençli proteinleri arttırdığı ve doza bağlı bir şekilde hücre içi ROS'da azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir.⁴⁸ İn vivo çalışmalarda, viteksinin, akciğerde ve periton boşluğunda nötrofil infiltrasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir.⁴⁹ Karagenan ile indüklenen bir plörezi fare modelinde, viteksinin (10 mg / kg), plevral sıvıda TNF- α ve IL-17 seviyelerini önemli ölçüde azalttığı ortaya konmuştur.⁵⁰ Miyokard kaynaklı İR hasarında MDA, SOD ve NADPH gibi oksidatif stres belirteçleri kullanılarak yapılan araştırmada, viteksin tedavisinin miyokard İR kaynaklı MDA oluşumunun azalması ve artmış antioksidan enzimleri olan SOD ve NADPH'nin aktivitesi ile de kanıtlanmıştır.⁵¹ Over İR hasarında özellikle reperfüzyon sonrası oksijenlenmeye bağlı olarak reaktif oksijen moleküllerinin üretilmesi hücreyi ölüme götürmektedir. Hücre ölümü ise genellikle apoptoz ve otofaji şeklinde olmaktadır. Over İR hasarında flavonoidlerin kullanımı ile ilgili yapılan çalışmalar mevcut olmakla birlikte, hala altta yatan mekanizmalar ve biyolojik aktiviteler hakkındaki bilgi çok sınırlı kalmaktadır.⁵² Bir flavonoid olan viteksinin antioksidan, anti-kanser ve anti-inflamatuar etkileri mevcut olup⁵³ miyokardiyal İR hasarında apoptoz ve otofajiyi azalttığı rapor edilmiştir.⁵⁴ Başka bir çalışma, viteksinin, beyin İR yaralanmasına karşı p-ERK1 / 2 regülasyonunu azalttığı, p-JNK ve p-P38 ekspresyonunu artırdığı, ayrıca korteks ve hipokampusda Bcl-2'yi arttırdığı ve Bax ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir.⁵⁵

İskemik hastalıklar ve pek çok hastalıkla bağlantısı olan otofaji ile ilgili araştırmaların önemi gün geçtikçe artmaktadır. Otofaji mekanizmalarının nasıl çalıştığı, hangi sinyal yolları tarafından kontrol edildiğinin aydınlatılması, tanı, takip ve tedavi yöntemlerinin bulunmasına büyük katkı sağlayacaktır. Yaptığımız literatür taramaları sonucunda over iskemi ve reperfüzyon hasarında otofaji mekanizmasının rolü ile birlikte

viteksin maddesinin etkisini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu doktora tez çalışmasında, over İR hasarı üzerinde, viteksin kullanımı sonucu overlerde görülecek histopatolojik değişikliklerin ışık mikroskopik olarak araştırılmasının yanısıra bu dokuda otofaji, apoptoz, inflamasyon ve oksidatif stresle ilişkili olarak gelişebilecek olası değişikliklerin immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak da ortaya konulması mümkün olacaktır. Çalışma sonucunda elde edilecek bulgular, over İR hasarının azaltılması ve hatta tedavisinde yeni protokollerin oluşturulmasına katkıda bulunacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Over Anatomisi ve Fizyolojisi

İnsanlarda ovaryumlar, yaklaşık olarak boyutları 1.5 cm genişliğinde, 1 cm kalınlığında, 3 cm uzunluğunda ve 4-8 gr ağırlığında badem şeklindeki organlardır.⁵⁶⁻
⁵⁸Cavitas pelviste uterusun her iki yanında intraabdominal ve intrapelvik olarak yerleşmiş, rektumun önünde, broad ligamentin arkasında, fossa ovarica içerisinde sağlı sollu bulunan bir çift organdır.⁵⁹ Arteria iliaca interna ile arteria iliaca externa arasında bulunan fossa ovarica, anteriordan, ligamentum uteri, posteriordan ise arteria iliaca interna ve üreterler ile sınırlandırılmış olup peritonla örtülüdür.⁶⁰ Ovaryumların facies lateralis ve facies medialis isimli iki yüzü, extremitas uterina ovarii ve extremitas tubaria ovarii isimli iki ucu ile margo mesovaricus ovarii ve margo liber isimli iki kenarı bulunmaktadır.^{60, 61} Ovaryumlar erkeklerdeki testislerin karşılığıdır. Ovaryumların yüzey kısmı ovulasyondan önce düzgündür, ovulasyondan sonra ise düzgünlük kaybolur.^{57, 58}

Ovaryumlardan salgılanan iki temel hormon vardır, bunlar östrojen ve progesterondur. Östrojen ve progesteron, memelilerde ovülasyonu, üreme hücrelerinin gelişmesini, hamileliğin başlamasını ve devamlılığını sağlarken bununla beraber meme bezlerinin ve ikincil cinsiyet organlarının, gelişmelerini ve büyümelerini kontrol etmektedirler. Hipotalamusta sentezlenen gonadotropin serbestleştirici hormona (GnRH) karşılık olarak ön hipofiz bezinden luteinizan hormon (LH) ve folikül uyarıcı hormon (FSH) ve salgılanmaktadır.⁶²⁻⁶⁵ FSH, foliküler hücrelerden östrojen salgılanmasını ve foliküllerin gelişmesini sağlamaktadır. LH ise yumurtlamayı tetikler ve ovülasyon sonrasında folikülü korpus luteuma dönüştürerek buradan progesteron salgılanmasını sağlar.^{66, 67}

2.1.1. Over Anjiyogenezi

Ovaryumların beslenmesi ve oksijenlenmesi iki önemli arter ile sağlanmaktadır. Bunlardan bir tanesi, uterusun beslenmesinden sorumlu olan uterin arterden ayrılan ramus ovaricus'dur. Diğeri ise abdominal aortadan 1. lumbal vertebra hizasından dallanan, asıcı bağ içindeki ovaryan arterdir. Ovaryan arter, ovaryumun medulla-korteks sınırında dağılım göstererek, organın kanlanmasını sağlar. Bu iki arter mezovaryumda anastomozlaşır ve halka şeklinde kıvrılarak dallanır. Bu halka şeklindeki iki artere heliksin arter denilmektedir. Arterler ovaryumun hilus kısmından girerek pleksus oluştururlar ve bu pleksusdan ayrılan dallar foliküllerin etrafını sararak kılcal bir damar ağı oluştururlar.⁶⁸⁻⁷¹

Ovaryumların venleri ve lenf damarları arterler ile birlikte seyrederler. Ovaryumun lenf damarları 1.lumbal vertebra hizasından para-aortik lenf nodlarına açılmaktadırlar. Venler ise, karın boşluğunda sol ovaryan ven; sol renal vene, sağ ovaryan ven, inferior vena kavaya açılarak kalbe geri dönmektedirler.^{72, 73}

2.2. Over Embriyolojisi

Memelilerde gonadlar embriyogeneze esnasında genital çıkıntı veya ürogenital kabartı olarak adlandırılan alandan gelişirler. Erken embriyonik dönem esnasında erkek ve dişi gonadlara dönüşebilme potansiyeli olduğundan “bipotansiyel” veya “farklılaşmamış” gonad şeklinde isimlendirilirler. Genetik sinyallere göre erkek (testis) veya dişi (ovaryum) gonadları olarak gelişirler. Yolk kesesinden genital çıkıntı bölgesinde primordiyal germ hücreleri kolonize olmadan gonadal farklılaşma oluşmaz. Farelerde primordiyal germ hücrelerinin farklılaşmamış gonadlarda kolonizasyonu ve ürogenital kabartıya yerleşmesi embriyonel dönemin 9,5. ve 11,5. günler arasında oluşur.^{74, 75}

Kolonize olan germ hücreleri mitoz bölünmelere uğrayarak, ovaryumda kist şeklindeki yapıları oluşturur. Bu yapılar oogonia olarak isimlendirilir.⁷⁶ Mitoz bölünme farelerde embriyonal dönemin 13,5. gününde başlar.⁷⁷ Mitoza giren germ hücreleri embriyonal dönemin yaklaşık 17,5. gününde mayoz bölünmenin diploten evresine ulaşarak beklemeye geçerler. Oogonia mitoz bölünmeyle çoğaldığında, tamamlanmamış sitokinezisin sonucu olarak mitotik köprüler oluştururlar. Bu sinsisyum daha sonra cinsiyet kordonlarını ve somatik hücre öncüllerini oluşturmak için bir araya gelip ovaryum foliküllerinin öncüllerine gelişirler.^{78, 79}

İnsanlarda doğumdan önce oluşan germ hücre sinsisyumlarının yıkılması ve primordiyal foliküllerinin oluşması, farelerde farklıdır ve doğumdan sonra oluşur.⁷⁵ Prenatal dönemde sinsisyumların yıkılarak oosit sayısının altı milyondan, bir milyona düşmesi germ hücre kaybıyla ilgilidir.⁷⁹⁻⁸² Doğumdaki toplam primordiyal folikül, üreme dönemi süresince mevcut olan germ hücrelerinin toplamıdır.⁸³

Ovaryumun embriyonel gelişimi sırasında başlangıçta prefoliküler hücreleri ve germ hücrelerini kapsayan ovariyel kordonlar şekillenmektedir. Ovariyel kordonların farklanmasıyla ovaryumun yüzey epiteli oluşurken, ovariyel kordonların çevresindeki intersitisyel bağ dokudaysa mezenşimal hücreler bulunmaktadır. Ovariyel kordonların yıkımıyla prefoliküler hücreler germ hücrelerinin çevresinde yerleşmeye başlarlar. Germ hücrelerinin mayotik profaza girmesiyle çok sayıdaki germ hücresi de apoptoza gider. Mayotik profazda bekleyen germ hücreleriyle onları çevreleyen tek katlı yassı foliküler hücrelerden oluşan foliküller şekillenir. Foliküllerin etrafında mezenşimal hücreler ve bazal membran bulunur. Bu esnadaki oosit, primer oosit; folikül ise primordiyal folikül ismini alır. Primer oosit ovulasyon oluncaya kadar mayozun diploten evresinde beklemektedir.^{84, 85}

2.3. Over Histolojisi

Ovaryumlar, steroidogenez ve oogenez ile endokrin ve ekzokrin fonksiyona sahip badem şeklinde çift organlardır.⁸⁶ Memelilerde ovaryumlar tek katlı kübik ya da tek katlı yassı epitelden oluşan germinal epitel adı verilen hücre tabakasıyla örtülüdür. Germinal epitel viseral peritonun mezotelyumuyla devam eder. Yoğun düzensiz sıkı bağ dokusu bu tabakanın altındadır ve tunika albuginea olarak adlandırılmaktadır. Ovaryum genel olarak medulla ve korteks olmak üzere iki bölüme ayrılır.⁸⁷ Medulla ovaryumun merkezinde bulunmaktadır ve kan ve lenf damarları, sinirler ve gevşek bağ dokusu içermektedir. Ovaryumu askıya alan mezovaryum, medullanın devamıdır. Bu yapı ovaryumun germinal epiteli ve peritonun mezoteli ile kaplanmıştır.⁸⁸

Over korteksi tunika albugineanın hemen altında bulunan ve çok sayıda ovaryan folikülleri ve oositleri, korpus albicans, korpus luteum içerir. Ayrıca gevşek aereolar bir stroma ile örtülüdür.^{89, 90} Fetal gelişimin üçüncü ayında ortaya çıkan primordiyal foliküller, ovaryumda tunika albugineanın hemen altında yer almaktadırlar. Oosit, tek tabaka halinde yassı folikül hücrelerinden oluşur. Primordiyal folikül, gelişmekte olan foliküle dönüştüğünde, oosit büyür ve oositi çevreleyen yassı hücreler çoğalarak kübik şeklini alarak primer foliküle dönüşürler. Oosit büyüdükçe proteinde yapısında olan zona pellusida, folikül hücreleri ile oosit arasında ortaya çıkar.⁹¹ Daha sonra folikül hücreleri mitozla çoğalarak çok katlı primer folikülü meydana getirir.

Folikül epiteli granüloza tabakası olarak adlandırılır. Bu değişiklikler meydana gelirken folikülün etrafını saran stroma farklılaşarak; içte salgı özelliğindeki teka interna ve dışta bağ dokusu ile folikülü çevreleyen teka eksterna olmak üzere iki tabakada oluşur.⁹² Granüloza hücreleri mitozla devam ederken multilaminar özellikteki sekonder folikül (SF) oluşmaya başlar. Folikül genişledikçe granüloza hücreleri 8-12 tabakaya ulaşır, folikül artık son büyüklüğüne ulaşmaya başlar ve granüloza hücrelerinin arasında

sıvı içeren boşluklar oluşur. Sıvı içeren bu boşluklar birleşerek antrum denen tek bir boşluk oluşturur. Bu özelliklerinden dolayı sekonder folikül, antral ya da veziküler folikül olarak da isimlendirilir.⁹³ Folikül boşluğunun genişliğinde artış sonucu oosit granüloza hücrelerinden oluşturulan bir sap ile folikül duvarına bağlanır. Oositi foliküle bağlayan bu yapıya kumulus ooforus adı verilir.⁹⁴ Oositi saran zona pellusida ile oositin etrafındaki granüloza hücreleri birleşerek ve oosite kimlik kazandıran korona radiatayı oluştururlar. Ovaryum içinde atreziye olmuş foliküllere de rastlanmaktadır. Ovülasyonun gerçekleşmesi ile birlikte teka interna hücreleri ve granüloza hücrelerinin tamamı, korpus luteum olarak isimlendirilen steroid hormon salgılayan bir beze değişmeye başlar. Eğer döllenme gerçekleşmemişse korpus luteum geriler. Daha sonra folikül korpus albicans olarak adlandırılan fibrotik dokuya değişir.^{66, 88, 94}

2.4. Ovaryum Torsiyon ve Detorsiyonu

Ovaryum torsiyonu, ovaryumların herhangi bir nedenden dolayı kendi ekseninde etrafında dönmesiyle oluşmaktadır. Torsiyon sonucunda kan akımı kesintiye uğramaktadır. Bir diğer adı adneksiyel torsiyon olarak bilinmektedir. Akut abdominal ağrının nedenlerinden olup, ağır morbidite ile sonuçlanmakta ve seyrek olarak görülmektedir. Acil jinekolojik cerrahi vakaların %2,7'sini oluşturmaktadır.⁹⁵ Ovaryum torsiyonu ilk olarak Sutton tarafından 1890 yılında tespit edilmiştir.⁹⁶

Ovaryum torsiyonunun tanısında abdomenin alt kısmında devamlı ve özel olmayan bir ağrı görülmektedir. Tespit edilemeyen ve gecikmiş tanı oldukça sık olarak görülmekte ve bu durumlar over ile fallopian tüpün kaybına neden olabilmektedir.^{97, 98} Muayene bulguları ve klinik semptomların yanında ultrasonografi (USG) değerlendirmeleri ve renkli doppler çalışmaları ovaryum torsiyonunun tanısında yardımcı olmaktadır. Tanı konulduktan sonra ise acilen cerrahi müdahale yapılmalıdır.⁹⁹

Ovaryum torsiyonunun nedenleri tam olarak bilinmemektedir. Normal şartlarda ovaryumlarda torsiyon görülmesi çok nadir bir durumdur. Olguların çoğunda ovaryumlarda bir kitleye rastlanmaktadır. Özellikle benign kistik teratom gibi kitlelere sahip ovaryumlar ve polikistik overler torsiyona meyillidir. Ayrıca gebelik de risk faktörleri arasındadır.^{100, 101}

Ovaryum torsiyonu, infundibulo-pelvik ve ovaryen ligamentlerin hareketliliği ile de oluşmaktadır. Torsiyon durumunda bağlar birbiri etrafında dönerek kan akımına engel olmaktadır. İlk olarak venöz kan akımı kesilir ve daha sonra arteriyel kan akımının durmasıyla ödem, iskemi, dokusal hasar, renk değişikliği ve son olarak da nekroz görülmektedir.¹⁰²

Şiddetli hasar görülen ovaryum torsiyonlarında bile müdahale sonrasında over fonksiyonlarının devam ettiği görülmüştür. Bu tip vakalarda arteriyel kan akımının tam olarak kesilmediği tespit edilmiştir.¹⁰³

Hastaların çoğunda teşhiste geç kalınmakta olup semptomların ilk görülmesinden tanının konulması saatler hatta günlerce sürebilmektedir. Bu nedenle gecikmiş tanı dönüşümsüz hasara neden olabilmektedir. Ovaryum torsiyonlarında erken tanı ve müdahaleyle overde gelişebilecek irreversible hasara engel olunabilmektedir.¹⁰⁴

2.5. İskemi ve Reperfüzyon (İR)

2.5.1. İskemi

İskemi, dokuların oksijen ve diğer metabolik ihtiyaçlarının yeterli düzeyde karşılanamaması ve oluşan atık ürünlerinin uzaklaştırılamaması olarak tanımlanmaktadır. Organ veya dokulara gelen kan akımındaki yetersizlik sonucunda geri dönüşümü olan veya olmayan hücre ya da doku hasarları oluşabilmektedir.^{105, 106}

Hücrelerin fonksiyonlarını düzgün bir şekilde devam ettirebilmeleri için oksijen mutlaka gereklidir. İskemi sırasında dokulara gerekli miktarda oksijen taşınamaz.

Dokularda yeterli miktarda oksijen bulunmaması durumuna hipoksi denilmektedir. İskemi, hipoksinin en sık görülme durumudur. Dokularda oksijen yetersizliğinden dolayı hipoksi ile birlikte hücresel fonksiyonların bozulmasına bağlı hücre ölümüyle şekillenen bir dizi kimyasal olay meydana gelmektedir. İskeminin süresi, yoğunluğu, organ ve hücre tiplerinin metabolik ihtiyaçları iskemi hasarının şiddetini belirlemektedir.^{107, 108}

İskemi nedeniyle hipoksi oluşan hücrelerde oksidatif fosforilasyon ile ATP üretimi sekteye uğrar veya durur. Ama hücrelerde ATP tüketimi devam eder ve ATP, adenozine ve AMP'ye parçalanır.¹⁰⁹ Adenozin hücre dışına diffüze olarak, hipoksantin ve inozin oluşmaktadır. Hipoksi durumlarında ksantin dehidrogenaz enzimi aktif hale gelemez ve bu nedenle hipoksantin, ksantin oksidaz (XO) ile metabolize olarak ksantin oluşur. Tüm bu reaksiyonlardan sonra ortaya serbest oksijen radikalleri çıkar.¹¹⁰ Sodyum-potasyum (Na-K) pompaları da ATP sentezinin bozulması sonucunda durmaktadır. Böylece hücrenin elektrolit dengesi de bozularak hücre içine kalsiyum (Ca^{+2}) iyonları girmeye başlar. Hücre içinde Ca^{+2} artışıyla beraber proteolitik enzim ve fosfolipazlar aktive olmaya başlar. Fosfolipazların aktivasyonu araşidonik asit oluşturur. Bu asit de mitokondriyal enzimleri inhibe ederek serbest radikal oluşumunda artışa sebep olmaktadır.^{111, 112} İskeminin erken safhasında, dokuda gerçekleşen bu metabolik olaylar sonucunda ödem ve konjesyon kanama görülmektedir.¹¹³

2.5.2. Reperfüzyon

Reperfüzyon, iskemi sonucu organ veya dokuda oluşan enerji ihtiyacının karşılanması ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılması için organ ya da dokuya kan akımının yeniden başlaması olayıdır. İskemik dokunun reperfüzyonu, iskemi ile oluşan hasara oranla dokuda paradoksal olarak çok daha ciddi hasarlara yol açmaktadır.^{109, 114}

İskemi ve iskemiye takip eden reperfüzyon hasarının ikisine birden iskemi-reperfüzyon (İR) hasarı adı verilmektedir. İR üzerine yapılan çalışmalarda reperfüzyon sırasında iskemiye göre daha fazla toksik metabolit oluştuğu tespit edilmiştir.¹¹⁵

Reperfüzyon hasarında rol oynayan humoral ve hücrel olaylar henüz tam olarak aydınlatılamamış fizyopatolojik bir süreçtir.^{116, 117} Bu süreçte serbest oksijen radikallerinin ve nitrik oksit sentaz düzeylerinin artması, lipid peroksidasyonunun gerçekleşmesi,¹¹⁸ lökositlerdeki integrinlerin olaya karışması,¹¹⁹ endoteldeki selektin ekspresyonunun görülmesi,¹²⁰ Na-K iyon pompasının bozulmasıyla beraber hücre içi Ca iyonunun artışı ve protein kinaz C'nin aktivasyonu, mitojen aktive edici protein kinaz ve fosfotidil inositol 3 kinaz-protein kinaz B yollarının çalışması gibi henüz tam olarak aydınlığa kavuşmamış çeşitli mekanizmalar sonucunda hücrede programlı hücre ölümü veya nekroz şeklinde patolojik durumlar ortaya çıkmaktadır.^{121, 122}

Reperfüzyon sırasında oluşan serbest oksijen radikalleri (SOR), dokuda nitrik oksit (NO) sentezinin azalması ve endotel hücreleri tarafından sentezlenen endotelin artışı gibi faktörler reperfüzyon endotel disfonksiyonuna neden olmaktadır.¹²³

2.5.2.1. İnflamatuar Yanıt

İnflamatuar yanıt, reperfüzyon ile ortaya çıkmakta olup, Polimorf nüveli lökositler (PMNL), endotel ve kompleman aktivasyonu ile karakterizedir. Eğer inflammatuar yanıt, vücudun temel bir organını veya reperfüzyonla ilişkili organı etkilerse, birçok kemokin, sitokin ve proinflammatuar metabolitler dolaşıma geçerek inflamasyon tüm vücuda yayılabilmektedir. Bu proinflammatuar durumun yansımaları, başlangıçtaki inflamasyonun şiddetine bağlı olarak her organda farklılık göstermektedir. Akciğer gibi kapiller yoğunluğu fazla olan organlar bu enflamasyona çok daha hassastır. Aktive olan nötrofiller, iskemiye uğrayan diğer organların parankimini infiltre ederek daha ileri

hasarlara neden olmaktadır. Bunun sonucunda lokal disfonksiyondan organ yetmezliğine kadar gidebilen sonuçlar görülebilmektedir.¹²⁴

Kompleman Sisteminin Aktivasyonu

Kompleman sistem, doğal bağışıklıkta görev alan karaciğerde sentezlenen yaklaşık 30 proteinden oluşmaktadır. Kan plazmasında inaktif şekilde bulunan enzimler inflamasyona bağlı olarak kademeli bir şekilde etkileşmesiyle kompleman sistem aktif hale gelmektedir. Aktif hale gelen proteinler, inflamasyon bölgesinde vasküler permeabilitenin artmasında, vazodilatasyonda ve fagositlerin endotele yapışmasında uyarıcı bir etki oluşturmaktadır.¹²⁵ Kompleman sistemin aktivasyonu ile C3b, C5a, C5b-9 ve C3a gibi önemli proinflamatuvar komponentler meydana gelmektedir. C3a ve C5a anaflatoksinlerden olup, lökositleri aktive etmektedirler. C5a kemotaksisi ve lökosit aktivasyonunu uyarmakla beraber, monosit kemoatraktan protein (MCP)-1, TNF- α ve IL-6, IL-1 makrofaj inflamatuvar protein (MIP)-2, MIP-1a, MIP-1b üretimlerini uyarak inflamatuvar yanıtı arttırmaktadır.¹²⁶ iC3b endotel yüzeyinde bulunan nötrofillerin adhezyonunda görev almaktadır. C5b-9 ise endotelde IL-8 ve monosit kemoatraktan protein-1 sentezini uyarak kemotaksisi ve lökosit aktivasyonunu aktive etmektedir. Tüm bunların yanında kompleman sistemin İR hasarındaki rolü tam manasıyla aydınlatılamamıştır.¹²⁷⁻¹²⁹

Sitokin ve Diğer Faktörlerin Rolü

Sitokinler, çok sayıda biyolojik fonksiyonları düzenleyen ve hücreler arası iletişimde rol alan polipeptit yapısındaki proteinlerdir. Sitokinler özellikle aktive olmuş lenfositler, makrofajlar ve pek çok hücre tarafından sentezlenmektedir.^{130, 131} İlk olarak Dupont ve arkadaşları tarafından tanımlanan sitokinlerin, başta immun sistem hücreleri olmak üzere pek çok hücre tarafından salgılandığı ve hücre gelişmesi, doku tamiri, hücre çoğalması, bağışıklık gibi çok sayıda görevi olduğu tespit edilmiştir.¹³² Sitokinler ilk

tespit edildiklerinde salgılandıkları yere göre farklı isimler ile anılmışlardır. Monositler tarafından salgılanan sitokinlere monokin, lenfositler tarafından salgılananlara lenfokin, lökositler tarafından salgılananlara ise interlökin denilmiştir.¹³³ Daha sonraki çalışmalarda ise birçok farklı hücre tarafından benzer sitokinlerin salgılandığı belirlenmiş ve sitokinlerin hücreler üzerinde yaptığı etkilere göre antiinflamatuvar sitokinler, kemotaktik sitokinler, büyüme faktörü sitokinleri, proinflamatuvar sitokinler ve immun düzenleyici sitokinler olmak üzere 5 gruba ayrılmışlardır.¹³⁴

Sitokinler pek çok yönden hormonlara benzese de hormonlar gibi özelleşmiş bir dokudan değil, farklı hücrelerden sentezlendiği için hormon olarak kabul edilmezler.¹³⁵ Sitokinler, yakınındaki hücreye etki ediyorsa parakrin, salgılandıkları hücreye etki ediyorsa otokrin, uzaktaki bir hücreye etki ediyor ise endokrin etki olarak tanımlanmaktadır.¹³⁶

TNF- α , IL-6 ve IL-1 β doğal bağışıklığa etki eden başlıca sitokinlerdendir. Bunlardan özellikle TNF- α İR'da inflamatuvar yanıtın oluşmasında çok önemli rol oynamaktadır.¹³⁷ TNF- α , damar endotel hücreleri ve tek çekirdekli fagositik hücreleri uyarak IL-1 β ve IL-6'nın dolaşıma geçmesini uyarmaktadır.¹³⁸ TNF- α , yüksek konsantrasyonlarda kan basıncını ve doku perfüzyonunu azaltıp, damar düz kaslarını ise gevşetmektedir.

IL-1 β 'nın temel kaynağı aktive mononükleer fagositlerdir ve TNF- α ile yakın biyolojik etkileri vardır. IL-1 β 'nın etkinliği dolaşımda bulunan sitokin miktarına bağlı olup düşük konsantrasyonda bölgesel inflamatuvar yanıtı aracılık etmektedir. Ayrıca IL-6'nın sentezini de tetiklemektedir.¹³⁹

IL-6 Sitokininin Rolü

IL-6; sitotoksik T hücre farklılaşma faktörü, B hücre farklılaşma faktörü, hepatosit farklılaşma faktörü, monosit uyarıcı faktör-2, hibridoma/plasmasitoma büyüme faktörü,

interferon β -2 ve trombopoietin olarak da isimlendirilmektedir. IL-6, B hücreleri aracılığıyla immunglobülin üretimini ve akut faz yanıtında rol alan plazma proteinlerinin sentezi için hepatositleri uyarmaktadır. Ayrıca in vitro primitif hematopoietik hücrelerde hücre siklusunun başlamasında bir kofaktör olarak rol oynamaktadır. Hücrelerde IL-6'nın reseptör sayısı 50-2000 arasında olup, T hücreleri, plazma hücreleri, epitel hücreleri, makrofaj, monosit, B hücreleri, hepatosit, fibroblast ve nöral hücreler gibi değişik hücrelerin membranlarında bulunmaktadır.¹⁴⁰ IL-6; ICAM-1, VCAM-1 ve E-selektin gibi adhezyon moleküllerinin miktarını artırarak lökositlerin endotel hücre yüzeylerine yapışmasına neden olurlar. IL-6, PMNL'lerin de kemotaksisini artırmaktadır.^{140, 141} Stres veya travma esnasında, kan düzeylerinin yükselmesi nedeniyle IL-6'nın sistemik inflamatuvar cevabın göstergesi olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.¹⁴² Over torsiyonu ile ilgili çalışmalarda, serum IL-6 düzeylerinin arttığı ve aralarında önemli bir ilişkinin bulunduğu tespit edilmiştir.¹⁴³ Ayrıca periferik kanda TNF- α ve IL-6'nın artışıyla iskemiye bağlı kardiyak hasar arasında bir ilişkinin varlığı bildirilmiştir.¹⁴⁴

2.5.2.2. Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistemler

Oksidatif stres, hücredeki biyokimyasal olaylar sırasında oluşan, hidrojen peroksit, süperoksit radikali, alkil radikali, hipokloröz asit radikali, singlet oksijen radikali, nitrik oksit, lipid peroksit ve hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türlerinin artışı (ROS) ile onları detoksifiye eden antioksidanların azalmasına bağlı olarak oksidatif dengenin bozulmasıdır^{145, 146}. Oksidatif stres sonucu oluşan ROS'lar hücrede bulunan protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asit ve enzimler üzerindeki etkisi sonucu oksidatif doku hasarı oluşmaktadır¹⁴⁷. Serbest radikallerin canlı vücudunda artmasına bağlı olarak hücre hasarları ve birçok hastalık meydana gelmektedir. Serbest radikallerin miktarı ile bağlantılı olan bu hasar ve hastalığın engellenmesi için oksidan maddelerin antioksidanlarla dengede tutulması sağlanmaya çalışılmalıdır¹⁴⁸.

Biyolojik sistemlerde serbest radikal hasarını önlemek için organizmada antioksidanlar olarak bilinen savunma sistemleri mevcuttur. Düşük konsantrasyonlarda substratın oksidasyonunu geciktiren veya inhibe eden tüm maddelere antioksidan denilmektedir.¹⁴⁹

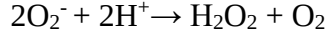
Antioksidanlar, oksidatif hasarın yayılmasını önleyen moleküllerdir. Organizmanın farklı organ, hücre ve hücre organellerinde bulunan ve reaktif oksijen türlerine(ROS) karşı savunmada rol alan çeşitli antioksidanlar vardır.¹⁵⁰ Bu savunma mekanizmaları etkilerini çeşitli şekillerde gösterebilmektedir. Mesela bazıları hasarlı hedef moleküllerini onarıp metal iyonlarını bağlarken, bazıları ise hasarlı hedef moleküllerinin yerini alıp reaktif oksijen türleri oluşumuna engel olmaktadır.¹⁵¹ Antioksidanların gruplandırılması farklı şekillerde olmaktadır. Bunlar kaynaklarına göre ekzojen ve endojen olanlar; yerleşimlerine göre ekstrasellüler ve intrasellüler olanlar; yapılarına göre enzim olanlar ve olmayanlar; çözünürlüklerine göre ise yağda çözünenler ve suda çözünenler şeklinde sınıflandırılmaktadır.¹⁴⁹

Malondialdehit (MDA)

MDA, lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak kullanılan ve lipid peroksitlerin toksik bir yıkım ürünüdür. Dolaşımda lipid peroksidasyon ürünlerinin artmasıyla endotelial hücre hasarı oluşmaktadır.¹⁵²⁻¹⁵⁴ Lipid peroksidasyonu sırasında MDA ile birlikte alken aldehitler, alkan aldehitler ve hidroksialken aldehitler de meydana gelmektedir. Fakat bunların ölçümleri uzun süreli işlemler gerektiren, pahalı ve pratik olmayan yöntemler olduğundan tercih edilmemektedir.¹⁵⁵ MDA, membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmasına neden olmaktadır. Bu olay sonucunda iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsek zar özellikleri değişime uğramaktadır. Oluşan bu değişiklikler MDA'nın genotoksik, karsinogenik ve mutajenik olduğunu göstermektedir.¹⁵⁶

Süperoksid Dismutaz (SOD)

Antioksidan savunma sisteminin ilk basamağında O₂'in H₂O₂'e dismutasyonunu katalize eden SOD enzimi bulunmaktadır.



Tepkimesi “oksidatif strese karşı ilk savunma” diye adlandırılmaktadır. Bu reaksiyon sayesinde hücresel kompartmanlardaki süperoksit düzeylerinin kontrol edildiği bildirilmiştir. Hepatit, respiratuar distres sendromu, akciğer enfeksiyonları, lösemi, muskuler distrofi, böbrek yetmezliği, motor nöron hastalıkları, iskemi ve fanconi anemisi gibi ROS çıkaran hastalıklarda koruyucu rol aldığı tahmin edilmektedir. Ayrıca lipid peroksidasyonunda SOD tarafından inhibe edilmektedir. SOD aktivitesinin, fazla O₂ kullanan hücre ve dokularda yüksek olduğu tespit edilmiştir.^{157, 158}

8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG)

8-OHdG, oksidatif DNA hasarı göstergesinin en çok çalışılan parametrelerinden bir tanesidir. Çoğu araştırmacı ROS'un mutasyon yapabilme kapasitesinin tamamını ölçmek için her bir DNA modifikasyonunu çalışmak istemektedir. Fakat 8-OHdG oluşumu, ROS tipine, organizmaya ve etkiye maruz kalma süresini gözetmeksizin diğer DNA modifikasyonlarıyla orantılıdır. Bu nedenle 8-OHdG ölçülerek, oksijen radikallerinin indüklediği hasarın hesaplanması daha kolay olmaktadır.¹⁵⁹

Karsinojen ve mutajenin DNA bileşikleri ile metabolik aktivasyon olsun veya olmasın reaksiyona girdiği bildirilmiştir. Bu reaksiyon sonucunda adenin, guanin, timin ve sitozin ile yeni bileşikler oluşturmaktadır. Tüm bu hedefler içinde en reaktif guanindir.¹⁶⁰ İn vitro DNA sentezi çalışmalarında 8-OHdG, DNA replikasyonu sırasında nokta mutasyon oluşturduğu için yanlış okunmasından dolayı potansiyel mutajen olduğu tespit edilmiştir. Okside guanin, in vitro çalışmalarda DNA replikasyonu sırasında A-C ve G-T değişimine sebep olmaktadır. Bu çalışma in vivo ortamda hücre DNA'sında 8-OHdG

oluşumunun karsinogenez ile irtibatlı olduğunu göstermesi açısından önem arz etmektedir. Farelerde yapılan bir çalışmada bütün vücuda radyasyon verilerek karaciğer hücre DNA'sında 8-OHdG oluşumu tespit edilmiş ve açığa çıkan 8-OHdG'in in vitro deneye göre yaklaşık 1000 kez daha az olduğu bildirilmiştir.¹⁶¹

2.5.3. Apoptozis: Programlı Hücre Ölümü

Çok hücreli canlılarda, hücre bölünmeleriyle artan hücre sayıları hücre ölümü ile dengelenmektedir. Organizma ihtiyacı olmayan hücreleri, hücre içi haberci sistemleri sayesinde intihar sürecine sokmaktadır. Sonuç olarak, apoptoz veya programlı hücre ölümü gerçekleşmektedir.^{162, 163}

Apoptozis, organizma için fizyolojik bir olay olup, dokuda hücre yapısının korunması, gelişim, yaşlanma gibi homeostatik dengenin korunmasına katkı sunmaktadır. Ayrıca, hastalık ve zararlı ajanlar yoluyla hücreler dejenere olduğunda veya immün sistemlerde koruyucu bir mekanizma olarak apoptoz devreye girmektedir.^{164, 165}

Hücrelerde apoptoz sinyalinin sonra biyokimyasal ve fizyolojik birtakım değişiklikler meydana gelmektedir. Bu aşamada hücreler küçülerek kondanse olur ve hücre iskeletleri dağılarak çekirdek zarında erimeler başlar, DNA parçalara ayrılır.¹⁶⁶

Programlı hücre ölümünde önemli bir rol oynayan kaspazlar, sistein proteaz grubu enzimlerinden olup multigen ailesinden oluşmaktadır. Kaspazlar hücre sitoplazmasında bulunmaktadır. Uygulayıcı ve başlatıcı kaspazlar olarak iki ayrı enzim grubundan oluşmaktadır.¹⁶⁷

2.5.3.1 Apoptotik Marker Kaspaz-3

Kaspaz "Cysteine Aspartate Specific Proteases-CASPASE-3" olup, sisteinproteaz grubu bir enzimdir. CPP32, Yama, apopain olarak bilinen kaspaz-3, 12 kDa ya da 17 kDa altbirimlerinden oluşan 32 kDa zimogeninden oluşmaktadır.^{168, 169}

İnsanlarda kan ve endotel hücrelerindeki veziküller “Kaspaz-3” bulundurmaktadır. Kaspaz-3’ü ihtiva eden bu veziküllerin inhibisyon ve salınımı, apoptozisin indüksiyonunu engelleyebilmektedir. Ayrıca kaspaz-3 DNA polimerazı inaktive ederek hücreyi apoptozise göndermektedir.¹⁶⁷ Apoptotik hücrede, hem intrinsik hem de ekstrinsik yollarla aktive edilen kaspaz-3 zimojen özelliğindedir. Bunun nedeni; kaspaz aktivitesinin hücreleri herhangi bir ayırım göstermeden öldürmesidir.¹⁷⁰

Kaspaz-3, öldürücü kaspazdır ve zimojen apoptotik sinyal olayları sonucu bir öncü kaspaz tarafından bölününceye kadar inaktif olarak bulunmaktadır.¹⁷¹ Bu ekstrinsik aktivasyon, kaspaz-3’ün etkin olduğu apoptotik olayların önemli kaspaz kaskadlarını tetiklemektedir.¹⁷² İntrinsik aktivasyondaysa, mitokondriyumda bulunan sitokrom c, procaspaz-3’ü işlemek için, kaspaz-9 apoptoz aktivasyon faktörü 1 ve ATP ile koordinasyonlu bir şekilde çalışmaktadır.¹⁷³⁻¹⁷⁵ İn vitro koşullarda bu moleküller kaspaz-3’ü aktif hale getirebilir fakat düzenleyici diğer proteinler ise in vivo olarak gerekmektedir.¹⁷⁴

2.5.4. Otofaji

Otofaji ilk olarak 1963 yılında Cristian de Duve tarafından farelerin karaciğer epitel hücrelerinde keşfedilmiştir.¹⁷⁶ Otofaji, hasarlı hücre organellerini ve proteinleri yok eden bir süreçtir.¹⁷⁷ Otofajide hücre içi moleküllerin ve organellerin döngüsüyle fizyolojik şartlar altında homeostaz sağlanmaktadır. Bununla beraber, artan hücre stresi esnasında hücrenin hayatta kalmasını sağlamaktadır.^{178, 179} Hücre içeriğinin parçalanması ile otofaji uyarıldığı zaman, bozunuma uğrayan organeller ve sitoplazma vezikül içerisine alınarak mayalarda vakuole, memelilerde ise lizozoma gönderilir.¹⁸⁰ Son zamanlardaki çalışmalarda otofajinin farklılaşma, yaşlanma, hücre ölümü, morfogenez, metabolizma ve bağışıklık sisteminde de rol oynadığı tespit edilmiştir.^{7, 8}

Mikrotofaji, makrotofaji ve şaperon aracılıklı olmak üzere 3 farklı otofaji mekanizması olmasına rağmen otofaji denildiğinde makrotofaji kastedilmektedir. İlk olarak otofajiyle bağlantılı proteinler (otofaji ile ilgili protein) yani ATG'ler mayalarda yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Günümüzde 30'dan fazla ATG geni bulunmakta olup bu proteinlerin bir kısmı otofagozom ve izolasyon membranının oluşumunda görev almaktadır. Mayalarda bulunan ATG proteinlerinin analogları memeli hücrelerinde bulunmaktadır. Bu analog proteinler, memelilerde otofaji basamaklarının düzenli olarak ilerlemesine yardımcı olmaktadır.¹⁴

Otofaji mekanizması başlıca 5 basamaktan oluşmaktadır;

1. Başlatma evresi; ATG/ULK (unc5-benzeri kinaz) proteinin aktif hale gelmesi,
2. Çekirdeklenme evresi; Beclin-1/sınıf III PI3K (fosfotidilinositol-3 kinaz) çift tabakalı membran oluşumu başlatılması,
3. Zar Uzama evresi; ATG8/LC3 ve ATG12 proteinlerinin kompleks oluşturması,
4. Toplanma Basamağı evresi; fagofor oluşumu için ATG protein ve transmembran ATG9 proteinlerin birleşmesi evresi,
5. Lizozom ile birleşme ve yıkım evresi; lizozom ve otofagozom birleşmesi, RAB7 ve LAMP2 proteinler görev alır. Sonuç olarak lizozomal hidroliz olur ve yıkım gerçekleşir.¹⁸¹

Hücrelerdeki otofajik aktiviteyi hipoksi, açlık ve çeşitli stres faktörleri başlatmaktadır. Target of rapamycin (TOR), otofajik aktivitenin denetlenmesinde önemli rol oynayan protein kompleksidir. TOR hücrenin büyümesini ve protein sentezinin kontrolünü sağlayan kinazdır. Bu TOR proteininin baskılanmasıyla memelilerde ve mayalarda otofaji aktif hale gelmektedir. Bu nedenle mammalian target of rapamycin

(mTOR) yolağı otofajiden sorumlu olarak kabul edilmektedir.¹⁸² hücrelerde mTOR mekanizmasının düzenlenmesinde Beclin-1, Bcl-2, PI3K-Akt-mTOR, LKB1-AMPK-mTOR ve P53 yolakları görev almaktadır.¹⁸³

2.5.4.1. Beclin-1

Beclin-1 insan dokularında ifade edilir ve mitokondri, endoplazmik retikulum ve perinükleer aralıkta bulunmaktadır. Beclin-1 otofaji ve tümör gelişiminin baskılanmasında görev almaktadır. Otofajide, otofaji için gerekli olan çift zarlı otofagozom oluşumunda görevlidir. Beclin-1'in kaybı insanlarda ovaryum, meme ve prostat kanserlerine neden olmaktadır.¹⁵ Beclin-1, hücrelerde otofajiyle ilgili Bcl-2, p150, Bif1, Rubicon, Vps34, UVRAG ve Atg14L gibi diğer proteinlerle birleşip büyük bir kompleks oluşturarak otofajide görev üstlenirler.¹⁸³ Bcl-2 familyasındaki proteinler ise Beclin-1'in aksine otofaji ve apoptozisi inhibe ettikleri tespit edilmiştir.¹⁸⁴ Örneğin, antisens RNA kullanılmasıyla Bcl-2 susturularak kanser hücrelerinde otofajinin indüklendiği gösterilmiş¹⁸⁵ ve yine Bcl-2'nin susturulmasıyla meme kanseri hücrelerinde otofajinin tekrar indüklendiği tespit edilmiştir.¹⁸⁶

Beclin-1, otofajide önemli rol oynamakta ve otofaji aktivitesinin göstergesi olarak kabul edilmektedir.^{187, 188} Beclin-1 temel sinyal başlatma kompleksinin(Beclin 1, sınıf III PI3 kinaz ve p150 proteini) bir parçası olup, otofagolizozom oluşumunda bulunan bir protein dizisini tetikleyerek direk olarak etki edecek şekilde görev almaktadır.¹⁸⁹ Beclin-1'in otofaji başlatmasındaki rolü, kendi alanlarındaki kendine özgü proteinlerin varlığına bağlıdır. Bu alanlardan çift sarmal alanı(CCD) ve evrimsel olarak korunmuş alan(ECD) içerisindeki en önemli protein *Saccharomyces cerevisiae* mayasında tanımlanmış olan, sınıf III fosfatidilinositol-3 kinaz(PI3K III)'dir.¹⁹⁰ Memeli hücrelerinin sınıf I, II ve III PI3 kinaz içerdiği bildirilmiştir.¹⁹¹ Sınıf III PI3 kinaz, yalnız Beclin-1 ile birleşip kompleks oluşturarak faaliyet yürütmektedir. PI3K-III/Beclin-1 kompleksi trans-golgi

aygıtında lokalize olup artan fosfotidilinositol 3-fosfat(PIP3) üretimine destek vererek fagoforun uzamasını arttırmaktadır. PI3K-III/Beclin-1 kompleksi ayrıca diğer Atg proteinlerinin fagoforlara katılmasına izin vermektedir.¹⁹² Beclin-1, otofagozom oluşumundan başlayarak otofagozom/endozom olgunlaşmasına kadarki sürede otofajik yollarda her temel adıma müdahalede bulunabilmektedir. Bu müdahalelerin çoğunda otofajik inhibitörler ve otofajik indüktörler dahil olarak, spesifik Beclin-1 bağlayıcı proteinlerin aktivasyonu aracılık etmektedir. Ayrıca Beclin-1 komplekslerinin birleşmesi hücreye veya dokuya bağlı olarak değişmektedir.¹⁹¹

2.5.4.2. BNIP-3

BNIP-3, Bcl-2 protein ailesinden olup, apoptozis ve hipoksida görev alan bir proteindir ve otofajiyi aktif hale getirdiği çeşitli sistemlerde gösterilmiştir. BNIP-3 ve Beclin-1'in etkileşim içinde oldukları bazı sistemlerde belirtilmiştir.¹⁹ Yapılan bir çalışmada hipoksi durumunda BNIP-3'ün; Beclin 1'i Bcl-2/Beclin 1 kompleksinden uzaklaştırarak Beclin-1'i serbest bırakıp otofajiyi başlattığı tespit edilmiştir.^{32, 33}

BNIP-3, hipoksik durumlarda upregüle olan Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyelerindendir.^{193, 194} BNIP-3'ün aşırı ekspresyonu mitokondride reaktif oksijen türleri üretimi, membran potansiyelinin kaybı ve geçirgen transisyon porların açılması ile karakterizedir. BNIP-3 ile oluşan hücre ölümü, fibroblast ve epitelyal hücrelerdeki kaspaz aktivasyonundan ve mitokondrideki sitokrom-c salınımından bağımsız bir şekilde gerçekleşmektedir.¹⁹⁵ BNIP-3, diğer Bcl-2 aile üyelerinde de olan ve aynı dizilimdeki Bcl-2 homology3 (BH3) domainine sahiptir fakat diğer Bcl-2 aile üyelerinden farklı olarak BH3 domainindeki delesyon BNIP-3'ün öldürme aktivitesini etkilememektedir.¹⁹⁶ BNIP-3 ile gerçekleşen hücre ölümü, Bcl-2'nin aşırı ekspresyonuyla bloke edilmektedir. Fakat diğer pro-apoptotik Bcl-2 aile üyelerinde bu durum gözlenmemektedir.¹⁹⁵ Hipoksik hücre cevabındaki gen ekspresyonunun regülasyonunda Hipoxia-inducible

factor-1 (HIF-1) transkripsiyon faktörü olarak rol oynamaktadır.¹⁹⁷ BNIP-3'ün promotor bölgesi HIF-1 duyarlı element(HRE) içermekte olup hipoksiyle veya HIF-1 alfa ekspresyonunun artmasıyla aktif hale gelmektedir. Hipoksida BNIP-3 ekspresyonu HIF-1 alfa'nın kontrolü altında olup transkripsiyon ile kontrol edilmektedir.¹⁹⁸

2.5.4.3. Bcl-2

Bcl-2 ailesi, apoptoziste önemli rol oynayan ve bir kısmı proapoptotik, bir kısmı da anti apoptotik etkiye sahip protein ailesidir.¹⁹⁹⁻²⁰¹ Proapoptotik etkiye sahip olanlar sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya çıkışını indüklemektedir.¹⁹⁹ Kaspaz-9'un aktive olması için oldukça sitokrom-c önemli olup, kaspaz-9'un kaspaz-3'ü aktifleştirmesiyle apoptoz başlamaktadır.²⁰² Anti apoptotik Bcl-2 ise sitokrom-c'nin çıkışını baskılamaktadır ve apoptozisi baskılayıcı etkiye sahiptir. Mitokondri zarı üzerinde bulunan Bcl-2 proteini, mitokondri porlarının geçirgenliğinin kontrolünü sağlamaktadır.^{200, 203}

2.5.5. Viteksin

Viteksin, apigenin(apigenin 8-C-glukozit) doğal türevi olup, alıç, tutku çiçeği, bambu yaprakları ve chasteberry bitkisi gibi çeşitli bitki türlerinde doğal olarak oluşan flavonoid ve lignan bileşiğidir. Viteksin'in antienflamatuvar, antikanserojen, antioksidan, antimetastatik ve nöroprotektif etkiler dahil, ancak bunlarla sınırlı olmayan geniş yelpazedeki farmakolojik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir.^{46, 204}

Yapılan çalışmalarda, viteksinin, hücre ölüm fosforilasyonunu, gen transkripsiyonunu modüle ettiği ortaya konmuştur.^{205, 206} Viteksinin oral kanser hücrelerinde p53, p21, Bax ve WAF1'i yukarı doğru düzenleyerek hücre canlılığını azalttığı ve apoptozu indüklediği bildirilmiştir.²⁰⁴ Viteksin, insan U937 lösemi hücreleri üzerinde apoptozun mitokondriyal yolla indüklenmesi ile ilişkili olduğu belirlendi. Bcl-2 aşağı regülasyonu, kaspaz-3 ile kaspaz-9'un yukarı regülasyonu viteksin tedavisi

uygulanan hücrelerde tespit edilmiştir.²⁰⁷ Viteksin tedavisi uygulanan MDA-MB-231 göğüs kanseri hücrelerinde apoptozis ile sonuçlanmıştır.²⁰⁸ Bir diğer çalışmada viteksin'in kaspazları aktive ettiği, apoptozu indüklediği ve meme kanseri ksenograft modellerinde geniş antitümör aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir.²⁰⁹ Ayrıca, yapılan çalışmalarda viteksinin; kanser, bilişsel bozukluklar, depresyon, beyin ve kalpteki İR hasarı, kardiyak hipertrofi, hipertansiyon, diyabet, obezite, enfeksiyonlar ve metabolik bozukluk gibi birçok problemi tedavi etme potansiyeline sahip çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu da gösterilmiştir.^{210, 211} Tan ve arkadaşları viteksin bileşiğinin hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, apoptozu indüklediği ve insan koriokarsinomu JEG-3 hücre hattında mTOR sinyalini inhibe ettiği bildirilmiştir.²¹² Miyokard iskemisi / reperfüzyon hasarı modeliyle yapılan bir çalışmada 6, 3, 1.5 mg/kg doz viteksin uygulanan gruplarda Rap1 Bax, ve Epac1 protein ekspresyon düzeyinde önemli bir düşüş olduğu ve Bcl-2 protein ekspresyon düzeyinde azalma görüldü. Sonuç olarak viteksinin miyokard hücrelerinin apoptozdan koruduğu lipid peroksidasyon düzeyini azalttığı izlendi.⁵¹ Viteksinin; in vivo veya in vitro olarak oluşturulan akut miyokard İR hasarı üzerinde koruyucu bir etkisinin olduğu ve miyokardiyal hücrelerin hipoksi sonrası regülasyonunu sağladığı bildirilmiştir.²¹³ Min, J, W. ve arkadaşlarının sıçan yavruları üzerinde yaptıkları bir çalışmada, hem akut hem de uzun vadeli nöroprotektif etkileri olan hipoksi-iskemi (HI) hasarı sistematik olarak değerlendirilmiştir. Hipoksi-iskemi yaralanmasından sonra viteksinin HIF1- α inhibitörü olarak, beyin ödemi ve nöronal yaralanmayı azalttığı rapor edilmiştir.²¹⁴ Hücre kültürüyle yapılan bir çalışmada, İR yaralanmasına maruz kalan izole edilmiş sıçan kalbinde, vitexin (50, 100, 200 mmol / L) tedavisi sonucu kan akışının önemli ölçüde arttığı ve histopatolojik bulguların azaldığı görüldü.²¹⁵ Koroner iskemi/reperfüzyon hasarı oluşturulan farelere 1,5, 3 ve 6 mg/kg olacak üç farklı dozda uygulanan viteksinin 6 mg / kg vitexin ile tedavi edilen grupta

etkili olduğu ortaya konmuştur. Serum, Kreatin Kinaz (CK) ve MDA düzeylerinin, viteksin gruplarında azaldığı, SOD aktivitesinin viteksin grubunda arttığı izlenmiştir.²¹³ Viteksinin nöroprotektif etkilerinin yanında İR hasarında beyin endotel geçirgenliği ilgili bir çalışmada insan beyindeki mikrovasküler endotel hücrelerinde İR yaralanma modelinde altta yatan mekanizmalar üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Viteksinin, enflamasyon, LDH, kaspaz 3 seviyesini önemli ölçüde azalttığı, aynı zamanda kan beyin bariyer bütünlüğünü koruduğu ortaya konmuştur.²¹⁶ Orta serebral arter tıkanıklığına bağlı oluşan serebral İR modelinde, düşük konsantrasyonlardaki viteksinin (3.25, 7,5 ve 15. mg / kg), serebral enfarktüs hacmini azalttığı, kortikal ve hipokampal hücreleri koruduğu ortaya konmuştur. Ayrıca, ERK1 / 2 protein kinaz fosforilasyonunu artırarak nöroproteksiyon etki göstermiştir.²¹⁷ Hücre kültürü çalışmasında çalışmada, farelerinin kortikal nöronlarının primer kültürleri viteksinle muamele edilmiş daha sonra oksijen yoksunluğuna maruz bırakılmıştır. Hücre canlılığının arttığı, LDH (laktat dehidrogenaz) ve Ca^{2+} miktarının azaldığı görülmüştür.²¹⁸ Fokal serebral İR hasarında viteksinin, serebral enfarktüs hacmini önemli ölçüde azaltıp iyileştirdiği izlenmiştir.⁵⁵ Yukarıda belirttiğimiz özelliklerinden dolayı, over İR hasarının tedavisinde, terapötik bir ajan olarak viteksinin etkisini incelemek büyük önem taşımaktadır. Şimdiye kadar birçok araştırma in vitro ve in vivo olarak viteksinin güvenliğine odaklanmış ve viteksinin sitotoksisite göstermediği ortaya konmuştur.⁴⁹ İn vivo olarak yapılan bir çalışmada, yüksek düzeyde viteksin kullanımının sıçanlarda belirgin akut ve subkronik toksisite ve genotoksisiteye neden olmadığı rapor edilmiştir.³⁰ Ayrıca, karaciğer ve mide mukozası yaralanmalarında, yedi gün boyunca viteksin ile tekrarlanan tedavide hiçbir sitotoksisite görülmeyişi de ortaya konmuştur.²¹⁰

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. Etik Kurul Onayı

“Over İskemi-Reperfüzyon Modeli Oluşturulan Sıçanlarda Viteksin’in Etkisinin Histokimyasal, İmmunohistokimyasal ve Biyokimyasal Yöntemlerle Araştırılması” adlı doktora tez çalışmasının etik kurallara uygunluğu, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığının, 27.06.2019 tarih ve 7/108 no’lu kararıyla onaylanmıştır.

3.2. Deneklerin Temin Edilmesi ve Deney Gruplarının Oluşturulması

3.2.1. Deneklerin Temin Edilmesi

Mevcut çalışmada 40 adet 10-12 haftalık, ortalama 250-300 gr ağırlığında Sprague-Dawley cinsi dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM)’nden temin edildi.

3.2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Deneyin başlangıcında, sıçanlar her grupta 8 denek olacak şekilde rastgele beş gruba ayrıldı. Gruplar aşağıdaki gibi düzenlendi:

1. Grup (8 hayvan): Sham Grubu
2. Grup (8 hayvan): 3 saat over iskemi+reperfüzyon
3. Grup (8 hayvan): 3 saat over iskemi+reperfüzyon (1 ml serum fizyolojik i.p)
4. Grup (8 hayvan): 3 saat over iskemi+ reperfüzyon (15mg/kg viteksin i.p)
5. Grup (8 hayvan): 3 saat over iskemi+ reperfüzyon (30mg/kg viteksin i.p)

3.3. Cerrahi İşlemler ve Deney Modelinin Oluşturulması

Bütün gruptaki sıçanlara Ketamin hidroklorür (40 mg/kg) ve Xylazin (5 mg/kg) ile anestezi uygulandı. 2 cm’lik orta hat kesisi ile laparotomiye takiben cilt, cilt altı dokular ve periton geçilerek sağ ve sol adneksler ortaya çıkarıldı. Sham grubu dışındaki bütün sıçanlara atravmatik vasküler klempler uygulanarak, overlerde bilateral iskemi

oluşturuldu. Sham grubundaki sıçanlarda overler insizyon bölgesine çıkarılıp klemp uygulanmadan tekrar yerine yerleştirildi. Batın ve cilt 5.0 ipek sütün ile kapatıldı. 3 saatlik iskemi sonrasında sıçanlara anestezi altında eski insizyon yerinden laparotomi uygulanıp, klempler alınarak reperfüzyon sağlandı ve overler normal anatomik lokalizasyonuna yerleştirildi. Batın ve cilt 5.0 ipek sütün ile kapatıldı.

Grup 1 (Sham grubu): Overler insizyon bölgesine çıkarılıp herhangi bir uygulama yapılmadan tekrar yerine yerleştirildi, 3 saat sonra batın açılıp kapatıldı.

Grup 2 (İR): Overler insizyon bölgesine çıkarılıp atravmatik vasküler klempler uygulanarak bilateral iskemi modeli oluşturuldu, 3 saat iskemi sonrası klempler çıkarılarak reperfüzyon sağlandı.

Grup 3 (İR-SF): Overler insizyon bölgesine çıkarılıp atravmatik vasküler klempler uygulanarak bilateral iskemi modeli oluşturuldu, 3 saat iskemi sonrası klempler çıkarılarak reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyondan 30 dk. önce intraperitoneal olarak 1 ml serum fizyolojik enjekte edildi.

Grup 4 (İR-15V): Overler insizyon bölgesine çıkarılıp atravmatik vasküler klempler uygulanarak bilateral iskemi modeli oluşturuldu, 3 saat iskemi sonrası klempler çıkarılarak reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyondan 30 dk önce intraperitoneal olarak 15 mg/kg viteksin (Sigma aldrich, 10 mg, katalog no:49513-10MG-F) yarım saat 1 ml serum fizyolojik karıştırılarak enjekte edildi.

Grup 5 (İR-30V): Overler insizyon bölgesine çıkarılıp atravmatik vasküler klempler uygulanarak bilateral iskemi modeli oluşturuldu, 3 saat iskemi sonrası klempler çıkarılarak reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyondan 30 dk önce intraperitoneal olarak 30 mg/kg viteksin 1 ml serum fizyolojik içinde karıştırılarak enjekte edildi.

3 saatlik reperfüzyon sonrasında overler cerrahi olarak çıkarıldı ve kan örnekleri alındı. Sonrasında tüm sıçanlara anestezi altında dekapitasyon ile ötenazi uygulandı.

Sağ overler histolojik incelemeler için kullanılmak üzere içinde %10'luk tamponlu formaldehit bulunan etiketli şişelere alındı, sol overler ise biyokimyasal analizler için -80 °C'de saklandı.

3.4. Histolojik Analiz

3.4.1. Doku takibi ve Hematoksilen-Eozin Boyama Prosedürü

Tüm gruptaki sıçanlardan alınan sağ over dokuları %10'luk tamponlu formaldehit içinde 48 saat boyunca fiske edildi. İki saat boyunca akan su altında yıkandıktan sonra doku örnekleri yarı otomatik Leica TP 1050 cihazında aşağıdaki sıra ile doku takibi gerçekleştirildi:

1. Distile suda 2 saat yıkama.
2. Dehidratasyon
 - a) %50 alkolde 2 saat bekletme.
 - b) %70 alkolde 1 saat bekletme.
 - c) % 80 alkolde 1 saat bekletme.
 - d) % 96 alkolde 1 saat bekletme
 - e) %100 alkolde 1 saat bekletme
 - f) %100 alkolde 1 saat bekletme.
3. Şeffaflaştırma
 - a) Ksilöl (15 dakika)
 - b) Ksilöl (15 dakika)
 - c) Ksilöl (15 dakika)
4. İnfiltrasyon
 - a) Parafin I (46-48 °C; 1 saat)
 - b) Parafin II (56- 58 °C; 2 saat)

İnfiltrasyon işleminden sonra, dokular manuel olarak eriyik parafin içinde bloklandı ve donmaya bırakıldı. Her bir bloktan 4-5 mikron kalınlığında kesitler, Leica RM 2145 mikrotom cihazı ile alındı. Histopatolojik değerlendirme yapmak için, Hematoksilen-Eozin boyama işlemi aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

1. Ksilende 15 dak. bekletme
2. Ksilende 5 dak. bekletme
3. Ksilende 5 dak. bekletme
4. %100'lük Alkolde 5 dak. bekletme
5. %96'lık Alkolde 5 dak. bekletme
6. %80'lik Alkolde 5 dak. bekletme
7. %70'lik Alkolde 5 dak. bekletme
8. Çeşme suyunda 1 dak. yıkama
9. Hemotoksilen boyasında 2 dak. bekletme
10. Asit-Alkol içine daldırıp çıkarma
11. Eozin solüsyonunda 1 dak. bekletme
12. %96'lık Alkolde 5 dak. bekletme
13. %100'lük Alkolde 5 dak. bekletme
14. Üç farklı ksilen serisinde 5 dak. bekletme

Entellan ile kapatma işlemi gerçekleştirilen kesitler kurumaya bırakıldı. Boyanan over kesitleri, üzerine kamera monte edilmiş Nikon Eclipse i50 (Nikon, Tokyo, Japan) marka ışık mikroskobunda incelendi ve fotoğrafları çekildi.

3.4.2. İmmunohistokimyasal Analizler

İmmünohistokimyasal boyamalar, kaspaz 3, Beclin-1, Bcl-2, BNIP-3, IL-6 proteinlerinin ekspresyon düzeyini ışık mikroskobik düzeyde incelemek amacıyla

Ventana BENCHMARK GX otomatik immünohistokimya boyama cihazında, aşağıda verilen protokole göre yapıldı.

1. 75 °C’de 4 dakika inkubasyon.
2. EZPRep 4 dakika uygulama.
3. Reaction buffer ile yıkama.
4. EZPRep’de 4 dakika inkubasyon.
5. Reaction buffer ile 1 kez yıkama.
6. EZPRep ile 4 dakika inkubasyon
7. Reaction buffer ile 1 kez yıkama.
8. 75 °C 4 dakika uygulama.
9. Reaction Buffer ile 1 kez yıkama.
10. CC 1, 95 °C , 8 dakika yıkama.
11. EZPrep / CC 1, 100 °C, 30 dakika uygulama.
12. EZPrep / CC 1, 100 °C ,60 dakika uygulama.
13. Reaction buffer ile 1 kez yıkama.
14. °C, 2 dakika inkubasyon.
15. Reaction buffer ile 1 kez yıkama.
16. UltraView inhibitor (3% H₂O₂) ile 4 dakika inkubasyon.
17. Reaction buffer ile 1 kez yıkama.
18. 32 dakika antikor uygulaması.
19. Reaction Buffer ile 1 kez yıkama.
20. UV HRP, UNIV MULTI ile 8 dakika inkubasyon.
21. Reaction buffer ile 1 kez yıkama.
22. UV DAB ve UV DAB H₂O₂ ile 8 dakika muamele
23. Reaction buffer yıkama.

24. UV Copper ile 4 dakika inkubasyon.
25. Reaction buffer ile 1 kez yıkama.
26. Hematoksilen ile 8 dakika uygulama.
27. Reaction buffer ile 1 kez yıkama.
28. Bluing reagent ile 4 dakika inkubasyon.
29. Reaction buffer ile 1 kez yıkama. Bu aşamadan sonra cihazdan çıkarılan preparatlar aşağıdaki işlemlere tabi tutulur:
30. Deterjanlı su ile 2 kez yıkama.
31. Distile su ile 2 kez yıkama.
32. 100 'lük etanolden 2 kez geçirme.
33. Ksilenden 2 kez geçirme.
34. Entellan ile kapatma.

Bu amaçla kullanılacak olan Anti-IL-6 (Bioss, 1 µg/ul, Kat No: bs-0782R), Anti-Beclin-1(Bioss, 1 µg/ul, Kat No: bs-1353R), Anti-BNIP-3(Bioss, 1 µg/ul, Kat No: bs-4239R), Anti-Bcl-2 (Bioss, 1 µg/ul, Kat No: bs-4563R), Anti-Caspase-3-3 (Bioss, 1 µg/ul, Kat No: bs-2593R), primer antikorları üreticinin önerdiği standart protokole uygun olarak dilüe edilerek uygulandı. İmmünohistokimyasal değerlendirmeler; bilgisayar destekli ve kamera ataçmanlı ışık mikroskobu (Nikon eclipse i50, Tokyo, Japan) altında değerlendirildi ve fotoğrafları çekildi.

3.5. Biyokimyasal Analiz

Sıçan serum örnekleri için kan örnekleri alındıktan sonra 4000 rpm'de, 15 dakika santrifüj ile elde edilen serumlar alikotlanarak -80°C'derecede saklandı. Sıçan over dokuları da alındığı anda hızlıca petri kabına alınıp alikotlanarak -80°C'derecede donduruldu. Analizlerin yapıldığı gün doku örnekleri uygun koşullarda çözölmeleri sağlandıktan sonra PBS (pH= 7.4)'de homojenatör ile homojenize edildi. Homojenize

hale getirilen örnekler 2000-3000 rpm’de 20 dakika santrifüjlendi ve süpernatantları analizler için ayrıldı. MDA (Kat No: AD2870Ra, AndyGene Biotechnology Co., Ltd 301 Universty Village Drive Richardson,USA), SOD (Kat No:AD2871Ra, AndyGene Biotechnology Co., Ltd ,301 Universty Village Drive Richardson,TX75081,USA) ve 8-OHdG (Kat No: AD2694Ra, AndyGene Biotechnology Co., Ltd, 301 Universty Village Drive Richardson,TX75081,USA) düzeyleri serum ve over doku örneklerinde, ticari ELİSA kitleri kullanılarak üreticinin önerdiği standart protokole uygun olarak Atatürk Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkez Müdürlüğü Tıbbi Biyokimya Laboratuvarında bulunan ELISA reader cihazında (Dynex Technologies Headquarters, Chantilly, USA) analiz edildi. Kitlerin varyasyon katsayısı intra-assay coefficient of varyasyon, CV değerleri %8’in, inter-assay CV’si %10’un altındaydı.

3.6. İstatistiksel Analiz

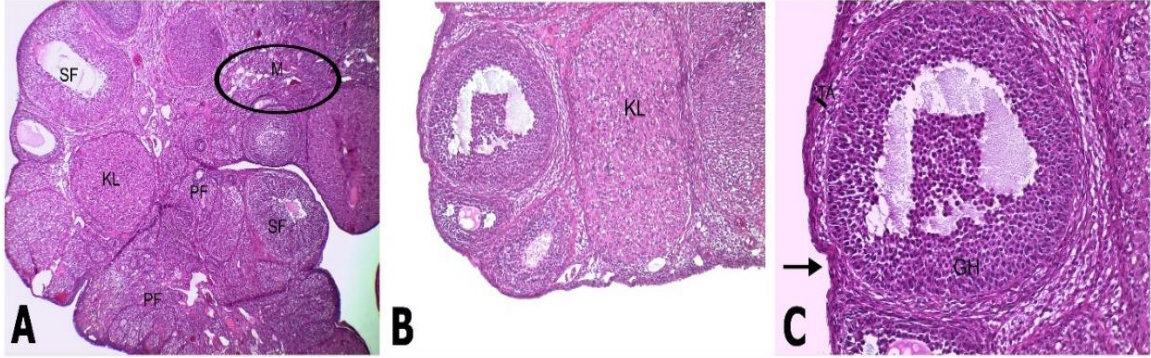
Varyans farkları, Graphpad prizma 5.0 istatistik yazılımı (GraphPad, La Jolla, CA, ABD) tarafından tek yönlü bir varyans analizi (ANOVA) testi kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi. Tukey’in testi post hoc olarak kullanıldı. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi. Kontrol ve İR gruplarını diğer çalışılan gruplarla karşılaştırmak için * ve # üstbilgileri kullanıldı. * kontrol ve diğer gruplar arasındaki önemli farklılıkları belirtir (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$). # İR ve diğer gruplar arasındaki önemli farklılıkları ifade eder (#; $p < 0.05$, # #: $p < 0.01$)

4. BULGULAR

4.1. Işık Mikroskopik Bulgular

4.1.1. H-E Boyama ile Elde Edilen Bulgular

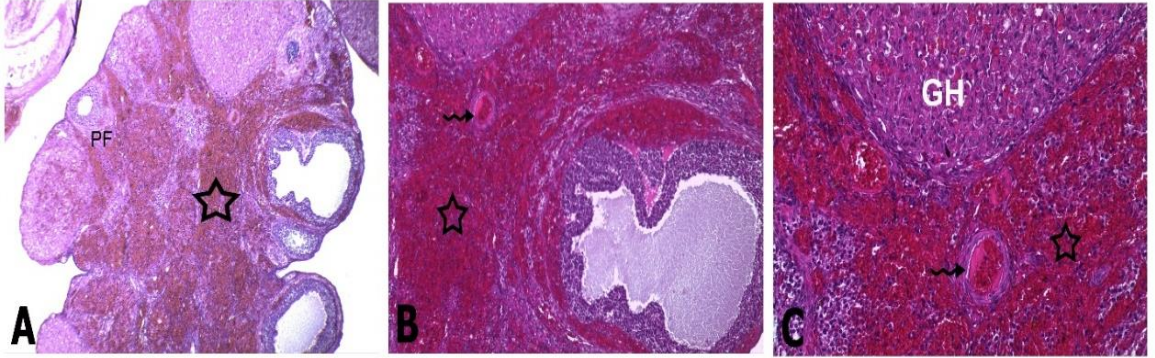
Sham grubuna ait HE ile boyanmış over dokuları histolojik olarak incelendiğinde, dışta korteks içte medulla sağlıklı olarak gözlemlendi. Overin yüzeyini saran, tek katlı kübik epitelden oluşan germinal epitel ve altındaki tunika albuginea normal görünümünde izleniyordu. Germinal epitel bazı alanlarda tek katlı yassı hücrelerden oluşuyordu. Düzensiz sıkı bağ dokusundan oluşan tunika albugineanın hemen altında primordiyal foliküller vardı. Farklı gelişim evrelerinde olan primer, sekonder ve tersiyer foliküllerin içinde zona pellusida ile çevrelenmiş oositler gözlemlendi. Foliküllerin arasındaki bağ dokusu hücreleri normal bir yapı sergiliyordu. Korpus luteum yapıları ve atrezik foliküller ise kortekste izlenen diğer yapılar idi. Korteksin altında ve overin iç kısmında bulunan ince medulla tabakasında, fibroelastik bağ dokusu içinde soluk boyanan stromal hücreler, bol miktarda damar ve sinir yapıları izlendi (Şekil 4.1.)



Şekil 4.1. Sham grubundaki sıçanlardan elde edilen over kesitinin ışık mikrofotografı. **KL:** Korpus luteum, **M:** Medulla, **PF:** Primer folikül, **SF:** Sekonder folikül, **TA:** Tunika albuginea, **GH:** Granüloza Hücreleri, **Ok:** Germinal epitel. **Büyütme:** A; x4, B; x10, C; x20, **Boya:** HE

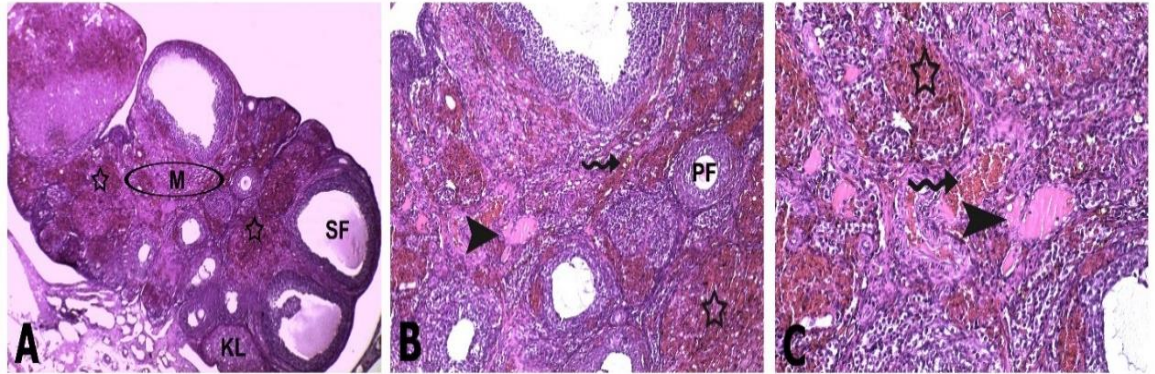
İR grubuna ait over kesitleri, Sham grubunun HE ile boyanmış over kesitleri ile karşılaştırıldığında, over korteksinde ve özellikle medullada yoğun hemoraji

alanları görüldü. Organda belirgin ödem ve kan damarlarında vasküler konjesyon dikkat çekiciydi (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. İR grubundaki sıçanlardan elde edilen over kesitinin ışık mikrosafı. **Yıldız:** Hemoraji, **PF:** Primer folikül, **Kıvrımlı ok:** Vasküler konjesyon, **GH:** Granüloza Hücreleri **Büyütme:** A; x4, B; x10, C; x20, **Boya:** HE

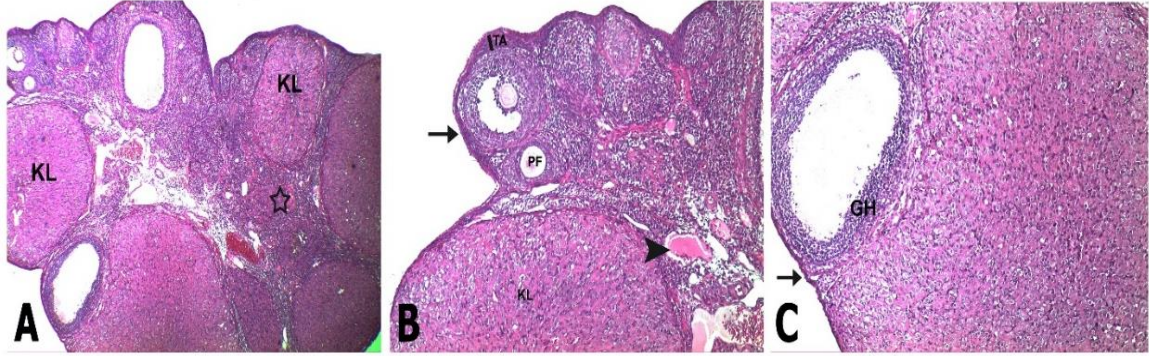
Reperfüzyondan 30 dk. önce intraperitoneal olarak 1 ml serum fizyolojik enjekte edilen İR-SF grubunda over medullasındada yoğun hemoraji alanları ve vasküler konjesyon görüldü. Özellikle medullada, primer ve sekonder foliküllerin etrafında belirgin ödem izlendi (Şekil 4.3.)



Şekil 4.3. İR-SF grubundaki sıçanlardan elde edilen over kesitinin ışık mikrosafı. **M:** Medulla, **SF:** Sekonder folikül, **KL:** Korpus luteum, **PF:** Primer folikül **Kıvrımlı ok:** Vasküler konjesyon, **Yıldız:** Hemoraji, **Ok başı:** ödem. **Büyütme:** A; x4, B; x10, C; x20, **Boya:** HE

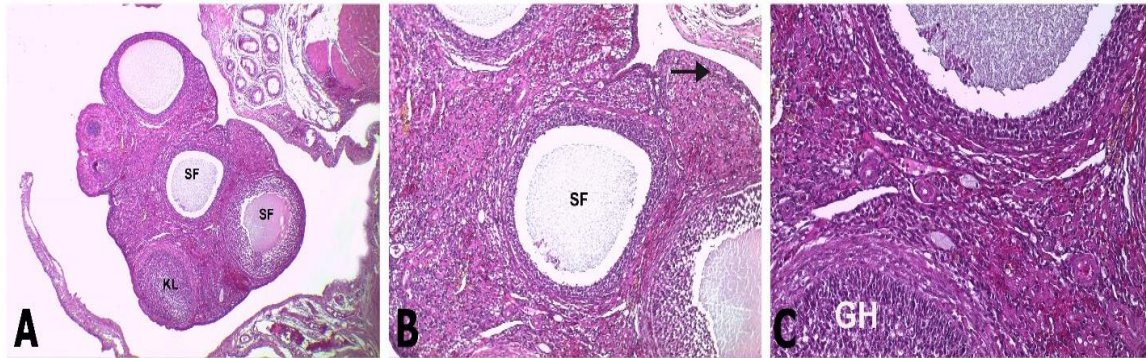
Reperfüzyondan 30 dk önce intraperitoneal olarak 15 mg/kg viteksin uygulanan İR-15V grubunda daha az hemorajik alan gözlemlendi. Foliküllerde ve korpus luteumda histolojik yapı normale yakındı. Hasarın İR ve İR-SF gruplarına kıyasla azaldığı, ancak

korteks ve medullada yer yer dejeneratif değişikliklerin varlığı izleniyordu. Bu grupta stromada çok az ödem vardı ve vasküler konjesyon da belirgin olarak azalmıştı (Şekil 4.4.)



Şekil 4.4. İR-15V grubundaki sıçanlardan elde edilen over kesitinin ışık mikrofrafı. **KL:** Korpus luteum, **Yıldız:** Hemoraji, **TA:** Tunika albuginea, **Ok başı:** Ödem, **Ok:** Germinal epitel, **GH:** Granüloza Hücreleri. **Büyütme:** A; x4, B; x10, C; x20, Boya: HE

Reperfüzyondan 30 dk önce intraperitoneal olarak 30 mg/kg viteksin uygulanan IR-30V grubu diğer IR grupları ile karşılaştırıldığında; over korteks ve medullasında hemorajik alanların çok daha az olduğu gözlemlendi. Stromal ödem belirgin şekilde azalmıştı. Bağ dokusunda ve bazı foliküllerde görülen küçük kanama odakları dışında dejeneratif değişiklikler izlenmedi. IR-30V grubunda korteks ve medullanın histolojik görünümü IR-15V grubuna kıyasla normal over yapısına daha yakın bir görünüm sergiliyordu (Şekil 4.5.).

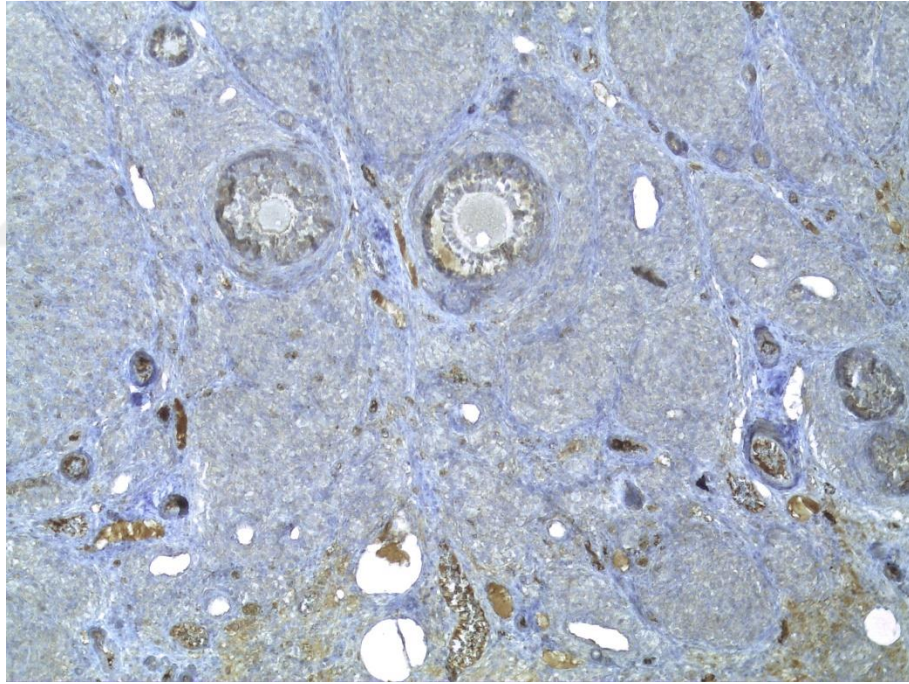


Şekil 4.5. İR-30V grubundaki sıçanlardan elde edilen over kesitinin ışık mikrofrafı. **SF:** Sekonder folikül, **KL:** Korpus luteum, **Ok:** Germinal epitel **GH:** Granüloza Hücreleri. **Büyütme:** A; x4, B; x10, C; x20, Boya: HE

4.1.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

Bütün gruplara ait over dokularında, IL-6, Beclin-1, BNIP-3, Bcl-2 ve kaspaz-3, antikorlarının uygulandığı immünohistokimyasal boyamada pozitif immünreaksiyon veren alanlar kahverengi olarak izlendi (Şekil 4.6-4.30).

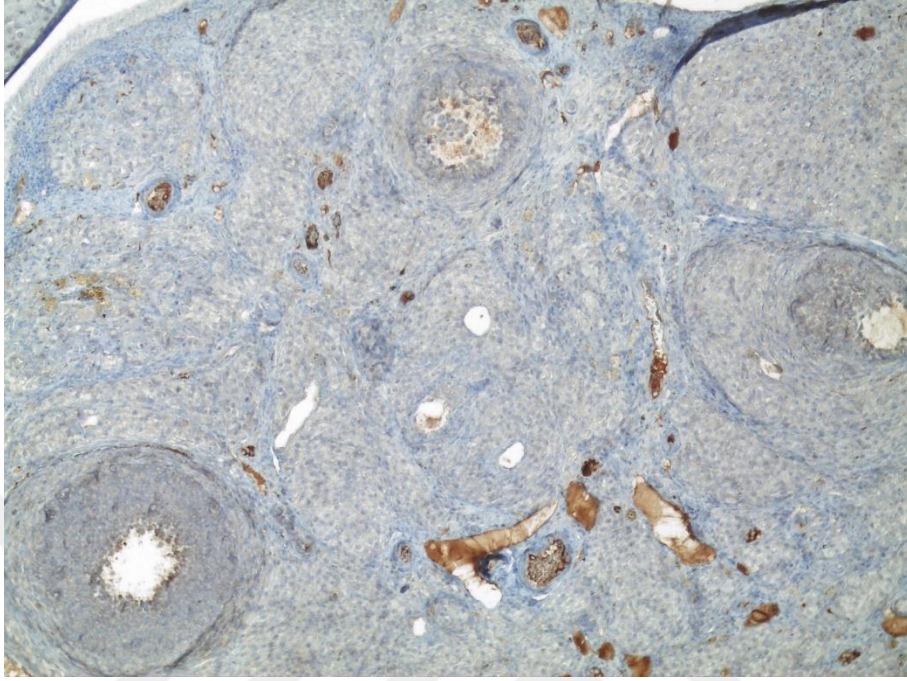
Sham gruplarından alınan over kesitlerinde IL-6 antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda; primer foliküllerin granüloza hücrelerinde ve stromal hücrelerde hafif (+) derecede immün pozitiflik görüldü (Şekil 4.6). Beclin-1 antikoruna ile boyanan sham grubu over kesitlerinde hafif (+) immün pozitiflik izlendi. (Şekil 4.7). BNIP-3 ile yaptığımız immünohistokimyasal analiz sonucu sham grubuna ait over kesitlerinde negatif (-) bir boyanma görüldü. (Şekil 4.8).



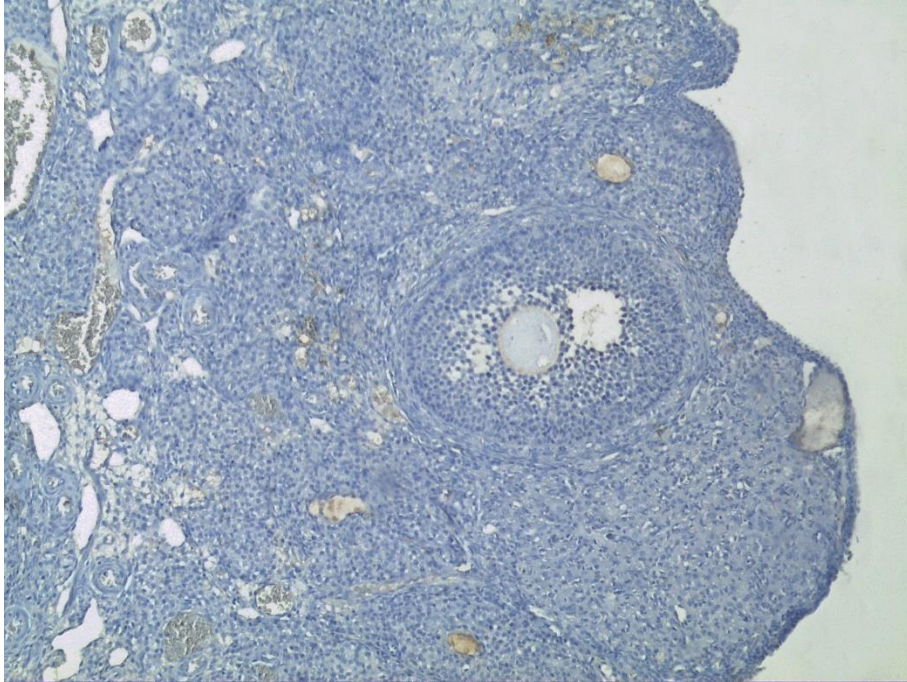
Şekil 4.6. Sham grubundaki sıçanların over dokusunda IL-6 immün pozitifliğini gösteren ışık mikroskop. **Büyütme:** x10.

Anti-apoptik antikor Bcl-2 ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucu sham grubu over kesitlerinde, özellikle primer foliküllerde ve korpus luteumlarda orta derecede (++) immün pozitif boyanan alanlar izlendi (Şekil 4.9). Sham gruplarından alınan over doku kesitlerinde Kaspaz-3 antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal

boyama sonucunda; özellikle stromada olmak üzere foliküller ve korpus luteumda hafif (+) derecede immün pozitiflik görüldü (Şekil 4.10).



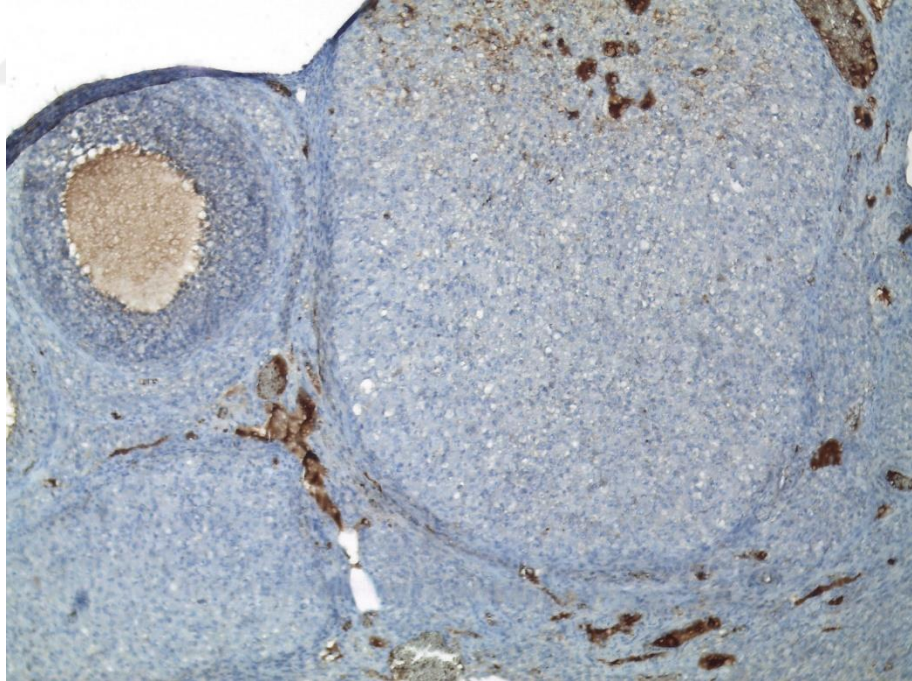
Şekil 4.7. Sham grubundaki sıçanların over dokusunda Beclin-1 immün pozitifliğini gösteren ışık mikroskop. **Büyütme:** x10



Şekil 4.8. Sham grubundaki sıçanların over dokusunda BNIP-3 immün pozitifliğini gösteren ışık mikroskop. **Büyütme:** x10.

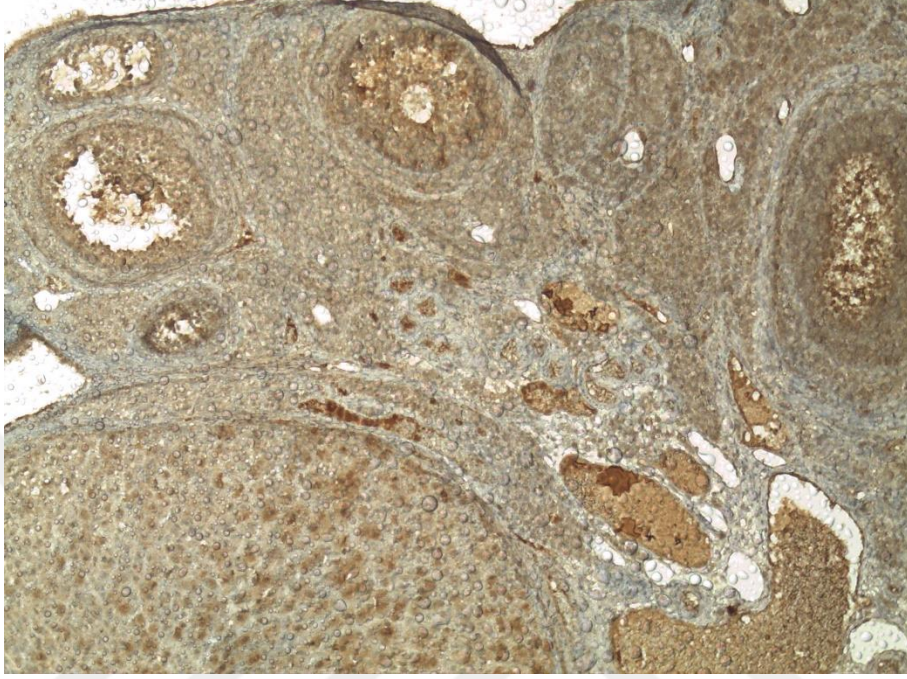


Şekil 4.9. Sham grubundaki sıçanların over dokusunda Bcl-2 immün pozitifliğini gösteren ışık mikroskop. **Büyütme:** x10.



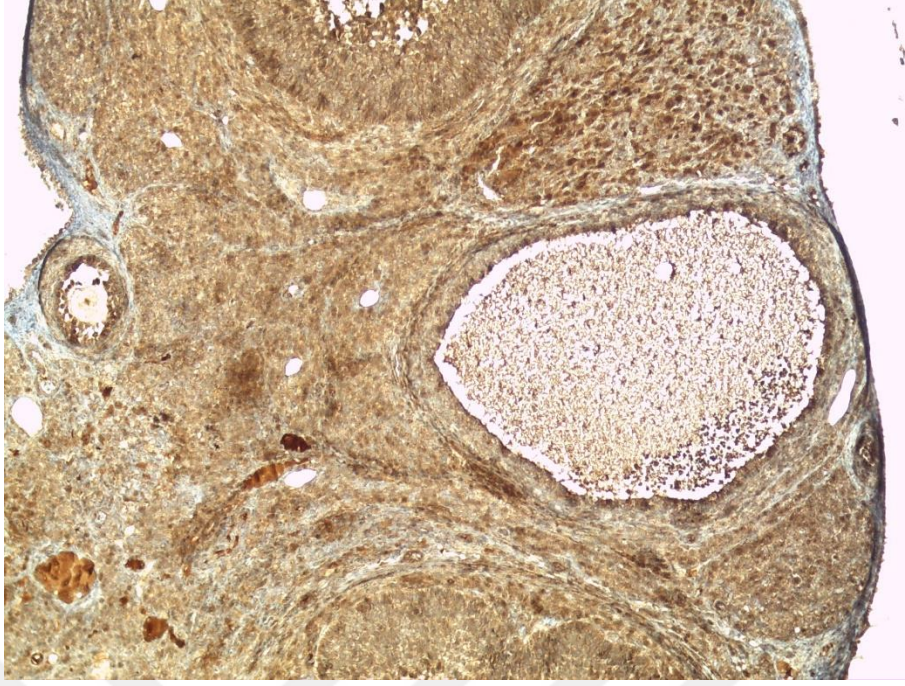
Şekil 4.10. Sham grubundaki sıçanların over dokusunda kaspaz-3 immün pozitifliğini gösteren ışık mikroskop. **Büyütme:** x10.

İR grubundaki over kesitlerinde stromada yaygın bir IL-6 immün pozitifliği izlendi. Özellikle foliküler granuloza hücrelerinde ve luteal hücrelerde şiddetli (+++) derecede immün pozitiflik görüldü (Şekil 4.11).

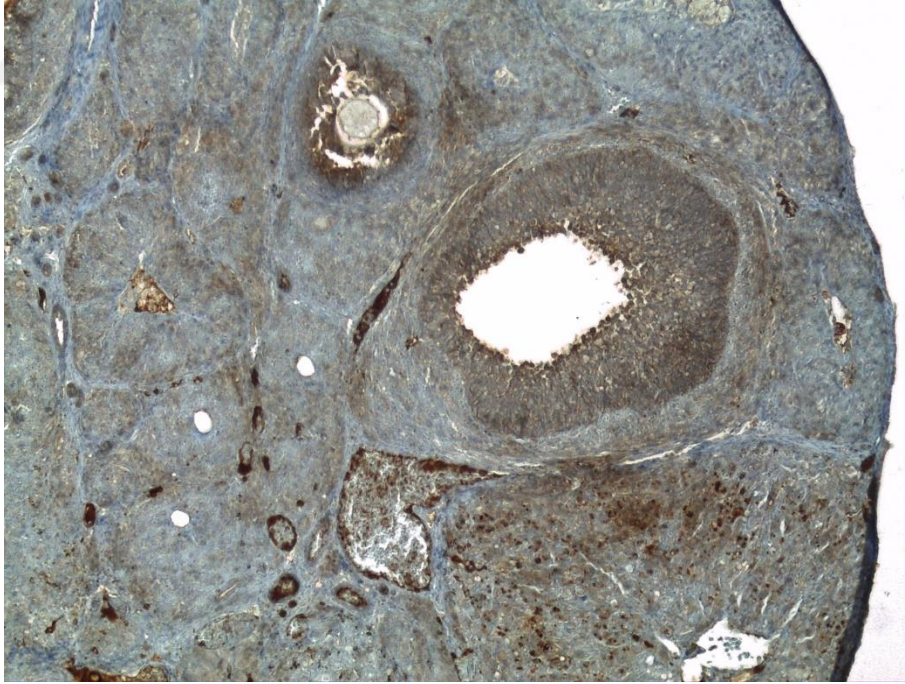


Şekil 4.11. İR grubundaki sıçanların over dokusunda IL-6 immün pozitifliğini gösteren ışık mikroskop. **Büyütme:** x10.

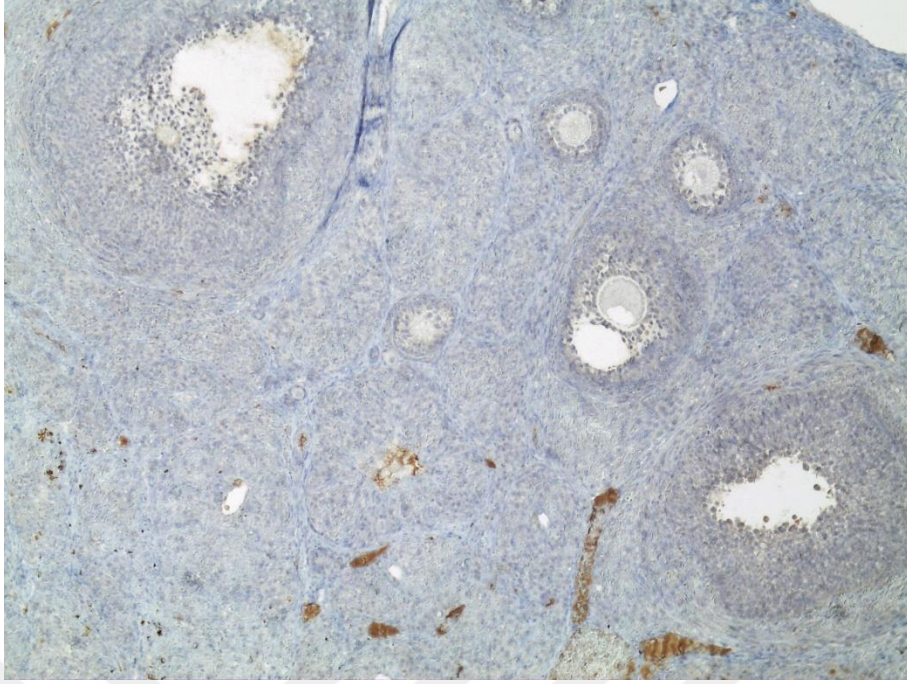
Beclin-1 antikoruna ile immünohistokimyasal boyama sonucunda over dokusu genelinde yaygın ve şiddetli (+++) derecede immün pozitiflik gözlemlendi (Şekil 4.12). Ayrıca BNIP-3'le boyanan over dokusu kesitlerinde de şiddetli (+++) derecede immün pozitiflik izlenmekteydi (Şekil 4.13). Anti-apoptotik protein olan Bcl-2 ise hafif (+) derecede immün pozitiflik gösterdi (Şekil 4.14). İR hasarı oluşturulan grupta kaspaz-3 antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda özellikle over dokusu medulla bölümünde ve granuloza hücrelerinde şiddetli (+++) derecede immün pozitiflik görüldü (Şekil 4.15).



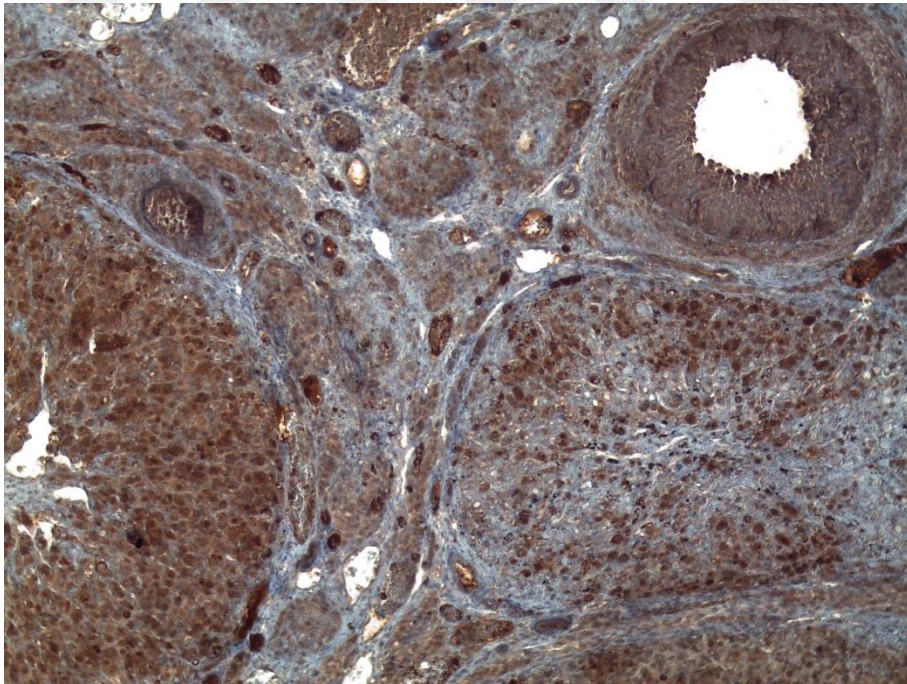
Şekil 4.12. İR grubundaki sıçanların over dokusunda Beclin-1 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrogram. **Büyütme:** x10



Şekil 4.13. İR grubundaki sıçanların over dokusunda BNIP-3 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrogram. **Büyütme:** x10.

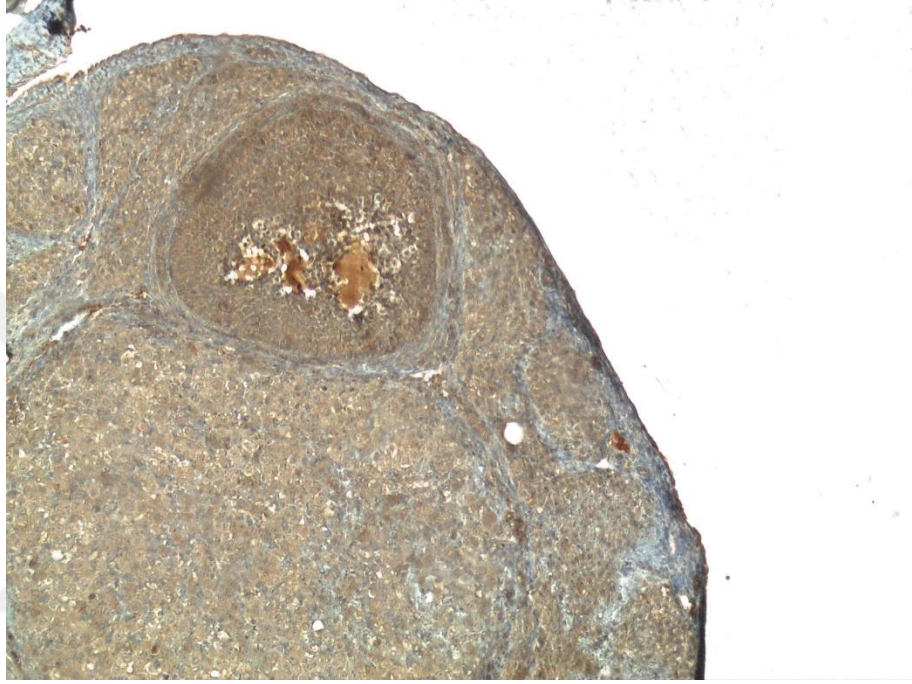


Şekil 4.14. İR grubundaki sıçanların over dokusunda Bcl-2 immün pozitifliğini gösteren ışık mikroskop. **Büyütme:** x10.



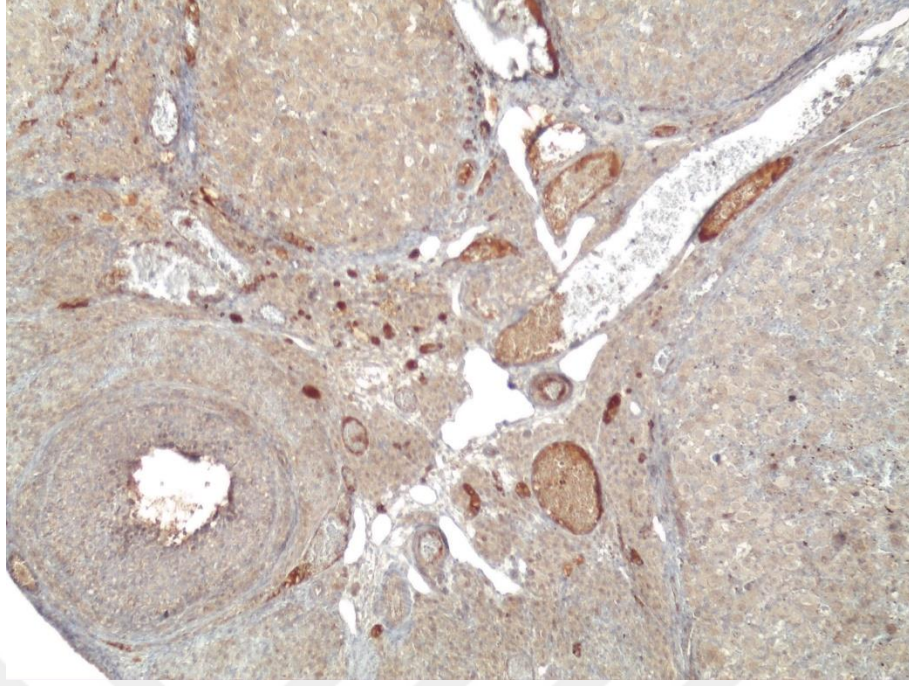
Şekil 4.15. İR grubundaki sıçanların over dokusunda kaspaz-3 immün pozitifliğini gösteren ışık mikroskop. **Büyütme:** x10.

Reperfüzyondan 30 dk. önce intraperitoneal olarak 1 ml serum fizyolojik enjekte edilen İR-SF grubunda IL-6 antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda şiddetli (+++) derecede immün pozitiflik görüldü (Şekil 4.16). İmmün pozitiflik İR grubuna benzer şekilde foliküller, korpus luteum ve stromada yani tüm over dokusunda yaygın olarak izleniyordu.



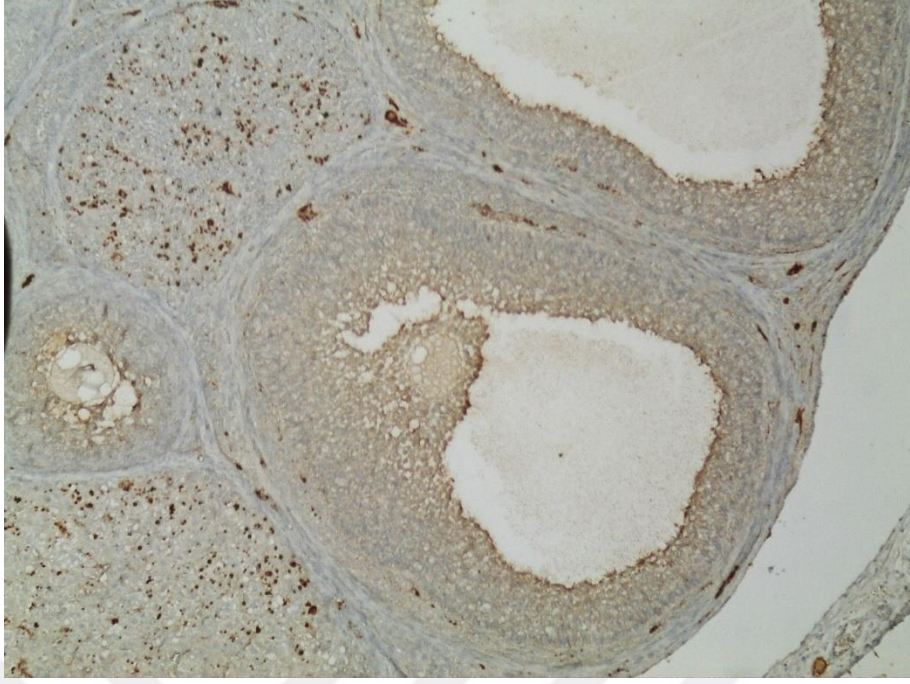
Şekil 4.16. İR-SF grubundaki sıçanların over dokusunda IL-6 immün pozitifliğini gösteren ışık mikroskopik görüntü. **Büyütme:** x10.

Beclin-1 antikoruna ile boyanan over kesitlerinde de İR grubundakine benzer şekilde tüm over dokusunda yaygın ve şiddetli (+++) immün pozitiflik izlendi (Şekil 4.17).

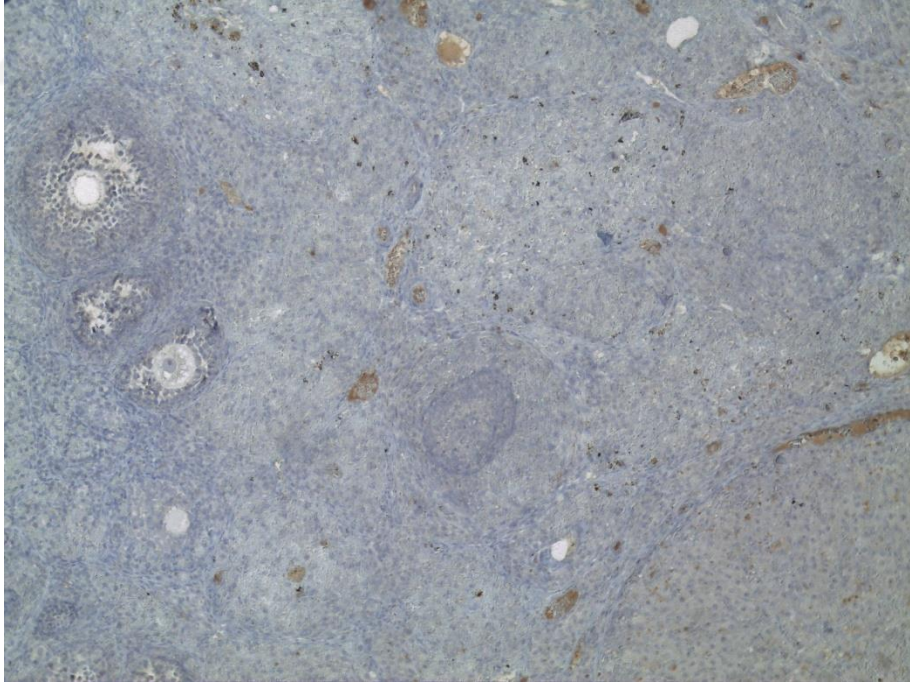


Şekil 4.17. İR-SF grubundaki sıçanların over dokusunda Beclin-1 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrogram. **Büyütme:** x10.

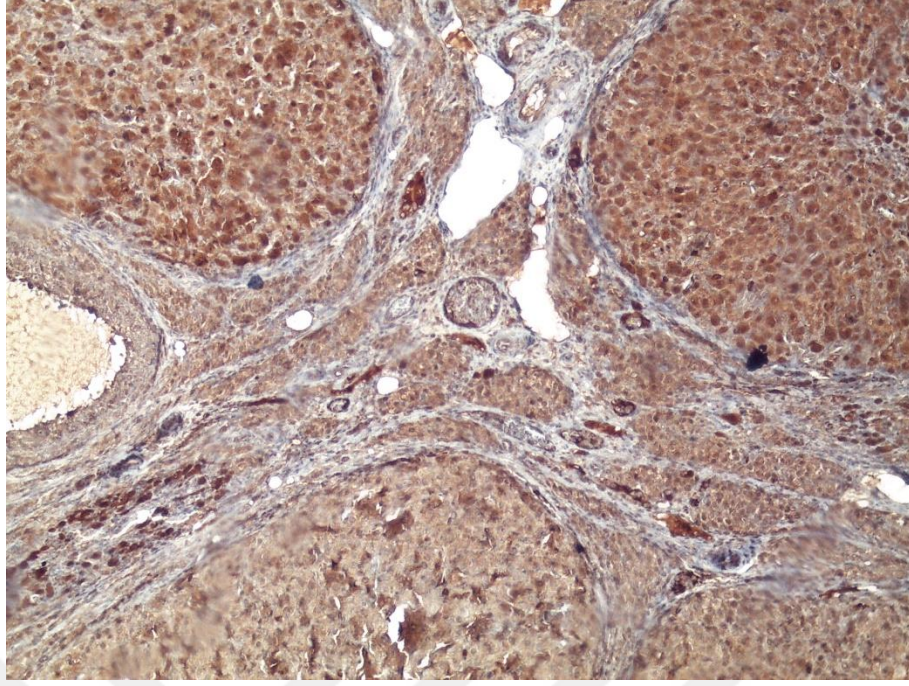
Reperfüzyondan 30 dk. önce intraperitoneal olarak 1 ml serum fizyolojik enjekte edilen İR-SF grubu over dokularında BNIP-3 antikoru ile boyanan kesitlerde, granüloza hücrelerinde ve lüteal hücrelerde orta (++) derecede immün pozitiflik izlendi (Şekil 4.18). Yine İR-SF grubundan aldığımız kesitlerde Bcl-2 antikoru ile yaptığımız immünohistokimyasal analiz sonucu hafif (+) derecede immün pozitiflik görüldü (Şekil 4.19). İR-SF grubunda kaspaz-3 antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda; korpus luteumda daha bariz olmak üzere tüm over dokusunda şiddetli (+++) derecede immün pozitiflik izlendi (Şekil 4.20).



Şekil 4.18. İR-SF grubundaki sıçanların over dokusunda BNIP-3 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrogram. **Büyütme:** x10.

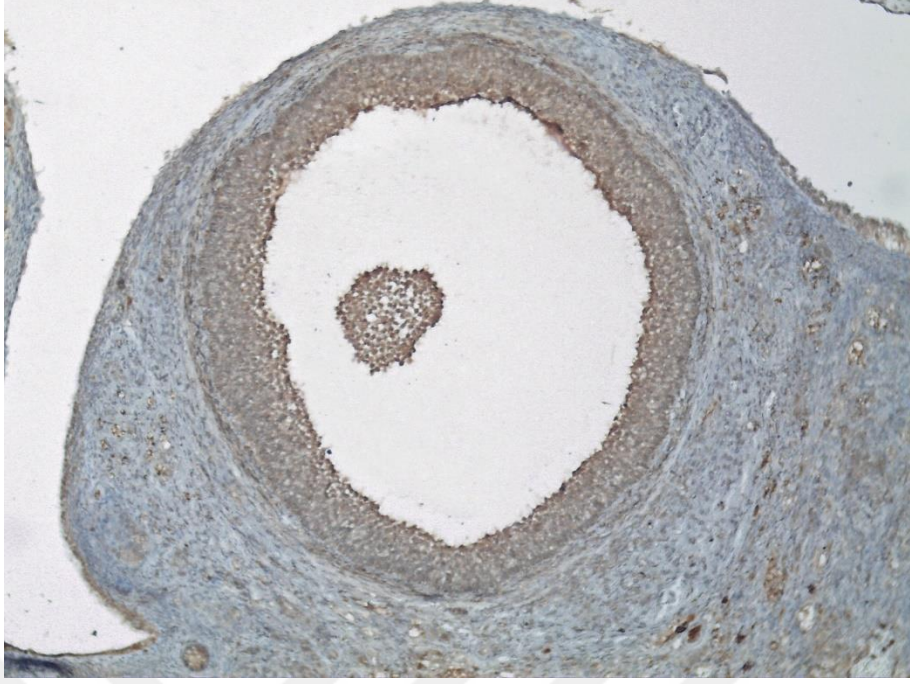


Şekil 4.19. İR-SF grubundaki sıçanların over dokusunda Bcl-2 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrogram. **Büyütme:** x10.

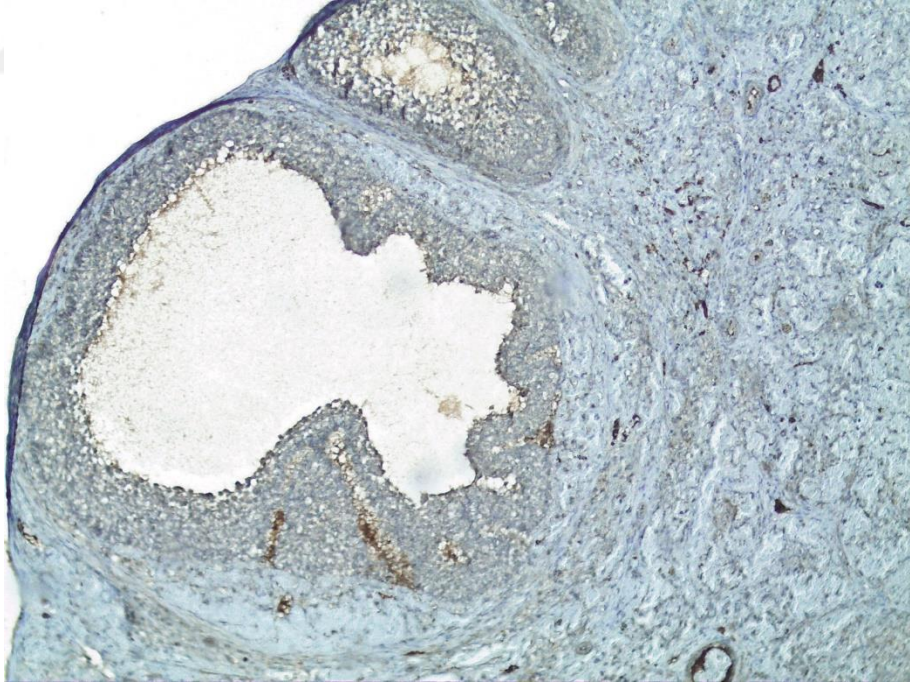


Şekil 4.20. İR-SF grubundaki sıçanların over dokusunda kaspaz-3 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrogram. **Büyütme:** x10.

Reperfüzyondan 30 dk önce intraperitoneal olarak 15 mg/kg viteksin uygulanan İR-15V grubunda, IL-6 antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda İR ve İR-SF gruplarındaki immün pozitifliğin azaldığı ve hafif (+) derecede immün pozitifliğin varlığı görüldü. Hatta granüloza hücrelerinde orta derecede olan pozitiflik stromada hafif derecedeydi (Şekil 4.21). Ayrıca Beclin-1 antikoru ile boyanan İR-15V over kesitlerinde immün pozitiflik azalarak tüm overde hafif (+) derecede izlendi (Şekil 4.22).

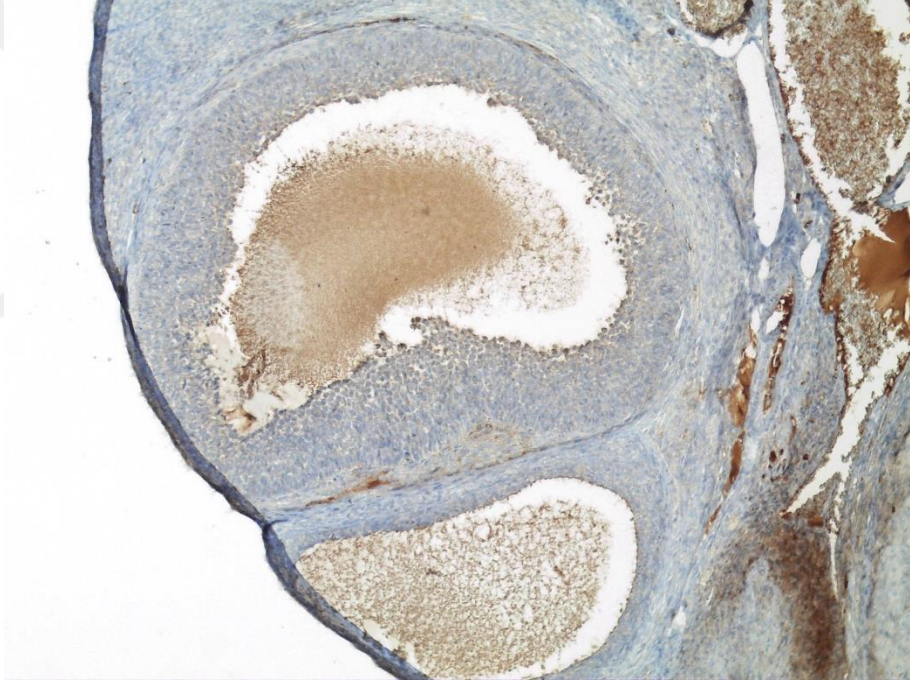


Şekil 4.21. İR-15V grubundaki sıçanların over dokusunda IL-6 immün pozitifliğini gösteren ışık mikroskop. **Büyütme:** x10.

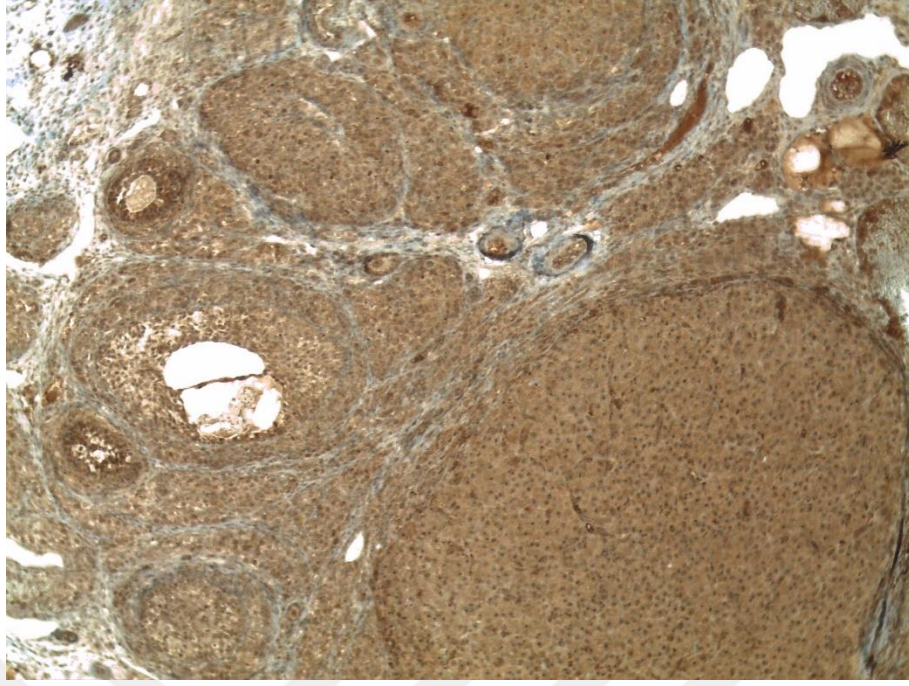


Şekil 4.22. İR-15V grubundaki sıçanların over dokusunda Beclin-1 immün pozitifliğini gösteren ışık mikroskop. **Büyütme:** x10.

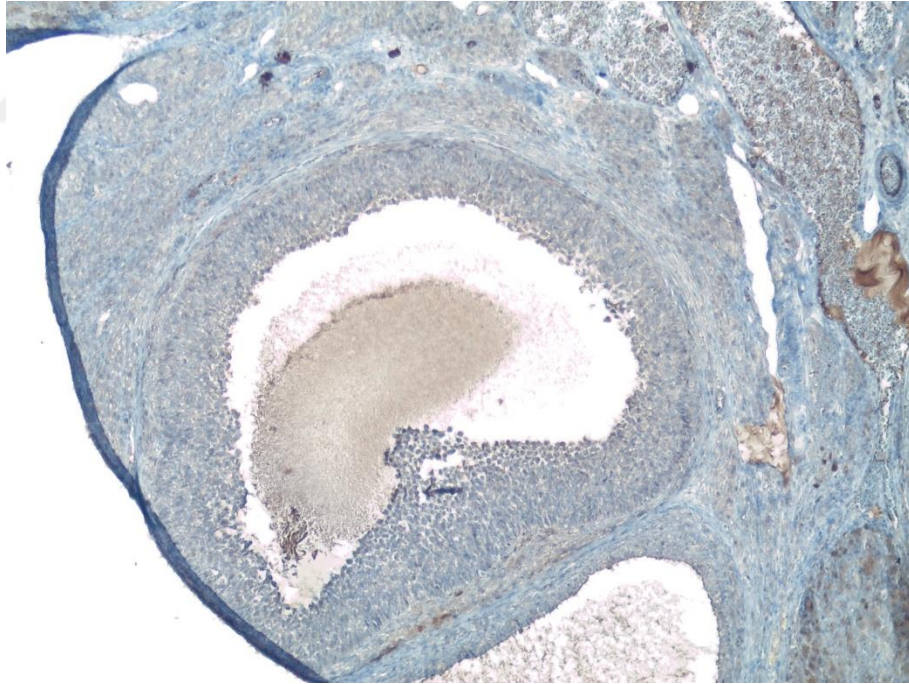
Reperfüzyondan 30 dk önce intraperitoneal olarak 15 mg/kg viteksin uygulanan İR-15V grubunda BNIP-3 antikorunun hafif (+) derecede immün pozitif boyandığı izlendi. (Şekil 4.23). Ancak anti-apoptik protein olan Bcl-2 antikoru ile yaptığımız immünohistokimyasal analiz sonucu over dokusunda şiddetli(+++) derecede immün pozitiflik görüldü (Şekil 4.24). Hatta bu pozitiflik sham grubundakinden bile fazlaydı. İR-15V grubunda kaspaz-3 antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda, İR gruplarındaki şiddetli immün pozitifliğin yerini özellikle foliküllerde ve stromada hafif (+) derecede immün boyanmanın aldığı izlendi (Şekil 4.25).



Şekil 4.23. İR-15V grubundaki sıçanların over dokusunda BNIP-3 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrogram. **Büyütme:** x10.



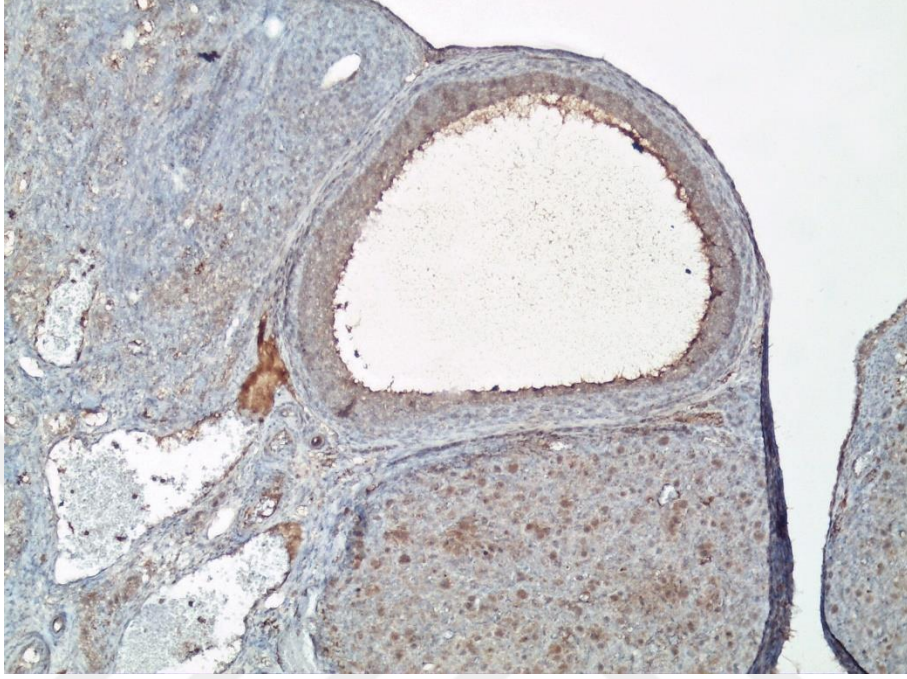
Şekil 4.24. İR-15V grubundaki sıçanların over dokusunda Bcl-2 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrogram. **Büyütme:** x10.



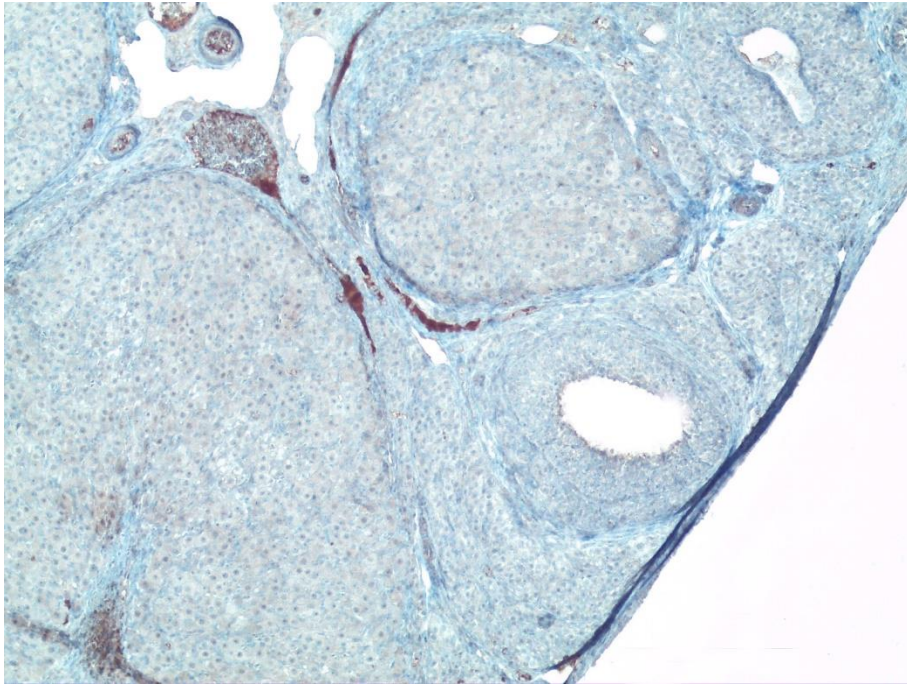
Şekil 4.25. İR-15V grubundaki sıçanların over dokusunda kaspaz-3 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrogram. **Büyütme:** x10.

Reperfüzyondan 30 dk önce intraperitoneal olarak 30 mg/kg viteksin uygulanan İR-30V grubunda yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda IL-6 antikoru

immün pozitifliği hafif (+) olarak gözlendi (Şekil 4.26). Ayrıca Beclin-1 antikoru ile boyanan İR-30V grubu over kesitlerinde özellikle kortikal alanlarda immün pozitiflik yok denecek kadar az idi (Şekil 4.27).

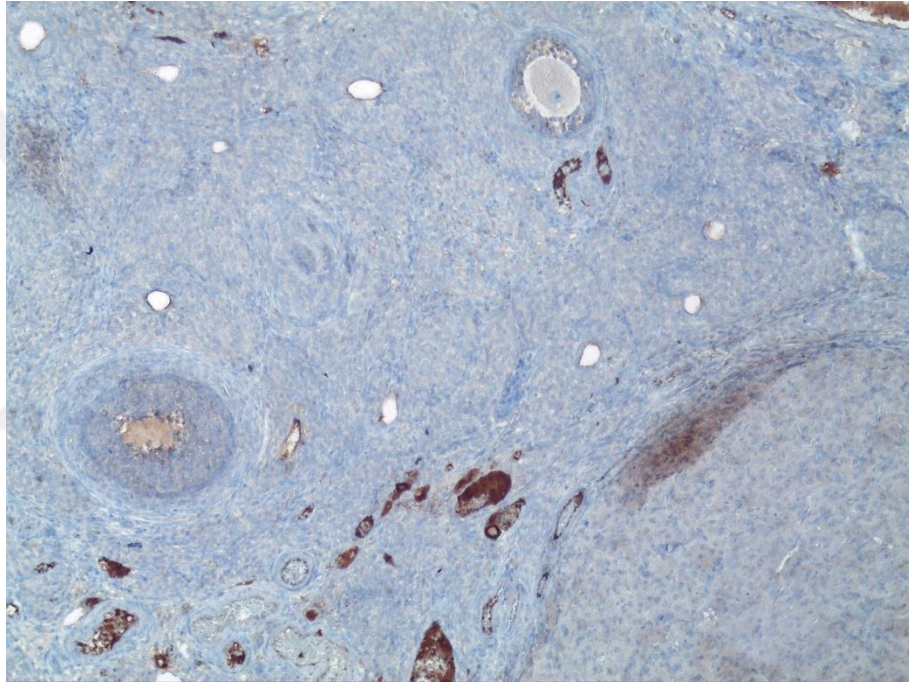


Şekil 4.26. İR-30V grubundaki sıçanların over dokusunda IL-6 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrogram. **Büyütme:** x10.

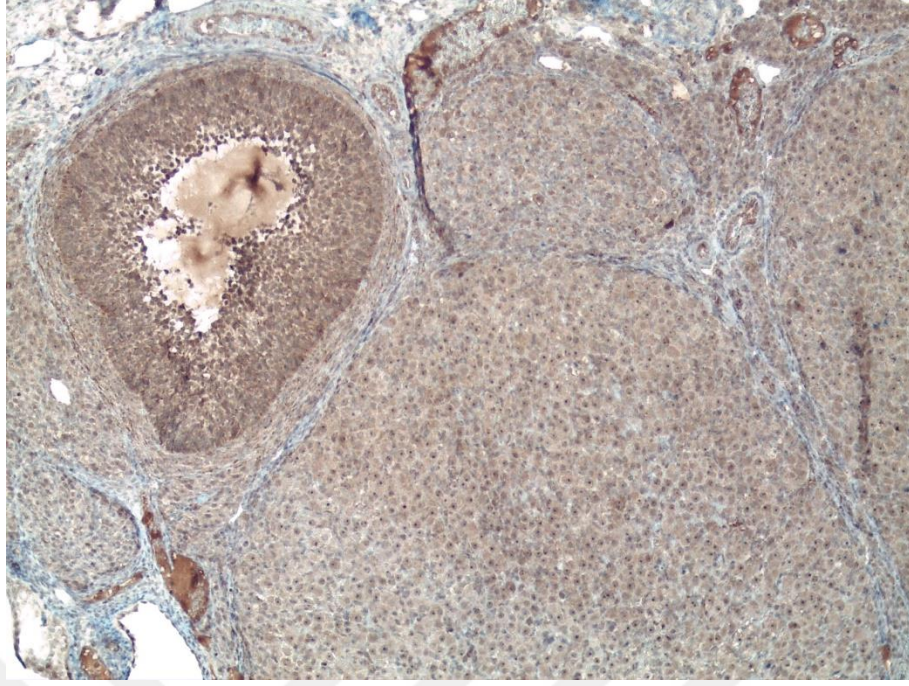


Şekil 4.27. İR-30V grubundaki sıçanların over dokusunda Beclin-1 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrogram. **Büyütme:** x10.

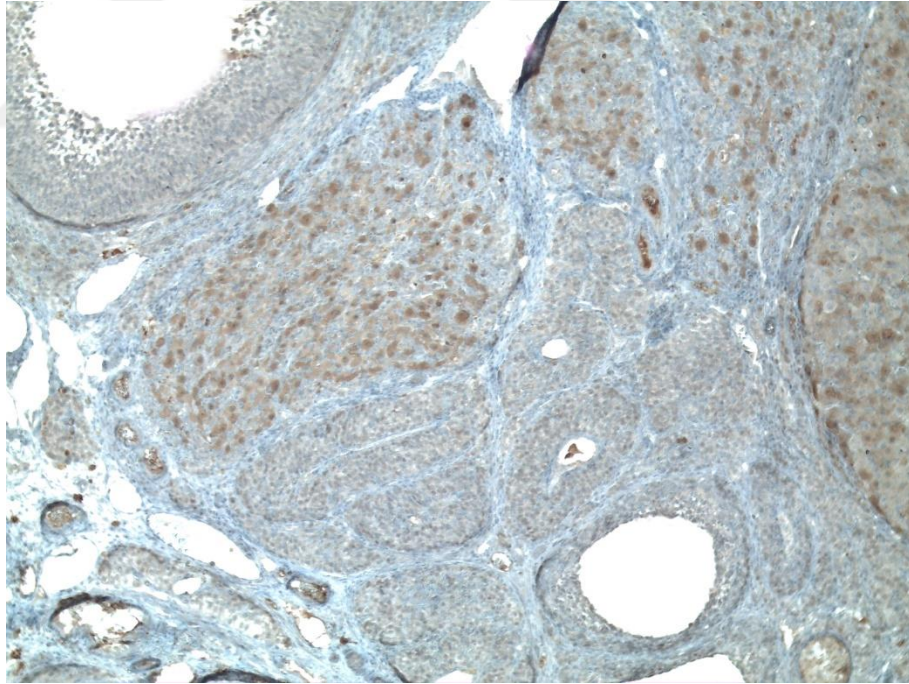
Reperfüzyondan 30 dk önce intraperitoneal olarak 30 mg/kg viteksin uygulanan İR-30V grubunda BNIP-3 antikoruna immün boyanması da Beclin-1 ile benzerlik gösteriyordu ve negatife yakın bir boyanma izlenmekteydi (Şekil 4.28). Bu grupta anti-apoptik protein olan Bcl-2 antikorunun ise tüm over dokusunda özellikle de granüloza hücrelerinde şiddetli (+++) derecede immün pozitif boyandığı dikkat çekiciydi (Şekil 4.29). Kaspaz-3 antikoruna ile boyanan kesitlerde özellikle foliküllerde ve stromal alanlarda immün pozitiflik hafif (+) derecede izlendi (Şekil 4.30).



Şekil 4.28. İR-30V grubundaki sıçanların over dokusunda BNIP-3 immün pozitifliğini gösteren ışık mikrofotograf. **Büyütme:** x10.



Şekil 4.29. İR-30V grubundaki sıçanların over dokusunda Bcl-2 immün pozitifliğini gösteren ışık mikroskop. **Büyütme:** x10.



Şekil 4.30. İR-30V grubundaki sıçanların over dokusunda kaspaz-3 immün pozitifliğini gösteren ışık mikroskop. **Büyütme:** x10.

Doku immunoreaktivitesini değerlendirmek için her gruptaki her bir sıçandan rastgele seçilmiş ortalama üç histolojik kesitten birbiri ile örtüşmeyen en az 3 alan değerlendirildi. Yarı-kantitatif bir skora göre immunreaktif dağılımı ve yoğunluğu

değerlendirildi²¹⁹⁻²²¹. Over dokusu yapısında görülen immün pozitif boyamanın şiddetine göre gruplar arasında değerlendirmenin anlaşılır olması amacıyla yarı-kantitatif skorlama yapıldı. Sonuç olarak over doku immün negatif ise -, immün pozitiflik hafif ise +, orta ise ++ ve şiddetli ise +++ olacak şekilde skorlandı. İmmünohistokimyasal olarak boyadığımız, IL-6, Beclin-1, BNIP-3, Bcl-2 ve kaspaz-3 antikorları over dokusunda immün pozitif boyamanın derecesine yarı kantitatif olarak elde ettiğimiz skorları tablo haline getirdik (Tablo 4.1.2).

Tablo 4.1. İmmünohistokimyasal boyama sonuçları skorlama tablosu

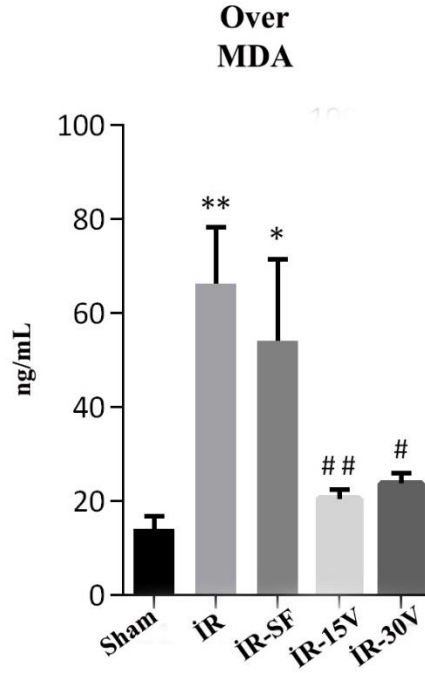
Gruplar	IL-6	Beclin-1	BNIP-3	Bcl-2	Kaspaz-3
Sham	+	+	-	++	+
İR	+++	+++	+++	+	+++
İR-SF	+++	+++	++	+	+++
İR-15V	+	+	+	+++	+
İR-30V	+	+	+	+++	+

4.2. Biyokimyasal Bulgular

4.2.1. Malondialdehit (MDA)

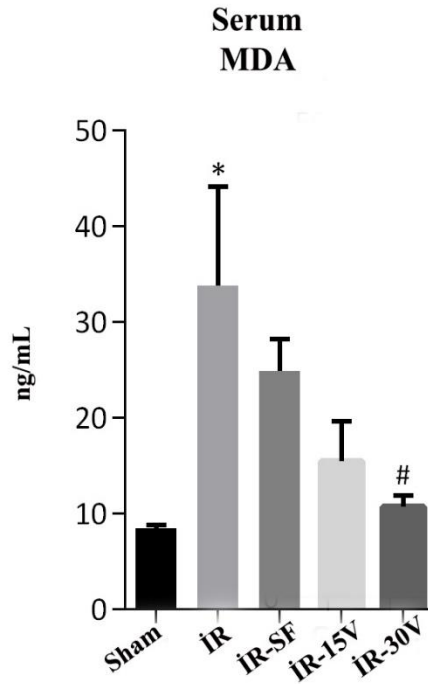
Lipit peroksidasyon son ürünü olan MDA düzeyleri, deney gruplarına ait her bir denekten alınan over doku ve kan örneklerinde ölçüldü. Gruplar arasında karşılaştırma yapıldı ve over dokusu açısından MDA değerleri istatistiksel olarak farklı bulundu ($p<0,05$). Sham grubuyla karşılaştırıldığında, İR-SF grubunda over dokusunda MDA seviyesi istatistiksel anlamda yükselirken ($p<0,05$), İR grubundaki artış daha belirgindi ($p<0,01$). Diğer taraftan İR grubuna kıyasla İR-15V ve İR-30V gruplarındaki MDA düzeylerinin anlamlı derecede azalmış olduğu görüldü. Reperfüzyondan 30 dk önce intraperitoneal olarak 15 mg/kg viteksin uygulanan İR-15V’de MDA seviyesi İR ve İR-SF gruplarına

göre anlamlı bir şekilde azalmıştı ($p<0.01$). Reperfüzyondan 30 dk önce intraperitoneal olarak 30 mg/kg viteksin uygulanan İR-30V’de MDA seviyesi İR ve İR-SF gruplarına göre azalmıştı ($p<0.05$) (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. Over dokusu MDA seviyelerini gösteren grafik. * kontrol ve diğer gruplar arasındaki farklılıkları belirtir. (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$). # İR ve diğer gruplar arasındaki farklılıkları ifade eder. (#: $p<0.05$, ##: $p<0.01$)

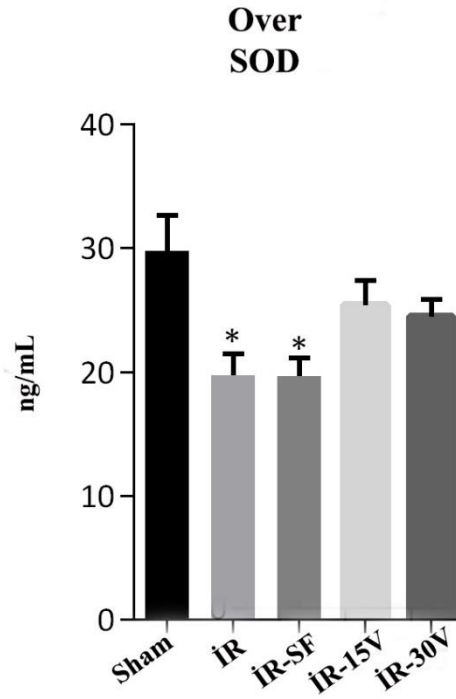
Gruplar serum MDA seviyesi açısından istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; sham grubuna göre, hem İR hem de İR-SF grubunda serum MDA seviyeleri yüksek olarak belirlendi. İR grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlı iken ($p<0.05$) İR-SF grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Viteksin verilen İR-15V ve İR-30V gruplarında MDA seviyeleri İR grubuna göre azalmıştı. Ancak azalma İR-15V grubunda İR grubuna kıyasla anlamlı değilken ($p>0.05$), reperfüzyondan 30 dk önce intraperitoneal olarak 30 mg/kg viteksin uygulanan İR-30V grubunda anlamlıydı ($p<0.05$) (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. Serum MDA seviyelerini gösteren grafik. * kontrol ve diğer gruplar arasındaki farklılıkları belirtir (*: $p < 0.05$). # İR ve diğer gruplar arasındaki farklılıkları ifade eder (#: $p < 0.05$).

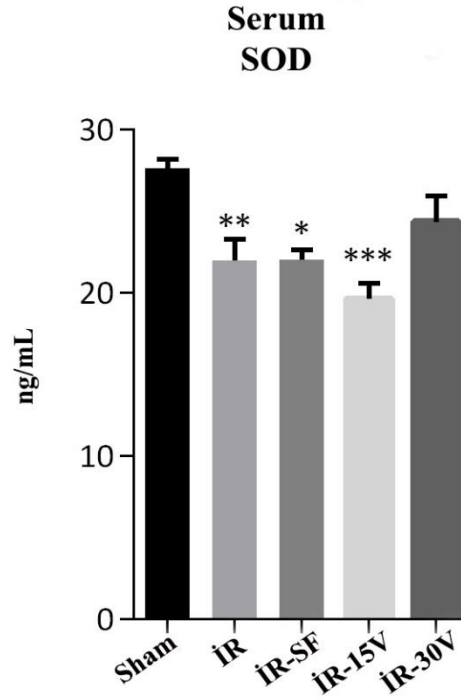
4.2.2. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Tüm deney gruplarındaki sıçanlarda ayrı ayrı ölçülen ve önemli bir antioksidan olan süperoksit dismutaz (SOD) istatistiği Şekil 4.33’de verildi. Sham grubuna göre İR ve İR-SF gruplarında overlerde SOD aktivitesi istatistiksel anlamda belirgin şekilde düşerken ($p < 0.05$), viteksin uygulanan tedavi gruplarında (İR-15V-İR-30V) SOD değerleri sham grubundakine yakındı ve sham grubuyla aralarında istatistiksel olarak bir fark yoktu ($p > 0.05$).



Şekil 4.33. Over dokusu SOD seviyelerini gösteren grafik. * kontrol ve diğer gruplar arasındaki farklılıkları belirtir (*:p<0.05).

Gruplar arasındaki serum SOD aktivitesi incelendiğinde²²² İR grubunda ve İR sonrası reperfüzyondan önce SF verilen grupta serum SOD miktarlarının sham grubuna göre istatistiksel olarak düşük olduğu (sırayla $p<0.01$, $p<0.05$) tespit edildi. Ayrıca reperfüzyondan 30 dk önce intraperitoneal olarak 15 mg/kg viteksin uygulanan İR-15V gruplarında serumda SOD aktivitesinin sham grubuna göre önemli şekilde azaldığı ($p<0.001$) görüldü. Serum SOD seviyesi açısından İR-30V grubundaki değer Sham grubundakine yaklaşıyordu ve sham grubu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.34).

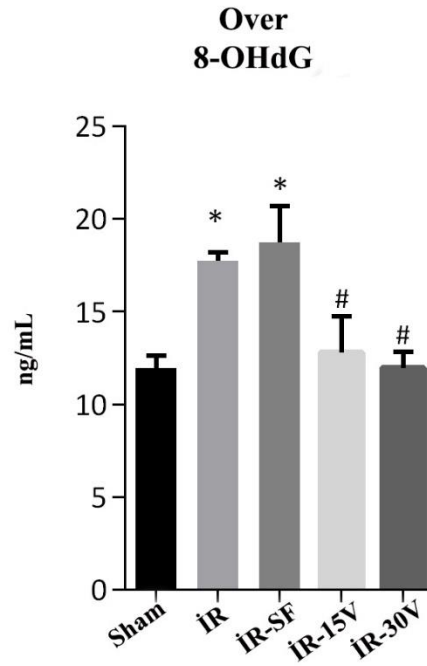


Şekil 4.34. Serum SOD seviyelerini gösteren grafik. * kontrol ve diğer gruplar arasındaki farklılıkları belirtir (*:p<0.05, **: p<0.0, ***: p<0.001).

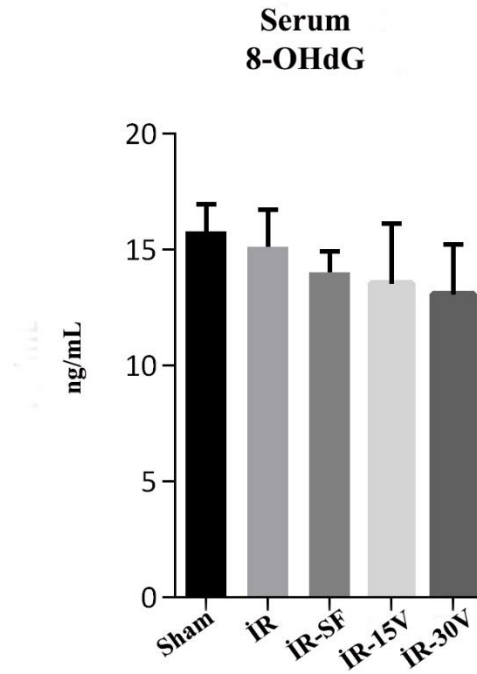
4.2.3. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG)

Bütün gruplara ait sıçanların overlerinde ölçülen oksidatif DNA hasar göstergesi olan, 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) değerleri Şekil 4.35.'de gösterildi. Sham grubuyla karşılaştırıldığında, iskemi- reperfüzyon grupları olan İR ve İR-SF gruplarında ovaryum 8-OHdG seviyesi istatistiksel anlamda belirgin şekilde yüksek bulundu (p<0.05). 15 mg/kg ve 30 mg/kg viteksin uygulanan İR-15V ve İR-30V gruplarında 8-OHdG seviyeleri iskemi-reperfüzyon gruplarına göre belirgin şekilde azalmıştı (p<0.05) ve sham grubuyla aralarında fark yoktu (p>0.05).

Beş deney grubunun serum 8-OHdG düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 4.36.)



Şekil 4.35. Over dokusu 8-OHdG seviyelerini gösteren grafik. * kontrol ve diğer gruplar arasındaki farklılıkları belirtir (*:p<0.05). # İR ve diğer gruplar arasındaki farklılıkları ifade eder (: p<0.05).



Şekil 4.36. Serum 8-OHdG seviyelerini gösteren grafik.

Tablo 4.2. Gruplara ait biyokimyasal parametreler (ortalama±standart sapma)

Gruplar	Over MDA	Serum MDA	Over SOD	Serum SOD	Over 8-OHdG	Serum 8-OHdG
SHAM	14,22 ± 2,601	8,491 ± 0,3069	29,80 ± 2,832	27,62 ± 0,5674	11,98 ± 0,6496	14,50 ± 0,6915
İR	66,25 ± 12,00	33,78 ± 2,601	19,73 ± 1,726	21,98 ± 1,323	17,72 ± 0,4890	15,24 ± 1,450
İR-SF	54,17 ± 17,20	26,34 ± 2,947	19,67 ± 1,419	22,02 ± 0,6380	18,75 ± 1,928	14,97 ± 0,8541
İR-15V	20,55 ± 2,009	15,49 ± 4,125	25,40 ± 1,993	23,71 ± 1,094	12,79 ± 1,953	11,89 ± 0,5906
İR-30V	23,75 ± 2,147	10,73 ± 1,146	24,46 ± 1,380	24,34 ± 1,585	11,96 ± 0,8788	12,18 ± 0,8619

5. TARTIŞMA

Over torsiyonunda oluşan iskemi sırasında dokulara yeterli miktarda oksijen gidemez. Bu nedenle oluşan hipoksi ile birlikte hücresel fonksiyonların bozulmasına bağlı olarak hücre ölümüne kadar gidebilen bir dizi kimyasal olaylar meydana gelmektedir.²²³⁻²²⁵ Reperfüzyon sonucu dokuya tekrar oksijen desteğinin sağlanmasıyla sisteme aniden aşırı miktarda giren oksijen, serbest oksijen radikallerinin oluşmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle dokuda meydana gelen hasar daha da artmaktadır. Yapılan çalışmalarda over İR hasarı oluşumunda otofaji ve apoptoz gibi mekanizmaların da rol aldığı belirtilmektedir.

Bu çalışmada iskemi ve reperfüzyon sonucu sıçan overlerinde oluşan hasarın inflamasyon ve oksidatif stresin yanı sıra, otofaji ve apoptoz ile olan ilişkisi ve bu hasar üzerinde antiinflamatuvar ve antioksidan ajan olan viteksinin etkisi, histokimyasal, immunohistokimyasal ve biyokimyasal olarak araştırıldı.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda iskemi-reperfüzyon sonucu dokuda oluşan hasar, bu hasarda serbest oksijen radikallerinin yeri ve antioksidanların bu hasarı gidermedeki etkileri araştırılmış.²²⁶ Reperfüzyon ile birlikte dokuya gelen lökositlerin, serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olarak oksidatif hasarı tetiklediği bildirilmiştir. Lökosit toplanmasının inhibe edilmesi durumunda ise oksidatif hasarın azaltıldığı tespit edilmiştir.²²⁶ İskemi-reperfüzyon hasarını önlemek ve azaltmak için birçok farmakolojik etken maddeyle değişik çalışmalar yapılmıştır.²²⁶⁻²²⁹

Yaptığımız histolojik incelemede sham grubuyla İR grupları karşılaştırıldığında; sham grupları normal over görünümündeyken, İR gruplarında şiddetli hasar görülmekteydi. Bu gruplarda ovaryan kortekste ve medullada yoğun hemoraji alanları olduğu ve ovaryumu besleyen kan damarlarında vasküler konjesyonun var olduğu görüldü. İR hasarını önlemek amacıyla viteksin uygulanan tedavi gruplarında ise daha az

hemoraji olduğu tespit edildi ancak yine de korteks ve medullada yer yer dejeneratif bazı değişikliklere rastlandı. Bu sonuçlara göre Wang ve arkadaşları⁵⁵ beyin iskemi-reperfüzyon hasarında viteksinin serebral enfarktüs hacmini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Min ve arkadaşları²¹⁸ hipoksik-iskemik yaralanmaya bağlı enfarktüsün viteksin tedavisiyle azaltıldığını bildirmiştir. Jiang ve arkadaşları²³⁰ serebral arter tıkanması kaynaklı felçli sıçanlarda viteksinin beyin enfarktüs hacmini belirgin şekilde azalttığını göstermiştir. Biz de deneysel olarak over İR hasarı oluşturduğumuz sıçanların overlerinde meydana gelen hasarın, viteksin verilmesiyle belirgin şekilde azaldığını, özellikle 30mg/kg viteksin verilen grupta histolojik görünümün belirgin şekilde normale yaklaştığını gözlemledik.

Çalışmamızda iskemik hasarın seyrinde ve gelişmesinde çok önemli rol oynayan inflamatuvar mediyatörlerden IL-6 da incelendi. IL-6; fibroblast, endotel hücreleri, tümör hücreleri, makrofaj ve T hücrelerinden sentez edilmektedir ve hematopoietik hücrelerin farklılaşması üzerine önemli etkileri vardır. Serum IL-6 konsantrasyonlarının artışı otoimmün hastalıklar, inflamasyon ve sepsis gibi hastalıklarda görülmektedir. IL-6 ayrıca İR hasarında salınan sitokinlerdendir.^{231, 232} Sonuçlarımıza göre İR ve İR-SF gruplarında IL-6 molekülünün immün pozitifliği belirgin bir şekilde artarken, tedavi gruplarında ise ekspresyon düzeyinin azaldığını tespit ettik. Karamiş ve arkadaşları²³³ over iskemi-reperfüzyon hasarında beta karoten uygulanan gruplarda IL-6 ekspresyonlarının normale yaklaştığını ancak iskemi-reperfüzyon gruplarında ise IL-6 ekspresyonlarının aşırı derecede arttığını bildirmiştir. Cohen ve arkadaşları¹⁴³ over torsiyonu tanısında IL-6 sitokin düzeylerinin önemli olduğunu belirtmiştir. Daponte ve arkadaşları²³⁴ şiddetli karın ağrısı ve over kitlesine sahip kadın hastalarda serum IL-6 seviyelerini inceleyerek over torsiyonu teşhisinde yardımcı olabileceğini iddia etmiştir. Wu ve arkadaşları²³⁵ ile Kim

ve arkadaşları²³⁶ fare karaciğeri, Li ve arkadaşları²³⁷ ise fare myokartında deneysel İR hasarında, serum IL-6 düzeylerinde önemli derecede artışlar olduğunu tespit etmiştir.

Beclin-1 otofaji ve tümör gelişiminin baskılanmasında görev almaktadır. Otofajide, otofaji için gerekli olan çift zarlı otofagozom oluşumunda görevlidir. Beclin-1'in kaybı insanlarda ovaryum, meme ve prostat kanserlerine neden olmaktadır.¹⁵ BNIP-3 ise Bcl-2 protein ailesinden olup, apoptozis ve hipokside görev alan bir proteindir ve otofajide rol aldığı çeşitli sistemlerde gösterilmiştir. BNIP-3 ve Beclin-1'in etkileşim içinde oldukları bazı sistemlerde gösterilmiştir.¹⁹ Yaptığımız çalışmada; iskemi-reperfüzyon gruplarında Beclin-1 ekspresyon düzeyi artarken viteksin ile tedavi gruplarında immunoreaktivitede görülür derecede azalma olduğu ve kontrole yakın bir immunoreaktivite gösterdiği tespit edildi. BNIP-3 ekspresyon düzeyi ise iskemi-reperfüzyon gruplarında şiddetli derecede artarken, tedavi gruplarında ekspresyon düzeyinin azaldığı belirlendi. Kalp İR hasarında berberin bitkisinin faydalı etkisiyle BNIP3 ve Beclin-1 proteinlerinin ekspresyon düzeyinin azalmasının, otofajinin inhibe edilmesiyle alakalı olduğu belirtilmiştir.²³⁸ Jiang ve arkadaşları serebral arter tıkanması sonucu oluşan felçli sıçanlarda Beclin-1 oranının artmasının viteksin tarafından inhibe edildiğini tespit etmiştir.²³⁰ Yapılan bir çalışmada Beclin-1'in aşırı ekspresyonunun kolorektal kanser hücre büyümesini baskıladığı ve yüksek Beclin-1 ekspresyonunun uzun yaşama ile ilişki içinde olduğu gösterilmesine rağmen,²³⁹ Beclin-1'in kolorektal kanserdeki fonksiyonu tam olarak tespit edilememiştir.²⁴⁰ Beş gün boyunca hipoksi stresine maruz bırakılarak nekrotizan enterekolit oluşturulan neonatal farelerde apoptozis ve otofaji aktivitesini inceleyen bir çalışmada, otofajinin belirleyicisi olarak Beclin-1 düzeylerine bakılmış ve nekrotizan enterekolit oluşturulan fare ileumunda kontrol grubuna göre Beclin-1 ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir.²⁴¹ Hipoksi ile indüklenen BNIP-3'ün makrofajlarda ve endotelial hücrelerdeki hipoksik hücre ölümünde rol

oynadığı tespit edilmiştir.²⁴² Sowter ve arkadaşları tarafından BNIP-3'ün solid tümörlerin hipoksik bölgelerinden üretildiğini ve aynı zamanda insan solid tümörlerinde ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir.¹⁹⁷ Çalışmamızda İR gruplarında hem Beclin-1 hem de BNIP-3 ekspresyonunun artması over İR hasarında otofajinin rolü olduğunu düşündürmektedir.

Wang ve arkadaşları 2015 yılında viteksinin beyin iskemi-reperfüzyon hasarına karşı etkilerini incelerken Bcl-2'yi yukarı yönde regüle ederek apoptozisi inhibe ettiğini saptamıştır.⁵⁵ İskemi-reperfüzyon kaynaklı miyokardial hasarında viteksinin Bcl-2 ekspresyonunun azalmasını baskıladığı bildirilmiştir.^{51, 243} Yang ve arkadaşları viteksinin Bcl-2 ekspresyonunu artırarak N-metil-D-aspartat kaynaklı nöronal apoptozu baskıladığını tespit etmiştir.⁴⁷ Viteksinin serebral arter kaynaklı felçli sıçanlarda kullanılmasıyla Bcl-2 ekspresyonunu düzenleyerek beyin dokularındaki apoptozu önlediği gösterilmiştir.²³⁰ Yaptığımız çalışmada anti-apoptotik protein olan Bcl-2 ekspresyonu da değerlendirildi. Bcl-2 molekülünün immunoreaktivitesi sham grubunda orta derecede iken, iskemi gruplarında çok az idi. Tedavi gruplarında ise immunoreaktivitede artış gözlemlendi. Yani viteksin Bcl-2 ekspresyonunu arttırarak, over İR hasarının azalmasında rol oynadı.

Kaspazın açılımı "Cysteine Aspartate Specific Proteases-CASPASE-3" olup, sisteinproteaz grubu bir enzimdir.^{168, 169} Kaspaz-3, insanlarda kan ve endotel hücrelerindeki veziküllerde bulunmaktadır. Kaspaz-3'ü ihtiva eden bu veziküllerin inhibisyon ve salınımı, apoptozun indüksiyonunu engelleyebilmektedir. Ayrıca kaspaz-3 DNA polimerazı inaktive ederek hücreyi apoptoza göndermektedir.¹⁶⁷ Apoptotik hücrede, hem intrinsik hem de ekstrinsik yollarla aktive edilen kaspaz-3 zimojen özelliğindedir. Bunun nedeni; kaspaz aktivitesinin hücreleri herhangi bir ayırım göstermeden öldürmesidir.¹⁷⁰ Çalışmamızda yapılan immunohistokimyasal

incelemelerde sham ve tedavi gruplarından alınan over kesitlerinde kaspaz-3 immunoreaktivitesinin hafif derecede olduğu görüldü. İR ve İR-SF gruplarında kaspaz-3 immunoreaktivitesinin şiddetli derecede arttığı tespit edildi. Literatüre baktığımızda viteksinin over İR hasarına olan etkisini araştıran mevcut çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak viteksinin serebral arter tıkanması kaynaklı felçli sıçanlarda etkisini inceleyen Jiang ve ark, kaspaz-3 ekspresyonunu önemli ölçüde azaltarak apoptozu inhibe ettiğini bildirmişlerdir.²³⁰ Kim ve ark'nın kalp dokusunda yaptıkları iskemi-reperfüzyon sonucunda kaspaz-3 aktivasyonu ile hücrede apoptotik cisimciklerin oluştuğunu tespit etmişlerdir.²⁴⁴ Çalışmamızda over İR hasarında artan kaspaz-3 ekspresyonunun apoptozu arttırdığı, viteksinin ise hasarlı dokuda kaspaz-3 aktivasyonunu azaltarak apoptozu inhibe ettiği ve over İR hasarında iyileştirici etkisi olabileceğini gösterdik.

İskemi-reperfüzyon hasarında primer sorumlunun oksidatif stres mekanizması olduğu tespit edilmiştir.²⁴⁵ Dokularda oksidatif stresin belirteci ve lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA kullanılmaktadır.^{246, 247} Over iskemi-reperfüzyon çalışmalarında MDA seviyesinin iskemi-reperfüzyon gruplarında aşırı miktarda arttığı bildirilmiştir.^{229, 248} 2016 yılında yapılan bir çalışmada sıçan overlerinde oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarında N-Asetil Sistein ve Resveratrol uygulanmış ve iskemi-reperfüzyon gruplarında MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre arttığı tespit edilmiştir.²⁴⁹ Çadircı ve arkadaşları atorvastatinin over iskemi-reperfüzyon hasarındaki koruyucu rolünü araştırdıklarında yine iskemi-reperfüzyon gruplarında MDA düzeylerinin anlamlı derecede arttığını tedavi gruplarında ise MDA seviyelerinin anlamlı derecede düşerek kontrol grubuna yaklaştığını göstermiştir.²⁵⁰ Başka bir çalışmada hepatik İR hasarında, iskemi-reperfüzyon grubunda MDA düzeylerinin anlamlı şekilde yükseldiği ve tedavi sonrasında ise anlamlı bir şekilde azaldığı bildirilmiştir.⁴³ Karameşe ve arkadaşları over iskemi-reperfüzyon hasarında beta karoten uygulamasının MDA

seviyelerini azalttığı tespit etmiştir.²³³ Biz de çalışmamızda hem ovaryum dokusu hem de serum MDA düzeyinin iskemi durumunda arttığını, viteksin verilen gruplarda ise azaldığını belirledik.

Çalışmamızda antioksidan koruyucu madde olarak kullandığımız viteksinin SOD aktivitelerini iskemi-reperfüzyon gruplarına göre anlamlı derecede düzelttiğini tespit ettik. Yapılan araştırmalarda over iskemi-reperfüzyon hasarında antioksidanların aşırı miktarda azaldığı tespit edilmiş ve uygulanan tedavi sonrasında ise değerlerin normale döndüğü bildirilmiştir.²⁵¹ Çadircı ve arkadaşları over iskemi-reperfüzyon hasarında SOD seviyesinin anlamlı derecede azaldığını fakat antioksidan olan atorvastatin uygulanan gruplarda ise SOD değerinin anlamlı derecede arttığını tespit etmiştir.²⁵⁰ Tang ve arkadaşları myokardial iskemi-reperfüzyon hasarına karşı viteksin uygulamasının SOD konsantrasyonunu artırdığını bildirmiştir.⁵⁴ Karamiş ve arkadaşları over iskemi-reperfüzyon hasarında beta karoten uygulamasının SOD değerini artırdığını bulmuşlardır.²³³ Bayir ve arkadaşları over torsiyonun ve detorsiyonunda doku hasarının tedavisi için çörekotu uygulamasının SOD değerini artırdığını tespit etmiştir.²⁵² Erkanlı ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada iskelet kasındaki iskemi-reperfüzyon hasarında melatonin uygulamasının SOD aktivitesinin anlamlı derecede arttırdığı gösterilmiştir.²⁵³ Bulduğumuz sonuçlar doğrultusunda over dokusunda antioksidan özelliği ile bilinen viteksin kullanımının oksidatif stresi azalttığını ve iskemi-reperfüzyon kaynaklı hasarın önlenmesinde kullanılabileceğini düşündürmektedir.

8-OHdG, oksidatif DNA hasarı göstergesinin en çok çalışılan parametrelerinden bir tanesidir. Çoğu araştırmacı ROS'un mutasyon yapabilme kapasitesinin tamamını ölçmek için her bir DNA modifikasyonunu çalışmak istemektedir. Fakat 8-OHdG oluşumu; ROS tipine, organizmaya ve maruz kalma süresi gözetmeksizin diğer DNA modifikasyonlarıyla orantılıdır. Bu nedenle 8-OHdG ölçülerek, oksijen radikallerinin

indüklediği hasarın hesaplanması daha kolay olmaktadır.¹⁵⁹ 8-OHdG serum, idrar, doku ve diğer biyolojik materyallerde bulunmaktadır.^{254, 255} 8-OHdG artışına neden olan durumlar arasında hiperglisemi de yer almaktadır.²⁵⁶ Demiryılmaz ve arkadaşları ovaryumda iskemi reperfüzyon hasarına bağlı olarak 8-hydroxyguanine seviyelerinin anlamlı şekilde arttığını bildirmiştir.²⁵⁷ Wakatsuki ve arkadaşları gebe sıçanlarda fetus beyinde iskemi-reperfüzyon tarafından üretilen serbest oksijen radikallerinin DNA'ya saldırarak 8-OHdG seviyelerinde artışa neden olduğunu tespit etmiştir.²⁵⁸ Kurt ve arkadaşları ovaryum iskemi-reperfüzyon hasarı sonucunda 8-OHdG seviyelerinin önemli oranda yükseldiğini belirtmiştir.²⁵⁹ Başka bir çalışmada sıçan ovaryumunda iskemi-reperfüzyonla oluşan oksidatif stres araştırılmış ve 8-OHdG seviyesi anlamlı ölçüde fazla olduğu bildirilmiştir.²⁶⁰ Aynı şekilde Ersoy ve arkadaşları sıçanlarda ovaryum torsiyonu modelinde 8-OHdG seviyesini iskemi-reperfüzyon gruplarında anlamlı ölçüde fazla olduğunu ortaya çıkarmıştır.²⁶¹ Yaptığımız çalışmada da literatür bilgilerine benzer şekilde over dokusunda 8-OHdG seviyelerinin İR durumunda arttığını belirledik. Viteksin ile tedavinin ise 8-OHdG seviyelerini belirgin düzeyde azalttığını tespit ettik.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sıklıkla üreme çağındaki kadınlarda görülen ve fertilizasyonu olumsuz etkileyen over torsiyonunda erken tanı ve en kısa sürede tedaviye başlanması büyük önem taşımaktadır. Cerrahi olarak yapılan detorsiyonun ardından iskemi ve reperfüzyona bağlı hasarı önleyecek hatta geri döndürecek bir ajanın kullanılması, bu hastaların tedavisine önemli katkı sağlayacaktır.

Bu amaçla, yaptığımız bu tez çalışmasında; dişi sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan over iskemi reperfüzyon modelinde anti-inflamatuvar ve anti-oksidan bir madde olan viteksinin etkisi histokimyasal, immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak araştırıldı. Yapılan ışık mikroskopik incelemede İR gruplarında belirgin yapısal hasar olduğu gözlemlendi. Bu hasara inflamasyon, otofaji ve apoptozun da eşlik ettiği immünohistokimyasal olarak, oksidatif stres varlığı da biyokimyasal analizlerle belirlendi. Reperfüzyondan 30 dk önce viteksin uygulanan gruplarda ise histolojik olarak hasarın, inflamasyonun, otofaji, apoptoz ve oksidatif stresin belirgin bir şekilde azaldığı tespit edildi.

Elde ettiğimiz veriler ışığında, viteksinin hem inflamasyon ve oksidatif stres azaltarak hem de otofaji ve apoptozu önleyerek over İR hasarında iyileştirici etkisi olabileceği düşünüldü. Sonuç olarak, viteksinin over İR hasarının önlenmesinde ve tedavi edilmesinde koruyucu bir ajan olarak faydalı olabileceği sonucuna varıldı.

Bu çalışmanın, over torsiyonunda otofaji ve apoptoz mekanizmasının daha iyi anlaşılması, İR sonucu oluşan hasara karşı yeni ve moleküler temelli çözümler üretilmesi ve tedavisiyle ilgili olarak yeni ajanların kullanılması açısından daha ileri çalışmalara ışık tutacağı ümit edilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Hibbard LT. Adnexal torsion. *American journal of obstetrics gynecology*, 1985, 152: 456-461.
2. Becker JH, de Graaff J, Vos CM. Torsion of the ovary: a known but frequently missed diagnosis. *European Journal of Emergency Medicine*, 2009, 16: 124-126.
3. Geimanaite L, Trainavicius K. Ovarian torsion in children: management and outcomes. *Journal of pediatric surgery*, 2013, 48: 1946-1953.
4. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia–reperfusion injury. *The Journal of pathology*, 2000, 190: 255-266.
5. Schweichel JU, Merker HJ. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*, 1973, 7: 253-266.
6. Clarke PG. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy embryology*, 1990, 181: 195-213.
7. Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 2004, 306: 990-995.
8. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 2008, 451: 1069.
9. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy and cell death. *Current topics in developmental biology*, 2007, 78: 217-245.
10. Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *The Journal of clinical investigation*, 2005, 115: 2679-2688.
11. Suzuki K, Ohsumi Y. Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 2007, 581: 2156-2161.
12. Pattingre S, Espert L, Biard-Piechaczyk M, Codogno P. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie*, 2008, 90: 313-323.

13. Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental cell*, 2003, 5: 539-545.
14. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature cell biology*, 2007, 9: 1102.
15. Aita VM, Liang XH, Murty V, Pincus DL, Yu W, Cayanis E, Kalachikov S, Gilliam TC, Levine B. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics*, 1999, 59: 59-65.
16. Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100: 15077-15082.
17. Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Canaani D, Oh B-H, Jung JU. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nature cell biology*, 2006, 8: 688.
18. Li D-D, Guo J-F, Huang J-J, Wang L-L, Deng R, Liu J-N, Feng G-K, Xiao D-J, Deng S-Z, Zhang X-S. Rhabdastrellin acid-A induced autophagy-associated cell death through blocking Akt pathway in human cancer cells. *PLoS One*, 2010, 5: e12176.
19. Mellor HR, Harris AL. The role of the hypoxia-inducible BH3-only proteins BNIP3 and BNIP3L in cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, 2007, 26: 553.
20. Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *The EMBO journal*, 2007, 26: 1749-1760.

21. Yu L, Wan F, Dutta S, Welsh S, Liu Z, Freundt E, Baehrecke EH, Lenardo M. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103: 4952-4957.
22. Liu C, Gao Y, Barrett J, Hu B. Autophagy and protein aggregation after brain ischemia. *Journal of neurochemistry*, 2010, 115: 68-78.
23. Zhang J, Wang J-S, Zheng Z-K, Tang J, Fan K, Guo H, Wang J-J. Participation of autophagy in lung ischemia–reperfusion injury in vivo. *journal of surgical research*, 2013, 182: e79-e87.
24. Suzuki C, Isaka Y, Takabatake Y, Tanaka H, Koike M, Shibata M, Uchiyama Y, Takahara S, Imai E. Participation of autophagy in renal ischemia/reperfusion injury. *Biochemical biophysical research communications*, 2008, 368: 100-106.
25. Hamacher-Brady A, Brady NR, Gottlieb RA. Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281: 29776-29787.
26. Yan L, Sadoshima J, Vatner DE, Vatner SF. Autophagy in ischemic preconditioning and hibernating myocardium. *Autophagy*, 2009, 5: 709-712.
27. Valentim L, Laurence KM, Townsend PA, Carroll CJ, Soond S, Scarabelli TM, Knight RA, Latchman DS, Stephanou A. Urocortin inhibits Beclin1-mediated autophagic cell death in cardiac myocytes exposed to ischaemia/reperfusion injury. *Journal of molecular cellular cardiology* 2006, 40: 846-852.
28. Gotoh K, Lu Z, Morita M, Shibata M, Koike M, Waguri S, Dono K, Doki Y, Kominami E, Sugioka A. Participation of autophagy in the initiation of graft dysfunction after rat liver transplantation. *Autophagy*, 2009, 5: 351-360.

29. Turkmen K, Martin J, Akcay A, Nguyen Q, Ravichandran K, Faubel S, Pacic A, Ljubanovic D, Edelstein CL, Jani A. Apoptosis and autophagy in cold preservation ischemia. *Transplantation*, 2011, 91: 1192-1197.
30. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 2005, 122: 927-939.
31. Fang W, Goldberg ML, Pohl NM, Bi X, Tong C, Xiong B, Koh TJ, Diamond AM, Yang W. Functional and physical interaction between the selenium-binding protein 1 (SBP1) and the glutathione peroxidase 1 selenoprotein. *Carcinogenesis*, 2010, 31: 1360-1366.
32. Maiuri MC, Criollo A, Tasdemir E, Vicencio JM, Tajeddine N, Hickman JA, Geneste O, Kroemer G. BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-XL. *Autophagy*, 2007, 3: 374-376.
33. Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, Gonzalez FJ, Semenza GL. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283: 10892-10903.
34. Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon H-U, Kimchi A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differentiation*, 2009, 16: 966.
35. Park K-J, Lee S-H, Kim T-I, Lee H-W, Lee C-H, Kim E-H, Jang J-Y, Choi KS, Kwon M-H, Kim Y-S. A human scFv antibody against TRAIL receptor 2 induces autophagic cell death in both TRAIL-sensitive and TRAIL-resistant cancer cells. *Cancer research*, 2007, 67: 7327-7334.

36. Pattingre S, Bauvy C, Levade T, Levine B, Codogno P. Ceramide-induced autophagy: to junk or to protect cells? *Autophagy*, 2009, 5: 558-560.
37. Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, Jin S, White E. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes development*, 2007, 21: 1621-1635.
38. Martins TB, Rose JW, Jaskowski TD, Wilson AR, Husebye D, Seraj HS, Hill HR. Analysis of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine serum concentrations in patients with multiple sclerosis by using a multiplexed immunoassay. *American journal of clinical pathology*, 2011, 136: 696-704.
39. Ortadeveci A, Semih Ö. Böbrek İskemi-Reperfüzyon Hasarı Üzerine Bir Derleme. *Osmangazi Tıp Dergisi*, 2017, 39: 115-124.
40. Buyukhatipoglu H, Kirhan I, Dag OF, Turan MN, Vural M, Taskin A, Aksoy N, Sezen Y. Oxidative stress increased in healthcare workers working 24-hour on-call shifts. *The American journal of the medical sciences*, 2010, 340: 462-467.
41. Yilmaz H, Sahin S, Sayar N, Tangurek B, Yilmaz M, Nurkalem Z, Onturk E, Cakmak N, Bolca O. Effects of folic acid and N-acetylcysteine on plasma homocysteine levels and endothelial function in patients with coronary artery disease. *Acta cardiologica*, 2007, 62: 579-585.
42. Wang Y, Ma S, Wang Q, Hu W, Wang D, Li X, Su T, Qin X, Zhang X, Ma K. Effects of cannabinoid receptor type 2 on endogenous myocardial regeneration by activating cardiac progenitor cells in mouse infarcted heart. *Science China Life Sciences*, 2014, 57: 201-208.
43. Yuan G-J, Ma J-C, Gong Z-J, Sun X-M, Zheng S-H, Li X. Modulation of liver oxidant-antioxidant system by ischemic preconditioning during

- ischemia/reperfusion injury in rats. *World journal of gastroenterology: WJG*, 2005, 11: 1825.
44. Ohtani K, Usui S, Kaneko S, Takashima S-i, Kitano K, Yamamoto K, Okajima M, Furusho H, Takamura M. Benidipine reduces ischemia reperfusion-induced systemic oxidative stress through suppression of aldosterone production in mice. *Hypertension Research*, 2012, 35: 287.
45. Mareta M, Toth S, Bujdos M, Jonecova Z, Vesela J. Alterations of epithelial layer after ischemic preconditioning of small intestine in rats. *Journal of molecular histology*, 2012, 43: 171-178.
46. He M, Min J-W, Kong W-L, He X-H, Li J-X, Peng B-W. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. *Fitoterapia*, 2016, 115: 74-85.
47. Yang L, Yang Z-m, Zhang N, Tian Z, Liu S-b, Zhao M-g. Neuroprotective effects of vitexin by inhibition of NMDA receptors in primary cultures of mouse cerebral cortical neurons. *Molecular cellular biochemistry*, 2014, 386: 251-258.
48. Lee EB, Kim JH, Cha Y-S, Kim M, Song SB, Cha DS, Jeon H, Eun JS, Han S, Kim DK. Lifespan extending and stress resistant properties of vitexin from *Vigna angularis* in *Caenorhabditis elegans*. *Biomolecules therapeutics*, 2015, 23: 582.
49. Rosa SIG, Rios-Santos F, Balogun SO, de Oliveira Martins DT. Vitexin reduces neutrophil migration to inflammatory focus by down-regulating pro-inflammatory mediators via inhibition of p38, ERK1/2 and JNK pathway. *Phytomedicine*, 2016, 23: 9-17.
50. Dos Reis GO, Vicente G, De Carvalho FK, Heller M, Micke GA, Pizzolatti MG, Fröde TS. *Croton antispyphiliticus* Mart. attenuates the inflammatory response to carrageenan-induced pleurisy in mice. *Inflammopharmacology*, 2014, 22: 115-126.

51. Che X, Wang X, Zhang J, Peng C, Zhen Y, Shao X, Zhang G, Dong L. Vitexin exerts cardioprotective effect on chronic myocardial ischemia/reperfusion injury in rats via inhibiting myocardial apoptosis and lipid peroxidation. *American journal of translational research*, 2016, 8: 3319.
52. Unlubilgin E, Suleyman B, Balci G, Al RA, Cankaya M, Nayki UA, Suleyman H. Prevention of infertility induced by ovarian ischemia reperfusion injury by benidipine in rats: Biochemical, gene expression, histopathological and immunohistochemical evaluation. *Journal of gynecology obstetrics human reproduction*, 2017, 46: 267-273.
53. Zhang S, Guo C, Chen Z, Zhang P, Li J, Li Y. Vitexin alleviates ox-LDL-mediated endothelial injury by inducing autophagy via AMPK signaling activation. *Molecular immunology*, 2017, 85: 214-221.
54. Tang Z, Yang L, Zhang X. Vitexin mitigates myocardial ischemia reperfusion-induced damage by inhibiting excessive autophagy to suppress apoptosis via the PI3K/Akt/mTOR signaling cascade. *RSC Advances*, 2017, 7: 56406-56416.
55. Wang Y, Zhen Y, Wu X, Jiang Q, Li X, Chen Z, Zhang G, Dong L. Vitexin protects brain against ischemia/reperfusion injury via modulating mitogen-activated protein kinase and apoptosis signaling in mice. *Phytomedicine*, 2015, 22: 379-384.
56. Dere F. Anatomi Atlası ve Ders Kitabı Cilt 2 Nobel Tıp Kitabevi 1999 4. Baskı, *Özefagus Anatomisi*: 586-591.
57. Gartner LP, Hiatt JL. *Color textbook of histology e-book*. Baskı. Elsevier Health Sciences, 2006.
58. Arıncı K, Elhan A. Anatomi (5. Baskı), 1. Cilt, *Güneş Kitabevi, Ankara*, 2014: 129-181.

59. Lentz GM, Lobo RA, Gershenson DM, Katz VL. *Comprehensive gynecology e-book*. Baskı. Elsevier Health Sciences, 2012.
60. Aydın S. *İnsan anatomisi ve fizyolojisi*. Baskı. Anadolu Üniversitesi, 2000.
61. Ross MH, Pawlina W. *Histology*. Baskı. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
62. Mader SS. *Mader's Understanding Human Anatomy & Physiology*. Baskı. McGraw-Hill Higher Education, 2008.
63. Oktem O, Oktay K. The ovary: anatomy and function throughout human life. *Annals of the New York academy of sciences*, 2008, 1127: 1-9.
64. Hall JE. *Guyton and Hall textbook of medical physiology e-Book*. Baskı. Elsevier Health Sciences, 2015.
65. Uzumcu M, Zachow R. Developmental exposure to environmental endocrine disruptors: consequences within the ovary and on female reproductive function. *Reproductive toxicology*, 2007, 23: 337-352.
66. Hawkins SM, Matzuk MM. Menstrual cycle: basic biology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1135: 10.
67. Vicdan K, Işık A. *İn vitro fertilizasyon ve mikro manipülasyon uygulamalarında laboratuvar*. Baskı. Ankara, Çağdaş Medikal Kitabevi, 1999.
68. Gökmen F. *Sistematik anatomi*. Baskı. İzmir, İzmir Güven Kitabevi, 2003.
69. Saksouk FA, Johnson SC. Recognition of the ovaries and ovarian origin of pelvic masses with CT. *Radiographics*, 2004, 24: S133-S146.
70. Waugh A, Grant A. *Ross and Wilson anatomy and physiology in health and illness*. Baskı. Churchill Livingstone London, 2001.
71. Unal B, Kara S, Bilgili Y. Contrast media induces hypoperfusion in kidneys with ureteral stone: Doppler US study. *Ultrasound in medicine biology*, 2005, 31: 31-37.

72. Standring S. *Gray's anatomy e-book: the anatomical basis of clinical practice*. Baskı. Elsevier Health Sciences, 2015.
73. Snell RS, Travill AA. *Clinical anatomy for medical students*. Baskı. Annals of Plastic Surgery, 1979.
74. Monk M, McLaren A. X-chromosome activity in foetal germ cells of the mouse. *Development*, 1981, 63: 75-84.
75. Richards JS, Pangas SA. The ovary: basic biology and clinical implications. *The Journal of clinical investigation*, 2010, 120: 963-972.
76. Pepling ME. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis*, 2006, 44: 622-632.
77. McLaren A. Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. *Molecular cellular endocrinology*, 2000, 163: 3-9.
78. Gondos B. Comparative studies of normal and neoplastic ovarian germ cells: 1. Ultrastructure of oogonia and intercellular bridges in the fetal ovary. *International journal of gynecological pathology: official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*, 1987, 6: 114-123.
79. Gondos B. Germ cell degeneration and intercellular bridges in the human fetal ovary. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 1973, 138: 23-30.
80. Baker T. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 1963, 158: 417-433.
81. Block E. Quantitative morphological investigations of the follicular system in women. *European Journal of Endocrinology*, 1951, 8: 33-54.

82. Faddy M, Gosden R, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Human reproduction*, 1992, 7: 1342-1346.
83. Kezele P, Nilsson E, Skinner MK. Cell-cell interactions in primordial follicle assembly and development. *Front Biosci*, 2002, 7: d1990-d1996.
84. Peters F, Hirsch H. Comparison between intra and para cervical anaesthesia in therapeutic abortion (author's transl). *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 1978, 38: 946-949.
85. Sawyer HR, Smith P, Heath DA, Juengel JL, Wakefield SJ, McNatty KP. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biology of reproduction*, 2002, 66: 1134-1150.
86. Eşrefoğlu M. *Özel Histoloji*. Baskı. Malatya, Medipres Matbaacılık Ltd. Şti. , 2009.
87. Eroschenko VP. *DiFiore's atlas of histology with functional correlations*. Baskı. Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
88. Kierszenbaum AL, Tres L. *Histology and Cell Biology: an introduction to pathology E-Book*. Baskı. Elsevier Health Sciences, 2015.
89. Junqueira LCU, Carneiro J, Aytekin Y, Solakoğlu S. *Temel histoloji: text & atlas*. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, 2009.
90. Novak E. *Berek & Novak's gynecology*. Baskı. Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
91. Ross MH, Pawlina W. *Histology atext atlas with correlated cell and molecular biology*. 2006.
92. Bercegeay S, Jean M, Lucas H, Barriere P. Composition of human zona pellucida as revealed by SDS-PAGE after silver staining. *Molecular reproduction and development*, 1995, 41: 355-359.

93. Ovalle WK, Nahirney PC. *Netter bases da histologia*. Baskı. Elsevier Brasil, 2008.
94. Eşrefoğlu M. Genel ve Özel Histoloji. *Ankara: Pelikan Yayınevi, s*, 2004, 82.
95. Bayer AI, Wiskind AK. Adnexal torsion: can the adnexa be saved? *American journal of obstetrics gynecology*, 1994, 171: 1506-1511.
96. Kazez A, Özokutan B, Küçükaydın M, Okur H, Turan C, Köse Ö. Çocuklarda over torsiyonları. *Pediatric Cerrahi Dergisi*, 1996, 10: 95-97.
97. Cass DL In *Ovarian torsion*, Seminars in pediatric surgery, (editör).^(editörler). Elsevier: 2005; 86-92.
98. Nissen E, Kent D, Nissen S, Feldman B. Unilateral tuboovarian autoamputation. *The Journal of reproductive medicine*, 1977, 19: 151-153.
99. Mazouni C, Bretelle F, Menard J, Blanc B, Gamberre M. Diagnosis of adnexal torsion and predictive factors of adnexal necrosis. *Gynecologie, obstetrique fertilite*, 2005, 33: 102-106.
100. Commerci JJ, Licciardi F, Bergh PA, Gregori C, Breen JL. Mature cystic teratoma: a clinicopathologic evaluation of 517 cases and review of the literature. *Obstetrics gynecology*, 1994, 84: 22-28.
101. 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. *Clinical experimental obstetrics gynecology*, 2004, 31: 235-238.
102. Breech LL, Hillard PJA. Adnexal torsion in pediatric and adolescent girls. *Current Opinion in Obstetrics Gynecology*, 2005, 17: 483-489.
103. Oelsner G, Cohen SB, Soriano D, Admon D, Mashiach S, Carp H. Minimal surgery for the twisted ischaemic adnexa can preserve ovarian function. *Human Reproduction*, 2003, 18: 2599-2602.

104. Houry D, Abbott JT. Ovarian torsion: a fifteen-year review. *Annals of emergency medicine*, 2001, 38: 156-159.
105. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology*, 1995, 146: 3.
106. Kandilci HB, Gümüşel B. Akciğerlerde İskemi-Reperfüzyon Hasarı ve İskemik Önkoşullama. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 2005: 35-49.
107. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery: Official Journal of the International Microsurgical Society the European Federation of Societies for Microsurgery*, 2004, 24: 468-475.
108. Ege T. *Kalp ve damar hastalıklarında iskemi-reperfüzyon hasarı*. Baskı. Kalp ve damar cerrahisi. I. Baskı. İstanbul, Çapa Tıp Kitabevi, 2004.
109. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *The surgical clinics of North America*, 1992, 72: 65-83.
110. Katori M, Berne RM. Release of adenosine from anoxic hearts: Relationship to coronary flow. *Circulation research*, 1966, 19: 420-425.
111. Best B. Ischemia and reperfusion injury in cryonics. 2018.
112. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL, Crain BJ. Basic Pathology. *Archives of Pathology Laboratory Medicine*, 1998, 122: 660-660.
113. Pignataro G, Scorziello A, Di Renzo G, Annunziato L. Post-ischemic brain damage: effect of ischemic preconditioning and postconditioning and identification of potential candidates for stroke therapy. *The FEBS journal*, 2009, 276: 46-57.
114. Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Piña E, Geller DA. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *Journal of Surgical Research*, 2008, 147: 153-159.

115. Mangino MJ, Anderson CB, Murphy MK, Brunt E, Turk J. Mucosal arachidonate metabolism and intestinal ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal Liver Physiology*, 1989, 257: G299-G307.
116. Abeş M, Sarihan H. Oophoropexy in children with ovarian torsion. *European Journal of Pediatric Surgery*, 2004, 14: 168-171.
117. Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cirurgica Brasileira*, 2005, 20: 336-343.
118. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia–reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovascular research*, 2004, 61: 448-460.
119. Riksen N, Smits P, Rongen G. Ischaemic preconditioning: from molecular characterisation to clinical application-part I. *Neth J Med*, 2004, 62: 353-363.
120. Das M, Das DK. Molecular mechanism of preconditioning. *IUBMB life*, 2008, 60: 199-203.
121. Davies KJ. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB life*, 2000, 50: 279-289.
122. Flaherty JT. Myocardial injury mediated by oxygen free radicals. *The American journal of medicine*, 1991, 91: S79-S85.
123. Granger DN. Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation*, 1999, 6: 167-178.
124. Gourdin MJ, Bree B, De Kock M. The impact of ischaemia–reperfusion on the blood vessel. *European Journal of Anaesthesiology*, 2009, 26: 537-547.
125. Roos A, Bouwman LH, Munoz J, Zuiverloon T, Faber-Krol MC, Fallaux-van den Houten FC, Klar-Mohamad N, Hack CE, Tilanus MG, Daha MR. Functional

- characterization of the lectin pathway of complement in human serum. *Molecular immunology*, 2003, 39: 655-668.
126. Thrane A, Skehan J, Thrane P. A novel interpretation of immune redundancy and duality in reperfusion injury with important implications for intervention in ischaemic disease. *Medical hypotheses*, 2007, 68: 1363-1370.
127. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *British medical bulletin*, 2004, 70: 71-86.
128. Arumugam TV, Magnus T, Woodruff TM, Proctor LM, Shiels IA, Taylor SM. Complement mediators in ischemia-reperfusion injury. *Clinica Chimica Acta*, 2006, 374: 33-45.
129. Zhang W, Smith C, Shapiro A, Monette R, Hutchison J, Stanimirovic D. Increased expression of bioactive chemokines in human cerebromicrovascular endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro. *Journal of neuroimmunology*, 1999, 101: 148-160.
130. Senatorski G, Paczek L, Kropiewnicka E, Bartłomiejczyk I. Cytokines in noninvasive diagnostics of diabetic nephropathy progression. *Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, 2002, 13: 28-32.
131. Gündüz A, Er H. Sitokinler ve Oftalmolojideki Yerleri. *Türkiye Klinikleri Journal of Ophthalmology*, 2000, 9: 53-58.
132. Dupont Y, Cohen JB, Changeux J-P. X-ray diffraction study of membrane fragments rich in acetylcholine receptor protein prepared from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *FEBS letters*, 1974, 40: 130-133.
133. Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of periodontal research*, 1991, 26: 230-242.

134. Hefti AF. Aspects of cell biology of the normal periodontium. *Periodontology*, 1993, 3: 64-75.
135. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and molecular immunology E-book*. Baskı. Elsevier Health Sciences, 2014.
136. Güner İ, Özmen D, Bayındır O. Sitokinler. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 1997, 17: 65-74.
137. Gabryel B, Łabuzek K, Małecki A, Herman ZS. Immunophilin ligands decrease release of pro-inflammatory cytokines (IL-1beta, TNF-alpha and IL-2 in rat astrocyte cultures exposed to simulated ischemia in vitro. *Polish journal of pharmacology*, 2004, 56: 129-136.
138. Carlson NG, Wieggl WA, Chen J, Bacchi A, Rogers SW, Gahring LC. Inflammatory cytokines IL-1 α , IL-1 β , IL-6, and TNF- α impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways. *The Journal of Immunology*, 1999, 163: 3963-3968.
139. Lefer AM, Lefer DJ. Pharmacology of the endothelium in ischemia-reperfusion and circulatory shock. *Annual review of pharmacology toxicology*, 1993, 33: 71-90.
140. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics-e-book*. Baskı. Elsevier Health Sciences, 2012.
141. Hierholzer C, Kalff JC, Audolfsson G, Billiar TR, Tweardy DJ, Bauer AJ. Molecular and Functional Contractile Sequelae of Rat Intestinal Ischemia/Reperfusion Injury. *Transplantation*, 1999, 68: 1244-1254.
142. Yao Y-M, Bahrami S, Redl H, Fuerst S, Schlag G. IL-6 release after intestinal ischemia/reperfusion in rats is under partial control of TNF. *Journal of Surgical Research*, 1997, 70: 21-26.

143. Cohen SB, Wattiez A, Stockheim D, Seidman DS, Lidor AL, Mashiach S, Goldenberg M. The accuracy of serum interleukin-6 and tumour necrosis factor as markers for ovarian torsion. *Human reproduction*, 2001, 16: 2195-2197.
144. Saini HK, Xu Y-J, Zhang M, Liu PP, Kirshenbaum LA, Dhalla NS. Role of tumour necrosis factor-alpha and other cytokines in ischemia-reperfusion-induced injury in the heart. *Experimental Clinical Cardiology*, 2005, 10: 213.
145. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 2015, 6: 331-336.
146. Çetin E, Çetin N, Küçük O. Toklularda karayolu ile taşımanın oksidan-antioksidan sistem üzerine etkisi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 2011, 6: 103-109.
147. Yu BP. Approaches to anti-aging intervention: the promises and the uncertainties. *Mechanisms of ageing and development*, 1999, 111: 73-87.
148. Karabulut H, Gülay MŞ. Antioksidanlar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2016, 1: 65-76.
149. Gutteridge J. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical chemistry*, 1995, 41: 1819-1828.
150. Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. Oxidants and antioxidants: state of the art. *The American journal of medicine*, 1991, 91: S2-S13.
151. Gutteridge J, Halliwell B. *Antioxidants in nutrition, health, and disease*. Baskı. Oxford University Press, 1994.
152. Aksoy H, Ozkan A, Aktas F, Borekci B. Helicobacter pylori seropositivity and its relationship with serum malondialdehyde and lipid profile in preeclampsia. *Journal of clinical laboratory analysis*, 2009, 23: 219-222.

153. Papalambros E, Sigala F, Georgopoulos S, Paraskevas KI, Andreadou I, Menenakos X, Sigalas P, Papalambros AL, Vourliotakis G, Giannopoulos A. Malondialdehyde as an indicator of oxidative stress during abdominal aortic aneurysm repair. *Angiology*, 2007, 58: 477-482.
154. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 1979, 95: 351-358.
155. Slater T. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. İçinde: *Methods in enzymology*, Elsevier, 1984: 283-293.
156. Akkuş İ. *Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri*. Baskı. Konya, Mimoza Yayınları,, 1995.
157. Tamer L, Polat G, Eskandari G, Ercan B, Atik U. Serbest radikaller. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2012, 1: 52-58.
158. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 2001, 94: 1133-1138.
159. Kanabrocki E, Ryan M, Murray D, Jacobs R, Wang J, Hurder A, Friedman N, Siegel G, Eladasari B, Nemchausky B. Circadian variation in multiple sclerosis of oxidative stress marker of DNA damage. A potential cancer marker? *La Clinica Terapeutica*, 2006, 157: 117-122.
160. Bartsch H, Nair J. Oxidative stress and lipid peroxidation-derived DNA-lesions in inflammation driven carcinogenesis. *Cancer detection prevention*, 2004, 28: 385-391.
161. Svoboda P, Maekawa M, Kawai K, Tominaga T, Savela K, Kasai H. Urinary 8-hydroxyguanine may be a better marker of oxidative stress than 8-

- hydroxydeoxyguanosine in relation to the life spans of various species. *Antioxidants redox signaling*, 2006, 8: 985-992.
162. Mak T. The E. Donnall Thomas lecture apoptosis:“’Tis death that makes life live”. *Biology of Blood Marrow Transplantation*, 2003, 9: 483-488.
163. Pınarbaşı E, Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M, B T, Biyoloji JM. *Apoptozis (programlı hücre ölümü) Moleküler Biyoloji*, . Baskı. Ankara, Nobel Yayıncılık, 2010.
164. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 2007, 35: 495-516.
165. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 1995, 267: 1456-1462.
166. Cohen JJ. Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function. *Chest*, 1993, 103: 99S-101S.
167. Böing A, Stap J, Hau C, Afink G, Ris-Stalpers C, Reits E, Sturk A, van Noorden C, Nieuwland R. Active caspase-3 is removed from cells by release of caspase-3-enriched vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Cell Research*, 2013, 1833: 1844-1852.
168. Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269: 30761-30764.
169. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 1995, 376: 37.
170. Salvesen GS. Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. 2002.

171. Walters J, Pop C, Scott FL, Drag M, Swartz P, Mattos C, Salvesen GS, Clark AC.
A constitutively active and uninhibitable caspase-3 zymogen efficiently induces apoptosis. *Biochemical Journal*, 2009, 424: 335-345.
172. Perry DK, Smyth MJ, Stennicke HR, Salvesen GS, Duriez P, Poirier GG, Hannun YA. Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3 a novel target for zinc in the inhibition of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272: 18530-18533.
173. Gallaher B, Hille R, Raile K, Kiess W. Apoptosis: live or die-hard work either way! *Hormone Metabolic Research*, 2001, 33: 511-519.
174. Li P, Nijhawan D, Wang X. Mitochondrial activation of apoptosis. *Cell*, 2004, 116: S57-S61.
175. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differentiation*, 1999, 6: 99.
176. Deter RL, De Duve C. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *The Journal of cell biology*, 1967, 33: 437-449.
177. Ferraro E, Cecconi F. Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells. *Archives of biochemistry biophysics*, 2007, 462: 210-219.
178. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 2008, 132: 27-42.
179. Ohsumi Y. Ubiquitin and proteasomes: Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2001, 2: 211.
180. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes development*, 2007, 21: 2861-2873.

181. Türei D, Földvári-Nagy L, Fazekas D, Módos D, Kubisch J, Kadlecsek T, Demeter A, Lenti K, Csermely P, Vellai T. Autophagy Regulatory Network—A systems-level bioinformatics resource for studying the mechanism and regulation of autophagy. *Autophagy*, 2015, 11: 155-165.
182. Arslan DÖ, Korkmaz G, Gözüaçık D. Otofaji: Bir hücresel stres yanıtı ve ölüm mekanizması. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2011, 2: 184-194.
183. Chen S, Rehman SK, Zhang W, Wen A, Yao L, Zhang J. Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta -Reviews on Cancer*, 2010, 1806: 220-229.
184. Levine B, Sinha SC, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy*, 2008, 4: 600-606.
185. Saeki K, Yuo A, Okuma E, Yazaki Y, Susin S, Kroemer G, Takaku F. Bcl-2 down-regulation causes autophagy in a caspase-independent manner in human leukemic HL60 cells. *Cell Death Differentiation*, 2000, 7: 1263.
186. Akar U, Chaves-Reyez A, Barria M, Tari A, Sanguino A, Kondo Y, Kondo S, Arun B, Lopez-Berestein G, Ozpolat B. Silencing of Bcl-2 expression by small interfering RNA induces autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. *Autophagy*, 2008, 4: 669-679.
187. Ruck A, Attonito J, Garces KT, Núñez L, Palmisano NJ, Rubel Z, Bai Z, Nguyen KC, Sun L, Grant BD. The Atg6/Vps30/Becclin 1 ortholog BEC-1 mediates endocytic retrograde transport in addition to autophagy in *C. elegans*. *Autophagy*, 2011, 7: 386-400.
188. Wang W, Fan H, Zhou Y, Duan P, Zhao G, Wu G. Knockdown of autophagy-related gene BECLIN1 promotes cell growth and inhibits apoptosis in the A549 human lung cancer cell line. *Molecular medicine reports*, 2013, 7: 1501-1505.

189. Mizushima N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Current opinion in cell biology*, 2010, 22: 132-139.
190. Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2007, 8: 931-937.
191. Kang R, Zeh H, Lotze M, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differentiation*, 2011, 18: 571-580.
192. Høyer-Hansen M, Jäättelä M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differentiation*, 2007, 14: 1576-1582.
193. Chen G, Ray R, Dubik D, Shi L, Cizeau J, Bleackley RC, Saxena S, Gietz RD, Greenberg AH. The E1B 19K/Bcl-2-binding Protein Nip3 is a Dimeric Mitochondrial Protein that Activates Apoptosis. *The Journal of experimental medicine*, 1997, 186: 1975-1983.
194. Cizeau J, Ray R, Chen G, Gietz RD, Greenberg AH. The C. elegans orthologue ceBNIP3 interacts with CED-9 and CED-3 but kills through a BH3-and caspase-independent mechanism. *Oncogene*, 2000, 19: 5453-5463.
195. Velde CV, Cizeau J, Dubik D, Alimonti J, Brown T, Israels S, Hakem R, Greenberg A. BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Molecular cellular biology*, 2000, 20: 5454-5468.
196. Ray R, Chen G, Velde CV, Cizeau J, Park JH, Reed JC, Gietz RD, Greenberg AH. BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-XL and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 1439-1448.

197. Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P, Greenberg AH, Harris AL. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer research*, 2001, 61: 6669-6673.
198. Dorn G, Kirshenbaum L. Cardiac reanimation: targeting cardiomyocyte death by BNIP3 and NIX/BNIP3L. *Oncogene*, 2008, 27: S158-S167.
199. Paul I, Jones JM. Apoptosis block as a barrier to effective therapy in non small cell lung cancer. *World journal of clinical oncology*, 2014, 5: 588.
200. Salman H, Bergman M, Djaldetti M, Bessler H. Lycopene affects proliferation and apoptosis of four malignant cell lines. *Biomedicine pharmacotherapy*, 2007, 61: 366-369.
201. Millau JF, Mai S, Bastien N, Drouin R. p53 functions and cell lines: have we learned the lessons from the past? *BioEssays*, 2010, 32: 392-400.
202. Johnson AL, Bridgham JT. Caspase-mediated apoptosis in the vertebrate ovary. *Reproduction-Cambridge*, 2002, 124: 19-27.
203. Abedin M, Wang D, McDonnell M, Lehmann U, Kelekar A. Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. *Cell Death Differentiation*, 2007, 14: 500-510.
204. Yang SH, Liao PH, Pan YF, Chen SL, Chou SS, Chou MY. The novel p53-dependent metastatic and apoptotic pathway induced by vitexin in human oral cancer OC2 cells. *Phytotherapy Research*, 2013, 27: 1154-1161.
205. Weinreb O, Amit T, Youdim MB. A novel approach of proteomics and transcriptomics to study the mechanism of action of the antioxidant–iron chelator green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Free Radical Biology and Medicine*, 2007, 43: 546-556.

206. Ha SK, Lee P, Park JA, Oh HR, Lee SY, Park J-H, Lee EH, Ryu JH, Lee KR, Kim SY. Apigenin inhibits the production of NO and PGE2 in microglia and inhibits neuronal cell death in a middle cerebral artery occlusion-induced focal ischemia mice model. *Neurochemistry international*, 2008, 52: 878-886.
207. Lee C-Y, Chien Y-S, Chiu T-H, Huang W-W, Lu C-C, Chiang J-H, Yang J-S. Apoptosis triggered by vitexin in U937 human leukemia cells via a mitochondrial signaling pathway. *Oncology reports*, 2012, 28: 1883-1888.
208. Liu L-H, Zhou Y-J, Ding L, Zhang S-Z, Sun J, Cao J-G. Induction of apoptosis by VB1 in breast cancer cells: The role of reactive oxygen species and Bcl-2 family proteins. *International journal of molecular medicine*, 2014, 33: 423-430.
209. Zhou Y, Liu YE, Cao J, Zeng G, Shen C, Li Y, Zhou M, Chen Y, Pu W, Potters L. Vitexins, nature-derived lignan compounds, induce apoptosis and suppress tumor growth. *Clinical Cancer Research*, 2009, 15: 5161-5169.
210. Borghi SM, Carvalho TT, Staurengo-Ferrari L, Hohmann MS, Pinge-Filho P, Casagrande R, Verri Jr WA. Vitexin inhibits inflammatory pain in mice by targeting TRPV1, oxidative stress, and cytokines. *Journal of Natural Products*, 2013, 76: 1141-1149.
211. Kang I, Choi S, Ha TJ, Choi M, Wi H-R, Lee BW, Lee M. Effects of mung bean (*Vigna radiata* L.) ethanol extracts decrease proinflammatory cytokine-induced lipogenesis in the KK-Ay diabese mouse model. *Journal of medicinal food*, 2015, 18: 841-849.
212. Tan Z, Zhang Y, Deng J, Zeng G, Zhang Y. Purified vitexin compound 1 suppresses tumor growth and induces cell apoptosis in a mouse model of human choriocarcinoma. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 2012, 22: 360-366.

213. Dong L-Y, Li S, Zhen Y-L, Wang Y-N, Shao X, Luo Z-G. Cardioprotection of vitexin on myocardial ischemia/reperfusion injury in rat via regulating inflammatory cytokines and MAPK pathway. *The American journal of Chinese medicine*, 2013, 41: 1251-1266.
214. Min J-W, Hu J-J, He M, Sanchez RM, Huang W-X, Liu Y-Q, Bsoul NB, Han S, Yin J, Liu W-H. Vitexin reduces hypoxia–ischemia neonatal brain injury by the inhibition of HIF-1alpha in a rat pup model. *Neuropharmacology*, 2015, 99: 38-50.
215. Dong L, Fan Y, Shao X, Chen Z. Vitexin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts by attenuating inflammatory response and apoptosis. *Food and chemical toxicology*, 2011, 49: 3211-3216.
216. Cui Y-h, Zhang X-q, Wang N-d, Zheng M-d, Yan J. Vitexin protects against ischemia/reperfusion-induced brain endothelial permeability. *European journal of pharmacology*, 2019, 853: 210-219.
217. Wang W-Y, Tan M-S, Yu J-T, Tan L. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Annals of translational medicine*, 2015, 3.
218. Min J-W, Kong W-L, Han S, Bsoul N, Liu W-H, He X-H, Sanchez RM, Peng B-W. Vitexin protects against hypoxic-ischemic injury via inhibiting Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II and apoptosis signaling in the neonatal mouse brain. *Oncotarget*, 2017, 8: 25513.
219. Allred D, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 1998, 11: 155-168.

220. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *Journal of clinical oncology*, 1999, 17: 1474-1481.
221. Elledge RM, Fuqua SA, Clark GM, Pujol P, Allred DC, McGuire WL. Prognostic significance of p53 gene alterations in node-negative breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 1993, 26: 225-235.
222. Gómez-Marcos MA, Blázquez-Medela AM, Gamella-Pozuelo L, Recio-Rodriguez JI, García-Ortiz L, Martínez-Salgado C. Serum superoxide dismutase is associated with vascular structure and function in hypertensive and diabetic patients. *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, 2016, 2016.
223. Okabe H. The role of xanthine dehydrogenase (xanthine oxidase) in ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *Nihon Jinzo Gakkai Shi*, 1996, 38: 577-584.
224. Kooij A, Schiller HJ, Schijns M, Van Noorden CJ, Frederiks WM. Conversion of xanthine dehydrogenase into xanthine oxidase in rat liver and plasma at the onset of reperfusion after ischemia. *Hepatology*, 1994, 19: 1488-1495.
225. Cighetti G, Del Puppo M, Paroni R, Kienle MG. Lack of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase during warm renal ischemia. *FEBS letters*, 1990, 274: 82-84.
226. Bakan V, Çıralık H, Tolun Fİ, Atlı Y, Mil A, Öztürk Ş. Protective effect of erythropoietin on torsion/detorsion injury in rat model. *Journal of pediatric surgery*, 2009, 44: 1988-1994.
227. Taskin O, Birincioglu M, Aydin A, Buhur A, Burak F, Yilmaz I, Wheeler JM. The effects of twisted ischaemic adnexa managed by detorsion on ovarian viability and

- histology: an ischaemia-reperfusion rodent model. *Human reproduction*, 1998, 13: 2823-2827.
228. Ergun Y, Koc A, Dolapcioglu K, Akaydin Y, Dogruer G, Kontas T, Kozlu T, Aslan E. The protective effect of erythropoietin and dimethylsulfoxide on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *European Journal of Obstetrics Gynecology Reproductive Biology*, 2010, 152: 186-190.
 229. Sahin FK, Cosar E, Koken G, Toy H, Basarali K, Buyukbas S. Protective effect of aprotinin on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *Journal of Obstetrics Gynaecology Research*, 2008, 34: 794-800.
 230. Jiang J, Dai J, Cui H. Vitexin reverses the autophagy dysfunction to attenuate MCAO-induced cerebral ischemic stroke via mTOR/Ulk1 pathway. *Biomedicine pharmacotherapy*, 2018, 99: 583-590.
 231. Sikorski R, Kapeć E, Krzemiński A, Zaleska W. Levels of proinflammatory cytokines (IL-1 alpha, IL-6, TNF-alpha) in the semen plasma of male partners of infertile couples. *Ginekologia polska*, 2001, 72: 1325-1328.
 232. Kondrusik M, Swierzbńska R, Zajkowska J, Pancewicz S, Hermanowska-Szapakowicz T. Levels of proinflammatory cytokines: IL-1, IL-6, IL-8, TNF-alpha and receptor IL-6R in Lyme borreliosis. *Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, 1999, 7: 218-220.
 233. Karamese SA, Toktay E, Unal D, Selli J, Karamese M, Malkoc I. The protective effects of beta-carotene against ischemia/reperfusion injury in rat ovarian tissue. *Acta histochemica*, 2015, 117: 790-797.
 234. Daponte A, Pournaras S, Hadjichristodoulou C, Lialios G, Kallitsaris A, Maniatis AN, Messinis IE. Novel serum inflammatory markers in patients with adnexal mass who had surgery for ovarian torsion. *Fertility sterility*, 2006, 85: 1469-1472.

235. Wu C, Wang P, Rao J, Wang Z, Zhang C, Lu L, Zhang F. Triptolide alleviates hepatic ischemia/reperfusion injury by attenuating oxidative stress and inhibiting NF- κ B activity in mice. *Journal of Surgical Research*, 2011, 166: e205-e213.
236. Kim S-J, Moon Y-J, Lee S-M. Protective effects of baicalin against ischemia/reperfusion injury in rat liver. *Journal of natural products*, 2010, 73: 2003-2008.
237. Li C, Gao Y, Tian J, Shen J, Xing Y, Liu Z. Sophocarpine administration preserves myocardial function from ischemia-reperfusion in rats via NF- κ B inactivation. *Journal of ethnopharmacology*, 2011, 135: 620-625.
238. Huang Z, Han Z, Ye B, Dai Z, Shan P, Lu Z, Dai K, Wang C, Huang W. Berberine alleviates cardiac ischemia/reperfusion injury by inhibiting excessive autophagy in cardiomyocytes. *European journal of pharmacology*, 2015, 762: 1-10.
239. Li B-X, Li C-Y, Peng R-Q, Wu X-J, Wang H-Y, Wan D-S, Zhu X-F, Zhang X-S. The expression of beclin 1 is associated with favorable prognosis in stage IIIB colon cancers. *Autophagy*, 2009, 5: 303-306.
240. Zheng T, Li D, He Z, Feng S, Zhao S. Prognostic and clinicopathological significance of Beclin-1 in non-small-cell lung cancer: a meta-analysis. *Oncotargets therapy*, 2018, 11: 4167.
241. Yu Y, Shiou S-R, Guo Y, Lu L, Westerhoff M, Sun J, Petrof EO, Claud EC. Erythropoietin protects epithelial cells from excessive autophagy and apoptosis in experimental neonatal necrotizing enterocolitis. *PloS one*, 2013, 8: e69620.
242. Bruick RK. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97: 9082-9087.

243. Dong L, Fan Y, Shao X, Chen Z. Vitexin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts by attenuating inflammatory response and apoptosis. *Food chemical toxicology*, 2011, 49: 3211-3216.
244. Kim G-T, Chun Y-S, Park J-W, Kim M-S. Role of apoptosis-inducing factor in myocardial cell death by ischemia–reperfusion. *Biochemical biophysical research communications*, 2003, 309: 619-624.
245. Hussein A, Abd-Elkhabir A, Abozahra A, Baiomy A, Ashamallah SA, Sheashaa HA, Sobh MA. Pancreatic injury secondary to renal ischemia/reperfusion (I/R) injury: possible role of oxidative stress. *Physiological research*, 2014, 63: 47.
246. Kowalczyk K, Stryjecka-Zimmer M In *The influence of oxidative stress on the level of malondialdehyde (MDA) in different areas of the rabbit brain*, Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Sectio D: Medicina, (editör).^(editörler). 2002; 160-164.
247. Lapenna D, Cuccurullo F. TBA test and" free" MDA assay in evaluation of lipid peroxidation and oxidative stress in tissue systems. *American Journal of Physiology-Heart Circulatory Physiology*, 1993, 265: H1030-H1032.
248. Usta U, Inan M, Erbas H, Aydogdu N, Puyan FO, Altaner S. Tissue damage in rat ovaries subjected to torsion and detorsion: effects of L-carnitine and N-acetyl cysteine. *Pediatric surgery international*, 2008, 24: 567-573.
249. Kilic A, Uyanikoglu H, Incebiyik A. Protective effect of N-acetylcystein and resveratrol on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *Dicle Med J*, 2016, 43: 229-236.
250. Cadirci E, Oral A, Odabasoglu F, Kilic C, Coskun K, Halici Z, Suleyman H, Keles ON, Unal B. Atorvastatin reduces tissue damage in rat ovaries subjected to torsion

- and detorsion: biochemical and histopathologic evaluation. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 2010, 381: 455-466.
251. Wang X, Zhou H, Yang J. GSH. Px or SOD encapsulated erythrocytes in the study of cerebral ischemia-reperfusion. *Zhonghua yi xue za zhi*, 1997, 77: 43-46.
 252. Bayir Y, Karagoz Y, Karakus E, Albayrak A, Sengul O, Can I, Yayla N, Kuskun U, Keles MS. Nigella sativa reduces tissue damage in rat ovaries subjected to torsion and detorsion: oxidative stress, proinflammatory response and histopathological evaluation. *Gynecologic obstetric investigation*, 2012, 74: 41-49.
 253. Erkanlı K, Kayalar N, Erkanlı G, Ercan F, Sener G, Kırallı K. Melatonin protects against ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *Journal of pineal research*, 2005, 39: 238-242.
 254. Lee J, Lee M, Kim J-U, Song KI, Choi YS, Cheong S-S. Carvedilol reduces plasma 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in mild to moderate hypertension: a pilot study. *Hypertension*, 2005, 45: 986-990.
 255. Shen J, Deininger P, Hunt JD, Zhao H. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) as a potential survival biomarker in patients with nonsmall-cell lung cancer. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 2007, 109: 574-580.
 256. Prabhakar S, Starnes J, Shi S, Lonis B, Tran R. Diabetic nephropathy is associated with oxidative stress and decreased renal nitric oxide production. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2007, 18: 2945-2952.
 257. Demiryilmaz I, Sener E, Cetin N, Altuner D, Akcay F, Suleyman H. A comparative investigation of biochemical and histopathological effects of thiamine and thiamine pyrophosphate on ischemia-reperfusion induced oxidative damage in rat ovarian tissue. *Archives of pharmacal research*, 2013, 36: 1133-1139.

258. Wakatsuki A, Okatani Y, Lzumiya C, Lkenoue N. Melatonin protects against ischemia and reperfusion-induced oxidative lipid and DNA damage in fetal rat brain. *Journal of pineal research*, 1999, 26: 147-152.
259. Kurt A, Ingec M, Isaoglu U, Yilmaz M, Cetin N, Calik M, Polat B, Akcay F, Gundogdu C, Suleyman H. An investigation about the inhibition of acute ischemia/reperfusion damage by dexmedetomidine in rat ovarian tissue. *Gynecological Endocrinology*, 2013, 29: 222-225.
260. Yapca OE, Borekci B, Turan MI, Gulapoglu M. The effect of agomelatine on oxidative stress induced with ischemia/reperfusion in rat ovaries. *Advances in clinical experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University*, 2014, 23: 715-721.
261. Ersoy GS, Eken M, Tal R, Oztekin D, Devranoglu B, Kaygusuz EI, Cevik O. N-acetylcysteine leads to greater ovarian protection than enoxaparin sodium in a rat ovarian torsion model. *Reproductive biomedicine online*, 2016, 33: 93-101.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Özlem Özgül Abuç
Doğum tarihi:	14 Mayıs 1984
Doğum Yeri:	Erzurum
Medeni Hali:	Bekâr
Uyruğu:	T.C.
Adres:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD, 25240 / ERZURUM
Tel:	0506 337 85 95
Faks:	-
E-mail:	oz_ozlemo@hotmail.com
Eğitim	
Lise:	Erzurum Lisesi
Lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans:	Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	Orta Derece
İlgi Alanları ve Hobiler	
Kitap Okumak	

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Histoloji ve Embriyoloji ana bilim dalında doktora Tezi olarak Dr.Öğr.Üyesi Tuba DEMİRCİ danışmanlığında sunulan “Over İskemi-Reperfüzyon Modeli Oluşturulan Sıçanlarda Viteksin’in Etkisinin Histokimyasal, İmmunohistokimyasal ve Biyokimyasal Yöntemlerle Araştırılması” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre yazıldığını, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	1	15
Genel Bilgiler	2	30
Materyal ve Metod	5	35
Bulgular	3	10
Tartışma	0	15

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz. 28 /01/ 2020

Öğrenci Adı-Soyadı

İmza

Özlem ÖZGÜL ABUÇ

Danışman Adı-Soyadı

İmza

Dr.Öğr.Üyesi Tuba DEMİRCİ

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayımlanmasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 75296309-050.01.04-E.1900192015
Konu : HADYEK Kararı.

28.06.2019

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 12.06.2019 tarihli ve 42190979-000-E.1900170755 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 27.06.2019 tarih ve 7 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 108 no'lu kararı ile sözkonusu doktora tez çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, mevcut oy birliği ile karar verilmiş olup, çalışmanın Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülmesine ve taahhütname hükümlerine göre çalışmada kullanılan hayvanlara ait bilgilerin, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğünün, Hayvanları Koruma Bilgi Sistemi (HAYBİS)'ne girilebilmesi için ekte sunulan "HADYEK Sonuç Raporu"nun Başkanlığımıza gönderilmesi hususunda;

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Prof.Dr. Fikret ÇELEBİ
Kurul Başkanı

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Ağ: <http://www.atauni.edu.tr/#!/birim=veteriner-fakultesi>

Bilgi: Mehmet KOCA
Faks: +90 442 2317244
E-Posta: vetfak@atauni.edu.tr

Kep Adresi: atauni@hs01.kep.tr



TOPLANTI TARİHİ : 27.06.2019

TOPLANTI SAYISI : 7

KARAR N0 108: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr.Öğr.Üyesi Tuba DEMİRCİ'nin yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan **“Over İskemi-Reperfüzyon Modeli Oluşturulan Sıçanlarda Viteksin'in Etkisinin Histokimyasal, İmmunohistokimyasal ve Biyokimyasal Yöntemlerle Araştırılması”** isimli doktora tez çalışması ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 12.06.2019 tarih ve 42190979-000-E.1900170755 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen doktora tez çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğuna, çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesinin, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Ek : Sonuç Raporu. 1 Adet.





T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Rektörlük



Sayı : 75296309-050.01.04-E.1900304530
Konu : HADYEK Kararı.

25.10.2019

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 23.10.2019 tarihli ve 42190979-000-E.1900301772 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 23.10.2019 tarih ve 13 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 178 no'lu kararı ile sözkonusu doktora tez çalışmasındaki değişikliklerin yapılarak yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, mevcut oy birliği ile karar verilmiş olup, çalışmanın Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülmesine ve taahhütname hükümlerine göre çalışmada kullanılan hayvanlara ait bilgilerin, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğünün, Hayvanları Koruma Bilgi Sistemi (HAYBİS)'ne girilebilmesi için ekte sunulan "HADYEK Sonuç Raporu"nun Başkanlığımıza gönderilmesi hususunda;

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Prof.Dr. Fikret ÇELEBİ
Kurul Başkanı

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Ağ: <http://www.atauni.edu.tr/#!/birim=veteriner-fakultesi>

Çep Adresi: atauni@hs01.kep.tr

Bilgi: Mehmet KOCA
Faks: +90 442 2317244
E-Posta: vetfak@atauni.edu.tr



TOPLANTI TARİHİ : 23.10.2019

TOPLANTI SAYISI : 13

KARAR N0 178: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr.Öğr.Üyesi Tuba DEMİRCİ'nin yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülen “**Over İskemi-Reperfüzyon Modeli Oluşturulan Sıçanlarda Vitexin’in Etkisinin Histokimyasal, İmmunohistokimyasal ve Biyokimyasal Yöntemlerle Araştırılması**” isimli doktora tez çalışmasının materyal metod kısmındaki her gruptaki hayvan sayısının 2 Adet artırılması ve uygulanacak olan over iskemi-reperfüzyon modelinin her iki overe de uygulanarak bilateral eksisyonu değişikliği ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 23.10.2019 tarihli ve 42190979-000-E.1900301772 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen doktora tez çalışmasındaki değişikliklerin yapılarak yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesinin, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Ek : Sonuç Raporu. 1 Adet.

