

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA TESTİS İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINDA
3',4'-DİHYDROXYFLAVONOL'UN LİPİD PEROKSİDASYONA
ETKİSİ**

AYSEL DUMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ (SELÇUKLU TIP) ANABİLİM DALI

**DANIŞMAN
PROF.DR. RASİM MOĞULKOÇ**

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
tarafından 10202046 proje numarası ile desteklenmiştir

KONYA-2011

i. ONAY SAYFASI

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

(Aysel Duman) tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Fizyoloji (Tıp) Anabilim Dalında Yüksek Lisans olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: "Prof. Dr. Ali Muhtar TİFTİK"
Selçuk Üniversitesi

İmza

Danışman: "Prof. Dr. Rasim Moğulkoç"
Selçuk Üniversitesi

İmza

Üye: "Prof. Dr. Abdülkerim Kasım BALTACI"
Selçuk Üniversitesi

İmza

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmenliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tevfik Tekeli

Enstitü Müdürü

ii. ÖNSÖZ

Reaktif oksijen türlerinin testis dokusunda iskemi-reperfüzyon hasarına karıştığı bilinmektedir. Testis torsiyon-detorsiyonu testis dokusunun kaybına kadar varan sonuçlara neden olabilmektedir. Sentetik bir flavonoid olan ve daha önceki çalışmalarda kalp ve beyin iskemisinde koruyucu etkilere sahip olduğu belirlenen ve koroner iskemide 1 haftaya kadar koruyucu etkileri olduğu tespit edilen 3',4'-dihydroxyflavon'un (DiOHF) deneysel testis torsiyon-detorsiyonunda daha önceki çalışmalarda kullanılmadığı mevcut literatürden bilinmektedir.

Bu nedenle DiOHF'nin testis torsiyon-detorsiyonunda korucu etkilere sahip olup olmadığını belirlemek bu dokunun maruz kaldığı torsiyon-detorsiyona karşı korunmasında önemli olacaktır.

Mevcut çalışma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Programı (BAP) Koordinatörlüğü tarafından 10202046 nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez çalışmam sırasında her türlü bilimsel desteğini ve katkısını gördüğüm danışman hocam Prof. Dr. Rasim Moğulkoç'a teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca çalışma sırasında her türlü yardımlarından dolayı S.Ü. Selçuklu Tıp Fakültesinden Dr. Abdullah Sivrikaya'ya ve Selçuklu Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Abdülkerim Kasım Baltacı ve çalışmamın histopatolojik kısmındaki yardımlarından dolayı S.Ü. Meram Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Mustafa Cihat Avunduk'a teşekkür ederim.

Beni dünyaya getiren, sevgisini, sabrını hiçbir zaman esirgemeyen kalbimin yarısı olan biricik annem NİLİFER SULTANA yani benim hayatta nefes alıp vermemi zorluklar karşısında dimdik ayakta durmamı sağlayan eşi benzeri olmayan enerji kaynağım canım annem ve diğer yarısına sahip olan benim için tereddütsüz her şeyi göze alan, ceplerindeki son harçlığa kadar hiç birşey düşünmeden bana yollayan biricik ablalarım DENİZ ve DERYA yani benim küçük annelerim yaptıkları her şey için sonsuz teşekkürler ederim. Kulu'da ikinci bir ailem olan ŞAHİN ve ŞERİFE ALP ailesine şükranlarımı sunarım.

iii. İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	1
1.1. İskemi – Reperfüzyon.....	2-3
1.1.2. İskemi-Reperfüzyon Hasarı Nasıl Gözlenir?.....	3
1.1.3. İskemik Önkoşullama.....	3
1.1.3.1. Önkoşullama Mekanizmaları.....	5
1.1.3.2. İskemi-Reperfüzyon Hasarına Karşı Savunma Mekanizmaları...5-6	
1.1.4. Testis Torsiyonu	6-7
1.1.5. Lipid Peroksidasyonu.....	7-8
1.1.6. Oksidan ve Antioksidan Mekanizmalar.....	8
1.1.6.1. Glutasyon Peroksidaz.....	8
1.1.6.2. Nitrik Oksit.....	8-10
1.1.6.3. Malondialdehid (MDA)	10-11
1.1.6.4. Glutasyon (GSH)	11
1.1.6.5. Ksantin Oksidaz (XO)	11
1.1.7. Flavonoidler	11-12
2. GEREÇ ve YÖNTEM	13
2.1. Deney Hayvanları	13
2.2. Dihidroksi Flavonoid Uygulaması	14
2.3. Kan Alımı	14
2.4. Kan ve Doku Analizleri	14
2.4.1. Glutasyon Peroksidaz Tayini	14
2.4.1.1. Reaktiflerin Hazırlanması	15
2.4.1.2. Çalışma Prensibi	15
2.4.2. Nitrik Oksit Düzeyleri Ölçümü	15

2.4.2.1. Reaktiflerin Hazırlanması	15
2.4.2.2. Standart Hazırlanması	16
2.4.2.3. Çalışma Prensibi	16
2.5. Protein Tayini	17
2.5.1. Reaktifin Hazırlanması	17
2.5.2. Standart Hazırlanması.....	17
2.5.3. Çalışma Prensibi	17
2.6. Plazma Malondialdehid Seviyelerinin Belirlenmesi	17
2.7. Doku Malondialdehid (MDA) Düzeylerinin Belirlenmesi.....	17-18
2.8. Eritrosit Glutasyon Analizi	18
2.9. Doku Glutasyon Analizi	18
2.10. Doku Ksantin Oksidaz Analizi	19-20
2.11. Histopatolojik Değerlendirme	20
2.12. İstatistik	21
3. BULGULAR	22-34
4. TARTIŞMA	35-42
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	43
6.ÖZET	44-45
7. SUMMARY	46
8. KAYNAKLAR	47-52
9. EKLER	53
10. ÖZGEÇMİŞ	54

1. GİRİŞ

Aerobik metabolizma için dokulara kan sağlayan damarların, bir pıhtı veya mekanik etkenle tıkanması sonucu dokunun beslenmesinin bozulmasına iskemi denir (Schaller ve Graf 2004). İskemi, hücre enerji düzeyinin düşmesine ve toksik metabolitlerin dokuda birikimine yol açarak, hücrede fonksiyon bozukluğuna ve sonrasında hücre ölümüne kadar gidebilen bir dizi biyokimyasal reaksiyonu başlatır. Doku kanlanmasının ilaçlarla veya mekanik müdahalelerle yeniden sağlanmasına reperfüzyon denir. İskemi-reperfüzyon (İR) hasarı, hipoksiye maruz kalan organın tekrar oksijenlenmesinin ardından ortaya çıkan hücresel zedelenmedir. Reperfüzyon hasarının daha fazla olması iskemi esnasında oluşan hasarın birikmiş etkisinden ziyade reperfüzyon esnasında yeniden oksijenlenme sebebiyledir. Serbest radikaller tarafından oluşturulan oksidatif stres organ hasarının sebebi olarak bilinir (Sasaki ve John 2007)

İskemi doku hasarına sebep olurken şaşırtıcı bir şekilde reperfüzyon sonucu meydana gelen hasar daha fazladır. Oysa dokularda kan akımının tekrar başlaması sonucu iskemik dokuda bir iyileşme olması beklenir (Khalil ve ark 2006). Reperfüzyon hasarı ilk olarak 1960'lı yıllarda tanımlanmış, iskemiye takiben gelişen reperfüzyon hasarının asidoz, sistemik şok ve subendotelyal hemorajik nekrozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Baue ve McClerkin 1965).

Hem iskemi hem de reperfüzyon değişik klinik durumlarda meydana geldiği için önemlidir. İnme, organ nakli ve dolaşım şoku doku hipoksisine en iyi örneklerdir. İskemi sonrası meydana gelen durumlar morbitide ve mortalitenin en yaygın sebebidir. Hipoksi esnasında meydana gelen sitoiskeletal değişiklikler muhtemelen epitelyal ve endotelyal permeabiliteyi değiştirir. Serbest radikaller-superoksid, hidroksil, peroksinitrit-iskemi esnasında tespit edilmiştir ve iskemi sonrası oluşan hasarı kısmen açıklar. Ancak hem reaktif oksijen türleri (ROS) hem de reaktif nitrojen türlerinin (RNS) fizyolojik önemi, posthipoksik hücrelerde iletişim süreçlerini etkileyebilmesi ve ROS'un apoptozis ve nekrozisde programlı hücre ölümünü başlatabilmesidir. ROS 'un farklı kaynakları mevcuttur ve bunlar iskemi-reperfüzyon esnasında aşırı derecede reaktif türleri üretirler (Li ve Jackson 2002).

İSKEMİNİN HÜCRESEL ETKİLERİ (Collard ve Gelman 2001)
Membran potansiyelinin değişmesi
İyon dengesinin bozulması (hücre içi kalsiyum/sodyum oranının artması)
Hücrenin şişmesi
Hücre iskeletinde bozulmalar
Hipoksantin miktarında artış
ATP’de azalma
Fosfokreatin miktarında azalma
Glutasyon miktarında azalma
Hücresel asidoz

İskemi reperfüzyon; kalsiyum şarjı, oksidan stres, metabolit birikimi ve enerji tükenmesini içeren karışık bir olaylar bütünüdür. Hasarın boyutu bu değişikliklerin büyüklüğüne bağlıdır. İskemi esnasında oksijen kaybı ile mitokondriyal ATP üretimi aniden kesilir ve bu durum kompennsatuar bir mekanizma olarak anaerobik glikoliz artışını tetikler. Sonuç olarak hidrojen iyonları ve laktik asit birikir, sonunda glikoliz inhibe edilir ve bu olayları hepsi enerji tükenmesine yol açar.

1.1. İskemi - Reperfüzyon

Arteriyel ya da venöz kan akımı azalmasına bağlı organ ve dokunun yetersiz perfüzyonu sonucu bu doku veya organların oksijenden yoksun kalması şeklinde tanımlanan iskemi, hücresel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi sonucunda hücre ölümüne yol açmaktadır. İskemik dokuya hem hücrenin rejenerasyonu, hem de toksik metabolitlerin temizlenmesi için yeniden kan akımı gerekir. Ancak, iskemik dokunun reperfüzyonu dokuda paradoksal olarak sadece iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasara yol açar (Rabinowitz ve Hulbert 1995). Reperfüzyon döneminde gözlenen hasarda, hücre içine moleküler oksijen girişi ile hızla oluşan serbest oksijen radikal (SOR) türevleri başta olmak

üzere birçok mekanizma rol oynamaktadır. Reperfüzyon hasarına en fazla duyarlı olan hücresel yapılar, zar lipitleri, proteinler, nükleik asitler ve deoksiribonükleik asit molekülleridir (Anderson ve Williams 1990).

İskemik dönemde hücrede metabolik ve yapısal değişiklikler meydana gelir. Dokuya gelen kan akımının kesilmesi ile hücresel oksidatif fosforilasyon azalır ve adenosin 5'-trifosfat ve fosfokreatin gibi yüksek enerjili fosfat sentezi azalır (Barada ve ark. 1989). Hücrede enerji depolarının boşalması ile hücre zarında bulunan Na^+ , K^+ -ATP az pompası inhibe olur. Sonuçta hücre içinde Na^+ ve Ca^{++} iyon konsantrasyonları artar (Krärup 1978). Hücre içinde Ca^{2+} iyon konsantrasyonunun artışı hücre için sitotoksiktir (Mogilner ve ark 2006). Nitekim yine bu dönemde hücrede iyon konsantrasyonunun değişimi ile proinflamatuvar sitokinlerin ve lökosit adhezyon moleküllerinin yapımında artış, buna karşılık antioksidan enzimlerin oluşumunda azalma olur. Bu durum hücreyi reperfüzyon dönemindeki hasara karşı dayanıksız kılar. İskemi döneminde ATP üretimi durduğu halde kullanımı devam ettiği için ATP'den AMP ve adenosin oluşur. Adenosin, hızla hücre dışına diffüze olarak inozin ve hipoksantine parçalanır. Dolayısıyla, iskemi sonucu yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin (ATP) yıkımı, dokuda ksantin ve hipoksantin gibi pürin metabolitlerinin birikimine ve ksantin dehidrojenazın (KDH) ksantin oksidaza (KO) dönüşümüne yol açar. Normal şartlarda hipoksantin ürik asite metabolize olur ve bu reaksiyonda elektron alıcı NAD^+ (nikotinamid adenin dinükleotidin okside formu) dir. Ancak hipoksi ya da iskemi nedeniyle $\text{KDH} \rightarrow \text{KO}$ 'a dönüştüğünden hipoksantin ürik asite dönüşümü KO tarafından gerçekleşir ve bu reaksiyonda ise elektron alıcı olarak moleküler oksijen kullanılır (Lysiak ve ark 2002).

Normal şartlarda:

Hipoksantin ——— KDH (NAD^+ yi kullanarak) ——— Ksantin ve ürik asit

İskemide:

ATP ——— parçalanır ——— AMP ve ADENOZİN

ADENOZİN hücre dışına geçer ——— inozin ve hipoksantin

AMP ——— Hipoksantin

KDH————— KO

Reperfüzyon ile:

Hipoksantin Ksantin ————— KO (O₂'i kullanarak)+ Ksantin O₂

Ksantin + 2O₂ + H₂O ————— Ürik asit + O₂ + H₂O₂

İskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarının fizyopatolojisi ile ilgili çeşitli faktörler ileri sürülmüştür. Bunlar birbiriyle ilişkileri karmaşık, hücrel ve humoral olaylar serisidir (Filho ve ark 2004).

Özellikle; serbest oksijen radikalleri, polimorf nüveli lökositler (PMNL), kompleman sistemi, endotel hücreleri olmak üzere başlıca dört faktör hasarın nedenleri arasında yer almaktadır (Prillaman ve Turner 1997).

1.1.2. İskemi-Reperfüzyon Hasarı Nasıl Gözlenir?

Kısa iskemik ataklar miyositler tarafından tolere edilirler, belirgin bir hasar oluşmaz. Örneğin, köpeklerde 15 dakika'ya kadar olan total proksimal koroner tıkanmalar, reversibl hasara yol açar. 15 dakika'dan fazla süren iskemik durumlar geri dönüşümsüzdür. Kısa iskemik periyodlarda kalp kasında, kontraktıl fonksiyonda bozulmalar gözlenebildiği gibi uzamış iskemik periyodlarda ise nekroza kadar giden hasar oluşur (Kloner ve ark 2001a, 2001b).

1.1.3. İskemik Önkoşullama

İskemik önkoşullama hücre veya dokuların iskemi ve reperfüzyona kısa süreli maruz kalması ve sonrasında daha uzun süreli iskemi ile oluşan doku hasarında belirgin olarak azalma oluşturan bir fenomendir (Murry ve ark 1986). İskemik önkoşullama ilk kez 1986 yılında Murry ve arkadaşları tarafından köpek miyokardında gösterilmiştir (Murry ve ark 1986). Miyokardiyal iskemik önkoşullamanın gösterilmesinden sonra yapılan çalışmalar bu fenomenin beyin, spinal kord, iskelet kası ve karaciğer gibi organlarda da oluşabileceği bildirilmiştir (Chen ve ark 1996, Matsuyama ve ark 1997). İskemik önkoşullamanın akciğerde de koruyucu etki yapabileceğini gösteren çalışmalar vardır (Featherstone ve ark 2000, Neely ve Keith 2000).

İskemik önkoşullamayı uyarabilmek için gereken iskemik tekrarlar türe ve organ sistemine göre değişiklik göstermektedir (Hawaleshka ve Jacobsohn, 1998). Sıçan, tavşan, köpek ve insan kalbi için literatürde iskemik önkoşullama oluşturan farklı sayıda iskemik tekrar protokolleri bulunmaktadır (Cohen ve ark 1991, Liu ve Downey 1992, Murry ve ark 1986). İskemik önkoşullamanın erken döneminde oluşan koruyucu etkinin süresi de türe özgü olarak değişiklik göstermektedir. Kalpteki bu koruyucu etki tavşanda 30 dakikalık reperfüzyonu takiben sonlanırken (Van Winkle ve ark 1991), bu sürenin sıçanlarda bir saat (Li ve ark 1992), köpeklerde ise iki saat olduğu bildirilmiştir (Murry ve ark 1991). İskemik önkoşullamanın geç dönemdeki koruyucu etkisinin ortaya çıkması için gereken zamanın da türler arasında farklılık gösterdiği düşünülmektedir (Chen ve ark 1996, Marber ve ark 1993).

1.1.3.1. Önkoşullama Mekanizmaları

İskemik önkoşullamanın deneysel olarak gösterilmesini takiben mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik pek çok çalışma yapılmıştır. İskemik önkoşullamada temel miyokardial koruma yollarından birinin artmış adenosin üretimi ile beraber A1 reseptörlerinin aktivasyonu olduğu gösterilmiştir (Lawson ve Downey 1993, Auchampach ve Gross 1993). Tavşan kalbinde tekrarlanan dozlarda (100 µg. kg-1) spesifik A1 agonisti 2-kloro-N(6)-siklopentil-adenozin (CCPA) ile önkoşullama oluşturulan bir çalışmada iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan infark alanında %42'lik bir azalma olduğu bildirilmiştir (Dana ve ark 1998).

Kalpte, iskemi sırasında endojen nitrik oksit (NO) üretiminin arttığı bilinmektedir (Zweier ve ark 1995). NO'nun kalbi reperfüzyon hasarından koruduğu (Nakanishi ve ark 1992, Williams ve ark 1995) ya da iskemik önkoşullamanın geç fazında infarktüse karşı korumada önemli rol oynadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Bolli ve ark 1997, 1998). NO'nun iskemik önkoşullamada miyokardın korunmasında önemli bir rol oynayabileceği deneysel olarak sentezinin engellenmesi yoluyla da araştırılmıştır.

1.1.3.2. İskemi-Reperfüzyon Hasarına Karşı Savunma Mekanizmaları

İskemi-reperfüzyon hasarını önlemek amacıyla çok sayıda deneysel çalışma

yapılmıştır. İskemi-reperfüzyonun fizyopatolojisinde serbest oksidan radikalleri önemli bir yer tuttuğu için çalışmalar daha çok bu yöndedir. Serbest radikaller tüm biyolojik maddelerle özellikle proteinler, polisakkaritler, nükleik asitler ve çoklu doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerler. Özellikle hidroksil radikalleri hücre zarındaki lipidlerin peroksidasyonuna neden olarak hücrenin yapısının bozulmasına neden olur. Son ürünlerden olan malondialdehit (MDA) lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak kullanılır. Lipid radikalleri oluşması, zar lipid yapısında değişikliklere ve zar işlevinin bozulmasına neden olmaktadır. Hücre içi kalsiyumun artması ile başlayan ve radikallerin enzimler ve diğer hücre elemanlarına etkisi ile oluşan sitotoksik ürünler hücreyi ölüme kadar götüren süreci başlatır. Hücrenin kendini korumak için geliştirdiği mekanizmalara antioksidan mekanizmalar denir. Bunlar; serbest radikallerin üretiminin inhibisyonu, nötrofillerin inhibisyonu, serbest radikallerin süpürülmesi, antioksidan enzimler, iskemik ön koşullanma ve hipotermi şeklindedir.

Vitamin E, vitamin C, beta karoten gibi vitaminler süperoksit, hidroksil ve lipid peroksit radikallerini tutma özelliğine sahiptir. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimler, allopurinol gibi metal bağlayan proteinler ve dimetil sülfoksit ve desferoksamin gibi birçok ajan oksijen radikallerinin oluşumunu azaltarak radikallerin yükseltgen olmalarını engeller ya da DNA onarım mekanizmalarını artırarak antioksidan etki gösterirler(Taşkınlar 2006).

1.1.4. Testis Torsiyonu

Testis torsiyonu, spermatik kord ve yapılarının kendi etrafında dönmesiyle oluşan ve çocuklarda acil cerrahi girişim gerektiren önemli bir ürolojik sorundur. Sağlıklı tek testisin bile, fertilizasyon için sorun oluşturmadığı bilindiği halde, tek taraflı testis torsiyonu olgularının uzun süreli izlemlerinde, %25 oranında infertilite ve %90'a varan anormal sperm analiz sonuçları, tek taraflı testis torsiyonunun karşı testistede histolojik ve hemodinamik değişikliklere neden olduğunu desteklemiştir. Puberte döneminde daha yaygın olmakla birlikte her yaşta gözlenebilen, torsiyonun derecesi ve süresi arttıkça testiküler fonksiyonlarda bozulmaya yol açan, acil bir ürolojik problem olarak ortaya çıkar (Barada ve ark 1989).

25 yaşından genç erkeklerdeki insidansı 1/4000'dir. Başarılı bir cerrahi

girişime karşın bu hastaların %40-60'ında testiküler atrofi ve infertilite gelişmektedir (Krärup 1978).

Testiküler torsiyon-detorsiyon (T/D) nedeniyle oluşan iskemi ve reperfüzyon (I/R) testiküler hasara neden olmaktadır. İskemi sırasında oksijen miktarının metabolik ihtiyaçlara oranla düşük seviyede olması, hücresel enerji depolarındaki azalma ve toksik metabolitlerin birikimine bağılı olarak germ hücre ölümü gerçekleşir (Palmer ve ark 1997). Reperfüzyon safhasında hem reaktif oksijen radikallerinde (ROS) (başlıca hidroksil radikalleri ve süperoksit anyonları olmak üzere) hem de reaktif nitrojen türevlerinde (RNS) (başlıca nitrik oksit (NO) ve onun peroksinitrit gibi toksik metabolitlerinde olmak üzere) ciddi artış olur (Lysiak ve ark 2002, Mogilner ve ark 2006) .

Bu serbest radikaller mitokondri ve hücre membranındaki lipidlerin peroksidasyonu yoluyla membran geçirgenliğinde artışa veya membran bütünlüğünde bozulmaya neden olur. Sonuçta iskemi nedeniyle oluşan germ hücre hasarı daha da artar (Mogilner ve ark 2006).

Torsiyon sonrası testiküler hasarın gelişmesinde iskemi ve bunu izleyen re-perfüzyon sırasında ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin (SOR) etkili olduğu bilinmektedir. Serbest oksijen radikalleri hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna yol açarak proteinleri denatüre eder ve hücre harabiyetine neden olur (Filho ve ark. 2004). Bu harabiyeti süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi endojen antioksidanlar azaltmaktadır (Akgöl ve ark. 1994).

1.1.5. Lipid Peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonu, membranlarda bulunan poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA) serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehitler gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur. Lipid hidroperoksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehidler oluşurlar. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffuze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar, böylece birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olurlar (Halliwell 1991).

Katalaz hidrojen peroksidi (H_2O_2) oksijen ve suya parçalar. Birçok hastalıkta

örneğin kanser, Down sendromu ve anemide serumda katalaz aktivitesinin değiştiği bildirilmiştir (Laurie ve Kaplowitz 1991).

1.1.6. Oksidan ve Antioksidan Mekanizmalar

1.1.6.1. Glutasyon Peroksidaz

Glutasyon peroksidaz (GPx), hidroperoksidlerin indirgenmesinden sorumlu sitozolik bir enzimdir. Eritrositlerde GSH-Px oksidant strese karşı en etkili antioksidant olup fagositik hücrelerde de önemli fonksiyonları vardır (Lunec, ve Blake 1990). *Fasciola hepatica* (F. hepatica)'da katalaz, GPx ve nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) fosfat bağlı glutasyon redüktaz aktivitesine rastlanılmamıştır. Düşük seviyelerde nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP) bağlı glutasyon redüktaz ve süperoksid dismutaz aktivitesine rastlanılmamıştır (Barrett 1980).

1.1.6.2. Nitrik Oksit

Otokrin ve parakrin bir hücrel ajan olan NO, normal fizyolojik koşullar ile birçok patofizyolojik durumda homeostazın sürdürülmesinde önemli bir etkidir. Memelilerde nitrik oksidin varlığı ilk kez 1916 yılında gösterilmiş, 1985'de aktive olmuş makrofajların NO saldığı bulunmuştur (Davies ve ark 1995). Sonrasında NO sentezi için L-argininin öncü madde olduğu ve NO sentezinin inhibisyonu için L-arginin bazlı hem analoglarının kullanılabileceğı gösterilmiştir. Endotel kaynaklı vazodilatör faktörün NO olduğu belirlendikten sonra bu molekülün beyin ve daha birçok hücre ve organ sistemlerinde üretilerek fizyolojik ve patofizyolojik olaylarda etkili olduğu ileri sürülmüştür (Davies ve ark 1995).

Nitrik oksit, L-argininden sitrulin oluşumu sırasında, L-argininin guanidin nitrojen grubunun hidroksilasyonu ile oluşan ara üründür. Bu reaksiyon bir dizi nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından katalize edilir. Nitrik oksit sentaz enzimleri, yapısal nitrik oksit sentaz (cNOS) ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Yapısal NOS vasküler endotelde, nöronlarda ve trombositlerde bulunur (Sarela ve Mathie 1996). Nöronlarda bulunan, nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS), endotel hücrelerinde bulunan endoteliyal nitrik oksit sentaz (eNOS) adını alır. İndüklenebilir NOS kardiyomiyositler, hepatositler, nöronlar, mikrogial hücreler, nötrofiller, vasküler endotel ve düz kas hücrelerinde

bulunur. Yapısal NOS tarafından yapılan nitrik oksit, hücreler arası ve hücre içi haberleşmede rol oynar. Yapısal NOS enzimleri, ortamdaki kalsiyum konsantrasyonlarının artışından etkilenirken iNOS etkilenmez (Lincoln ve ark 1997). Yapısal NOS çeşitli organ sistemleri için bazal seviyelerde gereklidir (Sarela ve Mathie 1996).

Nitrik oksit, suda ve yağda çözünebilen, solüsyon içinde yarılanma ömrü 30 saniye olan, nitrit ve nitrata okside olabilen renksiz ve sabit bir gazdır (Davies ve ark 1995). Tiol grupları ile reaksiyona girerek gerektiği zamanlarda kullanılmak üzere depolanır (Davies ve ark 1995, MacMicking ve ark 1997). Nitrik oksit, pankreasın asiner hücrelerinde guanozin 3,5-siklik monofosfat (cGMP) sentezini düzenler (Gukovskaya ve Pandol 1994). Guanozin 3,5-siklik monofosfat, böbrekler ile beyinde atrial natriüretik faktör, düz kasların gevşemesi, retinada fototransdüksiyon ve enterotoksinlerle ilişkili olarak ince bağırsağa sıvı salınımını etkiler (Davies ve ark 1995). Arterlerde venlerden daha fazla NO üretilir (Moncada ve Higgs 2002). Nitrik oksit demir sülfür içeren ve trikarboksilik asit siklusunun enzimi olan cis-akonitaz ile gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenazın tiyol (SH) gruplarına bağlanır (Davies ve ark 1995). Normal fizyolojik koşullarda NO konsantrasyonları 100-500 nM düzeylerinde iken endotoksin, gama-interferon, IL-1, TNF-alfa gibi ajanlarla iNOS'un tetiklenmesi sonucunda düzeyleri yaklaşık 10 kat artar. Hastalık ve sonuçlarına bağlı olarak NO zararlı veya yararlı etkiler gösterebilir (Eiserich ve ark 1998).

Nitrik oksidin serbest oksijen radikalleriyle etkileşimi ve antioksidan özellikleri ile ilgili araştırmalardan elde edilen sonuçlar çelişkilidir. Aktif makrofajların mikrosidal aktivitelerini NO aracılığıyla gösterdikleri ileri sürülmekle birlikte, doğru mediatörün NO'dan üretilen nitrojen dioksit (NO_2) gibi ikincil bir oksidan madde olabileceği düşünülmektedir (Kalff ve ark 1999). Ortamda oksijen varsa NO'dan NO_2 ve iki elektronlu oksidanlar olan N_2O_3 ile N_2O_4 oluşur. Süperoksidi bağladığı için NO'nun serbest radikalleri temizleyen koruyucu bir faktör olduğu düşünülmektedir. Süperoksit ile NO reaksiyonunun ürünü olan peroksinitrit (ONOO^-) ise güçlü ve yarılanma ömrü uzun bir oksidandır. Organizmada peroksinitrit, hidroksil radikali gibi davranan hidroksinitrite (HOONO) dönüşür. Peroksinitritin parçalanmasıyla yüksek konsantrasyonlarda NO_2

oluşur (Kalff ve ark 1999). Bu reaktif nitrojen bileşikleri lipidler, DNA, tioller, amino asitler ve metallerle reaksiyona girerek enzim fonksiyonlarını bozar, membran bütünlüğüne zarar verir ve DNA mutasyonuna neden olabilir (Eiserich ve ark. 1998). Bunların sonucunda lipid peroksidasyonu başlar (Kuo PC ve Schroeder 1995).

Yapılan deneysel çalışmalarda NO'nun besin alımı, öğün sayısı ve süresi gibi beslenme davranışları üzerinde olumlu etkileri olduğu da gösterilmiştir. Genetik obesite dışında sağlıklı kemirgenlerde, uzun süre nitrik oksit sentezi inhibe edildiğinde anoreksiya gelişmiştir. Bu hayvanlara L-arginin verildiğinde iştah ve besin alımı artmıştır (Janero 2001).

Artmış nitrik oksit aktivitesi ile ilişkili olan bazı hastalıklar şunlardır: septik şok, reperfüzyon hasarı, gastroözofageal reflü, ülseratif kolit, diabetes mellitus, graft versus host reaksiyonu ve allograft rejeksiyonu (Sarela ve Mathie 1996). Öte yandan, iskemik hasar, hipertansiyon, ateroskleroz ve vaskülopatiler, akalazya, doğuştan pilor stenozu ve Hirschsprung hastalığında da NO aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir.

1.1.6.3. Malondialdehid (MDA)

Oksijen radikalleri tüm lipid yapılarında yıkıcı etkilere sahiptir, ancak, hücresel yıkımlanma membrandan daha belirgindir. Lipid peroksidasyonun son ürünü MDA olarak tanımlanır. MDA lipid peroksidasyonun güvenilir bir göstergesi olarak dikkate alınır (Tsai ve ark 1993). Farklı dokulardaki iskemi-reperfüzyon çalışmalarında oksidatif hasarın göstergesi olarak kan ve dokudaki MDA düzeyleri çalışılmış olup bu dokulardan bir tanesi de testis dokusudur (Zhang ve ark 2011). Azizollazi ve ark'nın (2011) gerçekleştirdiği bir araştırmada testis iskemi-reperfüzyonunda serum MDA seviyelerinin arttığını rapor etmişlerdir. Benzer şekilde başka bir araştırma grubu tarafından yapılan çalışmada da iskemik testiste MDA seviyelerinin kontrol grubundan önemli şekilde yüksek olduğu belirlenmiştir (Tsounapi ve ark 2011).

1.1.6.4. Glutasyon (GSH)

Glutasyon hücreleri oksidan hasara karşı koruyan hücre içindeki en önemli antioksidan bileşiktir. Karaciğer başta olmak üzere pek çok dokuda glutamat, sistein ve glisinden sentezlenir. Proteinlerdeki sülfidril gruplarını redükte halde tutar ve oksidasyona karşı korur. Böylece fonksiyonel proteinlerin inaktivasyonunu engeller (Ross 1988). Organizmada antioksidan savunmanın önemli elemanlarından birisi olarak kabul edilir. Testis-iskemi reperfüzyon çalışmalarında da doku antioksidan aktivitelerinin göstergelerinden birisi olarak GSH düzeyleri belirlenmiştir (Yildiz ve ark 2011). Guimarae ve ark'nın (2010) gerçekleştirdiği çalışmada 2 saatlik iskemi ve bunu takiben 3 saatlik reperfüzyon süresi sonunda testis dokusunda GSH seviyelerinin azaldığı belirlenmiştir.

1.1.6.5. Ksantin Oksidaz (XO)

Ksantin oksidaz, ksantin oksiredüktazın bir formu olup reaktif oksijen türlerini oluşturur (Ardan ve ark 2004). Bir enzim aracılığıyla hipoksantin okside olması ksantini oluşturur ve bir sonraki reaksiyonda ksantin oksidasyonu ile ürik asit oluşur. Bu enzim insanı da içerisine alan bazı türlerde pürin metabolizmasında önemli rol oynar (Harrison 2002, Hille 2005). Ksantin oksidaz sülfidril gruplarının oksidasyonu ile ksantin dehidrogenaza dönüşebilir (Hille 2006). İnsanlarda ksantin oksidaz normalde karaciğerde bulunur. Şiddetli karaciğer hasarı sırasında ksantin oksidaz kana salınır ve böylece karaciğerde hasar oluştuğunda bunu belirlemek için kanda XO analizi yapılır. Kardiyovasküler hastalıklarda tedavi mekanizmasını sağlamak için ksantin oksidaz inhibisyonu da önerilmiştir (Dawson ve Walters 2006).

1.1.7. Flavonoidler

İçinde yaşadığımız 21. yüzyılda gelişmekte olan teknoloji, çevre kirliliği, sera etkisi, petrokimya ürünleri, X-UV ışınları (fotokimyasal), ilaçlar, sigara gibi pek çok etken sürekli olarak çeşitli oksidatif stres (oksidan) oluşturan maddelerle karşı karşıya kalmamıza neden olmaktadır (Bors ve ark 1990). Bu etkiler kendini serbest radikal oluşumuyla göstermektedir. Serbest radikaller hücrelere ve bağışıklık sistemine saldıran moleküllerdir. Antioksidanlar ise serbest radikallerin yıkıcı etkilerini

engelleyen, pek çok hastalığa ve erken yaşlanmaya neden olabilecek zincir reaksiyonları önleyen moleküllerdir. Antioksidan özellik gösteren flavonoidler, serbest radikal toplayıcı özellik göstermektedir. Hidrojenlerin ayrılmasıyla oluşan flavonoid radikalleri, ortamdaki eser metallerle şelat halka oluşturarak kararlı duruma geçerler.

Özellikle son yıllarda antioksidan özellik gösteren bitkilerin üzerine deneysel ve teorik çalışmalar vardır (Bors ve ark 1990). Günümüzde flavonoidlerin biyolojik ve farmakolojik aktiviteleri ile ilgili bilgi birikimimiz gittikçe artmaktadır.

Geleneksel tıpta, son yirmi yılda flavonoidlere karşı ilgi artmış, gerçekleştirilen geniş çaplı araştırmalar sonucu, flavonoidlerin çok yönlü biyokimyasal ve farmakolojik aktivitelere sahip oldukları belirlenmiştir. Örneğin, bu tür bileşiklerin antioksidatif (Moroney ve ark 1988), antinflamatuar (Pratt ve Hudson 1990), antimikrobiyal (Kato ve ark 1983) etkilere sahip oldukları açıklanmıştır. Bunlardan başka kuersetinin *in vitro* ve *in vivo* şartlarda antitumör ve antikarsinogenik etkilere sahip olduğu da belirtilmiştir (Huang ve ark 1983, Deschner ve ark 1991, Bilaloğlu ve Harmandar 2002).

Geniş kapsamlı kullanım alanına sahip olan flavonoidlerin kaynaklarının açığa çıkarılması, flavonoidlerin elde edilmesi, özelliklerinin belirlenmesi ve kullanım alanlarının genişletilmesi güncel ve önemli problemlerdendir (Jovanovic ve ark 1994).

Mevcut çalışmanın amacı da sentetik bir flavanoid olan ve daha önceki çalışmalarda kalp ve beyin iskemisinde koruyucu etkilere sahip olduğu belirlenen 3',4'-dihydroxyflavon'un deneysel testis torsiyon-detorsiyonunda lipid peroksidasyona karşı koruyucu etkisi olup olmadığını belirlemektir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Deney Hayvanları

Mevcut çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilen 60 adet erkek Wistar-albino türü erkek sıçan üzerinde ve aynı araştırma merkezinden alınan etik kurul onayı ile bahsedilen araştırma merkezinde gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan deney hayvanları ortalama olarak 250-260 gr ağırlığındaydı. Sıçanlar randomize olarak eşit sayıda iki tane altışarlı, altı tanede sekizerli olmak üzere toplam sekiz gruba ayrıldı. Bütün sıçanlara ısı ve ışık miktarları kontrol edilen odalarda su ve yemleri sağlanarak bakıldı. Sıçanlar intraperitoneal olarak uygulanan ketamin hidroklorür (60 mg/kg) ve Xylasine (rompun) (5 mg/kg) ile anestezi edildikten sonra cerrahi işlemler uygulandı.

1. **Genel Kontrol (n=6):** Bu gruptaki hayvanlara herhangi bir uygulama yapılmadan anestezi altında sadece tek taraflı orşidektomi yapıldı. Anestezi edilen hayvanlardan kardiyak punksiyonla kan alındı. Daha sonra öldürülen hayvanlardan testis dokuları alınıp çalışmadaki parametreler incelendi.
2. **Sham Kontrol (n=6):** Deney hayvanları önce genel anestezi (Ketamin +Rompun) edildikten sonra testis bölgesi cerrahi olarak açılıp kapatıldı. Ayrıca hayvanlara DiOHF çözücüsü periton içi olarak uygulandı. Daha sonra anestezi verilerek öldürülen hayvanların kan ve testis dokuları alındı.
3. **720°-4 saat torsiyon (n=8):** Bu grupta hayvanlar öncelikle genel anestezi yapıldıktan sonra sağ testisleri 720°-4 saat süreyle torsiyona maruz bırakıldı ve bu sürenin sonunda öldürülen hayvanlardan kan ve testis örnekleri alındı.
4. **720°-4 saat torsiyon+ 4 saat detorsiyon (n=8):** Çalışmanın bu grubunda hayvanlar genel anestezi yapıldıktan sonra sağ testisleri 720°-4 saat süreyle torsiyon yapıldı. Bunu takiben 4 saat süreyle de detorsiyon yapıldıktan sonra anestezi verilerek hayvanlar öldürüldü.
5. **720°-4 saat torsiyon+ DiOHF (n=8) :** Deney hayvanları öncelikle genel anestezi altına alındı. Bunu takiben testisleri 720° olarak 4 saat süreyle torsiyona maruz bırakıldı torsiyonun 30. dakikasından itibaren DiOHF 30 mg/kg dozunda periton içi olarak hayvanlara uygulandı. Torsiyon süresinin bitiminde deney hayvanları anestezi verilerek öldürülerek kan ve doku örnekleri alındı.

6. **720°-4 saat torsiyon + DiOHF + 4 saat detorsiyon (n=8)** : Çalışmanın bu grubunda hayvanlar genel anestezi yapıldıktan sonra sağ testisleri 720°-4 saat süreyle torsiyon yapıldı. Torsiyon süresinin bitiminde hayvanlara DiOHF 30 mg/kg dozunda periton içi uygulanarak 4 saat süreyle detorsiyon yapıldı. Detorsiyon süresinin bitiminde ise anestezi verilerek hayvanlar öldürüldü ve ilgili doku ve kan örnekleri alındı.
7. **720°-4 saat torsiyon+ 24 saat detorsiyon (n=8)** : Çalışmanın bu grubunda hayvanlara genel anestezi uygulandıktan sonra sağ testisleri 720°-4 saat süreli torsiyona maruz bırakıldı. Torsiyon süresinin bitiminden itibaren testisler 24 saat süreyle detorsiyone edildi. Detorsiyon süresinin bitiminde ise anestezi verilerek öldürülen hayvanlardan kan ve doku örnekleri alındı.
8. **720°-4 saat torsiyon+ DiOHF + 24 saat detorsiyon (n=8)** : Çalışmanın bu grubunda hayvanlara genel anestezi uygulandıktan sonra sağ testisleri 720°- 4 saat süreli torsiyona maruz bırakıldı. Torsiyon süresinin bitiminden itibaren DiOHF 30 mg/kg dozunda periton içi uygulandı ve testisler 24 saat süreyle detorsiyone edildi. Detorsiyon süresinin bitiminde ise anestezi verilerek öldürülen hayvanlardan kan ve doku örnekleri alındı.

2.2. Dihidroksi Flavonoid Uygulaması

DiOHF (Indofine Chemical Co., U.S.A.) 4 ml dimetil sülfoksitte çözdürüldükten sonra toplam 200 ml olarak polietilen glikol ve su ile karıştırıldı. Deney hayvanlarına 30 mg/kg dozunda periton içi uygulandı (Wang ve ark. 2004).

2.3. Kan Alımı

Anestezi edilen hayvanlardan kardiyok punksiyonla 3-4 ml kadar kan EDTA'lı tüplere alındı. Ayrıca hayvanlardan alınan testis doku örnekleri (torsiyon ve detorsiyonlu) histopatolojik değerlendirme için formaldehide konulurken diğer doku ve plazma örnekleri analiz yapıncaya kadar -80° C'de muhafaza edildi.

2.4. Kan ve Doku Analizleri

2.4.1. Glutasyon Peroksidaz Tayini

Glutasyon Peroksidaz düzeyleri Cayman marka ticari kit kullanılarak kolorimetrik metodla ölçüldü (Katalog No: 703102).

2.4.2.1. Reaktiflerin Hazırlanması

- 1) GPx assay buffer: Her vial 27 ml distile su ile seyreltildi. 6 ay stabildir.
- 2) GPx sample buffer: 2 ml sample buffer ile 18 ml distile su karıştırılarak hazırlandı. 1 ay stabildir.
- 3) Glutasyon peroksidaz kontrol: 50 µl bovin eritrisit GPx içerir. 10 µl enzim 490 µl dilüe sample bufferle seyreltildi. Buzda 4 saat stabildir.
- 4) GPX Co-Substrat Karışımı: 2ml deiyonize su ile hazırlandı. Çalışma anında 25 derecede tutulmalı aksi halde +4 derecede muhafaza edilmeli. 2 gün stabildir.
- 5) GPX Kümen Hidroperoksit: Kullanılmadığında -20 derecede olmalı, kullanıma hazır.

2.4.2.2. Çalışma Prensibi

- 1) İlk iki kuyucuğa 120 µl assay buffer ve 50 µl Co-substrat karışımı ilave edildi.
- 2) Kontrol kuyucuğuna 100 µl assay buffer, 50 µl Co-substrat ve 20 µl dilüe edilmiş kontrol numunesi koyuldu.
- 3) Numune kuyucuklarına 100 µl assay buffer, 50 µl Co-substrat ve 20 µl örnek ilave edildi.
- 4) Bütün kuyucuklara 20 µl kümen Hidroperoksit koyuldu.
- 5) Kümeni koyduktan sonra birer dakika aralıklarla 5 dakika boyunca 340 nm’de absorbansları alındı.

2.4.2. Nitrik Oksit Düzeyleri Ölçümü

NO düzeyleri Cayman marka ticari kit kullanılarak kolorimetrik metodla ölçüldü (Katalog No: 780001).

2.4.2.1. Reaktiflerin Hazırlanması

- 1) Assay Buffer: 100 ml distile suda çözülerek hazırlandı. Buffer 4°C’ de 2 ay stabildir.
- 2) Nitrat Redüktaz: 1,2 ml assay buffer ile sulandırıldı. Kullanım esnasında buzda tutulur. Kullanılmadığı zaman -20° C ‘de muhafaza edilir.

3) Enzim Kofaktörleri: 1,2 ml assay buffer ile sulandırıldı. Kullanım esnasında buzda tutulur. Kullanılmadığı zaman -20° C 'de muhafaza edilir.

4) Nitrat Standart: 1ml assay buffer ile sulandırıldı. 4° C 'de muhafaza edilir. Sulandırıldıktan sonra 4 ay stabildir.

5) Nitrit Standart: 1ml assay buffer ile sulandırıldı. 4° C 'de muhafaza edilir. Sulandırıldıktan sonra 4 ay stabildir.

6) Griess Reaktifleri R1, R2: Bu reaktifler kullanıma hazır durumdaydı, sulandırılmaz. 4° C 'de muhafaza edilir.

2.4.2.2. Standart Hazırlanması

0,9 ml. Assay buffer üzerine 0,1 ml. Nitrat standart eklenip vortekslendi. Böylece 200 µM stok standart hazırlanmış olur. Stok standart solüsyondan sırasıyla 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM ve 35 µM olmak üzere standartlar hazırlandı.

2.3.2.3. Çalışma Prensibi

1) Kör kuyucuklarına 200µl assay buffer pipetlendi. Başka herhangi bir şey ilave edilmedi.

2) 80 µl numune ilgili kuyucuklara pipetlendi.

3) Kör kuyucuğu hariç bütün kuyucuklara 10 µl enzim kofaktörleri ilave edildi.

4) Kör kuyucuğu hariç bütün kuyucuklara 10 µl nitrat redüktaz ilave edildi.

5) Plate kapatılarak 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.

6) İnkübasyondan sonra 50 µl Griess reagent R₁ kör kuyucuğu hariç bütün kuyucuklara ilave edildi.

7) Bekletilmeden 50 µl Griess reagent R₂ kör kuyucuğu hariç bütün kuyucuklara ilave edildi.

8) 10 dakika süreyle renk değişimi beklendikten sonra 550 nm' de okutuldu.

2.5. Protein Tayini

Protein analizi biüret metodu ile yapıldı. Protein düzeyleri Cayman marka ticari kit kullanılarak kalorimetrik metodla ölçüldü (Katalog No: 704002) (Burtis ve Ashwood, 1994).

2.5.1. Reaktifin Hazırlanması

Protein assay reagent: Kit distile su ile 50 ml'ye tamamlandı. Karanlıkta 1 yıl stabilir.

2.5.2. Standart Hazırlanması

Protein tayin BSA Standart: 4 µl stok solüsyonuna 996 µl distile su eklenerek hazırlandı. Stok standart konsantrasyon: 40 µg/ml oldu.

Stok standart solüsyonundan sırasıyla 5,6 µg/ml, 7,5 µg/ml, 10,1 µg/ml, 13,5 µg/ml, 18 µg/ml, 24 µg/ml ve 32 µg/ml olmak üzere standartlar hazırlandı.

2.5.3. Çalışma Prensibi

- 1) Serum numuneleri en az iki kez doku numuneleri ise 100 kez dilüe edildi.
- 2) Standartlar ve numunelerden kuyucuklara 100 µl konuldu.
- 3) Oda sıcaklığına gelen assay reagentten 100 µl bütün kuyucuklara ilave edildi. 5 dakika oda sıcaklığında bekletilip 595 nm de okutuldu.

2.6. Plazma Malondialdehid Seviyelerinin Belirlenmesi

Plazma (MDA) düzeyini belirlemek için Cayman Marka (katalog no: 705002) ticari kit kullanılarak ELISA kalorimetrik yöntemle MDA miktarları belirlendi. Sonuçlar nmol/ml olarak verildi (Draper ve Hadley, 1990).

2.7. Doku Malondialdehid (MDA) Düzeylerinin Belirlenmesi

Doku MDA düzeyi Uchiyama ve Mihara (3) yöntemiyle gerçekleştirildi.

Analizi yapılacak olan doku tatıldıktan sonra parçalara ayrılarak tüplere konuldu ve 4°C’de Misonix’s Microscan ultrasonic doku parçalayıcısında yaklaşık %10’luk 150 mM KCl’de parçalandı. Homojenize doku %8’lik 2 ml HClO₄’ye konularak 3000 devirde 15 dakika santrifüj edildi. 0.5 ml süpernatanta 3ml %1’lik H₃PO₄ ve 1 ml % 0.675’lik TBA asit ilave edilerek 90°’lik su banyosunda 45 dakika inkübasyon yapıldı. Karışımın soğutulmasından sonra, MDA-TBA kompleksi 4 ml n-butanol ile ekstrakte edildi ve n-butanole karşı absorbansı okundu. Konsantrasyon c=108.9A olarak sağlandı. Sonuç mg/g protein olarak tanımlandı (Uchiyama ve Mihara, 1977).

2.8. Eritrosit Glutasyon Analizi

Eritrositin 45µl’si 450µl distile suda sulandırıldı ve %10’luk sulfosalisilik asite ilave edildi. Karışımın 1 saat buzda soğutulmasından sonra, 3000 devirde 3 dakika santrifüj edildi. Sonra süpernatantın 200µl’si alınarak pH’ı 6.8 olan olan fosfat bufferın 8 ml, 1 N NaOH’in 78 ml’si ve Ellman’s solusyonunun 100µl’sine ilave edildi. 5 dakika sonra 412 nm de reagent tüpüne karşı okundu.

Ellman solusyonu 100 mg 5’-5’-dithiobis-2-nitrobenzoic asitin (DTNB; Sigma, katalog no. D-8130) fosfat bufferın pH 7.8, 100 ml’sinde çözündürülmesiyle hazırlandı. GSH standardı 15.34mg/100 ml olarak ve 15.34 mg indirgenmiş glutasyonun (Sigma, katalog no: G-4251) 1 mM sodyum EDTA’nın 100 ml’sinde çözündürülmesiyle hazırlandı (Atroschi ve Sandholm, 1981).

2.9. Doku Glutasyon Analizi

GSH düzeylerini belirlemek için MDA’da tanımlandığı gibi doku 4°C’de 150 mm KCl’de homojenize edilerek 3000 devirde 15 dakika süreyle santrifüj edildi. Örneklerde GSH miktarları Ellman’s metoduyla ölçüldü. 200µl süpernatant için, 8 ml fosfat buffer (pH 6.8), 78 ml 1 N NaOH ve 100µl Ellman’s solusyonu ilave edilerek 5 dakika bekletildikten sonra 412 nm’ye karşı okundu. Aktivite $a = (A_{\text{standard}} / A_{\text{örnek}}) \times C_{\text{standard}}$ olarak hesaplandı. Burada $c_{\text{standard}} = 15.34$ g/100 ml olarak verildi. Doku proteini Biüret metoduyla elde edilerek değerler nmol/gr protein olarak sunuldu (Elmann, 1959).

2.10. Doku Ksantin Oksidaz Analizi

Doku ksantin oksidaz değerlerinin belirlenmesi için deney hayvanlarından alınan testis örnekleri santrifüj edildikten sonra Ksantin oksidaz aktivite assay kiti kullanılarak (Bio Vision, katalog no: K710-100), kalorimetrik olarak spektrometrede belirlendi. Analiz şu şekilde gerçekleştirildi.

1-Standart eğri hazırlanması:

10 mM H₂O₂ oluşturmak üzere sulandırılmış 0.88 M H₂O₂'nin 4 µl'si, 348 µl dH₂O içerisine konuldu. Daha sonra 0.1 mM H₂O₂ standart oluşturmak üzere 10 mM H₂O₂'nin 10µl'si 990 µl dH₂O içerisine ilave edildi.

Kalorimetrik Assay: 0.1 mM H₂O₂'nin 0, 10, 20, 30, 40 ve 50 µl'si pleytlere çift olarak konularak, 0, 1, 2, 3, 4 ve 5 nmol/kutu H₂O₂ standardı oluşturmak üzere her tüp 50 µl hacime tamamlandı.

2. Örnek ve pozitif kontrol hazırlanması: 96 pleytte 50 µl/kutucuk olarak örnek hazırlandı. Örnekler direk olarak numune kutucuğuna konularak dH₂O ile hacim 50 µl/kutucuk olarak hazırlandı. Dokular Assay buffer'ın 4 hacimi ile ekstrakte edilerek, açık XO oluşturmak üzere 16000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Pozitif kontrol için 5 µl pozitif kontrol solüsyonu kutucuğa ilave edildi, dH₂O ile 50 µl /kutucuk denge hacmi oluşturuldu. Örnekteki H₂O₂ background'u oluşturacaktır. Background kontrol oluşturmak önemlidir.

3. Miks Reaksiyon Hazırlanması: Miks assay sayısı ve standart için yeterli olacaktır. Her kutucuk için toplam 50 µl reaksiyon miks hazırlandı.

XO ölçümü için 44 µl Assay Buffer, 2 µl Substrat miks, 2µl enzim miks, 2 µl OxiRed™ Probe, Background kontrol için 46 µl Assay buffer, 2 µl enzim miks, 2 µl OxiRed™ Probe.

4. Reaksiyon miksinin 50 µl'sini H₂O₂ standart, pozitif kontrol, tes örnekleri ve miks kutucuklara ilave edildi.

5. Kalorimetrik olarak 570 nm dalga boyunda örnek pleytleri hızlı bir şekilde A_1 için T_1 'de okundu daha sonra reaksiyon 25°C 'de 10-20 dakika inkübasyon yapıldıktan sonra A_2 için T_2 'de ölçüldü. XO tarafından oluşturulan sinyal A_2-A_1 'dir.

6. Hesaplama: Standart eğriden okunan değerler hesaplandıktan sonra değerler nmol olarak verildi.

2.11. Histopatolojik Değerlendirme

Ayrıca çalışmada testis dokusu histopatolojik olarak değerlendirildi. Hayvanlardan alınan testis dokuları %10'luk tamponlu formaldehi ile tespit edildikten sonra gerekli doku örnekleri alınarak ototeknikon takibi yapıldı. Daha sonra parafine gömülen dokulardan mikrotom yardımı ile $5\mu\text{m}$ kalınlığında kesitler lam üzerine alınarak hemotoksilen eosin (HE) ile boyandı. Boyanan preparatlar Nikon Eclipse E400 ışık mikroskobu ile değerlendirildi ve skorlandı. Skorlama için her bir grupta rastgele seçilen 10 tubulüs değerlendirildi.

Skorlama aşağıdaki şekilde yapıldı (Rosai 2004).

- 10 Spermatogenesis tamamlanmış ve mükemmel tubulus görünümü
- 09 Birkaç spermatozoa bulunmakta ancak spermatogenezde disorganizasyon mevcut
- 08 Sadece birkaç spermatozoa mevcut
- 07 Spermatozoa yok fakat birçok spermatit var
- 06 Birkaç Spermatit mevcut
- 05 Spermatozoa ve spermatit yok ancak birçok spermatosit var
- 04 Sadece birkaç spermatosit var
- 03 Sadece spermatogonia var
- 02 Germ Hücresi yok
- 01 Germ hücresi ve sertoli hücresi yok

Gruplara ait skorlar varyans analizi ile istatistik olarak değerlendirildi.

2.12. İstatistik

İstatistik analiz SPSS istatistik programı kullanılarak gerçekleştirildi. Sonuçlar ortalama±standard sapma olarak tanımlandı. Gruplar arası karşılaştırma için Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı ve $p<0.05$ seviyesi için Mann-Whitney U-testi uygulandı. $P<0.05$ seviyesi istatistik olarak önemli kabul edildi.

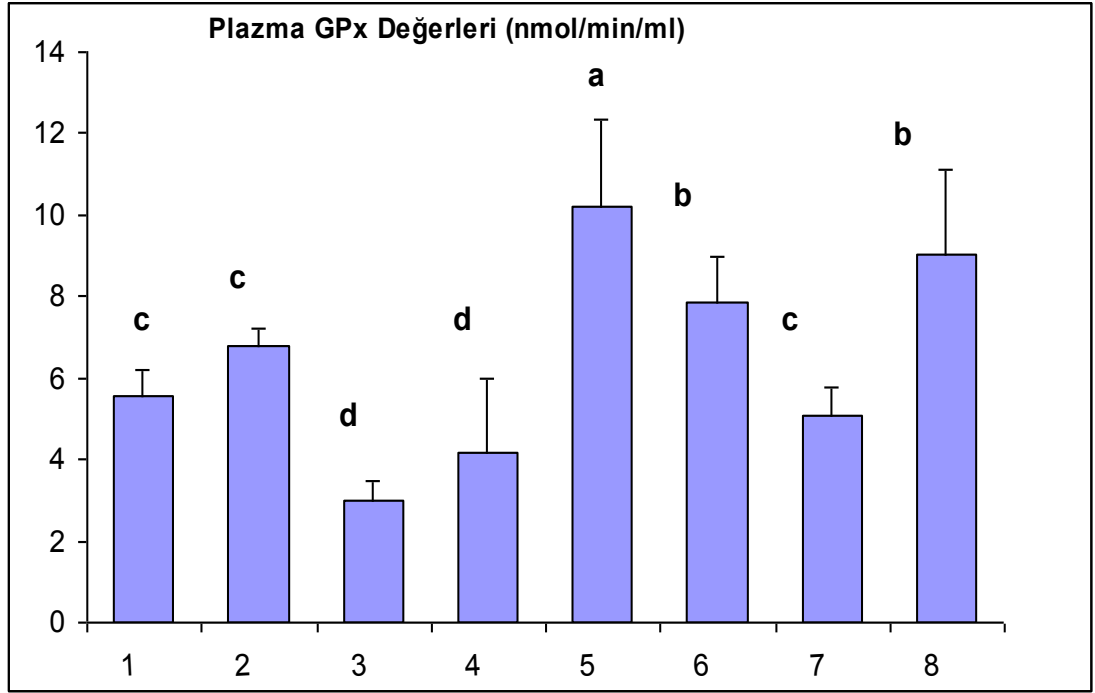
3. BULGULAR

Deney gruplarının plazma ve doku glutatyon seviyeleri çizelge 1’de verilmiştir. Çalışma gruplarının plazma glutatyon peroksidaz değerleri incelendiğinde bu parametrenin grup 5’de (720^o-4 saat torsiyon + DiOHF) grubunda en yüksek seviyede olduğu belirlendi (P<0.001). Torsiyon ve detorsiyon grupları olan 3. ve 4. gruplar ise en düşük plazma GPx değerlerine sahipti (P<0.001). Grup 6 ve 8 diğer gruplardan yüksek iken grup 5’den daha düşüktü (P<0.001). 1, 2 ve 7. gruplar 3 ve 4. gruptan daha yüksek plazma GPx değerlerine sahipti (P<0.001). (Şekil 1).

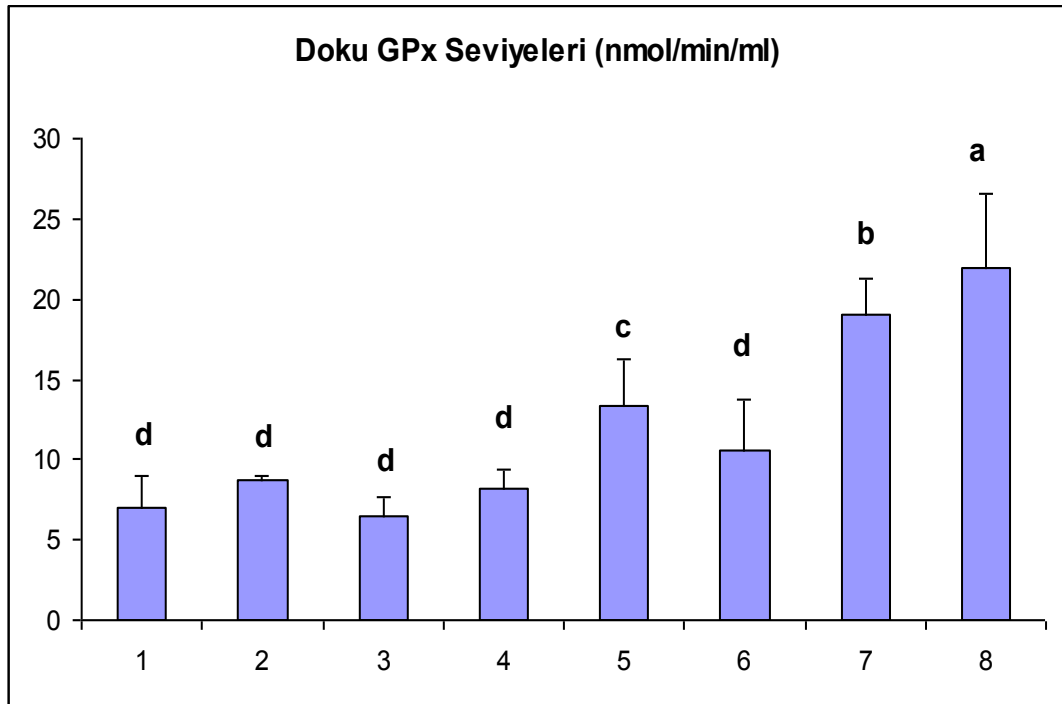
Deney gruplarının testis dokularındaki GPx değerleri incelendiğinde bu parametrenin 5. 7 ve 8. grupta diğer gruplara göre artış gösterdiği ancak 8. grubun en yüksek doku GPx seviyelerine sahip olduğu belirlendi (P<0.001). 7. grupta 5. gruba göre daha yüksek doku GPx değerlerine sahipti (P<0.001). (Şekil 2).

Çizelge 1. Plazma ve Doku GPx- Değerleri

Gruplar	Plazma GPx (nmol/min/ml)	Doku GPx (nmol/min/ml)
1-Kontrol	5.54±0.66	7.07±1.86
2-Sham-Kontrol	6.81±0.43	8.45±0.30
3-720^o-4 Saat torsiyon	2.99±0.50	6.47±1.15
4-720^o-4 Saat torsiyon + 4 saat detorsiyon	4.19±1.80	8.23±1.10
5-720^o-4 Saat torsiyon + DiOHF	10.23±2.12	13.37±2.82
6-720^o-4 Saat torsiyon + DiOHF + 4 saat detorsiyon	7.86±1.13	10.53±3.25
7-720^o-4 Saat torsiyon + 24 saat detorsiyon	5.06±0.72	18.98±2.27
8-720^o-4 Saat torsiyon + DiOHF + 24 saat detorsiyon	9.01±2.08	22.00±4.52



Şekil 1. Plazma GPx Değerleri



Şekil 2. Doku GPx Değerleri

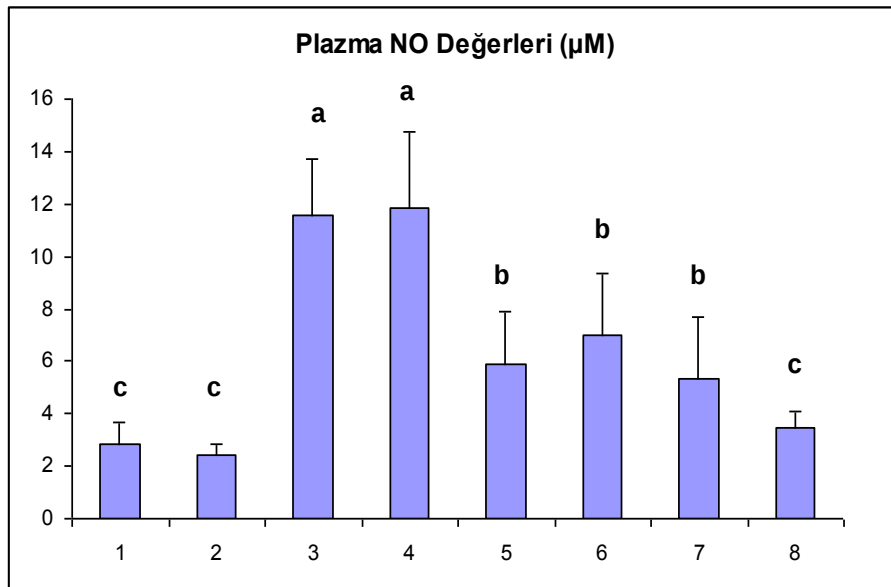
Çalışma gruplarının plazma ve doku NO değerleri çizelge 2’de sunulmuştur. Plazma NO değerlerinin incelenmesinde bu parametrenin 3. ve 4. gruplarda diğer

grupların tamamından daha yüksek olduğu görüldü ($P<0.001$). Grup 1, 2 ve 8'in en düşük NO seviyelerine sahip olduğu belirlendi ($P<0.001$). (Şekil 3).

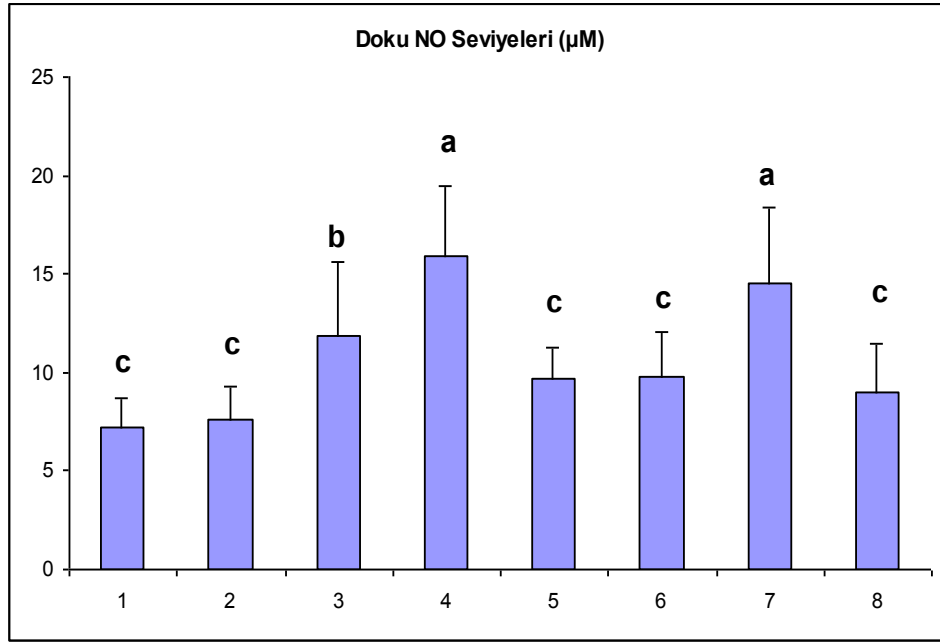
Doku NO miktarlarına bakıldığında grup 3, 4 ve 7 diğer gruplara göre daha yüksek NO değerlerine sahipken, grup 4 ve 7'nin bu değerleri diğer grupların tamamından yüksek olarak tespit edildi ($P<0.001$). (Şekil 4).

Çizelge 2. Plazma ve Doku NO Seviyeleri

Gruplar	Plazma NO (μM)	Doku NO (μM)
1-Kontrol	2.85 $\pm$ 0.79	7.18 $\pm$ 1.50
2-Sham-Kontrol	2.45 $\pm$ 0.38	7.62 $\pm$ 1.66
3-720⁰-4 Saat torsiyon	11.60 $\pm$ 2.09	11.81 $\pm$ 3.76
4-720⁰-4 Saat torsiyon + saat detorsiyon	11.86 $\pm$ 2.92	15.95 $\pm$ 3.52
5-720⁰-4 Saat torsiyon + DiOHF	5.87 $\pm$ 2.01	9.71 $\pm$ 1.52
6-720⁰-4 Saat torsiyon + DiOHF + 4 saat detorsiyon	6.99 $\pm$ 2.38	9.80 $\pm$ 2.21
7-720⁰-4 Saat torsiyon + 24 saat detorsiyon	5.36 $\pm$ 2.36	14.49 $\pm$ 3.89
8-720⁰-4 Saat torsiyon + DiOHF + 24 saat detorsiyon	3.45 $\pm$ 0.65	8.97 $\pm$ 2.46



Şekil 3. Plazma NO Seviyeleri



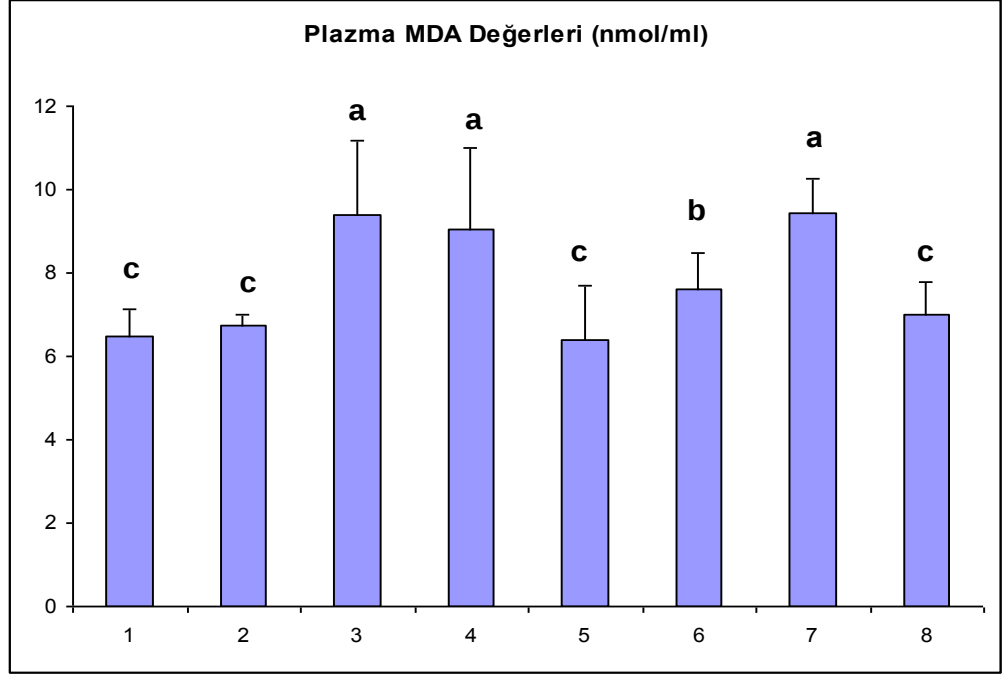
Şekil 4. Doku NO Seviyeleri

Çalışma gruplarının ayrıca plazma ve doku MDA seviyeleri de incelendi. Deney gruplarına ait plazma ve doku MDA seviyeleri çizelge 3’de gösterilmiştir. Bu parametrenin plazmadaki düzeyine bakıldığı zaman en yüksek değerlerin 3. 4. ve 7. gruplarda olduğu görüldü ($P<0.001$). Grup 6’da bu parametre 3, 4 ve 7. gruplardan daha düşük olmasına rağmen diğer grupların tamamından daha yüksek olarak belirlendi ($P<0.001$). (Şekil 5).

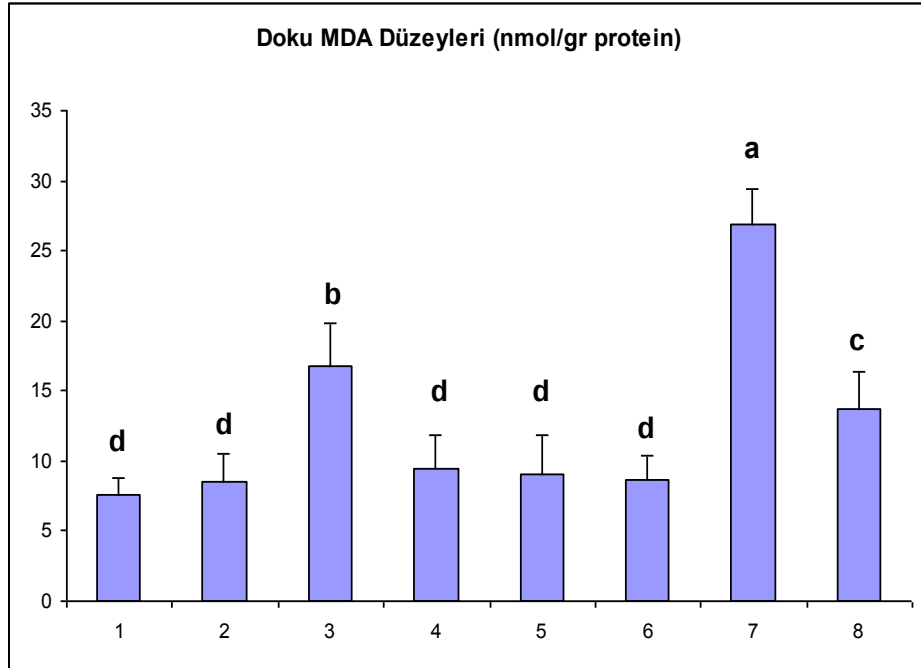
Çizelge 3. Plazma ve Doku MDA Miktarları

Gruplar	Plazma MDA (nmol/ml)	Doku MDA (nmol/gr protein)
1-Kontrol	6.49±0.66	7.56±1.18
2-Sham-Kontrol	6.74±0.27	8.56±1.90
3-720°-4 Saat torsiyon	9.37±1.82	16.83±3.00
4-720°-4 Saat torsiyon + 4 saat detorsiyon	9.03±1.95	9.50±2.40
5-720°-4 Saat torsiyon + DiOHF	6.40±1.29	9.06±2.75
6-720°-4 Saat torsiyon + DiOHF + 4 saat detorsiyon	7.61±0.86	8.71±1.62
7-720°-4 Saat torsiyon + 24 saat detorsiyon	9.42±0.83	26.82±2.62
8-720°-4 Saat torsiyon + DiOHF + 24 saat detorsiyon	6.99±0.81	13.74±2.67

Testis dokusundaki MDA seviyelerinin 3, 7 ve 8. gruplarda diğer gruplara göre daha yüksek olduğu tespit edildi ($P<0.001$). 8. grup 6. gruptan daha düşük olmasına rağmen bu farklılık istatistik düzeyde değildi. (Şekil 6).



Şekil 5. Plazma MDA Değerleri



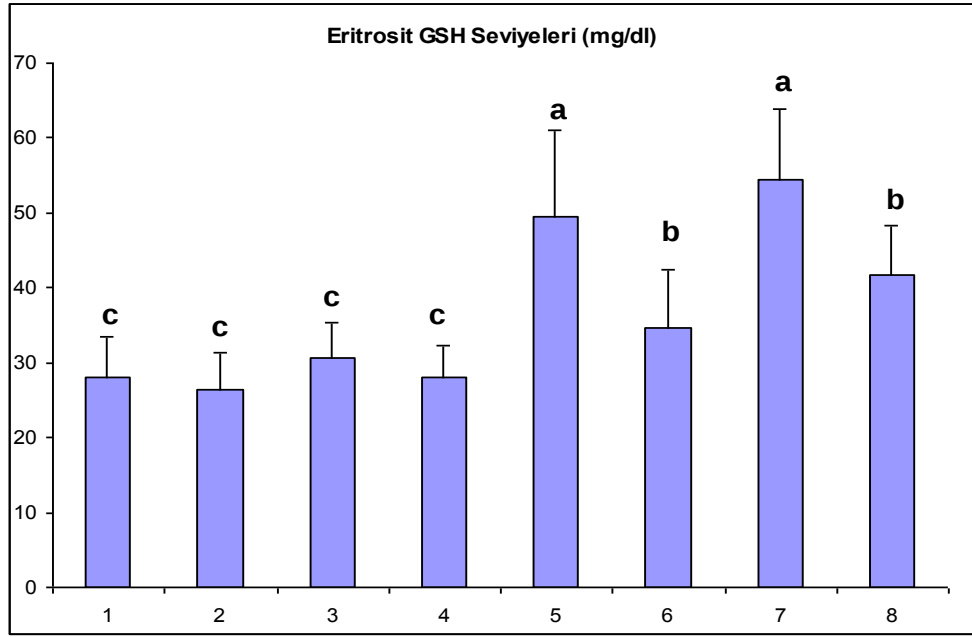
Şekil 6. Doku MDA Değerleri

Ayrıca kan ve ilgili dokuda antioksidan savunmanın bir parçası olarak GSH seviyeleri de incelenmiştir. Bu parametrenin eritrosit ve dokudaki miktarları incelenmiştir (Çizelge 4). Eritrosit GSH düzeylerine bakıldığında bu parametrenin grup 5 ve 7’de diğer grupların tamamından daha yüksek olduğu görüldü ($P<0.01$). Benzer şekilde 6 ve 8. gruplarda diğer grupların tamamından daha yüksek eritrosit GSH düzeylerine sahipti ($P<0.01$). (Şekil 7).

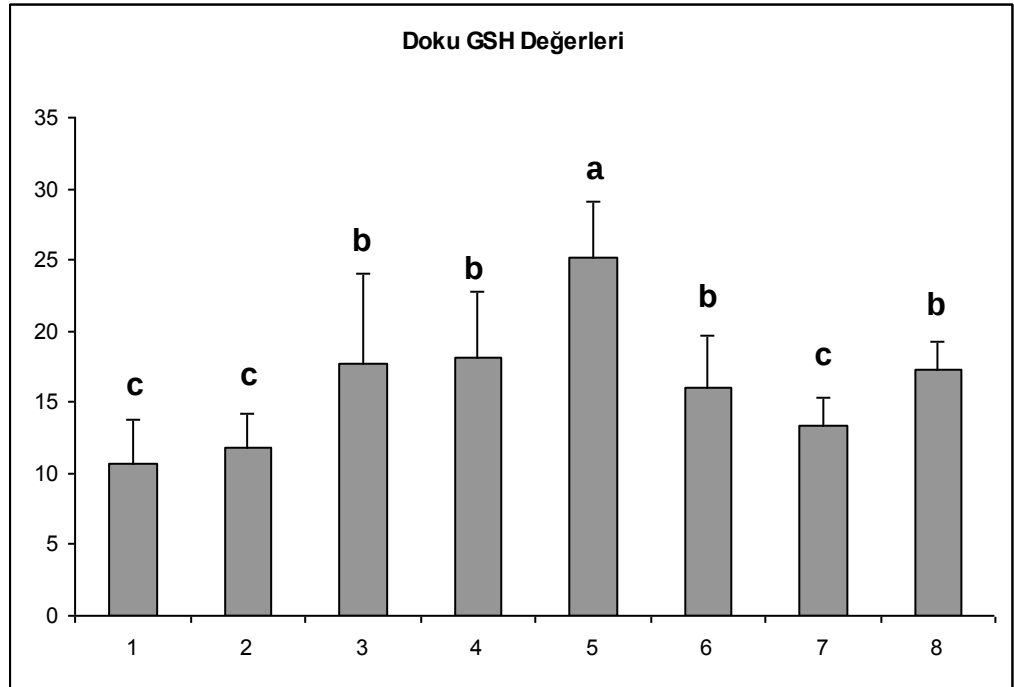
Çizelge 4. Eritrosit ve Doku GSH Düzeyleri

Gruplar	Eritrosit GSH (mg/dl)	Doku GSH (mg/gr protein)
1-Kontrol	27.97±5.45	10.72±3.02
2-Sham-Kontrol	26.47±4.93	11.87±2.35
3-720⁰-4 Saat torsiyon	30.66±4.77	17.71±6.32
4-720⁰-4 Saat torsiyon + 4 saat detorsiyon	27.93±4.30	18.11±4.62
5-720⁰-4 Saat torsiyon + DiOHF	49.54±11.62	25.19±3.94
6-720⁰-4 Saat torsiyon + DiOHF + 4 saat detorsiyon	34.57±7.79	16.07±3.55
7-720⁰-4 Saat torsiyon + 24 saat detorsiyon	54.44±9.50	13.32±2.02
8-720⁰-4 Saat torsiyon + DiOHF + 24 saat detorsiyon	41.69±6.61	17.31±2.00

Doku GSH miktarları incelendiğinde 5.grubun en yüksek doku GSH seviyelerine sahip olduğu belirlenmiştir ($P<0.001$). Grup 3, 4 ve 8 diğer gruplardan yüksek iken 5. gruptan daha düşüktü ($P<0.001$). (Şekil 8).



Şekil 7. Eritrosit GSH Değerleri

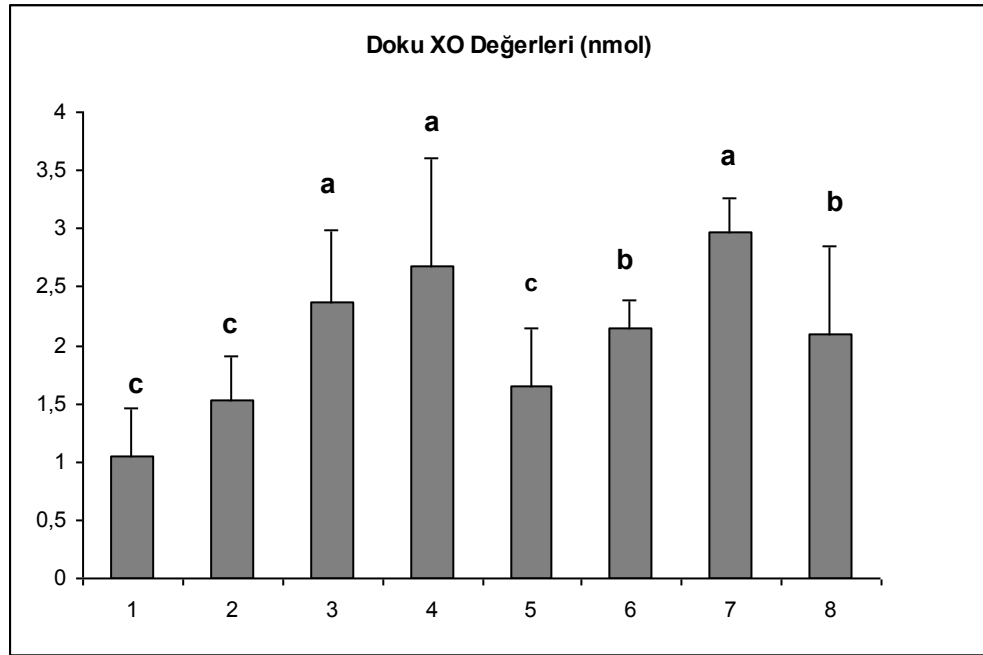


Şekil 8. Doku GSH Değerleri

Testis dokusuna ait ksantin oksidaz (XO) değerleri çizelge 5’de verilmiştir. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında en yüksek doku XO seviyeleri 3, 4 ve 7. grupta belirlenmiştir ($P<0.001$). Grup 6 ve 8’in değerleri de grup 1, 2 ve 5’den daha yüksek olarak tespit edilmiştir ($P<0.001$). (Şekil 9).

Çizelge 5. Doku Ksantiz Oksidaz Düzeyleri

Gruplar	Doku GSH (nmol)
1-Kontrol	1.05±0.41
2-Sham-Kontrol	1.53±0.38
3-720°-4 Saat torsiyon	1.37±0.62
4-720°-4 Saat torsiyon + 4 saat detorsiyon	2.67±0.94
5-720°-4 Saat torsiyon + DiOHF	1.64±0.51
6-720°-4 Saat torsiyon + DiOHF + 4 saat detorsiyon	2.14±0.24
7-720°-4 Saat torsiyon + 24 saat detorsiyon	2.97±0.30
8-720°-4 Saat torsiyon + DiOHF + 24 saat detorsiyon	2.09±0.76



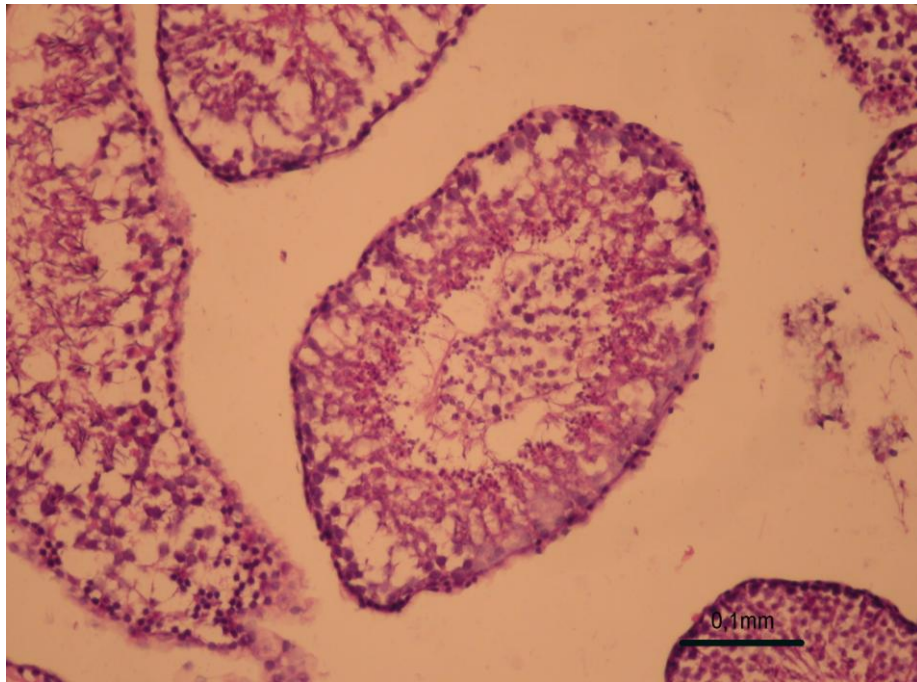
Şekil 9. Doku XO Değerleri

Testis dokusunda gruplara ait skor değerleri çizelge 6'da verilmiştir. Buna göre gruplar arası karşılaştırma yapıldığında kontrol ve sham grubunun en yüksek skor değerine sahip olduğu belirlendi ($P<0.001$).

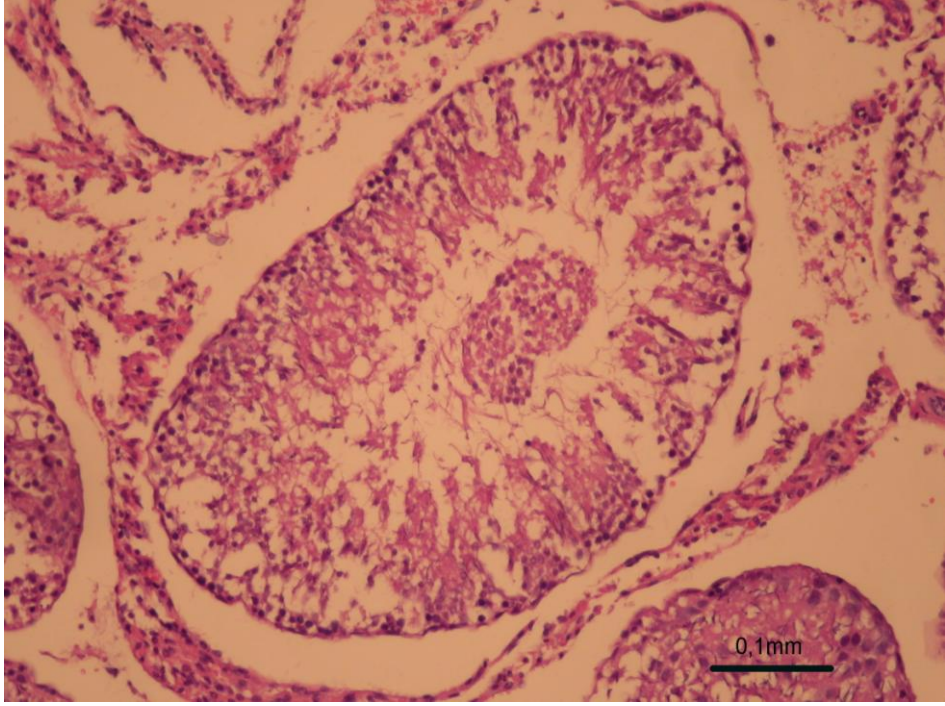
Çizelge 6: Testis Dokusu Skor Değerleri

Gruplar	Ortalama Skorlar
1-Kontrol	9.76±0.15 a
2-Sham-Kontrol	9.75±0.07 a
3-720°-4 Saat torsiyon	7.43±0.25 b
4-720°-4 Saat torsiyon + 4 saat detorsiyon	6.25±0.34 c
5-720°-4 Saat torsiyon + DiOHF	6.45±0.19 c
6-720°-4 Saat torsiyon + DiOHF + 4 saat detorsiyon	4.60±0.08 d
7-720°-4 Saat torsiyon + 24 saat detorsiyon	4.26±0.05 d
8-720°-4 Saat torsiyon + DiOHF + 24 saat detorsiyon	4.30±0.10 d

* P<0.001 (a>b>c>d)

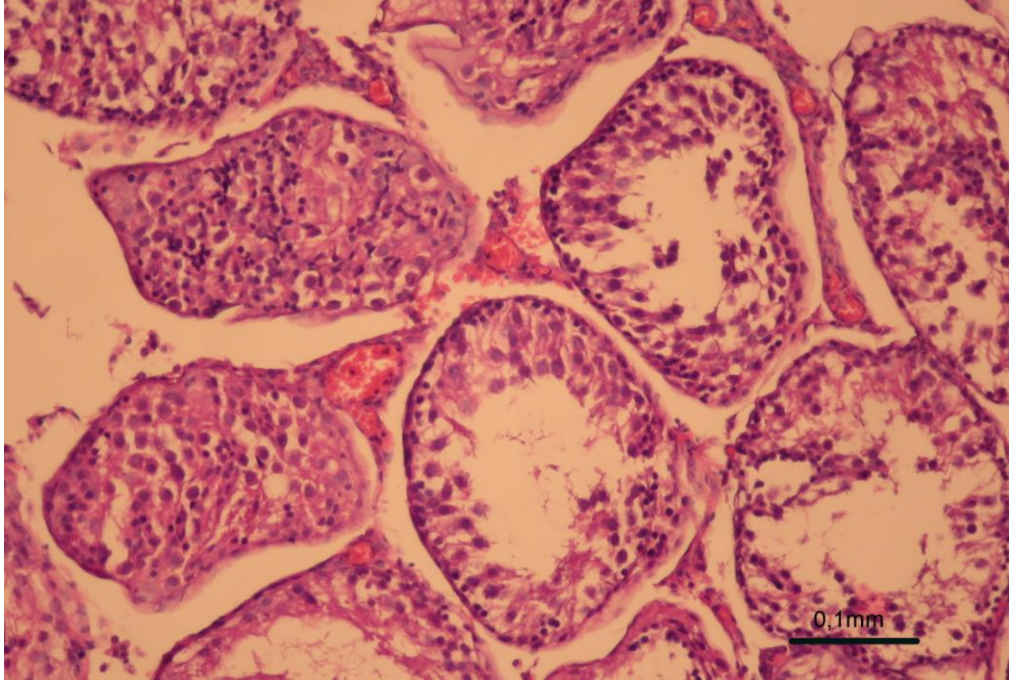


Resim 1. Kontrol Grubu

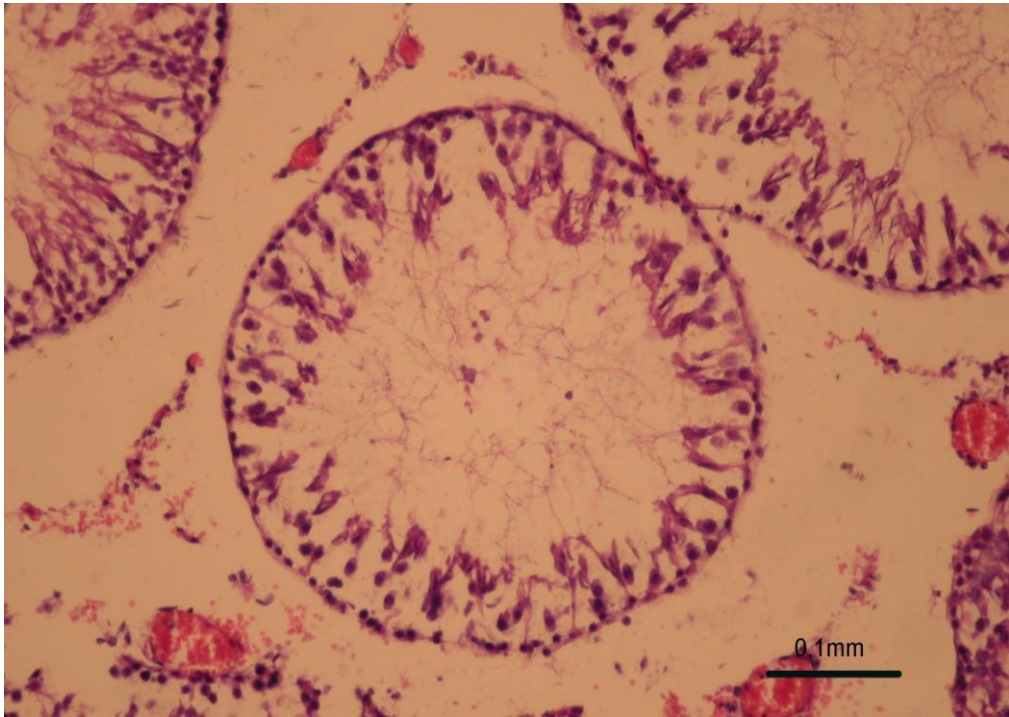


Resim 2. Sham-Grubu

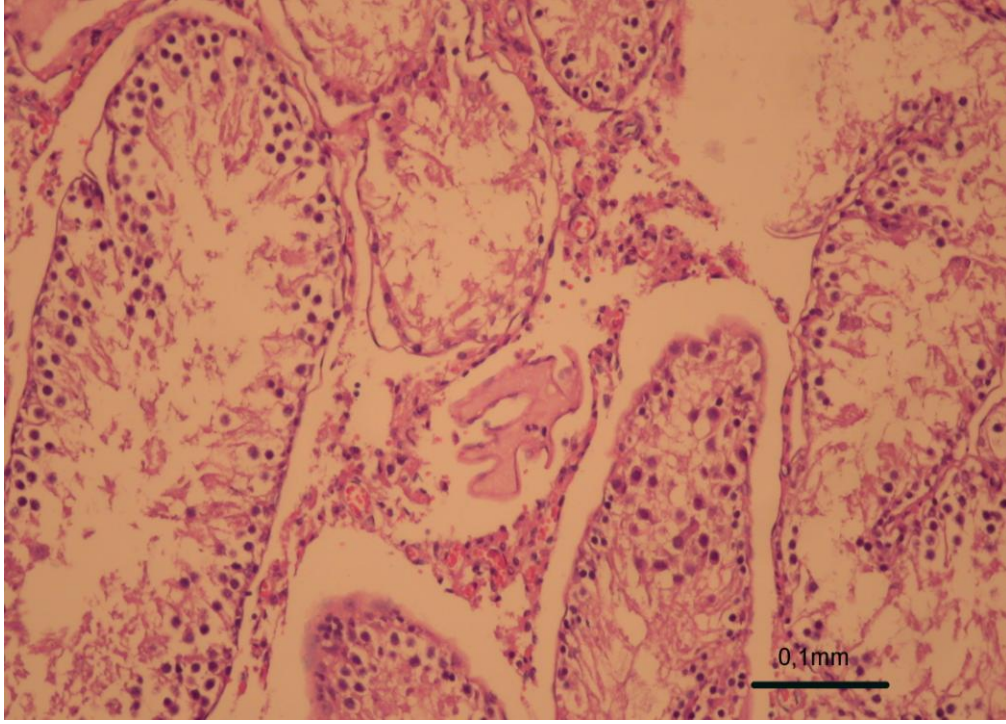
Torsiyon ve detorsiyon yapılan ve DiOHF uygulaması yapılan deney gruplarında bu skor değerleri kontrol ve sham-kontrol gruplarından daha düşük seviyede bulundu ($P<0.001$). Detorsiyon + DiOHF uygulaması yapılan gruplar (grup 6 ve 8), ilaç uygulaması yapılmayan detorsiyon gruplarından (grup 4 ve 6) ortalama olarak daha yüksek skorlara sahip olmalarına rağmen istatistik farklılık yoktu.



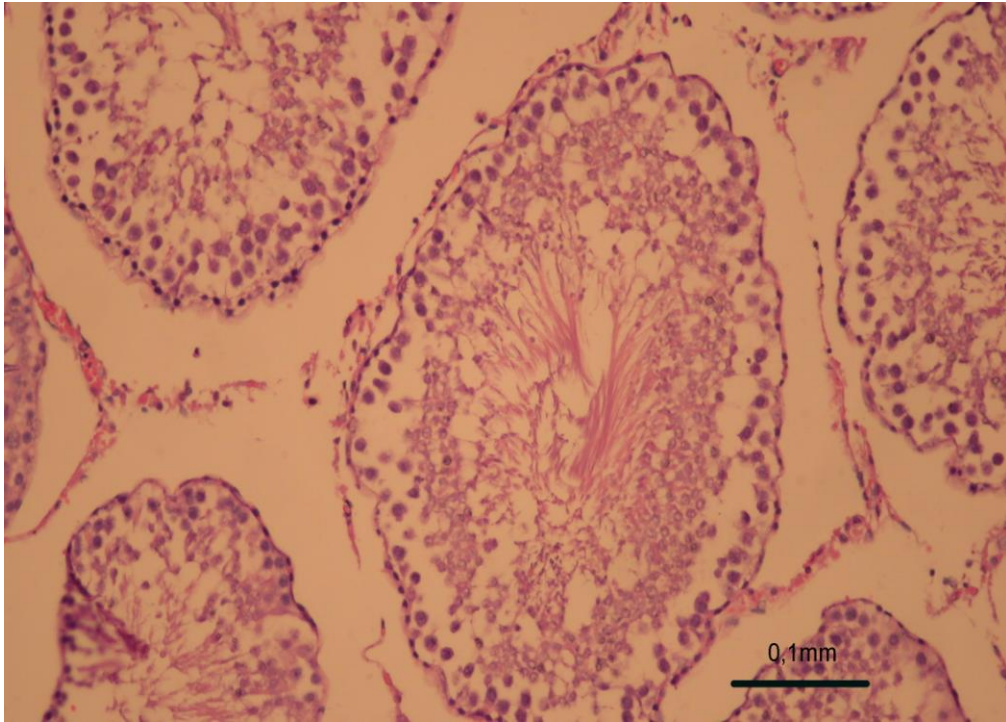
Resim 3. 720°-4 Saat Torsiyon Grubu



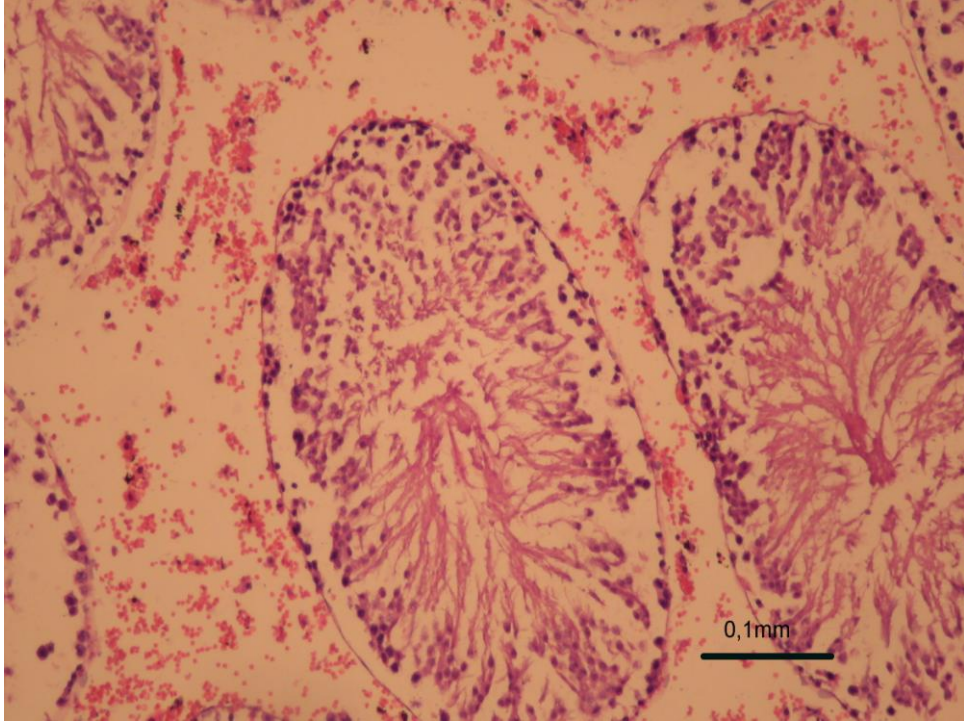
Resim 4. Grup 4 (720°-4 Saat Torsiyon+4 saat detorsiyon)



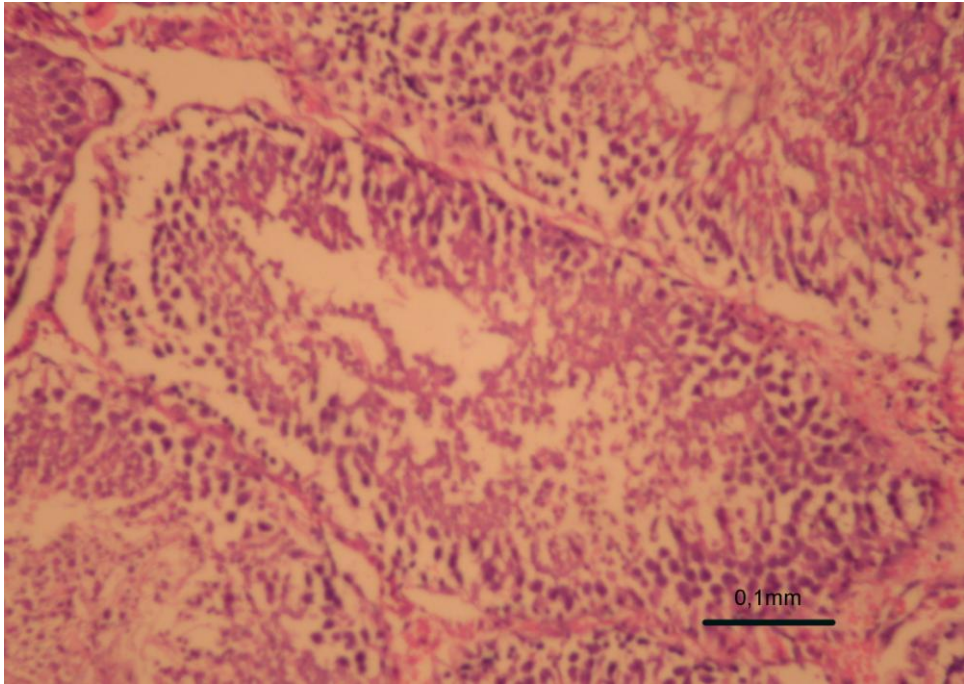
Resim 5. Grup 5 (720°-4 Saat Torsiyon + DiOHF)



Resim 6. Grup 6 (720°-4 Saat Torsiyon+DiOHF+ 4 saat detorsiyon)



Resim 7. Grup 7 (720⁰-4 Saat Torsiyon+ 24 saat detorsiyon)



Resim 8. Grup 8 (720⁰-4 Saat Torsiyon+ DiOHF+ 24 saat detorsiyon)

4. TARTIŞMA

Yapılan çalışmada erkek sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarında meydana gelen lipid peroksidasyondaki değişikliklerin gerçek anlamda olduğu görülmektedir. Özellikle iskemi-reperfüzyon hasarının bir göstergesi olarak dikkate alınabilen MDA seviyelerinde meydana gelen değişiklikler gerçekleşmesi çalışmanın başlangıcında hedeflenen testis dokusundaki torsiyonun olduğu ve buna bağlı olarak gerek doku ve gerekse plazma düzeyinde oksidatif hasar ve antioksidan savunma mekanizmalarında bir takım değişmelerin meydana geldiği görülmektedir.

İskemi ve reperfüzyon azalmış vazodilatör kaynaklara bağlı olarak iskeminin olduğu bölgede damar ve organlarda hasara neden olur (Hearse ve ark 1993, Sobey ve Woodman 1993). Damarların gevşetimi etkilerindeki azalma lökositlerin damarlara yapışmasından ve bunu takiben en küçük bölgelerdeki dolaşımı sağlayan kapillerlerdeki tıkanmadan oluşur ve bu kavram; akımın olmadığı fenomen olarak tanımlanır (Reffellmann ve Kloner 2006). Reperfüzyon sırasında serbest oksijen radikallerinin hızlı bir şekilde ortaya çıkmasıyla lökositlerdeki aktivasyon ve yapışma artar. Sonuçta reperfüzyona uğrayan doku azalmış kanlanma ve hipoksiden ciddi bir şekilde etkilenmiş olur. İskemi-reperfüzyon yaralanması bir seri toksik olayların uyarımıyla şekillenerek sonuçta lipidler, protein ve DNA'da hasar oluşturan oldukça reaktif moleküllerin üretimini güçlü bir şekilde uyarır (ArunaDevi ve ark 2010).

Yaptığımız araştırmada öncelikli olarak deney gruplarında hayvanlarda unilateral (tek taraflı) olarak testislerinde iskemi oluşturmayı amaçladık. Bunu sağlamak için de genel anestezi altına alınan hayvanların sağ testisleri saat yönünde 720° döndürüldükten sonra testislerin skrotum dokusuna tespiti yapılarak 4 saat süreyle iskemik olarak kalması sağlandı. Bunu takiben de aynı iskemi süresiyle birlikte sentetik bir flavonoid olan ve değişik iskemi reperfüzyon çalışmalarında güçlü bir doku koruyucu etkisi olduğu belirlenmiş olan 3,4 dihidroksiflavonoidin (Challa ve ark 2011; Chan ve ark 2003, Woodman ve Chan 2004) torsiyon ve farklı reperfüzyon sürelerine bağlı olarak testis dokusunda oluşan lipid peroksidasyondaki etkisini belirledik.

GPx eritrositlerde strese karşı en etkili oksidanlardan olup fagositik hücelere önemli görevler yapar (Lunec ve Blake 1990). Çalışmamızda ilk olarak belirlenen parametre plazma ve testis dokusundaki glutatyon peroksidaz (GPx) seviyeleri idi.

İskemi ve reperfüzyon çalışmalarında GPx düzeylerinin farklı şekillerde etkilendiği görülmektedir. Xu ve ark (2011) ve Sun ve ark (2010) gerçekleştirdiği çalışmalarda fokal serebral iskemiye bağlı olarak iskemiden sonra beyin dokusunda glutatyon peroksidaz aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir. Selvaraj ve ark'nın (2010) deneysel miyokardiyal iskemi çalışmalarında sıçanların kalp dokusunda GPx değerlerinin azaldığını rapor etmişlerdir. Ancak gerçekleştirilen başka bir araştırmada ise mezenterik iskemi reperfüzyon hasarının bağırsak, karaciğer, böbrek ve akciğer gibi dokularda GPx değerlerini artırdığı tespit edilmiştir (Sızlan ve ark 2009). Unilateral testis iskemi-reperfüzyon yaralanmasıyla ilgili gerçekleştirilen bir araştırma I/R ile glutatyon peroksidaz düzeylerinin arttığı belirlenmiştir (Hekimoğlu ve ark 2010). Guan ve ark'nın (2009) yaptığı çalışmada bizim araştırmamıza benzer şekilde sıçanların sağ testisleri 720° ve 2 saat torsiyon ve 4 saat detorsiyona maruz bırakılmış ve bu süre sonunda dokudaki GPx seviyelerinin azaldığı belirlenmiştir. Benzer bulgular Pekcetin ve ark (2007) ile Unal ve ark (2007) tarafından da rapor edilmiştir. Bizim gerçekleştirdiğimiz çalışmada ise 4 saat süreli testis iskemisi sonucu plazma ve dokudaki GPx seviyelerinin, plazmada daha belirgin olmak üzere kontrol grubundan daha düşük seviyede olduğu belirlendi. Bu azalmanın 4 saatlik torsiyonu takiben aynı süreli detorsiyon sonunda da meydana geldiği görülmektedir (grup 4). Ancak testis dokularında gerek torsiyon, gerekse torsiyon +detorsiyonla birlikte dihidroksiflavonoid uygulamasının hem plazma hem de dokudaki glutatyon peroksidaz değerlerini sadece torsiyon yapılan gruplar ve kontrol gruplarına göre önemli düzeyde artırdığı belirlenmiştir (Çizelge 1, Şekil 1, 2). Daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda flavonoidlerin güçlü bir antioksidan ve doku koruyucu etkilere sahip olduğu farklı organlarda belirlenmiştir (Aruna Devi ve ark 2010, Cao ve ark 2011, Wang ve ark 2011). Flavonoidler oldukça güçlü antioksidan etkilerine paralel olarak oksidanların üretimini de önleyebildiği ifade edilmektedir (Akhlaghi ve Bandy 2009). Bunlara ilave olarak anti-inflamatuvar ve antiagregasyon özellikleriyle ilgili enzimler ve sinyal yolunu baskılayarak oksidan üretimini azalttığı ve iskemi bölgesinde kan akımının yeniden daha iyi bir şekilde kurulmasını sağladığı belirtilmiştir (Akhlaghi ve Bandy 2009). Yaptığımız araştırma da ise gerçekleştirilen çalışmalardan farklı olarak testis dokusundaki iskemi-reperfüzyon hasarında sentetik

flavonoid olan DiOHF kullanılmıştır. DiOHF kullanımı hem iskemi hem de reperfüzyonda kan ve dokuda ki GPx seviyelerini önemli şekilde artırmış olup farklı araştırma gruplarının değişik organlarda flavonoid kullanımıyla elde ettiği bulgulara paralellik göstermektedir. Dolayısıyla testis dokusunda DiOHF kullanımıyla elde edilen bulgularımız diğer araştırmacıların bulgularıyla desteklenmektedir.

Deneysel çalışmamızın bir diğer bölümünde testis dokusundaki iskemi-reperfüzyon ve iskemi-reperfüzyon + DiOHF kullanımının plazma ve testis dokusundaki nitrik oksit düzeylerini ne şekilde etkilediğini inceledik. Bu parametrenin 4 saatlik iskemi sonucu hem plazma hemde iskemi yapılan dokuda kontrol grubuna göre önemli şekilde arttığını belirledik. Ancak 4 saatlik torsiyonu takiben 24 saat detorsiyon yapılan grupta (grup 7) doku NO değerleri plazma NO değerlerine göre çok daha yüksek olarak belirlendi. Gerek iskemik ve gerekse iskemi takiben reperfüzyon gerçekleştirilen gruplarda 30 mg/kg dozunda peritonisi DiOHF uygulaması iskemi ve reperfüzyona bağlı olarak ortaya çıkan artmış NO değerlerini önemli şekilde azaltmıştır.

Nitrik oksidin serbest oksijen radikalleriyle etkileşimi ve antioksidan özellikleri ile ilgili araştırmalardan elde edilen sonuçlar çelişkilidir. Süperoksidi bağladığı için NO'nun serbest radikalleri temizleyen koruyucu bir faktör olduğu düşünülmektedir. Reperfüzyonun başlangıcında serbest bırakılan yoğun reaktif oksijen türlerinin hücre yaralanması ve doku ölümüne neden olduğu belirtilmiştir (Wang ve ark 2011). Ancak reperfüzyon sırasında salınan NO'nun önkoşullanma mekanizmalarında koruyucu etkiye sahip olduğu da öne sürülmektedir (Wang ve ark 2011). Bununla birlikte değişik I/R hasarında nitrik oksitin değişik şekilde farklı etkilere sahip olduğu ortaya konulmuştur (Minutoli ve ark 2011). Aksine süperoksit ile NO reaksiyonunun ürünü olan peroksinitrit (ONOO-) ise güçlü ve yarılanma ömrü uzun bir oksidandır olarak kabul edilmektedir (Kalff ve ark 1999). Bu reaktif nitrojen bileşikler lipidler, DNA, tioller, amino asitler ve metallerle reaksiyona girerek enzim fonksiyonlarını bozar, membran bütünlüğüne zarar verir ve DNA mutasyonuna neden olabildiği de rapor edilmiştir (Eiserich ve ark 1998). Testis iskemi-reperfüzyonu sırasında NO seviyesindeki değişimlerle ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Koltuksuz ve ark 2000, Ozokutan ve ark 2000, Shiraishi ve ark 2001). Yıldız ve ark 2011) tarafından gerçekleştirilen çalışmada bizim çalışmamıza benzer şekilde sağ testis 720^o saat yönünde 2 saat torsiyon ve 2 saatte detorsiyon

yapılarak hayvanlar öldürülmüştür. Torsiyon yapılan testiste doku NO değerlerinin önemli şekilde artış gösterdiğini tespit etmişlerdir. Sıçanlarda gerçekleştirilen başka bir araştırmada testis iskemi-reperfüzyonu sırasında lazer Doppler ve nitrik oksite özel elektrot ile kan akımı ve NO salınımı incelenmiş ve testis arterinin klemplenmesiyle kan akımının önemli şekilde azaldığı ve kan akımının kesilmesiyle önemli şekilde artan NO değerlerinin klempin kaldırılmasıyla normal değerlerine döndüğü belirlenmiştir (Kono ve ark 2006, Tamamra ve ark 2010). Ozokutan ve ark (2000) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ratlarda NO sentezinin baskılanmasıyla testis I/R yaralanmasında hasarın önemli şekilde azalırken, L-arjinin tarafından NO üretiminin artırılmasının I/R'ye bağlı doku hasarını önemli şekilde artırdığı belirlenmiştir. Bizim gerçekleştirdiğimiz çalışmada torsiyon ve detorsiyonun her ikisinde de plazma ve doku NO düzeylerinde önemli artışlar belirledik. Üstelik detorsiyon sonrası nitrik oksit değerleri torsiyon değerlerinden daha fazla oranda belirlendi. Çalışmada elde ettiğimiz torsiyon ve detorsiyona bağlı olarak NO düzeylerinde meydana gelen artış, yukarıdaki çalışmalarda bahsedilen iskemiye bağlı NO artışını tespit eden araştırmalarla paralellik göstermektedir. Ancak dokudaki NO miktarlarının plazma seviyesinden daha fazla oranda artmış olarak bulunmasının lokal olarak dokuda oluşturulan iskemi ve bunu takibende detorsiyonla yeniden kanlamaya izin verilmesi neticesinde artan NO salgısının bir sonucu olarak ortaya çıktığı düşünülebilir. Çalışmamızda torsiyon ve detorsiyonla birlikte güçlü bir antioksidan olduğu daha önceki çalışmalarda özellikle kalp ve beyin iskemisi çalışmalarında ortaya konulan DiOHF kullanıldı. Gerek torsiyon ve gerekse detorsiyonla birlikte kullanılan DiOHF hem plazma hem de dokuda artış gösteren nitrik oksit değerlerini önemli şekilde azalttığı belirlenmiştir. Bu bulgular ışığında DiOHF'nin artan NO değerlerini azaltmak suretiyle antioksidan etki gösterdiği kabul edilebilir. Bu sonuç değişik dokuda DiOHF'nin farklı sonuçlar ortaya çıkarmasından kaynaklanmış olabilir. Nitekim genellikle kalp iskemi-reperfüzyon çalışmalarında DiOHF kullanımının NO bioyararlanımını artırarak doku da koruyucu etki gösterdiği ifade edilmiştir (Chan ve ark 2003).

Araştırmamıza çalışılan parametrelerden bir diğeri ise MDA'dır. MDA lipid peroksidasyonun güvenilir bir göstergesi olarak dikkate alınır. Nitekim daha önce gerçekleştirilen benzer bir testis iskemi-reperfüzyon çalışmasında da oksidan hasarın göstergesi olarak MDA değerleri belirlenmiştir (Ozturk ve ark 2003). Farklı

dokulardaki iskemi-reperfüzyon çalışmalarında oksidatif hasarın göstergesi olarak kan ve dokudaki MDA düzeyleri çalışılmış olup bu dokulardan bir tanesi de testis dokusudur (Zhang ve ark 2011). Azizollazi ve ark nın (2011) gerçekleştirdiği bir araştırmada testis iskemi-reperfüzyonunda serum MDA seviyelerinin arttığını rapor etmişlerdir. Benzer şekilde başka bir araştırma grubu tarafından yapılan çalışmada da iskemik testiste MDA seviyelerinin kontrol grubundan önemli şekilde yüksek olduğu belirlenmiştir (Tsounapi ve ark 2011). Hanci ve ark (2010) tarafından gerçekleştirilen bir araştırmada ratlarda testis dokusu 720° ve bir saat torsiyon ve bunu takibende 4 saat süreyle detorsiyona maruz bırakılmıştır. Bu araştırmacılar I/R sırasında MDA düzeylerinde önemli artış olduğunu belirlemişlerdir. Yine benzer şekilde gerçekleştirilen diğer araştırmalarda da I/R sonucu doku MDA miktarlarının arttığı tespit edilmiştir (Erol ve ark 2009, Yildiz ve ark 2011). Yaptığımız çalışmada deney hayvanlarında testislerin 720° 4 saat süreyle torsiyona maruz bırakılması gerek plazma ve gerekse doku MDA değerlerini artmıştır (grup 3). Gerçekleştirdiğimiz çalışmada iskemi ve reperfüzyon sırasında artış gösteren malondialdehid değerleri bu parametrenin I/R sırasında arttığını rapor eden yukarıda ki çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda I/R sırasında plazma ve doku MDA değerlerinin artış göstermiş olması araştırmada amaç edindiğimiz testiste iskemi ve reperfüzyonun tam anlamıyla gerçekleştiğini göstermektedir. Bununla birlikte aynı grupta torsiyonu takiben 4 saat detorsiyon yapılması yine plazma ve doku MDA seviyelerinin yüksek oranda bulunması sadece iskemi değil aynı zamanda reperfüzyon sırasında da dokuda önemli oksidan hasarın oluştuğunun göstergesidir. Ancak aynı süreli torsiyon ve detorsiyonla birlikte DiOHF uygulaması yapılan gruplarda (grup 5, 6) artan plazma ve doku MDA değerlerinin önemli şekilde azalarak kontrol grubu değerlerine yakın olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızın bir diğer grubun da ise hayvanlarda 4 saat süreli torsiyon ve bunu takiben 24 saat süreli detorsiyon uygulaması (grup 7) ve ilave olarak detorsiyon öncesi (torsiyondan hemen sonra) 30 mg/kg dozunda periton içi olarak tek doz DiOHF takviyesi yapılmıştır. Özellikle torsiyonu takiben uzun süreli detorsiyon sonucu (24 saat) doku MDA değerleri kontrol gruplarının yaklaşık üç buçuk katı oranında çok önemli oranda artış göstermiştir. Ancak bu grupta torsiyondan hemen sonra detorsiyon öncesi DiOHF takviyesi yapılması artan MDA seviyelerini önemli şekilde azaltmıştır. Daha önce

testis iskemi reperfüzyon çalışmalarında quersetin ve baicain gibi değişik flavonoidler kullanılmış olup bu ilaçların I/R hasarında faydalı olabileceği rapor edilmiştir (Aktoz ve ark 2010, Kim ve ark 2010). Ancak mevcut literatürden bildiğimiz kadarıyla sentetik flavonoid olan ve daha önce özellikle kalp iskemi reperfüzyon hasarında koruyucu etkisi araştırılan DiOHF'nin testis iskemi-reperfüzyon hasarında etkisi araştırılmamıştır. Çalışmamızda MDA parametresiyle ilgili elde edilen sonuçlar bu parametrenin I/R sırasında ve sonrasında artış gösterdiği ancak I/R'ye ilave olarak sentetik flavonoid olan DiOHF kullanımının artan MDA seviyelerini azaltmak suretiyle sıçanlarda I/R sırasında artan doku hasarını önemli oranda azaltabileceğini göstermektedir.

Araştırmada antioksidan sistemin göstergelerinden birisi olarak eritrosit ve doku glutatyon düzeyleri de değerlendirilmiştir. Glutatyon hücreleri oksidan hasara karşı koruyan hücre içindeki en önemli antioksidan bileşiklerden birisidir (Ross, 1988). Organizmada antioksidan savunmanın önemli elemanlarından birisi olarak kabul edilir. Ancak organizmada antioksidan göstergelerinden birisi olarak dikkate alınan parametrelerden olan glutatyonun antioksidan savunma sırasında farklı şekilde etkilendiği görülmektedir. Testis-iskemi reperfüzyon çalışmalarında da doku antioksidan aktivitelerinin göstergelerinden birisi olarak GSH düzeyleri belirlenmiştir (Yildiz ve ark 2011). Nitekim Guimarae ve ark'nın (2010) gerçekleştirdiği çalışmada 2 saatlik iskemi ve bunu takiben 3 saatlik reperfüzyon süresi sonunda testis dokusunda glutatyon seviyelerinin azaldığı belirlenmiştir. Ancak Unal ve ark (2007) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ratlarda 2 saat süreli torsiyonun doku GSH düzeylerinin arttığı görülmüştür. Hekimoglu ve ark.'nın (2010) yaptığı çalışmada da GSH değerlerinin testis iskemi-reperfüzyonuyla arttığını tespit etmişlerdir. Yaptığımız araştırmada ise deney hayvanlarında 4 saat süreli torsiyon yapılması hem plazma hemde doku GSH seviyelerini kontrol grubuyla kıyaslandığında önemli şekilde artırmış olup bu artış dokuda daha belirgin olarak ortaya çıkmıştır. Genel olarak deney gruplarına bakıldığında antioksidan savunmasının bir parçası olan GSH değerlerinin torsiyon ve detorsiyonlu gruplarda (grup 3 ve 4) özellikle doku düzeyinde artış gösterdiği görülmektedir. Bu parametre aynı zamanda torsiyon ve detorsiyona ilave olarak DiOHF takviyesi yapılan gruplarda da artış göstermiştir. GSH seviyelerinin iskemik gruplarda artış göstermiş olması dokudaki lipid peroksidasyona karşı savunma cevabının artmasından

kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte flavonoid takviyesinin GSH düzeylerinde yükselmeye neden olması plazma ve dokuda lipid peroksidasyona karşı savunma cevabının daha da güçlendirildiğinin bir göstergesi olarak kabul edilebilir.

Mevcut çalışmada diğer bir parametre olarak testis dokusunda XO değerleri incelendi. XO iskemik ve vasküler hastalıkların değişik formlarında önemli bir rol oynar (Portugal-Cohen ve ark 2009; Taibi ve ark 2010). Ayrıca ksantin oksidaz reperfüzyondan sonra kandaki süperoksit anyon radikalleri içinde önemli bir kaynak oluşturmaktadır (Ono ve ark 2009). Araştırmanın XO ile bölümü değerlendirildiğinde bu parametrenin gerek 4 saatlik torsiyon gerekse 4 saat torsiyon + reperfüzyon ve 4 saat torsiyon + 24 saatlik detorsiyon sırasında önemli şekilde artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu bulgular iskemi sırasında XO seviyelerinin arttığını belirleyen çalışmalar ile paralellik göstermektedir (Su ve ark 2003, Hasçalık ve ark 2004). Ancak deney hayvanlarında torsiyonla birlikte DiOHF uygulaması yapılması, torsiyon + detorsiyonla beraber DiOHF takviyesi yapılması hem iskemi hemde iskemi + reperfüzyon sırasında oluşan XO artışını önemli şekilde önlemiştir. XO düzeylerinde kısa süreli reperfüzyonda meydana gelen azalma (grup 6) uzun süreli reperfüzyon sonrası da görülmüştür (grup 8). Daha önce gerçekleştirilen testis iskemi-reperfüzyonu ve lipid peroksidasyon oluşumuyla ilgili çalışmalarda DiOHF kullanımının olmadığı mevcut literatürlerden bilinmektedir. Ancak yapılan bazı çalışmalarda gerek DiOHF ve gerekse flavonoid içeren bazı bitkiler değişik organlardaki iskemi-reperfüzyon çalışmalarında kullanılmıştır (Malakul ve ark 2011). Yapısında flavonoid bulunduran moleküllerin miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarına karşı XO oluşumunu engellemek suretiyle koruyucu etki oluşturduğu belirlenmiştir (Akhlaghi ve ark 2009, Malakul ve ark 2011). Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz testis dokusunda iskemi-reperfüzyon sırasında oluşan XO üretiminin DiOHF uygulamasıyla önlenmiş olması flavonoidlerin değişik dokularda oluşturduğu ksantin oksidazı inhibe etme yeteneğinin testis dokusunda da gerçekleştiğini göstermektedir. Çalışmamızda benzer şekilde tanımlayabileceğimiz bir araştırmada DiOHF kullanımının izole rat aortasında ksantin oksidaz varlığında süperoksit oluşumunu engellemiştir (Woodman ve Chan 2004). Gerçekleştirdiğimiz araştırmada elde ettiğimiz sentetik flavonoid (DiOHF) kullanımıyla ksantin oksidaz oluşumunun baskılanması yukarıda bahsedilen çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Araştırmada ayrıca testis iskemi-reperfüzyonu sırasında DiOHF uygulamasının dokuda oluşturacağı yapısal değişikliklerin belirlenmesi amacıyla alınan örnekler histopatolojik olarak incelendi. Histopatolojik inceleme için Johnsen skorlaması yapıldı. Gruplar arasında değerlendirme yapıldığında en yüksek skor değerleri kontrol ve sham-kontrol grubunda elde edilirken torsiyon ve detorsiyon gruplarının skor değerleri kontrol grubundan daha düşük olduğu tespit edildi. I/R grubunda azalmış spermatik aktivite daha önceki benzer çalışmalarda da rapor edilmiştir (Aktoz ve ark 2010, Minutoli ve ark 2011, Wei ve ark 2011). Çalışmanın bu parametresiyle ilgili önemli bulgu I/R sırasında oluşan spermatik aktivite bozulmasının tek doz DiOHF uygulamasıyla düzelmemiş olmasıdır. Elde edilen bulgular spermatik aktivitenin değerlendirme zamanı, uygulama şekli ve dozundan kaynaklanmış olabilir. Nitekim Sukhotnik ve ark'nın (2009) gerçekleştirdiği çalışmada germ hücre apoptozisinin iskemiden 6 saat ve reperfüzyondan ise 24 saat sonra artış gösterdiği belirlenmiştir. Ancak 72 saatlik süre sonunda artan germ hücre apoptozisi önemli şekilde azalma gösterdiği görülmüştür. Bizim çalışmamızda genel olarak 4 saatlik iskemi ve bazı gruplarda bunu takiben maksimum 24 saatlik reperfüzyon sonunda oluşan spermatik aktiviteyi değerlendirdik. Nitekim mevcut literatür bilgileri incelendiğinde bizim çalışmamızda kullandığımız sentetik flavonoid DiOHF'nin sadece kalp ve beyin dokusundaki iskemi reperfüzyon hasarında dokudaki koruyucu etkisi araştırılmıştır. Ayrıca bahsedilen mevcut preparat genellikle damar içi yolla deney hayvanlarına uygulanmıştır. Yapılan çalışmalarda DiOHF'nin özellikle kalp dokusunda uzun dönem de koruyucu etki oluşturduğu rapor edilmiştir (Wang ve ark 2004, Wang ve ark 2009). Mevcut araştırmada ise sadece kısa süre (maksimum 24 saat) sonunda testis dokusundaki spermatik aktivite değerlendirilmiştir. Elde edilen mevcut bulgularda iskemi ve reperfüzyona uğrayan testis dokusunda spermatik aktivitenin normal değerlere göre farklılık göstermesi dokunun değerlendirme zamanı ve ilacın uygulama şeklinden kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmada öncelikle ratların testis dokusunda iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulması amaçlanmıştır. Araştırmanın bulguları genel olarak değerlendirildiğinde iskemi ve reperfüzyon hasarının tam anlamıyla oluştuğu oksidanların artışı ve antioksidan sistemin baskılanmasından görülmektedir. İskemi-reperfüzyon yaralanması sırasında dokudaki oksidan hasarın göstergesi olarak NO ve MDA düzeylerinin artış gösterdiğini ortaya konulmuştur. Ayrıca lipid peroksidasyona karşı koruyucu aktiviteye sahip olan GSH düzeyleri de hem plazma hemde dokuda antioksidan aktivitede ki artışın bir sonucu olarak yükselme göstermiştir. Bunlara ilave olarak çalışmada kullanılan DiOHF'nun hem oksidanları baskılayarak hemde antioksidanların etkisini artırmak suretiyle deneysel iskemi reperfüzyonda lipid peroksidasyona karşı koruyucu etkiye sahip olduğu görülmektedir. Ancak testis dokusunda spermatik aktivite yönünden DiOHF önemli bir etki göstermemiştir. Daha fazla deney grupları ile farklı süre ve uygulama şekilleriyle birlikte bu ilacın verilmesinin oluşturacağı doku koruyucu etkisinin daha iyi bir şekilde ortaya konulması sağlanabilecektir.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Sıçanlarda Testis İskemi-Reperfüzyon Hasarında 3',4'-Dihydroxyflavonol'un Lipid Peroksidasyona Etkisi

“Aysel DUMAN”

Fizyoloji (Selçuklu Tıp) Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2011

Mevcut çalışmanın amacı sentetik bir flavanoid olan ve daha önceki çalışmalarda kalp ve beyin iskemisinde koruyucu etkilere sahip olduğu belirlenen 3',4'-dihydroxyflavonol'un deneysel testis torsiyon-detorsiyonunda lipid peroksidasyona etkisini belirlemektir.

Mevcut çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Tıp Merkezinden temin edilen 250-260 gr ağırlığında 60 adet erkek Wistar-albino türü erkek sıçan üzerinde gerçekleştirildi. Deney şu şekilde oluşturuldu.

1. Kontrol; 2. Sham; 3. 720°-4 saat torsiyon; 4. 720°-4 saat torsiyon + 4 saat detorsiyon; 5. 720°-4 saat torsiyon+ DiOHF; 6. 720°-4 saat torsiyon + DiOHF + 4 saat detorsiyon; 7. 720°-4 saat torsiyon + 24 saat detorsiyon; 8. 720°-4 saat torsiyon + DiOHF + 24 saat detorsiyon.

Deney gruplarında uygulamaların bitiminde anestezi edilen hayvanlardan kardiyak punksiyon ile kan örnekleri ve testis dokuları gerekli analizler yapılmak üzere alındı. Doku ve kan örnekleri analiz yapılncaya kadar -80°C'de tutuldu.

Çalışma gruplarının plazma glutatyon peroksidaz değerlerinin grup 5'de en yüksek seviyede olduğu belirlendi (P<0.001). Torsiyon ve detorsiyon grupları olan 3. ve 4. gruplar ise en düşük plazma GPx değerlerine sahipti (P<0.001). Deney gruplarının testis dokularındaki GPx değerlerinin 8. grupta diğer gruplardan daha yüksek olduğu belirlendi (P<0.001).

Plazma NO değerlerinin incelenmesinde bu parametrenin 3. ve 4. gruplarda diğer grupların tamamından daha yüksek olduğu görüldü (P<0.001). Doku NO miktarlarına bakıldığında grup 3, 4 ve 7 diğer gruplara göre daha yüksek NO değerlerine sahipti (P<0.001).

Plazma MDA düzeyinin 3. 4. ve 7. gruplarda en yüksek olduğu görüldü (P<0.001). Testis dokusundaki MDA seviyelerinin 3, 7 ve 8. gruplardan yüksek olduğu tespit edildi (P<0.001).

Eritrosit GSH düzeylerinin grup 5 ve 7'de diğer grupların tamamından önemlice yüksekti (P<0.01). Doku GSH miktarları incelendiğinde 5. grubun en yüksek değerlere sahip olduğu belirlenmiştir (P<0.001).

XO değerleri incelendiğinde en yüksek doku XO seviyeleri 3, 4 ve 7. grupta belirlendi (P<0.001). Grup 6 ve 8'in değerleri de grup 1, 2 ve 5'den daha yüksek olarak tespit edilmiştir (P<0.001). (Grafik 9).

Testis dokusunda spermatik aktivite skorlama yapılarak değerlendirilmiştir. Gruplararası karşılaştırma yapıldığında kontrol ve sham grubunun en yüksek skor değerine sahip olduğu belirlendi (P<0.001).

Çalışmanın sonuçları ratlarda testis iskemi perfüzyon hasarı sırasında artan lipid peroksidasyonun periton içi DiOHF uygulamasıyla önlendiğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Testis iskemi reperfüzyonu; 3',4'-Dihydroxyflavonol; rat

7.SUMMARY

The effect of 3',4'-Dihydroxyflavonol on Lipid Peroxidation in Testes Ischemia-Reperfusion Damage in Rat

The aim of present study was to determine the effect of 3',4'-dihydroxyflavonol on lipid peroxidation in experimental testis torsion-detorsion in rats.

This study was performed on the Wistar-albino male rats which weighted as 250-260 gr and in the Experimental Research and Medicine Center of Selcuk University. Experimental groups as follows.

1. Control; 2. Sham; 3. 720°-4h torsion; 4. 720°-4h torsion + 4h detorsion 5. 720°-4h torsion + DiOHF; 6. 720°-4h torsion + DiOHF + 4h detorsion; 7. 720°-4h torsion + 24h detorsion; 8. 720°-4h + DiOHF + 24h detorsion.

Following the all application, animals were anesthetized and blood samples were taken by cardiac puncture and testis tissue samples were taken by orchidectomy and animals were killed by anesthesia. Samples were kept at -80°C until the analysis.

Plasma GPx levels were the highest in the group 5 ($P<0.001$). Groups 3 and 4 have the lowest plasma GPx levels ($P<0.001$). Group 8 testis issue GPx was the highest compared to the other groups ($P<0.001$).

When the observed plasma levels, this parameter were the highest in the groups 3 and 4 ($P<0.001$). Tissue NO levels of groups 3, 4 and 7 were higher then other groups ($P<0.001$).

Plasma MDA levels of groups 3, 4 and 7 were the highest compared to other groups ($P<0.001$). Testis tissue MDA levels of groups 3, 7 and 8 were higher than the other groups ($P<0.001$).

Erythrocyte GSH levels of group 5 and 7 were significantly higher than other groups ($P<0.01$). When the tissue GSH levels evaluated this parameter was the highest in the group 5 ($P<0.001$).

Tissue XO ration of groups 3, 4 and 7 were higher then the other groups ($P<0.001$). Levels in Group 6 and 8 were determined increased compared to groups 1, 2 and 5 ($P<0.001$).

In addition testis tissue spermatic activity was evaluated by scoring. When the compared among the groups, control and sham groups have the highest scor levels ($P<0.001$).

The results of present study show that DiOHF supplementation by intraperitoneal prevents increased lipid peroxidation during testis Ischemia-Reperfusion damage in rat.

Key Words: Testicular-ischemia-reperfusion; 3',4'-Dihydroxyflavonol; rat

8. KAYNAKLAR

1. Akgül FM, Kılınç K, Tanyel FC, Büyükpamukçu N, Hiçsönmez A: Ipsilateral and contralateral testicular biochemical acute changes after unilateral testicular torsion and detorsion. *Urology*. 1994; 44: 413-18.
2. [Akhlaghi M, Bandy B. Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*. 2009; 46\(3\): 309-17.](#)
3. Aktöz T, Kanter M, Aktas C. Protective effects of quercetin on testicular torsion/detorsion-induced ischaemia-reperfusion injury in rats. *Andrologia*. 2010; 42(6):376-83.
4. Anderson JB, Williams RC. Fertility after torsion of spermatic cord. *Br J Urol*. 1990; 65: 225-30.
5. Ardan T, Kovaceva J, Cejková J. Comparative histochemical and immunohistochemical study on xanthine oxidoreductase/xanthine oxidase in mammalian corneal epithelium. *Acta Histochem*. 2004; 106 (1): 69–75.
6. Aruna Devi R, Lata S, Bhadoria BK, Ramteke VD, Kumar S, Sankar P, Kumar D, Tandan SK. Neuroprotective effect of 5,7,3',4',5'-pentahydroxy dihydroflavanol-3-O-(2"-O-galloyl)-beta-D-glucopyranoside, a polyphenolic compound in focal cerebral ischemia in rat. *Eur J Pharmacol*. 2010 ;626(2-3):205-12.
7. Auchampach JA and Gross GJ. Adenosine A1 receptors, KATP channels, and ischemic preconditioning in dogs. *Am J Physiol*. 1993 264: H1327-36 .
8. [Azizollahi S, Babaei H, Derakhshanfar A, Oloumi MM. Effects of co-administration of dopamine and vitamin C on ischaemia-reperfusion injury after experimental testicular torsion-detorsion in rats. *Andrologia*. 2011;43\(2\):100-5.](#)
9. Barada J, Weingarten JLI, Cronie WJ: Testicular salvage and age-related delay in the presentation of testicular torsion. *J Urol*. 1989; 142: 746-48.
10. Barrett J. Peroxide Metabolism in the Liver Fluke, *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol*. 1980; 66: 697.
11. Bilaloğlu GVM. Harmandar. Flavonoidler. Aktif Yayınevi 2002.
12. Bolli R, Daw B, Tang XL, Qiu Y, Ping P, Xuan XT, Jones WK, Takano H, Guo Y, Zhang J. The nitric oxide hypothesis of late preconditioning. *Basic Res Cardiol*. 1998; 93: 325-38.
13. Bolli R, Manchikalapudi S, Tang X.L, Takano H, Qiu Y, Guo Y, Zhang Q, Jadoon AK. The protective effect of late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is mediated by nitric oxide synthase: evidence that nitric oxide acts both as a trigger and as a mediator of the late phase of ischemic preconditioning. *Circ Res*. 1997; 81: 1094-1107.
14. Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. *Methods Enzymol*. 1990; 186: 343-55.
15. [Cao D, Li H, Yi J, Zhang J, Che H, Cao J, Yang L, Zhu C, Jiang W. Antioxidant properties of the mung bean flavonoids on alleviating heat stress. *PLoS One*. 2011; 6\(6\): e21071.](#)
16. [Challa SR, Akula A, Metla S, Gopal PN. Partial role of nitric oxide in infarct size limiting effect of quercetin and rutin against ischemia-reperfusion injury in normal and diabetic rats. *Indian J Exp Biol*. 2011;49\(3\):207-10.](#)
17. Chan EC, Drummond GR, Woodman OL. 3',4'-dihydroxyflavonol enhances nitric oxide bioavailability and improves vascular function after ischemia and reperfusion injury in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2003; 42(6): 727-35.

18. Chen J, Graham S.H, Zhu RL, Simon RP. Stress proteins and tolerance to focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996; 16: 566-77.
19. Cohen MV, Liu GS, Downey JM. Preconditioning causes improved wall motion as well as smaller infarcts after transient coronary occlusion in rabbits. *Circulation.* 1991; 84: 341-49.
20. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology.* 2001;94(6):1133-8.
21. Dana A, Baxter GF, Walker JM, and Yellon DM. Prolonging the delayed phase of myocardial protection: repetitive adenosine A1 receptor activation maintains rabbit myocardium in a preconditioned state. *J Am Coll Cardiol.* 1998; 31: 1142-49.
22. Dawson J, Walters M. Uric acid and xanthine oxidase: future therapeutic targets in the prevention of cardiovascular disease? *Br J Clin Pharmacol.* 2006; 62 (6): 633.
23. Duncker DJ, Verdouw PD. Role of K⁺ATP channels in ischemic preconditioning and cardioprotection. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2000;14: 7-16.
24. Eiserich JP, Patel RP, O'Donnell VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol Aspects Med.* 1998; 19: 221-57.
25. [Erol B, Tokgoz H, Hanci V, Bektas S, Akduman B, Yencilek F, Mungan G, Mungan A. Vardenafil reduces testicular damage following ischemia/reperfusion injury in rats. Kaohsiung J Med Sci.](#) 2009; 25(7): 374-80.
26. Featherstone RL, Chambers DJ, Kelly FJ. Ischemic Preconditioning Enhances Recovery of Isolated Rat Lungs After Hypothermic Preservation. *Ann Thorac Surg.* 2000; 69: 237-42.
27. Filho DW, Torres MA, Bordin AL, Crezcynski-Pasa TB, Boveris A. Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. *Mol Aspects Med.* 2004; 25: 199-210.
28. [Guan Y, Zheng XM, Yang ZW, Li SW. Protective effects of L-carnitine upon testicular ischemia-reperfusion damage in rats. Zhonghua Yi Xue Za Zhi.](#) 2009;89(26):1858-61.
29. [Guimarães SB, Kimura OS, Vasconcelos PR. Dimethylsulfoxide attenuates ischemia-reperfusion injury in rat testis. Acta Cir Bras.](#) 2010;25(4):357-61.
30. Gukovskaya A, Pandol S. Nitric oxide production regulates cGMP formation and calcium influx in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol.* 1994;266(3 Pt 1):G350-6.
31. Halliwell B. Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry and Role in Human Disease. *Am J Med.* 1991; 91:14-21.
32. [Hanci V, Erol B, Bektas S, Mungan G, Yurtlu S, Tokgöz H, Can M, Ozkoçak Turan I. Effect of dexmedetomidine on testicular torsion/detorsion damage in rats. Urol Int.](#) 2010;84(1):105-11.
33. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33 (6): 774-97.
34. [Hascalik S, Celik O, Turkoz Y, Hascalik M, Cigremis Y, Mizrak B, Yologlu S. Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, protects from ischemia-reperfusion damage of the ovaries. Gynecol Obstet Invest.](#) 2004;57(4):218-23.
35. Hawaleshka A, Jacobsohn E. Ischemic preconditioning: mechanisms and potential clinical applications. *Can J Anaesth.* 1998; 45: 670-82.
36. Hearse DJ, Maxwell L, [Saldanha C, Gavin JB.](#) The myocardial vasculature during ischemia and reperfusion: a target for injury and protection. *J Mol Cell Cardiol.* 1993;25(7):759-800.

37. [Hekimoglu A, Kurcer Z, Aral F, Baba F, Atessahin A, Sakin F. Effects of 3-aminobenzamide on unilateral testicular ischemia-reperfusion injury: what is the role of PARP inhibition? Can J Physiol Pharmacol. 2010;88\(12\):1123-9.](#)
38. Hille R. Molybdenum-containing hydroxylases. Arch Biochem Biophys. 2005; 433(1): 107-16.
39. Hille R. Structure and Function of Xanthine Oxidoreductase. [Eur J Inorganic Chemistry](#). 2006; (10): 1905–95.
40. Huang [MT](#), [Wood AW](#), [Newmark HL](#), [Sayer JM](#), [Yagi H](#), [Jerina DM](#), [Conney AH](#). Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol-epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by phenolic plant flavonoids. [Carcinogenesis](#). 1983; 4(12):1631-7.
41. Janero DR. Nutritional aspects of nitric oxide: human health implications and therapeutic opportunities. Nutrition. 2001;17. 896-903.
42. Kalff JC, Carlos TM, Schraut WH, Billiar TR, Simmons RL, Bauer AJ. Surgically induced leukocytic infiltrates within the rat intestinal muscularis mediate postoperative ileus. Gastroenterology. 1999;117:378-87.
43. Kato R, Nakadate T, Yamato S, Sugimura T. Carcinogenesis. 1983; 4: 1301.
44. Kim SJ, Moon YJ, Lee SM. Protective effects of baicalin against ischemia/reperfusion injury in rat liver. J Nat Prod. 2010;73(12):2003-8.
45. Kloner RA, Bolli R, Marban E, Reinlib L, Braunwald E. Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. Circulation. 1998; 97(18):1848-67.
46. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. Circulation. 2001;104(24):2981-9.
47. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2. Circulation. 2001;104(25):3158-67.
48. [Koltuksuz U, Irmak MK, Karaman A, Uz E, Var A, Ozyurt H, Akyol O. Testicular nitric oxide levels after unilateral testicular torsion/detorsion in rats pretreated with caffeic acid phenethyl ester. Urol Res. 2000;28\(6\):360-3.](#)
49. [Kono T, Saito M, Kinoshita Y, Satoh I, Shinbori C, Satoh K. Real-time monitoring of nitric oxide and blood flow during ischemia-reperfusion in the rat testis. Mol Cell Biochem. 2006; 286 \(1-2\):139-45.](#)
50. Krarup T. The testes after torsion. Br J Urol. 1978; 50: 43-6.
51. Kuo PC, Schroeder RA. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. Ann Surg. 1995; 221: 220-35.
52. Laurie D, Kaplowitz DN. Glutathione Metabolism and Its Role in Hepatotoxicity. Pharmacol Ther. 1991; 52: 287-305.
53. Lawson CS, Downey JM. Preconditioning: state of the art myocardial protection. Cardiovasc Res. 1993; 27: 542-50.
54. Li Y, Whittaker P, Kloner RA. The transient nature of the effect of ischemic preconditioning on myocardial infarct size and ventricular arrhythmia. Am Heart J. 1992; 123: 346-53.
55. Lincoln J, Hoyle CH, Burnstock G, editors. Nitric oxide in health and disease. Cambridge: Cambridge University Pres. 1997.
56. Liu Y, Downey JM. Ischemic preconditioning protects against infarction in rat heart. Am J Physiol. 1992; 263: H1107-1112.

57. Lunec J, Blake D. Oxygen Free Radicals: Their Relevance to Disease Processes. In: Cohen R.D., Lewis B., Albert K.G.M.M. The Metabolic and Molecular Basis of Acquired Disease. Balliere Tindall, London. 1990. 189-212.
58. Lysiak JJ, Nguyen QA, Turner TT. Peptide and nonpeptide reactive oxygen scavengers provide partial rescue of the testis after torsion. *J Androl.* 2002; 23: 400-9.
59. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 1997;15: 323-50.
60. [Malakul W, Ingkaninan K, Sawasdee P, Woodman OL. The ethanolic extract of Kaempferia parviflora reduces ischaemic injury in rat isolated hearts. *J Ethnopharmacol.* 2011;137\(1\):184-91.](#)
61. Marber M.S, Latchman D.S, Walker J.M, Yellon D.M: Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation.* 1993; 88: 1264-72.
62. Matsuyama K, Chiba Y, Ihaya A, Kimura T, Tanigawa N, Muraoka R. Effect of spinal cord preconditioning on paraplegia during cross-clamping of the thoracic aorta. *Ann Thorac Surg.* 1997; 63: 1315-20.
63. [Minutoli L, Antonuccio P, Squadrito F, Bitto A, Nicotina PA, Fazzari C, Polito F, Marini H, Bonvissuto G, Arena S, Morgia G, Romeo C, Caputi AP, Altavilla D. Effects of polydeoxyribonucleotide on the histological damage and the altered spermatogenesis induced by testicular ischaemia and reperfusion in rats. *Int J Androl.* 2011 Jun 8. doi: 10.1111/j.1365-2605.](#)
64. Mogilner JG, Lurie M, Coran AG, Nativ O, Shiloni E, Sukhotnik I. Effect of diclofenac on germ cell apoptosis following testicular ischemia-reperfusion injury in a rat. *Pediatr Surg Int.* 2006; 22: 99-105.
65. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993; 329: 2002 12.
66. Moroney MA, Alcaraz MJ, Forder RA, Carey F, Hoult JR. Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. *J Pharm Pharmacol.* 1988 ;40(11):787-92.
67. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986; 74: 1124-36.
68. Murry CE, Richard VJ, Jennings RB, Reimer KA. Myocardial protection is lost before contractile function recovers from ischemic preconditioning. *Am J Physiol.* 1991; 260: H796-H804.
69. Nakanishi K, Vinten-Johansen J, Lefer DJ, Zhao Z, Fowler WC, McGee DS, Johnston WE. Intracoronary L-arginine during reperfusion improves endothelial function and reduces infarct size. *Am J Physiology.* 1992; 263: H1650-1658.
70. Neely CF, Keith IM. A1 adenosine receptor antagonists block ischemia- reperfusion injury of the lung. *Am J Physiol.* 1995; 268: 237-242.
71. [Ono T, Tsuruta R, Fujita M, Aki HS, Kutsuna S, Kawamura Y, Wakatsuki J, Aoki T, Kobayashi C, Kasaoka S, Maruyama I, Yuasa M, Maekawa T. Xanthine oxidase is one of the major sources of superoxide anion radicals in blood after reperfusion in rats with forebrain ischemia/reperfusion. *Brain Res.* 2009;1305:158-67.](#)
72. [Ozokutan BH, Küçükaydin M, Muhtaroglu S, Tekin Y. The role of nitric oxide in testicular ischemia-reperfusion injury. *J Pediatr Surg.* 2000;35\(1\):101-3.](#)

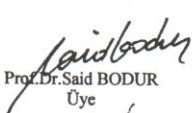
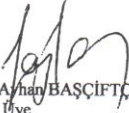
73. [Ozturk A, Baltaci AK, Mogulkoc R, Ozturk B. The effect of prophylactic melatonin administration on reperfusion damage in experimental testis ischemia-reperfusion. *Neuro Endocrinol Lett.* 2003;24\(3-4\):170-2.](#)
74. Palmer JS, Cornie WJ, Plzak LF, et al: A Platelet activating factor antagonist attenuates the effects of testicular ischemia. *J Urol.* 1997;158: 1186-90.
75. Parratt J, Vegh A. Pronounced antiarrhythmic effects of ischemic preconditioning. *Cardioscience.* 1994; 5: 9-18.
76. [Pekcetin C, Ergur BU, Kiray M, Bagriyanik A, Tugyan K, Erbil G, Ozogul C. The protective effects of trimetazidine on testicular ischemia and reperfusion injury in rats. 2007; 23\(11\):1113-8.](#)
77. [Portugal-Cohen M, Kohen R. Exposure of human keratinocytes to ischemia, hyperglycemia and their combination induces oxidative stress via the enzymes inducible nitric oxide synthase and xanthine oxidase. *J Dermatol Sci.* 2009;55\(2\):82-90.](#)
78. Pratt D E, Hudson B.J.F. In Food Antioxidants, Elsevier, London, 1990, 171.
79. Prillaman HM, Turner TT. Rescue of testicular function after acute experimental torsion. *J Urol.* 1997;157: 340-5.
80. Rabinowitz R, Hulbert WC. Acute scrotal swelling. *Urol Clin North Am.* 1995; 22: 101-5.
81. Reffelmann T, Kloner RA. The no-reflow phenomenon: A basic mechanism of myocardial ischemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol.* 2006;101(5): 359-72.
82. Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology 9th Edition, Mosby, Edinburg. 2004, pp1412
83. Ross D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. *Pharmacol Ther.* 1988; 37:231-49.
84. Sarela AI, Mathie RT. The role of nitric oxide in surgical practice. *Surgery.* 1996;14: 154-6.
85. Sasaki M, Joh T. Oxidative stress and ischemia-reperfusion injury in gastrointestinal tract and antioxidant, protective agents. *J Clin Biochem Nutr.* 2007;40(1):1-12.
86. Sasaki N, Sato T, Ohler A, O'Rourke B, Marban E. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. *Circulation.* 2000; 101, 439-45.
87. Schaller B, Graf R. Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004;24(4):351-71.
88. [Selvaraj P, Pugalendi KV. Hesperidin, a flavanone glycoside, on lipid peroxidation and antioxidant status in experimental myocardial ischemic rats. *Redox Rep.* 2010;15\(5\):217-23.](#)
89. [Shiraishi K, Naito K, Yoshida K. Nitric oxide promotes germ cell necrosis in the delayed phase after experimental testicular torsion of rat. *Biol Reprod.* 2001;65\(2\):514-21.](#)
90. [Sizlan A, Guven A, Uysal B, Yanarates O, Atim A, Oztas E, Cosar A, Korkmaz A. Proanthocyanidin protects intestine and remote organs against mesenteric ischemia/reperfusion injury. *World J Surg.* 2009 Jul;33\(7\):1384-91.](#)
91. Sobey CG, Woodman OL. Myocardial ischaemia: what happens to the coronary arteries? *Trends Pharmacol Sci.* 1993;14(12):448-53.
92. [Su JF, Guo CJ, Wei JY, Yang JJ, Jiang YG, Li YF. Protection against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats by oral pretreatment with quercetin. *Biomed Environ Sci.* 2003;16\(1\):1-8.](#)

93. [Sukhotnik I, Voskoboinik K, Lurie M, Bejar Y, Coran AG, Mogilner JG. Involvement of the bax and bcl-2 system in the induction of germ cell apoptosis is correlated with the time of reperfusion after testicular ischemia in a rat model. Fertil Steril. 2009;92\(4\):1466-9.](#)
94. [Sun YX, Tang Y, Wu AL, Liu T, Dai XL, Zheng QS, Wang ZB. Neuroprotective effect of liquiritin against focal cerebral ischemia/reperfusion in mice via its antioxidant and antiapoptosis properties. J Asian Nat Prod Res. 2010;12\(12\):1051-60.](#)
95. [Tamamura M, Saito M, Kinoshita Y, Shimizu S, Satoh I, Shomori K, Dimitriadis F, Satoh K. Protective effect of edaravone, a free-radical scavenger, on ischaemia-reperfusion injury in the rat testis. BJU Int. 2010;105\(6\):870-6.](#)
96. [Taibi G, Carruba G, Miceli V, Cocciaferro L, Cucchiara A, Nicotra CM. Sildenafil protects epithelial cell through the inhibition of xanthine oxidase and the impairment of ROS production. Free Radic Res. 2010;44\(2\):232-9.](#)
97. Tsai LY, Lee KT, Tsai SM, Lee SC, Yu HS. (1993) Changes of lipid peroxide levels in blood and liver tissue of patients with obstructive jaundice. Clin Chim Acta. 1993; 215: 41-50.
98. [Tsounapi P, Saito M, Dimitriadis F, Shimizu S, Kinoshita Y, Shomori K, Satoh I, Satoh K. Protective effect of sivelestat, a neutrophil elastase inhibitor, on ipsilateral and contralateral testes after unilateral testicular ischaemia-reperfusion injury in rats. BJU Int. 2011; 107\(2\):329-36.](#)
99. [Unal D, Karatas OF, Savas M, Yeni E, Keser BS, Verit A, Erel O, Bitiren M. Protective effects of trimetazidine on testicular ischemia-reperfusion injury in rats. Urol Int. 2007;78\(4\):356-62.](#)
100. Van Winkle, D.R, Thornton J.D, Downey D.M, Downey J.M: The natural history of preconditioning: cardioprotection depends on duration of transient ischemia and time to subsequent ischemia. Coron Artery Dis. 1991; 2, 613-619.
101. Vegh A, Gyorgy K, Rastegar MA, Papp JG, and Parratt JR. Delayed protection against ventricular arrhythmias by monophosphoryl lipid-A in a canine model of ischaemia and reperfusion. Eur J Pharmacol. 1999;382: 81-90.
102. Wang CZ, Mehendale SR, Calway T, Yuan CS. Botanical flavonoids on coronary heart disease. Am J Chin Med. 2011;39(4): 661-71.
103. Wang S, Dusting GJ, May CN, Woodman OL. 3',4'-Dihydroxyflavonol reduces infarct size and injury associated with myocardial ischaemia and reperfusion in sheep. Br J Pharmacol. 2004; 142: 443-52.
104. Wang S, Fei K, Xu YW, Wang LX, Chen YQ. Dihydroxyflavonol reduces post-infarction left ventricular remodeling by preventing myocyte apoptosis in the non-infarcted zone in goats. (Engl). Chin Med J. 2009; 122: 61-7.
105. Woodman OL, Chan ECh. Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2004;31(11):786-90
106. [Xu JX, Yang M, Deng KJ, Zhou H. Antioxidant activities of Dracocephalum tanguticum maxim extract and its up-regulation on the expression of neurotrophic factors in a rat model of permanent focal cerebral ischemia. Am J Chin Med. 2011;39\(1\):65-81.](#)
107. [Yildiz H, Durmus AS, Simsek H, Yaman M. Dose-dependent protective effect of sildenafil citrate on testicular injury after torsion/detorsion in rats. Andrologia. 2011 Jul 12. doi: 10.1111/j.1439-0272.2011.01181.x.](#)
108. Zweier J.L, Wang P, Kuppusamy P; Direct measurement of nitric oxide generation in the ischemic heart using electron paramagnetic resonance spectroscopy. J Biol Chem. 1995; 270: 304-307

9. EKLER

Etik Kurul Raporu

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
DENEYSEL TIP ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURUL KARARLARI

Karar Sayısı: 2010-048	Karar Tarihi: 31/05/2010
Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalından Doç.Dr.Rasim MOĞULKOÇ, Aysel DUMAN, Biyokimya Anabilim Dalından Dr.Esma MENEVŞE ve Patoloji Anabilim Dalından Prof.Dr.M.Cihat AVUNDUK tarafından sunulan "Sıçanlarda Testis İskemi-Reperfüzyon Hasarında 3',4'-Dihydroxyflavonol'un Lipid Peroksidasyona Etkisi" başlıklı tez projesi dokuz üyenin katılımı ile değerlendirildi. Projede sekiz grupta toplam 60 sıçan kullanılacağı, sıçanların süre sonunda yüksek doz anestezi ile sakrifiye edileceği belirtilmiştir. Projenin deney hayvanlarına ilişkin yönlerinin Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesinin 6ncı maddesinde belirtilen "etik kurallara uygunluk esası" dikkate alınarak hazırlandığı belirlenmiştir. Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesinde "Başvuru Sahibinin Sorumlulukları" başlığı altında yer alan kurallar ve madde 6da belirtilen "Hayvan Deneyleri ile İlgili Etik İlkeler" saklı kalmak koşulu ile projenin hazırlanmasında "Etik Kurul Yönergesi İlkelerine Uyulduğuna", çalışmanın deneysel kısmını yapacak çalışmacının "Deney Hayvanları Kullanım Sertifikasına" sahip olduğu dikkate alınarak projenin hayvan kullanım etiği açısından "uygun" olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.	
 Prof.Dr.K.Esra NURULLAHOĞLU ATALIK Başkan  Prof.Dr.Lema TAVLI Üye  Prof.Dr.Said BODUR Üye  Prof.Dr.A.Saide ŞAHİN Üye  Doç.Dr.H.Serdar GERGERLİOĞLU Üye  Doç.Dr.Nilsel OKUDAN Üye-Katılmadı  Doç.Dr.Faruk Aynan BAŞÇİFTÇİ Üye  Doç.Dr.Mehmet ŞİİRİN Üye  Dr.M.Mehmet ŞENER Üye  Mehmet ÖZ Üye  Mustafa ŞİRİN Üye-Katılmadı	

10. ÖZGEÇMİŞ

07.10.1985 yılında Eskişehir’de doğdum. 1990 yılında babamın iş nedeni dolayısıyla ailecek Alanya’ya taşındık. İlkokuldan liseye kadar devam eden eğitim dönemini Alanya’da tamamladım. 1991-1996 yıllarında İlkokulu Bilgi Bulut’ta, 1996-2003 tarihleri arasında ortaokul ve liseyi Ayşe Melahat Erkin Anadolu Lisesi’nde bitirdim. 2003–2007 yıllarında Üniversite eğitimimi Selçuk Üniversitesi Karaman Sağlık Yüksekokulunda tamamladım. 2008 yılında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Fizyoloji Ana Bilim Dalında yüksek lisans eğitimime başladım. Mesleğim olan hemşirelik görevini 2009 tarihinden beri Kulu Devlet Hastanesi Acil Servisinde sürdürmekteyim.