

TC.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OVER TORSİYONUNDAKİ
İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINA
SİLYMARİNİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

ÖZCAN ÜSTÜN

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2017

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-1997970035

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OVER TORSİYONUNDAKİ
İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINA
SİLYMARİNİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

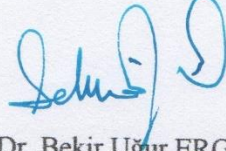
ÖZCAN ÜSTÜN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Bekir Uğur ERGÜR

Bu proje TÜBİTAK tarafından 216S473 sayı ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSL.MSc-1997970035

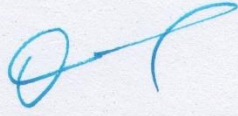
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,
Yüksek Lisans programı öğrencisi Özcan ÜSTÜN '**Over torsiyonundaki**
İskemi-reperfüzyon hasarına silymarinin etkisinin incelenmesi' konulu Yüksek Lisans
tezini 25/12/2017 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



Prof. Dr. Bekir Uğur ERGÜR

BAŞKAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Işıl TEKME

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Meltem KURUŞ

ÜYE

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. H. Alper BAĞRIYANIK

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Kemal ERGİN

ÜYE

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TABLO DİZİNİ	iv
ŞEKİL DİZİNİ	v
KISALTMALAR	viii
ÖZET	1
ABSTRACT	5
1. GİRİŞ VE AMAÇ	8
2. GENEL BİLGİLER	11
2.1. Ovaryum	11
2.1.1. Ovaryum Anatomisi.....	11
2.1.2. Ovaryum Histolojisi.....	14
2.1.2.1. Oogenezis.....	15
2.1.2.2. Follikülogenezis.....	17
2.1.2.3. Folikül Atrezisi.....	22
2.1.2.4. Ovulasyon Ve Korpus Luteum.....	22
2.1.3. Ovaryumun Embriyolojisi.....	23
2.1.4. Ovaryum'un Fizyolojisi.....	25
2.2. Ovaryum Torsiyon-Detorsiyonu Ve İskemi-Reperfüzyon Hasarı	26
2.2.1. Ovaryum Torsiyonu.....	26
2.2.2. İskemi-Reperfüzyon Hasarı.....	27
2.2.3. Malondialdehit (MDA).....	28
2.2.4. İskemi Modifiye Albümin (IMA)	29
2.3. Apoptoz.....	30
2.4. Antioksidan Savunma Mekanizması	32
2.4.1. Silymarin.....	33
2.4.2. Dimetil sülfoksit (DMSO).....	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1. Araştırmanın Tipi.....	37
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	37
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları	37

3.4. Çalışma Materyali	38
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	38
3.6. Veri Toplama Araçları	38
3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler	38
3.6.2. Araştırmada Kullanılan Yöntemler	39
3.6.2.1. Histokimyasal İncelemeler	40
3.6.2.1.1. Doku Takibi	40
3.6.2.1.2. Hematoksilen-eozin Boyama Yöntemi	41
3.6.2.1.3. Masson trikrom boyama yöntemi	42
3.6.2.1.4. Peryodik asit shiff boyama yöntemi	44
3.6.2.2. İmmunohistokimyasal Yöntemler	46
3.6.2.2.1. TUNEL Boyama Yöntemi	46
3.6.2.2.2. Aktif Kaspaz-3 Boyama Yöntemi	46
3.6.2.3. Elektron Mikroskopi Doku Takip Yöntemi	47
3.6.2.4. Biyokimyasal Analizler	48
3.6.2.4.1. Serumda Yapılan Analizler	48
3.6.2.5. Doku analizleri	48
3.6.2.5.1. Biyokimyasal Yöntemlerde Doku Homojenatlarının Hazırlanması	48
3.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi	50
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	50
3.9. Araştırmanın sınırlılıkları	50
3.10. Etik kurul onayı	50
4. BULGULAR	51
4.1. Işık Mikroskopik Bulgular	51
4.1.1. Hematoksilen - eozin Boyama Bulguları	51
4.1.2. Masson-trikrom boyama bulguları	67
4.1.3. Periyodik asit shiff Boyama Bulguları	75
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular	83
4.2.1. TUNEL Boyama Bulguları	83
4.2.2. Aktif kaspaz-3 Boyama Bulguları	91
4.3. Elektron Mikroskopik Bulgular	99
4.4. Biyokimyasal Bulgular	105
4.4.1. MDA Seviyeleri	105
4.4.2. GPx Değerleri	108

4.4.3. Ischemia Modified Albumin (IMA) düzeyleri.....	111
5. TARTIŞMA	114
6. SONUÇ	120
7. KAYNAKLAR.....	121
8. EKLER.....	129
8.1. EK-1. Etik Kurul Onayı	129
8.2. EK-2 Etik Kurul İsim Değişikliği.....	130
8.3. EK-3 TÜBİTAK Onayı.....	131
8.4. EK-4 Özgeçmiş.....	132



TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Doku takip yöntemi	40
Tablo 2: Hematoksilen-Eozin Boya Yöntemi	42
Tablo 3: Masson Trikrom Boyama Yöntemi	43
Tablo 4: Periyodik asit shiff boyama yöntemi	45
Tablo 5: Hasar skorlaması	52
Tablo 6: Hasar skorlaması	53
Tablo 7: Germinal epitel kalınlıkları	54
Tablo 8: Germinal epitel kalınlıkları	55
Tablo 9: Masson trikrom	67
Tablo 10: Masson trikrom	68
Tablo 11: Zona Pellusida Kalınlıkları	75
Tablo 12: Zona Pellusida Kalınlıkları	76
Tablo 13: TUNEL	83
Tablo 14: TUNEL	84
Tablo 15: Aktif kaspaz-3	91
Tablo 16: Aktif kaspaz-3	92
Tablo 17: MDA	105
Tablo 18: MDA	106
Tablo 19: GPx	108
Tablo 20: GPx	110
Tablo 21: IMA	111
Tablo 22: IMA	113

SEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Dişi genital sistemi genel görüntüsü (13).	14
Şekil 2: Ovaryum'un şematik görüntüsü (15).	15
Şekil 3: Oogenezis (17).	16
Şekil 4: Primordiyal folikül (13).	18
Şekil 5: Unilaminer primer folikül (13).	19
Şekil 6: Multilaminer primer folikül (13).	20
Şekil 7: Sekonder folikül (13).	21
Şekil 8: Olgun ya da Graaf folikül (13).	22
Şekil 9: Ovaryum Fizyolojisi (28).	26
Şekil 10: Kobalt Bağlama Testi (IMA) (47).	30
Şekil 11: Apoptoz'un mekanizması (49).	32
Şekil 12: Serbest radikaller ve antioksidanlar (51).	33
Şekil 13: Silybum marianum bitkisi (59).	35
Şekil 14: Silymarinin moleküler yapısı (60).	35
Şekil 15: DMSO'nun Moleküler Yapısı (63).	36
Şekil 16: HHS grafiği.	54
Şekil 17: Germinal Epitel Kalınlıkları.	56
Şekil 18: Kontrol grubu ovaryum kesiti. (H&E, X10).	57
Şekil 19: Kontrol grubu ovaryum kesiti. (H&E, X20).	57
Şekil 20: Kontrol grubu ovaryum kesiti. (H&E, X40).	58
Şekil 21: Kontrol grubu ovaryum kesiti. (H&E, X100).	58
Şekil 22: T+D grubu ovaryum kesiti. (H&E, X10).	59
Şekil 23: T+D grubu ovaryum kesiti. (H&E, X20).	59
Şekil 24: T+D grubu ovaryum kesiti. (H&E, X40).	60
Şekil 25: Torsiyon+Detorsiyon grubu ovaryum kesiti. (H&E, X100).	60
Şekil 26: T+D+SİL grubu ovaryum kesiti. (H&E, X10).	61
Şekil 27: T+D+SİL grubu ovaryum kesiti. (H&E, X20).	61
Şekil 28: T+D+SİL grubu ovaryum kesiti. (H&E, X40).	62
Şekil 29: T+D+SİL grubu ovaryum kesiti. (H&E, X100).	62
Şekil 30: DMSO grubu ovaryum kesiti. (H&E, X10).	63
Şekil 31: DMSO grubu ovaryum kesiti. (H&E, X20).	63
Şekil 32: DMSO grubu ovaryum kesiti. (H&E, X40).	64
Şekil 33: DMSO grubu ovaryum kesiti. (H&E, X100).	64
Şekil 34: SİL grubu ovaryum kesiti. (H&E, X10).	65
Şekil 35: SİL grubu ovaryum kesiti. (H&E, X20).	65
Şekil 36: SİL grubu ovaryum kesiti. (H&E, X40).	66
Şekil 37: SİL grubu ovaryum kesiti. (H&E, X100).	66
Şekil 38: Bağ dokusu artışı grafiği.	69
Şekil 39: Kontrol grubu ovaryum kesiti. (Masson trikrom, X4).	70
Şekil 40: Kontrol grubu ovaryum kesiti. (Masson trikrom, X40).	70
Şekil 41: T+D grubu ovaryum kesiti. (Masson trikrom, X4).	71
Şekil 42: T+D grubu ovaryum kesiti. (Masson trikrom, X40).	71
Şekil 43: T+D+SİL grubu ovaryum kesiti. (Masson trikrom, X4).	72

Şekil 44: T+D+SİL grubu ovaryum kesiti. (Masson trikrom, X40)	72
Şekil 45: DMSO grubu ovaryum kesiti. (Masson trikrom, X4).....	73
Şekil 46: DMSO grubu ovaryum kesiti. (Masson trikrom, X40).....	73
Şekil 47: Silymarin grubu ovaryum kesiti. (Masson trikrom, X4)	74
Şekil 48: Silymarin grubu ovaryum kesiti. (Masson trikrom, X40)	74
Şekil 49: Zona pellusida kalınlıkları grafiği.....	77
Şekil 50: Kontrol grubu ovaryum kesiti. (PAS, X40)	78
Şekil 51: Kontrol grubu ovaryum kesiti. (PAS, X100)	78
Şekil 52: T+D grubu ovaryum kesiti. (PAS, X40).....	79
Şekil 53: T+D grubu ovaryum kesiti. (PAS, X100).....	79
Şekil 54: T+D+SİL grubu ovaryum kesiti. (PAS, X40)	80
Şekil 55: T+D+SİL grubu ovaryum kesiti. (PAS, X100)	80
Şekil 56: DMSO grubu ovaryum kesiti. (PAS, X40).....	81
Şekil 57: DMSO grubu ovaryum kesiti. (PAS, X100).....	81
Şekil 58: SİL grubu ovaryum kesiti. (PAS, X40)	82
Şekil 59: SİL grubu ovaryum kesiti. (PAS, X100)	82
Şekil 60: TUNEL pozitif- negatif hücre oranı grafiği.....	85
Şekil 61: Kontrol grubu ovaryum kesiti. (TUNEL, X40)	86
Şekil 62: Kontrol grubu ovaryum kesiti. (TUNEL, X100)	86
Şekil 63: T+D grubu ovaryum kesiti. (TUNEL, X40)	87
Şekil 64: T+D grubu ovaryum kesiti. (TUNEL, X100).....	87
Şekil 65: T+D+SİL grubu ovaryum kesiti (TUNEL, X40).....	88
Şekil 66: T+D+SİL grubu ovaryum kesiti. (TUNEL, X100).....	88
Şekil 67: DMSO grubu ovaryum kesiti. (TUNEL, X40)	89
Şekil 68: DMSO grubu ovaryum kesiti. TUNEL, X100)	89
Şekil 69: SİL grubu ovaryum kesiti. (TUNEL, X40).....	90
Şekil 70: SİL grubu ovaryum kesiti. (TUNEL, X100).....	90
Şekil 71: Aktif kaspaz-3 pozitif hücrelerin grafiği.	93
Şekil 72: Kontrol grubu ovaryum kesiti. (Aktif kaspaz-3, X40).....	94
Şekil 73: Kontrol grubu ovaryum kesiti. (Aktif kaspaz-3, X100).....	94
Şekil 74: T+D grubu ovaryum kesiti. (Aktif kaspaz-3, X40)	95
Şekil 75: T+D grubu ovaryum kesiti. (Aktif kaspaz-3, X100)	95
Şekil 76: T+D+SİL grubu ovaryum kesiti. (Aktif kaspaz-3, X40).	96
Şekil 77: T+D+SİL grubu ovaryum kesiti. (Aktif kaspaz-3, X100)	96
Şekil 78: DMSO grubu ovaryum kesiti. (Aktif kaspaz-3, X40)	97
Şekil 79: DMSO grubu ovaryum kesiti. (Aktif kaspaz-3, X100)	97
Şekil 80: SİL grubu ovaryum kesiti. (Aktif kaspaz-3, X40)	98
Şekil 81: SİL grubu ovaryum kesiti. (Aktif kaspaz-3, X100).....	98
Şekil 82: Kontrol grubu elektron mikroskopi görüntüsü.	100
Şekil 83: Kontrol grubu elektron mikroskobunda, zona pellusida görüntüsü.....	100
Şekil 84: T+D grubu elektron mikroskopi görüntüsü.	101
Şekil 85: T+D grubu elektron mikroskobunda, zona pellusida görüntüsü.	101
Şekil 86: T+D+SİL grubu elektron mikroskopi görüntüsü.	102
Şekil 87: T+D+SİL grubu elektron mikroskobunda, zona pellusida görüntüsü.	102
Şekil 88: DMSO grubu elektron mikroskopi görüntüsü.	103

Şekil 89: DMSO grubu elektron mikroskopunda, zona pellusida görüntüsü.....	103
Şekil 90: SİL grubu elektron mikroskobi görüntüsü.	104
Şekil 91: SİL grubu elektron mikroskopunda, zona pellusida görüntüsü.	104
Şekil 92: MDA düzeylerinin grafiği.	107
Şekil 93: GPx düzeylerinin grafiği.....	109
Şekil 94: IMA düzeylerinin grafiği.	112



KISALTMALAR

DMSO: Dimetil sülfoksit

SİL: Silymarin

H&E: Hematoksilen Eozin

PAS: Periyodik Asit-Schiff

TUNEL: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Deoxyuridine Triphosphate DNA Nick-End Labelling

Kaspaz-3: Aktive- kaspase 3

MDA: Malondialdehit

GPx: Glutasyon Peroksidaz

IMA: İskemi Modifiye Albumin

TEM: Transmission Electron Mikroskopy

IVF: Invitro Fertilization

OMI: Oosit Maturasyon İnhibitörü

FSH: Folikül stimulan hormon

LH: Luteinizan hormon

ZP: Zona pellusida

ROS: Reactive oxygen species

ROT: Reaktif Oksijen Türleri

SRY: Sex-determining region on Y

TDF: Testis belirleyici faktör

GnRH: Gonadotropin serbestleştirici hormon

I/R: İskemi-Reperfüzyon

OS: Oksidatif stres

8-OHG: 8-hidroksiguanozin

TBI: Travmatik beyin hasarı

SOD: Süperoksit dismutaz

CAT: Katalaz

NO: Nitrik Oksit

MDA: Malondialdehit

APAF-1: Apoptotic protease activating factor

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

CASPASE: Cysteine Aspartate Specific ProteASEs

SMAC: Second mitochondria-derived Activator of Caspase

Endo-G: Endonukleaz-G

AIF: Apoptoz indükleyici faktör

DAB: Di Amino Benzidine

HCV: Hepatit C virüsü

RNA: Ribo Nükleik asit

NS5B: Nonstructural protein 5B

NF-κB: Nuclear Factor kappa B

PDX1: pancreatic and duodenal homeobox 1

HHS: Histomorfolojik hasar skorlaması

OVER TORSİYONUNDAKİ İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINA SİLYMARİNİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

**Özcan ÜSTÜN, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji
Anabilim Dalı, Narlıdere, İzmir, ozcan.ustun@deu.edu.tr**

ÖZET

Amaç:

Over torsiyonu üreme çağında sık görülen overde iskemi-reperfüzyon hasarına neden olan mümkün olduğunca erken tanı ve müdahale gerektiren jinekolojik bir durumdur. Çocukluk çağındaki tüm akut karın olgularının da %2,7'sini oluşturmaktadır. Semptomların nonspesifik olmasından dolayı genellikle tanı ve tedavide gecikme olmakta ve gecikmiş vakalarda overlerde geri dönüşümsüz hasarlar oluşturarak kadınlarda infertiliteye neden olmaktadır. Over torsiyonuna yol açan başlıca durumlar ise; ovaryum kitleleri, ovaryum kistleri ve yardımcı üreme tekniklerinde ovaryumun gonadotropinlerle hiperstimülasyonudur.

Torsiyon sonucunda meydana gelebilecek iskemik hasarın etyolojisinde, ortamda bulunan reaktif oksijen metabolitlerine bağlı oksidatif stres ve inflamasyon süreci sorumlu tutulmaktadır. İskemik hasar dönemi olarak adlandırılan bu süreçte, ovaryan hasar temel olarak hipoksiye bağlıdır. Torsiyon ortadan kaldırıldıktan sonra da reaktif oksijen ve nitrojen ürünlerinin oluşmasıyla reperfüzyon hasarı olarak adlandırılan süreç başlar. Dokudaki toplam hasar, iskemi ve reperfüzyonun her ikisinin de yol açtığı hasarın toplamı olarak kabul edilmektedir. Sonuç olarak, reperfüzyon hasarının önlenmesi iskemi tedavisinin başarısını daha da arttıracaktır. Biz de bu hipotezden yola çıkarak, farklı çalışmalarda antioksidan etkisi gösterilmiş olan Silymarin'in; ovaryum iskemi-reperfüzyon hasarındaki koruyucu etkisini ortaya koymayı amaçladık.

Silymarin, silybum marianum bitkisinin tohumlarından elde edilen ve yaklaşık olarak % 65-80 oranında Silymarin kompleksi, az miktarda flavonoidleri, yaklaşık olarak %20-35 oranında yağ asitlerini ve diğer polyphenolik yapıları içermektedir. Silymarin çoğunlukla karaciğer üzerinde etkili antioksidan ve kemoprotektiftir. Karaciğer hücrelerinin yanında, böbrek ve immun sistem hücreleri ile fibroblastlar, keratonositler ve endotelial hücreler üzerinde de toksik ajanlara karşı duyarlı olduğu ispatlanmıştır.

Çalışmamızda dişi sıçanlarda (200-250 gr) deneysel olarak oluşturulan ovaryan torsiyon detorsiyon modeli sonucunda overde oluşan iskemi-reperfüzyon hasarı; kontrol grubu, torsiyon-detorsiyon grubu, torsiyon-detorsiyon+silymarin grubu, Dimetil sülfoksit (DMSO) grubu ve sadece silymarin (SİL) uygulanan grupla karşılaştırılmalı olarak test edildi.. Bu amaçla, sakrifikasyon sonrası formalin tespit solüsyonuna alınan ve parafine gömülen ovaryum dokularında histolojik olarak hematoxilen eozin (H&E), periyodik asit schiff (PAS) ve masson trikrom boyamasıyla ovaryum histolojisi ışık mikroskopik olarak incelendi. İmmünohistokimyasal olarak apoptotik hücrelerin belirlenmesi için, TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate DNA nick-end labelling) ve aktive-kaspaz-3 immün boyamaları yapıldı. Ayrıca, elektron mikroskopik olarak ultrastrüktürel yapı incelendi. Biyokimyasal olarak oksidatif stres göstergesi olan lipid peroksidasyon düzeyi Malondialdehid (MDA) ve antioksidan savunma sisteminin göstergesi olan glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktiviteleri spektrofotometrik yöntemle ölçülerek Silymarin tedavisinin ovaryan iskemi-reperfüzyon hasarında koruyucu etkinlikleri değerlendirildi. Ayrıca, bir iskemi belirtici olan ve serumda çok kısa bir süre içinde belirlenebilen IMA (İskemi Modifiye Albumin) düzeylerine de bakılarak iskemi oluşup oluşmadığı kontrol edildi. Elde edilen veriler SPSS 15,0 istatistik programına yüklendi. Gruplar arası farklılıklar Kruskal Wallis ve Man Whitney U testi kullanılarak test edildi. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Yöntem:

35 adet dişi Wistar suşu sıçan (200-250g) 5 gruba ayrıldı (n=7).

GrupI, Kontrol Grubu (K): Hiçbir müdahale yapılmaksızın ovaryum dokuları alınan grup (n=7).

GrupII, Torsiyon+Detorsiyon Grubu (T+D): 3 saat torsiyon sonrası 3 saat detorsiyon uygulanan grup (n=7).

GrupIII, Torsiyon+Detorsiyon+Silymarin Grubu (T+D+SİL): 3 saat torsiyon sonrası, detorsiyondan 30 dakika önce 250mg/kg Silymarin verilen grup (n=7).

GrupIV, DMSO Grubu (DMSO): Deneklere % 10 luk DMSO'nun i.p. olarak verildiği grup (n=7).

GrupV, Silymarin Grubu (SİL): Deneklere DMSO'da çözülmüş Silymarinin i.p. olarak verildiği grup (n=7).

Deney sonunda deneklerden ovaryum dokuları alındı. Histolojik incelemeler gerçekleştirebilmek için H&E, masson trikrom ve PAS, apoptozun belirlenmesi için TUNEL ve Aktif Kaspaz- 3 boyamaları yapıldı. Deneyde iskemi-reperfüzyon modelinin ispatlanması için ise biyokimyasal olarak doku homojenatlarından GPx ve MDA düzeylerine bakıldı. Deneklerin kuyruk venlerinden alınan kanların serumunda ayrıca IMA düzeylerine de bakıldı. Ayrıca transmission electron mikroskopi (TEM) de dokular ultrastrüktürel olarak incelendi.

Bulgular:

Hasar skorlaması sonucunda; T+D grubu ve T+D+SİL gruplarında, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hasarda anlamlı bir artış olduğu, T+D+SİL, DMSO ve SİL gruplarında, T+D grubuyla karşılaştırıldığında ise hasarda anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi. DMSO ve SİL grupları, T+D+SİL grubuyla karşılaştırıldığında hasarda anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi.

Bağ dokusu artışının değerlendirilmesi sonucunda; Kontrol grubu, T+D grubu ile karşılaştırıldığında T+D grubunda bağ dokusunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi.

Zona pellusida kalınlıklarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmadı.

TUNEL boyamaları sonucunda; T+D grubu Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında apoptotik hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu, T+D+SİL grubu, DMSO grubu ve SİL grupları, T+D grubu ile karşılaştırıldığında ise her 3 grupta da apoptotik hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi. T+D+SİL grubu; DMSO grubu ile karşılaştırıldığında DMSO grubunda apoptotik hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi.

Aktif Kaspaz-3 boyaması sonucunda; Kontrol grubu, T+D grubu karşılaştırıldığında, T+D grubunda, aktif kaspaz-3 pozitif hücre yoğunluğunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu, T+D grubu, T+D+SİL, DMSO, SİL gruplarıyla karşılaştırıldığında, her üç grupta da aktif kaspaz-3 pozitif hücre yoğunluğunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi.

Yapılan biyokimyasal değerlendirmeler sonucunda; T+D grubu, T+D+SİL ve SİL grupları ile karşılaştırıldığında MDA seviyelerinin her iki grupta da istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi.

Antioksidan savunma mekanizması ölçümleri sonucunda; Kontrol grubu, T+D grubu ile karşılaştırıldığında T+D grubunda GPx seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi.

IMA ölçümleri sonrasında kontrol grubu, T+D grubu, T+D+SİL grubu ve DMSO gruplarıyla karşılaştırıldığında, her üç grupta da, IMA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi. T+D grubu; T+D+SİL, DMSO ve SİL gruplarıyla karşılaştırıldığında her üç grupta da IMA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi. T+D+SİL grubu; SİL grubu ile karşılaştırıldığında, SİL grubunda IMA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi.

DMSO grubu; SİL grubu ile karşılaştırıldığında, SİL grubunda IMA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi.

Sonuç:

Yaptığımız çalışmada, iskemi-reperfüzyon sonucunda oksidatif strese bağlı olarak dokuda apoptotik hücrelerde ve MDA seviyelerinde artış meydana geldiğini ve bu hasarın, reperfüzyon öncesi silymarin verilerek azaltılabileceğini gözlemledik. İleri çalışmalar yapılarak silymarinin nanopartikül boyutlarında hazırlanmış formlarının klinikte uygulanabilir bir yöntem olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Ovaryum, Torsiyon-Detorsiyon, İskemi- Reperfüzyon, Silymarin.

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF SILYMARIN ON ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY IN OVARY TORSION

ABSTRACT

Objective:

Ovarian torsion of ovary in reproductive period is the frequent ischemia- reperfusion injury which is possible causing a gynecological condition that requires early diagnosis and treatment. In all cases, of acute abdominal pain in childhood constitutes 2.7 %. In the delayed cases due to the delay in the diagnosis and treatment of nonspecific symptoms, irreversible damage in the ovaries has seen and this causes infertility in women. The main conditions that cause ovarian torsion are ovarian masses, hyperstimulation of the ovaries with gonadotropin, ovarian cysts and the assisted reproduction techniques. Torsion, result of damage caused by ischemic environment in the etiology of reactive oxygen metabolites which can occur with oxidative stress and inflammatory processes are implicated. Ovarian damage in the process called the ischemic injury period depends on mainly hypoxia. After torsion reactive oxygen species were eliminated and starts process called reperfusion injury by the formation of the nitrogen products. Tissue ischemia and reperfusion injury in total is recognized as the sum of the damage caused. Consequently, prevention of reperfusion injury ischemia would increase the success of treatment. We also worked on the hypothesis that a different antioxidant Silymarin which haven't shown previously the effects on ischemia-reperfusion injury. We aimed to demonstrate the protective effect of Silymarin on the ischemia-reperfusion injury. Silymarin, obtained from the *Silybum marianum* seeds and the complex of silymarin composed of approximately 65-80 % , a small amount of flavonoids, contains by approximately 20-35% fatty acids and other polyphenolic structures. Silymarin has antioxidant effect on liver and mostly chemoprotective. Besides liver cells, kidney and immune system cells, fibroblasts, keratinocytes, and endothelial cells has proven to be sensitive to toxic agents. In our study, female rats (200-250g) experimentally induced ovarian torsion and detorsion model consisting of control group, torsion -detorsion group, torsion –detorsion+silymarin group, silymarin group and DMSO groups. For this purpose, after sacrifice ovarian tissues fixed in the formalin and embedded in paraffin for histological evaluation. H&E, PAS and masson trichrome stained sections examined by light microscopy. Immunohistochemistry for the identification of apoptotic cells made by TUNEL and active-caspase 3 immunostaining. The tissue ultrastructure of the samples, were also investigated by electron microscopy. Biochemical oxidative stress

indicator of lipid peroxidation levels (MDA) and an indicator of antioxidant defense system, GPx is evaluated by the spectrophotometric method. In addition, IMA levels, which were identified as a symptom of ischemia and can be determined in a very short time in the serum, were checked to see if ischaemia was occurred or not. The obtained data loaded into the SPSS 15.0 statistical software. The difference between groups assessed by Kruskal-Wallis and Man - Whitney U test. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Method:

35 female Wistar rats (200-250 g) were divided into 5 groups ($n = 7$).

Group I, Control Group (K): Non-intervention group ($n = 7$).

Group II, Torsion + Detorsion Group (T + D): 3 hours detorsion after 3 hours of torsion ($n = 7$).

Group III, Torsion + Detorsion + Silymarin Group (T + D + SIL): given 250mg / kg Silymarin 30 minutes before detorsion intraperitoneally ($n = 7$).

Group IV, DMSO Group (DMSO): The subjects were treated with 10% DMSO i.p. ($n = 7$).

Group V, Silymarin Group (SIL): The subjects were treated with Silymarin ($n = 7$).

At the end of the experiment, the ovarian tissues were obtained from the subjects by surgical method. H & E, masson's tricom and PAS were performed, TUNEL and active caspase-3 staining for apoptosis determination. In the experiment, GPx and MDA levels were examined biochemically from tissue homogenates for the ischemia-reperfusion model. IMA levels were also measured in the serum of the blood taken from the tail veins of the subjects. In addition, the tissues of the TEM were examined ultrastructurally. Differences between the groups were evaluated statistically by Kruskal Wallis, Mann Whitney-U test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results:

As a result of the damage score; There was a significant decrease in damage in T + D + SIL, DMSO and SIL groups compared to T + D group and a significant decrease in damage in T + D group and T + D + SIL groups compared to control group. DMSO and SIL groups were observed to be significantly reduced in damage compared to the T + D + SIL group.

As a result of evaluation of connective tissue increase; when compared with the T + D group, the control group showed a statistically significant increase in the T + D group.

There was no statistically significant difference between the groups in zona pellucida thicknesses.

As a result of TUNEL staining; There was a statistically significant increase in the number of apoptotic cells in the T + D group compared to the control group, a statistically significant decrease in the number of apoptotic cells in the T + D + SIL group, the DMSO group and the SIL groups and in the 3 groups compared to the T + D group It was observed.

T + D + SIL group; A statistically significant increase in the number of apoptotic cells was observed in the DMSO group when compared to the DMSO group.

As a result of active caspase-3 staining; the T + D group showed a statistically significant increase in active caspase-3 positive cell density in the T + D group when compared with the control group; When T + D + SIL, DMSO, and SIL groups were investigated, it was observed that there was a statistically significant decrease in the active caspase-3 positive cell density in all three groups.

As a result of the biochemical evaluations made; compared with T + D group, T + D + SIL and SIL groups, MDA levels decreased statistically significantly in both groups.

As a result of antioxidant defense mechanism measurements; When compared with the T + D group, the control group showed a statistically significant decrease in GPx level in the T + D group.

After IMA measurements, there was a statistically significant increase in IMA level in all three groups when control group compared with T + D group, T + D + SIL group and DMSO groups. When T + D group compared with T + D + SIL, DMSO and SIL groups, it was observed that there was a statistically significant decrease in IMA levels in all three groups. When T + D + SIL group compared with the SIL group; it was observed that there was a statistically significant decrease in the IMA level in the SIL group. When DMSO group compared with the SIL group, it was observed that there was a statistically significant decrease in the IMA level in the SIL group.

Conclusion:

In our study, we observed that an increases in apoptotic cells and MDA levels in the tissue due to ischemia-reperfusion injury and oxidative stress, could be reduced by giving silymarin before reperfusion. We believe that advanced forms of silymarin prepared in nanoparticle sizes, may be a clinically feasible method.

Key Words: Ovary, Torsion-Detorsion, Ischemia-Reperfusion, Silymarin.

1. GİRİŞ VE AMAC

Adneksiyal torsiyon, zor tanı konabilen ve sıklıkla tuba uterina, ovaryum ve yardımcı yapıların tek tek ya da hep birlikte meydana getirdiği bir olgu olarak bilinen(1), nadir görülen, ancak kadınlardaki karın ağrısının en önemli nedenlerindendir. Görülme sıklığı günümüzde % 2, 7 dir ve jinekolojik acil cerrahi sıralamasında 5. sırada yer almaktadır. İlk olarak 1748 yılında Morgagni, 1850 yılında ise Rokitansky tarafından tanımlanmıştır(2).

Gebelik esnasında görülme sıklığı 1/5000'dir. Over torsiyonlarının çoğu ya gebelikte ilk trimestirda ya da lohusalıkta meydana gelmektedir. Gebelik esnasında meydana gelen akut abdominal ağrıda ilk olarak over torsiyonu akla gelmelidir. Erken tanı ve tedavi, anne ve bebek açısından hayati önem taşımaktadır(3).

Over torsiyonu çoğunlukla doğurganlık çağındaki kadınlarda görülmekle birlikte daha az sıklıkla 1-20 yaş arası kadınlarda 10000 de 4,9 sıklıkla görülmektedir (4).

İskemi, adneksin bükülmesinin bir sonucudur. Uterin ve ovaryan arterlerin terminal dallarının anastomozlarından beslenen adneksiyal sirkülasyonun kesilmesi ile sonuçlanan bir süreçtir. Arterial kan akımının kesilmesi adneksiyal torsiyonun ilk sonucu ya da ödeme bağlı venöz akımda kesilme ikincil sonucu olabilir. Tedavi edilememesi durumunda iskemi sonucu ovaryumda, tuba uterinada ya da adneksin tümünde nekroz meydana gelir. Nekroz, ovaryum ya da adneks kaybına ve bunu takiben genç hastalarda fertilite problemlerine yol açacaktır (2). Adneksiyal torsiyona neden olan faktörlerin tartışılması gerekmektedir. Adneksler sağlıklıysa buna malformasyon ya da utero-ovaryan ligamentin uzunluğu neden olmaktadır. Adnekslerdeki ağırlık artışı da buna neden olabilir. Yani ovaryan kistler ve çoğunlukla dermoid kistler, adneksiyal torsiyona yatkınlıkta önemli etkenlerdir. Comerci ve arkadaşları benign kistik teratomlu 517 hastada torsiyon sıklığını %3,5 bulmuştur. Benign ovaryan kistler, ovaryan kanserlerden daha çok torsiyona neden olmaktadır. Çünkü, ovaryan tümörler endometriomalarla birlikte komşu dokulara yapıştıkları için göreceli daha az adneksiyal torsiyona neden olmaktadır.

Paratubal kistlerin varlığı da tuba uterininin torsiyonuna ya da adneksiyal torsiyona neden olmaktadır. Benzer şekilde hematosalpinks, hidrosalpinks ya da gebelik de tuba uterininin tek başına torsiyonu için risk faktörüdür.

Tüp ligasyonunda adneksiyal torsiyon riski artmaktadır. Bu durumda tubal torsiyon riski değişik mekanizmalarla artmaktadır. Tubanın gevşekliğinin artmasıyla oluşan elektrokoagülasyonun neden olduğu mezosalpinks hasarı torsiyon ile sonuçlanabilir. Gebeliğin

ilk trimesterinde de torsiyon riski artmaktadır. Houry ve Abbott, adneksiyal torsiyonlu 87 gebe hastada bu oranı % 13,7 olarak bulmuşlardır. Bunun da etiolojisinde korpus luteum kistlerinin bulunuşu yatmaktadır.

Ovaryan stimölasyon da adnekslerin ağırlığında ve hacminde artışa neden olduğundan, bilateral adneksiyal torsiyonun etiolojisinde önemli rol oynamaktadır. Roest ve arkadaşları IVF döngüsündeki 2495 hastada adneksiyal torsiyon oranını % 0,8 bulurken, Kemman ve arkadaşları ovaryan stimölasyon uygulanmış 648 gebede bu oranı % 0,6 bulmuşlardır.

Günümüzde, ameliyat öncesi adneksiyal torsiyon tanısı koyabilecek güvenli bir yöntem bulunmamaktadır. Ameliyattan önce vakaların % 23- 60 kadarına doğru tanı konabilmesi gerçekten de çok verimsiz görünmektedir. Doppler tanıyı geciktirirken, ultrasound da tek başına yeterli olmamaktadır. Eksik tanı korkusuyla yapılmış gereksiz laparoskopilerde artış sonucu bazı hastalara da müdahalede gecikilince, adneksiyal nekroz ve komplikasyon riski artmaktadır. Laparoskopi ile cerrahi tedavi günümüzde standart hale gelmiştir (5).

Erken tanı konamadığında genç hastalarda over kaybına bağlı infertiliteye neden olmaktadır. Daha nadir olarak yanlış ya da gecikmiş tanı, ölümcül tromboflebit ya da peritonite neden olabilmektedir (5).

Over torsiyonunun tedavisi tartışmalıdır. Ağırlıklı olarak konservatif tedaviyi: özellikle detorsiyonu takiben kist drenajı ya da kistektomiye savunan çalışmalar artmaktadır. (4)

Klinik uygulamalarda nekrozun tanımlanmasında, kreatinin kinaz ve troponin gibi bazı serum markırları kullanılmaktadır. Ancak iskemi için klinik tanıyı kolaylaştıracak bir laboratuvar testi bulunmamaktadır (6).

IMA, iskemi ve enflamasyonla ilişkili durumlarda oluşan bir belirteçtir. İskemik vakalarda Reactive oxygen species (ROS) un ve serbest radikallerin oluşumu ile birlikte, albüminin terminal kısmında geçici bazı değışiklikler meydana gelir. Bu durum düşük yoğunluklu kobaltın bağlanma kapasitesini ve miktarını arttırabilir. Pek çok iskemik vakada kan IMA düzeyi, yeni bir miyokardial iskemi belirteci olarak önerilmektedir (7).

Sıçanlarda yapılan son çalışmalar, ovaryum detorsiyonunun tek başına fertilite problemlerini çözemediğini göstermiştir. Detorsiyon operasyonu öncesi, ovaryum rezervlerinin korunması amacıyla antienflamatuar ve antioksidan ajanlar kullanılmıştır. Ne yazık ki deneysel çalışmalarda kullanılan ilaçların hiç biri klinikte ovaryum torsiyonu vakalarında kullanılamamıştır. İdeal ilaç, torsiyon detorsiyon cerrahisi arasındaki kısa süreçte etkili olabilmeli ve insanda parenteral olarak güvenilir bir şekilde kullanılabilir olmalıdır (8).

Silymarin, silybum marianum bitkisinin tohumlarından elde edilen ve yaklaşık olarak % 65-80 oranında Silymarin kompleksi, az miktarda flavonoidleri, yaklaşık olarak %20-35 oranında yağ asitlerini ve diğer polyphenolik yapıları içermektedir. Silymarin çoğunlukla karaciğer üzerinde etkili antioksidan ve kemoprotektiftir. Karaciğer hücrelerinin yanında, böbrek ve immun sistem hücreleri ile fibroblastlar, keratonsitler ve endotelial hücreler üzerinde de toksik ajanlara karşı duyarlı olduğu ispatlanmıştır (9).

Reperfüzyon hasarının önlenmesi iskemi tedavisinin başarısını daha da arttıracaktır. Biz de bu hipotezden yola çıkarak farklı çalışmalarda antioksidan etkisi gösterilmiş olan Silymarin'in daha önce hiç çalışılmamış olan ovaryum iskemi-reperfüzyon hasarındaki koruyucu etkisini ortaya koymayı amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryum

Dişi genital sistemi, iç genital organlar ve dış genital organlardan meydana gelmektedir. İç genital organlar; iki ovaryum, iki tuba uterina, uterus ve vaginadır. Dış genital organlar ise mons pubis, klitoris, labia minör ve labia majörler, vestibüldür. Meme bezleri de dişi üreme sisteminin hormonal aktivitesi ile ilişkili olarak dişi genital sisteminin bir parçasıdır.

2.1.1. *Ovaryum Anatomisi*

Ovaryumlar iri badem büyüklüğünde bir çift organdır, yanlardan basılmış oval biçimdedir. Erkekteki testislerin karşılığıdır. Yunanca bir terim olan oophoron ile tanımlanan ovaryum, dişi genital organların merkezinde yer alır. Pelvis minor'un dış yan duvarında bulunan fossa ovarica (Krause çukuru) adı verilen çukura yerleşmiştir. Fossa ovarica, arteria iliaca externa ile arteria iliaca interna arasında bulunur. Bu çukuru aşağı ve ön taraftan ligamentum latum uterin tabanı, yukarıdan arteria iliaca externa ve arkadan da üreter sınırlar. Fossa ovaricanın tabanını peritoneum örter. Peritoneumun altından, arteria ve vena obturatoria ile nervus obturatorius geçer (10).

Ovaryumlar doğum yapmış kadınlarda ligamentum latum uterin gevşesi sonucunda biraz arkaya ve aşağıya doğru yer değiştirebilirler. Üreterin arkasında, pelvis arka duvarının önünde ve plica rectouterina'ların dış yanında yer alan fossa pararectalis de denilen Claudius çukuruna yerleşirler. Tuba uterina'ların arka ve aşağı bölümünde bulunan ovaryumlar ligamentum latum uteri içinde bulunurlar ve uzun eksenleri vertikale yakındır (11). Ovaryumlar pembemsi gri renktedir. Yüzeyleri düz ve parlak olup, puberteye kadar peritoneum ile örtülüdür. Puberteyle birlikte peritoneum özelliğini kaybeder ve matlaşır, ovulasyon ve doğurmaya bağlı olarak yüzeyleri pürüzlü bir görünüm alır (12).

Kıvamı oldukça katıdır. Bu özelliği nedeniyle de vaginal tuşede çevresindeki organlardan kolayca ayırt edilebilir. Her bir ovaryum yaklaşık 4 cm uzunluğunda, 2 cm genişliğinde ve 0,8 cm kalınlığındadır. Ağırlığı da 3 ila 5 gram kadardır (10,11).

Ovaryumların biri dış (facies lateralis) , diğeri iç (facies medialis) olmak üzere iki yüzü, extremitas tubaria ve extremitas uterina olmak üzere iki ucu, margo liber ve margo mesovaricus olmak üzere de iki kenarı vardır (11,12).

Facies lateralis fossa ovarica'yı örten peritoneum parietale'ye oturur. İç yüze nazaran daha az konvektir. Facies medialis pelvis boşluğuna bakar ve daha konvektir. Facies

medialis'in ön bölümü mesosalpinx ile orta bölümü ince barsak ve colon sigmoideum ile, arka bölümü ise infundibulum tubae uterinae ile komşuluk yapar (10,12).

Extremitas tubaria (üst uç) tuba uterina'nın infundibulum bölümüyle komşudur. Vena iliaca externa'ya komşu olan extremitas tubarya, fimria ovarica ile ligamentum ovarii suspensoriuma tutunur. Ligamentum ovarii suspensorium, iliak damarların ön tarafında yukarı doğru uzanan bir periton plikası olup içinde arteria ve vena ovarica ile plexus ovaricus bulunur. Extremitas uterina(alt uç) organı uterus'a bağlar. Bu uç ligamentum ovarii proprium aracılığı ile uterus'un cornu uterisine tutunur (12).

Margo liber (arka kenar) serbest ve hareketli olması nedeniyle bu adı alır. Ön kenara oranla daha konveks ve künt olan bu kenar üreter, arteria ve vena iliaca interna ile komşuluk yapar. Margo mesovaricus (ön kenar) arka kenara oranla daha incedir ve hilum ovarii'yi içerir. Bu kenara ligamentum latum uteri'nin bir bölümü olan mesovarium tutunur (10,11,12).

Ovaryum'un Bağları

I. Mesovarium

Ligamentum latum uterinin arka yaprağı olup margo mesovaricus'a tutunur. Mesovarium'un iki yaprağı arasında bulunan damar ve sinirler hilum ovarii'den girer ve çıkarlar (Şekil 1).

II. Ligamentum ovarii proprium

Ovaryumun alt ucunu fundus uteri'nin yan köşesine bağlar. Embriyonal dönemdeki gubernaculum'un üst bölümünün kalıntısıdır. Yaklaşık 2-3 cm uzunluğunda ve 2-3 mm kalınlığındadır. Ligamentum latum uteri'nin iki yaprağı arasında bulunması ve arka kıvrımını oluşturması nedeniyle önemli bir ligamenttir. İçerdiği az miktarda düz kas lifleri ve elastik lifler nedeniyle uzunluğu değişebilir.

III. Fimbria ovarica

Ovaryumun üst ucundan başlar ve ovaryumun tuba uterina'ya tutunmasını sağlar. Tuba uterina'nın fimbriyalarının en uzunudur. Fimbria ovarica, karın boşluğuna atılan oosit II' nin yakalanıp tuba uterina'ya ulaştırılmasından sorumludur.

IV. Ligamentum suspensorium ovarii

Ovaryum'u pelvis yan duvarına bağlayan bir periton katlantısıdır. Bu periton plikası, yukarıdan aditus pelvisten başlar, aşağıya doğru uzanır ve ovaryumun üst ucuna tutunur. Bu bağ, ilerleyişi sırasında musculus psoas major, arteria ve vena iliaca externa ile üreter'i önden çaprazlar. Düz kas lifleri ve elastik lifleri içeren bu bağ içinde arteria ve vena ovarica ile plexus

ovaricus bulunur. Bu plikanın içinde aorta abdominalis'den çıkan arteria ovarica, plexus coeliacus'tan gelen ve arteri saran plexus ovaricus ile vena ovarica ve lenf damarları bulunur. Bu damar ve sinirler bağı güçlendirir.

Bu ligamentlerden mesovarium ve ligamentum suspensorium ovarii, ovaryumu yerinde tutan en önemli bağlardır. Çeşitli yönlerde uzanan bu üç elastiki bağ aracılığı ile ovaryum kavitas pelvis içinde hiçbir yönden fazla çekme etkisi altında kalmadan asılı bir durumdadır. Bağların elastikiyeti ovaryuma gerektiğinde pozisyonunu değiştirme ve tekrar normal durumuna dönme olanağını sağlaması açısından gebelikte özellikle önemlidir.

Mesovarium'un ve ligamentum suspensorium ovarii'nin anormal uzun olması, ovaryum torsiyonuna yol açabilir. Torsiyone olan organın kan damarlarındaki baskı iskemiye, özellikle üst torakal ve alt lumbal dermatom alanlarında ağrıya yol açar (10,11,12).

Ovaryum'un Damarları

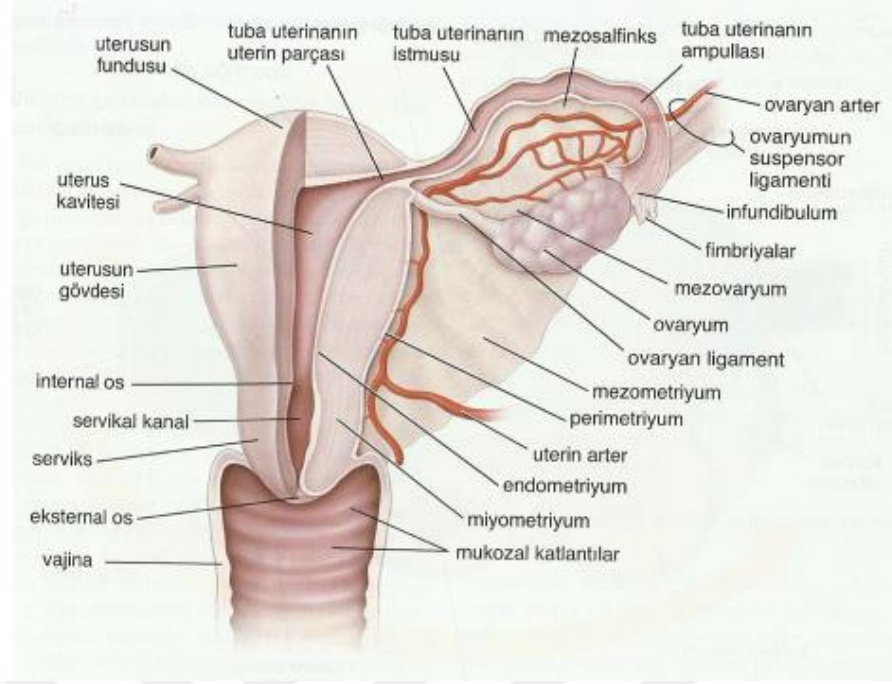
Arterleri: Aorta abdominalis'ten çıkan arteria ovarica'lardır. Arteria ovarica'lar, pelvise ligamentum suspensorium ovarii içinde gelirler. Ovaryumun ikinci kan desteği olan uterin arterlerle, ovaryan arterler anastomoz yaparlar, hilum ovarii'den ovarium'a girerler ve foliküller etrafında ağlar oluştururlar.

Venleri: arterleri izleyerek hilum ovarii'den çıkarlar. Venler plexus pampiniformis denilen venöz ağı, daha sonra da birbirleriyle birleşerek vena ovarica'yı oluştururlar. Sol tarafa ait vena ovarica, vena renalis sinistra'ya, sağ tarafa ait olan ise vena cava inferior'a dökülür.

Lenf drenajı: Kan damarları ile birlikte uzanırlar ve nodi lymphatici preaortici ve nodi lymphatici aortici lateralis'lere açılırlar.

Ovaryum'un Sinirleri

Plexus hypogastricus inferior (plexus pelvicus) ve arteria ovarica çevresindeki plexus ovarica'dan gelir. Sempatik lifler, nervus splanchnicus minor ve medulla spinalis'in torakal segmentlerinden gelirken, parasempatikleri ise nervus vagus aracılığı ile gelirler (10,11,12).



Şekil 1: Dişi genital sistemi genel görüntüsü (13).

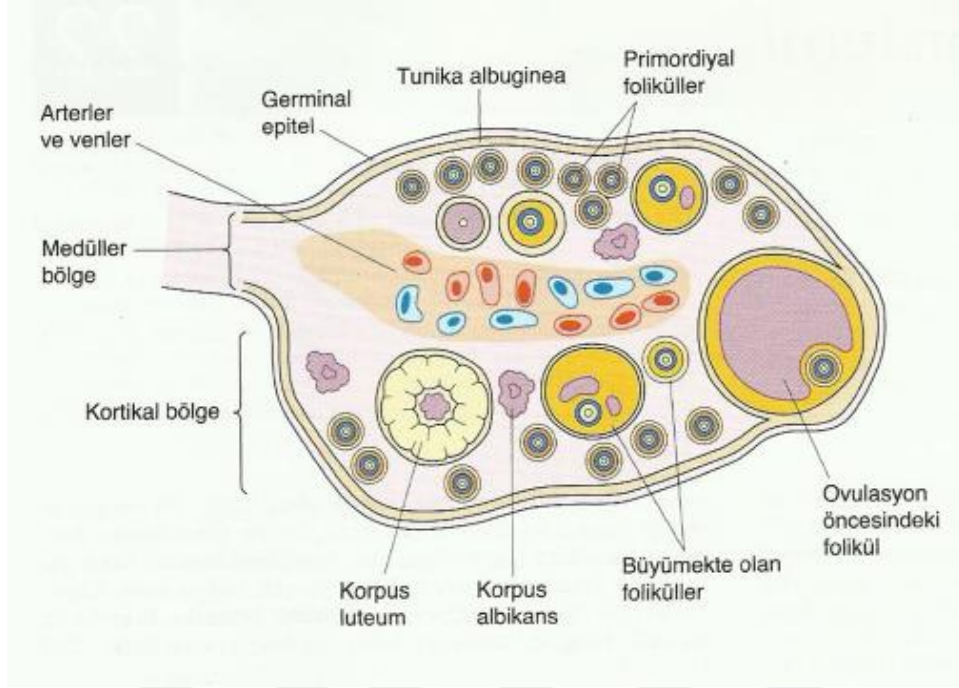
2.1.2. Ovaryum Histolojisi

Ovaryum, ovulasyon döngüsü boyunca yeniden biçimlenen dinamik bir organdır. Foliküllerin olgunlaşması, ovulasyon sırasında oositin serbest bırakılması ve korpus luteumun oluşması, hücre dışı matriksin ve vaskülarizasyonun sıkı kontrolü altında gerçekleşmektedir (14).

Ovaryumlar, pembemsi gri renkte bir çift organdır. Hem endokrin hem de ekzokrin fonksiyonları bulunmaktadır. Endokrin fonksiyonu steroid hormonlardan östrojen ve progesteron hormonlarını salgılaması, ekzokrin fonksiyonu ise oosit II yi üretmesidir.

Ovaryumun yüzeyi, gençlerde tek katlı kübik, yaşlılarda ise tek katlı yassı epitel hücreleri ile kaplıdır. Epitelyum germinativum adı verilen bu yapı geçmişte bu bölgeden germ hücrelerinin yapıldığı düşünülmekteydi. Epitelyum germinativum'un hemen altında sıkı bağ dokusu yapısındaki tunica albuginea bulunmaktadır (Şekil 2).

Ovaryum, korteks ve medulla olmak üzere iki bölümden meydana gelmektedir. Korteks, bağ dokusu içerisine yerleşik değişik gelişme aşamalarındaki folikülleri içermektedir. Medulla ise ovaryumun merkezini oluşturan gevşek bağ dokusu yapısındadır ve bol miktarda kan damarı, lenf damarı ve sinirleri içerir (13, 15).



Şekil 2: Ovaryum'un şematik görüntüsü (15).

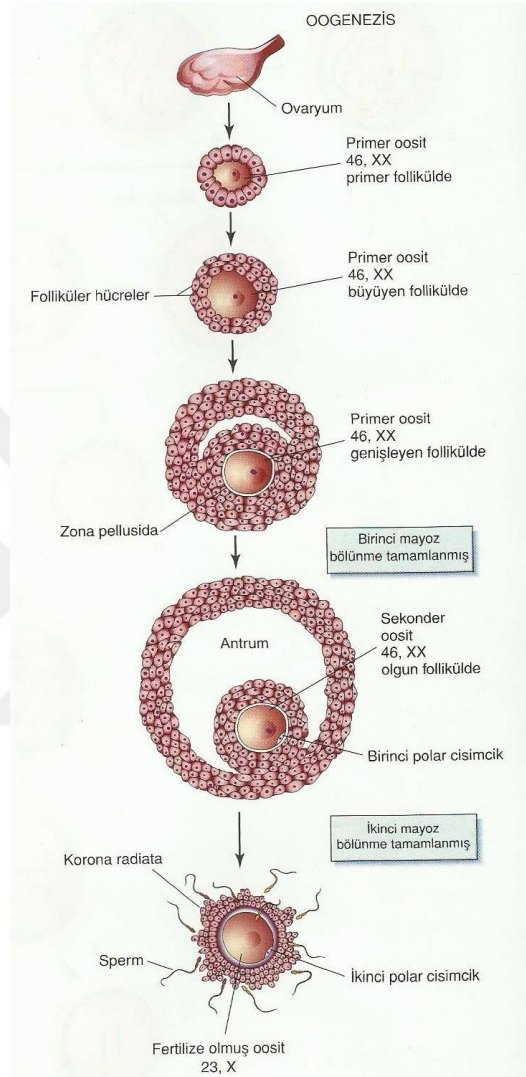
2.1.2.1. Oogenezis

Oogenezis doğum öncesi dönem ve doğum sonrası dönem olmak üzere iki bölümde incelenir.

Doğum Öncesi (Prenatal) Olgunlaşma: İlk germ hücreleri dışide gonadlara ulaşır ulaşmaz oogonyumlara farklılaşmaktadır. Mitotik bölünmeler geçirerek çoğalan oogonyumlar, 3. ayın sonunda kümeler halinde dizilip, yassı epitel hücreleri ile çevrelenir. Oogonyumların etrafındaki yassı epitel hücreleri follikül hücreleri olarak adlandırılırlar ve yüzey epitelinden köken alırlar. Oogonyumların büyük bir çoğunluğu mitoz bölünmeye devam ederken bir kısmı da I. Mayoz bölünmenin profaz evresinde kalarak primer oositlere farklılaşır. 3. Aydan itibaren oogonyumların sayısında artış meydana gelir ve gelişimin 5. ayında üreme hücrelerinin sayısı 7 milyona ulaşır. Oogonyum ve primer oositlerin birçoğu atreziye uğrar. Geriye kalan primer oositlerin tümü I. Mayoz bölünmenin profaz evresine girmiştir ve etraflarını tek katlı yassı epitel hücreleri sarmıştır (13, 16, 17, 18).

Doğum Sonrası (Postnatal) Olgunlaşma: Primer oositlerin tümü doğumda I. Mayoz bölünmenin profaz evresinin diploten aşamasında bulunmaktadır. Bu aşamada primer oosit'in çekirdek kromatinini seyrek ve düzensiz bir yapılanma gösterir. Dinlenme evresine giren primer oositler puberteye kadar dinlenme evresinde kalır. I. Mayoz bölünmelerini tamamlayamazlar. Primer oositlerin sayısı doğumda ovaryumlarda 600 bin ile 800 bin arasındadır (Şekil 3).

Puberteye kadar büyük bir çoğunluğu atreziye uğrayarak 400 bin'e kadar düşer. Geri kalanlar atretik foliküllere dönüşür. Ovulasyon menapoza kadar devam eden bir süreç olduğundan oositlerin bazıları 30 ila 40 yıl kadar I. Mayoz bölünmenin profaz evresinde beklerler. Reprodüktif yaşam boyunca yaklaşık 400 oosit ovaryumlardan atılmaktadır (13, 16, 17, 18).



Şekil 3: Oögenezis (17).

2.1.2.2. *Folikülogenezis*

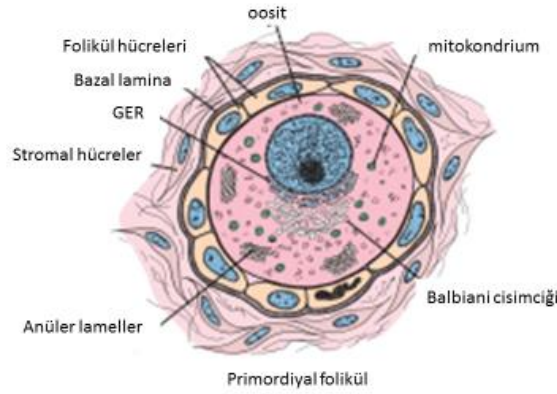
Folikülogenez, büyüyen foliküller havuzuna primordiyal bir folikülün alınmasıyla başlar atreziyle ya da ovulasyonla sonuçlanır. Kadınlarda folikülogenezis, primordiyal folikülün büyümesi ve ovulasyon evresine gelmesi için uzun bir süre gerektiren süreçtir. Folikülogenezis iki faza ayrılabilir. Preantral veya gonadotropin bağımsız faz olarak adlandırılan ilk faz ki bu faz oositin büyümesi ve farklılaşması ile karakterizedir. Antral veya gonadotropin bağımlı faz olarak adlandırılan ikinci faz ise folikül büyüklüğünün muazzam artışıyla karakterizedir. İkinci faz, FSH (Folikül stimulan hormon) ve LH (Luteinizan hormon) ile büyüme faktörleri tarafından düzenlenir. Büyüme faktörleri önemlidir çünkü, hücre proliferasyonunu uyarabilirler ve gonadotropin etkisini kontrol edebilirler. Folikülogenez süreci, ovaryum korteksi içerisinde gerçekleşir (19).

Kortekste yer alan ovaryum folikülleri 3 tiptir. Bunlar:

- Primordiyal foliküller,
- Büyümekte olan foliküller,
- Olgun ya da Graaf folikülleridir.

Primordiyal foliküller: Primordial foliküller ovaryumdaki temel üreme birimleri olarak düşünülebilir. Primordiyal folikül havuzunun boyutu, kadınların üreme potansiyelini belirler ve bu havuz spesifik genlerin ifadesine büyük ölçüde bağımlıdır. Bazal lamina sayesinde, folikül hücreleri ve oosit, diğer hücrelerle doğrudan temasın gerçekleşmediği bir mikro ortamda bulunur. Primordial foliküllerin bağımsız bir kan dolaşımı yoktur ve bu nedenle endokrin sistemle sınırlı bir iletişim içerisindeyler. Primordiyal folikülün gelişimi için hipofiz gonadotropinleri kesinlikle gerekli değildir, çünkü primordiyal foliküllerden primer folikül oluşumu hipofizektomize hayvanlarda da meydana gelmektedir (19, 20).

Olgun bir ovaryumda kortekste tunika albuginea'nın hemen altında yer alırlar. Oosit'in etrafı tek katlı yassı epitel ile çevrilmiştir (Şekil 4). Primordiyal folikülün içerisinde yer alan oosit 1 mayoz bölünmenin profaz aşamasında arreste uğramıştır. Oosit içerisinde elektron mikroskopik görüntülerde Balbiani cisimciği, küçük mitokondriyumlar, annüler lameller ve eksentrik yerleşimli bir nükleus yer almaktadır. Oosit'in çapı yaklaşık olarak 30 µm çapındadır (13).



Şekil 4: Primordiyal folikül (13).

Büyümekte olan foliküller:

Primer foliküller: Primer folikül içerisinde ortaya çıkan başlıca olaylar, oosit büyümesi ve farklılaşmasıdır. Granulosa hücreleri FSH reseptörlerini primer folikül evresinde eksprese etmeye başlarlar. Primer folikül gelişimindeki önemli olaylardan bir tanesi de, oosit ve granulosa hücreleri arasındaki hücre içi bağlantıların gelişmesidir. (19).

Oositin çevresindeki folikül hücreleri proliferasyon olarak kübik epitel dönüşürken üzerine oturduğu stromada da değişiklikler görülmeye başlar. Tek katlı kübik epitel ile çevrili olan bu foliküle **tek katlı (ünilaminer) primer folikül** adı verilir (Şekil 5).

Oosit büyürken özel proteinler salgılayarak etrafında ekstrasellüler bir örtü olan **zona pellusida'yı** (ZP) oluşturur. Zona pellusida 3 farklı glikoprotein içermektedir. Bunlar; ZP1, ZP2 ve ZP3 glikoproteinleridir. Fertilizasyon esnasındaki fonksiyonu açısından en önemlisi ZP2 ve ZP3'tür. Zona pellusida PAS boyası ile PAS + boyanmaktadır. Oosit'in çapı tek katlı primer folikülde yaklaşık olarak 50-80µm'dir.

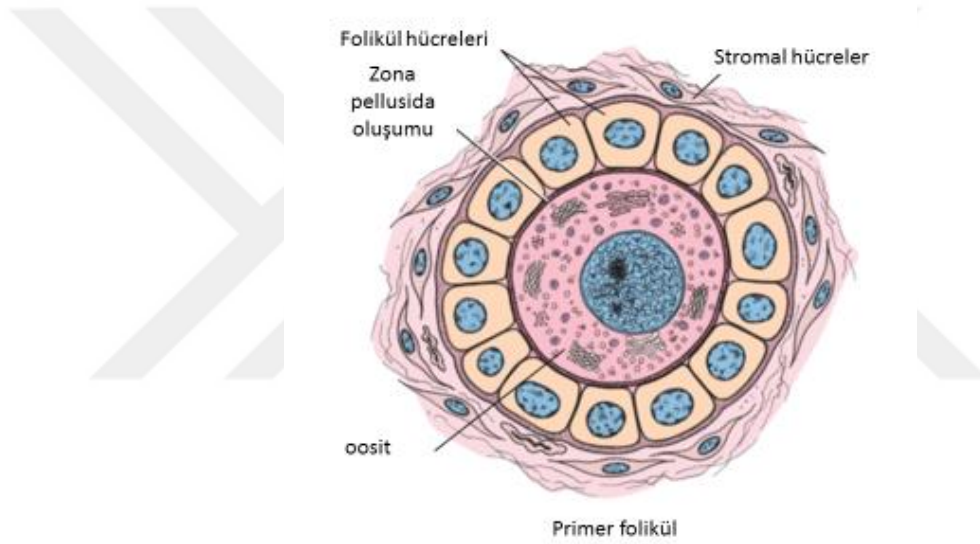
Folikül hücrelerindeki proliferasyon devam ederken oosit'in çapı artar. **Çok katlı (multilaminer) primer folikül, preantral folikül ya da geç primer folikül** adını alan bu folikülde, hücreler birbirleri ile "gap junctionlar" aracılığı ile iletişim kurarlar. Folikül hücreleri granuloza hücreleri olarak adlandırılarak oosit çevresindeki stratum granulozum tabakasını oluşturur (Şekil 6).

Granuloza hücreleri oluşurken bir yandan da çevresindeki stromada teka folikülü denen bağ dokusu hücre kılıfı oluşmaya başlar. Granuloza hücreleri ile teka tabakası arasında da bazal

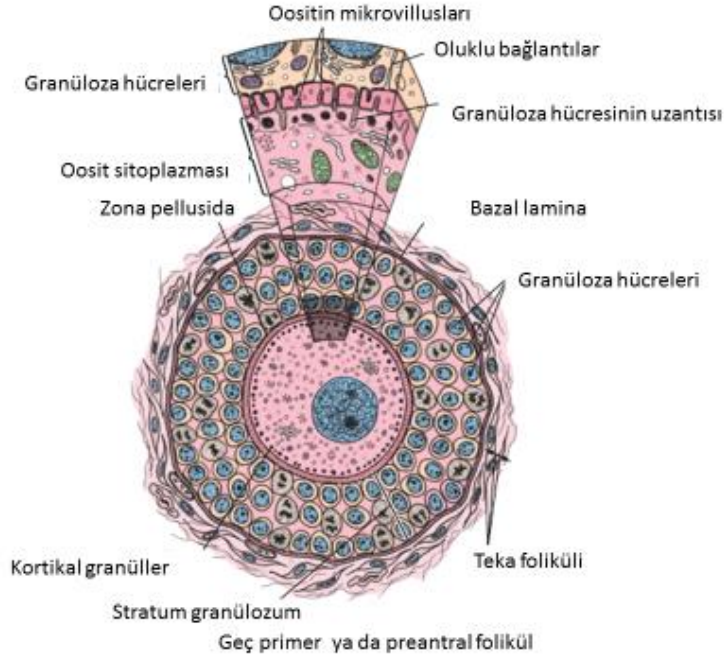
membran yer almaktadır. Bu kılıf iki tabakaya farklılaşarak; *teka interna* ve *teka eksterna*'yı oluşturur (13, 21, 22).

Teka interna: Kübik, salgı hücrelerinin oluşturduğu oldukça vaskülarize olan iç tabaka olup luteinizan hormon (LH) reseptörlerine sahiptir. Luteinizan hormona yanıt olarak östrojenin öncüleri olan androjenleri sentezlerler ve salgırlar.

Teka eksterna: Düz kas hücreleri, az miktarda bağ dokusu hücreleri ve kollajen fibrillerinden oluşan dış tabakadır. Teka interna ile teka eksterna arasındaki sınır belirgin değilken, hücrelerinin morfolojileri farklı olan granüloza hücreleri ile teka interna arasındaki sınır belirgin olarak gözlenmektedir (13).



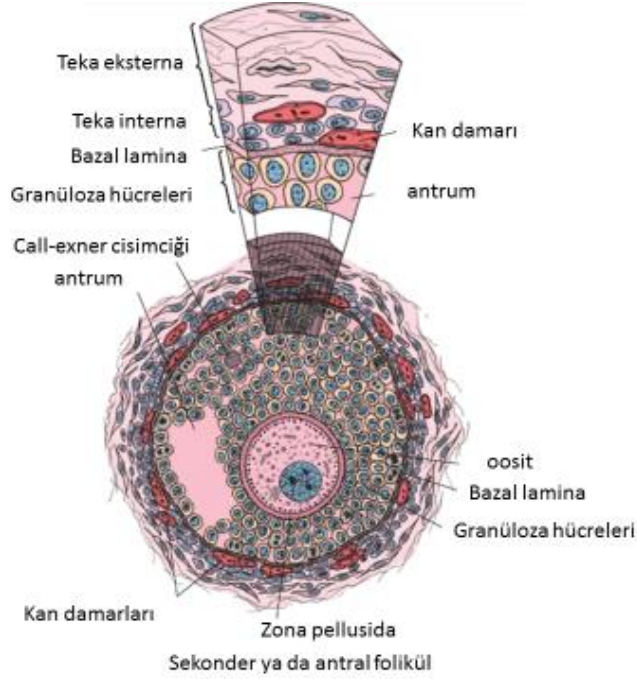
Şekil 5: Unilaminer primer folikül (13).



Şekil 6: Multilaminer primer folikül (13).

Sekonder Folikül: Granüloza hücrelerinin oluşturduğu stratum granulozum tabakası 6-12 hücre tabakası kalınlığına ulaştığında hücrelerin arası *likör folikülü* adı verilen bir sıvı ile dolmaya başlar. *Likör folikülü* aynı zamanda plazma bileşenlerini, glikozaminoglikanları, steroid bağlayıcı proteinleri ve yüksek oranda steroidleri de içermektedir. Hyaluronan açısından da zengin sıvı ile dolan folikülün içinde antrum denilen boşluklar oluşmaya başlar. (19, 23).

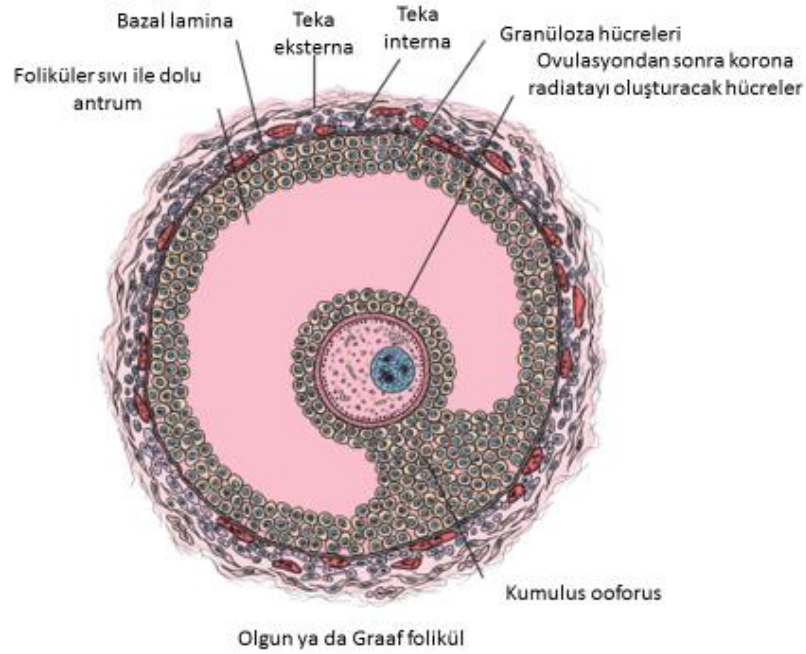
Sekonder foliküle, antral folikül de denmektedir (Şekil 7). Oosit çapı 125 μm 'ye ulaştığında oosit maturasyon inhibitörü (OMI)'nin etkisiyle oosit daha fazla büyümmez. Folikül çapı ise 0,2 mm ile 1cm arasında değişmektedir (13).



Şekil 7: Sekonder folikül (13).

Tersiyer ya da Graaf folikül: Sekonder folikül büyümeye devam ettikçe ovaryumun yüzeyine doğru bir çıkıntı oluşturur ve granüloza hücrelerindeki mitotik aktivite azalır. Antrumun boyu arttıkça granüloza hücreleri de incelmeye başlar. Granüloza hücreleri oosit ile ilgili kısımda bir tepecik oluşturur. Bu tepeciğe **kumulus ooforus** adı verilmektedir. Oositin çevresindeki granüloza hücreleri ise **korona radiata** adını alır. Folikül çapı 1,5-2cm arasındadır. Bu aşamadaki foliküle tersiyer, Graaf ya da olgun folikül adı verilmektedir (Şekil 8).

Olgun foliküldeki teka tabakaları daha belirgin olarak gözlenmektedir. Teka interna hücrelerinde lipid damlacıkları görülür. Bu hücreler steroid hormon sentezleyen hücrelerdeki ultrasrütürel özelliklere sahip olurlar. Luteinizan Hormon (LH) teka internadaki hücrelerden östrojen öncüleri olan androjenlerin salgılanmasını stimüle ederken, granüloza hücreleri Folikül Stimulan Hormon (FSH)'a yanıt olarak, androjenlerin östrojene dönüşümünü sağlarlar (13).



Şekil 8: Olgun ya da Graaf folikül (13).

2.1.2.3. Folikül Atrezisi

Embriyonik olarak farklılaşmaya başlayan ovaryum foliküllerinin çok az bir kısmı olgunlaşmalarını tamamlayabilir. Büyük bir kısmı ise, atreziye uğrar. Foliküller gelişimlerinin herhangi bir aşamasında atreziye uğrayabilirler. Atrezi programlanmış hücre ölümüdür. Apoptozis yani programlı hücre ölümü, dişilerde ovaryum fonksiyonları ve gelişimi için gerekli bir süreçtir. Primordiyal foliküllerde ve gelişmekte olan foliküllerde atrezi süresince oosit küçülür ve dejenere olur. Bu olay granüloza hücrelerinde de meydana gelir ve granüloza hücreleri bazal laminadan ayrılır. Zona pellusida, şişerek belirginleşir, bazal lamina kalınlaşıp daha görünür hale gelir ve atrezinin son döneminde teka hücreleri dejenere olarak yerini bağ dokusuna bırakır. Daha sonra ise kalıntılar makrofajlarla fagosit edilirler (13, 15, 21, 24).

2.1.2.4. Ovulasyon Ve Korpus Luteum

Sekonder oosit'in Graaf folikülden atılmasına ovulasyon denir. 28 günlük menstrüal siklusun 14. gününde meydana gelir. Ovulasyonla atılacak olan oosit bir grup primer oosit içerisinde seçilir. Her siklusta yalnızca bir tane sekonder oosit atılır. Nadiren de olsa tam olgunluğa ulaşmış diğer foliküllerden de oosit atılabilir ya da ovulasyon gerçekleşmeyebilir. Ovulasyonun gerçekleşmediği siklusa *anovulatuvar siklus* adı verilir. Ovulasyonun

gerçekleşmesi için gerekli olan östrojen granülosa hücreleri tarafından salgılanır. Östrojene yanıt olarak hipofizden salgılanan LH seviyesinde ani bir artış meydana gelir. Kan LH düzeyindeki artış ile ovaryumun kan akışında bir artış meydana gelir ve plazma proteinlerinin *kapiller ve postkapiller venüllerden* sızmasıyla ödem oluşur. *Prostoglandinler, histamin, vazopressin ve kolajenaz* lokal olarak salgılanır. Granüloza hücreleri *hiyaluronik asit* artışıyla gevşek bir hal alır.

Ovulasyon esnasında foliküler sıvının hacmi artar, folikül duvarı aktive plazminojen tarafından proteolize uğrar. Oositin çevresindeki kumulus ooforus hücreleri ile granülosa hücreleri arasında glikozaminoglikanlar birikir ve teka eksterna tabakasındaki düz kas lifleri prostoglandinlerin etkisiyle kasılır.

Ovulasyondan hemen önce Graaf folikülün ovaryum yüzeyine çıkıntı yapan bölümünde iskemi meydana gelir. Bu bölgeye *makula pellusida* ya da *stigma* adı verilmektedir. Oosit, etrafındaki kumulus ooforus ve korona radiata hücreleri ile birlikte rüptüre olmuş folikülden periton boşluğuna atılır. Tuba uterina'nın fimbriyaları tarafından tutulan sekonder oosit eğer bir spermatozoon ile karşılaşır II. Mayotik bölünmesini tamamlar.

Ovulasyonun tamalanmasıyla birlikte boşalan folikül içerisinde değişiklikler meydana gelir. Öncelikle teka internadaki kan damarlarından folikül boşluğuna kan dolmaya başlar. Bu aşamadaki korpus luteuma *korpus hemorajikum* adı verilir. Folikül duvarı büzüşerek kıvrımlı bir hal alır. Granülosa hücreleri ve teka hücreleri büyüyerek *granülosa lutein* ve *teka lutein* hücrelerini oluşturup, geçici bir iç salgı bezine dönüşürler.

Ovulasyon sonunda fertilizasyon gerçekleşirse *gebelik korpus luteumu* oluşur ve gebeliğin 4. ayının sonlarına kadar progesteron sentezlemeye devam eder. Fertilizasyon gerçekleşmesse *menstruasyon korpus luteumu* oluşur ve 14 gün aktif kalır. Korpus luteum en son *korpus albikansa* dönüşüp korteksin derinliklerinde birkaç ay içinde yok olur (13, 15, 21, 25) .

2.1.3. Ovaryumun Embriyolojisi

Herhangi bir organ sisteminin gelişmesi ve organ fonksiyonlarının yerine getirilmesi için gerekli olan heterojen hücre ve doku tiplerinin farklılaşması hücrel sinyallerin karmaşık bir şekilde etkileşimini gerektirir. Bu şekilde, bir hücre dışı uyaran, bir dizi etkileşen protein aracısı vasıtasıyla bir hücre içi hedefe iletilir. Sonuçta, hedef hücrenin bir yanıt elde etmesi sağlanır. Şaşırtıcı bir şekilde, embriyogenez boyunca çok az sayıda sinyal yolağı söz konusudur ve tekrar tekrar kullanılır. Gonadogenezis, morfolojik olarak farklı iki organın yani testislerin ve

ovaryumların ortak bir öncü olan iki potansiyel genital kabartıdan kaynaklandığı benzersiz bir süreçtir. Buna göre embriyogenez boyunca gözlemlenen sinyal yollarının çoğunun aynı zamanda memeli cinsiyetinin belirlenmesi ve gonad gelişimi için önemli olduğu gösterilmiştir (26).

Genetik cinsiyet fertilizasyonla belirlenir. Embriyo XX kromozomlarına sahipse gonadın korteksi ovaryuma farklanır. Fertilizasyon esnasında embriyonun cinsiyeti belirlenmiş olmasına rağmen gelişimin 7. haftasına kadar gonadlarda morfolojik olarak bir farklılık yoktur. Bu aşamadaki gonadlar farklanmamış gonadlar adını alır.

Cinsiyetin farklanması çok sayıda genin rol aldığı karmaşık bir süreçtir. Bu süreçte Y kromozomunun kısa kolunda yer alan SRY (Sex-determining region on Y) geni anahtar rol oynamaktadır. SRY geni TDF (Testis belirleyici faktör) olarak da bilinir ve varlığında cinsiyet erkek yönünde, yokluğunda ise dişi yönünde gelişir (27, 28). Gonadlar üç yerden köken almaktadır:

- Mezodermal epitel
- İntermedier mezoderm
- Primordiyal germ hücreleri

Gonadlar, sölomik epitelin çoğalması ve altında yer alan mezenşimin artmasıyla birlikte önce genital kabartılar şeklinde belirirler. Primordiyal germ hücreleri ise 4. hafta başında yolk kesesi duvarında, allontoisin başlangıç yerine yakın olarak endodermal hücreler içerisinde ortaya çıkmaya başlarlar. Son barsak mezenterinin dorsali boyunca hareket ederler ve 5. haftanın sonunda ilkel gonadlara ulaşır, 6. haftada genital kabartılarda birikmeye başlarlar. Primordiyal germ hücreleri, ilkel gonadlara ulaştıklarında genital kabartı epitelindeki artış nedeniyle mezenşim içine gömülürler ve *primitif seks kordonlarını* oluştururlar. Böylece farklanmamış gonatda dışta korteks, içte de medulla oluşur. Kortekste gelişim devam ederken, medulla geriler.

Overler onuncu haftaya kadar morfolojik olarak ayırtedilemezler. *Primitif seks kordonları* medulla içerisine sokulup *rete ovariiyi* oluşturur. Daha sonra kortikal (2. nesil) kordonlar oluşur ve 16. Haftada oluşan bu kordonlar parçalanıp izole hücre kümelerini oluştururlar. Bu hücre kümelerinden ise primordiyal foliküller oluşur. Primordiyal foliküllerin herbiri bir oogonium içermektedir. Postnatal dönemde yeni oogonyumlar oluşmaz ve ovaryumların yüzey epiteli düzleşip tek tabakalı hale gelir ve epitelyum germinativum ismini alır (16, 27).

2.1.4. Ovaryum'un Fizyolojisi

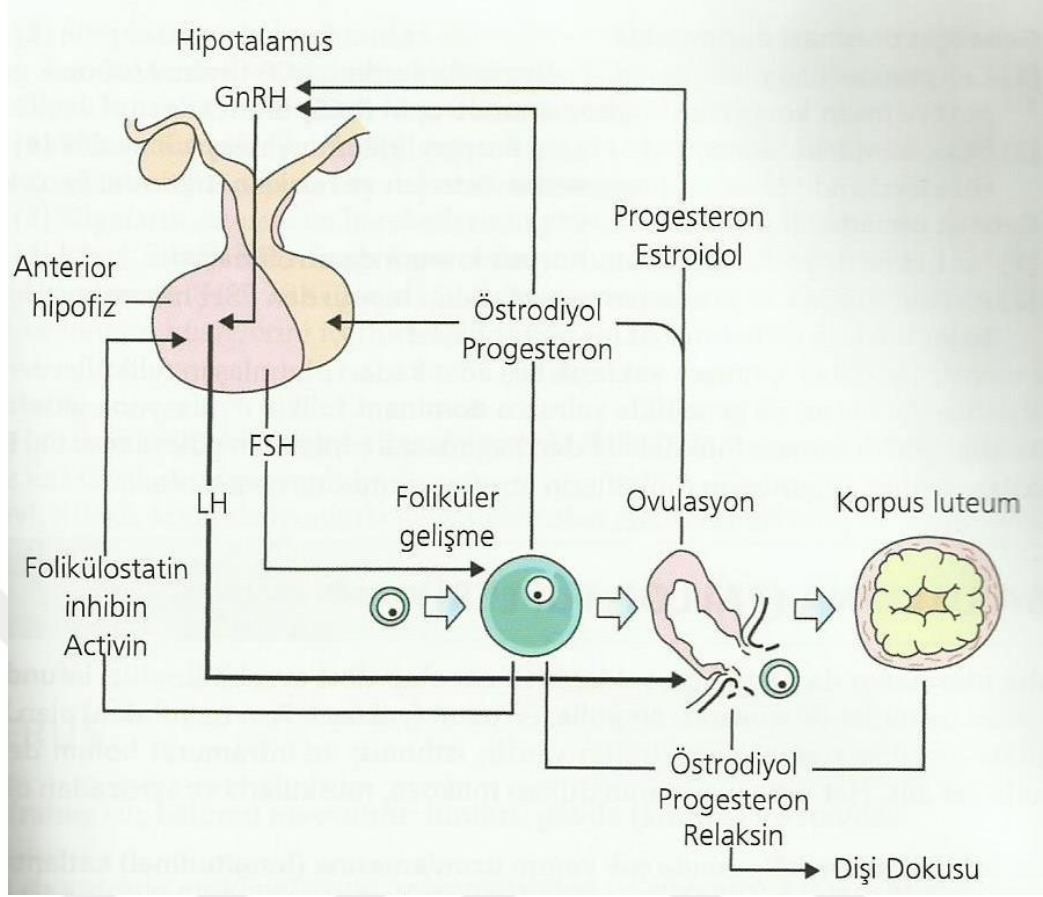
Dişi hormonal sistemi üç hormondan oluşur. Bunlar:

- 1) Hipotalamik serbestleştirici hormon olan GnRH (gonadotropin serbestleştirici hormon)
- 2) GnRH'a yanıt olarak salgılanan ön hipofiz hormonları olan FSH ve LH
- 3) FSH ve LH'a yanıt olarak salgılanan östrojen ve progesterondur.

Hipotalamustan salgılanan GnRH, adenohipofizden; FSH ve LH salgılanmasını aktive eder. FSH sekonder folikülleri olgun foliküle dönüştürmek için uyarırken teka interna hücrelerinin de androjenler salgılamasını sağlar. Bunun yanında FSH, granüloza hücrelerinde LH reseptörlerinin gelişimini, androjenlerin östrojene dönüşümünü, inhibin, aktivin, ve folikülostatinin salgılanmasını sağlar. Ayrıca FSH, östrojen maksimum seviyeye ulaştığında LH salgılanmasında ani bir artışa neden olur. Bu artış primer oosit'in I. Mayoz bölünmesine kaldığı yerden devam etmesine ve sekonder oosit'in II. Mayoz bölünmeye başlamasına ve dolayısıyla ovulasyona neden olur. LH artışı ayrıca, teka interna ve membrana granülozadan korpus luteum oluşumuna neden olur.

Korpus luteumun oluşumuyla birlikte GnRH salgılanması inhibe edilir ve LH'u baskılayan progesteron salgılanmış olur. Korpus luteumdan ayrıca östrojen ve relaksin hormonları da salgılanmaktadır (Şekil 9).

Kadında cinsel döngü ortalama 28 gün sürmektedir ve menstrüel döngü olarak adlandırılmaktadır. Menstrüel döngü sayesinde her ay bir adet sekonder oosit serbest kalır ve uterusun endometrium tabakası fertilize olmuş olan ovum'un implante olması için uygun hale getirilir (29, 30).



Şekil 9: Ovaryum Fizyolojisi (28).

2.2. Ovaryum Torsiyon-Detorsiyonu Ve İskemi-Reperfüzyon Hasarı

2.2.1. Ovaryum Torsiyonu

Sıklıkla adneksiyal torsiyon olarak adlandırılan ovaryum torsiyonu, kadınlarda jinekolojik acil durumlarda beşinci sırayı almaktadır. Genellikle unilateral olarak görülmektedir, nadir olarak bilateral olgulara da rastlanmaktadır. Adneksiyal torsiyon görülme oranı % 2,7'dir. Ovaryum ve fallop tüpünün broad ligament etrafında kıvrılması anlamına gelir.

Yeni doğan da dahil olmak üzere her yaşta görülebilmekle birlikte olguların % 70'i üreme çağındaki kadınlardır. Erken tanı ve tedavi, etkilenen overlerin korunması ve dolayısıyla doğurganlığın korunması açısından önem arz etmektedir. Adneksiyal torsiyona bağlı patoloji iki bölümden oluşmaktadır:

- a) Torsiyon işlemine kadar geçen süre yani iskemi periyodu,

- b) Reperfüzyon yani detorsiyondan sonra reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşturulması (31, 32, 33, 34).

Adneksiyal torsiyonun nedeni tam olarak anlaşılamamakla birlikte patolojik olarak büyümüş ovaryumla ilişkilendirilmektedir. Ovaryum torsiyonunun tanısı, semptomların nonspesifik olması nedeniyle sıklıkla atlanmaktadır. Tipik olarak ovaryum torsiyonu akut abdomen ile karakteristiktir ancak bazı hastalarda hafif aralıklı olarak meydana gelen ağrılar olabilir. Subklinik vakalarda, klinik ve radyolojik tanı zorlaşabilmektedir. Adneksiyal torsiyona maruz kalan hastaların klinik ve patolojik özelliklerinin anlaşılması, tanı ve tedavide klinisyenlere yardımcı olabilmektedir. Adneksiyal torsiyon şüphesi olduğunda, ultrasonografi tercih edilmelidir. Bazen tanı ancak laparoskopi ile konabilmektedir (31, 35, 36).

Başlangıçta venöz kan akımında azalma meydana gelir ve arteriyel kan akımı, iske mi ve enfarktüs şeklinde ilerler. İskemik hasarda yalnızca kan akışını sağlamak yeterli değildir. Aynı zamanda doku reperfüzyonunu da sağlamak gerekmektedir.

Over torsiyonu olan çocuk ve ergenlerde, overlerin ve fertilitenin korunması için laparoskopik detorsiyon yapılmalıdır. Ancak ciddi nekroz durumunda ooforopeksi düşünülmelidir. Bununla birlikte, laparoskopik detorsiyon durumunda, over kan akımının düzelmesi kısmi ve yavaş olabileceğinden reperfüzyon sonrası oksidatif stresin kademeli olarak artabileceği dikkate alınmalıdır.

Bütün bu unsurlar göz önüne alındığında, erken tanı ve cerrahi müdahale, özellikle ergenlerde, over anatomisini ve fonksiyonunu korumak açısından önemlidir (37).

2.2.2. İske mi-Reperfüzyon Hasarı

İske mi ve reperfüzyon, reaktif oksijen türlerinin (ROT) beyin, kalp, kas, ovaryum ve birçok dokuyu etkilemesi sonucu hücre membranlarında hasara neden olmaktadır. I / R sonrası dönemde, reaktif oksijen türleri (ROT) büyük miktarlarda üretilir ve vücudun antioksidan savunma mekanizmaları zayıflar. ROT üretiminin artması DNA zincirini etkiler, enzim ve iyon kanalları içeren proteinlerin denatürasyonuna neden olur ve lipid membran peroksidasyonu yoluyla hücre sel hasar oluşur.

Kanser ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli hastalıklarda, çoğunlukla mitokondriyal oksidatif fosforilasyonla üretilen reaktif oksijen türlerinin (ROT) seviyeleri artar. Kanser hücrelerinde, ROT üretimindeki artış, mtDNA mutasyonlarıyla ilişkilendirilmektedir. ROT aşırı üretimi, mitokondriyal membranlardaki yağ asitlerinin peroksidasyonunu artırabilmektedir.

İskeminin tedavisinde temel amaç yalnızca kan dolaşımını düzeltmek değil aynı zamanda doku perfüzyonunu iyileştirmektir. İskemiye takiben, dolaşım ve reperfüzyon devam edince "reperfüzyon hasarı" adı verilen yeni bir fizyopatolojik süreçle karşılaşılır ve bu durum birkaç derece doku hasarına neden olur. Dokunun maruz kaldığı toplam hasar, hem iske mi hem de reperfüzyonun neden olduğu hasarın toplamıdır.

Over torsiyonu tanısı konduktan hemen sonra ovaryumun kan akımını cerrahi müdahale ile düzeltmek için detorsiyon düşünülmelidir. Ovaryumda I / R hasarının sebepleri; artmış nitrik oksit (NO) konsantrasyonu, apoptoz, nötrofil ve trombosit aktivasyonu ile ROS ve sitokin salınımıdır. Aynı zamanda laktik asit, hipoksantin ve lipid peroksid seviyeleri de artmaktadır (38, 39).

2.2.3. Malondialdehit (MDA)

Oksidatif stres, antioksidan enzimler tarafından serbest radikallerin yeteri kadar uzaklaştırılamamasından ya da ana kaynak olan mitokondriumlardaki elektron transfer zincirlerinden ROT ürünlerinin artması sonucu oluşmaktadır.

Oksidatif stresin artması sonucu kanser, diyabet, pulmoner hastalıklar, Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, kronik hastalıklar ve yaşlanma meydana gelmektedir.

Aşırı ROT üretimi lipidlere, proteinlere ve DNA'ya oksidatif hasar verirken bir yandan da MDA, protein karbonilleri, 3-nitrotirosin, 8-hidroksiguanozin (8-OHG), vb. gibi stabil okside biyomoleküler ürünlerin oluşumuna neden olur. Öte yandan antioksidan seviyeleri (vitamin E, C, A ve B6 ve folat) ve antioksidan enzim aktivitesi (SOD, CAT ve GPx) önemli derecede azalır. Bu nedenle, artmış ROT üretimi ya da bozulmuş antioksidan sistemi, hücre sel redoks dengesini oksidatif dengesizliğe sürükleyerek ROT aşırı üretimine neden olacaktır. Kısa yaşam ömründen dolayı ROT ölçümünü yapmak oldukça zordur. Antioksidanlar, vitaminler veya antioksidan enzimlerin seviyeleri bilgilendirici niteliktedir. Bununla birlikte, sadece redoks homeostazının bir tarafını yansıtır ve azaltılmış seviyelerin aslında cevapsız oksidatif hasarın göstergesi olup olmadığı sorusunun cevabı hala net değildir (40, 41, 42).

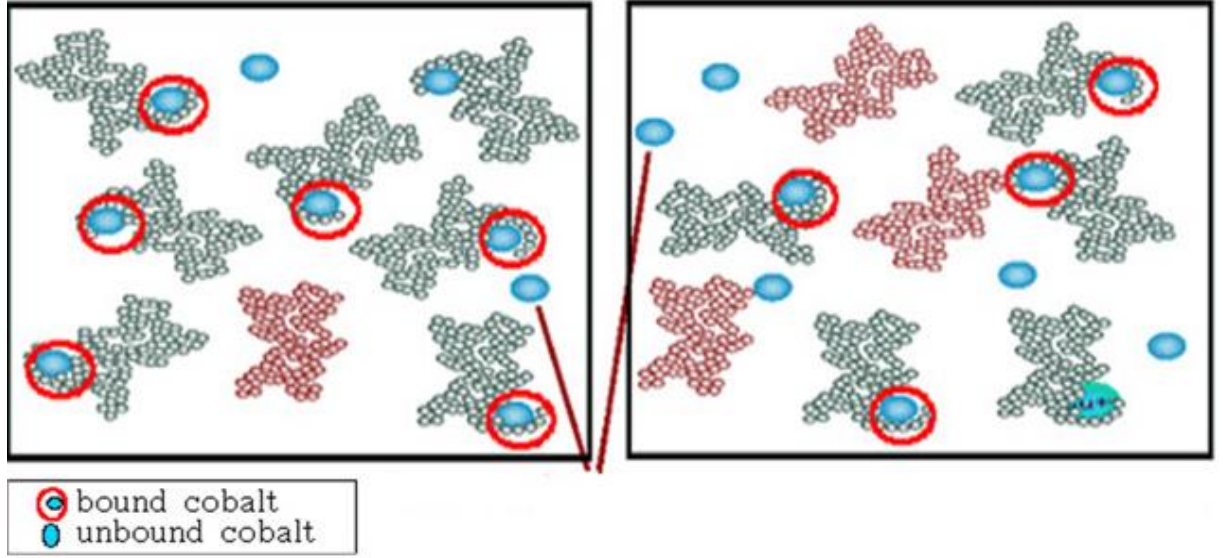
Travmatik beyin hasarı (TBI) sonrasında reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretiminde bir artış meydana gelir ve ikincil beyin hasarında hücre sel işlev bozukluğuna, mikrovasküler regülasyon kaybına, vazojenik ödeme ve ilerleyen travma sonrası iske miye neden olurlar. ROT'un artışı lipid peroksidasyonuna yol açar ve malondialdehit (MDA), bu lipid peroksidasyonu sırasında hücre zarı fosfolipidlerinin bozulmasına bağlı olarak oluşur.

Pankreasda adacık glukoz uyarımlı insülin sekresyonunu WNT sinyal yolağı ile MDA tarafından düzenlenmektedir. Ökaryotik hücrelerde mutasyona neden olan, tümörjenik özelliklere sahip oldukça toksik bir son üründür. Aynı zamanda Malondialdehid hücre dışı boşluğa ve nihayetinde kana salınır ve diğer klinik sepsis durumlarında lipid oksidasyonunun etkili bir biyolojik belirteci olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle, in vivo ve in vitro oksidatif stres seviyelerini belirlemek için MDA seviyesine bakılmaktadır (43, 44, 45).

2.2.4. İskemi Modifiye Albümin (IMA)

İskeminin, serum albümin yapısında değişiklikler yaptığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu da yeni bir kardiyak iskemi belirtecinin bulunmasına olanak sağlamıştır. Albuminin yapısında bulunan son amino terminali; nikel, bakır ve kobalt gibi transisyon metallerin bağlandığı bölgedir. İskemi sonucunda ortaya çıkan asidoz, hipoksi, serbest radikal hasarı ve membran bozulması gibi sebepler bu metallerin albüminin N terminaline daha az bağlanmasına neden olur. Yeni oluşan bu albümine İskemi Modifiye Albumin (IMA) adı verilmektedir. Hasta serumuna bir miktar kobalt eklenerek kolorimetrik yöntemle IMA seviyesi ölçülebilmektedir (Şekil 10).

Klinik uygulamalarda nekrozun tanımlanmasında, kreatinin kinaz ve troponin gibi bazı serum markırları kullanılmaktadır. İskeminin neden olduğu insan serum albümininin modifikasyonu son zamanlarda miyokardial iskemi markırı olarak kabul edilmekte ve Amerikan Tarım ve İlaç Uygulamaları Derneği tarafından da önerilmektedir. IMA (İschemia Modified Albumin), iskemi ve enflamasyonla ilişkili durumlarda oluşan bir belirteçtir. Pek çok iskemik vakada kan IMA düzeyi, yeni bir miyokardial iskemi belirteci olarak önerilmektedir (6, 7, 46).



Şekil 10: Kobalt Bağlama Testi (IMA) (47).

2.3. Apoptoz

Vücudumuzdaki hücreler bir süre yaşadıkdan sonra ölür. Hücre ölümüyle hücre çoğalması arasında bir denge bulunmaktadır. Hücre ölüm tiplerinden birisi olan apoptoz Yunancada düşen yaprak anlamına gelmektedir. İlk kez Avustralyalı bir bilim adamı olan J.F.K. Kerr tarafından tanımlanan apoptoz; hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, genlerle regüle olan, programlı, RNA, protein sentezi ve enerjiye ihtiyaç duyan, canlıda homeostazı koruyan bir mekanizmadır. Nematodlarda yapılan çalışmalar, CED-3 ve CED-4'ün ölüm geni olup apoptozu indüklediği, CED-9 geninin ise ölüme karşı koruyan bir gen olduğu ve apoptozu inhibe ettiğini göstermiştir. İnsanlarda bu genlerden CED-3'ün karşılığı kaspazlar, CED-4 geninin karşılığı APAF-1 (Apoptotic protease activating factor), CED-9 geninin karşılığı ise Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)'dir. Apoptoz organizmanın bütünlüğüne karşı tehdit oluşturan hücrelerin yıkımı için gereklidir.

Apoptoz, embriyonik dönemde, postnatal dönemde ve patolojik durumlarda meydana gelir. Apoptoz fizyolojik ve metabolik olayların devreye girdiği, hücrenin kendi kendini yok ettiği bir süreçtir. Hücre apoptoz uyarısı aldığı anda komşu hücrelerle bağlantısını koparıp büzülür. Kromatin yoğunlaşıp piknotik hale gelir. DNA'sı tipik bir merdiven bant şeklini almasına rağmen organeller yapısal bütünlüklerini hala korumaktadır. Hücre zarı yapısındaki fosfolipidlerin, hücre zarının iç yüzünden dış yüze aktarılır. Nükleus küçülerek parçalara ayrılır. Apoptotik cisimcikler ise makrofajlar tarafından yok edilir.

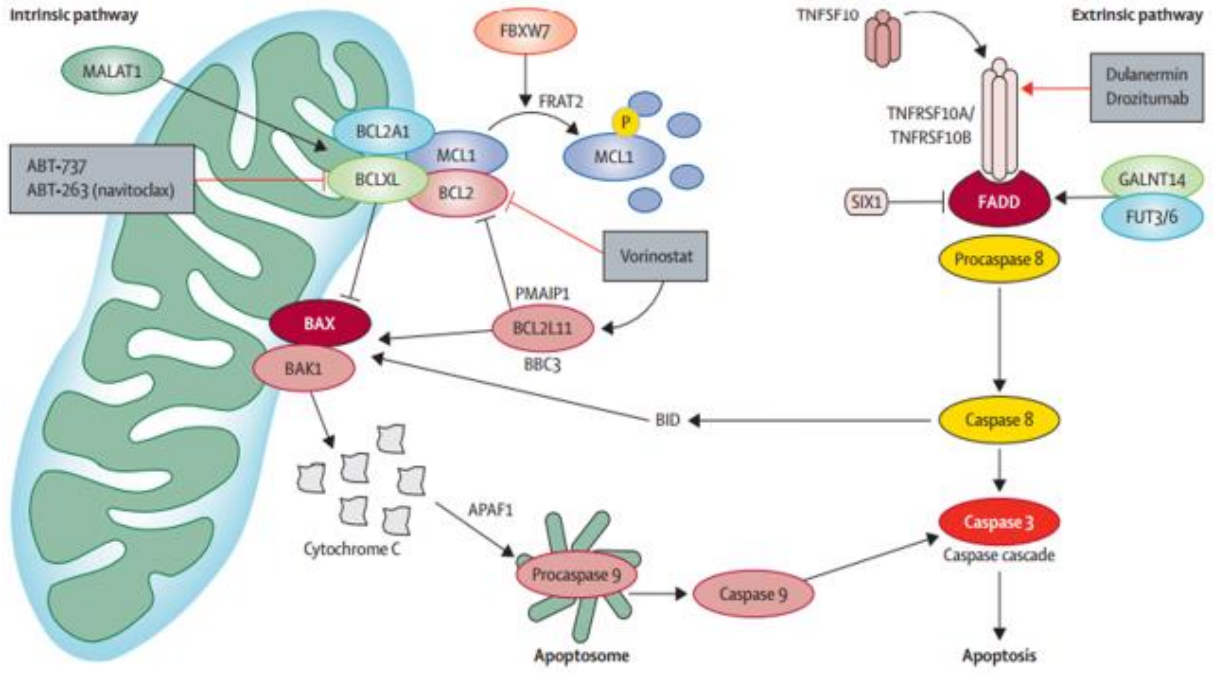
Kaspazlar (CASPASE: Cysteine Aspartate Specific ProteASEs)

Apoptoz ailesinden olan kaspazlar sistein proteazlar olup aspartik asitten sonraki peptid bağı kırarlar. Hücrede inaktif olup proteolitik olarak birbirlerini aktiveleştirirler. Kaspazlar 3 tiptir;

- I. Başlatıcı kaspazlar: Kaspaz 2,8,9,10
- II. Efektör kaspazlar: Kaspaz 3,6,7
- III. İnflamatuar kaspazlar: Kaspaz 1,4,5,11,12,13,14

Apoptoz mekanizması iki yolla gerçekleşmektedir:

- I. **İntrinsik (Mitokondriyal) yol:** Hücre içi sinyallerle apoptotik uyarı alınır ve proapoptotik protein olan Bid, antiapoptotik protein olan Bcl-2'yi inaktive eder. Böylece Bax ve Bac aktifleşerek, mitokondrium membranında por oluşumuna neden olup, porlardan Sitokrom-c, SMAC (Second mitochondria-derived Activator of Caspase), Endo-G (Endonukleaz-G), Ca^{++} ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) salınımını uyarır. Daha sonra Sitokrom-C oksidatif fosforilasyon için elektron taşır bu da SMAC ve IAF'nin inhibe olmasına neden olur ve apoptoz hızlanır. AIF'nin bulunuşu Kaspaz-3 ve Kaspaz-8'in aktivasyonunu engeller. AIF çekirdeğe yerleşerek parçalara ayrılır. ENDO-G DNA'yı parçalar ve mitokondrium porlarından salınan Sitokrom-c, Apaf-1 ve ATP'nin de katılımıyla sitozolde apoptozom adı verilen bir kompleks yapı ortaya çıkar. Apoptozom, kaspaz-9'u kesip aktiveleştirir ve o da prokaspaz-3'ün aktif kaspaz-3 olmasını sağlar. Aktif Kaspaz-3 ise ICAD (İnaktif kaspaz aktive edici DNaz)'ı inaktifleştirerek, çekirdeğin kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nukleozomal alt birimler halinde fragmente olmasına neden olan CAD (Kaspaz aktive edici DNaz)'ın serbest hale gelmesini sağlar (Şekil 11).
- II. **Ekstrinsik Yol:** Ölüm reseptörlerinden olan FAS, TNRF ve DR5'in, ölüm sinyallerinden olan FasL, TNF-alfa ve TRAIL'e bağlanması sonucu trimerik bir yapı oluşur. Bu yapıya, adaptör moleküllerinin ve prokaspazların eklenmesi DISC (Death inducing singnaling complex)'i oluşturur. DISC oluşuktan sonra inaktif olan prokaspaz-8'in uzun ve kısa kolları kesilerek, aktif kaspaz-8'in oluşması sağlanır. Aktif kaspaz-8 direkt ve indirekt yollarla kaspaz-3'ü aktif hale getirir (Şekil 11).
 - Direkt olarak; kaspaz-8, kaspaz-3'ü aktive eder.
 - İndirekt olarak; Bid'i keserek kaspaz-3'ü aktive eder.Her iki şekilde de DNA fragmentasyonu meydana gelir (48).



Şekil 11: Apoptoz'un mekanizması (49).

2.4. Antioksidan Savunma Mekanizması

Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimler de dahil olmak üzere kompleks bir savunma sisteminin aktivitesi, ROS'un metabolik ara ürün konsantrasyonlarını sıkı kontrol altında tutmaktadır. Antioksidan ajanlar oksidatif stresin doku ve hücrelerde neden olduğu hasarı engellemektedir (Şekil 12). Özellikle serbest radikal temizleme özelliği ile hücresel hasarı geciktirir veya inhibe eder ve hayati moleküller hasar görmeden serbest radikallerle güvenli bir şekilde etkileşime girip zincir reaksiyonunu sonlandırabilirler.

Glutatyon, ubikiniol ve ürik asit gibi bazı antioksidanlar normal metabolizma sırasında üretilir. Diğer antioksidanlar diyetten elde edilir. Birçok araştırma grubu, doğal ürünlerin antioksidan özelliklerini analiz etmiştir. Bu özellikler kimyasal veya biyolojik yöntemlerle veya her ikisi ile araştırılmıştır. Antioksidan bakımından zengin gıda tüketiminin birçok hastalığın ortaya çıkmasını yavaşlatabileceği ya da önleyebileceği düşünülmektedir (40, 50).

Serbest Radikal Kaynakları	Antioksidan Moleküller
❖ Aşırı alkol tüketimi ❖ Sigara kullanımı ❖ Elektromanyetik radyasyon ❖ Güneş ışınları(UV) ❖ Kronik inflamasyonlar ❖ Aşırı demir yüklemesi ❖ Aşırı fiziksel egzersiz ❖ Yaşlanma ❖ Doğum kontrol hapları	❖ Enzimler (SOD, Katalaz, GSH-Px) ❖ Proteinler (Albumin, serüloplazmin) ❖ Selenyum ❖ Askorbik asit (C vitamini) ❖ Tokoferoller (E vitamini) ❖ Karotenoidler ❖ Flavonoidler ❖ Glutasyon ve tiyoller ❖ Koenzim Q, ubikinon ve türevleri

Şekil 12: Serbest radikaller ve antioksidanlar (51).

2.4.1. Silymarin

Silymarin, *Silybum marianum* (deve diken) bitkisinden üretilen 2000 yıldır geleneksel tıpta karaciğer ve safra bozukluklarında bitkisel tedavi olarak kullanılan lipofilik bir bitki özüdür (Şekil 13).

Silykristin, silydianin, silybin A, silybin B, izosilybin A ve izosilybin B olmak üzere altı adet flavonoidden oluşmaktadır (Şekil 14).

Antioksidan, antienflamatuar ve antifibrotik özelliği nedeniyle farklı karaciğer rahatsızlıklarında, özellikle kronik karaciğer hastalıklarında, siroz ve hepatoselüler karsinomda kullanılmaktadır. Silymarinin antioksidan ve antienflamatuar etkisi, inflammatuar kaskadı yumuşatma ve bağışıklık sistemini düzenleme yoluyla virüse bağlı karaciğer hasarlarının azaltılmasına yöneliktir. Ayrıca, hepatit C virüsü enfeksiyonunda intravenöz uygulama ile doğrudan bir antiviral etkisi olduğu kanıtlanmıştır. Alkolizmde silymarin, hücrel canlılığı artırabilir ve hem lipid peroksidasyonunu hem de hücrel nekrozu azaltabilir. Aynı zamanda, silymarin / silybin kullanımı, alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması önemli biyolojik etkilere sahiptir. Silymarin/silybin, oksidatif stres, insülin direnci, karaciğerde yağ birikimi ve mitokondriyal disfonksiyon da dahil olmak üzere değişik hedeflere etki ederek alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanmasının ilerlemesini antagonize eder. Silymarin, farklı moleküler kalıpları modüle ederek karaciğer sirozu ve hepatoselüler karsinomda da kullanılır.

Gastroprotektif, antibakteriyel, antiviral, antitrombotik ve vazodilatör etkilerini gösteren birçok deneysel ve klinik çalışma da yapılmıştır (52, 53,54, 55).

Kronik hepatit C virüsü (HCV) enfeksiyonunda, hastaların yaklaşık üçte birinin karaciğer hastalıklarını daha önce kendi kendilerine silymarinle tedavi ettikleri gösterilmiştir. Aynı zamanda, RNA polimeraz aktivitesine bağımlı HCV NS5B RNA'nın baskılanması mekanizması, sitokin enflamasyonunun ve hepatosit NF-κB sinyalinin engellenmesini sağlayarak HCV enfeksiyonuna karşı güçlü bir anti-viral etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır. Silymarin, serbest radikal süpürücü reaktivitesi ve elverişli membran-lipid / su bölüşümü nedeniyle doğada bulunan en güçlü antioksidanlardan biri olabilir (53).

Karaciğer hücrelerinin yanında, böbrek ve immun sistem hücreleri ile fibroblastlar, keratonositler ve endoteliyal hücreler üzerinde de toksik ajanlara karşı duyarlı olduğu ispatlanmıştır (9).

Silymarinin aynı zamanda iskemi reperfüzyona bağlı renal hasara karşı koruyucu etkisinin olduğu ve renal hücreli karsinomayı ise antikanser özelliği sayesinde engellediği gösterilmiştir.

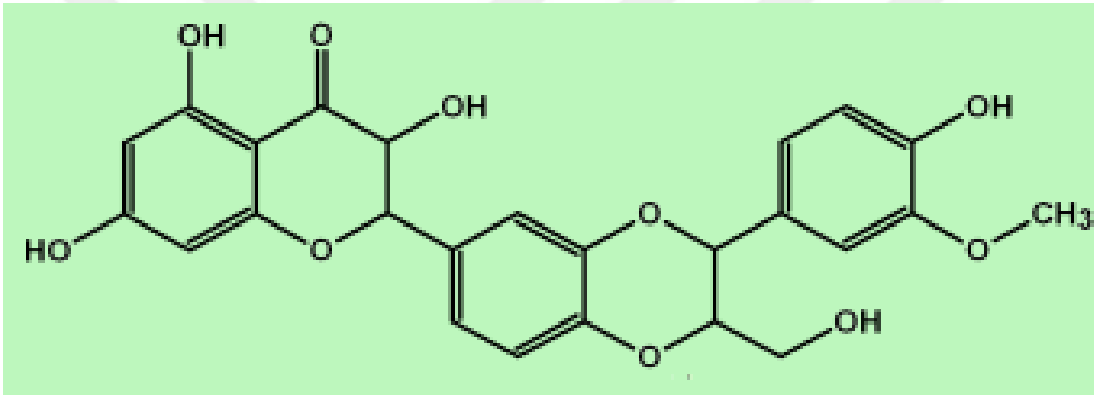
Silymarinin antikanser etkileri için olası mekanizmalar: hücre proliferasyonunun inhibisyonu, apopitozun artması, anjiogenezisin azalması ve hücre döngüsü düzenleyicilerinin blokağı olarak sıralanabilir. Silymarin tedavisinin, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerini arttırdığı, renal dokuda lipid peroksidasyonunu azalttığı, pankreas dokusunda β-hücre çoğalmasını arttırırken PDX1 (pancreatic and duodenal homeobox 1) ve insülin genlerinin her ikisinin de ekspresyonunu arttırdığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (56).

Bununla birlikte düşük suda çözünürlüğü nedeniyle emilimi oldukça düşüktür. Farmakokinetik araştırmalarda silymarinin oral uygulanişından sonra %23-47 kadarının sistemik dolaşıma ulaşabildiğı gösterilmiştir. Nanopartikül şeklinde hazırlanmış preparatların biyoyararlılığı arttırdığı yönünde bulgular mevcuttur (57).

Silybum marianum ekstrelerinin güvenli olduğu, iyi tolere edildiğı ve toksik veya yan etkilerinin nadir olduğu görülmüştür. (58).



Şekil 13: Silybum marianum bitkisi (59).

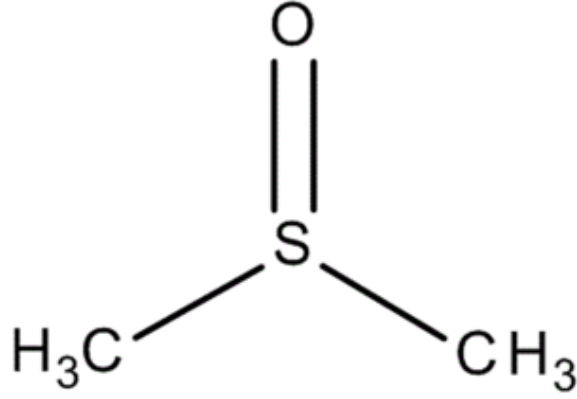


Şekil 14: Silymarinin moleküler yapısı (60).

2.4.2. Dimetil sülfoksit (DMSO)

Kimyasal formülü $(CH_3)_2SO$ olan Dimetil sülfoksit (DMSO) renksiz ve sıvı olan organokükürt bileşiğidir (Şekil 15). Cilde kolayca nüfuz eder, Ağızda sarımsak tadı bırakan ve cilde kolaylıkla nüfus eden bir maddedir. Alexander Zaytsev adında bir Rus bilimadamı tarafından 1866 yılında keşfedilmiştir. Kraft hamurundan elde edilir. Dimethylsulfide oksijen veya nitrojen dioksit ile reaksiyona girince DMSO oluşur. DMSO kimyasal reaksiyonlar için çözücü olarak kullanılmaktadır. 1963 yılından itibaren ilaç olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ağırlıklı olarak lokal ağrı kesici olarak kullanılmaktadır. DMSO ciltten verilen bileşiklerin emilimini arttırdığı için anti-enflamatuar ve antioksidan olarak bölgesel uygulamalarda da kullanılmaya başlanmıştır. Kendi başına toksisitesi düşük bir maddedir (61). Genellikle sinirbilimi çalışmalarında kullanılan DMSO'nun sıklıkla %10'luk konsantrasyonu kullanılır. DMSO'nun Na^+ , K^+ ve Ca^{++} akımlarını bloke ettiğini gösteren çalışmalar yapılmıştır.

Ayrıca DMSO, nöroblastoma-glioma hibrid NG108-15 hücreleri için sodyum inaktivasyon eğrisini azaltmaktadır (62).



Şekil 15: DMSO'nun Moleküler Yapısı (63).

DMSO, günde 50 mg'a kadar olan dozlarda nispeten güvenli bir solvent olarak kabul edilir. Endüstri ve biyolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanılan bir solventtir. DMSO rutin olarak otolog kemik iliği ve organ naklinde kriyoprezervatif olarak kullanılmaktadır (64).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma deneysel niteliktedir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırmanın planlanması Ocak 2015 tarihinde başlayıp literatür taranmasına başlandı. Etik kurul onayı ise 31 Mart 2015'te alındı. Haziran 2016'da TÜBİTAK başvurusu yapıldı, 23 Şubat 2017'de başvurumuz kabul edildi ve malzeme alımı sonrası Temmuz 2017 tarihinde deneysel çalışmalara başlandı. Araştırmanın deneysel aşaması, Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda, histokimyasal, immunohistokimyasal ve elektron mikroskopik değerlendirmeler Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda, biyokimyasal incelemeler ise Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Ana Bilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. 25 Aralık 2017 tarihinde tez savunmasına girilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Araştırmada toplam beş grup bulunmaktadır. Deney grupları aşağıdaki şekilde düzenlenmiştir:

Grup 1 (Kontrol grubu (K) n=7): Deneklere hiçbir uygulama yapılmaksızın sakrifikasyon sonrası sağ overler histolojik incelemeler için, sol overler ise ikiye bölünerek biyokimyasal ve elektron mikroskopik incelemeler için alınmıştır. Deney bitiminde kuyruk veninden IMA seviyelerinin analizi için de kan alınmıştır.

Grup 2 (Torsiyon-Detorsiyon (T+D) grubu, n=7): 3 saat torsiyonun ardından, 3 saat detorsiyon uygulanan gruptur. Sakrifikasyon sonrası sağ overler histolojik incelemeler için, sol overler ise ikiye bölünerek biyokimyasal ve elektron mikroskopik incelemeler için alınmıştır. Deney bitiminde kuyruk veninden IMA seviyelerinin analizi için de kan alınmıştır.

Grup 3 (Torsiyon+Detorsiyon+Silymarin grubu (T+D+SİL), n=7): 3 saat torsiyonun ardından, detorsiyondan 30 dakika önce 250mg/kg Silymarinin intraperitoneal olarak verildiği gruptur. Sakrifikasyon sonrası sağ overler histolojik incelemeler için, sol overler ise ikiye bölünerek biyokimyasal ve elektron mikroskopik incelemeler için alınmıştır. Deney bitiminde kuyruk veninden IMA seviyelerinin analizi için de kan alınmıştır.

Grup 4 (Dimetil sülfoksit grubu (DMSO), n=7): Deneklere % 10 luk DMSO'nun i.p. olarak verildiği gruptur. Sakrifikasyon sonrası sağ overler histolojik incelemeler için, sol overler ise

ikiye bölünerek biyokimyasal ve elektron mikroskopik incelemeler için alınmıştır. Deney bitiminde kuyruk veninden IMA seviyelerinin analizi için de kan alınmıştır.

Grup 5 (Silymarin grubu (SİL), n=7): Deneklere %10'luk DMSO'da çözülmüş 250 mg/kg Silymarinin i.p. olarak verildiği gruptur. Sakrifikasyon sonrası sağ overler histolojik incelemeler için, sol overler ise ikiye bölünerek biyokimyasal ve elektron mikroskopik incelemeler için alınmıştır. Deney bitiminde kuyruk veninden IMA seviyelerinin analizi için de kan alınmıştır.

3.4. Çalışma Materyali

Çalışmada, Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı Laboratuvarından temin edilen Wistar suşu toplam 35 adet dişi sıçan (200-250 g) kullanılmıştır. Literatürlerle uyumlu olması sebebiyle Wistar suşu sıçanlar tercih edilmiştir. Tüm denekler çalışma sonuna kadar Deney Hayvanları Laboratuvarında 12/12 saat karanlık/aydınlık periyodunda, 20–22 °C oda sıcaklığında barındırılmış ve ad libitum beslenmişlerdir.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımsız değişkenler: Çalışmada over torsiyonu ve detorsiyonu yapılan grup, torsiyon+detorsiyonu takiben silymarin verilen grup ve yalnızca silymarin ile yalnızca DMSO verilen gruplar bulunmaktadır.

Bağımlı değişkenler: Biyokimyasal olarak MDA, GPx ve IMA değerlerine bakılmıştır.

Çalışmada kontrol grubuna herhangi bir işlem yapılmamıştır. Torsiyon+Detorsiyon grubunda ve Torsiyon+Detorsiyon+Silymarin grubunda damarlara zarar vermemek için vasküler klempler kullanılmıştır. Ayrıca tek başına silymarin ve tek başına DMSO verilen gruplar kullanılmıştır.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler

Çalışmada, histopatolojik incelemeler için; distile su cihazı, etüv, çeker ocak, parafin dispenser, mikrotom, immünohistokimyasal incelemeler için; humidity chamber, mikrodalga fırın, buzdolabı, derin dondurucu ve mikropipetler, elektron mikroskopik incelemeler için ise; ultra saf su cihazı, knife maker ve ultra mikrotom kullanılmıştır. Biyokimyasal incelemeler için HPLC kolon, soğutmalı santrifüj, santrifüj, terazi, pH metre, vorteks, manyetik karıştırıcı, derin dondurucu ve spektrofotometre kullanılmıştır.

3.6.2. Araştırmada Kullanılan Yöntemler

Over Torsiyonu: Tüm cerrahi girişimler steril koşullar altında yapıldı. Ketamin (Ketamine HCl Ketalar; Eczacıbaşı Warner-Lambert, İstanbul, Turkey) 60 mg/kg, ksilazin (xylazine hydrochloride Rompun; Bayer AG, Leverkusen, Germany) 7 mg/kg intramüsküler olarak verildi. Anestezi altında torsiyon uygulanacak olan gruplarda deneklerin abdomeninde küçük bir kesi alanı açılarak sağ ve sol ovaryum dokusu 360° saat yönünde döndürülerek vasküler klempler kullanılarak sabitlendi. Torsiyon modeli teknik olarak uygulanması zor bir modeldir. Çünkü denekleri kaybetme riski yüksektir. Çalışmamızda tüm gruplarda olduğu gibi, torsiyon uyguladığımız gruplarda da (Grup 2 ve Grup 3) deney aşamasında hayvan kaybı yaşanmadı. Torsiyon uygulaması esnasında damarlara herhangi bir zarar vermemek için vasküler klempler kullanıldı. Grup 2’de adneksler 360° saat yönünde döndürülüp vasküler klemplerle sabitlendi. 3 saat süreyle iskemi modeli oluşturulup, 3 saatin sonunda bükülmüş olan adneksler eski haline getirililerek kan akımı tekrar sağlandı. Grup 3’de ise adneksler yine 360° saat yönünde döndürülüp vasküler klemplerle sabitlendi. Detorsiyondan 30 dakika önce, 250mg/kg Silymarin deneklere intraperitoneal olarak verildi. 3 saat süreyle iskemi modeli oluşturulup, 3 saatin sonunda bükülmüş olan adneksler eski haline getirililerek kan akımı tekrar sağlandı.

Silymarin’in hazırlanışı: Silymarin suda çözünürlüğü düşük olan bir madde olduğu için solvent olarak DMSO kullanıldı. Öncelikle 1 gr silymarin’in kaç ml’de çözülebildiğini öğrenmek için ön çalışmalar yapıldı. Bunun sonucunda 3,4 ml saf DMSO içerisinde 1 gr Silymarin çözüldü. Daha sonra her deneğin ağırlığına göre doz ayarı yapıldı. Örneğin 250 gr’lık bir denek için 0,0625 g silymarin gerekiyordu. 3,4 ml DMSO’da 1g Silymarin çözülürse, 0,0625 gr. Silymarin ne kadar DMSO’da çözülür hesabı yapıldı. Sonuç olarak 0,2125 ml bulundu. Saf DMSO içerisinde çözülmüş Silymarin çözeltisi yeteri kadar stok olarak hazırlandı. Detorsiyondan hemen önce her denek için hesaplanan miktarın üzerine 2 ml’ye tamamlayacak şekilde distile su eklenerek DMSO konsantrasyonu yaklaşık % 10 ‘a düşürüldü. İnsülin enjektörüne çekmeden önce vorteksle iyice çalkalanıp deneklere ondan sonra enjeksiyon yapıldı. Bu nedenle de yalnızca DMSO uyguladığımız gruba % 10’luk DMSO enjekte edildi.

Sakrifikasyon sonunda elde edilen dokular % 10’luk formaline alınmış, rutin doku takip işlemi uygulanmıştır. Histolojik ve immünohistokimyasal incelemeler için prafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Daha sonra histokimyasal işlemlerden sırasıyla; Hematoksilen-Eozin, Masson trikrom, PAS histokimyasal boyama yöntemleri uygulanmıştır.

İmmünohistokimyasal analizler için ise kesitler, Active Caspase-3 ve Tunel boyaları ile boyanmıştır. Elektron mikroskopik incelemeler için dokular Karnovsky fiksatifine alınıp daha sonra doku takibi yapılarak ultra ince kesitler alınmıştır. Biyokimyasal işlemler için alınan doku örnekleri homojenizasyon işleminin ardından çalışılmış ve spektrofotometre ile ölçümler yapılmıştır.

3.6.2.1. *Histokimyasal İncelemeler*

3.6.2.1.1. *Doku Takibi*

% 10'luk formalin içerisinde 3 gün bekletilen ovaryum dokuları doku takip kasetlerine alınarak gece boyunca akarsuda yıkandı. Dehidratasyon işlemleri için sırasıyla %70, 80, 96'lık alkollerde 20'şer dakika bekletildi. Ardından 4 değişik aseton serisinde 20'şer dakika daha tutulan dokular, şeffaflandırma işlemi için 2 kez 30'ar dakika xylolde alındı. 58 °C'lik 2 parafin banyosunda birer saat bekletilen dokulara parafinin nüfus etmesi sağlanıp, parafin bloklar hazırlandı ve 5 µm'lik kesitler alındı (Tablo 1).

Tablo 1: Doku takip yöntemi.

İşlem	Madde	Süre
Fiksasyon	%10'luk formalin	3 gün
Fiksatifin Uzaklaştırılması	Akarsu	1 gece
Dehidratasyon	%70'lik alkol	20 dakika
Dehidratasyon	%80'lik alkol	20 dakika
Dehidratasyon	%96'lık alkol	20 dakika
Dehidratasyon	Aseton 1	20 dakika
Dehidratasyon	Aseton 2	20 dakika
Dehidratasyon	Aseton 3	20 dakika
Dehidratasyon	Aseton 4	20 dakika
Şeffaflandırma	Xylol 1	30 dakika
Şeffaflandırma	Xylol 2	30 dakika
Parafin banyosu 1	58-60°C parafin	1 saat
Parafin banyosu 2	58-60°C parafin	1 saat
Bloklama	58-60°C parafin	

3.6.2.1.2. Hematoksilen-eozin Boyama Yöntemi

5 µm kalınlığındaki ovaryum kesitleri 60°C'lik etüvde gece boyunca tutuldu. Ardından, 60°C'lik etüvde 30 dakika ksilol 1'de, oda ısısında 20 dakika xylol 2'de ve 20 dakika oda ısısında xylol 3'de deparafinizasyon işlemlerinden geçirildi. Dokuları suya getirme işlemi için yüksek dereceli alkollerden başlayarak düşük dereceli alkollere doğru hidrasyon (% 100, % 96, % 80, % 70' lik alkoller) işlemi uygulandı. Distile suda çalkalanıp, Mayer hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) solüsyonunda 10 dakika nükleus boyaması yapıldı. Mavileştirme işlemi akarsuda 10 dakika tutularak yapıldı. Eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) solüsyonunda 2 dakika bekletilen dokular, dehidrasyon (% 70, % 80, % 96, % 100) işlemi için düşük dereceli alkollerden yüksek dereceli alkollere doğru geçirildi. 3 adet ksilol serisinden şeffaflandırma işlemi için geçirilen dokular, entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı. (Tablo 2)

Tablo 2: Hematoksilen-Eozin Boya Yöntemi

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	30 dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 1 (etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 2 (oda ısısında)	10 dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 3 (oda ısısında)	10 dakika
Hidratasyon	%100'lük absolü alkol	Çalkalama
Hidratasyon	%100'lük absolü alkol	Çalkalama
Hidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Hidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Hidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Mayer's Hematoksilen	10 dakika
Yıkama	Akarsu	10 dakika
Boyama	Alkolik Eozin	2 dakika
Dehidratasyon	%70-80-96-100-100'lük alkol	Çalkalama
Şeffaflandırma	Ksilol 1	20 dakika
Şeffaflandırma	Ksilol 2	20 dakika
Şeffaflandırma	Ksilol 3	20 dakika
Kapama	Entellan	Lamelle kapama

3.6.2.1.3. Masson trikrom boyama yöntemi

Ovaryum kesitleri deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 30 dakika (etüvde) diğer ikisi 20'şer dakikalık üç farklı ksilolde tutuldu. Daha sonra hidratasyon işlemi için 2 değişik absolü alkol ve %96'dan %70'e azalan alkol serilerinden geçirildi. Ve distile suda 5 dakika bekletildikten sonra Masson Trikrom boyama seti (Bio-Optica Milano/ İtalia) ile boyandı: Kesitlerin üzerine 6 damla Weigert'in demirli hematoksileni ile 6 damla ferric klorür solüsyonu damlatılarak 10 dakika bekletildi. Yıkama yapmaksızın 10 damla pikrik asit alkolik solüsyonu damlatılıp 4 dakika bekletildi. 3-4 saniye hızlıca yıkanıp 10 damla Ponceau acid fuchsin solüsyonunda 4 dakika bekletildi. Distile su ile çalkalanan kesitler daha sonra 10 dakika fosfomolibdik asit solüsyonunda bekletildi. Yine yıkama yapmadan fazla boya akıtılıp 10 damla Masson anilin blue solüsyonunda 5 dakika boyandı. Distile su ve yükselen derecelerdeki alkollerden geçirilen dokular absolü alkolde 1

dakika bekletilip ksilol ile şeffaflandırma işleminin ardından entellan ile kapatıldı. (Tablo 3)

Tablo 3: Masson Trikrom Boyama Yöntemi

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	30 dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 1 (etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 2 (oda ısısında)	10 dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 3 (oda ısısında)	10 dakika
Hidratasyon	%100'lük absolü alkol	Çalkalama
Hidratasyon	%100'lük absolü alkol	Çalkalama
Hidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Hidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Hidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	6 damla A+6 damla B solüsyonu	10 dakika
Boyama	10 damla C solüsyonu	4 dakika
Yıkama	Distile su	3-4 saniye
Boyama	10 damla D solusyonu	4 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	10 damla E solusyonu	10 dakika
Boyama	10 damla F solusyonu	5 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Dehidratasyon	%70-80-96-100-100'lük alkol	Çalkalama
Şeffaflandırma	Ksilol 1	20 dakika
Şeffaflandırma	Ksilol 2	20 dakika
Şeffaflandırma	Ksilol 3	20 dakika
Kapama	Entellan	Lamelle kapama

3.6.2.1.4. Peryodik asit Schiff boyama yöntemi

5 µm kalınlığındaki ovaryum kesitleri 60°C'lik etüvde gece boyunca tutuldu. Ardından, 60°C'lik etüvde 30 dakika ksilol 1'de, oda ısısında 20 dakika xylol 2'de ve 20 dakika oda ısısında xylol 3'de deparafinizasyon işlemlerinden geçirildi. Dokuları suya getirme işlemi için yüksek dereceli alkollerden başlayarak düşük dereceli alkollere doğru hidrasyon (% 100, % 96, % 80, % 70' lik alkoller) işlemi uygulandı. Distile suda çalkalanıp Periyodik asit solüsyonunda 2 dakika tutuldu. Distile su ile çalkalandı. Schiff solüsyonunda 15 dakika boyandı. Akarsuda 5-10 dakika yıkandı. Nükleus boyaması için Mayer hematoksilende (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) 5-6 kez daldırılarak boyandı. Tekrar akarsu işleminden sonra dehidrasyon (% 70, % 80, % 96, % 100) işlemi için düşük dereceli alkollerden yüksek dereceli alkollere doğru kesitler çalkalandı. 3 adet ksilol serisinden şeffaflandırma işlemi için geçirilen dokular, entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı. Işık mikroskopunda değerlendirildi. (Olympus BX-50 Almanya)

Tablo 4: Periyodik asit shiff boyama yöntemi

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	30 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (oda ısısında)	10 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (oda ısısında)	10 dakika
Hidratasyon	%100'lük absolü alkol	Çalkalama
Hidratasyon	%100'lük absolü alkol	Çalkalama
Hidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Hidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Hidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Glikol gruplarını kırma	Periyodik Asit Solüsyonu	2 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Schiff Solüsyonu	15 dakika
Yıkama	Akarsu	5-10 dakika
Boyama	Mayer's Hematoksilen	5-6 kez daldırıp çıkarma
Yıkama	Akarsu	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolü Alkol	Çalkalama
Şeffaflandırma	Ksilol 1	20 dakika
Şeffaflandırma	Ksilol 2	20 dakika
Şeffaflandırma	Ksilol 3	20 dakika
Kapama	Entellan	Lamelle kapama

3.6.2.2. İmmunohistokimyasal Yöntemler

3.6.2.2.1. TUNEL Boyama Yöntemi

Hücre içi DNA fragmantasyonunu göstermek için TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Deoxyuridine Triphosphate DNA Nick-End Labelling ROCHE) kiti kullanıldı. Kesitler 60°C'lik etüvde 1 gece bekletildikten sonra deparafinizasyon işleminden geçirilmek üzere 30 dakika ksilol 1'de etüvde, 20 dakika ksilol 2'de oda ısısında ve 20 dakika ksilol 3'de oda ısısında tutuldu. % 100'lük alkolden başlayarak % 70'lik alkole doğru azalan dereceli alkollerden geçirilerek suya getirme işlemi yani hidratasyon yapıldı. Distile suda bekletilen kesitler daha sonra hazırlanan sitrat solüsyonuna alınarak mikrodalga fırında medium ayarında 5 dakika bekletildi. Kaynatma işleminin ardından 20 dakika oda ısısında bekletilen dokular soğumaya bırakıldı. Dokuların etrafı PAP pen ile çizilerek üzerlerine PBS damlatıldı. PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra TdT (kitin içinden çıkan label solüsyonu ile enzim solüsyonu karıştırılarak) solüsyonu dokuların üzerini kaplayacak şekilde damlatılıp 1 saat 37°C'de enkübe edildi. 3 kez PBS ile bol bol yıkandı. Bu arada POD dondurucudan çıkarılıp çözülmesi sağlandı. Kesitler kurulanıp üzerlerini örtecek şekilde converter POD damlatılıp tekrar 30 dakika etüvde enkübe edildi. POD damlatılır damlatılmaz DAB kromojen (1:9 oranında) hazırlanıp karanlıkta bekletildi. Etüvden çıkarılan dokular PBS ile 3 kez yıkanıp DAB kromojen dokuların üzerini örtecek şekilde damlatıldı. Önce bir lam üzerinde deneme yapıp diğer tüm kesitlere aynı süre DAB ile muamele edildi. Distile su ile yıkanan kesitlere Mayer hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile zemin boyaması yapıp dehidratasyon işleminin ardından ksilol ile şeffaflandırma yapıp kesitler entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı. Daha sonra ışık mikroskopunda (Olympus BX-50 Almanya) inceleme yapıp TUNEL pozitif hücreler sayıldı.

3.6.2.2.2. Aktif Kaspaz-3 Boyama Yöntemi

Aktif kaspaz 3 boyaması için anti-kaspaz-3 antikoru (AB3623 Anti-Caspase 3 Antibody Merck-Millipore Darmstadt Germany) kullanıldı. Kesitler 60°C'lik etüvde 1 gece bekletildikten sonra deparafinizasyon işleminden geçirilmek üzere 30 dakika ksilol 1'de etüvde, 20 dakika ksilol 2'de oda ısısında ve 20 dakika ksilol 3'de oda ısısında tutuldu. % 100'lük alkolden başlayarak % 70'lik alkole doğru azalan dereceli alkollerden geçirilerek suya getirme işlemi yani hidratasyon yapıldı. Distile suda bekletilen kesitler daha sonra hazırlanan sitrat solüsyonuna alınarak mikrodalga fırında medium ayarında 5 dakika bekletildi. (Bu işlem, tespit için kullanılan formalin ile bağlanan epitopların serbest hale gelmesini sağlamak için yapıldı).

Etüvden çıkarılıp eksilen sitrat solüsyonu tamamlanarak 5 dakika daha mikrodalgada medium ayarında bekletildi. Kaynatma işleminin ardından 20 dakika oda ısısında bekletilen dokular soğumaya bırakıldı. Dokuların etrafı PAP pen ile çizilerek üzerlerine PBS damlatıldı. PBS ile 3 kez yıkandı. 10 dakika % 3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda bekletildi. (Bu işlem endojen peroksidazları bloke etmek için yapıldı). PBS ile 3 kez yıkanan dokuların üzerine bloklama solüsyonu (Histostatin Plus İnvitrogen 85-9043 USA) damlatılıp 30 dakika oda ısısında bekletildi. Yıkama yapmaksızın kesitlerin üzerindeki solüsyon akıtılıp, kesitlerin üzerini kapatacak kadar anti-kaspaz-3 solüsyonu yani primer antikor (AB3623 Anti-Caspase 3 Antibody Merck-Millipore Darmstadt Germany) 1:100 oranında sulandırılarak damlatılıp gece boyunca +4°C'de bekletildi. Ertesi gün +4°C'den çıkarılan kesitler oda ısısına getirilip 3 kez PBS ile yıkandı. Dokular streptavidin sekonder antikorunda 30 dakika (bu esnada DAB solüsyonu hazırlanır) bekletildi. DAB damlatılmadan önce 3 kez PBS ile kesitler yıkandı. DAB kromojen dokuların üzerini örtecek şekilde damlatıldı. Önce bir lam üzerinde deneme yapıp diğer tüm kesitlere aynı süre DAB ile muamele edildi. Distile su ile yıkanan kesitlere Mayer hematoksilin (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile zemin boyaması yapıp dehidratasyon işleminin ardından ksilol ile şeffaflandırma yapıp kesitler entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı. Daha sonra ışık mikroskobunda (Olympus BX-50 Almanya) inceleme yapıp aktif Kaspaz-3 pozitif hücreler sayıldı.

3.6.2.3. Elektron Mikroskopi Doku Takip Yöntemi

Sakrifikasyon sonucu alınan ovaryum dokusundan 1mm³'lük parçalar alınarak, Karnovsky fiksatifine konan dokular +4°C'de 1 gece bekletildikten sonra doku takibi uygulandı. Örnekler Sorenson'un fosfat buffer solüsyonu ve süktroz karışımı ile 3 kez değiştirilerek 15 dakika yıkandı. Daha sonra 1 kısım PBS+1 kısım osmium tetraoksit (500µl OsO₄ + 500µl PBS) karışımına alınan dokular 90 dakika karanlıkta bekletildi. PBS ile 3 kez 15 dakika yıkanan dokular dehidratasyon işlemi için 2 kez % 50'lik aseton solüsyonundan geçirildikten sonra, kontrastlama solüsyonunda (%70'lik aseton+%0,5'luk uranil asetat+ % 1'lik fosfotungustik asit) +4°C de 1 gece tutuldu. % 80'lik asetonda 2 kez 15 dakika, %90'lık asetonda 2 kez 15'şer dakika, %96'lık asetonda 2 kez 15 dakika, %100'lük asetonda 3 kez 20'şer dakika tutulan dokular daha sonra 2 kez 15'şer dakika propilen oksit'te bekletildi. 30 dakika 2:1 oranında karıştırılmış, propilen oksit+araldit karışımında, 30 dakika 1:1 oranında karıştırılmış propilen oksit+araldit karışımında, 30 dakika 1:2 oranında karıştırılmış propilen oksit+araldit karışımında bekletildikten sonra dokular temiz araldit karışımında +4 °C'de 1

gece bekletildi. Ertesi gün taze hazırlanan araldit solüsyonuna gömülen dokular 60°C’de 48 saat polimerizasyona bırakılıp daha sonra 1,5µm kalınlığında yarı ince kesitler alınıp, Toluidine Blue (% 1 lik) boyası ile boyandı. Uygun alanlar tespit edildikten sonra 90-120 nm kalınlığında ultra ince kesitler alınıp 100 mesh lik Cu (bakır) gridlere yerleştirildi ve ultra ince kesitler transmisyon elektron mikroskobunda (Zeiss SIGMA 500 STEM) değerlendirildi.

3.6.2.4. Biyokimyasal Analizler

3.6.2.4.1. Serumda Yapılan Analizler

Sıçanlardan alınan kan örnekleri 15 dakika 1000g de santrifüj edildi. Elde edilen serumlar her analiz için uygun miktarlarda porsiyonlanarak -80°C' de analiz süresine kadar saklandı.

Serum IMA Düzeyinin belirlenmesi: Ticari olarak satın alınan, kolorimetrik kit (Cusabio Kat No. CSB-E13620r) ile değerlendirildi. Kitin ölçüm aralığı 0.9-60 U/ml arasındadır. Sensitivitesi ise 0.225U/ml dir. Bu ölçüm yöntemi, IMA düzeylerinin kantitatif olarak ölçümü için hazırlanmış “sandwich tip enzim immünoassay” tekniğine dayanır. İlk inkübasyon süresinde, standart/örnek içerisindeki IMA, daha önceden kuyucuklara kaplanmış olan antikor tarafından tutulur. Yıkama aşamasından sonra IMA'ya spesifik monoklonal antikor eklenir. İkinci inkübasyon süresince, bu antikor immobilize olmuş antikora bağlanır. Bağlanmayan sekonder antikorların uzaklaştırılması amacıyla yapılan yıkama işleminden sonra, horseradish–peroksidaz (HRP) işaretli enzim ilave edilir. Bu enzim antikora bağlanır. Bağlanmayan fazla enzim yıkama işlemi ile uzaklaştırılır. Ortama substrat eklenir, oluşan rengin yoğunluğu, örnekte bulunan IMA miktarı ile doğru orantılıdır. Multiplak okuyucuda (Synergy HT, BioTek Ins., USA) 450 nm absorbands değerleri alındı. Standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak örneklerdeki IMA düzeyleri hesaplandı. Sonuçlar U/ml ile ifade edildi.

3.6.2.5. Doku analizleri

3.6.2.5.1. Biyokimyasal Yöntemlerde Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Ovaryum dokularının bir kısmı biyokimyasal analizler için kullanıldı. Cerrahi işlemle alınan ovaryum örnekleri serum fizyolojik ile iyice yıkandı. Kan hücrelerinden temizlendikten sonra cryovial tübe alındı ve buz üzerine kondu. Dokular, analiz koşullarına göre uygun homojenizasyon tamponu ile 1:8 oranında (w/v) homojenize edildi. Homojenizasyon için Tissue Lyser cihazı kullanıldı (TissueLyser II; Qiagen, West Sussex, UK). Dokular Gpx için

kullanılan ticari kit içeriğindeki assay buffer ile homojenize edildi. Homojenize edilen doku parçaları MDA analizi için 2500 g 10 dakika 4°C' de, GPx analizi içinse 10000 g 15 dakika 4°C' de sentrifüj edilip, süpernatantları toplandı. Tüm basamaklar +4 °C de (buz üzerinde) yapıldı ve süpernatantlar analizi yapılana kadar -80°C de saklandı.

MDA düzeyinin belirlenmesi: Ovaryum dokusundaki lipid peroksidasyonu MDA düzeyleri ölçülerek belirlendi. Bu ölçüm için (HPLC) yüksek performanslı sıvı kromatografi (Shimadzu VP Series, Tokyo, Japan) cihazı kullanıldı. Yöntemde lipid hidroperoksitleri asit katalizi ile MDA'ya parçalanarak, meydana gelen MDA'nın iki molekül tiyobarbitürik asit (TBA) ve bir molekül MDA'nın oluşturduğu kompleks floresans dedektör ile tespit edildi.. 150-4.6 mm, C18 100-5 (Macherey-Nagel) özelliklere sahip kolonda mobil faz olarak 10 mM, %30 metanol içeren fosfat tampon (pH 7) kullanıldı. Ultraviyole detektörün dalga boyu 532 nm'ye, floresan detektörün eksitasyon dalga boyu 515 nm ye, emisyon dalga boyu ise 553 nm'ye ayarlandı. Standart olarak 1,1,3,3-tetraetoksipropen (Sigma, 85H2501) kullanıldı. Standart konsantrasyonları 0.75, 1.5, 3, 5, 10, 20, 40, 50 µmol/L olarak belirlendi. Doku MDA değerleri µmol/mg protein olarak ifade edildi.

Glutatyon peroksidaz (GPx) aktivite düzeyinin belirlenmesi: Ticari olarak satın alınan, kolorimetrik kit (BioVison, Cat. No: #K762-100) ile değerlendirildi. Prensipli, glutatyonun (GSH) glutatyon disülfite (GSSG) oksitlenmesi sırasında GPx'in kümen hidroperoksit miktarını azaltmasına dayanır. GSSG, NADPH tüketimi ile üretilir ve NADPH miktarının azalması GPx aktivitesi ile orantılıdır. Kit prosedürü çalışıldıktan sonra, 5 dakika boyunca 340 nm'de spektrofotometre ile kinetik ölçüm alındı. Sonuçlar hesaplanıp, mU/mg protein olarak ifade edildi.

Protein Düzeylerinin Belirlenmesi: Tüm ovaryum doku örneklerinde yapılan analiz sonuçları mg proteine orantılanarak verildi. Doku örneklerinde protein ölçümünde biçinkonik asit (BCA) yöntemi kullanıldı. Bu amaçla Thermo marka (Kat No: BCA, Protein assay Kit, 2325) protein analiz kiti kullanıldı. Yöntemde, bakır sülfat BCA çözeltisine eklendiğinde elma yeşili renk oluşturmakta; bu çözelti protein çözeltisine ilave edildiğinde, proteinin peptid bağları ile etkileşerek, alkali koşullar altında iki değerlikli Cu²⁺ iyonları bir değerlikli Cu⁺ iyonlarına indirgenerek mavi-mor renkli bir kompleks oluşturmaktadır. Mavi rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile orantılıdır (2). Protein standartı olarak bidistile su içinde 25, 125, 250, 500, 1000, 1500, 2000 µg/mL konsantrasyonlarında sığır serum albumini (BSA) standartları

hazırlandı. Protein konsantrasyonları standart grafiği kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar $\mu\text{g/mL}$ olarak ifade edildi (65, 66).

3.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi

Tez Konusunun Belirlenmesi ve Literatür Taraması: Ocak 2015-Mart 2015
Etik Kurul Onayı: Mart 2015
TÜBİTAK Başvurusu Hazırlıkları: Ocak 2016-Haziran 2016
TÜBİTAK Onayı: Şubat 2017
TÜBİTAK Malzeme Temini Şubat: 2017-Temmuz 2017
DeneySEL Çalışma: Temmuz 2017
Laboratuvar Çalışmaları: Temmuz 2017-Eylül 2017
Tez Yazımı: Ocak 2017-Aralık 2017
Tez Savunması: 25 Aralık 2017

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Yapılan literatür taraması sonucu, gruplar arasındaki farklılıklar Kruskal Wallis, Mann Whitney-U testi kullanılarak hesaplanmıştır. $P<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.9. Araştırmanın sınırlılıkları

Silymarin suda çözünürlüğü az olan bir madde olması sebebiyle çözen olarak DMSO kullanılmıştır. Silymarin önce saf DMSO'da çözülüp, intraperitoneal enjeksiyondan hemen önce distile su ile konsantrasyonu %10'a indirilip, vorteks ile karıştırıldıktan sonra enjeksiyon yapılmıştır.

3.10. Etik kurul onayı

Çalışmanın literatür taraması Ocak 2015 tarihinde başlamış ve 31 Mart 2015 tarihinde etik kurul onayı alınmıştır. Daha sonra görülen lüzum üzerine isim değişikliği için tekrar başvuru yapılmış ve 10 Ocak 2017'de isim değişikliği kabul edilmiştir (EK-1 ve EK-2)

4. **BULGULAR**

4.1. **Işık Mikroskopik Bulgular**

4.1.1. ***Hematoksilen - eozin Boyama Bulguları:***

Kontrol grubuna ait preparatlarda, organı dıştan saran germinal epitel hücreleri kübik dizilimde ve bazal membranları düzgün olarak izlendi. Korteksde yer alan primordiyal, primer, sekonder ve tersiyer foliküllerin normal morfolojide olduğu gözlemlendi. Folikül granülosa hücrelerinin dizilimleri normal ve hücreler poligonal görünümde izlendi. Folikül içinde yer alan oosit'in zona pellusida'sı düzgün ve normal görünümdeydi. Kortekste yer yer korpus luteum yapıları gözlemlendi. Kortekste bağ dokusu yapıları normal görünümdeydi. Medullada yer alan vasküler yapılar da normal morfolojide izlendi (Şekil 18, 19, 20, 21).

Torsiyon+Detorsiyon grubuna ait preparatlarda, germinal epitel boyu ölçümü sonucu hücrelerin boylarında artış olduğu, folikül granülosa hücrelerinin diziliminde ve zona pellusida'nın yapısında bozukluklar olduğu gözlemlendi. Kortekste, bağ dokusu alanlarında ve folikül teka hücrelerinin etrafında hemorajik alanlar ve konjesyon izlendi. Yer yer doku içinde MNL infiltrasyonunda artış olduğu tespit edildi (Şekil 22, 23, 24, 25).

Torsiyon+Detorsiyon+Silymarin grubuna ait preparatlarda, germinal epitel hücrelerinin dizilimleri ve yükseklikleri normale benzer görünümde izlendi. Folikül granülosa hücrelerinin dizilimleri ve oosit'e ait zona pellusida yapıları normal morfolojideydi. Kortekste, değişik gelişme aşamalarındaki foliküller ve korpus luteumlar izlendi (Şekil 26, 27, 28, 29).

DMSO grubuna ait preparatlarda, kontrol grubuna benzer bulgular elde edildi (Şekil 30, 31, 32, 33).

Silymarin grubuna ait preparatlarda da kontrol grubuna benzer bulgular elde edildi (Şekil 34, 35, 36, 37).

Histomorfolojik hasar skorlaması (HHS) için; dokuda vazolilatasyon, Mono Nükleer Hücre infiltrasyonu (MNL), ödem ve hemoraji için, 0-3 arası puanlar verilerek skorlandı. 0; yok, 1; hafif, 2; orta, 3; yoğun olarak değerlendirildi. Gruplar arası farklılıklar Kruskal Wallis ve Man Whitney U testi kullanılarak test edildi. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (Tablo 5).

Hasar skorlaması sonucu elde edilen bulgular; Kontrol grubunda $0,0 \pm 0,0$, T+D grubunda $2,0 \pm 0,92$, T+D+SİL grubunda $1,0 \pm 0,0$, DMSO grubunda $0,0 \pm 0,0$, SİL grubunda $0,28 \pm 0,48$ olarak bulundu (Tablo 5).

İstatistiksel olarak; T+D grubu ve T+D+SİL gruplarında ($p=0,03$, $p=0,01$), Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hasarda anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi.

T+D+SİL grubu ($p=0,009$), T+D grubuyla karşılaştırıldığında hasarda anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi.

DMSO ve SİL grupları ($p= 0,00$, $p=0,007$), T+D+SİL grubuyla karşılaştırıldığında T+D+SİL grubunda hasarda anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi.

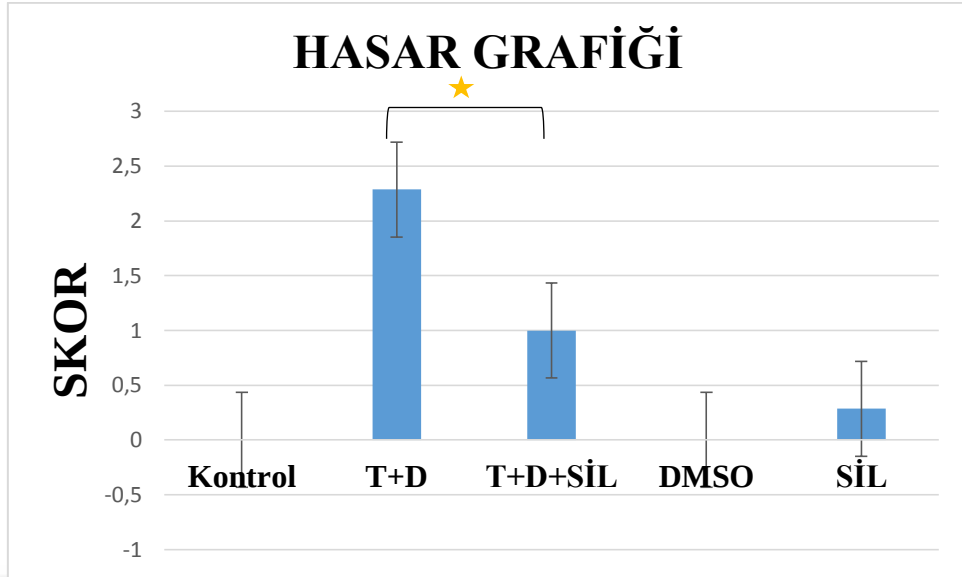
Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmadı (Tablo 6).

Tablo 5: Hasar skorlaması.

	Kontrol	T+D	T+D+SİL	DMSO	SİL
Hasar Skorlaması	0,0 ±0,0	2,0±0,92	1,0±0,0	0,0±0,0	0,28±0,48
Mann Whitney U testi	Gruplar arası anlamlı fark gözlemlendi.				

Tablo 6: Hasar skorlaması.

Grup Karşılaştırmaları	Değerler (p-value)	Sonuç
Kontrol T+D	0,03	<0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.
Kontrol T+D+SİL	0,01	<0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.
Kontrol DMSO	1	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
Kontrol SİL	0,17	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
T+D T+D+SİL	0,009	<0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.
T+D DMSO	0,002	<0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.
T+D SİL	0,004	<0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.
T+D+SİL DMSO	0,00	<0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.
T+D+SİL SİL	0,007	<0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.
DMSO SİL	0,14	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.



Şekil 16: HHS grafiği.

Germinal epitel kalınlıkları, Image Tool Version 3.0 programı kullanılarak ölçüldü. (Gruplar arası farklılıklar Kruskal Wallis ve Man Whitney U testi kullanılarak test edildi. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi).

Epitel kalınlıkları sırasıyla; Kontrol grubunda $6,87 \pm 1,70 \mu\text{m}$, T+D grubunda $9,10 \pm 2,23 \mu\text{m}$, T+D+SİL grubunda $7,15 \pm 1,29 \mu\text{m}$, DMSO grubunda $6,91 \pm 1,86 \mu\text{m}$, SİL grubunda ise $7,53 \pm 2,56 \mu\text{m}$ olarak bulundu (Tablo 7).

İstatistiksel olarak; T+D grubu Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında T+D grubunda epitel kalınlığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($p=0,048$).

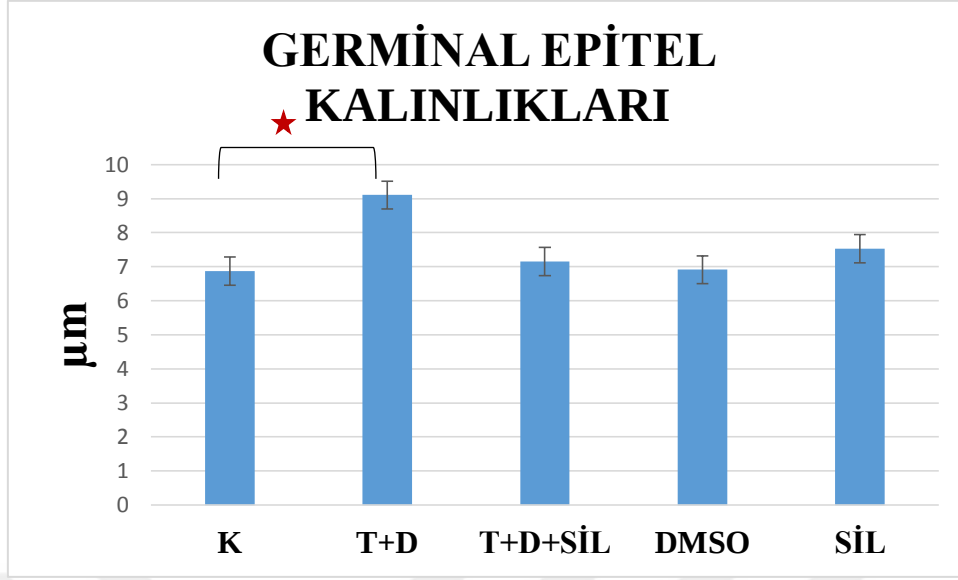
Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmadı (Tablo 8).

Tablo 7: Germinal epitel kalınlıkları

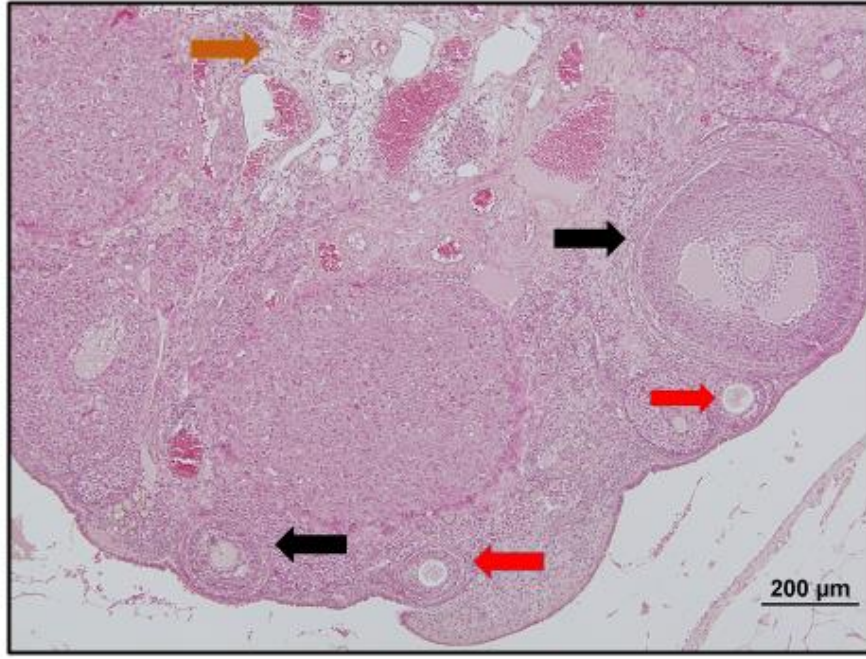
	Kontrol	T+D	T+D+SİL	DMSO	SİL
Germinal epitel kalınlıkları (μm)	$6,87 \pm 1,70$	$9,10 \pm 2,23$	$7,15 \pm 1,29$	$6,91 \pm 1,86$	$7,53 \pm 2,56$
Mann Whitney U testi	Gruplar arası anlamlı fark gözlemlendi.				

Tablo 8: Germinal epitel kalınlıkları

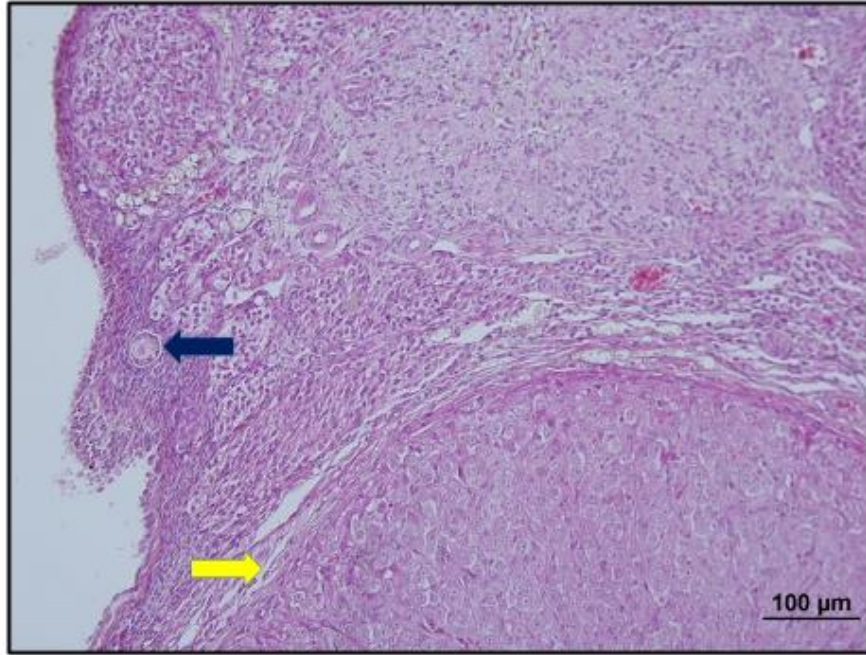
Grup Karşılaştırmaları	Değerler (p-value)	Sonuç
Kontrol T+D	0,048	<0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.
Kontrol T+D+SiL	0,79	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
Kontrol DMSO	0,74	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
Kontrol SiL	0,33	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
T+D T+D+SiL	0,08	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
T+D DMSO	0,06	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
T+D SiL	0,33	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
T+D+SiL DMSO	0,74	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
T+D+SiL SiL	0,84	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
DMSO SiL	0,60	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.



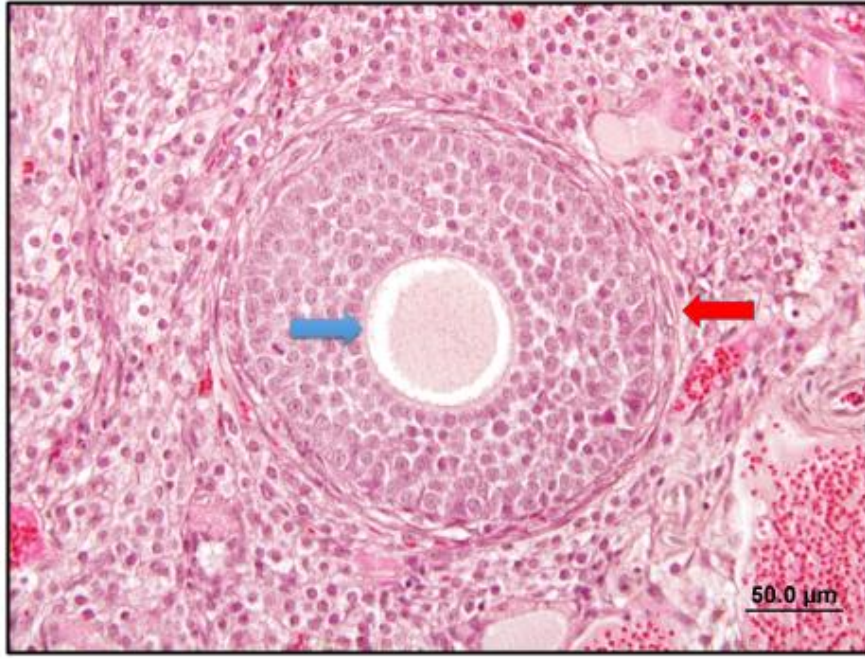
Şekil 17: Germinal Epitel Kalınlıkları.



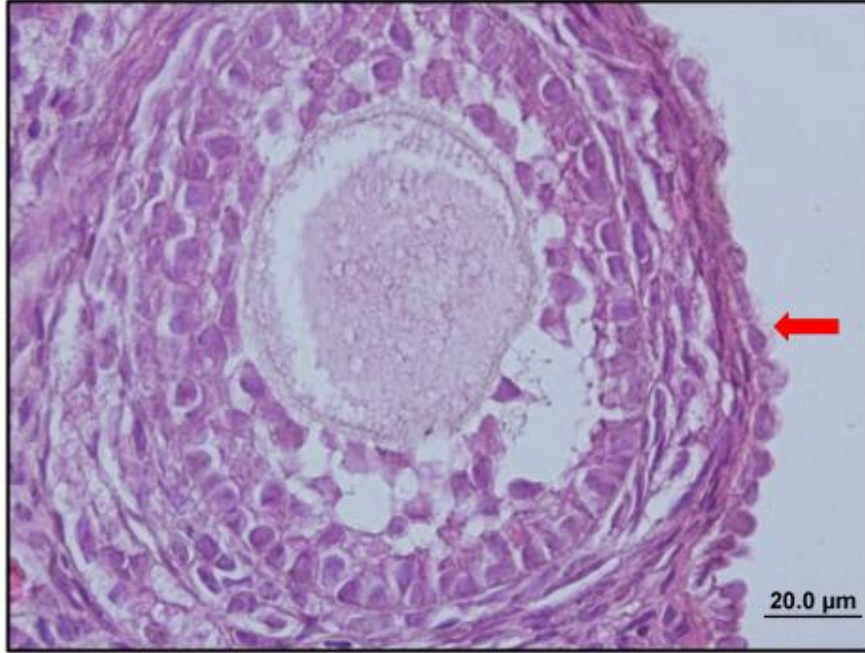
Şekil 18: Kontrol grubu ovaryum kesiti. Kortekste yer alan primer foliküller (←) ile, sekonder foliküller (→) ile, medulla (→) ile gösterilmiştir. (H&E, X10)



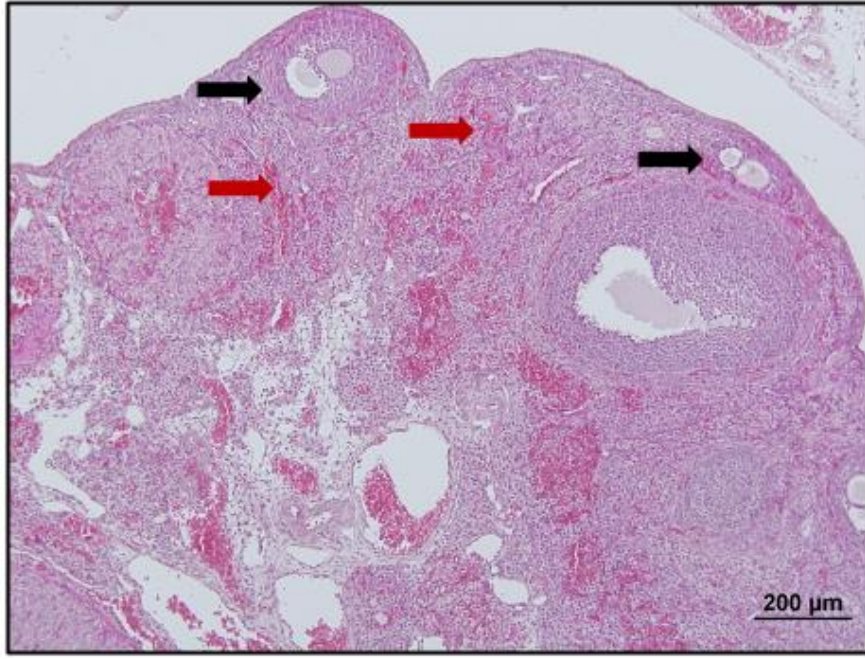
Şekil 19: Kontrol grubu ovaryum kesiti. Kortekste yer alan primordiyal foliküller (←) ile, korpus luteum (→) ile gösterilmiştir. (H&E, X20)



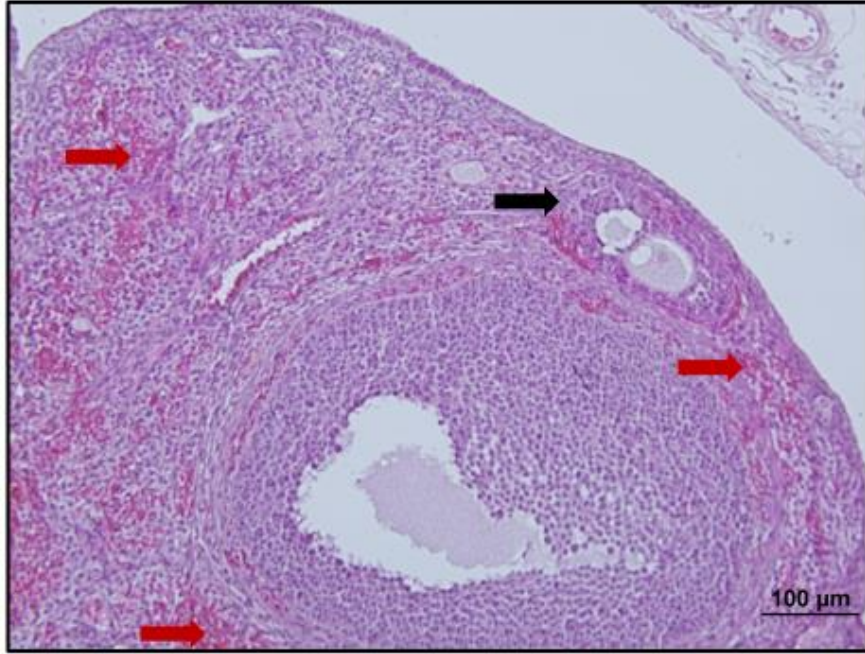
Şekil 20: Kontrol grubu ovaryum kesiti. Kortekste yer alan primer folikül (←) ile, oosit (→) ile gösterilmiştir. (H&E, X40)



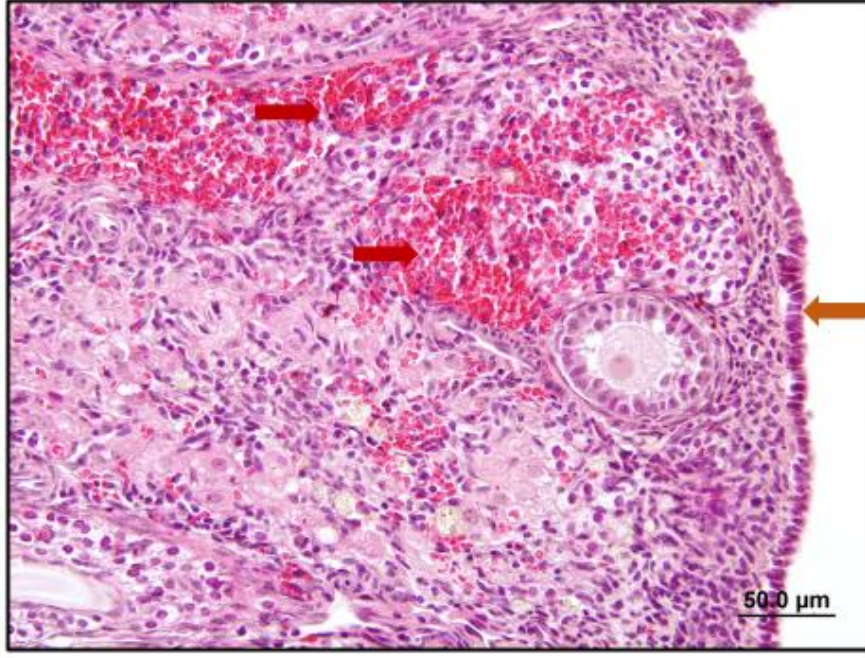
Şekil 21: Kontrol grubu ovaryum kesiti. Kortekste yer alan primer folikül. Germinal epitel (←) gösterilmiştir. (H&E, X100)



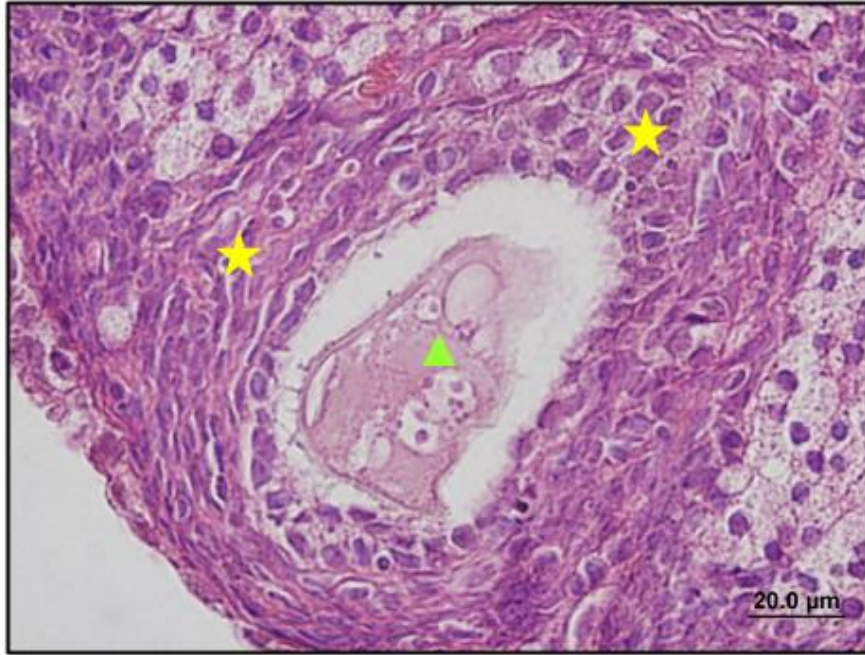
Şekil 22: T+D grubu ovaryum kesiti. Sekonder folikül (■) ile, konjesyon (■) ile gösterilmiştir. (H&E, X10)



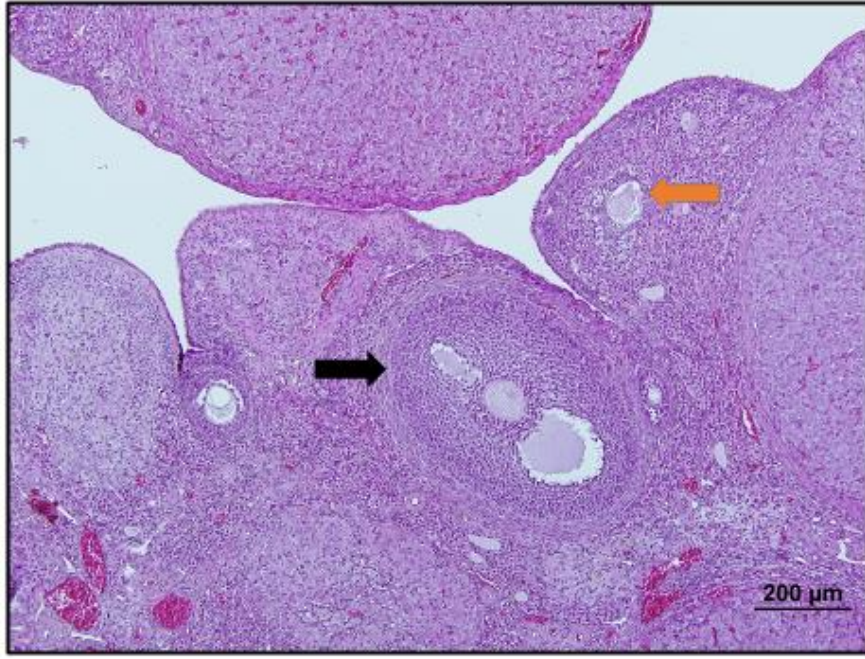
Şekil 23: T+D grubu ovaryum kesiti. Sekonder folikül (■) ile, konjesyon (■) ile gösterilmiştir. (H&E, X20)



Şekil 24: T+D grubu ovaryum kesiti. Germinal epitel (←) ile konjesyon (→) ile gösterilmiştir. (H&E, X40)

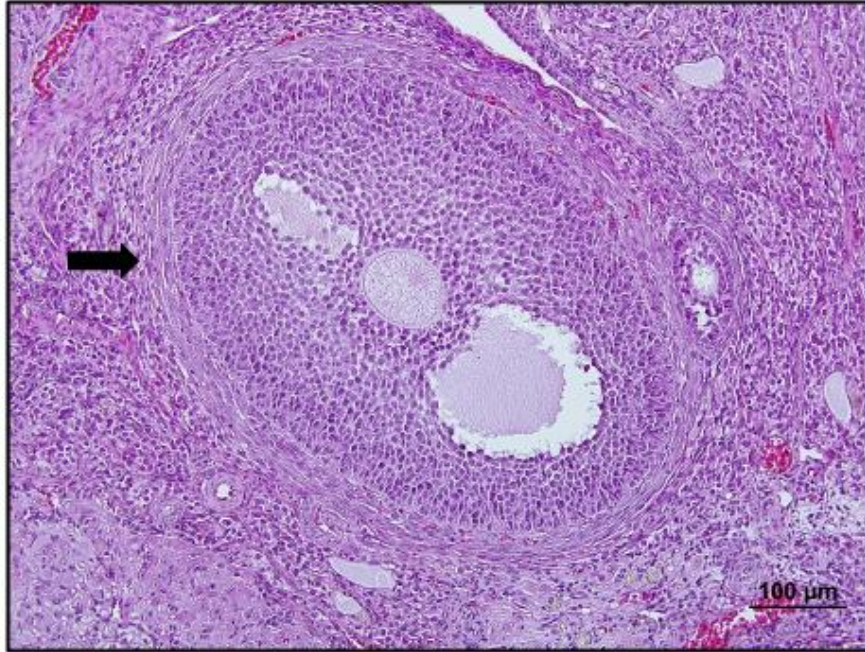


Şekil 25: Torsiyon+Detorsiyon grubu ovaryum kesiti. Oosit ve zona pellusida dejenerasyonu (▲) ile ve folikül epitel hücre diziliminde bozukluk (★) ile gösterilmiştir. (H&E, X100)



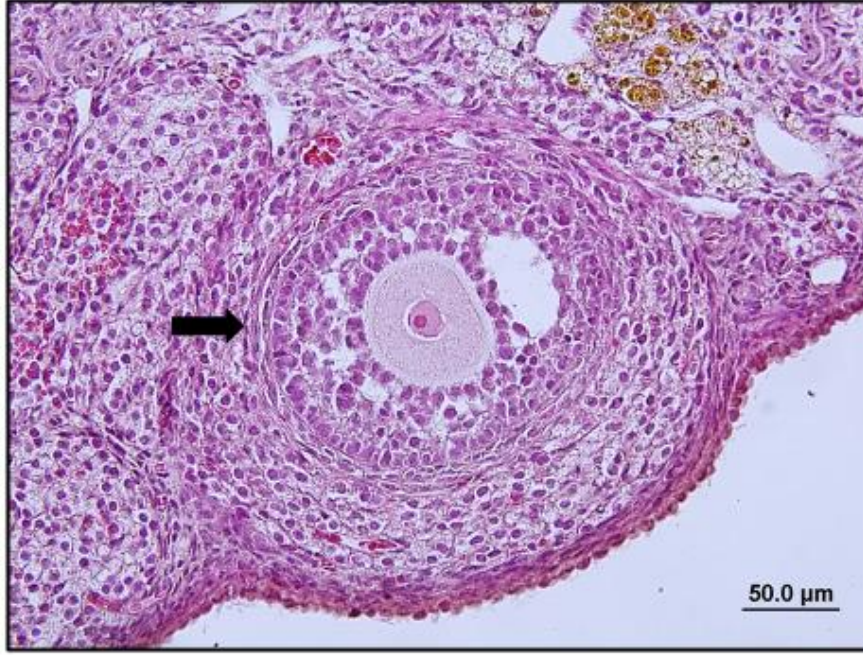
Şekil 26: T+D+SiL grubu ovaryum kesiti.

Sekonder folikül (➡) ile, atretik folikül (➡) ile gösterilmiştir. (H&E, X10)

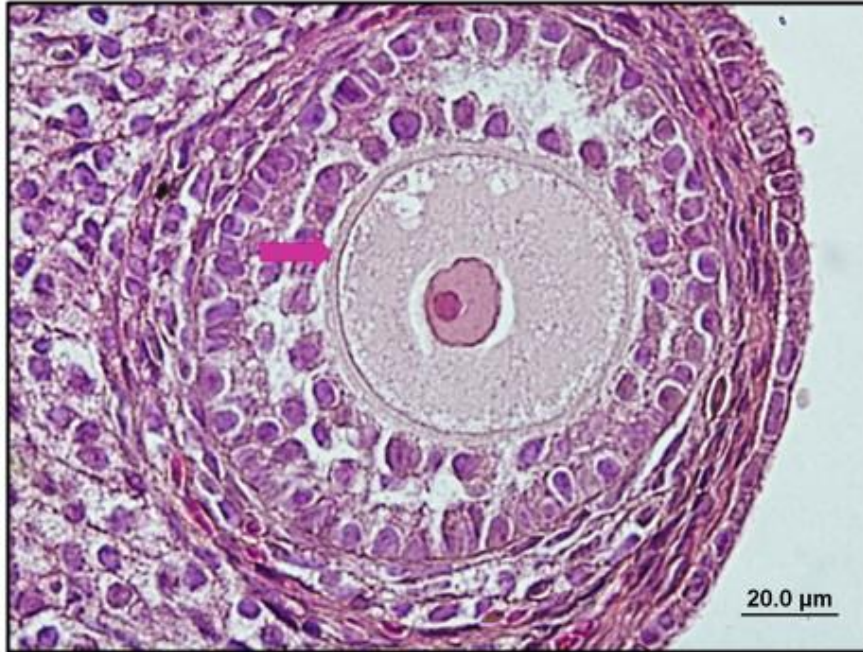


Şekil 27: T+D+SiL grubu ovaryum kesiti.

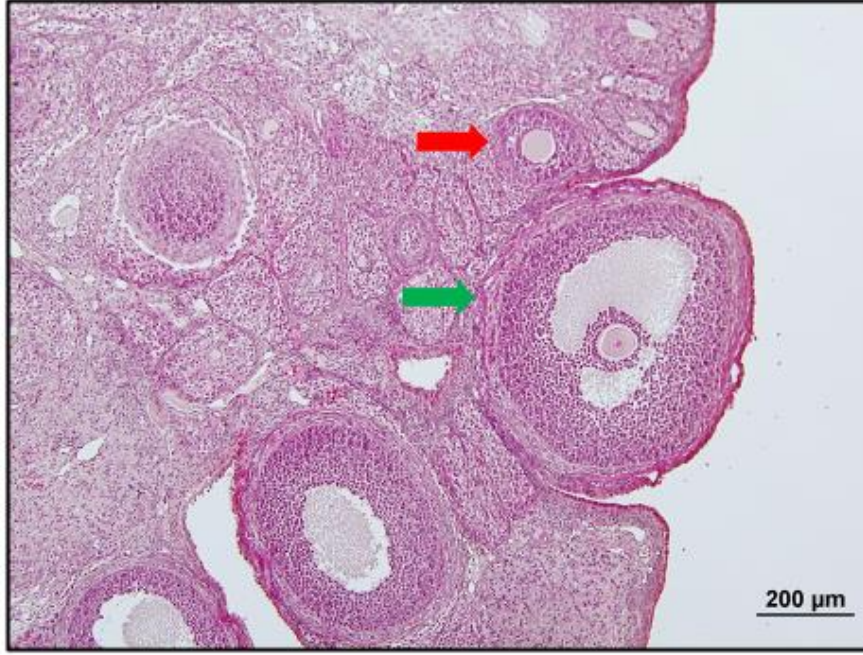
Sekonder folikül (➡) ile gösterilmiştir. (H&E, X20)



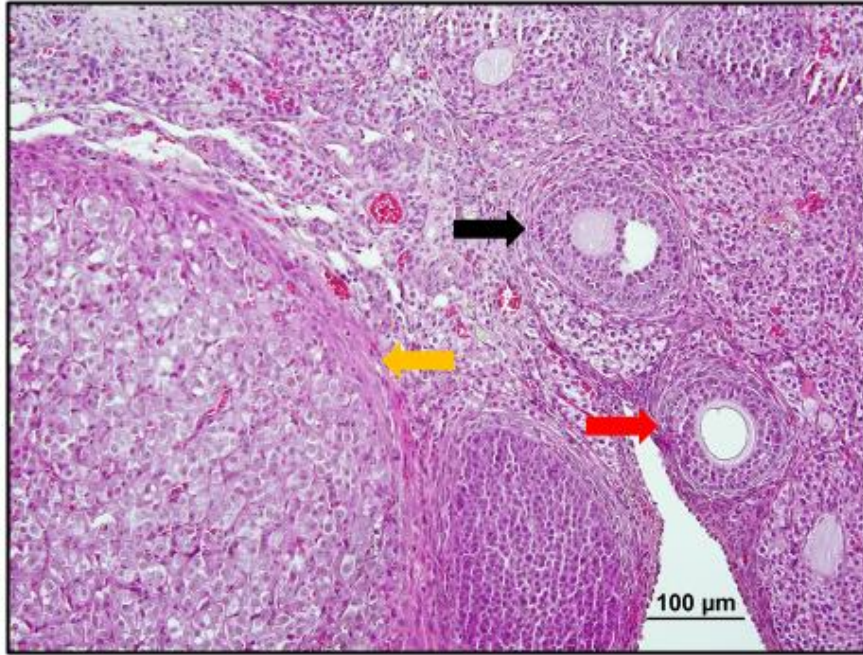
Şekil 28: T+D+SİL grubu ovaryum kesiti.
Sekonder folikül () ile gösterilmiştir. (H&E, X40)



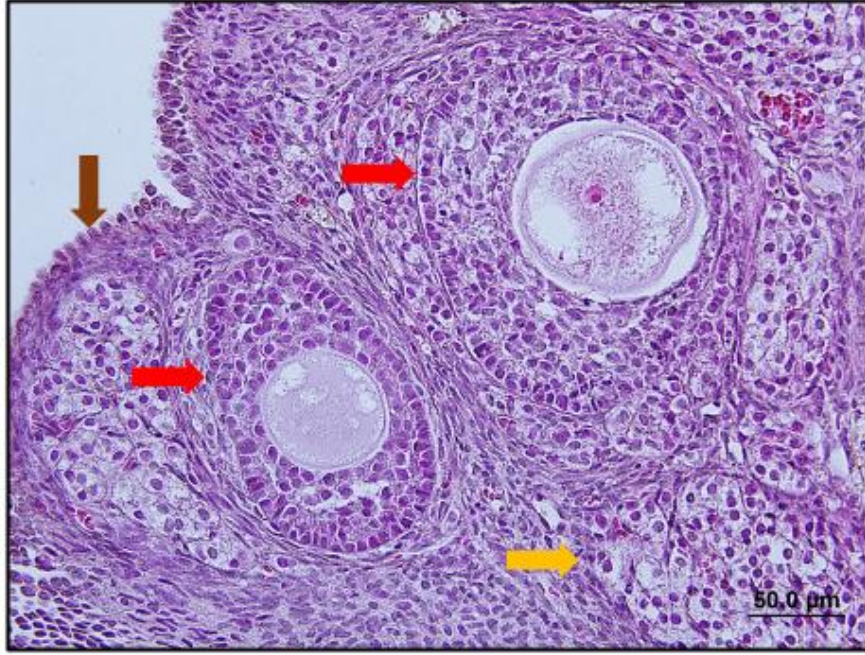
Şekil 29: T+D+SİL grubu ovaryum kesiti. Primer folikül. Zona pellusida
() ile gösterilmiştir. (H&E,X100)



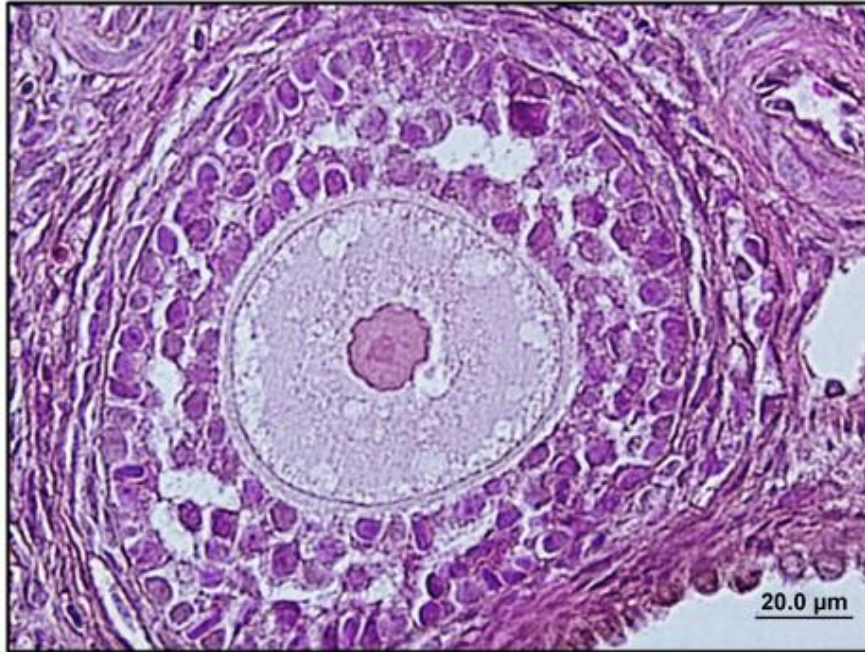
Şekil 30: DMSO grubu ovaryum kesiti. Primer folikül (➡) ile, tersiyer folikül (➡) ile gösterilmiştir. (H&E, X10)



Şekil 31: DMSO grubu ovaryum kesiti. Sekonder folikül (➡) ile, primer folikül (➡) ile, korpus luteum (➡) ile gösterilmiştir. (H&E, X20)



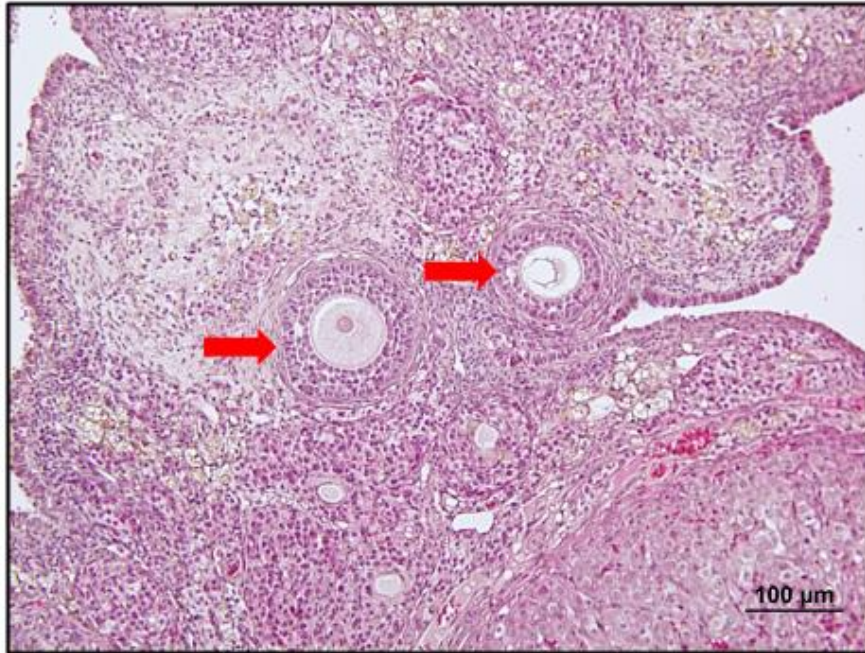
Şekil 32: DMSO grubu ovaryum kesiti. Primer foliküller (→) ile, germinal epitel (↓) ile gösterilmiştir. (H&E, X40)



Şekil 33: DMSO grubu ovaryum kesiti. Primer folikül. (H&E, X100)



Şekil 34: SİL grubu ovaryum kesiti. Sekonder folikül (■) ile gösterilmiştir.
(H&E, X10)



Şekil 35: SİL grubu ovaryum kesiti. Primer foliküller (■) ile gösterilmiştir.
(H&E, X20)



Şekil 36: SİL grubu ovaryum kesiti. Sekonder folikül (↓) ile gösterilmiştir. (H&E, X40)



Şekil 37: Silymarin grubu ovaryum kesiti. Primer folikül. Zona pellusida (→) ile gösterilmiştir. (H&E, X100)

4.1.2. *Masson-trikrom boyama bulguları*

Masson trikrom boyaması ile bağdokusu artışına bakıldı. 0 ile 3 arası skorlanarak gruplar arası farklılıklar Kruskal Wallis ve Man Whitney U testi kullanılarak test edildi. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Sonuçlar sırasıyla; Kontrol grubunda $0,00 \pm 0,00$, T+D grubunda $0,75 \pm 0,70$, T+D+SİL grubunda $0,42 \pm 0,53$, DMSO grubunda $0,42 \pm 0,53$ ve SİL grubunda $0,28 \pm 0,48$ bulundu (Tablo 9).

İstatistiksel olarak; Kontrol grubu, T+D grubu ile karşılaştırıldığında T+D grubunda bağ dokusunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($p=0,022$).

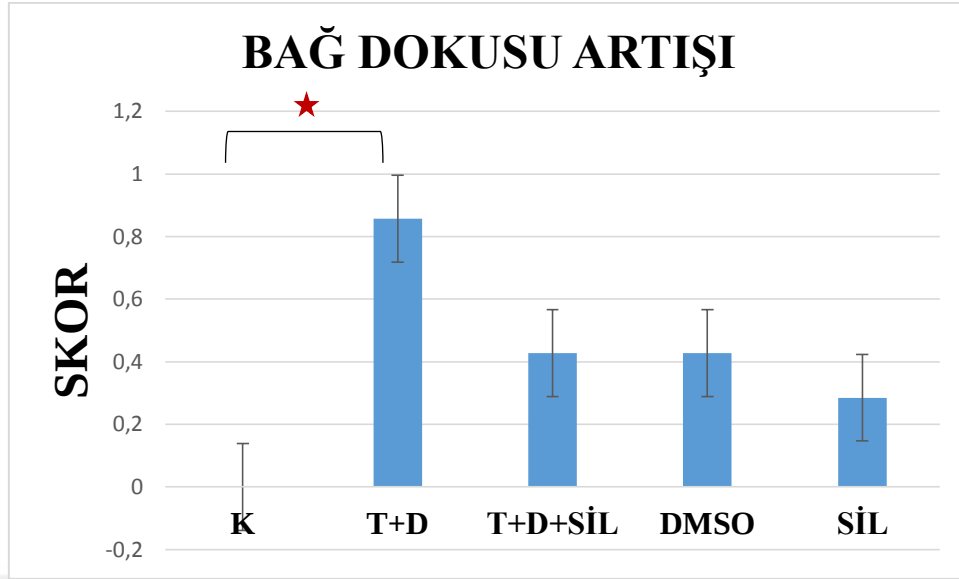
Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmadı (Tablo 10).

Tablo 9: Masson trikrom

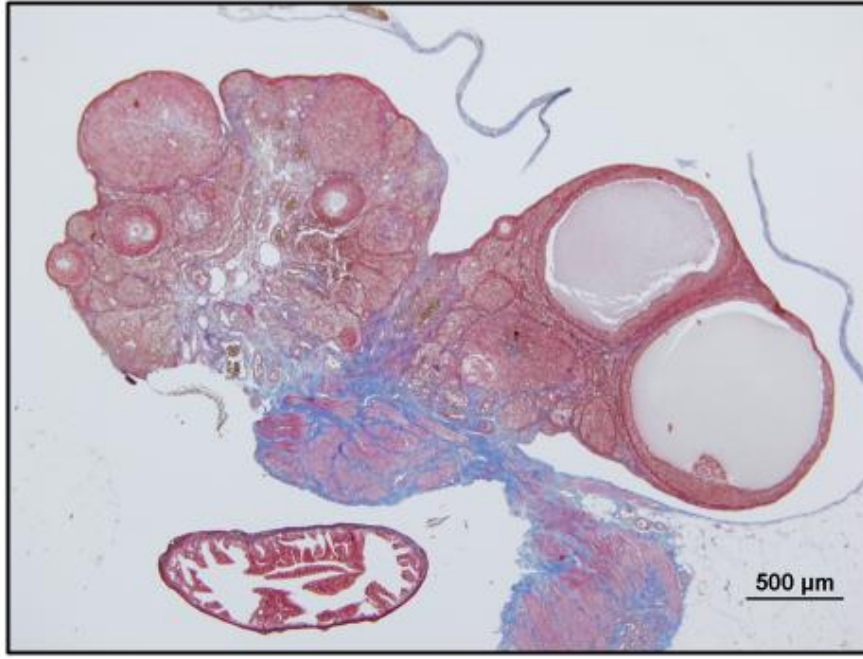
	Kontrol	T+D	T+D+SİL	DMSO	SİL
Masson Trikrom	$0,00 \pm 0,00$	$0,75 \pm 0,70$	$0,42 \pm 0,53$	$0,42 \pm 0,53$	$0,28 \pm 0,48$
Mann Whitney U testi	Gruplar arası anlamlı fark gözlemlendi.				

Tablo 10: Masson trikrom

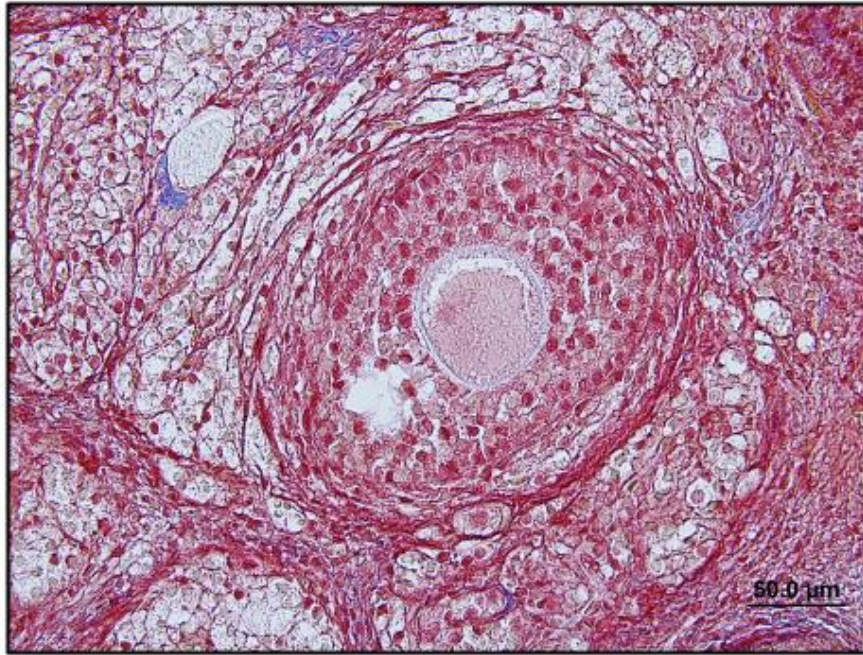
Grup Karşılaştırmaları	Değerler (p-value)	Sonuç
Kontrol T+D	0,022	<0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.
Kontrol T+D+SİL	0,079	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
Kontrol DMSO	0,079	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
Kontrol SİL	0,17	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
T+D T+D+SİL	0,36	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
T+D DMSO	0,36	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
T+D SİL	0,17	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
T+D+SİL DMSO	1	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
T+D+SİL SİL	0,59	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
DMSO SİL	0,59	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.



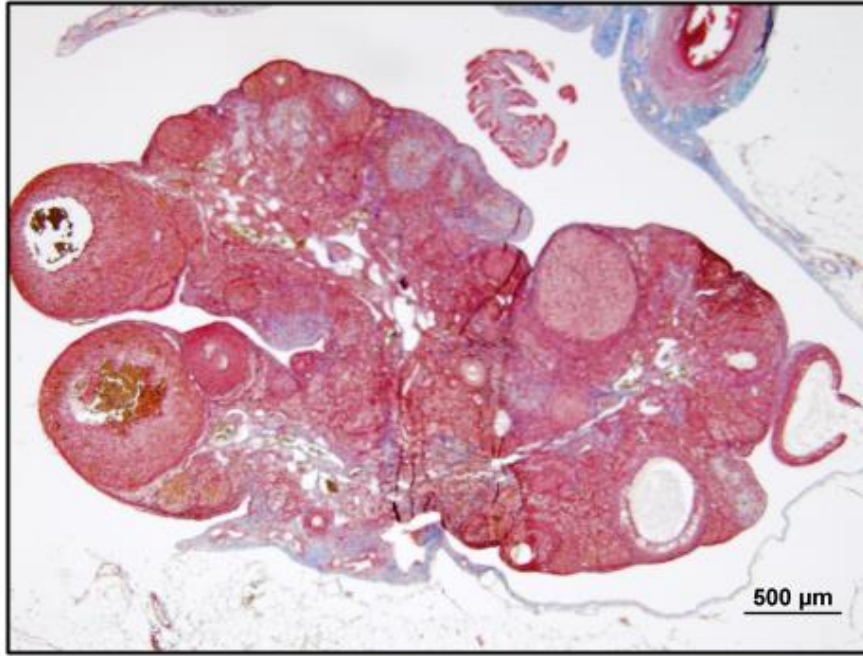
Şekil 38: Bağ dokusu artışı grafiği.



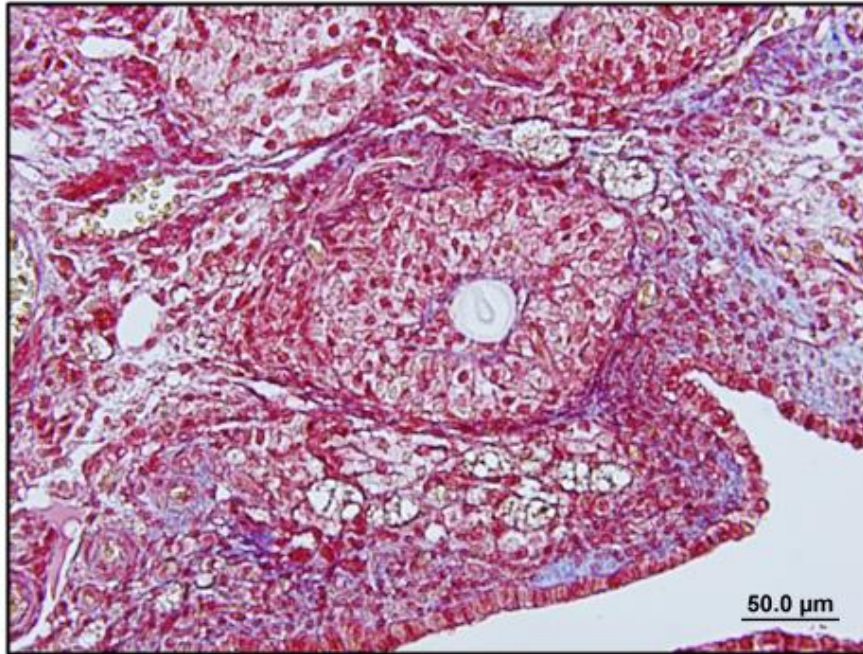
Şekil 39: Kontrol grubu ovaryum kesiti. (Masson trikrom, X4)



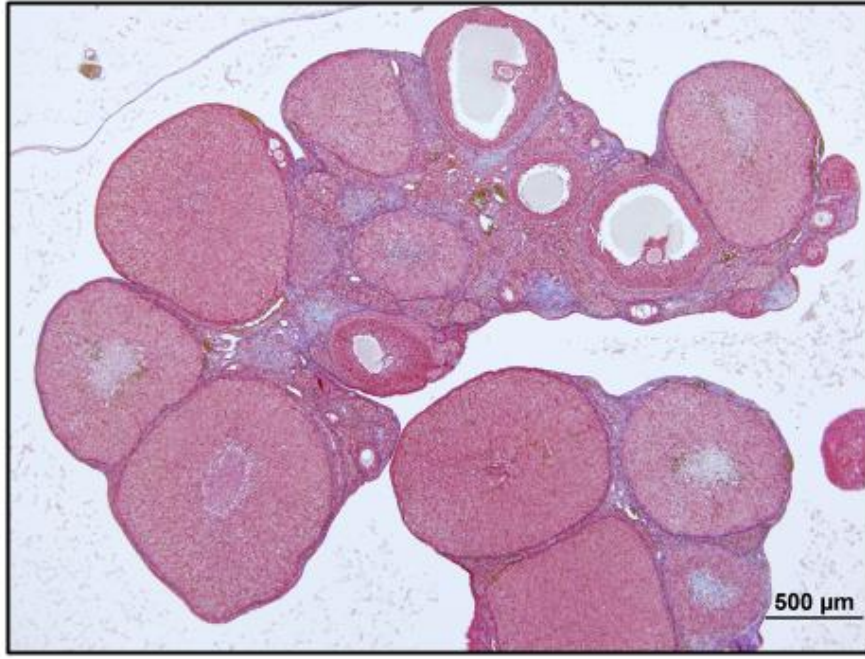
Şekil 40: Kontrol grubu ovaryum kesiti. (Masson trikrom, X40)



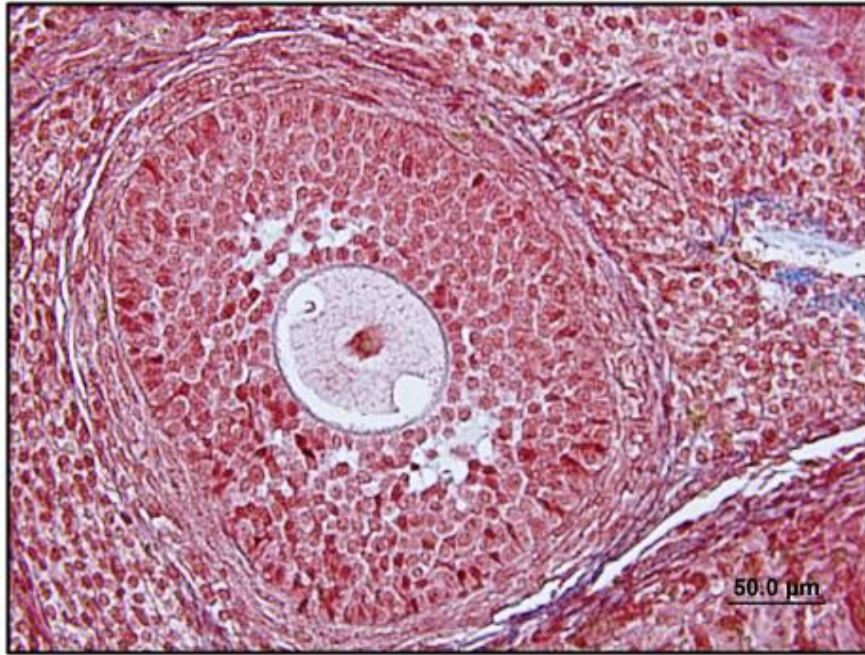
Şekil 41: T+D grubu ovaryum kesiti. (Masson trikrom, X4)



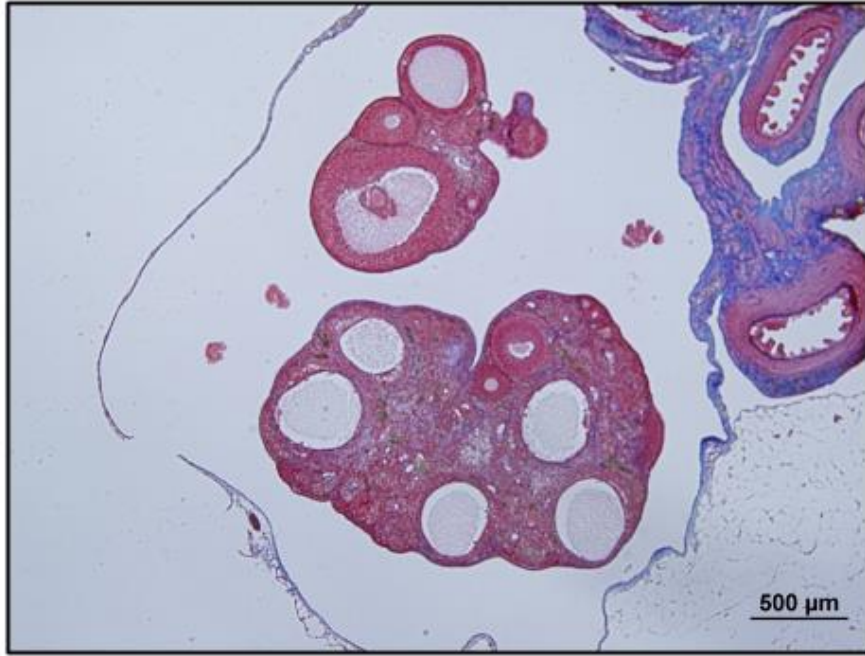
Şekil 42: T+D grubu ovaryum kesiti. (Masson trikrom, X40)



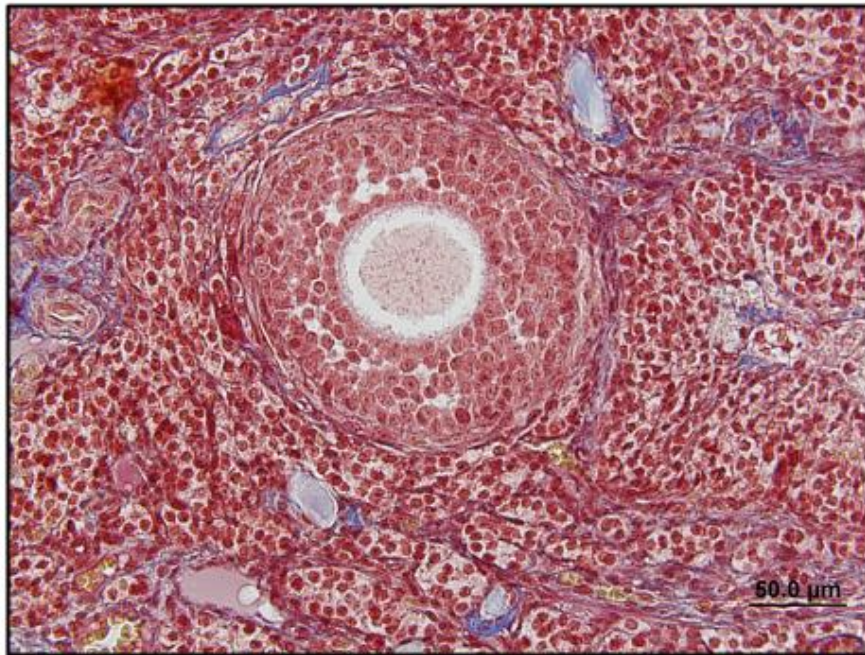
Şekil 43: T+D+SİL grubu ovaryum kesiti. (Masson trikrom, X4)



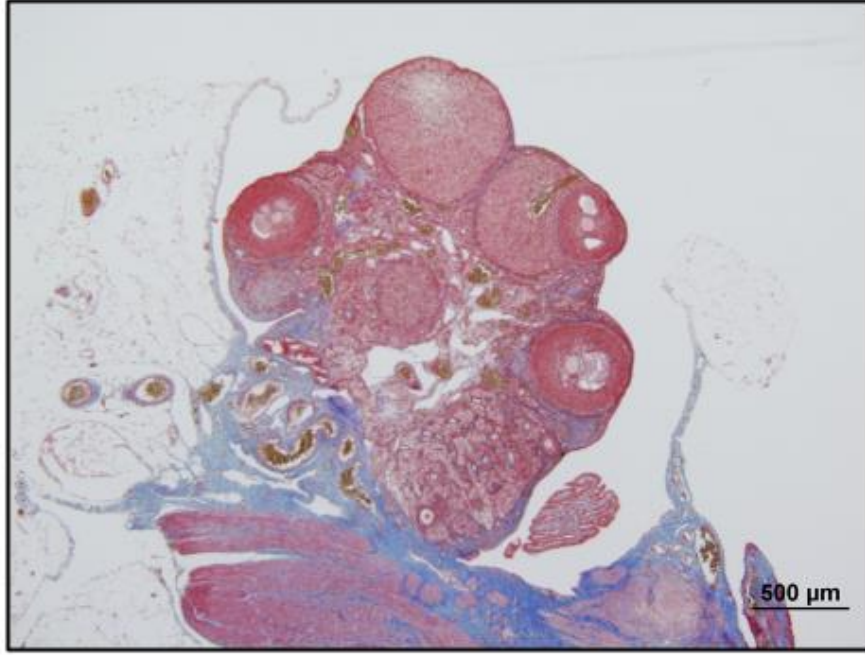
Şekil 44: T+D+SİL grubu ovaryum kesiti. (Masson trikrom, X40)



Şekil 45: DMSO grubu ovaryum kesiti. (Masson trikrom, X4)



Şekil 46: DMSO grubu ovaryum kesiti. (Masson trikrom, X40)



Şekil 47: Silymarin grubu ovaryum kesiti. (Masson trikrom, X4)



Şekil 48: Silymarin grubu ovaryum kesiti. (Masson trikrom, X40)

4.1.3. Periyodik asit shiff Boyama Bulguları

PAS ile boyanmış 5µm kalınlığındaki kesitlerde sekonder foliküllerde zona pellusida kalınlıkları Image Tool Version 3. 0 programı kullanılarak ölçüldü. Gruplar arası farklılıklar Kruskal Wallis ve Man Whitney U testi kullanılarak test edildi. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Zona pellusida kalınlıkları sırasıyla; Kontrol grubunda $3,05 \pm 0,71$ µm, T+D grubunda $3,09 \pm 0,71$ µm, T+D+SİL grubunda $2,86 \pm 1,02$ µm, DMSO grubunda $2,87 \pm 1,02$ µm ve SİL grubunda $2,71 \pm 0,8$ µm olarak ölçüldü (Tablo 11).

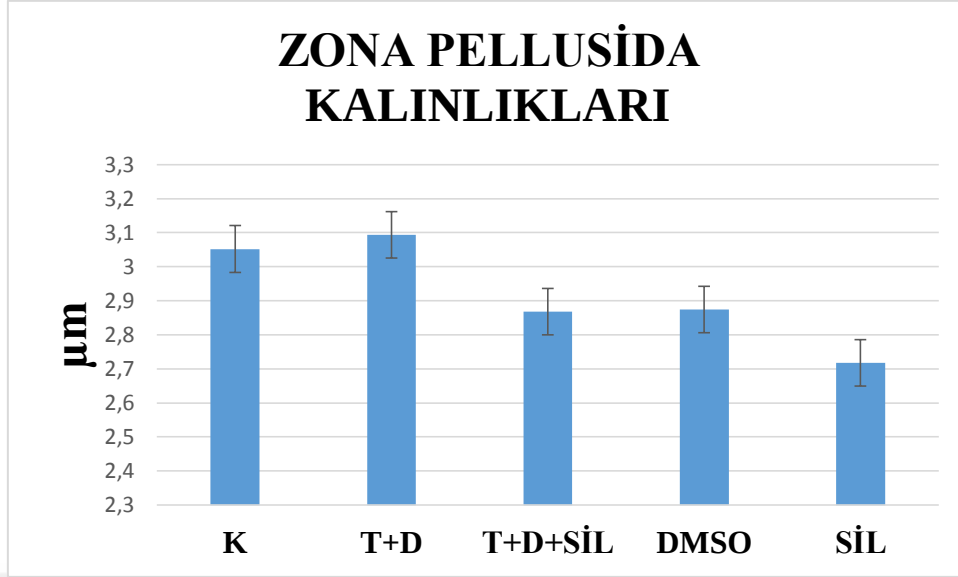
Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmadı. (Tablo 12).

Tablo 11: Zona Pellusida Kalınlıkları

	Kontrol	T+D	T+D+SİL	DMSO	SİL
ZP(µm)	3,05 ±0,71	3,09±0,71	2,86±1,02	2,87±1,02	2,71±0,8
Mann Whitney U testi	Gruplar arası anlamlı fark gözlenmedi.				

Tablo 12: Zona Pellusida Kalınlıkları

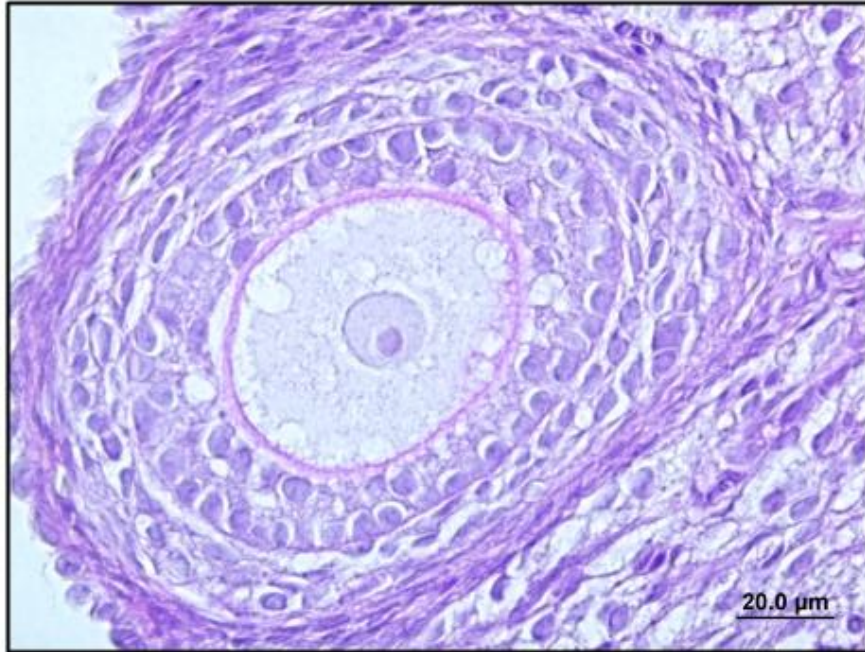
Grup Karşılaştırmaları	Değerler (p-value)	Sonuç
Kontrol T+D	0,94	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
Kontrol T+D+SİL	0,40	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
Kontrol DMSO	1,0	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
Kontrol SİL	0,22	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
T+D T+D+SİL	0,25	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
T+D DMSO	0,79	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
T+D SİL	0,22	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
T+D+SİL DMSO	0,37	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
T+D+SİL SİL	0,74	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
DMSO SİL	0,48	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.



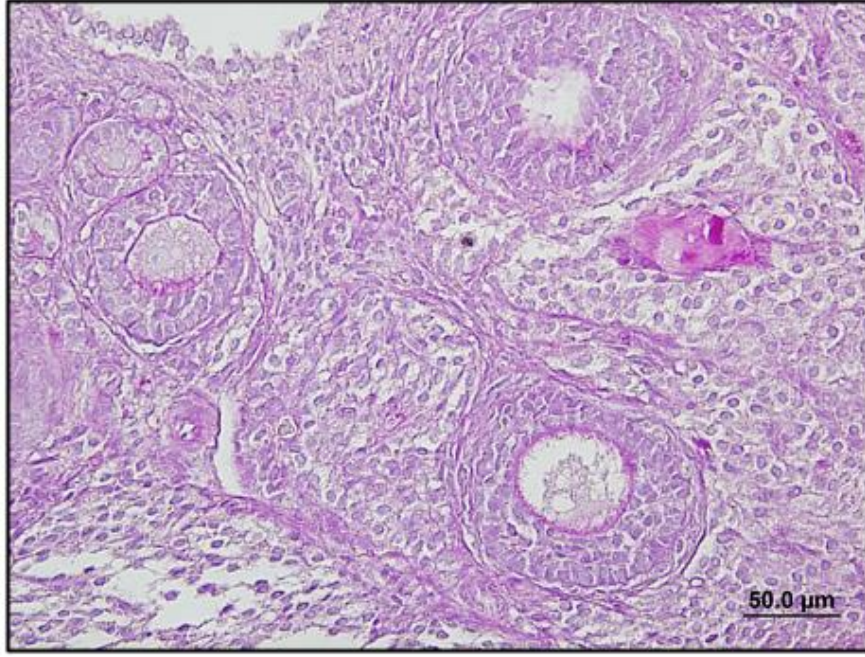
Şekil 49: Zona pellusida kalınlıkları grafiği.



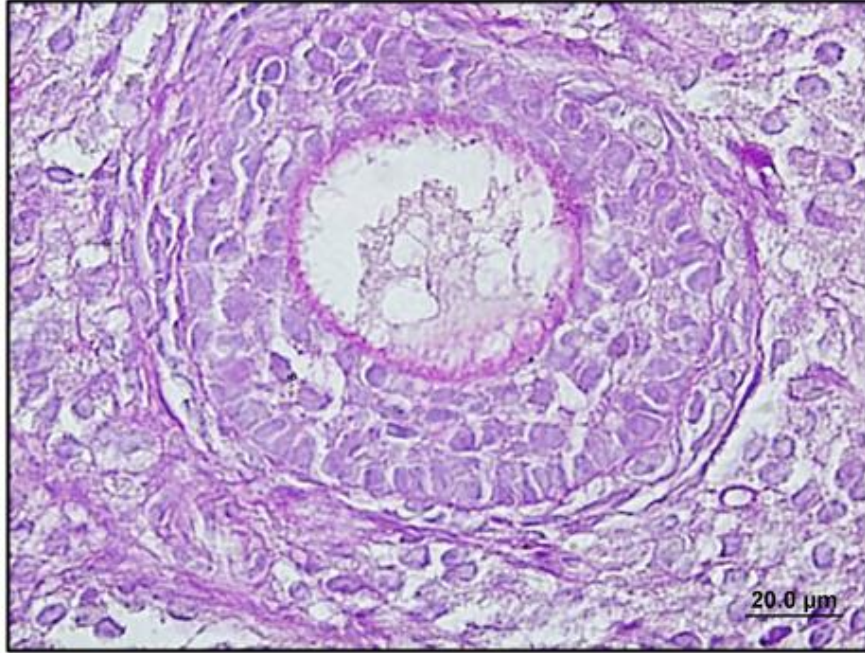
Şekil 50: Kontrol grubu ovaryum kesiti. (PAS, X40)



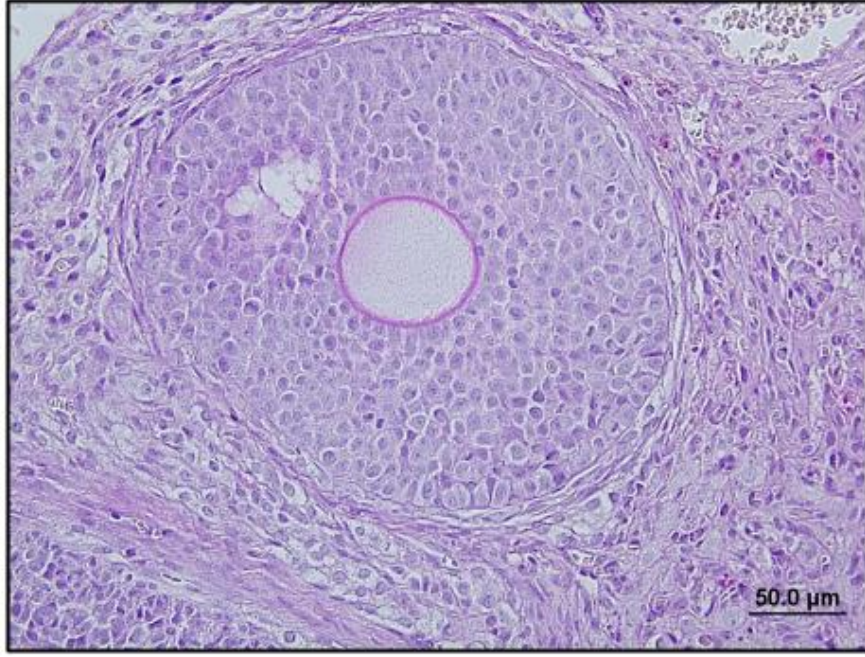
Şekil 51: Kontrol grubu ovaryum kesiti. (PAS, X100)



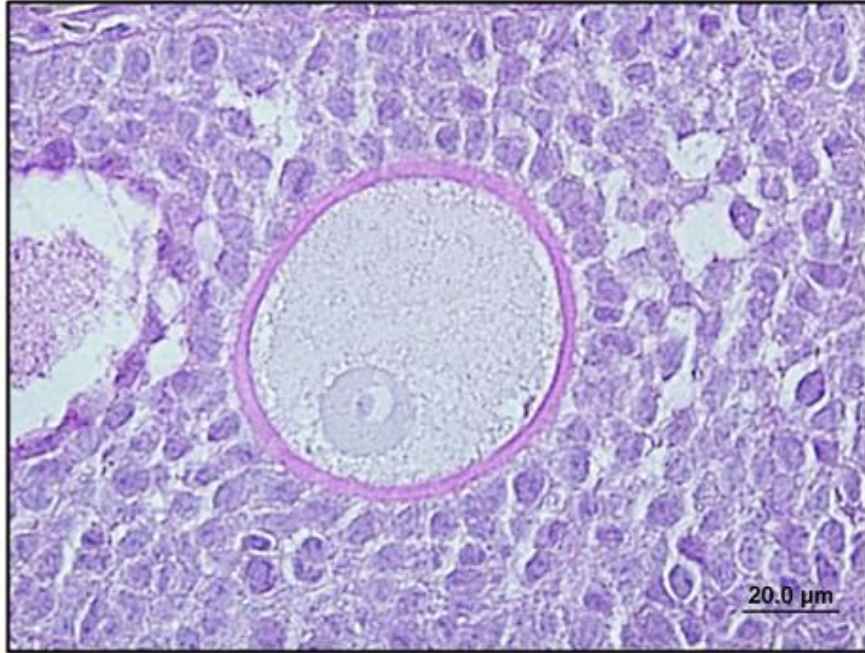
Şekil 52: T+D grubu ovaryum kesiti. (PAS, X40)



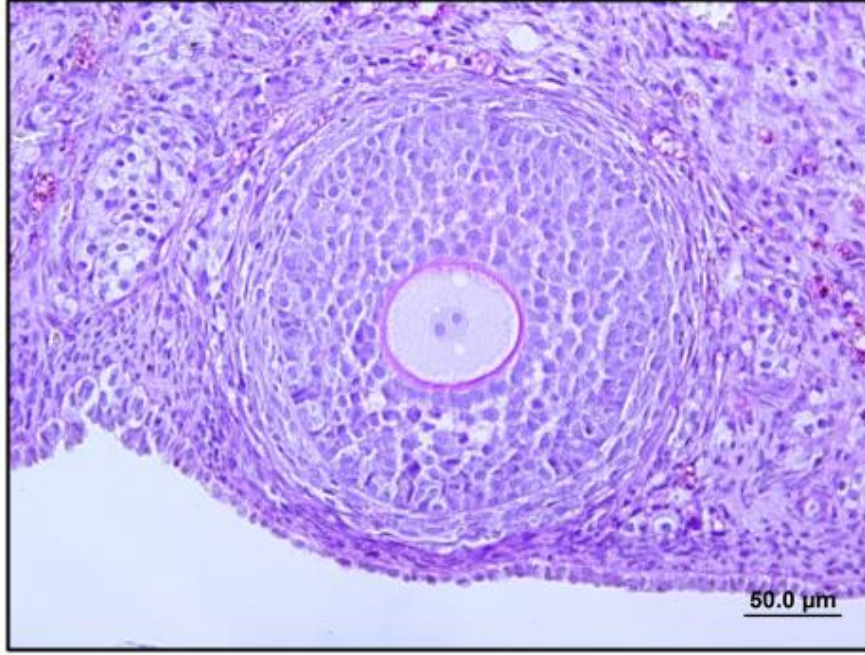
Şekil 53: T+D grubu ovaryum kesiti. (PAS, X100)



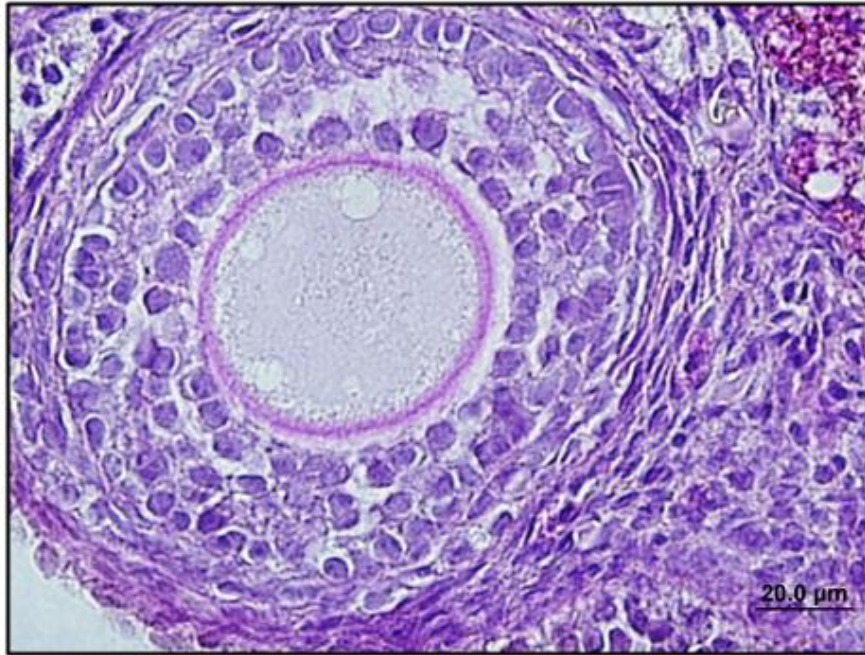
**Şekil 54: T+D+SiL grubu ovaryum kesiti.
(PAS, X40)**



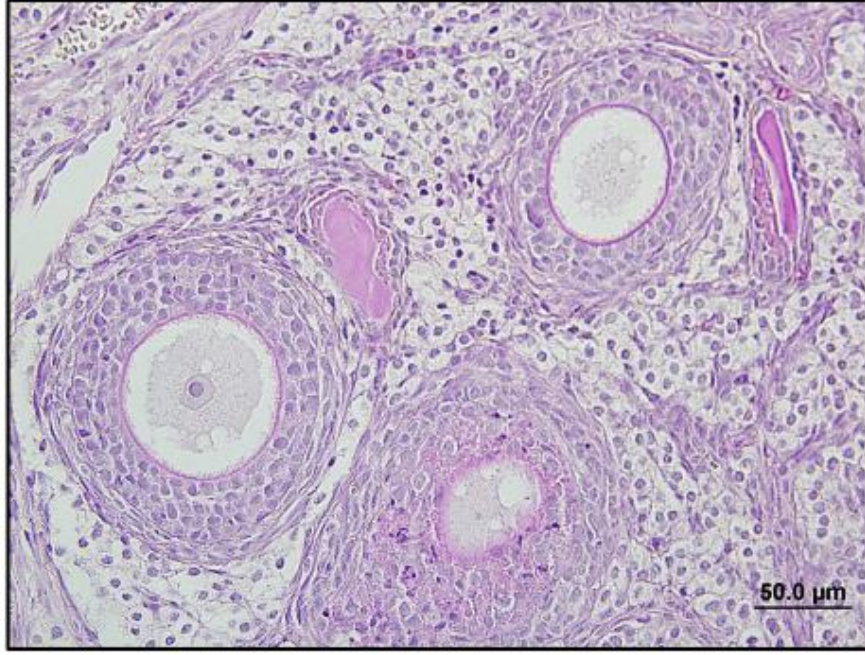
**Şekil 55: T+D+SiL grubu ovaryum kesiti.
(PAS, X100)**



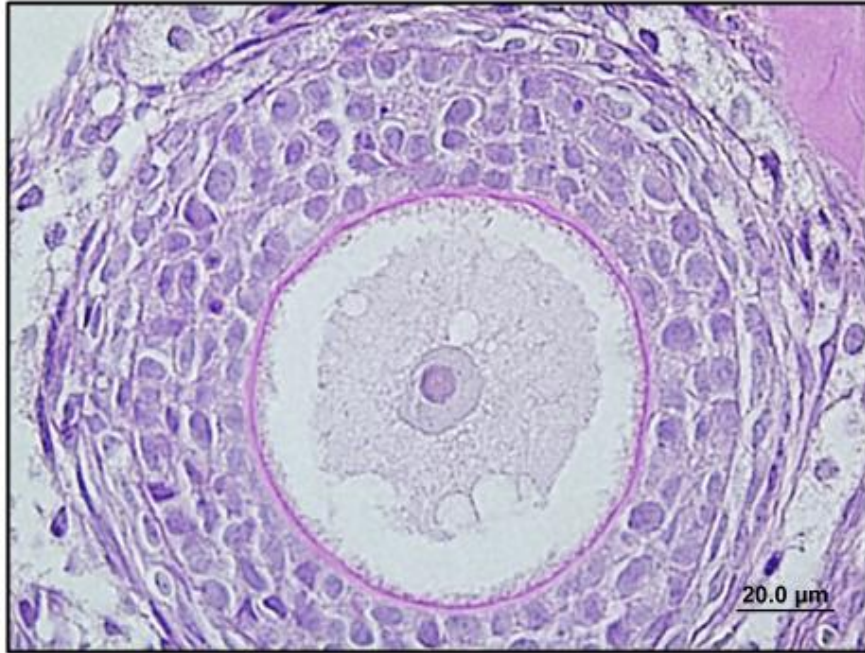
Şekil 56: DMSO grubu ovaryum kesiti. (PAS, X40)



Şekil 57: DMSO grubu ovaryum kesiti. (PAS, X100)



Şekil 58: SİL grubu ovaryum kesiti. (PAS, X40)



Şekil 59: SİL grubu ovaryum kesiti. (PAS, X100)

4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.2.1. TUNEL Boyama Bulguları

TUNEL boyaması apoptotik hücreleri göstermek amacıyla yapıldı. Image Tool Version 3. 0 programı kullanılarak rasgele 100 adet hücre sayıldı. Apoptotik hücre sayısının normal hücrelere oranı hesaplandı. Gruplar arası farklılıklar Kruskal Wallis ve Man Whitney U testi kullanılarak test edildi. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Apoptotik hücre sayıları sırasıyla; Kontrol grubunda $25,71 \pm 11,07$, T+D grubunda $79,42 \pm 6,39$, T+D+SİL grubunda $27,71 \pm 13,59$, DMSO grubunda $44,0 \pm 18,51$ ve SİL grubunda $31,57 \pm 12,01$ olarak sayıldı (Tablo 13).

İstatistiksel olarak; T+D grubu Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında apoptotik hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($p=0,002$).

T+D+SİL grubu, DMSO grubu ve SİL grupları ($p=0,002$, $p=0,004$, $p=0,002$), T+D grubu ile karşılaştırıldığında, 3 grupta da apoptotik hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi.

T+D+SİL grubu; DMSO grubu ile karşılaştırıldığında DMSO grubunda apoptotik hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($p=0,01$).

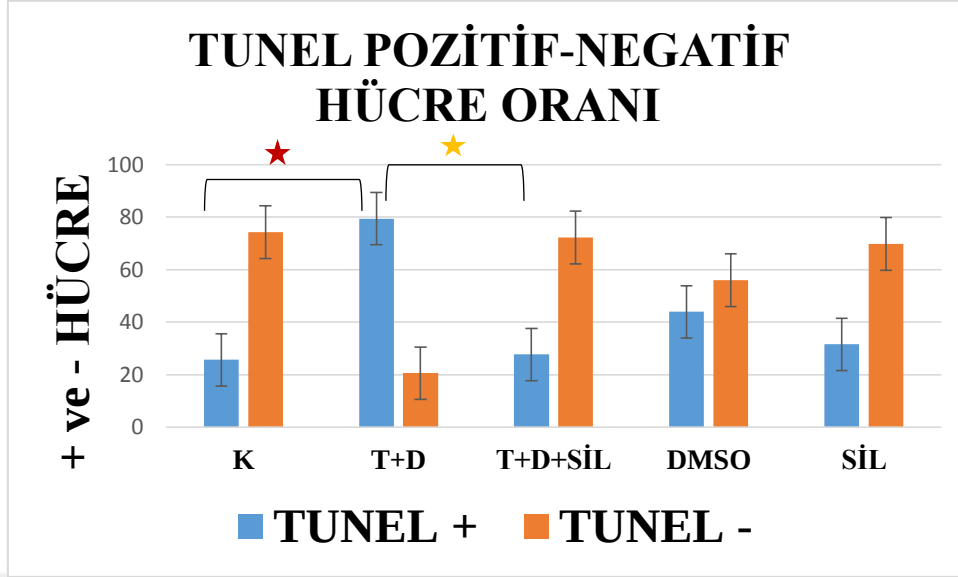
Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmadı (Tablo 14).

Tablo 13: TUNEL

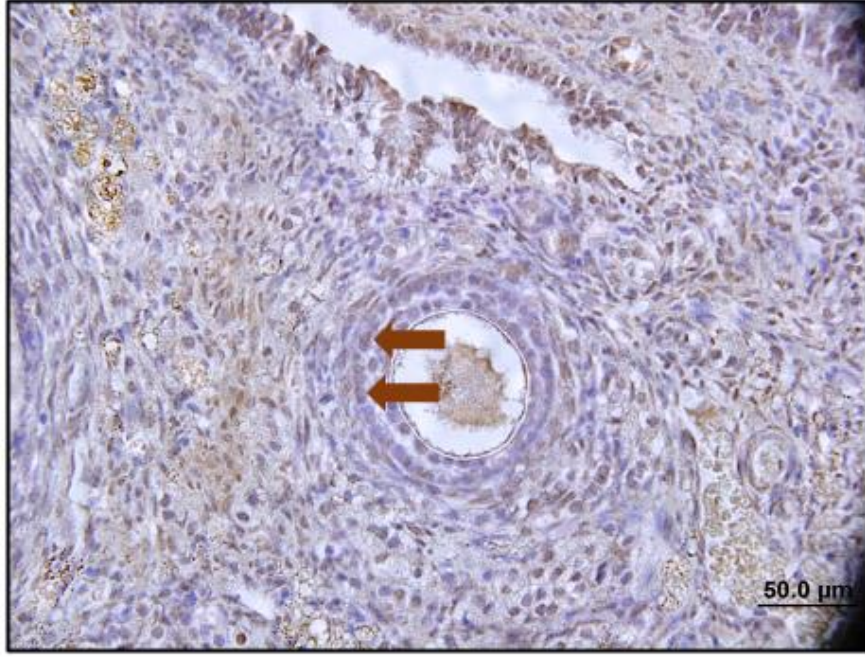
	Kontrol	T+D	T+D+SİL	DMSO	SİL
TUNEL	25,71 $\pm$ 11,07	79,42 $\pm$ 6,39	27,71 $\pm$ 13,59	44,0 $\pm$ 18,51	31,57 $\pm$ 12,01
Mann Whitney U testi	Gruplar arası anlamlı fark gözlemlendi.				

Tablo 14: TUNEL

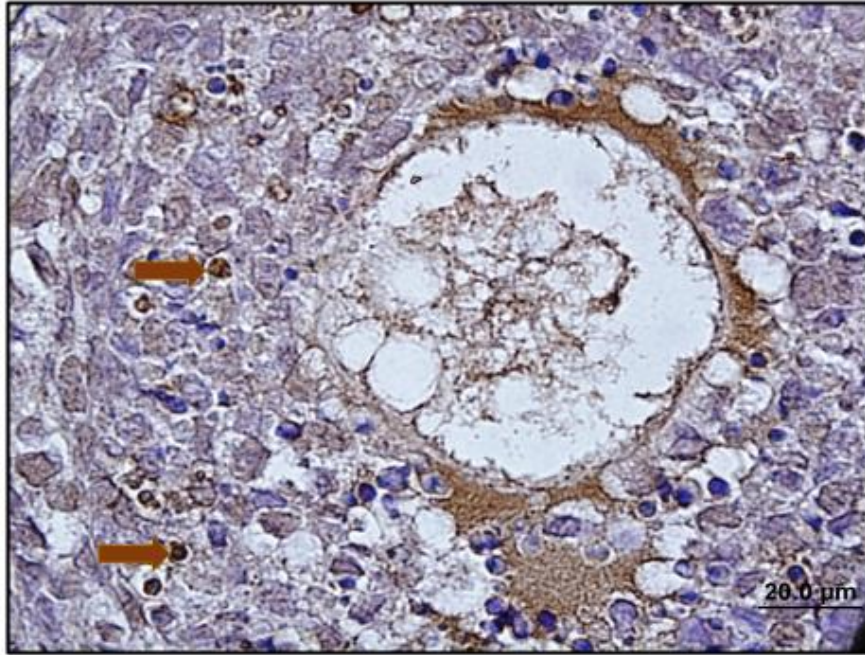
Grup Karşılaştırmaları	Değerler (p-value)	Sonuç
Kontrol T+D	0,002	<0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.
Kontrol T+D+SiL	0,79	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
Kontrol DMSO	0,06	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
Kontrol SiL	0,4	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
T+D T+D+SiL	0,002	<0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.
T+D DMSO	0,004	<0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.
T+D SiL	0,002	<0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.
T+D+SiL DMSO	0,01	<0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.
T+D+SiL SiL	0,52	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
DMSO SiL	0,06	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.



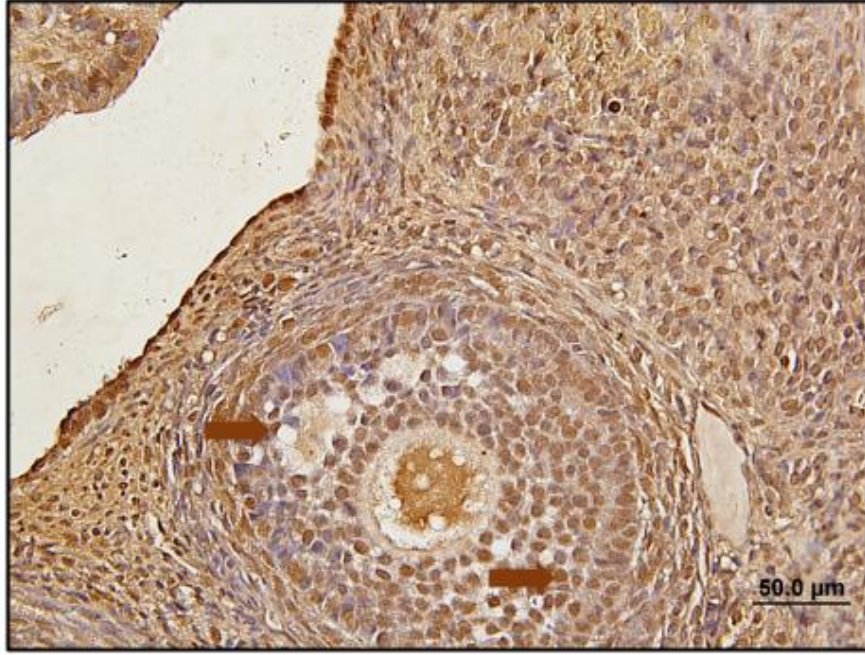
Şekil 60: TUNEL pozitif- negatif hücre oranı grafiği.



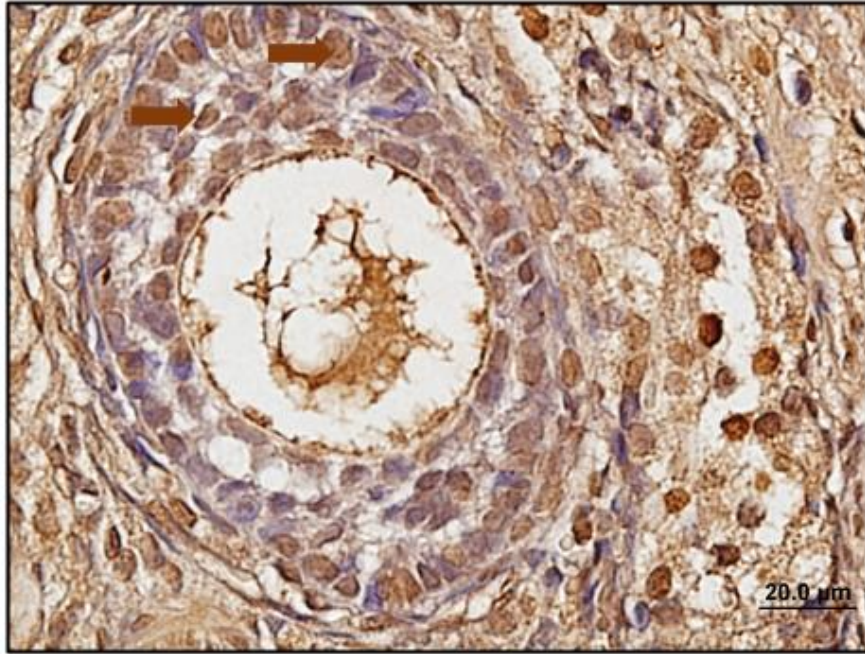
Şekil 61: Kontrol grubu ovaryum kesiti. TUNEL pozitif hücreler (←) ile gösterilmiştir. (TUNEL, X40)



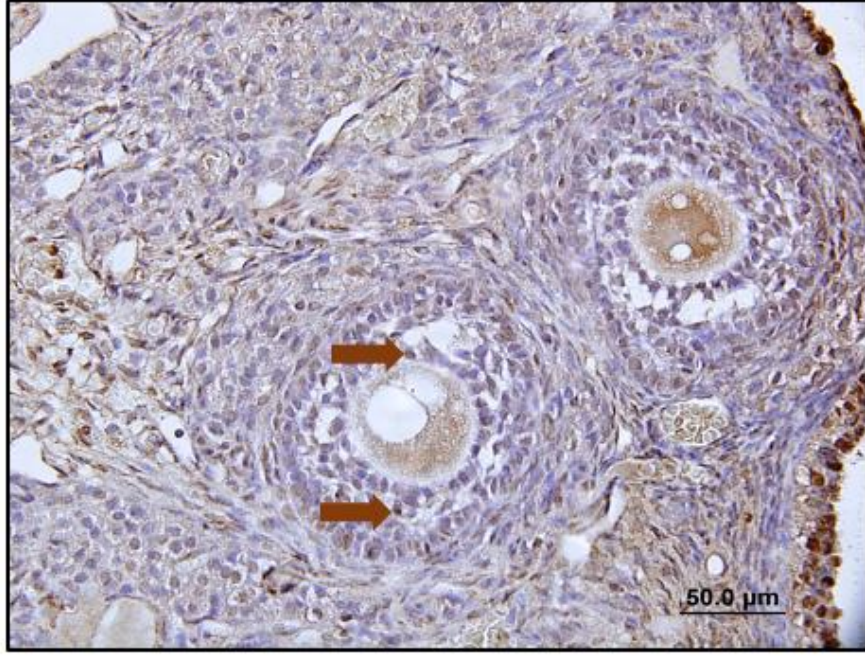
Şekil 62: Kontrol grubu ovaryum kesiti. TUNEL pozitif hücreler (←) ile gösterilmiştir. (TUNEL, X100)



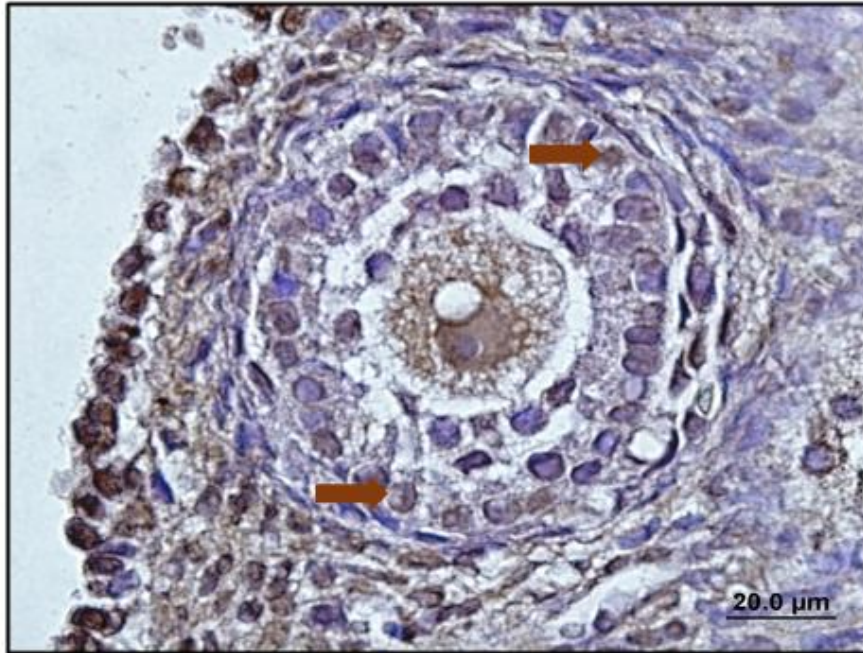
Şekil 63: T+D grubu ovaryum kesiti. TUNEL pozitif hücreler (➡) ile gösterilmiştir. (TUNEL, X40)



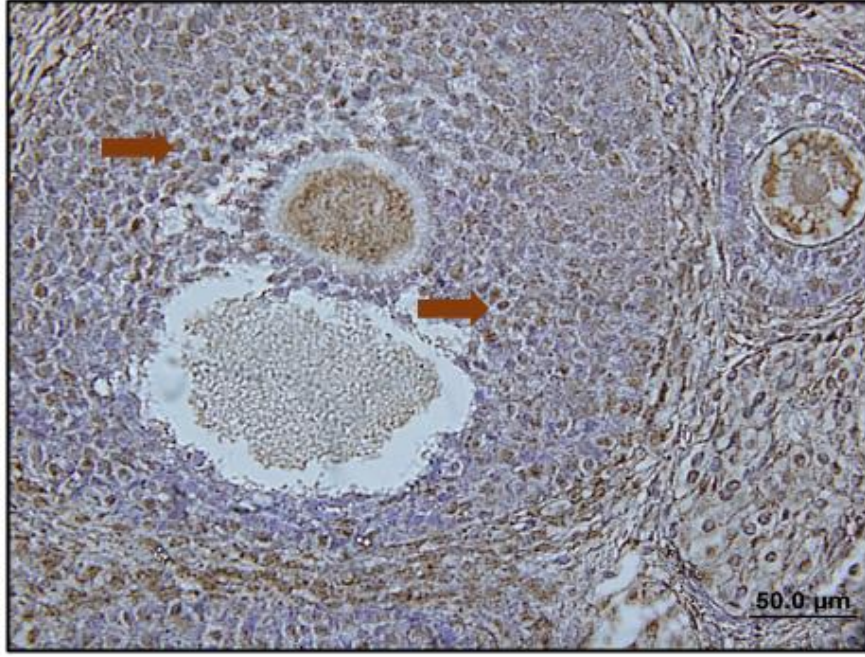
Şekil 64: T+D grubu ovaryum kesiti. TUNEL pozitif hücreler (➡) ile gösterilmiştir. (TUNEL, X100)



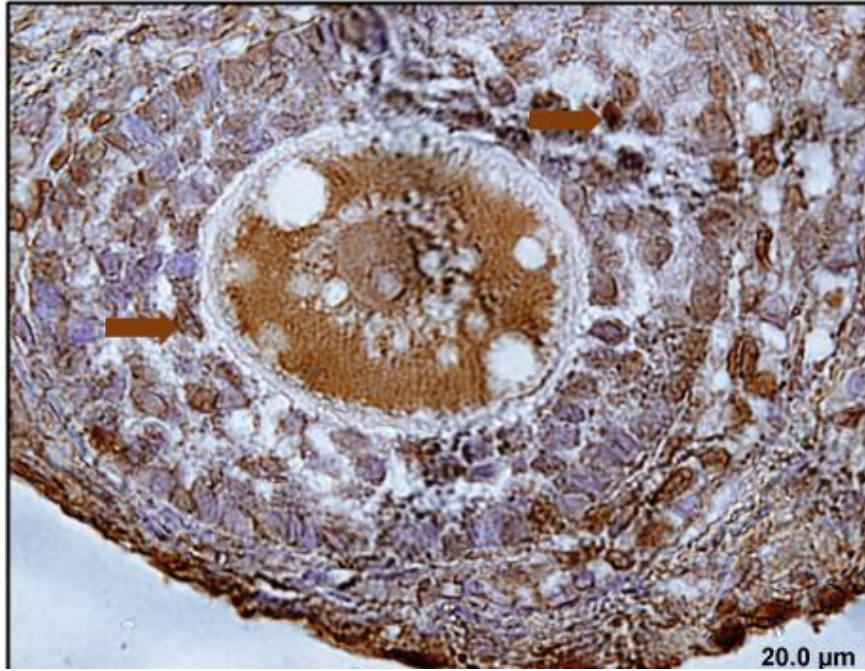
Şekil 65: T+D+SiL grubu ovaryum kesiti.
TUNEL pozitif hücreler (➡) ile gösterilmiştir. (TUNEL,X40)



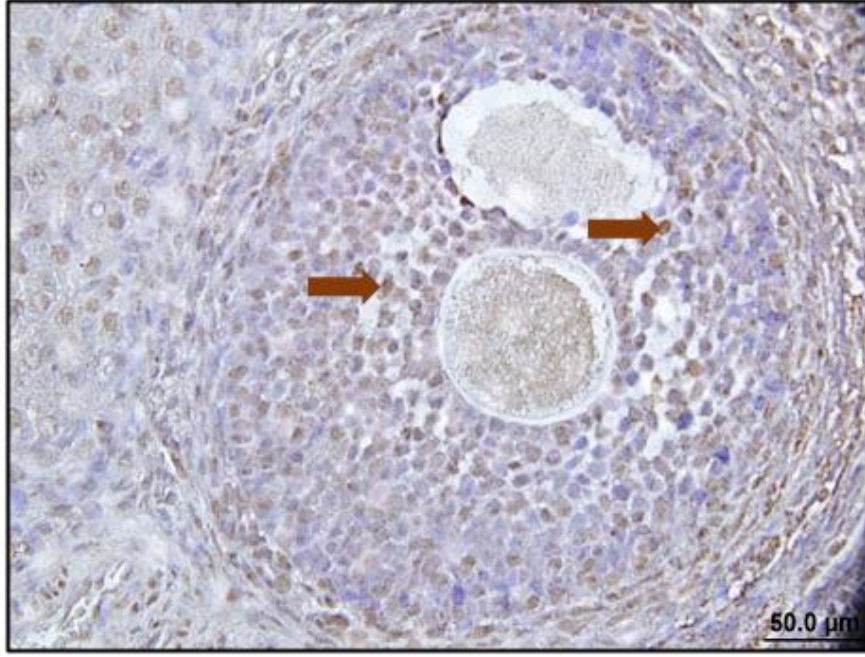
Şekil 66: T+D+SiL grubu ovaryum kesiti.
TUNEL pozitif hücreler (➡) ile gösterilmiştir. (TUNEL,X100)



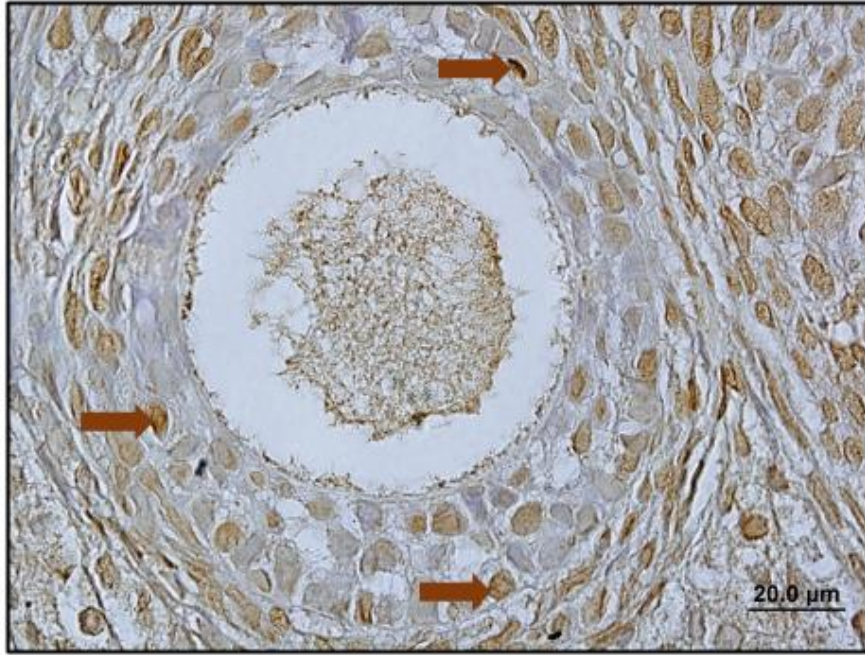
Şekil 67: DMSO grubu ovaryum kesiti. TUNEL pozitif hücreler (➡) ile gösterilmiştir. (TUNEL,X40)



Şekil 68: DMSO grubu ovaryum kesiti. TUNEL pozitif hücreler (➡) ile gösterilmiştir. (TUNEL,X100)



Şekil 69: SİL grubu ovaryum kesiti. TUNEL pozitif hücreler (➡) ile gösterilmiştir. (TUNEL,X40)



Şekil 70: SİL grubu ovaryum kesiti. TUNEL pozitif hücreler (➡) ile gösterilmiştir. (TUNEL,X100)

4.2.2. Aktif kaspaz-3 Boyama Bulguları

Aktif kaspaz-3 boyaması ile apoptoz esnasında önemli rol oynayan sistein-proteaz grubu enzimlere bakıldı. Boyanma yoğunluğu semikantitatif olarak 0 ile 3 arası skorlanarak gruplar arası farklılıklar Kruskal Wallis ve Man Whitney U testi kullanılarak test edildi. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Sonuçlar sırasıyla; Kontrol grubunda $1,0 \pm 0,0$, T+D grubunda $2,28 \pm 0,48$, T+D+SİL grubunda $1,28 \pm 0,48$, DMSO grubunda $1,14 \pm 0,37$ ve SİL grubunda $1,14 \pm 0,37$ bulundu (Tablo 15).

İstatistiksel olarak; Kontrol grubu, T+D grubu karşılaştırıldığında, T+D grubunda aktif Kaspaz-3 pozitif hücre yoğunluğunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($p=0,001$).

T+D grubu; T+D+SİL, DMSO, SİL gruplarıyla karşılaştırıldığında, her üç grupta da aktif kaspaz-3 pozitif hücre yoğunluğunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi ($p=0,006$, $p=0,002$, $p=0,002$).

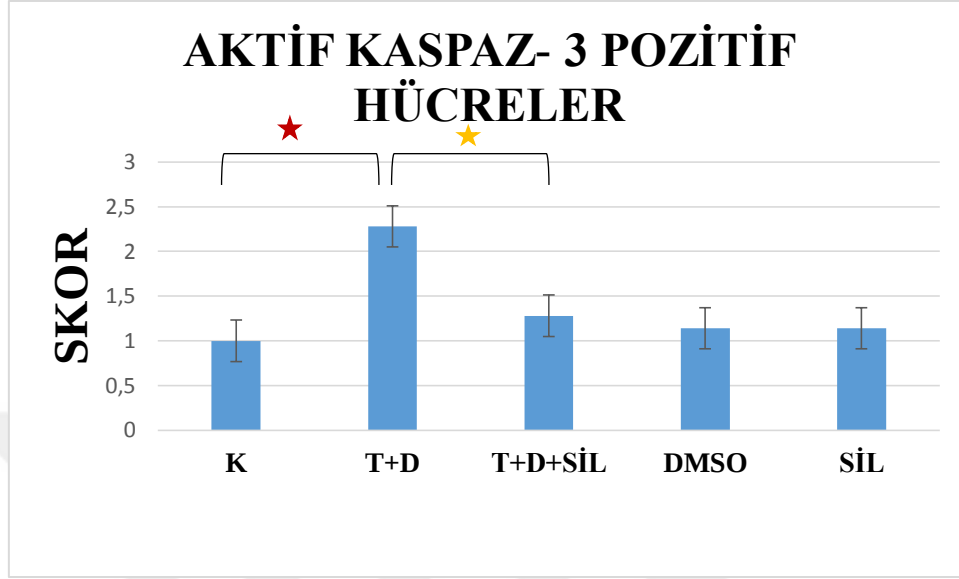
Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmadı (Tablo 16).

Tablo 15: Aktif kaspaz-3

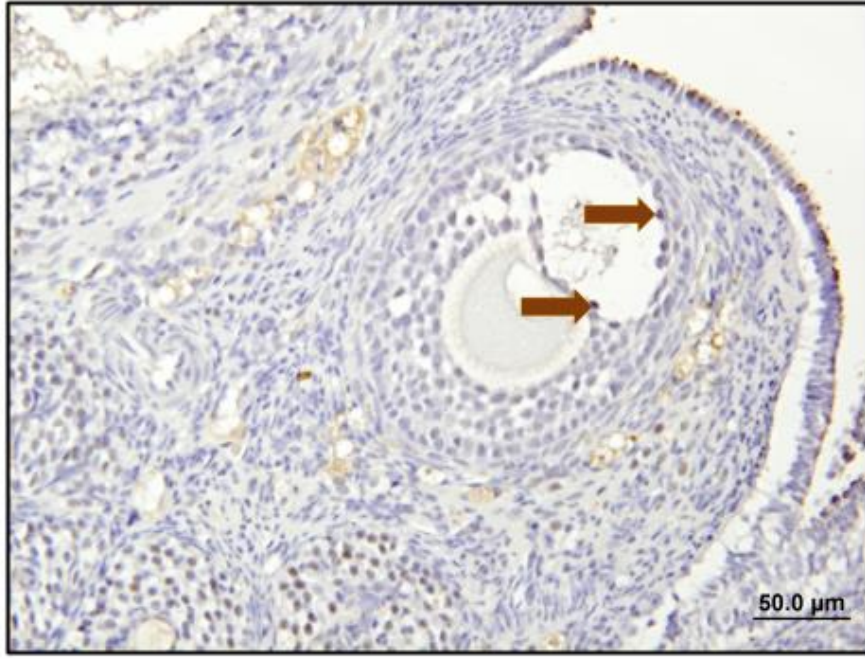
	Kontrol	T+D	T+D+SİL	DMSO	SİL
Aktif kaspaz-3	$1,0 \pm 0,0$	$2,28 \pm 0,48$	$1,28 \pm 0,48$	$1,14 \pm 0,37$	$1,14 \pm 0,37$
Mann Whitney U testi	Gruplar arası anlamlı fark gözlemlendi.				

Tablo 16: Aktif kaspaz-3

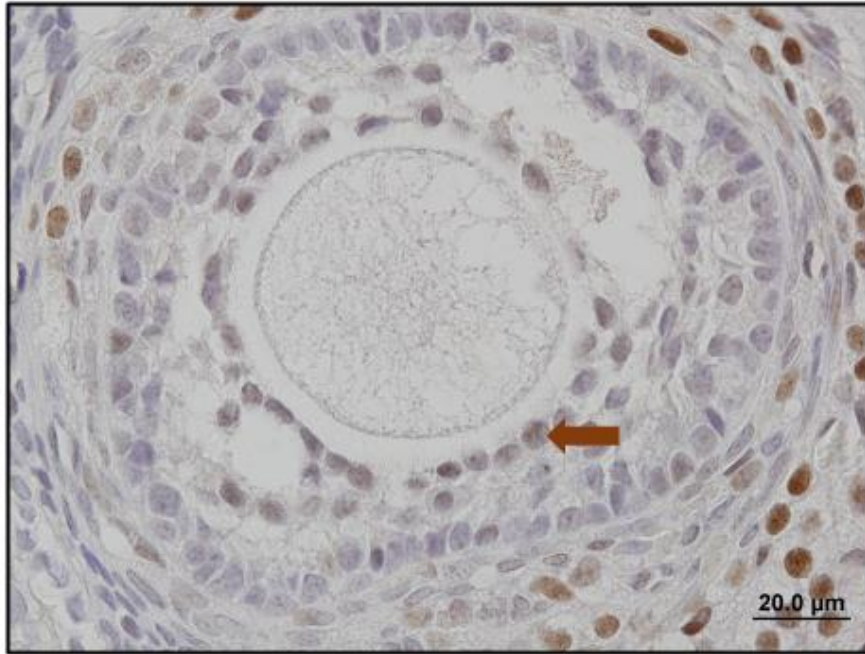
Grup Karşılaştırmaları	Değerler (p-value)	Sonuç
Kontrol T+D	0,001	<0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.
Kontrol T+D+SİL	0,14	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
Kontrol DMSO	0,71	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
Kontrol SİL	0,31	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
T+D T+D+SİL	0,006	<0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.
T+D DMSO	0,002	<0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.
T+D SİL	0,002	<0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.
T+D+SİL DMSO	0,53	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
T+D+SİL SİL	0,71	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
DMSO SİL	1,0	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.



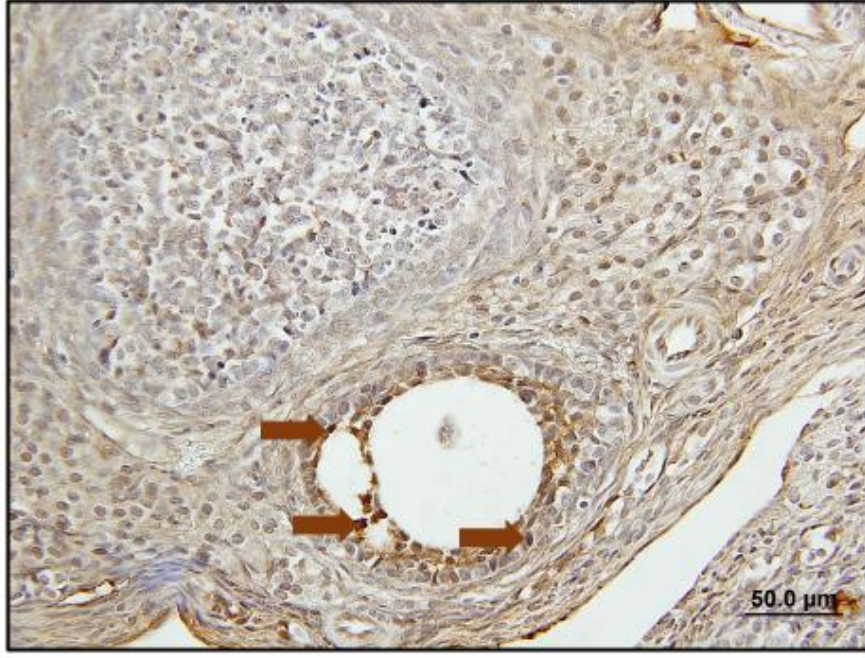
Şekil 71: Aktif kaspaz-3 pozitif hücrelerin grafiği.



Şekil 72: Kontrol grubu ovaryum kesiti. Aktif kaspaz-3 pozitif hücreler (→) ile gösterilmiştir. (Aktif kaspaz-3, X40)

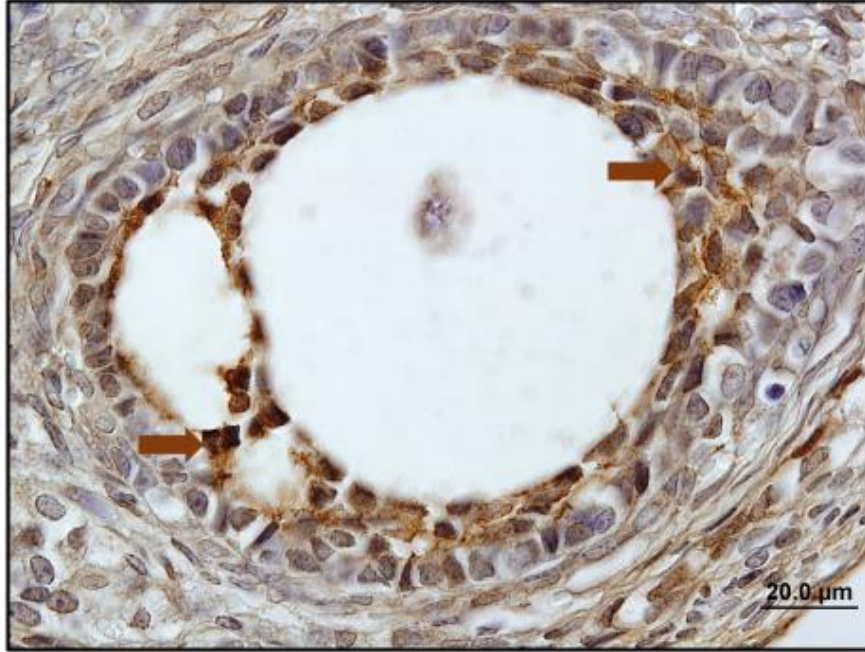


Şekil 73: Kontrol grubu ovaryum kesiti. Aktif kaspaz-3 pozitif hücreler (←) ile gösterilmiştir. (Aktif kaspaz-3, X100)

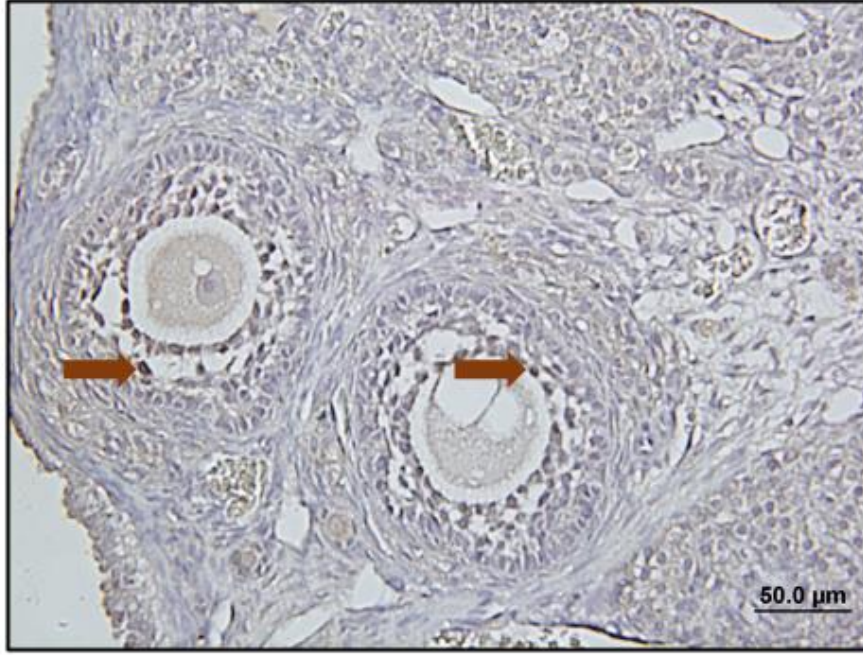


Şekil 74: T+D grubu ovaryum kesiti.

Aktif kaspaz-3 pozitif hücreler (➡) ile gösterilmiştir. (Aktif kaspaz-3, X40)

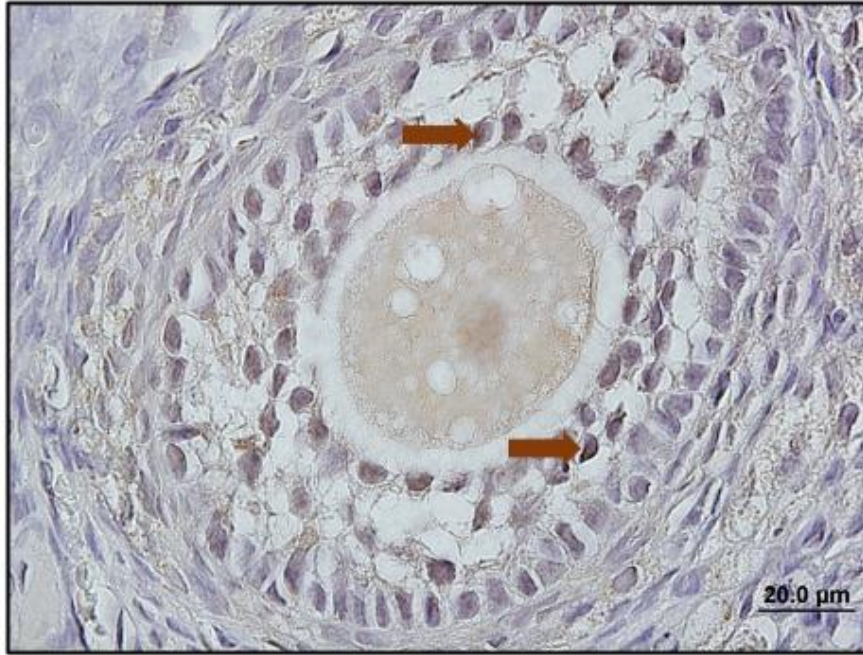


Şekil 75: T+D grubu ovaryum kesiti. Aktif kaspaz-3 pozitif hücreler (➡) ile gösterilmiştir. (Aktif kaspaz-3, X100)



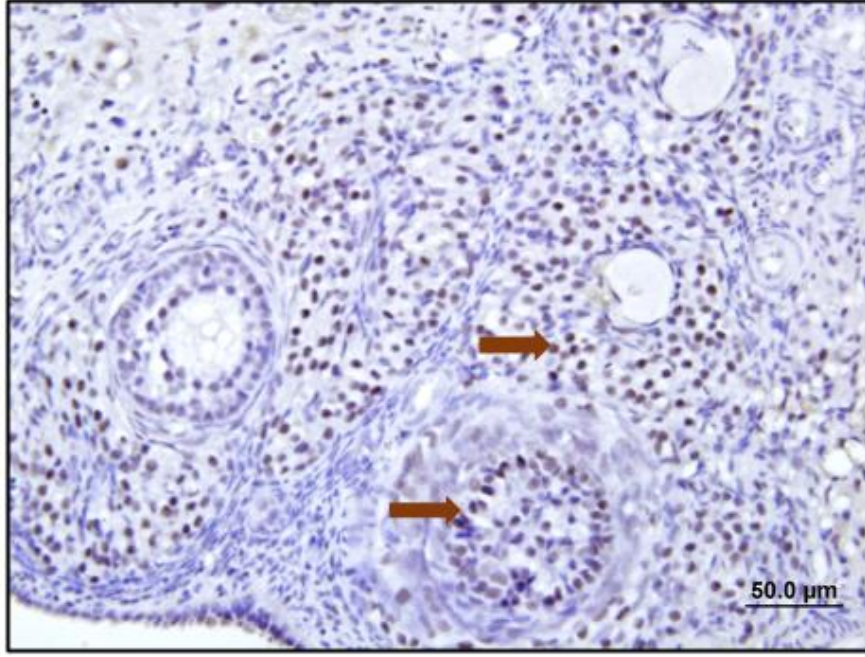
Şekil 76: T+D+SİL grubu ovaryum kesiti.

Aktif kaspaz-3 pozitif hücreler (➡) ile gösterilmiştir. (Aktif kaspaz-3, X40)

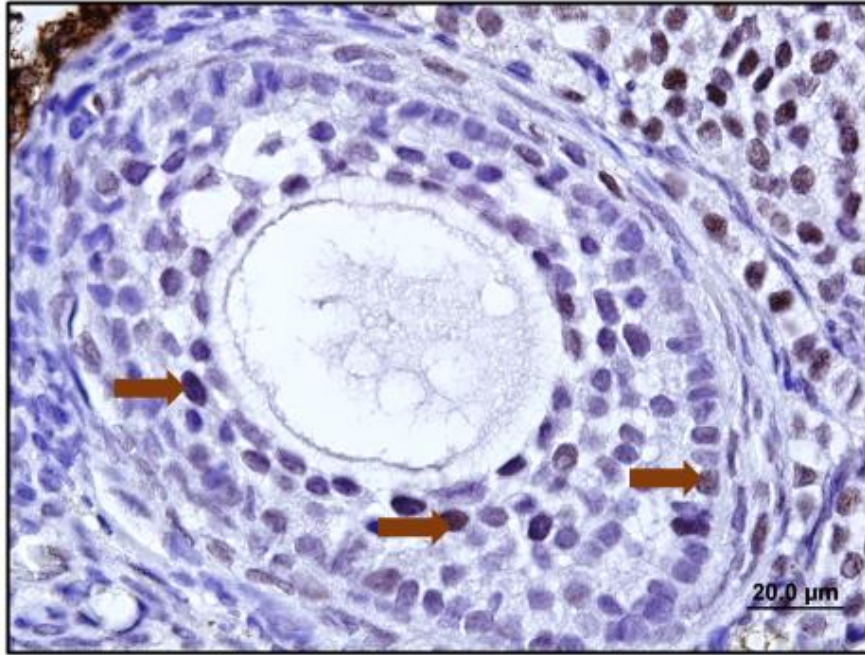


Şekil 77: T+D+SİL grubu ovaryum kesiti.

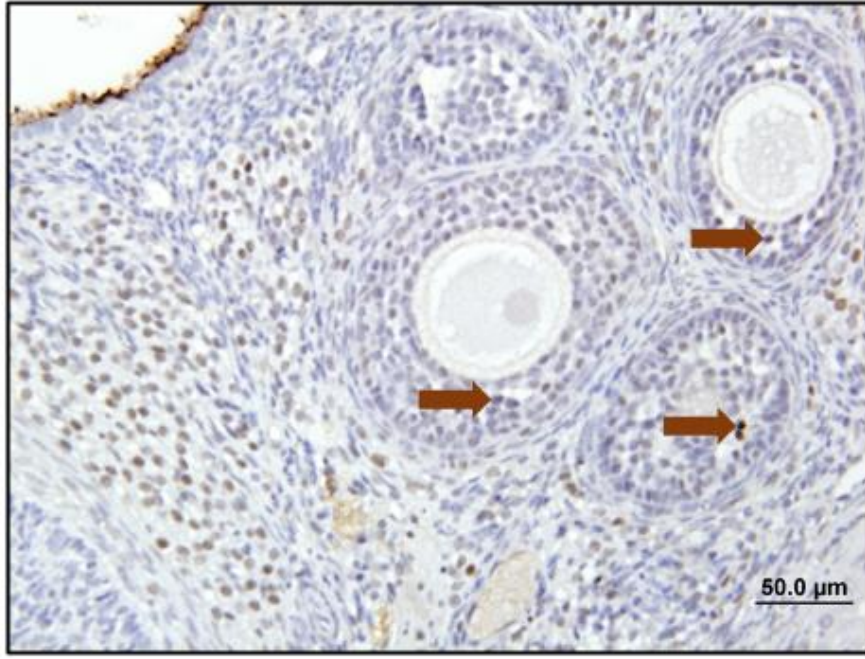
Aktif kaspaz-3 pozitif hücreler (➡) ile gösterilmiştir. (Aktif kaspaz-3, X100)



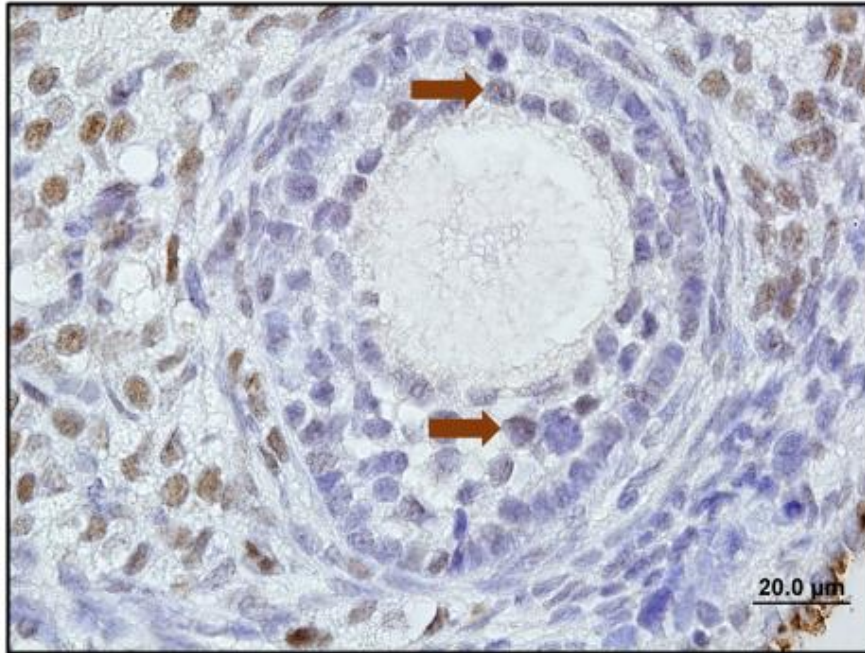
Şekil 78: DMSO grubu ovaryum kesiti. Aktif kaspaz-3 pozitif hücreler (➡) ile gösterilmiştir. (Aktif kaspaz-3,X40)



Şekil 79: DMSO grubu ovaryum kesiti. Aktif kaspaz-3 pozitif hücreler (➡) ile gösterilmiştir. (Aktif kaspaz-3,X100)



Şekil 80: SiL grubu ovaryum kesiti. Aktif kaspaz-3 pozitif hücreler (➡) ile gösterilmiştir. (Aktif kaspaz-3,X40)



Şekil 81: SiL grubu ovaryum kesiti. Aktif kaspaz-3 pozitif hücreler (➡) ile gösterilmiştir. (Aktif kaspaz-3,X100)

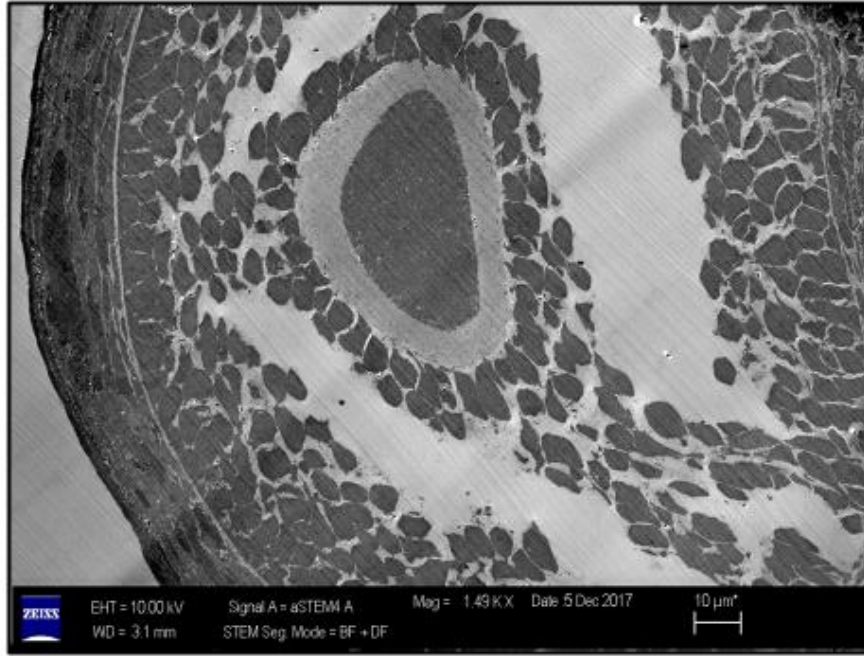
4.3. Elektron Mikroskopik Bulgular

Elektron mikroskopik incelemelerde, kontrol gruplarından elde edilen ovaryum dokusunda, folikül epitel hücre dizilimlerinin normal, granüloza hücreleri ile zona pellusida bağlantılarının düzgün, zona pellusidanın intakt görünümde ve perivitellin aralıkta da yer yer mikrovillus yapılarının varlığı gözlemlendi.

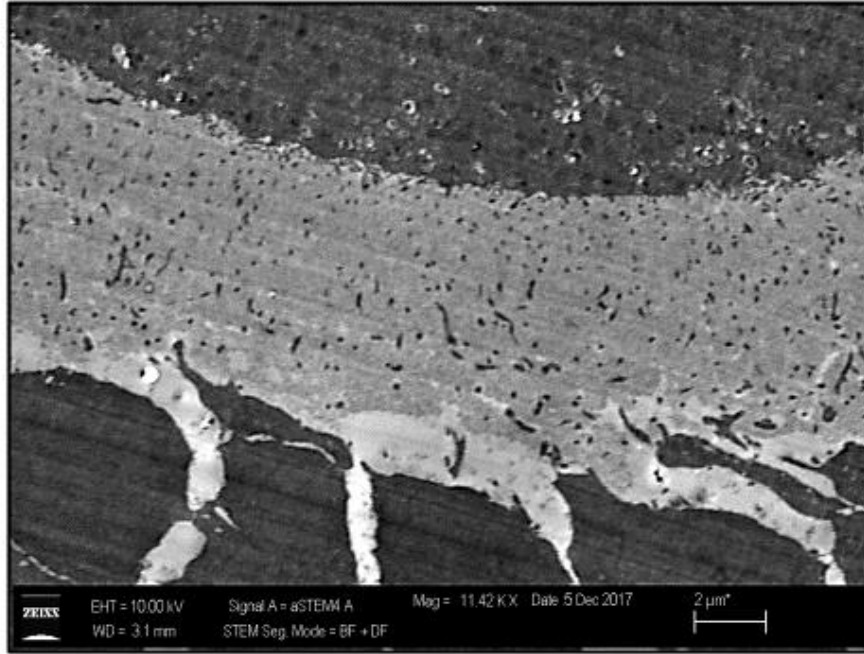
T+D grubunda, folikül epitel dizilimlerinde bozukluk olduğu, hücre hücre bağlantılarında gevşeme ve perivitellin aralıkta mikrovilluslarda azalma meydana geldiği gözlemlendi.

T+D+SİL grubunda, folikül hücre dizilimlerinin T+D grubuna göre daha düzgün olup, perivitellin aralıktaki mikrovillus yapılarında artış olduğu ve folliküler hücrelerin zona pellusida ile olan uzantılarının düzgün olduğu gözlemlendi.

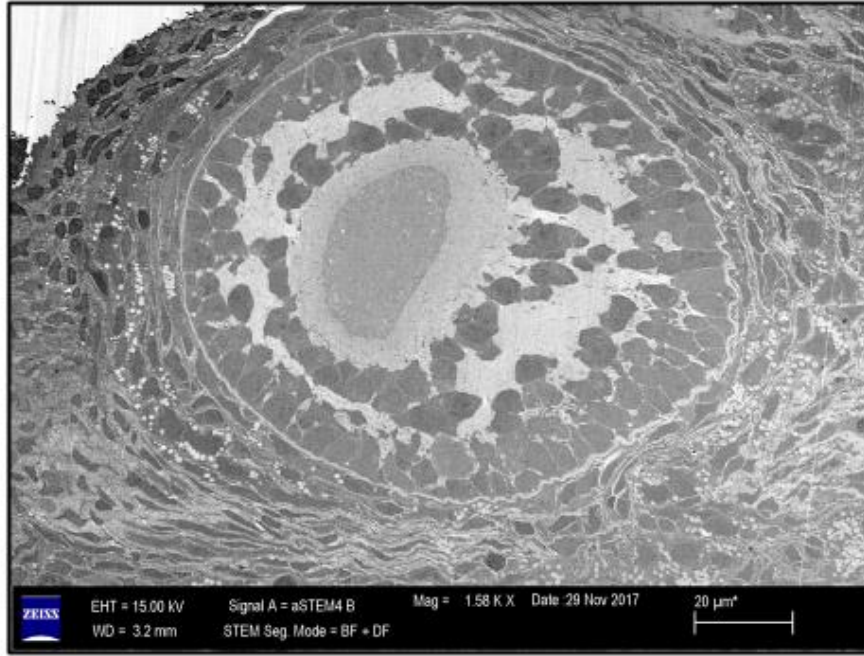
DMSO ve SİL gruplarında ise kontroldekine benzer değişiklikler gözlemlendi.



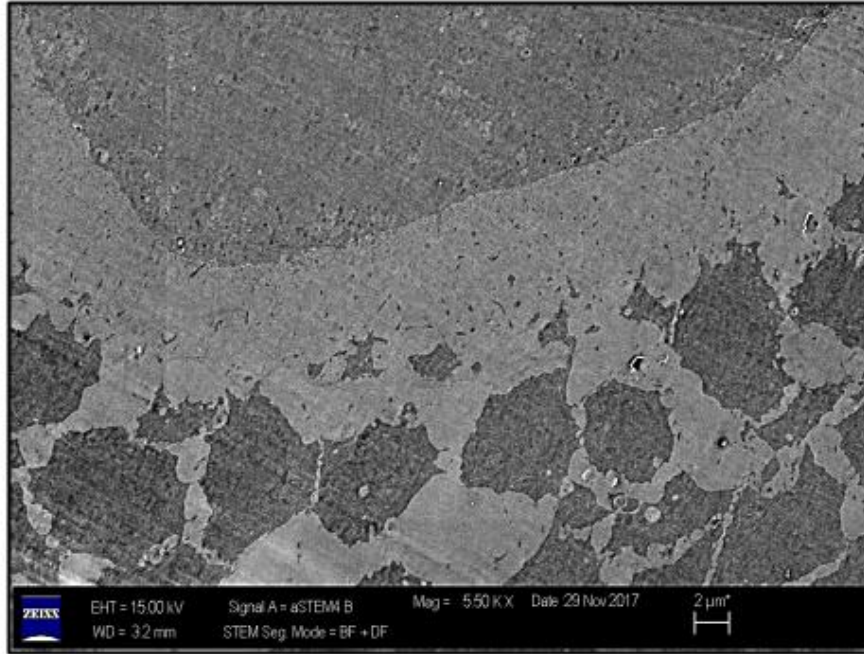
Şekil 82: Kontrol grubu elektron mikroskopi görüntüsü.



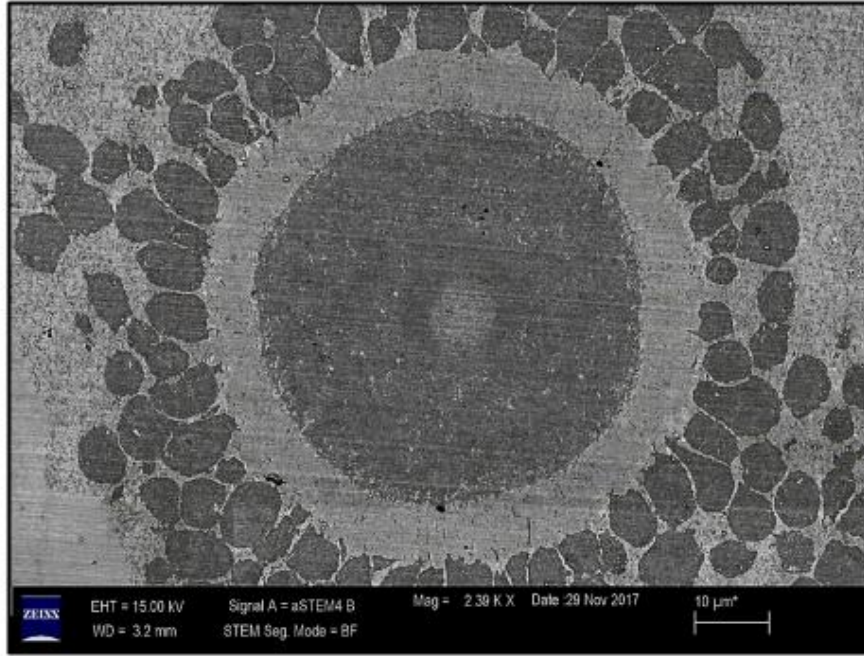
Şekil 83: Kontrol grubu elektron mikroskobunda, zona pellusida görüntüsü.



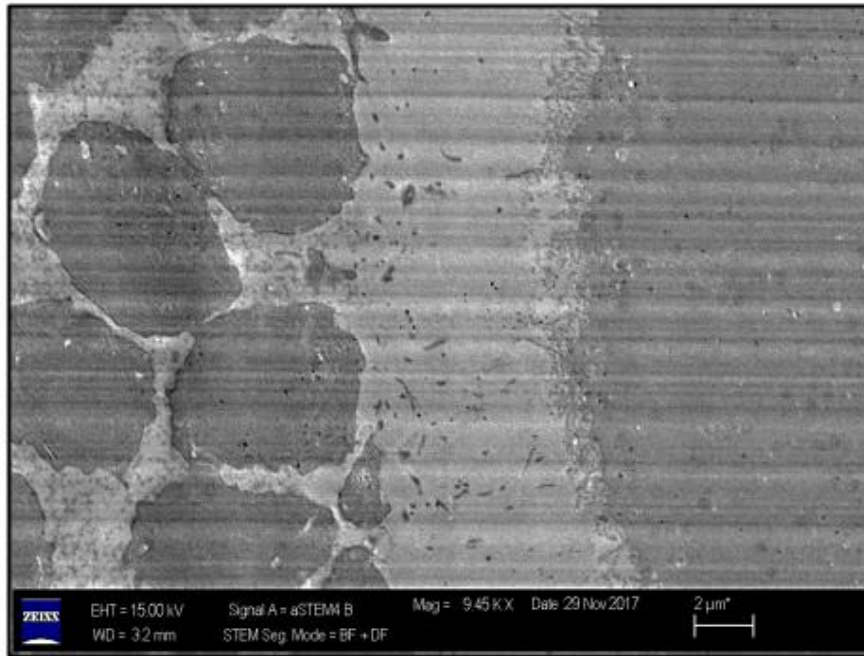
Şekil 84: T+D grubu elektron mikroskopi görüntüsü.



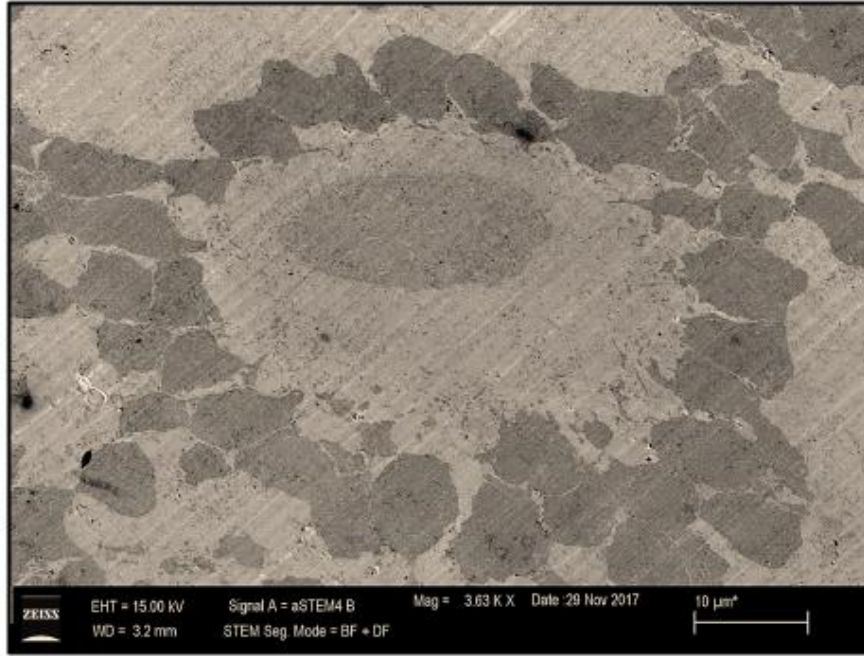
Şekil 85: T+D grubu elektron mikroskopunda, zona pellusida görüntüsü.



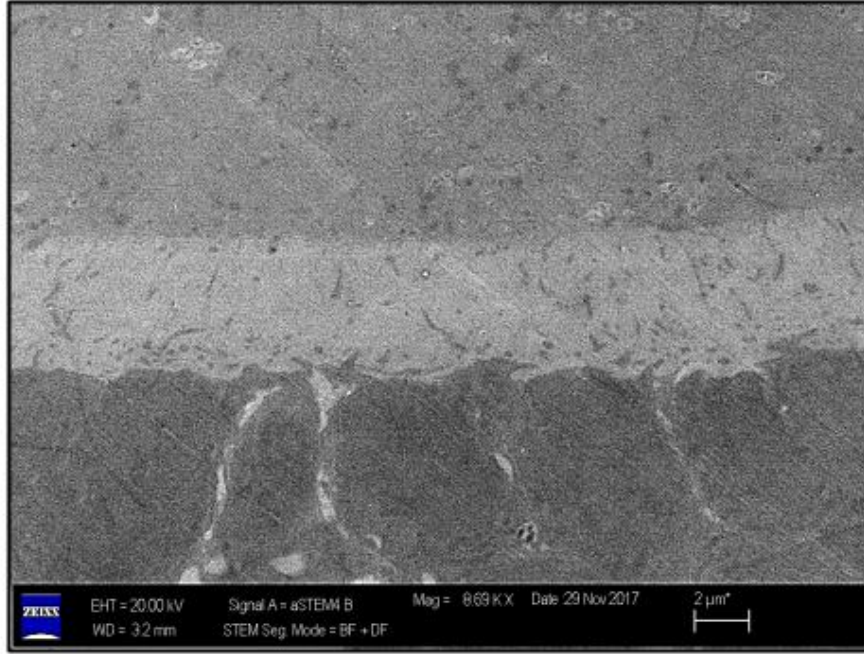
Şekil 86: T+D+SİL grubu elektron mikroskopi görüntüsü.



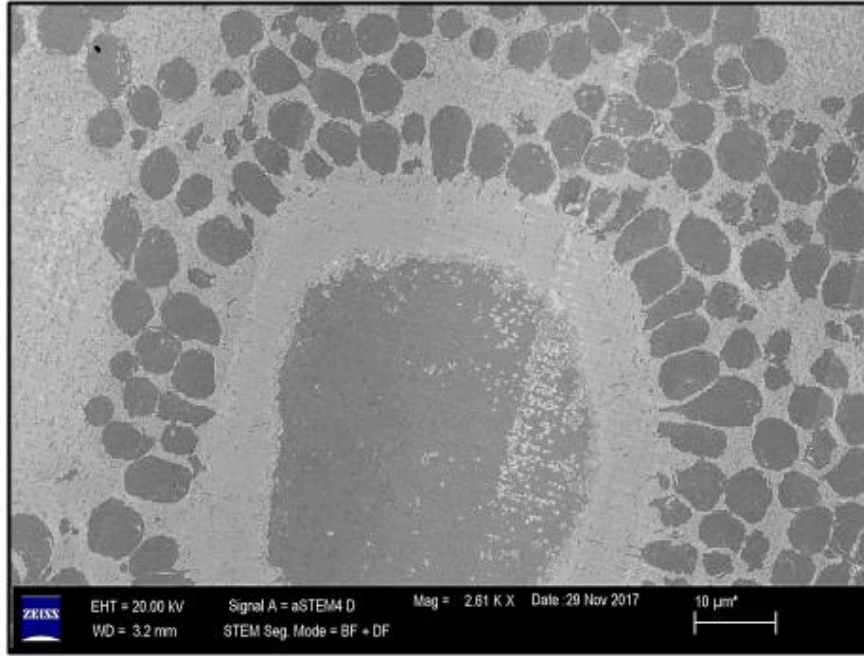
Şekil 87: T+D+SİL grubu elektron mikroskobunda, zona pellusida görüntüsü.



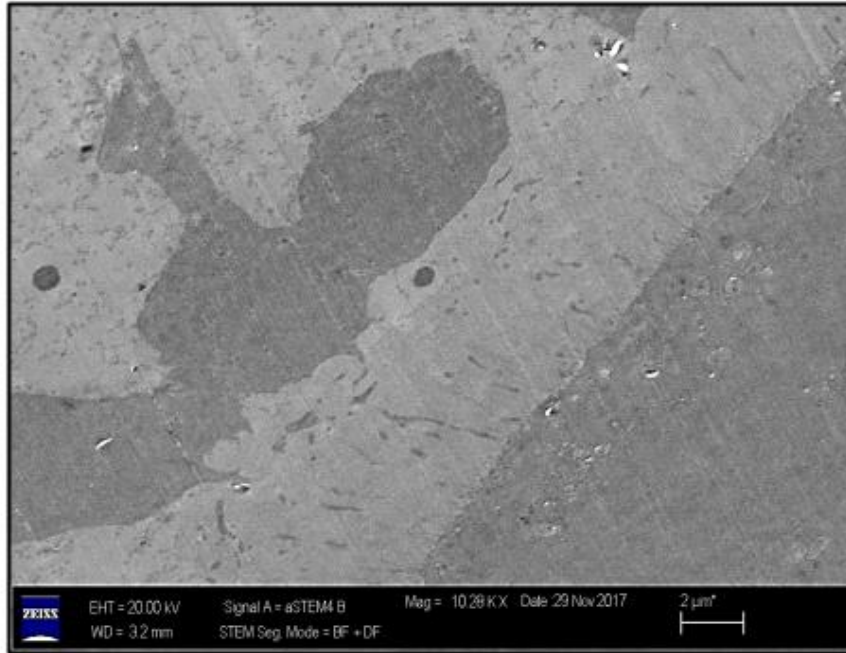
Şekil 88: DMSO grubu elektron mikroskobı görüntüsü.



Şekil 89: DMSO grubu elektron mikroskobunda, zona pellusida görüntüsü.



Şekil 90: SİL grubu elektron mikroskobı görüntüsü.



Şekil 91: SİL grubu elektron mikroskobunda, zona pellusida görüntüsü.

4.4. Biyokimyasal Bulgular

4.4.1. MDA Seviyeleri.

Oksidatif stres seviyelerini belirlemek için MDA seviyeleri doku homojenatlarında çalışıldı. Gruplar arası farklılıklar Kruskal Wallis ve Man Whitney U testi kullanılarak test edildi. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

MDA ölçümleri sırasıyla; Kontrol grubunda $0,08 \pm 0,04$ $\mu\text{mol/mg}$ protein, T+D grubunda $0,11 \pm 0,06$ $\mu\text{mol/mg}$ protein, T+D+SİL grubunda $0,07 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/mg}$ protein, DMSO grubunda $0,09 \pm 0,03$ $\mu\text{mol/mg}$ protein ve SİL grubunda $0,06 \pm 0,01$ $\mu\text{mol/mg}$ protein bulundu (Tablo 17).

İstatistiksel olarak; T+D grubu, T+D+SİL ve SİL grupları ile karşılaştırıldığında MDA seviyelerinin her iki grupta da istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi ($p=0,01$, $p=0,004$).

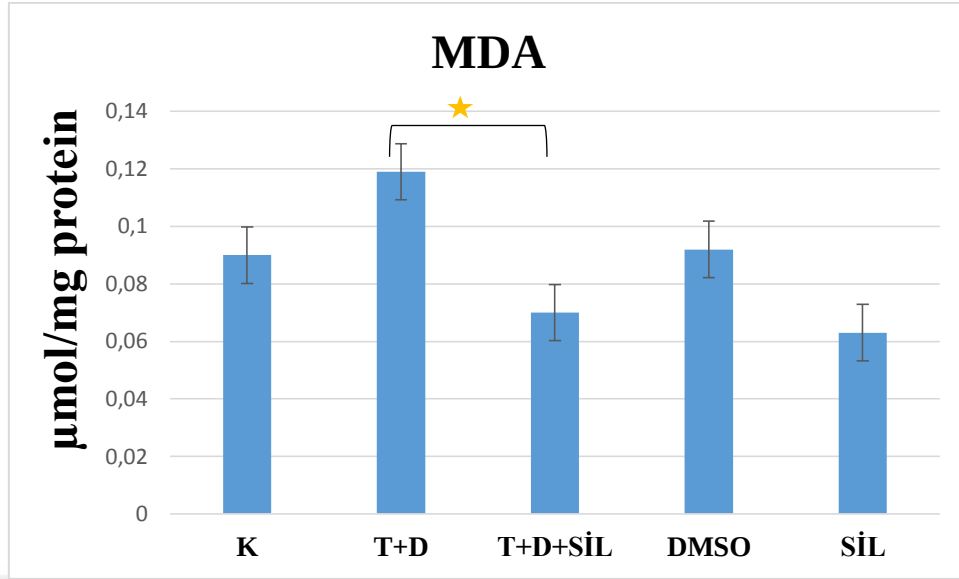
Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmadı (Tablo 18).

Tablo 17: MDA

	Kontrol	T+D	T+D+SİL	DMSO	SİL
MDA($\mu\text{mol/mg}$ protein)	$0,08 \pm 0,04$	$0,11 \pm 0,06$	$0,07 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,03$	$0,06 \pm 0,01$
Mann Whitney U testi	Gruplar arası anlamlı fark gözlemlendi.				

Tablo 18: MDA

Grup Karşılaştırmaları	Değerler (p-value)	Sonuç
Kontrol T+D	0,14	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
Kontrol T+D+SİL	0,70	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
Kontrol DMSO	0,79	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
Kontrol SİL	0,27	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
T+D T+D+SİL	0,01	<0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.
T+D DMSO	0,27	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
T+D SİL	0,004	<0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.
T+D+SİL DMSO	0,27	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
T+D+SİL SİL	0,48	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
DMSO SİL	0,12	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.



Şekil 92: MDA düzeylerinin grafiği.

4.4.2. GPx Değerleri

Antioksidan ajanlar oksidatif stresin doku ve hücrelerde neden olduğu hasarı engellemektedir. Çalışmamızda antioksidan savunma mekanizmalarından GPx ölçümleri doku homojenatlarında yapıldı. Gruplar arası farklılıklar Kruskal Wallis ve Man Whitney U testi kullanılarak test edildi. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

GPx ölçümleri sırasıyla; Kontrol grubunda $0,08 \pm 0,01$ U/mg protein, T+D grubunda $0,04 \pm 0,03$ U/mg protein, T+D+SİL grubunda $0,07 \pm 0,01$ U/mg protein, DMSO grubunda $0,07 \pm 0,02$ U/mg protein ve SİL grubunda $0,09 \pm 0,03$ U/mg protein bulundu (Tablo 19).

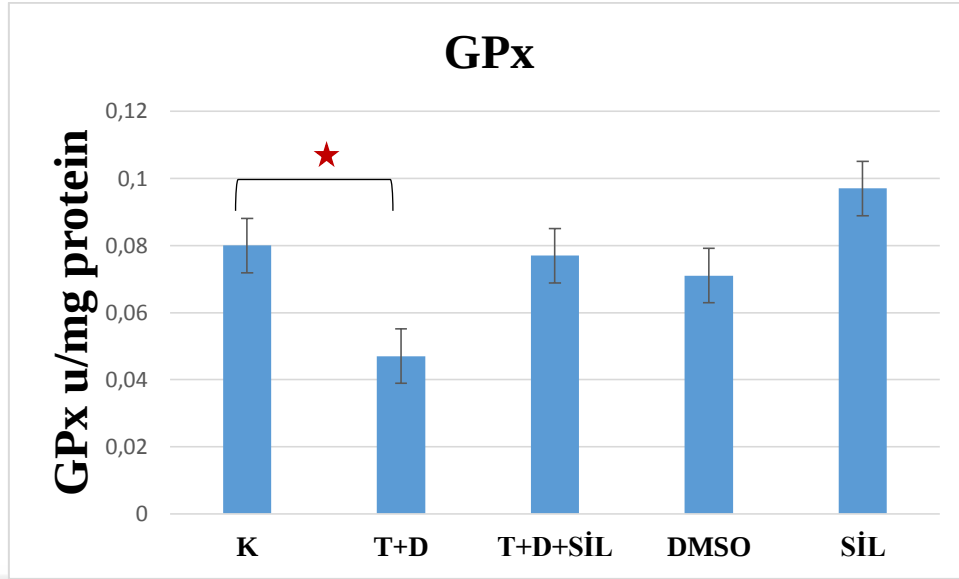
İstatistiksel olarak; Kontrol grubu, T+D grubu ile karşılaştırıldığında T+D grubunda GPx seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi ($p=0,048$).

T+D grubu SİL grubuyla karşılaştırıldığında, SİL grubunda GPx düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($p=0,025$).

Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmadı (Tablo 20).

Tablo 19: GPx

	Kontrol	T+D	T+D+SİL	DMSO	SİL
GPx(U/mg protein)	$0,08 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,03$	$0,07 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,03$
Mann Whitney U testi	Gruplar arası anlamlı fark gözlemlendi.				



Şekil 93: GPx düzeylerinin grafiği.

Tablo 20: GPx

Grup Karşılaştırmaları	Değerler (p-value)	Sonuç
Kontrol T+D	0,048	<0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.
Kontrol T+D+SİL	0,94	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
Kontrol DMSO	0,40	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
Kontrol SİL	0,40	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
T+D T+D+SİL	0,064	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
T+D DMSO	0,073	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
T+D SİL	0,025	<0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar vardır.
T+D+SİL DMSO	0,65	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
T+D+SİL SİL	0,159	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
DMSO SİL	0,225	>0,05 olduğundan Ortalamalar arası anlamlı farklılıklar yoktur.

4.4.3. Ischemia Modified Albumin (IMA) düzeyleri

IMA (Ischemia Modified Albumin), iskemi ve enflamasyonla ilişkili durumlarda oluşan bir belirteçtir. Deneklerin kuyruk venlerinden alınan kanların serumlarında IMA seviyeleri ölçüldü. Gruplar arası farklılıklar Kruskal Wallis ve Man Whitney U testi kullanılarak test edildi. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

IMA ölçümleri sırasıyla; Kontrol grubunda $5,70 \pm 1,60$ U/ml, T+D grubunda $23,71 \pm 1,90$ U/ml, T+D+SİL grubunda $14,19 \pm 3,05$ U/ml, DMSO grubunda $10,66 \pm 3,57$ U/ml ve SİL grubunda $4,0 \pm 1,03$ U/ml olarak bulundu (Tablo 21).

İstatistiksel olarak; Kontrol grubu, T+D grubu, T+D+SİL grubu ve DMSO gruplarıyla karşılaştırıldığında, her üç grupta da, IMA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($p=0,009$, $p=0,009$, $p=0,047$).

T+D grubu; T+D+SİL, DMSO ve SİL gruplarıyla karşılaştırıldığında her üç grupta da IMA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi ($p=0,009$, $p=0,009$, $p=0,009$).

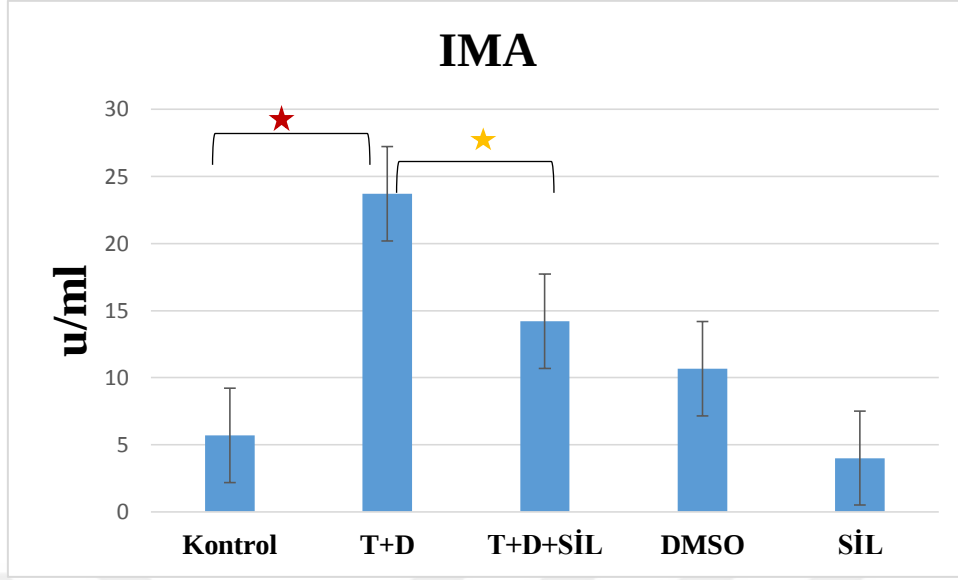
T+D+SİL grubu; SİL grubu ile karşılaştırıldığında, SİL grubunda IMA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi ($p=0,009$).

DMSO grubu; SİL grubu ile karşılaştırıldığında, SİL grubunda IMA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi ($p=0,028$)

Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmadı (Tablo 22).

Tablo 21: IMA

	Kontrol	T+D	T+D+SİL	DMSO	SİL
IMA (U/ml)	5,70±1,60	23,71±1,90	14,19±3,05	10,66±3,57	4,0±1,03
Mann Whitney U testi	Gruplar arası anlamlı fark gözlemlendi.				



Şekil 94: IMA düzeylerinin grafiği.

Tablo 22: IMA

Grup Karşılaştırmaları	Değerler (p-value)	Sonuç
Kontrol T+D	0,009	<0,05 olduğundan Ortalamlar arası anlamlı farklılıklar vardır.
Kontrol T+D+SİL	0,009	<0,05 olduğundan Ortalamlar arası anlamlı farklılıklar vardır.
Kontrol DMSO	0,047	<0,05 olduğundan Ortalamlar arası anlamlı farklılıklar vardır.
Kontrol SİL	0,117	>0,05 olduğundan Ortalamlar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
T+D T+D+SİL	0,009	<0,05 olduğundan Ortalamlar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
T+D DMSO	0,009	<0,05 olduğundan Ortalamlar arası anlamlı farklılıklar vardır.
T+D SİL	0,009	<0,05 olduğundan Ortalamlar arası anlamlı farklılıklar vardır.
T+D+SİL DMSO	0,175	>0,05 olduğundan Ortalamlar arası anlamlı farklılıklar yoktur.
T+D+SİL SİL	0,009	<0,05 olduğundan Ortalamlar arası anlamlı farklılıklar vardır.
DMSO SİL	0,028	<0,05 olduğundan Ortalamlar arası anlamlı farklılıklar vardır.

5. TARTIŞMA

Ovaryum; dişi organizmalarda bulunan bir çift, yumurta üreten ve üreme sisteminde birçok işlevi yerine getiren, östrojen ve progesteron gibi çeşitli steroid ve peptid hormonların üretiminde de işlev gören bir organdır. Over fonksiyonunda anormallikler genellikle anovulatuvar infertiliteye yol açmakta ve bu da önemli bir sorun teşkil etmektedir. Kadın infertilitesi ciddi bir tıbbi problemdir ve kadın üreme sistemi, farklı zararlı çevresel faktörlere karşı çok hassastır (67).

Over torsiyonu, en sık rastlanan jinekolojik acil durumlardan biridir. Komplikasyonları önlemek ve gelecekteki doğurganlığı korumak için, over torsiyonu tanısı erken evrede konmalıdır. Cerrahi olarak kanıtlanmış adneksiyal torsiyonlu olgulardaki over kan akımının Doppler sonografisinde bulguları over torsiyonunun tahmininde yardımcı olabilir, ancak doğruluk payı çok düşüktür. Pratikte, emboliyi önlemek için adneksleri çıkarma eğilimi yaygındır. Bununla birlikte, bu müdahalenin genç kadınlar için, özellikle de üreme yıllarında iyi bir seçenek olmadığı görülmektedir. Galinier ve ark. (2009), ovaryum detorsiyonundan sonra overlerin korunduğunu ve bunun güvenilir ve etkin bir yöntem olduğunu göstermişlerdir (68).

Over torsiyonunda birincil patofizyolojik olay iskemi ve ardından reperfüzyondur. Bu nedenle, overlerde IR hasarı meydana gelir. İskemi tedavisinin temel amacı sadece kan dolaşımını düzeltmek değil aynı zamanda doku perfüzyonunu da iyileştirmektir.

Serbest radikaller ve nötrofiller de dahil olmak üzere IR hasarı birçok faktör ile ilişkilendirilmiştir. IR hasarı; beyin, kalp, kas ve ovaryum gibi pek çok dokuda reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimiyle sonuçlanır ve ROT, hücre membranlarında hasara neden olmaktadır.

Reperfüzyon esnasında, ROT salan aktive olmuş nötrofil birikimi artmaktadır. Bu nedenle dokulardaki IR yaralanmalarını önlemek için birkaç anti-inflamatuar ve antioksidan serbest radikal süpürücü olarak kullanılmıştır (69).

Akdemir ve arkadaşları, over torsiyon+detorsiyonu modeli oluşturup, daha sonra detorsiyondan 30 dakika önce Oksitosin uyguladıkları çalışmalarında; foliküler dejenerasyon, vasküler konjesyon, ödem, hemoraji ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunu skorlamışlardır. Torsiyon+detorsiyon grubu ile oksitosin verdikleri grubu karşılaştırdıklarında, torsiyon+detorsiyon grubunda; vasküler konjesyon, hemoraji ve ödemin arttığını gözlemlemişlerdir (70).

Gencer ve arkadaşları, adneksleri 360° kıvrılıp, 3 saat torsiyon 3 saat detorsiyon modeli oluşturup, detorsiyondan 30 dakika önce quercetin uyguladıkları çalışmalarında; kontrol grubu ile iskemi reperfüzyon grubunu karşılaştırdıklarında, IR grubunda akut enflamatuvar süreçte ciddi bir artış ve nötrofillerde ve makrofajlarda artış gözlemlemişlerdir. Aynı zamanda IR grubunda stromal ödem, dejeneratif hücrelerde artış ve hemorajide artış gözlemlemişlerdir (7).

Sak ve arkadaşları, bilateral olarak adneksleri 360° kıvrıp, 3 saat torsiyon ve 3 saat detorsiyon uyguladıkları çalışmalarında; torsiyondan 30 dakika önce intraperitoneal olarak quercetin uyguladıkları çalışmalarında; torsiyon ve detorsiyon gruplarını, sham grubu ile karşılaştırdıklarında, vasküler konjesyon, hemoraji ve enflamatuvar hücre infiltrasyonunda her iki grupta da artış gözlemlemişlerdir (71).

Tunc ve arkadaşlar, bilateral olarak adneksleri 360° kıvrıp, 3 saat torsiyon ve 3 saat detorsiyon uyguladıkları çalışmalarında; torsiyon detorsiyon grubunu Sham grubu ile karşılaştırdıklarında, T+D grubunda vasküler konjesyon, hemoraji ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunda artış gözlemlemişlerdir (44).

Kurt ve arkadaşları, 2 saat iskemi ve 2 saat reperfüzyon uyguladıkları çalışmalarında; torsiyon ve detorsiyon grubunu sham grubu ile karşılaştırdıklarında, torsiyon ve detorsiyon grubunda, konjesyon, kanama, ödem ve hücre dejenerasyonunda artış olduğunu gözlemlemişlerdir (72).

Abali ve arkadaşları, 3 saat iskemi ile 3 saat reperfüzyon uyguladıkları ve 3 saat iskemi ile 24 saat reperfüzyon uyguladıkları çalışmalarında; torsiyon ve torsiyon+detorsiyon uygulanan gruplar sham grubu ile karşılaştırıldığında torsiyon ve torsiyon+detorsiyon grubunda doku hasarının arttığını gözlemlemişlerdir (73).

Bizim çalışmamızda da, 360° bilateral over torsiyon+detorsiyon modeli uygulandı ve T+D ile T+D+SİL grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; T+D grubunda ve T+D+SİL grubunda vazolilatasyon, MNL infiltrasyonu, ödem ve hemorajide istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi.

Toyota ve arkadaşları, kardiyak iskemi reperfüzyon hasarı oluşturdukları çalışmalarında fibroziste ve miyosit kalıntılarında Mason Trikrom ile boyadıkları kesitlerde, artış olduğunu gözlemlemişlerdir (74).

Erer ve arkadaşları, miyokardial iskemi ve reperfüzyonunun indüklediği karaciğer hasarına dexmedetomidinin etkileri konulu çalışmalarında; vena sentralis çevresindeki bağ dokusunda artış olduğunu gözlemlemişlerdir (75).

Oktar ve arkadaşları, miyokardial iskemi ve reperfüzyonunun indüklediği karaciğer hasarına levosimendanın etkileri konulu çalışmalarında; mason trikrom boyaması ile karaciğerde portal asinus zon 3'te özellikle vena sentralis çevresinde hepatosit dejenerasyonunda ve nekrozda anlamlı bir artış olduğunu gözlemlemişlerdir (76).

Sun ve arkadaşları, kardiyak spesifik bir gen olan Pdha1 geninin eksikliğinde, iskemik stresin toksikolojisi konulu çalışmalarında; mason trikrom boyaması ile kalpte fibrozis ve hipertrofide artış olduğunu gözlemlemişlerdir (77).

Tewes ve arkadaşları, iskemi reperfüzyon sonucu oluşan akut böbrek hasarında; interstisyel fibrosiste ve tubuler atrofide artış olduğunu gözlemlemişlerdir (78).

Bizim çalışmamızda da mason trikrom boyaması yaparak, T+D grubu yani iskemi reperfüzyon grubunu kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda; bağ dokusunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi.

ZP polispermının önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. ZP'deki anormallikler dölleme, implantasyon ve gebelik başarısızlığına neden olabilir.

Zhou ve arkadaşları, fare oositleri ile yaptıkları in vitro çalışmada; ZP kalınlıklarını ölçmüşler ve ZP kalınlığı 8 µm'den büyük olan oositlerin ZP kalınlıklarını azaltarak oosit matürasyonunu iyileştirebileceklerini düşünmüşler ve ZP kalınlığı 5 µm'den daha büyük oositlerin, daha fazla aktive olma potansiyeline ve blastosist evreye gelişme potansiyeline sahip olduğunu ve manipüle edilmiş ZP'larda bu potansiyelin iyileştirilemediğini veya bozulmadığını gözlemlemişlerdir. Bu sonuçlar foliküldeki oosit olgunlaşmasını değerlendirmek ve oositlerin aktivasyon ve embriyo gelişim potansiyelini belirlemek için ZP kalınlığının kullanılabileceğini göstermektedir (79).

Bizim çalışmamızda da, ZP kalınlıkları ölçüldü ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmadı.

Ugurel ve arkadaşları, ovaryan iskemi reperfüzyonu uyguladıkları çalışmalarında; apopitotik hücreleri belirlemek için TUNEL boyaması yapmışlar ve kontrol grubu ile IR grubunu karşılaştırdıklarında, IR grubunda apopitotik hücrelerin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığını gözlemlemişlerdir (34).

Gencer ve arkadaşları, adneksleri 360° kıvrılıp, 3 saat torsiyon 3 saat detorsiyon modeli oluşturup, detorsiyondan 30 dakika önce quercetin uyguladıkları çalışmalarında; kontrol grubu

ile iskemi reperfüzyon gruplarını karşılaştırdıklarında, TUNEL pozitif hücre sayısında iskemi reperfüzyon gruplarında, istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğunu gözlemlemişlerdir (7).

Bizim çalışmamızda da, kontrol grubu ile T+D grubu ve T+D grubu ile T+D+SİL grupları karşılaştırıldığında hasar grubunda yani, T+D grubunda TUNEL pozitif hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlenmiştir.

Gencer ve arkadaşları, adneksleri 360° kıvrılıp, 3 saat torsiyon 3 saat detorsiyon modeli oluşturup, detorsiyondan 30 dakika önce quercetin uyguladıkları çalışmalarında; kaspaz-3 pozitif hücreleri saymışlar ve kortekste medullaya göre daha fazla sayıda kaspaz-3 pozitif hücre bulunduğunu gözlemlemişlerdir. IR grupları ile quercetin grubunu karşılaştırdıklarında, IR gruplarında Aktif kaspaz-3 pozitif hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğunu gözlemlemişlerdir (7).

Ergenoglu ve arkadaşları, indüklenmiş ovaryum hasarı çalışmalarında, ovaryumun yüzey epitelinde aktif kaspaz-3 ekspresyonunda artış olduğunu gözlemlemişlerdir (80).

Bizim çalışmamızda da, kontrol grubu T+D grubu ile karşılaştırıldığında; T+D grubunda Aktif kaspaz-3 pozitif hücre yoğunluğunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu, T+D grubu ile T+D+SİL grubu karşılaştırıldığında, T+D+SİL yani tedavi grubu karşılaştırıldığında, T+D+SİL grubunda kaspaz-3 pozitif hücre yoğunluğunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlenmiştir.

Bozkurt ve arkadaşları, ovaryan IR çalışmalarında; IR gruplarını, selenyum grupları ile karşılaştırdıklarında, MDA seviyelerinin selenyum gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığını gözlemlemişlerdir (50).

Akdemir ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada; oksitosin gruplarını, iskemi ve IR grupları ile karşılaştırdıklarında, oksitosin gruplarında MDA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğunu gözlemlemişlerdir (70).

Bizim çalışmamızda da, T+D grubu T+D+SİL grubu ile karşılaştırıldığında, T+D+SİL grubunda MDA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlenmiştir.

Bozkurt ve arkadaşları, ovaryan IR çalışmalarında; IR gruplarını, sham grubu ile karşılaştırdıklarında, GPx aktivitesinin IR gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düştüğünü gözlemlemişlerdir. Selenyum grupları ile IR gruplarını karşılaştırdıklarında; GPx aktivitesinin selenyum gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığını gözlemlemişlerdir (50).

Kolusari ve arkadaşları, ovaryan IR çalışmalarında; EPO ile tedavi grubunu ve hasar grubunu karşılaştırdıklarında, tedavi grubunda doku GPx seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğunu gözlemlemişlerdir (81).

Hartman ve arkadaşları, intestinal IR'un indüklediği karaciğer hasarı adlı çalışmalarında; IR grubu ile sham ve sham+glutamine gruplarını karşılaştırdıklarında, IR grubunda GPx aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığını ve IR grubu ile IR+glutamine gruplarını karşılaştırdıklarında ise IR+glutamin grubunda GPx aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığını gözlemlemişlerdir (82).

Bizim çalışmamızda, T+D grubunu, kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda, T+D grubunda, GPx aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğunu gözlemledik.

Gunduz ve arkadaşları, akut mezenterik iskemi çalışmalarında; tromboembolik oklüzyon grubu ile kontrol grubunu karşılaştırdıklarında, tromboembolik oklüzyon grubunda IMA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğunu gözlemlemişlerdir (83).

Gencer ve arkadaşları, adneksleri 360° kıvrılıp, 3 saat torsiyon 3 saat detorsiyon modeli oluşturup, detorsiyondan 30 dakika önce quercetin uyguladıkları çalışmalarında; kontrol grubu ile IR grubunu karşılaştırdıklarında, IR grubunda IMA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğunu, IR grubu ile IR+Quercetin grubunu karşılaştırdıklarında ise IR+Quercetin grubunda IMA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğunu gözlemlemişlerdir (7).

Bizim çalışmamızda da kontrol grubunu, T+D grubu, T+D+SİL grubu, DMSO grubu ve SİL gruplarıyla karşılaştırdığımızda, T+D grubunda IMA seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğunu gözlemledik.

Perez ve arkadaşları, parkinson hastalığı modeli oluşturdukları farelerde yaptıkları çalışmada silymarinin değişik dozlarını denemişler ve 50 ve 100 mg / kg dozlarında dopamin seviyelerinin korunduğunu buna ek olarak, 100 mg / kg silymarin tedavisinin, apoptotik hücrelerin sayısını önemli ölçüde azalttığını ve dopaminerjik nöronların parkinsonlu farelerin substansiya nigrasında korunduğunu gözlemlemişlerdir. Bu sonuçlar da, 100 mg/kg silymarinin nöroprotektif özelliklerini göstermektedir (84).

Koçarlan ve arkadaşları, multivisseral IR hasarında intraperitoneal olarak 200mg/kg silymarin uyguladıkları çalışmalarında; silymarin grubunu IR grubu ile karşılaştırdıklarında, silymarin grubundaki organlarda (akciğer, karaciğer ve böbrek) hasarın istatistiksel olarak

anlamalı bir şekilde azaldığını, aynı zamanda silymarinin oksidatif stres seviyesini azalttığını gözlemlemişlerdir (54).

Jin ve arkadaşları, akciğer IR hasarı çalışmalarında; 250mg/kg silymarinin, I/R'ye bağlı akciğer vasküler disfonksiyonunu belirgin şekilde iyileştirdiğini, enflamasyon ve oksidatif stresin belirgin bir şekilde baskılandığını ve kaspaz-3 ve 9 protein ekspresyonunun engellendiğini gözlemlemişlerdir (85).

Bizim çalışmamızda da; T+D grubu ile T+D+SİL grubunu karşılaştırdığımızda; silymarin grubunda hasarda, apoptotik hücre sayısında ve oksidatif stres göstergesi olan MDA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğunu gözlemledik.



6. SONUC

Over torsiyonu, reproduktif çağda daha sık olmakla birlikte, her yaşta görülebilen patolojik bir durumdur. Tedavisi çoğunlukla detorsiyon ile organa kan akımını tekrar kazandırmaktır. Ancak detorsiyon öncesi uygulanacak bir antioksidan ile reperfüzyon hasarı azaltılabilir. Bu da fertilitenin korunması açısından önem kazanmaktadır.

Çalışmamızda; detorsiyon öncesi uyguladığımız silymarin enjeksiyonunun, dokudaki hasarı azalttığını tespit ettik. Silymarinin yüzlerce yıldır geleneksel tıpta kullanıldığı düşünülürse, klinikte daha ileri araştırmalar sonucunda uygulanabileceğini düşünmekteyiz.



7. **KAYNAKLAR**

1. Hibbard, L. T. Adnexal torsion. Am J. Obstet Gynecol. 1985; 152: 456-461.
2. Bayer, A.I., Wiskind A.K. Adnexal torsion: Can the adnexa be saved? Am J. Obstet Gynecol. 1994; 171 :1506-11.
3. Tsai, H.C., Kuo , T.N., Chung , M.T., Lin, M.Y.S., Kang, C.Y., Tsai, Y.C. Acute abdomen in early pregnancy due to ovarian torsion following successful in vitro fertilization treatment. Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology. 2015; 54: 438-441.
4. Ashwal, E., Krissi, H., Hirsch, L., Less, S., Ram E., Peled, Y. Presentation, Diagnosis, and Treatment of Ovarian Torsion in Premenarchal Girls. Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology. 2015; 526–529.
5. Huchon, C., Fauconnier, A. Adnexal torsion: a literature review. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 2010; 150: 8-12.
6. Aran, T., Süleyman, G., Unsal, M.A., Alver, A., Mentese, A., Yulug, E Serum ischemia-modified albumin as a novel marker of ovarian torsion: An experimental study. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology . 2010; 150: 72–75.
7. Gencer, M., Karaca, T., Gungor, A.N.C., Hacivelioglu, S.O., Demirtas, S., Turkon, H., Uysal, A., Korkmaz, F., Cosar, E., Hancı, V. The protective effect of quercetin on IMA levels and apoptosis in experimental ovarian ischemia-reperfusion injury. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 2014; 177: 135–140.
8. Gungor, A.N. Cakir., Turkon, H., Albayrak, A., Ovali, M., Islimye, M., Gencer, M., Hacivelioglu, S., Cevizci, S., Cesur, I., Cosar, E. Does Omegaven have beneficial effects on a rat model of ovarian ischemia/reperfusion? European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 2014; 181: 240-245.
9. Cecen, E., Dost, T., Culhaci, N., Karul, A., Ergur, B., Birincioglu, M. Protective effects of silymarin against doxorubicin-induced toxicity. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2011; Vol 12: 2697-2704.
10. Gökmen F.G. Sistematiik Anatomi, İzmir Güven Kitabevi. İzmir. 2003; 565-569
11. Arıncı K., Elhan A. Anatomi 1.Cilt 4. Baskı. Güneş Kitabevi. Ankara. 2006; 337-339.
12. Standring S. GRAY’S Anatomy. 39. Baskı. Elsevier Churchill Livingstone. İspanya. 2005; 1321-1326.
13. Ross MH., Pawlina W. Histoloji konu anlatımı. Altıncı baskıdan çeviri. Ankara. Palme yayıncılık. 2014; 830-845.

14. Bochner F., Alyagor L.F., Kalchenko V., Shinar S., Neeman N. A Novel Intravital Imaging Window for Longitudinal Microscopy of the Mouse Ovary. *Nature*. July 2015; 5:12446.
15. Junqueira LC, Carneiro J. Temel histoloji text&atlas. Nobel Tıp Kitapları. İstanbul. 2009; 435-443.
16. Sadler T.W. Medikal Embriyoloji 9. Baskı. Palme Yayıncılık. Ankara. 2005;328-331.
17. Moore K.L., Persaud T.V.N. İnsan Embriyolojisi 6. Baskıdan Çeviri İstanbul. Nobel Tıp Kitap Evleri.2002; 18-19.
18. Gartner L.P., Hiatt J.L. Color Textbook of Histology. Third edition Saunders 2001; 463-474.
19. Williams C.J., Erickson G.F. Morphology and physiology of the ovary. Endotext. South Dartmouth. 2012; 1-68.
 - a. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278951/#_NBK278951_pubdet_
20. Zhao L., Du X., Huang K., Tuo Zhang T., Teng Z., Niu W., Chao Wang C., Xia G. Rac1 modulates the formation of primordial follicles by facilitating STAT3-directed Jagged1, GDF9 and BMP15 transcription in mice. *Nature*. 2016; 6:23972.
21. Eşrefoğlu M. Renkli Resimli Genel ve Özel Histoloji. Malatya. 2014; 283-290.
22. Kalaycı Ş. Histoloji. Uludağ Üniversitesi Basımevi. Bursa. 1986; 223-233.
23. Diaz F.J., Wigglesworth K., Eppig J.J. Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. *Journal of Cell Science*. 2007; 120: 1330-1340.
24. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*. 2007;35(4): 495-516.
25. Eşreşoğlu M. Embriyoloji. 1. Baskı. İstanbul Tıp Kitabevleri. 2017;32-36
26. Windley S.P., D.Wilhelm. Signaling Pathways Involved in Mammalian Sex Determination and Gonad Development. Review Article. *Sex Dev*. 2015. 9:297–315.
27. Moore K.L, Persaud T.V.N. İnsan Embriyolojisi 6. Baskıdan Çeviri İstanbul, Nobel Tıp Kitap Evleri 2002;323-326

28. Gartner L.P, Hiatt L. Hücre biyolojisi ve histolojisi. Yedinci Baskı. İstanbul. İstanbul tıp kitabevi. 2016; 330-338.
29. Guyton A C, Hall J E. Tıbbi Fizyoloji. 12. Basım Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul. 2013; 987-988.
30. GartnerP., Hiatt J.L. Renkli histoloji atlası. Histofizyoloji. Dördüncü baskı. İstanbul. 2009; S: 345.
31. Yildirim A., Yildirim S., Topaloglu N., Tekin M. Correlation of ischemia-modified albumin levels and histopathologic findings in experimental ovarian torsion. Turkish Journal of Emergency Medicine. 2016; 8-11.
32. Kandasamy V.,Gopireddy M.M.R.,Vasanth N.S., Saktivel S. Clinico- Pathological Profile of Adnexal Torsion Cases: A Retrospective Analysis from A Tertiary Care Teaching Hospital. Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2014 Jun, Vol-8(6).
33. Eser A., Hızlı D., Haltas H., Namuslu M., Kosus A., Kosus N., Kafalı H. Effects of curcumin on ovarian ischemia-reperfusioninjury in a rat model Biomedical Reports. 2015; 3: 807-813.
34. Ugurel V., Cagatay Cicek A., Cemek M., Demirtas S., Kocaman A.T., Karaca T. Antioxidant and antiapoptotic effects of erdosteine in a rat model of ovarian ischemia-reperfusion injury. Iran J Basic Med Sci 2017; 20:53-58.
35. Takeuchi M., Matzusaki K., Harada M. Susceptibility weighted Imaging of Ovarian Torsion: A Case Report. Magn Reson Med Sci, Vol. 14, No.4. 2015; 355-358.
36. Sukkong K., Sananpanichkull P., Teerakidpisan P., Bhamarapratana K., Suwannarurk K. High Rate of Gangrenous Adnexal Torsion: Dilemma of a Missing Silent Cancer Asian Pac J Cancer Prev. 2016; 17 (11), 4981-4984.
37. Laganà A.S., Sofo V., Salmeri F.M., Palmara V.I. Oxidative Stress during Ovarian Torsion in Pediatric and Adolescent Patients: Changing The Perspective of The Disease Int J Fertil Steril. 2016; 9(4): 416-423.
38. Barrera G.,Gentile F.,Pizzimenti S.,Canuto R.A. Review Mitochondrial Dysfunction in Cancer and Neurodegenerative Diseases: Spotlight on Fatty Acid Oxidation and Lipoperoxidation Products Antioxidants. 2016; 5, 7; doi:10.3390.

39. Sagsoz N., Kisa U., Apan A. Ischaemia–reperfusion injury of rat ovary and the effects of vitamin C, mannitol and verapamil Human Reproduction. 2002; Vol.17, No.11 pp. 2972–2976.
40. Tonin F.S., Steimbach L.M., Wiens A., Perlin C.M. Impact of Natural Juice Consumption on Plasma Antioxidant Status: A Systematic Review and Meta-Analysis. Molecules. 2015; 20, 22146–22156.
41. Rasool M., Ashraf M.A.B., Malik A., Waquar S. Comparative study of extrapolative factors linked with oxidative injury and antiinflammatory status in chronic kidney disease patients experiencing cardiovascular distress. PLOS ONE February 2017; DOI:10.1371.
42. Zhou Q., Zhu L., Zhang D., Li N. Review Article Oxidative Stress-Related Biomarkers in Postmenopausal Osteoporosis: A Systematic Review and Meta-Analyses. Hindawi Publishing Corporation Disease Markers. Volume 2016; 12 pages.
43. Useros J.M., Foncillas J.G. REVIEW. Obesity and colorectal cancer: molecular features of adipose tissue. J Transl Med 2016; 14:21.
44. Tunc S.Y., Agacayak E., Goruk N.Y., Icen M.S. Protective effects of honokiol on ischemia/reperfusion injury of rat ovary: an experimental study. Drug Design, Development and Therapy. 2016;10 1077–1083.
45. Lorente L. New Prognostic Biomarkers in Patients With Traumatic Brain Injury. Review Article. Arch Trauma Res. 2015 December; 4(4): e30165.
46. Özdem S., Çete Y., Dönmez L., Başarı İ. Sağlıklı Yetişkinlerde ve Akut Koroner Sendromlu Hastalarda Serum İskemi Modifiye Albumin (İMA) Düzeyleri. Acil Tıp Dergisi. 2005; 169-174.
47. http://www.vasocare.co.kr/_ver01/_bbs_iw2000/?doc=bbs/board.php&bo_table=020202&page=1&wr_id=1&stext= 20.02.2017.
48. Coşkun G., Özgür H. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, ADANA. ARŞİV 2011; 20:145.
49. Rafael Rosell, Trever G Bivona, Niki Karachaliou Genetics and biomarkers in personalisation of lung cancer treatment. Lancet. 2013; 382: 720–31.

50. Bozkurt S., Arıkan D.C., Kurutas E.B., Sayar H. Selenium has a protective effect on ischemia/reperfusion injury in a rat ovary model: biochemical and histopathologic evaluation. *Journal of Pediatric Surgery*. 2012; 47, 1735–1741.
51. <http://www.oksante.com.tr/oksantest.pdf> 27.01.2017.
52. (<http://silymarin.net/silymarin>) 27.01.2017.
53. Ying Xie Y., Miranda S.R, Hoskins J.M., Roy L. Hawke R.L. Article Role of UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 in the Metabolism and Pharmacokinetics of Silymarin Flavonolignans in Patients with HCV and NAFLD. *Molecules*. 2017; 22, 142.
54. Koçarslan A., Koçarslan S., Aydın M.S., Gunay Ş. Intraperitoneal Administration of Silymarin Protects End Organs from Multivisceral Ischemia/Reperfusion Injury in a Rat Model. *Braz J Cardiovasc Surg*. 2016;31(6):434-9.
55. Federico A., Dallio M., Loguercio C. Review Silymarin/Silybin and Chronic Liver Disease: A Marriage of Many Years. *Molecules*. 2017, 22, 191.
56. Youn C.K., Cho S.I., Lee M.Y., Jeon Y.J., Lee S.K. Inhibition of ERK1/2 by silymarin in mouse mesangial cells. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2017;21(1):117-124.
57. Cengiz M., Kutlu H.M., Burukoglu D., Ayhancı A. A comparative study on the therapeutic effects of Silymarin and Silymarin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles on D-GaIN/TNF- α -induced Liver Damage in Balb/c Mice. *Food and Chemical Toxicology*. 2015; 77: 93–100.
58. (<http://silymarin.net/silymarin>) 27.01.2017
59. <http://www.healthspiritgreen.com/silymarin/> 27.01.2017.
60. <http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/silymarin.php> 27.01.2017.
61. <https://tr.wikipedia.org/wiki/DMSO> 21.02.2017.
62. Soltani, N., Mohammadi, E., Allahtavakoli, M., Shamsizadeh, A. Effects of dimethyl sulfoxide on neuronal response characteristics in deep layers of rat barrel cortex. *Basic and Clinical Neuroscience*. 2016; 7(3), 213-220.
63. <https://www.balmumcukimya.com/dimethyl-sulfoxide-11> 21.02.2017.
64. Jennifer L. Hanslick J.L., Lau K., Noguchi K.K., Olney J.W. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Produces Widespread Apoptosis in the Developing Central Nervous System. *Neurobiol Dis*. 2009; 34(1): 1–10.

65. Hong YL, Yeh SL, Chang CY, Hu ML. Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. *Clin Biochem.* 2000;33(8):619-25.
66. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK ve ark. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Biochem.* 1985; 150 (1): 76–85.
67. Abozaid Ali A., El-Seify G.H., El Haroun H.M., Solima M.A.E.M.M. Effect of monosodium glutamate on the ovaries of adult female albino rats and the possible protective role of green tea. *Menoufia Medical Journal.* 2014; 27:793–800.
68. Manizheh S.M.M., Maryamalsadat K.S., Jafar S.R., Mohammad-Reza R., Leila R., Nadereh R., Elaheh O., Morteza G., Mashrabi Omid M. The Ovario-Protective Effect of Erythropoietin against Oxidative Damage Associated with Reperfusion Following Ovarian Torsion in Rat *American Journal of Animal and Veterinary Sciences.* 2011; 6 (1): 18-24.
69. Yigiter M., Halici Z., Odabasoglu F., Keles O.N., Atalay F., Unal B., Salman A.B. Growth hormone reduces tissue damage in rat ovaries subjected to torsion and detorsion: biochemical and histopathologic evaluation. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* 2011;157, 94-100.
70. Akdemir A., Erbas O., Gode F., Ergenoglu M., Yeniel O., Oltulu F., Yavasoglu A., Taskiran D. Protective effect of oxytocin on ovarian ischemia-reperfusion injury in rats. *Peptides.* 2014; 55, 126-30.
71. Sak M.A., Soydinc H.E., Sak S., Evsen M.S, Alabalik U., Akdemir F., Gul T. The protective effect of curcumin on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *International Journal of Surgery* 11. 2013; 967-970.
72. Kurt R.K., Dogan A.C., Dogan M., Albayrak A., Kurt S.N., Eren F., Okyay A.G., Karateke A., Duru M., Fadillioglu E., Delibasi T. Protective Effect of Colchicine on Ovarian Ischemia–Reperfusion Injury: An Experimental Study *Reproductive Sciences.* 2015; 22(5) 545-550.
73. Abali R., Tasdemir N., Yuksel M.A., Guzel S., Oznur M., Nalbantoglu B., Tasdemir U.G. Protective effect of infliximab on ischemia/reperfusion injury in a rat ovary model: biochemical and histopathologic evaluation. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* 2013; 171,353-357.

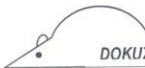
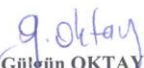
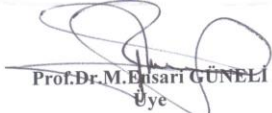
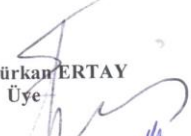
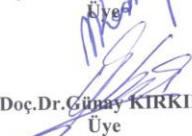
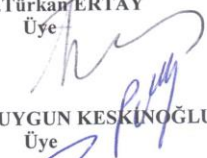
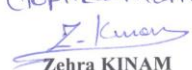
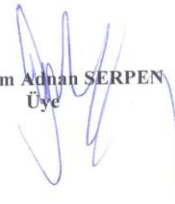
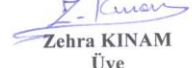
74. Toyota E., Kawaguchi Y., Ogasawara Y., Watanabe N., Neishi Y., Kawamoto T., Okura H., Yoshida K. Novel Rat Model of Ischemic Cardiomyopathy Induced by Repetitive Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury While Conscious. *Circ J.* 2007; 71: 788 –795.
75. Erer D., Ozer A., Arslan M., Oktar GL., Iriz E., Elmas C., Zor MH., Tatar T., Goktas G. The protective effects of dexmedetomidine on liver injury-induced myocardial ischemia reperfusion. *Bratisl Lek Listy.* 2014; 115 (7) 422 – 426.
76. Oktar GL., Demir Amac N., Elmas C., Arslan M., Goktas G., Iriz E., Erer D., Zor MH., Tatar T. The histopathological effects of levosimendan on liver injury induced by myocardial ischemia and reperfusion. *Bratisl Lek Listy.* 2015; 116 (4) 241 – 247.
77. Sun W., Quan N., WangL., Yang H., Chu D., Liu Q., Zhao X., Leng J., Li J. Cardiac-Specific Deletion of the Pdha1 Gene Sensitizes Heart to Toxicological Actions of Ischemic Stress. *TOXICOLOGICAL SCIENCES.* 2016; 151(1) 193–203.
78. Tewes S., Gueler F., Chen R., Gutberlet M., Jang MS., Meier M., Mengel M., Hartung D., Wacker F., Rong S., Hueper1 K. Functional MRI for characterization of renal perfusion impairment and edema formation due to acute kidney injury in different mouse strains. 2017 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173248>.
79. Zhou H-X., Ma Y-Z., Liu Y-L., Ying Chen Y., Zhou C-J., Wu S-N., Shen J-P., Cheng-Guang Liang C-G. Assessment of Mouse Germinal Vesicle Stage Oocyte Quality by Evaluating the Cumulus Layer, Zona Pellucida, and Perivitelline Space. 2014; doi:10.1371/journal.pone.0105812.
80. Ergenoglu M., Erbaş O., Akdemir A., Yeniel A.O., Yildirim N., Oltulu F., Aktuğ H., Taskiran D. Attenuation of Ischemia/Reperfusion-Induced Ovarian Damage in Rats: Does Edaravone Offer Protection? *Eur Surg Res.* 2013;51:21–32.
81. Kolusari A., Okyay AG., Kockaya EA. The Effect of Erythropoietin in Preventing Ischemia–Reperfusion Injury in Ovarian Tissue Transplantation. *Reproductive Sciences.* 2017; <https://doi.org/10.1177/1933719117715127>.
82. Hartmann RM., Licks F., Schemitt ES., Colares JR., Silva J., Moura RMBL., Zabot GP., Fillmann HS., Marroni NP. Effect of glutamine on liver injuries induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats. *Nutr Hosp.* 2017; 34(3):540-547.

83. Gunduz A., Turedi S., Mentese A., Karahan SC., Hos G., Tatlı O., Turan I., Ucar U., Russell RM., Topbas M. Ischemia-modified albumin in the diagnosis of acute mesenteric ischemia: a preliminary study. *American Journal of Emergency Medicine*. 2008; 26, 202–205.
84. Pérez J., Carrillo-S C., García E., Ruiz-Mara G., Pérez-Tamayo R., Chavarría A. Neuroprotective effect of silymarin in a MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Toxicology*. 2014; 319, 38-43.
85. Jin Y., Zhao X., Zhang H., Li Q., Gudong LG., Zhao X. Modulatory effect of silymarin on pulmonary vascular dysfunction through HIF-1 α -iNOS following rat lung ischemia-reperfusion injury. *Experimental And Therapeutic Medicine*. 2016; 12: 1135-1140.



8. EKLER

8.1. EK-1 Etik Kurul Onayı

 DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU	
35340, Inciraltı, İzmir-232 4122234	
Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 03/08/2015 Toplantı Tarihi : 31 Mart 2015	
Sayın, Prof.Dr.Bekir Uğur ERGÜR Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	
10/2015 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Over torsiyonunda meydana gelen değişikliklere silymarinin tedavi edici etkisinin biyokimyasal, ışık mikroskobik ve elektron mikroskobik düzeyde incelenmesi" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir. Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.	
 Prof.Dr.Osman YILMAZ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı	 Prof.Dr.Ali Necati GÖKMEN Başkan Vekili
 Prof.Dr.Gülşin OKTAY Üye	 Prof.Dr.Safiye AKTAS Üye
 Prof.Dr.M.Emisari GÜNELİ Üye	 Prof.Dr.Hüsnü Alper BAĞRIYANIK Üye
 Doç.Dr.Meral KARAMAN Üye	 Doç.Dr.Türkan ERTAY Üye
 Doç.Dr.Günay KIRKIM Üye	 Doç.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU Üye
 Doç.Dr.Nermin Nüket GÖÇMEN MAS Üye	 Doç.Dr.Zekiye Sultan ALTUN Üye
 Yard.Doç.Dr.Orhan KALEMCİ Üye (toplıkatılamadı)	 Vet.Hekim Adnan SERPEN Üye
 Zehra KINAM Üye	
NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde bold karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.	

8.2. EK-2 Etik Kurul İsim Değişikliği

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ MULTİDİSİPLİN LABORATUVARI HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

35340, İnciraltı, İzmir-232 4122234

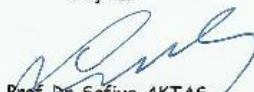
Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 03/24/2017

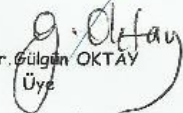
Toplantı Tarihi : 10 Ocak 2017

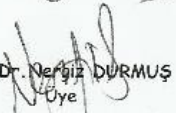
Sayın, Prof.Dr.Bekir Uğur ERGÜR
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

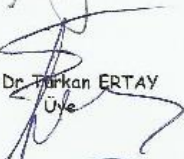
10/2015 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Over torsiyonundaki iskemi-reperfüzyon hasarında meydana gelen değişikliklere silymarinin tedavi edici etkisinin biyokimyasal, ışık mikroskopik ve elektron mikroskopik düzeyde incelenmesi" isimli projede; gönderilen belgeler incelenerek, proje isminin "Over torsiyonundaki iskemi-reperfüzyon hasarına silymarinin etkisinin incelenmesi" olarak değiştirilmesi uygun bulunmuştur. Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

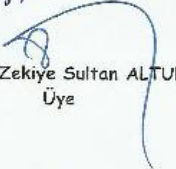

Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı

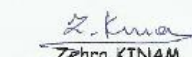

Prof.Dr.Safiye AKTAŞ
Üye

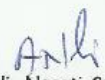

Prof.Dr.Gülşin OKTAY
Üye


Doç.Dr.Nergiz DURMUŞ
Üye


Doç.Dr.Tarkan ERTAY
Üye


Doç.Dr.Zekiye Sultan ALTUN
Üye


Zehra KINAM
Üye


Prof.Dr.Ali Necati GÖKMEN
Başkan Vekili


Prof.Dr. Hatice Nur OLGUN
Üye


Prof.Dr.Günay KIRKIM
Üye


Prof.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Üye


Doç.Dr.Nermin Nüket GÖÇMEN MAS
Üye


Yard.Doç.Dr.Orhan KALEMCI
Üye (Topl.Katılmadı)


Vet.Hekim Adnan SERPEN
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin proje başvuru formunda **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

8.3. EK-3 TÜBİTAK Onayı



T.C.
TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU BAŞKANLIĞI
Araştırma Destek Programları Başkanlığı

Sayı : B.14.2.TBT.0.06.03.02-161-34391
Konu : 216S473 Numaralı Proje Öneriniz

23/02/2017

Sayın Bekir Uğur ERGÜR

"Hızlı Destek Programı" kapsamında Kurumumuza önerdiğiniz ve bilimsel değerlendirmeye alınması uygun bulunan 216S473 numaralı ve "Over Torsiyonundaki İskemi-Reperfüzyon Hasarında Meydana Gelen Değişikliklere Silymarinin Tedavi Edici Etkisinin Biyokimyasal, Işık Mikroskopik Ve Elektron Mikroskopik Düzeyde İncelenmesi." başlıklı projenize ilişkin değerlendirme süreci tamamlanmıştır.

Desteklenmesine karar verilen proje önerinizin ilgili mevzuat çerçevesinde, mali ve benzeri konularda değerlendirme çalışmalarına başlanmıştır. Süreç tamamlandığında projelere ait sözleşme ve diğer belgeler imzalanmak üzere tarafınıza gönderilecektir.

Çalışmalarınızda başarılar diler, saygılar sunarım.

Prof. Dr. Sevim AYDIN
Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu
Yürütme Komitesi Sekreteri V.

PANEL PUAN SEVİYESİ: B

A: Çok İyi B: İyi C: Orta D: İyi Değil E: Yetersiz

Panel toplam puanı A ve B seviyesinde olan projeler desteklenmiştir.

8.4. EK-4 Özgeçmiş

ÖZGEÇMİŞ

ÖZCAN ÜSTÜN

TC Kimlik No / Pasaport No:	18311501550
Doğum Yılı:	1967
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Dekanlık Binası 7. Kat 35330 İnciraltı/İZMİR
Telefon :	0232 4124570
Faks :	
e-posta :	ozcan.ustun@deu.edu.tr

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
TR	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyoloji	Lisans	1989

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı	Türkiye	İzmir	Temel Tıp Bilimleri	Biyolog	1989-2017

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Ovaryum, iskemi-reperfüzyon hasarı, Silymarin

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı	

Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Biocompatibility and biomechanical characteristics of loofah based scaffolds combined with hydroxyapatite, cellulose, poly-l-lactic acid with chondrocyte-like cells. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2016 Dec 1;69:437-46.

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

