



T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM KLİNİĞİ

BAŞKAN: PROF.DR. İSMAİL METE İTİL

**RATLARDA OLUŞTURULAN İSKEMİ
REPERFÜZYON MODELİNDE HASARIN OVER
DOKUSU ÜZERİNE OLASI ETKİLERİNİN VE
VİTAMİN D3 KULLANIMININ ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI.**

UZMANLIK TEZİ

DR.İZZET MUSAYEVA

DANIŞMAN

PROF.DR.TEKSİN ÇIRPAN

İZMİR 2018

ÖNSÖZ

İskemi-reperfüzyon hasarı miyokard infarktüsü, serebrovasküler infarkt, organ transplantasyonları, kardiyopulmoner resusitasyon, trombolitik tedavi ve hemorajik şok gibi birçok klinik durumda hala hastalar için yüksek morbidite ve mortalite nedenidir. Çalışmamızda ratlarda oluşturulan deneysel 60 dk pneumoperitonium modeli sonrası overlerde oluşan iskemi reperfüzyon (İR) hasarın biyokimyasal, histopatolojik, mikrovasküler boyutu değerlendirilmiş , kontrol grubu ve bu hasarların önlenmesinde preoperatif vit D kullanılan çalışma grubu ile karşılaştırılmıştır. Vit D nin overde iskemi/reperfüzyonun neden olduğu hasarın biyokimyasal ve histopatolojik parametreleri kısa dönemde bile düzelttiği gösterilmiştir. **Çalışmamızın gerçekleştirilmesine destek veren Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkür ederim.**

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, başta anabilim dalı başkanımız Sayın **Prof. Dr. İSMAİL METE İTİL** olmak üzere tüm değerli hocalarıma destek ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemedikleri için en içten saygı ve teşekkürümü sunarım.

Tez danışmanım olan sayın hocam **TEKSİN ÇIRPAN'a** , çalışmalarımda bana yol gösteren, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan **Doç. Dr. ALİ AKDEMİR'e** vermiş olduğu emekten dolayı çok teşekkür ederim.

Tezin tasarım ve sürdürülme aşamasında, materyalin temininde preparatların değerlendirilmesinde, biyokimyasal ve histolojik analiz işlemlerinin gerçekleştirilmesinde büyük yardımını gördüğüm Fizyoloji ABD Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. **DİLEK TAŞKIRAN'a**, Histoloji ve Embriyoloji ABD Uzman Dr. Fatih Oltulu'ya, Araştırma görevlisi Aylin Buhur'a teşekkürlerimi sunarım.

Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalında uzmanlık eğitimim boyunca her konuda desteklerini esirgemeyen, deneyim ve yardımlarıyla bu alanda yetişmemde büyük katkısı olan çok değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. **NEDİM KARADADAŞ'a**, Prof. Dr. **SERMET SAĞOL'a**, Prof. Dr. **SERDAR ÖZŞENER'e**, Prof. Dr. **AYDIN ÖZSARAN'a**, Prof. Dr. **COŞAN TEREK'e**, Prof. Dr. **MURAT ULUKUŞ'a**, Doç. Dr. **METE ERGENOĞLU'na**, Doç. Dr. **ÖZGÜR YENİEL'e**, Doç. **LEVENT AKMAN'a**, Uzm. Dr. **ÇAĞDAŞ ŞAHİN'e**, Uzm. Dr. **NURİ YILDIRIM'a**, Uzm. Dr. **FIRAT ÖKMEN'e**, Uzm. Dr. **İSMET HORTU'a** ayrıca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm araştırma görevlisi arkadaşlarım, klinik hemşire ve personeline teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	II
ŞEKİL VE ÇİZELGE DİZİNİ.....	V
KISALTMALAR VE SEMBOLLER	VI
ÖZ.....	VII
ABSTRAKT	VIII
1.GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	1
2.1 Over	1
2.1.1 Embriyoloji	1
2.1.2 Anatomi.....	1
2.1.3 Histoloji.....	2
2.2. İskemi-Reperfüzyon Hasarı	2
2.2.1 İskemik Hasarın Patofizyolojisi	2
2.1.2 Reperfüzyon Hasarın Patofizyolojisi	4
3. ANTİOKSİDANLAR.....	11
4. D VİTAMİNİNİN İSKELET SİSTEMİ DIŞI ETKİLERİ	12
5. MATERYAL VE YÖNTEM.....	14
5.1 Anestezi İşlemi	15
5.2.Yöntem.....	15
6. HİSTOLOJİ VE İMMUNOHİSTOLOJİ DEĞERLENDİRME	16
7. BİOKİMYASAL ANALİZLER İÇİN DOKU HAZIRLIĞI.....	17
8. BULGULAR	17
8.1 Işık Mikroskopik Bulgular	17
9. İSTATİSTİK SONUÇLAR	19

9.1 Biyokimyasal Sonuçlar	19
9.2 Histopatolojik Sonuçlar	21
9.2.1 Folliküler Dejenerasyon	21
9.2.2 Vasküler Konjesyon	22
9.2.3 İnflamasyon	22
9.2.4 Ödem	23
10. APAPTOZİS MARKIRLARI	24
10.1.Caspaz 3	24
10.2 Pcna	25
11. TARTIŞMA	27
12. SONUÇ ve ÖNERİLER	30
13.KAYNAKLAR	32

ŞEKİL VE ÇİZELGELER

Tablo 1	Hücre membran hasarı	11
Tablo 2	Antioksidan	12
Tablo 3	Plazma ve over dokusunda ölçülen biyokimyasal belirteçler	20
Tablo 4	Foliküler dejenerasyon düzeylerinin gruplar arası dağılımı.....	21
Tablo 5	Vasküler konjesyon değerinin gruplar arası dağılımı	22
Tablo 6	İnflamasyon değerinin gruplar arası dağılımı	22
Tablo 7	Ödem değerinin gruplar arası dağılımı	23
Tablo 8	Tüm parametrelerinin karşılıklı değerlendirilmesi.....	24
Tablo 9	Caspaz- 3 değerinin gruplar arası dağılımı	24
Tablo 10	PCNA değerinin gruplar üzerine dağılım şeması.....	27
Resim 1	Sham kontrol grubuna ait HE boyaması. TF-Tersiyer Follikül	18
Resim 2	İskemi-reperfüzyon grubu	18
Resim 3	D vit grubu	19
Resim 4	Caspaz 3 ile boyanan hücrelerin gruplar arası gösterdikleri farklılıklar	25
Resim 5	PCNA değerinin gruplara göre dağılımı	26

KISALTMALAR

İRİH	: İskemi reperfüzyon hasar
PMNL	: Polimorf nüveli lökositler
MH	: Anti Müllerian hormon
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
SOR	: Serbest oksijen Radikalleri
SOD	: Superoksid Dismutaz
KDH	: Ksantin Dehidrojenaz
KO	: Ksantin Oksidaz
MDA	: Malondialdehit
NO	: Nitrik Oksit
HE	: Hematoksilen Eozin

ÖZET

Çalışmamızda ratlarda oluşturulan deneysel 60 dk pneumoperitonium modeli sonrası overlerde oluşan iskemi reperfüzyon (İR) hasarın biyokimyasal, histopatolojik, mikrovasküler boyutu değerlendirilmiş, kontrol grubu ve bu hasarların önlenmesinde preoperatif vit D kullanılan çalışma grubu ile karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda 24 aylık gebe olmayan 200-250 gr ağırlığında Sprague Dawley cinsi dişi sıçanlar kullanıldı. Pneumoperitonium sağlandıktan 60 dk sonra desuflasyon gerçekleştirilmiş ve 30dk boyunca İntrabdominal basınç (İAB) normalize edilmiştir. Her biri 7 rattan oluşan 3 çalışma grubu oluşturulmuştur. Reperfüzyon periyodunu takiben midline abdominal insizyon uygulanarak overler vizualize edilmiş, sağ overde histopatolojik, sol overde biyokimyasal olarak oksidatif stres markırları üzerinden İR hasar değerlendirilmiştir. Histopatoloji olarak dokulardaki folliküler dejenerasyon, vasküler konjesyon, inflamasyon ,hemoraji ve ödem değerlendirildi. Biyokimyasal olarak, apoptoz markırı olan caspaz 3 ve DNA tamir mekanizmalarının nükleotid eksizyon tamiri (NER) kısmından sorumlu olan PCNA düzeyi ve AMH düzeyi değişiklikleri araştırıldı. Dvit uygulanan grup ile diğer iki grup (şam ve iskemi-reperfüzyon) arasında anlamlı fark saptandı.

ANAHTAR KELİMELE

İskemi reperfüzyon, AntiMüllerian hormon, Dezoksiribonükleik asid, Nükleotid eksizyon tamiri.

ABSTRACT

In our study biochemical, histopatological, microvascular size of ischemic reperfusion damage in ovaries was assessed after creating experimental 60 min pneumoperitoneum model on the rats, compared with control group and study group which used preoperative vit D for prevention of damages. 24 month nonpregnant 200-250 gr of weight Sprague Dawley species female rats were used. 60 min after providing Pneumoperitoneum desulfurization was realized and through 30 min IAB was normalized. Each consisted of 7 rats 3 study groups were formed. To make ovaries visualize midline abdominal incision was performed following reperfusion period, IR damage was assessed histopathological in right ovary, biochemical in left ovary over oxidative stress markers. Follicular degeneration, vascular congestion, inflammation, hemorrhage and edema was assessed histopatological in tissues. Apoptosis marker Caspase 3 and PCNA level which responsible of the part of nucleotide excision repair of DNA repair mechanism and AMH level changes was investigated. There were significant differences between the group which administered D vit. and other two groups (sham and ischemic reperfusion)

KEY WORDS

Ischemic reperfusion, AntiMullerian hormone, deoxyribonucleic acid, nucleotide excision repair.

1.GİRİŞ

İskemi-reperfüzyon hasarı; miyokard infarktüsü, serebrovasküler infarkt, organ transplantasyonları, kardiyopulmoner resüsitasyon, trombolitik tedavi ve hemorajik şok gibi birçok klinik durumda halen hastalar için yüksek morbidite ve mortalite nedenidir. Tez çalışmasında ratlarda oluşturulan deneysel 60 dk pneumoperitonium modeli sonrası overlerde oluşan iskemi reperfüzyon (İR) hasarın biyokimyasal, histopatolojik, mikrovasküler boyutu değerlendirilmiş kontrol grubu ve bu hasarların önlenmesinde preoperatif vit D kullanılan çalışma grubu ile karşılaştırılmıştır. Reperfüzyon periyodu takiben sham grupta (90 dk veres insersiyonu sonrası ve iskemi-reperfüzyon grubunda midline abdominal insizyon uygulanarak overler vizualize edilmiş, sağ overde histopatolojik, sol overde biyokimyasal olarak oksidatif stres markırları üzerinden İR hasar değerlendirilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Over

2.1.1 Embriyolojisi

Embriyonik hayatın 7. haftasına kadar dişi ve erkek embriyodaki gonadlar morfolojik olarak aynıdır. Primordiyal germ hücreleri 4. haftada yolk sak duvarında belirir ve 5-6. haftalarda ürogenital kıvrıma göç ederler. Ürogenital kıvrımın mezodermal (çölomik) epiteli gonadın epitelini ve stromasını oluşturmak üzere proliferer olur ve bölünen endodermal kökenli germ hücreleri bu proliferer epitel hücreleri içine overi oluşturmak üzere inkorpore olurlar.(1) 7 haftadan sonra primordiyal germ hücrelerinde mayoz bölünmeler gerçekleşir ve etraflarını çölomik epitelyal hücreler ile mezonefrik hücre artıkları sarar

2.1.2 Anatomisi

Overler çift pelvik organlardır. Erişkinde overler ovoid şekilli olup yaklaşık olarak 3-5 x 1,5-3 x 0,6-1,5 cm ölçüde ve 5-8 gr ağırlıktadır Uterusun her iki yanında lateral pelvik duvara yakın, broad ligamanının arkasında, rektumun önünde yer alırlar. Her iki over anterior (hiler) yüzünden iki katlı periton kıvrımıyla (mezoovaryum) broad

ligamanının arka yüzüne asılıdır. Aynı zamanda medial polden aynı taraf uterus kornusuna uteroovaryan ligaman ile, lateral polden lateral pelvik duvara infundibulopelvik ligaman ile bağlıdır. Aortun bir dalı olan ovaryan arter infundibulopelvik ligaman üzerinden overin mezoovaryal sınırında uterin arterin ovaryan dalı ile anastomoz yapar ve buradan çıkan yaklaşık 10 arterial dal ile over hilusundan medullaya girer. Overin venleri arterleri takip ederek hilusta bir araya gelip plexus oluşturarak ovaryan venlere drene olurlar. Sağ ovaryan ven inferior kaval vene, sol ovaryan ven renal vene drene olur. Overin lenfatikleri esas olarak folliküllerin teka tabakalarından köken alır.(1) Olgun follikülün granuloza tabakası lenfatiklerden yoksunken korpus luteumda zengin bir lenfatik ağ mevcuttur. Overin lenfatikleri damarlardan bağımsız olarak stromada ilerleyip hilusta plexus yaparak kan damarlarına yakın seyreder. Mezoovaryuma 4-8 efferent girer ve burada tuba ve uterusan gelen dallarla subovaryan plexusu oluştururlar. Buradan çıkan dallar böbreğin alt polü hizasında üst paraaortik lenf nodlarına drene olurlar

2.1.3 Histolojisi

Over morfolojik olarak korteks ve medulla olmak üzere iki kısma ayrılır. Korteks, follikülleri de içeren dış kısmı asellüler kollajenöz bağ dokudan, iç kısmı fibroblastları andıran sıkı yerleşimli içi hücrelerden oluşmuş bir tabakadır. Medulla ise daha gevşek formda mezenkimal dokudan oluşan kan damarları, sinirleri ve bunları çevreleyen epitelyum benzeri hücreleri içeren tabakadır. Overin yüzey epiteli tüm overi çevreleyen kısmen psödostratifiye modifiye peritoneal hücrelerden oluşan bir tabakadır.

2.2. İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI

2.2.1 İskemik Hasarının Patofizyolojisi

İskemi, dokunun oksijen ve yaşam için gerekli diğer maddelere olan ihtiyacı ile sunumu arasındaki dengesizlik halidir. Ayrıca iskemi sürecinde, ortaya çıkan metabolitlerin uzaklaştırılmasında da sorun meydana gelir

2.2.1.1 Akut hücre zedelenmesinin nedenleri

Akut hücre zedelenmesi, uyarana karşı oluşur ve hücre morfolojisinde değişimler meydana getirir. İskemide aktive olan SOR (serbest oksijen radikali), lipid peroksidasyonuna ve hücre hasarlanmasına neden olur.

Geri Dönüşümlü Zedelenme

- a. Hipoksi hücre hasarı ve ölümünün en sık nedenlerinden biridir. Hipokside, hücre içi oksijen azlığı nedeniyle aerobik solunum aksar ve mitokondrideki oksidatif fosforilasyon engellenir. Adenozin trifosfat (ATP) üretimi azalır ya da tamamen sona erer. ATP kaybı sonucu ATPaz aktivitesi de azalır. Bu, hücre zarında aktif sodyum pompası yetersizliği ve beraberinde hücre içinde sodyum birikimi sonucunu doğurur. Hücre içi potasyum dışarı atılır. Ardından su hücre içine girer ve hücre sel şişme meydana gelir. Hücre sel şişmenin bir diğer nedeni ise katabolitlerin birikimidir
- b. Hücre enerji metabolizması bu süreç içerisinde glikoza bağımlı hale gelir. Glikojen depoları hızla azalır. Glikoliz, laktik asit ve fosfat türevlerinin hidrolizi ile inorganik fosfatların birikimine, bu ise hücre içi pH'yı düşürerek asidoza neden olur.(2)
- c. Sonrasında granüllü endoplazmik retikulumdan ribozomlar ayrılır ve polizomlar monozomlara parçalanarak protein sentezi azalır. Hipoksi devam ederse membran geçirgenliği artar ve mitokondri fonksiyonları yavaşlar. Bu sırada mitokondriler normal, hafif yoğunlaşmış ya da şişmiş, endoplazmik retikulum ise genişlemiş olarak görülür. Sonuçta hücre belirgin biçimde şişer. Buraya kadar olan olaylar geri dönebilir değişikliklerdir. İskemi bu andan sonra da devam ederse, geri dönüşümsüz hücre zedelenmesi başlar. Hücre hasarının yapısal değişiklikleri, bazı kritik biyokimyasal sistemlerin bozulmasından sonra görünür hale gelir. Hücre şişmesi geri dönüşümlü bir hasardır ve dakikalar içinde görülebilir

Geri Dönüşümsüz Zedelenme

Geri dönüşümsüz hücre zedelenmesinde mitokondri ve kristalarda aşırı vakuolizasyon ile plazma zarında aşırı zedelenme vardır. Hasarlanmış ve ileri derecede geçirgenleşmiş zarlardan hücre için gerekli yaşamsal elemanların kaybolduğu görülür.

Hücre içi pH'nın düşmesi, lizozom zarlarının zedelenmesi ve beraberinde enzimlerin sitoplazmaya geçerek asit hidrolazları aktiflemesi sonucu, çekirdek ve sitoplazma yapıları sindirilir. Hücre zedelenmesinde en önemli basamak kuşkusuz membran zedelenmesidir. Hücre membran zedelenmesinde altı neden suçlanmaktadır.

1. Mitokondri fonksiyon bozukluğu,
2. Membran fosfolipidlerinin giderek artan kaybı,
3. Hücre iskeletindeki değişimler,
4. SOR,
5. Lipid yıkım ürünleri,
6. Hücre içi aminoasitlerin kaybı.

2.1.2 Reperfüzyon Hasarının Patofizyolojisi

İskemi sonrasında dokuda dolaşımın yeniden başlaması, reperfüzyon olarak adlandırılmaktadır. İskemi sonucunda artan SOR kan akımı düzeldikten sonra reperfüzyon zedelenmesine yol açar. Reperfüzyon oluşmazsa, öldürücü iskemik zedelenme gelişir fakat toksik SOR oluşmaz. Reperfüzyon sırasında iskemik alanda toplanan nötrofil ve trombositlerin aktivasyonu, hücre içi Ca^{+2} birikimi ile mikrovasküler hasarın dokudaki zedelenmenin nedeni olduğu bilinmektedir. Toksik oksijen türevlerinin büyük ölçüde iskemik alanda toplanan polimorf nüveli lökositler tarafından yapıldığı düşünülmektedir. Dokuya giden kan akımının azalması ve oksijen yetersizliği ile başlayan iskemik doku hasarı, reperfüzyon sağlandığında hasarlanmış dokuların yeniden oksijenizasyonu ile artarak devam eder.(3) Hücrelerdeki mitokondriyel ATP üretiminin azalması hücre içi metabolizmanın anaerobik yöne kaymasına ve hücre içi asidoza sebep olur. ATP bağımlı Na-K iyon pompalarının yavaşlaması, hücre içi hidrojen artışına yol açar. Artmış hidrojen yükünü dengelemek için ATP bağımlı olmayan Na-Ca pompası intraselüler kalsiyum miktarını artırır. Artmış kalsiyum yükü ise birçok sitozolik proteazı aktive eder. Hücre içi proteaz aktivasyonu ve reperfüzyonla dokuların yeniden oksijenizasyonu ise sonuçta hidroksil radikali ($OH\bullet$), süperoksit radikali ($O_2\bullet^-$) ve hidrojen peroksit H_2O_2 gibi reaktif oksijen türleri (ROS) ile peroksinitrit ($ONOO^-$) gibi reaktif nitrojen türlerinin (RNS) üretimine yol açan kritik biyokimyasal yolları hızlandırır. Ayrıca artmış serbest

radikallerin neden olduğu inflamasyon, bölgeye inflamatuvar hücrelerin toplanmasını tetikler. Endotelyal hücrelerle başta polimorf çekirdekli lökositler olmak üzere inflamatuvar hücreler arasındaki etkileşimler, birçok sitokinin salınmasına ve iskeminin yol açtığı hasarın reperfüzyonla genişlemesine yol açar. Ksantin oksidaz, nitrik oksit sentaz, mitokondrilerde bulunan elektron transport zinciri ve fagositlerdeki solunumsal patlamadan sorumlu NADPH oksidaz, ROS ve RNS üretiminden sorumlu başlıca mekanizmalardır. Sonuçta oluşan serbest radikaller hücre membranlarındaki lipid yapılar, hücre içi yapısal ve fonksiyonel proteinler ve genetik materyal gibi önemli makromoleküllere zarar vererek hücre hasarı veya ölümüne yol açarlar. Daha detaylı inceleyecek olursak İskemi döneminde ATP üretimi durduğu halde kullanımı devam ettiği için ATP'den AMP ve adenozin oluşur. Adenozin, hızla hücre dışına difüze olur ve inozin ve hipoksantine parçalanır. Dolayısıyla, iskemi sonucu yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin (ATP) yıkımı, dokuda ksantin ve hipoksantin gibi pürin metabolitlerinin birikimine ve ksantin dehidrojenazın (KDH) ksantinoksidaza (KO) dönüşümüne yol açar. Normal şartlarda hipoksantin ürik aside metabolize olur ve bu reaksiyonda elektron alıcı NAD⁺ (nikotinamid adenin dinükleotidin okside formu) dir. Ancak hipoksi ya da iskemi nedeniyle KDH → KO'a dönüştüğünden hipoksantin ürik aside dönüşümü KO tarafından gerçekleşir ve bu reaksiyonda ise elektron alıcı olarak moleküler oksijen kullanılır.

İskemi sonucunda artan SOR kan akımı düzeldikten sonra reperfüzyon zedelenmesine yol açar. Reperfüzyon oluşmazsa, öldürücü iskemik zedelenme gelişir fakat toksik SOR oluşmaz. Reperfüzyon sırasında iskemik alanda toplanan nötrofil ve trombositlerin aktivasyonu, hücre içi Ca²⁺ birikimi ile mikrovasküler hasarın dokudaki zedelenmenin nedeni olduğu bilinmektedir. (3)

Toksik oksijen türevlerinin büyük ölçüde iskemik alanda toplanan polimorf nüveli lökositler tarafından yapıldığı düşünülmektedir

İskemi sonrasında endotel ve hücre zarı fonksiyonlarının bozulmasıyla hem hücre içinde, hem de hücre dışında ödem görülür. Endotel hücrelerinde şişme ile damar dışı boşluğa sızan sıvının nedeni olduğu bası sonucu kapiller damar lümeni daralır ve sonuçta reperfüzyon olsa da mikrosirkülasyonda ciddi yetersizlikler ortaya çıkar. Reperfüzyon ile iskemide bozulmuş mikrosirkülasyonun tam olarak düzeltilememesine

“no-reflow olayı” denir. Dokuda ortaya çıkan ödemin yanı sıra aktive olan nötrofil ve trombositlerin kapiller dolaşımında kalmaları bu tabloya katkıda bulunmaktadır:

Serbest oksijen radikalleri:

Polimorf nüveli lökositler (PMNL)

Kompleman sistemi

Endotel hücreleri olmak üzere başlıca dört faktör hasarın nedenleri arasında yer almaktadır.

1. Serbest radikaller

Serbest radikaller fizyolojik şartlarda ve dış etkenlere karşı organizmanın savunmasında da belirli oranda oluşur ve içsel mekanizmalarla organizmaya olabilecek zararlı etkileri önlenir. Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikallerin endojen kaynakları oksijen, nitrik oksit(NO), uyarılmış nötrofil, mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranı olarak sayılabilir. Solunan oksijenin% 95’inden fazlası mitokondrilerde ATP şeklinde enerji oluşumunda kullanılırken, yaklaşık %5 ’i de son yörüngelerinde ortaklanmamış elektron içeren ve bu özellikleri nedeniyle de toksik serbest radikallere dönüşmektedir (4)

Süperoksit radikali, oksijen molekülüne bir elektron ilavesi ile oluşur ve serbest radikal hasarına karşı koruyucu antioksidan bir enzim olan ve oksidan hasar oluşumu ile birlikte artan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığı ile hidrojen peroksit (H₂O₂)’e indirgenir.

2. Polimorf nüveli lökositler (PMNL)

Reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik anti nötrofil serumlarla ya da lökosit adhezyon moleküllerine karşı monoklonal antikörlerle yapılan çalışmalar, reperfüzyonda mikrovasküler permeabilededeki artıştan başlıca nötrofillerin sorumlu olduğunu göstermiştir. İ/R ile lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adhezyonu meydana gelir. Diğer taraftan, PMNL yüksek miktarda SOR üretme

kapasitesine de sahiptir. İskemi reperfüzyon hasarında PMNL'in rolü ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür. Bunlar:

1. Mikrovasküler oklüzyon;
2. SOR salınması;
3. Sitotoksik enzim salınması;
4. Vasküler permeabilite artışı
5. Sitokin salınmasında artıştır.

PMNL'lerin aktivasyon ve migrasyonları endotel hücrelerinde ve lökositlerde bulunan adhezyon molekülleri aracılığıyla olur. Selektinler olarak bilinen adhezyon moleküllerinin

L, P ve E selektin olmak üzere bilinen üç üyesi vardır. İ/R, endoteldeki P-selektin ekspresyonunu artırır. Bu molekül, PMNL'lerde bulunan P-selektin glikoprotein 1 (PSGL-1) adlı reseptörü ile etkileşerek düşük afiniteli lökosit endotel bağlantısını oluşturur (lökosit rolling). İkinci aşamada, lökosit beta2 integrinler (CD11a/CD18 ve CD11b/CD18) ile endoteldeki interselüler adhezyon molekülü 1 (ICAM-1) arasındaki etkileşim sonucunda

lökosit adhezyonu ve agregasyonu gelişir. Üçüncü aşama ile, trombosit-endotel hücresi adhezyon molekülü 1 (PECAM-1) ile endotel hücre bağlantıları arasındaki etkileşim ile lökosit transmigrasyonu gerçekleşir. Aktive lökositler damar dışına ulaşınca hasar bölgesine doğru göç etmeye başlarlar (kemotaksis)

Nötrofillerin dokuya gelebilmeleri için gerekli kemotaktik maddeler arasında C3a ve interlökin-1 (IL-1), lökotrien B4 (LT-B4), trombosit aktive edici faktör (PAF) ve prostaglandin (PG) türleri vardır. Aktif lökositler nükleer transkripsiyon faktörlerinin (NF-kB) aktivasyonuna ve tümör nekrozis faktör (TNF-a) sentezine yol açar. Lökositlerin ürettiği serbest radikallerle etkileşen bu maddeler, mast hücrelerinden selektin ve ICAM gibi adhezyon moleküllerini mobilize eden inflamatuvar mediyatörlerin salınmasını uyarırlar. Aktif nötrofiller salıverdikleri maddelerle yol açtıkları hasarın yanı sıra, damar içinde oluşturdukları hücre toplulukları (agregatlar) ve aktif trombositlerle birlikte damar endoteline yapışarak mikrovasküler tıkanmaya da neden olurlar.¹ Yapılan son çalışmalarda; nötrofillerin aktivasyon ve dokuya infiltrasyon derecesi ile reperfüze dokudaki nekroz ve apoptozis

derecesi arasında bir korelasyon olduğu bulunmuştur. Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptozisin gelişmesi, normalde immün sistemin ve vücut homeostazının vazgeçilmez bir bileşenidir.¹⁷ Hücresel ölüm yolağındaki düzensizlikler, iskemi-reperfüzyon hasarının yanı sıra, kanser, otoimmün hastalıklar, immün sistem bozuklukları ve nörodejeneratif hastalıklara da yol açabilmektedir. Dokuda aktive lökositlerin başlattığı yanıt şu mekanizmalar ile gerçekleştirilir: Fosfolipaz A2 aktivasyonu araşidonik asit metabolitleri (prostoglandinler ve lökotrienler) sonucu üretilir. Degranülasyon sonucu lizozomal enzimler salınır. SOR üretimi gerçekleşir. Bu ürünler endotel hasarı ve doku zedelenmesinin güçlü araçlarıdır ve başlangıçtaki inflamatuvar uyaranın etkisini güçlendirirler. Bazı durumlarda lizozomal enzimler hücre dışına salınabilir. Hasar yapıcı etkeni ortadan kaldırmaya veya yoğunluğunu azaltmaya yönelik bu inflamatuvar yanıt sonucu, mikrovasküler permeabilite artışı, ödem, tromboz ve parankim hücre ölümü de gerçekleşir. Görevini tamamlayan lökositler apoptotik hücre ölümüne uğrarlar ve makrofajlar aracılığıyla lenfatik dolaşım yoluyla ortamdaki uzaklaştırılırlar. İskemik dokunun reperfüzyonu, arteriyollerde endotel bağımlı dilatasyonun bozulmasına, kapillerlerde lökosit tıkaçlarının oluşmasına ve sıvı filtrasyonunun artmasına, post-kapiller venüllerde plazma proteinlerinin damar dışına sızmasına ve böylece mikrovasküler fonksiyonun bozulmasına neden olur. Reperfüzyonun başlangıç döneminde, mikrosirkülasyonun tüm segmentlerinde aktive edilmiş endotel hücrelerinden fazla miktarda O₂ oluşurken NO oluşumu ise azalır.⁽⁴⁾

Süperoksit radikali ile NO arasındaki dengenin bozulması, endotel hücrelerinden PAF, TNF- α gibi inflamatuvar mediyatörlerin salınmasına ve lökosit-endotel hücre adhezyonuna aracılık eden adhezyon moleküllerinin biyosentezinin artmasına neden olur. Serbest radikallerin oluşumunda ve İ/R hasarında önemli bir kaynak olan nötrofiller azurofilik granüllerinde oksidan etkili NADPH oksidaz, elastaz ve miyeloperoksidaz enzimlerini içerirler. Bu enzimler oksidan doku hasarında önemli roller üstlenir; aktive nötrofillerde ksantin-oksidad'ın artması ile SOR'un salınması "solunum patlaması" olayını meydana getirir. İskemi sonrası reperfüzyonun başlaması ile birlikte, dokuya sunulan oksijenin yaklaşık %70'i NADPH-bağımlı oksidaz ile süperoksit iyonlarına oksitlenmektedir. Süperoksit iyonu, çoğu kez spontan dismutasyonla hidrojen perokside dönüşür. Hidrojen peroksit ise klorür iyonlarının varlığında miyeloperoksidaz

enzimi aracılığı ile hipoklorik aside indirgenir. Hipoklorik asit güçlü bir oksidandır ve birçok biyolojik molekülle kolayca reaksiyona girebilir.(5)

Nötrofillerin aktivasyonu ile nötrofil sekonder granüllerden salıverilen apolaktoferrin, plazminojen aktivatörü, komplemanı aktive eden enzim ve elastaz, kolajenaz, ve jelatinaz gibi proteolitik enzimler damar endotelinde hasara neden olmaktadır. Proteinazların etkisi ile damar duvarında yapının değişimi ve duvar yapısının gevşemesi ile nötrofillerin dokuya göçü kolaylaşır.

3. Komplemanın rolü

İskemi reperfüzyon hasarında kompleman sisteminin rolü tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Kompleman sisteminin aktivasyonu sonunda proinflamatuvar komponentler oluşur. Bunlar C3a, C5a, iC3b ve C5b-9'dur. C3a ve C5a anaflatoksinlerdir ve lökositleri aktive ederler. Lökosit aktivasyonu ve kemotaksisin uyarılmasına ek olarak C5a, makrofaj inflamatuvar protein (MIP)-2, MIP-1a, MIP-1b, monosit kemoatraktan protein (MCP)- 1, TNF-a, IL-1 ve IL-6 üretimini uyararak inflamatuvar yanıtı amplifiye eder. Kompleman tarafından sentezi uyarılan lökosit adhezyon molekülleri şunlardır(6)

Vasküler hücre adhezyon molekülü 1 (VCAM-1)

İnterselüler adhezyon molekülü 1 (ICAM-1)

E-selektin

P-selektin

C5b9 endotelde IL-1a, IL-8 ve MCP-1 salgısını uyararak lökosit aktivasyonu ve kemotaksisi artırır. Aynı zamanda endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe ederek ve endotelde siklik guanozin monofosfatı azaltarak vasküler tonusu bozar.

4. Endotel hücresinin rolü

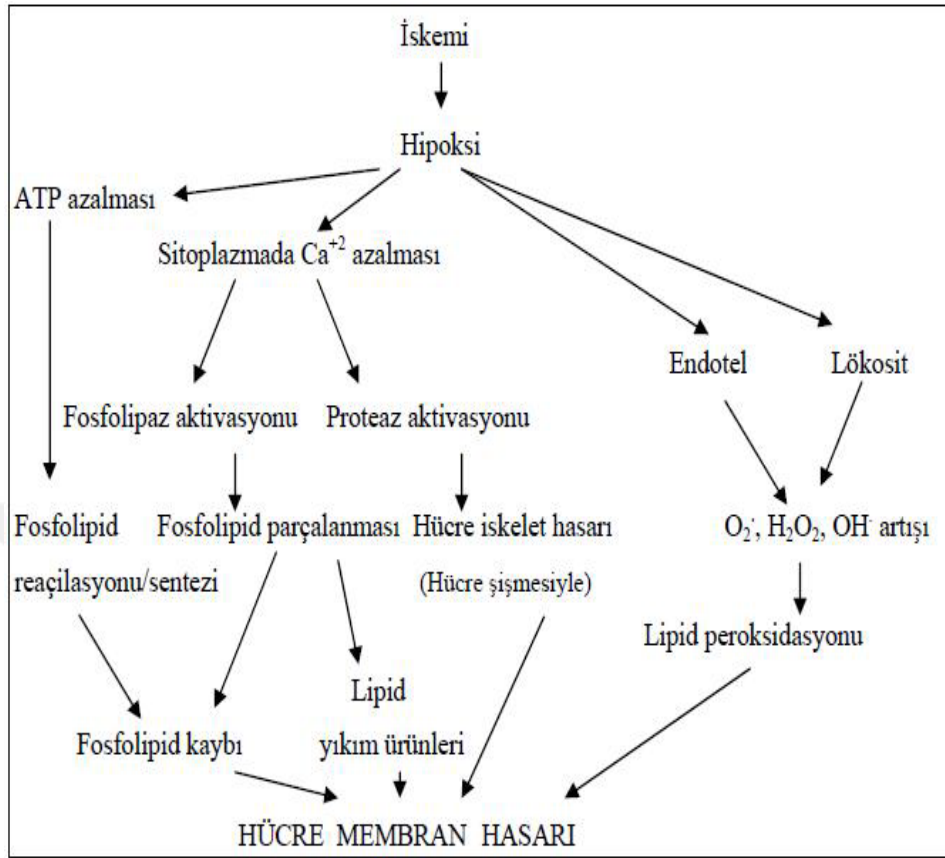
İ/R hasarının oluşmasında endotel hücreleri önemli role sahiptir. Oksidatif stres endotel hücrelerinin aktivasyonuna ve işlevlerinin bozulmasına neden olur. Endotel hücreleri SOR için potansiyel hedef konumundayken diğer taraftan da SOR

üretim kaynağıdır. Endotel, mikrovasküler homeostazdan sorumlu olan endotelin (ET)'i ve NO'yu üretir. NO arteriyel dolaşımında ET'in vazokonstriktör etkisini tersine çevirme eğilimindedir. Venlerde ise bunun tersi söz konusudur. İ/R hasarında endotelin/ NO oranı endotelin lehine bozulur. Sonuçta arteriyel vazokonstriksiyon, venlerde vazodilatasyon olur.

Endotel hücrelerinin oksidatif stresi sonucu kompleman aktive edilir; lökosit adhezyon moleküllerinin üretimi artar.

SOR etkisi ile endotel hücreleri hasara yanıt olarak İL-1, PAF, prostaglandinler (PG I₂, PG E₂), GM-CSF, büyüme faktörleri, endotelin, NO ve tromboksan A₂ (TxA₂) salgırlar. Aktive olan endotel hücreleri ek olarak kendi bazal membranlarını sindiren kollajenazlar salgılama yeteneğindedir. Nitrik oksitlerin radikal olarak reaktivitesi düşüktür, ancak metal içeren bileşikler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girerler. Özellikle lipid radikallerle tepkimeye girmesi NO'ya antioksidan bir etki kazandırır. (7)Fizyolojik derişimde üretilen NO, esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata (NO₃⁻) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, nitrik oksidi ortamdan temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz enziminin indüksiyonu sırasında NO derişiminin artması ile oksidasyonu da hızlanır ve çeşitli reaktif nitrojen oksit türleri oluşur. Bu reaktif türler NO'in dolaylı etkilerinden sorumludur ve hücrel moleküllerin nitrozilasyonuna, nitrasyonuna, nitrozasyonuna yol açarak, proteinlerin ve enzimlerin aktivitelerinin sonlanmasına neden olabilirler.(8)

Tablo1. Hücre membran hasarı



3.ANTİOKSİDANLAR

Organizmanın pro-oksidan/antioksidan dengesi sağlıklı bir yaşam sürdürebilmek için çok önemlidir. SOR'ların oluşumunu ve meydana getirdikleri hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere organizmayı koruyan “antioksidan savunma sistemi” dört yolla etki göstermektedir: Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma, yok etme, “süpürücü etki”. Antioksidan enzimler, küçük moleküller bu yolla etki gösterirler.

Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya “inaktif şekle dönüştürücü etki”. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler(9).

Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki zincir kırıcı etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller “zincir kırıcı etki” gösterirler.

Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması şeklinde “onarıcı etki” gösterirler.

Endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olan antioksidanların tanımlanmasında ve etkinliklerinin ortaya konmasında İ/R hasarı modelleri önemli katkı sağlamıştır.

Antioksidan özelliği öne sürölmüş pek çok madde çeşitli İ/R modellerinde test edilerek değerlendirilmiştir.(10)

Tablo 2. Antioksidanlar

ENZİMLER	YAĞDA ÇÖZÜNEN RADİKAL TUTUCULAR
Süperoksid dismutaz	E vitamini
Katalaz	β-karoten
Glutasyon peroksidaz	Bilirübin
Glutasyon redüktaz	Ubiquinol
Glutasyon transferaz	Flavonoidler
Glikoz 6 fosfat dehidrogenaz	Melatonin
Sitokrom oksidaz	
SUDA ÇÖZÜNEN RADİKAL TUTUCULAR	METAL İYONLARI BAĞLAYAN PROTEİNLER
İndirgenmiş glutasyon	Ferritin
C vitamini (Askorbik asid)	Transferrin
Ürik asit	Haptogloblin
Glukoz	Hemopeksin
Sistein	Seruloplazmin
Mukus	Albumin
Taurin	Laktoferrin
Sisteamin	

4. D VİTAMİNİNİN İSKELET SİSTEMİ DIşI ETKİLERİ

Uzun zamandır ismi rikets ile birlikte anılan D vitamininin anti-proliferatif, pro-diferansiyatif, proapoptotik ve immünomodölatör fonksiyonlar gibi kemik dokusu dışı etkilerinin anlaşılması bu hormonun farklı yönleri ile yeniden büyüteç altına alınmasına neden olmuştur. D vitamininin reseptör düzeyindeki etkisi aktif D vitamini sayesinde gerçekleşir ve bu etki diğer steroid hormonlarda olduğu gibi ya doğrudan olarak (saatler veya günler içinde gerçekleşen) nükleer DVR üzerinden gen transkripsiyonunu regüle ederek (genomik etki) ya da daha kısa sürede (dakikalar) gerçekleşen hücre membranı

üzerindeki DVR üzerinden genellikle geçici olan iyonların Ca, klorür (Cl) trans-membran geçişini değiştirerek veya hücre içi sinyal yolak aktivitelerini (cAMP, PKA, PLC, PI-3 kinaz ve MAP kinaz), aktive ederek gerçekleştirmektedir (non-genomik etki). D vitaminine ait yapılan gen ekspresyon çalışmalarının hemen hepsi, aktif D vitamininin doğrudan veya dolaylı olarak total genomun % 0.8-5'ini regüle ettiğini vurgulamaktadır(11) Bu durum aktif D vitamininin hücresel büyümenin düzenlenmesi, DNA onarımı, diferansiasyon, apoptozis, membran transportu, hücresel metabolizma, adhezyon ve oksidatif stres gibi birçok olayda görev almasını açıklamaktadır(12)

D vitamininin hedef dokulardaki klasik olmayan etkilerini üç grupta toplamak mümkündür. Bunlar immün fonksiyonların regülasyonu, hücresel proliferasyon ve diferansiasyonun regülasyonu ve hormon sekresyonunun regülasyonudur.

İmmün fonksiyonların düzenlenmesi D vitamini veya onun aktif metabolitlerinin immün fonksiyonların modülasyonu üzerine olan etkileri yaklaşık 25 yıl öncesine uzanan üç önemli keşifle ayrıntılandırılmaya başlamıştır. Bunlar; (a) İnsan aktif inflamatuvar hücrelerde DVR'nin varlığı; (b) Aktif D vitamininin T hücre proliferasyonunu inhibe etme yeteneği; (c) Aktive olan makrofajların 1-alfa hidroksilaz ekspresyonu yolu ile aktif D vitamini üretimini sağlamasıdır.

Aktif D vitamini; Th17 üzerine inhibitör etki yaparak otoimmün hastalıkların kısmen de olsa önlenmesinde görev aldığı yönünde son zamanlarda yayınlar bulunmaktadır. D vitamini eksikliği durumunda daha güçlü bir Th1 cevabına bağlı olarak immün yanıt bozulur ve lökosit kemotaksisi etkilenir. Sonuç olarak; aktif D vitamininin kazanılmış immüniteyi baskılaması (a) dendritik hücrelerin olgunlaşmasının baskılanması ve böylece CD4 hücrelerine antijen sunumunun azalması, (b) CD4 hücrelerinin Th1 ve Th17 hücrelerine diferansiasyon ve proliferasyonunun inhibisyonu ve Th2 ve Treg hücrelerinin üretiminin artması yolu ile olmaktadır (12)

D vitamininin anti-neoplastik aktivitesi içinde birçok hücre serisinde gerçekleşebilen proliferasyonun inhibisyonu ve diferansiasyonun indüksiyonu, programlanmış hücre ölümünün indüksiyonu'nun yanı sıra anjiyogenezis ve invazivitenin inhibisyonu yer almaktadır. D vitamininin apoptozisi indüklediği meme, prostat ve kolon kanserleri gibi birçok tümör modelinde gösterilmiştir. Bununla birlikte altta yatan mekanizma tam olarak aydınlanmış değildir. D vitamininin apoptotik hücre

ölümü üzerine muhtemel etkisi ya doğrudan antiapoptotik hücre proteini olan Bcl 2'nin inhibisyonu yolu ile ya da "pro-apoptotik proteinleri " harekete geçirerek veya EGF, PG, IGF, TNF-alfa ve beta-katenin gibi diğer sinyal yolları ile etkileşime girerek onları bir şekilde etkisiz kılması ile gerçekleşmektedir. (13, 14) D vitamininin üreme organları üzerine olan etkisi yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. DVR null dişi farelerde uterin hipoplazi, ovarian follikulogenezde bozulma geliştiği, fertilitenin %75 oranında azaldığı gösterilmiştir. Fertilitedeki azalma hipokalsemi düzeltildikten sonra da devam etmektedir. Bu durum D vitamininin fertilité üzerine olan etkisinin dolaylı olmaktan çok doğrudan olduğunu düşündürmektedir. Yine, hayvan çalışmalarında D vitamini eksikliğinin erkek sıçanlarda azospermi, hipomobilité, testiküler morfolojide bozulma yaparak fertilitéde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Bu farelerde LH ve FSH düzeylerinin artması olayın gonadal olduğunu düşündürmektedir.(15)

5. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu randomize kontrollü deneysel çalışma Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 26/07/2016 tarihli, 2016 Tıp 029 no'lu protokol numaralı projesi kapsamında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı tarafından planlandı ve uygulandı. Çalışmanın deney aşaması Aralık 2016-Ocak 2017 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nde gerçekleştirildi. Çalışmamızda Kobay Deney Hayvan Laboratuvarından elde edilen 24 aylık gebe olmayan 200-250 gr ağırlığında Sprague Dawley cinsi dişi sıçanlar kullanıldı. Denekler 22±1 oC ısıda, 12 saat karartılıp 12 saat aydınlatılan ve %50-60 oranında nemlendirilen bir ortamda tutuldular. Deney gününe kadar sıçanların beslenmesinde standart pellet yem ile içme suyu kullanıldı.

Giderler için Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında destek sağlandı. Deney sonunda çıkartılan dokuların histopatolojisi , dokuda AMH düzeyi Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, dokudaki apoptoz düzeyi, Caspas-3 ve PCNA (proliferating cell nuclear antigen)değerleri ise Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı tarafından çalışıldı.

5.1 Anestezi İşlemi

Ketamin (Ketalar flakon 50 mg/ml, Eczacıbaşı İlaç ve Ticaret A.Ş. İstanbul) 50 mg/kg intraperitoneal dozunda sıçanlara uygulandı. Gerektiğinde deneklerin anestezisi derinliğini sabit tutmak için ketamin idamesi yarı doz oranında, refleks yanıtlara bakılarak tekrarlandı.

5.2.Yöntem

Çalışmamızda ratlarda oluşturulan deneysel 60 dk pneumoperitonium modeli sonrası overlerde oluşan iskemi reperfüzyon (İR) hasarın biyokimyasal, histopatolojik, mikrovasküler boyutu değerlendirilen kontrol grubu ve bu hasarların önlenmesinde preoperatif vit D kullanılan çalışma grubu ile karşılaştırıldı. Pneumoperitonium öncesi sıçanlar standart cerrahi masaya immobilize edilmiş, abdominal cilt temizliğini takiben %10 povidone iodin uygulamasıyla antisepsis yapılmıştır. 18 G Abbocath kateter ksifoidal bölgeden abdominal kaviteye yerleştirilerek insufflator tüpe bağlanmış, CO2 insufflator cihazından 12 mm Hg hızıyla CO2 insuflasyonu sağlanmıştır. Pneumoperitonium sağlandıktan 60 dk sonra desuffle gerçekleştirilmiş ve 30dk boyunca İAB (intra abdominal basınç) normalize edilmiştir.

Her biri 7 rattan oluşan 3 çalışma grubu oluşturulmuştur. Bu gruplar;

1. Sham veres grup-pneumoperitonium oluşturulmadan veres iğne insersiyonu gerçekleştirilen grup
2. 60dk pneumoperitonium ve 30 dk reperfüzyon sonrası sakrifiye edilen kontrol grup (İR)
3. 30 dk işlem öncesi oral 500IU/kg 1,25 vitD suplementasyonu uygulanmış 60dk pneumoperitonium ve 30dk reperfüzyon sonrası sakrifiye edilen (vitD) grup

Reperfüzyon periyodu takiben (sham grupta 90 dk veres insersiyonu sonrası) midline abdominal insizyon uygulanarak overler vizualize edildi, sağ overde histopatolojik, sol overde biyokimyasal olarak oksidatif stres markırları üzerinden İR hasar değerlendirilmiştir.

Anti-Müllerian hormon (AMH), aynı zamanda Müllerian inhibiting substance (MIS)olarak da bilinir, aktivinler ve inhibitörler gibi transforming growth faktör-β

ailesine ait olan homodimerik glikoprotein bir hormondur. Genetik lokusu 19p13.3 kromozomu üzerinde, AMH reseptörü kromozom 12 üzerindedir. Josh tarafından 1947’de testisten eksprese edildiği, erkek fetüste fetal cinsiyet farklılaşmasında müller kanalının regresyonundan sorumlu olduğu gösterildi. Kadınlarda ayrıcalıklı olarak AMH overde granüloza hücrelerinde eksprese edilir ve primer follikül formasyonunda rol oynar.

AMH sentezi primer follikülde başlar, gittikçe artar ve maximum 4 mm olan pre-antral ve antral follikülde pik yapar.

Bu eşikten sonra sentez azalır, follikül 8 mm çapa ulaştığında da ölçülemez olacak kadar azalır, atreziye uğrayan follikülde ve korpus luteumda AMH ekspresyonu izlenmez. AMH follikülogenezin 2 kritik düzenleyici aşamasında sentezlenir: başlangıç aşamasında ve folliküler dominans seçiminde İlk aşama başlangıç seçimi olup; folliküler primordial follikül havuzdan seçilir. İkinci seçim siklik seçim olup; büyümek için seçilen folliküller perovulatuvar döneme kadar gelişir. İkinci seçim dönemi her reproduktif siklusta FSH düzeylerinin artışının sonucudur. Sadece büyük preantral ve küçük antral folliküller FSH tarafından atreziden kurtulacak kadar duyarlıdır. Çalışmamızda oluşturulan deneysel pneumoperitonium iskemi reperfüzyon modelinde plazmada AMH düzeyindeki değişiklikleri de araştırdık.

6. HİSTOLOJİ VE İMMUNOHİSTOLOJİ DEĞERLENDİRME

Over doku örnekleri %10 Formaldehid solusyonunda hızlı fiksasyon sonrası dehidrate edilerek parafine ilave edilmiş, 4µm kalınlığında doku kesitleri hazırlanarak genel morfoloji bakı için haemotoksilin eozinle boyanmıştır. 4µm kalınlığında doku kesitleri hazırlanarak genel morfoloji bakı için haemotoksilin eozinle boyanmıştır. Kesitler Olympus Bx51 mikroskopuna sabitlenmiş Olympus C-5050 dijital kamerayla görüntüye alındı.(Olympus Corp., Tokyo, Japan).

Folliküler dejenerasyon grade follikül sayımı ve intestisial ödem boyutuna göre 0-3 skarlama sistemi yapılarak değerlendirilmiştir.

Skarlama sistemi: 0-patolojik bulgu saptanmadı, 1-2-3 patolojik bulgu boyutu <%33; % 33-66 ve >%66 olduğunda skorlandı.

Apoptosis Caspaz 3 değerlerinin immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesi ile analiz edildi.

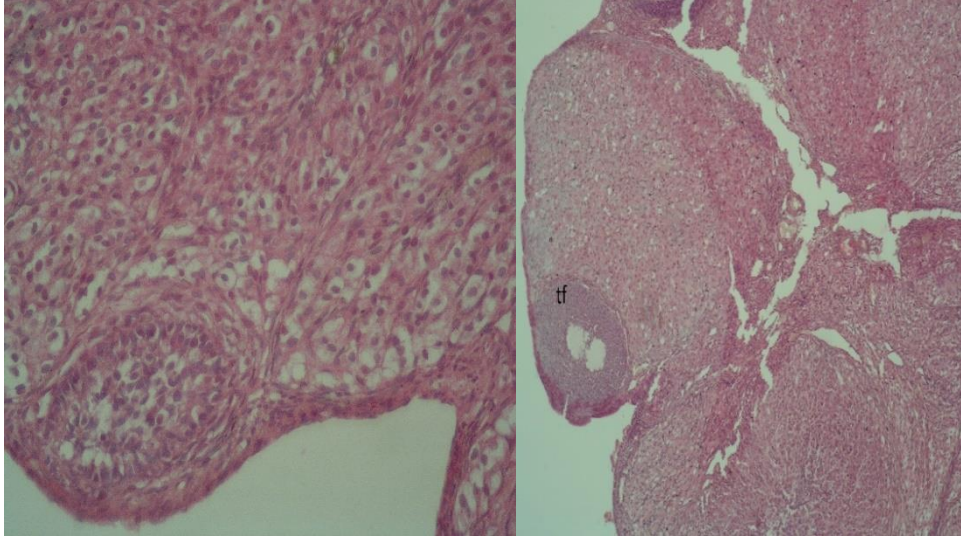
7. BİYOKİMYASAL ANALİZLER İÇİN DOKU HAZIRLIĞI

Sıçanların deney sonunda ötenazi esnasında intrakardiyak yöntemle elde edilen kan örnekleri düz tüplere alındı. Tüpler 3000 rpm hızında 10 dakika santrifüj edilerek serumları eppendorf tüplerine konarak ayrıldı. Örnekler çalışılncaya kadar -70 °C’de saklandı. Over dokuları çıkartıldıktan sonra , hemen -70 °C’de saklandı. İR hasarın boyutunun biyokimyasal olarak değerlendirilmesi overlerin 150 Mm KCL da homojenize edilmesi ve 5000pm /10 dk santrifüj sonrası malondialdehid (MDA) Glutation (GSH) Superoksiddismutaz (SOD) TAS (total antioksidan status) bakılması ile gerçekleştirmiştir.

8. BULGULAR

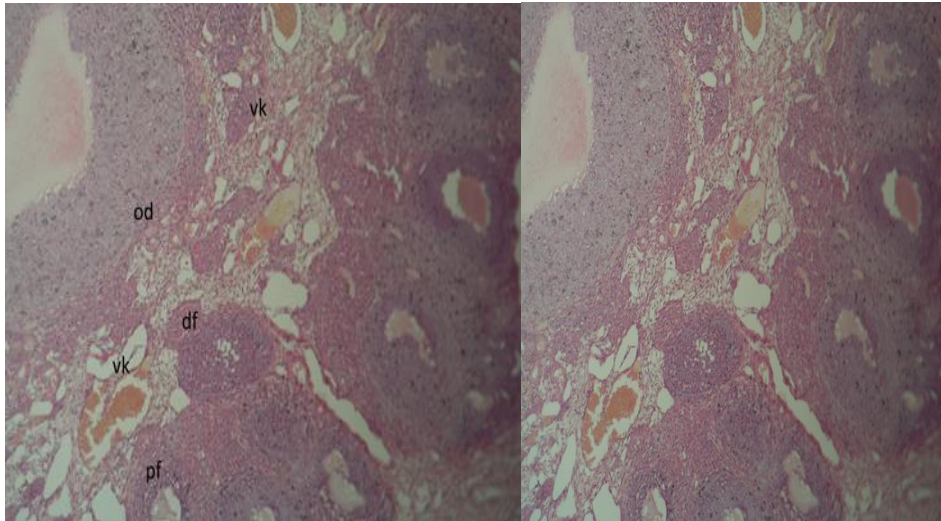
8.1 Işık Mikroskopik Bulgular

Kontrol grubunda ovaryum ince fibröz bağ dokudan oluşan bir kapsül ile çevrelenmişti. Üst kısmında germinal epitel kübik şekilli hücrelerden oluşmaktaydı. Bazal membran düzgün ve düzenli olarak gözlenmekte, kapsülden parankima içine uzanan ince bağ dokusu bantları düzgün olarak izlenmekteydi. Kortekste ovaryum dokusu içerisinde primordiyal folliküller, çeşitli çaplarda primer, sekonder ve tersiyer folliküller yer almaktaydı. Folliküllerde bulunan oosit ve ona ait zona pellusida düzenli ve normal görünümdeydi. Folliküllerin etrafında bulunan granüloza hücreleri poligonal, eozinofilik sitoplazmalı olup çekirdekleri kromatinden zengin ve yuvarlaktı. Stroma içinde folliküller arasında yerleşmiş interstisyel hücreler bulunmaktaydı. Vasküler yapılar normal olarak gözlendi.



Resim 1. Sham kontrol grubuna ait HE boyaması. TF-Tersiyer Follikul

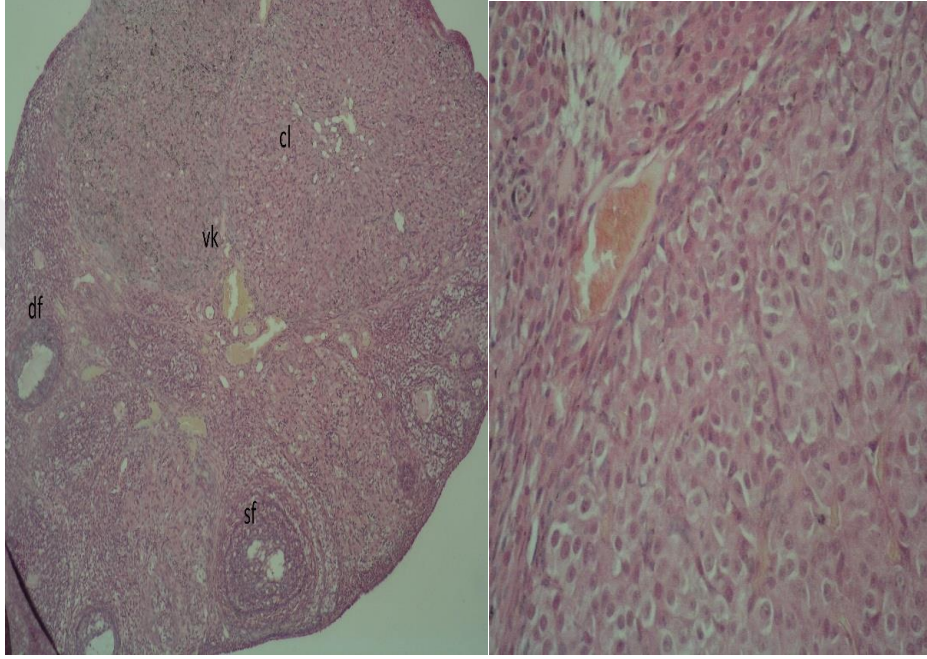
Kontrol gurubu ile kıyasladığımızda, iskemi-reperfüzyon grubunda özellikle kortekste folliküllerin çevresinde yoğun olmak üzere korteks ve medullada yoğun PMNL infiltrasyonu gözlenmiştir. Konjesyon ve hemorajik alanların, hem korteks hem de medullada çok yoğun olduğu, Corpus luteum alanlarında diğer tüm gruplara oranla küçülme olduğu ve folliküllerde dejenerasyon olduğu gözlemlendi.



Resim 2. 1 İskemi-reperfüzyon grubu

8.2. D Vitamini Suplementasyonu Uygulanmış Dvit Grubu

Bu grupta folliküllerde ve interstisyel alanda daha az hasar dikkati çekti. İnterstisyel alanda ödem, diffüz hemaraji ve vasküler dilatasyonda iskemi-reperfüzyon grubuna göre azalma, inflamatuvar seri hücrelerinin bulunduğu ancak iskemi grubuna göre daha az olduğu gözlemlendi



Resim 3. D vit grubu

9. İSTATİSTİK SONUÇLAR

9.1. Biyokimyasal Sonuçlar

Çalışmamızdaki biyokimyasal analizlerin toplu sonuçları Tablo 1’de verilmiştir. Plazma AMH sonuçları değerlendirildiğinde Grup 2’de ölçülen AMH düzeyleri Grup 1’e göre anlamlı düşüktü ($p=0.035$). Grup 3’te ölçülen AMH düzeyleri Grup 2’ye göre daha yüksek olmasına karşın anlamlı fark bulunmadı ($p=0.07$). Bu sonuçlara göre çalışmamızda uygulanan IR modelinin plazma AMH düzeylerinde anlamlı bir azalmaya neden olduğunu ve IR uygulamasından önce D vit verilmesinin over kaynaklı AMH salınımına olumlu etkisinin olduğunu desteklemektedir.

Over dokularında ölçülen lipid peroksidasyonu belirteci MDA düzeyleri değerlendirildiğinde Grup 2 MDA düzeyinin Grup 1'e göre anlamlı yüksek olduğu saptandı (p=0.006)

D vit verilen Grup 3'te ölçülen MDA düzeyleri Grup 2 ile kıyaslandığında ise anlamlı düzeyde azaldığı görüldü 88 (p=0.033).

Bu sonuçlar IR modelinin overlerde anlamlı düzeyde oksidatif strese ve doku hasarına yol açtığını; IR modeli öncesi D vit verilmesinin gelişebilecek hasarı azaltabileceğini göstermektedir.

Over dokularında ölçülen total antioksidan kapasite (TAK) sonuçları değerlendirildiğinde ; Grup 2'nin TAK düzeyinin Grup 1'e göre anlamlı düşük olduğu (p=0.012) gözlemlendi. D vit verilen Grup 3'te elde edilen TAK düzeyleri Grup 2 ile kıyaslandığında ise anlamlı düzeyde yüksek olduğu görüldü (p=0.0001). Bu sonuçlar IR modelinin overlerde antioksidan kapasiteyi anlamlı ölçüde azalttığını, IR öncesinde D vit verilmesinin antioksidan kapasite üzerine olumlu etkilerinin olabileceğini göstermektedir.

Over dokularında ölçülen SOD enzim aktiviteleri değerlendirildiğinde Grup 2'de ölçülen enzim aktivitesinin Grup1'e göre anlamlı düşük olduğu (p=0.004). IR öncesi D vit verilen Grup 3 de ise bu düşmenin anlamlı düzeyde azaldığı görüldü (p=0.033). Bu sonuçlar IR modelinin over dokusunda önemli bir antioksidan enzim olan SOD aktivitesini anlamlı düzeyde azalttığını, D vit verilmesinin ise SOD aktivitesini kısa ve uzun dönemde koruduğunu desteklemektedir

Tablo 3. Plazma ve over dokusunda ölçülen biyokimyasal belirteçler

	Plazma AMH (ng/mL)	Over MDA (nM)	Over TAC (μM)	Over SOD (U/mL)
Grup 1 (Sham)	2.09 ± 0.14	152.6 ±11.03	210.37±15.25	1.77 ± 0.03
Grup 2 (IR)	1.45 ± 0.21 (p=0.035)	332.54±44.51 (p=0.006)	147.50 ±9.48 (p=0.012)	1.260.11 (p=0.004)
Grup 3 (D vit+ IR + 48 saat)	1.67 ± 0.08 (p=0.07)	181.78±29.29 (p=0.033).	231.17 ± 7 (p=0.0001)	1.640.07 (p=0.033).

9.2. Histopatoloji Sonuçlar

Histopatoloji olarak dokulardaki folliküler dejenerasyon, vasküler konjesyon, inflamasyon, hemoraji ve ödem değerlendirildi. Folliküler dejenerasyon grade follikül sayımı ve interstisyel ödem boyutuna göre 0-3 skarlama sistemi yapılarak değerdendirdi. Skarlama sistemi:

0-patolojik bulgu saptanmadı , 1-2-3 patolojik bulgu boyutu <%33; % 33-66 ve >%66 olduğunda skarlandı. Histopatoloji bulgular gruplar arası farklılıklar göstermiştir.

9.2.1. Follikular Dejenerasyon

Tablo 4:.Follikular değenerasyon düzeylerinin grublaraarası dağılımı

Sample1/sample2	Test statistic	Std.Error	Std test statistic	Sig.	Adj.sig
Sham-D vit	-8.583	5730	-1.498	,134	1,000
Sham-iskemi	23.250	5.730	-4,058	0,000	,001
Dvit-İskemi	14.667	5.7300	2.560	0,010	1.57

Bulgular ortalama±SD olarak belirtildi. *p< 0.05 Folliküler dejenerasyon değerdlerini incelediğimizde Sham ve İR grupları arasında anlamlı fark olduğru (p<0.05) izlenmiştir.

9.2.2 Vasküler Konjesyon

Tablo 5. Vasküler konjesyon değerinin gruplar arası dağılımı. Sham ve iskemi reperfüzyon grubu arasındaki anlamlı fark saptanmıştır.

Sample1 / sample2	Test statistic	Std.Error	Std test statistic	Sig.	Adj.sig
Sham-D vit	14.833	5.765	-2.573	0.10	1.51
Sham-iskemi	-20.583	5.765	-3570	0.000	0.005
Dvit-İskemi	5.750	5.765	,997	,319	1,000

9.2.3 İnflamasyon

Tablo 6. İnflamasyon değerinin gruplar arası dağılımı

Sample1/sample2	Test statistic	Std.Error	Std test statistic	Sig.	Adj.sig
Sham-D vit	-7.250	5.829	-1.244	214	1.000
Sham-iskemi	-23.500	5.829	-4.032	,000	0.001
Dvit-İskemi	-1.667	5.829	-2.86	,775	1.000

Bulgular ortalama±SD olarak belirtildi. *p< 0.05

Sham ve iskemi reperfüzyon grubu arasındaki anlamlı fark saptanmıştır.

9.2.4 Ödem

Tablo 7. Ödem değerinin gruplar arası dağılımı

Sample1/sample2	Test statistic	Std.Error	Std test statistic	Sig.	Adj.sig
Sham-D vit	-10.833	5.686	-1.905	,057	,851
Sham-iskemi	-19.000	5.686	-3.342	.001	.012
Dvit-İskemi	8.167	5.686	1.436	,151	.000

Bulgular ortalama $\pm$ SD olarak belirtildi. * $p < 0.05$

Sham ve iskemi reperfüzyon grubu arasındaki anlamlı fark saptanmıştır.

Sonuçları toplu halde değerlendirecek olursak, sham grupta ovarian stroma, kortekste her üç tip follikülün (primer,sekonder,tersiyer) medullada kapiller damarların görüntülenmesiyle normal ovarian morfolojinin korunduğu izlenmiştir. İskemi Reperfüzyon grubundaki over kesitlerinde sham grubu ile kıyaslandığında yüksek boyutta folliküler dejenerasyon ve ödem izlenmiştir. ($p < 0.0001$) Vit D suplementasyonu ovarian dejeneratif değişiklikleri, histoloji hasar boyutunu azalttığı izlenmiştir.

Tablo 8. Tüm parametrelerin karşılıklı değerlendirilmesi

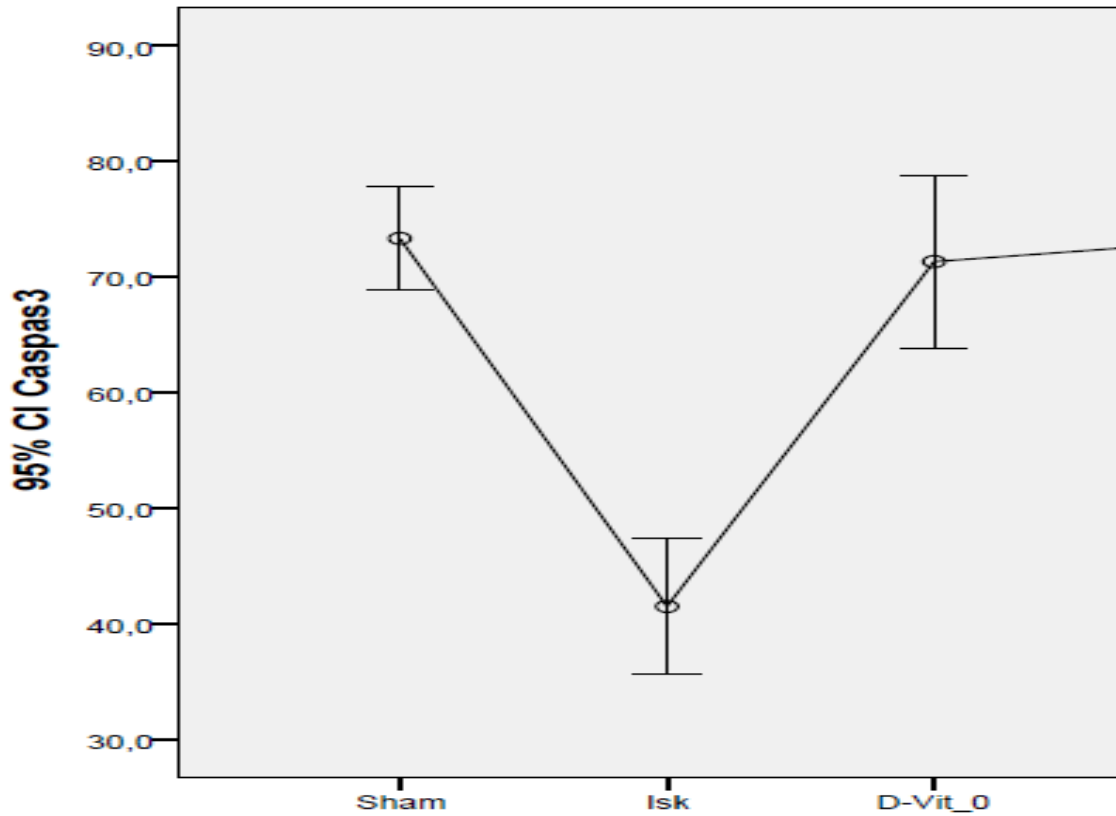
	Grup 1 Sham	Grup 2 İ-R.	Grup 3 vit D
Foll. dejenerasyon	0.33 $\pm$ 0.21 P=0,134	2.5 $\pm$ 0.34 P=0,000	1.17 $\pm$ 0.16 P=0,010
Vasküler konjesyon	0.33 $\pm$ 0.21 P=0,10	2.33 $\pm$ 0.33 P=0,000	1.83 $\pm$ 0.30 P=0,319
İnflamasyon	0.33 $\pm$ 0.21 P=214	2.67 $\pm$ 0.21 P=0,000	1.17 $\pm$ 0.16 P= ,775
Ödem	0,33 $\pm$ 0.21 P=0,57	2.17 $\pm$ 0.30 P=0,01	1.5 $\pm$ 0.22 P= ,151

10. APAPTOZİS MARKIRLARI

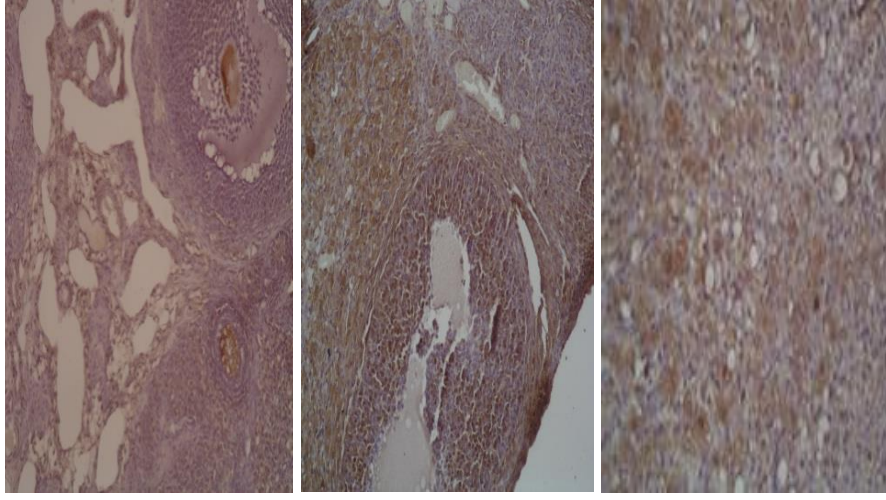
10.1. Caspaz 3

Oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasar modelinde apoptoz markırı olan caspaz 3 ve DNA tamir mekanizmalarının nükleotid eksizyon tamiri (NER) kısmından sorumlu olan PCNA düzeylerini ve bu hasarın önlenmesinde Vit D etkinliğini araştırdık.

Tablo 9. Caspaz- 3 değerin gruplar arası dağılımı



Caspaz 3 immunreaktivitesinin, her mikroskopik sahada boyanan hücre sayının azlığını iskemi modelinde hasarlı hücre sayındaki fazlalık ve caspaz 3 değerlerinin zamana göre değişik aktivite göstermesi ile izah edilebilir. vit D suplementasyonu yapılan grupta caspaz 3 değerlerindeki farklılık göstermesi vit D nin takviyesi yapılan grupta iskemi reperfüzyon grubuna göre daha az hücre hasarı oluştuğunun göstergesidir.



1

2

3

Resim 4. Caspaz 3 ile boyanan hücrelerin gruplar arası gösterdikleri farklılıklar:

1.iskemi grubu 2.vit D grubu 3.sham grubu



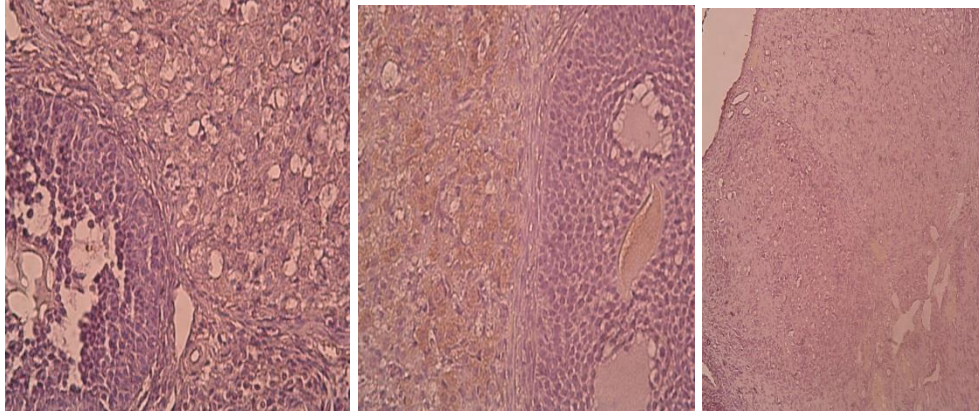
10.2 PCNA

Oksidatif stres DNA hasarına neden olan endojen faktörlere aittir. DNA üzerindeki hatalı bölgeler üç genel mekanizma ile düzeltilir.

1. Hatalı eşleşmenin tamiri
2. Baz çıkarımı-nükleotid eksizyon tamiri (NER)
3. Nükleotid çıkarımı

Nükleotid eksizyon tamiri mekanizmasının evrelerinden olan boşluk doldurulması ve ligasyon fazında PCNA rol oynar. Dolayısıyla, bu enzim DNA oksidatif hasarının göstergesi olarak da önemlidir

Çalışmamızda ratlarda oluşturulan deneysel oksidatif stres modelinde PCNA değerlerini de araştırdık. Gruplar arası anlamlı farklılıklar saptandı.



1

2

3

Resim 5. PCNA değerinin gruplara göre dağılımı

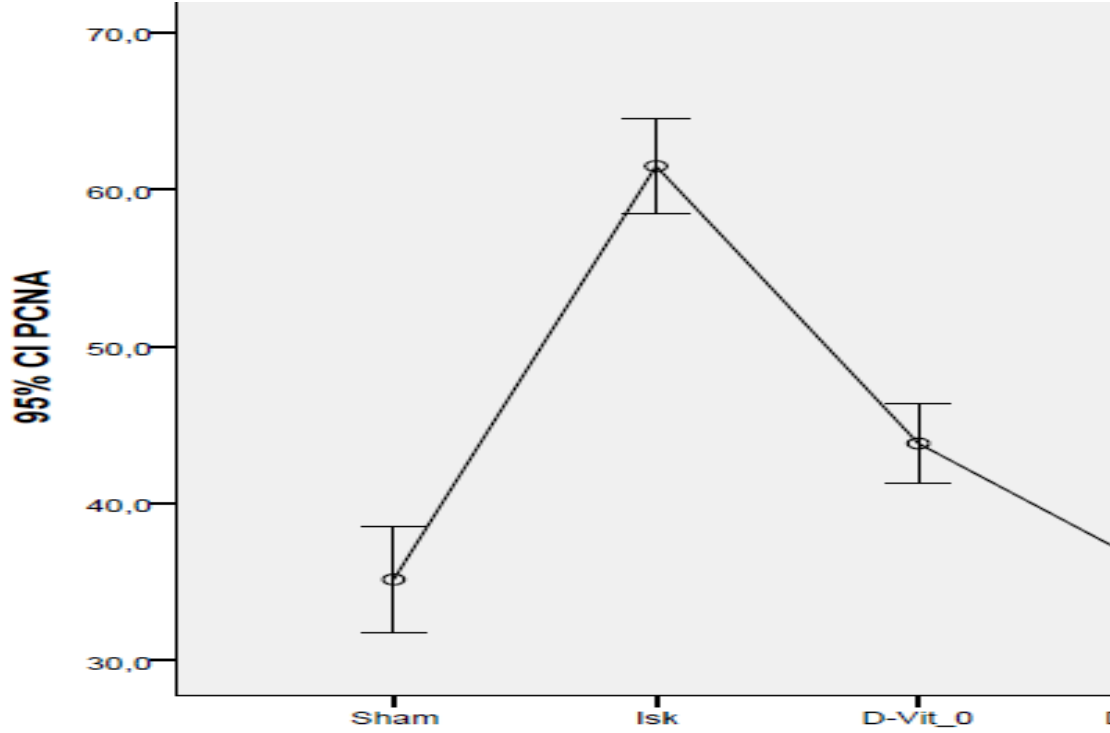
1.Sham grubu 2.İskemi reperfüzyon grubu 3.Dvit grubu

PCNA değerlerini grafik olarak gösterecek olursak,

Dependent Variable	(I) Grup	(J) Grup	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
PCNA	Sham	Isk	-26,3333 [*]	1,4214	,000	-30,657	-22,010
		D-Vit_0	-8,6667 [*]	1,4214	,000	-12,990	-4,343
	Isk	Sham	26,3333	1,4214	,000	22,010	30,657
		D-Vit_0	17,6667 [*]	1,4214	,000	13,343	21,990
	D-Vit_0	Sham	8,6667 [*]	1,4214	,000	4,343	12,990
		Isk	-17,6667 [*]	1,4214	,000	-21,990	-13,343

PCNA değerleri iskemi grubunda sham ve vit D grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p < 0.005$) vit D uygulanan gruptaki oksidatif stres hasar göstergesi olarak değerlendirilen PCNA değerlerin iskemi grubu ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde düşük bulunması vit D nin oksidatif hasarda koruyucu etkisini olabileceğini göstermektedir. Şematik olarak gösterecek olursak:

Tablo 10. PCNA değerinin gruplar üzerine dağılım şeması



11.TARTIŞMA

Laparoskopi açık cerrahiye göre minimal invaziv bir teknik olduğu düşünülmese de rağmen oluşturulan pneumoperitonium (PP) bağlı gelişen intraabdominal basınç (İAB) artışlarının özellikle abdominal organlarda hipoperfüzyona neden olabildiği gerek deneysel gerekse klinik çalışmalarla ortaya konulmuştur. Overdeki iskemi reperfüzyonun uzun dönem etkilerini araştıran ilk çalışma Taşkın ve ark. tarafından yapılmıştır.

Çalışmamızda 12 mm Hg ile oluşturulan pneumoperitonium modelindeki over iskemi-reperfüzyon hasarı tartışılmıştır. Diğer çalışmalardan farklı olarak biz oluşturulan deneysel iskemi modelinde Vit D nin oksidatif stresekteki protektif etkisini biyokimyasal ve histoloji parametreler üzerinden araştırdık.

Laporoskopik cerrahinin avantajı hastanede kalış ve rehabilitasyon süresinin kısalığı, güncel aktivitelere erken başlanması, kozmetik iyi sonuçların olması, postoperatif komplikasyonların ve morbidite azlığıdır. Normal İAP (10-15 mm

Hg)normal fizyoloji portal sistem basıncından (7-10 mm Hg)yüksektir. Bu sebepten intraabdominal basınç artışı abdominal organ ve sistemlerde perfüzyon bozukluğuna neden olmaktadır.

Bu dönemde biyokimyasal oksidatif stres parametreleri, sitokin düzeyi ve histopatoloji hasar düzeyi elektron mikroskopu ile araştırılmıştır. Geçen yıllarda pneumoperitonium esnasında oluşan İR hasarın solid intraabdominal organlar üzerine olan oksidatif hasar çeşitli insan ve hayvan çalışmalarında araştırılmıştır. Bir tek oksidatif stres parametrelerinin bakıldığı diğer çalışmalardan farklı olarak, çalışmamızda iskemi reperfüzyon dönemde oluşan oksidatif hasarın doku AMH düzeyi üzerine olan etkisi de araştırılmış,Vit D suplementasyonunun etkinliği araştırılmıştır.Vit D uygulanan grupta AMH değerleri arasında anlamlı farklılıklar izlenmiştir.(17)

Dokuya giden kan akımının azalması ve oksijen yetersizliği ile başlayan iskemik doku hasarı, reperfüzyon sağlandığında hasarlanmış dokuların yeniden oksijenizasyonu ile artarak devam eder. İskemi sonucunda artan SOR kan akımı düzeldikten sonra reperfüzyon zedelenmesine yol açar. Reperfüzyon sırasında iskemik alanda toplanan nötrofil ve trombositlerin aktivasyonu, hücre içi Ca^{+2} birikimi ile mikrovasküler hasarın dokudaki zedelenmenin nedeni olduğu bilinmektedir. Toksik oksijen türevlerinin büyük ölçüde iskemik alanda toplanan polimorf nüveli lökositler tarafından yapıldığı düşünülmektedir. İskemi sonrasında endotel ve hücre zarı fonksiyonlarının bozulmasıyla hem hücre içinde, hem de hücre dışında ödem görülür. Endotel hücrelerinde şişme ile damar dışı boşluğa sızan sıvının neden olduğu bası sonucu kapiller damar lümeni daralır ve sonuçta reperfüzyon olsa da mikrosirkülasyonda ciddi yetersizlikler ortaya çıkar.(18) Reperfüzyon ile iskemide bozulmuş mikrosirkülasyonun tam olarak düzeltilememesine “no-reflow olayı” denir. Dokuda ortaya çıkan ödemin yanı sıra aktive olan nötrofil ve trombositlerin kapiller dolaşımında kalmaları bu tabloya katkıda bulunmaktadır. Bu yanıt, multipl organ disfonksiyon sendromunun özelliği olan lökosit bağımlı mikrovasküler hasara yol açar. Doku ve plazmada MDA,SOD,XO (ksantin oksidaz),NO artışı bu hasarı oluşturmaktadır. Xingwei ve ark. çalışmalarında pneumoperitonium esnasında 3. saatte İL6, TNF, MDA, SOD, iFABP (intestinal fatty acid binding protein) düzeylerinde artışın multisistem doku hasarına neden olduğunu göstermişlerdir.(19)

Güven ve ark. pneumoperitonium esnasında oksijen serbest radikallerinin lipid peroksidasyonu yoluyla oluşturdukları hücresel hasarın ara ürünü olan malondialdehid (MDA) değerlerinin yükseldiğini göstermişler. Çalışmamızdaki oksidatif stres markır değerleri önceki çalışmalarla uyumludur. Ovaryan torsiyon modelinin laporoskopik iskemi modeline göre daha destrüktif olması değerler arası kantitatif farkın nedeni olarak izah edilebilir.

Nesek-Adam ve ark. pneumoperitonium esnasında oluşan İR hasarda TAK total antioksidan kapasitenin azaldığını göstermişler. Biler A. Yücebilgin S.ve ark. yapmış olduğu çalışmada da oksidatif stres markırlarındaki sonuçlara benzer sonuçlar alınmıştır.

Çalışmamızda SOD ve TAK değer dağılımı gruplar arası farklılıklar göstermiş, İR grubunda antioksidan enzimler TAK ve SOD'un azaldığı, vit D uygulanan grupla kıyaslanınca anlamlı düzeyde düşük olduğu izlenmiştir

Glantzounis ve ark. da laparoskopik cerrahinin ,pneumoperitoniumun serbest oksidatif radikallerini, oksidatif stres markırlarını yükselttiğini ,bunun ise total antioksidan kapasiteni azalttığını göstermiştir. Güven ve ark. bu parametreleri kontrol grubu ve normal intraabdominal basınç olan pneumoperitonium grubu ile kıyaslamıştır. Histoloji skorların çalışma grubunda yüksek olduğu gösterilmiştir. Mevcut çalışma ve önceki araştırmalar normal intraabdominal basınç altında bile overler de dahil olmak üzere diğer solid organlarda sitokin yolaklarının aktivasyonu, inflamatuvar yanıtın gerçekleşmesi ile İR hasarın olduğunu göstermiştir. Bizim çalışmamızda vit D suplementasyonu yapılmış grupta histoloji skorlamada farklılıklar izlenmiştir.(20)

Kıray ve ark. pneumoperitonium esnasında over yüzey epitelindeki değişiklikleri elektron mikroskobunda incelemiştir. Diğer çalışmalardan farklı olarak onlar over yüzey epitelindeki reversibl hasarı vit E suplementasyonu yapılan grupta azalttığını göstermişler. Ozmen ve ark. sadece intraabdominal basınç artışının bile iskemiye, serbest radikal oluşumunu, proinflamatuvar sitokin artışını sağladığını , apaptoz ve diğer yolaklarla (TNF, IL-1, IL-6 artışı) hücre hasarını oluşturduğunu göstermiştir.

Uzun zamandır ismi rikets ile birlikte anılan D vitamininin anti-proliferatif, pro-diferansiyatif, proapoptotik ve immünomodülatör fonksiyonlar gibi kemik dokusu dışı etkilerinin anlaşılması bu hormonun farklı yönleri ile yeniden büyüteç altına alınmasına

neden olmuştur. Birçok çalışma, vit D'nin kalpte, mide epiteli üzerinde ve ince barsakta iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olduğunu göstermiştir. Yau ve ark. rat miyokard dokusunda VDR (vitamin D reseptör) ekspresyonunu, bu reseptörün endojen ve ekzojen aktivasyonunun miyokard infarktüsünde infarkt alanını küçülttüğünü miyokard fonksiyonlarını iyileştirdiğini, endoplazmatik retikulumda CCAAT (enhancer-binding protein homologous protein) ve caspas -12 ekspresyon aktivasyonunu, mitokondriyal yanmayı (mitokondriyal cytochrome C ve caspas 9 aktivasyonunu azaltmakla) ve kardiomyosit apoptozisini azalttığını göstermiştir. Bunun dışında VDR aktivasyonunun miyokardiyal iskemik reperfüzyonda autofag disfonksiyonunu azalttığı, metallothionein bağımlı oksidatif stres mekanizmalarını inhibe ettiği gösterilmiştir.

Bunu dışında Goncalves ve ark. çalışmalarında vitamin D eksikliğinin akut böbrek iskemisinden sonra kronik böbrek hastalıklarını progresyonunu göstermiştir. Uberti ve ark. vit D'nin gastrik epitel hücrelerinde iskemik hasarı önlediğini göstermişler. Biz kendi çalışmamızda ratlarda oluşturduğumuz laparoskopik pneumoperitonium modelinde overlerde iskemi-reperfüzyon hasarın boyutunu histolojik ve biyokimyasal markırlarla gösterdik. İskemik –reperfüzyon hasarın önlenmesinde vit D etkinliğini araştırdık.

Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler ışığında vit D uygulanan grupta oksidatif hasar boyutunun daha düşük olduğunu izledik.

12. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

İskemik ve reperfüzyon hasarı trombolitik tedavi, organ nakli, koroner anjiyoplasti kardiyopulmoner bypass gibi çeşitli tıbbi ve cerrahi girişimler sırasında görülen potansiyel olarak ciddi bir sorundur. İskemik ve reperfüzyon hasarında temel patofizyoloji, iskemik dokuların reperfüzyonu sonrası gelişen mikrovasküler disfonksiyondur. Bu durum kendini arteriyollerde endotel bağımlı dilatasyonda bozulma, kapillerlerde sıvı filtrasyonunda ve lökosit tıkanmasında artma ve postkapiller venüllerde lökositlerde sıkışma ve plazma protein ekstrevasasyonu şeklinde göstermektedir. Mikrosirkülasyondaki aktive endotel hücreleri reperfüzyon sonrası ilk dönemde daha fazla oksijen radikali, ancak daha az nitrik oksid üretmektedir. Endotel

hücrelerindeki süperoksid ile nitrik oksid arasındaki dengesizlik inflamatuvar mediyatörlerin (trombosit aktive edici faktör, tümör nekroz faktörü gibi) üretim ve salınımına yol açmakta ve lökosit-endotel hücre adhezyonuna aracılık eden adhezyon moleküllerinin biyosentezini arttırmaktadır. Reperfüzyon sonucunda salınan inflamatuvar mediyatörlerin başlangıçtaki iskemik hasara maruz kalmamış uzak organlardaki endotel hücrelerini de aktive ettiği görünmektedir. İskemi ve reperfüzyona karşı verilen bu uzak yanıt, multipl organ disfonksiyon sendromunun özelliği olan lökosit bağımlı mikrovasküler hasara yol açabilir.

Bu çalışmada ratlarda oluşturulan laparoskopik pneumoperitonium modelinde overlerde oluşturulan iskemik-reperfüzyon model üzerinde İR hasar biyokimyasal, histopatolojik parametrelerle ve over folliküler rezerv parametresi olan AMH değerleri ile gösterildi ve vit D'nin etkinliği araştırıldı. Vit D nin overde iskemi/reperfüzyonun neden olduğu hasarın biyokimyasal ve histopatolojik parametreleri kısa dönemde bile düzelttiği gösterilmiştir. Bununla birlikte altta yatan mekanizma tam olarak aydınlanmamış olmakla beraber D vitamininin overlerde bulunan VDR aktivasyonu ile iskemi-reperfüzyon hasara karşı protektif etkisini apoptotik hücre ölümü üzerine muhtemel etkisi ya doğrudan antiapoptotik hücre proteini olan Bcl 2'nin inhibisyonu yolu ile ya da "pro-apoptotik proteinleri " harekete geçirerek veya EGF, PG, IGF, TNF-alfa ve beta-katenin gibi diğer sinyal yolları ile etkileşime girerek onları bir şekilde etkisiz kılması ile gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Klinikte görülen over İR hasarının önlenmesi fertilizasyonun korunmasının sağlanması açısından önemlidir. Vit D'nin bu etkisi sadece laparoskopik pneumoperitonium modelinde değil, overin direkt ya da indirekt olarak oksidatif strese maruz kaldığı durumlarda da –radyoterapi veya kemoterapi öncesi- kullanılabilir.

Vit D'nin insan overindeki etkilerini göstermek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

13.KAYNAKLAR

1. Akdemir A, Erbas, O, Ergenoglu M, Ozgur Yeniel A, Oltulu F, Yavas et al. Montelukast prevents ischemia/reperfusion-induced ovarian damage in rats. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014;173:71–6.
2. Ergenoglu M, Erbas O, Akdemir A, Yeniel AO, Yildirim N, Oltulu F, et al. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced ovarian damage in rats: does edaravone offer protection. *Eur Surg Res* 2013;51:21–2.
3. Guven S, Muci E, Unsal MA, Yulug E, Alver A, Kadioglu Duman M, et al. The effects of carbon dioxide pneumoperitoneum on ovarian blood flow, oxidative stress markers, and morphology during laparoscopy: a rabbit model. *Fertil Steril* 2010;93:1327–32.
4. Magrina JF: Complications of laparoscopic surgery. *Clin Obstet Gynecol* 2002; 45: 469–480.
5. Windberger UB, Auer R, Keplinger F, Längle F, Heinze G, Schindl M, Losert UM: The role of intra-abdominal pressure on splanchnic and pulmonary hemodynamic and metabolic changes during carbon dioxide pneumoperitoneum. *Gastrointest Endosc* 1999; 49: 84–91..
6. Windberger UB, Auer R, Keplinger F, Längle F, Heinze G, Schindl M, Losert UM: The role of intra-abdominal pressure on splanchnic and pulmonary hemodynamic and metabolic changes during carbon dioxide pneumoperitoneum. *Gastrointest Endosc* 1999; 49: 84–91.
7. Yilmaz S, Koken T, Tokyol C, Kahraman A, Akbulut G, Serteser M, Polat C, Gokce C, Gokce O: Can preconditioning reduce laparoscopy-induced tissue injury? *Surg Endosc* 2003; 17: 819–824.
8. Eleftheriadis E, Kotzampassi K, Papanotas K, Heliadis N, Sarris K: Gut ischemia, oxidative stress, and bacterial translocation in elevated abdominal pressure in rats. *World J Surg* 1996; 20: 11–16.
9. Avital S, Itah R, Szomstein S, Rosenthal R, Inbar R, Sckornik Y, Weinbroum A: Correlation of CO₂ pneumoperitoneal pressures between rodents and humans. *Surg Endosc* 2009; 23: 50–54.

10. Berguer R, Cornelius T, Dalton M: The optimum pneumoperitoneum pressure for laparoscopic surgery in the rat model. A detailed cardiorespiratory study. *Surg Endosc* 1997; 11: 915–918.
11. Yao T¹, Ying X, Zhao Y, Yuan A, He Q, Tong H, Ding S, Liu J, Peng X, Gao E, Pu J, He B. To determine the roles of vitamin D receptor (VDR) in ischemia/reperfusion-induced myocardial injury and to investigate the underlying mechanisms involved.
12. Vitamin D deficiency aggravates chronic kidney disease progression after ischemic acute kidney injury. Gonçalves JG1, de Bragança AC1, Canale D1, Shimizu MH1, Sanches TR1, Moysés RM1, Andrade L1, Seguro AC1,
13. Vitamin D deficiency aggravates chronic kidney disease progression after ischemic acute kidney injury. Gonçalves JG1, de Bragança AC1, Canale D1, Shimizu MH1, Sanches TR1, Moysés RM1, Andrade L1, Seguro AC1, Volpini RA1
14. The role of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in mouse liver ischemia reperfusion injury: regulation of autophagy through activation of MEK/ERK signaling and PTEN/PI3K/Akt/mTORC1 signaling. Yang J¹, Chen Q², Tian S², Song S¹, Liu F¹, Wang Q³, Fu Z
15. Effect of novel vitamin D receptor activator paricalcitol on renal ischaemia/reperfusion injury in rats. Azak A1, Huddam B, Haberal N, Koçak G, Ortabozkoyun L, Şenes M, Akdoğan MF, Denizli N, Duranay M.
16. Melatonin with 1,25-dihydroxyvitamin D3 protects against apoptotic ischemia-reperfusion injury in the rat kidney. Sinanoglu O1, Sezgin G, Ozturk G, Tuncdemir M, Guney S, Aksungar FB, Yener N.
17. The emerging role of vitamin D3 in protecting ischemic tissues. Poynter JA1.
18. The combination of vitamin D3 and dehydroascorbic acid administration attenuates brain damage in focal ischemia. Ekici F1, Ozyurt B, Erdogan H.
19. Preconditioning with 1,25-dihydroxyvitamin D3 protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in the rat kidney. Kim YO1, Li C, Sun BK, Kim JS, Lim SW, Choi BS, Kim YS, Kim J, Bang BK, Yang CW.

20. Avital S, Itah R, Szomstein S, Rosenthal R, Inbar R, Sckornik Y, Weinbroum A: Correlation of CO₂ pneumoperitoneal pressures between rodents and humans. Surg Endosc 2009; 23: 50–54.

