



**OVER İSKEMİ VE REPERFÜZYON HASARI
OLUŞTURULAN SIÇANLARDA, TİMOKİNON'UN DOKU
OKSİDATİF DNA HASARI ÜZERİNDEKİ KORUYUCU
ETKİLERİNİN BİYOKİMYASAL, HİSTOLOJİK VE
SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ**

Halil İbrahim ÖZKAN

**Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı
Tez Danışmanı**

Prof. Dr. Nuri BAKAN

Doktora Tezi-2023



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

**OVER İSKEMİ VE REPERFÜZYON HASARI
OLUŞTURULAN SIÇANLARDA, TİMOKİNON’UN DOKU
OKSİDATİF DNA HASARI ÜZERİNDEKİ KORUYUCU
ETKİLERİNİN BİYOKİMYASAL, HİSTOLOJİK VE
SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ**

Halil İbrahim ÖZKAN

**Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nuri BAKAN**

**ERZURUM
2023**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Overler	4
2.1.1. Overlerin Anatomisi	4
2.1.2. Over Histolojisi.....	5
2.1.3. Embriyoloji	8
2.1.4. Overler Fizyolojisi	10
2.1.5. Rat Overi.....	11
2.1.6. Overlerde Görülebilen Hastalıklar	13
2.2. İskemi ve Reperfüzyon	14
2.2.1. İskemi.....	14
2.2.2. Reperfüzyon.....	15
2.2.3. İskemi Reperfüzyon Hasarı	16
2.2.3.1. Ksantin Oksidaz İndüksiyonunun İskemi-Reperfüzyon Hasarındaki Rolü.....	21
2.2.3.2. Mitokondriyal Elektron Transport Zincirinin İskemi-Reperfüzyon Hasarındaki Rolü.....	21

2.2.3.3. Nitrik Oksit Sentaz Yolağının İskemi-Reperfüzyon Hasarındaki Rolü.....	22
2.2.3.4. Endotel ve Fagositik Hücrelerin İskemi-Reperfüzyon Hasarındaki Rolü	22
2.3. İnflamatuar Yanıt	23
2.3.1. Sitokinlerin Rolü.....	23
2.3.2. Antioksidanların Rolü.....	24
2.3.2.1. Malondialdehit (MDA)	26
2.3.2.2. Süperoksid Dismutaz (SOD)	26
2.3.2.3. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG).....	27
2.3.2.4. Glutasyon Peroksidaz (GPx)	28
2.3.2.5. Redükte Glutasyon (GSH)	28
2.3.2.6. Membran Antioksidanları	28
2.4. Timokinon.....	29
2.4.1. Timokinonun Antioksidan Aktivitesi	30
2.4.2. Timokinon DNA yapısı ve sentezi ile ilişkisi	31
2.5. Oksidatif DNA Hasarı	32
2.5.1. Overde İskemi-Reperfüzyon.....	33
3. MATERYAL VE METOT.....	35
3.1. Etik Kurul Onayı.....	35
3.2. Deneklerin Temini ve Özellikleri	35
3.3. Çalışmanın Deney Grupları	35
3.3.1. Cerrahi İşlemler	36
3.3.2. Kimyasallar	37
3.4. Biyokimyasal Analizler	37
3.4.1. Enzim İmmünölçümler	37
3.4.2. Doku Homojenatının Hazırlanışı	38

3.4.3. Dokuda Protein Tayini.....	38
3.5. Histolojik Analizler.....	48
3.5.1. Doku Kesitlerinin Alınması	48
3.5.2. Hematoksilen-Eozin(H&E) Boyama Protokolü	48
3.6. Spektroskopik Analiz.....	49
3.6.1. Fourier Dönüştürümlü Kızıl Ötesi Spektroskopisi (FTR)	49
3.6.1.1. Doku IR spektrumlarının Elde Edilmesi.....	49
3.6.1.2. Spektral Verilerin Kemometrik Analizleri	49
3.7. İstatistiksel Analizler	50
4. BULGULAR.....	51
4.1. Biyokimyasal Bulgular	51
4.3. Spektroskopik Bulgular	62
5. TARTIŞMA.....	67
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	74
KAYNAKLAR	75
EKLER	98
EK-1. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU.....	98
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU	99

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, beni ileriki meslek yaşantıma eksiksiz olarak hazırlamak için büyük uğraş veren, bilgi, deneyim ve enerjisi ile her zaman yanımda olan, danışmanım Sayın Prof. Dr. Nuri BAKAN'a tez çalışmam boyunca sağladığı sonsuz destek için teşekkürlerimi sunuyorum.

Destekleri ve emekleri sayesinde tez çalışmamı ve diğer akademik çalışmalarımı yürütmemde bana emek veren çok kıymetli hocam Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Ahmet KIZILTUNÇ' a teşekkürlerimi sunuyorum.

Doktora eğitimim boyunca bilgilerinden yararlandığım, desteğini ve yardımlarını esirgemeyen, bölümümüz değerli hocalarına ve asistan arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim. Tezimin hazırlanmasında desteklerini esirgemeyen bölüm personellerimize de ayrıca teşekkür ederim. Bu çalışmayı TDK-2022-10742 proje numarası ile destekleyen Atatürk Üniversitesi BAP birimine teşekkürlerimi sunarım. Son olarak hayatım boyunca bana maddi manevi desteklerini esirgemeyen anneme, babama, kardeşlerime, eşime ve çocuklarıma çalışmamın ilk aşamasından itibaren her zaman bana destek oldukları için çok teşekkür ederim.

Halil İbrahim ÖZKAN

ÖZET

Over İskemi ve Reperfüzyon Hasarı Oluşturulan Sıçanlarda, Timokinon'un Doku Oksidatif Dna Hasarı Üzerindeki Koruyucu Etkilerinin Biyokimyasal, Histolojik ve Spektroskopik Yöntemlerle Belirlenmesi

Amaç: Bu çalışmanın amacı ratlarda deneysel olarak oluşturulan over iskemi reperfüzyon hasarında iyi bir antioksidan olduğu bilinen Timokinon'un tedavi edici etkilerinin araştırılmasıdır.

Materyal ve Metot: Çalışmada 9 gruptan oluşan 72 adet dişi rat kullanıldı. Gruplar; Sağlıklı, Sham, Sham+TK40, iskemi (ISC), iskemi reperfüzyon (IR), ISC+TK20, ISC+TK40, IR+TK20 ve IR+TK40 olarak belirlendi. Timokinon'un 20 ve 40mg/kg dozları tedavi grupları olarak kullanıldı. Deney sonunda over dokusunda biyokimyasal, histopatolojik ve spektroskopik analizler yapıldı.

Bulgular: Çalışmamızda sağlıklı gruba kıyasla ISC ve IR gruplarında SOD, GSH, CAT değerlerinin azaldığı, $Tnf\alpha$, IL1B, MDA, CoQ10 ve 8OHdG değerlerinin arttığı tespit edilmiştir. Timokinon doza bağlı olarak SOD, GSH, CAT değerlerini artırdığı, $Tnf\alpha$, IL1B, MDA, CoQ10 ve 8OHdG değerlerini ise azalttığı tespit edilmiştir. Histolojik değerlendirmelere göre ISC ve IR gruplarında yoğun hemoraji alanları, dilate kan damarları, ödematoz alanlar ve enflamasyon tespit edilmiştir. Dokudaki hasara bağlı olarak hücre ölümleri belirlenmiş, nekrotik ve apoptotik hücreler görülmüştür. Timokinon uygulanan gruplarda doza bağlı olarak doku hasarında ve nekrotik hücrelerde azalma tespit edilmiştir. Spektroskopik sonuçlarda bu bulguları desteklemektedir.

Sonuç: Timokinon, antioksidan ve DNA koruyucu etkileri ile insanların over iskemi ve reperfüzyonunun neden olduğu hasarın tedavisinde yardımcı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Antienflamatuvar, Antioksidan, İskemi reperfüzyon hasarı, Over, Timokinon

ABSTRACT

Investigation of the Protective Effects of Thymoquinone on Tissue Oxidative DNA Damage in Rats with Ovarian Ischemia and Reperfusion Damage by Biochemical, Histological and Spectroscopic Methods

Aim: The aim of this study was to investigate the therapeutic effects of Thymoquinone, which is known to be a potent antioxidant, in experimentally induced ovarian ischemia reperfusion injury in rats.

Material and method: Totally 72 female rats in 8 groups have been used in study. Groups were determined as Healthy, Sham, Sham+TK40, ischemia (ISC), ischemia reperfusion (IR), ISC+TK20, ISC+TK40, IR+TK20 and IR+TK40. Thymoquinone doses were 20 and 40mg/kg in the treatment groups. At the end of the experiment, biochemical, histopathological and spectroscopic analyzes were performed on the ovarian tissue.

Results: In our study, it was determined that SOD, GSH, CAT values decreased and Tnf α , IL1B, MDA, CoQ10 and 8OHdG values increased in the ISC and IR groups compared to the healthy group. It was determined that thymoquinone increased SOD, GSH, CAT values and decreased Tnf α , IL1B, MDA, CoQ10 and 8OHdG values depending on the dose. According to histological evaluations, intense hemorrhage areas, dilated blood vessels, edematous areas and inflammation were detected in the ISC and IR groups. Cell deaths were determined due to tissue damage, and necrotic and apoptotic cells were observed. A dose-dependent decrease in tissue damage and necrotic cells was detected in the groups administered thymoquinone. Spectroscopic results supported these findings.

Conclusion: Thymoquinone, with its antioxidant and DNA protective effects, can be useful in people with ovarian ischemia and reperfusion injury.

Key Words: Anti-inflammatory, Antioxidant, Ischemia reperfusion injury, Ovary, Thymoquinone

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADP	: Adenozin difosfat
AMP	: Adenozin monofosfat
ATP	: Adenozin trifosfat
BH ₄	: Tetrahidrobiopterin
C	: Santigrat
Ca	: Kalsiyum
CAT	: Katalaz
CoQ10	: Koenzim Q10
DNA	: Deoksiribo nükleikasit
DTNB	: Ditiyobis Nitrobenzoik Asit
ELISA	: Enzim bağlı immünosorbent ölçüm
eNOS	: Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
ETZ	: Elektron transport zinciri
FITR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
G	: Gram
GnRH	: Gonadotropin serbestleştirici hormon
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: Glutasyon
GSSG	: Okside glutasyon
H	: Hidrojen
HCA	: Hiyerarşik kümeleme
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
H&E	: Hematoksilen Eozin
HRP	: Yaban turpu peroksidaz

IFN	: İ nterferon
IL	: İ nterl�kin
IR	: İ skemi/Reperfüzyon
ISC	: İ skemi
iNOS	: İ nd�klenebilir Nitrik Oksit Sentaz
�/R	: İ skemi/Reperfüzyon
Kg	: Kilogram
K	: Potasyum
KAT	: Katalaz
KCl ₂	: Potasyum Klorür
L	: Litre
LH	: Lüteinize edici hormon
MAPK	: Mitojen-aktif protein kinaz
MDA	: Malondialdehit
MPO	: Miyeloperoksidaz
Mg	: Miligram
ml	: Mililitre
nNOS	: Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
Na	: Sodyum
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NO	: Nitrik oksit
NOX	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidaz
NTB	: Nitroblue Tetrazolyum
¹ O ₂	: Singlet oksijen
O ₂ . ⁻	: Süperoksit radikali

OH.	: Hidroksil radikali
8OHdG	: 8 hidroksi 2 deoksi guanozin
PMNL	: Polimorf nüveli lökosit
ROT-ROS	: Reaktif oksijen türleri
RNT	: Reaktif nitrojen türleri
Rpm	: Dakikada devir sayısı
SF	: Sekonder folikül
SH	: Tiyol
SOD	: Süperoksit dismutaz
TK	: Timokinon
Tnf	: Tümör nekrotizan faktör

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Overlerin anatomik yapısı	5
Şekil 2.2. Her iki cinsiyet yönünde gelişme potansiyeli olan gonadların SRY geni varlığına bağlı olarak farklılaşma yolları	8
Şekil 2.3. Ovaryum Fizyolojisi.....	11
Şekil 2.4. Dişi ratlarda ürogenital sistem anatomisi	12
Şekil 2.5. İskemi reperfüzyon hasarında dokunun kısa ve uzun dönem yanıtı	20
Şekil 2.6. İskemi reperfüzyon hasarında doku hasarı zaman ilişkisi.....	20
Şekil 2.7. Timokinon'un (2-İzopropil-5-metilbenzo-1,4-kinon) moleküler yapısı	29
Şekil 2.8. Timokinon'un kanser karşıtı etkisinin önemli mekanizmaları.	30
Şekil 3.1. İnterlökin 1- β standart eğrisi	40
Şekil 3.2. 8-Hidroksideoksiguanozinin standart eğrisi	42
Şekil 3.3. KoenzimQ10'un standart eğrisi.....	44
Şekil 3.4. TNF-alfa'nın standart eğrisi	46
Şekil 4.1. Rat overlerinde ölçülen SOD aktivitesi.....	52
Şekil 4.2. Rat overlerinde ölçülen CAT aktivitesi.....	53
Şekil 4.3. Rat overlerinde ölçülen GSH seviyesi.....	54
Şekil 4.4. Rat overlerinde ölçülen MDA seviyesi.	55
Şekil 4.5. Rat overlerinde ölçülen 8OHdG seviyesi.	56
Şekil 4.6. Rat overlerinde ölçülen CoQ10 seviyesi.	57
Şekil 4.7. Rat overlerinde ölçülen Tnf α seviyeleri.	58
Şekil 4.8. Rat overlerinde ölçülen IL 1B seviyeleri.	59
Şekil 4.9. Over dokularının histopatolojik incelenmesi.	61

Şekil 4.10. Sham ve ISC grupları için 3800-925 cm ⁻¹ spektral bölgede elde edilen HCA dendrogram grafiği.	64
Şekil 4.11. Sham ve IR grupları için 3800-925 cm ⁻¹ spektral bölgede elde edilen HCA dendrogram grafiği.	64
Şekil 4.12. Sham ve Sham TK40 grupları için 3800-925 cm ⁻¹ spektral bölgede elde edilen HCA dendrogram grafiği.	65
Şekil 4.13. Sham ve ISC, ISC TK20 ve ISC TK40 grupları için 3800-925 cm ⁻¹ spektral bölgede elde edilen HCA dendrogram grafiği.	66
Şekil 4.14. Sham ve IR, IR TK20 ve IR TK40 grupları için 3800-925 cm ⁻¹ spektral bölgede elde edilen HCA dendrogram grafiği.	66

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Overlerde görülebilen hastalıklar.....	13
Tablo 3.1. Spektroskopik analizlerde kullanılan deney grupları.....	49
Tablo 4.1. Histopatolojik bulguların skorlaması.....	62



1. GİRİŞ

Reaktif oksijen türleri (ROS), iskemi kaynaklı nöronal hücre hasarı yanı sıra nörodejeneratif bozuklukların patogeneğinde yer almaktadır. Oksidatif stres, nöronal hücre ölümüne ve apoptotik sürecin aktivasyonuna yol açmaktadır (Collins ve diğerleri, 1998; Morocz ve diğerleri, 2002). Ayrıca, oksidatif DNA hasarı, oksidatif stresin bir göstergesi olarak tanımlanmış ve Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif bozukluklarda artmış olduğu gösterilmiştir (Kadioglu ve diğerleri, 2004; Reardon ve diğerleri, 1997). Birçok antioksidan, oksidatif stresle indüklenen nöronal hücre hasarını, endojen savunma kapasitelerini artırarak azaltabilir (Mousavi ve diğerleri, 2010).

İskemi-Reperfüzyon (İR) hasarı, çoklu faktörlerin etkileşimine bağlı olarak karmaşık bir patofizyoloji oluşturmaktadır. Doku hasarının iskemi sonucu ortaya çıkması, reperfüzyon aşamasında hücre içerisinde çeşitli biyokimyasal yolların devreye girmesiyle reaktif oksijen türlerinin üretilmesine ve dolayısıyla hücre ölümüne sebep olabilir (F ve ark., 2014).

Proinflamatuvar mediyatörlerin üretimi ve nötrofil, makrofaj, lenfosit gibi immün hücrelerin hasar bölgesinde birikimi, İR hasarının kapsamını genişletir ve bu hasarın sistematik etkilerinin oluşmasına neden olur. İskeminin süresi ve şiddeti, etkilediği dokular arasında farklılıklar yaratır (Dokuyucu ve ark., 2014). Oksidatif stresin biyokimyasal mekanizmalarının İR hasarında rolü, doku ve organ koruma stratejilerinin geliştirilmesi bağlamında klinik öneme sahiptir. Bu nedenle, İR hasarının altında yatan dinamiklerin derinlemesine anlaşılması, etkilenen doku ve organlara yönelik etkin tedavi yaklaşımları oluşturmaının temelini atmaktadır (Vaghasiya ve ark., 2010).

İskemi-reperfüzyon hasarı sırasında, ROS oluşumunda önemli bir rol oynayan faktörler arasında endotel hücrelerin ve inflamatuvar hücrelerin (özellikle nötrofiller) etkileşimleri yer alır. İR sürecinde, dokuların hasar görmesine yol açan inflamasyon olayı,

endotel hücrelerinin yanı sıra vasküler yatakta bulunan diğer hücreler (örneğin makrofajlar ve mast hücreleri) tarafından salgılanan pro-inflamatuvar mediyatörlerle desteklenir. Bunlar, polimorf çekirdekli lökositlerin (PMNL) bölgeye göç etmesine ve yapışmasına neden olur (Serracino-Inglott ve ark., 2001).

Çeşitli çalışmalarda, İR hasarı sonucunda karaciğer, kalp, böbrek, akciğer ve beyin gibi organlarda nötrofillerin hem doku düzeyinde hem de sistemik olarak arttığı bildirilmiştir (Serracino-Inglott ve ark., 2001; Schmid-Schoenbein ve Engler, 2003; Hansson ve ark., 2003; Pan ve ark., 2007; Dworakowski ve ark., 2008; Rodriguez ve Granger, 2010). Normal fizyolojik durumlarda, fagositik lökositler (makrofaj, nötrofil gibi) ROS tarafından tetiklenen inflamatuvar mediyatörlere yanıt verirler. Bu yanıt, solunumsal patlama olarak bilinen bir mekanizma ile oksidan mediyatörlerin üretilmesi şeklinde gerçekleşir. Bu süreçte, NADPH oksidaz (NOX) enzimi, ROS üretiminden başlıca sorumlu olup, aktivasyon sırasında oksidan üretimi 50-100 kat artırabilir (Serracino-Inglott ve ark., 2001). NOX aracılığıyla üretilen süperoksitler, SOD ile hidrojen peroksit ve daha sonra miyeloperoksidaz etkisiyle hipokloröz asite ya da Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikale dönüşür. Bu artmış ROS üretimi, reperfüzyon hasarının ana nedenlerinden biridir (Parks ve Granger, 1986). Ayrıca, PMNL'den IL-1, IL-6, IL-12, IFN γ ve Tnf α gibi sitokin ve kemokinler ile elastaz ve kollejenaz gibi proteazlar salınır. Bunlar, daha fazla inflamatuvar hücrenin bölgeye toplanmasına ve dolayısıyla daha fazla ROS üretimine neden olur (Kalogeris ve ark., 2012).

Endotel hücrelerinin İR sırasında ROS üretimini artırmadaki rolü, sadece selektin ve integrin gibi adhezyon molekülleri aracılığıyla lökosit toplanmasını teşvik etmekle sınırlı değildir. Aynı zamanda, endotel hücrelerinin yüzeyinde bulunan ksantin oksidaz enzimi de oksidatif stresin artmasına katkı sağlar. Ancak bu enzim, özellikle hepatosit,

enterosit ve kapiller endotelyal hücrelerde diğer dokulara göre daha belirgin olarak bulunur (Phillips ve ark., 2009).

Çok çeşitli sebze, meyve, baharat ve şifalı bitkiler, hastalık önleyici ve tedavi edici de dahil olmak üzere bir dizi uygulama için tüketilmektedir ve çeşitli biyoaktif bileşikler içerdiği bilinmektedir. Bitkiler, modern terapötiklerde yerini bulan çağdaş ilaçlar olarak birçok fito-bileşenin doğal kaynağıdır (Kaur ve ark., 2018). Timokinon (2-İzopropil-5-metil-1, 4-benzokinon), Orta Doğu ve Güneydoğu Asya ülkelerinde geleneksel olarak yaygın olarak kullanılan çörek otu tohumlarının uçucu yağının biyoaktif bileşenidir (Majdalawieh ve ark., 2017). Timokinon güçlü bir süperoksit radikal temizleyicisidir (Mansour et al., 2002). Timokinonun çeşitli serbest radikalleri etkili bir şekilde süpürme yeteneği, vücut için son derece faydalı bir antioksidan potansiyel sunmaktadır. Bu özellik, hücresel düzeyde yaşanan oksidatif stresi azaltma konusunda önemli bir rol oynayabilir. Oksidatif stres, vücudun normal metabolik aktiviteleri sırasında üretilen serbest radikallerin artması sonucu hücrelerde oluşan zararlı etkileri ifade eder. Bu serbest radikaller, hücresel bileşenlere zarar vererek DNA, proteinler ve lipitler gibi temel yapı taşlarını bozabilirler (Badary ve ark., 2003).

Bu çalışmanın amacı, over iskemi ve reperfüzyon hasarı ile timokinonun etkilerini çok yönlü bir şekilde değerlendirerek, bu alanın daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

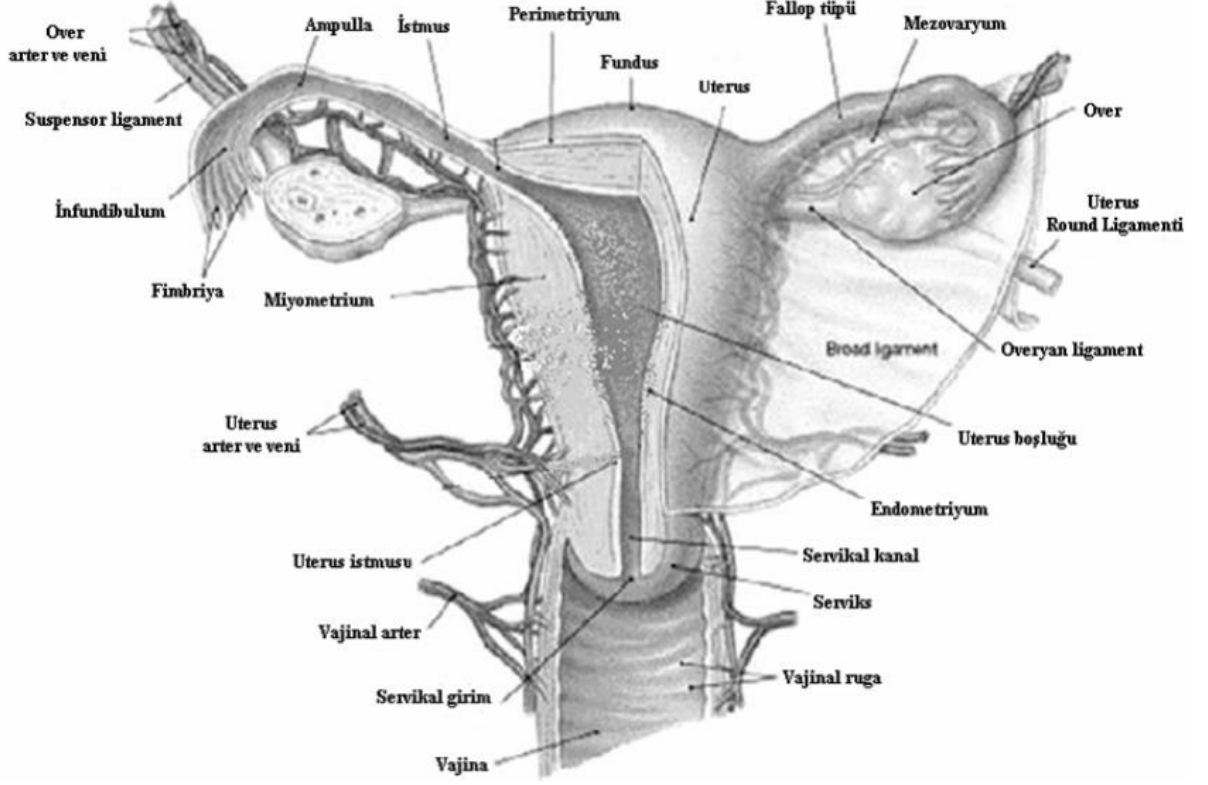
2.1. Overler

2.1.1. Overlerin Anatomisi

İnsan overleri, hilum (rete ovarii), dış korteks ve merkezi medulla olmak üzere üç ana bölgeden oluşur. Hilum, kan damarları, sinirler ve hilus hücrelerini içerir ve overin mezovaryuma bağlandığı noktadır. Over korteksinde, dış bölge olarak tunika albuginea bulunur ve iç bölgede oositleri çevreleyen over foliküllerinin stromal dokuya gömülü olduğu bir alan yer alır (Lew 2019). Overler, reproduktif dönemde genellikle 2.5-5 cm uzunluğunda, 1.5-3 cm genişliğinde, 0.7-1.5 cm kalınlığında ve 4-8 gr ağırlığındaki bir çift gonadal organdır. Boyutları, yaş, menstrual siklus, dışarıdan alınan oral kontraseptifler, ovulasyon indüksiyonu gibi faktörlere bağlı olarak değişebilir ve endojen hormonal durumları etkileyebilir (Standring, 2005).

Over dıştan içe doğru sırasıyla dört katmandan oluşur. Germinal epitel tabakası, kollajen bağ dokusu, korteks içinde preantral folikülleri ve medulla içinde gevşek bağ dokusu, kan damarları ve büyük foliküller bulunur. Foliküller, granüloza hücreleri tarafından çevrelenmiş oositlerin yumurtalığın birincil birimleridir. Bir bazal lamina, granüloza hücrelerini primordial ve primer foliküllerdeki stromal hücrelerden veya sekonder ve antral aşamalı foliküllerdeki teka hücrelerinden ayırır. Folikül gelişimi, oosit ve granüloza hücreleri arasındaki çift yönlü sinyal iletişiminin ve büyüme faktörleriyle etkileşimlerden etkilenebilir. Ayrıca, folikülojenez için gerekliliklerden biri, oosit ve somatik hücreler arasındaki etkileşimlerin varlığıdır. Folikülojenez, primordial aşamadan yumurtlama veya atrezi ile sonuçlanan folikül gelişim sürecidir. Foliküllerin büyümesi iki aşamada gerçekleşir: küçük kemirgenlerde haftalar, büyük memeli türlerinde ise aylar süren ilk yavaş aşama, granüloza hücrelerinin çoğalması ve foliküllerde ve oosit çapında

bir artışla karakterize edilir. İkinci aşamada, folikül uyarıcı hormonu (FSH) ve lüteinize edici hormona (LH) yanıt verir, antrum boşluğunu oluşturur, steroid hormonları sentezler ve preovulatar aşamaya ulaşır (Dadashzadeh ve ark. 2021; DeCherney ve ark. 2012). Şekil 2.1’de overin anatomik yapısı görülmektedir (Schorge ve ark., 2008).



Şekil 2.1. Overlerin anatomik yapısı

2.1.2. Over Histolojisi

Ovaryumlar, badem şeklinde iki organ olup endokrin ve ekzokrin işlevlere sahip olup steroidogenez ve oogenezi ile ilişkilidir. Memelilerin ovaryumları, germinal epitel olarak bilinen tek katlı kübik ya da yassı epitelten oluşur. Bu epitel, viseral peritonun mezotelyumuyla bağlantılıdır. Altında yoğun düzensiz sıkı bağ dokusu bulunur ve bu tabaka tunika albuginea olarak isimlendirilir. Ovaryum medulla ve korteks olmak üzere iki ana bölüme ayrılır. Medulla, ovaryumun merkezindedir ve kan damarları, lenf damarları, sinirler ve gevşek bağ dokusu içerir (Eroschenko 2008). Medullanın devamı olan mezovaryum, ovaryumu asılı tutar ve germinal epitel ve peritonun mezoteli ile

kaplıdır (Kierszenbaum ve ark., 2015). Over korteksi ise ovaryan folikülleri, oositleri, korpus albicans, korpus luteum içermekte ve gevşek aereolar bir stroma ile kaplıdır (Junqueira ve ark., 2009; Novak, 2007). Tunika albuginea'nın daha altında, oositleri barındıran over folikülleri ile dolu korteks bölgesi yer almaktadır. Folliküller, korteksin içinde bulunan bağ dokusu olan stroma içine gömülüdür. Stroma, iğ şeklindeki fibroblastları içerir ve bu fibroblastlar diğer organlara özgü fibroblastlarla kıyaslandığında hormonal uyaranlara farklı tepkiler gösterir. Overin iç kısmı ise, medüller bölge olarak bilinir ve gevşek bağ dokusu ile zengin damar yatakları içerir. Korteks ile medulla bölgeleri arasında net bir sınır bulunmaz (Kierszenbaum, 2006).

Overlerin temel işlevi, steroid hormonların üretimi ve salgılanması (steroidogenez) ile dişi üreme hücresi oositin oluşumu ve atılması (oogenez) olarak iki ana kısımda özetlenebilir. Östrojen ve progesteron, overler tarafından salgılanan iki ana steroid hormondur. Hipotalamus tarafından sentezlenen GnRH, ön hipofiz hormonları olan FSH ve LH'nin salgılanmasını tetikler, karşılık olarak overlerden östrojen ve progesteron salgılanmasını başlatır (Uzumcu ve Zachow, 2007). Bu hormonlar, üreme hücrelerinin olgunlaşmasını, ovülasyonu, gebeliği ve ikincil cinsiyet özelliklerinin gelişmesini kontrol eder (Shier ve ark., 2001). FSH, foliküllerin büyümesini ve foliküler hücrelerden östrojen salgılanmasını teşvik eder. LH ise, sekonder oositte ilk mayotik bölünmenin tamamlanmasını tetikleyerek ovülasyonu başlatır ve ovulasyon sonrası kalan folikülü korpus luteuma dönüştürüp progesteron salınmasını destekler (Russel ve Robker, 2007). Östradiol, granüloza hücreleri tarafından üretilen en etkili östrojen formudur. Overdeki teka hücreleri tarafından üretilen progesteron ise, menstrual döngünün ikinci yarısında uterusu döllenmiş yumurtanın yerleşimine hazırlar ve meme bezlerinin gelişimini destekler (Shier ve ark., 2001). Bu karmaşık yapı ve işlev, memeli üreme sisteminin düzenlenmesinde ve dişi üreme yeteneğinde hayati bir rol oynar.

Fetal gelişimin üçüncü ayında primordiyal foliküller, tunika albugineanın hemen altında yerleşirler. Oositler, yassı folikül hücrelerinin tek tabakasından oluşur. Primordiyal folikül geliştikçe, oosit büyür ve etrafını saran hücreler çoğalır, kübikleşir ve primer foliküle dönüşürler. Oosit büyümesi zona pellusida'nın oluşmasına yol açar, folikül hücreleri ve oosit arasında belirginleşir. Folikül hücreleri daha sonra mitozla çoğalarak çok katlı primer folikülü oluşturur (Ross ve Pawlina, 2006). Bu sırada, folikülün etrafını saran stroma, iç kısmında salgı yapan teka interna ve dış kısmında bağ dokusu olan teka eksterna olacak şekilde iki katman halinde farklılaşır (Bercegeay ve ark., 1995).

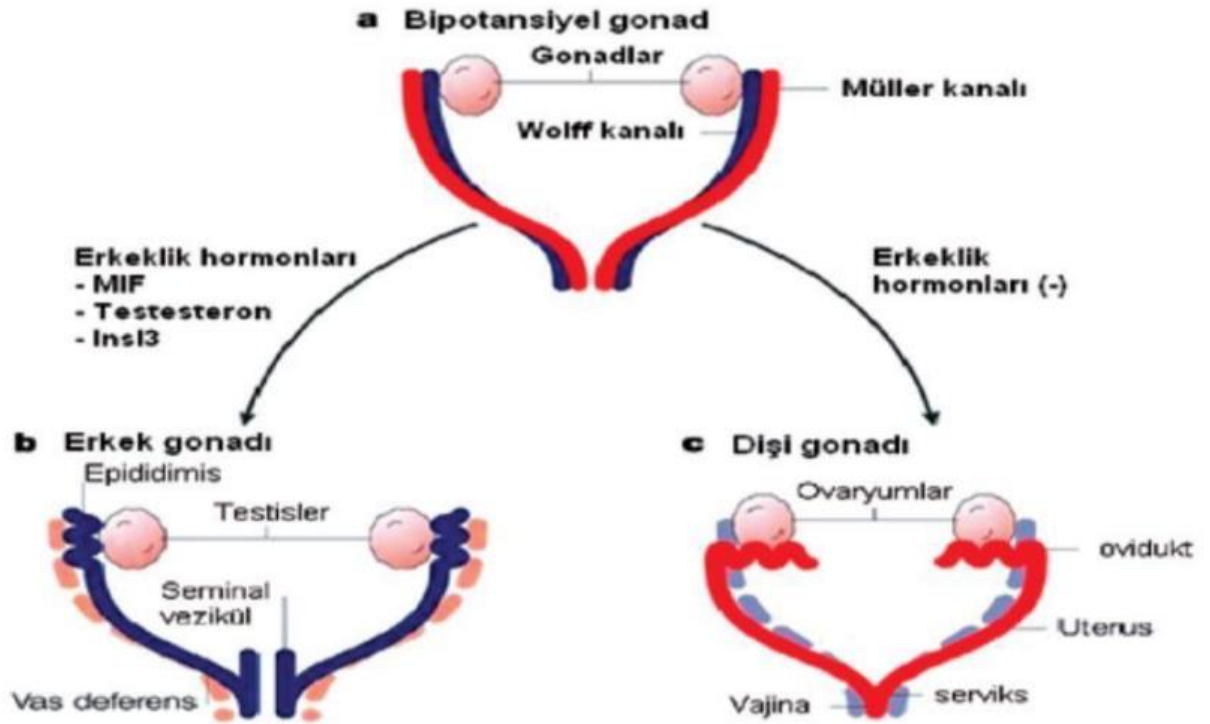
Granüloza hücrelerinin mitotik bölünmeye devam etmesi, sekonder folikülün (SF) multilaminar özellikte oluşumuna neden olur. Bu evrede, folikülün genişlemesi ile granüloza hücre tabakaları 8 ila 12 kat arasında artış gösterir ve böylece folikül neredeyse maksimum boyutuna ulaşır. Bu süreçte, granüloza hücreleri arasında sıvı dolu boşluklar belirmeye başlar. Bu boşluklar zamanla birleşir ve antrum adı verilen tek bir alanı oluşturur. İlgili nitelikler sebebiyle, sekonder folikül aynı zamanda antral veya veziküler folikül olarak da bilinir (Ovalle ve Nahirney, 2008).

Folikül boşluğunun genişlemesiyle, oosit bir sap yardımıyla folikül duvarına bağlanır. Oositi foliküle bağlayan bu yapı, kumulus ooforus olarak adlandırılır. Zona pellusida adı verilen özel bir yapı, oositin etrafındaki granüloza hücrelerle bir araya gelerek, oosite özgül bir kimlik kazandıran korona radiata yapısını meydana getirir. Ovaryum içinde, işlevini yitirmiş ve atreziye olmuş foliküller de bulunabilir (Kierszenbaum ve ark., 2015). Ovülasyon meydana geldiğinde, teka interna hücreleri ve granüloza hücrelerinin tümü, steroid hormon üreten korpus luteum isimli bir bez dokusuna dönüşür. Eğer döllenme olmazsa, korpus luteum küçülür ve geriler. Son

aşamada, folikül fibrotik bir doku olan korpus albicans haline dönüşebilir (Eşrefoğlu, 2004).

2.1.3. Embriyoloji

Cinsiyet farklılaşması bazıları otozomal olan birçok geni içerir. Bu farklılaşmadaki anahtar rol Y kromozomunun kısa kolu üzerinde bulunan SRY genindedir. Bu genin etkisinde sentezlenen protein bir transkripsiyon faktörüdür ve diğer genleri etkileyerek erkek cinsiyet yönünde farklılaşmayı yönetir. Bu genin yokluğunda cinsiyet dişi yönünde gelişir (Şekil 2.2) (Demirtaş ve Pişkin, 2009).



Şekil 2.2. Her iki cinsiyet yönünde gelişme potansiyeli olan gonadların SRY geni varlığına bağlı olarak farklılaşma yolları

Embriyonun cinsiyeti fertilizasyon sırasında genetik olarak belli olsa da, gonadlar 7. haftaya kadar farklılaşma göstermezler. Gonadlar başta bir çift uzunlamasına kabartı (Genital ya da gonadal kabartı) olarak meydana gelir. Germ hücreleri 6.haftadan önce görülmezler. Primordial germ hücreleri 3. hafta civarında epiblastda meydana gelir ve primitif çizgi üzerinden göç ederek allontoisin yakınındaki yolk kesesi duvarındaki

endodermal hücreler arasında yerini alırlar. Dördüncü haftada son barsağın arka mezenteriy boyunca ameboid hareketlerle göç ederek 5. hafta başında primitif gonadlara varırlar ve 6. haftada genital kabarıklıkları istila ederler. Bu kabarıklıklara varılamaması durumunda gonadların oluşması mümkün değildir. Primordial germ hücreleri gonadların testis veya over yönünde farklılaşmasında uyarıcı bir role sahiptir (Sadler 2018). Primordial germ hücrelerinin varması sırasında veya hemen öncesinde genital kabarıklığın epiteli çoğalır ve altındaki mezenşime nüfuz ederek primitif cinsiyet kordları adı verilen düzensiz şekilli kordları oluşturur. Dişi ve erkekte bu kordların ikisi de yüzey epiteline bağlıdır ve aralarında ayrım yapmak imkânsızdır, bu yüzden farklılaşmamış gonad ismiyle anılırlar (Sadler, 2018; Dansuk, 2011).

XX kromozomu olan ve Y kromozomu bulunmayan dişide primitif cinsiyet kordu düzensiz hücre kümelerine dönüşür ve primitif germ hücrelerini içeren bu kümeler overin medulla bölümünü işgal ederler. Sonrasında yerini damarsal bir stromaya bırakır ve over medullası oluşur. Dişi gonadının yüzey epiteli erkeklerden farklı olarak çoğalmaya devam eder ve 7. haftada altındaki mezenşimi geçen ancak yüzeye yakın kalmaya devam eden kortikal kord adı verilen yeni bir kordu oluşturur. Üçüncü ay civarında kortikal kordlar bölünerek izole hücre kümeleri oluştururlar. Bu kümelerdeki hücreler çoğalmaya devam ederek her oogoniumu foliküler hücreler adı verilen bir katman epitelyal hücrelerle sarmaya başlarlar. Oogonia ve foliküler hücreler birlikte primordial folikülü meydana getirirler. Sonuç olarak, dişi gonad gelişiminin erkeğe göre en önemli farkı medüller kordların gerilemesi ve kortikal kordların oluşmasıdır. Kortikal kordlar erkek gonadlarında oluşmazlar (Demirtaş ve Pişkin, 2009; Sadler, 2018; Gokalp, 2017).

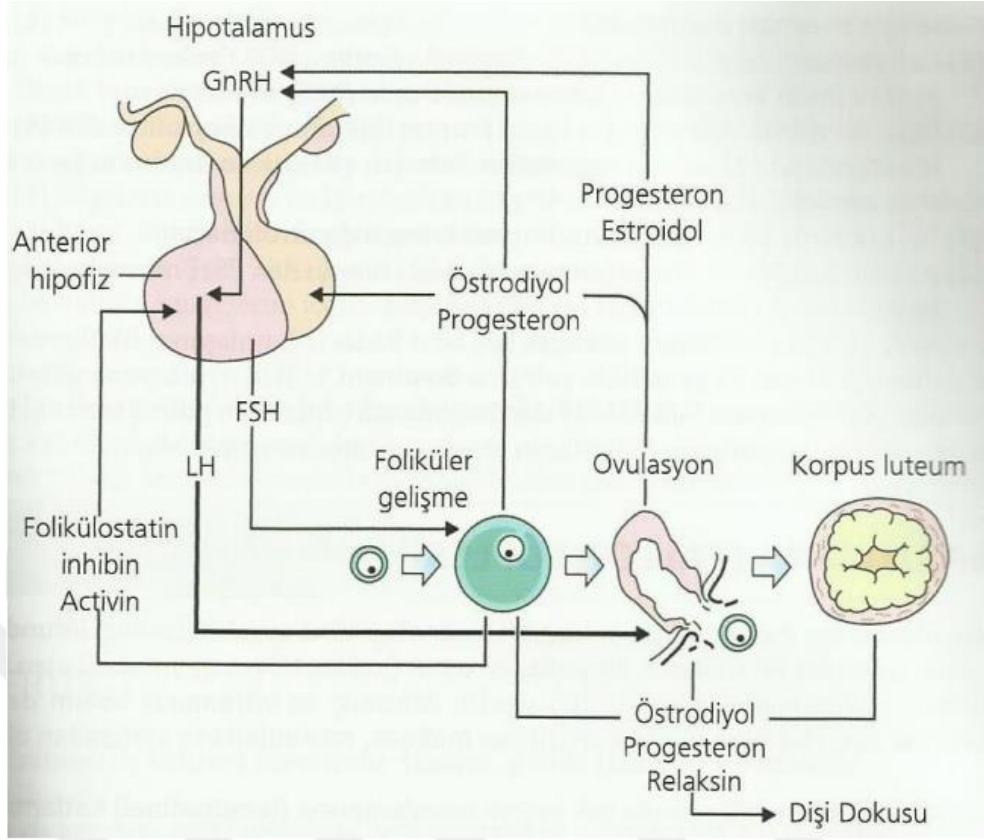
2.1.4. Overler Fizyolojisi

Kadın hormonal sistemi üç ana bileşenden oluşur: GnRH, FSH ve LH ile östrojen ve progesteron. Bu karmaşık süreç, hipotalamus, ön hipofiz ve yumurtalıklar arasındaki etkileşimlerle düzenlenir.

Hipotalamus: Hipotalamus, gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH) adı verilen bir hormon salgılar. Bu hormon, hipofiz bezi üzerinde etkilidir ve FSH (folikül uyarıcı hormon) ve LH (luteinleştirici hormon) salgılanmasını tetikler (Gartner ve Hiatt, 2016).

Ön Hipofiz: GnRH'nın uyarısı üzerine, hipofiz bezinden FSH ve LH salgılanır. FSH, yumurtalıklarda bulunan sekonder foliküllerin olgun foliküllere dönüşmesini uyarır. Ayrıca, bazı hücrelerin androjenler üretmesine ve diğerlerinin östrojen üretimine yardımcı olur. LH ve FSH, birlikte, östrojen seviyelerinin yükselmesine ve LH'nın ani bir artışa neden olmasına yol açar. Bu artış, ovulasyon sürecine neden olur (Gartner ve Hiatt, 2016).

Yumurtalıklar: Östrojen ve progesteron, yumurtalıklardan salgılanan hormonlardır. FSH ve LH'nın etkisiyle, bu hormonlar üretilir ve salınır. Östrojen maksimum seviyeye ulaştığında, birincil oositin mayoz bölünmesini tamamlamasına ve ikincil oositin mayoz bölünmesine başlamasına yol açar. Ayrıca, LH artışı, korpus luteum oluşumuna yol açar, bu da GnRH, LH, ve progesteron seviyelerinin düzenlenmesinde rol oynar (Guyton A C, Hall, 2016; Guyton ve Hall, 2013) (Şekil 2.3) (Gartner ve Hiatt, 2016).



Şekil 2.3. Ovaryum Fizyolojisi

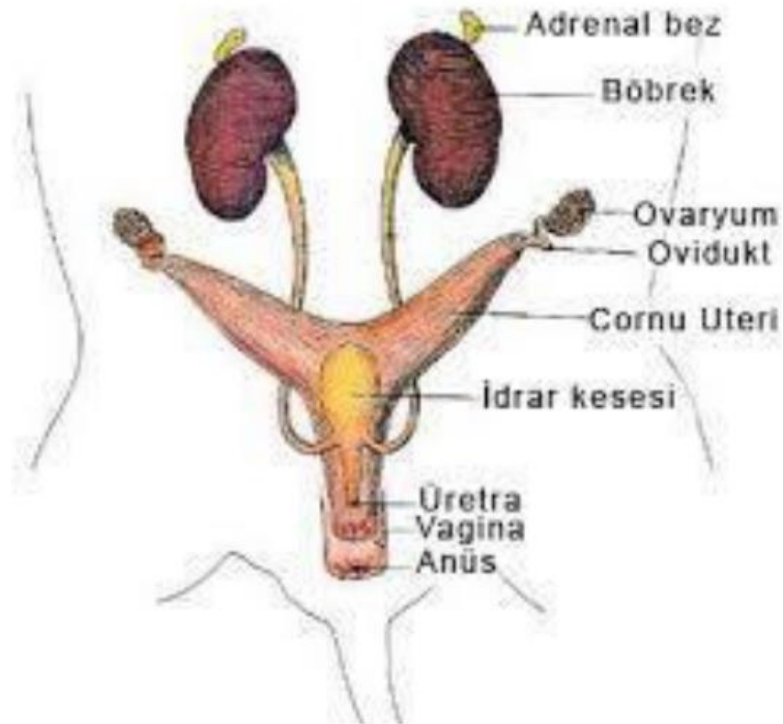
Bu dinamik sistem, döngüsel olarak tekrarlar ve her adımda karmaşık bir düzenleme ve geri besleme süreçleri devreye girer. Bu sayede kadın vücudunda düzenli bir menstrüasyon döngüsü sağlanır. Bu süreç aynı zamanda kadının doğurganlığını da kontrol eder (Gartner ve Hiatt, 2009).

2.1.5. Rat Overi

Ratlarda over, böbreklerin kaudalinde bikornual yapıdaki uterusun her iki yanında yer alır. Overle uterus arasındaki bağlantı helezonik yapıdaki tuba uterina sayesinde olur. Ratlardaki ovaryan gelişim temel olarak insandakine çok benzemektedir; ancak farklılık zamanlamasındadır. Primordial germ hücreleri ileri embriyolojik gelişim sürecinde oogonia oluşturmak üzere gonadlara göç eder. Doğumda rat ovaryumu kordon ve oogonyalardan oluşmaktadır. Primordial folliküller doğumdan sonra 3.günde oluşurlar. İlk follikul dalgasının antral folliküle kadar gelişimi yaklaşık 3 haftadır. İyi gelişmiş sekonder folliküller ise yedinci günde gözükür. Puberte veya ilk östrus 34. Gün civarında

meydana gelir. Düzenli östrus siklusu 10-12. Aylarda düzensiz siklusların oluşumuna kadar devam eder. 12-14. Ayların sonunda hayvanlar persistent siklusa geçerler. Bunun ardından da anöstrus siklusu meydana gelir. Follikulogenez, premordial follikülden preovulatuvar follikül evresine 60 günden fazla bir sürede ulaşır (ortalama 15 östrus siklusu). Primordiyal follikülün sekonder folliküle gelişim aşaması 30 günden uzun olabilir. Sekonder follikülden ovulasyona kadarki süre ise ortalama 28 gündür (Mülazımoğlu ve ark., 2011; Mazaud ve ark., 2002).

Primordial folikül (25 µm çapında) gelişimi, 500-800 µm (preovulatuvar folikül) büyüklüğüne ulaşmak için 60 günden daha uzun bir süreyi kapsar, yani yaklaşık 15 östrus döngüsüne denk gelir. Primordial folikül aşamasından sekonder folikül aşamasına geçiş, 30 günden daha fazla sürebilir. Sekonder aşamadan ovulasyona kadar olan toplam gelişim süresi ise yaklaşık $28 \pm 2-3$ gün kadar olabilir. Bu nedenle, erken folikül olgunlaşması, insanlardaki gibi, farelerde de oldukça uzun bir süreyi kapsar (Mazaud ve ark., 2002). (Şekil 2.4.) (Uğurel ve ark., 2017).



Şekil 2.4. Dişi ratlarda ürogenital sistem anatomisi

2.1.6. Overlerde Görülebilen Hastalıklar

Overlerde, benign veya malign olmak üzere birçok farklı hastalık görülebilirken, aynı zamanda over ve gonadlarda ortaya çıkan genetik değişikliklerle karakterize edilen çeşitli rahatsızlıklar da meydana gelebilir (Altchek vd., 2003; Runge ve Patterson, 2006).

Tablo 2. 1. Overlerde görülebilen hastalıklar

Hastalık Grubu	Hastalıklar
Benign Durumlar	Anjiyomiyolipoma, Kronik pelvik ağrı (PCS), Over foliküler kistleri, Sitomegalovirüs ooforit, Over ödemi, Endometriozis, Fibromatozis, Hemorajik korpus luteum, Korpus luteum kisti, Hidatik rahatsızlık, Over inguinal hernisi, Over torsiyonu, Gebelik luteinize folikül kisti, Gebelik luteomasi, Gebelikte over torsiyonu, Polikistik over sendromu (PCOS), Over hiperstimulasyon sendromu, Paraoveryan kist, Gossipiboma, Ksantognülatöz ooforit, Overin teka-lutein kistleri, Overde splenozis, Over ven trombozu, Over ven inkompetansı
Over/Gonadal Genetik	Aromataz eksikliği, Hermafroditizm, Testiküler regresyon sendromu, Multisistem genetik hastalıklarda: Bardet-Biedl sendromu, Frasier sendromu, Gorlin sendromu, Ovariölökodistrofi, McCune –Albright sendom, Rothmund-Thomson sendrom, Turner sendromu
Epitelyal Tümörler	Adenokarsinom, Adenofibrom, Seröz tümörler, Müsinöz tümörler, Endometrioid tümörler, Transisyonel hücreli tümörler, Berrak hücreli tümörler
Germ Hücre Tümörleri	Koryokarsinom, Disgerminoma, Embriyonal karsinom, Endodermal sinus tümörü (Yolk sac tümör), Mikst germ hücreli tümör, Teratomlar
Malign Kenfoma ve Lösemiler	Burkitt lenfoma, Non-Hodkin lenfoma
Mezenşimal Tümörler	Leiomyom, Leiomyosarkom
Overlere Metastaz	Krukenberg tümör, Metastatik meme karsinomu, Metastatik karsinoid, Metastatik melanom
Seks Kord-Stromal Tümörler	Granuloza hücre tümörleri, Gynandroblastoma, Sertoli-Leydig hücre tümörleri (androblastomalar), Annular tübüllü seks kord tümörleri, Steroid (lipid) hücre tümörleri, Tekoma-Fibroma grubundaki tümörler
Vasküler Tümörler	Over Hemanjiyomu

Tablo 2.1 de görüldüğü gibi overlerde görülebilen hastalıkların geniş bir yelpazesini içermektedir ve her biri belirli semptomlar, tedaviler ve prognozlarla ilişkilidir.

2.2. İskemi ve Reperfüzyon

2.2.1. İskemi

İskemi, arteriyel veya venöz kan akımının yetersizliği nedeniyle bir doku veya organın oksijen eksikliği yaşaması durumunu tanımlar. Bu durum, hücresel enerji depolarının tükenmesi ve zararlı metabolitlerin birikmesi sonucunda hücre ölümüne yol açar. İskemik dönemde, hücrelerde metabolik ve yapısal değişiklikler meydana gelir (Zimmerman ve Granger, 1992).

Kan akımının kesilmesiyle hücresel oksidatif fosforilasyon azalır ve yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden olan adenosin 5'-trifosfat (ATP) ve fosfokreatin sentezi azalır (Jennings ve Reimer, 1991). Hücre zarındaki Na^+ ve K^+ -ATPaz pompası, enerji eksikliği nedeniyle etkisiz hale gelir. Bu durumda hücre içinde Na^+ ve Ca^{2+} iyonlarının konsantrasyonu artar. Bu artış, hücre için zararlı olan bir durumdur (Green ve ark., 1989; Orrenius ve ark., 1992). İskemi sırasında, hücre içindeki Ca^{2+} konsantrasyonundaki artış, proinflamatuvar sitokinlerin ve lökosit adhezyon moleküllerinin üretiminde artışa neden olurken, antioksidan enzimlerin üretimi azalır. Bu, hücrenin reperfüzyon döneminde daha savunmasız hale gelmesine yol açar. ATP üretimi durmasına rağmen kullanımı devam eder, bu nedenle ATP'den adenosin monofosfat (AMP) ve adenosin oluşur. Adenosin hızla hücre dışına yayılır ve inozin ve hipoksantin gibi pürin metabolitlerine dönüşür. Bu nedenle, yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin yıkımı sonucu dokuda ksantin ve hipoksantin birikir. Normal koşullarda hipoksantin, ürik aside metabolize olur ve bu reaksiyonda elektron alıcısı olarak nikotinamid adenin dinükleotidin okside formu (NAD^+) kullanılır. Ancak hipoksi veya iskemi nedeniyle ksantin dehidrojenazın ksantin oksidaza dönüştüğü

durumlarda, hipoksantinin ürik aside dönüşümü sırasında moleküler oksijen kullanılır (Parks ve ark., 1988).

İskemik hasarı önlemek için tüm tedavilerin temel dayanağı olarak hızlı kan akışı onarımının sağlanması önemli bir adımdır. Bu bağlamda, farklı organ sistemlerinin iskemiyeye karşı farklı hassasiyet gösterdiğine dikkat etmek önemlidir. Ayrıca, herhangi bir organda, hücreler kısa süreli iskemiyeye maruz kaldıklarında hayatta kalabildikleri ve bu hücrelerin diğerlerinden daha uzun iskemik tutulumlara dayanabildiği bildirilmiştir. Artan iskemi süreleri ile artan sayıda hücre ölür, geri dönüşü olmayan ve etkilenen dokularda yapısal bütünlük kaybı ile karakterize edilen yaralanmalara maruz kalır (Kalogeris ve ark. 2016).

2.2.2. Reperfüzyon

İskemiyi önlemek ve iskemi sonrası dokuda kan akımını sağlamak amacıyla geliştirilen mekanizmalar sonucunda dokudaki oksijen miktarının artışı, "reperfüzyon" olarak adlandırılmaktadır (Kalogeris ve ark. 2012, Nour ve ark. 2013). Reperfüzyon hasarı ilk olarak Cerra ve arkadaşları tarafından 1975'te reperfüzyon hasarının derecesini saptamak için dikkatlice tasarlanmış bir deneyde, köpeklerde miyokard pediküllerini incelemişler ve kan akışının restorasyonunun subendotelial hemorajik nekroz ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Elde edilen sonuçlar araştırmacılara aort kapağı replasmanından sonra ölen bir grup klinik notlarını ve otopsi bulgularını gözden geçirme konusunda ilham vermiştir (Cerra ve ark. 1975, Khalil ve ark. 2006). Diğer bir deyişle reperfüzyon hasarı, önceki iskemik dönemde meydana gelmeyen ve yalnızca reperfüzyon sırasında verilen bir müdahale ile tamamen azaltılabilen, reperfüzyonla ilişkili nedensel bir olayı ifade etmektedir (Piper ve ark. 1998).

Reperfüzyon, reaktif oksijen radikalleri ile hücresel düzeyde iskemik hasarı kötüleştirir. Bu araçlar hücre zarı lipidlerini etkileyerek malondialdehit (MDA) gibi

toksik ürünlerin artmasına neden olurlar. Bununla birlikte, ROS, oksidan molekülleri artırmanın yanı sıra doğal antioksidanlar, glutatyon (GSH) ve süperoksit dismutazı (SOD) azaltır (Tokgoz ve ark. 2018).

2.2.3. İskemi Reperfüzyon Hasarı

İskemi nedeniyle hücrede aerobik metabolizma inhibe olur ve hasar oluşur. Reperfüzyon hasarında birçok patofizyolojik faktör rol oynar. Bunlar arasında lipid oksidasyonu, protein metabolizması disfonksiyonu, hücre iskeleti bozulması, hücrel bütünlüğün bozulması ve DNA'nın zarar görmesi sayılabilir. Reaktif oksijen türleri (ROS) oluşur ve hücrenin metabolik yollarında yer alan sitokinler ve kemokinler iskemi sürecine katkıda bulunur (Wu ve ark. 2018).). Memelilerde, esansiyel bir amino asit olan metionin ile enzimler, metionin sentaz veya betain homosistein metil transferaz tarafından homosistein arasında bir denge korunur. Bu enzimler homosistein birikimini engeller. Homosistein reperfüzyondan sonra iskemik kalp, beyin ve böbrek dokusunda birikir ve iskemi-reperfüzyon hasarına neden olur (Caylak ve ark. 2008; Calvert ve ark. 2010; Ren 2010).

İskemi-reperfüzyon hasarı, bir organa azalan kan akışında iki aşamalı bir olgudur, hipoksi ile sonuçlanır, hücre hasarına neden olmaktadır. Hepatik iskemi-reperfüzyon hasarına bağlı olumsuz sonuçlar, klinik uygulamada çözülmemiş büyük bir sorun olarak varlığını sürdürmektedir (Li ve ark. 2021). Sorumlu mekanizmalar son derece karmaşıktır ve çok sayıda hücrel bileşen, faktör ve aracılığı reaktif oksijen türleri, nötrofil infiltrasyonu ve mikrodolaşım disfonksiyonu içerir. Bugüne kadar, araştırma verileri, bu patolojiyi anlamamızda çeşitli tartışmalara ve hatta tutarsızlıklara neden olmaktadır (Jiménez-Castro ve ark. 2019).

İskemi ve reperfüzyon, hücre hasarına ve ölüme yol açan bir dizi süreci başlatan apoptotik olayları indükler. Bu süreçler, radikal oksijen türlerinin oluşumunu, endotel

aracı başlatmalarını ve lökosit aktivasyonunu içerir. IR ile ilişkili hasarın boyutu, apoptotik yanıtın derecesi ile ilişkilidir. Sıklıkla programlanmış hücre ölümü olarak adlandırılan apoptoz, canlı organizmalar tarafından hücrelerin normal olarak silinmesi için kullanılan biyomoleküler bir süreçtir (Lopez-Neblina ve ark. 2005). İskemik hasardan etkilenen ana hücre tipleri, hepatositler ve karaciğer sinüzoidal endotel hücreleridir. Hepatositler ve karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri sırasıyla sıcak ve soğuk iskemide daha duyarlıdır. Sıcak iskemide O_2 eksikliği hepatositlerde elektron akışını keserek solunum zincirinin yavaşlamasına neden olur ve ATP tükenmesine, anaerobik glikolizin hızlanmasına, artan laktat oluşumuna ve H^+ , Na^+ ve Ca^{2+} homeostazında değişikliklere yol açar; birlikte, hepatosit üzerinde ciddi zarar verici etkilere neden olur. Reperfüzyon hasarı esas olarak O_2 'nin iskemik dokulara yeniden verilmesi üzerine üretilen toksik ROS'tan kaynaklanır. ROS hem hücre içi hem de hücre dışı kaynaklardan üretilir, mitokondri karaciğer hücrelerinde ana kaynaklarıdır. Tersine, çoğu hepatosit 48 saatlik soğuk iskemiden sonra canlı kalır, ancak karaciğer sinüzoidal endotel hücreleri reperfüzyonu takiben ciddi hasar görür. Bu sinüzoidal hasarın sonucu, müteakip mikrodolaşım bozuklukları ve reperfüzyonu takiben hepatik disfonksiyonlardır (Jiménez-Castro ve ark. 2019).

İskemi-reperfüzyon hasarında karakterize edilmesi gereken bir diğer değişken faktör, uygulanan hepatik iskeminin yüzdesidir. Reperfüzyon sırasında kan akışının ve enerji yükünün geri kazanılması gibi hepatik iskemide reperfüzyon mekanizmalarının yanı sıra hepatik hasarın ciddiyeti iskemideki derecesine, yani total veya parsiyel hepatik iskemide uygulanıp uygulanmadığına bağlıdır. Bu farklılaşma, hırsızlık olgusuna referansla açıklanabilir. %100 hepatik iskemiden farklı olarak, %70 iskemide (sol ve medyan hepatik loblarda iskemide) sırasında, akış sağ loblar yoluyla şantlanır ve sol ve medyan lobların oklüzyonunun serbest bırakılmasının ardından, bir miktar şant yoluyla sağ loblar, post-

iskemik loblarda vasküler direnç azalana kadar hepatik reperfüzyon sırasında devam edecektir. Bu nedenle, pre-iskemik lobun kan akışının geri kazanımı kısmi olarak (%70) total hepatik iskemiye göre daha sonra gerçekleşir. Tersine, total iskemide hepatoduodenal ligamanın toplam sıkışması, karaciğer iskemik lezyonları ve bağırsak tıkanıklığı riskini artırır; kısmi hepatik iskemide olmayan bir risk faktörü. Bu nedenle, hepatik iskemi yüzdesine bağlı olarak farklı mekanizmaların hepatik hasara katkıda bulunduğu açıktır. Dolayısıyla, bu gözlemler doğrultusunda, bazı ilaçların koruyucu etkileri uygulanan hepatik iskeminin derecesine bağlıdır (Li ve ark. 2021; Jiménez-Castro ve ark. 2019).

İskemi/reperfüzyon yaralanması, bir iskemi döneminden sonra kan akışının restorasyonu sırasında belirgin hale gelen fonksiyonel ve yapısal değişiklikleri tanımlamak için kullanılan bir terimdir. İskeminin tersine çevrilmesine ek olarak, kan akışının onarılması, geri dönüşümsüz olarak hasar görmüş hücrelerin nekrozu ve dokunun tüm bölümlerinde akış restorasyonu gibi potansiyel olarak çok zararlı etkilere neden olabilir. Dokudaki kan akışının bu kaotik restorasyonu, azalmış lokal perfüzyon, yoğun disfonksiyonel değişiklikler, ödem ve daha pek çok etki ile vasküler, endotelial ve mitokondriyal disfonksiyonun kısır döngüsünün sonucudur (Soares ve ark. 2019).

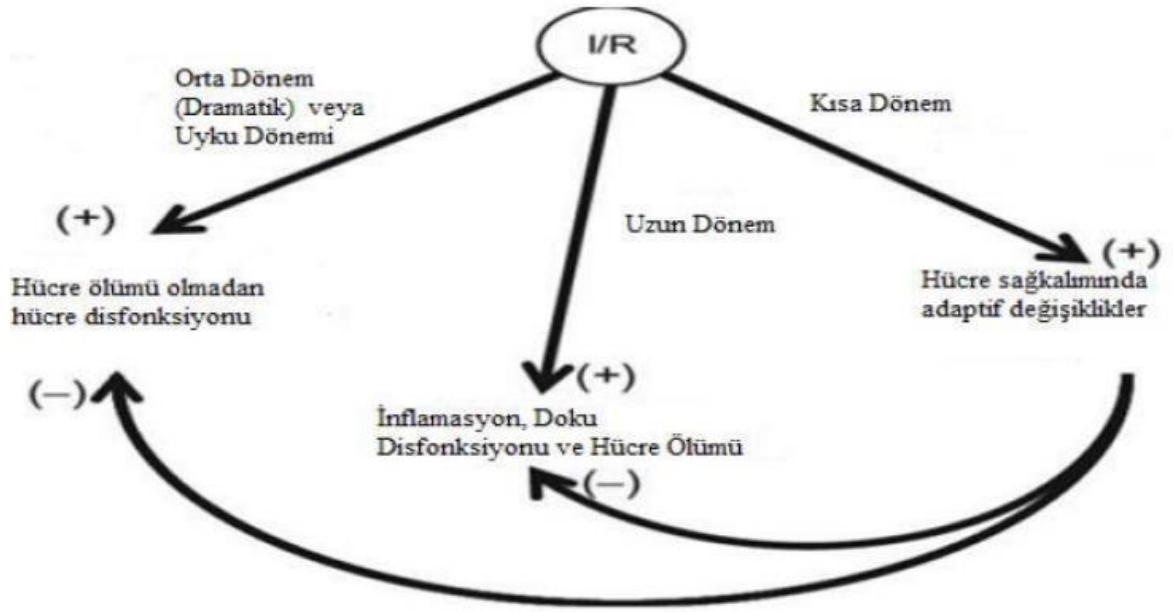
İskemi-reperfüzyon yaralanması, özellikle kardiyak travma sonrası birçok hastalıkta majör bir patolojik faktördür. Ek olarak, iskemi reperfüzyon yaralanması, nakledilen organların ve tedavi gören hastaların iyileşmesini geciktirir. Farmakolojik tedavi ve erken reperfüzyon tedavisi, iskeminin neden olduğu doku hasarını ve hücre nekrozunu azaltabilir. Ancak bu tedaviler geri dönüşümsüz İR yaralanmalarına da neden olabilir. Hücre ölümü, tüm dokularda başlıca yaygın İR hasarı özelliğidir ve sonuç olarak, iskemi reperfüzyon hasarının stabil bir patolojik indeksidir. Ferroptoz, demir ve ROS dayanan ve reperfüzyon hasarının nedeni olduğuna inanılan programlanmış hücre

ölümünün yeni tanınan bir şeklidir. Böylece, yeni hücre ölümü biçimi olan ferroptoz, birçok hastalığın anlaşılması ve tedavi edilmesi için yeni yollar sağlar. Kalp, beyin, böbrek ve karaciğer dahil olmak üzere çok sayıda organda İR hasarı üzerine araştırmalar yürütülmüştür. Son çalışmalar, ferroptoz ve iskemi reperfüzyon yaralanması arasındaki bağlantıları ortaya çıkarmıştır ve ferroptoz inhibitörleri, çeşitli organlarda İR hasarını başarılı bir şekilde engellemiş veya azaltmıştır. Ferroptoz, iskemi reperfüzyon yaralanması ve organ yetmezliğinin ana itici gücüdür. Ferroptozun engellenmesi, ilgili organ hastalıkları için etkili bir tedavi stratejisi haline gelebilir ve reperfüzyon yaralanması sırasında hücre ölümünün azaltılmasına yardımcı olabilir (Li ve ark. 2021).

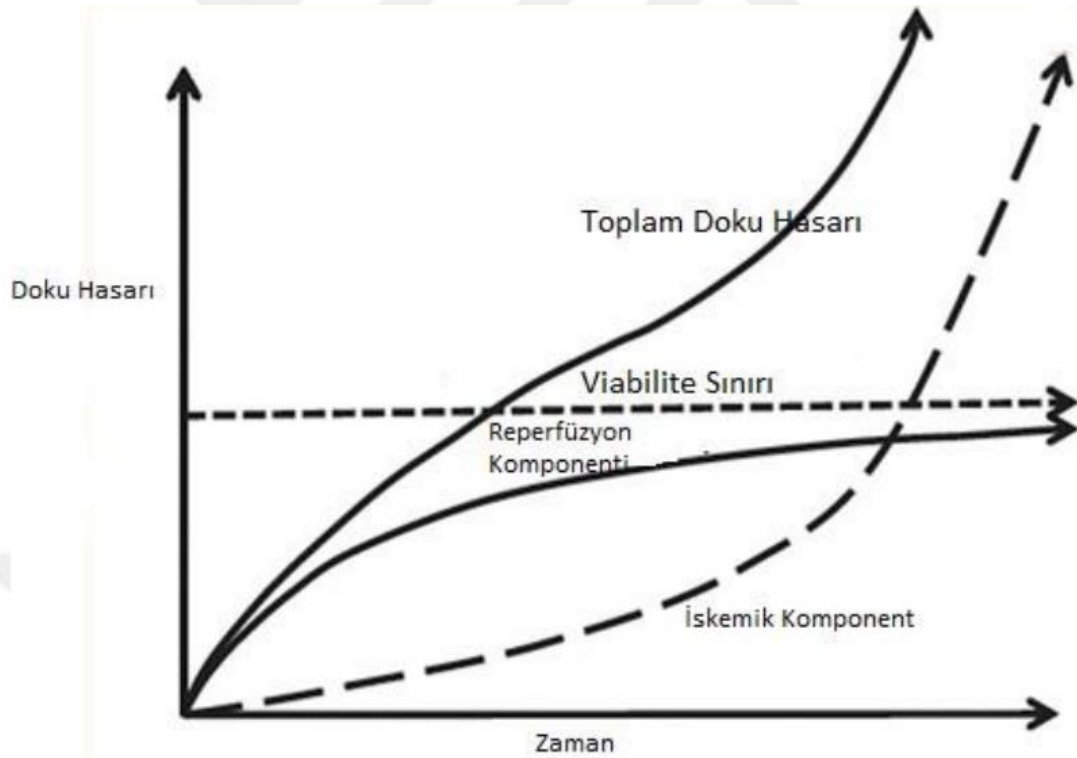
İskemi ve reperfüzyon hasarı esas serbest oksijen radikalleri tarafından oluşturulmaktadır. Serbest oksijen radikalleri temel olarak 4 mekanizma ile oluşmaktadır (Ozcan ve ark. 2015).

1. Nitrik oksit sentaz sistemi
2. Ksantin oksidaz sistemi
3. Mitokondriyal elektron zinciri (ETZ)
4. Fagositik sistem

İskemi reperfüzyon doku hasarında her dokunun hasar görmesi ve inflamatuvar süreci ve dokunun verdiği tepki aynı değildir. İskemi reperfüzyon sürecinde hücrenin kısa ve uzun dönem cevabı Şekil 2.5 de, iskemi reperfüzyon hasarında doku hasarı zaman ilişkisi ise Şekil 2.6 da gösterilmiştir (Doğan, 2019; Ozcan ve ark., 2015).



Şekil 2.5. İskemi reperfüzyon hasarında dokunun kısa ve uzun dönem yanıtı



Şekil 2.6. İskemi reperfüzyon hasarında doku hasarı zaman ilişkisi

2.2.3.1. Ksantin Oksidaz İndüksiyonunun İskemi-Reperfüzyon Hasarındaki Rolü

Hücre içi iyon dengesinin değişmesiyle proinflamatuvar sitokinlerin, lökosit adezyon moleküllerinin oluşumu artarken antioksidan mekanizmaları yöneten enzimlerin yapımı azalır. Antioksidan mekanizmaların kaybı hücrenin reperfüzyon stresi karşısında savunmasını kırar. ATP üretimi durduğu halde ATP'nin yıkımı devam eder ve bunun sonucunda AMP ve adenozin oluşur. Adenozin hücre dışına çıkarak inozin ve hipoksantine parçalanır. Hücredeki enerji yoksunluğu ATP'nin yıkımına ve sonuç olarak ksantin ve hipoksantin gibi pürin metabolitlerinin birikmesine sebep olur. Hücrenin normal şartlarında hipoksantinün ürik aside dönüştürülmesinde kullanılan ksantindehidrogenaz yerine iskemi döneminde ksantinoksidaz enzimi kullanılır (Wu, 2018). Yine normal şartlar altında elektron alıcısı olarak kullanılan NAD^+ 'ın okside formu yerine bu reaksiyonda elektron alıcısı moleküler oksijen haline gelir ve oksijen radikalleri oluşur (Şener ve Yeğen, 2009; Fernández, 2020). Antioksidan savunma mekanizmalarının çalışır durumda olması halinde superoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) tarafından etkisiz hale getirilirler.

2.2.3.2. Mitokondriyal Elektron Transport Zincirinin İskemi-Reperfüzyon Hasarındaki Rolü

Hücre içerisinde oluşan süperoksit radikalının ana kaynağı mitokondridir. Normal şartlar altında bunların %90'ı suya dönüştürülür. Ancak iskemi statüsünde bulunan hipoksik dokularda kompleks I ve III indirgenmiş halde kalırlar ve bu dönüşümler yavaşlar, elektron akışı bozulur. Elektron kaçağı ve rezidüel moleküler oksijenin birleşmesiyle süperoksit radikali oluşur. Sonrasında reperfüzyonun sağlanması sırasında moleküler oksijenin tekrar ulaşmasıyla ETZ'den elektron kaçağı artar ve daha çok süperoksit oluşur. Bir diğer mekanizma ise mitokondri membranında bulunan

monoaminoksidaz enzimi aracılı oluşumdur. Normalde nörotransmitter deaminasyonu ile görevli bu enzimin çalışması sırasında hidrojen peroksit oluşmaktadır. Hidrojen peroksit prooksidan bir moleküldür. Tüm bu mekanizmalara antioksidan mekanizmaların azalması da eklenince doku hasarı meydana gelir (Ozcan ve ark., 2015; Solaini ve Harris, 2005).

2.2.3.3. Nitrik Oksit Sentaz Yolağının İskemi-Reperfüzyon Hasarındaki Rolü

Nitrik oksitin bilinen 3 çeşidi vardır. Bunlar indüklenebilir (iNOS), nöronal (nNOS) ve endotelial (eNOS) olarak sayılabilir. Tüm nitrik oksit sentaz çeşitleri L-arginin'den L-sitrülin sentezlenmesi sırasında nitrik oksit (NO) üretirler. NO'nun antiinflamatuar ve antioksidant özellikleri bulunmaktadır ve sinyal iletiminde rol oynar. NOS'un çalışmasında doku tetrahidrobiopterin (BH₄) kofaktör seviyesinin önemi büyüktür. İskemi esnasında azalan BH₄ seviyeleri, NOS'un eşlenmemiş NOS'a dönüşümüne sebep olur ve bu da oksijen radikallerinin üretimine yol açar (Wu, 2018).

2.2.3.4. Endotel ve Fagositik Hücrelerin İskemi-Reperfüzyon Hasarındaki Rolü

İskemi-reperfüzyon hasarı sırasında meydana gelen inflamasyon, endotel hücreleri ve vasküler yatakta bulunan diğer hücreler (Makrofajlar ve mast hücreleri) tarafından salınan proinflamatuar mediatörler polimorf nüveli lökositlerin (PMNL) bölgeye göçüne sebep olur. Normal şartlarda bu fagositik hücreler inflamasyon esnasında solunumsal patlama yaparak NADPH oksidaz (NOX) yardımıyla süperoksit ve SOD yardımıyla hidrojen peroksit üretirler. Sonrasında miyeloperoksidaz (MPO) yardımıyla hipokloroz asite dönüşüm sağlanır. Bu aşamada Fenton reaksiyonuyla hidroksil radikali de oluşabilir. PMNL hücreleri bu reperfüzyon hasarında başlıca rolü oynarlar (Parekar, 2014; Azurah, 2015).

İskemik dokuya kan akışını yeniden sağladıktan sonra hücreler, fosfolipaz A2, Tnf a, IL-1 β , IFN-y ve anjiyotensin II gibi NADPH oksidazı aktive eden birkaç kimyasal aracılığıyla serbest bırakır. Fosfolipaz A2'nin salınımı, trombosit aktive edici faktör üretimini indükleyerek, lokal inflamasyonu teşvik eden tromboksan ve lökotrienlerin doku seviyelerinde artışa yol açar. Post-iskemik dokuda NADPH oksidaz kaynaklı ROS, inflamatuvar hücre birikimine neden olarak reperfüzyon hasarına yol açabilir (Wu,2018; Carden ve Granger, 2000).

2.3. İnflamatuvar Yanıt

İnflamatuvar yanıt, reperfüzyon süreci ile meydana gelir. Bu süreçte, PMNL, endotel hücreleri ve kompleman aktivasyonu gibi faktörler rol oynar. Eğer bu inflamatuvar yanıt, vücudun önemli bir organını veya reperfüzyonla ilişkili bir organı etkilerse, bir dizi kemokin, sitokin ve proinflamatuvar metabolit dolaşıma geçer. Bu da inflamasyonun tüm vücuda yayılmasına neden olabilir. Bu proinflamatuvar durumun etkileri, başlangıç inflamasyonunun şiddetine göre her organda farklılık gösterebilir. Örneğin, akciğer gibi kapiller yoğunluğu yüksek olan organlar, bu inflamasyona daha hassas hale gelirler. Aktive olan nötrofiller, iskekiye uğrayan diğer organların dokularına sızarak daha fazla hasara yol açabilirler. Bu da yerel işlev bozukluğundan organ yetmezliğine kadar çeşitli sonuçlara yol açabilir (Gourdin ve ark., 2009).

2.3.1. Sitokinlerin Rolü

Sitokinler, hücreler arası iletişimde rol oynayan polipeptit yapılarıdır ve birçok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde etkilidir. Özellikle aktive olmuş lenfositler, makrofajlar ve çeşitli hücreler tarafından üretilir (Senatorski ve ark., 2002; Gündüz ve Er, 2000). Sitokinler, ilk kez Dupont ve ekibi tarafından tanımlandı. Bu proteinler özellikle bağışıklık sistemi hücreleri başta olmak üzere birçok hücre tarafından üretilir. Bunlar hücre gelişimi, doku tamiri, hücre çoğalması ve bağışıklık gibi bir dizi

görevi düzenler (Dupont ve ark., 1974). İlk keşfedildiklerinde, sitokinler ürettikleri hücrelere bağlı olarak farklı isimlerle anıldı. Monositlerden gelenlere monokin, lenfositlerden gelenlere lenfokin ve lökositlerden gelenlere interlökin denildi (Page, 1991). Sonraki çalışmalarda, birçok farklı hücre tipinin benzer sitokinleri ürettiği bulundu ve bu sitokinler hücreler üzerindeki etkilerine göre antiinflamatuvar, kemotaktik, büyüme faktörü, proinflamatuvar ve immun düzenleyici olmak üzere beş gruba ayrıldı (Hefti, 1993).

Sitokinler, hormonlara benzemelerine rağmen özelleşmiş bir dokudan ziyade farklı hücreler tarafından üretildiği için hormon olarak kabul edilmezler (Abbas ve ark., 2014). Sitokinler, yakındaki hücrelere etki ediyorsa parakrin, üretici hücreye etki ediyorsa otokrin ve uzak hücrelere etki ediyorsa endokrin etki olarak adlandırılır (Güner ve ark., 1997). $Tnf\alpha$, IL-6 ve IL-1 β , doğal bağışıklığa etki eden temel sitokinlerdendir. Özellikle $Tnf\alpha$, iltihabi yanıtın IR'da oluşumunda önemli bir rol oynar (Gabryel ve ark., 2004). $Tnf\alpha$, damar endotel hücrelerini ve tek çekirdekli fagositoz yapabilen hücreleri uyarak IL-1 β ve IL-6'nın dolaşıma geçişini teşvik eder (Carlson ve ark., 1999). $Tnf\alpha$, yüksek konsantrasyonlarda kan basıncını ve doku perfüzyonunu azaltırken damar düz kaslarını gevşetir. IL-1 β 'nin ana kaynağı aktive mononükleer fagositoz yapabilen hücrelerdir ve $Tnf\alpha$ ile benzer biyolojik etkilere sahiptir. IL-1 β 'nin etkinliği dolaşımdaki sitokin miktarına bağlı olup düşük konsantrasyonlarda bölgesel iltihabi yanıtı aracılık eder. Ayrıca IL-6 üretimini de uyarır (Lefer ve Lefer, 1993).

2.3.2. Antioksidanların Rolü

Serbest radikal hasarı, biyolojik sistemlerde karşılaşılan bir sorundur. Bunun önlenmesi için organizmalarda, antioksidan olarak bilinen savunma sistemleri mevcuttur. Antioksidanlar, düşük konsantrasyonlarda oksidasyonu geciktirme veya inhibe etme yeteneğine sahip maddelerdir (Gutteridge, 1995). Antioksidanlar, oksidatif hasarın

yayılmasını engelleyen moleküllerdir. Farklı organlar, hücreler ve hücresel organeller içinde bulunan çeşitli antioksidanlar, reaktif oksijen türlerine karşı savunmada rol oynarlar (Bast ve ark., 1991). Oksidatif hasarın yayılmasını önlerler ve çeşitli organ, hücre ve hücre organellerinde bulunurlar. Bu savunma mekanizmaları, bazılarının hasarlı molekülleri onarıp metal iyonlarını bağlaması, bazılarının ise hasarlı moleküllerin yerine geçip reaktif oksijen türleri oluşumunu engellemesi gibi farklı yollarla etkili olur. (Gutteridge ve Halliwell, 1994).

Antioksidanlar, farklı şekillerde sınıflandırılabilir. Bunlar, kaynaklarına göre vücut dışından gelen (ekzojen) ve vücut içinden üretilen (endojen); yerleşim yerlerine göre hücre dışı (ekstrasellüler) ve hücre içi (intraseellüler); yapılarına göre enzim içeren veya içermeyen; çözünürlüklerine göre yağda çözünen veya suda çözünen olarak gruplandırılmaktadır (Gutteridge, 1995).

Antioksidan savunma sistemi, organizmayı oksidan moleküllerin zararlarından koruyan mekanizmaların tümüne verilen isimdir. Antioksidanlar bu etkilerini çeşitli mekanizmalar üzerinden yapabilirler:

- Antioksidan enzimlerin çalışma mekanizması oksidan molekülleri etkileyerek onları tutarak süpürücü veya yok edici etki göstermeleridir (Karihtala ve Soini, 2007).
- Vitaminler ve flavanoidlerin çalışma mekanizmasıysa, bu radikallere bir hidrojen aktararak etkilerini azaltmaktır (Cherubini, 2008).
- Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller etkilerini bu radikalleri bağlayıp, zincirlerini kırarak gösterirler (Mickle ve Weisel, 1993).
- Radikallerin oluşturduğu hasarın tamiri şeklinde onarıcı etki de gösterebilirler (Virág ve Szabó, 2002).

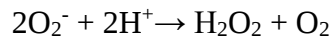
2.3.2.1. Malondialdehit (MDA)

MDA, lipid peroksidasyonun bir belirteci olarak kullanılır ve lipid peroksidlerin zararlı bir parçalanma ürünüdür. Bu ürünlerin dolaşımında artması, endotel hücre hasarına yol açabilir (Aksoy ve ark., 2009; Papalambros ve ark., 2007). Lipid peroksidasyon sürecinde MDA ile birlikte alken aldehytler, alkan aldehytler ve hidroksialken aldehytler de oluşur. Ancak bu bileşiklerin ölçümleri uzun ve maliyetli süreçler gerektirdiğinden pratik değildir (Slater, 1984).

MDA, hücre zarının bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmasına yol açabilir. Bu durum iyon taşıma, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin bir araya gelmesi gibi zarın içsel özelliklerini değiştirebilir. Bu değişiklikler, MDA'nın genotoksik, karsinogenik ve mutajenik etkilere neden olabileceğini gösterir (Akkuş, 1995).

2.3.2.2. Süperoksid Dismutaz (SOD)

Antioksidan savunma sisteminin ilk savunma hattında, oksijenin hidrojen peroksit dönüşümünü hızlandıran SOD enzimi bulunmaktadır. Bu reaksiyon şu şekildedir:



Bu tepki, "oksidatif stresle mücadelede ilk savunma" olarak adlandırılır. Bu reaksiyon sayesinde hücresel bölmelerdeki süperoksit seviyelerinin düzenlendiği belirtilmiştir. Örneğin hepatit, solunum sıkıntısı sendromu, akciğer enfeksiyonları, lösemi, kas distrofisi, böbrek yetmezliği, motor nöron hastalıkları, iskemi ve Fanconi anemisi gibi durumlarda SOD'un koruyucu bir rol oynadığı düşünülmektedir. Aynı zamanda, SOD tarafından lipid peroksidasyonunun da engellendiği bilinmektedir. SOD aktivitesi, yüksek oksijen tüketen hücrelerde ve dokularda daha yüksek seviyelerde bulunur (Tamer ve ark., 2012; Collard ve Gelman, 2001).

2.3.2.3. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG)

8-OHdG, oksidatif DNA hasarının en yaygın olarak araştırılan göstergelerinden biridir. Birçok araştırmacı, ROS'un DNA üzerindeki mutasyon oluşturma yeteneğini tam olarak ölçmek için her DNA modifikasyonunu incelemek istese de, 8-OHdG oluşumu diğer DNA modifikasyonlarına göre daha belirgin bir şekilde ROS varlığına işaret eder. Bu nedenle 8-OHdG ölçümü, oksijen radikallerinin neden olduğu hasarın daha kolay hesaplanmasını sağlamaktadır (Kanabrocki ve ark., 2006). 8-OHdG oluşumu, ROS türüne, organizmaya ve maruz kalma süresine bağlı olmaksızın diğer DNA modifikasyonlarıyla ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, 8-OHdG ölçümüyle oksijen radikallerinin yol açtığı hasarın tahmini daha pratiktir. Ayrıca, 8-OHdG'nin oksijen radikallerinin yol açtığı hasarın hesaplanmasında daha kullanışlı olduğu kabul edilmektedir (Bartsch ve Nair, 2004).

8-OHdG, karsinojenler ve mutajenler gibi DNA bileşikleriyle reaksiyona girerek adenin, guanin, timin ve sitozin gibi bazıları içeren yeni bileşikler oluşturabilir. Guanin bazı, bu reaksiyonlar içerisinde en reaktif olanıdır. İn vitro DNA sentezi çalışmaları, 8-OHdG'nin DNA replikasyonu sırasında nokta mutasyonlara neden olabileceğini ve potansiyel bir mutajen olabileceğini göstermiştir. Okside guanin, in vitro çalışmalarda DNA replikasyonu sırasında A-C ve G-T değişimlerine yol açabilir. Bu tür çalışmalar, hücresel DNA üzerindeki 8-OHdG oluşumunun kanser oluşumuyla ilişkili olduğunu göstermesi açısından önemlidir. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, tüm vücuda radyasyon uygulanarak karaciğer hücrelerinde 8-OHdG oluşumu gözlemlenmiş ve bu oluşumun in vitro deneylere kıyasla yaklaşık olarak 1000 kat daha düşük olduğu belirtilmiştir (Svoboda et al., 2006; Bartsch ve Nair, 2004).

2.3.2.4. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Glutasyon peroksidaz, hücre içerisinde yer alan sitoplazma ve mitokondrilerde etkin olan bir enzimdir. Süperoksit dismutaz (SOD) tarafından üretilen hidrojen peroksit ve yağ asidi hidroperoksitlerini etkisiz hale getirir. Özellikle düşük seviyelerde hidrojen peroksit bulunan durumlarda etkin çalışır. Glutasyon peroksidaz, özellikle fagositozla görevli hücrelerde önemli bir rol oynar. Diğer antioksidan enzimlerle birlikte solunum patlaması esnasında ortaya çıkan serbest radikallerin neden olduğu hasarı engeller. Aynı zamanda eritrositlerde, oksidatif stresle mücadelede önemli bir rol üstlenir. Glutasyon peroksidaz aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksitin artmasına ve hücrelere ciddi zarar verilmesine yol açabilir. Hidrojen peroksitin yüksek konsantrasyonlarında katalaz (CAT), düşük konsantrasyonlarda ise glutasyon peroksidaz (GSH-Px) önemli bir işlev gösterir (Collard ve Gelman, 2001).

GPx reaksiyonu şu şekildedir:



2.3.2.5. Redükte Glutasyon (GSH)

Enzimatik olmayan, vücut için önemli bir antioksidan olan redükte glutasyon, proteinlerdeki tiyol (SH) gruplarını oksidasyona karşı koruyarak onların işlevini sürdürmelerini sağlar. Bu sayede proteinlerin ve enzimlerin hasar görmesini engeller. Redükte glutasyon aynı zamanda hemoglobinin oksidasyonunu engelleyerek methemoglobine dönüşümünü önler. Eritrosit zarını hidrojen peroksit gibi zararlı bileşiklere, lökositlerin fagositoz sırasında ürettiği oksidantlara ve lens proteinlerinin oksidatif hasarına karşı korur (Collard ve Gelman, 2001).

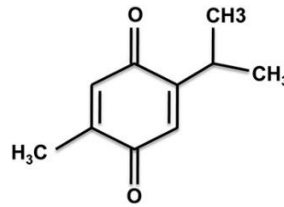
2.3.2.6. Membran Antioksidanları

Hücre zarlarının hidrofobik lipid yüzeyinde, hücre içi ortamdan farklı olarak zararlı radikaller oluşabilir. Bu radikaller, lipidlere çözünen ve hücresel enzimlerle etkisiz

hale getirilemeyen bileşiklerdir. Bu noktada başta alfa-tokoferol (E vitamini) olmak üzere alfa-karoten, ubiquinol bileşikleri ve koenzim Q gibi maddeler devreye girer. Bu antioksidanlar, zarların sağlığını korumada kritik bir rol oynarlar. Ubiquinol, düşük yoğunluklu lipoproteinlerde oto-oksidasyonu engeller. Alfa-karoten ise güçlü bir serbest radikal yakalayıcısıdır ve aktivitesi ortamdaki oksijen seviyesine bağlıdır.

2.4. Timokinon

Kemoterapötik ajanlar birçok yan etki oluşturur. Genellikle daha az toksik olduğu ve minimal yan etki oluşturduğu düşünülen doğal ürünlerde kansere karşı kimyasallar aramada şu anda bir trend bulunmaktadır. Doğal kaynaklı ilaçlar, dünyanın çeşitli bölgelerinde binlerce yıldır geleneksel olarak kullanılmaktadır. Bilim insanları, ilaç geliştirmek için aktif bileşenleri belirlemek ve çıkarmak amacıyla birçok geleneksel veya halk ilacını modern tıpla paralel olarak hedeflemiştir. Timokinon (2-metil-5-isopropil-1,4-benzoquinone) (Şekil 2.7), siyah kimyon (*Nigella sativa*) içinde bulunan bir fitokimyasal bileşiktir ve uzun bir tıbbi kullanım geçmişi vardır (Padhye ve ark., 2008; Khan ve ark., 2011).



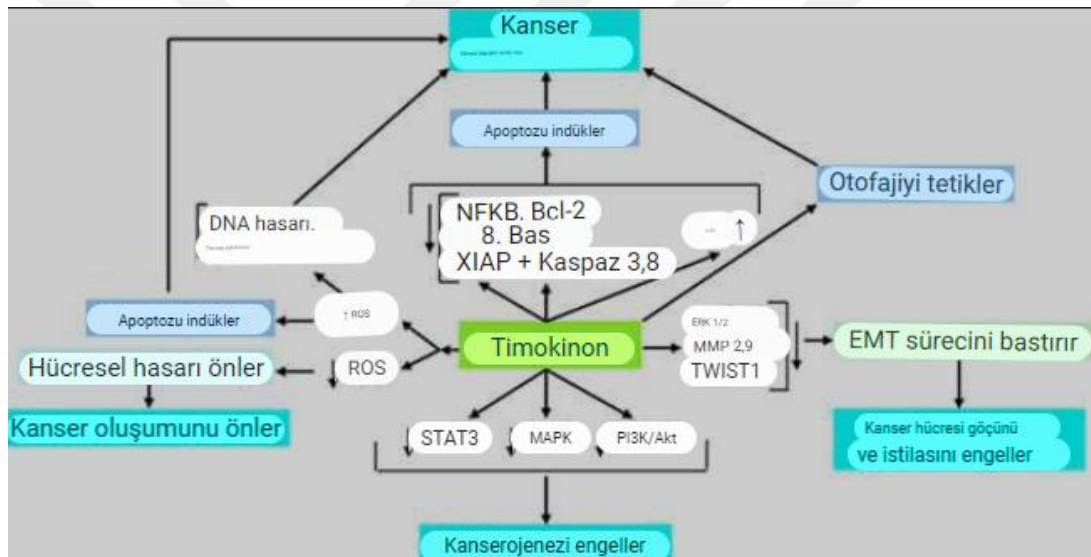
Şekil 2.7. Timokinon'un (2-İzopropil-5-metilbenzo-1,4-kinon) moleküler yapısı.

Siyah kimyon tohumları, özellikle Güney ve Güneydoğu Asya, Arap, Afrika ve Akdeniz bölgelerindeki geleneksel tıp uygulamalarında önemli bir yere sahiptir. Antik Mısır, Yunanistan ve Türkiye'de, siyah kimyon tohumları birçok hastalık ve rahatsızlığın tedavisinde sıklıkla kullanıldığı bilinmektedir (Ahmad ve ark., 2013; Salih ve ark., 2009).

Nigella sativa bitkisinin hem tohumları hem de yağı tıbbi amaçlarla kullanılır ve kansere karşı, diyabeti önleyici, hipertansiyonu önleyici, antimikrobiyal, ağrı kesici,

immünomodülatör, anti-inflamatuar, spazmolitik, hepatoprotektif, renal koruyucu, gastroprotektif, bronkodilatatör ve antioksidan aktiviteleri ile bilinirler (Khan ve ark., 201; Ahmad ve ark., 2013; Salih ve ark., 2009).

Timokinon kanser hücrelerinde apoptozis oluşturarak reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturur, DNA hasarı, telomerik aşınma, immünomodülasyon, sinyal yollarının düzenlenmesi ve otofaji indüksiyonu yoluyla etki gösterir. Timokinon aynı zamanda epitelialden mezankime geçişi düzenler ve kanser metastazını inhibe eder. Kanser olmayan hücrelerde ise timokinon antioksidan aktiviteler ve kemoprevantif aktivite gösterir (Şekil 2.8) (Asaduzzaman ve ark., 2017).



Şekil 2.8. Timokinon'un kanser karşıtı etkisinin önemli mekanizmaları.

2.4.1. Timokinonun Antioksidan Aktivitesi

Timokinonun antioksidan aktivitesinin, kemopreventif aktivitelerden sorumlu olduğunu öne süren başlangıç çalışmaları bulunmaktadır; ancak diğer bazı çalışmalar, timokinonun kanser hücrelerinde oksidatif hasara neden olarak apoptoza yol açtığını belirtmiştir (Richards ve ark., 2006; Hussain ve ark., 2011; Dergarabetian ve ark., 2013). İlginç bir çalışma, timokinonun kanser hücrelerinde güçlü bir apoptoz indükleyicisi olduğunu, ancak diğer hücre yaralanma türlerinde oksidatif stresi azaltarak antiapoptotik

etki gösterdiğini bildirmiştir (Abd El-Ghany ve ark., 2009). Bir başka hipotez, timokinonun düşük konsantrasyonlarda antioksidan, yüksek konsantrasyonlarda ise prooksidan olarak hareket ettiğini öne sürmektedir (Zubair ve ark., 2013). Timokinonun antioksidan, antiproliferatif ve proapoptotik aktivitesi, Cecarini ve ark. tarafından daha ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır. Bu çalışmada, timokinonun seçici proteazom inhibisyonunu indüklediği ve bu durumun kanser hücrelerinde apoptoz indüksiyonu ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Cecarini ve ark., 2010). Torres ve ark. tarafından yapılan daha ileri bir çalışmada, timokinonun proteasomal yoluyla glikoprotein mukin 4 ekspresyonunu düşürdüğü ve pankreatik kanser hücrelerinde c-Jun NH(2)-terminal kinaz ve p38 mitojen-aktif protein kinaz (MAPK) yollarını aktive ederek apoptoza yol açtığı ortaya çıkmıştır (Torres ve ark., 2010).

2.4.2. Timokinon DNA yapısı ve sentezi ile ilişkisi

Tamoksifen, DNA yapısına müdahale yoluyla etki gösterir. Hücresel bakırı hedef alır, özellikle DNA'da bulunan guanin bazları ile etkileşime geçer ve oksidatif kırılmaya neden olur. Sonuç olarak, kanser hücrelerinde ölüme yol açabilir (Zubair ve ark., 2013). Timokinon muhtemelen G-kadrupeks DNA stabilizatörü olarak hareket edebilir ve böylece telomeraz enziminin inhibisyonuna ve kanserin proliferasyonunun engellenmesine katkıda bulunabilir (Salem ve ark., 2015). DNA hasarına ve telomer kısalmasına yol açarak glioblastoma hücrelerinde telomerazı ve hücre ölümünü inhibe edebilir, normal hücrelere minimal etki gösterir (Gurung ve ark., 2010). Kanser hücrelerinde DNA sentezini etkileyebilir. Daha önceki bir çalışmada, timokinonun DNA sentezini, proliferasyonu ve LNCaP, C4-B, DU145 ve PC-3 gibi kanserli hücrelerin canlılığını inhibe ettiği, ancak nonkanserli BPH-1 prostat epitel hücrelerini etkilemediği bulunmuştur (Kaseb ve ark., 2007).

2.5. Oksidatif DNA Hasarı

Oksidatif stres, hücresel biyokimyasal süreçler sırasında ortaya çıkan reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışıyla birlikte, bu türleri dengeleyen antioksidanların azalması sonucunda hücre içi denge bozulmasını ifade eder. Bu reaktif oksijen türleri şunlardır: hidrojen peroksit, süperoksit radikali, alkil radikali, hipokloröz asit radikali, singlet oksijen radikali, nitrik oksit, lipid peroksit ve hidroksil radikali (Özcan ve ark., 2015; Çetin ve ark., 2011). Oksidatif stresin neden olduğu ROS'lar, hücresel proteinler, lipitler, karbonhidratlar, nükleik asitler ve enzimler üzerinde etkili olur, bu da oksidatif doku hasarına yol açar (Yu 1999). Canlı organizmada serbest radikallerin artması, hücresel hasarları ve birçok hastalığı tetikleyebilir. Bu nedenle, serbest radikal üretimi ile oksidan maddelerin antioksidanlar arasındaki dengeyi korumak, hasar ve hastalıkların önlenmesinde kritik öneme sahiptir (Karabulut ve Gülay, 2016).

Son yirmi yıl içinde, oksidatif stresin ve bununla ilişkili biyomoleküllerin oksidatif hasarının birçok insan hastalığının başlangıcında temel bir rol oynadığı doğrulanmıştır (Liguori ve ark., 2018; Rasheed ve Rasheed, 2019). Oksidatif stres, oksidanlar ve antioksidan sistemlerin dengesizliğinden kaynaklanır ve genellikle oksidan seviyelerinin antioksidan sistemi zayıflattığı durumlarda meydana gelir (Moloney ve Cotter, 2017). Artmış oksidan veya reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyelerinin oksidatif hasara neden olma yeteneği artık iyi belgelenmiştir (Al-Shobaili ve ark., 2013). Özellikle proteinlerin oksidatif hasarı, başta otoimmün hastalıklar ve kanser gibi birçok insan hastalığının indüksiyonu için ana nedenlerden biri olarak kanıtlanmıştır (Reichmann ve ark., 2018). Hidrojen peroksit, normal metabolizmada aerobik metabolizmanın bir ürünü olup normal metabolik süreçler için gereklidir, ancak aynı zamanda en ölümcül oksidatif yan ürünlerin, hidroksil radikallerinin (OH.) öncüsüdür, bu da özellikle proteinlerin hasarı

dahil olmak üzere oksidatif biyomoleküler hasara zararlı etkileriyle tanınır(Khan ve ark., 2007; Dizdaroglu, 2015).

2.5.1. Overde İskemi-Reperfüzyon

Over torsiyonu, overdeki dolaşımın kesilmesine ve sonrasında tekrar sağlanmasına bağlı olarak ortaya çıkan bir durumdur ve en yaygın nedeni iskemi-reperfüzyon hasarıdır. Over torsiyonuna yol açan etmenler arasında ovaryan kitleler, ovaryan kistler ve yardımcı üreme teknikleri sıralanabilir. Aynı zamanda, nadir olsa da ovaryan arterin geçici veya kalıcı trombozu da iskemi-reperfüzyon hasarına neden olabilir. Overler, ovaryan arter ve uterin arterin ovaryan dalı gibi iki farklı damar tarafından beslenir. Bu damarlar arasındaki bağlantı, overlerin kan akışının bir kısmının devam etmesini sağlar. Bu durum, iskemi-reperfüzyon hasarını azaltıcı bir rol oynar (Kukan, 2004). Sık karşılaşılacakla birlikte ovaryan torsiyonunun nedenleri arasında ovaryan kitleler, kistler ve aşırı gonadotropin uyarısı gibi faktörler de yer alabilmektedir (Berek, 2002). Over torsiyonu, iskemi-reperfüzyon hasarına yol açabilecek durumların başında gelmektedir. Gökmen tarafından belirtildiği üzere, overlerin kanlanması uterin arterin ovaryan dalı tarafından da sağlandığı için doku hasarı riski azalmaktadır (Gökmen, 2003).

Yumurtalık kan akışındaki değişiklikler korpus luteum işleviyle yakından ilişkilidir. Gerileme fazında yumurtalıkta kan akışında düşüş meydana gelmektedir. Kan akımı hızındaki düşüş, iskemi-reperfüzyon hasarı mekanizması ile reaktif oksijen türleri oluşturarak doku hasarına neden olduğu çeşitli organlarda iyi bilinmektedir. Yumurtalık iskemi-reperfüzyonunun progesteron üretimi üzerindeki bu inhibe edici etkisi, eşzamanlı SOD enjeksiyonu ile bloke edilmektedir. Bu nedenle, yumurtalık iskemi-reperfüzyonu, reaktif oksijen türlerinin oluşumu yoluyla korpus luteum tarafından progesteron üretimini

inhibe eder. Bu nedenle, korpus luteumda gerileyen reaktif oksijen türlerinin artmasından yumurtalık kan akımındaki azalma sorumlu olduğu düşünülmektedir (Sugino 2005).



3. MATERYAL VE METOT

TDK-2022-10742 proje kodlu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından desteklenmiştir.

3.1. Etik Kurul Onayı

“Over İskemi-Reperfüzyon Hasarı Oluşturulan Sıçanlarda Timokinon’un Doku Oksidatif DNA Hasarı Üzerindeki Etkilerinin Biyokimyasal Histotolojik ve Spektroskopik Yöntemlerle Belirlenmesi”, adlı çalışma Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığının, 30.06.2021-178 nolu kararıyla etik kurallara uygun bir çalışma olduğuna karar verilmiştir (Ek-1)

3.2. Deneklerin Temini ve Özellikleri

Çalışmada kullanılan toplam 72 adet 12 haftalık, ortalama 200-220 gram ağırlığında Wistar albino cinsi dişi denek, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi’nden (ATADEM) temin edilerek kullanılmıştır.

3.3. Çalışmanın Deney Grupları

Çalışma 9 ayrı grup oluşturularak yapıldı. Oluşturulan gruplar sırasıyla aşağıdaki gibi adlandırıldı.

1. Grup (8 hayvan): Sağlıklı Grup
2. Grup (8 hayvan): Sham Operasyonu
3. Grup (8 hayvan): 3 Saat Over İskemisi
4. Grup (8 hayvan): 3 Saat Over İskemisi + 3 Saat Reperfüzyon
5. Grup (8 hayvan): 3 Saat Over İskemisi + Timokinon 20 mg/ kg (oral)
6. Grup (8 hayvan): 3 Saat Over İskemisi + Timokinon 40mg/ kg (oral)
7. Grup (8 hayvan): 3 Saat Over İskemisi + 3 Saat Reperfüzyon + Timokinon 20 mg/ kg(oral)

8. Grup (8 hayvan): 3 Saat Over İskemisi + 3 Saat Reperfüzyon + Timokinon 40 mg/ kg (oral)

9. Grup (8 hayvan): Sham Operasyonu + Timokinon 40 mg/ kg (oral)

3.3.1. Cerrahi İşlemler

Her grupta 8 sıçan olacak şekilde 9 ayrı gruba ayrılan toplam 72 dişi sıçan, 25 mg/kg dozda tiopental sodyumla anestezi altına alındı. Her gruba yapılan işlemler sonucunda, sıçanların lateral abdominal bölgesinden 2-3 cm kesilerek karın kası ve periton geçilerek overlerine ulaşıldı ve çalışma için overleri alındı.

Grup 1: Herhangi ilaç ve cerrahi işlem yapılmadı. 3 saat sonra overler cerrahi olarak çıkarıldı.

Grup 2: Sadece karın bölgesi açılarak, herhangi bir uygulama yapılmadan kapatıldı. 3 saat sonra overler cerrahi olarak çıkarıldı.

Grup 3: Overleri besleyen damarlar klemplerle sıkıştırılarak, overlerde iskemi oluşturuldu. 3 saat iskemide kalan overler cerrahi olarak çıkarıldı.

Grup 4: 3 saat boyunca iskemi altında tutulan overler, klempleri çıkartılarak 3 saat boyunca reperfüzyon sağlandı. Bu uygulamanın sonunda overler cerrahi olarak çıkarıldı

Grup 5 ve 6: İskemi oluşturulmadan yarım saat önce oral gavaj yardımıyla, grup 5'e; 20 mg/kg, grup 6'ya; 40 mg/kg Timokinon verildi. Bu uygulamaların ardından overler cerrahi olarak çıkarıldı.

Grup 7 ve 8: İskemi yapılan overlere reperfüzyon uygulamasına başlamadan 30 dakika önce oral gavaj yardımıyla, grup 7'ye; 20, grup 8'e; 40 mg/kg Timokinon verildi. Bu uygulamaların ardından overler cerrahi olarak çıkarıldı.

Grup 9: Bu gruba ise ilaç toksitesini ölçmek için 40 mg/kg Timokinon uygulaması yapıldı. Bu uygulamanın sonunda overler cerrahi olarak çıkarıldı.

Çalışma esnasındaki tüm hayvanlara, iskemi ve reperfüzyon boyunca metamizol sodyum verilerek cerrahi ağrının oluşması engellendi. Çalışma sonrasında tüm deneklere yüksek doz tiopental sodyum verilerek ötanazi edildi. Overlerden, birincisi % 4'lük formaldehit içerisinde histolojik analizler için saklandı. İkinci over ise daha sonra çalışılmak üzere biyokimyasal ve spektrofotometrik analizler için -80 derecede saklandı.

3.3.2. Kimyasallar

Timokinon(C₁₀H₁₂O₂, 2-izopropil-5-metil-1,4-benzokinon) maddesi Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) firmasından temin edilmiştir. Çalışmada, TK'nun rat başına 1 ve 2 mg/kg dozu 1 ml' ye tekabül edecek şekilde %1'lik karboksi metil selüloz (CMC) içinde çözünerek hazırlandı. Hazırlanan çözelti ratlara oral yoldan gavaj yardımıyla verildi.

3.4. Biyokimyasal Analizler

3.4.1. Enzim İmmünölçümler

Enzim immünölçüm, enzimlerin katalitik özelliklerinin kullanıldığı immunokimyasal bir ölçüm yöntemidir. En yaygın kullanılan yöntem ise enzim-bağlı immunosorbent ölçüm (ELISA) tekniğidir. Reaksiyon bileşenlerinden birinin katı faz yüzeye bağlanması sebebi ile bu yöntem heterojen özellik gösterir. Kimyasal, immunokimyasal veya nonspesifik adsorbsiyon şeklinde olabilen bu bağlanma ile serbest işaretli reaktifin bağlı olandan ayrılması kolaylaşır. ELISA yöntemi ile ölçülecek antijeni içeren bir kalibratör veya numune, katı fazdaki antikor ile bağlanabilmesi için bir süre inkübe edilir. İnkübasyondan sonra yıkama işlemi yapılır ve ilk aşamada bağlanmış olan antikordan farklı bir antikor ortama eklenir. Böylece, katı faz antikor-antijen-enzim bağlı antikor sandviç kompleksi oluşur. Bağlı halde olmayan antikor yıkama işlemi ile reaksiyon ortamından uzaklaştırılır ve enzimin substratı eklenir. Numunedeki veya kalibratördeki antijen miktarınca oluşan sandviç kompleksin içerdiği enzim, ortama

eklenen substratı ürüne dönüştürür. Sonuç olarak reaksiyon ortamında elde edilen ürün miktarı, ölçülmek istenen antijen ile doğru orantılı olur.

3.4.2. Doku Homojenatının Hazırlanışı

9 gruba ayırdığımız sıçanların cerrahi işlem sonrası over dokuları alındıktan sonra izotonik çözeltide yıkanıp kurutuldu. Hassas terazide overler tartıldı ve alikotlama işlemi yapılarak -80 derecedeki derin dondurucuya kaldırıldı. Sonrasında biyokimyasal analiz için kademeli şekilde (-80 °C, -20 °C ve +4 °C) çözündürüldü. Çözündürülen over dokuları ağırlığının 10 katı kadar tris tamponu (50 mM, nM pH:7.8, 6.057 g Tris + 500 mL distile su) eklenerek homojenizatörde parçalandı. Sonrasında 3500 rpm’de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant alınarak biyokimyasal, oksidan ve antioksidan parametrelere bakıldı.

3.4.3. Dokuda Protein Tayini

Commassia Brilliant Blue G-250 renk reaktifi: Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözeltidir. Bradford yönteminde boya olarak kullanılan Commassia Brilliant Blue G-250 negatif bir yüke sahiptir. Ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı (λ_{max} : 465 nm) ve mavi (λ_{max} : 595 nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Protein tayini için, 0,100 gr Commassia Brilliant Blue G-250 50 mL %95 lik etanolde çözülerek bu çözeltiye %85 lik 100 mL orto fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi distile su ile 1 L ye tamamlandı.

Kantitatif olarak protein tayin etmek için 1 mL’inde 1 mg protein bulunduran standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 10-20-30-40-50-60-70-80-90-100 μ L konuldu. Distile deiyonize su ile tüm tüplerin hacimleri 0,100 mL ye tamamlandı. Her bir tüpe 5 mL renklendirme reaktifi olan Commassia Brilliant Blue G-250 renk reaktifi ilave edildi. Ve vorteksle karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm’de köre karşı absorbens değerleri okutuldu. Kör olarak 0,1 mL aynı tampon ve 5 mL renk reaktifinden oluşan karışım kullanıldı. Absorbans değerlerine karşılık gelen μ g protein değerleri standart grafik

halinde verildi. Dokuda protein tayini için 10 µL numune + 90 µL distile su + 5 mL Commassia Brilliant Blue G-250 reaktifi katılıp 10 dakika sonra absorbans değerleri 595 nm’de okundu.

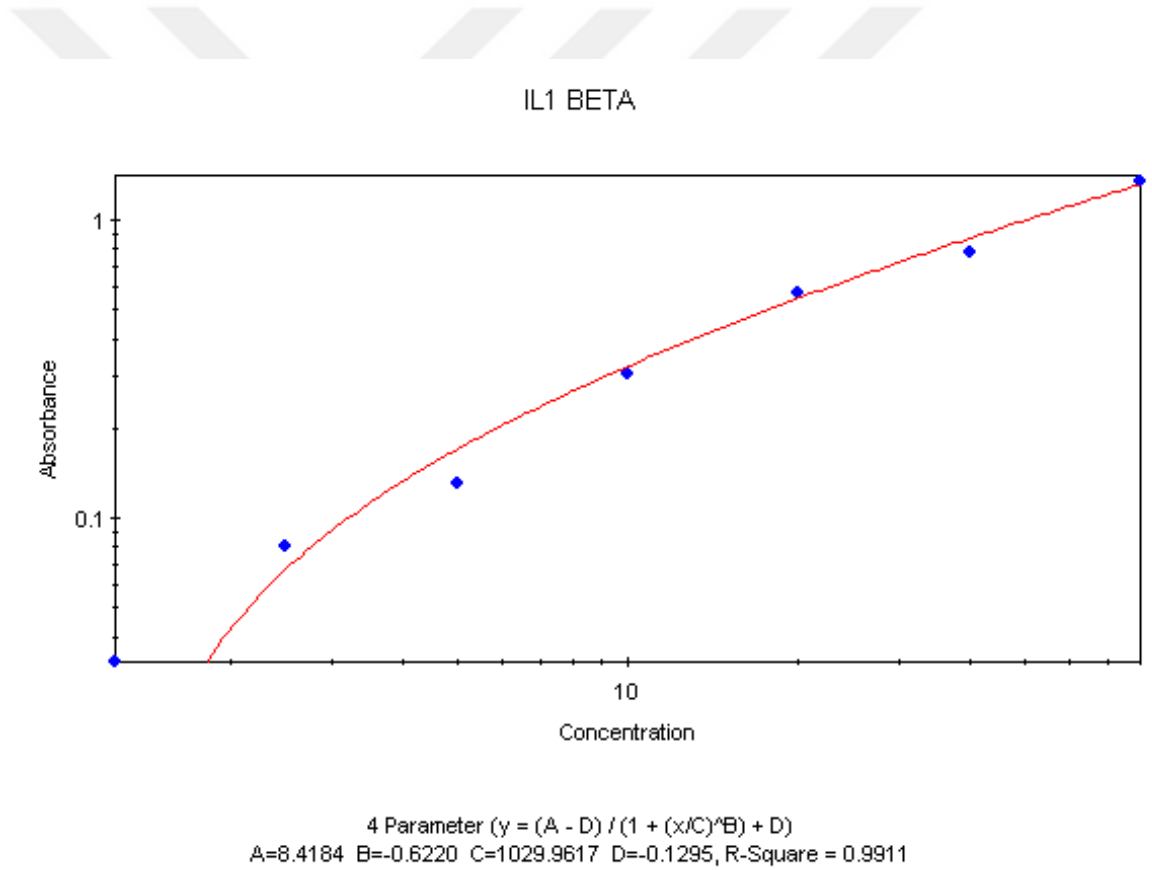
İnterlökin 1-β Ölçümü: Doku homojenatında interlökin 1-β düzeyi ölçümü için ticari ELISA kiti (Rat İnterlökin 1-β ELISA Kit, E0119Ra, Bioassay Technology Laboratory, China) kullanıldı. Doku homojenatı, hücre kültürü süpernatantı, plazma, serum ve diğer biyolojik sıvılarda rat İnterlökin 1-β ölçümü amacıyla üretilen kitin standart eğri aralığı 0,2-60 ng/mL, duyarlılığı 0,08 ng/mL, çalışma içi kesinlik CV değeri <%8, çalışmalar arası kesinlik CV değeri <%10’dur.

Kitin içerisindeki direktifler doğrultusunda aşağıdaki basamaklar takip edilerek doku homojenatında interlökin 1-β analiz edildi:

1. Doku homojenatları ve tüm reaktifler oda sıcaklığında 15 dakika bekletilerek uygun sıcaklığa getirildi.
2. Seri dilüsyon yapılarak 80 ng/ml, 40 ng/ml, 20 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml ve 2,5 ng/ml olacak şekilde 6 adet standart hazırlandı.
3. Numune kuyucuklarına 40 µL doku homojenatı ve 10 µL biyotinlenmiş Rat interlökin 1-β antikoru eklendi, standart kuyucuklarına ise 50 µL standart eklendi.
4. Kör haricindeki tüm standart ve numune kuyucuklarına 50 µL streptavidin-HRP ilave edildi ve 37°C’de 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
5. İnkübasyon bittikten sonra 25 kat seyreltilmiş yıkama solüsyonundan 300 µL kullanılarak beş defa yıkama işlemi yapıldı.
6. Tüm kuyucuklara sırasıyla 50 µL substrat solüsyonu A ve B eklendi. Sonrasında 37°C’de 10 dakika karanlıkta inkübe edildi ve mavi renk oluşumu gerçekleşti.

7. 10 dakikalık inkübasyondan sonra tüm kuyucuklara 50 µL stop solüsyonu eklendi ve mavi rengin sarıya dönüştüğü görüldü.
8. 450 nm’de BIO-TEK PowerWave XS mikropate okuyucu cihazında absorbans değerleri ölçüldü.

Standartların absorbans değerleri kullanılarak elde edilen ve R^2 değeri **0,9911** olan absorbans-konsantrasyon grafiği **Şekil 3.1’de** gösterilmiştir. Standart eğrisinden yola çıkılarak doku homojenatların interlökin 1-β konsantrasyonları ng/mL birimine göre belirlendi.



Şekil 3.1. İnterlökin 1-β standart eğrisi

8-Hidroksideoksiguanozin Ölçümü:

Doku homojenatında 8-Hidroksideoksiguanozin düzeyi ölçümü için ticari ELISA kiti (Rat 8-Hidroksideoksiguanozin ELISA Kit, BLS-8994Ra, Bostonchem, USA) kullanıldı. Doku homojenatı, hücre kültürü süpernatantı, plazma, serum ve diğer biyolojik

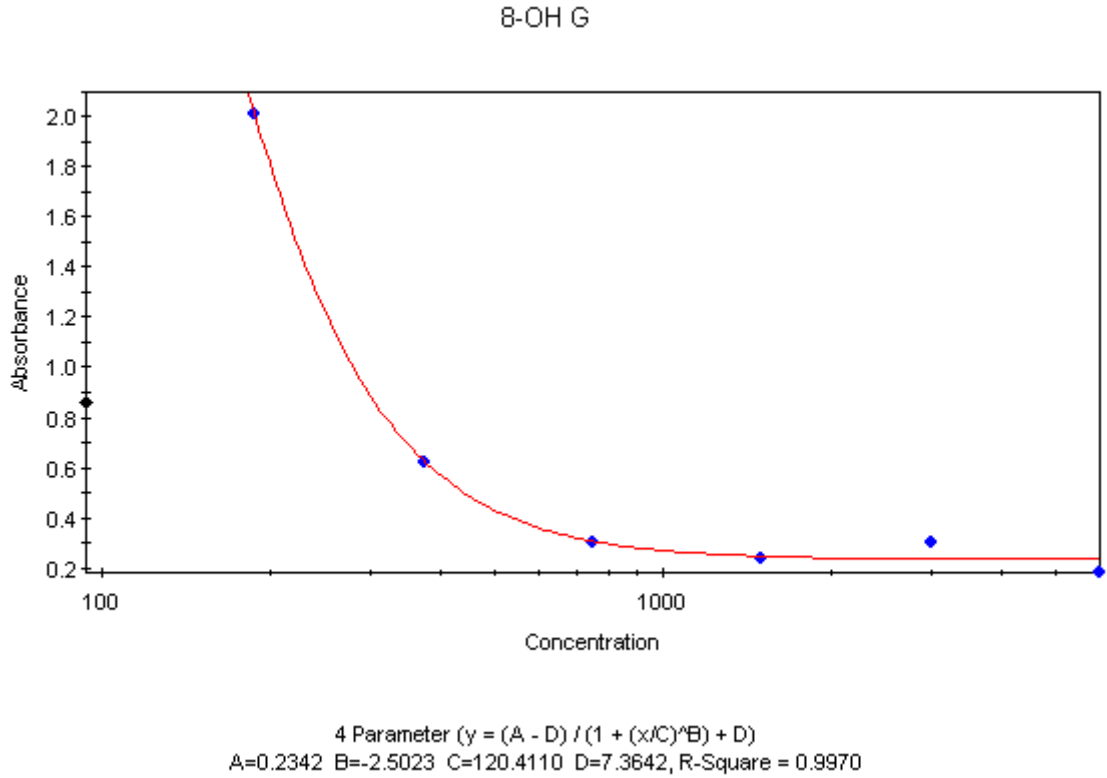
sıvılarda rat 8-Hidroksideoksiguanozin ölçümü amacıyla üretilen kitin standart eğri aralığı 93,75-6000 pg/mL, duyarlılığı 26,29 pg/mL, çalışma içi kesinlik CV değeri <%8, çalışmalar arası kesinlik CV değeri <%10'dur.

Kitin prospektüsüne göre aşağıdaki basamaklar takip edilerek doku homojenatında 8-Hidroksideoksiguanozin analiz edildi:

1. Doku homojenatları ve tüm reaktifler oda sıcaklığında 15 dakika bekletilerek uygun sıcaklığa getirildi.
2. Seri dilüsyon yapılarak 6000 pg/mL, 3000 pg/mL, 1500 pg/mL, 750 pg/mL, 375 pg/mL, 187,5 pg/mL, 93,75 pg/mL olacak şekilde 7 adet standart hazırlandı.
3. 100 kat seyreltilmiş streptavidin-HRP ve biyotinlenmiş konjugatı hazırlandı.
4. Numune kuyucuklarına 50 µL doku homojenatı, standart kuyucuklarına 50 µL standart, kör kuyucuğuna ise 50 µL standart dilüent çözücüsünden eklendi.
5. Tüm kuyucuklara 50 µL 100 kat dilüe edilmiş biyotinlenmiş rat 8-Hidroksideoksiguanozin antikoru eklendi ve 37°C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyondan sonra kuyucuklardaki karışım aspire edildi ve 25 kat dilüe edilmiş yıkama solüsyonundan 200 µL kullanılarak üç defa yıkama işlemi yapıldı.
7. Tüm kuyucuklara 100 µL 100 kat dilüe edilmiş streptavidin-HRP eklendi ve 37°C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
8. İnkübasyondan sonra kuyucuklardaki karışım aspire edildi ve 25 kat dilüe edilmiş yıkama solüsyonundan 200 µL kullanılarak beş defa yıkama işlemi yapıldı.

9. Tüm kuyucuklara sırasıyla 90 µL TMB substrat solüsyonu eklendi. Sonrasında 37°C’de 20 dakika karanlıkta inkübe edildi ve mavi renk oluşumu gerçekleşti.
10. Numune kuyucuklarına 40 µL numune ve 10 µL adiponektin antikoru eklendi.
11. Kör haricindeki tüm standart ve numune kuyucuklarına 50 µL streptavidin-HRP ilave edildi ve 37°C’de 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
12. 20 dakikalık inkübasyondan sonra tüm kuyucuklara 50 µL stop solüsyonu eklendi ve mavi rengin sarıya dönüştüğü görüldü.
13. 450 nm’de BIO-TEK PowerWave XS mikropate okuyucu cihazında absorbans değerleri ölçüldü.

Standartların absorbans değerleri kullanılarak elde edilen ve R^2 değeri **0,9970** olan absorbans-konsantrasyon grafiği **Şekil 3.2’de** gösterilmiştir. Standart eğrisinden yola çıkılarak numunelerin adiponektin konsantrasyonları ng/mL birimine göre belirlendi.



Şekil 3.2. 8-Hidroksideoksiguanozinin standart eğrisi

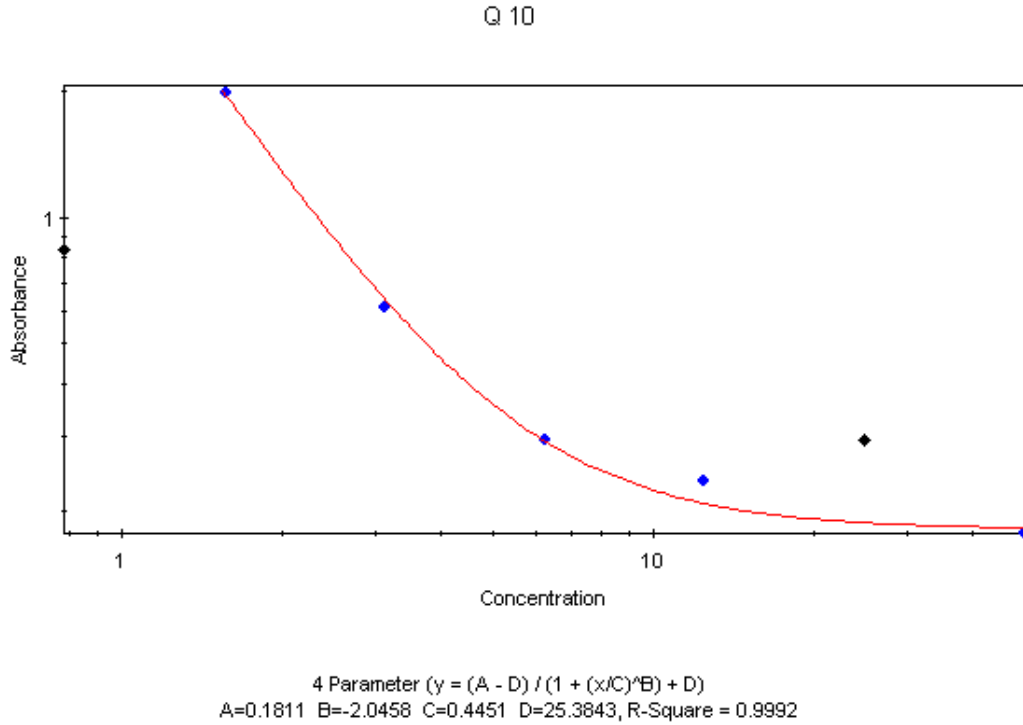
KoenzimQ₁₀ Ölçümü: Doku homojenatında KoenzimQ₁₀ düzeyi ölçümü için ticari ELISA kiti (Rat KoenzimQ₁₀ ELISA Kit, BLS-9442Ra, Bostonchem, USA) kullanıldı. Doku homojenatı, hücre kültürü süpernatantı, plazma, serum ve diğer biyolojik sıvılarda rat KoenzimQ₁₀ ölçümü amacıyla üretilen kitin standart eğri aralığı 0,78-50 ng/mL, duyarlılığı 0,27 ng/mL, çalışma içi kesinlik CV değeri <%8, çalışmalar arası kesinlik CV değeri <%10'dur.

Kitin prospektüsüne göre aşağıdaki basamaklar takip edilerek doku homojenatında KoenzimQ₁₀ analiz edildi:

1. Doku homojenatları ve tüm reaktifler oda sıcaklığında 15 dakika bekletilerek uygun sıcaklığa getirildi.
2. Seri dilüsyon yapılarak 50 ng/mL, 25 ng/mL, 12,5 ng/mL, 6,25 ng/mL, 3,12 ng/mL, 1,56 ng/mL, 0,78 ng/mL olacak şekilde 7 adet standart hazırlandı.
3. 100 kat seyreltilmiş streptavidin-HRP ve biyotinlenmiş konjugatı hazırlandı.
4. Numune kuyucuklarına 50 µL doku homojenatı, standart kuyucuklarına 50 µL standart, kör kuyucuğuna ise 50 µL standart dilüent çözücüsünden eklendi.
5. Tüm kuyucuklara 50 µL 100 kat dilüe edilmiş biyotinlenmiş rat KoenzimQ₁₀ antikorı eklendi ve 37°C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyondan sonra kuyucuklardaki karışım aspire edildi ve 25 kat dilüe edilmiş yıkama solüsyonundan 200 µL kullanılarak üç defa yıkama işlemi yapıldı.
7. Tüm kuyucuklara 100 µL 100 kat dilüe edilmiş streptavidin-HRP eklendi ve 37°C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
8. İnkübasyondan sonra kuyucuklardaki karışım aspire edildi ve 25 kat dilüe edilmiş yıkama solüsyonundan 200 µL kullanılarak beş defa yıkama işlemi yapıldı.

9. Tüm kuyucuklara sırasıyla 90 µL TMB substrat solüsyonu eklendi. Sonrasında 37°C’de 20 dakika karanlıkta inkübe edildi ve mavi renk oluşumu gerçekleşti.
10. Numune kuyucuklarına 40 µL numune ve 10 µL adiponektin antikoru eklendi.
11. Kör haricindeki tüm standart ve numune kuyucuklarına 50 µL streptavidin-HRP ilave edildi ve 37°C’de 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
12. 20 dakikalık inkübasyondan sonra tüm kuyucuklara 50 µL stop solüsyonu eklendi ve mavi rengin sarıya dönüştüğü görüldü.
13. 450 nm’de BIO-TEK PowerWave XS mikropate okuyucu cihazında absorbans değerleri ölçüldü.

Standartların absorbans değerleri kullanılarak elde edilen ve R^2 değeri **0,9992** olan absorbans-konsantrasyon grafiği **Şekil 3’de** gösterilmiştir. Standart eğrisinden yola çıkılarak numunelerin adiponektin konsantrasyonları ng/mL birimine göre belirlendi.



Şekil 3.3. KoenzimQ10’un standart eğrisi

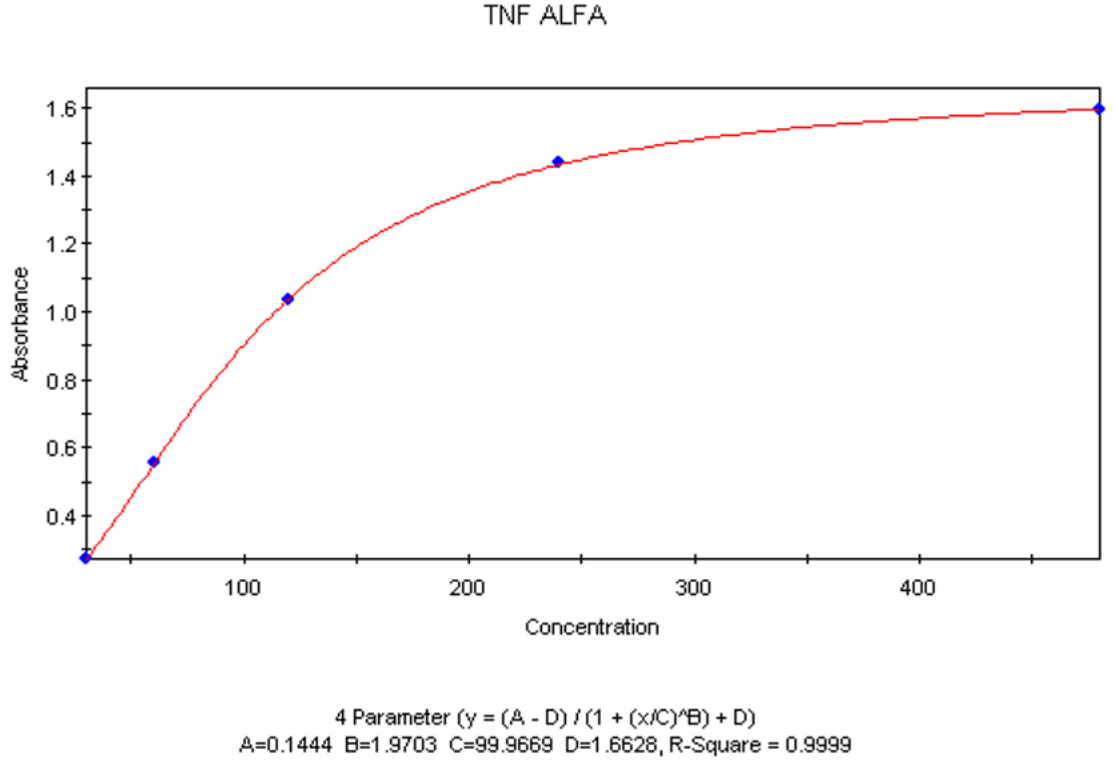
TNF-alfa Ölçümü:

Doku homojenatında TNF-alfa düzeyi ölçümü için ticari ELISA kiti (Rat TNF-alfa ELISA Kit, E0764Ra, Bioassay Technology Laboratory, China) kullanıldı. Doku homojenatı, hücre kültürü süpernatantı, plazma, serum ve diğer biyolojik sıvılarda rat TNF-alfa ölçümü amacıyla üretilen kitin standart eğri aralığı 5-1000 ng/L, duyarlılığı 2.51 ng/L, çalışma içi kesinlik CV değeri <%8, çalışmalar arası kesinlik CV değeri <%10'dur.

Kitin içerisindeki direktifler doğrultusunda aşağıdaki basamaklar takip edilerek serum numunesinde adiponektin analiz edildi:

1. Oda sıcaklığına getirilen standartlar, numuneler ve tüm reaktifler hazırlandı.
2. Seri dilüsyon yapılarak 1280 ng/L, 640 ng/L, 320 ng/L, 160 ng/L, 80ng/L, 40 ng/mL, 20 ng/L olacak şekilde 7 adet standart hazırlandı ve standart kuyucuklarına 50 µL standart eklendi.
3. Numune kuyucuklarına 40 µL numune ve 10 µL TNF-alfa antikoru eklendi.
4. Kör haricindeki tüm standart ve numune kuyucuklarına 50 µL streptavidin-HRP eklendi, kuyucukların üzeri kapatılarak 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.
5. Her bir kuyucuk için 300 µL yıkama solüsyonu kullanılarak beş defa yıkama yapıldı.
6. Kör, standart ve numune kuyucuklarına ellişer µL substrat solüsyonu A ve B eklendi, mavi renk oluşumu gerçekleşti. Kuyucukların üzeri kapatılarak 37°C'de 10 dakika karanlıkta inkübe edildi.
7. Her bir kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyonu eklendi, mavi rengin sarıya dönüştüğü görüldü. 10 dakika içerisinde 450 nm'de BIO-TEK PowerWave XS mikropate okuyucu cihazında absorbans değerleri ölçüldü.

Standartların absorbans değerleri kullanılarak elde edilen ve R^2 değeri 0,9999 olan absorbans-konsantrasyon grafiği Şekil 3.4’de gösterilmiştir. Standart eğrisinden yola çıkılarak numunelerin adiponektin konsantrasyonları mg/L birimine göre belirlendi.



Şekil 3.4. TNF-alfa’nın standart eğrisi

Malondialdehit  l  m  (MDA):

Her bir over dokusu  rneęi 15 mg olacak şekilde steril tüplere aktarıldı. Litesinde 100 gram içeren potasyum klorür (KCl_2) tampon  z ltisi hazırlandı. Steril tüplerde buluna over dokusuna 1.5 mL KCl_2 tampon  z ltisi eklenerek soğukta homojen hale getirildi. Homojen hale getirilen over doku homojenatları bir saat olmak üzere 4 C’de ve 10.000 g’de santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra 2 mL ependorf tüpüne; 0,2 mL 80 g/L sodyum lauril sülfat, 1,5 mL 200 g/L asetik asit, 1,5 mL 8 g/L tiyobarbütirik asit sulu  z lti ve 0,3 mL distile su içeren karışıma santrifüj edilen 0,25 mL doku homojenatı eklendi ve karıştırılarak homojen hale getirildi. Sıcak su banyosunda 45 dakika boyunca ısıtıldı. Sonrasında soğutulma işlemi yapıldı. Soęutulduktan sonra her bir numune

örneğine 4 mL n-bütanol ilave edildi ve santrifüj işlemi yapıldı. Santrifüj işleminden sonra üstteki süpernatant kısmından 150 µL alınarak 96 kuyucuklu plate aktarıldı. Standartlar 1,1,3,3 tetrametoksipropandan oluşan seri dilüsyon yapılarak hazırlandı ve 150 µL alınarak 96 kuyucuklu plate aktarıldı. 532 nm'de spektrofotometre cihazında (Bio-Tek, Winooski, VT, ABD) absorbans ölçüldü. Standart eğri kullanılarak MDA sonuçları, dokunun gramı başına nanomol birimi (nmol/mg protein) cinsinden ifade edildi (Ohkawa ve ark., 1979).

Süperoksit dismutaz Ölçümü (SOD):

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivite ölçümü, ksantin-ksantin oksidaz sistemi tarafından dönüştürülen süperoksit radikal oluşumuna dayanır, sistem formazan boyası oluşturmak için nitroblue tetrazolyum (NBT) ile reaksiyona girer. SOD aktivitesi tahlili, NBT indirgeme yöntemiyle formazan boyası spektrofotometrik ölçüme dayanır. SOD ölçümü manuel yöntemler kullanılarak tespit edilmiştir (Sun ve ark., 1988). Sonuçlar U/mg protein olarak verildi.

Katalaz Ölçümü:

Katalaz (KAT) aktivite ölçümü, hidrojen peroksit (H_2O_2) tüketimine dayanır. KAT aktivitesini ölçmek için süpernatant numuneleri ependorflara aktarıldı ve fosfat tamponunda H_2O_2 solüsyonu ile karıştırıldı. Numuneler 96 kuyucuklu plate aktararak 240 nm'de ölçüldü. Katalaz aktivitesi dakikada 1 nanomol H_2O_2 'yi parçalamak için gereken enzim miktarı olarak tanımlandı. Deney manuel yöntemle yapıldı (Aebi 1984). Sonuçlar U/mg protein olarak verildi.

GSH (Glutasyon) Ölçümü:

Manuel yöntemlerle ölçülen GSH seviyesi şu prensibe göre analiz edilmiştir. Ölçüm ortamındaki DTNB 5,5'-Ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) disülfid bir kromojendir ve sülfhidril gruplu bileşikler tarafından kolayca indirgenir. Meydana gelen sarı renk 412

nm spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Glutatyon analizi manuel yöntem kullanılarak yapıldı (Sedlak and Lindsay 1968). Elde edilen sonuçlar nmol/mg protein doku olarak hesaplandı.

3.5. Histolojik Analizler

3.5.1. Doku Kesitlerinin Alınması

Alınan ovaryum doku örnekleri 72 saat %10'luk formaldehit solüsyonunda fikse edildi. Akabinde dokular 30 dakika akan suda fiksatifin uzaklaştırılması amacı ile yıkandı. Daha sonra dokulardan suyun uzaklaştırılması amacı ile artan derecelerde alkol serilerinden (%70, %80 ve %96) birer saat geçirildi ve %96'lık alkolde 1 gece bekletildi. Ardından %99 iki değişim alkollerde de birer saat bekletildi ve dokunun şeffaflaştırılması amacı ile iki değişim 15'şer dakika ksilen serilerinden geçirilip 60 °C etüv içerisinde beklemiş üç değişim parafin serilerinde birer saat bekletilerek parafinin dokuya emdirilmesi sağlandı. Daha sonra kesit alınabilmesi için doku örnekleri bloklandı ve bloklanan dokulardan 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Kesitler Hematoksilen ve eozin boyası ile boyandı.

3.5.2. Hematoksilen-Eozin(H&E) Boyama Protokolü

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemine tabi tutuldu ardından iki değişim ksilol serisinde 20 ve 10 dakika, %99, %96, %80, %70 alkol serileri ve distile suda 3'er dakika bekletildi. Ardından çekirdeklerin boyaması amacı ile 5 dakika hematoksilen boyası ile boyandı ve fazla boyanın yıkanması için akan su altında 5 dakika bekletildi. Takiben hücrelerin sitoplazmasının boyanması amacı ile eozin boyası ile 5 dakika boyandı ve daha sonra artan alkol serilerinde (%70, %80,%96,%99) çalkalanıp iki değişim ksilol (20 dakika ve 10 dakika) serisine alındı. Ardından entellan ile kapatıldı. Kesitler Olympus CX 21 kamera ataçmanlı mikroskop ile incelendi ve fotoğraflandı. Son olarak ise kesit fotoğraflar Photoshop CS5 ile bir araya getirdi.

3.6. Spektroskopik Analiz

3.6.1. Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektroskopisi (FİTR)

3.6.1.1. Doku İR spektrumlarının Elde Edilmesi

Spektrumlar Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM)'da yer alan Bruker Vertex 70 ATR-FTIR spektroskopisi kullanılarak toplandı. Çalışılan gruplardan elde edilen ovaryum doku örnekleri ATR-FTIR spektroskopisi kristalinin (Elmas/ZnSe) üzerine konularak, sabit basınç altında, 4000-400 cm^{-1} frekans aralığında, 4 cm^{-1} çözünürlükte ve 32 tarama sayısı ile OPUS 7.5 yazılımı (Bruker Optics, GmbH) kullanılarak elde edildi. Her grupta bulunan dokulardan her grup için 6 spektrum elde edildi ve spektrumlara kemometrik analizler uygulandı.

3.6.1.2. Spektral Verilerin Kemometrik Analizleri

Grupların birbirleri arasındaki farklılıkları/bağlantıları ortaya koymak amacıyla aşağıda tabloda verilen örneklem grupları için, kemometrik analiz metodlarından olan gözetimsiz (unsupervised) örüntü tanıma yöntemlerinden, hiyerarşik kümeleme (HCA) analizi kullanıldı. Analiz için Unscrambler X 10.3 (Camo Software, Inc.) programı kullanıldı.

Tablo 3.1. Spektroskopik analizlerde kullanılan deney grupları

Örneklem Grupları	Amaç
Sham-ISC-IR	İskemi ve iskemi reperfüzyon gruplarında oluşan etkileri shamle karşılaştırmak
Sham-ShamTK40	TK40 uygulamasını sham ile karşılaştırmak
Sham- ShamTK40-ISC-ISCTK20-ISCTK40	İskemi durumunda TK uygulamasının etkilerini shame göre kıyaslamak
Sham- ShamTK40-IR-IRTK20-IRTK40	İskemi reperfüzyon durumunda TK uygulamasının etkilerini shame göre kıyaslamak

HCA analizleri için örnek spektrumlarına baseline düzeltmesi ardından Savitzky Golay -17 smoothing points parametreleri kullanılarak düzeltme yapıldı. Analiz için 3800-925 cm⁻¹ spektral bölge kullanıldı. HCA sonuçları ise dendrogram grafikleri şeklinde gösterildi.

3.7. İstatistiksel Analizler

Çalışmada istatistiksel analizler One-Way ANOVA Tukey testiyle yapılmıştır. Sağlıklı grubuyla diğer gruplar karşılaştırıldığında * p<0.05, ** p<0.01 ve *** p<0.001 işaretleri kullanılmıştır. IR grubuyla diğer gruplar karşılaştırıldığında # p<0.05, ## p<0.01 ve ### p<0.001 işaretleri kullanılmıştır. ISC+TK20 grubuyla diğer gruplar karşılaştırıldığında δ p<0.05, δδ p<0.01, δδδ p<0.001 işaretleri kullanılmıştır. IR+TK20 grubuyla diğer gruplar karşılaştırıldığında ise λ p<0.05, λλ p<0.01, λλλ p<0.001 işaretleri kullanılmıştır.

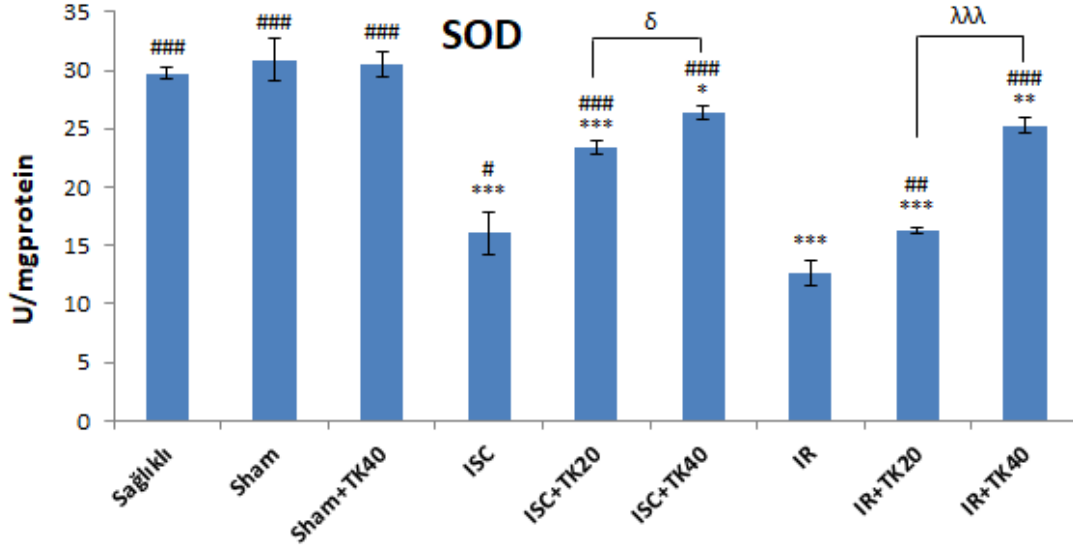
4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

Çalışmada manuel yöntemler kullanılarak oksidan-antioksidan parametrelerden SOD, GSH, CAT ve MDA analizleri yapılmıştır. Şekillerde tüm parametreler protein seviyelerine oranlanmış ve istatistiksel analizleri ile birlikte sunulmuştur.

SOD aktivitesi analizinde Şekil 4.1.'de görüldüğü gibi Sağlıklı, Sham ve Sham+TK40 grupları arasında herhangi bir istatistiksel fark bulunmamıştır. Sağlıklı grubu SOD aktivitesi ile diğer tüm gruplar kıyaslandığında, İskemi (ISC) ve İskemi+Reperfüzyon (IR) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı derecede SOD aktivitelerinin azaldığı görülmüştür ($p<0.001$). Sağlıklı grubunda 29.71 ± 0.53 U/mg protein olarak ölçülen SOD aktivitesi, İskemi grubunda 16.07 ± 1.83 ölçülürken IR grubunda 12.64 ± 1.10 U/mg protein olarak ölçülmüştür. Tedavi gruplarında beklenildiği gibi Timokinon'un (TK) SOD aktivitesini doza bağlı olarak artırdığı görülmektedir (Şekil 1). Sadece iskemi yapılan gruplara kendi arasında bakıldığında ISC+TK20 grubunda SOD seviyesi 23.38 ± 0.52 U/mg protein iken, ISC+TK40 grubunda 26.38 ± 0.53 U/mg protein olarak ölçülmüştür. Timokinon'un 40mg/kg dozunda uygulandığı İskemi+TK40 grubunda SOD seviyesi, ISC+TK20 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). IR gruplarına bakıldığında SOD aktiviteleri, IR+TK20 grubunda 16.27 ± 0.31 ve IR+TK40 grubunda 25.28 ± 0.65 U/mg protein olarak tespit edilmiştir. IR grubu ile diğer gruplar kıyaslandığında SOD aktivitesinin reperfüzyon hasarına bağlı olarak IR grubunda en az seviyede olduğu tespit edilmiştir. IR grupları kendi aralarında analiz edildiğinde, IR+TK40 grubunun SOD aktivitesinin IR+TK20 grubundan fazla olduğu ve istatistiksel olarak bu farkın anlamlı derecede olduğu tespit edilmiştir ($p<0.001$). Timokinon uygulaması Şekil 4.1.'de görüldüğü gibi

iskemi-reperfüzyon gruplarında da iskemi gruplarında olduğu gibi doza bağlı olarak SOD aktivitesini artırmıştır.

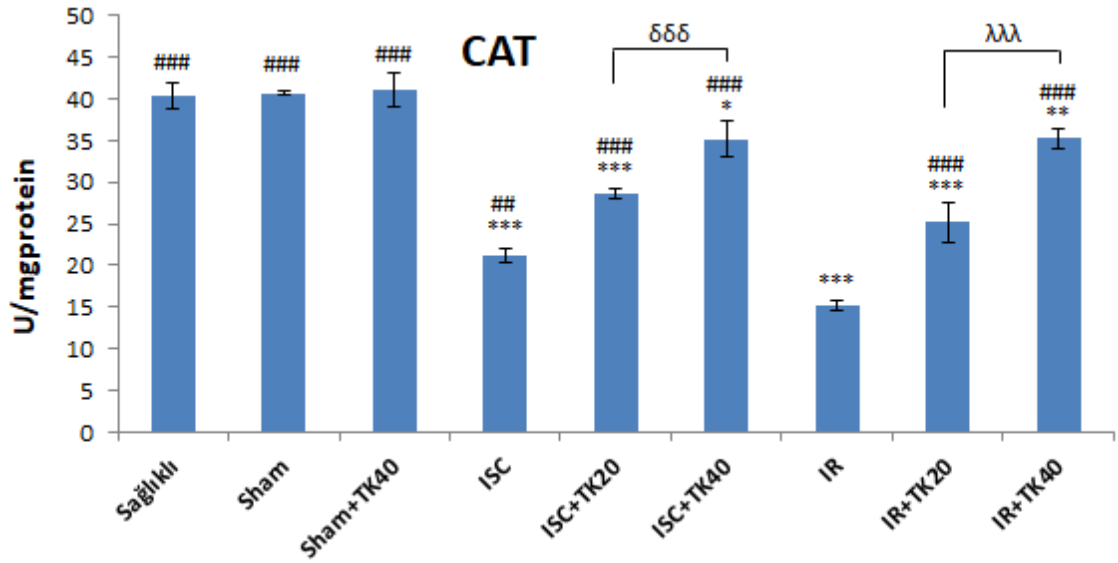


Şekil 4.1. Rat overlerinde ölçülen SOD aktivitesi.

TK: Timokinin, ISC: İskemi, IR: İskemi Reperfüzyon. TK20: 20mg/kg timokinin, TK40: 40mg/kg timokinin. Sağlıklı grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde * p<0.05, ** p<0.01 ve *** p<0.001 işaretleri kullanılmıştır. IR grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde # p<0.05, ## p<0.01 ve ### p<0.001 işaretleri kullanılmıştır. ISC+TK20 grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde δ p<0.05, δδ p<0.01, δδδ p<0.001 işaretleri kullanılmıştır. IR+TK20 grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde ise λ p<0.05, λλ p<0.01, λλλ p<0.001 işaretleri kullanılmıştır.

Çalışmamızda analiz edilen diğer antioksidan enzim katalaz (CAT) dır (Şekil 4.2.). CAT aktiviteleri Sağlıklı, Sham ve Sham+TK40 gruplarında istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. Analiz sonucunda CAT aktiviteleri Sağlıklı, Sham ve Sham+TK40 gruplarında sırasıyla, 40.31 ± 1.53 , 40.71 ± 0.20 ve 41.13 ± 2.03 U/mg protein olarak ölçülmüştür. İskemi yapılan gruplara bakıldığında; iskemi grubunda CAT aktivitesi 21.18 ± 0.91 olarak ölçülmüş ve sağlıklı grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derece azaldığı analiz edilmiştir (p<0.001). Timokinin uygulanan gruplarda CAT aktivitesi, İskemi+TK20 grubunda 28.55 ± 0.63 U/mg protein iken, ISC+TK40 grubunda 35.18 ± 2.21 U/mg protein olarak ölçülmüştür. Timokinin'un 40mg/kg dozunda uygulandığı ISC+TK40 grubunda CAT seviyesinin, ISC+TK20 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görülmüştür (p<0.001). IR gruplarına

bakıldığında timokinon uygulamasının katalaz aktivitesinin sağlıklı seviyelerine yaklaştırdığı ve bu artışın da doza bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir. IR grubunda CAT aktivitesi 15.22 ± 0.64 U/mg protein, IR+TK20 grubunda 25.16 ± 2.37 U/mg protein ve IR+TK40 grubunda 35.24 ± 1.28 U/mg protein olarak ölçülmüştür. TK20 ve TK40 gruplarındaki CAT aktivite artışı istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0.001$).

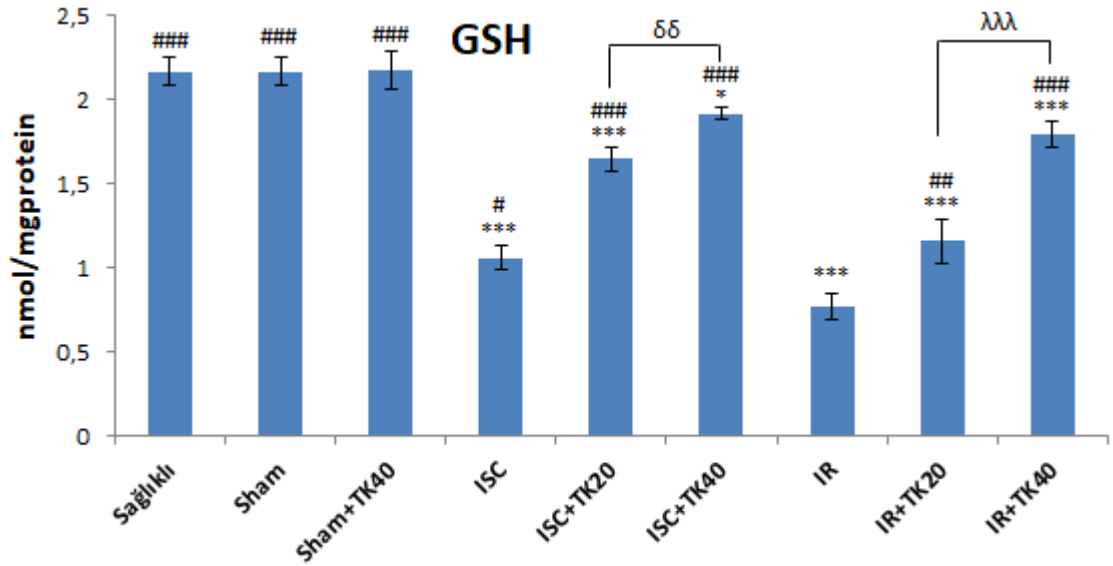


Şekil 4.2. Rat overlerinde ölçülen CAT aktivitesi.

TK: Timokinon, ISC: İskemi, IR: İskemi Reperfüzyon. TK20: 20mg/kg timokinon, TK40: 40mg/kg timokinon. Sağlıklı grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$ işaretleri kullanılmıştır. IR grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ ve ### $p < 0.001$ işaretleri kullanılmıştır. ISC+TK20 grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde δ $p < 0.05$, δδ $p < 0.01$, δδδ $p < 0.001$ işaretleri kullanılmıştır. IR+TK20 grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde ise λ $p < 0.05$, λλ $p < 0.01$, λλλ $p < 0.001$ işaretleri kullanılmıştır.

Glutasyon seviyesinin tespit edildiği GSH analizinde (Şekil 4.3.) sonuçlarımız SOD ve CAT sonuçlarını desteklemektedir. Sağlıklı grubunda 2.16 ± 0.07 nmol/mg protein olarak ölçülen GSH, ISC grubunda 1.05 ± 0.07 nmol/mg protein olarak ölçülürken, IR grubunda 0.77 ± 0.07 nmol/mg protein olarak ölçülmüştür. İskemi ve IR gruplarında ölçülen GSH değerleri Sağlıklı grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecelerde azalmıştır ($p < 0.001$). ISC grubunda ölçülen GSH seviyesi IR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede farklıdır ($p < 0.05$). İskemi gruplarına kendi aralarında

bakıldığında timokinon uygulamasının doza bağlı olarak GSH seviyelerini artırdığı tespit edilmiştir. GSH seviyeleri ISC+TK20 grubunda 1.64 ± 0.07 nmol/mg protein olarak ölçülürken, ISC+TK40 grubunda 1.91 ± 0.03 nmol/mg protein olarak ölçülmüştür. Doza bağlı olan bu artışta yine kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklıdır ($p<0.01$). İskemi reperfüzyon yapılan IR gruplarına bakıldığında IR grubunda 0.77 ± 0.07 nmol/mg protein olarak ölçülen GSH seviyesi, IR+TK20 grubunda 1.16 ± 0.13 iken IR+TK40 grubunda 1.79 ± 0.07 nmol/mg protein olarak tespit edilmiştir. IR+TK20 ve IR+TK40 grubunda tespit edilen GSH seviyeleri de yine doza bağlı olarak ve istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı görülmüştür ($p<0.001$).

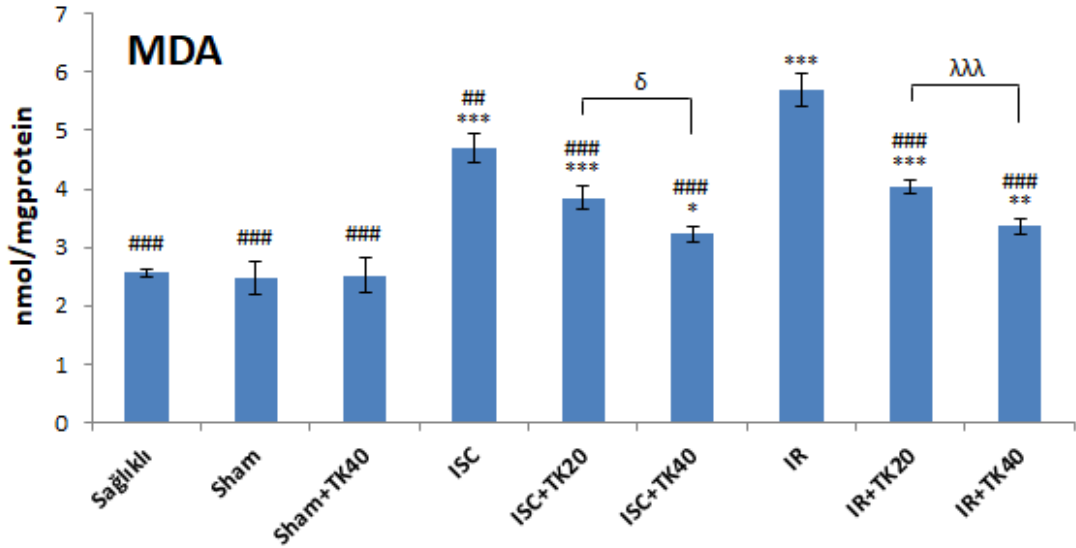


Şekil 4.3. Rat overlerinde ölçülen GSH seviyesi.

TK: Timokinon, ISC: İskemi, IR: İskemi Reperfüzyon. TK20: 20mg/kg timokinon, TK40: 40mg/kg timokinon. Sağlıklı grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$ işaretleri kullanılmıştır. IR grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde # $p<0.05$, ## $p<0.01$ ve ### $p<0.001$ işaretleri kullanılmıştır. ISC+TK20 grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde δ $p<0.05$, δδ $p<0.01$, δδδ $p<0.001$ işaretleri kullanılmıştır. IR+TK20 grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde ise λ $p<0.05$, λλ $p<0.01$, λλλ $p<0.001$ işaretleri kullanılmıştır.

Oksidatif stresin önemli bir göstergesi olan MDA analizi çalışmamızın bir diğer bulgusudur. MDA seviyeleri Sağlıklı, Sham ve Sham+TK40 gruplarında istatistiksel farklılık göstermemiştir (Şekil 4.4.). Sağlıklı grubunda MDA seviyesi 2.56 ± 0.07

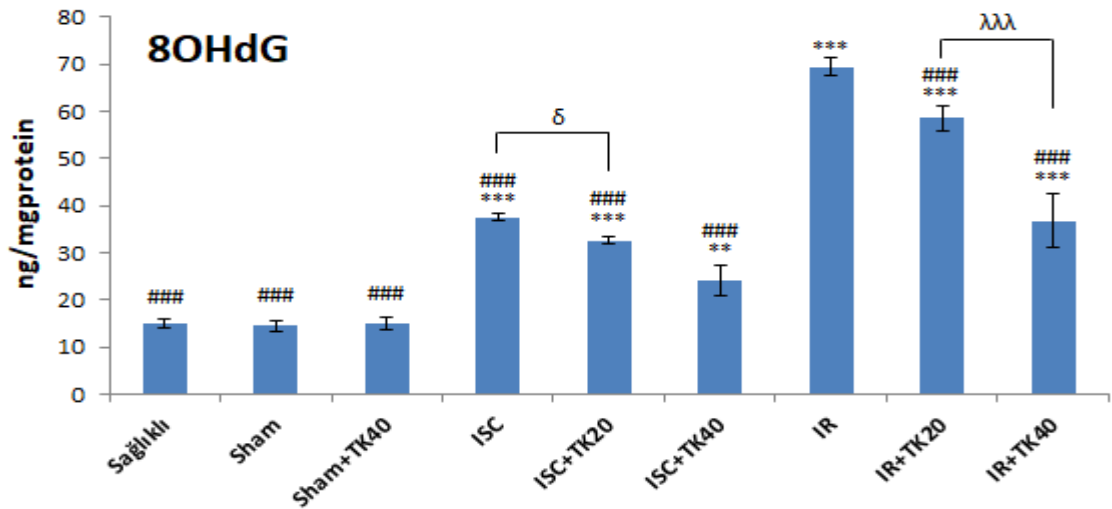
nmol/mg protein olarak ölçülmüştür. ISC grubunda MDA seviyesi 4.70 ± 0.24 olarak ölçülmüştür. İskemiye bağlı oluşan bu artış Sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.001$). Timokinin uygulanan gruplarda MDA seviyeleri ISC+TK20 grubunda 3.84 ± 0.20 nmol/mg protein olarak ölçülürken, ISC+TK40 grubunda 3.22 ± 0.12 nmol/mg protein olarak ölçülmüştür. Doza bağlı olarak ortaya çıkan bu azalma istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). İskemi reperfüzyon gruplarına kendi aralarında bakıldığında artmış olan MDA seviyelerinin tedavi gruplarında yine doza bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir. IR grubunda MDA seviyesi 5.69 ± 0.27 nmol/mgprotein iken IR+TK20 grubunda bu seviye 4.02 ± 0.11 nmol/mg protein seviyesine gerilemiştir. Timokinin'in 20mg/kg uygulandığı bu grupta MDA seviyesi IR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$). IR uygulanan ve tedavi uygulanan gruplara kendi aralarında bakıldığında IR+TK40 grubunda MDA seviyesi 3.36 ± 0.14 nmol/mg protein seviyesine gerilemiştir ve bu azalmanın bu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0.001$).



Şekil 4.4. Rat overlerinde ölçülen MDA seviyesi.

TK: Timokinin, ISC: İskemi, IR: İskemi Reperfüzyon. TK20: 20mg/kg timokinin, TK40: 40mg/kg timokinin. Sağlıklı grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$ işaretleri kullanılmıştır. IR grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde # $p<0.05$, ## $p<0.01$ ve ### $p<0.001$ işaretleri kullanılmıştır. ISC+TK20 grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde δ $p<0.05$, δδ $p<0.01$, δδδ $p<0.001$ işaretleri kullanılmıştır. IR+TK20 grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde ise λ $p<0.05$, λλ $p<0.01$, λλλ $p<0.001$ işaretleri kullanılmıştır.

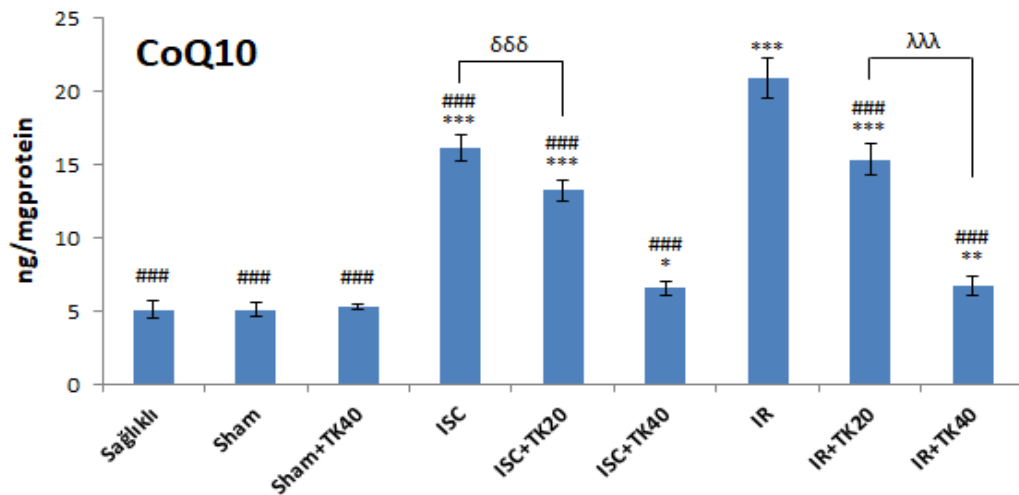
DNA hasarının göstergesi olarak kullanılan 8OHdG seviyesi proteine oranlanarak ve istatistiksel analizi yapılarak Şekil 4.5.'de gösterilmiştir. Sağlıklı grubunda 14.90 ± 0.83 ng/mg protein olarak ölçülmüştür. Sağlıklı grubu ile Sham ve Sham+TK40 grubu arasında herhangi bir istatistiksel bir fark bulunmamıştır. ISC grubunda beklenildiği gibi doku hasarına bağlı olarak 8OHdG seviyesinin 37.46 ± 0.72 ng/mg protein seviyesine yükseldiği ve bu artışın Sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0.001$). Timokinin uygulanan iskemi gruplarına bakıldığında ISC+TK20 grubunda 8OHdG seviyesi 32.56 ± 0.81 ng/mg protein iken ISC+TK40 grubunda 24.06 ± 3.28 ng/mg protein olarak ölçülmüştür. IR grubuna bakıldığında 8OHdG seviyesinin 69.40 ± 1.87 ng/mg protein olarak en yüksek değer ölçülmüştür. Tedavi gruplarında IR+TK20 grubunda 58.57 ± 2.64 seviyesi ölçülürken, IR+TK40 grubunda 36.76 ± 5.66 ng/mg protein seviyesi ölçülmüştür. Her iki tedavi grupta da 8OHdG seviyesi IR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecelerde azalmıştır ($p < 0.001$). Ayrıca IR+TK20 ve IR+TK40 gruplarına kendi aralarında bakıldığında yüksek doz timokinin uygulamasının 8OHdG seviyesini anlamlı derecede azalttığı tespit edilmiştir ($p < 0.001$).



Şekil 4.5. Rat overlerinde ölçülen 8OHdG seviyesi.

TK: Timokinin, ISC: İskemi, IR: İskemi Reperfüzyon. TK20: 20mg/kg timokinin, TK40: 40mg/kg timokinin. Sağlıklı grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$ işaretleri kullanılmıştır. IR grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ ve ### $p < 0.001$ işaretleri kullanılmıştır. ISC+TK20 grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde δ $p < 0.05$, $\delta\delta$ $p < 0.01$, $\delta\delta\delta$ $p < 0.001$ işaretleri kullanılmıştır. IR+TK20 grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde ise λ $p < 0.05$, $\lambda\lambda$ $p < 0.01$, $\lambda\lambda\lambda$ $p < 0.001$ işaretleri kullanılmıştır.

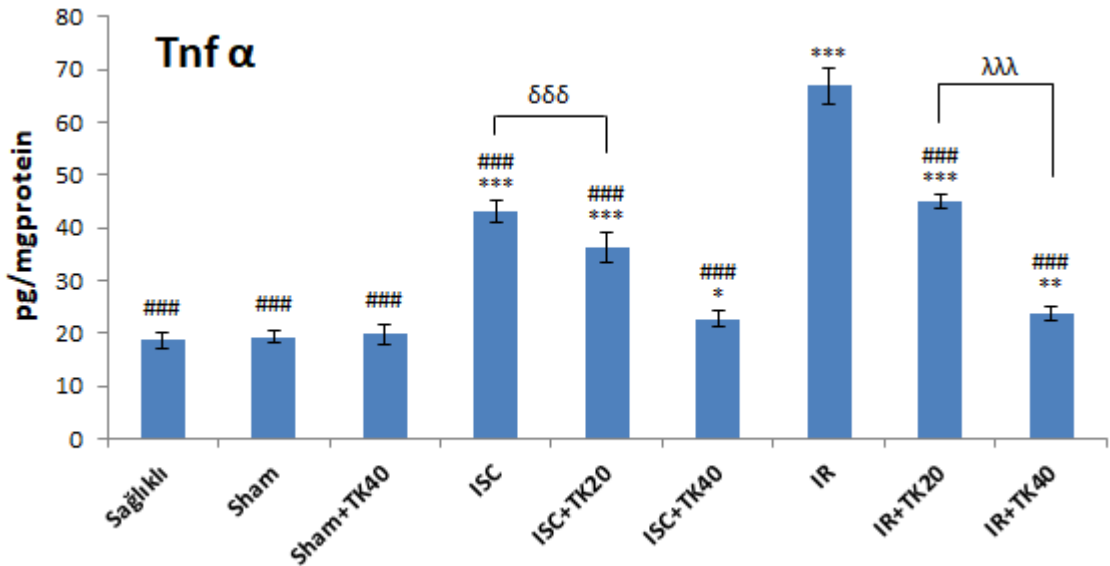
Çalışmamızın bir diğer bulgusu mitokondriyel enzim sisteminin önemli kofaktörü olan CoQ10'dir. Şekil 4.6.'da gösterildiği gibi artan oksidatif hasarın bir sonucu olarak iskemi ve reperfüzyon hasarında CoQ10 seviyeleri bizim çalışmamızda da artmıştır. Sağlıklı grubunda CoQ10 seviyesi 5.10 ± 0.63 ng/mg protein olarak ölçülürken Sham ve Sham+TK40 grupları ile istatistiksel olarak farklılık tespit edilmemiştir. İskemi grubunda CoQ10 seviyesi 16.19 ± 0.88 iken IR grubunda bu seviye reperfüzyon hasarına bağlı olarak 20.93 ± 1.35 ng/mg protein seviyesine yükselmiştir. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı olarak belirlenmiştir ($p < 0.001$). ISC+TK20 grubunda CoQ10 seviyesi 13.27 ± 0.71 ng/mg protein olarak ölçülürken ISC grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlemlenmiştir ($p < 0.001$). ISC+TK40 grubuna bakıldığında CoQ10 seviyesi 6.55 ± 0.43 seviyesinde ölçülmüştür. Bu değer Timokinin'un yüksek dozunun CoQ10 seviyesini Sağlıklı grubuna en fazla yaklaştıran grup olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$). IR gruplarına kendi aralarında bakıldığında benzer şekilde Timokinin doza bağlı olarak CoQ10 seviyesi IR grubuna göre anlamlı derecede azaltmıştır ($p < 0.001$). CoQ10 seviyeleri IR+TK20 ve IR+TK40 gruplarında sırasıyla, 15.35 ± 1.06 ve 6.72 ± 0.61 ng/mg protein olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.6. Rat overlerinde ölçülen CoQ10 seviyesi.

TK: Timokinin, ISC: İskemi, IR: İskemi Reperfüzyon. TK20: 20mg/kg timokinin, TK40: 40mg/kg timokinin. Sağlıklı grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$ işaretleri kullanılmıştır. IR grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ ve ### $p < 0.001$ işaretleri kullanılmıştır. ISC+TK20 grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde δ $p < 0.05$, $\delta\delta$ $p < 0.01$, $\delta\delta\delta$ $p < 0.001$ işaretleri kullanılmıştır. IR+TK20 grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde ise λ $p < 0.05$, $\lambda\lambda$ $p < 0.01$, $\lambda\lambda\lambda$ $p < 0.001$ işaretleri kullanılmıştır.

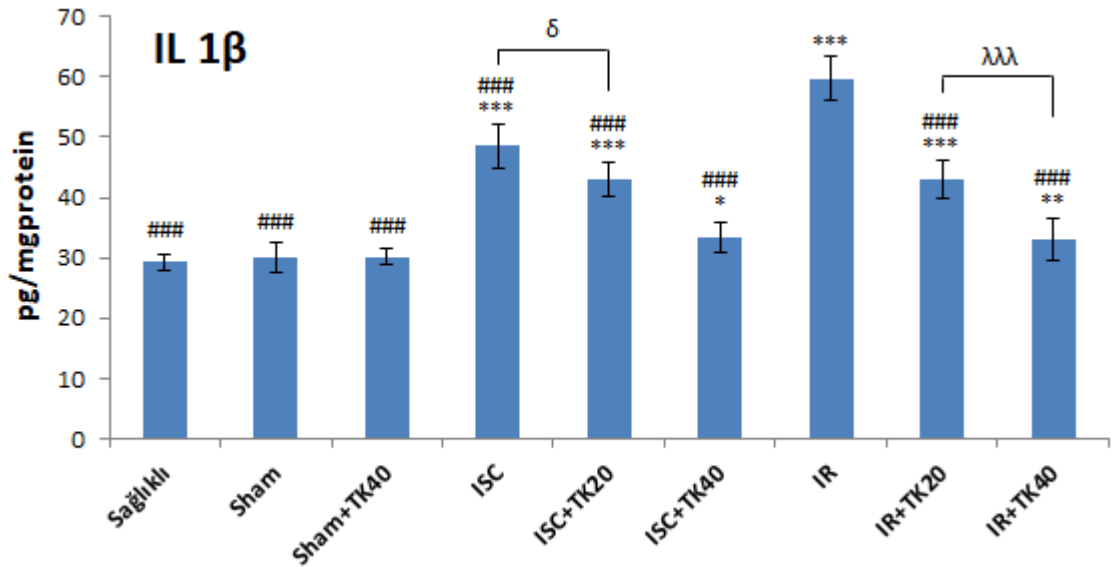
Biyokimyasal analizlerimizin son bölümünde proinflatuar sitokinlerden Tnf α ve IL 1B seviyelerini araştırdık. Sonuçları protein seviyelerine oranladık ve istatistiksel analizlerle birlikte gösterdik. Sağlıklı Tnf α seviyelerine bakıldığında Sham ve Sham+TK40 gruplarında istatistiksel fark bulunmamıştır (Şekil 4.7.). Sağlıklı Tnf α değeri 18.59 ± 1.45 pg/mg protein olarak ölçülmüştür. Tnf α seviyeleri ISC grubunda 43.04 ± 2.19 iken IR grubunda 66.88 ± 3.36 pg/mg protein olarak ölçülmüştür. ISC ve IR gruplarında bu artış Sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı olarak belirlenmiştir ($p < 0.001$). İskemi gruplarında timokinon uygulaması doza bağlı olarak Tnf α seviyelerini anlamlı derecede azaltmıştır ($p < 0.001$). Tnf α seviyeleri ISC+TK20 grubunda 36.24 ± 2.70 iken ISC+TK40 grubunda 22.75 ± 1.40 pg/mg protein olarak ölçülmüştür. İskemi reperfüzyon gruplarına bakıldığında, iskemi gruplarına benzer şekilde Timokinon doza bağlı ve istatistiksel olarak anlamlı derece Tnf α seviyelerini azaltmıştır ($p < 0.001$). Tnf α seviyeleri IR+TK20 ve IR+TK40 gruplarında sırasıyla, 44.96 ± 1.31 ve 23.58 ± 1.35 pg/mg protein olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.7. Rat overlerinde ölçülen Tnf α seviyeleri.

TK: Timokinon, ISC: İskemi, IR: İskemi Reperfüzyon. TK20: 20mg/kg timokinon, TK40: 40mg/kg timokinon. Sağlıklı grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$ işaretleri kullanılmıştır. IR grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ ve ### $p < 0.001$ işaretleri kullanılmıştır. ISC+TK20 grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde δ $p < 0.05$, $\delta\delta$ $p < 0.01$, $\delta\delta\delta$ $p < 0.001$ işaretleri kullanılmıştır. IR+TK20 grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde ise λ $p < 0.05$, $\lambda\lambda$ $p < 0.01$, $\lambda\lambda\lambda$ $p < 0.001$ işaretleri kullanılmıştır.

IL 1B seviyelerine bakıldığında (Şekil 4.8.) Sağlıklı, Sham ve Sham+TK40 grupları arasında istatistiksel bir fark görülmemiştir. Sağlıklı grubunda IL 1B seviyesi 29.38 ± 1.32 olarak ölçülürken, ISC grubunda bu seviye 48.58 ± 3.62 ve IR grubunda 59.67 ± 3.63 pg/mg protein olarak ölçülmüştür. ISC ve IR gruplarında tespit edilen bu artış Sağlıklı gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.001$). İskemi gruplarına bakıldığında tedavi gruplarında IL 1B seviyeleri ISC+TK20 grubunda 43.06 ± 2.84 seviyesine, ISC+TK40 grubunda 33.41 ± 2.51 pg/mg protein seviyesine gerilemiştir. Bu azalma ISC grubuna göre ISC+TK20 grubunda ($p < 0.05$) ve ISC+TK40 ($p < 0.001$) istatistiksel olarak anlamlıdır. İskemi ve reperfüzyon yapılan ve Timokinon tedavisi uygulanan gruplara bakıldığında IL 1B seviyeleri IR+TK20 ve IR+TK40 gruplarında sırasıyla 43.05 ± 3.10 ve 32.92 ± 3.47 pg/mg protein olarak ölçülmüştür. Bu iki tedavi grubundaki IL1B seviyeleri IR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$).



Şekil 4.8. Rat overlerinde ölçülen IL 1B seviyeleri.

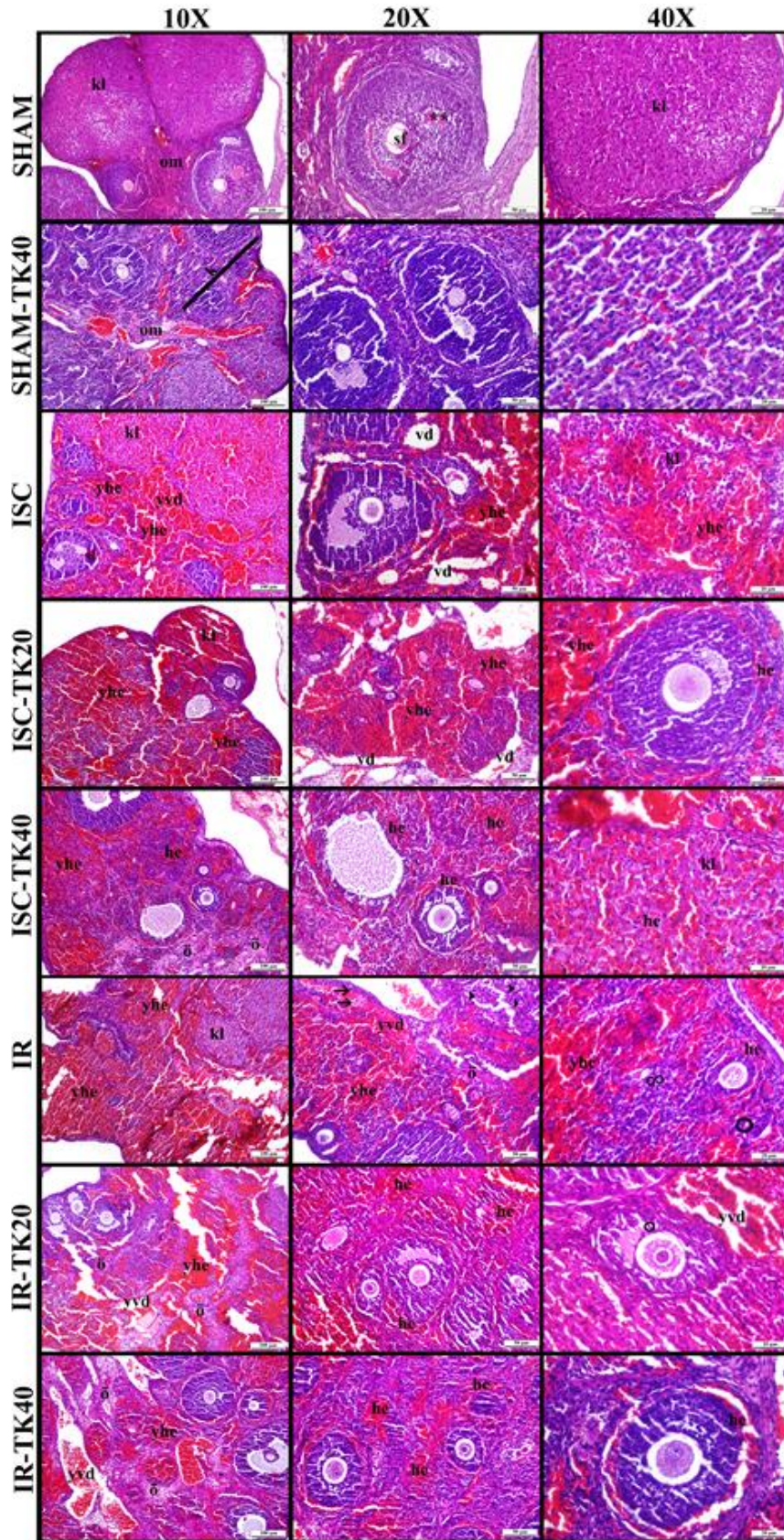
TK: Timokinon, ISC: İskemi, IR: İskemi Reperfüzyon. TK20: 20mg/kg timokinon, TK40: 40mg/kg timokinon. Sağlıklı grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$ işaretleri kullanılmıştır. IR grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ ve ### $p < 0.001$ işaretleri kullanılmıştır. ISC+TK20 grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde δ $p < 0.05$, δδ $p < 0.01$, δδδ $p < 0.001$ işaretleri kullanılmıştır. IR+TK20 grubuyla diğer çalışma grupları mukayese edildiğinde ise λ $p < 0.05$, λλ $p < 0.01$, λλλ $p < 0.001$ işaretleri kullanılmıştır.

4.2. Histopatolojik Bulgular

Sham, iskemi (ISC), iskemi reperfüzyon (IR) ve tedavi grupları olan iskemi+TK20 (ISC-TK20), iskemi+TK40 (ISC-TK40), iskemi reperfüzyon'+TK20 (IR-TK20), iskemi reperfüzyon+TK40 (IR-TK40) den alınan ovaryum kesitleri incelendiğinde,

Şekil 4.9.'da ovaryumda foliküllerin ve korpus luteumun bulunduğu bölge korteks olarak; foliküllerin ve korpus luteumun aralarında kalan kan damarlarından yoğun bölge ise ovaryum medullası olarak gösterilmiştir. Sham grubu, ovaryumun normal histolojik yapısını göstermektedir. Sham-TK40 grubu da ovaryumun normal histolojik yapısını korumaktadır.

ISC grubu incelendiğinde hasara bağlı yoğun hemoraji alanları ve yoğun venöz dilatasyonlar izlenmektedir. ISC-TK20 ve ISC-TK40 gruplarında, ISC grubuna göre hemoraji alanlarının ve vasküler dilatasyonların azaldığı gözlene de patolojik değişiklikler hala mevcudiyetini korumaktadır. ISC-TK20 ve ISC-TK40 grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise ISC-TK40 grubunda tedavinin daha etkili olduğu iskemik hasarın etkisinin ISC-TK20 grubuna göre daha fazla azaldığı görülmektedir.



Şekil 4.9. Over dokularının histopatolojik incelenmesi.

TK: Timokinin, ISC: İskemi, IR: İskemi Reperfüzyon. TK20: 20mg/kg timokinin, TK40: 40mg/kg timokinin. **Kl**: korpus luteum, **om**: ovaryum medullası, **k**:korteks, **sf**: sekonder folikül, ******:işareti: antrum, **he**: hemoraji, **yhe**: yoğun hemoraji, **vd**: venöz dilatasyon, **yvd**: yoğun venöz dilatasyon, **ö**: ödem, ok başları: nekrotik hücre, çember işareti: apoptotik hücre, → işareti: lökosit infiltrasyonunu göstermektedir.

IR grubu incelendiğinde, iskemi ve reperfüzyona bağlı gelişen yoğun hemorajik alanları, dilate kan damarları, ödematoz alanlar dikkat çekmektedir. Dokudaki hasara bağlı olarak hücre ölümleri gözlenmekte nekrotik ve apoptotik hücreler görülmektedir. Aynı zamanda kan damarlarından lökosit infiltrasyonları da izlenmektedir. IR-TK20 ve IR-TK40 grupları, ISC ile karşılaştırıldığında tedavi uygulamasının hasar üzerinde iyileştirici etkisi yoğun hemorajik alanların, ödem alanlarının ve dilate damarların azalması ile izlenebilmektedir. IR-TK20 ve IR-TK40 grupları kıyaslandığında ise IR-TK40 grubunun genel görünümüyle daha az hasarlı olduğu izlenmektedir.

Çalışmanın histopatolojik bulguları için semi kantitatif skorlama yapılmıştır (Aksak Karamese ve ark., 2015). Buna göre hasar yok ya da çok az (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) hasar olacak şekilde skorlanmıştır (Tablo 4.1).

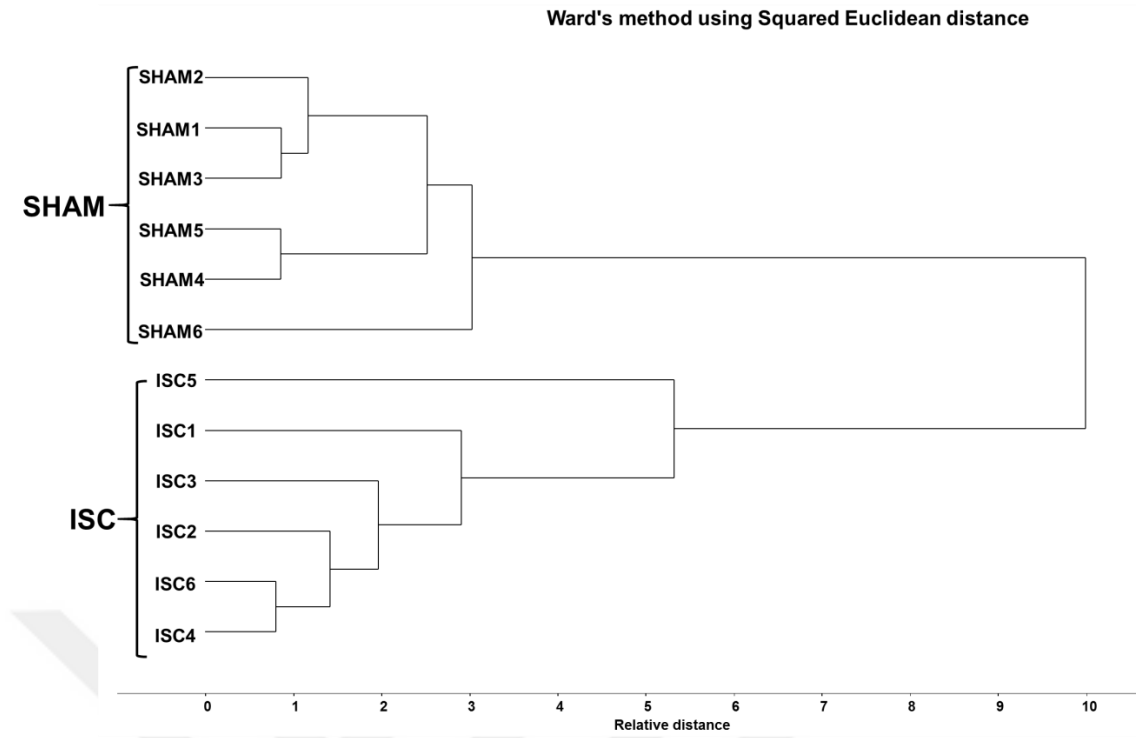
Tablo 4.1. Histopatolojik bulguların skorlaması

GRUPLAR	HEMORAJİ	ÖDEM	İNFLAMATUVAR HÜCRE	NEKROTİK HÜCRE
Sham	-	-	-	-
Sham-TK40	-	-	-	-
ISC	++	+	++	+
ISC-TK20	+	-	+	-
ISC-TK40	-	-	-	-
IR	+++	+++	+++	+++
IR-TK20	++	+	++	+
IR-TK40	+	-	+	-

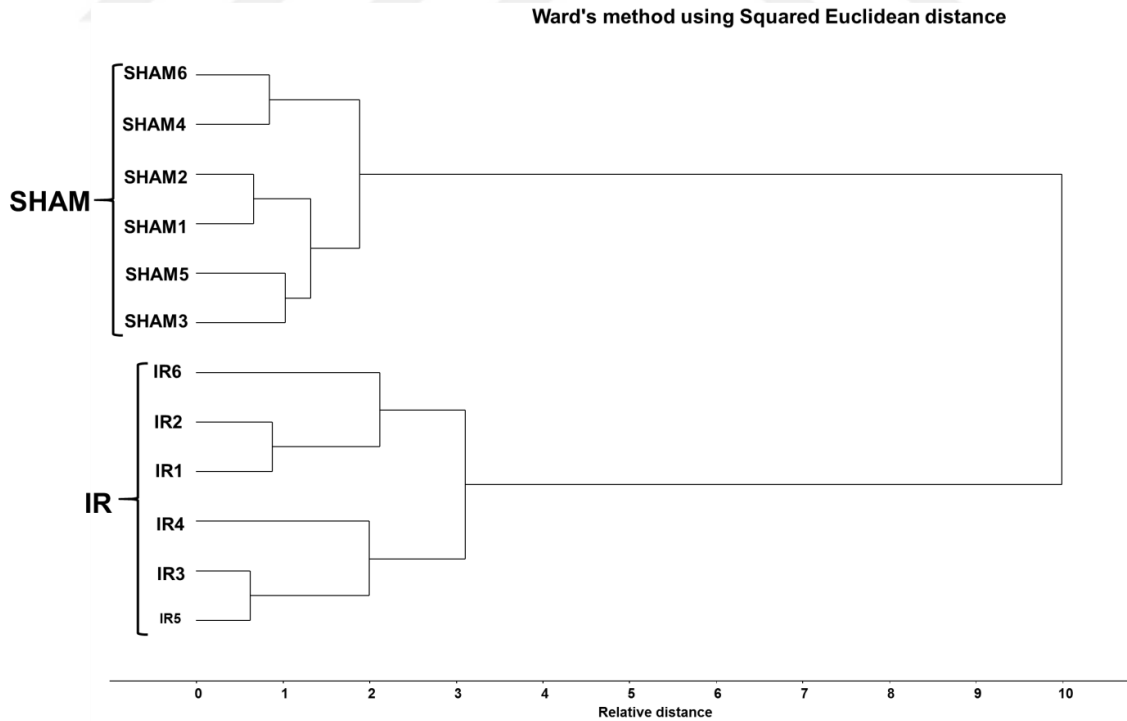
4.3. Spektroskopik Bulgular

FTIR spektroskopisi çalışılan örneklerle karakteristik biyomoleküler kompozisyonu hakkında bilgiler veren bir tekniktir. Bu nedenle hücre, doku biyolojik sıvılar gibi çok farklı örnekler kullanılarak ilaç- doku/hücre etkileşim çalışmasından

hastalık tanısına kadar oldukça geniş bir alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Wang and Mizaikoff 2008). Yalnızca bir örneğe ait IR spektrumu absorbans ve dalga sayısı açısından binlerce veri içermektedir. Örnek sayısı arttıkça analiz edilecek spektral veri yükü de arttığından, analiz işlem süresi ve yükü artmaktadır. Bu nedenle spektral verilerin analizinde çalışılan gruplar arasındaki ilişkileri ortaya koymak için çok değişkenli analiz yöntemleri veya kemometrik analiz metotları kullanılmaktadır. Analiz yöntemlerinden en yaygın kullanılanı, grupları spektral farklılıklara dayalı olarak sınıflandıran hiyerarşik kümeleme analizi (HCA)'dır. HCA da, örnekler arasındaki farklılık oranı arttıkça, örnekler dendrogramda farklı clusterda konumlanmaktadır (Wang and Mizaikoff 2008). Çalışma kapsamında iskemi ve iskemi/reperfüzyon uygulamasında TK20 ve TK40 uygulamasının koruyucu etkilerini ortaya koymak için elde edilen spektrumlara HCA analizi uygulandı. İskemi ve iskemi reperfüzyon uygulamasına bağlı ovaryum dokusundaki değişiklikleri belirlemek için SHAM-ISC ve SHAM-IR grup çiftlerine analiz yapıldı. Şekil 4.10. ve 4.11'de elde edilen HCA dendrogram grafikleri verilmektedir. Her iki grafikte de ISC ve IR grupları SHAM grubuna göre farklı yerde konumlanmaktadır. Farklı clusterda yer alma ovaryum dokusunda iskemi ve reperfüzyon uygulamasında biyomoleküllerde içeriksel olarak değişim/degradasyon olduğunu ortaya koymaktadır.

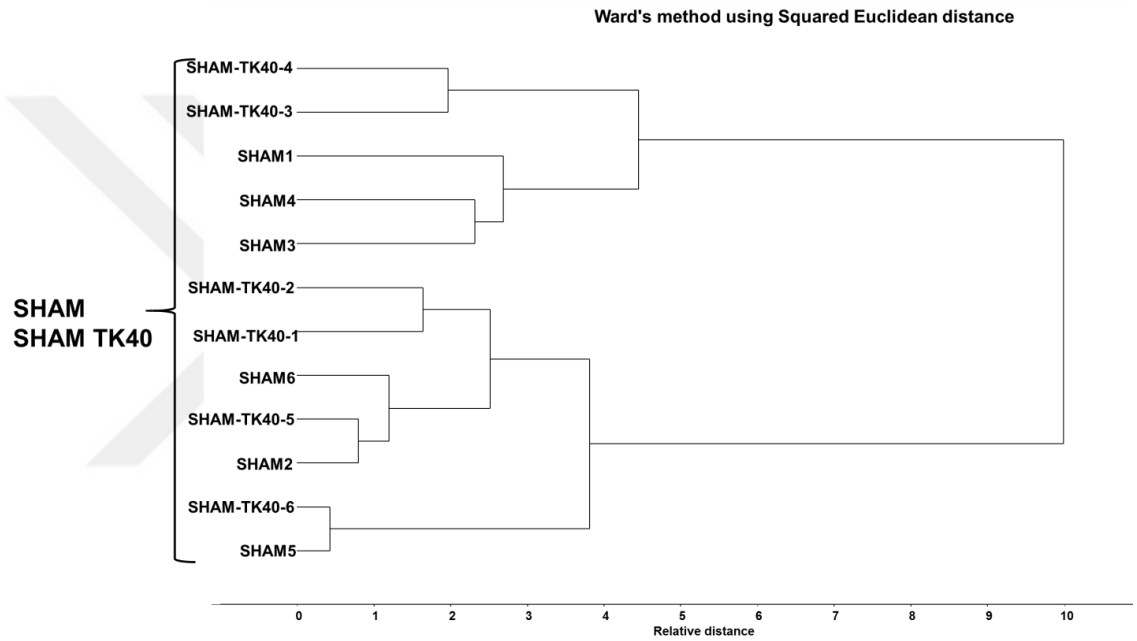


Şekil 4.10. Sham ve ISC grupları için $3800-925\text{ cm}^{-1}$ spektral bölgede elde edilen HCA dendrogram grafiği.



Şekil 4.11. Sham ve IR grupları için $3800-925\text{ cm}^{-1}$ spektral bölgede elde edilen HCA dendrogram grafiği.

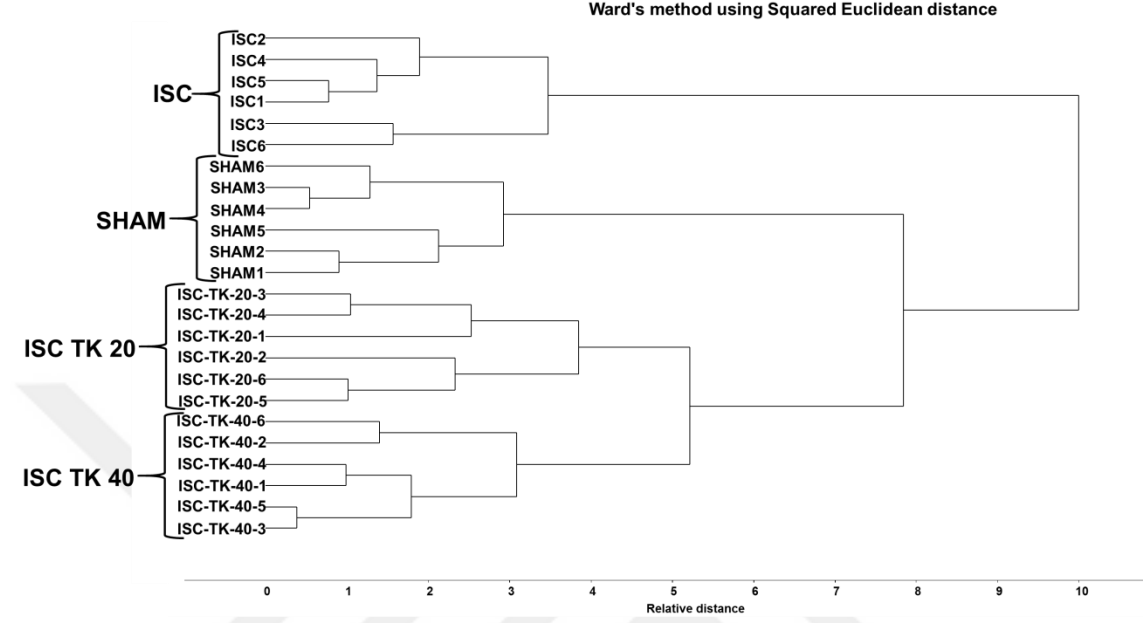
TK40 uygulamasının toksik etkisinin olup olmadığını değerlendirmek amacıyla TK 40 tek başına SHAM grubuna da uygulandı ve SHAM-SHAM TK 40 gruplarına HCA uygulandı. Elde edilen dendrogram grafiği Şekil 4.12. de verilmektedir. TK 40 uygulanmış örnekler SHAM grubu örnekleri arasında belirgin bir ayrım görülmedi. Şekilden de görüleceği üzere tüm örnekler bir arada konumlanmaktadır. TK40 uygulamasının ovaryum dokusunda herhangi bir toksik etkisinin olmadığını ortaya koymaktadır.



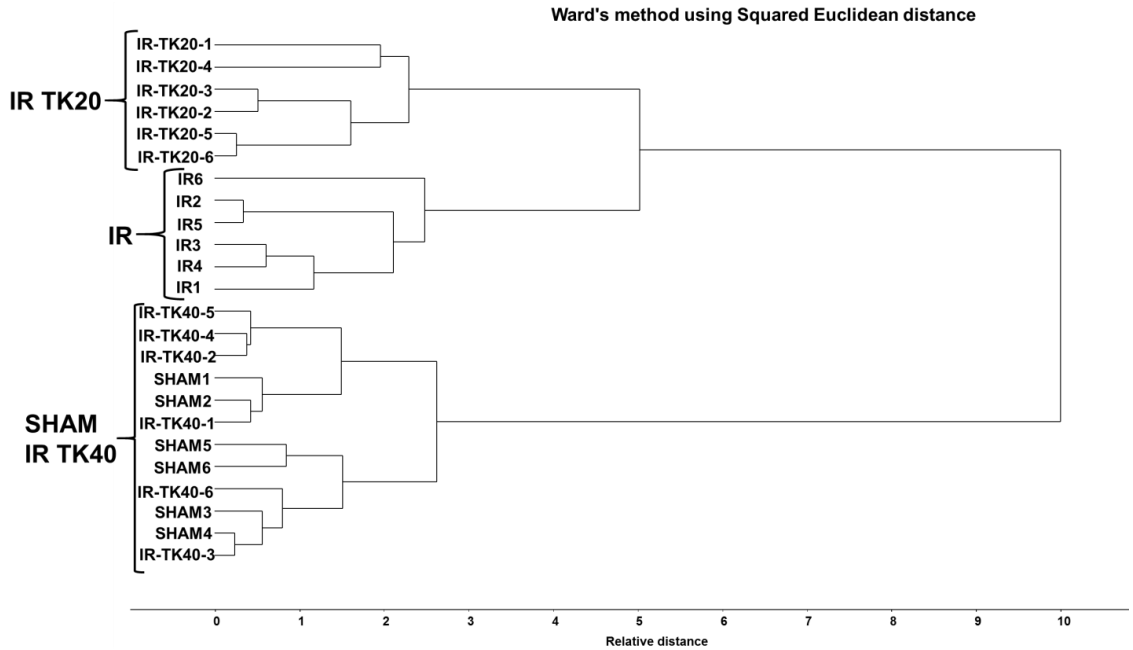
Şekil 4.12. Sham ve Sham TK40 grupları için $3800-925\text{ cm}^{-1}$ spektral bölgede elde edilen HCA dendrogram grafiği.

Şekil 4.13’de SHAM, ISC ve TK20 ile TK40 uygulanmış ISC gruplarına ait elde edilen HCA dendrogramı görülmektedir. Dendrogram grafiği ISC grubu diğer üç gruba göre farklı bir clusterda yer almaktadır. ISC TK20 ve ISC TK 40 grupları ile SHAM grubu ile ISC grubuna göre yakın bir şekilde bulunmaktadır. TK uygulama gruplarının SHAM grubu ile benzer clusterda yer alması TK gruplarındaki ovaryum dokularında tedavi edici/protektif etkinliğini göstermektedir. Söz konusu uygulamanın IR durumunda değerlendirmek SHAM, IR ve IR TK20 ile IR TK40 örneklerine de HCA uygulandı. Elde edilen grafik Şekil 4.14. de verilmektedir. IR ve TK20 grupları diğer gruplara göre

daha uzak bir konumda, TK40 ve SHAM örnekleri ise birbirine karışmış olarak bulunmaktadır. TK40 uygulamasının TK20'ye göre daha etkin olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.13. Sham ve ISC, ISC TK20 ve ISC TK40 grupları için 3800-925 cm^{-1} spektral bölgede elde edilen HCA dendrogram grafiği.



Şekil 4.14. Sham ve IR, IR TK20 ve IR TK40 grupları için 3800-925 cm^{-1} spektral bölgede elde edilen HCA dendrogram grafiği.

5. TARTIŞMA

Timokinonun antioksidan ve antienflamatuvar etkilere bağılı olarak indüklenen doku hasarı üzerindeki koruyucu etkisi, daha önce IR hasarını hafifletmesini açıklayabilecek bir dizi deneysel modelde gözlemlenmiştir. Ancak iskemi veya reperfüzyonun başlangıcında timokinonun akut uygulanmasının over IR hasarını önleyip önlemeyeceğı veya zayıflatacağı henüz tespit edilmemiştir. Bu çalışma timokinonun over iskemi/reperfüzyon hasarını önlemede koruyucu etkili olduğunu gösteren ilk çalışma olmuştur.

Kuvvetli bir antioksidan molekül olan timokinon tedavisinin araştırıldığı bu çalışmanın en önemli bulgularını şu şekilde sıralayabiliriz:

Timokinon ilk olarak hem iskemik hasarda hem de reperfüzyon hasarında over doku enfarktüsünü azaltmıştır. Timokinon over iskemi/reperfüzyon deneysel modelinde ilk defa kullanıldığı için makroskobik sonuçlarla doku üzerindeki etkisinin analiz edilmesi çok önemlidir. Yaptığımız doku incelemesi ile timokinonun IR hasarını önlemede etkili olduğu tespit edilmiştir. İkinci bulgumuz antioksidan mekanizma ve parametrelerin analizidir. Oksidatif stresin arttığı bilinen IR hasarında over doku oksidan ve antioksidan seviyeleri araştırılmıştır. Timokinon hem iskemi yapılan hem de iskemi+reperfüzyon yapılan gruplarda oksidatif stresi azaltan bir sonuç vermiştir. Timokinon bu etkisini bu her iki deneysel grupta SOD, GSH ve Koenzim Q10 seviyelerini negatif kontrol grubuna göre artırarak ve MDA, ve 8OHdG seviyelerini baskılayarak göstermiştir. Üçüncü ve son bulgumuz enflamasyon sürecinin timokinon ile azaltılmasıdır. Timokinon uygulaması pro-inflamatuvar sitokin olan Tnf α ve IL-1B seviyelerini iskemi ve reperfüzyon gruplarında baskılayarak daha önceki çalışmalarda da gösterilen antienflamatuvar etkisini over torsiyonunda da göstermiştir. Bu sonuçlara

bakarak timokinonun over iskemi ve reperfüzyon hasarında koruyucu olabileceği biyokimyasal ve histopatolojik analizlerle tespit edilmiştir.

IR ye bağlı gelişen over hasarının mekanizmaları hala tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak IR hasarının en önemli patofizyolojik mekanizmalarından birisi oksidatif stresin artışı olarak tespit edilmiştir. Hipoksi, iskemi ve diğer damar problemleri gibi durumlardan kaynaklanan, sıklıkla görülen bir sorundur. Kan akışındaki azalmanın, artan düzeylerde hidrojen peroksit ve diğer kimyasal formları içeren reaktif oksijen türlerinin hipoksiye neden olduğu bilinmektedir (Bayir ve ark., 2016). Oksijensiz radikal oluşumunun, iskemi sonrası hücre ve dokularda hasara neden olan kritik bir mekanizma olduğu gösterilmiştir (Halici ve ark., 2008). Bir hücre genellikle normal koşullar altında oksidanlar ve antioksidanlar arasında uygun bir dengeyi koruyabilir. Bu denge bozulduğunda ve oksidanlardaki artış veya antioksidanlardaki azalma nedeniyle oksidatif strese doğru kaydığında, hücre iskemi/reperfüzyon hasarı gibi yaralanmalara karşı daha duyarlı hale gelir. Hipoksik dokuların reperfüzyonu, reaktif oksijen türlerinin ve reaktif nitrojen türlerinin (RNT) aşırı üretimiyle ilişkili olarak daha fazla doku hasarına yol açabilir (Un ve ark., 2015). Kan hipoksik dokulara yeniden aktığında, dokuların yeniden oksijenlenmesi büyük miktarda serbest oksijen radikalının dönüşümüne neden olur. Aktive edilmiş nötrofillerin birikmesi ve ROS salınımının, reperfüzyon sırasında doku hasarının patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir (Bulkley 1987). Bu serbest radikal oluşumları, hücre bileşenlerinde bir dizi değişikliğe ve membran lipidlerinin peroksidasyonuna neden olabilir. Bu olaylar periyodu reperfüzyon hasarı olarak bilinir (Oral ve ark., 2017). Postiskemik lipid peroksidasyonu antioksidanlar tarafından bloke edilebilir (Cadirci ve ark., 2010). Oksidatif stresin neden olduğu IR hasarına karşı korunmak için hücrelerde, çoğu düşük düzeyde ifade edilen bir takım antioksidan enzimler ve onarım aktiviteleri bulunur. IR hasarından sonra üretilen ROS normalde

çeşitli antioksidan enzimler ve aşağıdakileri içeren bileşikler tarafından temizlenir: SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz (Halici ve ark., 2008). SOD'lar süperoksit anyonunu antioksidan savunma sisteminin önemli bir bileşeni olan hidrojen peroksit'e dönüştürür (Puglia and Powell 1984).

Sugino ve arkadaşları, hamile sıçanlara harici SOD enjeksiyonunun, yumurtalık iskemisi sırasında hormonal fonksiyondaki azalmaları önlediğini bildirmiştir (Sugino ve ark., 1993). Ayrıca bu çalışmada araştırmacılar IR hasarının lipid peroksit düzeylerini arttırdığını, süperoksit dismutaz düzeylerini ise azalttığını bildirmişlerdir (Sugino ve ark., 1993). Timokinon, in vitro çalışmalarda antioksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilen OH⁻, O₂, singlet oksijen, peroksil radikalini temizleyen güçlü bir antioksidandır (Khader ve ark., 2009). Timokinonun antioksidan etkilerinin yanı sıra SOD ve antiinflatuar aktivite üzerinde uyarıcı etkisi de vardır (Al Wafai 2013; El-Khouly ve ark., 2012). Temizleyici etkileri birçok dokuda gösterilmesine rağmen (El Gazzar ve ark., 2006; Kanter 2011; Lu ve ark., 2018; Parlar and Arslan 2020), yumurtalığın korunması ayrıntılı olarak değerlendirilmemiştir. Bu nedenle timokinonun antioksidan etkisi overin IR hasarından korunmasında yetersiz olabilir. Yapmış olduğumuz bu çalışmada, iskemi ve ardından reperfüzyon periyodundan sonra SOD düzeylerinde azalma meydana geldi. IR sonrası azalan SOD seviyeleri önceki çalışmalarla uyumluydu. IR sırasında SOD seviyelerindeki azalma muhtemelen oksidatif stres sırasındaki tüketimden kaynaklanmaktadır. Öte yandan IR artı timokinon grubunda SOD düzeylerinde görülen anlamlı artışın nedeni timokinonun SOD aktivitesi üzerindeki uyarısına bağlı olabilir.

Bu çalışmada, ayrıca iskemi ve reperfüzyonun sonrasında GSH düzeylerinde azalma ve MDA düzeylerinde ise önemli bir artış meydana gelmiştir. IR sonrası azalan SOD ve GSH seviyeleri ve artan MDA seviyeleri önceki çalışmalarla uyumluydu (Cadirci ve ark., 2010; Halici ve ark., 2008). IR sırasında SOD, GSH seviyelerindeki azalma ve

MDA seviyelerindeki artış muhtemelen oksidatif stres süresince oksijen tükenmesinden kaynaklanıyordu. Öte yandan IR artı timokinon gruplarında SOD ve GSH düzeylerindeki anlamlı artış ve MDA düzeylerindeki azalmanın nedeni ise timokinonun koruyucu etkisine bağlanabilir. Bu çalışmada timokinonun bahsedilen parametreler aracılığıyla oksidatif stresi azalttığı ve önemli ölçüde önlediği düşünülmektedir.

Reaktif oksijen türlerinin ve dolayısıyla oksidatif stresin oluşmasını engelleyen bir diğer mekanizma da mitokondriyel elektron transport sisteminin bir parçası olan CoQ10 dir (Saini 2011). CoQ10'un primer biyokimyasal etkisi, adenozin trifosfatın sentezinde yer alan bir dizi redoks reaksiyonunda elektron taşıma zincirinde bir kofaktör olarak rol oynar. Çoğu hücresel fonksiyon yeterli ATP kaynağına bağlı olduğundan CoQ10 neredeyse tüm insan doku ve organlarının sağlığı için gereklidir (Duberley ve ark., 2013). Koenzim Q10, serbest radikallerin oluşumunu ve proteinlerin, lipidlerin ve DNA'nın modifikasyonlarını önleyen en önemli lipid antioksidanlarından biridir (Montero ve ark., 2005). Artan üretim ve reaktif oksijen türlerinin etkisi ile bağlantılı birçok hastalık durumunda, insan vücudundaki koenzim Q10 konsantrasyonu azalır (Battino ve ark., 2001) ve koenzim Q10 eksikliği, solunum zincirinin işlev bozukluğuna yol açar (Fragaki ve ark., 2016). IR hasarında artan oksidatif strese bağlı olarak mitokondriyel CoQ10 seviyesinde belirgin bir düşüş gözlemlendiği tespit edilmiştir (Simani ve ark., 2018). Bizim çalışmamızda da iskemi ve reperfüzyon modeli oluşturulan rat overlerinde CoQ10 seviyelerinin sham grubuna göre azaldığı ve timokinon uygulamasının CoQ10 seviyelerinin artırdığı gösterilmiştir. Bu sonuca göre timokinonun doku hasarının önlenmesindeki rolünün yanında mitokondriyel hasarı da önleyebileceği gösterilmiştir. Literatürde CoQ10'un aynı zamanda çeşitli enflamatuvar hastalıklarda koruyucu (Sifuentes-Franco ve ark., 2022) ve iskemik dokularda tedavi edici olarak kullanılabileceği de gösterilmiştir (Liang ve ark., 2017; Whitman ve ark., 1997).

Timokinonun hücre içi oksidatif stresin yanında mitokondriyel sistemi de desteklediğini göstermek çalışmamızın diğer bir önemli bulgusudur.

IR hasarı sadece over dokusunda tüm dokularda yıkıcı bir etki gösterir. Bu etkinin en önemli nedeni dokuya kan akışının kesilmesi ve bu süreçte oksijen tükenmesine bağlı olarak hücresel oksidanların seviyelerinin artması gösterilebilir. Reperfüzyonda ise dokuya yeniden kan akımı başlar ve sırasıyla, aşırı oksijen girişi, iskemik dönemde ortama çıkan ksantin oksidazların, hipoksatini ksantine dönüştürmesi ve serbest oksijen radikalleri salınımı görülmektedir (Bulkley 1987; Yılmaz ve ark., 2020). Ortaya çıkan oksidatif stress ve oluşan serbest radikallerin bir diğer önemli hedefi de hücresel DNA'dır. Bu bağlamda, serbest radikaller tarafından üretilen, DNA'nın modifiye edilmiş bir ürün olan 8-OHdG, oksidatif DNA hasarının iyi bir biyolojik belirteci olarak kabul edilmektedir (Kulbacka ve ark., 2009; Yue ve ark., 2015). Yapılan çalışmalar, iskemi ve reperfüzyon sonrasında DNA hasarına bağlı olarak hücresel 8-OHdG içeriğinin arttırdığını ileri sürmüştür (Sehirli ve ark., 2008; Tamamura ve ark., 2010). Timokinonun hücresel hasarı ve DNA hasarını koruyucu etkisi de literatürde bu çalışmalara benzer olarak tespit edilmiştir (Karimi ve ark., 2019; Karimian ve ark., 2022). Biz de bu çalışmaları destekleyecek şekilde timokinon uygulaması ile over dokusunda 8-OHdG seviyelerinin azaltıldığını ve bu sonuçla timokinonun DNA hasarında da koruyucu rol oynadığını göstermiş olduk.

İskemi-reperfüzyon hasarında birincil patofizyolojik mekanizma, iskemi sonrası reperfüzyonun neden olduğu onarım sırasındaki aşırı oksidatif strestir. İskeminin yıkıcı etkisi etkilenen dokuya hasar verdiğinde, doku reperfüzyon sırasındaki inflamatuvar hasara duyarlı hale gelir (Edgerton ve ark., 2009). Birçok açıdan IR hasarı, organları etkileyen aktif nötrofillerin toplanması ve oksidatif stresteki artışla karakterize edilen inflamatuvar bir yanıtla benzemektedir (Chandrasekar ve ark., 1998; Edgerton ve ark., 2009; Fleming

and Tsokos 2006). Reaktif oksijen türleri, sitokinler, kemokinler, kompleman sistem, doğal antikorlar ve nötrofiller gibi birçok molekül ve hücre, IR hasarında rol oynar (Chandrasekar ve ark., 1998; Edgerton ve ark., 2009; Fleming and Tsokos 2006). Çalışmamızda IR hasarına bağlı olarak sonra proinflatuar sitokinler olan IL-1 β ve Tnf α seviyelerinde artış vardı. Bu hasarın oksidatif stresin bir sonucu olduğu önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Sitokinlerin aşırı birikmesi enflamasyonu daha da ilerleteceği ve sonuç olarak hücre kaybına yol açacağı için literatürde antienflatuar ajanların özellikle proinflatuar sitokinleri baskılamada ve böylece hücre hasasına engel olmada kullanılabileceği belirtilmiştir (Halici ve ark., 2008; Yılmaz ve ark., 2020). Timokinonda bu amaçla daha önceki çalışmalarda kullanılmış ve sitokinler üzerinde baskılayıcı bir etki göstermiştir (Shaterzadeh-Yazdi ve ark., 2018). Bizim çalışmamız timokinonun over iskemide ortaya çıkan enflamasyonun proinflatuar sitokinler üzerinden azaltılabileceğini ortaya koymuştur. Daha önce timokinonun barsak iskemi hasarında IL-1 β ve Tnf α seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (Parlar and Arslan 2020). Timokinonun bilinen antioksidan etkisinin yanında antienflatuar etkisinde desteklenmesi açısından bulgularımız çok önemlidir.

Yapmış olduğumuz histolojik analizler biyokimyasal bulgularımızı desteklemektedir. Timokinon uygulanmayan over iskemi ve reperfüzyon gruplarında over dokusunda kanama, nekrotik değişiklikler ve nötrofil infiltrasyonunu ortaya çıkarmıştır. İskemi ve reperfüzyon hasarının over dokusunda enflamasyona ve oksidatif hasara bağlı olarak dokumorfolojisinde bozulmalara yol açtığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Oral ve ark., 2017). Timokinon uygulaması histopatolojik sonuçlarımızda da görüldüğü gibi bozulan over dokusunu korumuştur. Timokinonun daha önceki çalışmalarda da buna benzer etkileri tespit edilmiştir (Gokce ve ark., 2016).

Sonuç olarak, biyokimyasal ve histopatolojik bulgulara dayanarak elde ettiğimiz sonuçlar öncelikle iskemi ve IR hasarının over dokusunda gerçek bir sorun olduğunu ortaya koymuştur. Verilerimiz, timokinon ile konservatif tedavinin yumurtalıklarda IR kaynaklı doku hasarını azaltmada etkili olduğunu güçlü bir şekilde ortaya koymaktadır. Timokinonun bu etkisinin öncelikle mitokondride koenzim Q10 artışı ile ortaya çıkması muhtemel oksidanları engelleyerek yaptığını düşünüyoruz. Sonuç olarak timokinon, antioksidan ve DNA koruyucu etkileri ile insanların over iskemi ve reperfüzyonunun neden olduğu hasardan korunmasında yardımcı olabileceği düşünülmüştür.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Biyokimyasal ve histopatolojik bulgulara dayanarak elde ettiğimiz sonuçlar öncelikle iskemi ve IR hasarının over dokusunda gerçek bir sorun olduğunu ortaya koymuştur. Timokinon ilk olarak hem iskemik hasarda hem de reperfüzyon hasarında over doku enfarktüsünü azaltmıştır. Yaptığımız doku incelemesi ile timokinonun IR hasarını önlemede etkili olduğu tespit edilmiştir. Oksidatif stresin arttığı bilinen IR hasarında over doku oksidan ve antioksidan seviyeleri araştırılmıştır. Timokinon hem iskemi yapılan hem de iskemi+reperfüzyon yapılan gruplarda oksidatif stresi azaltan bir sonuç vermiştir. Timokinon bu etkisini bu her iki deneysel grupta SOD, GSH ve Koenzim Q10 seviyelerini negative kontrol grubuna göre artırarak ve MDA ve 8OHdG seviyelerini baskılayarak göstermiştir. Son olarak enflamasyon sürecinin timokinon ile azaltılmasıdır. Timokinon uygulaması pro-inflamatuar sitokin olan Tnf α ve IL-1B seviyelerini iskemi ve reperfüzyon gruplarında baskılayarak daha önceki çalışmalarda da gösterilen antienflamatuar etkisini over torsiyonunda da göstermiştir. Verilerimiz, timokinon ile konservatif tedavinin yumurtalıklarda IR kaynaklı doku hasarını azaltmada etkili olduğunu güçlü bir şekilde ortaya koymaktadır. Timokinonun bu etkisinin öncelikle mitokondride koenzim Q10 artışı ile ortaya çıkması muhtemel oksidanları engelleyerek yaptığını düşünüyoruz. Sonuç olarak timokinon, antioksidan ve DNA koruyucu etkileri ile insanların over iskemi ve reperfüzyonunun neden olduğu hasardan korunmasında yardımcı olabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pillai, S., 2014. Cellular and molecular immunology e-book. Elsevier Health Sciences, 618 p, Philadelphia, ABD.
- Abd El-Ghany, R. M., Sharaf, N. M., Kassem, L. A., Mahran, L. G. and Heikal, O. A., 2009. Thymoquinone triggers anti-apoptotic signaling targeting death ligand and apoptotic regulators in a model of hepatic ischemia reperfusion injury. *Drug Discov Ther*, 3(6), 296-306.
- Abdel-Aziz, A. M., Mohammed, H. H., Abdelazem, O., Ahmed, R. F. and Ibrahim, Y. F., 2021. Tribulus terrestris Saponins Improve Ovarian Ischemia-reperfusion Injury in Female Rats: Modulation of Vascular Endothelial Growth Factor-A and Hemeoxygenase-1. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 55(1), 240-248.
- Abuç, Ö. Ö., 2020. Over İskemi-Reperfüzyon Modeli Oluşturulan Sıçanlarda Viteksin'in Etkisinin Histokimyasal, İmmunohistokimyasal ve Biyokimyasal Yöntemlerle Araştırılması. Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Erzurum: Atatürk Üniversitesi.
- Adu-Bredu, T. K., Arkorful, J., Appiah-Denkyira, K. and Wiafe, Y. A., 2021. Diagnostic value of the sonographic whirlpool sign in the diagnosis of ovarian torsion: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Ultrasound*, 49(7), 746-753.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.
- Ahmad, A., Husain, A., Mujeeb, M., Khan, S. A., Najmi, A. K., Siddique, N. A., Damanhour, Z. A. and Anwar, F., 2013. A review on therapeutic potential of Nigella sativa: A miracle herb. *Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine*, 3(5), 337-352.

- Akkuş, İ., 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1. Baskı. 157 p, Mimoza Yayınları, Konya.
- Aksak Karamese, S., Toktay, E., Unal, D., Selli, J., Karamese, M. and Malkoc, I., 2015. The protective effects of beta-carotene against ischemia/reperfusion injury in rat ovarian tissue. *Acta Histochemica*, 117(8), 790-797.
- Aksoy, H., Ozkan, A., Aktas, F. and Borekci, B. 2009. Helicobacter pylori seropositivity and its relationship with serum malondialdehyde and lipid profile in preeclampsia. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 23(4), 219-222.
- Al Wafai, R. J., 2013. Nigella sativa and thymoquinone suppress cyclooxygenase-2 and oxidative stress in pancreatic tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *Pancreas*, 42(5), 841-849.
- Al-Shobaili, H. A., Alzolibani, A. A., Al Robaee, A. A., Meki, A. R. and Rasheed, Z., 2013. Biochemical markers of oxidative and nitrosative stress in acne vulgaris: correlation with disease activity. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 27(1), 45-52.
- Altchek, A., Deligdisch, L., Kase, N., 2003. Diagnosis and Management of Ovarian Disorders. 568 p, Academic Pres, USA.
- Asaduzzaman Khan, M., Tania, M., Fu, S. and Fu J., 2017. Thymoquinone, as an anticancer molecule: from basic research to clinical investigation. *Oncotarget*, 8(31), 51907-51919.
- Azurah, A. G. N., Zainol, Z. W., Zainuddin, A. A., Lim, P. S., Sulaiman, A. S. and Ng, B. K., 2015. Update on the management of ovarian torsion in children and adolescents. *World Journal of Pediatrics*, 11, 35-40.

- Bartsch, H. and Nair, J., 2004. Oxidative stress and lipid peroxidation-derived DNA-lesions in inflammation driven carcinogenesis. *Cancer Detection and Prevention*, 28(6), 385-391.
- Bast, A., Haenen, R. and Doelman, C. J., 1991. Oxidants and antioxidants: State of the art. *The American Journal of Medicine*, 91(3), 2-13.
- Battino, M., Ferreiro, M. S., Bompadre, S., Leone, L., Mosca, F. and Bullon, P., 2001. Elevated hydroperoxide levels and antioxidant patterns in Papillon-Lefevre syndrome. *Journal of Periodontology*, 72(12), 1760-1766.
- Bayir, Y., Cadirci, E., Polat, B., Kilic Baygutalp, N., Albayrak, A., Karakus, E., Un, H., Keles, M. S. Kocak Ozgeris, F. B., Toktay, E., Karaca, M. and Halici, Z., 2016. Aliskiren-a promising strategy for ovarian ischemia/reperfusion injury protection in rats via RAAS. *Gynecological Endocrinology*, 32(8), 675-683.
- Bercegeay, S., Jean, M., Lucas, H. and Barriere, P. 1995. Composition of human zona pellucida as revealed by SDS-PAGE after silver staining. *Molecular Reproduction and Development*, 41(3), 355-359.
- Berek, J. S., 2002. Novak's Gynecology. 13th edition, 1200 p, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, ABD.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Bulkley, G. B., 1987. Free radical-mediated reperfusion injury: A selective review. *Br J Cancer Suppl*, 8, 66-73.
- Cadirci, E., Oral, A., Odabasoglu, F., Kilic, C., Coskun, K., Halici, Z., Suleyman, H., Keles O. N. and Unal, B. 2010. Atorvastatin reduces tissue damage in rat ovaries

- subjected to torsion and detorsion: biochemical and histopathologic evaluation. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 381, 455-466.
- Carden, D. L. and Granger, D. N., 2000. Pathophysiology of ischaemia–reperfusion injury. *The Journal of Pathology*, 190(3), 255-266.
- Carlson, N. G., Wieggl, W. A., Chen, J., Bacchi, A., Rogers, S. W. and Gahring, L. C. 1999. Inflammatory cytokines IL-1 α , IL-1 β , IL-6, and TNF- α impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways. *The Journal of Immunology*, 163(7), 3963-3968.
- Cecarini, V., Quassinti, L., Di Blasio, A., Bonfili, L., Bramucci, M., Lupidi, G., Cuccioloni, M., Mozzicafreddo, M., Angeletti, M. and Eleuteri, A. M., 2010. Effects of thymoquinone on isolated and cellular proteasomes. *The FEBS Journal*, 277(9), 2128–2141.
- Cerra, F. B., Lajos, T. Z., Montes, M. and Siegel, J. H., 1975. Hemorrhagic infarction: A reperfusion injury following prolonged myocardial ischemic anoxia. *Surgery*, 78(1), 95-104.
- Chandrasekar, B., Streitman, J. E., Colston, J. T. and Freeman, G. L., 1998. Inhibition of nuclear factor kappa B attenuates proinflammatory cytokine and inducible nitric-oxide synthase expression in postischemic myocardium. *BBA Molecular Basis of Disease*, 1406(1), 91-106.
- Cherubini, A., 2008. Dietary antioxidants as potential pharmacological agents for ischemic stroke. *Current Medicinal Chemistry*, 15(12), 1236-1248.
- Collard, C. D. and Gelman, S., 2001. Pathophysiology, clinical manifestations and preventations of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology*, 94, 1133-1138.

- Collins, A. R., Raslova, K., Somorovska, M., Petrovska, H., Ondrusova, A., Vohnout, B., Fabry, R. and Dusinska, M., 1998. DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(3), 373-377.
- Çetin, E., Çetin, N. ve Küçük, O., 2011. Toklularda karayolu ile taşımının oksidan-antioksidan sistem üzerine etkisi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 6(2), 103- 109.
- Dadashzadeh, A., Moghassemi, S., Shavandi, A. and Amorim, C. A., 2021. A review on biomaterials for ovarian tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 135, 48-63.
- Dansuk, R., 2011. Kadın genital sisteminin embriyolojisi ve cinsel farklılaşma. *Türk Pediatri Arşivi*, 46(11). 115-117.
- De Perrot, M., Liu, M., Waddell, T. K. and Keshavjee, S., 2003. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 167(4), 490-511.
- DeCherney, A. H., Nathan, L., Goodwin, T. M. and Lauger, N., 2012. Current Diagnosis and Treatment Obstetrics and Gynecology. McGraw Hill Medical Books, New York.
- Demirtaş, A. ve Pişkin, İ., 2009. Memelilerde cinsiyet gelişimi ve hormonal kontrolü. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 80(3), 23-28.
- Dergarabetian, E. M., Ghattass, K. I., El-Sitt, S. B., Al-Mismar, R. M., El-Baba, C. O., Itani, W. S., Melhem, N. M., El-Hajj, H. A., Bazarbach, A. A., Schneider-Stock, R. and Gali-Muhtasib, H. U., 2013. Thymoquinone induces apoptosis in malignant T-cells via generation of ROS. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 5(2), 706–719.
- Dizdaroglu, M., 2015. Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 763, 212-245.

- Doğan, Ş., 2019. Deneyisel Over Torsiyonu Modelinde Over İskemi Reperfüzyon Hasarında Aşamalı Detorsiyon ve Hipoterminin Overi Koruyucu Etkisinin Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Tıp Fakültesi, Çocuk Cerrahisi Ana Bilim Dalı, Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi.
- Dokuyucu, R., Karateke, A., Gokce, H., Kurt, R. K., Ozcan, O., Ozturk, S., Tas, Z. A., Karateke, F. and Duru, M., 2014. Antioxidant effects of erdosteine and lipoic acid in ovarian ischemia-reperfusion injury. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 183, 23-27.
- Duberley, K. E. C., Abramov, A. Y., Chalasani, A., Heales, S. J., Rahman, S. and Hargreaves, I. P., 2013. Human neuronal coenzyme Q10 deficiency results in global loss of mitochondrial respiratory chain activity, increased mitochondrial oxidative stress and reversal of ATP synthase activity: implications for pathogenesis and treatment. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 36, 63-73.
- Dupont, Y., Cohen, J. B. and Changeux, J. P., 1974. X-ray diffraction study of membrane fragments rich in acetylcholine receptor protein prepared from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *FEBS Letters*, 40(1), 130-133.
- Dworakowski, R., Walker, S., Momin, A., Desai, J., ElGamel, A., Wendler, O., Kearney, M. T. and Shah, A. M., 2008. Reduced nicotin amide adenine dinucleotide phosphate oxidase-derived superoxide and vascular endothelial dysfunction in human heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 51(14), 1349-1356.
- Edgerton, C., Crispin, J. C., Moratz, C. M., Bettelli, E., Oukka, M., Simovic, M., Zacharia, A., Egan, R., Chen, J., Dalle Lucca, J. J., Juang, Y. T. and Tsokos, G. C., 2009. IL-17 producing CD4⁺ T cells mediate accelerated ischemia/reperfusion-induced injury in autoimmunity-prone mice. *Clinical Immunology*, 130(3), 313-321.

- El Gazzar, M., El Mezayen, R., Marecki, J. C., Nicolls, M. R., Canastar, A. and Dreskin, S. C., 2006. Anti-inflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation. *International Immunopharmacology*, 6(7), 1135-1142.
- El-Khouly, D., El-Bakly, W. M., Awad, A. S., El-Mesallamy, H. O. and El-Demerdash, E., 2012. Thymoquinone blocks lung injury and fibrosis by attenuating bleomycin-induced oxidative stress and activation of nuclear factor Kappa-B in rats. *Toxicology*, 302(2-3), 106-113.
- Eroschenko, V. P., 2008. DiFiore's atlas of histology with functional correlations. Lippincott Williams & Wilkins.
- Eşrefoğlu, M., 2004. Genel ve Özel Histoloji. 360 s, Ankara, Pelikan Yayınevi.
- Fernández, A. R., Sánchez-Tarjuelo, R., Cravedi, P., Ochando, J. and López-Hoyos, M., 2020. Ischemia reperfusion injury-a translational perspective in organ transplantation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8549.
- Fleming, S. D. and Tsokos, G. C. 2006. Complement, natural antibodies, autoantibodies and tissue injury. *Autoimmunity Reviews*, 5(2), 89-92.
- Fragaki, K., Chaussenot, A., Benoist, J. F., Ait-El-Mkadem, S., Bannwarth, S., Rouzier, C., Cochaud, C. and Paquis-Flucklinger, V., 2016. Coenzyme Q10 defects may be associated with a deficiency of Q10-independent mitochondrial respiratory chain complexes. *Biological Research*, 49, 1-9.
- Gabryel, B., Łabuzek, K., Małecki, A. and Herman, Z. S., 2004. Immunophilin ligands decrease release of pro-inflammatory cytokines (IL-1beta, TNF-alpha and IL-2 in rat astrocyte cultures exposed to simulated ischemia in vitro. *Polish Journal of Pharmacology*, 56(1), 129-136.
- Gartner, L. P. and Hiatt, J. L., 2009. Renkli histoloji atlası. Histofizyoloji. Dördüncü baskı. 456 s, Güneş Tıp Kitabevleri, İstanbul.

- Gartner, L.P and Hiatt, J. L. 2016. Hücre biyolojisi ve histolojisi. Yedinci Baskı. 434 s, İstanbul tıp kitabevi, İstanbul.
- Gokalp, N., Basaklar, A. C., Sonmez, K., Turkyilmaz, Z., Karabulut, R., Poyraz, A. and Gulbahar, O., 2017. Protective effect of hydrogen rich saline solution on experimental ovarian ischemia reperfusion model in rats. *Journal of Pediatric Surgery*, 52(3), 492-497.
- Gokce, E. C., Kahveci, R., Gokce, A., Cemil, B., Aksoy, N., Sargon, M. F., Kisa, U., Erdogan, B., Guvenc, Y., Alagoz, F. and Kahveci, O. 2016. Neuroprotective effects of thymoquinone against spinal cord ischemia-reperfusion injury by attenuation of inflammation, oxidative stress, and apoptosis. *Journal of Neurosurgery: Spine*, 24(6), 949-959.
- Gourdin, M. J., Bree, B. and De Kock, M., 2009. The impact of ischaemia–reperfusion on the blood vessel. *European Journal of Anaesthesiology*, 26(7), 537-547.
- Gökmen, G., 2003. Sistematik Anatomi, 930 s, Güven Yayınevi, İzmir.
- Green, C. J., Gower, J. D., Healing, G., Cotterill, L. A., Fuller, B. J. and Simpkin, S., 1989. The importance of iron, calcium and free radicals in reperfusion injury: an overview of studies in ischaemic rabbit kidneys. *Free Radical Research Communications*, 7(3-6), 255-264.
- Gulcin, İ., 2020. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of Toxicology*, 94, 651-715.
- Gupta, R. K., Patel, A. K., Shah, N., Choudhary, A. K., Jha, U. K., Yadav, U. C., Gupta, P. K. and Pakuwal, U., 2014. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: A review. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 15(11), 4405-4409.
- Gurung, R. L., Lim, S. N., Khaw, A. K., Soon, J. F., Shenoy, K, Mohamed Ali, S., Jayapal, M., Sethu, S., Baskar, R. and Hande, M. P. 2010. Thymoquinone induces telomere

- shortening, DNA damage and apoptosis in human glioblastoma cells. *PLoS One*. 5(8), e12124.
- Gutteridge, J. and Halliwell, B., 1994. Antioxidants in nutrition, health, and disease. 160 p, Oxford University Press.
- Gutteridge, J. M., 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, 41(12), 1819-1828.
- Guyton, A. C. and Hall, J. E., 2013. Tıbbi Fizyoloji. 12. Basım, 1158 p, Güneş Tıp Kitabevleri. İstanbul.
- Gündüz, A. ve Er, H. 2000. Sitokinler ve Oftalmolojideki Yerleri. *Turkiye Klinikleri Journal of Ophthalmology*, 9, 53-58.
- Güner, İ., Özmen, D. ve Bayındır, O., 1997. Sitokinler. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 17, 65-74.
- Halici, Z., Karaca, M., Keles, O. N., Borekci, B., Odabasoglu, F., Suleyman, H., Cadirci, E., Bayir, Y. and Unal, B., 2008. Protective effects of amlodipine on ischemia-reperfusion injury of rat ovary: biochemical and histopathologic evaluation. *Fertility and Sterility*, 90(6): 2408-2415.
- Hansson, R., Jonsson, O., Lundstam, S., Petterson, S., Schersten, T. and Waldenström, J. 1983. Effects of free radical scavengers on renal circulation after ischemia in the rabbit. *Clinical Science* 65(6), 605-610.
- Hefti, A. F. 1993. Aspects of cell biology of the normal periodontium. *Periodontology*, 3(1), 64-75.
- Hussain, A. R., Ahmed, M., Ahmed, S., Manogaran, P., Plataniias, L. C., Alvi, S. N., Al-Kuraya, K. S. and Uddin, S., 2011. Thymoquinone suppresses growth and induces apoptosis via generation of reactive oxygen species in primary effusion lymphoma. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(8), 978-987.

- Ighodaro, O. M. and Akinloye, O. A., 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287-293.
- Jennings, R. B. and Reimer, K. A., 1991. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annual Review of Medicine*, 42, 225-246.
- Jiménez-Castro, M. B., Cornide-Petronio, M. E., Gracia-Sancho, J. and Peralta, C., 2019. Inflammasome-mediated inflammation in liver ischemia-reperfusion injury. *Cells*, 8(10), 1131.
- Junqueira, L. C. U., Carneiro, J., 2009. Temel histoloji: text & atlas. 500 p, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Jurcau, A. and Ardelean, A. I., 2022. Oxidative stress in ischemia/reperfusion injuries following acute ischemic stroke. *Biomedicines*, 10(3), 574.
- Kadioglu, E., Sardas, S., Aslan, S., Isik, E. and Karakaya, A. E., 2004. Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. *Biomarkers*, 9(2), 203-209.
- Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M. and Korthuis, R. J., 2016. Ischemia/Reperfusion. *Compr Physiol*, 7(1), 113-170.
- Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M. and Korthuis, R. J., 2012. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 298, 229-317.
- Kanabrocki, E., Ryan, M. D., Murray, D., Jacobs, R. W., Wang, J., Hurder, A., Friedman, N. C., Siegel, G., Eladasari, B., Nemchausky, B. A., Cornelissen, G. and Halberg, F., 2006. Circadian variation in multiple sclerosis of oxidative stress marker of

- DNA damage. A potential cancer marker? *La Clinica Terapeutica*, 157(2), 117-122.
- Kanter, M., 2011. Thymoquinone attenuates lung injury induced by chronic toluene exposure in rats. *Toxicology and Industrial Health*, 27(5), 387-395.
- Karabulut, H. ve Gülay, M. Ş., 2016. Antioksidanlar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1(1). 65-76.
- Karamese, S. A., Toktay, E., Unal, D., Selli, J., Karamese, M. and Malkoc, I., 2015) The protective effects of beta-carotene against ischemia/reperfusion injury in rat ovarian tissue. *Acta Histochemica*, 117(8), 790-797.
- Karihtala, P. and Soini Y. 2007. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *Apmis*, 115(2), 81-103.
- Karimi, S., Tabatabaei, S. N., Gutleb, A. C., Novin, M. G., Ebrahimzadeh-Bideskan, A. and Mofarahe, Z. S. 2020. The effect of PEGylated iron oxide nanoparticles on sheep ovarian tissue: An ex-vivo nanosafety study. *Heliyon*, 6(9), e04862,
- Karimi, Z., Ghaffari, M., Ezzati Nazhad Dolatabadi, J. and Dehghan, P. 2019. The protective effect of thymoquinone on tert-butylhydroquinone induced cytotoxicity in human umbilical vein endothelial cells. *Toxicology Research*, 8(6), 1050-1056.
- Karimian, A., Majidinia, M., Moliani, A., Alemi, F., Asemi, Z., Yousefi, B. and Fazlollahpour Naghibi, A., 2022. The modulatory effects of two bioflavonoids, quercetin and thymoquinone on the expression levels of DNA damage and repair genes in human breast, lung and prostate cancer cell lines. *Pathology Research and Practice*, 240, 154143.
- Kaseb, A. O., Chinnakannu, K., Chen, D., Sivanandam, A., Tejawani, S., Menon, M., Dou, Q. P. and Reddy, G. P. V., 2007. Androgen receptor and E2F-1 targeted

- thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Research*, 67(16), 7782–7788.
- Khader, M., Bresgen, N. and Eckl, P. M. 2009. In vitro toxicological properties of thymoquinone. *Food and Chemical Toxicology*, 47(1), 129-133.
- Khalil, A. A., Aziz, F. A. and Hall, J. C., 2006. Reperfusion injury. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117(3), 1024-1033.
- Khan, A., Chen, H. C., Tania, M. and Zhang, D. Z. 2011. Anticancer activities of *Nigella sativa* (black cumin). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(5S), 226–232.
- Khan, M. W., Rasheed, Z., Khan, W. A. and Ali, R. 2007. Biochemical, biophysical, and thermodynamic analysis of in vitro glycated human serum albumin. *Biochemistry (Moscow)*, 72, 146-152.
- Kierszenbaum, A. L. and Tres, L., 2015. Histology and Cell Biology: an introduction to pathology E-Book. Elsevier Health Sciences.
- Kierszenbaum, A. L., 2006. Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Follikül gelişimi ve Menstrual Döngü (siklus) (Çev. R. Demir), Palme Yayıncılık, Ankara.
- Kukan, M., 2004. Emerging roles of proteasomes in ischemia-reperfusion injury of organs. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 55(1), 3-15.
- Kulbacka, J., Saczko, J. and Chwilkowska, A. 2009. Oxidative stress in cells damage processes. *Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, 27(157), 44-47.
- Lefer, A. M. and Lefer, D. J., 1993. Pharmacology of the endothelium in ischemia-reperfusion and circulatory shock. *Annual Review of Pharmacology Toxicology*, 33, 71-90.

- Lew, R., 2019. Natural history of ovarian function including assessment of ovarian reserve and premature ovarian failure. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 55, 2-13.
- Li, X., Ma, N., Xu, J., Zhang, Y., Yang, P., Su, X., Xing, Y., An, N., Yang, F. Zhang, G., Zhang L. and Xing, Y., 2021. Targeting ferroptosis: pathological mechanism and treatment of ischemia-reperfusion injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1587922.
- Liang, S., Ping, Z. and Ge, J., 2017. Coenzyme Q10 Regulates Antioxidative Stress and Autophagy in Acute Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 9863181.
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D. and Abete, P., 2018. Oxidative stress, aging, and diseases, *Clinical Interventions in Aging*, 13, 757-772.
- Lopez-Nebolina, F., Toledo, A. H. and Toledo-Pereyra, L. H., 2005. Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion. *Journal of Investigative Surgery*, 18(6), 335-350.
- Lu, Y., Feng, Y., Liu, D., Zhang, Z., Gao, K., Zhang, W. and Tang, H. 2018. Thymoquinone Attenuates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury Through Activation of SIRT1 Signaling. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 47(3), 1193-1206.
- Mandelbaum, R. S., Smith, M. B., Violette, C. J., Matsuzaki, S., Matsushima, K., Klar, M., Roman, L. D., Paulson, R. J. and Matsuo, K., 2020. Conservative surgery for ovarian torsion in young women: perioperative complications and national trends. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 127(8), 957-965.

- Mazaud, S., Guigon, C. J., Lozach, A., Coudouel, N., Forest, M. G., Coffigny, H. and Magre, S., 2002. Establishment of the reproductive function and transient fertility of female rats lacking primordial follicle stock after fetal gamma-irradiation. *Endocrinology*, 143(12), 4775-4787.
- Mickle, D. A. and Weisel, R. D., 1993. Future directions of vitamin E and its analogues in minimizing myocardial ischemia-reperfusion injury. *The Canadian Journal of Cardiology*, 9(1), 89-93.
- Moloney, J. N. and Cotter, T. G., 2018. ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 80, 50-64.
- Montero, R., Artuch, R., Briones, P., Nascimento, A., Garcia-Cazorla, A., Vilaseca, M. A., Sanchez-Alcazar, J. A., Navas, P., Montoya, J. and Pineda, M., 2005. Muscle coenzyme Q10 concentrations in patients with probable and definite diagnosis of respiratory chain disorders. *Biofactors*, 25(1-4): 109-115.
- Morocz, M., Kalman, J., Juhasz, A., Sinko, I., McGlynn, A. P., Downes, C. S., Janka, Z., Rasko, I., 2002. Elevated levels of oxidative DNA damage in lymphocytes from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 23(1), 47-53.
- Mousavi, S. H., Tayarani-Najaran, Z., Asghari, M. and Sadeghnia, H. R., 2010. Protective Effect of Nigella sativa Extract and Thymoquinone on Serum/Glucose Deprivation-Induced PC12 Cells Death. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 30, 591-598.
- Mülazımoğlu, S. B., İde, T., Aslan, S., 2011. Ratlarda Üreme. Journal of clinical and Analytical Medicine, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji ABD, Ankara, Türkiye.
- Neha, K., Haider, M. R., Pathak, A. and Yar, M. S., 2019. Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 178, 687-704.

- Niki, E., 1993. Antioxidant defenses in eukariotic cells: an overview. *Free Radicals: From Basic Science To Medicine*, 365-373.
- Noguchi, N., Watanabe, A. and Shi, H., 2000. Diverse functions of antioxidants. *Free Radical Research*, 33(6), 809-817.
- Nour, M., Scalzo, F. and Liebeskind, D. S., 2013. Ischemia-reperfusion injury in stroke. *Interventional Neurology*, 1(3-4), 185-199.
- Novak, E. 2007. Berek & Novak's gynecology. 1671 p, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, ABD.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351-358.
- Oral, A., Halici, Z., Bayir, Y., Topcu, A., Un, H., Bilgin, A. O. and Atmaca, H. T., 2017. Effects of oral zinc administration on long-term ipsilateral and contralateral testes damage after experimental testis ischaemia-reperfusion. *Andrologia*, 49(6), e12673.
- Orrenius, S., Burkitt, M. J., Kass, G. E., Dypbukt, J. M. and Nicotera, P., 1992. Calcium ions and oxidative cell injury. *Annals of Neurology*, 32 (S1), 33-42.
- Ovalle, W. K. and Nahirney, P. C., 2008. Netter bases da histologia. Elsevier, Brasil.
- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G. ve Yönden, Z., 2015. Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6(3), 331-336.
- Özcan, O., Erdal, H. ve Yönden, Z., 2015. İskemi-reperfüzyon hasari ve oksidatif stres ilişkisine biyokimyasal bakış. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi*, 6(23), 27-33.

- Padhye, S., Banerjee, S., Ahmad, A., Mohammad, R. and Sarkar, F. H., 2008. From here to eternity - the secret of Pharaohs: Therapeutic potential of black cumin seeds and beyond. *Cancer Ther*, 6(b), 495–510.
- Page, R. C., 1991. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of Periodontal Research*, 26(3), 230-242.
- Pan, J., Konstas, A. A., Bateman, B., Ortolano, G. A. and Pile-Spellman J., 2007. Reperfusion injury following cerebral ischemia: pathophysiology, MR imaging, and potential therapies. *Neuroradiology*, 49, 93-102.
- Papalambros, E., Sigala, F., Georgopoulos, S., Paraskevas, K. I, Andreadou, I., Menenakos, X., Sigalas, P., Papalambros, A. L., Vourliotakis, G., Giannopoulos, A., Bakoyiannis, C. and Bastounis, E., 2007. Malondialdehyde as an indicator of oxidative stress during abdominal aortic aneurysm repair. *Angiology*, 58(4), 477-482.
- Parelkar, S. V., Mundada, D., Sanghvi, B. V., Joshi, P. B., Oak, S. N., Kapadnis, S. P., Shetty, S., Athawale, H. and Multani, P., 2014. Should the ovary always be conserved in torsion? A tertiary care institute experience. *Journal of Pediatric Surgery*, 49(3), 465-468.
- Parks, D. A. and Granger, D. N., 1986. Xanthineoxidase: biochemistry distribution and physiology. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum*, 548, 87-99.
- Parks, D. A., Williams, T. K. and Beckman, J. S., 1988. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 254(5), 768-774.
- Parlar, A. and Arslan, S. O., 2020 Thymoquinone reduces ischemia and reperfusion-induced intestinal injury in rats, through anti-oxidative and anti-inflammatory effects. *Turkish Journal of Surgery*, 36(1), 96-104.

- Phillips, L., Toledo, A. H., Lopez-Neblina, F., Anaya-Prado, R. and Toledo-Pereyra, L. H., 2009. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *Journal of Investigative Surgery*, 22(1), 46-55.
- Piper, H. M., García-Dorado, D. and Ovize, M., 1998. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 38(2), 291-300.
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Iordache, F., Stanca, L., Predoi, G. and Serban, A. I., 2021. Oxidative stress mitigation by antioxidants-an overview on their chemistry and influences on health status. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 209, 112891.
- Puglia, C. D. and Powell, S. R., 1984. Inhibition of cellular antioxidants: a possible mechanism of toxic cell injury. *Environmental Health Perspectives*, 57, 307-311.
- Rasheed, N. and Rasheed, Z., 2019. Oxidative biomolecular damage: A possible mechanism for systemic autoimmunity. *International Journal of Health Sciences*, 13(5), 1-3.
- Reardon, J. T., Bessho, T., Kung, H. C., Bolton, P. H. and Sancar, A., 1997. In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: Possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(17), 9463-9468.
- Reichmann, D., Voth, W. and Jakob, U., 2018. Maintaining a healthy proteome during oxidative stress. *Molecular Cell*, 69, 203- 213.
- Richards, L. R., Jones, P., Hughes, J., Benghuzzi, H. and Tucci, M., 2006. The physiological effect of conventional treatment with epigallocatechin-3-gallate, thymoquinone, and tannic acid on the LNCaP cell line. *Biomedical sciences instrumentation*, 42, 357-362.

- Rodriguez, S. F. and Granger, D. N., 2010. Role of blood cells in ischemia-reperfusion-induced endothelial barrier failure. *Cardiovascular Research*, 87(2), 291-299.
- Ross, M. H. and Pawlina W. 2006. Histology atext atlas with correlated cell and molecular biology. Lippincott Williams & Wilkins.
- Runge, M. S. and Patterson, C. M., 2006. Ovarian diseases. Principles of Molecular Medicine (Ed. E.A. McGee, T.L. Loucks), 2nd ed., Humana Pres Inc., New Jersey, 495-510.
- Russel, D. L. and Robker, R. L., 2007. Molecular mechanism of ovulation; coordination through the cumulus complex. *Human Reproduction Update*, 13(3), 289-312.
- Sadler, T. W. 2018. Langman's medical embryology. 472 p, Lippincott Williams & Wilkins.
- Saini, R., 2011. Coenzyme Q10: The essential nutrient. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 3(3), 466-467.
- Salem, A. A., El Haty, I. A., Abdou, I. M. and Mu, Y., 2015. Interaction of human telomeric G-quadruplex DNA with thymoquinone: A possible mechanism for thymoquinone anticancer effect. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1850(2), 329-342.
- Salih, B., Sipahi, T. and Dönmez, E. O., 2009. Ancient nigella seeds from Boyali Höyük in north-central Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*. 124(3), 416–420.
- Schmid-Schönbein, G. W. and Engler, R. L., 1987. Granulocytes as active participants in acute myocardial ischemia and infarction. *The American Journal of Cardiovascular Pathology*, 1(1), 15-30.
- Schorge, J. O., Schaffer, J. I., Halvorson, L. M, Hoffman, B. L., Bradshaw, K. D. and Cunningham, F. G., 2008. Epithelial ovarian cancer. "Williams Gynecology". The McGraw-Hill Companies, Inc., USA.

- Sedlak, J. and Lindsay, R. H., 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 25, 192-205.
- Sehirli, O., Sener, E., Cetinel, S., Yuksel, M., Gedik, N. and Sener, G., 2008. Alpha-lipoic acid protects against renal ischaemia-reperfusion injury in rats. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 35(3), 249-255.
- Senatorski, G., Paczek, L., Kropiewnicka, E. and Bartłomiejczyk, I., 2002. Cytokines in noninvasive diagnostics of diabetic nephropathy progression. *Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, 13, 28-32.
- Serracino-Inglott, F., Habib, N. A. and Mathie, R. T., 2001. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *The American Journal of Surgery*, 181(2), 160-166.
- Shaterzadeh-Yazdi, H., Noorbakhsh, M. F., Hayati, F., Samarghandian, S. and Farkhondeh, T., 2018. Immunomodulatory and Anti-inflammatory Effects of Thymoquinone. *Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets*, 18(1): 52-60.
- Shier, D., Butler, J. and Lewis, R., 2001. Human Anatomy and Physiology, 9th edition, 39 p, The McGraw-Hill.
- Sifuentes-Franco, S., Sánchez-Macías, D. C., Carrillo-Ibarra, S., Rivera-Valdés, J. J., Zuñiga, L. Y. and Sánchez-López, V. A., 2022. Antioxidant and anti-inflammatory effects of coenzyme Q10 supplementation on infectious diseases. *Healthcare*, 10(3), 487.
- Simani, L., Ryan, F., Hashemifard, S., Hooshmandi, E., Madahi, M., Sahraei, Z., Rezaei, O., Heydari, K. and Ramezani, M., 2018. Serum coenzyme Q10 is associated with clinical neurological outcomes in acute stroke patients. *Journal of Molecular Neuroscience*, 66(1), 53-58.

- Slater, T. F., 1984. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 105, 283-293.
- Soares, R. O., Losada, D. M., Jordani, M. C., Évora, P. and Castro-e-Silva, O., 2019. Ischemia/reperfusion injury revisited: an overview of the latest pharmacological strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), 5034.
- Solaini, G. and Harris, D. A. 2005. Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochemical Journal*, 390(2), 377-394.
- Standring, S., 2005. Gray's Anatomy, The Anatomical Basis of Clinical Practice, 39th edition, 137p, Elsevier Churchill Livingstone.
- Sugino, N., 2005. Reactive oxygen species in ovarian physiology. *Reproductive Medicine and Biology*, 4(1), 31-44.
- Sugino, N., Nakamura, Y., Okuno, N., Ishimatu, M., Teyama, T. and Kato, H., 1993. Effects of ovarian ischemia-reperfusion on luteal function in pregnant rats. *Biology of Reproduction*, 49(2), 354-358.
- Sun, Y., Oberley, L.W. and Li, Y. A., 1988. Simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, 34(3), 497-500.
- Svoboda, P., Maekawa, M., Kawai, K., Tominaga, T., Savela, K. and Kasai, H., 2006. Urinary 8- hydroxyguanine may be a better marker of oxidative stress than 8-hydroxydeoxyguanosine in relation to the life spans of various species. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(5-6), 985-992.
- Şener, G. ve Yeğen, B. Ç. 2009. İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi*, 22(3), 5-14.
- Tamamura, M., Saito, M., Kinoshita, Y., Shimizu, S., Satoh, I., Shomori, K., Dimitriadis F and Satoh, K., 2010. Protective effect of edaravone, a free-radical scavenger, on ischaemia-reperfusion injury in the rat testis. *BJU International*, 105(6), 870-876.

- Tamer, L., Polat, G., Eskandari, G., Ercan, B. ve Atik, U., 2012. Serbest radikaller. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 1, 52-58.
- Tielli, A., Scala, A., Alison, M., Vo Chieu, V. D., Farkas, N., Titomanlio, L. and Lenglar, L., 2022. Ovarian torsion: diagnosis, surgery, and fertility preservation in the pediatric population. *European Journal of Pediatrics*, 181(4), 1405-1411.
- Tokgoz, V. Y., Sipahi, M., Keskin, O., Guvendi, G. F. and Takir, S., 2018. Protective effects of vitamin D on ischemia-reperfusion injury of the ovary in a rat model. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 21(6), 593-599.
- Torres, M. P., Ponnusamy, M. P., Chakraborty, S., Smith, L. M., Das, S., Arafat, H. A. and Batra, S. K., 2010. Effects of thymoquinone in the expression of mucin 4 in pancreatic cancer cells: implications for the development of novel cancer therapies. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(5), 1419-1431.
- Ugurel, V., Cagatay Cicek, A., Cemek, M., Demirtas, S., Kocaman, A. T. and Karaca, T., 2017. Antioxidant and antiapoptotic effects of erdosteine in a rat model of ovarian ischemiareperfusion injury. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 20(1), 53-58.
- Un, H., Bayir, Y., Halici, Z., Akpınar, E., Karakus, E., Oral, A., Ziypak, T. and Selli, J., 2015. The effects of RAAS inhibition in rate limiting step by aliskiren on testicular torsion injury in rats. *The Journal of Urology*, 194(3), 828-833.
- Uzumcu, M. and Zachow, R., 2007. Developmental exposure to environmental endocrine disruptors: consequences within the ovary and on female reproductive function. *Reproductive Toxicology*, 23(3), 337-352.
- Vaghasiya, J. D., Sheth, N. R., Bhalodia, Y. S. and Jivani, N. P., 2010. Exaggerated liver injury induced by renal ischemia reperfusion in diabetes: effect of exenatide. *The Saudi journal of Gastroenterology*, 16(3), 174-180.

- Virág, L. and Szabó, C. 2002. The therapeutic potential of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacological Reviews*, 54(3), 375-429.
- Wang, L. and Mizaikoff, B. 2008. Application of multivariate data-analysis techniques to biomedical diagnostics based on mid-infrared spectroscopy. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 391(5), 1641-1654.
- Whitman, G. J., Niibori, K., Yokoyama, H., Crestanello, J. A., Lingle, D. M., and Momeni, R. 1997. The mechanisms of coenzyme Q10 as therapy for myocardial ischemia reperfusion injury. *Molecular Aspects of Medicine*, 18, 195-203.
- Wu, M. Y., 2018. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 46(4), 1650-1667.
- Yilmaz, E. P. T., Un, H., Gundogdu, B., Polat, E., Askin, S., Topdagi, Y. E. and Halici, Z. 2020. Protective effect of lycopene against reperfusion injury in rats with ovarian torsion: a biochemical and histopathological evaluation. *Journal of Laboratory Physicians*, 12(1), 32-37.
- Yu, B. P., 1999. Approaches to anti-aging intervention: the promises and the uncertainties. *Mechanisms of Ageing and Development*, 111(2-3), 73-87.
- Yue, R., Xia, X., Jiang, J., Yang, D., Han, Y., Chen, X., Cai, Y., Li, L., Wang, W. E. and Zeng, C., 2015. Mitochondrial DNA oxidative damage contributes to cardiomyocyte ischemia/reperfusion-injury in rats: cardioprotective role of lycopene. *Journal of Cellular Physiology*, 230(9), 2128-2141.
- Zimmerman, B. J. and Granger, D. N., 1992. Reperfusion injury. *Surgical Clinics of North America*, 72(1), 65-83.
- Zubair, H., Khan, H. Y., Sohail, A., Azim, S., Ullah, M. F., Ahmad, A., Sarkar, F. H. and Hadi, S. M., 2013. Redox cycling of endogenous copper by thymoquinone leads to

ROS-mediated DNA breakage and consequent cell death: putative anticancer mechanism of antioxidants. *Cell Death & Disease*, 4, e660.



EKLER

EK-1. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

	SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ Graduate School of Health Sciences	
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU¹		
Öğrencinin Adı ve Soyadı	Halil İbrahim ÖZKAN	
Öğrencinin Numarası		
Ana Bilim Dalı	Tıbbi Biyokimya	
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Doktora	
Yukarıda bilgileri verilen tezin intihal tespit yazılımıyla (Turnitin) yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdaki gibidir. Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi hâlde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.		
Bölümler	Benzerlik Oranı	Maksimum Benzerlik Oranları
I. Giriş	%15	% 15
II. Genel Bilgiler	%15	% 35
III. Materyal ve Metod	%24	% 35
IV. Bulgular	%15	% 15
V. Tartışma	%2	% 20
<i>Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.</i>		

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU

TOPLANTI TARİHİ : 30.07.2021

TOPLANTI SAYISI : 6

KARAR NO 178: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Nuri BAKAN'ın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneyisel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan "Over İskemi-Reperfüzyon Hasarı Oluşturulan Sıçanlarda Timokinin'in Doku Oksidatif DNA Hasarı Üzerindeki Koruyucu Etkilerinin Biyokimyasal, Histolojik ve Spektroskopik Yöntemlerle Belirlenmesi" isimli araştırma çalışması ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 30.06.2021 tarihli ve E-42190979-000-2100172688 sayılı yazısı ile ekleri görüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra, adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, taahhütname hükümleri gereğince çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesine, mevcut oy birliği ile kabülüne karar verildi.

Prof.Dr. Fikret ÇELEBİ
Kurul Başkanı

Ek : Sonuç Raporu. 1 Adet.

