T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

OVERİ TORSİYON EDİLMİŞ RATLARDA NİFEDİPİN, RESVERATROL VE DETORSİYON TEDAVİSİNİN SERUMDAKİ ANTİ-MÜLLERİAN HORMON DÜZEYİ VE OVERYAN HİSTOPATOLOJİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. AYDAN PİRİYEVA

ANKARA
MART 2021

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

OVERİ TORSİYON EDİLMİŞ RATLARDA NİFEDİPİN, RESVERATROL VE DETORSİYON TEDAVİSİNİN SERUMDAKİ ANTİ-MÜLLERİAN HORMON DÜZEYİ VE OVERYAN HİSTOPATOLOJİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. AYDAN PİRİYEVA

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. MESUT ÖKTEM

ANKARA
MART 2021

TEŞEKKÜRLER

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde çok büyük desteği olan, her türlü zorlukta yanımda olduğunu hissettiren tez danışmanım sayın Prof. Dr. Mesut Öktem'e; gerek teorik ve pratik bilgileriyle, gerek iyi ve kötü tecrübeleriyle eğitimimde katkısı olan ve bana her zaman yol gösteren tüm değerli hocalarıma teşekkür ederim.

Başım sıkıştığında yardıma koşan, varlığı güven veren, benim için birer abi ve abla gibi olan tüm uzmanlarımıza ve zor asistanlık döneminde ailemden çok vakit geçirdiğim, artık ikinci bir aile gibi gördüğüm başta Dilara Duygulu ve Ayşe Duygu Tufan olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Uzaktan da olsa sevgilerini hep hissettiğim, her türlü kararımda yanımda olan ve beni benden çok düşünen, bugünlere gelmemde en çok emeği olan çok sevgili aileme; desteğini ve yardımını esirgemeyen sevgili eşime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜRLER i

İÇİNDEKİLER ii

KISALTMALAR iv

TABLOLAR v

ŞEKİLLER ve GRAFİKLER vi

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Over 3

2.1.1. Embriyoloji 3

2.1.2. Over Anatomi 4

2.1.3. Rat Overi 5

2.2. Adneksiyal Torsiyon 7

2.2.1. Klinik 8

2.2.2. Değerlendirme 8

2.2.3. Tanı ve Tedavi 10

2.3. İskemi-Reperfüzyon Hasarı 11

2.4. Resveratrol ve Nifedipin 12

2.5. Anti-Müllerian Hormon 13

2.6. VEGFR-2 13

2.7. TAS, TOS 14

3. GEREÇ VE YÖNTEM 15

3.1. Deneysel Çalışma Modeli 15
3.2. Histolojik Ve Biyokimyasal Değerlendirme 19
3.2.1. Histomorfolojik İnceleme ve Follikül Sayımı 20
3.2.2. İmmünohistokimyasal İnceleme 24
3.2.3. Over Dokusunun TAS, TOS Ve OSI Düzeyinin Belirlenmesi 25
3.3. AMH Düzeyinin Biyokimyasal Olarak Belirlenmesi 26
3.4. İstatistiksel Değerlendirme 26
4. BULGULAR 28
4.1. AMH' nın Biyokimyasal Değerlendirilmesi 28
4.2. Histomorfolojik Değerlendirme 29
4.3. İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları 37
4.3.1. AMH İşaretleme Bulguları 37
4.3.2. VEGFR-2 İşaretleme Bulguları 40
4.4. TAS-TOS düzeyi ve OSI Değerlendirilmesi 47
4.5. Follikül Sayımı Bulguları 47
5. TARTIŞMA 50
6. SONUÇ 56
7. ÖZET 57
8. SUMMARY 59
9. KAYNAKÇA 61
10. EKLER 69
EK 1: ETİK KOMİSYON ONAYI 69
11. ÖZGEÇMİŞ 70

KISALTMALAR

AMH : Anti-Müllerian Hormon
BT : Bilgisayarlı Tomografi
CM : Santimetre
CV : Varyasyon Katsayısı
DAB : Diaminobenzedin
DNA : Deoksiribo Nükleik Asit
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EOSİN B : Eosin Bluish
EOSİN Y : Eosin Yellowish
H&E : Hematoksilen-Eozin
I/R : İskemi-Reperfüzyon
IL-6 : İnterlökin – 6
IVF : İnvitro Fertilizasyon
KG : Kilogram
LH : Luteinizan Hormon
MG : Milligram
ML : Millilitre
MR : Manyetik Rezonans
OSI : Oksidatif Stres İndeks
PBS : Phosphate Buffer Saline
TAS : Total Antioksidan Seviyesi
TGF- β : Transforming Growth Factor β
TOS : Total Oksidan Seviyesi
USG : Ultrasonografi
VEGFR-2 : Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü Reseptörü-2

TABLOLAR

Tablo 1. Grup içi AMH′ nın preoperatif ve postoperatif değişiminin değerlendirilmesi. Paired Sample T test. p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı değerlendirildi. 28
Tablo 2. AMH ve VEGFR-2' nin çalışma gruplarında immünohistokimyasal boyamalarda gözlemsel değerlendirilen tutulumları. 47
Tablo 3. TAS-TOS ve OSI değerlendirilmesi. ANOVA testi. p<0.05 istatiksel olarak anlamlı değerlendirildi. 47
Tablo 4. Gruplar arası primordial, primer, sekonder, antral, korpus luteum ve atretik follikül sayımının değerlendirilmesi. ANOVA testi. p<0.05 istatiksel olarak anlamlı değerlendirildi. 48
Tablo 5. Primordial ve Sekonder follikül için 2'li grup karşılaştırması. Independent T test. p <0.05 istatiksel olarak anlamlı değerlendirildi. 49

ŞEKİLLER ve GRAFİKLER

Şekil 1: Kadın iç genital sistemi 5
Şekil 2: Dişi rat genital sistemi 6
Şekil 3: İçerisinde kist bulunan torsiyone over görüntüsü. Ok ile periferal yerleşimli folliküller gösterilmiştir 9
Şekil 4: 180.Dakikada detorsiyon öncesi overin görünümü.....17
Şekil 5: Deney Tasarım Şeması.....18
Şekil 6: Normal yapılarıyla izlenen primordiyal folliküller (P), primer folliküller (MP) ve zona pellucidanın (→) belirgin gözlemlendiği sekonder follikül (SF), tek katlı kübik epitelden oluşan epitelyum germinativum (*) (H-E, X200) 23
Şekil 7: Sadece torsiyon-detorsiyon uygulaması yapılan grupta gelişen vaksküler dilatasyon (→) ve atreziye giden folliküllerin (*) varlığı gözlemlendi (H-E, X100).....23
Şekil 8: Sham kontrol grubu; küçük büyütmedeki incelemede ovaryum korteks (K) ve medulla (M) olarak iki katmanıyla ayırt edildi. Kortekste gelişim aşamasında folliküller izlendi. Damar yapısı (→) normaldi. Gelişen folliküller; primordial follikül (*), unilaminer primer follikül (♦), sekonder follikül (■) ve antral follikül (A); (H-E, X100) 29
Şekil 9: Normal yapılarıyla izlenen primordiyal folliküller (P), primer folliküller (MP) ve zona pellucidanın (→) belirgin gözlemlendiği sekonder follikül (SF), tek katlı kübik epitelden oluşan epitelyum germinativum (*) (H-E, X200). 30
Şekil 10: Bol vaskülerize yapısı ile teka interna (↔), oositin etrafını saran korona radiata (*) ve kumulus ooforus (KO) normal histolojik yapı ile ayırt edildi (H-E, X400). 30
Şekil 11: Sadece torsiyon-detorsiyon uygulaması yapılan grupta gelişen vasküler dilatasyon (→) ve atreziye giden folliküllerin (*) varlığı gözlemlendi (H-E, X100).....31

Şekil 12: Zona pellusida dejenerasyonu (*) ve hiyalinizasyon gösteren atretik follikül (AF), antrum organizasyonunun bozulduğu (↔) ve stratum granülozum hücrelerinde heterokromatin çekirdek ve intrasitoplazmik ödemin (→) varlığı belirlenir. (H-E, X200).....32
Şekil 13: Tersiyer follikül duvarında apoptotik cisimcikler (→) ve yer yer hücre katmanında da ayrılmalar (↔), zona pellusidasında dejenerasyon meydana gelen atretik folliküller (AF) ve net bir şekilde ayırt edilemeyen doku ödemi gelişen primordial folliküller (*) (H-E, X200).....32
Şekil 14: Primordiyal folliküller (P) ve primer folliküller (unilaminer primer follikül: UP) normal histolojik yapı gösterirken sekonder folliküller (SF) ve antral folliküllerde (AF) atreziye gidiş görülmektedir (H-E, X100).....33
Şekil 15: Normal histolojik yapıda gelişim gösteren primordiyal (PF) ve unilaminer primer follikül (UPF) (H-E, X200).....33
Şekil 16: Atreziye giden antral follikül (*) ve atreziye giden sekonder follikül (↔) (H-E, X200).....34
Şekil 17: Atreziye giden primer follikül (*) ve sekonder follikül (→) (H-E, X200).....34
Şekil 18: Primordial folliküller (→) ve primer folliküller (PF) de normal oluşumdaydı. (H-E, X100).....35
Şekil 19: Büyük büyütmede nifedipin tedavisi uygulanan grupta normal histolojik yapı gösteren farklı gelişim aşamalarındaki folliküller; primordiyal folliküller (→), primer follikül (*) ve antral follikül (↔). Antral follikülündeki stratum granülosa (str g.) hücreleri normal yapıdadır. (H-E, X200) 36
Şekil 20: Antral follikülde teka interna (→) bol vasküler yapıda izlendi. (H-E, X100).....36
Şekil 21: Kontrol grubunda AMH antikorunun immünohistokimyasal boyamasında kuvvetli tutulum gösteren preantral folliküller (P) ile

zayıf ve kuvvetli tutulum gösteren antral folliküller (A), kırmızı renkli oklar (→) kuvvetli tutulum gösteren granüler hücreleri, sarı renkli oklar (→) da zayıf tutulum sergileyen granüler hücreleri göstermektedir. (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X200).....37
Şekil 22: Torsiyon uygulaması yapılan grupta preantral (P) ve özellikle antral folliküllerden (A) küçük folliküllerde negatiften (→) zayıfa (→) değişen immünreaktivite gösteren granüler hücreler (*) ile atretik (AF) folliküllerdeki kuvvetli (→) tutulum gösteren granüler hücreler. (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X200).....38
Şekil 23: Resveratrol uygulanan grupta kontrol grubuna göre zayıf torsiyon uygulanan gruba göre kuvvetli AMH tutulumu sergileyen granüler hücreler (→), preantral (P) ve antral folliküller (A). (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X200).....39
Şekil 24: Nifedipin uygulanan grupta AMH immünboyamalarında belirgin immünreaktivite gösteren preantral (P) ve antral (A) folliküller, kuvvetli AMH tutulumu sergileyen granüler hücreler (→), teka interna (*) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X200).....40
Şekil 25: Kontrol grubundan yapılan VEGFR-2 immünohistokimyasal boyamalarında medulladaki kapillerlerde tutulum saptanan endotel hücreleri (→), VEGFR2 tutulumu saptanmayan büyük damar endoteli (→) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X200).....41
Şekil 26: Kontrol grubunda kortekste yer alan preantral ve antral folliküllerde granüler katmanında (*) yer yer zayıf VEGFR-2 tutulumu izlenirken, kortekste bulunan kapillerle (→) de tutulum saptandı. (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X200).....41
Şekil 27: Torsiyon-detorsiyon grubunda doku genelinde kuvvetli immünreaktivite, kapillerlerde tutulum saptanan endotel hücreleri (→), kuvvetli VEGFR-2 tutulumu saptanan büyük damar endoteli (→) ve kuvvetli immün tutulum gösteren düz kas hücreleri (*) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X200).....42

Şekil 28: Kortekste antral follikülde (A) ve atretik folliküllerde (AF) granüloza katmanında (↔) kuvvetli ve yaygın VEGFR-2 tutulumu ile kapiller endotel hücrelerinde belirgin tutulum (→) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X200) 43
Şekil 29: Resveratrol grubunda medullada bulunan tüm damar tiplerinde negatiften (→) zayıfa (*) değişen immüntutulum (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X200) 43
Şekil 30: Antral follikül (A) granüloza katmanında (↔) kontrol grubuna benzer tutulum (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X200) 44
Şekil 31: Atretik folliküllerde (AF) non-dejenere folliküllere benzer immün tutulum (↔), korteks kapillerlerinde yer yer immünoreaktivite (→) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X200).....44
Şekil 32: Nifedipin grubunda torsiyon grubuna daha yakın tutulum düzeyinde olduğunu gösteren resim, VEGFR-2 tutulumu; medullada bulunan damarların endotel (*) hücrelerinde, preantral (P) ve antral (A) folliküllerin granüloza (↔) katmanlarında, Atretik folliküllerin (AF) granüloza katmanlarında (↔) torsiyon grubundan daha zayıf, orta düzeyili bir reaktivite (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X200) 45
Şekil 33: Nifedipin uygulanan grupta korteks kapillerlerinde (→) de torsiyon grubuna benzer immünreaktivite (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X200).....46

1. GİRİŞ

Adneksiyel torsiyon adneksin (over ve tuba uterinanın) infundibulopelvik ligament veya tubo-overyan ligament merkezinde vasküler ekseni etrafında total ya da parsiyel olarak dönmesi demektir (Polat ve arkadaşları, 2015) (1). Torsiyona uğrayan adnekste venöz ve lenfatik blokaj gelişir. Ovaryum parankiminde hemorajik alanlar oluşur. Dokulardaki arteriyal blokaj nedeniyle gangren ve nekrotik tablo meydana gelir. Torsiyonun derecesine göre (komplet, inkomplet ya da spontan detorsiyon göstermesi şeklinde) asemptomatik olabileceği gibi keskin akut ve giderek artan ağrı şeklinde semptom verebilir (Bingöl ve Günenç, 2005) (2). Reprodüktif çağdaki kadınlarda görülen, adneksi oluşturan tuba uterina, over ve komşu yapıları ayrı ayrı veya birlikte etkileyerek organlarda iskemik hasara neden olan bir durumdur. Tanı için Doppler ultrasanografi (USG) yardımcıdır. Nadir görülen bir durum olup ortaya çıktığında olguların yarısından fazlasında jinekolojik açıdan acil müdahale gerektiren bir durumdur (Koca, Yıldız ve Yılmaz, 2014) (3). Adneksiyal torsiyon nonspesifik bulgu ve semptomlara sahip olduğundan tedavide gecikme söz konusudur. Torsiyon tedavi edilmezse doku nekroze olur, hafif ateş ve lökositoz başlar ve nadiren de olsa letal sonuca kadar ulaşabilen değişen derecelerde klinik tablolar oluşabilir (Bingöl ve Gönenç, 2005) (2). Önceleri tedavide torsiyone olan adneksin çıkartılması ön planda iken artık torsiyone olan adneksi detorsiyone etmek daha konservatif bir yaklaşım olarak görülüp klinik olarak uygulanmaktadır (Joliniere ve arkadaşları, 2017) (4). Ancak yapılan çalışmalar göstermiştir ki torsiyone olan adnekste hasarı oluşturan sadece

iskemi değil detorsiyon – reperfüzyon sonrası dokuda ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin yarattığı reperfüzyon hasarıdır. Bu nedenle bu hasarı önlemek amacı ile kullanılabilecek ajanlar geliştirilmektedir (Borekci ve arkadaşları, 2009) (5). Yapılan çalışmalarda nifedipin (Mestroviç ve arkadaşlar, 2014) (6) ve resveratrolun (Hasçelik ve arkadaşları, 2004) (7) reperfüzyon hasarını azaltabilecek özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle biz bu çalışmada nifedipin ve resveratrolun iskemi – reperfüzyon (I / R) modeli oluşturulan ratlarda over rezervi üzerine olan koruyucu etkisine bakmayı amaçlamaktayız. Bu çalışmada aynı koşullardaki 4 grup rata (I. Kontrol grubu, II. İskemi-reperfüzyon yapılan grup, III. İskemi-reperfüzyon yapılıp nifedipin verilen grup, IV. İskemi-reperfüzyon yapılıp resveratrol verilen grup) belirlenen süre aralığında deneysel prosedür uygulandıktan sonra biyokimyasal olarak serum Anti - Müllerian Hormon (AMH) düzeyi belirlenmesi, çıkartılan over dokusundan alınan kesitlerde immünohistokimyasal olarak AMH ve Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü Reseptörü - 2 (VEGFR-2) işaretlemesinin yapılması, Total Antioksidan ve Total Oksidan (TAS, TOS) seviyesinin bakılması, histokimyasal olarak boyanan preparatların primordiyal follikül, antral follikül, atretik follikül ve corpus luteum sayımı yapılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Over

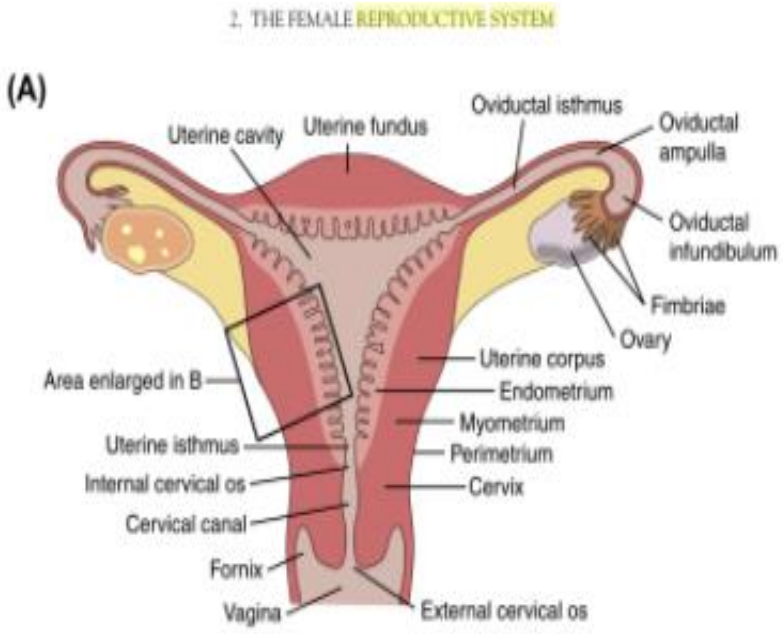
2.1.1. Embriyoloji

Gebeliğin 5. haftasında gonadlar çölemik çıkıntı şeklinde mezonefroz üzerinde yoğunlaşırlar. Bunlar gonadal çıkıntı şeklinde adlandırılırlar. Bu dönemde gonadlar distal çölemik epitel ile iç içe olan germ hücreleri, içte de medullar mezenşimden oluşmaktadır. Gonadal çıkıntılar germ hücrelerinin yaşamasi için en uygun yerdir. Germ hücreleri dorsal mezenter boyunca ameboid hareketlerle gebeliğin 4-6 haftasında bahsettiğimiz gonadal çıkıntılara göç eder. Göç zamannda eş zamanlı olarak germ hücreleri prolifere olmaya başlar. Germ hücreleri hem sperm hem de ovumun öncülüdür. Gebeliğin 6. haftasında bunlar mitozla çoğalarak yaklaşık 10.000 civarında bir sayıya ulaşır. Bu haftada gonadlar germ hücresi, çölomik epitel ve mezenşimden oluşmaktadır. Y kromozomu varlığında SRY geninin varlığı ile gelişim testis yönünde olur. Yokluğunda ise evrimsel gelişim her zaman dişi yönündedir. Dişi embriyoda germ hücreleri gelişmekte olan gonadların dışına lokalize olur. Yüzey epiteli cinsiyet kordonlarını oluşturur. Bu kortikal cinsiyet kordonları germ hücrlerini sarar ve follikülün granülozasını oluşturur. Mezenşim dokusu ise follikülü çevreleyen teka hücrelerini oluşturur. Gebeligin 20. haftasına kadar oogonia adı verilen bu germ hücreleri hızla çoğalarak yaklaşık 6-7 milyona ulaşır. Ancak bilinmeyen bir nedenle bunların çoğu ateziye uğrar. Doğumda sadece 1-2 milyon pubertede

300.000 oosit bulunmaktadir. 8. gebelik haftasında oogoniyumlar mayoza girerler, mayoza giren oogoniyumlar oosit adını alır. Bunlar ovulasyon zamanına kadar (puberteye kadar) kadar 1 mayozun profaz sahfasında kalırlar. Ovulasyon zamanında luteinizan hormon (LH) piki ile 1 mayoz tamamlanır, 2 mayozun metafaz safhasına gelinir. Eğer fertilizasyon olursa 2 mayotik bölünme tamamlanır (8).

2.1.2. Over Anatomi

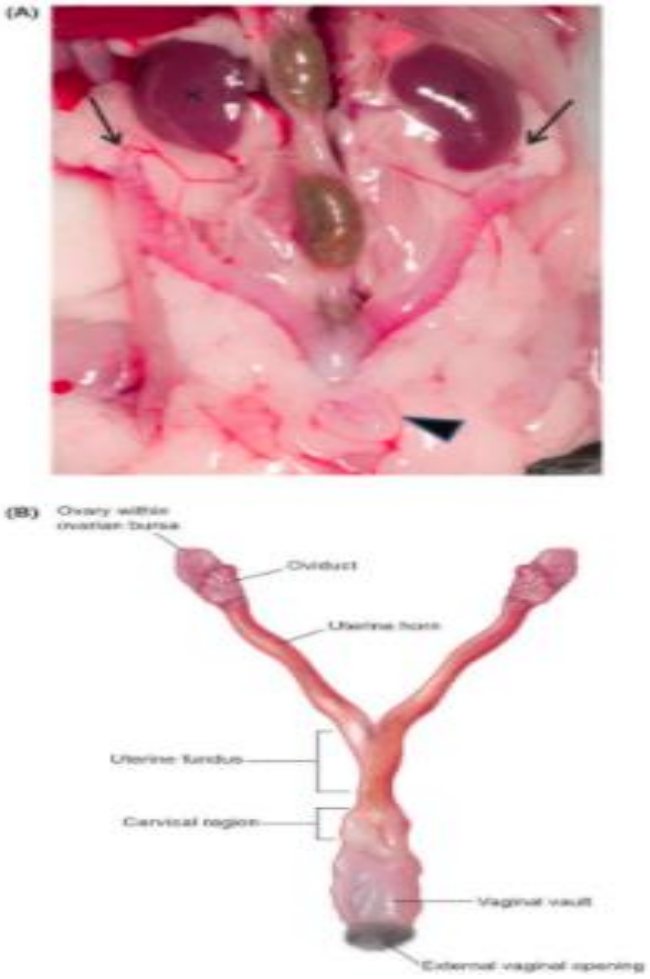
Fallop tüpleri ve overler adneksi oluştururlar. Fallop tüpleri uzunluğu yaklaşık genellikle 7-12 cm arasındadır. Fertilizasyon için mutlak gereklidir. Fallop tüpleri ovumun yakalanması, ovum için fiziksel ortam yaratmak, fertilize ovumun trasportundan sorumlu bir yapıdır. 4 kısımdan oluşur: İnterstisyal, istmus, ampulla ve fimbriya. Asıl gonadal yapı overlerdir. Overler pelvise ligamanlarla tutunur. İnfundibulopelvik ligaman sayesinde pelvik yan duvara, uterooveryan ligaman sayesinde ise uterusla bağlantı kurar. Seröz tabakası sayesinde ise broad ligamana tutunur. Over; korteks ve medulladan oluşmaktadır. Korteks de follikül ve stromadan oluşur. Normal bir over boyutu 5x3x3 cm boyutunda olup, dönemsel olarak degişiklik gösterebilmektedir. Overin kanlanması overyan arter tarafindan sağlanır, inervasyonu ise overyan pleksus ve uterovajinal pleksus tarafindan sağlanmaktadır. Adnekslerin lenfatik drenaji ise paraaortik lenf nodlarınadır (9).



Şekil 1: Kadın iç genital sistemi (10)

2.1.3. Rat Overi

Ratların overleri böbreklerin kraniyal kısmında yer almakta olup helezonik yapıdadırlar. Dişi üreme sistemi 2 over ve genital traktustan ibarettir. Genital traktusa ait olan yapılar: Ovidukt, uterus, serviks ve vajendir. Overler, overyan bursa denilen kapsül ile kaplıdır. Oviduktlar küçük ve aşırı derecede kıvrımlı yapılardır. Uterus fazla sayıda döllenmeyi sağlayan 2 ayrı horndan (uterus didelfis) oluşur. Overler; ovidukt denen yapı ile bikornual yapılı uterusa bağlanır (11).



Şekil 2: Dişi rat genital sistemi (12).

Overler histopatolojik olarak korteks ve medulladan ibarettir. Yetişkin bir ratta korteks; follikül ile doludur. Folliküler atrezi yaklaşık 18 günde başlar. Ratlarda overyan gelişim 4 evrede gerçekleşir: 1. Dönem; neonatal (doğum-1 hafta), 2. Dönem; infantil (1-3 hafta arası), 3. Dönem; juvenil (3-4,5 hafta arası), 4. Dönem; prepubertal dönem (juvenil dönemden sonraki 3 gün) (13). Dişi ratlarda primordiyal follikül havuzu doğumdan sonraki 3 günde oluşur. Bu folliküller infantil dönem sırasında hızlıca gelişirler. Folliküller infantil periyodun

ortasından büyüme havuzuna girip juvenil dönem boyunca büyümeye devam ederler. Puberteden önce preovulatuar folliküle dönerler. İlk ovulasyon, yaklaşık rat 5 haftalık iken olur. Ratlarda ilk östrus yaklaşık 5 haftalıkken olmakta olup, her östrus siklusu 5 gün sürmektedir. Ovulasyon spontane gerçekleşmektedir. Rat overini histopatolojik olarak incelediğimizde primordial, primer, sekonder, preantral, antral ve atretik antral follikülleri görüyoruz (14).

2.2. Adneksiyal Torsiyon

Adneksiyal torsiyon kadınlarda çok sık rastlanmasa da abdominal ağrının en önemli nedenlerinden biridir. Jinekolojik cerrahi aciller arasında 5. sırada olup, görülme oranı %2.7 dir (15). Adneksiyal torsiyon overin, fallop tüplerinin veya her ikisinin kendi vasküler eksenleri etrafında kısmı veya total rotasyonu olarak tanımlanır. Torsiyon sonucunda overde iskemi gelişir. Arteryal kan akımının kesilmesi sonucu iskemi ve ödem oluşur, oluşan bu ödemin venöz drenajı bozması sonucu belli bir süre sonra dokuda kan akımı iyice bozulur ve nekroz oluşur (16). Adneksiyal torsiyon sağ adnekste (% 66) sol adneksten daha sık görülmektedir (17), (18). Adneksiyal kitle yetişkinlerde görülen torsiyon vakalarının çoğunda görülmektedir. En sık görülen tümörler; benign over tümörleri ve tubal veya paraoveryan kistlerdir (19, 20). Yetişkinlerde en sık görülen benign over tümörler kistik teratom (%60) ve kistadenomdur (%30) (21, 22). Malign tümörler torsiyon vakalarında daha az görülmekte olup, yetişkin torsiyon vakalarının sadece %3' te görülmüştür. Pediyatrik torsiyon vakalarında yetişkinlere nazaran daha az tümör görülmektedir. Yapılan bir çalışmada 50 onaylanmış torsiyon vakasının sadece

%15’ inde tümör görülmüştür. Bu tümörlerin çoğu teratom (%25) ve benign fonsiyonel over kistleridir. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki torsiyon, genelde 5 cm ve üzeri boyuttaki overlerde gerçekleşir (23). Gebelik, ovulasyon indüksiyonu ve geçirilmiş torsiyon öyküsü adneksiyal torsiyon riski artıran faktörlerdir.

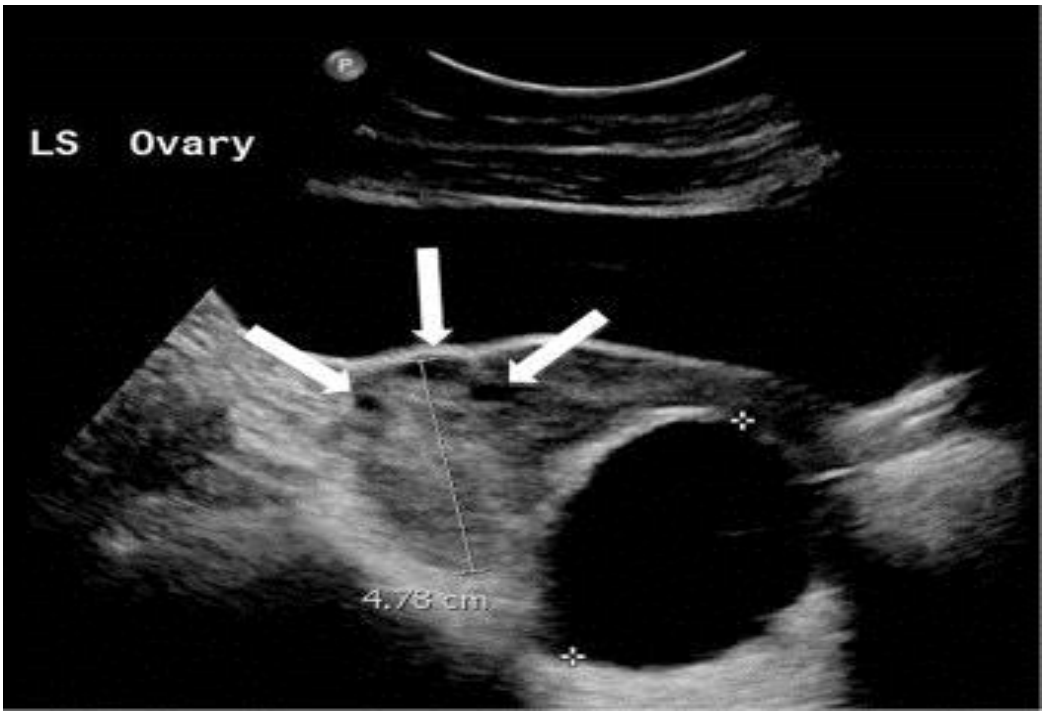
2.2.1. Klinik

Adneksiyal torsiyonun klinik prezentasyonu genelde akut pelvik ağrı, bulantı ve kusma ve adneksiyal kitle şeklindedir. Ancak bu semptomlar çoğu zaman degişkenlik gösterebildikleri gibi birçok başka durumlarla da ilgili olabilir. Ateş, daha nadir görülen semptomlardan biridir (%4) (24).

2.2.2. Değerlendirme

Hastanın ilk önce medikal öyküsü alınıp, fizik muayenesi yapılmalıdır. Fizik muayenede akut batın bulgularının olup olmamasına dikkat edilmelidir. Çoğu hastada pelvik ve abdominal hassasiyet olmasına karşın bazı hastalarda bu bulgular olmayabilir. Abdominal hassasiyet çoğu zaman torsiyone olmuş adneks tarafına lokalize oluyor (24). Abdominal hassasiyete neden olabilecek diğer durumlar göz önünde bulundurulmalıdır (Ektopik gebelik, kolesistit, appendisit, divertikülit vs.). Laboratuvarda hastanın beta-hcg, tam kan sayımı ve elektrolitlerine bakılmalıdır. Gebe kadınlarda torsiyon riskinin artması ve ektopik gebelik açısından torsiyon şüphesi bulunan hastalardan beta-hcg bakılması mühimdir. Bazı torsiyon vakaları hemoraji, anemi ve lökositoza neden olabilir. Bu bulguların olmadığı birçok torsiyon vakasının olmasına rağmen, bulguların varlığı

torsiyon şüphesi bulunan hastada adneksiyal hasar olduğu düşüncesini artırır. Adneksiyal torsiyonu gösteren spesifik laboratuvar bulguları olmasa da birkaç küçük çalışmada artan interlökin – 6 (IL-6) değerleri ile adneksiyal torsiyon arasında ilişki saptanmıştır (25). Hastayı değerlendirmede ilk görüntüleme yöntemi olarak usg önerilmektedir. Usg' de ödemden dolayı karşı taraf overden büyük over görülmesi, adneksiyal tümör görülmemiş, over lokalizasyonu değişmemiş, overde heterojen görünümünün olması, multiple küçük periferal yerleşimli folliküllerin gözükmesi torsiyonda görülen yaygın bulgularıdır. Adneks torsiyone olduğunda venöz ve lenfatik akım engellenir. Bunu takiben adnekste şişme ve ödem gelişir ve sonuç olarak arteriyal akım bozulur.



Şekil 3: İçerisinde kist bulunan torsiyone over görüntüsü. Ok ile periferal yerleşimli folliküller gösterilmiştir (26).

Doppler usg ile venöz ve arteryel akım eksikliğini görebiliyoruz (27). Yapılan bir çalışmada gösterilmiştir ki venöz doppler daha yüksek pozitif prediktiv değere sahiptir (torsiyon vakalarının %94 için). Arteryel kan akımının torsiyon vakalarının %60' da devam ettiği gösterilmiştir (28). Anormal doppler kan akımı torsiyon vakalarının hepsinde görülmez. Bu da tanı ve tedavide gecikmelere neden olabiliyor. USG' de inceleme esnasında vasküler yapıların oluşturduğu "whirlpool sign" dediğimiz görüntüyüde görebiliriz. Bu bulgu tanı koymaya yardımcıdır ama her vakada görülmez. Bilgisayarlı Tomografi (BT) ve Manyetik Rezonans (MR) görüntüleme ile genelde acil servis departmanlarında tanı amacı ile kullanılabilir. BT' de eşzamanlı tuba duvar kalınlığı, kist varlığında; kist duvar kalınlığı, asit, torsiyone olan adneks tarafına uterin deviasyon gözlenebilir. MR' da ise, özellikle T2 sekansta dönmüş adneksin stroması suya benzer hiperintesitisite gösterir (29).

2.2.3. Tanı ve Tedavi

Bütün klinik, laboratuvar ve görüntüleme bulgularına rağmen adneksiyal torsiyonun kesin tanısı eksplorasyonda görülür. Bunun için en çok tercih edilen yöntem ise laparoskopik yöntemdir. Tedavi yöntemi ise hastanın yaşına, fertil durumuna neoplazm riskine, menopozda olup olmadığına ve başka risk faktörlerinin bulunup bulunmadığına göre verilir (30). Eskiden torsiyone olan overin direkt çıkarılması altta yatan maligniteyi kaçırmamak, tromboemboli riski, torsiyone olan overin hasardan dolayı fonksiyonunu kaybetmesi gibi düşüncelerden dolayı esas tedavi yöntemi olarak görülmekteydi. Son yıllarda

yapılan çalışmalar ise torsiyon tedavisinde konservatif yaklaşımların daha faydalı olduğunu gösteriyor. Konservatif yaklaşımlar özellikle fertilite çağında olan kadınlar için daha önemlidir. Amaç fertil bir kadında over rezervini maksimum derecede korumaktır. Torsiyone olan overin çıkarılması yerine detorsiyon tedavisi, detorsiyon sonrası ekstirpasyonu mümkün olan benign kistlerin çıkarılması daha uygun bir yaklaşım olarak görülmektedir. Eskiden torsiyone olan overin detorsiyone edilmesinin tromboemboli riskini artırdığı düşünülüyordu. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki adneksiyal torsiyon sonrası detorsiyon yapılması tromboemboli riskini arttırmadığı gibi uzun dönemde yapılan usg de overlerde folliküler aktivitenin yeniden oluştuğu gösterilmiştir (31, 32).

2.3. İskemi-Reperfüzyon Hasarı

Adneksiyal torsiyon, iskemik hasar oluşturur. Bizim tedavideki hedefimiz overin kanlanmasını yeniden sağlayıp fonksiyonlarını geri kazandırmaktır. Ancak yapılan çalışmalar göstermiştir ki iskemi sonrası reperfüzyon dokulara daha çok zarar verebilir. Bunun nedeni reperfüzyon sonucu dokuda oluşan serbes oksijen radikalleridir (33). Buna iskemi-repefüzyon hasarı (I / R hasarı) denir. O yüzden sadece detorsiyon tedavisi yeterli olmayıp, detorsiyon sonrası over dokusunu bu oksidatif hasardan korumaya yönelik medikal tedaviler araştırılmaktadır (34). Bizim amacımız ise bu çalışmada nifedipin ve resveratrolun iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan overlerde koruyucu etkisini araştırmaktır.

2.4. Resveratrol ve Nifedipin

Vücut tarafından normal fizyolojik oksijen tüketimi (solunum, immun olaylar gibi) esnasında reaktif okijen radikalleri üretilir. Bunlara örnek olarak serbest superoksid anyonu ve hidroksil grubu; serbest olmayan oksijen radikali ise hidrojen peroksid ve oksijen moleküleridir. Normalde bu moleküller fizyolojik miktarlarda hücrelere zarar veremezler, ancak fazla miktarda biriktikleri zaman başta lipidlere olmak üzere, DNA, karbohidrat ve protein hasarına neden olur (35).

Resveratrol (3,4′,5-trihydroxy-*trans*-stilbene) doğal fitoalexin olup, üzüm ve şarapta bulunur. Resveratrolun antiproliferatif ve antioksidan etkisi bulunmaktadır. Resveratrol çok bilinen bir molekül değil, ama yapılan araştırmalar göstermiştir ki içerdiği hidroksil gruplarının sayısı ve pozisyonu onun antioksidan etkinliğinde rol oynuyor. Resveratrolun lipid metabolizmasını modüle ettiği, düşük molekul ağırlıklı lipidleri oksijen radikallerine karşı ve oksidatif hasardan koruduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (36). Yapılan çalışmalarda resveratrolun antioksidan etkisi sayesinde (moleküler yapısından dolayı) dokuda iskemi-reperfüzyon sonrası oluşan hasarı azalttığı gösterilmiştir (37).

Nifedipin, dihidropiridin grubu kalsiyum kanal blokörüdür. Kalsiyum kanal blokörlerinin esas kullanım yeri hipertansiyon ve koroner kalp hastalıklarıdır. Yapılan çalışmalarda kalpte ve testiste iskemi- reperfüzyon hasarı sonrası oluşan oksijen radikallerini azalttığı görülmüştür (38, 39). Bu nedenle

çalışmamızda resveratrol ve nifedipinin iskemi-reperfüzyon hasarı üzerindeki etkisini araştıracağız.

2.5. Anti-Müllerian Hormon

AMH; Transforming growth factor (TGF-β) ailesinin üyesi olup preantral ve erken antral folliküllerden salgılanır. AMH bize sahip olunan primordial follikül havuzu hakkında bilgi verip, over fonksiyonunu değerlendirmek için olan en iyi biyokimyasal markerlardan biridir. Primordial follikül havuzu yaşla birlikte azaldıkça AMH düzeyi de azalır. AMH, menopozda ölçülemez düzeydedir. Invitro fertilizasyon (IVF) planlanan hastalarda AMH over stimulasyonu sonrasında elde edilebilecek oosit sayısı ile korelasyon gösterir. Over stimulasyonu yapılan hastalarda düşük ve aşırı over yanıtını göstermede önemli bir prediktif değer olmasına rağmen canlı doğum oranını göstermedeki prediktif değeri o kadar yüksek değil (40, 41). Biz bu çalışmamızda iskemi- reperfüzyon hasarının ve vereceğimiz medikal tedavilerin AMH düzeyi üzerindeki etkilerini araştıracağız.

2.6. VEGFR-2

VEGF; vasküler endotelyal hücre büyümesinde ve vasküler permeabiltede en önemli rol oynayan faktörlerden biridir. Yapılan çalışmalarda birçok kötü huylu tümörlerin büyümesinde ve metastazında rol oynadığı görülmüştür (42). VEGF reseptorünün 3 alt tipi mevcuttur, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3. Tüm reseptör alt tipleri immünoglobin zincirlerine sahip olup tirozin kinaz bağımlı

çalışmaktadır. Bu reseptörler embriyonik vaskülogenezis, tümor anjiogenesiz ve lenfanjiogenezisten sorumludur (43). Hipoksi anjiogenezis için potent stimül olup, çeşitli organ ve hücrelerde VEGF ve reseptörlerinin up regulasyonuna neden olur. Renal iskemi-reperfüzyon modeli yapılan bir çalışmada VEGF ve VEGFR-1 ekspresyonun artmadığı, ancak VEGFR-2 ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. Artan bu VEGFR-2 ekspresyonunun endotel hücrelerinin bütünlüğünü ve iskemik dokulara kan sağlama potansiyelini koruduğu düşünülmektedir. Bu nedenle çalışmamızda bütün gruplarda VEGFR-2 ekspresyon düzeyi bakılıp değerlendirilecektir.

2.7. TAS, TOS

Çalışmamızda iskemi-reperfüzyon hasarı sonrası oluşan oksidan yapıların over dokusunda oluşturduğu oksidatif hasarı ve verdiğimiz ilaçlar sayesinde bu oksidatif hasarı ne kadar engelleyebileceğimizi araştırdığımız için; dokularda TAS, TOS düzeyi bakılmasının amaca uygun oldugu düşünüldü. Over dokusunda TAS ve TOS düzeyini belirlemek için Erel (2004) tarafından geliştirilen tam otomatik klorometrik bir yöntem kullanılarak ölçülmüştür (44).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız için Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik kurulu'ndan (HADYEK) etik kurul onayı alındı. Hollanda Harlan laboratuvarından alınan 24 adet dişi 250-300 gr ağırlığında Sprague Dawley cinsi gebe olmayan dişi rat deneye dahil edilmiştir. Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde 12 saat aydınlık / karanlık siklusunda ve standart deney rat diyeti (Korkuteli Yemek Endustrisi, Türkiye) ve su ad libitum şeklinde (sürekli ulaşabilecekleri şekilde) verilmiştir. 24 hayvan randomize şekilde 4 gruba ayrılmıştır.

3.1.Deneysel Çalışma Modeli

1. Grup 1'de 6 adet 250-300 gr ağırlığında olan Sprague Dawley cinsi gebe olmayan dişi ratlara 45 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg xylazine uygulanarak anestezi yapıldı. Uygun tıraşlama ve batikon ile saha temizliğini takiben preoperatif AMH için inrakardiyak 1 ml kan alındı. Sonrasında 3 cm'lik vertikal insizyon ile batına girildi ve bilateral adneksler eksplore edildikten sonra batın 4.0 monocryl ile kapatıldı. Diğer gruplarla aynı operasyon süresine maruz kalması amacı ile 6 saat sonra postoperatif AMH için tekrar 1 ml kan alınıp bilateral ooferektomi işlemi yapıldıktan sonra ratlar sakrifiye edildi.

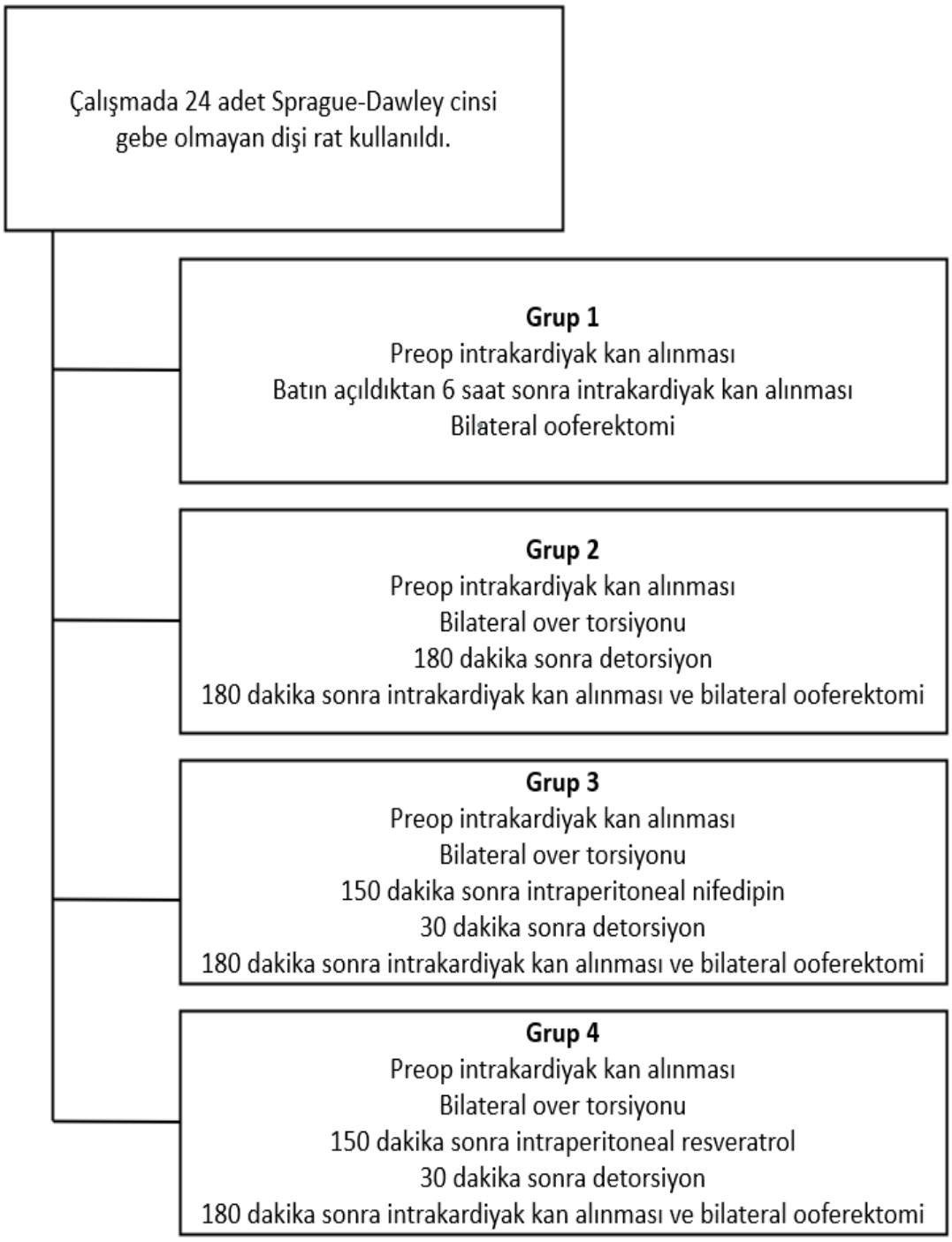
2. Grup 2'de 6 adet 250-300 gr ağırlığında olan Sprague Dawley cinsi gebe olmayan dişi rata 45 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg xylazine uygulanarak anestezi yapıldı. Uygun tıraşlama ve batikon ile saha temizliğini takiben preoperatif AMH için inrakardiyak 1 ml kan alındı. Sonrasında 3 cm'lik insizyon ile batına girildi ve bilateral adneksler eksplore edildikten sonra her 2 adneks kendi etrafında 720 º döndürüldükten sonra 5.0 vicryl ile abdomen yan duvarına süture edildi. 3 saat torsiyon süresi dolduktan sonra relaparotomi yapıp adneksler detorsiyone edilip batın tekrar kapatıldı. Detorsiyondan 3 saat sonra postoperatif AMH için tekrar 1 ml kan alınıp bilateral ooferektomi işlemi yapıldıktan sonra ratlar sakrifiye edildi.

3. Grup 3'te 6 adet 250-300 gr ağırlığında olan Sprague Dawley cinsi gebe olmayan dişi rata 45 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg xylazine uygulanarak anestezi yapıldı. Uygun tıraşlama ve batikon ile saha temizliğini takiben preoperatif AMH için inrakardiyak 1 ml kan alındı. Sonrasında 3 cm' lik vertikal insizyon ile batına girildi ve bilateral adneksler eksplore edildikten sonra her 2 adneks kendi etrafında 720º döndürüldükten sonra 5.0 vicryl ile abdomen yan duvarına süture edildi ve batın 4.0 monocryl ile kapatıldı. Torsiyondan 2,5 saat sonra her rata 100 mg/kg intraperitoneal nifedipin verildi. 30 dk sonra relaparatomi yapılıp adneksler detorsiyone edildi ve batın tekrar kapatıldı. Detorsiyondan 3 saat sonra postoperatif AMH için tekrar 1 ml kan alınıp bilateral ooferektomi işlemi yapıldıktan sonra ratlar sakrifiye edildi.

4. Grup 4’te 6 adet 250-300 gr ağırlığında olan Sprague Dawley cinsi gebe olmayan dişi rata 45 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg xylazine uygulanarak anestezi yapıldı. Uygun tıraşlama ve batikon ile saha temizliğini takiben preoperatif AMH için inrakardiyak 1 ml kan alındı. Sonrasında 3 cm’lik insizyon ile batına girildi ve bilateral adneksler eksplore edildikten sonra her 2 adneks kendi etrafında 720º döndürüldükten sonra 5.0 vicryl ile abdomen yan duvarına süture edildi ve batın 4.0 monocryl ile kapatıldı. Torsiyondan 2,5 saat sonra her rata 10 mg/kg intraperitoneal resveratrol verildi. 30 dk sonra relaparatomi yapılıp adneksler detorsiyone edildi ve batın tekrar kapatıldı. Detorsiyondan 3 saat sonra postoperatif AMH için tekrar 1 ml kan alınıp bilateral ooferektomi işlemi yapıldıktan sonra ratlar sakrifiye edildi.
5.



Şekil 4: 180.Dakikada detorsiyon öncesi overin görünümü



Şekil 5: Deney Tasarım Şeması

3.2.Histolojik Ve Biyokimyasal Değerlendirme

IŞIK MİKROSKOBİK TAKİP BASAMAKLARI: Deneklerin diseksiyonu sonrasında çıkarılan ovaryum dokuları %10'luk formaledhitte tespit edildi. Ardından aşağıdaki işlem basamaklarına riayet edilerek dokular takibe alındı:

1.Tespit solüsyonun uzaklaştırılması-yıkama

2.%50 etil alkol (20 dk)

3. %70 etil alkol (20 dk)

4. %80 etil alkol (20 dk)

5. %96 etil alkol (20 dk)

6. Aseton 1 (20 dk)

7. Aseton II (20 dk)

8. Aseton III (20 dk)

9. Aseton IV (20 dk)

10. Ksilol I (30 dk)

11. Ksilol II (30 dk)

12. 60°C'1ik etüvde erimiş parafin I'de (1 saat)

13. Parafin II (1 saat)

14. Parafin içinde bloklama

Hazırlanan bloklardan 4 mikron kalınlığında kesitler alınarak hematoksilen – eozin (H&E) boyama ve immünohistokimyasal işaretlemeler yapıldı.

3.2.1. Histomorfolojik İnceleme ve Follikül Sayımı

Dokulardan 4 µm kalınlıkta kesitler alınarak histokimyasal hematoksilen-eozin ile boyanan preparatlarda primordiyal follikül, antral follikül, atretik follikül ve corpus luteum sayımı yapıldı. Histokimyasal boyama ile ilgili detaylı bilgi aşağıda belirtilmektedir.

1. Haris Hematoksilen hazırlanışı
2. Hematoksilen 1 g
3. %100 etil alkol 10 ml
4. Potasyum alum (Al2SO4)3K2SO4•24H2O 20 g
5. Saf su 200 ml
6. Civa oksit (HgO) 0,5 g
7. Glasiyal asetik asit 8 ml

Boyanın hazırlanışı: 1 gram hematoksilen 10 ml etil alkolde çözülür. Ayrıca potasyum alum saf suda ısıtılarak çözülür. İki eriyik birbirine karıştırılıp ½ dakika kaynatılır ve hemen soğutulur. İçerisine civa oksit eklenir ve soğuk su banyosunda hızla soğuması sağlanır. Son olarak da karışıma glasiyal asetik asit ilave edilir. Bu boya 3-4 ay kullanılabilir.

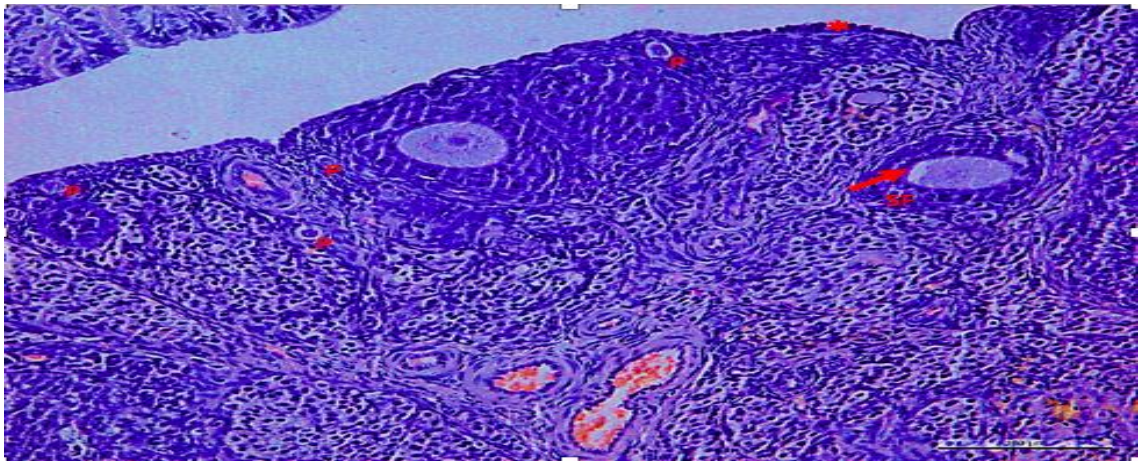
Eosin genellikle hematoksilen için zıt boya (Hematoksilen-Eosin) olarak kullanılır. Eosinin suda ve alkolde hazırlanabilen iki çeşidi vardır.

Eozin solüsyonu hazırlanışı

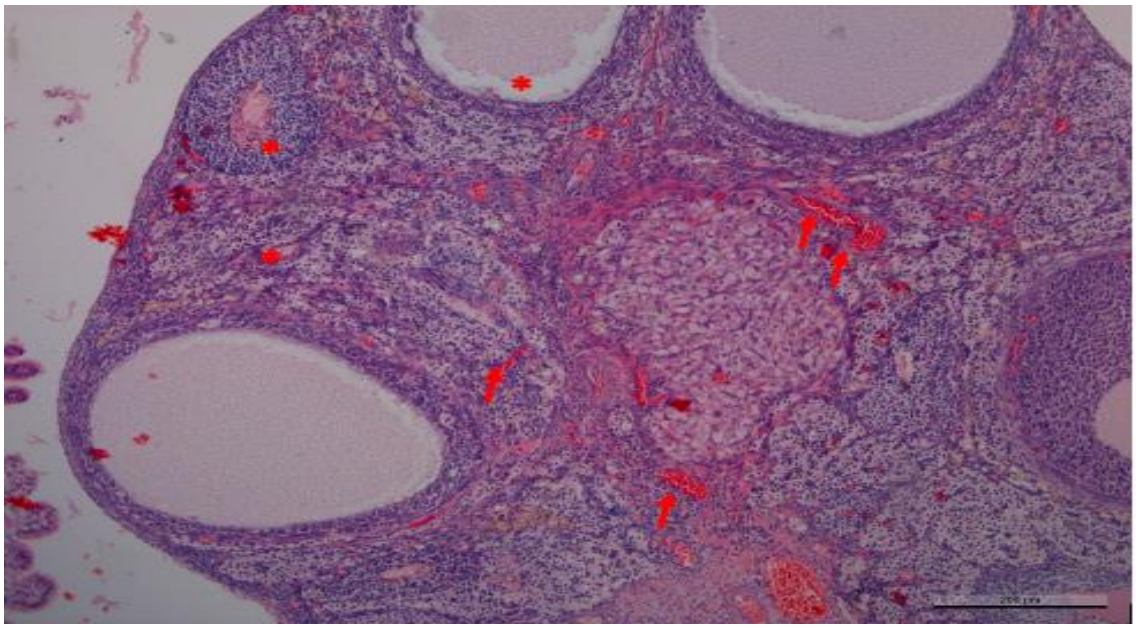
1. Eosin Y (Yellowish) 1 gram
2. Saf su 100 mililitre
3. Bir adet küçük Timol kristali
4. Eosin B (Bluish) %90 alkol içinde doymuş olarak hazırlanır (Ozban & Ozmutlu, 1994). Biz çalışmamızda Eosin Y solüsyonunu kullandık.
5. Hematoksilen-Eozin boyama Protokolü
6. Lama alınan kesitlerin üzerindeki parafinin erimesi için etüvde 70 ^{0} C'de 20 dakika ya da 60 ^{0} C'de bir gece boyunca bekletilir.
7. 2x 15 dakika ksilolde bekletilir.
8. 10 dakika %100'lük alkolde bekletilir.
9. 10 dakika %96'lık alkolde bekletilir.
10. 10 dakika %80'lik alkolde bekletilir.
11. 10 dakika %70'lik alkolde bekletilir.
12. 10 dakika %50'lik alkolde bekletilir.

13. Havada alkol uçana kadar kurutulduktan sonra 10 dakika akar suda yıkanır.
14. 10-15 dakika Harris Hematoksilen'de bekletilir.
15. 10 dakika akar suda yıkanır.
16. (%70 alkol + 2-3 damla Glasiyal asetik asit) karışımına batırılarak 2-3 dip yapılır.
17. 10 dakika akar suda yıkanır.
18. 5-10 dakika Eozin'de bekletilir.
19. 10 dakika akar suda yıkanır.
20. 1-2 dakika %50 alkol
21. 1-2 dakika %70 alkol
22. 1-2 dakika %80 alkol
23. 1-2 dakika %96 alkol
24. 1-2 dakika %100 alkol
25. 2 x 15 dakika Ksilol'de bekletilir ve Entellan ile kapatılır.

Dokuda bulunan hücrelerin nükleusu Haris hematoksilen ile mor, sitoplazmik kısımları eozin ile pembe boyanır (Şekil 6 ve 7) .



Şekil 6: Normal yapılarıyla izlenen primordiyal folliküller (P), primer folliküller (MP) ve zona pellucidanın (→) belirgin gözlemlendiği sekonder follikül (SF), tek katlı kübik epitelden oluşan epitelyum germinativum (*) (H-E, X200)



Şekil 7: Sadece torsiyon-detorsiyon uygulaması yapılan grupta gelişen vaksküler dilatasyon (→) ve atreziye giden folliküllerin (*) varlığı gözlemlendi (H-E, X100).

3.2.2. İmmünohistokimyasal İnceleme

İmmünohistokimyasal işaretlemeler için 4 μm kalınlığındaki ovaryum dokuları polilizinli lamlara alınarak 62ºC' deki etüvde 1 saat bekletildi. Lamlar deparafinizasyonu tamamlamak için 2 kez 15' şer dakika ksilende bekletildi. Daha sonra 10' ar dakika sırasıyla %100, %96, %90, %80 ve %70'lik alkol serilerinden geçirildi. Dehidrate edilen dokuları alkolden arındırmak için kesitler 2 kez 5'er dakika distile sudan geçirilecektir. Daha sonra doku içerisinde formaldehit'in kapattığı reseptör bölgelerinin açığa çıkarılmasını sağlamak amacıyla, dokulara sitrat tamponu (pH 6.0) ile mikrodalga fırında retriver işlemi uygulandı. Mikrodalgadan çıkan sitrat tamponundaki dokular 20 dakika dışarıda soğumaya bırakıldı. Daha sonra dokular sitrattan arındırılmak için 2 kez 5'er dakika distile sudan geçirildi. Dokuların etrafı PAP-PEN ile çevrilerek nemli ortam olan immünohistokimya barına dizildi. Dokular 3 kez 3'er dakika PBS (Phosphate Buffer Saline) (Ph:7,4) ile yıkandı. Daha sonra, 15 dakika %3'lük hidrojen peroksit ile etkin bırakılan dokulardan endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. İşlem sonrasında PBS ile camlar 3 kez 3'er dakika yıkandı. Yıkanan camlara 5 dakika UltraV block uygulanarak, özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Bu işlemden sonra dokular yıkanmadan primer antikor aşamasına geçildi. Bloklama aşamasının ardından kesitler yıkanmadan, 1/200 oranlarda hazırlanan AMH ve VEGFR-2 primer antikorunda 4ºC' de 1 gece inkübe edildi. Primer antikordan sonra camlar 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. Daha sonra 10 dakika biotinli sekonder antikor uygulanarak sekonder antikorun primer antikora

bağlanması sağlandı. İşlem sonunda dokular yine 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. Sonra 10 dakika streptavidin uygulanacak ve işlem sonunda dokular 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. Son olarak dokulara diaminobenzedin (DAB) substratı içeren DAB kromojeni damlatılarak gözle görülebilir immün tepkimenin ortaya çıkması sağlandı. 2 kez 5'er dakika distile su ile yıkanan dokularda zemin boyası olarak Mayer's Hematoksilen'i kullanılacak olup distile su ile tekrar yıkama yapıldı. DAB ile boyanan lamlar azalan alkol serilerinden geçirildi. Sonrasında 20 dakika ksilende bekletilen lamlara entallan damlatılıp lamel ile kapatıldı. Kesitler Leica DM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica Q Vin 3programında fotoğrafları çekilerek değerlendirildi. Değerlendirmeler sonunda immünohistokimyasal tutulum yoğunlukları incelenerek istatistiksel verileri oluşturuldu.

3.2.3. Over Dokusunun TAS, TOS Ve OSI Düzeyinin Belirlenmesi

Örneklerin total antioksidan (TAS) değerleri Erel (2004) tarafından geliştirilen tam otomatik kolorometrik bir yöntem kullanılarak belirlenecektir.

Yöntemin temel prensibi; Numunede bulunan oksidanlar ferroz iyon-o-dianisidin kompleksini ferik iyona oksitler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak üç katına çıkarmaktadır. Ferik iyonlar asidik ortamda "xylenol orange" ile renkli bir kompleks oluşturması sağlamaktadır. Örneklerde bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak 660 nm dalga boyunda ölçülür ve aşağıdaki formül kullanılarak mmol Trolox equivalent/l cinsinden hesaplanır.

Örnek Absorbansı = Örneğin İkinci Absorbansı – Örneğin Birinci Absorbansı

TAS = [(Abs Std 1 – Abs Örnek)] / [(Abs Std 1 – Abs Std 2)] x Std 2

Abs Std 1 = İkinci Abs Std 1 – Birinci Abs Std 1

Abs Std 2 = İkinci Abs Std 2 – Birinci Abs Std 2

3.3.AMH Düzeyinin Biyokimyasal Olarak Belirlenmesi

Kanda AMH düzeyine bakmak için ratlardan operasyon öncesi ve operasyon sonrası alınan kanlar sarı kapaklı jelli tüplere konulduktan 30 dakika sonra 3000 devirde 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Elde edilen serumlar yeni eppendorf tüplere konulup analizi yapılıncaya kadar -80º saklandı. Serum AMH düzeyleri Enzyme-Linked immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi ile enzim bagli immunsorban test kiti (Bioassay Technology Laboratory Shanghai Korain Biotech Co., Ltd) kullanılarak ELISA okuyucu cihazinda analiz edilmiştir. Kitin test içi varyasyon katsayısı (CV) değeri <%8 ve testler arasi CV değeri <%10 dur.

3.4.İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin değerlendirilmesi SPSS for Windows 22.0 (Stattistical Package of Social Science) paket program kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi. Normal dağılıma uyan veriler için ortalama ± standart sapma, normal dağılıma uymayan veriler için ortanca ile 25. ve 75. persentil değerleri kullanıldı, kategorik veriler ise yüzde (%) olarak verildi. Bağımsız gruplar arasında normal dağılıma

uymayan sayısal iki grup verilerinin karşılaştırılmasında ‘‘Mann Whitney U Test’’ ve normal dağılıma uyan sayısal bağımsız gruplar için ‘‘Student T Test’’ kullanıldı. Bağımlı gruplar arasında normal dağılıma uymayan iki grup verilerinin karşılaştırılmasında "Paired Sample T Test", ikiden fazla grup karşılaştırmasında "ANOVA" kullanıldı ve posthoc testler uygulandı. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Araştırmaya toplamda 24 adet rat dahil edilmiş olup her grupta 6 adet rat olacak şekilde ayarlama yapıldı.

4.1. AMH' nın Biyokimyasal Değerlendirilmesi

Preoperatif ve postoperatif biyokimyasal AMH düzeyi her bir rat için spesifik olduğundan grup içi karşılaştırma yapılarak preoperatif ve posteoperatif AMH düzeyi arasındaki değişimin anlamlı olup olmadığı değerlendirildi.

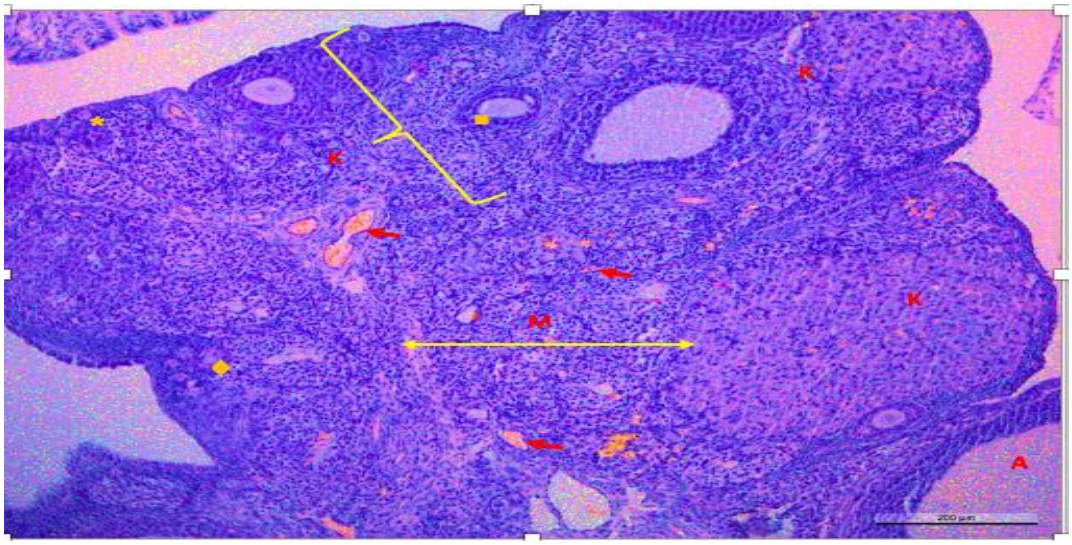
Grup içi yapılan karşılaştırmada preoperatif ve postoperatif AMH düzeyleri arasında Grup 1 (kontrol), Grup 2 (torsiyon-detorsiyon), Grup 3 (torsiyon-detorsiyon+nifedipin) ve Grup 4' te (torsiyon-detorsiyon+resveratrol) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Sırasıyla, p =0,058; p=0,089; p=0,756; p =0,206) .

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Pre-postoperatif AMH değişimi (ng/ml)	0,3 ± 0,3	0,35 ± 0,4	0,9 ± 0,6	0,17 ± 0,3
p- değeri	0,058	0,089	0,756	0,206

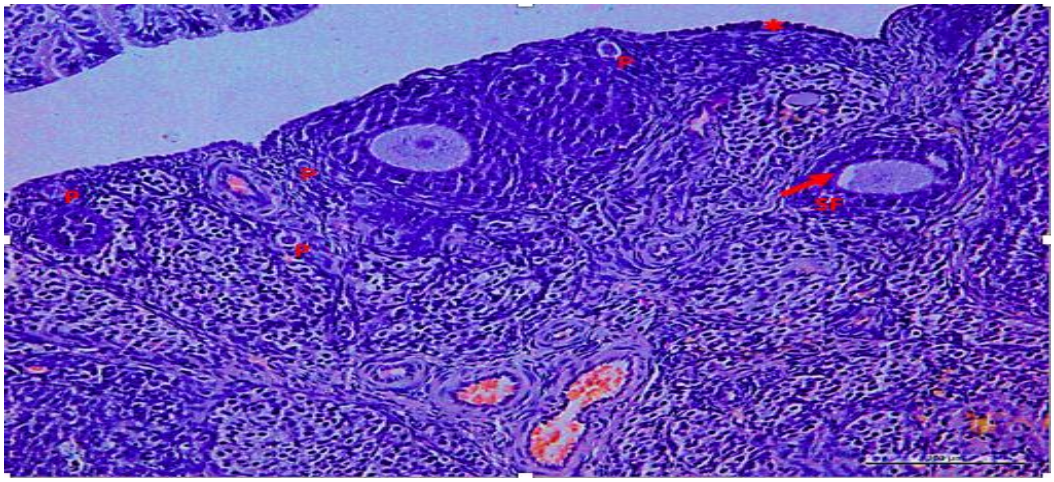
Tablo 1. Grup içi AMH′ nın preoperatif ve postoperatif değişiminin değerlendirilmesi. Paired Sample T test. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı değerlendirildi.

4.2. Histomorfolojik Değerlendirme

Grup 1'den alınan ovaryum örneklerinin hematoksilen eozin ile boyanan preparatlarında ovaryum küçük büyütmede korteks ve medulla olarak iki kısımda normal histolojik yapıdaydı (Şekil 8). Primordial folliküller, primer folliküller ve sekonder folliküller normal yapılarıyla izlendi. Primer folliküllerden itibaren zona pellucida belirgindi. Damar yapısı normaldi (Şekil 9).

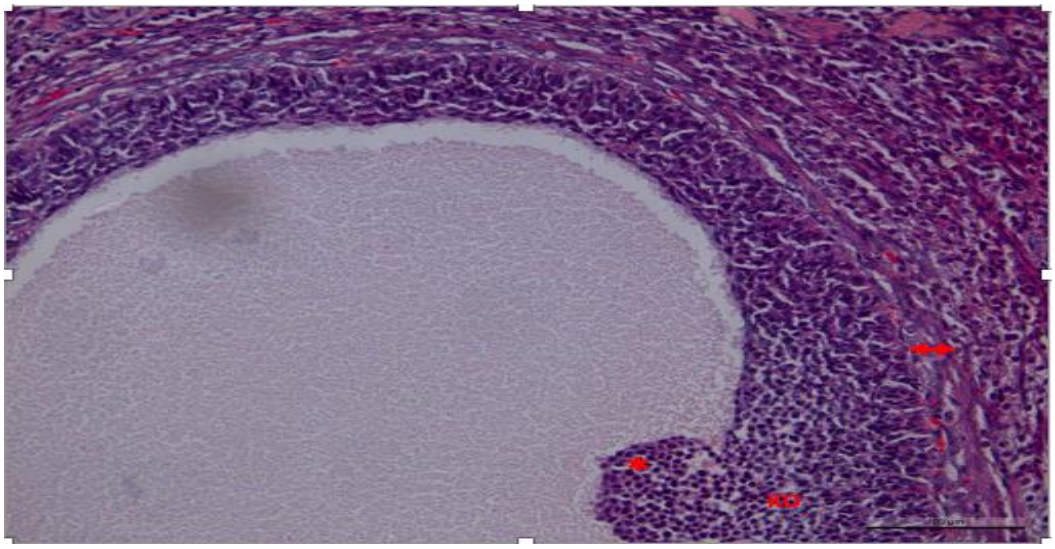


Şekil 8: Sham kontrol grubu; küçük büyütmedeki incelemede ovaryum korteks (K) ve medulla (M) olarak iki katmanıyla ayırt edildi. Kortekste gelişim aşamasında folliküller izlendi. Damar yapısı (→) normaldi. Gelişen folliküller; primordial follikül (*), unilaminer primer follikül (♦), sekonder follikül (■) ve antral follikül (A); (H-E, X100)



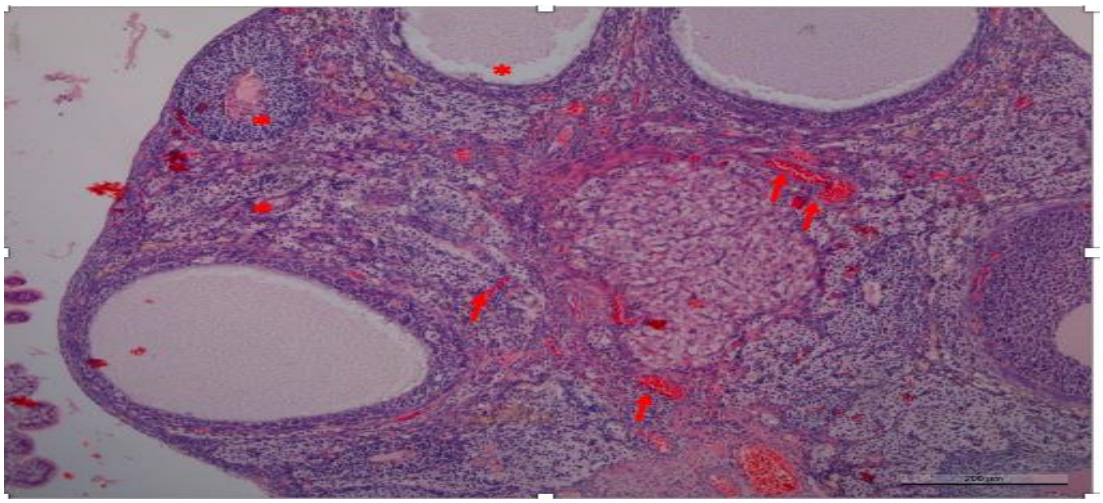
Şekil 9: Normal yapılarıyla izlenen primordiyal folliküller (P), primer folliküller (MP) ve zona pellucidanın (→) belirgin gözlemlendiği sekonder follikül (SF), tek katlı kübik epitelden oluşan epitelyum germinativum (*) (H-E, X200).

Antral follikülde teka interna bol vaskülerize bir görünümdeydi. Teka interna ve stratum granülosum normal histolojik yapılarıyla ayırt edildi. Corona radiata ve kumulus ooforus belirgindi (Şekil 10).

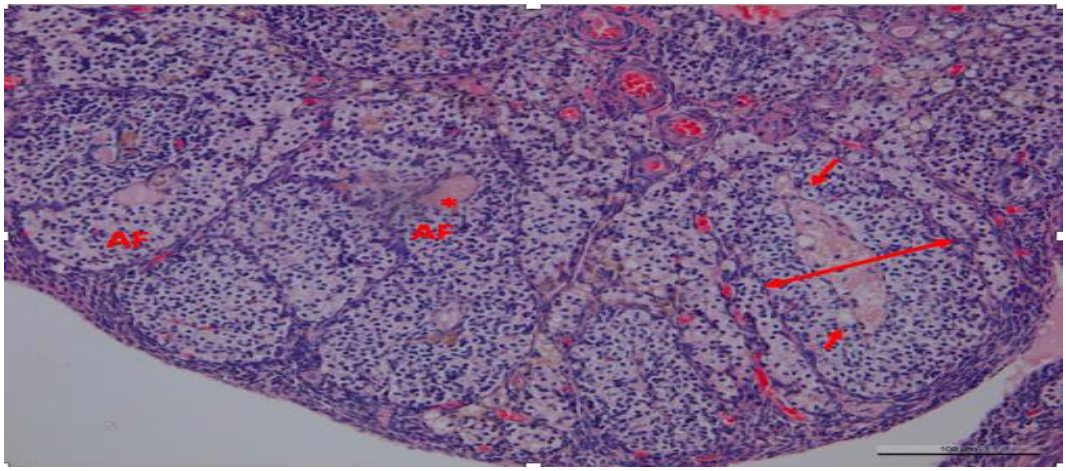


Şekil 10: Bol vaskülerize yapısı ile teka interna (↔), oositin etrafını saran korona radiata (*) ve kumulus ooforus (KO) normal histolojik yapı ile ayırt edildi (H-E, X400).

Grup 2’ de vasküler dilatasyon belirgindi. (Şekil 11) Gruptaki en belirgin değişiklik gruptaki hücrelerin ve atreziye giden folliküllerin varlığıydı. Atreziye giden folliküllerde özellikle zona pellusidasında dejenerasyon ve hiyalin yapı haline geldiği, antrumun organizasyonunun bozulduğu ve stratum granülosum katmanını oluşturan hücrelerde heterokromatin çekirdek ve intrasitoplazmik ödemin varlığı belirlendi. Follikül sınırları stromadan net bir şekilde ayırt edilemedi. (Şekil 12)

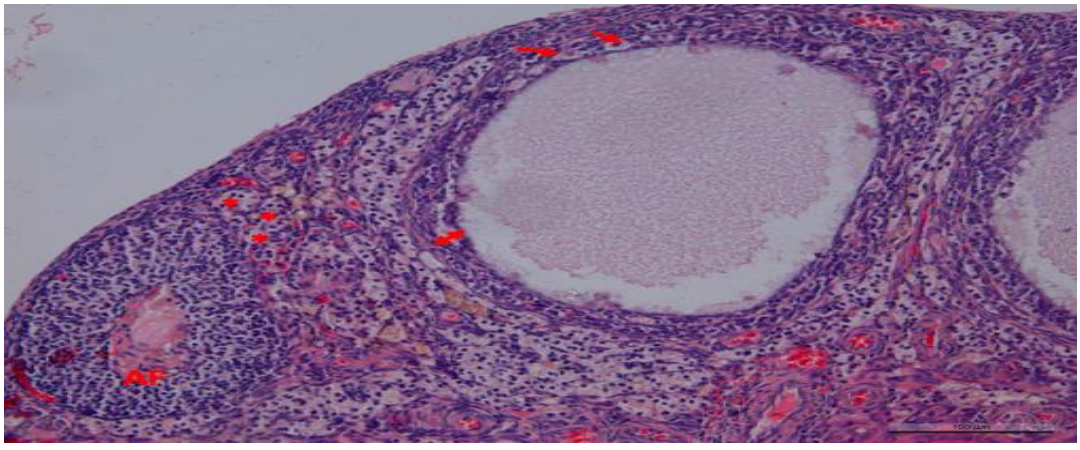


Şekil 11: Sadece torsiyon-detorsiyon uygulaması yapılan grupta gelişen vasküler dilatasyon (→) ve atreziye giden folliküllerin (*) varlığı gözlemlendi (H-E, X100).



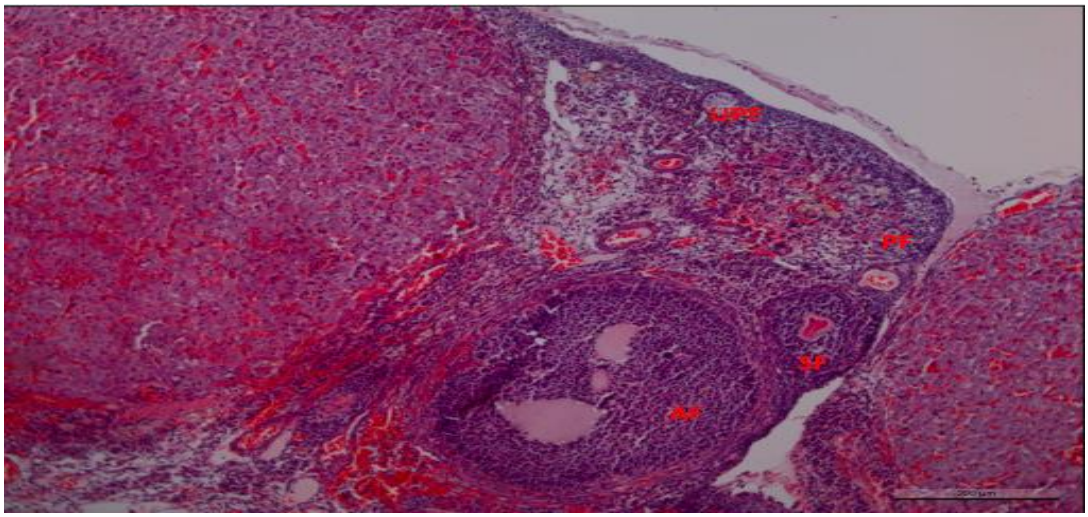
Şekil 12: Zona pellusida dejenerasyonu (*) ve hiyalinizasyon gösteren atretik follikül (AF), antrum organizasyonunun bozulduğu (↔) ve stratum granülozum hücrelerinde heterokromatin çekirdek ve intrasitoplazmik ödemin (→) varlığı belirlenir. (H-E, X200)

Daha normal görünüme sahip tersiyer follikül duvarında da apoptotik cisimcikler ve yer yer hücre katmanında da ayrılmalar dikkati çekti. Bu grupta doku ödemine bağlı olarak primordiyal folliküller net olarak ayırt edilemedi. (Şekil 13)

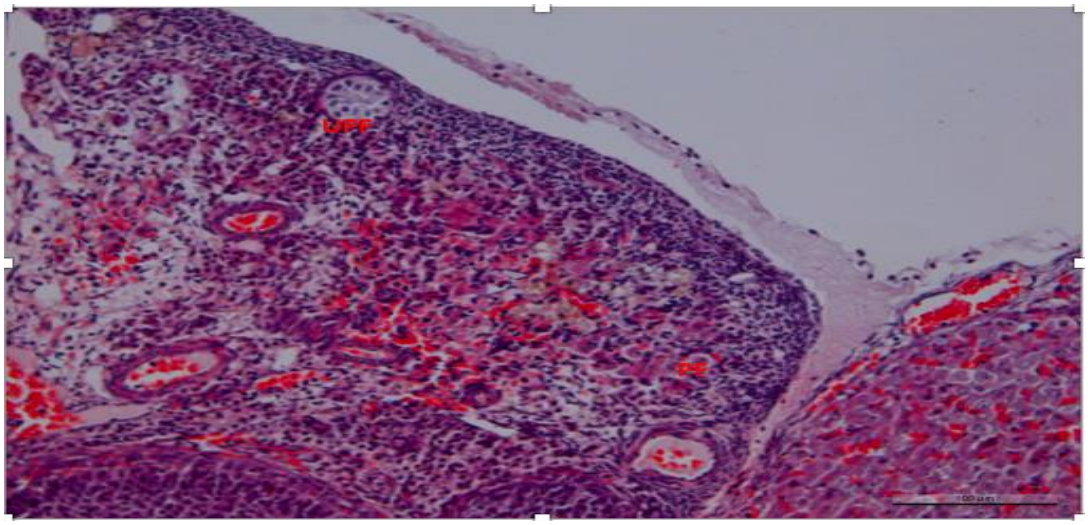


Şekil 13: Tersiyer follikül duvarında apoptotik cisimcikler (→) ve yer yer hücre katmanında da ayrılmalar (↔), zona pellusidasında dejenerasyon meydana gelen atretik folliküller (AF) ve net bir şekilde ayırt edilemeyen doku ödemi gelişen primordial folliküller (*) (H-E, X200)

Grup 3'te kontrol grubuna kıyasla atretik follikül sayısı, atreziye giden antral follikül sayısı daha fazla sayıdaydı. (Şekil 14) Normal folliküller de mevcuttu ancak bunlarda primer ve sekonder folliküllerde atreziye gidiş görülmekteydi.

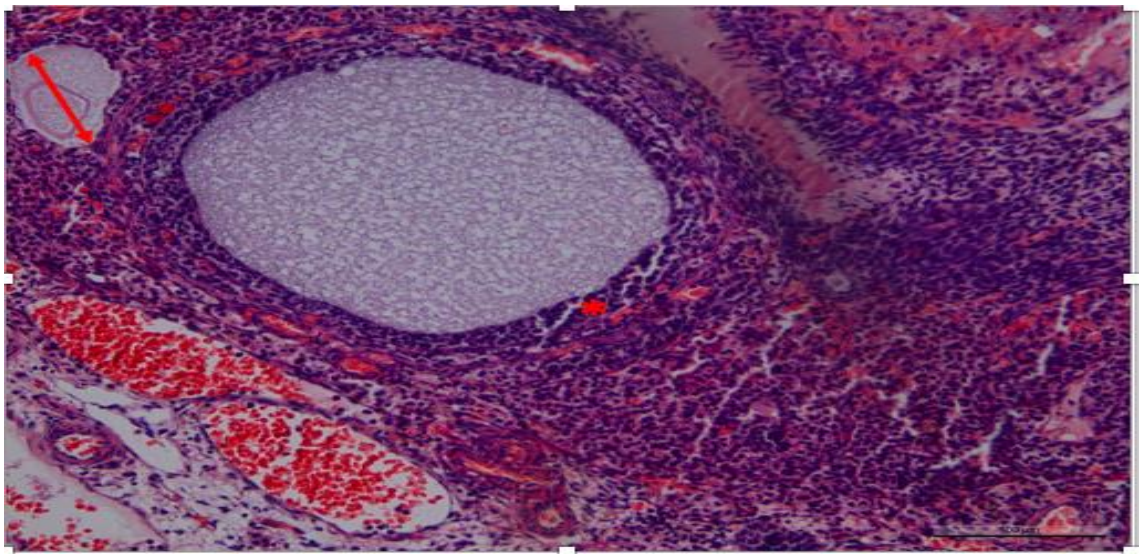


Şekil 14: Primordiyal folliküller (P) ve primer folliküller (unilaminer primer follikül: UP) normal histolojik yapı gösterirken sekonder folliküller (SF) ve antral folliküllerde (AF) atreziye gidiş görülmektedir (H-E, X100).

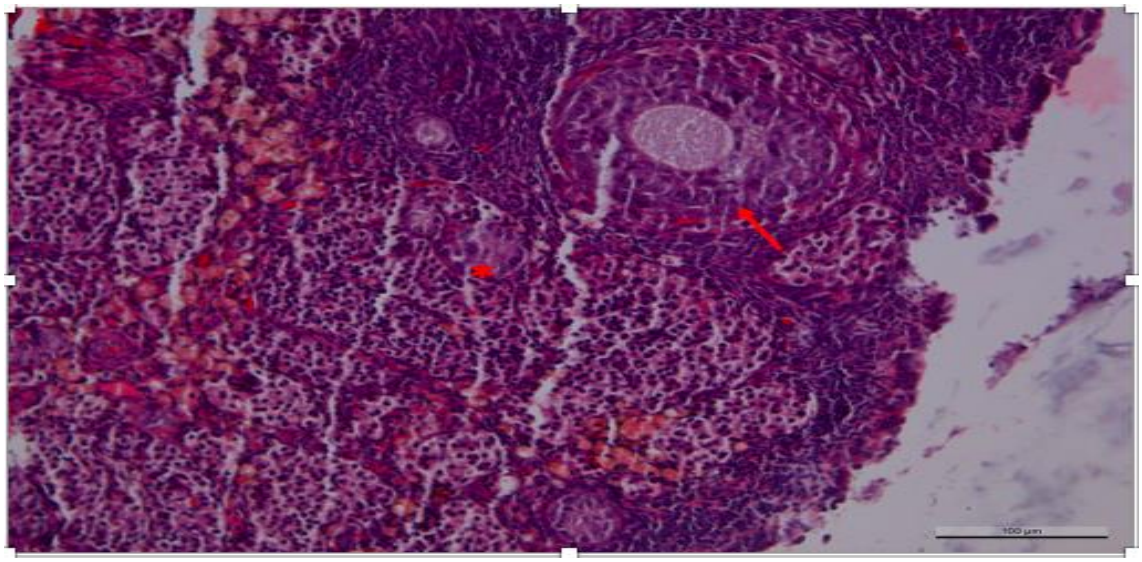


Şekil 15: Normal histolojik yapıda gelişim gösteren primordiyal (PF) ve unilaminer primer follikül (UPF) (H-E, X200).

Atreziye giden primer follikül, sekonder follikül ve antral follikül varlığı gözlemlendi. (Şekil 16, Şekil 17)

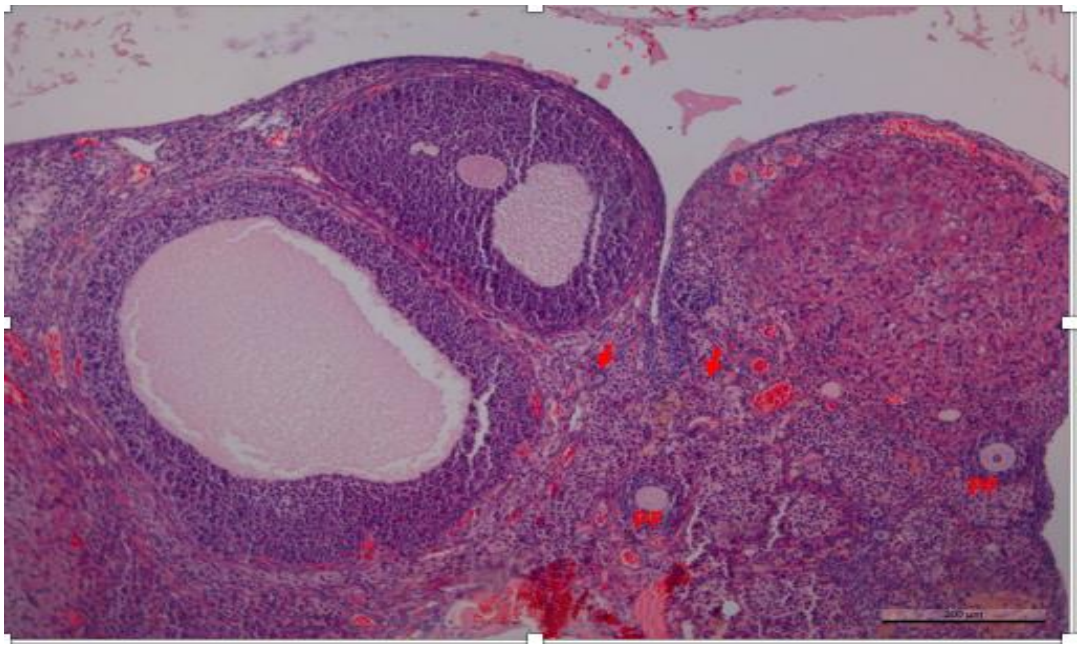


Şekil 16: Atreziye giden antral follikül (*) ve atreziye giden sekonder follikül (↔) (H-E, X200).

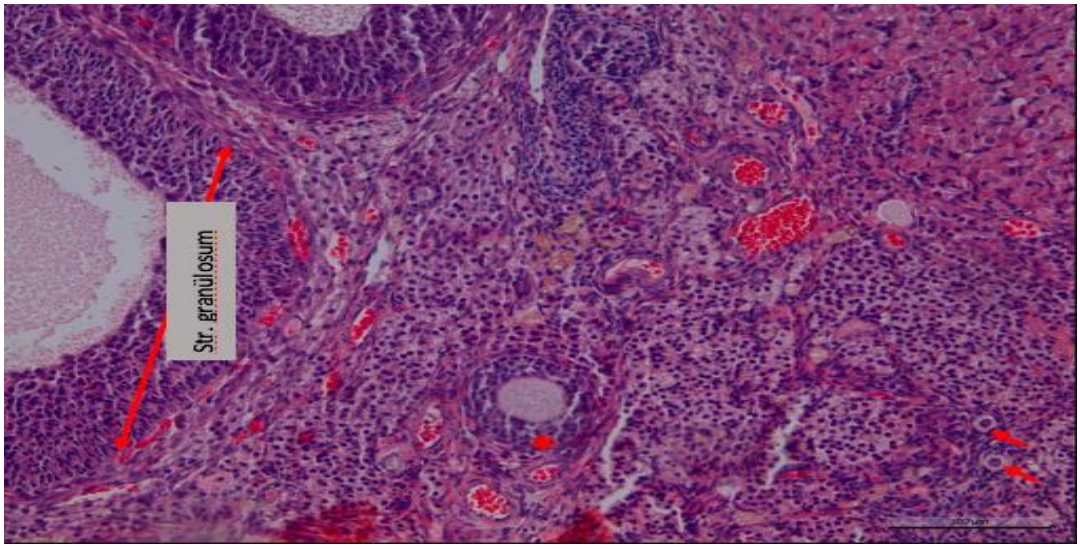


Şekil 17: Atreziye giden primer follikül (*) ve sekonder follikül (→) (H-E, X200)

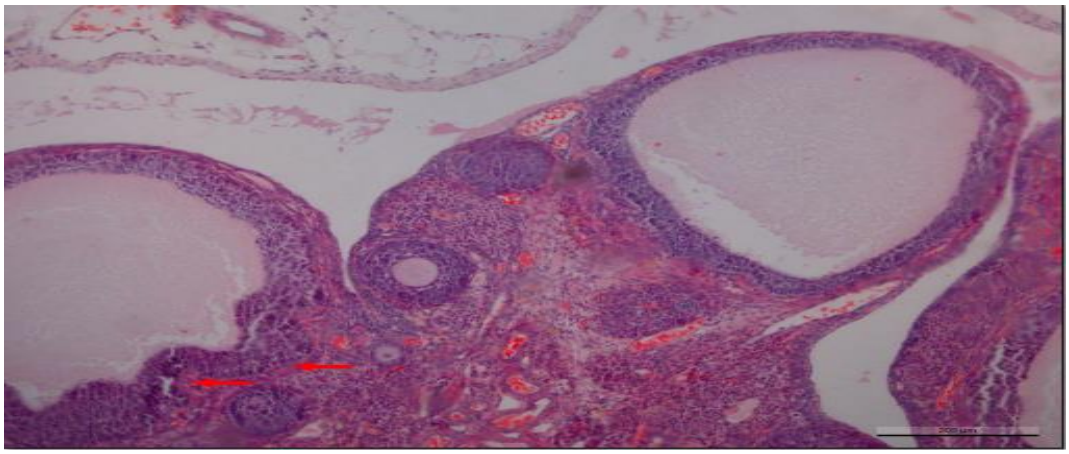
Grup 4’ te küçük büyütmede vasküler dilatasyonun kısmen devam ettiği gözlendi. Ancak çeşitli gelişim evrelerindeki folliküller normal histolojik yapıdaydı. Bu grupta torsiyon grubundan ayrı olarak normal gelişimden ayrıcalı atretik follikül izlenmedi. Antral follikülde stratum granülosayı oluşturan hücreler normal yapılarıyla izlenirken teka interna yapısı da bol vasküler görünümdeydi. Primordiyal folliküller, primer folliküller de normal histolojide gözlemlendi. (Şekil 18)



Şekil 18: Primordial folliküller (→) ve primer folliküller (PF) de normal oluşumdaydı. (H-E, X100)



Şekil 19: Büyük büyütmede nifedipin tedavisi uygulanan grupta normal histolojik yapı gösteren farklı gelişim aşamalarındaki folliküller; primordiyal folliküller (→), primer follikül (*) ve antral follikül (↔). Antral follikülde stratum granülosa (str g.) hücreleri normal yapıdadır. (H-E, X200)



Şekil 20: Antral follikülde teka interna (→) bol vasküler yapıda izlendi. (H-E, X100)

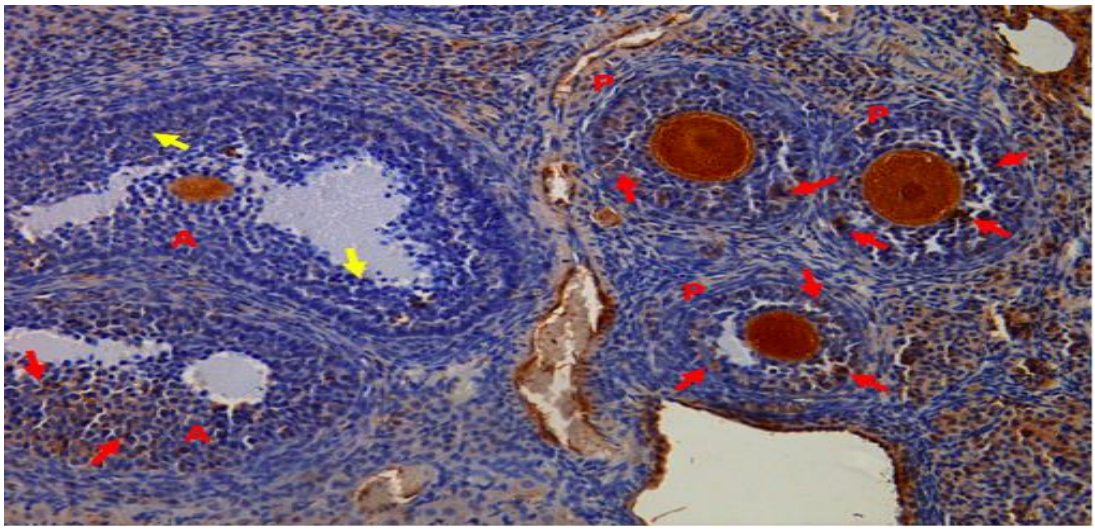
Histopatolojik değerlendirme için yapılan hematoksilen-eozin boyamalarda, torsiyon-detorsiyon grubunda atretik follikül artışı belirgin olarak gözlendi. Aynı zamanda bu grupta vasküler dilatasyon belirgindi. Protektif resveratrol uygulamasının dejenerasyonu ve vasküler dilatasyonu önlemede yine

protektif olarak uygulanan nifedipine karşın yetersiz kaldığı, nifedipinin histopatolojik değerlendirmede torsiyon-detorsiyon uygulaması kaynaklı follikül yapısını korumada daha etkin bir ajan olabileceği kanısına varıldı.

4.3. İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları

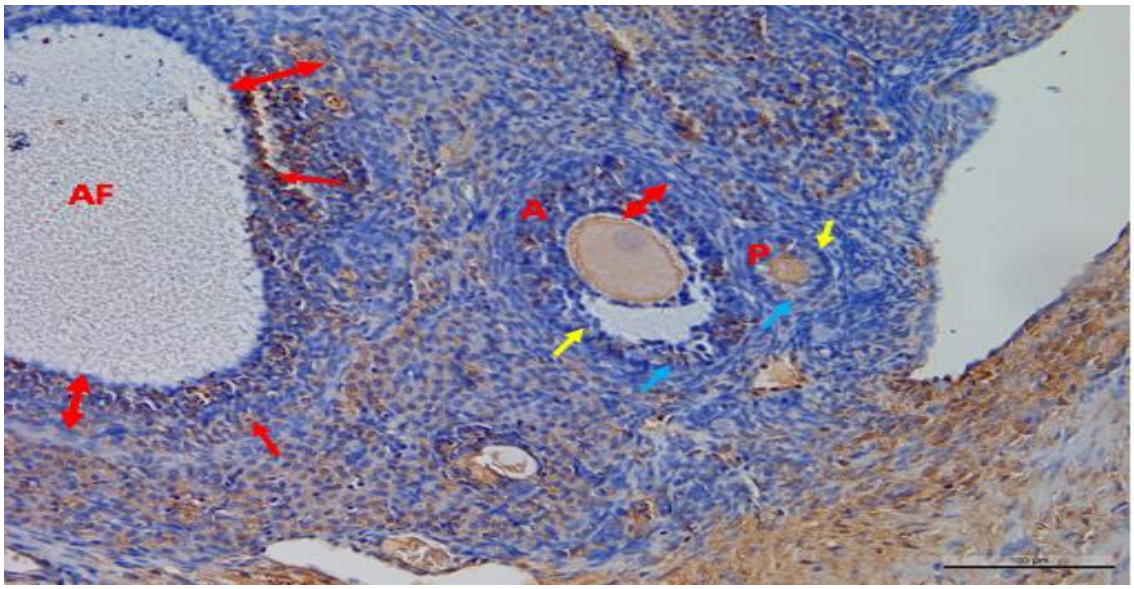
4.3.1. AMH İşaretleme Bulguları

Kontrol grubunda yapılan AMH immün boyamalarında preantral ve küçük antral folliküllerin granüler katmanlarında tutulum izlendi. Kuvvetli tutulum gösteren granüler katman hücrelerinin özellikle teka internaya komşu hücreler olduğu dikkati çekti. Küçük antral folliküllere kıyasla büyük antral folliküllerde tutulum daha zayıftı. (Şekil 21)



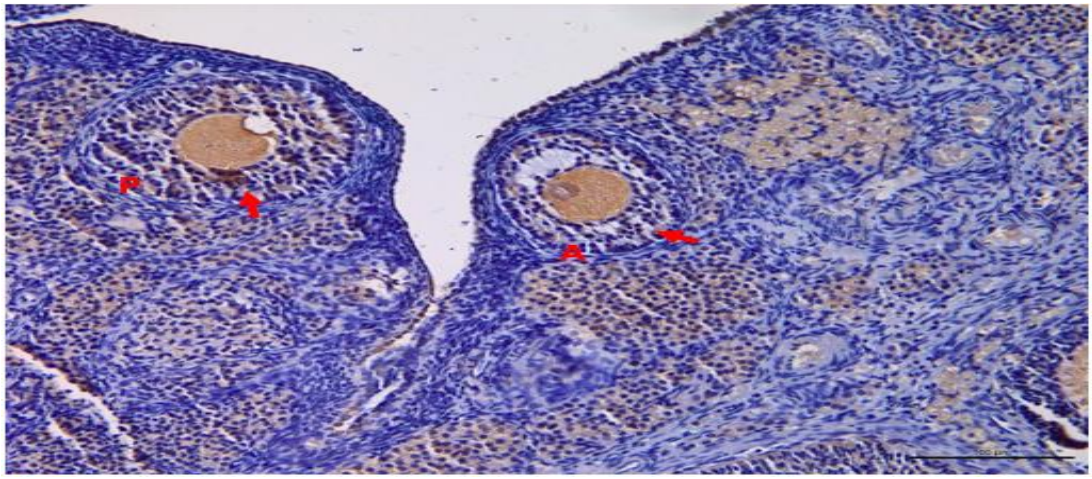
Şekil 21: Kontrol grubunda AMH antikorunun immünohistokimyasal boyamasında kuvvetli tutulum gösteren preantral foliküller (P) ile zayıf ve kuvvetli tutulum gösteren antral foliküller (A), kırmızı renkli oklar (→) kuvvetli tutulum gösteren granüler hücreleri, sarı renkli oklar (→) da zayıf tutulum sergileyen granüler hücreleri göstermektedir. (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X200)

Torsiyon uygulaması yapılan grupta AMH reaktivitesi değerlendirildiğinde; kontrol grubuna karşın belirgin olarak azaldığı dikkati çekti. Hem tutulumun beklendiği follikül sayısında hem de folliküllerdeki tutulum yoğunluğunda belirgin bir azalma dikkati çekti. Bu grupta da beklendiği üzere preantral ve özellikle küçük antral folliküllerde immünreaktivite değerlendirildiğinde, kontrol grubundan ayrı olarak preantral folliküllerde negatiften zayıfa değişen bir tutulum gözlenirken, küçük antral folliküllerdeki tutulum yoğunluğunun da kontrol grubuna karşın zayıfladığı ilgiyi çekti. Atretik folliküllerin granüler hücrelerinde ise kuvvetli tutulum gözlemlendi. (Şekil 22)



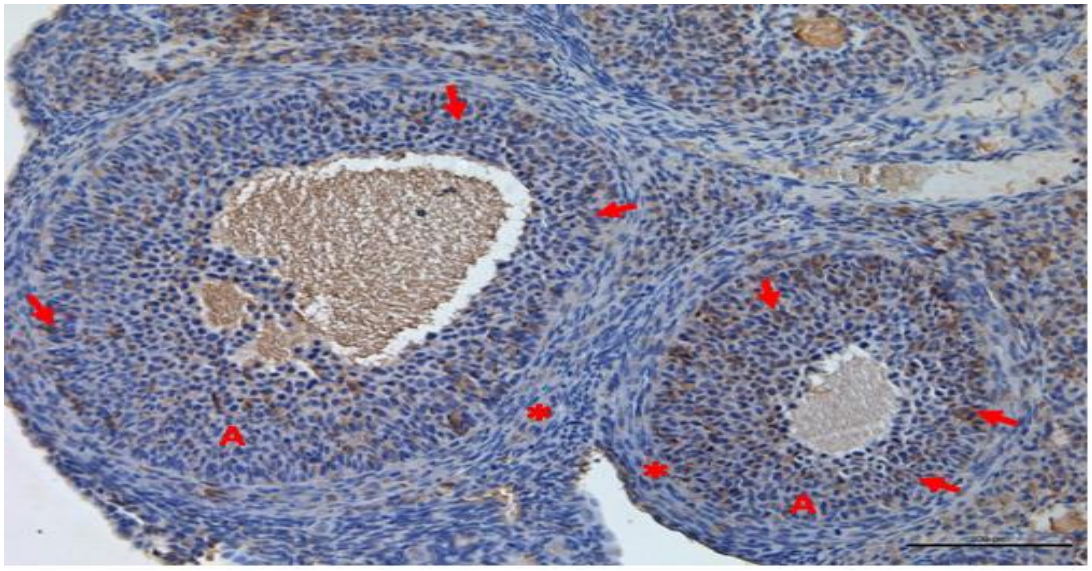
Şekil 22: Torsiyon uygulaması yapılan grupta preantral (P) ve özellikle antral folliküllerden (A) küçük folliküllerde negatiften (→) zayıfa (→) değişen immünreaktivite gösteren granüler hücreler (*) ile atretik (AF) folliküllerdeki kuvvetli (→) tutulum gösteren granüler hücreler. (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X200)

Resveratrol uygulanan grupta AMH tutulumunun preantral ve antral folliküllerde torsiyon grubundan daha belirgin olsa da kontrol grubuna karşın zayıf olduğu görüldü. (Şekil 23).



Şekil 23: Resveratrol uygulanan grupta kontrol grubuna göre zayıf torsiyon uygulanan gruba göre kuvvetli AMH tutulumu sergileyen granüler hücreler (→), preantral (P) ve antral folliküller (A). (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X200)

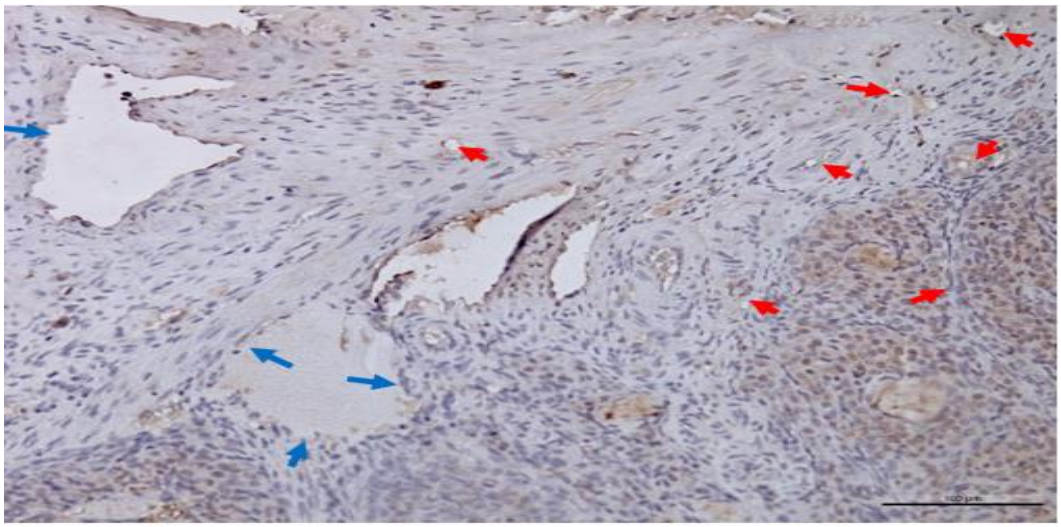
Nifedipin uygulanan grupta yapılan AMH immün boyamalarında doku genelinde tutulumun kontrol grubuna yakın olduğu dikkati çekti. Gerek preantral gerek küçük antral folliküllerde immünreaktivite belirgindi. Özellikle preantral folliküllerdeki granüler hücre tutulumunun teka follikülüne yakın hücrelerde olduğu gözlendi. (Şekil 24)



Şekil 24: Nifedipin uygulanan grupta AMH immünboyamalarında belirgin immünreaktivite gösteren preantral (P) ve antral (A) folliküller, kuvvetli AMH tutulumu sergileyen granüler hücreler (→), teka interna (*) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X200)

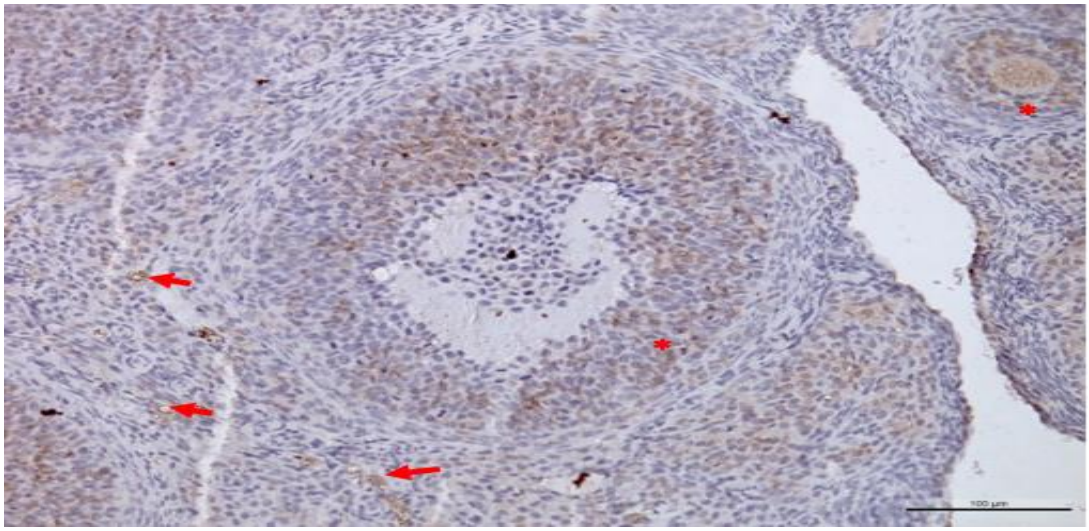
4.3.2. VEGFR-2 İşaretleme Bulguları

Kontrol grubundan yapılan VEGFR-2 immünohistokimyasal incelemelerinde medullaya ait özellikle kapiller endotel hücrelerinde daha belirgin olmak üzere tutulum izlendi. Büyük damar endotel hücrelerinde tutulum saptanmadı. (Şekil 25)



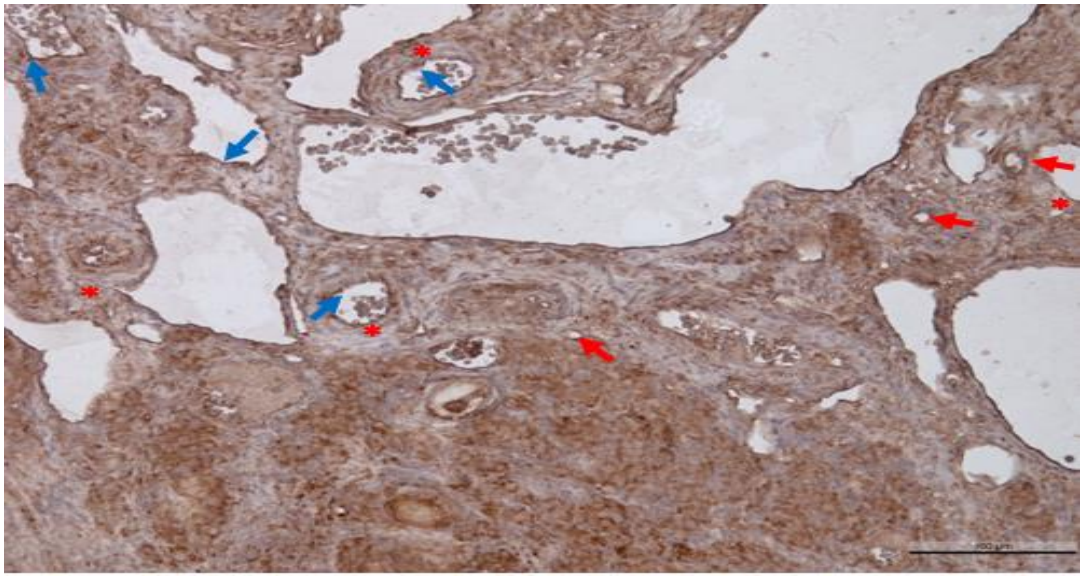
Şekil 25: Kontrol grubundan yapılan VEGFR-2 immünohistokimyasal boyamalarında medulladaki kapillerlerde tutulum saptanan endotel hücreleri (→), VEGFR2 tutulumu saptanmayan büyük damar endoteli (→) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X200)

Kortekste yapılan incelemelerde preantral ve antral folliküllerde granüler katmanda yer yer zayıf tutulum izlenirken, tutulum kortekste bulunan kapillerle de saptandı. (Şekil 26)



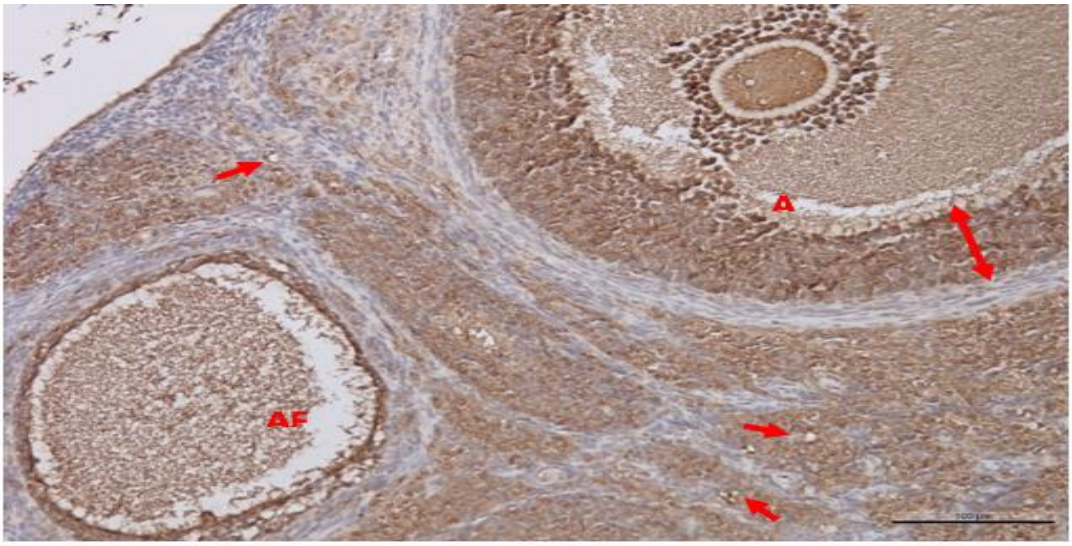
Şekil 26: Kontrol grubunda kortekste yer alan preantral ve antral folliküllerde granüler katmanında (*) yer yer zayıf VEGFR-2 tutulumu izlenirken, kortekste bulunan kapillerle (→) de tutulum saptandı. (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X200)

Torsiyon-detorsiyon grubunda doku genelinde immünreaktivitenin belirgin olarak artıp, kuvvetli hale geldiği izlendi. Medullaya ait kan damarlarında hem kapiller hem de daha büyük damar düzeyinde endotel ve düz kas hücre tutulumu belirgindi (Şekil 27).



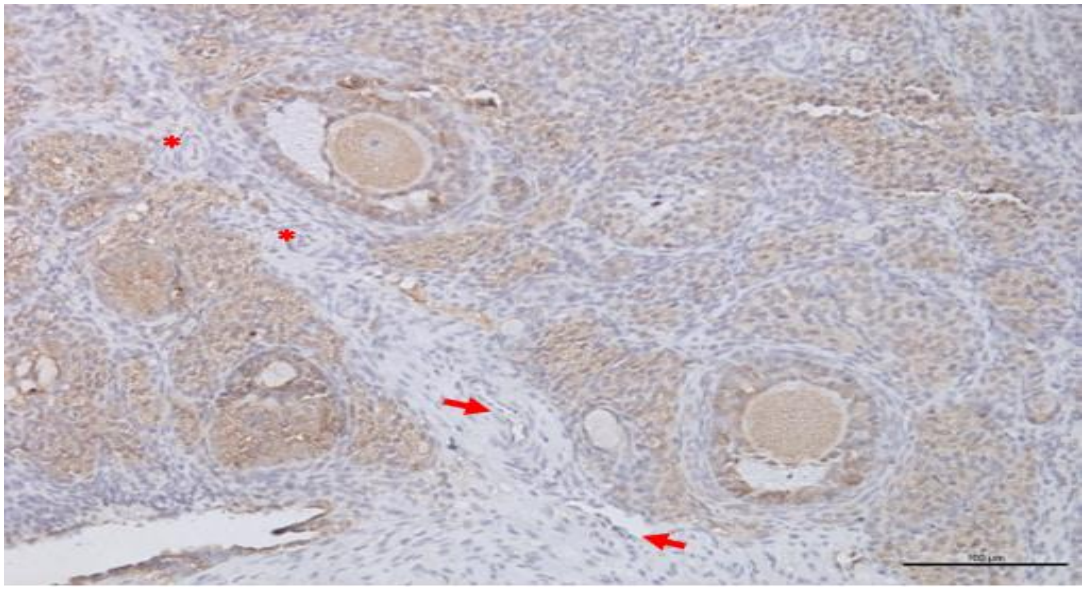
Şekil 27: Torsiyon-detorsiyon grubunda doku genelinde kuvvetli immünreaktivite, kapillerlerde tutulum saptanan endotel hücreleri (→), kuvvetli VEGFR-2 tutulumu saptanan büyük damar endoteli (→) ve kuvvetli immün tutulum gösteren düz kas hücreleri (*) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X200)

Kortekste yapılan incelemede ise gerek antral gerekse atretik folliküllerde granüloza katmanında kuvvetli ve yaygın VEGFR-2 tutulumu ilgiyi çekti. Bu grupta da kortekse ait kapiller endotel hücrelerinde reaktivite belirgindi. (Şekil 28)



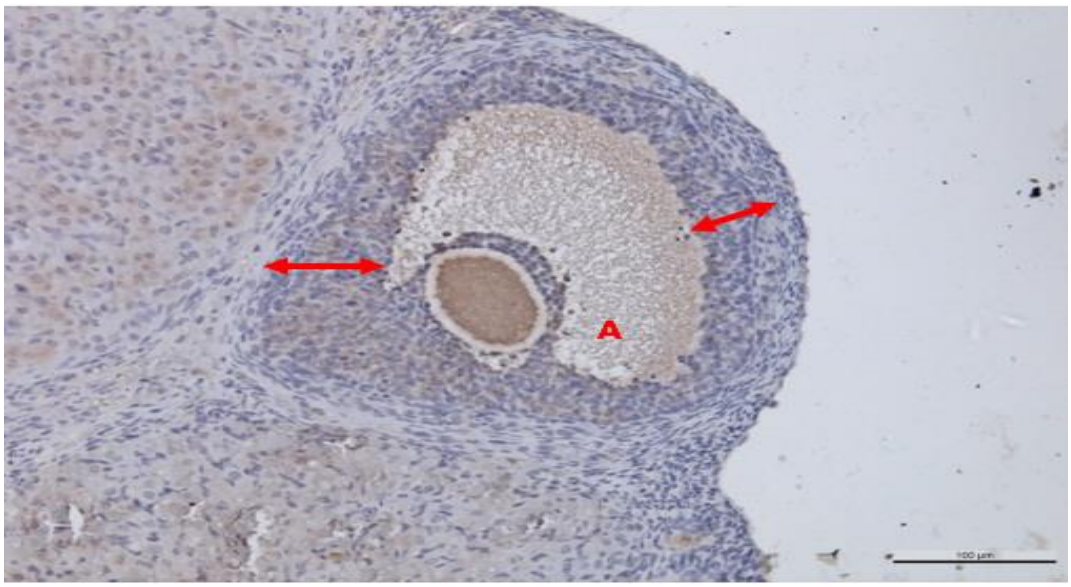
Şekil 28: Kortekste antral follikülde (A) ve atretik folliküllerde (AF) granüloza katmanında (↔) kuvvetli ve yaygın VEGFR-2 tutulumu ile kapiller endotel hücrelerinde belirgin tutulum (→) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X200)

Resveratrol grubunda en tipik bulgu medullada bulunan tüm damar tiplerinde tutulumun negatiften zayıfa değişmesiydi. (Şekil 29)

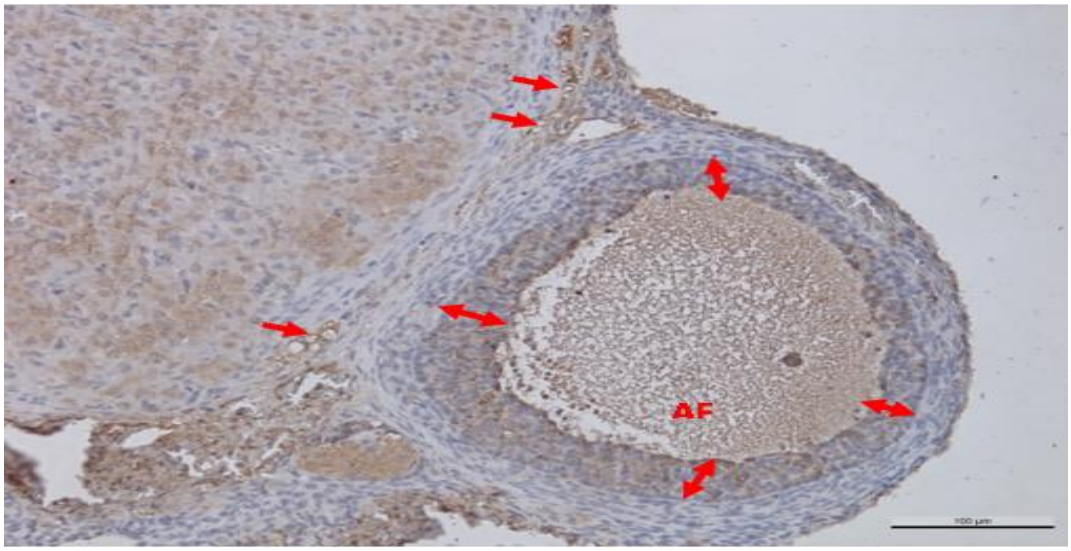


Şekil 29: Resveratrol grubunda medullada bulunan tüm damar tiplerinde negatiften (→) zayıfa (*) değişen immüntutulum (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X200)

Antral follikül granüloza katmanında tutulum kontrole benzer olup, korteks kapillerlerinde yer yer immünoreaktivite izlendi. Mevcut atretik folliküllerde de tutulum non-dejenere folliküllere benzerdi. (Şekil 30, 31)

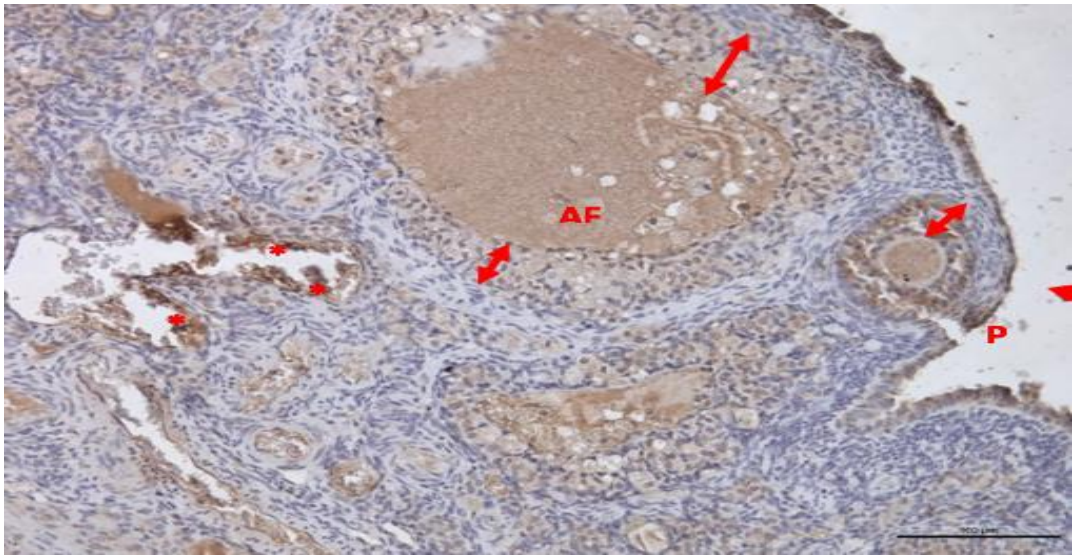


Şekil 30: Antral follikül (A) granüloza katmanında (↔) kontrol grubuna benzer tutulum (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X200)



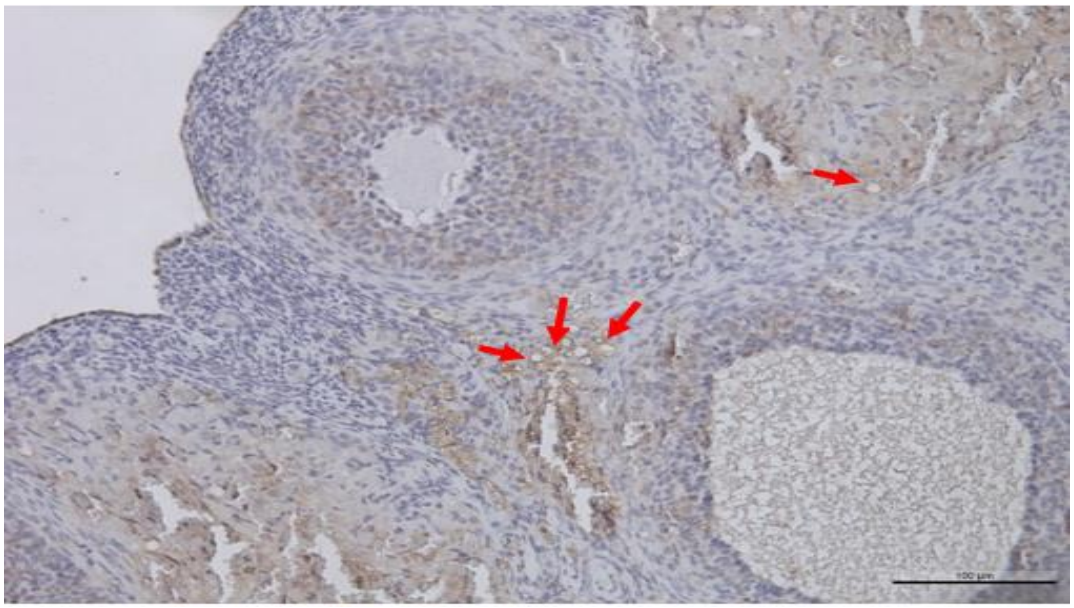
Şekil 31: Atretik folliküllerde (AF) non-dejenere folliküllere benzer immün tutulum (↔), korteks kapillerlerinde yer yer immünoreaktivite (→) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X200)

Nifedipin grubunda tutulum düzeyinin kontrolden ziyade torsiyon grubuna daha yakın olduğu ilk dikkat çeken bulguydu. Medullada bulunan endotel ve diğer damar endotel hücrelerinde VEGFR-2 tutulumu gözlendi. Bu grupta preantral ve antral folliküllerin granüloza katmanlarında torsiyon grubundan daha zayıf bir reaktivite gözlenirken, yine de orta düzeyili bir reaktivite vardı. Atretik folliküllerin granüloza katmanlarında dahi VEGFR-2 tutulumu izlendi. (Şekil 32)



Şekil 32: Nifedipin grubunda torsiyon grubuna daha yakın tutulum düzeyinde olduğunu gösteren resim, VEGFR-2 tutulumu; medullada bulunan damarların endotel (*) hücrelerinde, preantral (P) ve antral (A) folliküllerin granüloza (↔) katmanlarında, Atretik folliküllerin (AF) granüloza katmanlarında (↔) torsiyon grubundan daha zayıf, orta düzeyili bir reaktivite (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X200)

Bu grupta korteks kapillerlerinde de torsiyon grubuna benzer immünreaktivite ilgiyi çekti (Şekil 33).



Şekil 33: Nifedipin uygulanan grupta korteks kapillerlerinde (→) de torsiyon grubuna benzer immünreaktivite (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X200)

Sonuç olarak VEGF reseptör dağılımının damar endotel hücrelerinde ve granüloza katmanında varlığı kontrol grubunda yapılan immün boyamalarda izlendi. Torsiyon grubunda VEGF reseptör immünreaktivitesinin belirgin olarak her bölgede arttığı dikkati çekti. Bu bulgu torsiyon-detorsiyon sonucu oluşan hipoksi ve oksidatif stress yüküne bağlı olarak vaskülerizasyonun indüklenmiş olabileceği şeklinde yorumlandı. Resveratrol grubunda saptanan düşük VEGF reseptör düzeyi ise bu ajanın hipoksi nedeniyle oluşan oksidatif stresi tolere edebildiği ve vaskülogenezisi azaltabildiği sonucunu doğurdu. Nifedipin uygulamasının ise torsiyona bağlı hipokside vaskülogenezis açısından resveratrol kadar başarılı olamadığı belirlendi.

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
AMH ekspresyonu	Yüksek	Zayıf	Orta	Yüksek
VEGFR-2 ekspresyonu	Orta	Yüksek	Zayıf	Yüksek

Tablo 2. AMH ve VEGFR-2' nin çalışma gruplarında immünohistokimyasal boyamalarda gözlemsel değerlendirilen tutulumları.

4.4. TAS-TOS düzeyi ve OSI Değerlendirilmesi

Alınan over dokularında yapiıan histolojik incelemede TAS, TOS ve OSI düzeyi gruplar arası karşılaştırılmıştır. Gruplar arası TAS, TOS düzeyi ve OSI açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Sırasıyla p=0,094, p=<0,089, p =0,162, p =0,611).

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	p-değeri
TAS (mmol/L)	0,37 ± 0,17	0,40 ± 0,12	0,58 ± 0,13	0,45 ± 0,14	0,094
TOS (μmol/L)	3,4 ± 1,3	5,6 ± 5,1	9,0 ± 3,5	8,6 ± 6,7	0,162
OSI	1,1 ± 0,8	1,3 ± 0,8	1,6 ± 0,7	1,7 ± 1,1	0,611

Tablo 3. TAS-TOS ve OSI değerlendirilmesi. ANOVA testi. p<0.05 istatiksel olarak anlamlı değerlendirildi.

4.5. Follikül Sayımı Bulguları

Çıkartılan over dokularından hazırlanan 5 rastgele preparat alınarak primordial, primer, sekonder, antral, korpus luteum ve atretik follikül sayımı yapıldı. Sayımlar yapıldıktan sonra gruplar arası anlamlı fark olup olmadığını

anlamak için istatistiksel analiz yapıldı. Primordial ve sekonder follikül dışında diğer veriler açısından gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Tablo 3). Primordial ve sekonder folliküllere bakıldığında gruplar arası anlamlı fark saptandı (sırasıyla p=<0.047, p=<0.031). Primordial ve sekonder follikül sayısının hangi gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulunduğunu anlamak için 2' li gruplar karşılaştırıldı (Tablo 4). Grup 1 / Grup 2 karşılaştırıldığında primordial follikül sayısının Grup 1' de Grup 2' den istatiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek çıktığı görüldü (p=<0.014). Sekonder follikül açısından gruplar karşılaştırıldığında: Grup 3'te sekonder follikül sayısı Grup 2 ve Grup 4' ten istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde yüksek bulundu (sırasıyla p=0.013, p=0.17).

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	p-değeri
Primordial follikül	8,8 ± 2,6	4,8 ± 1,9	6,3 ± 2,5	6,3 ± 1,9	0,047
Primer follikül	3,6 ±0,8	2,8 ±1,3	4,8 ± 0,9	4,8 ± 2,7	0,13
Sekonder follikül	3,6 ±2,2	1,5 ± 0,7	2,8 ± 0,7	1,8 ± 0,4	0,031
Antral follikül	4,3 ± 0,8	2,6 ± 1,2	3,5 ±1,3	3 ± 1,2	0,246
Korpus luteum	5,5 ± 2,07	5,1 ± 1,7	4,8 ± 1,7	5 ± 3,09	0,96
Atretik follikül	17 ± 6,2	23 ± 11,1	16,8 ± 9,1	18,6 ± 6,5	0,541

Tablo 4. Gruplar arası primordial, primer, sekonder, antral, korpus luteum ve atretik follikül sayımının değerlendirilmesi. ANOVA testi. p<0.05 istatiksel olarak anlamlı değerlendirildi.

	Primordial follikül	Sekonder follikül
Grup 1 / Grup 2	0,014	0,05
Grup 1 / Grup 3	0,123	0,41
Grup 1 / Grup 4	0,092	0,078
Grup 2 / Grup 3	0,273	0,013
Grup 2 / Grup 4	0,213	0,374
Grup 3 / Grup 4	1	0,017

Tablo 5. Primordial ve Sekonder follikül için 2'li grup karşılaştırması. Independent T test. $p < 0.05$ istatiksel olarak anlamlı değerlendirildi.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada torsiyon-detorsiyon sonucunda iskemi reperfüzyon hasarı oluşan overlerde, resveratrolun ve nifedipinin koruyucu etkisini; biyokimyasal olarak bakılan preoperatif ve postoperatif AMH düzeyi, over dokusundakı immünohistokimyasal AMH ve VEGFR-2 tutulumu, dokudan TAS, TOS, OSI düzeyi parametreleriyle ve dokunun histomorfolojik incelemesiyle araştırdık. Gruplar arasında biyokimyasal olarak bakılan preoperatif ve postoperatif AMH düzeyi değişimleri arasında istatistiksel anlamlı fark saptamadık. AMH için yapılan boyamalarda ise; kontrol grubunda preantral ve antral folliküllerde tutulumun iyi olduğunu ancak torsiyon / detorsiyon grubunda belirgin azaldığını gözlemledik. Resveratrol verilen gruptaysa tutulum torsiyon / detorsiyon grubuna kıyasla daha iyiydi ancak kontrol grubuna göre zayıftı. Nifedipin verilen grupta tutulum kontrol grubu ile benzerdi. VEGFR-2 tutulumunun ise torsiyon / detorsiyon grubunda fazla, resveratrol tedavisi verilen grupta ise az olduğunu gördük. TAS, TOS ve OSI için yapılan gruplar arası karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptamadık. Gruplar arası follikül sayımı karşılaştırıldığında; kontrol grubu ve torsiyon-etorsiyon grubu arasında primordial follikül, torsiyon-detorsiyon ve torsiyon-etorsiyon+nifedipin ve torsiyon–detorsiyon+nifedipin, torsiyon -detorsiyon+resveratrol grupları arasında ise sekonder follikül açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunduğunu saptadık.

Literatürde I/R hasarını önlemek amacı ile çesitli ajanların kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Resveratrolun, overde iskemi reperfüzyon hasarına

etksi daha önce araştırılmış olsa da bu değerlendirmeler farklı parametreler üzerinden yapılmıştır. Bu sebeple mevcut çalışmamızda kullanılan parametreler özgündür. Nifedipinin iskemi reperfüzyon hasarı üzerindeki koruyucu etkisi ise testis dokusunda araştırılmış olup çalışmamızda over dokusundaki etkisi literatürde ilk kez araştırılmıştır.

AMH düzeyi, kadınlarda reprodüktif süreyi tahmin etmek ve uzun vadeli over fonksiyonunu değerlendirmek için önemli bir parametredir. Fakat literatürde birçok çalışmada sadece postoperatif AMH düzeyi bakılmıştır. Çalışmamızda preoperatif ve postoperatif AMH değişiminin değerlendirilmesinin daha anlamlı olduğunu düşündük. Neticede gruplar arasında preoperatif ve posoperatif AMH düzeyi açısından istatiksel olarak anlamlı fark saptamadık. Öte yandan; Karakas ve arkadaşlarının metforminin over dokusunda iskemi reperfüzyon hasarı üzerine koruyucu etkisinin araştırıldığı çalışmada, aynı bizim çalışmamızda olduğu gibi, kandan preoperatif ve postoperatif AMH düzeyi bakılmış ve metformin verilen grupta AMH düzeyi torsiyon/detorsiyon yapılan gruba göre anlamlı derecede yüksek çıktığı bulunmuştur (45). Karakas ve arkadaşlarının çalışmasında postoperatif AMH düzeyine, bizim çalışmamızdaki postoperatif 6 saat aksine, operasyondan yaklaşık 14 gün sonra bakılmıştır. AMH'nın yarı ömrünün yaklaşık 1,5-2 gün olması; bizim çalışmamızda preoperatif-postoperatif AMH düzeylerinin farklı olmamasını açıklayabilir. Sakin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise sildenafil, vardenafil ve taldafilin over dokusundaki I/R hasarı üzerine olan koruyucu etkisi araştırılmış, preoperatif AMH düzeyi bakılmadan 6 saat sonra deney bitiminde postoperatif AMH düzeyi bakılmıştır (46). Bu çalışmada

postoperatif AMH düzeyleri arasında gruplar arası valdenafil verilen grup ile torsiyon/detorsiyon grubu arasında istatiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. Ancak, preoperatif AMH düzeylerinin bilinmemesi nedeni ile elde edilen bu sonucun tartışmaya açık olduğu söylenebilir. Soyman ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada apigenin'in I/R hasarı üzerine olan etkisi araştırılmış ve AMH düzeyi bakılmıştır. Postoperatif 6. saatte bakılan AMH düzeyinin kontrol grubunda nispeten daha yüksek olduğu, ancak apigenin verilen grup ile torsiyon/detorsiyon grubu arasında bir fark olmadığı raporlanmıştır (47). Sonuçlarımız ve literatürdeki tartışmalar ışığında; AMH düzeyindeki değişimi görmek adına, kapsamlı çalışmalarda, verilen ilaçları farklı dozlarda uygulayıp, çalışmanın süresinin daha uzun tutulmasının faydalı olacağını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda aynı zamanda dokuda AMH ve VEGFR-2 immunboyamaları yapıldı. AMH eskpresyonu, erken antral folliküllerin granüloza hücrelerinde başlar (48). En fazla AMH ekspresyonu yapan folliküller preantral ve küçük antral folliküllerdir (49). İskemi AMH ekspresyonun azaltan bir faktördür. Daha yüksek AMH ekspresyonu yapan hücrelerin proliferatif ve steroidojenik aktivitelerinin yüksek olduğu düşünülmektedir (50). Çalışmamızda, AMH için yapılan boyamalarda preantral ve antral folliküllerde tutulumun, torsiyon/detorsiyon grubunda ve resveratrol verilen grupta belirgin azalmış olmasına rağmen nifedipin verilen grupta kontrole yakın olması; nifedipinin hücrelerin proliferatif kapasitesini koruyor olabileceğini bu nedenle de AMH eskpresyonunu artırıyor olabileceğini düşündürmektedir. VEGFR-2 tutulumuna bakıldığında ise torsiyon/detorsiyon grubunda fazla olan tutulumun, resveratrol

tedavisi verilen grupta az olduğu görülmüştür. Bu bulgu, torsiyon-detorsiyon sonucu oluşan hipoksi ve oksidatif stres yüküne bağlı olarak vaskülarizasyonun indüklenmiş olabileceği şeklinde yorumlanabilir. Resveratrol grubunda saptanan düşük VEGF reseptör düzeyi ise, bu ajanın hipoksi nedeniyle oluşan oksidatif stresi tolere edebildiğine ve vaskülogenezisi azaltabildiğine işaret ediyor olabilir. Öte yandan, sonuçlarımıza göre Nifedipin uygulamasının torsiyona bağlı hipokside vaskülogenezis açısından resveratrol kadar başarılı olamamıştır. Parlakgumus ve arkadaslari, atorvastatinin I/R hasarı oluşturulan over dokusunda AMH ve VEGF-A ekspresyonu üzerindeki etkisini araştırmış ve immünohistokimyasal AMH ekspresyonunu torsiyon / detorsiyon+atorvastatin grubunda, torsiyon / detorsiyon grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulmuşlardır. VEGF-A ekspresyonu ise sadece atorvastatin verilen (torsiyon/detorsiyon yapılmadan) grupta kontrol grubuna gore anlamlı düzeyde yüksek raporlanmıştır (51). Hipoksi, anjiogenezis icin temel indükleyicidir ve I/R esnasında VEGF ve reseptörlerinin ekspresyonun artması beklenen bir olaydır. Kanellis ve ark. renal I/R sonrasi VEGFR-2 ekspresyonun arttığını göstermiştir. Bizim çalışmamızda da VEGFR-2 tutulumunun torsiyon/detorsiyon grubunda fazla, resveratrol tedavisi verilen grupta ise az oldugu görülmüştür. Bu bulgu torsiyon-detorsiyon sonucu oluşan hipoksi ve oksidatif stres yüküne bağlı olarak vaskülarizasyonun indüklenmiş olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

Araştırmamızda TAS, TOS ve OSI açısından gruplar arası istatistiksel anlamlı bir fark saptanmadı. Bu parametrelere bakma nedenimiz torsiyon /

detorsiyon durumunun I/R hasarına neden olması ve takiben dokuda reaktif oksijen radikalerini artırıp dokuya daha çok zarar vermesiydi. Tokgöz ve ark. yaptığı çalışmada vitamin D' nin overdeki I/R hasarı üzerindeki koruyucu etkisini TAS, TOS ve OSI parametreleriyle araştırmış ve D vitamini uygulanan ve uygulanmayan gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir (52). Güngör ve arkadaşlarının omegavenin olası yararlı etkisinin araştırıldığı çalışmada da TAS, TOS ve OSI düzeylerinde gruplar arası anlamlı fark saptanmamıştır (53). Bir diğer çalışmada erostein ve lipolik asidin over dokusundaki I/R hasarı üzerindeki antioksidan etkinliği araştırılmış ve erdostein ve lipolik asid verilen gruplarda TOS, OSI tedavi verilmeyen gruplardan anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (54). Nifedipin ve resveratrolun antioksidan etkinliğe sahip olduğu birçok çalışmada görülmesine rağmen biz çalışmamızda bu etkilerini destekleyebilecek anlamlı bir bulgu elde edemedik.

Literatürde over dokusunda I/R hasarının değerlendirildiği çoğu çalışmada follikül sayımı yapılmıştır. Bizim çalışmamızda da hematoksilen eozin ile boyanan preparatlarda primordiyal, primer, sekonder, antral, atretik follikül ve korpus luteum sayımı yapıldı. Shokri ve ark. çalışmalararında, Galea officinalis ekstraktının I/R hasarında koruyucu etksisi araştırmışlar ve Galea officinalis verilen gruplar verilmeyen gruplar arasında primer, antral, graf ve atretik follikül açısından anlamlı fark saptamışlardır (55). Over torsiyonu esnasında oksidatif stresin artması doku hasarına ve over dokusundaki neredeyse bütün evrelerdeki folliküllerin azalmasına neden olmaktadır (56). Kaya ve ark. enoksaparinin I/R hasarı yapılan over dokusundakı etkilerini araştırıdıkları çalışmalarında

primordiyal follikül, preantral follikül, corpus lutem ve atretik folkül açısından anlamlı bir fark raporlamamışlardır. Küçük ve büyük antral folliküller ise torsiyon-detorsiyon grubunda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Ancak yine de bu parametreler açısından torsion / detorsiyon+enoksaparin grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı bir fark gösterilememiştir. Bizim çalışmamızda ise kontrol grubu / torsiyon-detorsiyon grubu arasında primordiyal follikül, torsiyon-detorsiyon / torsiyon-detorsiyon + nifedipin ve torsiyon-detorsiyon + nifedipin / torsiyon-detorsiyon + resveratrol grupları arasında ise sekonder follikül açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptadık. Gruplar arasında diger parametreler (primer, antal, atretik follikül ve korpus luteum) açısından ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. Nifedipin verilen grupta sekonder follikül sayısının torsiyon-detorsiyon ve torsiyon–(detorsiyon + resveratrol) verilen gruptan anlamlı düzeyde yüksek bulunması nedeniyle bu etkinin klinik çalışmalarda araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ

Over torsiyon ve detorsiyon işlemi uygulanmış ratlarda:

1. Detorsiyon, nifedipin veya resveratrol tedavisinin, preoperatif ve postoperatif dönemdeki AMH düzeyi değişimine etkisi gösterilememiştir.
2. İmmünohistokimyasal boyamalarda AMH eskpresyonu Grup 2'de belirgin azalmış, Grup 3'te kontrol grubuna benzer, Grup 4'te Grup 2'den daha iyi ancak yine de kontrol grubuna göre belirgin zayıf olarak izlenmiştir.
3. İmmünohistokimyasal boyamalarda VEGFR-2 boyamasının Grup 2 ve Grup 3'te benzer olduğu, Grup 4'te ise belirgin azaldığı gösterilmiştir.
4. TAS, TOS VE OSI değerlerinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.
5. Follikül sayımında, primordial follikül sayısı Grup 1'de Grup 2'den anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Sekonder follikül sayısı ise Grup 3'te Grup 2'den ve Grup 4'ten anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Primer follikül, antral follikül, korpus lutem ve atretik follikül sayılarında ise gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır.

7. ÖZET

Amaç: Adneksiyel torsiyon en yaygın jinekojik acillerden biridir. Reproduktif çağda olan bir kadında ozellikle acil müdahele gerektiren bir durumdur. Bu çalışmada detorsiyon, nifedipin ve resveratrol tedavisinin AMH ve overyan histopataloji üzerindeki koruyucu etkisi değerlendirildi.

Gereç ve Yöntem: 24 adet erişkin, sağlıklı gebe olmayan Sprague-Dawley cinsi dişi rat 4 gruba ayrıldı: Kontrol (Grup 1), torsiyon/detorsiyon (Grup 2), torsiyon/detorsiyon+nifedipin (Grup 3), torsiyon/detorsiyon +resveratrol (Grup 4). İlk gruba sadece laparatomi işlemi yapıldı. İkinci grubun bilateral overleri 720° döndürülerek 3 saaat boyunca abdomen yan duvarına fikse edildi, torsiyonu takiben 3 saat detorsiyon durumunda bekletildikten sonra bilateral ooferektomi işlemi yapıldı. Üçüncü Grup'a 2.Grup'tan farklı olarak 150 dk da 100 mg/kg, 4. Grup'a ise 10 mg/kg resveratrol verildi. AMH düzeyi, immünohistokimyasal AMH ve VEGFR-2 tutulumu, TAS-TOS, OSI ve follikül sayımı değerlendirildi.

Bulgular: Grup içi preoperative postoperatif AMH degişimi istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı (Sırasıyla p=<0.058, p=<0.089, p=<0.756, p=<0,206). İmmünohistokimyasal boyamalarda AMH eskpresyonu Grup 3'te kontrol grubuna benzer, Grup 2'de belirgin azalmış, Grup 4'te Grup 2'den daha iyi ancak kontrol grubuna gore belirgin zayıf tutulum izlendi. İmmünohistokimyasal boyamalarda VEGFR-2 boyaması Grup 2 ve Grup 3'te benzer, Grup 4'te belirgin azalmış izlendi. TAS, TOS ve OSI değerlerinin gruplar arasındaki farkı istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı (p> 0.05). Primordiyal follikül sayısı Grup 1' de, Grup 2' den

anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0.014$). Sekonder follikül sayısı Grup 3'te Grup 2 ve Grup 4'ten anlamlı düzeyde yüksek bulundu (Sırasıyla, $p<0.013$; $p<0.017$).

Sonuç: Nifedipin ve Resveratrol tedavileri biyokimyasal AMH düzeyi ve dokuların antioksidan-oksidan sistem belirteçlerine etki etmediği; nifedipinin immünohistokimyasal AMH ekspresyonunu ve sekonder follikül sayısını koruduğu; resveratrolun dokularda VEGFR-2 ekspresyonunu azalttığı görülmüştür.

Anahtar kelime: Nifedipin, resveratrol, AMH, over torsiyonu-detorsiyonu

8. SUMMARY

Objective: Adnexial torsion is amongst the most common gynecological emergencies which requires emergent treatment in women in reproductive age. In this study we aimed to evaluate the protective effect of detorsion, resveratrol and nifedipine treatment on AMH and ovarian histopathology.

Materials and Methods: Twenty-four female, adult, healthy, nonpregnant Sprague-Dawley rats were included in this study which were separated into 4 groups: control (Group 1), torsion/detorsion (Group 2), torsion/detorsion+nifedipine (Group 3), torsion/detorsion+resveratrol (Group 4). Group 1 only received a laparotomy. 720° of bilateral ovarian torsion was performed in Group 2 and ovaries were fixed to the abdominal wall for a duration of 3 hours. Following 3 hours of ischemia, derotation was performed and rats were followed in this state for another 3 hours. At the end of 3 hours of derotation, bilateral oophorectomy was performed. In addition to the procedures performed in Group 2, Group 3 recieved 100mg/kg of nifedipine at 150 minutes and Group 4 recieved 10 mg/kg of resveratrol at 150 minutes. AMH levels, immunohistochemical expression of AMH and VEGFR-2, TAS-TOS-OSI and follicle counts were evaluated.

Results: No statistically significant difference between groups in postoperative change in AMH levels were detected (p=0.058; 0.089; 0.756; 0.206, respectively). Immunohistochemical staining revealed AMH expression compared control group was similar in Group 3, significantly decreased in Group 2. Group 4 had better

expression compared to Group 2 however it was still lower than in the control group. Also, in immunohistochemical staining, VEGFR-2 staining was similar in Group 2 and Group 3 but decreased in Group 4, compared to the control group. No statistically significant difference in TAS, TOS and OSI values were detected between groups ($p>0.05$). Primordial follicle count in Group 1 was found to be significantly higher than in Group 2 ($p=0.014$). Secondary follicle count in Group 3 was found to be significantly higher than in Group 2 and Group 4 ($p=0.013$; 0.017, respectively).

Conclusion: Nifedipine and resveratrol treatments were found not to have an effect on biochemical AMH levels and antioxidant-oxidant system parameters in rats that received ovarian torsion and subsequent detorsion. Nifedipine was demonstrated to have a protective effect on immunohistochemical AMH expression and secondary follicle count. It was also observed that resveratrol decreased the expression of VEGFR-2 in tissues.

Keywords: Nifedipine, Resveratrol, AMH, ovarian torsion-detorsion

9. KAYNAKÇA

1. Polat M, Şenol T, İncebıyık A, Özkaya E, Şanverdi İ, Bostancı E, et al. Retrospective analysis of 14 patients who managed for adnexal torsion during pregnancy. Dicle Medical Journal / Dicle Tip Dergisi. 2015;42.

2. Bingöl B, Günenç MZ. Laparoscopic Management Of Adnexal Torsion. Journal of Clinical Obstetrics & Gynecology. 2005;15(2):108 - 12.

3. Koca Y, Yıldız İ, Yılmaz E, Yazar S, Yavuz, Koca S, et al. Miad Gebelikte Nadir Bir Akut Karın Nedeni; Adneksiyal Torsiyon Adnexal Torsion; A Rare Reason of Acute Abdomen in Term Pregnancy Genel Cerrahi Olgu Sunumu. 2015.

4. Bouquet de Joliniere J, Dubuisson JB, Khomsi F, Fadhlaoui A, Grant G, Ali NB, et al. Laparoscopic Adnexectomy for Ovarian Torsion during Late Pregnancy: Case Report of a Non-Conservative Treatment and Literature Analysis. Frontiers in Surgery. 2017;4(50).

5. Borekci B, Gundogdu C, Altunkaynak BZ, Calık M, Altunkaynak ME, Unal D, et al. The protective effect of dehydroepiandrosterone on ovarian tissues after torsion-detorsion injury: a stereological and histopathological study. The Eurasian journal of medicine. 2009;41(1):22-7.

6. Meštrović J, Drmić-Hofman I, Pogorelić Z, Vilović K, Šupe-Domić D, Šešelja-Perišin A, et al. Beneficial effect of nifedipine on testicular torsion-detorsion injury in rats. Urology. 2014;84(5):1194-8.

7. Hascalik S, Celik O, Turkoz Y, Hascalik M, Cigremis Y, Mizrak B, et al. Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, protects from ischemia-reperfusion damage of the ovaries. Gynecologic and obstetric investigation. 2004;57(4):218-23.

8. Wolman I. Berek and Novak’s Gynecology 15th Edition. The Journal of Obstetrics and Gynecology of India. 2014;64:150-1.

9. Gaudet TW. Berek and Novak's Gynecology 15th Ed.

10. Jones RE, Lopez KH. Human reproductive biology: Academic Press; 2013.

11. Hamid HY, Zakaria MZAB. Reproductive characteristics of the female laboratory rat. African journal of biotechnology. 2013;12(19):2510-4.

12. Treuting PM, Dintzis SM, Liggitt D, Frevert CW. Comparative anatomy and histology: a mouse and human atlas (expert consult): Academic Press; 2011.

13. Westwood FR. The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. Toxicologic Pathology. 2008;36(3):375-84.

14. Mazaud Sv, Guigon ClJ, Lozach A, Coudouel Nl, Forest MG, Coffigny H, et al. Establishment of the Reproductive Function and Transient Fertility of Female Rats Lacking Primordial Follicle Stock after Fetal γ-Irradiation. Endocrinology. 2002;143(12):4775-87.

15. Bayer AI, Wiskind AK. Adnexal torsion: can the adnexa be saved? American journal of obstetrics and gynecology. 1994;171(6):1506-10; discussion 10-1.

16. Huchon C, Fauconnier A. Adnexal torsion: a literature review. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 2010;150(1):8-12.

17. Kives S, Gascon S, Dubuc É, Van Eyk N. No. 341-Diagnosis and Management of Adnexal Torsion in Children, Adolescents, and Adults. Journal of obstetrics and gynaecology Canada : JOGC = Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada : JOGC. 2017;39(2):82-90.

18. Pansky M, Smorgick N, Herman A, Schneider D, Halperin R. Torsion of normal adnexa in postmenarchal women and risk of recurrence. Obstetrics and gynecology. 2007;109(2 Pt 1):355-9.

19. Kives S, Gascon S, Dubuc É, Van Eyk N. No. 341-Diagnosis and Management of Adnexal Torsion in Children, Adolescents, and Adults. Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada. 2017;39(2):82-90.

20. Anders JF, Powell EC. Urgency of evaluation and outcome of acute ovarian torsion in pediatric patients. Archives of pediatrics & adolescent medicine. 2005;159(6):532-5.

21. Rousseau V, Massicot R, Darwish AA, Sauvat F, Emond S, Thibaud E, et al. Emergency management and conservative surgery of ovarian torsion in children: a report of 40 cases. Journal of pediatric and adolescent gynecology. 2008;21(4):201-6.

22. Oltmann SC, Fischer A, Barber R, Huang R, Hicks B, Garcia N. Pediatric ovarian malignancy presenting as ovarian torsion: incidence and relevance. Journal of pediatric surgery. 2010;45(1):135-9.

23. Varras M, Tsikini A, Polyzos D, Samara C, Hadjopoulos G, Akrivis C. Uterine adnexal torsion: pathologic and gray-scale ultrasonographic findings. Clinical and experimental obstetrics & gynecology. 2004;31(1):34-8.

24. Rossi BV, Ference EH, Zurakowski D, Scholz S, Feins NR, Chow JS, et al. The clinical presentation and surgical management of adnexal torsion in the pediatric and adolescent population. Journal of pediatric and adolescent gynecology. 2012;25(2):109-13.

25. Daponte A, Pournaras S, Hadjichristodoulou C, Lialios G, Kallitsaris A, Maniatis AN, et al. Novel serum inflammatory markers in patients with

adnexal mass who had surgery for ovarian torsion. Fertility and Sterility. 2006;85(5):1469-72.

26. Wilkinson C, Sanderson A. Adnexal torsion — A multimodality imaging review. Clinical Radiology. 2012;67(5):476-83.

27. Sasaki KJ, Miller CE. Adnexal Torsion: Review of the Literature. Journal of Minimally Invasive Gynecology. 2014;21(2):196-202.

28. Shadinger LL, Andreotti RF, Kurian RL. Preoperative sonographic and clinical characteristics as predictors of ovarian torsion. Journal of ultrasound in medicine : official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine. 2008;27(1):7-13.

29. Ghossain MA, Hachem K, Buy JN, Hourany-Rizk RG, Aoun NJ, Haddad-Zebouni S, et al. Adnexal torsion: magnetic resonance findings in the viable adnexa with emphasis on stromal ovarian appearance. Journal of magnetic resonance imaging : JMRI. 2004;20(3):451-62.

30. Spinelli C, Piscioneri J, Strambi S. Adnexal torsion in adolescents: update and review of the literature. Current opinion in obstetrics & gynecology. 2015;27(5):320-5.

31. Geimanaite L, Trainavicius K. Ovarian torsion in children: Management and outcomes. Journal of pediatric surgery. 2013;48(9):1946-53.

32. Yildiz A, Erginel B, #351, ak, Akin M, Karada, et al. A retrospective review of the adnexal outcome after detorsion in premenarchal girls. African Journal of Paediatric Surgery. 2014;11(4):304-7.

33. Özler A, Turgut A, Soydinç HE, Sak ME, Evsen MS, Alabalik U, et al. The Biochemical and Histologic Effects of Adnexal Torsion and Early Surgical Intervention to Unwind Detorsion on Ovarian Reserve: An Experimental Study. Reproductive Sciences. 2013;20(11):1349-55.

34. Celik O, Turkoz Y, Hascalik S, Hascalik M, Cigremis Y, Mizrak B, et al. The protective effect of caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 2004;117(2):183-8.

35. Gülçin İ. Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2010;11(1):210-8.

36. Lu Z, Cheng B, Hu Y, Zhang Y, Zou G. Complexation of resveratrol with cyclodextrins: Solubility and antioxidant activity. Food Chemistry. 2009;113(1):17-20.

37. Ertürk N, Elbe H, Erdemli ME, Aktas S, Yigitturk G, Aksungur Z, et al. Protective effects of sildenafil and resveratrol on ovarian ischemia reperfusion injury in rats. Biomedical Research. 2017;28:8973.

38. Mak IT, Boehme P, Weglicki WB. Antioxidant effects of calcium channel blockers against free radical injury in endothelial cells. Correlation of protection with preservation of glutathione levels. Circulation research. 1992;70(6):1099-103.

39. Meštrović J, Drmić-Hofman I, Pogorelić Z, Vilović K, Šupe-Domić D, Šešelja-Perišin A, et al. Beneficial Effect of Nifedipine on Testicular Torsion-detorsion Injury in Rats. Urology. 2014;84(5):1194-8.

40. Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R, et al. The physiology and clinical utility of anti-Mullerian hormone in women. Human reproduction update. 2014;20(3):370-85.

41. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. Human reproduction update. 2006;12(6):685-718.

42. Ghosh S, Sullivan CAW, Zerkowski MP, Molinaro AM, Rimm DL, Camp RL, et al. High levels of vascular endothelial growth factor and its receptors (VEGFR-1, VEGFR-2, neuropilin-1) are associated with worse outcome in breast cancer. Human Pathology. 2008;39(12):1835-43.

43. Takahashi S. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2011;34(12):1785-8.

44. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clinical Biochemistry. 2004;37(4):277-85.

45. Karakaş S, Kaya C, Güraslan H, Sakiz D, Süzen Çaypinar S, Cengiz H, et al. Effect of metformin and detorsion treatment on serum anti-Müllerian hormonelevels and ovarian histopathology in a rat ovarian torsion model. Turkish journal of medical sciences. 2020;50(2):455-63.

46. Sakin O, Anğın AD, Akalın EE, Cikman MS, Basak K, Kaptanagasi AO. Comparison of the protective effects of sildenafil, vardenafil and tadalafil treatments in ischemia-reperfusion injury in rat ovary. Ginekologia polska. 2019;90(9):513-9.

47. Soyman Z, Kelekçi S, Sal V, Şevket O, Bayındır N, Uzun H. Effects of Apigenin on Experimental Ischemia/Reperfusion Injury in the Rat Ovary. Balkan Med J. 2017;34(5):444-9.

48. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, et al. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. Endocrinology. 2002;143(3):1076-84.

49. Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. Reproduction (Cambridge, England). 2002;124(5):601-9.

50. Baarends WM, Uilenbroek J, Kramer P, Hoogerbrugge J, Van Leeuwen E, Themmen A, et al. Anti-müllerian hormone and anti-müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. Endocrinology. 1995;136(11):4951-62.

51. Parlakgumus HA, Aka Bolat F, Bulgan Kilicdag E, Simsek E, Parlakgumus A. Atorvastatin for ovarian torsion: effects on follicle counts, AMH, and VEGF expression. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 2014;175:186-90.

52. Tokgoz VY, Sipahi M, Keskin O, Guvendi GF, Takir S. Protective effects of vitamin D on ischemia-reperfusion injury of the ovary in a rat model. Iran J Basic Med Sci. 2018;21(6):593-9.

53. Gungor ANC, Turkon H, Albayrak A, Ovali M, Islimye M, Gencer M, et al. Does Omegaven have beneficial effects on a rat model of ovarian ischemia/reperfusion? European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 2014;181:240-5.

54. Dokuyucu R, Karateke A, Gokce H, Kurt RK, Ozcan O, Ozturk S, et al. Antioxidant effect of erdosteine and lipoic acid in ovarian ischemia–reperfusion injury. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 2014;183:23-7.

55. شکری , فرزناز, شکوهی , رررآ دان, ایدا, ار سد تاقیکل, et al. The ameliorative effect of Galega officinalis extract on histological damages, oxidative stress induced by torsion-detorsion in adult rats' ovarian. International Journal of Women's Health and Reproduction Sciences. 2019;7(1):119-23.

56. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. Reproductive biology and endocrinology. 2012;10(1):1-31.

10.EKLER

EK 1: ETİK KOMİSYON ONAYI

Evrak Tarih ve Sayısı: 09.07.2020-E.72422

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Mesut ÖKTEM
İnfertilite Üreme Endokrinolojisi Bilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Mesut ÖKTEM, Gülnur TAKE KAPLANOĞLU, Cengiz KARAKAYA, Aydan PİRİYEVA ve Asiye Aslı EMNİYET SERT'ten oluşan G.Ü.ET-20.034 kod numaralı ve ***"Overi Torsiyon Edilmiş Ratlarda Nifedipin, Resveratrol ve Detorsiyon Tedavisinin Serumdaki Anti-Müllerian Hormon Düzeyi ve Overyan Histopatoloji Üzerindeki Etkisi"*** başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-20.034 and entitled ***"A Rat Ovarian Torsion Model Study:Effect of Nifedipin, Resveratrol and Detorsion Treatment on Serum Anti-Mullerian Hormone Levels and Ovarian Hystopathology"*** is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Commitee regulations.

With my best regards.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Hayvan Türü : Rat Sprague Dawley
Hayvan Sayısı : 24

Ek: 1 Liste

Emniyet Mahallesi Bandırma Caddesi No :6/1 06560 Yenimahalle/ANKARA
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://hadyek.gazi.edu.tr/
Bilgi için :Burak Çitrak
Genel Evrak Sorumlusu

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

11.ÖZGEÇMİŞ

Adı: Aydan

Soyadı: Piriyeva

Doğum Yeri ve Tarihi: AZERBAYCAN/1990

Eğitimi:

2007 Zengilan Lisesi (Bakü)

2007-2010 Azerbaycan Tıp Üniversitesi

2010-2016 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi (Ankara)

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:

Bilimsel Etkinlikleri (aldığı burslar, ödüller, projeleri, yayınları):