



DeneySEL İskemi / Reperfüzyon Modeli Uygulanmış Dişi Sıçanlarda Tuba Uterina Dokusuna Pycnogenol 'un Etkisinin Değerlendirilmesi

Mukadder Sunar¹, Gülce Naz Yazıcı²

1 Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Erzincan, Türkiye

2 Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Erzincan, Türkiye

Gelis: 21.05.2021; Revizyon: 21.01.2022; Kabul Tarihi: 16.02.2022

Öz

Amaç: Adneksiyal torsiyon; en önemli jinekolojik acil durumlardan biri olarak tanımlanmaktadır. Adneksiyal torsiyondan etkilenen organlarda biri de tuba uterinadır. Ovaryum ve tuba uterinayı içeren adneksiyal torsiyon, bu yapıların infundibulopelvik ve tuba – ovaryum ligamentinin oluşturduğu bir merkez hat etrafında bükülerek dönmesi olarak tarif edilmektedir. Bu çalışmada, dişi sıçanlarda deneysel adneksiyal torsiyon ile oluşturulan iskemi /reperfüzyon (IR) tuba uterina hasarına karşı bir antioksidan olan pycnogenol 'un (PYC) olası koruyucu etkisini histolojik ve biyokimyasal yöntemlerle incelemeyi amaçladık.

Yöntemler: 18 adet Wistar albino cinsi dişi sıçan randomize olarak 3 gruba ayrıldı. 1. Grup Sağlıklı kontrol (K), 2. Grup I/R Grubu (IR), 3. Grup I/R + Pycnogenol Grubu (PIR) olarak belirlendi. Sağ adneksa iskemi durumu vasküler klipslerle oluşturuldu. İki saat boyunca iskemi uygulandıktan sonra adneksa 2 saat boyunca reperfüze edildi. Daha sonra sıçanlar yüksek doz anestezi altında sakrifiye edilerek; tuba uterina dokularında malondialdehit (MDA) ve toplam glutatyon (tGSH) seviyeleri ile biyokimyasal olarak incelendi. Aynı zamanda dokular, rutin histolojik tespit ve takip yöntemlerinden geçirilerek histopatolojik olarak değerlendirildi.

Bulgular: Çalışmada MDA seviyeleri değerlendirildiğinde; K grubu ile karşılaştırıldığında IR grubunda istatistiksel anlamlı artış, K ve PIR grubu MDA seviyelerinde ise benzerlik tespit edildi. tGSH seviyelerinde yine K grubu ile karşılaştırıldığında IR grubunda anlamlı düşüş, IR ve PIR grupları arasında ise benzerlik gözlemlendi. Histopatolojik değerlendirmelerde ise, IR uygulamasının tuba uterina dokusunda belirgin epitelyal dejenerasyon, hemoraji, ödem, PMNL infiltrasyonu ve kan damarlarında kongesyon /dilatasyona neden olduğu gözlemlendi. PIR grubunda ise bahsedilen histopatolojik değişimlerin oldukça azaldığı dikkati çekti. Özellikle PMNL infiltrasyonu ve hemorajinin, IR grubunda oldukça yoğun olduğu ve bu değişimlerin PIR grubunda istatistiksel anlamlı olarak azaldığı tespit edildi.

Sonuç: Çalışmamızın biyokimyasal ve histopatolojik değerlendirmeler yaparak bu değerlendirmelerimizi istatistiksel analizler ile de destekledik. Sonuç olarak, dişi sıçanlarda AT ile oluşturulmuş tuba uterina IR hasarına karşı, antioksidan olarak kullanmış olduğumuz PYC 'nin histopatolojik ve biyokimyasal yönlerden koruyucu etkisi olduğu kanısına vardık.

Anahtar Kelimeler: Tuba uterina, İskemi / Reperfüzyon, Pycnogenol

DOI: 10.5798/dicletip.1086382

Yazışma Adresi / Correspondence: Gülce Naz Yazıcı, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Erzincan, Türkiye e-mail: gulcenazyazici.ank@gmail.com

Evaluation of the Effect of Pycnogenol on Tuba Uterina Tissue in Female Rats with Experimental Ischemia / Reperfusion Model

Abstract

Objective: Ovarian torsion, which affects females of all ages, is a gynecological emergency. Adnexal torsion is uncommon, occurring most often during reproductive years. Torsion of the normal adnexa, which is rare, is more common among children than adults. Typically, one ovary is involved, but sometimes tuba uterina is also involved. Adnexal torsion is defined as at least one full turn around the midline of the adnexa, ovary or, more rarely, the tuba uterina alone, including the infundibulopelvic and tubo-ovarian ligaments. In this study, we aimed to investigate the possible protective effect of pycnogenol (PYC), an antioxidant, against ischemia / reperfusion (IR) tuba uterina tissue damage induced by experimental adnexal torsion in female rats by histological and biochemical methods.

Method: 18 Wistar albino female rats were randomly divided into 3 groups. Group 1 was determined as Healthy control (K), Group 2 as I / R Group (IR), and Group 3 as I / R + Pycnogenol Group (PIR). Ischemia in the right adnexa was created with vascular clips. After ischemia was applied for two hours, the adnexa was reperfused for more two hours. At the end of the experiment, the subjects were sacrificed under high anesthesia and the tissues obtained were evaluated. Subsequently, malondialdehyde (MDA) and total glutathione (tGSH) levels were biochemically investigated in the tuba uterina tissues of rats. At the same time, the tissues were evaluated histopathologically by performing routine histological methods.

Results: MDA levels are evaluated in the study; when compared with the K group, a statistically significant increase in the IR group, and a similarity in the K and PIR group MDA levels were found. When compared with the K group, a significant decrease in tGSH levels was observed in the IR group, and similarity was observed between the IR and PIR groups. In histopathological evaluations, it was observed that IR application caused significant epithelial degeneration, hemorrhage, edema, PMNL infiltration and congestion / dilatation in blood vessels in the tubular uterine tissue. It was noticed that the histopathological changes in the PIR group decreased considerably. Particularly, PMNL infiltration and hemorrhage were found to be quite intense in the IR group and these changes were found to be statistically significant in the PIR group.

Conclusion: By making biochemical and histopathological evaluations of our study, we supported these evaluations with statistical analyzes. As a result, we concluded that PYC, which we used as an antioxidant, had a protective effect on histopathological and biochemical aspects against AT-induced tuba uterina IR damage in female rats.

Keywords: Tuba uterina, İschemia / reperfusion, Pycnogenol.

GİRİŞ

Adneksiyal torsiyon (AT); %3 'lük global insidansa sahiptir ve en önemli jinekolojik acil durumlardan biri olarak tanımlanmaktadır. Ovaryum ve tuba uterinayı içeren adneksiyal torsiyon, bu yapıların infundibulopelvik ve tuba - ovaryum ligamentinin oluşturduğu bir merkez hat etrafında bükülerek dönmesi olarak tarif edilmektedir¹. AT genellikle herhangi bir ovaryum anomalisini gösteren durumlardandır. Bununla birlikte, gebelik, in - vitrofertilizasyon tedavisi sırasında uygulanan ovulasyon indüksiyonu ajanları, iyi huylu tümörlerin varlığından kaynaklı ovaryum büyümesi gibi nedenlerle de adneksiyal torsiyon riski oluşmaktadır. İyi huylu tümörlerin, kötü huylu olanlara kıyasla torsiyona neden olma olasılığı daha yüksektir. Adneksiyal organlar sabitlenmeyen hareketli organlar oldukları için,

tümör büyümesi gibi büyük bir ana nokta bükülmeye neden olabilmektedir².

Torsiyona bağlı olarak geliştiği bilinen iskemi, son yıllarda yoğun bir araştırma alanı haline gelmiştir. İskemi, doku / organlarda kan akışının azalması ya da kesintisi yoluyla bölgeye kan ile taşınan oksijenin yoksunluğu ile ortaya çıkar. AT 'nu tedavi etmenin altın standardı cerrahidir ve bu aynı zamanda laparoskopi ya da laparotomi gibi teknikleri kullanarak torsiyonu doğrulamanın tek yoludur². Cerrahi müdahale sayesinde bölgeye tekrar kan akışı sağlanarak detorsiyon gerçekleştirilir. Detorsiyon ile onu besleyen damarlar etrafında dönmüş- burulmuş olan adneksiyal bölge organlarına tekrar kan akışı sağlanır fakat bu işlemi takiben olaylanması muhtemel iskemi / reperfüzyon hasarı karşılaşılabilecek yeni problemdir. Torsiyonun neden olduğu iskemi;

hipoksik hasara, dokuda laktik asit birikimine, hipoksantin ve lipid peroksidasyon seviyelerinin artışına neden olur¹. İskemiden sonra, reperfüzyon devam ettiğinde, 'reperfüzyon hasarı' adı verilen yeni bir fizyopatolojik süreç ortaya çıkar ve bu da daha şiddetli doku hasarı gerçekleşir³. Reperfüzyonu takiben ise bölgeye polimorfonükleer nötrofil infiltrasyonu (PMNL) olur ve aşırı miktarda reaktif oksijen radikali (ROS) üretilir. Reperfüzyon mediatörleri olarak bilinen bu ROS 'lar, hücre membran lipidlerini oksidasyona uğratarak, lipidlerden aldehid ve malondialdehid (MDA) gibi toksik ürünlerin meydana gelmesine neden olur⁴. Ali FF ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada, iskemi / reperfüzyon (IR) işleminin ovarium dokusunda oksidanların yanı sıra proenflamatuar sitokin düzeylerinin de artış gösterdiği rapor edilmiştir⁵. Tuba uterina dokusunda IR hasarını araştıran nadir çalışmalardan bir tanesinde ise, IR işleminin uygulandığı deney grubunda süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) seviyelerinin düştüğü rapor edilmiştir⁶.

Pycnogenol (PYC) antioksidan ve anti-enflamatuar etkili French maritimepine bark (Pinusmaritime) 'ın standartlaştırılmış bir özütüdür. PYC prosiyanidinler, biyoflavonoidler ve fenolik asitler içerir⁷. Dünyanın bir çok ülkesinde PYC bir besin takviyesi olarak ve kronik enflamasyondan dolaşım bozukluğuna kadar çeşitli hastalıklar için bir fitokimyasal tedavi şeklinde, çeşitli psikofizyolojik fonksiyonlar dahil olmak üzere kullanılmaktadır. Bileşenlerinin temel kimyasal yapısı sayesinde PYC 'nin en belirgin özelliği güçlü antioksidan aktivitesidir⁸. Birçok dokuda antioksidan etkinliği araştırılmış olan PYC 'nin, tuba uterina dokusunda olaylanan IR hasarına karşı koruyucu etkisi olabileceği düşüncesinden hareketle çalışmamızda, dişi sıçanlarda deneysel adneksatorsiyonu ile oluşturulan IR tuba uterina hasarına karşı PYC 'nin olası

koruyucu etkisini histolojik ve biyokimyasal yöntemlerle incelemeyi amaçladık.

YÖNTEMLER

Deney Hayvanları ve Gruplandırma

Deney hayvanları, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edildi. Deneyde, Wistar albino cinsi 18 adet dişi sıçan kullanıldı, denekler 245 - 258 gram ağırlığında erişkin sıçanlardı ve çalışma süresince 22-25 °C oda ısısında, 12 saat aydınlık / 12 saat karanlık siklusları içeren ortamda, standart gıda ve suya serbest erişimli olarak tutuldular. Hayvanlar üzerindeki tüm cerrahi işlemler steril şartlar altında, uygun laboratuvar ortamında gerçekleştirildi. Üç gruba randomize olarak bölünen dişi sıçanlardan, 1. Grup, Sağlıklı kontrol (K) (n=6), 2. Grup, I/R grubu (IR) (n=6), 3. Grup, I/R + Pycnogenol grubu (PIR) (n=6) olarak belirlendi. 1. Gruba; oral gavaj yoluyla % 0,9 'lukNaCL solüsyonu uygulandı. 2. Gruba operasyondan 1 saat önce oral gavaj yoluyla % 0,9 'lukNaCL solüsyonu uygulandı. 3. Gruba operasyondan 1 saat önce oral gavaj yoluyla % 0,9 'lukNaCL içerisinde çözdürülmüş 40 mg/kg Pycnogenol uygulandı. Bu çalışmada kullanılan Pycnogenol dozu, Pycnogenol 'un antioksidan etkilerinin gözlemlendiği daha önceki çalışmalara dayanılarak kurgulandı 9. Daha sonra; 25 mg/kg intraperitoneal (i.p.) tiopental sodyum anestezisi altında 2. ve 3. gruba ait dişi sıçanların adneksiyal bölgelerine, karnın alt kısmından 2-2,5 cm uzunluğunda vertikal bir kesi açılarak ulaşıldı. Ardından, 2. ve 3. gruba ait dişi sıçanların sağ adneksiyal bölgelerinin alt kısmına damar klipsi uygulanarak iki saat iskemi ve ardından iki saat reperfüzyon olaylanması sağlandı. Deneysel uygulama bitiminde, tüm dişi sıçanların sağ tuba uterina dokuları çıkartıldı ve denekler sakrifiye edildi. Deney için; 75296309-050.01.04-E.2100073371 kod numarası ile Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı'ndan Etik Kurul onayı alınmıştır.

Işık Mikroskopik Yöntem

Deneklere ait dokular %10 formaldehit solüsyonu içerisinde alınarak 72 saat tespit edildi. Tespit işlemi sonrasında, dokular kasete alınarak 24 saat akar suda yıkandı ardından artan alkol serilerinden (%70, %80, %90, ve %100) geçirilerek sudan arındırıldı. Ksilolde şeffaflaştırılan tuba uterina dokuları parafin bloklara gömülerek 4-5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler hematoksilen - eozin ikili boyaması ile boyanarak; Olympus DP2-SAL firmwareprogram'da (Olympus® Inc. Tokyo, Japan) değerlendirildi ve fotoğraflandı. Alınan seri kesitlerde, her bir deney grubu için altı kesitte 100x büyültmede bir merkez - beş perifer olmak üzere altışar alan seçilerek normal histolojik doku yapısından sapmalar; doku dejenerasyonu, ödem, polimorfonükleer hücre infiltrasyonu, hemoraji damarlarda dilatasyon / kongesyon (tıkanıklık) kriterleri adı altında puanlandı. Sayılan kriterler için 0=bulunmuyor, 1=hafif, 2=orta ve 3=şiddetli olmak üzere 0-3 puan arasında skorlama yapıldı. Histopatolojik değerlendirme çalışma grupları için çift kör bir histolog tarafından gerçekleştirildi.

Biyokimyasal Yöntem

Çalışmanın bu aşamasında çıkarılan her bir dokudan 0,2 g. tartıldı. MDA tayini için %1,15 'lik potasyum klorür çözeltisi, tGSH ölçümü için pH=7,5 olan fosfat tamponu içinde 2 ml.'ye tamamlanarak buzlu ortamda homojenize edildi. Daha sonra, +4 °C 'de 10000 rpm 'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı analiz numunesi olarak kullanıldı. Tuba uterina dokusu MDA ölçümleri, Ohkawa ve arkadaşları tarafından kullanılan yöntemeye dayalıdır. Tiobarbitürik asit ve MDA tarafından oluşturulan pembe renkli bileşimin absorbansının spektrofotometrik ölçümünü içerir¹⁰. Sedlak ve Lindsay tarafından tanımlanan yöntemeye göre Total glutathione (tGSH)seviyeleri araştırılmıştır. DTNB (5,5'-ditiyobis [2-nitrobenzoik asit]) disülfür

ortamda kromojeniktir ve DTNB, sülfhidril grupları tarafından kolayca indirgenir. İndirgeme sırasında üretilen sarı renk, 412 nm 'de spektrofotometri ile ölçülmektedir¹¹. Çalışmamızda ölçümü yapılan biyokimyasal parametreler, hizmet alımı şeklinde değerlendirilmiş olup, yazarlar tarafından finanse edilmiştir.

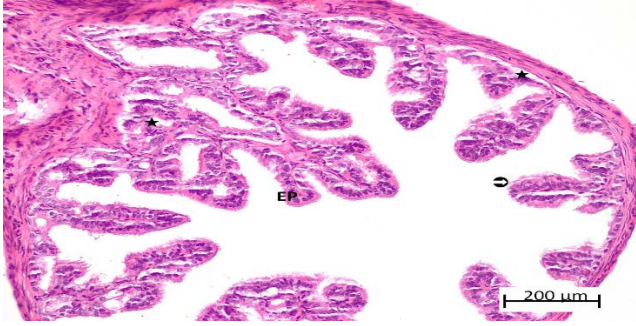
İstatistiksel Yöntem

Verilerin analizinde IBM SPSS ver. 22 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA) kullanıldı. Sürekli değişkenlere ait tanımlayıcı istatistikler ortalama±standart sapma, medyan (minimum-maksimum) değer, kategorik değişkenler ise sayı (%) olarak sunuldu. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov Smirnov testi ile sınıandı. Gruplarda sürekli değişkenler karşılaştırılırken One-way ANOVA testi kullanıldı. Varyans homojenliği Levene 's test ile kontrol edildi. Varyans homojenliği sağlanmayan durumlarda Games-Howell test, sağlanan durumlarda ise Tukey 's HSD test kullanılmıştır. Normal dağılım varsayımı sağlanmayan durumlarda Kruskal Wallis testi kullanıldı ve post-hoc test olarak Dunn 's test uygulandı. Tüm istatistiksel testlerde p<0,05 değeri anlamlı kabul edildi.

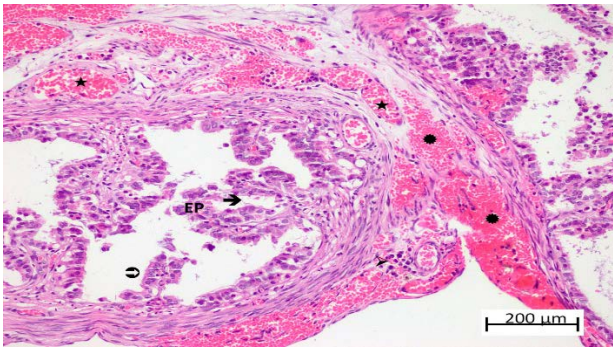
BULGULAR

Kontrol grubuna ait tuba uterina dokusu histolojik olarak değerlendirildiğinde; tek katlı silli prizmatik epitel ve altındaki bağ dokuyu içeren tunika mukoza, düz kas katmanı tunika muskularis ve tunika seroza katmanlarının düzenlenişi ile dokunun normal histolojik görünümüne sahip olduğu gözlemlendi (Fotoğraf 1). Adneksiyal iskemi ve reperfüzyon deneysel modeli uygulanmış IR grubunun tuba uterina kesitleri değerlendirildiğinde; tek katlı silli prizmatik epitel hücrelerin sil yapılarını kaybederek dejenere olduğu gözlemlendi. Epitelin altındaki bağ dokuda orta şiddetli ödemli alanların bulunduğu tespit edildi. Kan damarları çevresinde ve bağ dokuda yaygın ve

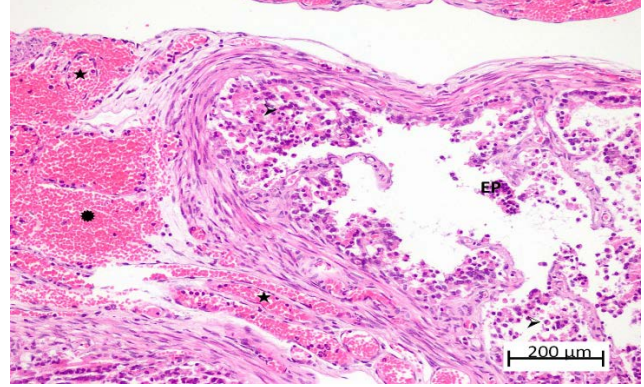
şiddetli PMNL hücre infiltrasyonu, hemorajik alanlar dikkati çekerken; yine kan damarlarında yoğun dilatasyon ve kongesyon tespit edildi (Fotoğraf 2). Aynı gruba ait tuba uterina dokusu kesitlerinin bir kısmında, epitel dejenerasyonunun epitel doku kaybı şeklinde olduğu, lümeneye dökülmüş hücre birikimlerinin bulunduğu ve katman bütünlüğünün bozulduğu izlendi. Bağ dokusu içinde yoğun ödemli alanların varlığı da gözlemlendi (Fotoğraf 3). PIR grubu değerlendirildiğinde, epitel dejenerasyonunun hafif şiddette olduğu, katman bütünlüğünün korunduğu, prizmatik hücrelerde yer yer sillerin varlığı, bağ doku ödeminin hafif düzeyde varlığını sürdürdüğü gözlemlendi. Dokuya PMNL hücre infiltrasyonu nadirdi. Dokuda hemorajik alan bulunmazken, kan damarlarında dilatasyonun hafif düzeyde, kongesyonun ise orta şiddette olduğu tespit edildi (Fotoğraf 4).



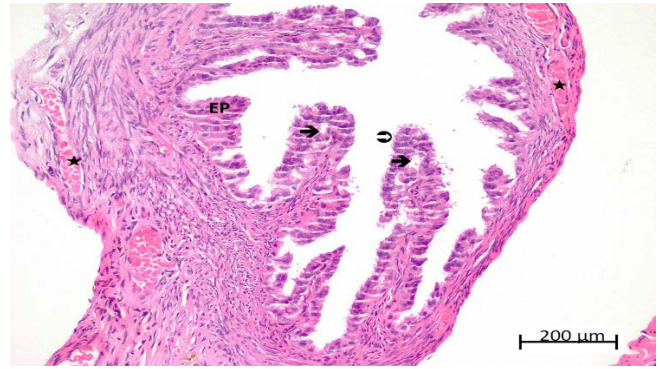
Fotoğraf 1: Hematoxylin-eozin ile boyanmış tuba uterina dokusu kontrol grubunda; EP: normal görünümdeki tek katlı prizmatik epitel, ⊕: sil yapısı ve ★: normal görünümdeki kan damarları, x100.



Fotoğraf 2: Hematoxylin-eozin ile boyanmış tuba uterina dokusu IR grubunda; EP: yoğun dejenere tek katlı prizmatik epitel, ⊕: kaybolmuş sil yapısı, >: polimorfonükleer hücre infiltrasyonu, ➔: bağ dokuda orta şiddette ödemli alanlar, ★: hemorajik alanlar, ★: kan damarlarında yoğun dilatasyon ve kongesyon, x100.



Fotoğraf 3: Hematoxylin-eozin ile boyanmış tuba uterina dokusu IR grubunda; EP: yoğun dejenere ve bütünlüğünü yitirmiş tek katlı prizmatik epitel, >: yoğun polimorfonükleer hücre infiltrasyonu, ★: hemorajik alanlar, ★: kan damarlarında yoğun dilatasyon ve kongesyon, x100.



Fotoğraf 4: Hematoxylin-eozin ile boyanmış tuba uterina dokusu PIR grubunda; EP: hafif dejenere tek katlı prizmatik epitel, ⊕: yer yer gözlemlenen sil prizmatik hücreler, ➔: bağ dokuda hafif şiddette ödem, ★: kan damarlarında hafif - orta şiddette dilatasyon ve kongesyon, x100.

Histopatolojik bulguların skorlaması sonucunda yapılan istatistiksel değerlendirmeler Tablo I 'de sunulmuştur. Doku dejenerasyonu, ödem ve kongesyon / dilatasyon kriterleri değerlendirildiğinde; K grubu ile IR grubu arasında istatistiksel anlamlı fark olduğu gözlemlendi ($p < 0.001$). Bu kriterler için PIR grubunun IR grubu ile karşılaştırıldığında azalmış fakat IR grubuna benzer düzeyde olduğu tespit edildi (sırasıyla $p = 0.140$, $p = 0.418$, $p = 0.140$). IR grubunda PMNL infiltrasyonu ve hemorajinin K grubuna göre arttığı sonucuna varıldı ($p < 0.001$). PIR grubunda PMNL infiltrasyonu IR grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak azalmış ($p = 0.047$) ve K grubu ile istatistiksel olarak benzer ($p = 0.142$) düzeyde bulunmuştur.

Tablo I: Çalışma gruplarındaki histopatolojik bulgular

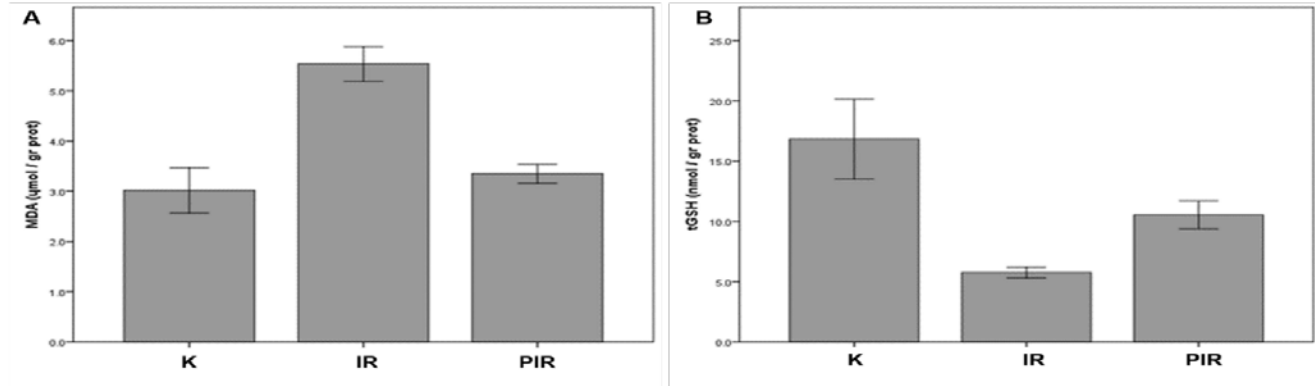
	Gruplar			p	İkili Karşılaştırma p-değerleri		
	K (1)	IR (2)	PIR (3)		1 - 2	1 - 3	2 - 3
Dejenerasyon	0.0(0.0-0.0)	2.4(2.0-3.0)	1.7(1.2-1.8)	<0.001	<0.001	0.140	0.140
Ödem	0.0(0.0-0.0)	2.9(2.5-3.0)	1.8(1.2-2.0)	0.001	<0.001	0.059	0.418
PMNL infiltrasyonu	0.0(0.0-0.0)	2.4(2.0-2.7)	0.8(0.3-1.2)	0.001	<0.001	0.142	0.047
Kongesyon/Dilatasyon	0.0(0.0-0.0)	2.9(2.5-3.0)	1.8(1.2-2.0)	<0.001	<0.001	0.140	0.140
Hemoraji	0.0(0.0-0.0)	2.4(2.3-3.0)	0.7(0.5-0.7)	0.001	<0.001	0.137	0.046

Kruskal Wallis testi post-hoc olarak Dunn testi ile yapıldı. Sonuçlar medyan (minimum-maksimum) olarak sunuldu. K: kontrol grubu, IR: iskemi/reperfüzyon grubu, PIR: IR + Pycnogenol grubu.

Hemoraji kriteri değerlendirildiğinde ise; PIR grubunda IR grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak azalmış ($p=0.046$) ve K grubu ile istatistiksel olarak benzer ($p=0.137$) düzeyde bulunmuştur.

Çalışma gruplarında MDA seviyeleri biyokimyasal olarak incelendiğinde, IR grubunda düzeyin K grubu ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu görüldü

($p<0.001$). PIR grubunda ise MDA seviyelerinin IR grubuna göre azaldığı ($p<0.001$) ve K grubu ile benzer düzeye geldiği ($p=0.246$) bulundu (Şekil IIA). tGSH seviyeleri biyokimyasal olarak incelendiğinde, IR grubunda düzeyin K grubu ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğu görüldü ($p<0.001$). PIR grubunda ise tGSH seviyelerinin IR grubuna göre arttığı ($p<0.001$) fakat K grubu ile benzer düzeye gelemediği ($p<0.001$) tespit edildi (Şekil IIB).

**Şekil II:** Çalışma grupları arasında MDA (A) ve tGSH (B) seviyeleri arasındaki biyokimyasal karşılaştırma.

TARTIŞMA

AT çoğunlukla üreme döneminde görülür ancak puberte döneminde ve çocuklar arasında yetişkinlerle karşılaştırıldığında daha sık görüldüğü bilinmektedir. Tipik olarak ovaryumun dahil olduğu AT olgusuna nadiren tuba uterina tutulumu da dahil olmaktadır¹². İfundibulopelvik ligamentler, ovaryumları hareket edebilecek şekilde askıya alarak, ovaryumların uterusu göre lateral ya da

posterior olarak konumlanmasını sağlar². Ovaryum ve tuba uterinayı içeren adneksiyal torsiyon, bu yapıların infundibulopelvik ve tuba - ovaryum ligamentinin oluşturduğu bir merkez hat etrafında bükülerek dönmesi olarak tanımlanır¹. Belirgin semptomları genellikle akut apandisit semptomlarına benzerlik gösterir; bu nedenle AT, özellikle genç kızlarda sıklıkla yanlış teşhis edilir. Normal ovaryumların torsiyonunun etiyojisi üzerine, vasküler staz ve adneksiyal tıkanıklığa neden

olan engelli venöz dönüş, uzun tuba uterinalar ve mezosalpenks nedeniyle adneksanın aşırı hareketliliği ve uzun utero-ovaryan ligamentler dahil olmak üzere bir dizi teori öne sürülmüştür¹³. Jinekolojik acil durumlar nedeniyle ameliyat edilen hastalarda en sık beşinci neden olan AT jinekolojik acil durumların %2,7 'sini oluşturmaktadır. Tüm yaş gruplarında görülmekle birlikte üreme çağındaki kadınlarda görülme sıklığı daha yüksektir. Çocuklarda vakaların yaklaşık %15 'i bebeklik ve çocukluk döneminde ortaya çıkar¹⁴. Guthrie ve arkadaşlarını tarafından geniş bir seride, 1 ila 20 yaşındaki kadınlarda tahmini AT insidansı 100.000 'de 4,9 olarak tahmin edilmiştir^{15,16}. Kesin etiyoloji bilinmemekle birlikte, vakaların çoğunluğunda ovaryum kaynaklı bir tümör varlığı tespit edilmiştir. Normal büyüklükteki ovaryumlarda torsiyon çok nadirdir. Polikistikover ve benign kistik teratom gibi ovaryum boyutunu büyüten patolojilerde görülme sıklığı anlamlı olarak artmaktadır¹⁷.

Adneksiyal dolaşımdaki yetersizlik ya da kesintiden dolayı oluşan iskemik hasar ile hipoksi, laktik asit birikimi ve lipid preoksidasyon seviyelerinin artışı sağlamaktadır¹⁶. Cerrahi müdahale ile adneksiyal bölgenin detorsiyonu, iskemi vakalarında kaçınılmaz bir prosedürdür. Ancak, reperfüzyon sırasında oksijenli kanın geri dönüşü, dokuya daha fazla zarar verebilecek yeni bir reaksiyonu başlatır. Reperfüzyon hasarı, ROS oluşumu ile başlar ve bir dizi olayı tetikler¹⁸. Reperfüzyonu takiben bölgeye nötrofilin filtrasyonu ve aşırı reaktif oksijen radikali üretimi ile ek hasar olayları. Reperfüzyon sırasında kan tarafından iskemik dokuya taşınan proenflamatuar PMNL hücre birikimlerinin, IR hasarında meydana gelen hem oksidatif stres hem de enflamatuar yanıtı indüklemesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir¹⁹.

IR hasarının tüm olası patolojik mekanizmaları arasında, serbest radikal hasarının (esas olarak oksidatif / nitrozatif stres hasarı) bu süreçte anahtar bir rol oynadığı bulunmuştur. Serbest radikaller protein fonksiyon kaybına, DNA hasarına ve lipid peroksidasyonuna yol açarak hücre ölümüne neden olur. Serbest radikaller iki ana gruba ayrılır: ROS ve reaktif nitrojen türleri (RNS). ROS ve RNS, IR sırasında birçok patolojik süreçte anahtar rol oynar. Şu anda, IR hasarında serbest radikallerin toksisitesi yoğun bir şekilde araştırılan gözde bir alan olmuştur²⁰. Lipidoksidasyon, MDA 'nın da dahil olduğu toksik maddelerin üretimine neden olur. Doku hasarının bir belirteci olan MDA, lipid peroksidasyon sırasında oluşan oksidatif hasarın ikincil bir ürünüdür²¹. MDA, iyonik taşınımı ve enzimatik aktiviteyi bozar, hücre zarı geçirgenliğini ve grip idaresini, hücreleri ve organel içeriklerini ayıran süreksizliklere ve kırılmalara neden olacak şekilde ciddi şekilde değiştirir¹. Bu nedenle MDA, birçok çalışmada temel biyokimyasal parametre olarak seçilmiştir. Ovaryum dokusu üzerinde yapılan çalışmalarda, MDA seviyesinin IR uygulanmış deney gruplarında anlamlı olarak artmış olduğu gözlemlenmiştir¹⁹.

Hücreler, hidrojen peroksiti hidrojen okside (su) ve SOD 'a dönüştüren katalaz dahil süpürücü enzim sistemleri gibi çeşitli yollarla ROS hasarına karşı korunur. SOD, süperoksit (O₂⁻) radikalinin sıradan moleküler oksijene (O₂) veya hidrojen peroksite (H₂O₂) bölünmesini katalize eder. Süperoksit, oksijen metabolizmasının bir yan ürünü olarak üretilir. Bu düzeylerin düzenlenmesi gerekir; aksi takdirde birbirini izleyen reaksiyonlarla hücre hasarına neden olur. Hipotalamik hormonların reseptörlerine azalmış bağlanmasında rol oynayan lipid peroksidasyonu, antioksidan sistemlerde düşüşe neden olur²².

ROS 'un metabolik ara ürünlerinin konsantrasyonları; başlıca SOD, katalaz (CAT)

ve GSH-Px enzimlerinin oluşturduğu karmaşık bir savunma sistemi tarafından sıkı kontrol altında tutulur²³. Tuba uterina dokusunda IR hasarını araştıran çalışmalar oldukça nadirdir; bu çalışmalardan birinde, IR işleminin SOD ve GSH-Px seviyelerini düşürdüğü rapor edilmiştir⁶. Glutasyon (GSH), dokuları ROS 'tan koruyan vücudun en önemli antioksidan kapasiteli moleküllerinden biridir²³. Antioksidan olarak kullanılan lutein, IR tarafından hasarlanan sıçan ovaryumunda tGSH seviyelerini önemli ölçüde artırırken, MDA seviyelerini önemli ölçüde düşürmüştür²⁴. Yine Naykı ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da IR uygulaması ovaryumda MDA seviyelerini istatistiksel anlamlı olarak yükseltmiş buna karşın tGSH seviyesini düşürmüştür¹⁹.

PYC, Fransız deniz çamı kabuğundan elde edilen patenli bir ekstre olup, hem in vitro perfüze organlarda hem de in vivo renal iskemi / reperfüzyon modellerinde etkinliği kanıtlanmış, güçlü bir antioksidan ve anti-enflamatuvar 'dır⁷. PYC 'nin ana bileşenleri, monomerik fenolik bileşikler (kateşin, epikateşin ve taksifolin) ve yoğun flavonoidler (prosiyanidinler ve proantosiyandinler) 'dir⁷. Aslında fenolik asitler, polifenoller ve özellikle flavonoidler, bir veya daha fazla hidroksil grubu taşıyan bir (ya da daha fazla) aromatik halkadan oluşur ve bu nedenle potansiyel olarak stabilize edilmiş fenoksil radikalleri oluşturarak serbest radikalleri etkin bir biçimde süpürür. PYC 'nin çalışmamızda tercih edilmesinin sebebini de teşkil eden ilginç özelliği ise ekstraktın tam karışımının, herhangi bir saflaştırılmış bileşenin ağırlık bazında benzer bir miktardan daha fazla biyolojik etki göstermesidir. Bu, enzim inhibisyonu üzerine yapılan çalışmalarda ve PYC antioksidan kapasitesi üzerine yapılan çalışmalarla açıkça gösterilmiştir. Bu, PYC 'de muhtemelen "sihirli mermi" karakterinde tek bir etken madde içermediği aksine çeşitli bileşenleri arasındaki karmaşık sinerjistik etkileşimler nedeniyle,

ekstraktın tamamının biyolojik olarak etkin olduğunu kanıtlamaktadır⁸.

Özöner ve arkadaşları, beyin dokusunda IR modeli uygulamış; PYC 'nin MDA ve proenflamatuvar sitokin seviyelerindeki artış, total glutasyon seviyesinde ise azalışını önleyerek beyin dokusunu IR hasarından biyokimyasal düzeyde koruduğunu ayrıca histopatolojik dejenerasyon bulgularını da geri döndürdüğünü bildirmişlerdir⁹. Şehirli ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada IR modeli uygulayarak PYC 'nin renal koruyucu etkisini araştırmış, kanda böbrek fonksiyon testleri ve dokuda oksidan / antioksidan seviyelerini ve proenflamatuvar sitokin düzeylerini değerlendirmişlerdir. PYC 'nin, böbrek dokusunda I/R uygulaması ile artan MDA seviyesini azalttığı ve azalan GSH seviyesini ise artırdığı ve sitokin düzeylerini kontrol grubu düzeylerine yaklaştırdığı tespit edilmiştir²⁵. Tokaç ve arkadaşları, IR modeli uyguladıkları deney gruplarında; PYC 'nin etkisini araştırmışlar ve PYC 'nin, doku ve kan oksidan değerlerini düşürdüğünü ayrıca tek hücre jel elektroforeziyle yaptıkları incelemede de DNA hasarını azalttığını tespit etmişlerdir³. Türkler ve arkadaşları, sıçanlar üzerinde yapmış oldukları çalışmada sisplatin uygulaması sonrası ovaryum ve uterus dokuları üzerinde oluşan hasara karşı PYC 'nin hafifletici etkileri olduğunu bildirmişlerdir²⁶. Güncel çalışmamızda; tuba uterina IR hasarı araştırılmış ve çalışma gruplarında MDA seviyeleri biyokimyasal olarak incelendiğinde, IR grubunda düzeyin K grubu ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu PIR grubunda ise MDA seviyelerinin IR grubuna göre azaldığı bulunmuştur. tGSH seviyeleri biyokimyasal olarak incelendiğinde ise, IR grubunda düzeyin K grubu ile karşılaştırıldığında daha düşük, PIR grubunda ise IR grubuna göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızın sonuçları; daha önce

yapılmış IR hasarı çalışmalarının biyokimyasal sonuçları ile örtüşmektedir.

IR deneysel modeli kullanılarak tuba uterinada neden olduğu histopatolojik değişimleri inceleyen çalışmalarda, IR gruplarının tuba uterina dokuları incelendiğinde; epitelyal dejenerasyon, epitelyal döküntüler ve epitel bütünlüğünde bozulma, sil kaybı gözlemlenmiş bunun yanısıra; kan damarlarında kongesyon, dokuda ödem ve hemoraji tespit edilmiştir^{6,27,28}. Güncel çalışmamızda; biz de IR grubunda epitelyal dejenerasyon, sil kaybı ve epitelyal bütünlüğün bozulması gibi bulgularla birlikte, dokuda ödem, PMNL infiltrasyonu, hemorajik alanlar ve kan damarlarında kongesyon / dilatasyon olgularının varlığını tespit ettik. Bu histolojik bulguları skorladığımızda; doku dejenerasyonu, ödem ve kongesyon / dilatasyon kriterleri değerlendirildiğinde; K ve IR grupları arasında belirgin artış, PIR grubu düzeylerinde K grubu düzeylerine yakınlaşma tespit edilmiştir. IR grubunda PMNL infiltrasyonu ve hemorajinin K grubuna göre arttığı sonucuna varılmıştır. Pycnogenol uygulanan grupta ise bu histopatolojik kriterler göz önüne alındığında sonuçların K grubuna benzer düzeyde olduğu bulunmuştur.

Literatür tarandığında, daha önce AT ile oluşturulmuş IR modeli uygulanmış çalışmalarda, PYC 'nin dişi üreme organlarına olası koruyucu etkilerinin araştırılmamış olduğu görülmektedir. Bu bilgidan hareketle; tuba uterina dokusu üzerine kurguladığımız çalışmamızı biyokimyasal ve histopatolojik bulgular ışığında değerlendirdiğimizde, IR modeli uygulanan deneklerde olaylanan oksidan hasarı ve histopatolojik dejenerasyonu geri döndürdüğü tespit edilen PYC 'nin dişi sıçanlarda koruyucu etki gösterdiği kanısına vardık.

Etik Kurul Kararı: Deney için; 75296309-050.01.04-E.2100073371 kod numarası ile Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı'ndan Etik Kurul onayı alınmıştır.

Çıkar Çatışması Beyanı: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma herhangi bir fon tarafından desteklenmemiştir.

Declaration of Conflicting Interests: The authors declare that they have no conflict of interest.

Financial Disclosure: No financial support was received.

KAYNAKLAR

1. Akdemir A, Erbas O, Gode F, Ergenoglu M, Yeniel O, Oltulu F, Yavasoglu A, Taskiran D. Protective effect of oxytocin on ovarian ischemia-reperfusion injury in rats. *Peptides*. 2014; 55: 126-30.
2. Huang C, Hong MK, Ding DC. A review of ovary torsion. *Ci Ji Yi Xue Za Zhi*. 2017; 29 (3): 143-7.
3. Tokaç M, Bacanlı M, Dumlu EG, et al. The ameliorative effects of pycnogenol® on liver ischemia-reperfusion injury in rats. *Turk J Pharm Sci*. 2017; 14: 257-63.
4. Yapca OE, Borekci B, Suleyman H. Ischemia-reperfusion damage. *The Eur J of Med*. 2013; 45: 126-7.
5. Ali FF, Ahmed AF, Elroby Ali DM. Underlying mechanisms behind the protective effect of angiotensin (1-7) in experimental rat model of ovarian ischemia reperfusion injury. *Life Sci*. 2019; 235: 116840.
6. Kaplan S, Türk A. Effects of vitamin B12 on isolated tubal torsion with ischaemia/reperfusion injury: evaluation with histological and biochemical parameters. *J Obstet Gynecol Investig*. 2020; 3: e4-e9.
7. Fan B, Dun SH, Gu JQ, Guo Y, Ikuyama S. Pycnogenol attenuates the release of proinflammatory cytokines and expression of perilipin 2 in lipopolysaccharide-stimulated microglia in part via inhibition of NF-κB and AP-1 activation. *PLoS One*. 2015; 10: e0137837.
8. D'Andrea G. Pycnogenol: a blend of procyanidins with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia*. 2010; 81: 724-36.
9. Ozoner B, Yuceli S, Aydin S, et al. Effects of pycnogenol on ischemia/reperfusion-induced

inflammatory and oxidative brain injury in rats. *NeurosciLett.* 2019; 704: 169-75.

10. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95: 351-8.

11. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968; 25: 192-205.

12. Anne A, Dalley A. Grant's Atlas of Anatomy. 13th ed. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins; 2012.

13. Cadirci E, Oral A, Odabasoglu F, et al. Atorvastatin reduces tissue damage in rat ovaries subjected to torsion and detorsion: biochemical and histopathologic evaluation. *NaunynSchmiedebergsArchPharmacol.* 2010; 381: 455-66.

14. Eskander RN, Bristow RE. Adnexal masses in pediatric and adolescent females: A review of the literature. *CurrObstetGynecolRep.* 2012; 1, 25–32.

15. Guthrie BD, Adler MD, Powell EC. Incidence and trends of pediatric ovarian torsion hospitalizations in the United States, 2000–2006. *Pediatrics.* 2010; 125: 532–8.

16. Bozkurt S, Arikan DC, Kurutas EB, et al. Selenium has a protective effect on ischemia/reperfusion injury in a rat ovary model: biochemical and histopathologic evaluation. *J Pediatr Surg.* 2012; 47:1735-41.

17. Kurt A, Isaoglu U, Yilmaz M, et al. Biochemical and histological investigation of famotidine effect on postischemic reperfusion injury in the rat ovary. *J of PedSurg.* 2011; 46: 1817-23.

18. Ercan CM, Keskin U, ÇoksuerH,ve ark. Ektopik gebeliklerin laparoskopik yaklaşımla tedavilerinin retrospektif incelenmesi. *Gülhane Tıp Dergisi.* 2011; 53: 99-103.

19. Nayki C, Nayki U, Keskin Cimen F, et al. The effect of rutin on ovarianischemia-reperfusion injury in a rat model. *GynecolEndocrinol.* 2018; 34: 809-14.

20. Sun MS, Jin H, Sun X, et al. Free radical damage in ischemia-reperfusion injury: an obstacle in acute ischemic stroke after revascularization therapy. *OxidativeMed Cell Longev.* 2018; 2018: 3804979.

21. Akdemir A, Erbas O, Ergenoğlu M, et al. Montelukast prevents ischemia/reperfusion-induced ovarian damage in rats. *Eur J ObstetGynecolReprodBiol.* 2014; 173: 71–6.

22. Aslan M, Senturk GE, Akkaya H, Sahin S, Yılmaz B. The effect of oxytocin and Kisspeptin-10 in ovary and uterus of ischemia-reperfusion injured rats. *Taiwan J ObstetGynecol.* 2017; 56: 456-62.

23. Eren I, Naziroglu M, Demirdas A. Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stres in rat brain. *NeurochemRes.* 2007; 32: 1188-95.

24. Turkler C, Kulhan NG, Ata N, et al. The ameliorative effect of lutein on ovarian ischemia-reperfusion injury in rats. *BratislLekListy.* 2018; 119: 713-7.

25. Şehirli AO, Şener G. Protective effects of Pycnogenol against ischemia reperfusion-induced oxidative renal injury in rats. *Ren Failure.* 2009; 31: 690-7.

26. Turkler C, Kiremitli T, Onat T, et al.Pycnogenol prevent cisplatin-induced damage in uterus and ovaries.*ArchMedSci.* 2019; 15: 1.

27. Ural DA, Aykan DA, Koçarslan S, Doğaner A. Effect of tadalafil treatment on ovarian ischemia injury in rats. *CukurovaMed J.* 2019; 46: 55-62.

28. Annaç E, Karaçor T, Doğan Z. İskemi/reperfüzyon hasarı sonrası iloprost ile tedavi edilen sıçanlarda tuba uterina dokusunun histopatolojik değerlendirilmesi. *Jinekoloji-Obstetrik ve Neonatoloji Tıp Dergisi.* 2020; 17: 280-4.