

Rat Overinde İskemi-Reperfüzyon Üzerine N-Asetil Sistein ve Resveratrol'ün Koruyucu Etkisi

Protective Effect of N-Acetylcystein and Resveratrol on Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Ovary

Avni Kılıç¹, Hacer Uyanıkoğlu², Adnan İncebiyık²

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, rat overinde iskemi-reperfüzyona bağlı doku hasarı üzerine N-asetil sistein ve resveratrol'ün etkisini değerlendirmektir.

Yöntemler: 42 adet dişi Wistar rat temin edildi. Bu ratlar rando-mize bir şekilde 6 gruba eşit olarak bölündü (n=7). Oluşturulan gruplar; sham (S), torsiyon (T), torsiyon - detorsiyon (T - D), torsiyon - detorsiyon + salin (T - DT - S), torsiyon - detorsiyon + resveratrol (20 mg/kg) (T - DT - Res) ve torsiyon - detorsiyon + N-asetil sistein (150 mg/kg) (T - DT - NAC) şeklinde işlemlere tabi tutuldu. Sham grubu hariç diğer tüm gruplara iki saat boyunca ovarian torsiyon işlemi uygulandı. Torsiyon grubu dışındaki diğer tüm gruplara 2 saat detorsiyon prosedürü uygulandı. Salin, resveratrol ve N-asetil sistein gruplarında yer alan ratlara; detorsiyon işleminden yarım saat önce intraperitoneal yoldan 2 ml serum fizyolojik, 20 mg/kg resveratrol ve 150 mg/kg N-asetil sistein uygulandı. Ardından tüm ratlardan oksidatif stres markerları ve tümör nekrotizan faktör alfa (TNF- α) düzeylerinin çalışılması için 2 ml kan örneği ile histolojik inceleme için torsiyone edilen overler çıkarıldı. Histopatolojik değişiklikler ödem, konjesyon, hemoraji, lökosit infiltrasyonu ve follikül dejenerasyonu şeklinde tanımlandı.

Bulgular: Histopatolojik hasar skorlamasına göre en az hasar sham grubunda, en fazla ise torsiyon-detorsiyon grubunda olduğu görüldü (1,00 \pm 0,81, 11,00 \pm 1,15, p<0,001, p<0,001, sırasıyla). Resveratrol ile N-asetil sistein tedavisinin doku hasarını azaltmada etkili olduğu (total hasar skoru ortalaması: (83,85 \pm 0,89 ve 3,85 \pm 0,89 sırasıyla; p<0,001), buna karşın her iki ilaç arasında histopatolojik hasarın azaltılmasında anlamlı bir farklılığın olmadığı görüldü (p=0,966). Torsiyon-detorsiyon grubunda oksidatif stres düzeylerinin daha yüksek olduğu, resveratrol ile N-asetil sistein tedavisinin ise oksidatif stres düzeylerinde belirgin bir azalmaya neden olduğu saptandı. Ayrıca TNF- α düzeylerinin ilaç verilen gruplarda anlamlı ölçüde azaldığı tespit edildi (7,85 \pm 2,08 ve 8,68 \pm 1,88 sırasıyla; p<0,001). Buna karşın TNF- α düzeylerini azaltmada her iki ilacın da eşit etkinlikte olduğu gözlemlendi (8,68 \pm 1,88 ve 7,85 \pm 2,08, sırasıyla; p=0,968).

Sonuç: Resveratrol ve NAC tedavisinin ovarian reperfüzyona bağlı gelişen oksidatif stres ve doku hasarının azaltılmasında etkili olabileceği düşünülmektedir. Her iki ilaç arasında koruyucu etkinlik açısından bir fark bulunmadı.

Anahtar kelimeler: İskemi-reperfüzyon, over, N-asetilsistein, resveratrol

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is evaluating the protective activity of N-acetyl cysteine and resveratrol treatment against ischemia - reperfusion damage created experimentally in rat ovaries.

Methods: 42 female Wistar rats were used in our study. Rats were separated randomly into six groups consisting of seven rats as sham, torsion, torsion- detorsion, torsion- detorsion+saline, torsion-detorsion+resveratrol (20 mg/kg) and torsion- detorsion+N-acetyl cysteine (150 mg/kg). Except Sham, ovarian torsion procedure was implemented to all other groups for 2 hours. Detorsion procedure was implemented to other groups for 2 hours, except the torsion group. Medications were given through intraperitoneal way half an hour before the detorsion procedure in saline (two milliliter), resveratrol (20 mg/kg) and N-acetyl cysteine (150 mg/kg) groups. Then, 2 ml of blood samples were drawn for markers of oxidative stress and tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) work and the ovaries, which were torsioned for the histologic examination, were extracted from all rats. Edema, congestion, hemorrhage, leukocyte infiltration and degeneration of follicles were evaluated by histopathological examination.

Results: According to histopathologic damage scores, the least damage was seen in sham group and the most damage was seen T-DT group (1.00 \pm 0.81 vs. 11.00 \pm 1.15, respectively; p<0.001). It was seen that resveratrol and N-acetyl cysteine treatments were effective in decreasing tissue damage (total damage score average 83.85 \pm 0.89 vs. 3.85 \pm 0.89, respectively; p<0.001), and on the other hand there was not any difference between resveratrol and N-acetyl cysteine treatments (p=0.966). Besides, it was determined that oxidative stress levels were higher in torsion - detorsion group and the resveratrol and N-acetyl cysteine treatment caused a significant decrease in oxidative stress levels. In additionally, the reductions of TNF- α levels were found to be equally effective in both drugs (8.68 \pm 1.88 vs. 7.85 \pm 2.08, p=0.968).

Conclusion: Presented study showed that resveratrol and N-acetyl cysteine treatment can be effective in preventing tissue damage and oxidative stress, which is induced by ischemia-reperfusion that is created in rat ovaries. On the other hand, no difference was found between the resveratrol and N-acetyl cysteine with regards to protective activity.

Key words: ischemia-reperfusion, ovary, N-acetylcysteine, resveratrol

¹ Şanlıurfa SB Kadın Hastalıkları ve Doğumevi Hastanesi, Şanlıurfa, Türkiye

² Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, Şanlıurfa, Türkiye

Yazışma Adresi /Correspondence: Hacer Uyanıkoğlu,

Harran Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, Şanlıurfa, Türkiye Email: huoglu@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received: 03.02.2016, Kabul Tarihi / Accepted: 09.03.2016

Copyright © Dicle Tıp Dergisi 2016, Her hakkı saklıdır / All rights reserved

GİRİŞ

Adneksiyal torsiyon nadir görülmesine rağmen, acil jinekolojik operasyonların 5. sıradaki nedenidir. Sıklıkla üreme çağındaki kadınlarda görülse de; prepubertal ve postmenapozal dönemde de görülebilir [1].

Fertilizasyonu koruyabilmek için erken tanı ve tedavi önemli rol oynamaktadır. Laparaskopi over torsiyonunda kesin tanı ve tedavi yöntemidir [2,3]. Özellikle genç hastalarda ovaryan fonksiyonun korunması gerektiğinden organ koruyucu cerrahi yapılması gerekmektedir. Laparaskopi ile konservatif tedavi olarak over detorsiyone edilebilir. Fakat detorsiyon işleminde iskemik dokuların oksijenlenmesi reaktif oksijen moleküllerinin üretilmesine neden olmaktadır [4,5].

Reperfüzyon hasarı paradoksal olarak doku veya organlara iskemik hasardan daha fazla zarar vermektedir. Bu nedenle iskem-reperfüzyon (İ/R) modeli birçok çalışmada kullanılmış ve reperfüzyon hasarının azaltılması için birçok farmakolojik ajan denenmiştir [6-9]. Resveratrol polifenol ailesinden olup (3,4',5 trihidroksistilben) üzüm tanelerinde bol miktarda bulunan doğal antioksidan bir maddedir [10]. N-asetil sistein (NAC) ise, intrasellüler glutatyon (GSH) prekürsörüdür ve karaciğerde glutatyon S-transferaz aktivitesini belirgin olarak artırır. Bu ajanın mukolitik ve antioksidan etkileri uzun süredir bilinmektedir. Asetaminofen zehirlenmesi sonrası karaciğer hasarının ve radyografik kontrast maddelerin üriner sistem üzerindeki zararlı etkisinin önlenmesi amacıyla uzun süredir kullanılmaktadır [11].

Daha önce yapılmış birçok hayvan çalışmasında adneksiyal torsiyonda ovaryan hasarın (reperfüzyon hasarının) azaltılması için hesperetin, aprotinin, ursodeoxycholic acid, tacrolimus, eritropoietin ve curcumin gibi birçok madde kullanılmıştır [6-9,12,13]. Bu çalışmalarda over hasarının belli oranlarda azaltıldığı öne sürülmüştür.

Bugüne kadar NAC ve resveratrol'ün over İ/R modelinde koruyucu etkisinin olup olmadığını gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çalı-

şmamızın amacı, rat overinde İ/R'na bağlı doku hasarı üzerine NAC ve resveratrol'ün etkisini değerlendirmektir.

YÖNTEMLER

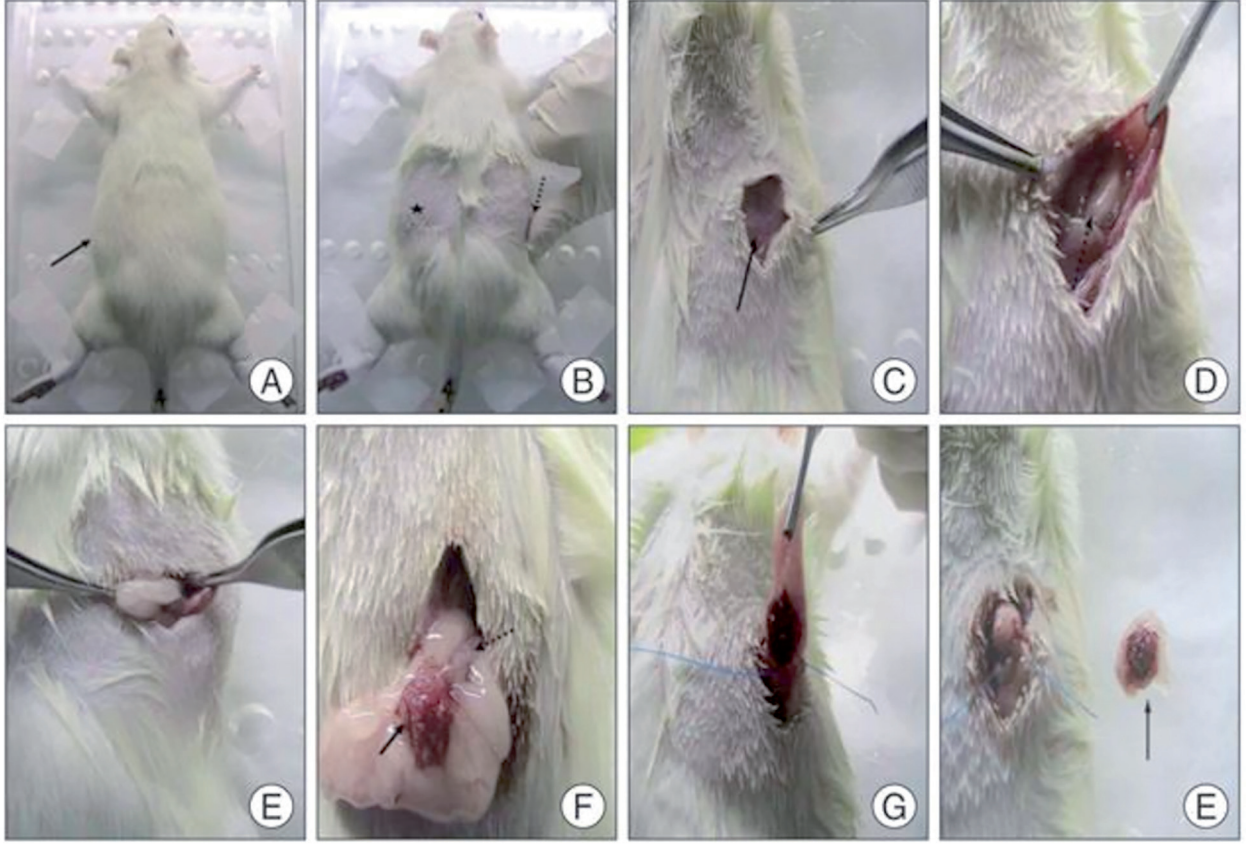
Çalışma protokolümüz Harran Üniversitesi ve Dövllet Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (DOLL-VET - HADYEK) tarafından gözden geçirildi ve onaylandı (30.05.2014 tarih ve sayı no: 2014/28). Ratların bakımı ve uygulanacak olan tüm cerrahi işlemler "Guide for the care and use of laboratory animals"a uygun olarak planlandı.

Ağırlıkları 180-240 gr olan 42 adet dişi Wistar rat Elazığ Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü, Türkiye'den temin edildi. Ratlar deney yapıncaya kadar paslanmaz çelik kafeslere konularak; uygun çevre ısısı (24-25°C), nemli ortam (%55-60) ve kontrollü fotoperiyot (12:12 saat ışık: karanlık)'da standart kemirgen yemi ve su ile beslendi.

Cerrahi girişimler için anestezik ilaç olarak; Ketamin (Ketalar; Parke Davis, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ve Xylazine (Rompun; Bayer AG, Leverkusen Germany) kombine olarak kullanıldı.

Toplam 42 dişi Wistar rat randomize bir şekilde 6 gruba eşit olarak bölündü (n=7). Gruplar aşağıda sıralanan şekilde oluşturuldu; sham (S), torsiyon (T), torsiyon - detorsiyon (T-DT), torsiyon - detorsiyon + salin (T - DT - S), torsiyon - detorsiyon + resveratrol (20 mg/kg) (T-DT-Res) ve torsiyon - detorsiyon + N-asetil sistein (150 mg/kg) (T-DT-NAC). Deneyde kullanılan resveratrol ve NAC dozu ve verilme yöntemi daha önce rat üzerinde yapılan çalışmalardan elde edildi [14]. Oluşturulan gruplar deneyi gerçekleştiren araştırmacılar tarafından kaydedildi. Ancak biyokimyasal ve histopatolojik incelemeyi yapan araştırmacılar çalışmanın sonuna kadar oluşturulan bu gruplardan habersiz idi.

Tüm cerrahi girişimler uygun laboratuvar ortamında ve steril koşullar altında yapıldı. Alt abdominal bölgede yaklaşık 2 cm'lik longitudinal insizyon yapılarak batına girildi (Resim 1). Bu aşamadan sonra tüm gruplara uygulanan cerrahi girişimler aşağıda tariflenen şekilde yapıldı.



Resim 1. Rat overinin ortaya konması

Sham grubu

Nazık bir şekilde sağ uterin horn ve sağ adneks lokalize edildikten sonra abdominal duvar 4 - 0 naylon sütürlerle kapatıldı. İki saat sonra relaparotomi yapılarak sağ over çıkarıldı. Ardından oksidatif stres parametrelerinin çalışılması amacıyla vena kava inferiordan yaklaşık 3 mililitre kan örneği ile uzak organ hasarının gözlenmesi amacıyla böbrek, karaciğer ve akciğerden doku örnekleri alındı. Cerrahi işlem sonrasında tüm ratlar sakrifiye edildi.

Torsiyon grubu

Ovarian torsiyon oluşturmak için sağ tuba ve overyan damarları içeren adneksiyal yapının yaklaşık 1 cm altından damar klempleri konuldu ve insizyon hattı 4 - 0 naylon ile kapatıldı. İki saat sonra relaparotomi yapılarak reperfüzyonun gerçekleştiği overin pembe renk alması ile izlendi. Ratlarda uyguladığımız iki saatlik iske mi ve reperfüzyon süresi daha önce yayınlanmış olan yazılardan esinlenerek uygulanmıştır [15]. Reperfüzyonun gerçekleştiğinden

emin olunmayan denekler çalışma dışı bırakıldı. Çalışma için gerekli olan kan ve doku örnekleri sham grubunda tariflendiği gibi alındı. Cerrahi işlem sonrasında tüm ratlar sakrifiye edildi.

Torsiyon - detorsiyon grubu

İki saatlik ovaryan torsiyonun ardından relaparotomi yapılarak damar klempleri açıldı ve insizyon hattı 4 - 0 naylon sütürlerle kapatıldı. İki saat boyunca reperfüzyona izin verildi. Reperfüzyon fazı sonrasında relaparotomi yapılarak çalışma için gerekli olan kan ve doku örnekleri sham grubunda tariflendiği gibi alındı. Cerrahi işlem sonrasında tüm ratlar sakrifiye edildi.

Torsiyon - detorsiyon - salin grubu

Bir buçuk saatlik ovaryan torsiyonun ardından intraperitoneal yoldan salin verildi. Yarım saat sonra relaparotomi yapılarak damar klempleri açıldı ve insizyon hattı kapatılarak iki saat boyunca reperfüzyona izin verildi. Reperfüzyon fazı sonrasında

relaparatomisi yapılarak çalışma için gerekli olan kan ve doku örnekleri sham grubunda tariflendiği gibi alındı. Cerrahi işlem sonrasında tüm ratlar sakrifiye edildi.

Torsiyon - detorsiyon + resveratrol (20 mg/kg) grubu

Bir buçuk saatlik ovarian torsiyonun ardından resveratrol 20 mg/kg dozunda intraperitoneal yoldan verildi. Yarım saat sonra relaparatomisi yapılarak damar klempleri açıldı ve insizyon hattı kapatılarak iki saat boyunca reperfüzyona izin verildi. Reperfüzyon fazı sonrasında relaparatomisi yapılarak çalışma için gerekli olan kan ve doku örnekleri sham grubunda tariflendiği gibi alındı. Cerrahi işlem sonrasında tüm ratlar sakrifiye edildi.

Torsiyon - detorsiyon + N-asetil sistein (150 mg/kg) grubu

Bir buçuk saatlik ovarian torsiyonun ardından 150 mg/kg dozunda NAC intraperitoneal yoldan verildi. Yarım saat sonra relaparatomisi yapılarak damar klempleri açıldı ve insizyon hattı kapatılarak iki saat boyunca reperfüzyona izin verildi. Reperfüzyon fazı sonrasında relaparatomisi yapılarak çalışma için gerekli olan kan ve doku örnekleri sham grubunda tariflendiği gibi alındı. Cerrahi işlem sonrasında tüm ratlar sakrifiye edildi.

Histopatolojik inceleme

Histopatolojik inceleme için ratlardan çıkarılan ovarian dokular %10'luk tamponlu formalin solusyonu içerisinde 48 saat boyunca fikse edildi. Ardından solusyondan çıkarılan dokular parafin bloklar içerisinde gömüldü. Parafin bloklar 4 µm mikrotomlar kullanılarak kesildi ve hematoxylen and eosin (H&E) ile boyandı. Histolojik kesitleri değerlendirmek için ışık mikroskopu (Olympus® Inc. Tokyo, Japan) kullanıldı ve fotoğrafları çekildi. Doku hasarının varlığını ve şiddetini belirlemek amacıyla en az beş mikroskopik alan incelendi. Histopatolojik değişiklikler ödem, konjesyon, hemoraji, lökosit infiltrasyonu ve follikül dejenerasyonu şeklinde tanımlandı. Hasarın şiddetine göre 0 - 4 arasında skorlama yapıldı. 0; patolojik bulgu yok, 1, 2, 3, 4 ise patolojik bulguların sırasıyla incelenen alanın <%25, %25-50, %50-75 ve >%75 olması şeklinde

belirlendi. Her parametre için elde edilen skorlar toplanarak toplam skor hesaplandı.

Verilerin Değerlendirilmesi ve Analizi

İstatistiksel analiz için SPSS 16.0 software (SPSS for Windows Chicago, IL) programı kullanıldı. Tüm veriler ortalama ve standart sapma olarak sunuldu. Verilerin dağılımını analiz etmek amacıyla Kolmogorov-Smirnov testi uygulandı. Gruplar arasında karşılaştırmalar için Oneway ANOVA, posthoc test olarak Bonferroni kullanıldı. Veriler arasında korelasyon testi olarak Pearson's correlation test kullanıldı. $p < 0,05$ değeri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan grupların; Total Antioksidan Kapasite (TAS), Total Oksidatif Stres (TOS), Oksidatif Stres İndeksi (OSİ), Arilesteraz, Paraoksonaz (PON), Lipit Hidroperoksit (LOOH), Seruloplazmin, Sülfhidril (SH), Tümör nekrotizan faktör alfa (TNF- α) değerleri Tablo 1'de sunuldu.

Gruplara göre oksidatif markerler açısından değerlendirilmesi

TAS açısından yapılan değerlendirmede; gruplar arasında anlamlı bir farklılığın olduğu saptandı ($p < 0,001$). En yüksek TAS düzeyinin NAC grubunda, en düşük TAS düzeyinin ise T-DT grubunda olduğu görüldü. NAC ve Resveratrol grupları arasında yapılan değerlendirmede ise her iki ilacın TAS düzeyini arttırmada eşit etkinlikte olduğu gözlemlendi ($p = 0,988$, Tablo 1).

TOS açısından yapılan değerlendirmede gruplar arasında anlamlı fark saptandı ($p < 0,001$). En yüksek TOS düzeyi T-DT-S grubunda izlenirken, en düşük TOS düzeyi ise sham grubunda izlendi. NAC ve Resveratrol grupları arasında yapılan değerlendirmede TOS düzeyi açısından anlamlı bir fark izlenmedi ($p = 0,995$, Tablo 1).

OSİ açısından yapılan değerlendirmede gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu izlendi ($p < 0,001$). En yüksek OSİ değeri T-DT grubunda izlenirken, en düşük OSİ değeri ise Resveratrol grubunda izlendi. NAC ve Resveratrol grupları arasında anlamlı bir farklılık izlenmedi ($p = 0,965$, Tablo 1).

Tablo 1. Çalışma gruplarının biyokimyasal sonuçlar

| | Sham | T | T-DT | T-DT-S | T-DT-NAC | T-DT-Res | p |
|---------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|--------|
| TAS | 1,03±0,09 | 0,91±0,13 | 0,86±0,04 | 0,89±0,05 | 1,25±0,14 | 1,22±0,11 | <0,001 |
| TOS | 56,41±3,17 | 53,42±7,51 | 84,28±11,05 | 85,83±9,59 | 61,94±11,80 | 59,46±8,83 | <0,001 |
| OSI | 5,50±0,33 | 6,28±1,68 | 8,75±0,59 | 8,44±1,16 | 4,82±0,90 | 4,80±0,59 | <0,001 |
| Arilesteraz | 113,1±13,3 | 122,6±19,5 | 130,6±8,7 | 111,3±16,6 | 129,8±29,8 | 115,1±20,3 | 0,259 |
| LOOH | 34,80±7,65 | 25,29±11,14 | 16,72±1,71 | 39,49±10,19 | 28,30±4,88 | 33,56±7,07 | <0,001 |
| PON | 99,6±23,6 | 151,0±32,6 | 158,3±32,7 | 122,8±28,5 | 120,6±27,3 | 116,4±25,4 | 0,005 |
| Seruloplazmin | 744,2±35,6 | 685,9±47,8 | 707,5±62,4 | 691,6±38,8 | 695,3±40,4 | 704,1±22,4 | 0,172 |
| SH | 0,34±0,09 | 0,32±0,09 | 0,25±0,02 | 0,37±0,08 | 0,34±0,06 | 0,40±0,06 | 0,017 |
| TNF-α | 8,08±1,87 | 9,68±3,18 | 19,14±4,64 | 18,27±4,85 | 8,68±1,88 | 7,85±2,08 | <0,001 |

T: Torsiyon, T-DT: Torsiyon - detorsiyon, T-DT-S: Torsiyon - detorsiyon + salin, T-DT-Res: Torsiyon - detorsiyon + resveratrol, T-DT-NAC: Torsiyon - detorsiyon + N-asetil sistein

TAS: Total Antioksidan Kapasite, TOS: Total Oksidatif Stres, OSI: Oksidatif Stres İndeksi, PON: Paraoksonaz, LOOH: Lipit Hidroperoksit, SH: Sülfhidril, TNF-α: Tümör nekrotizan faktör alfa

TNF-α açısından yapılan değerlendirmede gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p<0,001$). En yüksek TNF-α değeri T-DT grubunda izlendi, en düşük TNF-α değeri ise Resveratrol grubunda izlendi. NAC ve Resveratrol grupları arasında TNF-α değeri açısından anlamlı bir farklılık görülmedi ($p=0,968$, tablo 1).

Histopatolojik hasar açısından gruplar değerlendirildiğinde

Histopatolojik hasar açısından kullanılan konjesyon, hemoraji, lökosit infiltrasyonu ve ödem parametreleri açısından yapılan değerlendirmede; gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edildi ($p<0,001$). Yine follikül dejenerasyonu açısından yapılan histopatolojik değerlendirmede de; gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edildi ($p=0,031$). Gruplara göre histopatolojik hasarın dağılımı Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Gruplara göre histopatolojik hasarın dağılımı

| | Sham | T | T-DT | T-DT-S | T-DT-NAC | T-DT-Res | p |
|------------------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-------|
| Konjesyon | 0,28±0,48 | 1,85±0,37 | 2,85±0,37 | 2,57±0,53 | 1,57±0,53 | 1,28±0,48 | 0,001 |
| Hemoraji | 0,28±0,48 | 2,14±0,37 | 3,00±0,00 | 2,85±0,37 | 1,14±0,37 | 1,76±1,05 | 0,001 |
| Lökosit infiltrasyonu | 0,28±0,48 | 0,42±0,53 | 1,57±0,53 | 1,42±0,78 | 0,42±0,53 | 0,42±0,53 | 0,001 |
| Follikül dejenerasyonu | 0,00±0,00 | 0,28±0,48 | 0,85±0,37 | 0,71±0,75 | 0,14±0,37 | 0,57±0,78 | 0,031 |
| İnterstisyel ödem | 0,14±0,37 | 2,00±0,57 | 2,71±0,48 | 2,14±0,37 | 0,71±0,75 | 0,57±0,53 | 0,001 |
| Total skor | 1,00±0,81 | 6,71±1,38 | 11,00±1,15 | 9,71±1,25 | 3,85±0,89 | 3,85±0,89 | 0,001 |

T: Torsiyon, T-DT: Torsiyon - detorsiyon, T-DT-S: Torsiyon - detorsiyon + salin, T-DT-Res: Torsiyon - detorsiyon + resveratrol, T-DT-NAC: Torsiyon - detorsiyon + N-asetil sistein

En az konjesyon ve hemoraji hasarının sham grubunda (her iki hasar için de $0,28±0,48$), buna karşın en yüksek konjesyon ve hemoraji hasar skorunun ise T-DT grubunda (her iki hasar için $2,85±0,37$) olduğu görüldü. T-DT grubu ile NAC ve resveratrol grupları arasında yapılan değerlendirmede ise; ilaç kullanılan gruplarda konjesyon hasarının istatistiksel açıdan önemli oranda azaldığı saptandı ($p<0,001$

ve $p<0,001$; Tablo 2). NAC ve resveratrol grupları arasında yapılan değerlendirmede ise her iki ilacın konjesyon hasarını azaltmada eşit etkinlikte olduğu görüldü (Tablo 2, $p=0,978$).

T-DT grubu ile NAC ve Resveratrol grupları arasında yapılan değerlendirmede ise; ilaç kullanılan gruplarda hemoraji hasarının istatistiksel açıdan önemli oranda azaldığı saptandı ($p<0,001$, $p<0,001$,

Tablo 2). NAC ve Resveratrol grupları arasında yapılan değerlendirmede ise her iki ilacın hemoraji hasarını azaltmada eşit etkinlikte olduğu görüldü (Tablo 2, $p=0,998$).

Lökosit infiltrasyonu açısından yapılan histopatolojik değerlendirmede; gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0,001$). En az lökosit infiltrasyonu hasarı sham grubunda ($0,28\pm0,48$), buna karşın en yüksek hasar skorunun ise T-DT grubunda ($1,57\pm0,53$) olduğu görüldü. T-DT grubu ile NAC ve Resveratrol grupları arasında yapılan değerlendirmede ise; ilaç kullanılan gruplarda lökosit infiltrasyonu hasarının istatistiksel açıdan önemli oranda azaldığı saptandı ($p=0,01$, $p=0,011$, tablo 2). NAC ve Resveratrol grupları arasında yapılan değerlendirmede ise her iki ilacın lökosit infiltrasyonu hasarını azaltmada eşit etkinlikte olduğu görüldü (tablo 2, $p=0,998$).

Follikül dejenerasyonu açısından yapılan histopatolojik değerlendirmede; gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edildi ($p=0,031$). En az follikül dejenerasyonu hasarı sham grubunda ($0,00\pm0,00$), buna karşın en yüksek hasar skorunun ise T-DT grubunda ($0,87\pm0,37$) olduğu görüldü. T-DT grubu dışında geriye kalan tüm gruplarda follikül dejenerasyonun eşit olarak oluştuğu görüldü

Ödem açısından yapılan histopatolojik değerlendirmede; gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edildi ($p<0,001$). En az ödem hasarının sham grubunda ($0,14\pm0,37$), buna karşın en yüksek hasar skorunun ise T-DT grubunda ($2,71\pm0,48$) olduğu görüldü. T-DT grubu ile NAC ve Resveratrol grupları arasında yapılan değerlendirmede ise; ilaç kullanılan gruplarda ödem hasarının istatistiksel açıdan önemli oranda azaldığı saptandı ($p<0,001$ ve $p<0,001$, Tablo 2). NAC ve Resveratrol grupları arasında yapılan değerlendirmede ise her iki ilacın ödem hasarını azaltmada eşit etkinlikte olduğu görüldü (Tablo 2, $p=0,978$).

TARTIŞMA

Bu deneysel çalışmamızda; ovaryan torsiyon-detorsiyon uygulanan rat modelinde resveratrol ile NAC tedavisinin etkinliğini araştırmayı amaçladık. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar İ/R hasarına bağlı gelişen hem biyokimyasal hem de histopatolojik ha-

sarın azaltılmasında resveratrol ile NAC tedavisinin etkili olabileceğini göstermektedir.

Ovaryan vasküler pedikülün kendi ekseninde torsiyonu arteriyel kan akımının azalması ile venöz ve lenfatik drenajın obstrüksiyonu ile sonuçlanır [16]. Ovaryan iskemisi olarak tanımlanan bu durum over boyutunda artış, hemoraji ve venöz konjesyon ile karakterizedir [7]. Torsiyona bağlı olarak kan akımının azalması ovaryan dokuda laktik asit, hipoksantin ve lipid peroksit düzeyinde artışa neden olur [7,17]. Tedavi olarak fertilitenin korunması arzu edilen hastalarda nekrotik görünümde ovaryan doku görünse dahi detorsiyon prosedürü uygulanmalıdır [18]. Ancak detorsiyon prosedürü sonrasında ovaryan dokuda nötrofil infiltrasyonu - aktivasyonu, nitrik oksit, TNF- α gibi sitokinler ve serbest oksijen radikallerinin üretiminde artış oluşur [17,19,20]. Oksidatif denge serbest oksijen radikallerinin üretimi ve eliminasyonu arasındaki uygunluk, oksidatif stres ise serbest oksijen radikallerinin üretimi ile inaktivasyonunda görevli antioksidanların üretimi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanır [21]. Ovaryan detorsiyon uygulanan olgularda reperfüzyona sekonder olarak dokudaki oksijen konsantrasyonu artar. Artan oksijen iskemik dokudaki hypoksantin ve ksantin oksidaz ile tepkimeye girer. Sonuçta doku hasarına yol açan serbest oksijen radikallerinin oluşumu tetiklenir. Artmış serbest oksijen radikallerinin üretimi; hücre membranı ve mitokondrial lipidlerin peroksidasyonuna yol açarak iskemik dokudaki hasarın daha da artmasına neden olur [22]. İ/R hasarı olarak adlandırılan bu durum iskemiden daha fazla doku hasarının oluşumuna neden olur [19]. Dolayısıyla İ/R hasarından korunmak amacıyla reperfüzyon sırasında veya öncesinde antioksidan farmakolojik ajanların kullanımının yararlı olabileceği ileri sürülmektedir [20].

NAC, 1960'lı yıllardan bu yana, akciğer hastalıklarında mukolitik bir ajan ve asetaminofen hepatoksisitesinde bir antidot olarak kullanılan, tiyol türevi bir aminoasittir [22]. Son yıllarda, insanlarda ve deneysel hayvan çalışmalarında bir antioksidan olarak kullanımı, giderek yaygınlaşmaktadır [17,23]. Sun ve arkadaşları NAC ve indometazin intestinal reperfüzyon modeline olan etkilerini gösteren çalışmalarında NAC'ın endotelial ve epitelial bariyer bütünlüğünü sağladığını göstermişlerdir.

Ayrıca NAC kullanımının proteaz inhibitörlerini ve retiküloendotelial sistem aktivasyonunu azalttığını göstermişlerdir. Yine NAC'ın reperfüzyon zedelenmesini engellemede efektif olduğunu belirlemişlerdir [24]. Çay ve arkadaşları testiküler torsiyon nedeniyle gelişen İ/R hasar üzerine yaptıkları çalışmada NAC etkili bulunmuştur [25]. Karaciğer İ/R hasar üzerine yapılan başka bir çalışmada NAC'ın dokuda trombosit agregasyonu azaltıp, cAMP düzeylerini artırarak İ/R hasarını azalttığı gösterilmiştir [26]. Demir ve arkadaşları İ/R hasarında karaciğerde lipid peroksit düzeylerinin arttığını ve NAC uygulamasının doku lipid peroksit seviyelerinde azalmaya yol açtığını öne sürmüşlerdir [27]. Bizim çalışmamızda da NAC kullanımı ile oksidatif stres markerlerinin belirgin oranda azaldığı gözlenmiştir.

Resveratrol'ün doğal antioksidan rolü üç farklı antioksidan mekanizma ile açıklanmaktadır. Bunlar, koenzim Q ile yarışmak ve SOR oluşum yerinde oksidatif zincir kompleksini azaltmak, mitokondride oluşan O_2^- radikalini yakalamak ve lipid peroksidasyonunu inhibe etmektir. Birçok çalışmada resveratrol'ün hem O_2^- hem de OH^- radikalini yakalama yeteneğinin olduğu gösterilmiştir. Resveratrol in vitro koşullarda SOR'un zayıf yakalayıcısı olmasına rağmen in vivo olarak güçlü bir antioksidan işlevini görür [14]. Hoch ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada İ/R uygulanan köpek ekstremitelelerinde mannitol ve SOD enziminin nöromusküler koruyucu etkinliği olduğunu saptamışlardır [28]. Bhalodia ve arkadaşları renal arter oklüzyonu ile gerçekleştirdikleri İ/R deneysel çalışmasında İ/R gurubunda MDA, BUN ve kreatinin seviyesinin yükseldiğini, SOD, katalaz ve GSHpx enzim aktivitelerinin azaldığını belirtmişlerdir [29]. Yuan ve arkadaşları hepatik İ/R hasarını araştırdıkları deneysel çalışmalarda İ/R gurubunda MDA düzeylerinin yükseldiğini, SOD, katalaz ve GSHpx enzim aktivitelerinin azaldığını gösterdiler [30]. Diğer bir değerlendirme enzimi olan eritrositlerde ve diğer dokularda, prostetik grup olarak selenyum içeren GSHpx enzimi, indirgenmiş glutatyon tarafından H_2O_2 ve lipid peroksitlerinin parçalanmasını katalize eder; böylece membran lipidlerini ve hemoglobini, peroksidlerin oksidasyonuna karşı korur. Gedik ve arkadaşlarının hepatik İ/R hasarına resveratrol'ün etkisini araştırdıkları deneysel çalışmalarda İ/R gurubunda MDA düzeylerinin yükseldiğini, SOD, katalaz ve GSHpx

enzim aktivitelerinin azaldığını gösterdiler. Resveratrol verilen gurupda değerlerin kontrol gurubuyla benzer olduğunu belirterek resveratrol'ün hepatik İ/R hasarında yararlı olduğunu göstermişlerdir [14].

Literatürde resveratrol dozu $10^{(-6)}$ mg/kg ile 20 mg/kg arasında değişmektedir [14]. Huang ve arkadaşlarının serebral iskemide resveratrolün etkinliğini araştırdıkları çalışmada resveratrolü farklı dozlarda uygulamışlar ve en etkili dozun o çalışmada kullanılan en yüksek dozlar olan $10^{(-8)}$ ve $10^{(-9)}$ mg/kg olduğunu saptamışlardır [31]. Hassan-Khabbar ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada karaciğer İ/R hasarında resveratrol 0,02, 0,2, 2 ve 20 mg/kg olmak üzere 4 farklı dozda uygulanmıştır. Düşük dozda resveratrol uygulamasının doku koruyucu olduğu saptanırken, 20 mg/kg dozda resveratrol uygulamasının karaciğerdeki hasarı arttırdığı ve yüksek dozda resveratrol'ün bir prooksidan madde gibi davrandığı saptanmıştır [32]. Gedik ve arkadaşlarının yaptığı bir karaciğer İ/R hasarı çalışmasında resveratrol 10 mg/kg dozda uygulanmış ve bu dozda resveratrol'ün doku koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır [14]. Biz çalışmamızda 20 mg/kg dozda resveratrol kullandık ve bu dozda resveratrolün doku hasarını anlamlı oranda azalttığını bulduk (Tablo 2). Resveratrol ve NAC kullanımının doku hasarını azaltmada eşit etkinlikte oldukları tespit edildi.

Çalışmamızda İ/R bağlı gelişen ovaryan histopatolojik hasarı tespit etmek amacıyla Kara ve arkadaşlarının 2012 yılında tanımladıkları skorlama sistemi kullanıldı [19]. Beklenildiği gibi sham grubunda histopatolojik hasar tespit edilmedi. En yüksek doku hasar skoru T-DT yapılan grupta izlenirken, resveratrol ile NAC tedavilerinin ise doku hasar skorunu azaltmada eşit etkinlikte olduğu görüldü. Yine NAC ve resveratrol kullanılan gruplarda antioksidan parametrelerin yüksek, oksidatif parametrelerin ise düşük olduğu izlendi (Tablo 1). Bulgularımız literatür ile uyumlu idi.

Sonuç olarak bu çalışma; resveratrol ve NAC tedavisinin ovaryan reperfüzyona bağlı gelişen doku ve biyokimyasal hasarın azaltılmasında etkili olabileceğini düşündürmektedir. Resveratrol ve NAC gibi antioksidan ve anti-inflamatuvar farmakolojik ajanların ovaryan detorsiyon uygulanan olgularda kullanımı doku hasarının azaltılmasında yararlı olabilir.

Çıkar Çatışması Beyanı: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma her hangi 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

- Hibbard LT. Adnexal torsion. *Am J Obstet Gynecol* 1985;152:456-461.
- Mage G, Canis M, Mahnes H, et al. Laparoscopic management of adnexal torsion. A review of 35 cases. *J Reprod Med* 1989;34:520-524.
- Porpora MG, Gomel V. The role of laparoscopy in the management of pelvic pain in women of reproductive age. *Fertil Steril* 1997;68:765-779.
- Meyer JS, Harmon CM, Hartly MP, et al. Ovarian torsion: Clinical and imaging presentation in children. *J Pediatr Surg* 1995;30:1433-1436.
- Celik O, Turkoz Y, Hascalik S, et al. The protective effect of caffeic acid phenethyl ester on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;117:183-188.
- Cakir Gungor AN, Gencer M, Karaca T, et al. The effect of hesperetin on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *Arch Gynecol Obstet* 2014;290:763-769.
- Sahin FK, Cosar E, Koken G, et al. Protective effect of aprotinin on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *J Obstet Gynaecol Res* 2008;34:794-800.
- Ustundag UV, Sahin S, Ak K, et al. The effects of tacrolimus on the activity and expression of tissue factor in the rat ovary with ischemia-reperfusion induced injury. *Reprod Biol* 2015;15:139-145.
- Akdemir A, Sahin C, Erbas O, et al. Is ursodeoxycholic acid crucial for ischemia / reperfusion-induced ovarian injury in rat ovary? *Arch Gynecol Obstet* 2015;292:445-450.
- Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J Clin Lab Anal* 1997;11:287-313.
- Cotgreave IA. N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. *Adv Pharmacol* 1997;38:205-227.
- Ergun Y, Koc A, Dolapcioglu K, et al. The protective effect of erythropoietin and dimethylsulfoxide on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010;152:186-190.
- Eser A, Hizli D, Haltas H, et al. Effects of curcumin on ovarian ischemia- reperfusion injury in a rat model. *Biomed Rep* 2015;3:807-813.
- Gedik E, Girgin S, Ozturk H, et al. Resveratrol attenuates oxidative stress and histological alterations induced by liver ischemia/reperfusion in rats. *World J Gastroenterol* 2008;14:7101-7106.
- Incebiyik A, Seker A, Camuzcuoglu H, et al. Does sildenafil have protective effects against ovarian ischemia-reperfusion injury in rats? *Arch Gynecol Obstet* 2015;291:1283-1288.
- Abali R, Tasdemir N, Yuksel MA, et al. Protective effect of infliximab on ischemia/reperfusion injury in a rat ovary model: biochemical and histopathologic evaluation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013;171:353-357.
- Buyukhatipoglu H, Kirhan I, Vural M, et al. Oxidative stress increased in healthcare workers working 24-hour on-call shifts. *Am J Med Sci* 2010;340:462-467.
- Sayyah-Melli M, Rashidi MR, Kaseb-Ganeh M, et al. The effect of erythropoietin against oxidative damage associated with reperfusion following ovarian detorsion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012;162:182-186.
- Kara M, Daglioglu YK, Kuyucu Y, et al. The effect of edaravone on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012;162:197-202.
- Maretta M, Bujdos M, Toth S Jr, et al. Alterations of epithelial layer after ischemic preconditioning of small intestine in rats. *J Mol Histol* 2012;43:171-178.
- Bozkurt S, Arıkan 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; 47:1735-1741.
- Yılmaz H, Sahin S, Sayar N, et al. Effects of folic acid and N-acetylcysteine on plasma homocysteine levels and endothelial function in patients with coronary artery disease. *Acta Cardiol* 2007;62:579-585.
- Millea PJ. N-Acetylcysteine: Multiple clinical applications. *Am Fam Physician* 2009;80:265-269.
- Sun Z, Lasson A, Olanders K, et al. Gut barrier permeability, reticuloendothelial system function and protease inhibitor levels following intestinal ischaemia and reperfusion effects of pretreatment with N-acetyl-L-cysteine and indomethacin. *Dig Liver Dis* 2002;34:560-569.
- Cay A, Alver A, Kucuk M, et al. the effects of N-aceylcysteine on antioxidant enzyme activities in experimental testicular torsion. *J Surg Res* 2006;131:199-203.
- Smyrniotis V, Arkadopoulos N, Kostapanaqioutou G, et al. Attenuation of ischemic injury by N-acetylcysteine preconditioning of the liver. *J Surg Res* 2005;129:31-37.
- Demir S, Inal-Erden M. Pentoxifylline and N-acetylcysteine in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Clin Chim Acta* 1998;275:127-135.
- Hoch JR, Stevens RP, Keller MP, et al. Recovery of neuromuscular function during reperfusion of the ischemic extremity: effect of mannitol and superoxide dismutase. *Surgery* 1991;110:656-662.
- Bhalodia Y, Kanzariya N, Patel R, et al. Renoprotective activity of benincasa cerifera fruit extract on ischemia/reperfusion-induced renal damage in rat. *Iran J Kidney Dis* 2009;3:80-85.
- Yuan GJ, Ma JC, Gong ZJ, et al. Modulation of liver oxidant-antioxidant system by ischemic preconditioning during ischemia/reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol* 2005;11:1825-1828.
- Huang SS, Tsai MC, Chih CL, et al. Resveratrol reduction of infarct size in Long-Evans rats subjected to focal cerebral ischemia. *Life Sci* 2001;69:1057-1065.
- Hassan-Khabbar S, Cottart CH, Wendum D, et al. Postischemic treatment by trans-resveratrol in rat liver ischemia-reperfusion: a possible strategy in liver surgery. *Liver Transpl* 2008;14:451-459.