

T.C.
ADİYAMAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKSORUBİSİN VERİLEREK OVERTOKSİSİTESİ OLUŞTURULAN
SIÇANLARDA HİDROKSİTİROSOLÜN KORUYUCU ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NIHAN GÜNEŞ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. ELİF ONAT

ADİYAMAN, 2025

Bu tez çalışması BAP Komisyonu tarafından kabul edilen TIPFYL/2024-0003 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir (Tez Çalışması Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir).

ÖZET

DOKSORUBİSİN VERİLEREK OVER TOKSİSİTESİ OLUŞTURULAN SIÇANLARDA HİDROKSİTİROSOLÜN KORUYUCU ETKİSİ

Nihan GÜNEŞ

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Adıyaman Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Haziran/2025, Sayfa:68

Danışman: Doç. Dr. Elif ONAT

Doksorubisin (Dox) genellikle doğurganlık çağında görülen meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan ve ayrıca over toksisitesine neden olan kemoterapötik bir ajandır. Bu çalışmada Hidroksitirosol'ün (HT) over toksisitesi üzerine olası etkileri araştırıldı. Çalışmada 8-10 haftalık, Sprague Dawley cinsi, 200-250 gr ağırlığında 28 adet dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar dört gruba ayrıldı: 1. Kontrol grubu, 2. Dox grubu, 3. HT grubu ve 4. Dox+HT grubu. 1.Kontrol grubu, 4 hafta boyunca oral yoldan 1 ml serum fizyolojik verildi ; 2.Dox grubu, deneyin 1. günü tek doz şeklinde 10 mg/kg/gün dozunda Dox intraperitoneal yolla uygulandı; 3.HT grubu, HT 4 hafta boyunca 4 ml/kg/gün oral yoldan verildi; ve 4.Dox+HT grubu, deneyin 1. günü tek doz şeklinde 10 mg/kg/gün dozunda Dox ip. yolla uygulandı. Uygulama sonrasında HT 4 hafta boyunca 4 ml/kg/gün oral yoldan verildi. 28 günlük deney süresinin sonunda ovaryumlar alındı, sonrasında histopatolojik ve immunohistokimyasal analizler yapıldı. Elde edilen tüm veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. Histokimyasal analizlere göre Dox'un over dokusunun medullasında ve ayrıca foliküllerde bazı dejeneratif değişikliklere neden olduğu belirlendi. Ayrıca dokudaki kistik folikül sayısını da göreceli olarak arttırdığı izlendi. Dox uygulaması ile birlikte primordiyal, sekonder, graaf foliküllerinin kontrol ve diğer gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı ve atretik folikül sayısının arttığı tespit edildi. Dox+HT grubu uygulamasının ise yalnız Dox uygulanan gruba göre sadece atretik foliküllerde istatistiksel olarak anlamlı azalmaya neden olduğu belirlendi. Bu bilgiler doğrultusunda Dox'un neden olduğu over toksisitesinde HT'nin olumlu yönde etkisi olan bir madde olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Overtoksisite; HT; Dox; TRPC1.

ABSTRACT

PROTECTIVE EFFECT OF HYDROXYTYROSOL IN RATS WITH OVARIAN TOXICITY CAUSED BY DOXORUBICIN

Nihan GÜNEŞ

Department of Medical Pharmacology

Adiyaman University, Graduate Education Institute, June/2025, Page:68

Supervisor: Assoc.Prof. Dr. Elif ONAT

Doxorubicin (Dox) is a chemotherapeutic agent widely used in the treatment of breast cancer, which is commonly observed in women of reproductive age, and is also known to cause ovarian toxicity. In this study, the potential effects of Hydroxytyrosol (HT) on ovarian toxicity were investigated. Twenty-eight female Sprague Dawley rats, aged 8–10 weeks and weighing 200–250 g, were used. The rats were divided into four groups: 1. Control group, 2. Dox group, 3. HT group, and 4. Dox+HT group. The Control group received 1 ml of physiological saline orally for 4 weeks; the Dox group was administered a single intraperitoneal dose of Dox at 10 mg/kg on the first day of the experiment; the HT group received HT orally at 4 ml/kg/day for 4 weeks; and the Dox+HT group received a single intraperitoneal dose of Dox at 10 mg/kg on the first day, followed by oral administration of HT at 4 ml/kg/day for 4 weeks. At the end of the 28-day experimental period, the ovaries were excised, and histopathological and immunohistochemical analyses were performed. All obtained data were statistically evaluated. Histochemical analyses revealed that Dox induced degenerative changes in the medulla and follicles of the ovarian tissue. In addition, it relatively increased the number of cystic follicles. Dox administration significantly reduced the numbers of primordial, secondary, and Graafian follicles compared with the control and other groups, while the number of atretic follicles was increased. In the Dox+HT group, only the number of atretic follicles showed a statistically significant reduction compared with the Dox group. Based on these findings, it was concluded that HT is a substance with a beneficial effect on Dox-induced ovarian toxicity.

Keywords: Overtotoxicity; Hydroxytyrosol; Doxorubicin; TRPC1.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim süresi boyunca bilgisi, desteği, hoşgörüsü ve deneyimleriyle benim her zaman yanımda olan, tezimin hazırlanmasında büyük desteğini gördüğüm çok değerli ve sevgili danışman hocam Doç. Dr. Elif ONAT'a, yüksek lisans eğitimime başlamama vesile olan ve bu süreçte desteğini her zaman hissettiğim Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Mehmet Kaya ÖZER'e, eğitim öğretim hayatım süresince desteklerini her zaman hissettiren kıymetli canım aileme ve arkadaşlarıma destekleri ve her zaman her koşulda yanımda oldukları için teşekkür ederim.



ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Adıyaman Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

.....
(İmza)

(Öğrencinin Adı ve SOYADI)

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLOLAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Ovaryum (Yumurtalık) Nedir?.....	3
2.2. Yumurta Üretimi Sürecindeki Yapılar	3
2.3. Ovaryumun Hormonal Fonksiyonları.....	4
2.3.1. Ovaryumda hormon üretim süreci.....	4
2.3.2. Ovaryum hormonlarının üretimi adet döngüsünün farklı fazları.....	5
2. 4. Ovaryumun Yapısı.....	8
2.4.1. Korteks.....	8
2.4.2. Bağ dokusu ve hücrel yapılar.....	10
2.4.3. Medulla.....	10
2.4.4. Medullanın işlevleri.....	10
2.5. Ovaryumun Histolojik Yapısı.....	11
2.6. Ovaryumun Hücrel Yapısı.....	11
2.7. Ovaryumun Damar ve Sinir Yapıları.....	12
2.8. Ovaryum Hastalıkları.....	13
2.8.1. Polikistik over sendromu (PCOS).....	14
2.8.2. Over kistleri.....	14
2.8.3. Over kanseri.....	15
2.8.4. Over torsiyonu (ovaryum dönmesi).....	15
2.8.5. Endometriozis.....	15
2.8.6. Prematür over yetmezliği.....	15
2.9. Overtoksisite.....	16

2.10. Doksorubisin.....	17
2.10.1.Doksorubisin metabolizması.....	18
2.10.2. Doksorubisin etki mekanizması.....	19
2.11. Hidroksitirozol.....	20
2.12. TRPC1 Testi.....	25
2.13.Histopatolojik Çalışma Yöntemleri.....	26
2.13.1. Hematoksilen-eozin.....	26
2.13.2. Masson trikrom.....	28
2.14. İmmünohistokimyasal Yöntem.....	29
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	32
3.1. Deney Hayvanları.....	32
3.2. Deney Planı	32
3.3. Deneyin Sonlandırılması.....	32
3.4. Histolojik İnceleme.....	32
3.4.1. Hematoksilen - eozin boyama (H&E) prosedürü	33
3.4.2. Masson Trikrom boyama prosedürü.....	33
3.4.3. İmmünohistokimyasal inceleme	34
3.5. İstatistiksel Analiz.....	35
3.6. Kullanılan Kimyasallar	35
4.BULGULAR.....	36
4.1. Histopatolojik Bulgular	36
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular	46
5. TARTIŞMA.....	53
6. SONUÇ	60
KAYNAKÇA	
ÖZ GEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Korteks ve medula arasında farklar.....	10
Tablo 2.2. Farklı ürünlerin içeriğinde bulunan hidroksitirozol miktarları.....	22
Tablo 2.3. Zeytinyağında bulunan hidroksitirozolün biyoaktiviteleri.....	24
Tablo 4.1. Over dokusunda histopatolojik bulgular (hematoxylin and eosin).....	36
Tablo 4.2. Over dokusunda TRPC1 için immünohistokimyasal bulgular.....	47



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Farklı matürasyon evrelerindeki folikü yapıları.....	9
Şekil 2.2. Ovaryumun genel görünümü (eroschenko, 2012)	11
Şekil 2.3. DOX'un kimyasal yapısı	17
Şekil 2.4. Doksorubusin (DOX) metabolizması.....	18
Şekil 2.5. Doksorubusin metabolik aktivasyonundaki serbest reaksiyonları.....	19
Şekil 2.6. Oleuropeinden hidroksitirozol elde edilmesi.....	21
Şekil 2.7. Hidroksitirozol'un kimyasal yapısı.....	22
Şekil 2.8.Oleuropeinden hidroksitirozol ve elenoik asit oluşum mekanizması.....	23
Şekil 4.1.Over dokusunda histopatolojik bulgular (hematoksilen ve eosin).....	37
Şekil 4.2.Kontrol grubu ovaryum dokusuna ait kesitlerde folikül ve epitel kesitleri (H&Ex50).....	38
Şekil 4.3.HT grubu ovaryum dokusuna ait kesitlerde folikül ve korpus luteum Kesitleri (H&Ex50).....	39
Şekil 4.4.DOX grubu ovaryum dokusuna ait kesitlerde folikül ve korpus luteum Kesitleri (H&Ex50).....	40
Şekil 4.5. DOX grubu ovaryum dokusuna ait kesitlerde folikül ve korpus luteum Kesitleri (H&Ex50).....	41
Şekil 4.6. DOX+HT grubu ovaryum dokusuna ait kesitlerde folikül ve korpus luteum kesitleri(H&Ex50).....	42
Şekil 4.7. Kontrol grubu ovaryum dokusuna ait kesitlerde folikül ve korpus luteum Kesitleri (MTx50).....	43
Şekil 4.8. HT grubu ovaryum dokusuna ait kesitlerde folikül ve korpus luteum kesitleri (MTx50).....	44
Şekil 4.9. DOX grubu ovaryum dokusuna ait kesitlerde folikül ve korpus luteum kesitleri (MTx50).....	45
Şekil 4.10. DOX+HT grubu ovaryum dokusuna ait kesitlerde folikül ve korpus luteum kesitleri(MTx50).....	46
Şekil 4.11. Over dokusunda TRPC1 için immünohistokimyasal bulgular.....	47
Şekil 4.12. Kontrol grubu ovaryum dokusuna ait folikül ve korpus luteum kesitleri(TRPC1x50).....	48

Şekil 4.13. HT grubu ovaryum dokusuna ait kesitlerde folikül ve korpus luteum kesitleri(TRPC1x50).....	49
Şekil 4.14. DOX grubu ovaryum dokusuna ait folikül ve korpus luteum kesitleri(TRPC1x50).....	50
Şekil 4.15. DOX grubu ovaryum dokusuna ait folikül ve korpus luteum Kesitleri (TRPC1x50).....	51
Şekil 4.16. DOX+HT grubu ovaryum dokusuna ait folikül ve korpus luteum kesitleri (TRPC1x50).....	52



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Alfa
β	: Beta
AL	: Alperujo
BPA	: Bisfenol Alfa
Ca²⁺	: Kalsiyum
DHPG	: 3,4-Dihidroksifenilglolikol
DPPH	: 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil radikali
Dox	: Doksorubisin
E2	: Estradiol
E3	: Estriol
ERα	: Östrojen Reseptörü Alfa
ERβ	: Östrojen Reseptörü Beta
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
GnRH	: Gonadatropin Salgılatıcı Hormon
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
H&E	: Hematoksilen-Eosin
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
Hg	: Cıva
HT	: Hidroksitirozol
IHK	: İmmunohistokimya
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LH	: Litüenize Hormon

LPO	: Lipit Peroksidasyonu
MAO	: Monoamin Oksidaz
MT	: Masson Trıkrom
MWCNT	: Karbon Nanotüpler
NF	: Nükleer Faktör
OleA	: Oleuropein
μM	: Mikron
PBMC	: Periferik Kan Mononükleer Hücre
PCOS	: Polikistik Over Sendromu
PNML	: Polimorfonükleer Lökosit İnfiltrasyonu
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOCE	: Depoya bağlı Kalsiyum Giriş Mekanizması
SOD	: Süperoksit Dizmutaz
STIM1	: Stromal Etkileşim Molekülü 1
TCDD	: 2,3,7,8-Tetraklordibenzodioksin
TRPC	: Geçici Potansiyel Reseptör
TRPC1	: Geçici Reseptör Potansiyel Kanalı
TY	: Tirozol
VE	: Verbaskozit
VOO	: Saf Zeytinyağı
ZEA	: Zaeralenon



1. GİRİŞ

Çevresel kimyasallar ve ilaçlar, hem hayvanlarda hem de insanlarda üreme toksisitesine yol açabilir [1]. Bu toksik etkiler, yumurtalıkları doğrudan etkileyebileceği gibi, hipotalamus ve hipofiz bezi gibi organlarda da görülebilir [2]. Özellikle kemoterapi, DNA çift iplikçik kırılmaları ve apoptoza bağlı foliküllerin tükenmesiyle over toksisitesine neden olabilir. Kemoterapi uygulanan kadınlarda primordial foliküllerin büyük ölçüde tahrip olması erken menopoza yol açabilir. Primordial foliküllerin sayısındaki azalma, üreme fonksiyonunun düşmesine neden olur. Bu foliküller, doğumdan itibaren sabit sayıda olup, oosit sayısını belirler [3].

Erken menopoz, amenore, düzensiz adet kanaması over toksisitesine neden olabilir [4]. Kemoterapötik ajanlar özellikle çocuklarda, pubertal gelişim ve büyümeyi etkileyebilir, bu da infertilite ve erken menopoz gibi olumsuz sonuçlara yol açabilir [5].

Oksidatif hasar, toksik maddelere maruz kalmanın oosit kalitesini kalıcı olarak düşürmesinde rol oynayabilir. Fetal dönemde gelişmekte olan germ hücrelerinin de bu tür streslere duyarlı olduğu gösterilmiştir [6].

Kanser tedavisinde kullanılan kimyasal yapılar, etki mekanizmalarına göre sınıflandırılabilir. Bu gruplar arasında alkilleyici ajanlar, antimetabolitler, topoizomeraaz inhibitörleri ve mitotik iğ iplikleri inhibitörleri yer alır. Topoizomeraaz I inhibitörleri, irinotekan ve topotekan gibi ajanlar, DNA çift iplikçiklerinde kırılmalara neden olurken, doksorubisin DNA zincirindeki topoizomeraazları inhibe ederek replikasyon ve transkripsiyon süreçlerini bozar [7]. 1960'lı yıllardan itibaren yaygın şekilde kullanılan Dox, birçok kanser türünde etkin olarak kullanılmaktadır [8]. Özellikle yumuşak doku ve kemik sarkomları, akut lenfoblastik lösemi, Hodgkin lenfoma ve meme, yumurtalık, mesane ve tiroid kanserlerinin tedavisinde önemli bir yeri vardır [9].

Doksorubisine (Dox) bağlı toksisite mekanizması, serbest radikallerin oluşumu, antioksidan enzimlerin azalması ve lipid peroksidasyonunun artışı gibi süreçleri içerir. Antrasiklinlerde bulunan kinon/hidrokinon grupları, serbest radikal ve peroksitlerin aktivasyonuna yol açabilen bir yapıya sahiptir [10]. Dox, kemoterapide geniş bir kullanım alanına sahip, etkin bir antineoplastik ilaçtır. Ancak, bağışıklık sisteminin bozulması sonucu bağışıklık hücrelerinin sayısındaki azalma, hastaların mikrobiyal enfeksiyonlara karşı daha duyarlı hale gelmesine ve tedavi sürecinin olumsuz etkilenmesine neden olabilir [11]. Organ işlev bozuklukları, kanser tedavisinde sıklıkla karşılaşılan bir durum olup, bu durum tedaviye bağlı sağlık sorunlarını daha da karmaşık hale getirebilir [12].

Doksorubisin, özellikle meme kanseri tedavisinde tercih edilen kemoterapötik ajandır ve etkisini iki ana mekanizma ile gösterir: topoizomeraaz II inhibisyonu ve kromatin hasarı. Tümör hücrelerinde mitoz bölünmeyi engelleyerek DNA hasarına neden olur, ancak bu durum, tümör hücrelerinin tedaviye karşı direnç kazanmasına yol açabilir [13]. Dox, oksidatif stresi artırarak ve DNA hasarını tetikleyerek hücre ölümüne sebep olur. Bunun yanında, tedavi sırasında böbrek ve bağırsaklarda apoptoz, gastrointestinal hasar, pulmoner, hematolojik ve testiküler toksisite gibi yan etkiler gözlemlenebilir. Doksorubisin ayrıca yumurtalık rezervi üzerinde olumsuz etkiler yapmaktadır [14].

Zeytin meyvesi, fenolik maddeler açısından zengin olup, bu maddeler kuru meyve etinin %1-14'ünü oluşturur. Zeytindeki başlıca fenoller arasında oleuropein, hidroksitirozol, tirozol ve verbaskozit yer alır. Hidroksitirozol, oleuropeinin parçalanma ürünü olarak kabul edilir; zeytinin olgunlaşma sürecinde oleuropein konsantrasyonu azaldıkça hidroksitirozol artar. Çeşitli in vivo çalışmalar, zeytinyağı fenolik bileşenlerinin bağırsak seviyelerinde iyi emildiğini doğrulamıştır [15]. Tirozol ve hidroksitirozol, zeytinyağından kana yüksek oranda geçer. Bir başka çalışmada, mide sindirimi sonrası bu fenolik bileşenlerin (tirozol, hidroksitirozol ve sekoiridoid yapılar) stabilitesinin yüksek olduğu, ancak ince bağırsakta bu stabilitenin azaldığı bildirilmiştir [16].

Hidroksitirozolün, diğer biyofenollere kıyasla daha kolay saflaştırılabildiği gösterilmiştir. Örneğin, 1 litre zeytinyağı atık suyundan 1,2 g hidroksitirozol ve 0,4 g flavonoid içeren bir ekstrakt elde edilebilmektedir [16]. Bu bileşik, zeytin meyvesinde, yağında ve yapraklarında bulunan oleuropeinin hidroliziyle açığa çıkar. Son yıllarda hidroksitirozolün güçlü antioksidan ve antienflamatuvar özellikleri ortaya konmuştur. Çeşitli kanser hücre hatları ve hayvanlar üzerinde yapılan in vitro ve in vivo çalışmalar, hidroksitirozolün antioksidan, antiproliferatif, proapoptotik etkilerini ve anjiyogenezi engelleme potansiyelini göstermektedir. Ayrıca, kemik yapımı ve korunmasında da teşvik edici etkileri bulunmaktadır [17].

Zeytinin olgunlaşma süreciyle birlikte, oleuropein hidroliz olur ve hidroksitirozol ile elenolik asit oluşur. Hidroksitirozol, canlılarda normal metabolizma sırasında serbest radikalleri stabilize eder, oksidatif stresi azaltır ve aterosklerotik lezyonların büyüklüğünü küçültme etkisi gösterir [18].

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryum (Yumurtalık) Nedir?

Ovaryumlar, dişi üreme sisteminin bir parçasıdır ve yumurta üretimi gibi önemli bir işlevi üstlenir. Yumurtalıklar, doğuştan itibaren belirli sayıda yumurta hücresine sahiptir. Bu hücreler ergenlik döneminden itibaren olgunlaşarak üreme için hazır hale gelir [19]. Oogenez, yumurta hücresinin başlangıçtan olgunlaşmaya kadar geçirdiği süreçtir. Bu süreç, embriyonik dönemde başlar ve kadının doğurganlık dönemi boyunca adet döngüsüyle devam eder [20].

Oogenez; multiplikasyon evresi, büyüme evresi, olgunlaşma evresi olmak üzere üç aşamaya ayrılır. Multiplikasyon evresi, embriyonik dönemde başlar. Primordial germ hücreleri, mitoz bölünme yoluyla hızla çoğalarak oogoniumları oluşturur. Oogoniumlar, dişi fetüsün yumurtalıklarında bulunur ve doğumdan önce bu hücreler birincil oosit (primordial folikül) haline gelir. Dişi fetüs, doğumda yaklaşık 1-2 milyon primordial foliküle sahiptir. Büyüme evresi, doğumdan sonra birincil oositler, mayoz bölünmenin 1. profaz aşamasında durdurulur (diploten evre). Bu durum, doğurganlık dönemi başlayana kadar devam eder [21].

Ergenlik ile birlikte, her adet döngüsünde folikül uyarıcı hormon (FSH) etkisiyle bazı foliküller seçilir ve büyümeye başlar. Ancak bu süreçte genellikle sadece bir folikül tam olgunlaşır. Olgunlaşma evresi, mayoz bölünmenin devam etmesiyle gerçekleşir. Mayoz 1 tamamlanır ve bir ikincil oosit ile bir kutuplu cisimcik (polar body) oluşur. Kutuplu cisimcik, genetik materyal içerir ancak sitoplazmadan yoksundur ve işlevsel değildir. İkincil oosit, mayoz bölünmenin 2. metafazında durdurulur. Bu aşamada ovülasyon gerçekleşir. Eğer yumurta bir sperm tarafından döllenirse, mayoz 2 tamamlanır ve olgun bir yumurta hücresi (ovum) oluşur. Döllenme olmazsa oosit parçalanır ve döngü sona erer [22].

2.2. Yumurta Üretimi Sürecindeki Yapılar

Primordial foliküller doğum sırasında ovaryumda bulunan en ilkel yumurtalık hücresidir. Tek katlı yassı epitel hücreleriyle çevrilidir. Birincil foliküller adet döngüsünün başlangıcında FSH etkisiyle büyümeye başlayan foliküllerdir [22]. Epitel hücreleri (granüloza hücreleri) kübik bir yapıya dönüşür. Sekonder foliküller granüloza hücrelerinin çoğalması ve folikül içinde sıvı dolu boşlukların oluşmasıyla karakterizedir. Bu aşamada yumurta hücresi büyümeye devam eder. Graaf folikül (olgun folikül) tamamen olgunlaşmış foliküldür. Ovülasyon sırasında Graaf folikül çatlar ve içindeki oosit serbest kalır. Çatlayan

folikül, korpus luteuma dönüşerek progesteron salgılar. Gebelik gerçekleşmezse korpus luteum geriler ve korpus albicans adı verilen fibröz bir yapı oluşur [23].

Yumurtalık rezervi, yaşa bağlı değişimler ve toksik etkenler yumurtalığın üretim kapasitesini etkileyen unsurlardandır. Kadınlar sınırlı sayıda yumurtayla doğar (yaklaşık 1-2 milyon). Ergenlik dönemine kadar bu sayı yaklaşık 300.000'e düşer. Kadın yaşamı boyunca bu yumurtaların sadece 400-500 kadarı olgunlaşır ve ovülasyona katılır. Yaş ilerledikçe yumurta rezervi azalır ve kalan yumurtaların kalitesi düşer. Özellikle 35 yaş sonrasında bu süreç hızlanır. Sigara, radyasyon, kemoterapi gibi çevresel faktörler yumurta rezervini ve kalitesini olumsuz etkileyebilir [24].

2.3. Ovaryumun Hormonal Fonksiyonları

Ovaryumlar, üç temel hormon üretir: östrojen, progesteron, inhibin. Bu hormonlar hipotalamus ve hipofiz bezi ile etkileşim halindedir ve hormonal bir feedback mekanizması oluşturur. Ovaryumda üretilen hormonlar, kadın üreme sisteminin yanı sıra diğer sistemleri de etkiler. Granüloza hücreleri östrojen üretir. Androjenleri östrojene dönüştürmek için aromataz enzimini kullanır. Ayrıca inhibin-B salgılayarak FSH seviyesini kontrol eder. Teka hücreleri androjen üretiminden sorumludur. Bu androjenler, granüloza hücrelerinde östrojene dönüştürülür. Korpus luteum progesteron ve östrojen salgılar. Gebelik gerçekleşmezse korpus luteum dejenerasyona uğrar ve hormon üretimi durur. Aktivin, FSH salgısını artırır [25].

Progesteron ve östrojen seviyeleri arttıkça, hipotalamus ve hipofiz bezine negatif feedback yoluyla FSH ve LH üretimi engellenir. Bu, yeni bir folikülün gelişimini engeller. Eğer gebelik oluşmazsa, korpus luteum dejenerasyona uğrar ve progesteron ile östrojen seviyeleri düşer. Bu, endometriyumun dökülmesine yol açar ve menstrüasyon başlar.

2.3.1. Ovaryumda hormon üretim süreci

Östrojen, ovaryumun granüloza hücreleri tarafından üretilen en önemli hormonlardan biridir. Östrojen, teka interna hücreleri ve granüloza hücreleri iş birliğiyle üretilir. Teka hücreleri, kolesterolden androstenedion adı verilen bir öncül hormon üretir. Granüloza hücreleri, androstenedionu aromataz enzimi aracılığıyla östrojene dönüştürür. Ana türleri: Estradiol (E2) en aktif ve baskın formdur. Adet döngüsünün foliküler fazında üretilir. Estron (E1) menopoza sonrası daha baskın hale gelir. Estriol (E3) hamilelik sırasında plasenta tarafından üretilir. Endometriumu (rahim iç tabakası) kalınlaştırarak döllenmiş

yumurtanın tutunması için hazırlar. İkincil cinsiyet özelliklerinin (örneğin meme gelişimi, pelvis genişlemesi) oluşmasını sağlar. Vajina ve serviks salgılarının üretimini artırarak üreme sağlığını destekler [26].

Progesteron, ovaryumun luteal fazında korpus luteum tarafından üretilir. Bu hormonun üretimi ve etkisi şu şekildedir. Korpus luteum (ovülasyon sonrası oluşan folikül kalıntısı), kolesterolden progesteron sentezler. Endometriumu olası bir gebelik için destekler ve kanlanmasını artırır. Gebelik sırasında rahim kaslarının kasılmasını engelleyerek embriyonun tutunmasını sağlar. Süt bezlerinin gelişimini destekler. Eğer döllenme gerçekleşirse, korpus luteum progesteron üretimini sürdürür. İlk trimester sonrası bu görevi plasenta devralır.

Inhibin, granüloza hücreleri tarafından üretilir ve FSH salınımını baskılar. Folikül gelişiminin düzenlenmesine yardımcı olur. Hipofizden aşırı FSH salınımını engeller, böylece sadece bir folikülün ovülasyon için olgunlaşmasını sağlar [27].

2.3.2. Ovaryum hormonlarının üretimi adet döngüsünün farklı fazları

Ovaryumlar, hormonal etkilere yanıt vererek düzenli bir döngü içerisinde çalışır. Ovaryumun işlevsel döngüsü, kadın üreme sisteminin temel süreçlerinden biridir. Foliküllerin olgunlaşması, ovülasyon, korpus luteum oluşumu ve hormon salınımının düzenlenmesi gibi bir dizi karmaşık biyolojik olayı içerir. Bu döngü, genel olarak menstrüel döngü ile paralel olarak işler ve bir kadının üreme sağlığının düzenlenmesinde hayati bir rol oynar. Ovaryum işlevsel döngüsü, genellikle 28 gün süren bir döngüde gerçekleşir, ancak bu süre kişiden kişiye değişebilir. Ovaryumun işlevsel döngüsü foliküler faz, ovülasyon ve luteal faz olmak üzere üç ana aşamaya ayrılabilir. Bu döngüde hipotalamus, hipofiz bezi ve ovaryum arasındaki hormonal etkileşimler kritik bir rol oynar [28].

Foliküler faz (1-14. gün) (ovulasyona hazırlık)

Bu faz, menstrüasyon (adet kanaması) ile başlar. Rahim iç tabakası (endometrium), bir önceki döngüdeki gebelik gerçekleşmediği için dökülür. Folikül gelişimi hipofiz bezinden salgılanan FSH(folikül uyarıcı hormon), yumurtalıklardaki birkaç folikülün büyümesini uyarır. Ancak bu foliküllerden sadece biri (bazen nadiren iki tanesi) baskın folikül olarak seçilir ve olgunlaşır. Olgunlaşan folikülde yumurta hücresi gelişmeye başlar. Folikülün içindeki granüloza hücreleri tarafından östrojen üretilir. Östrojen seviyesi arttıkça

rahim iç tabakası yeniden kalınlaşmaya başlar. Servikal mukus (rahim ağzındaki salgı) daha ince ve kaygan hale gelir, bu da spermin hareketini kolaylaştırır.

Hipofizden salgılanan FSH, folikül büyümesini ve granüloza hücrelerinden östrojen üretimini uyarır. Dominant folikül, östrojen üretimini artırır ve rahim iç tabakasını kalınlaştırır. Artan östrojen seviyeleri, hipofizden FSH salınımını baskılar. Foliküller gelişir ve östrojen salgılanır. Foliküler faz, döngünün başından ovülasyona kadar geçen süreci kapsar ve FSH seviyesinin arttığı dönemi ifade eder. Menstrüel kanama başladığında, FSH ve luteinize edici hormon (LH) seviyeleri düşer. Hipotalamus, gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) salgılar. Bu hormon, hipofiz bezini uyararak, FSH ve LH salgılanmasına yol açar. FSH, ovaryumdaki primordial folikülleri uyararak, onların büyümesini ve gelişmesini sağlar. Foliküller büyür ve granüloza hücreleri çoğalır. Sekonder foliküller ve daha sonra tersiyer (Graaf) foliküller oluşur. Foliküller, östrojen üretmeye başlar. Bu, rahmin iç tabakasını, yani endometriyumunu, gebeliğe hazırlanmak için inceltir.

Granüloza hücrelerinden salgılanan östrojen, hipotalamus ve hipofiz bezine geri bildirerek FSH seviyesini baskılar. Bu durum, genellikle bir veya birkaç folikülün gelişimini sürdürmesini sağlar. Granüloza hücreleri, inhibin salgılar. Inhibin, FSH üretimini inhibe ederek, yalnızca en gelişmiş folikülün olgunlaşmasını teşvik eder [28].

Ovülasyon (14. Gün): yumurta serbest bırakılması

Östrojen seviyelerinin zirve yapması, LH hormonunda ani bir artışa neden olur. Bu durum ovülasyonu tetikler. Ovülasyondan sonra folikül, korpus luteuma dönüşerek progesteron üretimine başlar.

Ovülasyon, ovaryumun temel fonksiyonlarından biridir ve folikül gelişimiyle birlikte hormonal değişikliklere dayanır. FSH sayesinde primordial foliküller büyümeye başlar. Granüloza hücreleri östrojen salgılar. Östrojen seviyelerinin yükselmesi, LH salınımını tetikler. LH dalgası ovülasyonu başlatır. Tersiyer (Graaf) folikül çatlar ve oosit serbest bırakılır. Serbest kalan oosit, fallop tüpüne geçerek döllenme için hazır hale gelir.

Adet döngüsünün en kritik aşamalarından biridir ve bir kadının üreme kapasitesi açısından önemli bir dönemi temsil eder. Bu aşama, yumurtalıklardan olgun bir yumurta hücresinin (oosit) serbest bırakılması sürecidir. Ovülasyon, döngünün tam ortasında, genellikle 14. günde gerçekleşir. Ancak bu süre, kadının döngüsünün uzunluğuna bağlı olarak değişebilir. Adet döngüsü yaklaşık 28 gün sürer (kadınlar arasında bu süre değişiklik

gösterebilir) ve şu 4 ana faza ayrılır: menstrüasyon (1-5. Gün), foliküler faz (1-13. Gün), ovülasyon (14. Gün), luteal faz (15-28. Gün).

Foliküler faz boyunca artan östrojen seviyeleri, hipofiz bezine pozitif feedback yapar. Bu feedback, LH seviyesinde ani bir artışa neden olur (LH dalgası). LH dalgası, olgun folikülün çatlamasına ve içindeki yumurtanın serbest bırakılmasına yol açar. Olgun yumurta (ikincil oosit), folikülden çıkar ve fallop tüpüne geçer. Yumurta, burada 12-24 saat boyunca canlı kalır ve döllenmeye hazır hale gelir. Ovülasyon sırasında servikal mukus oldukça elastik, berrak ve yumurta akı kıvamındadır. Bu durum, spermin yumurtaya ulaşmasını kolaylaştırır.

Olgun yumurta folikülden serbest bırakılır. Ovülasyon, döngünün ortasında meydana gelir ve genellikle 14. gün civarında gerçekleşir. Bu aşama, en olgun folikülün çatlayarak içindeki oositi serbest bırakmasıdır.

Östrojen seviyelerinin yükselmesi, hipofizde bir LH salgı dalgasına neden olur. LH artışı, ovülasyonu tetikler ve folikül çatlar. FSH seviyesi de artar, ancak LH'nin etkisi daha belirgindir. Ovaryumdaki olgun folikül çatlar, oositi ve çevresindeki granüloza hücrelerini serbest bırakır. Oosit, fallop tüpüne yönelir.

Luteal faz (15-28. Gün): ovülasyondan sonra

Çatlayan folikül, ovülasyondan sonra korpus luteum adı verilen geçici bir endokrin yapıya dönüşür. Korpus luteum, progesteron ve az miktarda östrojen salgılar. Progesteron, rahim iç tabakasını (endometrium) kalınlaştırır ve olası bir gebelik için hazır hale getirir. Rahim kaslarının gevşemesine ve embriyonun tutunması için uygun bir ortam oluşmasına yardımcı olur. Eğer döllenme olmazsa korpus luteum yaklaşık 10-14 gün boyunca aktif kalır, ardından progesteron üretimi durur ve korpus luteum gerileyerek korpus albicans adı verilen inaktif bir yapıya dönüşür. Progesteronun azalmasıyla rahim iç tabakası dökülmeye başlar ve bir sonraki menstrüasyon döngüsü başlar. Eğer yumurtanın serbest bırakılmasının ardından fallop tüpünde bir spermle birleşirse döllenme gerçekleşir. Döllenmiş yumurta, yaklaşık 6-10 gün sonra rahim endometriuma yerleşir. Eğer döllenme olmazsa yumurta 24 saat içinde parçalanır ve luteal faz sonrası menstrüasyonla birlikte vücut dışına atılır.

Korpus luteum, progesteron salgılar ve endometriumu gebelik için destekler. Eğer döllenme olmazsa progesteron üretimi azalır, korpus luteum geriler (korpus albicans) ve adet kanaması başlar.

Korpus luteum progesteron salgılar. Ovülasyon sonrası, çatlayan folikül korpus luteum adı verilen geçici bir endokrin yapıya dönüşür. Luteal faz, döngünün son aşamasıdır ve genellikle ovülasyondan sonra 14 gün sürer.

Korpus luteum; granüloza ve teka hücrelerinin birleşmesiyle oluşur. Korpus luteum, progesteron üretir. Progesteron, endometriyumun kalınlaşmasını ve gebeliğe hazırlanmasını sağlar. Korpus luteum ayrıca östrojen de üretir, ancak progesteronun baskın olduğu bir dönemde rahmi gebelik için hazır hale getirir.

2. 4. Ovaryumun Yapısı

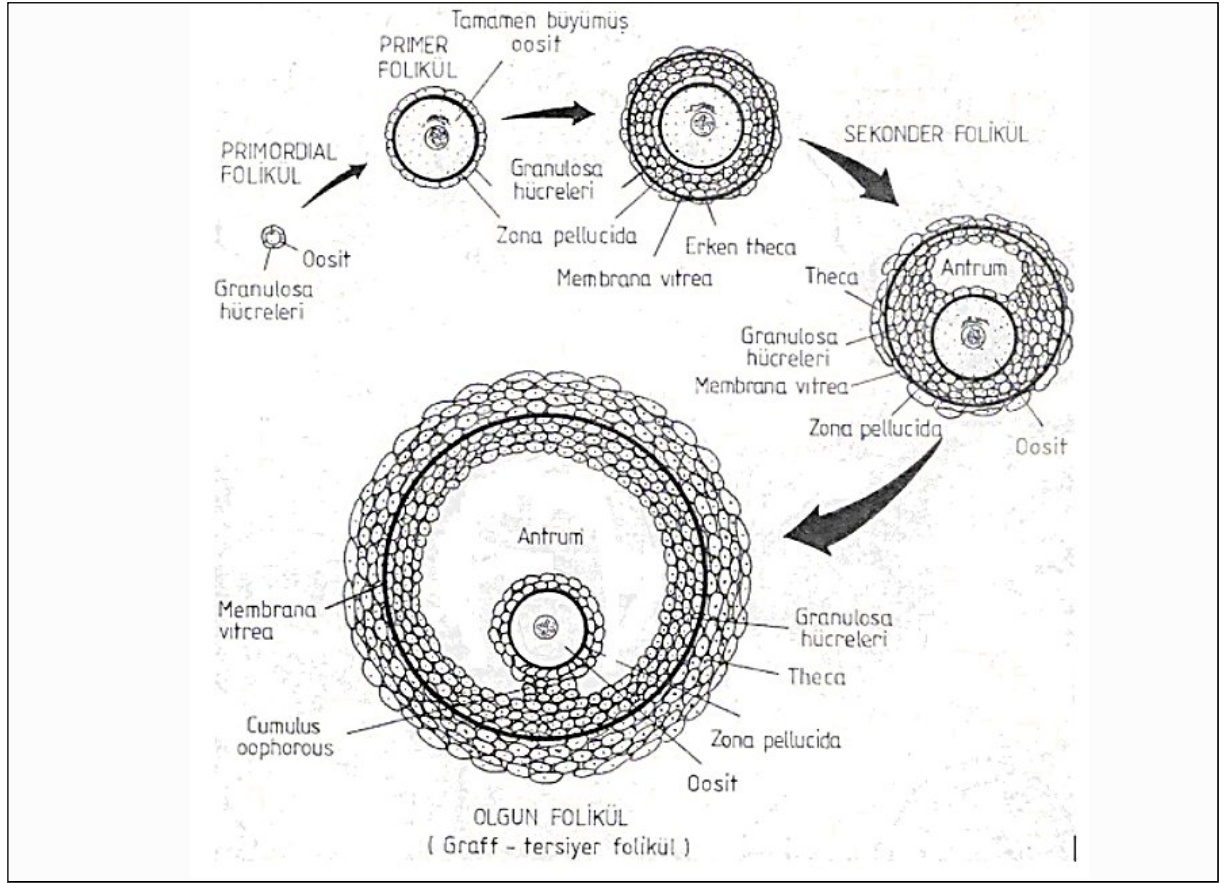
Foliküller, oosit adı verilen yumurta hücrelerini çevreleyen yapı birimleridir. Folikül gelişimi şu aşamalardan geçer: primordial folikül, folikül gelişiminin başlangıç aşamasıdır ve düz epitelyal hücrelerle çevrilidir. Birincil folikül, hücreler kübik şekil alır ve granüloza hücreleri olarak adlandırılır. İkincil folikülde, granüloza hücrelerinin arasında sıvı dolu boşluklar (antrum) oluşur. Tersiyer folikülde, antrum belirginleşir ve folikül olgunlaşır. Graaf folikülde, ovülasyona hazır olgun foliküldür. Oositler, foliküllerin içinde bulunur ve her ay bir tanesi olgunlaşarak ovülasyon yoluyla salınır. Oosit, zona pellucida adı verilen koruyucu bir tabakayla çevrilidir. Korpus luteum, ovülasyondan sonra folikül kalıntılarından oluşur, progesteron ve östrojen salgılayarak olası bir gebelik için rahmi hazırlar.

2.4.1. Korteks

Ovaryumun dış bölgesinde yer alan ve oositlerin yanı sıra destekleyici hücrelerin bulunduğu bir alandır. Ovaryumun yüzeyinin hemen altında yer alır. Korteks, medulladan daha yoğun bir yapıya sahiptir. Bağ dokusu açısından zengindir ve içinde çok sayıda folikül bulunur. Korteksin dış yüzeyi, germinal epitel olarak adlandırılan, tek katlı düz veya kübik hücrelerden oluşan bir epitel tabakasıyla kaplıdır. Bu epitelin altında ise tunika albuginea adı verilen ince fibröz bir bağ doku tabakası bulunur. Korteks, foliküller ve bağ dokusu hücrelerinden oluşur.

Korteks, folikülleri korur ve yumurta hücrelerinin gelişimi için uygun bir ortam sağlar. Granüloza hücreleri östrojen üretir. Teka hücreleri androjen üretir, bu da granüloza hücrelerinde östrojene dönüşür. Graaf folikül, korteksin dış yüzeyine yakın bir yerde bulunur. LH dalgasının etkisiyle folikül çatlar ve yumurta serbest bırakılır. Kadınlar doğumda belli bir sayıda primordial folikülle doğar.

Kortekste bulunan foliküllerin çoğu, olgunlaşma sürecini tamamlayamadan dejenerasyona uğrar. Bu sürece foliküler atrezi denir. Atrezi, korteksteki foliküllerin sayısını yaşla birlikte azaltır. Menopoz döneminde kortekste neredeyse hiç aktif folikül kalmaz.



Şekil 2.1. Farklı matürasyon evrelerindeki folikül yapıları

Primordial foliküller en küçük ve en fazla sayıda bulunan foliküllerdir. İlk olarak fetal dönemde oluşur ve korteksin dış kısmında kümeler halinde bulunurlar. Her bir primordial folikül, tek bir primer oositi ve onu çevreleyen ince bir yassı epitel hücre katmanını içermektedir. Çevresindeki granuloza hücreleri büyür ve kübik bir şekil alır. Sekonder foliküllerde, granuloza hücreleri daha fazla katman oluşturur, ve folikülün içinde sıvı dolu boşluklar gelişmeye başlar. Teka interna ve teka externa adı verilen bağ dokusu katmanları, folikülün çevresinden oluşmaktadır. Graaf foliküller ovülasyona hazır, en büyük ve olgun foliküllerdir. İçindeki yumurta hücresi, cumulus oophorus adı verilen bir hücre tabakasıyla çevrelenmiştir.

2.4.2. Bağ dokusu ve hücresel yapılar

Korteksin foliküller dışında kalan kısmı, bağ dokusu ve fibroblast benzeri hücrelerle doludur. Stroma, kollajen liflerden ve fibroblastlardan oluşan bağ dokusudur. Bu doku, folikülleri destekler ve kan damarlarını içerir. Teka hücreleri, androjen üretiminden sorumludur. Bu androjenler, granüloza hücrelerinde östrojene dönüştürülür.

2.4.3. Medulla

Ovaryumun iç kısmında kan damarları, sinirler ve bağ dokular yer alır. Ovaryumun medulla kısmı, ovaryumun iç bölgesini oluşturur ve yapısal olarak korteksten farklıdır ve hormon üretimi ve yumurta gelişiminde dolaylı bir rol oynar. Ovaryumun merkezinde yer alır [26]. Korteks kısmını içten çevreleyen bir yapıdadır. Medulla, gevşek bağ dokusundan oluşur. Bu bağ dokusu, kortekse göre daha az yoğun ve daha yumuşaktır. Kollajen ve elastik liflerden zengin bir yapı içerir. Medulla, kan damarları açısından zengindir ve kortekse kan sağlamak için önemli bir işlev görür. Arterler, venler ve lenfatik damarlar medullada yoğun şekilde bulunur. Ovaryan arter ve uterin arter dalları medulla yoluyla ovaryuma kan sağlar. Medulla, zengin bir sinir ağına sahiptir. Bu sinirler, otonom sinir sistemi yoluyla hormon salgılanmasını ve ovaryumun fizyolojik aktivitelerini düzenler. Medullayı oluşturan temel bileşenler: kan damarları, lenf damarları, sinirler, bağ dokusundan oluşur.

Tablo 2.1. Korteks ve medulla arasındaki farklar

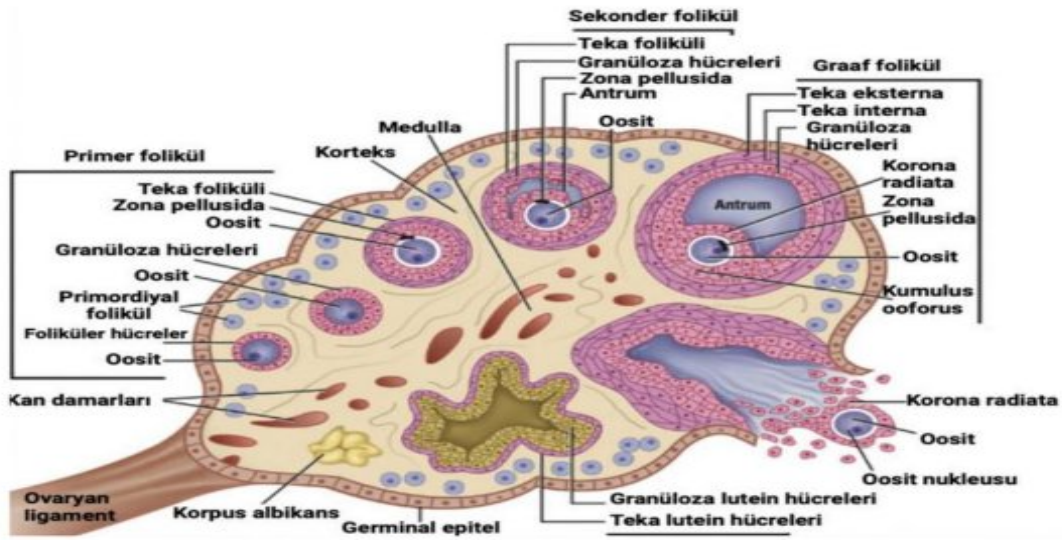
Özellik	Korteks	Medulla
Konum	Ovaryumun dış kısmında	Ovaryumun iç kısmında
Doku Yapısı	Yoğun bağ dokusu	Gevşek bağ dokusu
İçerik	Foliküller, granüloza ve theca hücreleri	Kan damarları, sinirler ve lenfatik damarlar
Görev	Yumurta üretimi ve folikül gelişimi	Kortekse destek sağlama ve dolaşımı düzenleme

2.4.4. Medullanın işlevleri

Medulla, doğrudan yumurta üretimine katılmamakla birlikte, bu süreçleri dolaylı olarak destekleyen bir yapıdır. Medulladaki arterler, kortekste bulunan foliküllere oksijen ve besin taşırlar. Bu, foliküllerin büyümesi ve hormon üretimi için kritik bir rol oynar. Medulla, korteksten salgılanan östrojen ve progesteron gibi hormonların kan dolaşımına

taşınmada aracılık eder. Lenf damarları, korteksten gelen atık maddeleri uzaklaştırır ve ovaryumun sağlıklı kalmasını sağlar. Sinir ağları, ovaryumun fizyolojik süreçlerini düzenler. Medulla doğrudan yumurta üretiminde yer almasa da, destekleyici işlevleri nedeniyle ovaryumun sağlığı ve üreme fonksiyonları açısından hayati öneme sahiptir [28].

2.5. Ovaryumun Histolojik Yapısı



Şekil.2.2. Ovaryumun genel görünümü (eroschenko, 2012).

Germinal epitel, ovaryumun en dış kısmını kaplar. Tek katlı kübik epitelyumdan oluşur. Ancak bazen yassı epitel görünümünde olabilir. Uzun süre "germinal" adı verilmesine rağmen bu tabaka, germ hücreleri üretmez. Dış ortamla ovaryum arasındaki sınırı oluşturur ve koruma sağlar. Over kanserlerinin büyük bir kısmı bu epitel hücrelerinden köken alır.

Tunika albuginea, germinal epitelin hemen altında yer alır. Yoğun bağ dokusundan oluşur. İnce, fibröz bir tabakadır. Ovaryumun korteksine mekanik destek sağlar. Foliküllerin korunmasına yardımcı olur.

2.6. Ovaryumun Hücresel Yapısı

Ovaryumun histolojik yapısında yer alan temel hücresel bileşenler şunlardır: Granuloza hücreleri, foliküllerin iç tabakasını oluşturur. Östrojen üretimi için androjenleri östrojene dönüştürür. Olgunlaşan oositin beslenmesi ve korunmasında önemli rol oynar. Teka hücreleri folikül çevresinde iki tabaka oluşturur. Teka interna androjen salgılar ve

hormon üretiminde görev alır. Teka externa bağ dokusu yapısında olup folikül için destek sağlar. Oositler her folikülün içinde bulunan olgunlaşmamış yumurta hücresidir. Zona pellucida adlı glikoprotein bir tabaka ile çevrilidir. Stromal hücreler, ovaryumun bağ dokusunu oluşturan hücrelerdir. Hormonal değişikliklere yanıt olarak farklılaşabilir [28].

Ovaryumun histolojik yapısı, üreme fonksiyonu ve hormon üretimi için mükemmel bir organizasyon sergiler. Germinal epitel, tunica albuginea, korteks ve medulla tabakaları hem koruyucu hem de fonksiyonel görevler üstlenir. Bu yapıların her biri, ovaryumun hem üreme hem de endokrin işlevlerini yerine getirmesinde hayati öneme sahiptir.

2.7. Ovaryumun Damar ve Sinir Yapıları

Ovaryum arterleri (genellikle abdominal aorttan gelir), ovaryuma kan sağlayarak korteks ve medullaya oksijen ve besin taşır. Venöz dönüş, ovaryum venleri aracılığıyla sağlanır. Lenf drenajı, pelvik lenf düğümlerine yöneliktir.

Ovaryumun damar ve sinir yapıları, hem ovaryumun fonksiyonlarını yerine getirebilmesi hem de hormon üretiminin düzenlenmesi açısından önemli bir rol oynar. Bu yapılar, ovaryumun kan ve sinirsel uyarı ile beslenmesini, hormon salınımını ve foliküllerin olgunlaşmasını destekler.

Ovaryumun damar yapıları, içindeki foliküllerin gelişimi ve hormonal işlevlerin yerine getirilmesi için gereklidir. Ovaryum, kan damarlarıyla yoğun bir şekilde beslenir ve bu damarlar hem korteks hem de medulladaki yapıları besler.

Ovaryumun damar yapısının en önemli bileşenleri, ovaryal arter ve uterin arter gibi ana arterlerdir. Ovaryumun kanlanması temel rol oynar. Ovaryal Arter, ovaryumun medulla kısmına kan sağlar. Medullada yoğun kan damarları bulunan bu arter, ovaryumun iç kısmındaki damarları besler. Uterin Arter, uterusun kanlanması rol oynadığı gibi, ovaryuma da dal verir. Bu arter, ovariumun korteks kısmına kan taşır ve özellikle foliküllerin gelişmesinde yardımcı olur.

Ovariumun medullasında büyük bir damar ağı bulunur. Bu damarlar, kanla besleme işlevini yerine getirir ve medulladaki sinirler ile hormon taşıyan damarlarla bağlantılıdır. Kortekste ise daha ince damarlar bulunur. Ovaryum, yoğun vasküler yapıya sahip bir organdır, çünkü oositlerin ve foliküllerin gelişimi için besin ve oksijen gereklidir. Damarlar, özellikle ovaryumun korteks kısmındaki folikülleri ve korpus luteum'u besler. Ovaryumun venöz drenajı, ovaryal ven aracılığıyla sağlanır.

Ovaryumda bulunan sinir yapıları, hormon salınımını düzenlemek ve ovaryumun fonksiyonlarını kontrol etmek için önemlidir. Ovaryumda hem otonom sinir sistemi hem de somatik sinirler yer alır.

Otonom sinir sistemine ait sempatik sinirler ovaryumda, sempatik sinir uçları, n. ovaricus adı verilen sinir yoluyla ovaryumun medullasında bulunan damarlarla bağlantı kurar. Bu sinirler, kan damarlarının daralmasını ve hormon salınımını uyarabilir. Ayrıca, foliküllerin olgunlaşma sürecini etkileyebilir. Parasempatik sinirler de ovaryumda yer alır, ancak daha az yoğundur. Bu sinirler, genellikle ovaryumda bulunan damarlarla bağlantı kurar. Kan damarlarını genişleterek daha fazla kan akışı sağlar ve bu da ovaryumun fonksiyonlarını destekler. Ayrıca, foliküllerin gelişimine etki edebilir [29].

Ovaryum, sinirsel uyarıları ileten somatik sinirlerle de bağlantılıdır. Bu sinirler, genellikle ovaryumun çevresindeki kapsüler bölgede bulunur. Ovaryumda somatik sinirler, ağrı iletiminde önemli bir rol oynar [29].

Sinirsel yapılar, hormonların salınımını doğrudan etkileyebilir. Sempatik sinirler, bazı durumlarda LH ve FSH salınımını modüle edebilir. Ayrıca, sempatik sinirler, foliküllerin gelişim süreçlerini de etkileyebilir. Ovaryumda aşırı sinirsel aktivite, ovaryal hastalıkların oluşmasına zemin hazırlayabilir [29].

Ovaryumun damar ve sinir yapıları, ovaryumun fonksiyonlarını yerine getirebilmesi ve genel üreme sağlığının korunabilmesi için kritik öneme sahiptir. Kan damarları, ovaryumun hormon üretiminden sorumlu olan yapılarını besler ve oositlerin olgunlaşmasını sağlar. Sinir yapıları ise, hormonal salınımı ve ovaryal işlevleri etkileyerek, üreme sisteminin düzgün çalışmasına katkıda bulunur. Vasküler ve sinirsel bozukluklar, çeşitli hastalıklar ve fonksiyonel bozukluklar için risk faktörleri oluşturabilir.

2.8. Ovaryum Hastalıkları

Normal ovaryum döngüsünde (28 gün), foliküler faz ve luteal faz arasında dengeli bir hormon salınımı görülür. Bu döngü, yumurtlamanın her ay düzenli olmasını sağlar. Ovaryumun işlevsel döngüsü, yumurtalıkların doğru çalışabilmesi ve üreme sağlığının sürdürülebilmesi için hormonların karmaşık bir etkileşimini gerektirir. Foliküllerin gelişimi, ovülasyon ve korpus luteumun fonksiyonları, gebelik oluşumu için temel bir rol oynar. Bu döngüdeki herhangi bir bozukluk, üreme sağlığını ve adet döngüsünü etkileyebilir, bu nedenle düzenli tıbbi izleme ve değerlendirme önemlidir.

Ovaryum hastalıkları, kadın üreme sisteminin önemli bir parçası olan ovaryumların normal fonksiyonlarını etkileyebilen çeşitli sağlık sorunlarını kapsar. Bu hastalıklar, genetik faktörlerden hormonal dengesizliklere, enfeksiyonlardan tümörlere kadar farklı sebeplerle ortaya çıkabilir.

2.8.1. Polikistik over sendromu (PCOS)

Polikistik Over Sendromu (PCOS), kadınlarda en sık görülen endokrin hastalıklardan biridir. Bu hastalık, yumurtalıklarda birçok küçük kistin oluşmasına yol açar ve hormonal dengesizliklere neden olur. Ailede PCOS öyküsü olan kadınlarda daha yaygındır. Yüksek LH ve düşük FSH seviyeleri, yumurtaların olgunlaşmasını engeller. Yüksek erkeklik hormonu seviyeleri, yumurtalıklarda kistlerin oluşmasına ve adet düzensizliklerine yol açar [20]. PCOS'lu kadınların çoğunda insülin direnci vardır, bu da hormonal dengesizliklere ve yumurtlama bozukluklarına neden olabilir. Belirtileri, düzensiz adet döngüleri veya adet görmeme, yumurtlamada sorunlar (infertilite), yüzde, sırtta ve vücutta aşırı tüylenme (hirsutizm), obezite ve insülin direnci, ciltte sivilce ve yağlanma, yumurta sayısının fazla olmasıdır.

2.8.2. Over kistleri

Foliküller olgunlaşamaz ve sıvı dolu kistler oluşur. Bu durum, adet döngüsünü ve ovülasyonu etkileyebilir. Over kistleri, ovaryumlarda sıvı dolu kese veya yapılar olarak tanımlanır. Çoğu over kisti zararsızdır ve genellikle belirti vermez. Ancak bazıları büyüdüğünde, ağrıya veya komplikasyonlara neden olabilir.

Fonksiyonel kistler, foliküllerin olgunlaşamaması ya da çatlamaması nedeniyle oluşur. Bu tip kistler genellikle zararsızdır ve birkaç ay içinde kaybolur. Foliküler kist, ovaryumda olgunlaşamayan bir folikülün içinde sıvı birikmesiyle oluşur. Korpus luteum kisti, ovülasyon sonrasında korpus luteumun sıvı dolarak büyümesiyle oluşur. Endometriozis (endometrial kistler), endometrial doku, ovaryumda büyüyebilir ve kanamaya neden olarak kistlerin oluşumuna yol açar. Dermoid kistler, genellikle doğuştan gelen kistlerdir. İçlerinde saç, diş ve diğer vücut dokuları bulunabilir. Belirtileri, pelvik ağrı, adet düzensizlikleri, cinsel ilişki sırasında ağrı, karın şişliği, mide bulantısı veya kusmadır.

2.8.3. Over kanseri

Over kanseri, yumurtalıkların kanseridir ve genellikle geç evrelerde teşhis edilir. İleri evrelerde semptomlar daha belirgin hale gelir. Over kanseri, kadınlarda genital sistemin en ölümcül kanseridir. Ailesel öykü ve genetik mutasyonlar, over kanseri riskini artırır. Gen mutasyonları, over kanseri için önemli risk faktörlerindendir. 50 yaş üstü kadınlarda daha yaygındır. Uzun süreli östrojen maruziyeti, özellikle menopoz sonrası hormonal tedavi, over kanseri riskini artırabilir. Overde gelişen kanserli hücreler genellikle karın zarı ve pelviste yayılabilir. Belirtileri, karın şişliği veya basıncı, yavaş gelişen mide problemleri (kabızlık, şişkinlik, iştahsızlık), pelvik ağrı veya rahatsızlık, sık idrara çıkma, yorgunluk, kilo kaybı ve adet düzensizlikleridir.

2.8.4. Over torsiyonu (ovaryum dönmesi)

Ovaryum torsiyonu, ovaryumun kendisinin veya bağlı olduğu damarların dönmesidir. Bu durum acil bir durumdur ve hızlı müdahale gerektirir. Overdeki kistler veya tümörler, ovaryumu yerinden çekerek dönmesine neden olabilir. Bazı kadınlarda, ovaryumlar normalden farklı bir yerde olabilir ve bu da torsiyon riskini artırır. Belirtileri, şiddetli pelvik ağrı, mide bulantısı, kusma, karın şişliği ve idrar yapmada zorluktur.

2.8.5. Endometriozis

Endometriozis, rahim iç tabakasının (endometriyum) rahim dışındaki alanlarda büyümesidir. Endometrial doku rahim dışındaki bölgelerde büyür, ağrıya ve infertiliteye neden olabilir. Yumurtalıklarda, fallop tüplerinde veya karın zarı üzerinde olabilir. Endometriozis, genellikle kistik yapılarla birlikte olur. Ailede endometriozis öyküsü olan kadınlarda daha yaygındır. Bağışıklık sistemi, endometrial hücrelerin vücudun diğer bölgelerinde büyümesine engel olamaz. Östrojen, endometriozis gelişimini teşvik edebilir. Belirtileri, ağrılı adet dönemleri, cinsel ilişki sırasında ağrı, infertilite, adet dışı kanama, pelvik ağrı sayılabilir.

2.8.6. Prematür over yetmezliği

Over fonksiyonunun erken yaşta durmasıdır. Foliküller tükenir ve adet döngüsü bozulur. Prematür over yetmezliği, kadınların 40 yaşından önce yumurtalık fonksiyonlarının kaybolmasıdır. Ovarium, normal yumurta üretim kapasitesini kaybeder. Genetik faktörler,

otoimmün hastalıklar, kemoterapi veya radyoterapi neden olabilir. Düzensiz adet döngüleri veya adet kesilmesi, geç menopoz belirtileri (sıcak basmaları, gece terlemeleri), infertilite, ovaryum hastalıkları, kadın üreme sağlığı üzerinde önemli etkiler yaratabilir. Hormonal dengesizlikler, genetik faktörler, çevresel etkiler veya enfeksiyonlar, ovaryum sağlığını tehdit edebilir [29].

2.9. Overtoksisite

Overtoksisite, ovaryum hücrelerinin çeşitli toksik maddelere veya tedavilere (örneğin kemoterapi, radyoterapi, ağır ilaçlar) maruz kalması sonucu zarar görmesi durumudur. Bu durumun neden olduğu etkiler; yumurtalık rezervinin azalması, hormon üretiminde azalma, kısırlık, adet döngüsünün bozulması veya erken menopozdur.

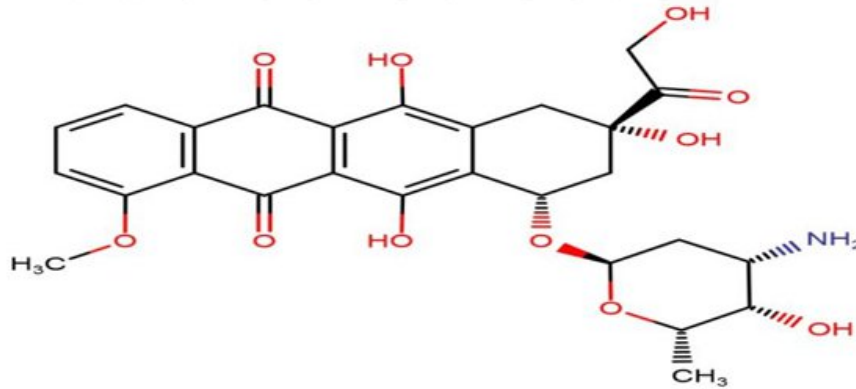
Özellikle alkileyici ajanlar (örneğin, siklofosfamid) yumurtalık dokusuna zarar verebilir. Bu yüzden ilaçların ve kimyasal maddelerin dikkatli kullanımı, sağlık profesyonellerinin rehberliği ve düzenli takipler, overtoksisitesini önlemenin temel yollarıdır [29]. Overtoksisitesi, ovaryum fonksiyonlarını doğrudan etkileyerek üreme sağlığını tehdit eder. Özellikle genç yaşta kanser tedavisi gören kadınlar için önemli bir risk faktörüdür. Ovaryumun toksik maddelere karşı korunması amacıyla geliştirilen yöntemler arasında gonadal koruma teknikleri (örneğin, yumurtalık dokusunun dondurulması) bulunmaktadır.

Oksidatif stres, hücrelerdeki serbest radikallerin birikmesiyle ortaya çıkar ve yumurtalıklar bu duruma oldukça hassastır. Oksidatif stres, oositlerin hasar görmesine, folikül gelişiminin bozulmasına ve erken yaşlanmaya yol açabilir. Çevresel toksinler, ağır metaller ve bazı ilaçlar, oksidatif strese neden olarak yumurtalık fonksiyonlarını olumsuz etkileyebilir. Oksidatif stres, yumurtalıkların hücresel yapısına zarar verir ve bu da doğurganlık problemlerine yol açabilir. Ayrıca, oksidatif stresin, yumurtalıkların yaşlanma sürecini hızlandırarak erken menopoz riskini artırabileceği gösterilmiştir [29].

Genetik yatkınlık, bireylerin çevresel toksinlere karşı hassasiyetini etkileyebilir. Özellikle bazı genetik bozukluklar, vücudun toksik maddeleri daha az etkili bir şekilde atmasına veya metabolize etmesine yol açarak overtoksisitesini artırabilir. Bu da yumurtalıkların işlevselliğini bozar ve doğurganlık üzerinde olumsuz etkilere yol açabilir. Genetik polimorfizimli bazı bireylerde, toksinleri metabolize etme yeteneği zayıf olabilir. Bu, çevresel veya farmasötik toksinlerin daha uzun süre vücutta kalmasına ve yumurtalıkların zarar görmesine yol açabilir [29].

2.10. Doksorubisin

Doksorubisin, 1970'lerde çeşitli *Streptomyces* suşlarından izole edilen antrasiklin yapısında bir antibiyotiktir ve solid tümörler, lenfomalar, lösemiler gibi birçok kanser türünün kemoterapisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [30]. Meme kanseri tedavisinde etkili kemoterapötik ajanlardan biridir. Dox'un sitotoksik etkisinin iki temel mekanizma ile gerçekleştiği bilinmektedir: klasik topoizomerez II inhibisyonu ve kromatin hasarı. Topoizomerez II, DNA çift sarmalında replikasyon, transkripsiyon ve rekombinasyon süreçlerindeki topolojik stresi azaltmak için DNA'da geçici çift sarmal kırıkları oluşturan bir enzimdir. DOX, sikloheksan ve şeker kısımları aracılığıyla bu enzimle kompleks oluşturarak DNA hasarına neden olur, p53 aracılığıyla hücre döngüsünü durdurur ve replikasyon, transkripsiyon, rekombinasyon süreçlerinin engellenmesiyle hücre ölümüne yol açar. Kromatin hasarı mekanizmasında ise, DOX'un şeker kısmı DNA'ya göç ederek histon alanını işgal eder ve nükleozomun çökmesine neden olur, bu da hücre ölümünü tetikler. Ayrıca DOX, reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açarak hücresel redoks dengesini bozmakta, DNA ve hücre zarlarında hasara neden olmaktadır [31].



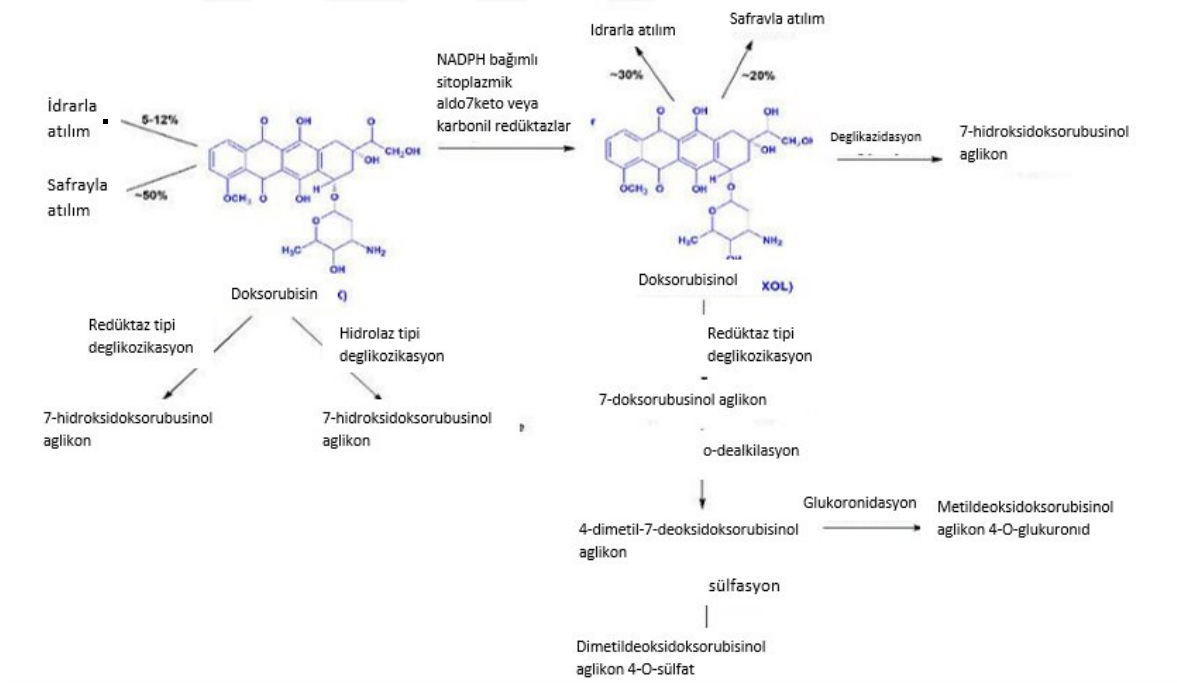
Şekil 2.3. DOX'un kimyasal yapısı

Doksorubisinin bu etki mekanizmalarından dolayı meme kanseri, lösemi, lenfoma ve diğer solid tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanıldığı belirtilmiştir. Ancak, bu tedavi sürecinde Dox, kusma ve ishal gibi geçici yan etkilerin yanı sıra ilaç direnci ve kardiyotoksisite gibi ciddi komplikasyonlara yol açabilmektedir. Ayrıca, Dox'a karşı gelişen ilaç direnci, kanser tedavisinde önemli bir engel oluşturmaktadır. Metastatik kanser hastalarının %90'ından fazlasında, kemoterapötik ilaçlara karşı gelişen direnç tedavi başarısızlığının ana nedenidir [32].

Doksorubisinin antikanser etkisini artırmak ve toksisitesini azaltmak için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir [33]. Bunlar, Dox'un diğer kemoterapötik ajanlarla kombinasyon halinde kullanılması, böylece dozun azaltılması; yapısının ve uygulama formunun değiştirilmesi ve sadece tümör hücrelerini hedefleyen ilaç taşıma sistemlerinin kullanımıdır [34].

Doksorubisin toz ya da sıvı formda (10-200 mg şişelerde) piyasada bulunur ve genellikle 21-28 günde bir 60-75 mg/m² dozunda intravenöz olarak uygulanır. Dozu, endikasyona, vücut yüzey alanına ve karaciğer fonksiyonlarına göre ayarlanır [34]. Yaygın yan etkileri arasında kemik iliği supresyonu, bulantı, kusma, mukozit, ishal, baş ağrısı, alopesi ve deri döküntüleri bulunur.

2.10.1.Doksorubisin metabolizması



Şekil 2.4. Doksorubisin (DOX) metabolizması

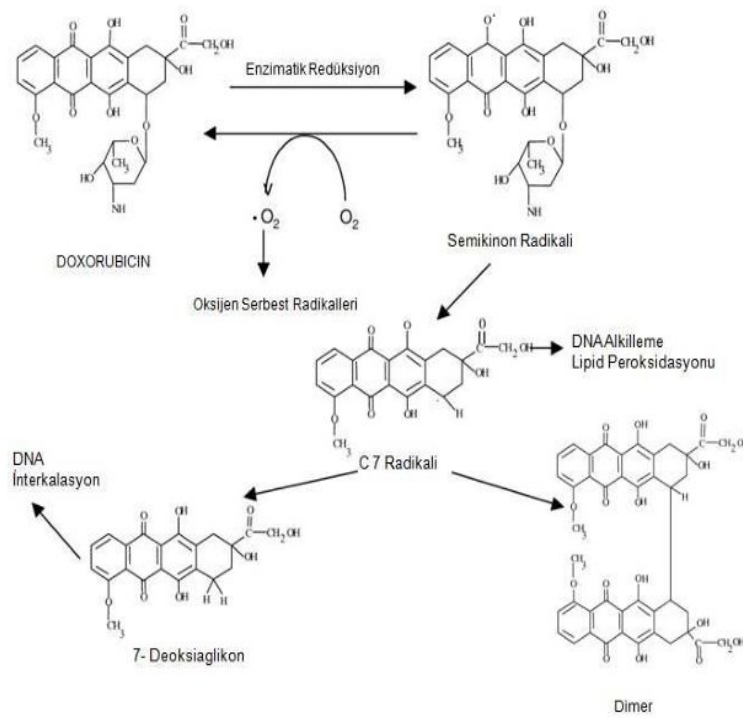
Doksorubisin karaciğerde CYP3A4 enzimleri tarafından metabolize edilerek doksorubisinol ve diğer hepatotoksik aglikon metabolitlerine dönüşür. İlacın yaklaşık %50'si değişmeden atılır [34].

Antrasiklin yapısında bir antibiyotik olan Dox, tek başına veya kombinasyonlarla intravenöz olarak uygulanan antikanser ilaçlarındandır. Yapısında, tetrasiklin halkası ve bu

halkaya glikozidik bağ ile bağlı daunozamin şekeri bulunur. Hidrofilik özellikte olan Dox'un hidroklorür tuzunun sudaki çözünürlüğü yaklaşık 10 mg/mL'dir [35].

2.10.2. Doksorubisin etki mekanizması

Doksorubisinin tam olarak anlaşılamayan kompleks bir etki mekanizması bulunmaktadır. Bilinen mekanizmalar şöyle özetlenebilir. Semikinona indirgenme; kinon halkası otooksidasyona uğrayarak hidrojen peroksit ve ROS üretir. Membrana bağlanma; belirli lipidlere karşı yüksek affinite gösterir ve lipid peroksidasyonu yoluyla membran yapısında değişikliklere neden olur. Biyoalkilasyon; metabolik aktivasyonla oluşan aglikon C7 merkezli radikal, alkilleyici ajan olarak DNA hasarına yol açar. Metal şelatlama; demir ve bakır gibi bi- ve trivalent katyonlara yüksek affinitesi, ilacın redüktif aktivasyonu ve serbest radikal oluşumunu sağlar [36].



Şekil 2.5. Doksorubisin metabolik aktivasyonundaki serbest reaksiyonları

Doksorubisin, DNA baz çiftleri arasında girerek (interkalasyon) DNA ve RNA sentezinin inhibisyonuna yol açar. İnterkalasyon tekli ve çift ipliklerin kırılmasına neden olur. DNA 9'da ipliklerinin ayrılması, topoizomerez II aktivitesine veya demir katalizli hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri aracılığıyla gerçekleşir. Ayrıca, Dox kovalent topoizomerez II kompleksi oluşmasına yol açarak DNA replikasyonunda iplik ligasyonunu

inhibe eder. Hücre siklusu boyunca aktif olmakla birlikte, maksimum toksisitesini S fazında gösterir. Doksorubisinin organ dağılımına bakıldığında, intravenöz uygulama sonrası en yüksek konsantrasyonlar böbrek (90,2 nmol/g), karaciğer (46,0 nmol/g) ve kalpte (15,9 nmol/g) tespit edilmiştir. Kalpte düşük Dox konsantrasyonları, kardiyotoksisiteyi azaltması açısından avantaj sağlamaktadır.

Dox'un, somatik hücrelerde apoptozisin güçlü bir aktivatörü olduğu bildirilmiştir. Bu etkisini hedef hücrelerin mitokondriyonlarında ve çekirdeğinde DNA hasarı ve sonucunda da oksidatif stres oluşturarak göstermektedir. Yapılan çalışmalar Dox'un lenfatik ve miyeloid dokular, bağırsak mukozası, ovaryumlar ve testisler gibi hızlı hücre döngüsüne sahip dokular üzerinde toksik etkilere sahip olduğunu vurgulamaktadır. Dox kaynaklı oksidatif stresin, sıçanlarda spermatositlerde ve spermatogonyumlarda apoptozise sebep olduğu ve bundan dolayı testis ağırlığında azalma gibi, doza bağlı önemli yan etkilere yol açtığı gösterilmiştir. Dox'un ovaryum toksisitesi ise granüloza hücrelerinde indüklenen apoptozis ve granüloza hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelinin azalması ile karakterizedir. Dox'un ovaryum folikül gelişimi, oosit maturasyonu ve hormon salgılanması üzerinde doza bağlı toksisiteye sebep olduğunu belirtilmektedir. Ayrıca, ovaryum boyutunda küçültme ve düşük ovulasyon oranı da Dox'a bağlı yan etkiler arasında yer almaktadır [36].

2.11. Hidroksitirozol

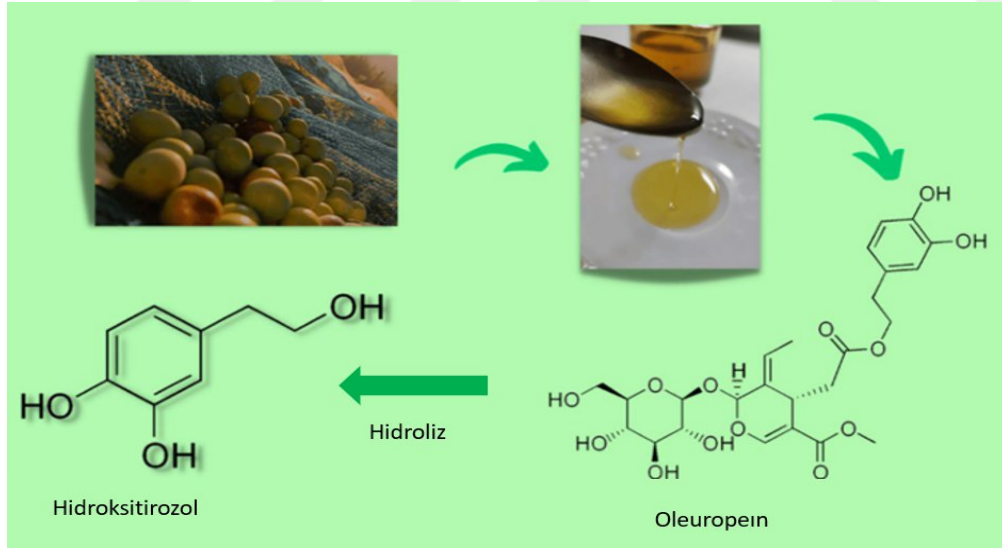
Zeytin, Akdeniz iklimine özgü, meyvesi yenen bir ağaç türüdür. Yunanca "elaia" ve Latince "olea" kelimelerinden türetilen bu bitki, genellikle 300-400 yıl yaşayabilir ve boyu 10 metre civarındadır [37].

Zeytinyağının içinde bulunan fenolik bileşikler, özellikle hidroksitirozol ve oleuropein gibi sekoiridoidler, güçlü antioksidan özelliklere sahiptir. Bu bileşiklerin, kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etme ve apoptozisi indükleme potansiyeli vardır. Zeytinyağı tüketiminin, kardiyovasküler hastalıklar, Parkinson ve Alzheimer gibi hastalıkların oluşum riskini azaltabileceği ve tedavi sürecinde faydalı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, zeytinyağının içeriğindeki oleik asit ve biyoaktif bileşenler, antioksidan özellikleri ile kronik hastalıkların önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Zeytinyağındaki biyoaktif bileşenlerin, vücuttaki oksidatif stresi azaltma ve inflamasyonu engelleme potansiyeli vardır. HT, oksidatif stres kaynaklı hasarı önleyebilir, hücre içi redoks faaliyetlerini kontrol edebilir ve çeşitli hastalıkların önlenmesine katkı sağlayabilir .

Zeytin yaprağı, kurutulup ruminantlar için düşük kaliteli kaba yem olarak kullanılabilir. Zeytin çekirdeği, kabuk ve posasından oluşan pirina ise, yüksek oranda ham selüloz, tanen ve fenolik bileşikler içerir [37].

Zeytinin kimyasal bileşimi, su (%50), yağ (%22), protein (%1,6), şeker (%19,1), selüloz (%5,8), mineral maddeler (%1,5) ve hidrokarbonlar, tokoferoller ve polifenoller içerir. Zeytin yaprağı, biyoaktif maddeler açısından oldukça zengindir; fenolik bileşikler (tirozol, HT, gallik asit, kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit), flavonoidler (kersetin, kateşin, apigenin, luteolin) ve sekoiridoidler (oleuropein, ligstrosit) içerir.

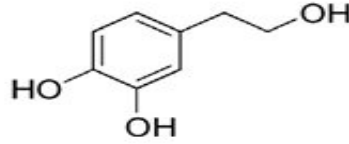
Hidroksitirozol, Akdeniz diyetinin temel bileşeni olan zeytinyağında bulunan güçlü bir fenolik bileşiktir. Bu bileşik, kalp hastalıkları ve kanser gibi hastalıkların ölüm oranlarının Akdeniz ülkelerinde düşük olmasına katkı sağlayan unsurlardan biridir. Zeytinyağının üretimi sırasında, zeytin ağacının (*Olea europea* L.) meyvesinin basınç altında ya da kimyasal yöntemlerle işlenmesiyle farklı tatlar ve kimyasal içerikler elde edilir. Basınç altında elde edilen zeytinyağı, yüksek HT içeriği ile dikkat çeker. HT, ekstra saf zeytinyağının içeriğinde genellikle 9-21 mg/kg arasında bulunur ve oleuropein'in hidrolizi sonucu oluşur. Zeytin yaprakları da, HT'nin antioksidan, antiaterosklerotik, antiviral ve antimikrobiyal özellikleri nedeniyle tedavi amaçlı kullanılır [38].



Şekil 2.6. Oleuropeinden hidroksitirozol elde edilmesi

Hidroksitirozol'un yüksek antioksidan kapasitesi, kanser ve kalp hastalıkları gibi hastalıklarla ilişkili etkilerinin araştırılmasına neden olmuştur. Aynı zamanda, HT bir metal şelatlayıcısı olarak da bilinir, demir katyonlarının şelatlanmasında önemli bir rol oynar ve

metal toksisitesinin neden olduğu oksidatif stresin önlenmesinde etkilidir. HT'nin ayrıca UV koruyucu özellikleri ve kalp damar sağlığını koruyucu etkileri bilinmektedir [38].



Şekil 2.7. Hidroksitirozol'ün kimyasal yapısı

Zeytin yaprağının antioksidan etkileri, serbest radikal toplayıcı ve metal şelatör olarak işlev görebilmesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, zeytin yaprağının antimikrobiyal özellikleri, virüs, bakteri, küf, mantar ve parazitlere karşı etkilidir. Yapılan toksikoloji çalışmalarında, zeytin yaprağı ekstresinin fareler üzerinde toksik etkiler göstermediği tespit edilmiştir [39].

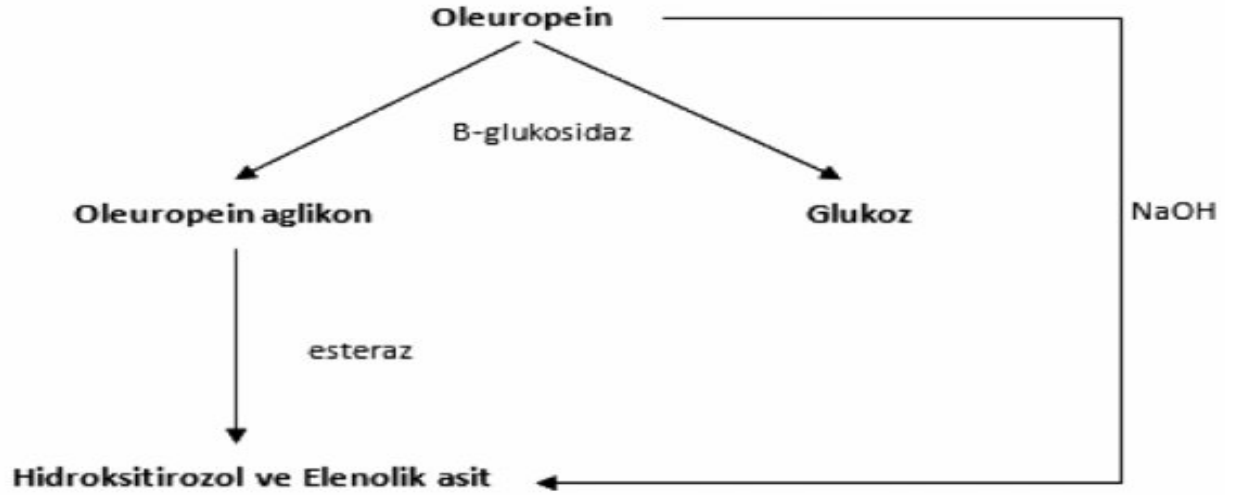
Tablo 2.2. Farklı ürünlerin içeriğinde bulunan hidroksitirozol miktarları

Ürün	HT içeriği
Beyaz şarap	1.5–2.70 mg/L
Kırmızı şarap	2–3.9 mg/L
Eski şarap	25 mg/L
Saf zeytinyağı	9–21 mg/kg
Zeytin yaprağı	10–17 mg/g

Hidroksitirozol zeytin polifenollerinden en güçlü antioksidan aktiviteye sahip olan bileşiktir. HT, serbest radikal toplayıcı ve metal şelatör olarak çalışarak oksidatif strese karşı hücrel savunma sistemlerini artırır. HT, anti-diyabetik etkiler göstererek insülin duyarlılığını iyileştirir ve diyabetik vaskülopatiyi önler. Aynı zamanda, hücrelerde insülin sinyalini düzenler ve diyabetik nöropatiyi engeller.

Hidroksitirozol, fenolik alkol yapısında olup, serbest formlarda dokulara daha rahat nüfuz eder. Çoğunlukla lipitlerde çözünür, ancak az da olsa suda çözünür. Zeytinyağında bulunan HT, antioksidan, anti-inflamatuar ve nöroprotektif özelliklere sahiptir ve sağlık üzerinde faydalı etkiler sağlar. Özellikle serbest radikal türlerini temizleyerek oksidatif strese karşı koruyucu bir etki gösterir. Antioksidan özelliklerinin yanı sıra, glukoz ve lipid

homeostazını düzenleyerek diyabeti engelleyebilir. Ayrıca, kardiyoprotektif, antikanser, nöroprotektif, antiinflamatuvar gibi çeşitli biyolojik etkilere sahiptir [39].



Şekil 2.8. Oleuropeinden hidroksitirozol ve elenoik asit oluşum mekanizması

Tablo 2.3. Zeytinyağında bulunan hidroksitirozolün biyoaktiviteleri

Fenolik Bileşik	Biyoaktivite	Bulgular
	Antioksidan aktivite	Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonuna karşı koruyucu etki DNA onarım proteinleri veya faz II detoksifikasyon enzimlerinin aktivitesini artırır
	Kardiyoprotektif özellik	LDL'nin oksidasyona olan direncinin sağlanması ile koroner kalp hastalığı insidansında azalma Toplam kolesterol düzeyinde azalma ve Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein (HDL) düzeyinde artışla oksidatif strese bağlı kronik ve dejeneratif hastalık riskinde azalma
Hidroksitirozol	Kemoprevansiyon	İnsan promiyelositik lösemi hücrelerinin ve kolon adenokarsinom hücre çoğalmasının inhibisyonu, meme kanseri riskinde %62 azalma
	Antiinflamatuvar	Enflamasyona sebep olan Tnf-a üretiminin inhibisyonu, COX ve INOX ekspresyonunu inhibe etme
	Nöroprotektif	Parkinson hastalığı tedavisinde monoamin oksidaz (MAO) inhibitörünün etkinliğini artırma, Alzheimer patolojisinde azalma
	Anti-mikrobiyal ve anti-viral özellik	İnsanda bağırsak ve solunum yolu enfeksiyonlarına sebep olan Staphylococcus aerous, Vibrio spp. Ve Salmonella spp. vb. farklı türlere karşı koruyucu etkinlik, in vitro anti-HIV aktivitesi

Zeytinyağı üretiminde ortaya çıkan atıklar, HT ve diğer fenolik bileşenler açısından zengindir. Bu bileşiklerin geri kazanılması, çevresel sürdürülebilirlik açısından önemlidir. Zeytinyağı üretiminden çıkan atıklar, biyodizel, biyogaz üretimi, hayvan yemi, fonksiyonel gıda bileşenleri ve ilaç sektörlerinde değerlendirilmektedir [39]. Zeytinyağı üretim atıklarından elde edilen HT, gıda sektöründe antioksidan olarak kullanılmakta ve bu da ekonomik fayda sağlamaktadır.

2.12. TRPC1 Testi

TRPC1 (Geçici reseptör potansiyel kanalı 1), geçici reseptör potansiyel (TRP) iyon kanallarının bir üyesidir ve bu kanal ailesi, 1986 yılında meyve sineği *Drosophila melanogaster*'de ilk kez keşfedilmiştir. Bu kanallar, başlangıçta görme sistemine dair çalışmalarda keşfedilmiştir ve fototransdüksiyon sürecinde kritik bir rol oynarlar [40]. TRP kanalları, fizyolojik süreçlerde önemli işlevler üstlenirler ve bu işlevler, kalsiyum (Ca^{2+}) iyonlarının hücre içindeki ve hücre dışındaki dengesini yönetmekle ilgilidir. TRPC1 ve diğer TRPC kanalları, kalsiyum iyonlarının hücre içine geçişini sağlar ve hücre içindeki Ca^{2+} seviyelerini düzenleyerek çeşitli hücresel yanıtları tetiklerler [41].

TRPC ailesi, yedi temel üyeye sahiptir ve her bir üye, farklı şekilde aktive edilebilir. Bu kanallar, kalsiyum geçirebilen seçici olmayan katyon kanallarıdır. TRPC1, özellikle Ca^{2+} ve diğer katyonların hücreye girmesine izin veren bir iyon kanalı olarak bilinir ve bununla birlikte, hücreler arası sinyal iletiminde, hücre proliferasyonu, apoptosis, hücre göçü gibi temel biyolojik süreçlerde önemli bir rol oynar [41].

TRPC1, özellikle depo tükenmesi (store-depletion) ile aktive olan store-operated calcium entry (epoya bağlı kalsiyum girişi mekanizması) (SOCE) kanallarının bileşenidir. SOCE, hücre içindeki kalsiyum depolarının (örneğin endoplazmik retikulum) tükenmesiyle aktive olur. Endoplazmik retikulum içindeki Ca^{2+} depolarının tükenmesi, stromal etkileşim molekülü 1 (STIM1) gibi sensör proteinlerinin oligomerleşmesine ve ardından bu proteinlerin plazma membranına hareket etmesine yol açar. STIM1, TRPC1 kanalları ile etkileşime girerek onların aktivasyonunu sağlar. TRPC1'in SOCE'ye katılımı, hücrelerin kalsiyum dengesini sağlamada kritik bir rol oynar. TRPC1, geniş bir dokuda ekspresyon gösteren bir proteindir. Beyin, kalp, düz kas hücreleri, testisler, overler, endotel hücreleri ve bazı salgı bezlerinde yüksek miktarda bulunur [41].

TRPC1, özellikle damar düz kas hücrelerinde ve endotel hücrelerinde önemli roller üstlenir. Damar düz kas hücrelerinde, TRPC1'in aracılık ettiği kalsiyum girişi, kasılma, gevşeme ve hücre proliferasyonu gibi süreçleri düzenler. Örneğin, sıçan torasik aortasında yapılan bir çalışmada, TRPC1'in antikorlarla blokajı, endotel hücrelerinden kaynaklanan kasılmayı inhibe etmiştir. Bu tür bulgular, TRPC1'in damar sağlığı ve kan basıncı üzerinde önemli etkiler yapabileceğini göstermektedir [42].

TRPC1'in ayrıca hücre proliferasyonu, farklılaşma ve hücre göçü gibi hücresel süreçlerle ilişkili olduğu da bilinmektedir. Bununla birlikte, TRPC1'in işlevselliği, diğer TRPC izoformlarıyla etkileşime girerek daha karmaşık yapılar oluşturmaya da bağlıdır.

Yalnızca TRPC1'in tek başına çalışması, bazı hücresel yanıtları başlatmak için yeterli olmayabilir [43].

TRPC1'in biyolojik rolü, kanser araştırmalarında da büyük bir öneme sahiptir. Çeşitli kanser türlerinde, TRPC1'in rolü araştırılmaktadır. Kanser hücrelerinin proliferasyonu, göçü, invazyonu ve hayatta kalması gibi süreçlerde TRPC1'in önemli bir rolü olabilir. Örneğin, meme kanseri, pankreas kanseri, akciğer kanseri ve glioblastoma gibi kanser türlerinde, TRPC1'in artan ekspresyonu, bu kanserlerin ilerlemesine yardımcı olabilir [43]. Bazı araştırmalar, TRPC1'in bağımsız olarak bir iyon kanalı oluşturmak için yeterli olmadığını ve yalnızca diğer TRPC kanallarıyla birlikte çalıştığında etkili olduğunu öne sürmektedir.

TRPC1, sadece kalsiyum sinyalizasyonu ile sınırlı değildir. Bu kanal, hücre içindeki diğer işlevlere de katılır. Örneğin, hücre döngüsünün düzenlenmesi, gen ekspresyonu, kasların kasılma ve gevşeme döngüsünde yer alır. TRPC1'in çeşitli hücresel yollarla etkileşimde bulunarak hücresel düzeyde önemli işlevler gerçekleştirdiği bilinmektedir [43]. Ayrıca, TRPC1'in kaveola olarak bilinen hücresel yapı ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir. Kaveolalar, kalsiyum sinyali, kolesterol taşınımı ve endositoz gibi hücresel süreçlere katılır. TRPC1'in membranda bulunan kaveola bölgelerinde yoğunlaşması, bu kanalın kasılma ve gevşeme döngülerinde rol oynadığını ve bunun fizyolojik işlevlerde önemli bir yere sahip olduğunu göstermektedir. Kaveola bölgeleri, özellikle düz kas hücrelerinde ve endotel hücrelerinde yoğun olup, bu bölgelerde TRPC1'in SOCE aracılığıyla kalsiyum girişini düzenlediği gösterilmiştir.

TRPC1, hücresel kalsiyum homeostazını ve çeşitli fizyolojik süreçleri düzenleyen önemli bir iyon kanalıdır. TRPC1'in SOCE'deki rolü, kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve metastazını etkileyebilir, bu nedenle bu kanalın terapötik hedef olarak kullanılması, yeni tedavi stratejileri geliştirilmesine katkı sağlayabilir [40]. TRPC1'in genetik ve farmakolojik araçlarla düzenlenmesi, yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde önemli bir fırsat sunmaktadır [44].

2.13.Histopatolojik Çalışma Yöntemleri

2.13.1. Hematoksilen-eozin

Hematoksilen-Eozin (H&E) boyama tekniği, rutin histopatolojik analizlerde en sık kullanılan boyama yöntemlerinden biridir. Hematoksilen, nükleik asitleri, eozin ise proteinleri boyar, bu sayede hücre ve doku yapıları hakkında temel bilgi edinilmesine olanak

tanır. H&E boyası, sadeliği, düşük maliyeti, kolay uygulanabilirliği ve ileri teknik altyapı gerektirmemesi nedeniyle bir yüzyıldan fazla bir süredir histopatolojide en önemli yardımcılardan biri olmuştur. Ayrıca, kanser tanısında da kritik rol oynamaktadır [45],[46].

Hematoksilen kelimesi, Yunanca "kan" anlamına gelen *haimato* ve "ağaç" anlamına gelen *xylon* kelimelerinden türetilmiştir. Hematoksilen, *Haematoxylon campechianum* adlı ağacın kaynatılması ve kristalleştirilmesiyle elde edilir. 1500'lü yıllarda, yerli halk tarafından kullanılan bu doğal boyayı, İspanyol gezginleri Avrupa'ya getirmiş ve tekstil sanayinde kullanmaya başlanmıştır. Hematoksilenin aktif formu olan hematein, bir mordant ile birleştğinde dokuları koyu maviden siyaha kadar boyar. 1865 yılında, Bohmer mordant kullanarak hematoksilenle başarılı bir şekilde doku boyamıştır [46].

Eosin, katrandan elde edilen sentetik bir turuncu-pembe renkli boyadır ve Yunanca *şafak* anlamına gelen "eos" kelimesinden türetilmiştir. İlk kez 1871'de sentezlenmiş ve 1876'da Dreschfeld ve Fischer tarafından doku boyası olarak kullanılmıştır. Eosin, non-spesifik olarak proteinleri boyar ve genellikle sitoplazma ve hücre dışı maddelerde pembenin farklı tonlarını ortaya çıkarır. Hematoksilen ile birlikte kullanıldığında, çekirdekler mavi-siyah renkte boyanırken, sitoplazma ve hücre dışı maddeler pembenin tonlarında boyanır [46].

Hematoksilen&eosin boyası, histopatoloji laboratuvarlarında primer diagnostik teknik olarak kabul edilmektedir. Pek çok malignensi tanısı H&E boyamasına dayanır. Bugün, biyomedikal araştırmalarda, ileri düzey tekniklerle birlikte H&E boyası hala yaygın olarak kullanılmaktadır. H&E boyama, özellikle hücre çekirdeklerinin detaylı incelenmesi, heterokromatin ve kromatin yapılarının analizi açısından önemlidir.

Hematoksilenin aktif formu olan hematein, asidik pH'da kırmızı, bazik pH'da ise mavi renkte boyama yapar. Hematoksilen, metal tuzları (mordant) ile birleşerek, nükleusları boyamak için etkili bir araçtır. Ayrıca, çeşitli metallerle birleştğinde farklı renkler elde edilir: Demir ve krom ile mavi-siyah, bakır ile mavi-yeşil, kurşun ile koyu kahverengi renkler ortaya çıkar.

Eosin, özellikle proteinleri boyamada etkilidir ve farklı formülasyonları, histopatolojik analizlerde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Eosin Y, hafif sarı renkteyken, Eosin B mavimsi bir renge sahiptir. Boya, hücre sitoplazmasını, kas liflerini, kollajeni ve diğer protein yapıları farklı tonlarda boyar.

Hematoksilen ve eosinin kombinasyonu, dokularda çekirdekler ile sitoplazma arasındaki kontrastı net bir şekilde belirler. Hematoksilen, nükleik asitleri mavi-siyah renkte

boyarken, eozin, proteinleri pembe veya kırmızımsı tonlarla boyar. Bu sayede, dokuların mikroskopik analizinde önemli morfolojik bilgiler elde edilir. H&E boyaması, nükleusların, sitoplazmanın, hücre dışı maddelerin ve diğer doku elemanlarının hızlı ve verimli bir şekilde ayırt edilmesini sağlar [46].

Hematoksilen ve eosin boyama, histopatolojide yıllardır en temel ve en sık kullanılan yöntemlerden biri olmayı sürdürmektedir. H&E'nin kimyasal özellikleri, bu boyama tekniğinin doku analizinde neden bu kadar etkili olduğunu açıklar. H&E'nin birleşimi, histopatolojik çalışmalarda da önemli bir yer tutmaya devam edecek gibi görünmektedir [46].

2.13.2. Masson trikrom

Trikrom yöntemleri, patolojide kullanılan H&E tekniğinin yerini almaktadır. Bu yöntemler, bağ dokusunun topografik sınırlarının belirlenmesiyle teşhisi kolaylaştırmakta ve skleroz gibi bu dokunun reaksiyonlarını hızlı bir şekilde tespit etmeye olanak sağlamaktadır [47]. Masson'un trikrom boyama yöntemi, bu alandaki en iyi tekniklerden biri olmaya devam etmektedir. Bunun nedeni, Heidenhain'in demir hematoksileni, asit fuşin ve ponceau de xylidine gibi detay açısından zengin sitoplazma boyalarıyla ve bağ dokusu için oldukça seçici olan açık yeşil veya anilin mavisi gibi boyalarla birleştirmesidir [47].

Masson trikrom (MT) boyama yöntemi, bağ dokusu ve diğer yapıları ayırt etmede etkili bir tekniktir. Yöntem, 24 saat boyunca amonyum-demir ile mordanlama ve ardından aynı süre boyunca Regaud'un hematoksileni ile boyama gerektirir. Bu işlem, mordanlama süresinin 30 dakika, boyama süresinin ise 50°C'de aynı süre boyunca yapılmasıyla kısaltılabilir. Boyama süresi daha da kısaltıldığında, hassasiyet kaybı yaşanabilir ve nükleuslar hızla solarak fuşin ile yer değiştirebilir. Ayrıca, nükleuslar pikrik asit alkolü ile farklılaştırılmalıdır ve bu işlem mikroskop altında izlenmelidir. Ancak, yüzlerce kesit boyamak gerektiğinde bu mükemmel trikrom yöntemi uygulamak oldukça zordur [48].

Masson trikrom boyaması, iskelet kası gibi doku kesitlerinde, morfolojik değişiklikleri tespit etmek için hızlı bir yöntemdir. Bu boyama, kollajen liflerinin birikim düzeyini belirler ve üç farklı boyanın kombinasyonunu kullanarak kas liflerini (kırmızı), kollajeni (mavi) ve çekirdekleri (siyah) ayırt edebilir. Boyama, kollajen liflerini yoğun bir şekilde mavi renkte boyar, ancak bazal membran gibi diğer alanlar seçici olarak boyanmaz [48].

Masson trikromu, bağ dokusundaki kollajen liflerinin kantitatif görselleştirilmesini ve analizini sağlar. Kollajen, mavi renkte boyanırken, kırmızı arka plan gözlemi zorlaştırabilir. MT'nin temel prensibi, dokulardaki asidik ve bazik seviyeler arasındaki farklara dayanır [49].

Masson trikrom boyaması, yara iyileşmesinin değerlendirilmesinde önemli morfolojik anahtarları net bir şekilde ayırt etme yeteneğine sahiptir. Keratin, hemogloblin ve kas lifleri (kırmızı renk), sitoplazma ve adiposit hücreleri (açık kırmızı veya pembe), hücre çekirdekleri (koyu kahverengiden siyaha) ve kollajen lifleri (mavi renk) kolayca ayırt edilebilir [49]. Boyama yöntemi, yara iyileşmesinin her aşamasında kollajen liflerinin migrasyonu ve yeniden organizasyonunu açıkça gösterir. Bu süreç, yara iyileşme sürecinin anlaşılmasına yardımcı olur ve iyileşen deri dokusundaki kollajen liflerinin farklılaşmasını net bir şekilde gözler önüne serer.

Masson trikrom boyaması, tıbbi patoloji laboratuvarlarında tümörlerde kollajen ve düz kası ayırt etmek, siroz gibi hastalıklarda kollajen artışını belirlemek ve karaciğer ve böbrekler için rutin bir boyama olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak, MT boyamasının yara iyileşmesindeki kullanımına dair sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Sonuçlar, MT boyamasının yara iyileşmesi sürecindeki kollajen liflerinin migrasyonunu ve yeniden organizasyonunu anlamamıza katkı sağladığını göstermektedir. Bu boyama yöntemi, kollajen liflerini mavi renkte belirgin bir şekilde göstermekle kalmaz, aynı zamanda yara iyileşmesinin tüm aşamalarını histopatolojik olarak incelememize olanak tanır.

Masson trikrom boyaması, yara iyileşmesi ve bağ dokusu hastalıkları üzerine yapılan histopatolojik çalışmalarda önemli bir rol oynamaktadır. Boyamanın, kollajen liflerinin düzenini, yoğunluğunu ve organizasyonunu net bir şekilde ayırt etme yeteneği, histopatologlar için yararlı bir araçtır. Bu teknik, histolojik analizlerde doğruluğu artırır ve yara iyileşmesi sürecinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlar [49].

2.14. İmmünohistokimyasal Yöntem

İmmünohistokimya (IHK), adından da anlaşılacağı gibi histoloji ve immünolojinin birleşimidir ve belirli bir antijenin dokudaki varlığını ve mikroanatomik konumunu saptamak için kullanılan güçlü bir tekniktir. IHK, monoklonal ve poliklonal antikorların kullanıldığı bir yöntem olup, sağlık ve hastalık durumlarında ilgilenilen antijenlerin doku içindeki dağılımını belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır [50].

IHK, özellikle kanser teşhisinde önemli bir yer tutar. Bazı kanser türlerinde spesifik tümör antijenleri *de novo* olarak ifade edilir ya da yukarı regüle edilir; bu durum IHK'yi tanıda güçlü bir araç haline getirir. Bu teknik, başta onkolojik patoloji, nöropatoloji ve hematopatoloji olmak üzere birçok patoloji alt dalında rutin olarak uygulanmaktadır. Ayrıca, hastalık teşhisi, ilaç geliştirme ve biyolojik araştırmalarda da kullanılmaktadır [51].

İmmünohistokimyasal analizler, biyopsi örneklerinin mikrotom ile ince kesitler halinde hazırlanmasının ardından, bu kesitlerin spesifik antikorlarla inkübe edilmesiyle gerçekleştirilir [52]. Antijen–antikor bağlanması, birincil veya ikincil antikora bağlanmış enzim, floresan boya, radyoaktif element veya kolloidal altın gibi işaretleyiciler aracılığıyla görünür hale getirilir. Görselleştirme, ışık veya floresan mikroskop ile yapılır. Bu işlem sayesinde hem doku mimarisi korunur hem de pozitif hücrelerin yerleşimi doğrudan gözlemlenebilir [53].

IHK'nin tarihi 1930'lara dayansa da, ilk uygulaması 1941 yılında Coons ve arkadaşlarının pnömokok antijenlerini floresan boya (FITC) ile işaretli antikorlarla lokalize etmesiyle başlamıştır. Zamanla peroksidaz, alkalın fosfataz ve kolloidal altın gibi farklı işaretleyiciler geliştirilmiş, hem ışık hem de elektron mikroskopisi düzeyinde kullanılabilir hale gelmiştir. IHK'nin en büyük avantajı, özel enzim boyama tekniklerinin sınırlı sayıda protein ve yapıyı tanımlayabilmesine karşın, spesifik antijen–antikor etkileşimleri sayesinde çok daha geniş bir hedef protein yelpazesinde çalışabilmesidir. Bu yönüyle IHK, klasik histokimyasal yöntemlerin ötesine geçerek çok önemli bir tanı ve araştırma aracı haline gelmiştir [54].

Ayrıca, IHK ile tümöre özgü antijenler, onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve proliferasyon belirteçleri tanımlanabilir. Bu sayede tümörlerin prognozu hakkında bilgi sağlanabilir; hatta bu yöntem, klasik klinik evreleme ve histolojik derecelendirme yöntemlerine kıyasla daha ayrıntılı ve anlamlı bir prognostik değerlendirme sunabilir. Klinik uygulamalarda, IHK ile kanserin iyi huylu ya da kötü huylu olup olmadığı, evresi, derecesi ve metastazın hücre tipi ya da kökeni belirlenebilir [54].

İmmünohistokimya aynı zamanda enfeksiyöz ajanların saptanmasında da etkilidir. Mikrobiyal DNA veya RNA'ya karşı geliştirilen spesifik antikorlar sayesinde enfekte dokularda enfeksiyonun varlığı doğrulanabilir.

Sonuç olarak, immünohistokimya, yalnızca patolojide değil; moleküler biyoloji, farmakoloji, mikrobiyoloji ve immünoloji gibi çok çeşitli disiplinlerde de yaygın şekilde kullanılan, hücre popülasyonlarını ve fonksiyonlarını ayırt etmede, hastalık mekanizmalarını

anlamada ve yeni tedavi stratejileri geliştirmede kritik rol oynayan çok yönlü bir tekniktir [54].

İmmnositokimya, bir proteinin hem hücresel düzeyde hem de hücre altı düzeydeki dağılımını belirlemek için en doğrudan yöntemlerden biridir. Spesifik antikorlar sayesinde protein modifikasyonları ve ifadesi in vivo olarak incelenebilir.

Bu bağlamda İmmünohistokimya (İHK), formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş dokularda spesifik antijenlerin lokalizasyonunu antijen–antikor etkileşimine dayanarak belirlemede güçlü bir yöntemdir. Bu teknik, özellikle dermatolojik tanı ve araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Kullanım kolaylığı, güvenilirliği ve çok yönlülüğü sayesinde uygulama alanları giderek genişlemektedir [54].

İmmünohistokimya’da antijen–antikor kompleksi, ışık mikroskobu altında bir renk sinyali aracılığıyla görünür hale getirilir. İHK’nin immünfloresan tekniklere göre en önemli avantajlarından biri, hematoksilen (mavi) gibi karşı boyalar kullanılarak antijenin çevresindeki doku morfolojisinin de net bir şekilde gözlemlenebilmesidir.

İmmünohistokimya ile elde edilen boyama sonuçları yarı kantitatif olarak raporlanır. Bu sonuçlar, özellikle deri tümörleri, lenfomalar ve enfeksiyöz mikroorganizmaların tespiti açısından önemli tanısıl ve prognostik bilgiler sağlar.

Bu alışma elde edilen veriler doğrultusunda, doğurganlık çağındaki kadınlarda sıkça görülen meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan Dox’un sistemik etkilerle ovaryum dokusunda oluşturduğu toksisiteye karşı, zeytin yapağı ekstresinden elde edilen hidroksitirosolün koruyucu etkisini araştırmayı amaçlamaktadır. Dox kaynaklı toksisiteyi ve hidroksitirosolün bu toksisite üzerindeki terapötik etkilerini değerlendirmek amacıyla, doku rnekleri H&E ve MT ile histokimyasal olarak incelenmiştir. Ayrıca, over dokusunda TRPC1 immnreaktivitesini değerlendirmek üzere immünohistokimyasal boyama yapılmış ve elde edilen bulgular ışık mikroskobu altında gözlemlenmiştir. Histolojik değişiklikler Masson Trikrom boyaması ve ilgili analizlerle tespit edilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Deney Hayvanları

Adıyaman Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEHAM) 07.11.2024 tarih ve 2024/049 nolu etik kurul kararınca onaylandı. Deney hayvanları, Adıyaman Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEHAM)'dan karşılandı.

3.2. Deney Planı

Bu çalışmada 8-10 haftalık, Sprague Dawley cinsi, 200-250 gr ağırlığında 28 adet dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlara 12 saat gün ışığı/12 saat karanlık siklusta, havalandırmalı, sabit ısı (21 $\pm$ 1 C°) odalarda ve özel kafeslerde standartlara uygun olarak bakıldı ve beslenmeleri 8 mm' lik standart sıçan pelet yemi ve musluk suyu ile sağlandı. Uygulanacak dozlar için önceki yapılan çalışmalar referans alındı [54].

Grup 1: Kontrol (Sham) grubu (n=7): Bu gruptaki sıçanlara 4 hafta boyunca oral yoldan 1 ml serum fizyolojik verildi ayrıca deneyin ilk günü intraperitoneal olarak serum fizyolojik enjekte edildi.

Grup 2: HT grubu (n=7): HT 4 hafta boyunca 4 ml/kg/gün oral yoldan verildi.

Grup 3: DOX grubu (n=7): Deneyin 1. günü tek doz şeklinde 10 mg/kg/gün dozunda doxorubicin ip. yolla uygulandı.

Grup 4: HT + DOX grubu (n=7): Deneyin 1. günü tek doz şeklinde 10 mg/kg/gün dozunda DOX ip. yolla uygulandı. Uygulama sonrasında HT 4 hafta boyunca 4 ml/kg/gün oral yoldan verildi.

3.3. Deneyin Sonlandırılması

Deney sonunda tüm sıçanlara 50 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilasin karışımının periton içi enjeksiyonu ile anestezi uygulandı. Sağ juguler arter kateterize edildi ve kan örnekleme için kullanıldı. Biyokimyasal ve histopatolojik değerlendirme için over doku örnekleri alındı. Kalan dokular da çıkarıldı. Over ve dokuların bir kısmı %10 formalin içinde sabitlendi ve sonraki histolojik değerlendirme için parafin içinde işlendi. Serum ve dokuların bir kısmı -80 °C'de saklandı.

3.4. Histolojik İnceleme

Her gruptan alınan over dokuları, % 10'luk formaldehit solüsyonunda 24 saat süresince tespit edildikten sonra musluk suyu altında yıkamaya alındı. Musluk suyunda 24

saat yıkanan dokular daha sonra rutin histolojik takip serilerinden geçirilip parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan alınan 5µm'lik kesitler Hematoksilen-Eozin (H&E) boyası yapıldı. Hazırlanan preparatlar Zeiss AX 10 mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. Her grup için yaklaşık 4-10 hematoksilen-eozin boyalı kesitler incelendi ve lezyon alanlarını en iyi temsil eden örnekler seçilerek immünohistokimyasal inceleme için kullanıldı.

3.4.1. Hematoksilen - eozin boyama (H&E) prosedürü

1. Deparafinizasyon: Dokular 10'ar dakika sürelerle ksilol içerisinde bekletildi.
2. Dehidrasyon: Rehidrate edilmiş dokular sırasıyla Absolut alkol, %95'lik alkol, %80'lik alkol ve %70'lik alkolden 10'ar dakika süreyle geçirildi..
3. Hematoksilen aşaması: Dokular hematoksilene alınıp, 5-6 dakika boyunca tutuldu.
4. İlk yıkama: Hematoksilenden çıkarılan dokular akan su altında yaklaşık olarak 5-10 dakika boyunca yıkandı.
5. Asit alkol aşaması: Yıkanan dokular asit alkole daldırılıp, birkaç saniye soluk mavi renk alana kadar tutuldu ve ikinci yıkamaya alındı. 5-10 dakika kadar akan suda yıkandı.
6. Eozin aşaması: İkinci yıkamaya tabi tutulan dokular eozine daldırılıp, 3-4 dakika boyunca tutuldu.
- 7.Çıkış alkolü aşaması: Dehidrasyonda olduğu gibidir ancak alkollerin sırası terstir. Dokulardaki fazla eozini uzaklaştırmak için sırasıyla %70, %80, %95 ve absolut alkolden geçirildi. İlk 3 alkole dokular daldırılıp, çıkarılırken absolut alkolde 15-20 dakika tutuldu.
8. Çıkış ksilol'ü aşaması: Dokular çıkış alkolünden alındı. Birkaç dakika dışarıda kurumaya bırakıldı ve çıkış ksilol'üne alındı. 10'ar dakika 3 tane ksilol'den geçirildi.
9. Yapıştırma: Çıkış ksilol'ündeki dokular yapıştırma ksilol'üne alındı. Burada teker teker çıkarılıp, sentetik reçine (Entellan) ile yapıştırılıp kurumaya bırakıldı.

3.4.2. Masson Trikrom boyama prosedürü

Ksilol ve alkol serilerinden geçirilen dokular çeşme ve distile sudan geçirilip weigerth hematoksilen ile muamelenin ardından tekrar çeşme ve distile sudan geçirilip suyu bierbrich scarlet asit fuksinden geçirildi. Distile suda çalkalanıp fosfotungustik-fosfomolibdik asit (her boyama için yeniden hazırlandı) ve aniline blue ile muamelenin ardından, distile su ve (asitli su) glacial asetik asit (%1) den geçirildi. Dereceli alkol, sonra ksilol serilerinin ardından kapatıldı.

Histopatolojik incelemeler (H&E ve Masson Trikrom boyama) için hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Zeiss Axio scope A1) incelenip fotoğraflandı. Dokulardaki histopatolojik değişiklikler, yarı kantitatif olarak değerlendirildi. Her parametre için skorlamalar; 0=yok, 1=zayıf, 2=orta ve 3=güçlü olarak verildi ve istatistiksel analizleri yapıldı.

3.4.3. İmmünohistokimyasal inceleme

İmmünohistokimyasal inceleme için her gruptan yaklaşık 4-10 hematoksilen-eozin boyalı kesitler incelenerek lezyon alanlarını en iyi temsil eden örnekler kullanıldı.

Over dokusunda TRPC1 immünreaktivitesinin belirlenmesi için Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleksi yöntemi uygulandı. Parafin bloklardan 4-6 mm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirilip, antigen retrieval için sitrat tampon solüsyonunda pH:6'da mikrodalga fırında (750W) 12 dakika kaynatıldı. Kaynatma sonrası oda ısısında yaklaşık 20 dakika soğutmak için bekletilen dokular PBS (Phosphate Buffered Saline, P4417, Sigma-Aldrich, USA) ile yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için hidrojen peroksid blok solusyonu ile 5 dakika inkübe edildi (Hydrogen Peroxide Block , TA-125-HP, Lab Vision Corporation, USA). PBS ile yıkanan dokulara zemin boyasını engellemek için 5 dakika Ultra V Block (TA-125-UB, Lab Vision Corporation, USA) solüsyonu uygulandıktan sonra 1/200 oranında dilüe edilen primer antikor ile nemli ortamda oda ısısında 60 dakika inkübe edildi. Dokular, primer antikor uygulanmasından sonra PBS ile yıkandıktan sonra primer antikorlarla uyumlu monoklonal sekonder antikorlar ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Dokular, sekonder antikor uygulanmasından sonra PBS ile yıkayıp Streptavidin Peroxidase (TS-125-HR, Lab Vision Corporation, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildikten sonra PBS içerisine alındı. Dokulara 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) Substrate + AEC Chromogen (AEC Substrate, TA-015 ve HAS, AEC Chromogen, TA-002-HAC, Lab Vision Corporation, USA) solüsyonu damlatılıp, ışık mikroskopunda görüntü sinyali alındıktan sonra eş zamanlı olarak PBS ile yıkamaya alındı. Mayer's hematoksilen ile zıt boyaması yapılan dokular PBS ve distile sudan geçirilerek uygun kapatma solusyonu (Large Volume Vision Mount, TA-125-UG, Lab Vision Corporation, USA) ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Zeiss Axio scope A1 mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı (Zeiss Axio scope A1). Boyamada immünreaktivitenin yaygınlığı (0.1: (0: yok, +0.5: çok az, +1: az, +2: orta, +3: şiddetli) esas

alınarak histoskor oluşturuldu. Elde edilen histoskor verileri SPSS programında analiz edildi.

Histoskor= yaygınlık x şiddet

3.5. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler ortalama± standart hata (SH) olarak ifade edildi. Ortalamalar arasındaki farkların istatistiksel anlamlılık düzeylerini belirlemek için SPSS paket istatistik programı kullanıldı. İstatistiksel farklar bağımsız gruplarda “one-way ANOVA” ve “independent-t” testleri ile hesaplandı. Aynı grubun farklı zaman noktalarındaki değerleri arasındaki farkı değerlendirmek için “paired t test” kullanıldı. Elde edilen sonuçların yorumlanmasında $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.6. Kullanılan Kimyasallar

Hidroksitirozol, Türkiye'deki Kale Naturel Bitkisel Ürünler Şirketi'nden sıvı formda elde edildi. Koçak Firmasına ait Doxorubicin 10 mg I.V./intravesikal infüzyon için liyofilize toz içeren flakon ticari olarak temin edildi.

4.BULGULAR

4.1. Histopatolojik Bulgular

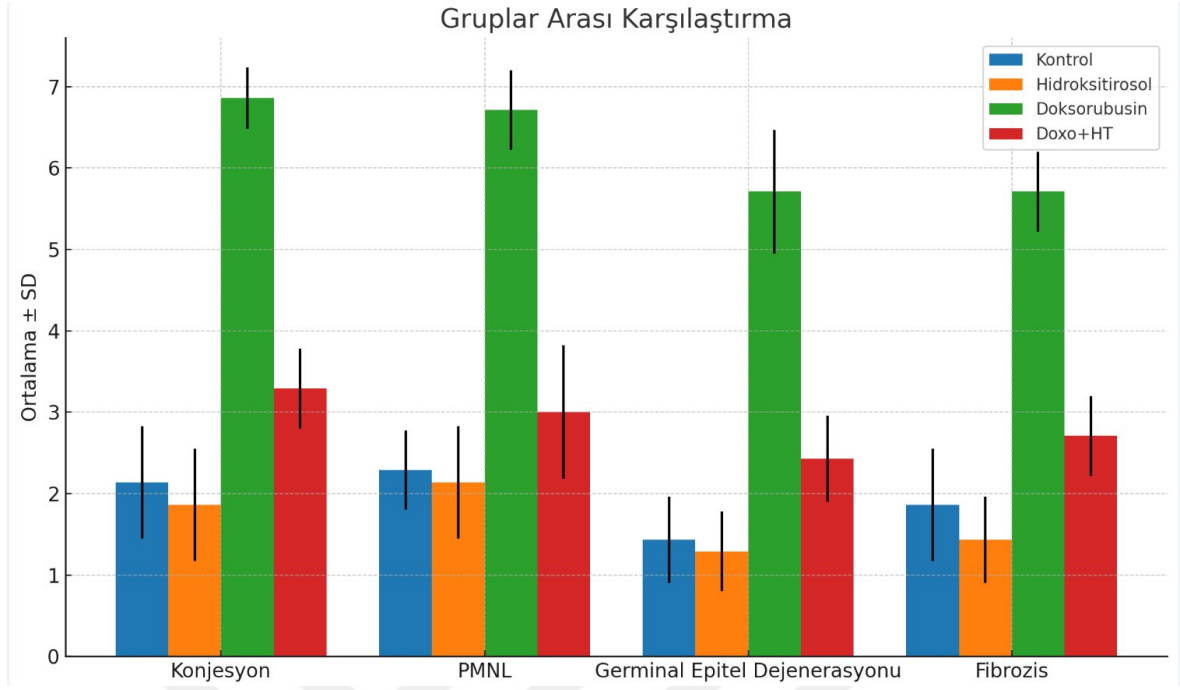
Tüm grupların Hematoksilen-Eozin ve Masson trikrom boyalı preparatlarının ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucunda, kontrol ve HT grupları normal görünümdeydi (Tablo 4) (Şekil 9,10,14,15).

Over dokusunda doxorubisin uygulaması sonucunda konjesyon, polimorfonükleer lökositler (PNML), germinal epitel dejenerasyonu ve fibroziste kontrol ve HT gruplarına göre artış görüldü ($p<0,001$) (Tablo 4) (Şekil 11,12,16). Dox ile birlikte tedavi amacıyla HT uygulanan gruplarda ise, konjesyon, PMNL, germinal epitel dejenerasyonu ve fibroziste sadece doxorubisin uygulanan gruba göre anlamlı azalma gözlemlendi ($p<0,001$) (Tablo 4) (Şekil 13,17).

Tablo 4.1. Over dokusunda histopatolojik bulgular (hematoksilen ve eosin)

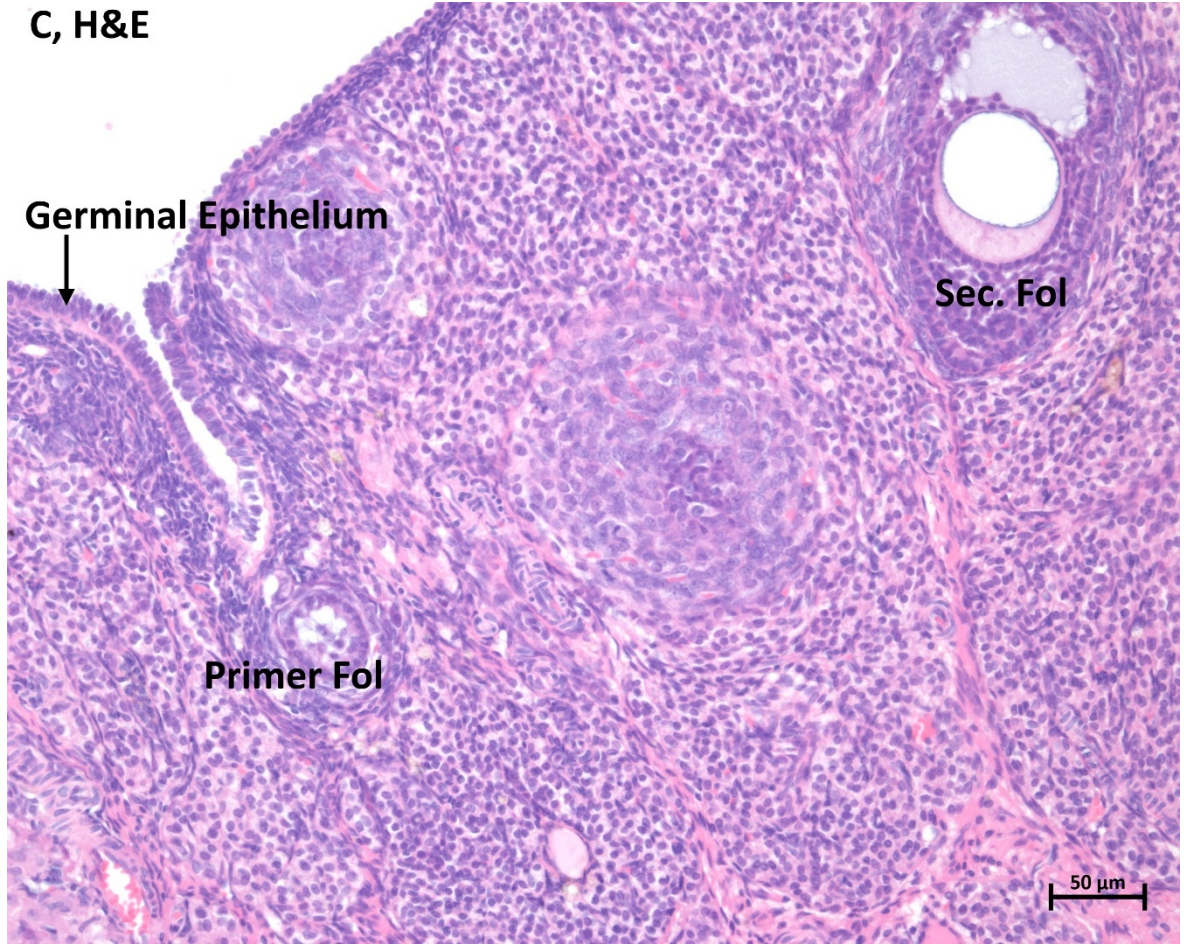
Gruplar	Kontrol	Hidroksitirozol	Doksorubisin	Doxo+HT
Konjesyon	2.14±0.69	1.86±0.69	6.86±0.38 ab	3.29±0.49 abc
PMNL	2.29±0.49	2.14±0.69	6.71±0.49 ab	3±0.82 c
Germinal Epitel Dejenerasyonu	1.43±0.53	1.29±0.49	5.71±0.76 ab	2.43±0.53 abc
Fibrozis	1.86±0.69	1.43±0.53	5.71±0.49 ab	2.71±0.49 bc

Hata çubukları SD'yi gösterir. a. Kontrol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$ b. HT ile karşılaştırıldığında $p<0.05$. c. Doxo ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.

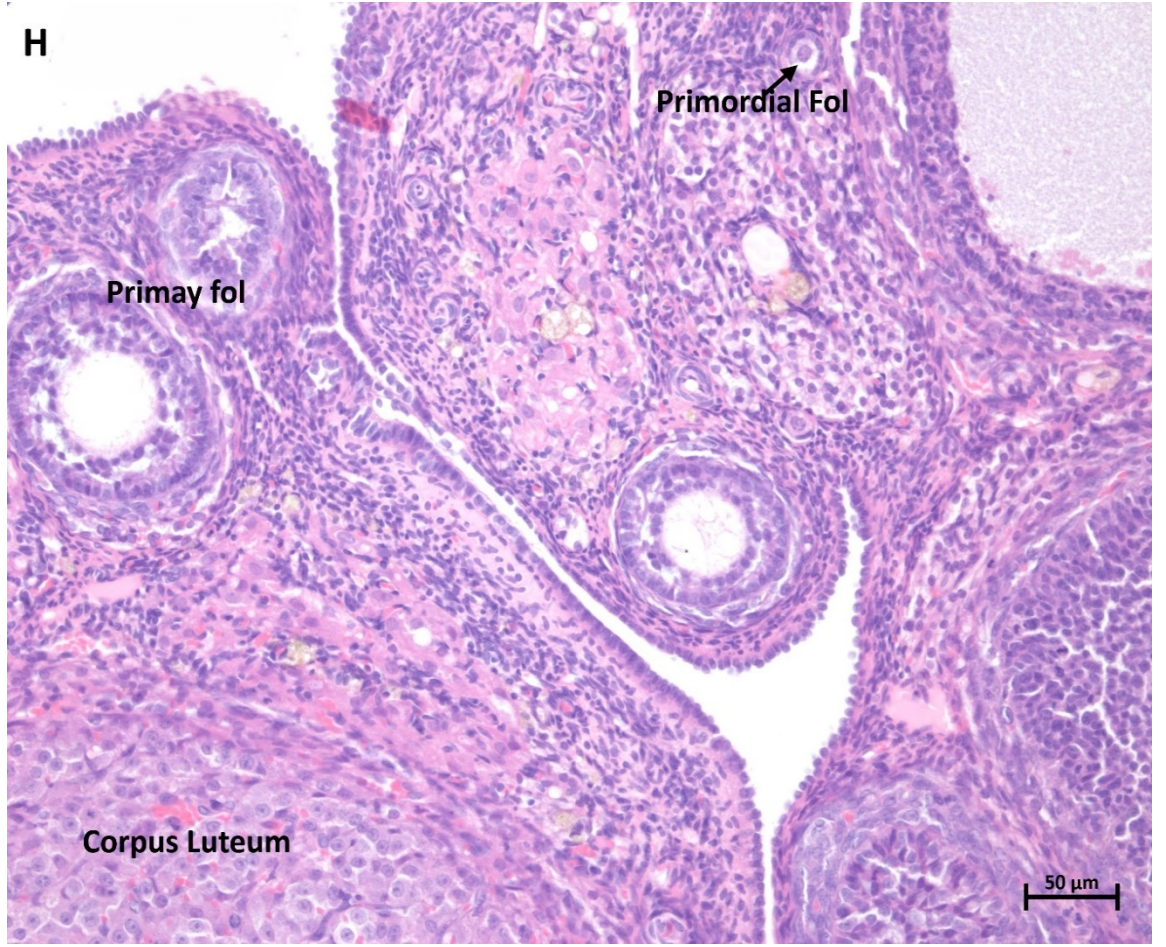


Şekil 4.1. Over dokusunda histopatolojik bulgular (hematoksilen ve eosin)

Doksorubisin grubu diğer gruplara göre açıkça daha yüksek değerler gösteriyor. **Doxo+HT** grubunda ise bu değerlerin kısmen düştüğü gözlemleniyor, yani hidroksitirozolün kısmi koruyucu etkisi görünüyor.

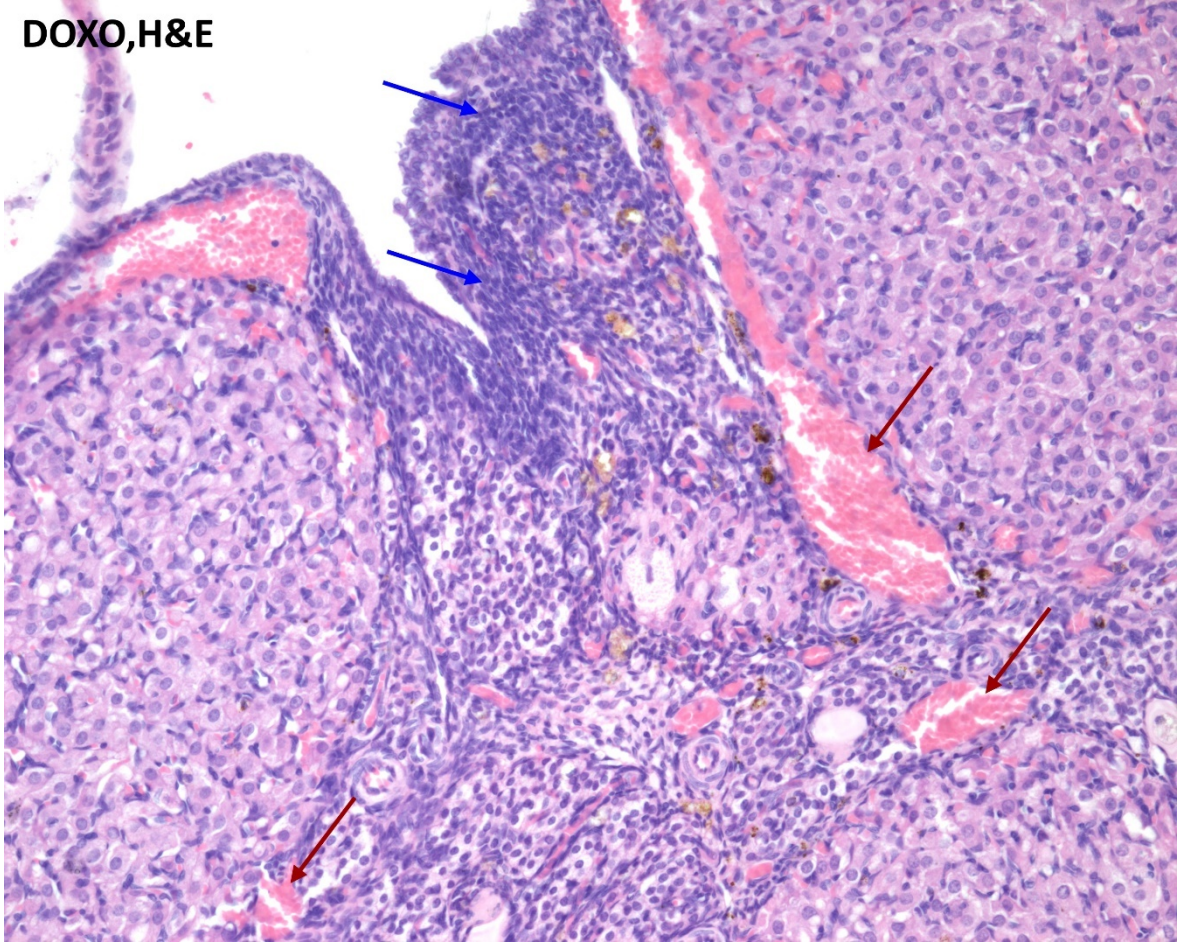


Şekil 4.2. Kontrol grubu ovaryum dokusuna ait kesitlerde folikül ve epitel kesitleri (H&Ex50)

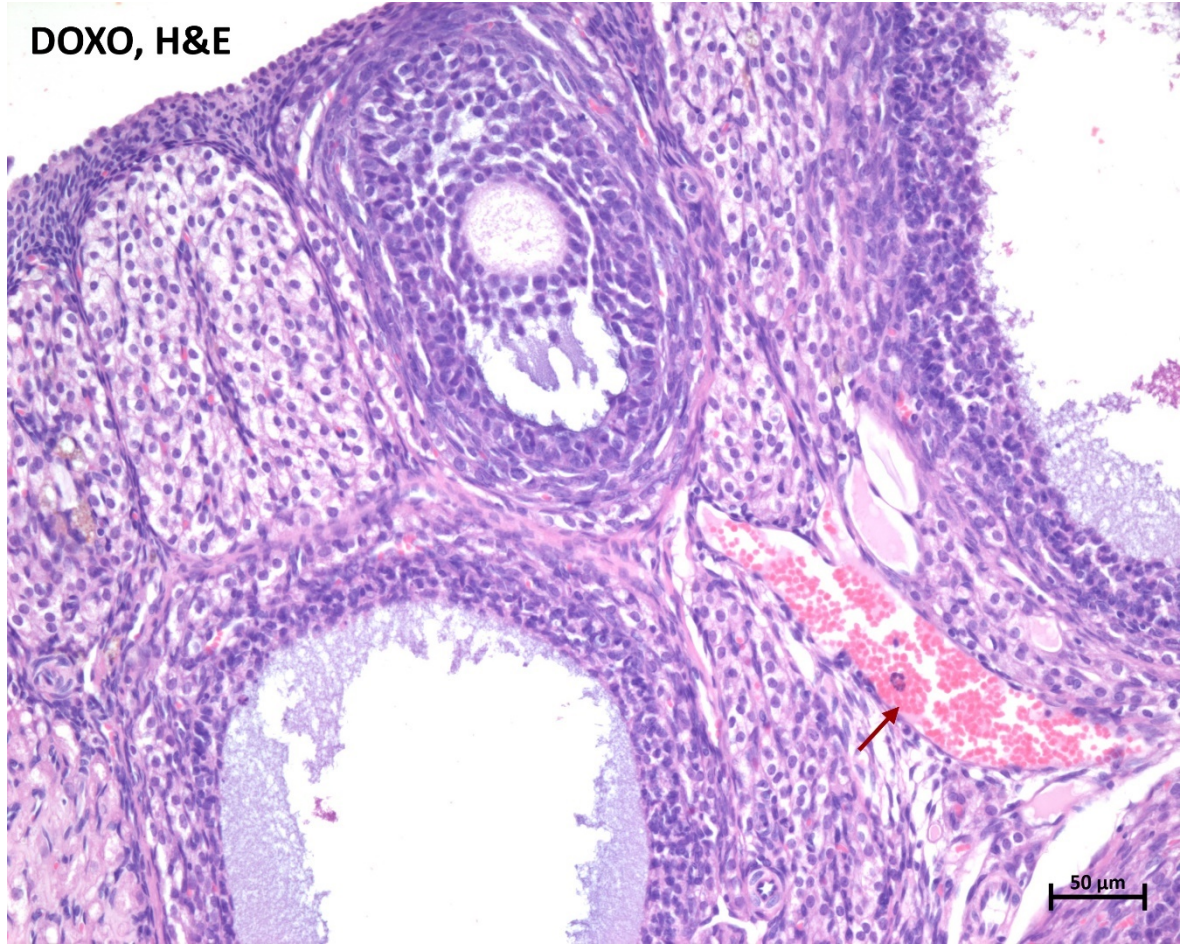


Şekil 4.3. HT grubu ovaryum dokusuna ait kesitlerde folikül ve korpus luteum kesitleri (H&Ex50)

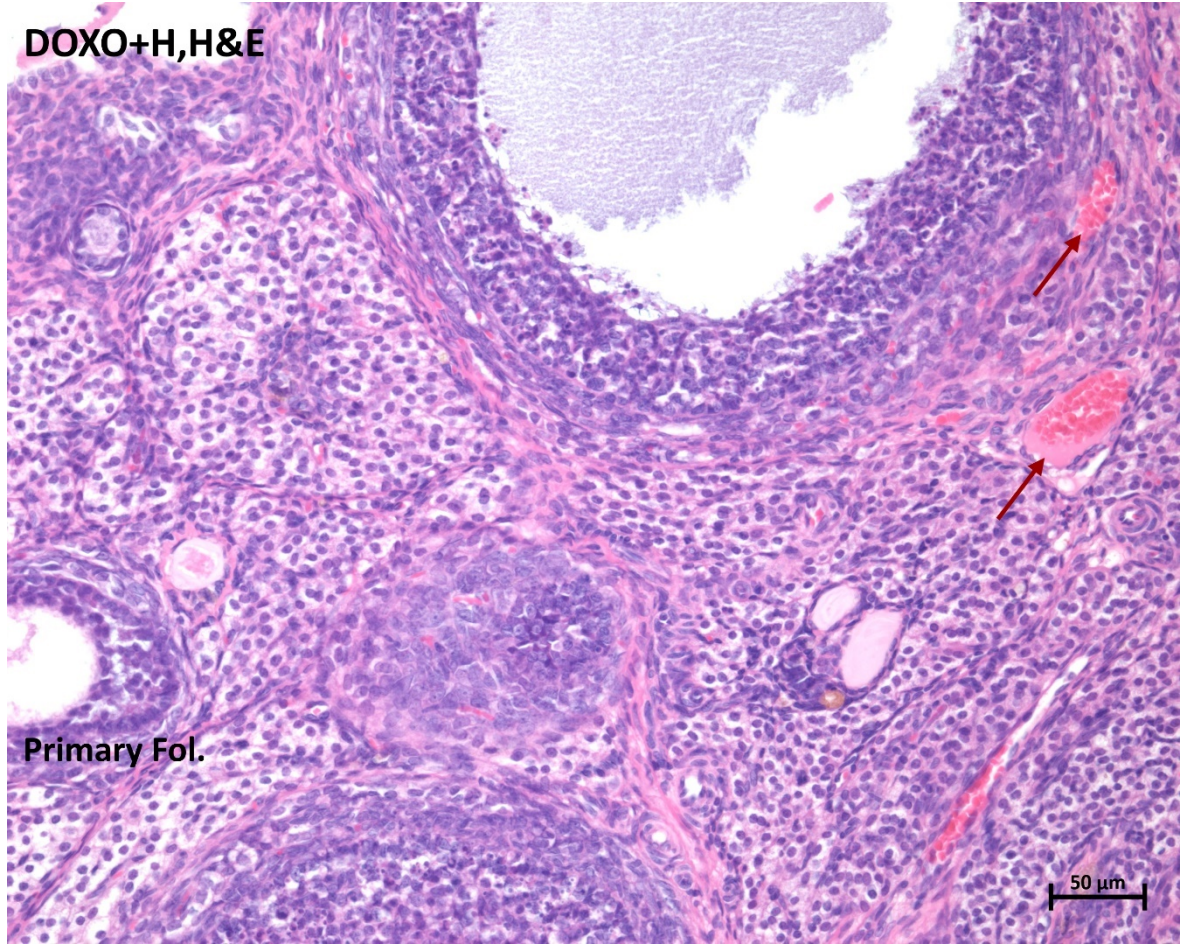
DOXO,H&E



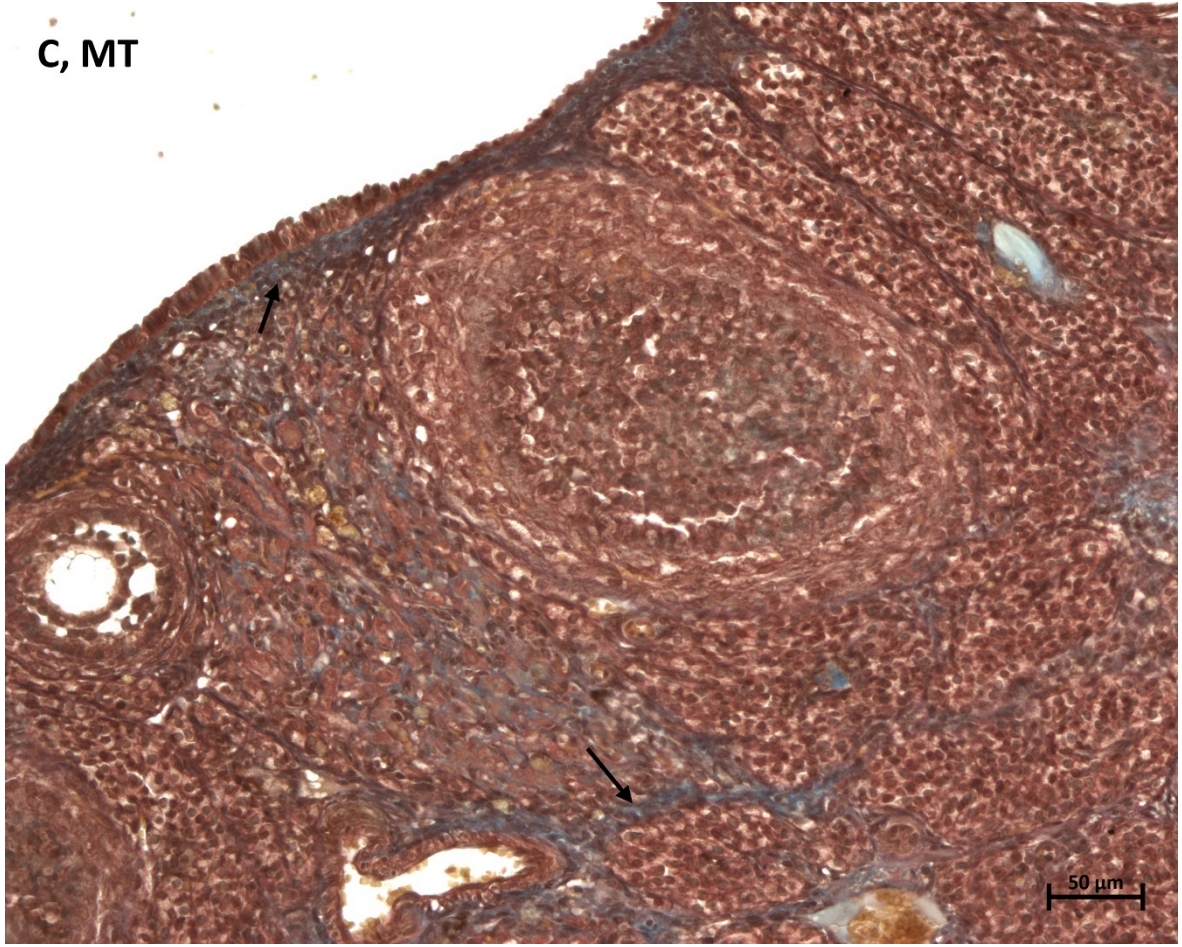
Şekil 4.4. DOX grubu ovaryum dokusuna ait kesitlerde folikül ve korpus luteum kesitleri (H&Ex50)



Şekil 4.5. DOX grubu ovaryum dokusuna ait kesitlerde folikül ve korpus luteum kesitleri (H&Ex50)

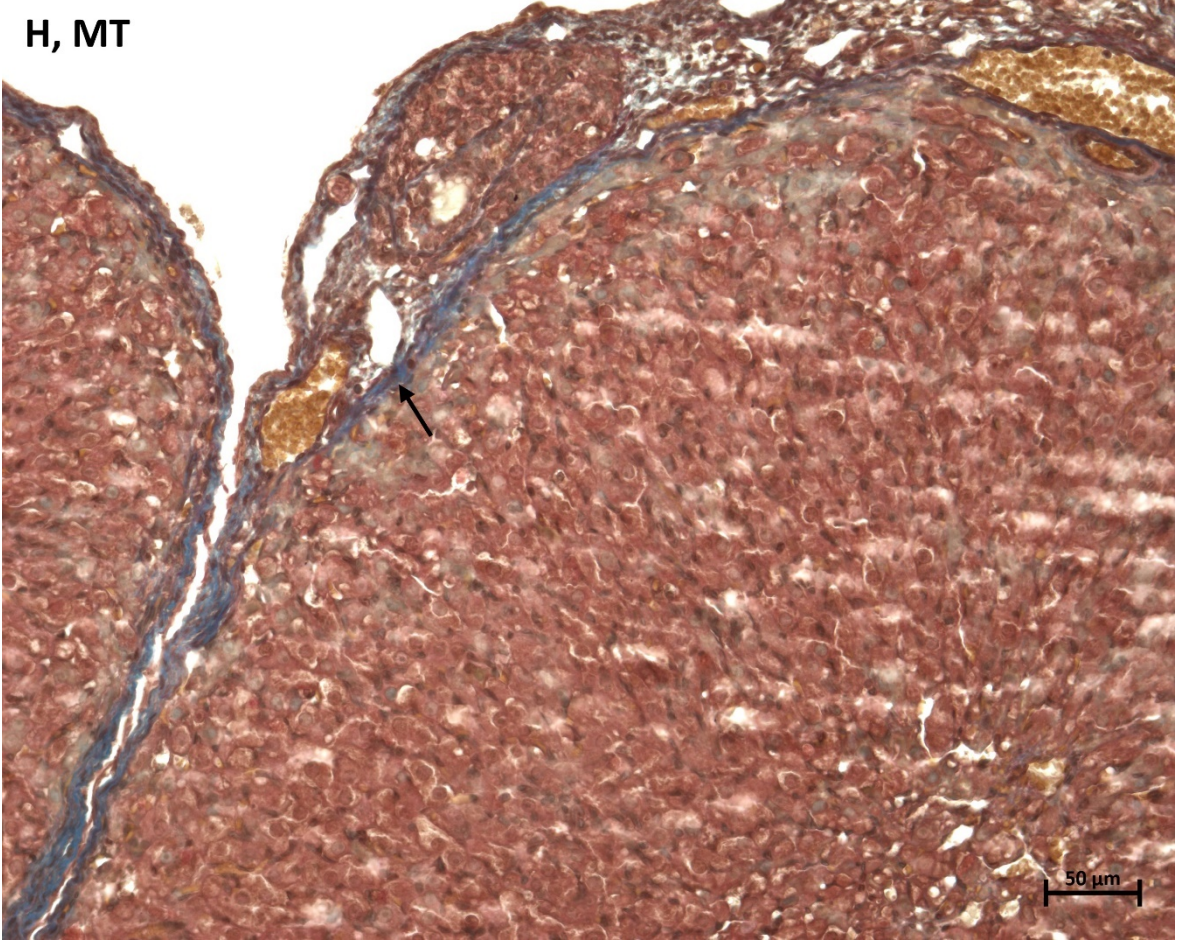


Şekil 4.6. *DOX+HT grubu ovaryum dokusuna ait kesitlerde folikül ve korpus luteum kesitleri (H&Ex50)*

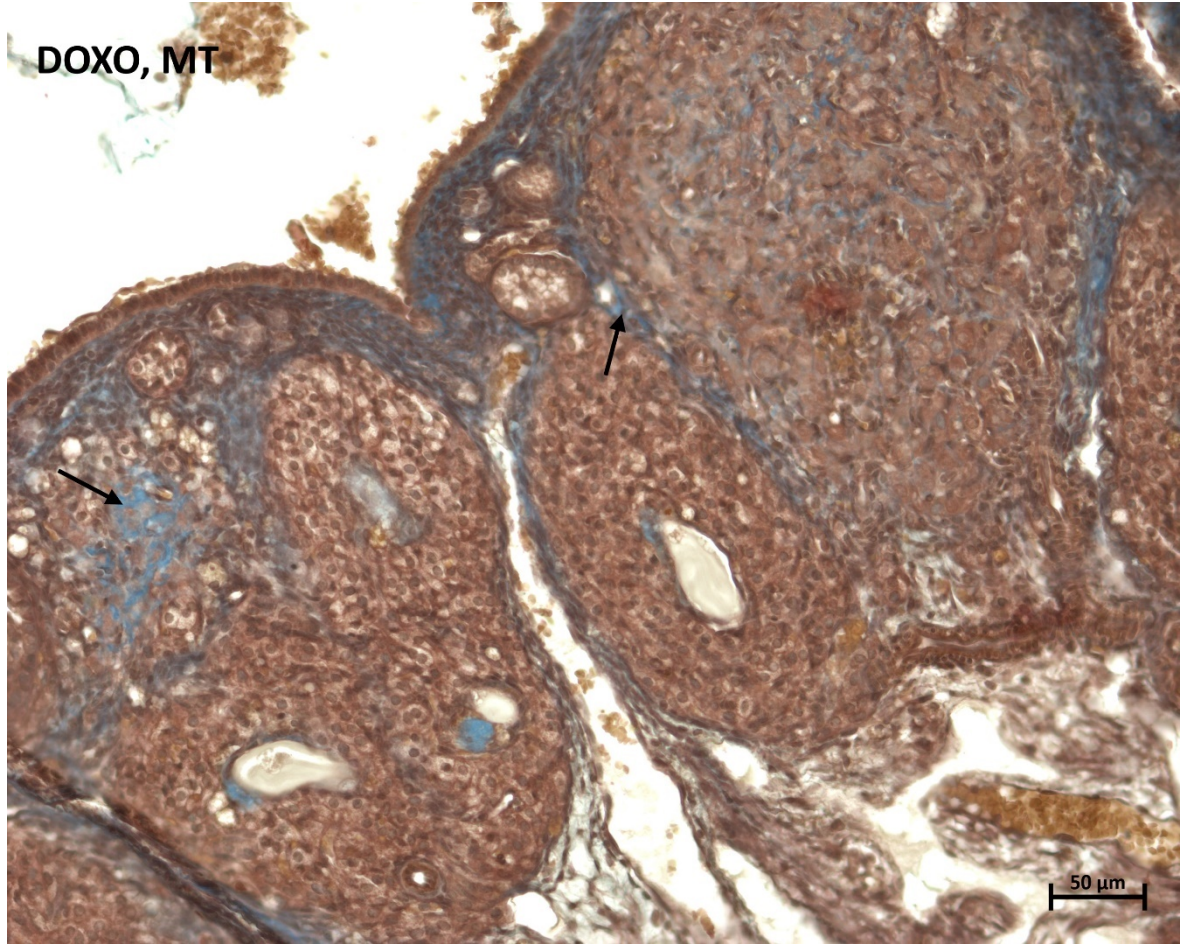


Şekil 4.7. Kontrol grubu ovaryum dokusuna ait kesitlerde folikül ve korpus luteum kesitleri (MTx50)

H, MT

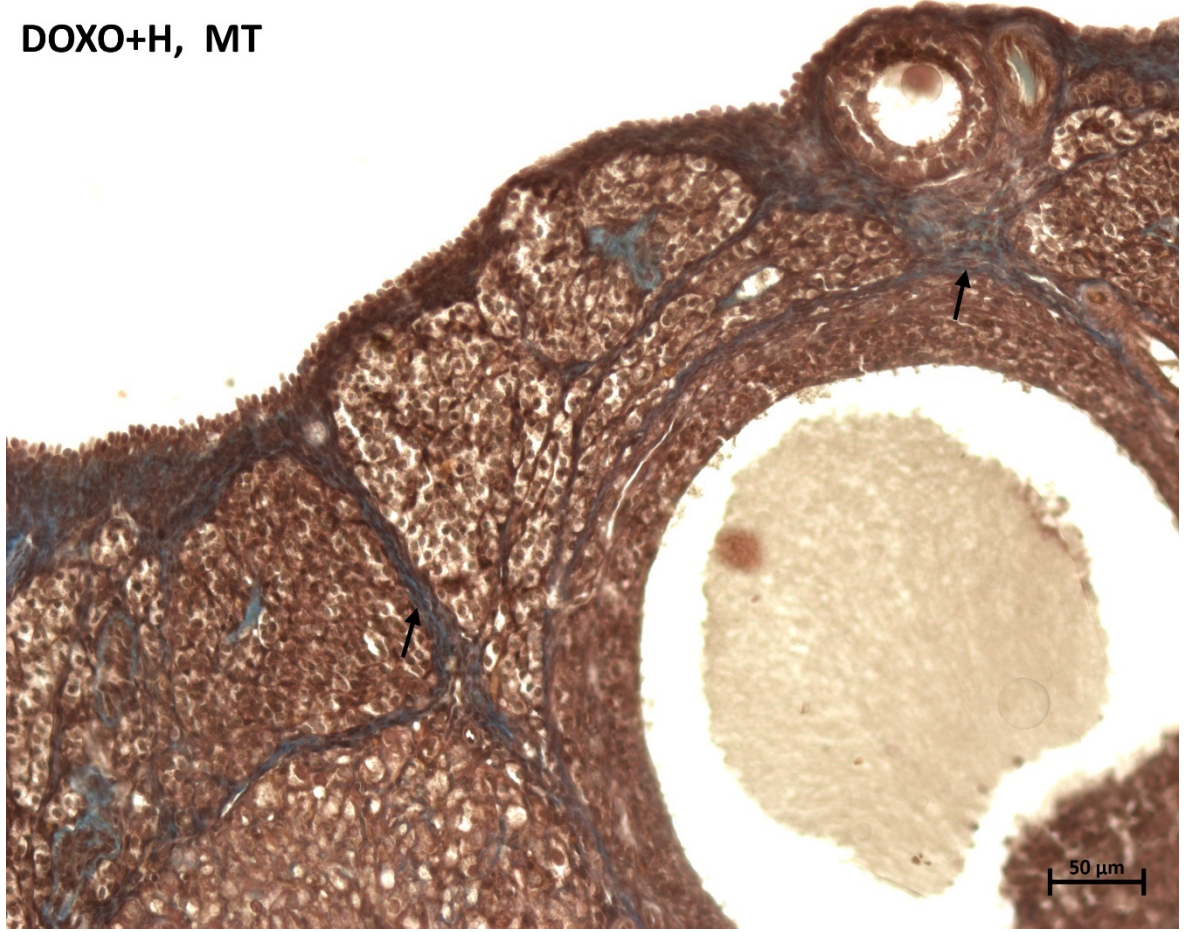


Şekil 4.8. *HT grubu ovaryum dokusuna ait kesitlerde folikül ve korpus luteum kesitleri (MTx50)*



Şekil 4.9. DOX grubu ovaryum dokusuna ait kesitlerde folikül ve korpus luteum kesitleri (MTx50)

DOXO+H, MT



Şekil 4.10. *DOX+HT grubu ovaryum dokusuna ait kesitlerde folikül ve korpus luteum kesitleri (MTx50)*

4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

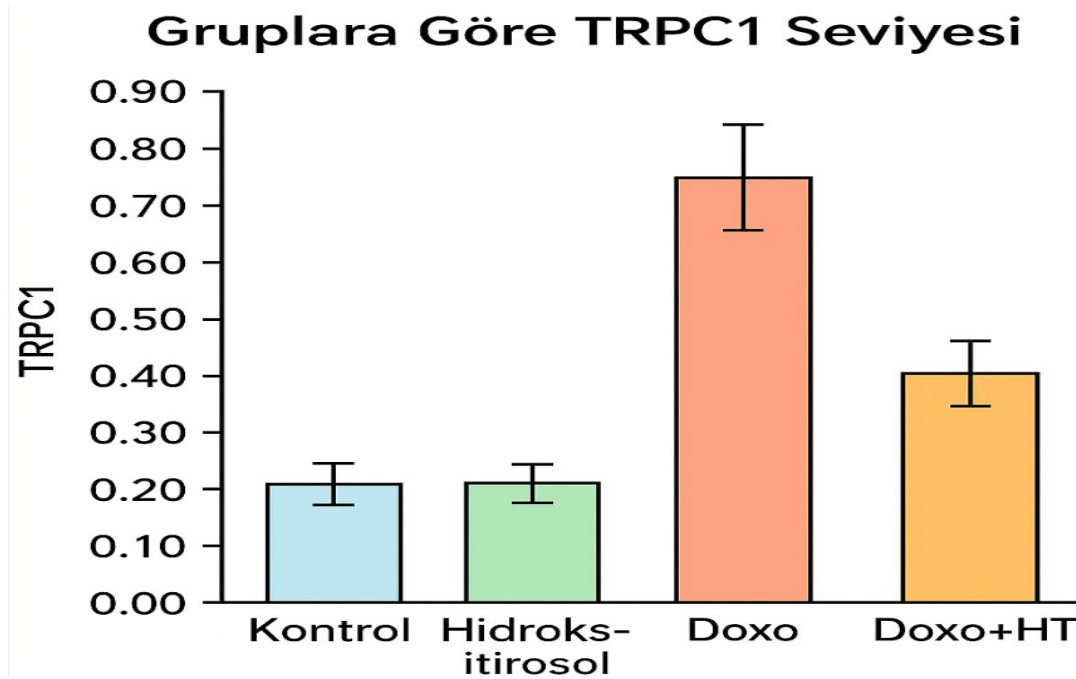
Over dokusunda TRPC1 immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında gözlemlenmesi sonucu;

TRPC1 immünreaktivitesi; Kontrol, HT grubuyla kıyaslandığında, DOXO uygulanması sonucunda belirgin olarak arttı ($p<0,001$). DOXO grubu ile kıyaslandığında, DOXO+HT grubunda TRPC1 immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,001$) (Tablo 5) (Şekil 18,19,20,21,22).

Tablo 4.2.Over dokusunda TRPC1 için immünohistokimyasal bulgular

Gruplar	Kontrol	Hidroksitirosol	Doxo	Doxo+HT
TRPC1	0,13±0,07	0,14±0,06	0,81±0,15 ab	0,33±0,09 abc

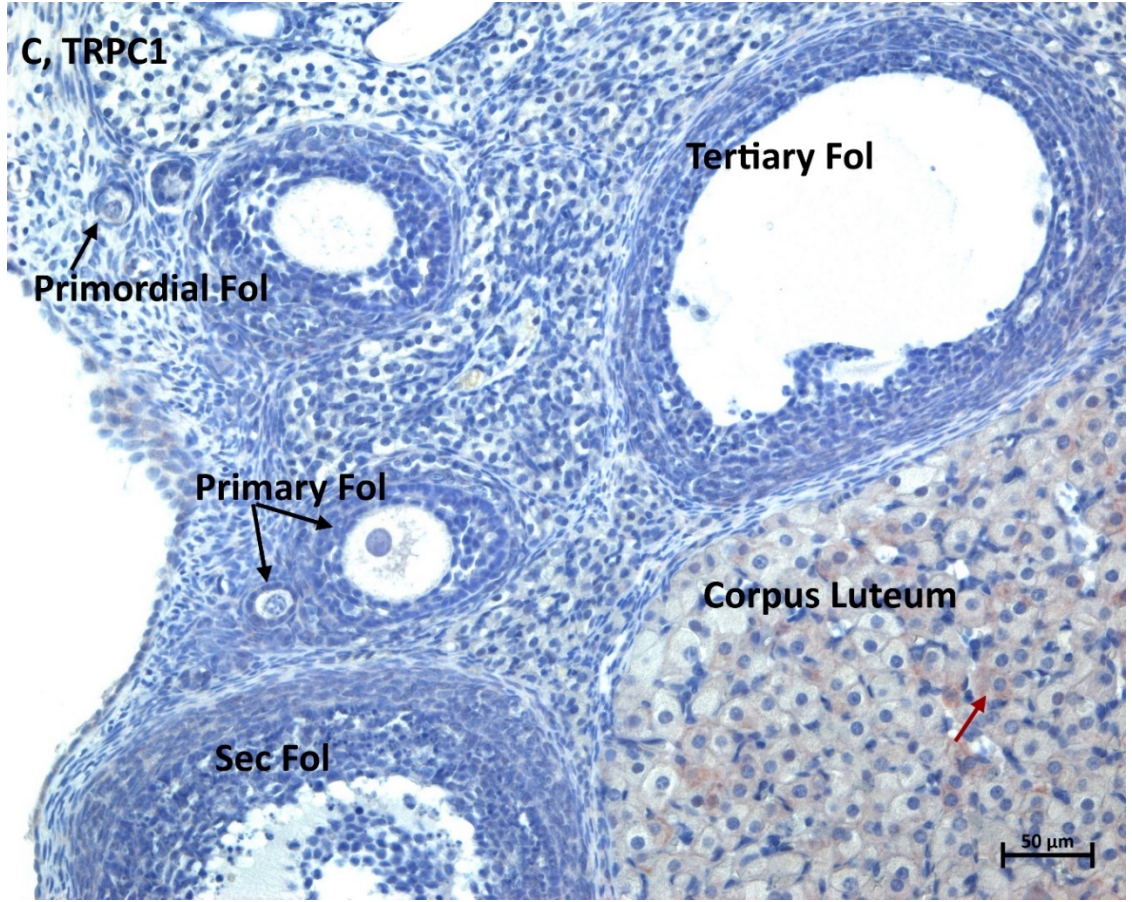
Hata çubukları SD'yi gösterir. a. Kontrol ile karşılaştırıldığında $p<0.05$ b. HT ile karşılaştırıldığında $p<0.05$. c. DOXO ile karşılaştırıldığında $p<0.05$.



Şekil 4.11. Over dokusunda TRPC1 için immünohistokimyasal bulgular

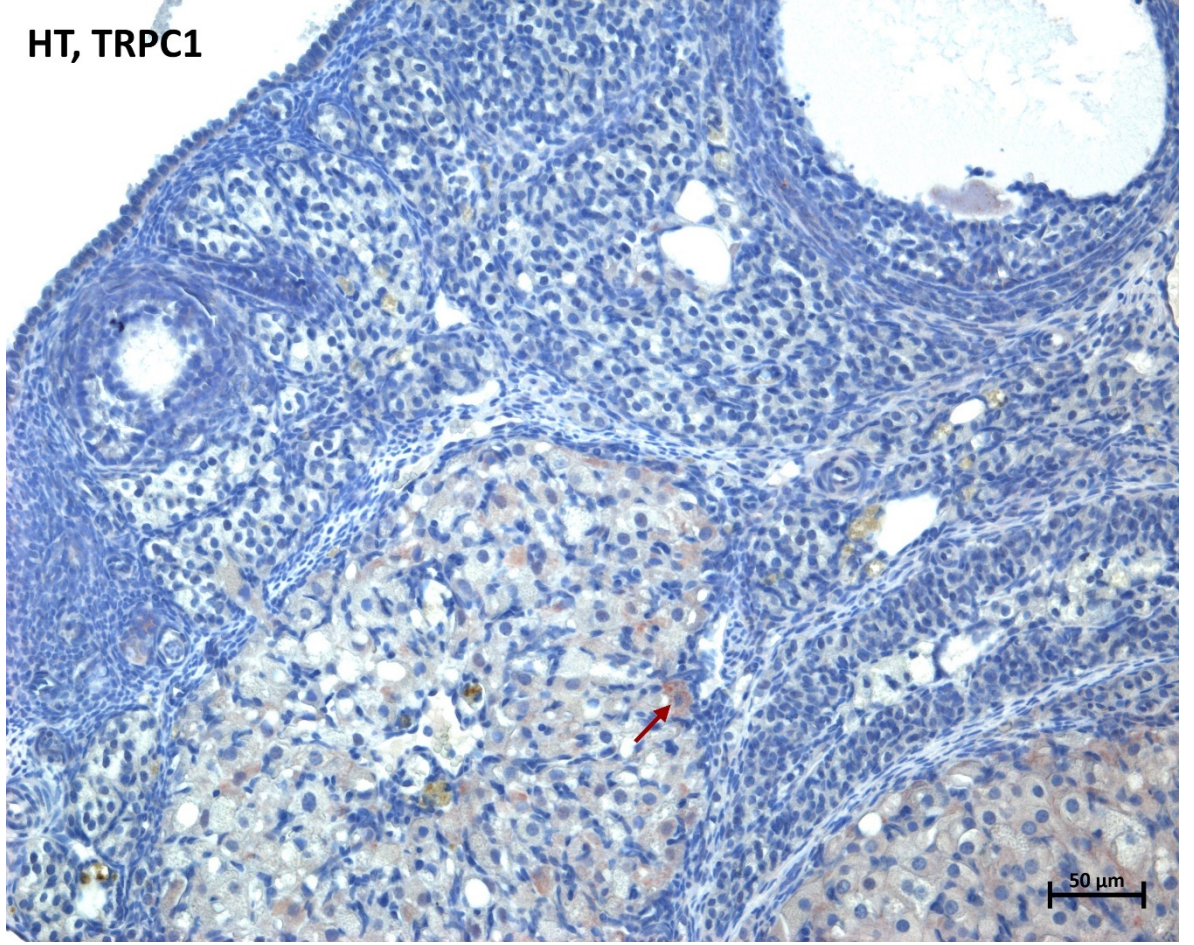
1. **Kontrol vs Hidroksitirosol:** Aralarında çok fark yok (0,13 → 0,14), yani HT tek başına TRPC1 ekspresyonunu anlamlı şekilde değiştirmiyor.
2. **Dox grubu:** TRPC1 ifadesi 0,81 ile belirgin şekilde artmış, Dox'un TRPC1 yolunu aktive ettiğini gösteriyor. .
3. **Dox+HT grubu:** TRPC1 ifadesi 0,33'e düşmüş, yani hidroksitirosol Dox'un artırdığı TRPC1 ekspresyonunu kısmen baskılıyor.

Doxorubisin TRPC1 yolunu aktive ediyor, hidroksitirosol ise bu artışı azaltıyor, yani olası koruyucu bir etki gösteriyor.

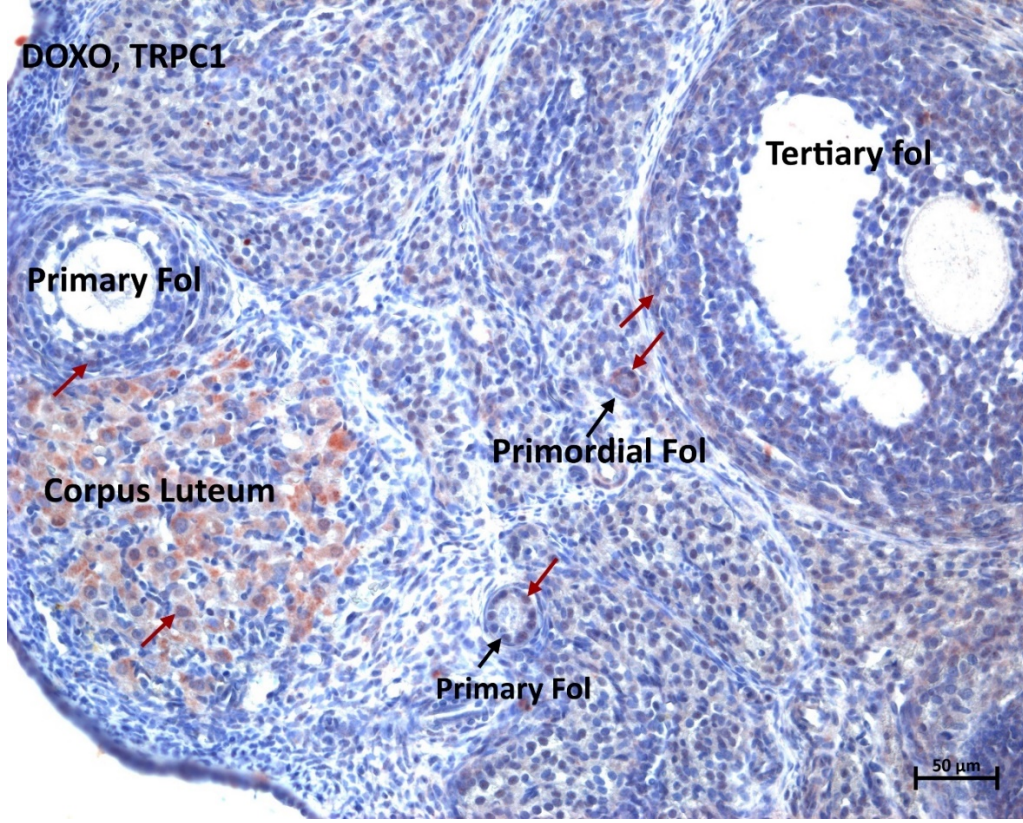


Şekil 4.12. Kontrol grubu ovaryum dokusuna ait folikül ve korpus luteum kesitleri (TRPC1x50)

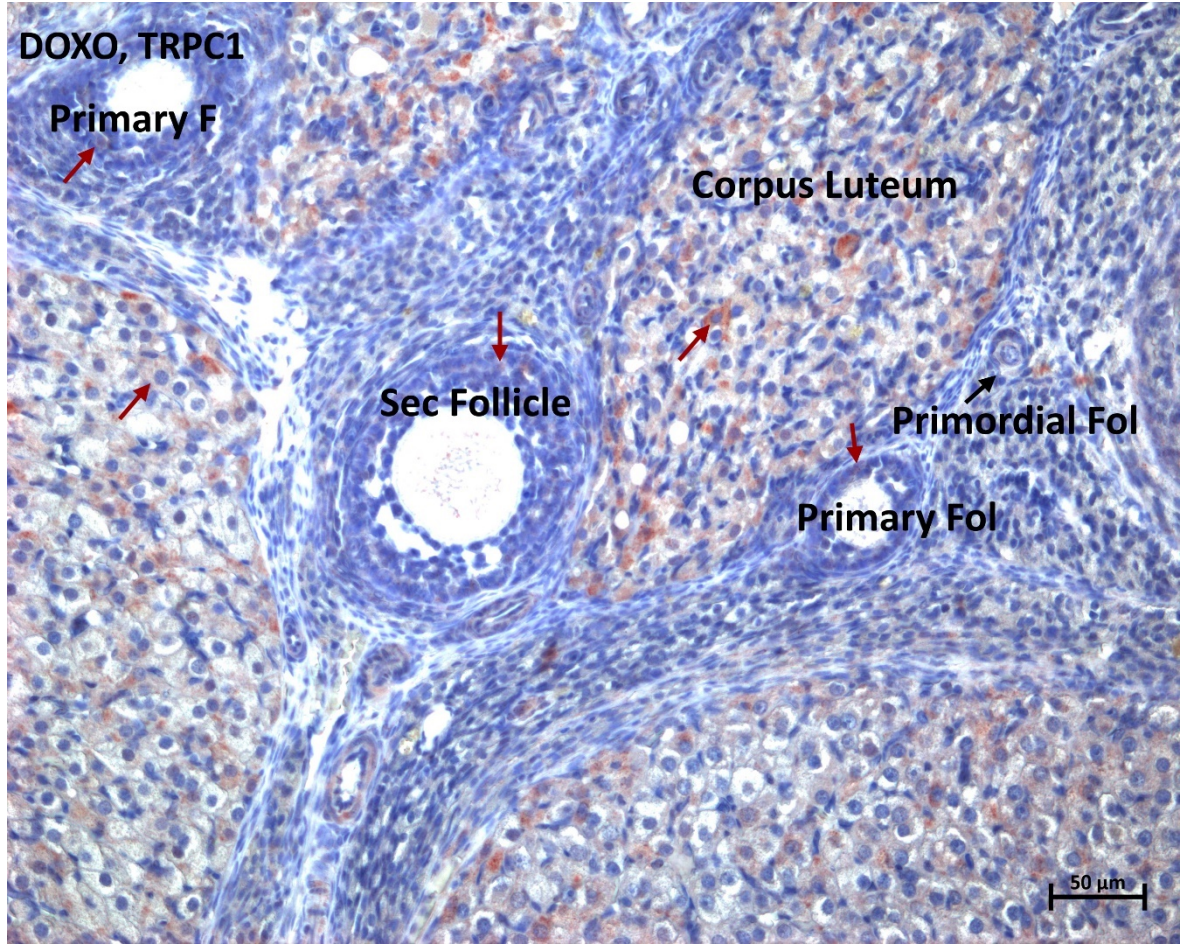
HT, TRPC1



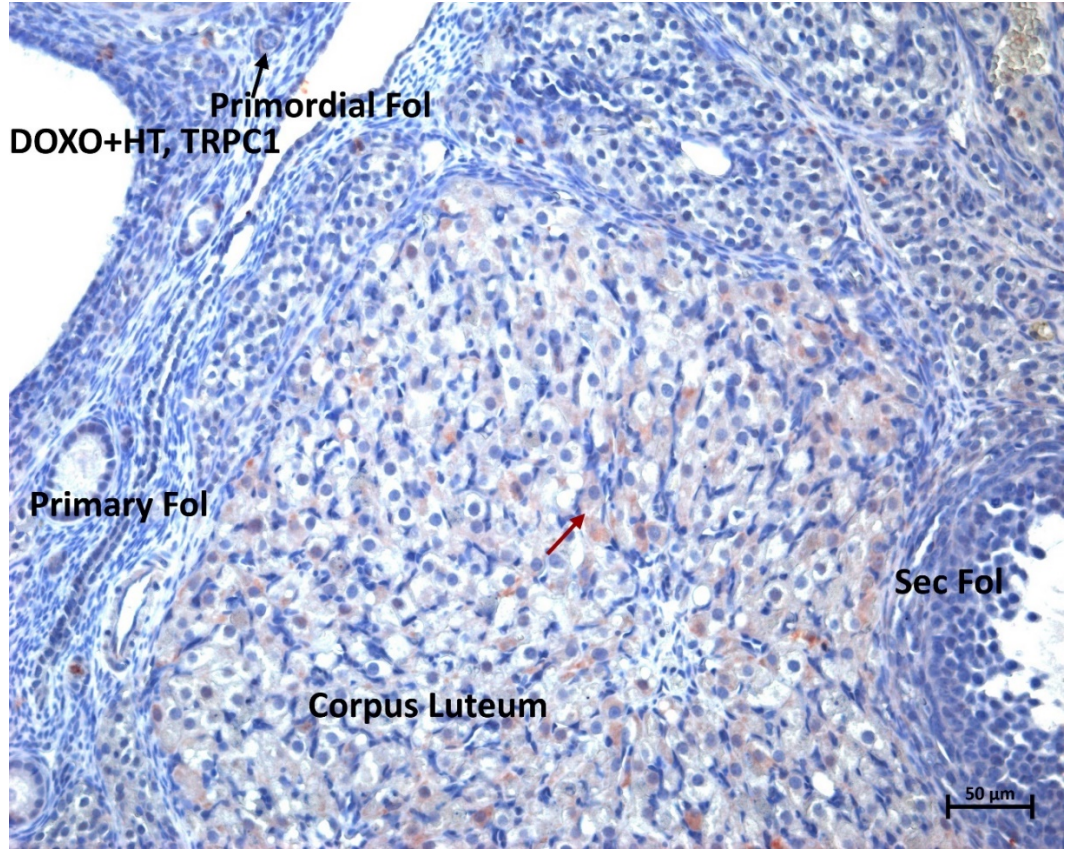
Şekil 4.13. HT grubu ovaryum dokusuna ait kesitlerde folikül ve korpus luteum kesitleri (TRPC1x50)



Şekil 4.14. DOX grubu ovarium dokusuna ait folikül ve korpus luteum kesitleri (TRPC1x50)



Şekil 4.15. DOX grubu ovaryum dokusuna ait folikül ve korpus luteum kesitleri (TRPC1x50)



Şekil 4.16. *DOX+HT grubu ovaryum dokusuna ait folikül ve korpus luteum kesitleri (TRPC1x50)*

5. TARTIŞMA

Overtoksisitesi, ilaçlar, kimyasallar veya çevresel toksinlerin aşırı dozda alınmasıyla vücutta toksik maddelerin birikmesi sonucu ortaya çıkan ve organ sistemlerinin işlevlerini bozan ciddi bir durumdur. Kadınlarda overtoksisitesi, özellikle ovaryumları etkileyerek üreme sağlığını tehdit eder. Kemoterapi ve hormon tedavileri gibi bazı farmasötik ajanlar, özellikle alkilasyon ajanları (örneğin siklofosamid), yumurtalık dokusuna zarar vererek ovaryum rezervinde azalmaya ve doğurganlıkta kalıcı bozulmalara yol açabilir. Bu tedaviler yumurtlama ve hormon üretimi gibi temel ovaryum işlevlerini olumsuz etkiler.

Over toksisitesinin önlenmesi ve yönetimi için çevresel risk faktörlerinden uzak durmak, ilaçları hekim kontrolünde ve bilinçli şekilde kullanmak, sağlıklı bir yaşam tarzı benimsemek ve düzenli sağlık kontrollerini aksatmamak gereklidir. Ayrıca, risk altındaki bireylerde ovaryumların korunmasına yönelik yumurtalık dokusunun dondurulması ya da GnRH agonistleriyle geçici baskılama gibi koruyucu yöntemler de uygulanabilir. Ancak overtoksisitesine karşı kesin bir tedavi yönteminin bulunmaması, toksisitenin önlenmesi veya gerçekleşmiş hasarın iyileştirilmesine dair yeni araştırmaları önemli hale getirmektedir. Bu noktalardan hareketle başladığımız çalışma kapsamında Dox verilerek overtoksisitesi oluşturulan sıçanlarda HT'nin koruyucu etkisi histopatolojik yöntemlerle araştırıldı. Kontrol ve HT gruplarının over dokusunda normal histolojik yapı gözlenirken, Dox grubunda belirgin konjesyon, PNML, germinal epitel dejenerasyonu ve fibrozis tespit edildi. Dox ve HT'nin birlikte uygulandığı Dox+HT grubunda bu patolojik bulgular sadece Dox uygulanan gruba göre anlamlı düzeyde azaldı (Tablo 4). Bu durum, HT'nin Dox kaynaklı histopatolojik değişikliklere karşı koruyucu etkisi olduğunu düşündürmektedir. İmmunohistokimyasal analizlerden de histopatolojik bulguları destekler nitelikte sonuçlar alındı. TRPC1 immünreaktivitesi kontrol ve HT gruplarında düşük düzeyde iken, Dox grubunda anlamlı şekilde artmış olarak saptandı. Dox+HT grubunda TRPC1 ekspresyonu, yalnızca Dox uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldı (Tablo 5). Bu bulgular, HT'nin Dox'un over dokusunda oluşturduğu hücrel stres yanıtı azaltması lehine yorumlandı.

Ben-Aharon, H. Bar-Joseph ve arkadaşlarının benzer şekilde, Dox'un overtoksisitesine yönelik yaptığı önceki bir çalışmada, dişi farelere intraperitoneal olarak uygulanan tek doz Dox'un (7.5 veya 10 mg/kg), over morfolojisi ve fonksiyonu üzerindeki kısa ve uzun vadeli etkileri değerlendirilmiştir. Yüksek çözünürlüklü MRG ile yapılan in vivo görüntülemelerde, Dox uygulamasından bir gün ve bir ay sonra over boyutunda ve

ağırlığında belirgin azalma tespit edilmiştir. Histolojik analizlerde, TUNEL ve aktif kaspaz-3 boyamaları ile apoptozun arttığı, özellikle sekonder ve primordial folikül sayılarında anlamlı düşüş gözlemlendiği bildirilmiştir. Ayrıca süperovülasyon sonrası ovülasyon oranlarında, tedaviden bir hafta sonra ciddi azalma meydana gelmiş ve bu durum bir ay sonunda sadece kısmen toparlanmıştır [55].

Uma P. Mohan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Dox'un kadın üreme sistemi üzerinde ciddi toksik etkiler oluşturduğu ortaya konmuştur. Bu ajan, follikülogenez ve oogenezi bozarak ovülasyon başarısızlığına ve uterus döngüsünde düzensizliklere yol açmakta; bu durum da prematür over yetmezliği (POF) ile karakterize edilen bir klinik tabloya zemin hazırlamaktadır. Dox'un doğrudan foliküller ve oositler üzerinde genotoksik etkiler oluşturması, oosit rezervinde azalmaya ve dolayısıyla infertiliteye neden olmaktadır. Yapılan literatür çalışmalarında da gösterildiği gibi, Dox uygulaması estrus döngüsünde bozulmalara, düşük östrojen düzeylerine, anormal meme bezi gelişimine ve zayıf endometrial reseptiviteye sebep olabilmektedir. Bu toksik etkilerin şiddeti, ilacın dozu ve maruz kalma süresi ile doğrudan ilişkilidir. Over ağırlığında ve ovülasyon oranında gözlenen azalma, Dox'un indüklediği artmış oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyonla bağlantılıdır. Bu mekanizmalar, tarafımızdan yapılan çalışmada da histopatolojik ve immünohistokimyasal verilerle desteklenmiştir. Dox uygulanan grupta over dokusunda konjesyon, PNML infiltrasyonu, germinal epitel dejenerasyonu ve fibrozis gibi yapısal hasarlar gözlenmiştir [56].

S. Xiao ve arkadaşlarının in vitro bulgularla uyumlu olarak yaptıkları in vivo çalışmada, CD-1 farelerine uygulanan farklı Dox dozlarının oosit meiotik olgunlaşması, folikül gelişimi ve hormon salınımı üzerinde doz bağımlı toksik etkiler oluşturduğunu gösterilmişlerdir. Özellikle 10 mg/kg Dox dozu, over boyutunda küçülmeye, ovülasyon oranında azalmaya ve folikül apoptozunda artışa yol açmıştır [57].

B. Al-Kawlani ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada fare modellerinde Dox'un over toksisitesine yol açtığı mekanizmalar arasında folliküler yapılar ve granüloza hücrelerinde hasar, oosit olgunlaşmasında bozulma ve hormon salınımında düzensizlik yer almaktadır. İn vitro çalışmalarda oositlerde apoptoz ve buna bağlı olarak artmış folliküler atrezi bildirilmiştir [58].

Yingzheng Wang ve arkadaşlarının farklı yaş gruplarındaki dişi farelerde yaptığı çalışmada aynı dozda Dox uygulaması sonucunda, özellikle 5 günlük farelerde belirgin primordial folikül kaybı ve düşük düzeyde folikül aşırı aktivasyonu gözlenmiştir. Bu durum,

Dox'un over rezervini hem atreziyi artırarak hem de aşırı aktivasyon yoluyla tükettiğini ve toksik etkinin yaşa bağlı olduğunu göstermektedir [59].

A. Pugazhendhi, T. N. J. I. Edison ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada oksidatif stres ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) birçok hastalıkta rol oynaması nedeniyle, Dox'un çoklu organ toksisitesinin altında yatan mekanizmalardan biri olarak oksidatif stres değerlendirilmektedir. Bu süreçte ROS düzeylerindeki ve hücrel antioksidanlardaki değişimlerin etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, oksidatif stres, apoptoz ve inflamasyon, Dox'un toksik etkilerinin olası temel mekanizmaları olarak kabul edilmektedir [60].

S. Fareed, M. Kabir ve arkadaşlarının dox kaynaklı over toksisitesine karşı zeytinyağı ekstresinin değerlendirdikleri çalışmada, yalnızca Dox uygulanan grupta vücut ağırlığında ve folikül sayısında anlamlı azalma gözlenirken, zeytinyağı ile birlikte uygulandığında bu etkilerin büyük ölçüde engellendiği bildirilmiştir. Histolojik olarak da folikül yapılarında ve nükleer hasar düzeylerinde koruyucu etkiler saptanmıştır [61].

Bu literatür bulguları doğrultusunda elde ettiğimiz veriler değerlendirildiğinde, Dox'un over dokusunda oluşturduğu toksisitenin hem histopatolojik hem de moleküler düzeyde belirgin olduğu; ancak HT uygulamasının bu zararlı etkileri anlamlı düzeyde hafiflettiği görülmektedir. Çalışmamızda Dox uygulanan grupta foliküler yapıların hasar gördüğü, germinal epitelde dejenerasyonun meydana geldiği, TRPC1 ekspresyonunun arttığı ve buna bağlı olarak over rezervinin azaldığı gözlemlenmiştir. Bu bulgular, Dox'un üreme sistemi üzerindeki toksik etkilerini doğrulamakta olup, aynı zamanda HT gibi doğal antioksidan bileşiklerin bu etkileri hafifletme potansiyeline sahip olabileceğini göstermektedir. Dox+HT grubunda ise söz konusu etkilerin azalması, HT'nin Dox kaynaklı hücrel hasarı hafiflettiğini ve over dokusunu koruyucu rol oynadığını desteklemektedir. Bu durum, HT'nin Dox kaynaklı over hasarına karşı potansiyel bir koruyucu ajan olabileceğini düşündürmekte ve hem histopatolojik hem de moleküler düzeyde gözlemlenen bulgularla uyum göstermektedir. Sonuçlarımız, HT'nin Dox'un neden olduğu oksidatif stres ve doku hasarına karşı etkili bir koruyucu ajan olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır.

A. Chiavaroli, S. C. Di Simone ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada APP/PS1 transgenik farelerde 6 ay süresince HT tedavisi uygulamışlardır ve sonucunda HT'nin mitokondriyal oksidatif stresi, inflamasyonu ve apoptozu azalttığı, ayrıca mitokondriyal fonksiyonları iyileştirdiği gösterilmiştir [62].

I. Rodríguez-Ramiro ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada akrilamid kaynaklı oksidatif stres modelinde HT'nin ROS birikimini azaltarak koruyucu etki gösterdiği, ancak glutatyon seviyelerini tamamen geri kazandıramadığı ve apoptoz sinyallerini tam olarak durduramadığı bildirilmiştir [63].

M. Bertelli, A. K. Kiani ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada HT'nin yüksek yağlı diyetli tavşanlarda ateroskleroza azaltıcı etkisi, kanser hücrelerinde hücre döngüsünü durdurması ve apoptozu indüklemesi, çalışmalarda geniş biyolojik aktivite yelpazesine sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, fare modellerinde yüksek dozlarda dahi yan etki oluşturmaması ve non-mutajenik/non-genotoksik bulunması, HT'nin güvenli profilini desteklemektedir [64].

Yapılan akut, subkronik ve kronik toksisite çalışmalarında, saf zeytinyağı (VOO) ekstraktları ve başlıca fenolik bileşiği HT, geniş doz aralıklarında hem dişi hem erkek sıçanlarda güvenle kullanılmıştır. Akut tek doz çalışmalarında 5 g/kg HT'ye ($\approx 3,5$ g/kg eşdeğeri) kadar ölüm veya belirgin olumsuz etki gözlenmemiş, 2000 mg/kg HT dozu da iyi tolere edilmiştir. Subkronik ve üç aylık kronik uygulamalarda ise 300–2000 mg/kg VOO veya 125–2000 mg/kg HT dozları, davranışsal, biyokimyasal ve histopatolojik incelemelerde toksisite belirtisi vermemiştir. Tüm bu bulgular, VOO ekstrelerindeki fenolik bileşiklerin, özellikle HT'nin, uzun süreli ve yüksek doz kullanımlarında dahi non-toksik olduğunu ve sağlık açısından güvenli bir profil sunduğunu ortaya koymaktadır [65].

N. Harun, I. K. Adnyana ve arkadaşlarının yaptığı prelinik çalışmalarda oleuropein ve hidroksitirozolün güvenli kullanım profilleri net olarak ortaya konmuştur. HT'nin nadiren kilo kaybı gibi yan etkiler bildirilmiş olsa da, zeytin yaprağı ekstresinin akut (tek doz 2000 mg/kg) ve subakut (28 gün, 100–400 mg/kg) uygulamalarında toksik etki gözlenmemiş; 90 günlük tekrarlayan doz çalışmasında ise genotoksisite rapor edilmemiştir. Benzer şekilde, 100–2000 mg/kg doz aralığında uygulanan sulu VOO ekstresi hem akut hem kronik çalışmalarda güvenli bulunmuş ve fonksiyonel gıda bileşeni olarak önerilmiştir [66].

Oleuropein (OleA) ve HT, $A\beta_{1-42}$ agregasyonunu ve toksisitesini 1:1 ve 1:3 molar oranlarda karşılaştıran bir çalışmada, 25 μ M $A\beta_{1-42}$ 'nin 25 μ M veya 75 μ M OleA/HT ile 0–72 saat inkübasyonu sonucunda Thioflavin T bağlanmasıyla fibril oluşumu ve RA SH SY5Y hücrelerinde MTT testi ile sitotoksisite değerlendirilmiştir. Her iki polifenolde de 1:3 oranı, ThT floresansını yaklaşık %40 oranında azaltarak hücre canlılığını tamamen geri kazandırmıştır. Ancak OleA'da sinyal 24 saatte plato yapıp azalmaya başlarken, HT'de 48

saatte pik yapıp hızla düşmüştür. Bu bulgular, hem OleA hem de HT'nin fibril oluşumunu geciktirerek toksik ara türlerin birikimini azaltıp nöronal hücreleri koruduğunu göstermektedir [67].

P. Zygouri, A. M. Athinodorou ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, oksitlenmiş çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT), HT ile fiziksel adsorpsiyon yoluyla yüklenerek etkili bir nanotaşıyıcı platform oluşturulmuştur. Normal fibroblastik hücre hattı NIH/3T3 üzerinde, oksitlenmiş MWCNT'lerle taşınan HT, serbest HT'ye kıyasla daha dengeli koruyucu etki göstererek koloni oluşum testlerinde oksidatif stres kaynaklı hasarı azaltmış ve hücre canlılığını korumuştur. Buna karşılık, Tg/Tg hücrelerinde 48 saatlik maruziyet sonrasında zaman bağımlı canlılık düşüşü ve artan ROS üretimi gözlenmiş; uzun süreli koloni testlerinde ise bu hücrelerin oksitlenmiş MWCNT'lerin sitotoksik etkilerine NIH/3T3 hücrelerine göre daha duyarlı olduğu ortaya çıkmıştır. Aynı dozlarda karşılaştırıldığında, MWCNT ile taşınan HT, normal hücrelerde benzer sitotoksikite profili sergilerken Tg/Tg hücrelerinde daha belirgin hücre ölümü indüklemiştir [68].

Zeytinyağı fenollerinden HT, tyrosol (TY), verbaskozit (VE) ve alperujo (AL) üzerine yapılan çalışmalarda, tüm bileşiklerin genotoksikiteyi baskılayan antimutajenik etkiler gösterdiği, ancak hücre ölümü yolları ve koruyucu potansiyellerinin farklılıklar taşıdığı belirlenmiştir. HT, en yüksek dozda (100 µM) genotoksikiteyi anlamlı biçimde azaltırken, en düşük dozda (6,25 µM) H₂O₂ kaynaklı hasarı en etkin şekilde engellemiştir. TY ise yalnızca yüksek konsantrasyonlarda H₂O₂ indüklenen hasara karşı koruma sağlamış, düşük dozlarda etkisiz kalmıştır; Caco-2 ve eritrositlerde antioksidan koruma sunarken kanser hücrelerinde düşük sitotoksikite göstermiştir. TY, H₂O₂ hasarını azaltarak genotoksikiteyi düşürmüş, HL60 hücrelerinde ise güçlü nekrotik hücre ölümü indüklemiş, apoptoz işaretleri ise daha zayıf ve geç ortaya çıkmıştır. AL ise genotoksikiteyi baskılamasının yanı sıra HL60 hücrelerinde kaspaz 3 bağımlı apoptozu tetikleyerek apoptoz yönelimli hücre ölümünü desteklemiştir [69].

M. Maranesi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada diyetle alınan polifenollerin tavşan over dokusundaki inflamasyon ve apoptozla ilişkin moleküler yanıtlar üzerindeki etkileri değerlendirilmiş polifenolik konsantre takviyesinin üreme fonksiyonları üzerinde olumlu biyolojik etkiler oluşturduğu belirlenmiştir. Zeytinyağı değirmeni atıklarından elde edilen polifenolik konsantre uygulanan tavşanlarda, primer ve toplam follikül sayılarında anlamlı artış gözlenmiştir. Bu grupta inflamatuvar yanıtla ilişkili COX2 gen ekspresyonu artmasına rağmen, immünohistokimyasal analizlerde COX2 protein sinyal yoğunluğu düşük

bulunmuştur; benzer şekilde, apoptoz belirteci BAX gen ekspresyonu azalmış ve protein düzeyinde de baskılanma gözlenmiştir. IL1B ve TNFA gen ve protein düzeylerinde gruplar arasında anlamlı fark izlenmemiştir [70].

Hidroksitirosolün zebra balığı embriyolarında östrojenik mikotoksin olan zearalenon (ZEA) toksisitesine karşı etkili bir şekilde koruyucu rol oynadığı gösterilen çalışmada, HT'nin ZEA'nın yol açtığı embriyo ölüm oranını, yumurtadan çıkış süresindeki gecikmeyi ve fenotipik bozuklukları anlamlı şekilde azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca, proapoptotik genler ile hücre döngüsü düzenleyicileri üzerindeki olumsuz etkileri hafifleterek, ZEA kaynaklı apoptoz ve G2 fazı hücre döngüsü durmasını engellemiştir [71].

Yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz veriler ve literatür bulguları birlikte değerlendirildiğinde, Dox over dokusunda oluşturduğu toksisitenin; artmış TRPC1 ekspresyonu, belirgin histopatolojik hasar, foliküler yapıların bozulması ve apoptoz artışı ile karakterize olduğu; buna karşın HT uygulamasının bu zararlı etkileri anlamlı düzeyde hafiflettiği görülmektedir. Çalışmamızda Dox+HT grubunda gözlenen TRPC1 ekspresyonundaki azalma, histopatolojik iyileşme ve over dokusunda apoptozun hafiflemesi, HT'nin over toksisitesine karşı etkili bir koruyucu ajan olduğunu desteklemektedir. HT'nin mitokondriyal koruma sağlaması ve hücrel savunma mekanizmalarını aktive edici etkisi, Dox kaynaklı hücrel hasar ve oksidatif stresin baskılanmasında önemli rol oynamıştır. Çalışmamızda HT'nin, Dox uygulanan grupta gözlenen TRPC1 ekspresyon artışı, histopatolojik dejenerasyon ve apoptoz düzeyindeki yükselmeyi anlamlı şekilde azalttığı ve over rezervini koruduğu saptanmıştır. Bu veriler, HT'nin Dox kaynaklı over hasarına karşı dokusal koruyucu ve fonksiyonel iyileştirici etkiler gösterdiğini ve güvenli bir antioksidan ajan olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır. Bu bulgularla paralel olarak, HT'nin güçlü antioksidan kapasitesi Dox'un neden olduğu hücrel hasarı ve oksidatif stresi azaltmakta, apoptozu baskılamakta ve over sağlığını desteklemektedir.

R. Mwakulukwa, A. Ashour ve arkadaşlarının HT'nin doku koruyucu ve hücrel fonksiyonları düzenleyici etkileri üzerine yapılan çalışmada, HT'nin STIM1 ve TRPC1 ekspresyonlarını anlamlı şekilde azalttığı, ancak Orai1 üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, 1-asetoksinopinoresinol 4 yalnızca TRPC1 ekspresyonunu azaltmıştır. Her iki bileşiğin IP3R ekspresyonunu da anlamlı derecede düşürmesi, endoplazmik retikulum kalsiyum depolarının tükenmesine katkı sağladığını göstermektedir. Bu durum, hücre içi kalsiyum seviyelerindeki düzenleyici etkilerle uyumlu

olup, HT ve türevlerinin sadece ekstraselüler kalsiyum girişini engellemekle kalmayıp, aynı zamanda endoplazmik retikulum kaynaklı kalsiyum sinyal yollarını da etkileyerek hücrel homeostazda kritik rol oynadığını ortaya koymaktadır [72].

Yapılan çalışmada HT ve türevlerinin hücre işlevleri üzerindeki etkileri bağlamında, zeytin işleme atık suyundan izole edilen polifenolik ve triterpenoid metabolitlerin anti-alerjik aktiviteleri incelenmiş; bu bileşiklerin RBL-2H3 hücrelerinde degranülasyon inhibisyonu ve hücre içi kalsiyum artışını azaltma kapasitesi değerlendirilmiştir. Özellikle kalsiyum kanal proteinleri STIM1, Orai1, TRPC1 ile endoplazmik retikulum membran proteini IP3R ekspresyonları üzerindeki etkiler dikkatle analiz edilmiştir. Hidroksitirosoil asetat, STIM1 ve TRPC1 ekspresyonunu anlamlı şekilde azaltırken Orai1 üzerinde etkisiz kalmış, 1-asetokspinoresinol ise sadece TRPC1 ekspresyonunu düşürmüştür. İlginç bir şekilde, her iki bileşik de IP3R ekspresyonunu anlamlı biçimde azaltarak ER Ca^{2+} depolarının tükenmesine katkı sağladığını göstermiştir. Bu bulgular, hücre içi kalsiyum regülasyonunda sadece ekstraselüler kalsiyum girişinin engellenmediğini, aynı zamanda ER kaynaklı kalsiyum sinyal yollarının da etkilenmekte olduğunu ortaya koymuştur [73].

Çalışmamızda HT'nin, dokulardaki oksidatif stresi azaltıcı ve hücrel fonksiyonları iyileştirici etkileri göz önünde bulundurulduğunda, bu etkilerin HT'nin koruyucu rolünü destekleyen önemli moleküler temeller oluşturduğu görülmektedir. Özellikle Dox uygulanan grupta artmış TRPC1 ekspresyonu, hücre içi kalsiyum dengesinin bozulmasına, mitokondriyal disfonksiyona ve apoptozun artmasına neden olurken, HT uygulaması bu etkileri anlamlı düzeyde baskılamıştır. TRPC1, hücre içi kalsiyum homeostazının düzenlenmesinde görev alan bir katyon kanalı olup, aşırı aktive olduğunda hücre içi Ca^{2+} düzeylerinin artmasına bağlı olarak oksidatif stresin şiddetlenmesine ve hücre ölüm yollarının aktive olmasına neden olmaktadır. Çalışmamızda HT'nin, TRPC1 ekspresyonunu azaltarak kalsiyum sinyalizasyonunu dengelediği, bu sayede mitokondriyal fonksiyonların korunmasına katkı sağladığı ve apoptoz düzeyini düşürdüğü belirlenmiştir. Bu moleküler mekanizma, HT'nin hem oksidatif stresin azaltılmasında hem de hücrel fonksiyonların korunmasında etkili olduğunu ve over dokusunda gözlemlenen histopatolojik iyileşme ile paralellik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, HT'nin TRPC1 üzerinden kalsiyum sinyalizasyonunu modüle etmesi, dokulardaki oksidatif stres yanıtını baskılaması ve hücrel bütünlüğü desteklemesi, Dox kaynaklı over toksisitesine karşı koruyucu etkisinin temel moleküler dayanaklarını oluşturmaktadır.

6. SONUÇ

Yapılan histopatolojik incelemeler sonucunda, Dox uygulamasının ovaryum dokusunda çeşitli gelişim aşamalarındaki foliküllerde ve ovaryum medullasında dejeneratif değişimlere neden olduğu, ayrıca kortikal bölgede kistik folikül sayısında görece bir artışa yol açtığı belirlenmiştir.

Doksorubisin uygulaması ayrıca, oksidatif stres göstergelerinde belirgin artış ve genel hücresel düzeyde hasar meydana getirmiştir. HT ile yapılan uygulamanın ise bu olumsuz hücresel etkileri önemli ölçüde hafiflettiği görülmüştür. HT uygulanan gruplarda overtoksisiteye ilişkin bulguların gerilediği, antioksidan savunma sistemine ait parametrelerin güçlendiği ve hücresel redoks dengesinin daha stabil hale geldiği saptanmıştır. Bu veriler, HT'nin yüksek antioksidan kapasitesi sayesinde serbest radikallerin etkisini azaltabildiğini ve toksisiteye bağlı oksidatif stres üzerinde koruyucu bir etki sağlayabildiğini göstermektedir.

Ayrıca histopatolojik analizler, HT'nin yalnızca oksidatif hasarı sınırlandırmakla kalmayıp hücresel onarım mekanizmalarının korunmasına da katkı sunduğunu ortaya koymuştur. Bu bağlamda, doğal bir fenolik bileşik olan HT, Dox gibi yaygın kullanılan bir kemoterapötik ajanın neden olduğu toksisiteyi azaltabilecek potansiyele sahiptir.

Hidroksitirosol, hücre içi kalsiyum sinyallemede kritik rol oynayan TRPC1 kanalının ekspresyonunu anlamlı şekilde azaltmaktadır. TRPC1, hücre zarında bulunan ve ekstraselüler ortamdan kalsiyum girişini sağlayan bir kanal proteini olup, hücresel işlevlerin düzenlenmesinde önemli bir bileşendir. HT'nin TRPC1 ekspresyonunu düşürmesi, hücre içi kalsiyum seviyelerinin düzenlenmesine doğrudan etki ederek aşırı kalsiyum birikimini engellemekte ve böylece oksidatif stres ve hücresel hasar riskini azaltmaktadır. Ayrıca, HT'nin lipofilik yapısı sayesinde hücre içine kolayca girmesi, TRPC1 kanalının regülasyonunda etkili olmasını sağlamaktadır. Bu mekanizma, HT'nin antioksidan ve koruyucu etkilerinin moleküler temelini oluşturarak, özellikle kalsiyum kaynaklı hücre hasarlarının önlenmesinde önemli bir rol oynar.

Sonuç olarak, elde edilen bulgular doğrultusunda HT'nin, Dox kaynaklı toksik ve genotoksik etkilere karşı koruyucu bir ajan olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir. Ancak bu etkinin klinik uygulamalara yansıtılabilmesi için farklı deneysel model sistemlerinde, daha geniş örneklem gruplarıyla ve uzun dönemli izleme verileriyle desteklenmesi gerekmektedir. Özellikle dozaj, uygulama süresi ve uzun vadeli etkiler gibi

parametrelerin ayrıntılı biçimde ortaya konulması, HT'nin overtoksisitesine bağlı yan etkilerin azaltılmasında tamamlayıcı bir tedavi seçeneği olarak kullanılabilirliğini netleştirmek ağısından büyük önem arz etmektedir.



KAYNAKÇA

- [1] Smith, B. J. (1991). "Comparison of random and serial sections in assessment of ovarian toxicity." *Reproductive Toxicology*, 5(4), 379–383.
- [2] Güney, M. (2007). "Ovarian toxicity in rats caused by methidathion and ameliorating effect of vitamins E and C." *Human & Experimental Toxicology*, 26(6), 491–498.
- [3] Zhang, T. (2017). "Effect of doxorubicin-induced ovarian toxicity on mouse ovarian granulosa cells." *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 86, 1–10.
- [4] İlhan, İ. (2022). "Doksorubisin ile oluşturulan böbrek hasarında lerkandipinin antioksidan ve antiapoptotik etkilerinin BCL-2/BAX/Sit C/CAS-3 yolağı üzerinden araştırılması." *Medical Journal of Süleyman Demirel University*, 29(4), 671–679.
- [5] Maronpot, R. R. (1987). "Ovarian toxicity and carcinogenicity in eight recent National Toxicology Program studies." *Environmental Health Perspectives*, 73, 125–130.
- [6] Luderer, U. (2014). "Ovarian toxicity from reactive oxygen species." *Vitamins & Hormones*, 94, 99–127.
- [7] Eralp, T. N. (2024). Doksorubisin ve Abemaciclibin meme kanseri üzerindeki etkilerinin moleküler olarak irdelenmesi. Yüksek lisans tezi. İstanbul: Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [8] Akyüz, A. (2023). Kemoterapötik Doksorubisin ve 5-Florourasil'in Kurkumin ve C Vitamini ile kombine uygulamalarının MCF-7 hücrelerine etkilerinin değerlendirilmesi. Yüksek lisans tezi. Tekirdağ: Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [9] Jawad, M. H. J. (2024). "TNF α -doksorubisin yüklü altın nanopartiküllerin sentezi, karakterizasyonu ve meme kanseri tedavisinde kullanılabilirliğinin in vitro koşullarda araştırılması." *Journal of Nanomedicine*, 12(3), 45-58.
- [10] Bayrak, E. (2020) Doksorubisin uygulanan sıçanlarda apelin-13 molekülünün karaciğere etkisi. Uzmanlık tezi. Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı.
- [11] Ateş, Ö. (2023). Sıçanlarda doksorubisine bağlı kardiyotoksisite üzerine vinkristin ve zeytin yaprağı ekstratının (tyrosol) serum biyokimyasal ve histopatolojik etkilerinin karşılaştırılması. Yüksek lisans tezi. Bursa: Bursa Uludağ Üniversitesi.

- [12] Şen, E. (2020). “Sıçan ovaryum dokusunda doksorubisin ile indüklenmiş folliküler apoptotik aktivasyonda Dialil Disülfid’in koruyucu etkisi.” *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 46(1), 1–8.
- [13] Hamurcu, Z. Y., & Metin, İ. (2022–2023). Doksorubisin ve Flavopiridol kombinasyonunun meme kanser hücrelerinde FOXM1, Ras, MAPK ve NFkB sinyal yolağına etkisi. Yükseköğretim Kurumları tarafından desteklenen araştırma projesi. Yüksek Lisans Tezi. Kayseri: Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [14] Oruç Demirbağ, H. (2024). Doksorubisin kaynaklı ovaryum hasarında adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin PTEN/AKT/FOXO3A yolağı ve follikülogenez üzerine etkilerinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi. Malatya: İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [15] Kırılan, M., & Yorulmaz, A. (2006). “Zeytin meyvesinde ve sızma zeytin yağında bulunan başlıca fenoller ve bunları etkileyen bazı faktörler.” *Anadolu University Journal of Science and Technology*, 7(2), 311–321.
- [16] Ede, A., & El, S. N. (2022). “Zeytinyağı üretim atıklarının biyolojik aktiviteleri ve gıdalarda kullanım potansiyeli.” *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 10(5), 798–810.
- [17] Gülcemal, N. (2021). Bazı zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitlerinin farklı gelişim dönemlerinde görülen pomolojik ve fizyolojik değişimlerin incelenmesi .Yüksek lisans tezi. Isparta: Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü.
- [18] Tuğrul, B., & Oktay, L. M. (2014). “Sağlık ve hastalıkta hidroksitirozolün rolü.” *Turkish Journal of Oncology/Türk Onkoloji Dergisi*, 29(4).
- [19] Li, C.-J. (2021). “The molecular regulation in the pathophysiology in ovarian aging.” *Aging and Disease*, 12(3), 934.
- [20] Ergüven, S. P., & Hekimoğlu, G. (2024). *Histoloji ve Embriyoloji-I*. Ankara:Sağlık & Bilim Yayınları.
- [21] Wang, X., Wang, L., & Xiang, W. (2023). “Mechanisms of ovarian aging in women: A review.” *Journal of Ovarian Research*, 16(1), 67.
- [22] Findlay, J. (2018). “Ovarian physiology: Follicle development, oocyte and hormone relationships.” *Animal Reproduction*, 6(1), 16–19.

- [23] Rezaei-Sadabady, R. (2013). "Studies of the relationship between structure and antioxidant activity in interesting systems, including tyrosol, hydroxytyrosol derivatives indicated by quantum chemical calculations." *Soft*, 2(4), 40–45.
- [24] Haspolat, Y. K., Aktar, F., & Ege, S. (2019). Çocuk ve ergenlerde gonad hastalıkları. In S. Bilici (Ed.). Ankara: Orient Yayınları, 975-978.
- [25] Kinnear, H. M. (2020). "The Ovarian Stroma as a New Frontier" *Reproduction*, 160(3), R25–R39.
- [26] Okamura, H. (2006). "Structural changes and cell properties of human ovarian surface epithelium in ovarian pathophysiology." *Microscopy Research and Technique*, 69(6), 469–481.
- [27] Kabasakal, G., Tural, E., & Ünal, M. S. (2023). "Deneysel overyan yetmezliklerde mezenkimal kök hücrelerin ovaryum dokusuna etkisi." *Kocatepe Tıp Dergisi*, 24(2), 249–253.
- [28] Irani, M., & Merhi, Z. (2014). "Role of vitamin D in ovarian physiology and its implication in reproduction: A systematic review." *Fertility and Sterility*, 102(2), 460–468.e3.
- [29] Li, L. (2021). "The signaling pathways involved in ovarian follicle development." *Frontiers in Physiology*, 12, 730196.
- [30] Ak, G. (2010). Folat-PEG-doxorubicin türevinin sentezlenerek teknesyumla işaretlenmesi ve kanser görüntüleme ajanı olarak kullanım olanaklarının araştırılması. Yüksek lisans tezi. İzmir: Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [31] Houba, P. (2001). "A novel doxorubicin-glucuronide prodrug DOX-GA3 for tumour-selective chemotherapy: Distribution and efficacy in experimental human ovarian cancer." *British Journal of Cancer*, 84(4), 550–557.
- [32] Bayrak, E. (2020). Doksorubisin uygulanan sıçanlarda apelin-13 molekülünün karaciğere etkisi. Yüksek lisans tezi. Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı.
- [33] Kenar, Z. Ç. (2024). Ratlarda doxorubicin uygulamalarında kalp dokusu hasarının moleküler ve patolojik yöntemlerle araştırılması. Yüksek lisans tezi. Edirne: Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [34] Green, A. E., & Rose, P. G. (2006). "Pegylated liposomal doxorubicin in ovarian cancer." *International Journal of Nanomedicine*, 1(3), 229–239.

- [35] Rose, P. G. (2005). "Pegylated liposomal doxorubicin: Optimizing the dosing schedule in ovarian cancer." *The Oncologist*, 10(3), 205–214.
- [36] Pisano, C. (2013). "Clinical trials with pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of ovarian cancer." *Journal of Drug Delivery*, 2013(1), 898146.
- [37] Aydar, A., Öner, T. Ö., & Ücok, E. (2017). "Effects of hydroxytyrosol on human health." *EC Nutrition*, 11(4), 147–157.
- [38] Torić, J., Barbarić, M., & Brala, J. (2019). "Hydroxytyrosol, tyrosol and derivatives and their potential effects on human health." *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(10), E2001.
- [39] Martínez, L., Ros, G., & Nieto, G. (2018). "Hydroxytyrosol: Health benefits and use as functional ingredient in meat." *Medicines*, 5(1), 13.
- [40] Eraç, Y., Selli, Ç., & Tosun, M. (2009). "Kalsiyumun çok yönlü işlevselliğinde TRPC iyon kanallarının rolü." *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 2, 161–184.
- [41] Özaydin, S. (2017). "İnsanda tümörlü ve tümörsüz prostat dokularında etkin olduğu düşünülen iyon kanal ekspresyonlarının araştırılması." Yüksek Lisans Tezi. Elazığ: Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [42] Erac, Y., Selli, C., & Tosun, M. (2016). "TRPC1 ion channel gene regulates store-operated calcium entry and proliferation in human aortic smooth muscle cells." *Turkish Journal of Biology*, 40(6), 1336–1344.
- [43] Ambudkar, İ. (2010). "Recent progress in the regulation of TRPC1 by store depletion." *Cell Membranes and Free Radical Research*, 2(2), 79–86.
- [44] Elzamzamy, O. M., Penner, R., & Hazlehurst, L. A. (2020). "The role of TRPC1 in modulating cancer progression." *Cells*, 9(2), 388.
- [45] Nacar, E., & Nacar, A. (2017). "Hematoksilen ve Eozin: Histopatologların eskimeyen dostları." *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi*, 8(29), 46–49.
- [46] Yörükoğlu, K. (2014). "Hematoksilen-Eozin'den moleküler tekniklere: Patolojinin tarihçesine kısa bir bakış." *Güncel Patoloji Dergisi*, 1(1), 1–7.
- [47] Goldner, J. (1938). "A modification of the Masson trichrome technique for routine laboratory purposes." *The American Journal of Pathology*, 14(2), 237.

- [48] Costa, G. M. (2019). "Picrosirius red and Masson's trichrome staining techniques as tools for detection of collagen fibers in the skin of dogs with endocrine dermatopathologies." *Ciência Animal Brasileira*, 20, e-55398.
- [49] Juntausa, S. (2024). "Quantitative evaluation of different fixatives for Masson trichrome staining in canine intestinal tissue: An image analysis-based comparative study." *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 54(1), 55–62.
- [50] Suvik, A., & Effendy, A. (2012). "The use of modified Masson's trichrome staining in collagen evaluation in wound healing study." *Mal J Vet Res*, 3(1), 39–47.
- [51] Schacht, V., & Kern, J. S. (2015). "Basics of immunohistochemistry." *Journal of Investigative Dermatology*, 135(3), 1–4.
- [52] Duraiyan, J. (2012). "Applications of immunohistochemistry." *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 4(Suppl 2), S307–S309.
- [53] Onat, E., Türk, A., Kocaman, N., Hançer, S., Susam, S., Parlar, A., Turhan, S., & Özer, M. K. (2025). "Hydroxytyrosol protects isoproterenol-induced myocardial infarction through activating Notch signaling." *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 28(2), 217–223.
- [54] Hawes, D. (2009). "Immunohistochemistry." In *Modern Surgical Pathology* (p. 48).
- [55] Ben-Aharon, I. (2010). "Doxorubicin-induced ovarian toxicity." *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8, 1–7.
- [56] Mohan, U. P. (2021). "Mechanisms of doxorubicin-mediated reproductive toxicity—a review." *Reproductive Toxicology*, 102, 80–89.
- [57] Xiao, S. (2017). "Doxorubicin has dose-dependent toxicity on mouse ovarian follicle development, hormone secretion, and oocyte maturation. *Toxicological Sciences*," 157(2), 320–329.
- [58] Al-Kawlani, B. (2020). "Doxorubicin induces cytotoxicity and miR-132 expression in granulosa cells." *Reproductive Toxicology*, 96, 95–101.
- [59] Wang, Y. (2019). "Doxorubicin obliterates mouse ovarian reserve through both primordial follicle atresia and overactivation." *Toxicology and Applied Pharmacology*, 381, 114714.
- [60] Pugazhendhi, A. (2018). "Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems." *Life Sciences*, 200, 26–30.

- [61] Fareed, S. (2023). "Protective role of olive oil in the doxorubicin induced ovarian toxicity in female rats." *Pakistan Journal of Physiology*, 19(3), 31–35.
- [62] Chiavaroli, A. (2022). "Protective effects of PollenAid Plus Soft Gel Capsules' hydroalcoholic extract in isolated prostates and ovaries exposed to lipopolysaccharide." *Molecules*, 27(19), 6279.
- [63] Rodríguez-Ramiro, I. (2011). "Olive oil hydroxytyrosol reduces toxicity evoked by acrylamide in human Caco-2 cells by preventing oxidative stress." *Toxicology*, 288(1–3), 43–48.
- [64] Bertelli, M. (2020). "Hydroxytyrosol: A natural compound with promising pharmacological activities." *Journal of Biotechnology*, 309, 29–33.
- [65] odríguez-Lara, A. (2019). "Acute/subacute and sub-chronic oral toxicity of a hydroxytyrosol-rich virgin olive oil extract." *Nutrients*, 11(9), 2133.
- [66] Harun, N. (2024). "Oleuropein and hydroxytyrosol as antidiabetics: A review on extraction method, effectiveness and toxicity effect." *Military Medical Science Letters/Vojenské zdravotnické Listy*, 93(4).
- [67] Leri, M. (2019). "Oleuropein aglycone and hydroxytyrosol interfere differently with toxic A β 1-42 aggregation." *Food and Chemical Toxicology*, 129, 1–12.
- [68] Zygouri, P. (2023). "Oxidized-multiwalled carbon nanotubes as non-toxic nanocarriers for hydroxytyrosol delivery in cells." *Nanomaterials*, 13(4), 714.
- [69] Anter, J. (2014). "Evaluation of potential antigenotoxic, cytotoxic and proapoptotic effects of the olive oil by-product "alperujo", hydroxytyrosol, tyrosol and verbascoside." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 772, 25–33.
- [70] Maranesi, M. (2021). "Effects of dietary polyphenols from olive mill waste waters on inflammatory and apoptotic effectors in rabbit ovary." *Animals*, 11(6), 1727.
- [71] Zhang, H.-Y. (2024). "Reversing Zearalenone Toxicity: The role of hydroxytyrosol in zebrafish." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(46), 25905–25918.
- [72] Mwakalukwa, R. (2019). "Anti-allergic activity of polyphenolic compounds isolated from olive mill wastes." *Journal of Functional Foods*, 58, 207–217.

[73] Rogers, M. (2020). The biological potentials of olive oil by-products: Valorization through recovery and utilization of bioactive metabolites. Doctoral dissertation. Kyushu: Kyushu University Institutional Repository.