

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

**HİSTEROSALPİNGOGRAFİ İŞLEMİNİN OVER ÜZERİNE
OLAN ZARARLI ETKİLERİNİ ÖNLEMEDE AMİFOSTİN'İN
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr.Behzat CAN**

**TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Remzi ATILGAN**

**ELAZIĞ
2015**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Murad ATMACA

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. M. ŞİMŞEK

Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Remzi ATILGAN

Danışman

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

.....

.....

.....

.....

.....

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi, deneyim ve yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mehmet ŞİMŞEK, saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Ekrem SAPMAZ, Doç. Dr. Burçin KAVAK, Doç. Dr. Alparslan AKYOL, Doç. Dr. Sema ÖZKAN, Doç. Dr. Banu AYGÜN'e içten teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin hazırlanmasında çok büyük emeği geçen başta Yrd. Doç. Dr. Remzi ATILGAN'a, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU'na ve histoloji çalışanlarına, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Nevin İLHAN'a ve tüm Tıbbi Biyokimya bölümü çalışanlarına teşekkür ederim.

Tezime maddi destek sağlayan FÜBAP ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığımız hemşire ve personel arkadaşlarıma ayrıca değerli çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim ve tez hazırlanması süresince destek gördüğüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Bu çalışma, Histerosalpingografi (HSG) işleminin over üzerine olan erken ve geç dönem zararlı etkilerini ortaya koyma ve oluşan zararlı etkileri önlemede antioksidan, sitoprotektif ve radyoprotektif bir ajan olan amifostinin etkinliğinin incelenmesi amacıyla yapıldı.

Çalışma, 40 adet erişkin dişi Winstar Albino cinsi rat rastgele, prospektif, tek kör olarak Kontrol grubu, Radyasyon grubu, HSG grubu ve Amifostin grubu şeklinde 4 gruba ayrıldı. Her gruptaki 10 ratın yarısı rastgele seçilerek erken dönem etkilerini araştırmak üzere 3 saat sonra, diğer yarısı ise 1 ay sonra batinları açılarak overleri çıkarıldı. Her ratın overinin birinde histolojik ve immünohistokimyasal inceleme ve proliferasyon hücre çekirdek antijeni (PCNA) aktivitesi, diğer over dokusunda malondialdehit (MDA), Total Oksidan Seviye (TOS), Total Antioksidan Kapasite (TAK), Nitrik Oksit (NO), Tümör Nekrotizan Faktör-alfa (TNF- α) çalışıldı. Alınan intrakardiyak kan örneklerinde Antimüllerian Hormon (AMH) düzeyleri ölçüldü.

Oksidatif stres göstergesi olan parametrelerin (MDA, TOS, NO) tamamında 3. saatte gruplar arasında anlamlı fark izlenmezken, 1. ayda over dokusunda radyasyon ve HSG gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik izlendi ($p<0,05$). Bununla birlikte amifostin grubunda oksidatif stres bulguları belirgin olarak daha düşük izlendi. AMH değerleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmedi. Radyasyon ve HSG gruplarında histolojik olarak germinal epitel dejenerasyonu ve apoptozis anlamlı olarak artmış iken, PCNA immünreaktivitesi tüm gruplarda benzerdi. Amifostin grubunda germinal epitel dejenerasyonu ve apoptozis ise anlamlı olarak azalmıştı.

Sonuç olarak bizim çalışmamız gösterdi ki, amifostin uygulaması radyasyon ve HSG işlemine bağlı olarak gelişen oksidatif hasarı onarmada etkili bir ajandır.

Anahtar Kelimeler: Histerosalpingografi, amifostin, oksidatif hasar, over

ABSTRACT

ACTIVITY OF AMIFOSTINE IN PREVENTION OF HARMFUL EFFECTS OF HYSTEROSALPINGOGRAPHY ON OVARY: EXPERIMENTAL STUDY

This study is conducted to examine the harmful effects of Hysterosalpingography (HSG) on ovary in early and late period and investigate the effects of amifostine, an antioxidant, cytoprotective and radioprotective substance to inhibit its harmful effects.

In the study, 40 adult female Wistar albino genus rats were divided into 4 groups as control group, radiation group, HSG group and Amifostine group in a randomized, prospective and single blind manner. Ten rats in each group were again randomly divided into two groups. Both ovaries of each rat were removed after 3 hours to determine early effects and in the rest the ovaries were removed one month after the procedures to determine late effects.

One of ovary in each rat were used for histologic, immunohistochemical examination and to determine proliferated cell nuclear antigen (PCNA) immunoreactivity, other ovaries were used to determine levels of Malondialdehyde (MDA), Total Oxidant Status (TOS), Total Antioxidant Capacity (TAC), Nitric Oxide (NO), Tumor Necrotizing Factor-alpha (TNF- α). Intracardiac blood samples were used to determine Antimullerian Hormone (AMH) levels.

No statistically difference was found between the groups in respect to parameters showing oxidative stress (MDA, TOS, NO) at the third hour of examination but these parameters were significantly higher among radiation and HSG groups when compared to control group at the end of first month ($p < 0.05$). However evidence of oxidative stress were found to be lower in amifostine group. There was no statistically significant difference between the groups in terms of AMH levels. While histologic examination revealed that germinal epithelial degeneration and apoptosis were prominent in HSG and radiation group, there was no difference between the the control and other groups in term of PCNA. Germinal epithelial degeneration and apoptosis were lower in statistically significant amount in the amifostine group.

As a result, our study demonstrated that amifostine is an effective substance in reducing oxidative damage to HSG procedure and radiation.

Keywords: histerosalpingography, amifostine, oxidative damage, ovary

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vii
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
KISALTMALAR LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	3
1.1.1. Overin Yapısı ve Fonksiyonları	3
1.1.1.1. Over Embriyolojisi ve Oogenez	3
1.1.1.2. Prolifere Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA)	4
1.1.1.3. Over Histolojisi	5
1.1.1.4. Pre-antral folikül popülasyonu	6
1.1.1.5. Folliküler gelişimin başlaması	7
1.1.1.6. Preantral büyüme evresi veya bazal foliküler büyüme	8
1.1.1.7. Oositlerde apoptoz	8
1.1.1.8. Tümör Nekrotizan Faktör Alfa (TNF- α)	8
1.1.1.9. Rodentlerde Follikül Gelişiminin Kronolojisi	9
1.1.1.10. Östrus Siklusu	10
1.1.2. Over Follikül Reserv Testleri	10
1.1.2.1. Bazal Serum FSH	10
1.1.2.2. Bazal FSH/LH Oranı	11
1.1.2.3. Bazal Serum Östradiol (E2)	11
1.1.2.4. Bazal Serum İnhibin B	11
1.1.2.5. CCCT (Clomiphene Citrate Challenge Test)	11
1.1.2.6. Antral Folikül Sayısı (AFS)	11
1.1.2.7. Over Volümü	12

1.1.2.8. Anti Mülleryan Hormon (AMH)	12
1.1.3. Oksidatif Stres	15
1.1.3.1. Serbest Radikaller	15
1.1.3.2. Serbest Radikallerin Hücre Düzeyinde Oksidatif Etkileri	17
1.1.3.3. Malondialdehit (MDA)	17
1.1.3.4. Nitrik Oksit (NO [•])	18
1.1.3.5. Total oksidatif Seviye (TOS)	18
1.1.4. Radyasyon Hasarı ve Oksidatif Stres	18
1.1.5. Histerosalpingografi (HSG)	20
1.1.6. Radyoprotektif Ajanlar ve Mekanizması	22
1.1.6.1. Amifostin	24
1.1.7. Antioksidanlar	27
1.1.7.1. Endojen antioksidanlar	28
1.1.7.2. Eksojen antioksidanlar	28
1.1.7.3. Total Antioksidan Kapasite (TAK, TAC)	29
2. GEREÇ VE YÖNTEM	30
2.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Hayvan Bakımı	30
2.2. Deneyin Yapılışı	30
2.3. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması	32
2.4. AMH Düzeylerinin Ölçümü	33
2.5. TNF- α Düzeylerinin Ölçümü	33
2.7. TOS Düzeylerinin Ölçümü	34
2.8. MDA Düzeylerinin Ölçümü	34
2.9. NO Düzeylerinin Ölçümü	34
2.10. İmmünohistokimyasal İnceleme	34
2.11. TUNEL Metodu	36
2.12. İstatistiksel Analiz	37
3. BULGULAR	38
3.1. Biyokimyasal Bulgular	38
3.1.1. MDA Düzeyi Sonuçları	38
3.1.2. NO Düzeyi Sonuçları	38
3.1.3. TOS Düzeyi Sonuçları	39

3.1.4. TAK (TAS) Düzeyi Sonuçları	39
3.1.5. TNF- α Düzeyi Sonuçları	40
3.2. Histolojik Bulgular	41
3.3. TUNEL Bulguları	42
3.4. İmmünohistokimyasal Bulgular	43
4. TARTIŞMA	44
5. KAYNAKLAR	51
6. ÖZGEÇMİŞ	68

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Radyoprotektif etkili ajanlar	24
Tablo 2. Standart rat yemi	30
Tablo 3. İmmünohistokimyasal boyama prosedürü	35
Tablo 4. TUNEL boyama prosedürü	37
Tablo 5. MDA Düzeyi Sonuçları	38
Tablo 6. NO Düzeyi Sonuçları	39
Tablo 7. TOS Düzeyi Sonuçları	39
Tablo 8. TAK (TAS) Düzeyi Sonuçları	40
Tablo 9. TNF- α Düzeyi Sonuçları	40
Tablo 10. AMH Düzeyi Sonuçları	41
Tablo 11. Apoptotik indeks	43
Tablo 12. PCNA immünreaktivitesi	43

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Overin Histolojik Yapısı	6
Şekil 2. Overdeki folüküllerin gelişimi	7
Şekil 3. Amifostinin biyokimyasal yapısı.	25
Şekil 4. HSG çekilen ratlar	32
Şekil 5. 3. Saat. Masson trikrom.	41
Şekil 6. 1. ay.Masson trikrom.	42

KISALTMALAR LİSTESİ

AFS	: Antral Folikül Sayısı
AMH	: Anti-Müllerian Hormon
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CAT	: Katalaz
CCCT	: Clomiphene Citrate Challenge Test
cGy	: Santigrey
DNA	: Deoksiribonükleik asit
E2	: Bazal Serum Östradiol
FDA	: Amerika gıda ve ilaç dairesi
FSH	: Follikül stimüle edici hormon
GCT	: Granüloza hücreli tümör
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GRD	: Glutasyon redüktaz
GSHPx	: Glutasyon peroksidaz
GST	: Glutasyon-s transferaz
H[•]	: Hidrojen radikali
H₂	: Moleküler hidrojen
H₂O₂	: Hidrojen peroksid
HOO[•]	: Hidroperoksil radikali
HSG	: Histerosalpingografi
IL-1	: İnterlökin 1
IV	: İntravenöz
KT	: Kemoterapi
LH	: Luteinleştirici hormon
MDA	: Malondialdehit
mRad	: Milirad
NO[•]	: Nitrik oksit
O₂⁻	: Süperoksid
OH[•]	: Hidroksil radikali

PCNA	: Prolifere Hücre Çekirdek Antijeni
PCO	: Polikistik over
RNA	: Ribonükleik asit
ROM	: Reaktif oksijen radikalleri
RT	: Radyoterapi
sn	: Saniye
SOD	: Süperoksid dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
TAC	: Total Antioxidant Capacity
TAK	: Total Antioksidan Kapasite
TBA	: Tiyoarbitürik asit
TGF-b	: İnhibin transforming growth faktör-b
TNF-α	: Tümör Nekrotizan Faktör Alfa
TNF-β	: Tümör Nekrotizan Faktör Beta
TOS	: Total oksidatif Seviye
UV	: Ultraviyole
WR	: Walter Reed

1. GİRİŞ

Histerosalfingografi (HSG) işlemi, tubalar ve uterin kavitenin kontrast madde verilerek radyografik yöntemlerle incelenmesinde hem tarama hem de tanı yöntemidir. İşlem esnasında kontrast maddenin basınçlı etkisine bağlı tedavi edici etki de görülebilmektedir. İlk HSG 1910 yılında çekilmiş ve radyolojik tetkik olarak kabul edilmiştir. HSG hem tubaların luminal yapısını hem de açık olup olmadıklarını göstermesi ayrıca uterin kavitenin yapısını göstermesi nedeni ile infertil olgularda yaygın kullanım alanı bulmuştur. HSG işleminin dezavantajları ise, bazen ağrılı ve rahatsız edici bir işlem olmasının yanında, az miktarda iyonizan radyasyona maruziyettir (1, 2).

Düşük dozdaki (≤ 10 cGy) iyonizan radyasyonun canlılarda oluşturacağı sağlık sorunlarının çeşitliliği ve boyutları hususunda gerçekçi bir tahminde bulunulamamaktadır. Çevre koşulları, diyet ve canlılar arasındaki biyolojik değişkenlik gibi bir takım faktörlerde oluşacak hasarda rol oynamaktadır. Ayrıca, alınan total radyasyon dozu, her bir seansta alınan doz ve maruziyet süresinin uzaması, lineer enerji transferi, organizmanın ortaya koyduğu savunma mekanizmaları, protoonkogen aktivasyonuna yol açabilecek eş zamanlı alınan kimyasal karsinojenler ve diğer toksinler ile eşlik eden daha pek çok faktörün varlığı da, iyonizan radyasyonla ilişkili hasarları arttırmaktadır. Bu bakımdan düşük dozdaki iyonizan radyasyona hiçbir koşulda güvenli ya da tolere edilebilir gözüyle bakılmamalıdır çünkü dozdan bağımsız olarak radyasyon etkisiyle neoplastik ve non-neoplastik hastalıklara yol açabilecek somatik mutasyonlar gelişebilir. Ayrıca diğer toksinlerle etkileşim sonucunda hayatı tehdit eden kalıtsal mutasyonlar da tetiklenebilmektedir. Dolayısıyla iyonizan radyasyon ile organizma arasındaki etkileşim, çok değişkenli bir süreç şeklinde düşünülmelidir (3).

İyonizan radyasyon, etkileşime girdiği yüzeylerde iyonların serbestleşmesine yol açmak suretiyle bir takım kimyasal değişiklikleri uyarabilmektedir. Bunu farklı elektromanyetik dalga ya da partiküller etkisi ile de yapabilmektedir. Bu değişiklikler günler ya da haftalar içinde hücre hasarına veya organizmanın ölümüne yol açabilecek bir metabolik düzensizliğe neden olur. Radyasyon hasarı hedef moleküller ile doğrudan bir etkileşim neticesinde ya da dolaylı olarak başlıca su moleküllerinden türeyen aktif kimyasal ve farmakolojik elementlere bağlı olarak gelişebilir.

Radyasyon absorbe edildikten sonra atomların yapısındaki elektronları ve dokuları etkiler. Bu süreç pozitif yüklü iyonların oluşumuyla sonlanır. Ancak biyolojik açıdan hücre düzeyinde gelişen en önemli değişiklik, serbest radikallerdir. Bunlar yörüngelerinden birinde eşlenmemiş elektron taşıyan moleküllerin açığa çıkması sonucu oluşur. Serbest radikaller ömürleri sadece birkaç saniye ile sınırlı olan bileşiklerdir (4).

Su içeriği yüksek olan dokularda iyonizan radyasyonun etkileri özellikle su molekülleri üzerinden oluşmaktadır. Su molekülünün radyolizisi, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler hidrojen (H_2) gibi moleküllerin ve aynı zamanda hidrojen radikali ($H^\bullet$), hidroksil radikali ($OH^\bullet$), hidroperoksil radikali ($HOO^\bullet$) ve süperoksit (O_2^-) gibi yüksek aktiviteli radikallerin oluşumuna yol açar. Sülfhidril bileşikler radyasyonun dolaylı etkilerine karşı son derece duyarlıdır. Ayrıca kompleks organik moleküllerin yapısındaki disülfid bağları ve sülfür atomları da sayılan radikallerin etkilerine oldukça duyarlıdır. Hücresel proteinlerin yapısında bulunan sülfhidril bileşiklerinin oksidasyonu radyasyona bağlı hasarın gelişiminde rol oynayan başlıca faktördür.

Serbest radikaller hücrenin genetik materyalinde de bir takım değişikliklere yol açabilir. Örneğin serbest radikallerin etkisiyle nükleik asitlerin yapısındaki hidrojen bağları ile baz-şeker molekülleri arasındaki bağlar kopabilir, şeker molekülleri okside olabilir, nükleotid zinciri kırılabilir ve terminal fosfatlar serbestleşebilir (4).

Radyoprotektif etki mekanizmaları şu şekillerde tanımlanabilir: serbest radikal ürünlerinin etkisizleştirilmesi, hedef moleküllere hidrojen atomu bağlanması, karışık disülfid bileşiklerinin oluşumu, hücre bölünmesinin yavaşlatılması ve dokularda hipoksi gelişiminin uyarılması. Radyoprotektif ajanlar başlıca 4 grupta incelenirler: bunlar tiol bileşikler, diğer sülfür bileşikler, anestezik ilaçlar, analjezikler ve trankilizanlar gibi farmakolojik ajanlar ve WR-1065, WR-2721, vitamin C ve E ve glutatyon gibi diğer radyoprotektif etkili bileşiklerdir (4).

Amifostin (WR 2721, Ethylol) özellikle radyoterapi ve kemoterapotik ajanlar nedeni ile ortaya çıkan serbest radikalleri sağlıklı hücrelere spesifik olarak temizleme özelliğine sahip organik tiyofosfat olan hücre koruyucu bir ön ilaçtır. Hücre zarında bulunan alkalen fosfataz enzimi ile defosforile edilerek aktif formu olan WR 1065' e

dönüşür. WR 1065' in normal hücreler tarafından daha fazla alınmasının sebebi; normal dokuların tümör dokularından daha fazla alkalen fosfataz aktivitesine sahip olmasıdır. Ayrıca daha iyi kanlanması ve daha yüksek pH' ya sahip olması da bu durumu daha da kolaylaştırır. Hücre içerisine alınan WR 1065, radyasyon nedeniyle ortaya çıkan serbest radikallere hidrojen iyonu vererek veya oksijen miktarını azaltarak sitoprotektif etkisini gösterir. Sitotoksik ajanları ise ya direk bağlanarak ya da inaktive ederek etkisizleştirir (3, 5). Yapısındaki sülfidril atomu sayesinde, kemoterapötik ajanlar ve radyoterapi (RT) nedeniyle oluşan serbest radikaller sonucu meydana gelen ve DNA hasarına yol açan reaktif nükleofilleri yok eder (6).

Bu çalışmadaki amacımız histerosalpingografi işlemi sırasında radyasyonla ortaya çıkan zararlı etkilerin overdeki hücre hasarını ve follikül rezervindeki etkileşimin gösterilmesi ve amifostinin hücre koruyucu etkisinin değerlendirilmesidir.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. Overin Yapısı ve Fonksiyonları

Kadın üreme sisteminde bulunan ve uterusun her iki yanında lateral pelvik duvara yakın yerleşmiş olan overler, gametlerin üretilmesi (gametogenez) ve steroid yapıdaki hormonların (östrojen ve progesteron) sentezlenip salgılanmasından sorumludurlar. Puberteden itibaren, üreme yaşamı boyunca kadınlar devamlı olarak aylık üreme sikluslarına girerler. Bu olaylarda hipotalamus, hipofiz bezi, overler ve uterusun işlevleri vardır. Hipotalamustaki nörosekretuar hücreler, gonadotropin salgılatıcı Hormon (GnRH) sentezler ve hipofiz bezinin ön lobuna hipofizyal portal sistem aracılığıyla iletir. GnRH hipofizde üretilir ve overler üzerine etkili hormonların salınmasını uyarır. Bu hormonlar; over folikülünün gelişimini ve folikül hücrelerinden östrojen salınımını uyararak Follikül stimüle edici hormon (FSH) ve ovulasyonu tetikleyen, follikül hücreleri ve korpus luteumu uyararak progesteron üretimini sağlayan Luteinleştirici hormon (LH)'dur (7, 8).

1.1.1.1. Over Embriyolojisi ve Oogenez

Oogenez, oogonia olarak bilinen primitif germ hücrelerin olgun oositlere dönüşmesi sırasında gerçekleşen olaylar dizisidir. Bu süreç, doğum öncesi dönemde

başlar, pubertede tamamlanır ve menopoza kadar devam eder (7, 9). Erken fetal dönemde, vitellus kesesi duvarından köken alan primitif germ hücreleri çoğalarak ameboid hareketlerle gelişmekte olan gonadlara doğru göç eder. Overlere ulaşan oogoniumlar mitoz bölünmeyle çoğalarak primer oositleri oluştururlar. Primer oositler, over stromal hücreleri ile çevrilerek, kortekste tek sıralı epitelyum hücreleri ile çevrelenmiş primordial follikülleri oluştururlar. Her iki overde yaklaşık 500 bin primordial folikül içinde primer oosit 1.mayozun profaz safhasına girer ve diktiat fazda bekler. Primer oositi çevreleyen folliküler hücrelerin oosit olgunlaşma inhibitörü salgılayarak oositin mayoz bölünme aşamasını durdurduğu düşünülmektedir. Cinsel olgunluk dönemi içinde bir bölüm folliküller atreziye ve apoptozise giderken bir bölümü de bu oosit havuzundan ayrılıp gelişimlerini sürdürürler. Yenidoğan bir kız çocuğun overlerinde yaklaşık olarak 2 milyon primer oosit mevcuttur. Ancak gittikçe azalarak pubertede 400 bin kadar kalır, bunlardan ancak 400 tanesi sekonder oosit olarak ovulasyonla atılır (8, 10). Fetal dönemde en fazla 7 milyon'a ulaşabilen germ hücreler, fetal dönemde başlayan oosit apoptoz'u ve doğumdan itibaren menopoz'a dek süren granuloza hücre apoptoz- folliküler atrezi ile tükeneceklerdir (11).

1.1.1.2. Prolifere Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA)

Hücrelerin çoğalması ya da proliferasyonu hücre bölünmesi ile gerçekleşmektedir. Hücrelerin iki yavru hücreye bölünmesi işlemi hücre bölünmesi olarak adlandırılmaktadır. Çoğu hücrede, hücre bölünmesi dört farklı aşamadan meydana gelmekte ve bu evreler sırası ile G1, S, G2 ve M olarak adlandırılmaktadır, ek olarak gerekli hücre dışı sinyalleri almadıkları için bölünmeyen hücrelerin bulunduğu faz ise G0 olarak adlandırılmaktadır (12). G1, S ve G2 evreleri birlikte interfaz olarak adlandırılır ve interfazda mitoz için gerekli hazırlıklar yapılır, M ise bölünmenin gerçekleştiği evredir (12). Bu evrelerde gerçekleşen hücresel olaylar aşağıdaki gibidir.

Mitoz bölünme evrelerinde hücrede gerçekleşen değişimler (12):

G1 evresi: Metabolizma açısından aktif olan hücre, hacimce büyür.

S evresi: Deoksiribonükleik asitin kopyalanması, replikasyonu gerçekleşir.

G2 evresi: Mitoz için gerekli olan proteinler sentezlenir ve hücre büyümesi gerçekleşir.

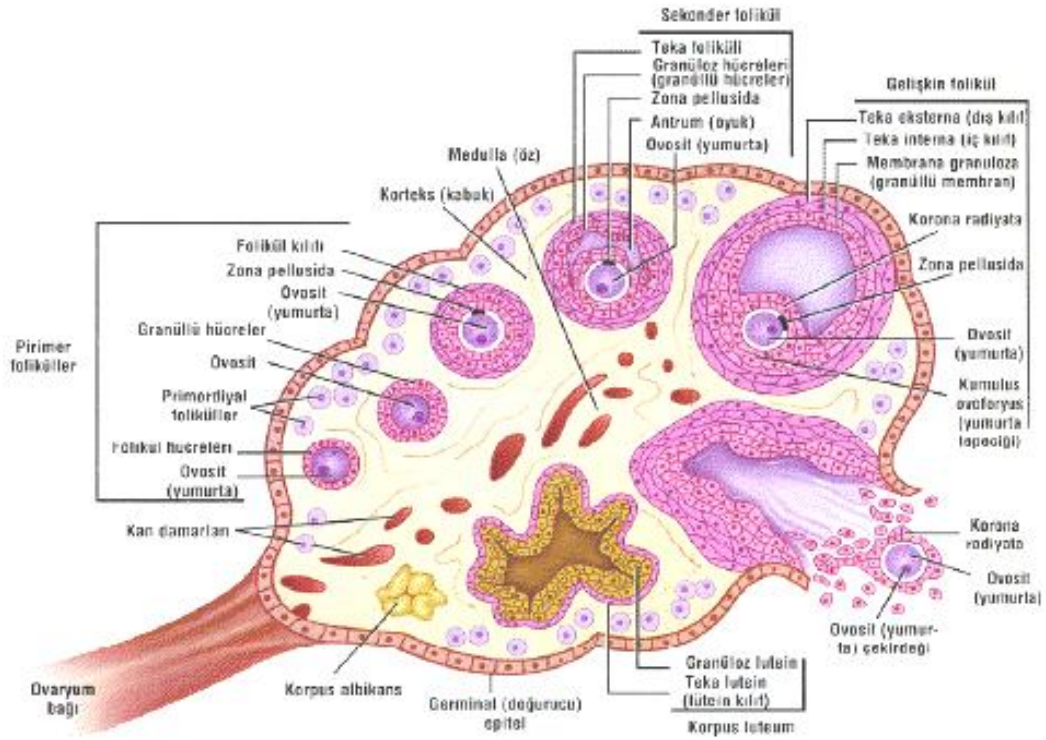
M evresi: Hücrenin bölünerek iki eş yavru hücre oluşturduğu evredir.

G0 evresi: Metabolik aktivitelerini sürdürmekte olan hücrelerdir, fakat bölünme görülmez.

Hücre proliferasyon sürecinde hücrelerde bazı özel antijenler görülür, bu antijenler proliferasyon olmayan hücrelerde görülmemektedir. Histon H3'ün 10. konumdaki serin aminoasidi üzerinden fosforillenmesi, bölünme esnasındaki kromozom yoğunlaşması ile kuvvetli korelasyon göstermektedir (13). Prolifere hücre çekirdek antijeni (PCNA) ekspresyonu üzerinden hücrelerin bölünme döngüsündeki konumları belirlenebilir, PCNA ekspresyonu G fazında artıp, DNA'nın ikilendiği S fazında maksimuma ulaşır. Bölünmenin M evresine geçiş sırasında PCNA ekspresyonunda düşüş görülür (14). Böylece PCNA gibi işaretçilere bakılarak hücrenin bulunduğu bölünme fazı ya da aşaması belirlenebilir. PCNA dışında Ki-67, fosfohiston H3, topoisomerase IIB ya da Aurora kinaz gibi proliferasyon spesifik işaretçilere özgün antikorlar kullanılarak hücre döngüsü incelenebilir (15, 16).

1.1.1.3. Over Histolojisi

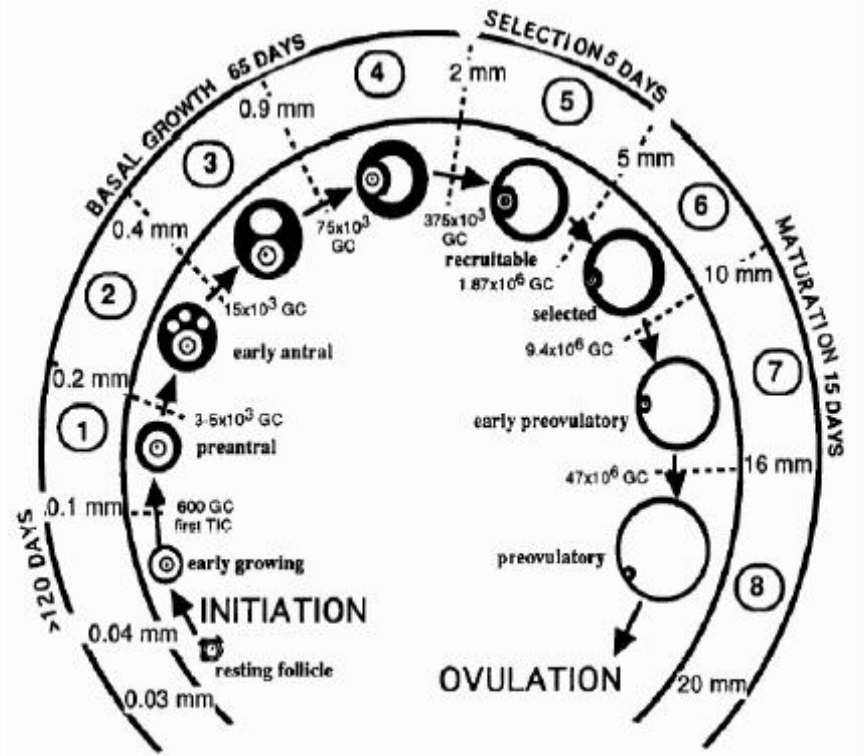
Overlerin yüzeyi tek katlı yassı ya da kübik epitel ile kaplıdır; bu epitel germinal epitelyum olarak adlandırılır. Germinal epitelin altında, overin beyazımsı rengini veren ve tunika albuginea olarak adlandırılan sıkı bir bağ dokusu tabakası mevcuttur. Tunika albugineanın altında oositleri içeren over folliküllerinin bol miktarda bulunduğu korteks vardır. Folliküller, korteksin bağ dokusu (stroma) içinde gömülüdürler. Bu stroma tipik iğ biçiminde fibroblast barındırır ve bu fibroblastlar, hormonal uyarılara diğer organların fibroblastlarından farklı cevap verir. Overin en iç kısmı gevşek bağ dokusu içinde zengin bir damar yatağı barındıran medüller bölgedir (Şekil 1). Korteks ile medulla bölgelerini ayıran kesin bir sınır yoktur (17).



Şekil 1. Overin Histolojik Yapısı (9)

1.1.1.4. Pre-antral folükül popülasyonu

‘Non-growing’ folükül popülasyonu 4 tip folükülden oluşur; (I) iğsi granuloza hücreleriyle çevrelenmiş primer oositten oluşan primordial folükül (35.0 μm çapta), (II) iğsi ya da küboidal granuloza hücreleriyle çevrelenmiş primer oositten oluşan intermediyer folükül (38.0 μm çapta), (III) tek tabaka granuloza hücresiyle çevrelenmiş primer oositten oluşan primer folükül (46.0 μm çapta) ve (IV) Tek kattan fazla granuloza hücresiyle çevrelenmiş primer oositten oluşan sekonder folükül (77.0 μm çapta) (18). Gerçek folüküler büyüme sekonder folükül içerisinde oluşan germinal vezikül’ün 19 μm ’yi geçmesiyle başlar (19). 35 yaşına kadar her ay bekleme evresindeki folüküllerin, ‘resting follicle’, yaklaşık olarak 1000 tanesi büyüme sürecine geçmek üzere aktive olur ve 35 yaş üzerinde bu sayı gitgide artar ve sonunda resting follicle 100–1000 arası kalınca menopozal dönem başlar (20, 21). Folüküler büyüme- gelişme Şekil 2.’de gösterilmiştir (18).



Şekil 2. Overdeki folüküllerin gelişimi (22)

1.2.1.5. Folliküler gelişimin başlaması

Doğumla birlikte overlerdeki folliküllerin hemen hemen tamamı primordial folliküldür. Folliküler gelişimi başlatan mekanizma net olarak anlaşılamamakla birlikte bir grup faktör'ün folliküler gelişimi başlattığı tesbit edilmiştir. Bu faktörler epidermal growth factor, insulin-like growth factor, transforming growth factor, fibroblast growth factor ve siklik adenosin monofosfat (cAMP) salgılanmasını arttıran vazodaktif intestinal peptid, pitüiter adenilat siklaz active eden peptid ve neurotropinlerdir (23).

Diğer taraftan Anti-Müllerian Hormon (AMH) ve somatostatin'in follikül büyümesini engellediği tesbit edilmiştir. Bekleme evresindeki 'resting follicle' folliküllerin ne kadar miktarlar ile aktive olacağı; bekleme havuzunda kalan follikül sayısına, testesteron seviyesine, hastanın yaşına, beslenmeye ve timus aktivitesi ile opioid peptidlere bağlıdır (24, 25).

1.1.1.6. Preantral büyüme evresi veya bazal foliküler büyüme

Preantral büyüme evresine geçiş fetal dönemde başlar ve bu süreç menopoza kadar devam eder (19, 23). Bu evre iğsi yapıdaki pregranuloza hücrelerinin (primordial follikül-35.0 µm), tek katlı kübik granuloza hücrelerine (primer follikül-46.0 µm), dönüşmesiyle başlar. Bu dönüşüm ile birlikte granuloza hücreleri ve/veya oosit tarafından yapılan mukopolisakkarit tabaka olan zona pellucida oluşur (20). Primer oosit çevresindeki granuloza tabakasının 2 katı geçmesi ve ovarian stromal hücrelerin granuloza hücrelerini saran bazal lamina'nın etrafına lokalize olmasıyla primer folliküller sekonder follikül'e dönüşür (26). Sekonder follikülü oluşturan granuloza hücrelerinde FSH, östrojen ve androjen reseptörleri mevcut olmakla birlikte tam fonksiyonel değildir (26, 27). Bazal lamina etrafındaki ovarian stromal hücreler theca interna ve theca externa olmak üzere 2 ayrı tabakaya farklılaşacaklardır. Theca interna hücreleri LH reseptörleri taşımaktadır. Sekonder foliküller ya büyümeye devam edeceklerdir ya da %99'unda olduğu gibi atreziye uğrayacaklardır (28).

1.1.1.7. Oositlerde apoptoz

Oositlerdeki gelişim ve atrezi, apoptoz birçok moleküler mekanizma ile düzenlenmektedir. Fizyolojik koşullar altında apoptoz, ovarian follikül'de 3 hücre tipinde görülür. Granuloza hücrelerinde ve luteal hücrelerdeki apoptoz sıklıkla erişkin dönemde olurken oositlerdeki apoptoz fetal hayatta gözlenir. Oositlerde apoptoz 13.haftadan başlar ve 14-20. haftalar arasında maximum seviyeye (%11-17) ulaşır (29). Bu dönemden sonra doğuma dek gitgide azalır ve postnatal oositlerde apoptoz izlenmemektedir.

Çevresel faktörler, genetik yapı, ilaç toksikasyonu, ovaryen iskemi, adneksiyel torsiyon gibi durumlarda ise overlerde hasar ve apoptoz görülebilmektedir.

1.1.1.8. Tümör Nekrotizan Faktör Alfa (TNF-α)

Kaşektin olarak bilinen TNF, akut faz reaksiyonunu uyaran bir proinflatuvar sitokindir. Apoptotik hücre ölümünü ve inflamasyonu indükler, tümör gelişimini ve viral replikasyonu engeller. TNF'nin aynı reseptöre bağlanan TNF-α ve TNF-β olmak üzere iki ayrı formu vardır. Aralarında ki en önemli fark

kaynaklandıkları hücrelerdir. TNF- α esas olarak monosit/makrofaj ve Kupffer hücrelerinden, TNF- β ise aktive T lenfositlerde yapılmaktadır. TNF geni 6. kromozomun kısa kolunda bulunur. TNF'ler sadece lipopolisakkaritler ile değil tümör promoterleri, virüsler ve mitojenler gibi diğer uyaranlarla da uyarılabilir.

IL-1 ve TNF- α sıklıkla simültane olarak sentezlenip salgılanırlar. TNF'nin doğal bağışıklık ve akut iltihap yanıtının oluşumunda önemli rolü bulunmaktadır. TNF- α 'nın direkt antiviral etkisi olduğu gibi, immünomodülatör aktivite, virüsle enfekte hücrelere sitotoksik etki ile apoptoz ve multipl biyolojik fonksiyonlarla birlikte enflamasyon ve hücrel immün cevapta da etkileri bulunmaktadır. Sağlıklı bireylerde plazma TNF düzeyleri 0-35 pg/ml arasında değişmektedir (30, 31).

TNF- α 'nın diğer biyolojik etkinlikleri ise şu şekilde sıralanabilir (30, 31):

- a) Ateş
- b) Hepatosit aktivasyonu
- c) Nötrofil adezyonunun artması
- d) Anjiogenez
- e) Fibroblast ve mezenşimal hücre proliferasyonu
- f) Nöronların çoğalması ve fonksiyonlarının regülasyonu
- g) T hücre aktivasyonu ve B hücre proliferasyonunun indüksiyonu
- h) Akut faz reaktanlarının sentezini uyarmak

1.1.1.9. Rodentlerde Follikül Gelişiminin Kronolojisi

Rodentlerdeki ovaryan gelişim insanlardakine benzer ancak zamanlama değişiktir. Primordiyal germ hücreleri ileri embriyonik gelişimde oogonya oluşturmak üzere gonadlara göç eder. Doğumda, rat ovaryumu kordonlardan ve oogonyalardan oluşur. Primordiyal foliküller doğumdan sonra, üçüncü günün sonunda oluşurlar (32). İlk folikül dalgasının antral foliküle kadar gelişimi üç haftayı bulur (33). İyi gelişmiş sekonder foliküller yedinci günde gözlenir. Minimal ovaryan hücre apoptozisi ancak 18. günde oluşur (32, 34). Bu dönemde erken antral foliküller gözlenir. Puberte ya da ilk östrus 34. gün civarında meydana gelir. Düzenli östrus siklusu, 10-12. aylarda düzensiz siklusların oluşumuna kadar devam eder. 12-15. ayların sonunda hayvanlar persistent siklusa girerler ve bunu persistent diöstrus ve ardından anöstrus takip eder. Folikül gelişimi 25 μ m'den (primordial folikül) 500

-800 µm (preovulatar folikül) çapa kadar, 60 günden fazla bir sürede ulaşır (yaklaşık 15 östrus siklusu). Primordiyal folikülün sekonder foliküle gelişim aşaması 30 günden uzundur. Sekonder aşamadan ovulasyona kadar olan gelişim süresi $28 \pm 2-3$ gündür. Bu durumda erken folikül gelişimi, insanlardakine benzer şekilde rodentlerde de uzundur (33).

1.1.1.10. Östrus Siklusu

Farelerde genital siklus (östrus siklusu) post-natal 28-42. günlerde (32, 33, 35) vajinal açıklığın gözlenmesiyle, vajinal smear yöntemi kullanılarak takip edilmektedir. Östrus siklusu yaklaşık 4-5 gün sürer (35, 36, 37). Fare ve ratlarda, insanlardakine benzer olarak, genital siklus çeşitli hormonlar ile kontrol edilmektedir. Östrus siklusu, proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus olmak üzere başlıca 4 fazdan oluşur. Proöstrus fazı 12 saat, östrus fazı 12-24 saat, metöstrus fazı 6-8 saat, diöstrus fazı ise 52-60 saat sürmektedir (38, 39, 10).

Östrus siklusu boyunca cinsiyet hormonlarının siklik değişimleri vajinal epitelin histolojik görünümünde belirgin değişiklikler oluşturur. İlk defa 1917'de Stockard ve Papanicolou tarafından, *guinea pig*'lerde başlayan östrus siklusu çalışmalarından bugüne kadar, farklı memeli türlerinde östrus aşamalarını belirlemek için kabul edilen yöntem 'vajinal smear'dir (40, 41). Bu yöntem, vajinal duvardan sürüntü alınması ya da vajinal yıkama sonucu elde edilen preparatlar üzerinde, her bir faz ile bağlantılı hücre tiplerinin (epitelial hücre, kornifiye hücre, lökositler) histolojik olarak tanınması esasına dayanır. Bu yöntem canlı hayatta iken, tekrarlayan siklusa ait gözlemler için güvenilir bir kayıt sağlamaktadır. Ayrıca hayvanlarda ovulasyon zamanı, kızgınlık dönemi (davranışsal östrus) ve gebeliğin tespiti için de kullanılan pratik bir yöntemdir (38, 42-44).

1.1.2. Over Follikül Reserv Testleri

1.2.2.1. Bazal Serum FSH

Folliküller arasında ovulasyona gidecek olan dominant follikülün seçilmesi, normal menstruel siklusta, geç luteal fazdaki FSH uyarısına bağlıdır. Overin FSH'ya olan duyarlılığını değerlendirmek için en uygun zamanın, menstrüel siklusun luteofolliküler geçiş dönemi olduğu kabul edilmektedir. FSH ölçümleri genelde

siklusun 3. gününde (D3) yapılmaktadır. Normal over rezervi için laboratuvar ölçüm sınırı 12 mIU/mL kabul edilmektedir (45, 46).

1.1.2.2. Bazal FSH/LH Oranı

Menopozda FSH ve LH değerleri birlikte artış göstermektedir. Ancak FSH'daki yükselme LH'dan daha önce gerçekleşmektedir. Bu bağlamda FSH/LH oranındaki artış over rezervindeki azalmanın ilk belirtisidir (45).

1.1.2.3. Bazal Serum Östradiol (E2)

Bazal E2 ölçümü, fertilite potansiyelini önceden belirlemede bazal FSH'ya ya da kronolojik yaşın tek başına kullanılmasına göre daha etkin olabilir (47). 38-42 yaş arasındaki, FSH düzeyleri normal olan kadınlarda D3 E2'nin <80 pg/ml olması, tedavide iyi prognoz olarak görülmektedir (46). Folliküler E2 düzeylerinin erken dönemde artmasının, azalmış overyan cevapla ilişkili olduğu gösterilmiştir (48).

1.1.2.4. Bazal Serum İnhibin B

İnhibin transforming growth faktör-b (TGF-b) ailesinden, 32 kDa ağırlıkta, hipofizden FSH salımını inhibe eden, yapısal olarak AMH'ya benzeyen heterodimerik bir proteindir (49). Serum inhibin B düzeylerinin gelişmekte olan folliküllerin sayı ve kalitesiyle orantılı olduğu düşünülmektedir (45, 50).

1.1.2.5. CCCT (Clomiphene Citrate Challenge Test)

Menstruel siklusun 5-9. günleri arasında 100 mg klomifen sitrat verilir. Siklusun 3. ve 10. günlerinde FSH ölçülür. Bu ölçümlerde normal sınırların üstünde bir değer bulunmuşsa test pozitif olarak değerlendirilir. Bu sınır genellikle 10-12 mIU/mL dir (51).

1.1.2.6. Antral Folikül Sayısı (AFS)

AFS yaşla beraber azalmaktadır. Otuzyedinci yaşından önce yılda %4,8, sonrasında ise %11,7 oranında azalmaktadır (51). AFS gonadotropin stimülasyonuna verilen yanıtı değerlendirmede iyi bir parametre olsa da yapılan çalışmalarda gerek antral follikül tanımında, gerekse AFS eşik değerinde farklılıklar bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda 2-5mm arasındaki folliküller antral follikül olarak tanımlanırken,

bazılarında 2-10 mm arasındaki folliküller antral follikül olarak tanımlanmaktadır. AFS aynı hastada sikluslar arasında farklılıklar gösterebilmekte ve bu değişiklik genç ve AFS fazla olanlarda daha sık gözlenmektedir (52).

AFS'ye göre yapılan derecelendirme

Grade I overler; 4 ve altında antral follikül içerir.

Grade II overlerde 4-6 AF bulunur.

Grade III overlerde 7-10 AF bulunur.

Grade IV overler polikistik over (PCO) yada PCO benzeri olarak değerlendirilir ve tedavi dozu bu derecelendirmeye göre belirlenir.

1.1.2.7. Over Volümü

Over hacmi, ilerleyen yaşla beraber azalır. Kadın hayatı boyunca over hacmi, 10 yaşında ortalama 0,7 cm³'ten, 18 yaşında 5,8 cm³'e kadar büyür. Over hacminin transvajinal yoldan ultrasonografik ölçümü, hızlı, doğru ve cost-effective bir yöntemdir. Over hacminin ve antral folikül sayısının artması ile over rezervinin de arttığı düşünülmektedir (52).

1.1.2.8. Anti Mülleryan Hormon (AMH)

TGF- β ailesinden 140kDa büyüklüğünde dimerik glikoprotein yapıdadır (53). Erkeklerde testiküler gelişimin başlangıcından puberteye kadar sertoli hücrelerinden salgılanır. Dişilerde granüloza hücrelerinden, doğumdan menapoza kadar, erkeklere oranla daha az miktarda salgılanmaktadır (54). AMH'nın tek etkisinin reproduktif organlara olduğu düşünülmektedir. En önemli ve belirgin etkisi mülleryan kanalın regresyonu üzerinedir. Yokluğunda mülleryan kanaldan fallop tüpleri, uterus ve vajenin üst 1/3' ü gelişmektedir (55).

Anti-mülleryan hormon overyan granüloza hücrelerinden preantral ve küçük antral folliküllerden, pitüiter FSH'nın etkisiyle salgılanır. AMH dominant follikül için seçilebilecek büyüklüğe ve farklılaşmaya ulaşılıncaya kadar sentezlenmektedir. İnsanlarda bu olay follikül 4-6 mm büyüklüğe ulaşılıncaya kadar gerçekleşmektedir. AMH teka hücresi ve atretik folliküllerden sentezlenmemektedir (56). Son çalışmalarda preantral, geç pre-antral ve preovulatuvar folliküllerde AMH mRNA seviyelerinin oositin gelişim evreleriyle paralel olarak düzenlendiği, AMH'nın intra ve inter-folliküler koordinasyonda önemli görevleri olduğu gösterilmiştir (57). AMH

sentezini düzenleyen mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. AMH'nın granüloza hücreleri üzerinde reseptörlerinin tespit edilmesi overyan fizyolojide rolü bublunduğunu düşündürmektedir (58). AMH'nın serin tireonin kinaz reseptörlerini kullanan iki farklı reseptörü bulunmaktadır (AMHR Tip1, AMHR Tip 2). AMHR2 mülleryan kanal mezenkiminde bulunmaktadır. Bu reseptörün fonksiyon bozukluğu kalıcı mülleryan kanal sendromuna yol açabilmektedir. Ratlarda AMHR2 granüloza ve teka hücrelerinde de izlenmektedir (59). AMHR 1 özellikleri ve işlevi tam olarak bilinmemektedir.

Primordial folliküllerin gelişmesi negatif ve pozitif faktörlerin etkisi altındadır. AMH erken folliküler gelişim üzerine negatif olarak etki etmektedir. Homozigot AMH knockout dişi ratlarda daha fazla büyüyen preantral ve küçük antral follikül saptanmış olup, bu ratlarda primordial follikül stoklarının daha erken yaşta tükendiği gözlenmiştir.

Anti-mülleryan hormon etkilerinin direk primordial hücreler üzerinden olup olmadığını göstermek için yapılan bir çalışmada AMH bulunmayan rat overini AMH bulunan yapay ortama bıraktıktan iki gün sonra yapılan incelemede büyüyen follikül sayısının %50 azaldığı, AMH'nın primordial oositleri direk olarak etkilediği gözlenmiştir ve AMH'nın primordial follikül gelişiminin aktivasyonunu preantral folliküllerde azalttığı sonucu çıkartılmıştır (60).

İn vivo ve in vitro çalışmalar AMH eksikliğinde foliküllerin FSH'ya daha duyarlı olduğunu göstermektedir. Düşük ve yüksek FSH konsantrasyonları ile yapılan çalışmalarda AMH'dan yoksun fareler, AMH mevcut farelerle karşılaştırıldığında; hem sayısal hem de gelişimsel olarak follikül gelişimine etkilerinin daha iyi olduğu gözlenmiştir (61). Clemente ve ark. (62) ekzojen AMH'nın kültür ortamında granüloza hücrelerinde aromataz aktivitesini ve LH reseptör sayısını azalttığını göstermişlerdir. Bu çalışmalar ışığında AMH'nın overyan folliküllerin FSH'ya verdiği yanıtı belirleyen faktörlerden birisi olduğu sonucu çıkmaktadır. Başka bir çalışmada ise AMH'nın farelerde 1.mayoz bölünmeyi inhibe ettiği gösterilmiştir (63). AMH insan granüloza-luteal hücrelerin proliferasyonunu engellemektedir. Folliküler sıvı AMH konsantrasyonu granüloza hücrelerindeki mitoz indeksi ile ters orantılıdır (64). Hayat boyunca AMH düzeyi kadınlarda erkeklerden daha düşüktür. Yenidoğanda AMH seviyeleri tespit edilemeyecek kadar düşüktür; 2-4 yaşlarında

hafif yükselme olur ve sonrasında ergenliğe kadar stabil seyreder. Yaş ilerledikçe folliküler rezerv azalmasına bağlı olarak serum düzeyi düşer, menapozda çok düşük veya tespit edilemeyecek seviyelere gelir (65). Serum AMH, menstrüal siklus sırasında dalgalanma göstermemektedir. Bu özelliği diğer over rezerv testlerinden farklı olarak siklusun herhangi bir gününde değerlendirilebilmeyi sağlamaktadır (66). Minimal dalgalanmalar siklik olmayan küçük follikül büyümesinden dolayı oluşabilmektedir. Overyan follikül havuzunun azalması ve oosit kalitesinin düşmesi nedeniyle yaşla beraber üreme fonksiyonları azalmaktadır. AMH over rezervini ölçmek amaçlı son zamanlarda kullanılmaya başlanmıştır.

Spontan menapoz ve ooferektomi sonrasında AMH düzeylerinin tespit edilemeyecek düzeylere düşmesi AMH'nın tamamen over kaynaklı olduğunu göstermektedir (67). D3'te saptanan AMH seviyeleri yaşla beraber düşmektedir. De Vet ve ark. (68) yaptığı çalışmada 1,1-7 yıl boyunca takip edilen olgularda AMH seviyelerinin ortalama %38 düştüğünü, ancak aynı sürede antral follikül sayısı, bazal FSH düzeyi ve inhibin B düzeylerinde değişiklik olmadığı saptanmıştır. AMH'nın over rezervini gösteren diğer testlere göre yaşa bağlı oosit/follikül rezervini daha iyi gösterdiği düşünülmektedir ve yaş arttıkça diğer parametrelerde değişiklik olmadan ilk olarak AMH düzeyleri azalmaktadır (69).

Folliküller, antral follikül aşamasına gelinceye kadar gonadotropinlerden bağımsız olarak gelişmektedir (70). Hipofizektomize, hipopituitarizm olan olgularda antral follikül basamağına kadar folikül gelişimi olur ve bu basamakta gelişim sona erer. AMH sekonder amenore tanısında hipogonadotropik hipogonadizm ile hipergonadotropik hipogonadizm ayırımında yardımcı bir belirteçtir. Gebelikte gonadotropin düzeyleri oldukça düşük izlenmesine rağmen gebelik öncesi AMH düzeylerinde değişiklik görülmemektedir. AMH plasentadan sentezlenmemekte, gebelik boyunca ve puerperiumda düzeyleri değişmemektedir (71).

Anti-mülleryan hormon sadece granüloza hücrelerinden sentezlenmektedir ve granüloza hücreli tümörlerde (GCT) marker olarak kullanılabilir. GCT saptanan olguların %76-93'ünde yüksek bulunmuştur (72). Tümör rezeksiyonunu takiben yapılan ölçümlerde, nüksün klinik olarak tespitinden ortalama 16 ay önce yükselmeye başlamaktadır (73). AMH, GCT takibinde E₂ ve inhibine göre daha iyi bir belirteçtir, özellikle rekürrenslerin 10-20 yıllık zaman dilimlerinde ortaya çıktığı

GCT’lerde nükslerin erken tesbitinin sağ kalım süresini arttırdığı düşünülerek takiplerde kullanılmaktadır.

1.1.3. Oksidatif Stres

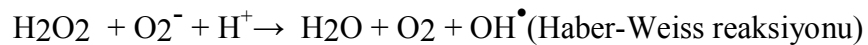
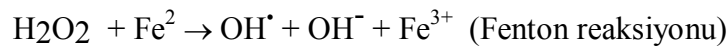
1.1.3.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, iyonlaştırıcı radyasyonların etkisinin kimyasal kademesinde önemli bir yer tutar. Serbest radikaller; iyonların veya uyarılmış moleküllerin ayrılması ile oluşan, dış yörüngelerinde eşleşmemiş bir elektron olan ve genellikle elektriksel açıdan yüksüz atom ya da moleküllerdir. İyon çiftlerinin oluşumu sonucu radyasyon etkisi ile ortaya çıkan son kimyasal ürünler arasındaki ara kademeyi oluştururlar. Son derece reaktiftirler çünkü eşleşmemiş elektronları çok hareketlidir ve bir başka radikalın aynı durumdaki elektronu ile eşleşerek kararlı hale geçme eğilimleri vardır. Bu sebeple serbest radikaller, elektron alıcı ya da elektron verici özelliklere sahiptir.

Aerobik metabolizmaya sahip memeli hücrelerinde, başlıca serbest radikal kaynağının oksijen türevi radikaller olduğu bilinmektedir. Yapısı nedeniyle radikal olduğundan serbest radikal denilince aslında serbest oksijen radikalleri, daha genel bir tabirle reaktif oksijen radikalleri (ROM) akla gelmelidir. Söz konusu radikallerin başlıcaları, oksijenin dokularda kısmen indirgenmesi sonucu oluşan çok kısa ömürlü ve güçlü oksidleyici özelliklere sahip oksijen metabolitleri şunlardır:

Hidrojen peroksid (H_2O_2), süperoksid anyonu (O_2^-), hidroksil radikali ($OH^\bullet$)

Süperoksid anyonu kendisi direkt olarak zararlı değildir. Önemi H_2O_2 kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasından dolayıdır. Hidrojen peroksidin serbest radikal biyokimyasında önemli bir yeri vardır. Demir ve diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu sonucu, süperoksit radikalinde etkisi ile Haber- Weiss reaksiyonu sonucu en zarar verici ROM olan $OH^\bullet$ ’ni oluşturur. Hidroksil radikali ROM’ların en güçlüsüdür.



Oksijen kullanan her canlı soluma ile serbest radikaller olarak bilinen moleküller üretirler. Ancak hücrelerde devamlı olarak, fizyolojik veya patolojik olaylar sonucunda serbest radikaller meydana gelir. Hiperoksi varsa, bu olayların radikal oluşturması artar. Serbest radikaller yaşam için gereklidir ancak kontrolsüz bırakılırsa hücreler daha çok serbest radikal üretir ve böylece hücrelerin savunma mekanizmaları zayıflar. Serbest radikaller tahrip edicidir ve aynı zamanda moleküler saldırganlardır. Kimyasal, oksijen ve diğer gaz toksisiteleri, hücresel yaşlanma, fagositik hücrelerin mikroorganizmaları öldürmesi, inflamatuvar hasarlar, makrofajların tümöre verdikleri hasar ve diğer olaylarda genel bir doku zedelenmesi yolu ile serbest radikal oluşumu artar ve etkileri ortaya çıkar (74-76).

Serbest radikaller hücrelerde birkaç yolla oluşabilirler (74):

1. Radyan enerjinin emilmesi (UV, X ışınları): İyonize edici radyasyonun oksiradikallerin kaynağı olduğu bilinmektedir.
2. Çeşitli fizyolojik olaylar da redüksiyon-oksidasyon reaksiyonları ile meydana gelir. Normal solunum sırasında moleküler oksijen dört elektron alarak suyu oluşturur. Bu arada az miktarda toksik ara maddeler oluşur ve bunların her biri serbest oksijen radikali olan H_2O_2 , O_2^- , $OH^\bullet$ dir. Yine aktive polimorfonükleer lökositlerden nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz enzimi yardımıyla süperoksit oluşur.
3. Demir ve bakır gibi bazı metal iyonları hücre içi reaksiyonlar sırasında elektron alarak veya vererek serbest radikal oluşturur.
4. Nitrik oksit ($NO^\bullet$) oluştururlar.

Mitokondrideki elektron transport zinciri reaksiyonları, endoplazmik retikulumdaki karma fonksiyonlu oksidaz sistemi, sitoplazmada ksantin oksidaz, dopamin beta hidroksilaz, D-aminoasit oksidaz, ürat oksidaz gibi enzimlerin etkinliği, prostaglandin sentetaz ve lipooksijenazların faaliyeti, peroksizomlarda ve lizozomlardaki metabolik olaylar endojen olarak serbest radikal oluşumuna yol açmaktadır. Organizmada serbest radikal oluşumunu arttıran eksojen kaynaklar ise diyetel faktörler, çevresel faktörler ve ilaçlar olmak üzere başlıca üç gruba ayrılır (77, 78).

1.1.3.2.Serbest Radikallerin Hücre Düzeyinde Oksidatif Etkileri

Serbest radikaller, vücut için gerekli ve dengeli olduğu miktarı aşınca, yakın çevrelerindeki yapılarla etkileşime girerek dengeli hale gelirler. Ancak çevre yapıları bozar, doku ve hücrelerde hasara neden olurlar. Başlıca etkileri şöyledir (79-84):

- Lipid peroksidasyonu oluşturarak kaçış reaksiyonlarına neden olurlar. Bu zincirleme reaksiyon eğer engellenmezse hücre mebranını bozar, bölmelere ayrılmış organelleri parçalar, lizozomal enzimlerin salınmasına ve otolize neden olur.
- Mutasyonlara ya da kansere neden olacak şekilde baz sekanslarında değişiklik yapar ve nükleik asit fonksiyonunu bozarlar. Geri dönüşsüz DNA hasarı oluşturarak telomer uzunluğunu kısaltırlar. Gen ekspresyonunda değişikliklere, replikatif kapasitenin düşmesine neden olurlar.
- Enzim aktivitelerinde değişikliklere neden olurlar.
- Proteinlere zarar vererek, yeni immünolojik yapılar oluştururlar. Bu şekilde immünolojik disfonksiyon ya da inflamatuvar süreçlere neden olurlar.
- Karbonhidratları etkileyerek reseptör aktivitelerini ya direkt olarak inaktive eder ya da normal fonksiyonlarını inhibe ederler.
- Sistemik tiyol/disülfid redox durumunu bozarlar.
- İyon pompalarını bozarlar.
- Kollajen fragmantasyonuna ve fibril çapraz bağlarında artışa neden olurlar.

1.1.3.3. Malondialdehit (MDA)

Lipid peroksidasyonu serbest radikaller tarafından başlatılan, membran yapısındaki doymamış uzun zincirli yağ asitlerinin oksidatif yıkımını içeren kimyasal bir olaydır. Bu kimyasal olay, lipid hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesi ile sona ermektedir. Bu bileşiklerden biri olan malondialdehit (MDA) miktarı tiyobarbitürik asit (TBA) testi ile ölçülmekte ve bu yöntem lipid peroksit düzeylerinin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır (74, 76, 85, 86). Biyomembranlar ve hücre içi organeller membran fosfolipitlerindeki doymamış yağ asitlerinin olması nedeniyle oksidanların saldırılarına duyarlıdırlar. Lipid

peroksidasyonun en önemli ürünlerinden olan malondialdehit (MDA), hücre membranlarından iyon alış-verişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir (87).

1.1.3.4. Nitrik Oksit (NO[•])

Bir adet eşlenmemiş elektronu olan küçük bir moleküldür. Endotel hücreleri, makrofajlar, nöronlar ve diğer birçok hücre tarafından “Nitrik Oksit Sentaz “ ile oluşturulan bir kimyasal medyatör olup, kan basıncı regülasyonu, savunma mekanizmaları, düz kas gevşemesi ve immun regülasyon gibi süreçlerde oksidatif biyolojik sinyal molekülü olarak görev yapan reaktif bir radikal olarak görev yapar. H₂O₂, O₂⁻, OH[•] hücre içinde üretilen başlıca serbest radikallerdir. Bunlar nitrik oksit ile etkileşerek reaktif azot ara bileşiklerini oluştururlar. Sitoplazmadan ve plazma membranlarından kolayca geçebilir. Ekstrasellüler alanda oksijen ve nitrojenle reaksiyona girerek “Nitrit” ve “Nitrat” anyonlarını oluşturarak inflamatuvar yanıtın oluşmasına sebep olur. Yüksek miktarda salındıklarında hücre hasarına sebep olurlar (76, 81, 82, 84).

1.1.3.5. Total oksidatif Seviye (TOS)

Erel (88) tarafından geliştirilen tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir. Numunede bulunan oksidanlar ferröz iyon-*o*-dianisidin kompleksini ferrik iyonla oksidlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda “xylenol orange” ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir.

1.1.4. Radyasyon Hasarı ve Oksidatif Stres

Partiküler radyasyonun madde ile etkileşmesi sonucu ısı eksitasyonu ve iyonizasyonu oluşur. Bu etkileşimler sonucunda kimyasal ve biyolojik etkiler oluşur. Elementlerin dış yörüngelerindeki elektronlar, kimyasal reaksiyonlarda önemli rol

oyunar. Radyasyon etkisiyle elektronların sökülmesi, maddenin kimyasal özelliğini değiştirir (89, 90). Bu etkileşim hücre içerisindeki makromoleküllerde (DNA-RNA) veya su moleküllerinde görülebilir. Etkileşime göre radyasyonun etkileri doğrudan veya dolaylı olmak üzere ikiye ayrılır (89-91). Radyasyonun direkt etkisinde radyasyon doğrudan biyolojik hedef moleküllerle (DNA, enzim vb.) etkileşime girer ve enerjisini direkt olarak hedef moleküllere transfer eder. Dolaylı etkileşimde, hücrelerin büyük oranda su molekülü içermesi nedeniyle, suyun hidroliziyle açığa çıkan serbest radikaller diğer hücre moleküllerini etkiler. Dolaylı gerçekleşen etkileşim radyobiyolojik açıdan direkt etkileşimden daha önemlidir ve memeli hücrelerinde iyonizan radyasyonun olası etkilerinin %70'ini dolaylı yolla gösterdiği düşünülmektedir (92, 93). Serbest oksijen radikalleri (SOR) oksijen molekülleri ile de etkileşime girerler ve bu etkileşimler sonucunda gerek hidrojen gerekse bazı organik moleküllerin peroksit radikalleri oluşur. Bunlar biyolojik açıdan son derece aktiftirler. Oksijen varlığında, sözü geçen peroksit radikallerinin oluşum sıklığı belirgin olarak artmıştır (90). Radyasyon sonrası sistemik hasar özellikle SOR'nin aşırı üretimine bağlı olup; dokuların prooksidant/antioksidan dengesinin değişmesine yol açar. Sonuçta hücrenin temel yapılarının oksidasyonuna neden olur (94). İyonlaştırıcı radyasyona maruz kalınması sonucunda canlılarda oluşan iyonizasyonun söz konusu biyolojik reaksiyonları etkileyerek bazı fizikokimyasal değişikliklere neden olması çok kısa bir süre içinde ($<1\text{sn}$) gerçekleşir. Bu değişikliklerin doğurduğu genetik mutasyonlar, kanserleşme ve hücre ölümü gibi biyolojik sonuçlar; saatler, günler, aylar hatta yıllar içinde gözlenebilir (95, 96). İyonlaştırıcı radyasyona bağlı hücre ölümünün başlıca nedeni nükleik asitlerin reaktif oksijen türevleri ile reaksiyonudur. Reaktif oksijen türevleri DNA çift sarmalında ayrılmaya veya nükleik asit baz değişimlerine neden olmaktadır. Hatalı onarılmış ya da onarılmamış DNA çift kırığı, silinme, yer değiştirme ve asentrik veya disentrik kromozomlar; ayrıca kromozomal kırık ve parça oluşumu, hızlı çoğalan hücrelerde mikronükleus artışı olarak gözlenir (97, 98). Sonuçta bu süreç kromozomal mutasyonlar ve sitotoksosite ile sonuçlanır (99,100).

1.1.5. Histerosalpingografi (HSG)

Histerosalpingografi (HSG) uterus kavitesine radyoopak madde verilerek uterin kavitenin ve tubaların radyografik yöntemlerle incelenmesinde kullanılan bir tarama ve tanı yöntemidir. HSG ilk defa 1910 yılında Rindfleisch tarafından bismus solusyonu kullanılarak yapılmıştır (101). 1914 yılında Rubin-Gary gümüş tuzu kullanarak uterin kavite ve tubaları radyolojik olarak görüntülemişlerdir (102).

Yağlı iyot solüsyonu olarak Lipiodol ilk defa 1925 yılında kullanılmaya başlanmıştır (103). En büyük tercih nedeni 24 saat sonra çekilen kontrol filmlerde daha iyi görüntü vermesidir ve yaygın kullanımı 1960'lı yıllara kadar devam etmiştir. Yağ bazlı kontrast maddeler pelvik boşlukta aylarca kalabilirler. Yağ bazlı kontrast maddelerin kullanımı sırasında yağ embolisi riski ve yağlı kontrast maddelere bağlı granülasyon dokusunun oluşabilmesi başka bir radyoopak madde ihtiyacı doğurmuştur (104, 105). Alternatif olarak suda eriyebilen kontrast maddeler geliştirilmiştir. Suda eriyen kontrast maddeler içinde, günümüzde genelde organik iyot içeren kontrast maddeler kullanılmaktadır. Bu maddelerle elde edilen görüntü hemen kaybolabildiği için kontrol filmler 15-20 dakika sonra çekilmelidir. HSG işlemi sonrası spontan gebeliklerin izlenmesi, HSG'nin teşhis kadar tedavi edici yönünü de ortaya koymaktadır. Bazı çalışmalarda aksi belirtilse de (106) yağda eriyebilen kontrast madde kullanılan olgularda suda eriyen kontrast madde kullanılan olgulara göre gebelik oranları anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (107). Uzun dönem gebelik oranlarının araştırıldığı Rasmussen ve ark. yaptığı kapsamlı randomize kontrollü prospektif bir çalışmada HSG çekildikten 4-6 ay sonra elde edilen gebelik oranları karşılaştırılmış ve yağda eriyen kontrast maddeler kullanılarak çekilen filmler sonrası elde edilen gebelik oranları anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (108). Günümüzde HSG çekimlerinde yağda eriyen kontrast maddeler tercih edilmektedir (109).

Histerosalpingografi işlemi için en uygun zaman adet kanamasının bittiği ilk günlerdir. Bu dönemde uterusun istmus kısmında ve tubalarda dilatasyon kapasitesi arttığı için enstrumantasyon kolaylaşmaktadır. Ayrıca gebelik ihtimalinin olmamasıyla birlikte gelişen bir ovumun radyasyona maruz kalması da engellenmiş olur (110). Servikal mukus bu süreçte daha az miktarda ve incedir. Periovulatuvar dönemde çekilen HSG esnasında servikal mukusun kavite içine itilmesi mümkündür

ve bu durum hem kavite içinde artefakt oluşmasına hem de endometrite sebep olacaktır. İşlem sırasında genelde sedasyona ihtiyaç duyulmaz. Kontrast maddenin verilmesi sırasında gelişebilecek tubal spazmı önlemek için bazı antispasmotik ilaçlar kullanılabilir. Ancak hiçbirisi spazmı engellemekte tam olarak başarılı değildir. Hastanın stresli olması durumunda 5-10 mg diazem verilebilir.

Genital enfeksiyon varlığında, uterin kanama durumunda, gebelik şüphesinde ve kontrast maddeye karşı alerjisi olması durumunda HSG kontrendikedir.

Histerosalpingografi çekimi sonrası pelvik enfeksiyon, endometriozis riskinde artış, vajinal kanama, vazovagal atak, kontrast maddenin intravaze olması gibi komplikasyonlar görülebilir. Hidrosalpenks durumunda, özellikle tuba duvarının çok ince olduğu durumlarda radyoopak maddenin 180 mmHg'dan fazla basınçla verilmesi tubal rüptüre neden olabilir. Overler ve diğer pelvik dokular HSG çekimi esnasında radyasyona maruz kalır. Yapılan bir çalışmada HSG işlemi sırasında overlerin maruz kaldığı ortalama radyasyon dozu 500-1000 mRad olarak saptanmıştır (111). Hem yağda eriyen hem de suda eriyen kontrast maddelerde granülom oluşabilmesine rağmen yağda eriyen kontrast maddelerde bu komplikasyon daha sık görülür (109). Kullanılan kontrast maddenin iyot içeriği nedeni ile HSG sonrası yapılan tiroid fonksiyon testleri değerlendirilirken, bu durum göz önünde bulundurulmalıdır.

Histerosalpingografide; uterin kavite kenarları düzgün, tepesi aşağıda, tabanı yukarıda bir üçgene gibidir. Korpus serviksin 2 katı kadardır. Fundal bölgedeki hafif bir çöküntü normal bir görüntü olarak değerlendirilir. Endometriyal polipler ile submüköz myomlar dolum defekti oluşturabilirler. Bu defektler düzgün yüzeylidirler ve sebat ederler. İlk filmlerde daha net izlenir ve kavitenin distansiyonu arttıkça görüntü alanından silinirler. Uterin septum ve bikornuat uterusu çift kavite izlenir ancak uterusun dış konturları izlenmediği için bu iki anomalinin ayırıcı tanısında başka yöntemler kullanılmalıdır. İntrauterin sineşilerde kavite konturları düzensizdir. Düzensiz sınırlı dolum defektleri izlenebilir.

Histerosalpingografi hem tubaların luminal yapısı ve açık olup olmadıklarını göstermesi ve hem de uterin kavitenin yapısını göstermesi nedeni ile infertil olgularda yaygın kullanım alanı bulmuştur. HSG işleminin dezavantajları ise, bazen

ağrılı ve rahatsız edici bir işlem olmasının yanında, az miktarda da olsa iyonizan radyasyona maruziyettir (1, 2).

1.1.6. Radyoprotektif Ajanlar ve Mekanizması

Radyoprotektörler, canlıyı radyasyona karşı koruyan maddelerdir. Bazı maddeler hücrelerin radyasyon duyarlılıklarını etkilemedikleri halde canlıyı bütün olarak korurlar. Çünkü bunlar vazokonstriksiyona yol açar ya da normal metabolik süreçleri etkilerler ve kritik organların oksijen konsantrasyonlarını düşürürler. Hücreler hipoksik koşullarda X ışınlarına karşı direnç kazanacakları için, bu olay bir koruma sağlayabilir. Sodyum siyanür, karbon monoksit, epinefrin, histamin ve serotonin bu tür maddelere örnektir (3, 74, 112-114). Birçok radyoprotektör mevcuttur. Bunların ortak özelliği iki ya da üç karbonlu bir düz zincir ile, bu zincirin bir ucunda serbest bir sülfidril grubu, diğer ucunda da amin ya da guanidin gibi kuvvetli bazik bir gruptan oluşmalarıdır. Sülfidril grubunun X ve γ ışınlarına karşı etkin bir koruyucu olduğu bilinmektedir ve bu etkinin radikal yakalama özelliğine bağlı olduğu kabul edilmektedir. Sülfidril grupları oksijen yerine serbest radikalle birleşirler. Bu sebeple, koruyucu etkileri serbest radikalleri yakalama özellikleridir ve oksijen etkisi ile paralellik gösterir (112, 115-117).

Tiol içeren antioksidan etkili bileşiklerin antioksidatif aktivitesinde hem moleküllerdeki tiol sayısı hem de moleküllerdeki sülfür atomlarının oksidasyon durumu etkilidir.

$\text{SH-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$ Sistein

$\text{SH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ Sisteamin

$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-PO}_3\text{-H}_2\text{WR2721}$

Radyoprotektif etki ve ajan tanımlamaları ilk olarak Dale (1942) tarafından terminolojiye sunulmuştur. İnsanlarda kullanılabilecek radyoprotektif etkili ilaçlara yönelik ilk çalışma ise Patt ve ark. (1949) (118) tarafından gerçekleştirilmiştir. Sıçanlar üzerindeki bu çalışmada ölümcül dozda ışınlamadan 15 dk önce intravenöz (iv) yolla sülfür içeren sistein aminoasidi uygulamasının sıçanların yaşam sürelerinde artış sağladığı gözlenmiştir.

Radyoprotektif etki mekanizması ile serbest radikal ürünleri etkisiz hale getirilmeye çalışılmıştır. Serbest radikallerin etkisizleştirilmesi süreci, H_2O_2 , O_2^- ve $OH^\bullet$ gibi radyasyon etkisiyle oluşan su metabolitlerinin, eksojen ya da endojen bir takım ajanları okside etmeleri ve diğer hücre içi yapılarla etkileşime girememeleri, kararlı yapılu bileşiklerin oluşması ile sağlanmaktadır (113, 119).

Diğer bir radyoprotektif etki mekanizması, serbest radikale hidrojen atomu bağlanmasıdır. R-H şeklinde sembolize edilen bir molekülün radyasyon etkisiyle radikal R metabolitine dönüşmesi halinde, koruyucu etkili ajan, R radikalının yapısına bir hidrojen atomu ekleyerek kararlı yapıdaki R-H formunun yeniden oluşmasını sağlar. Karışık disülfid bileşiklerin oluşumu, hücre bölünmesinin yavaşlatılması ve dokularda hipoksi gelişiminin uyarılması diğer bir mekanizmadır. Aminotiollerin koruyucu etkisi, radyasyon alınması sonrasında hücresel proteinlerin yapısındaki sülfidril bileşiklerinde okside ve redükte formda sülfür atomlarının oluşumu üzerinden gerçekleşir. Bu durum hücresel proteinin serbest radikal hasarından %50 oranında korunması anlamına gelir (113, 119, 120).

Tiol ve disülfidler nükleer materyale de bağlanabilir. DNA molekülüne bağlanmaları halinde reversibl olarak replikasyonu inhibe eder ve genetik materyalin yapısını stabil vaziyette tutar. Bu durum DNA yapısındaki bozulmanın düzeltilmesine yönelik pozitif bir adımdır. Koruyucu etkili tiol gruplarının serbest radikallerce oksidasyonu ortamda oksijenin yeterli düzeyde bulunması ile sağlanır. Oksijenin oksidasyon sürecinde tüketilmesi özellikle hücre içi ortamda oksijen doyumluğunda bir düşüşe yol açar ve bunun sonucunda tiol gruplarının ve hücresel proteinlerin yapısındaki sülfür atomlarının oksidasyonu azalır. Ortamın hipoksik hale getirilmesinin radyoprotektif etkili olabilmesi ve/veya tiol bileşikleri gibi ajanların koruyucu etkilerine katkıda bulunabilmesi açısından önemlidir (74, 76-78, 120).

Radyoprotektif ajanlar Tablo 1'deki gibi 4 grupta incelenir. Bunlar tiol bileşikleri, sülfidril içeren bileşikler, analjezikler ve tranklizanlar gibi farmakolojik ajanlar ve WR-1065, WR-2721, vitamin C ve E ve glutatyon gibi diğer radyoprotektif etkili bileşiklerdir (113).

Tablo 1. Radyoprotektif etkili ajanlar (113)

Tiol bileşikleri	Sülfidril bileşikler	içeren Farmakolojik ajanlar	Diğer radyoprotektif ajanlar
• Sisteamin • Sistamin • Sistein • 2-mercaptoethyl guanidine	• Tiourasil • Sulfoksidler • Tiazolinler • Tioüreler • Sulfonlar	• Analjezikler • Trankilizanlar • Kolinomimetikler • Alkol • Sempatomimetikler • Dopamin • Histamin • Serotonin • Hormonlar • Kolşisin • Kalsiyum kanal blokörleri	• ATP gibi nükleik asid türevleri • Sodyum fluoroasetat • Paraaminopropiopen • Melittin ve diğer arı zehiri bileşenleri • Endotoksinler • Adenozin • cAMP • Antibiyotikler • Lipidler • Eritropoetin • Siyanid • Hidroklorik merkaptotetilamin • WR-638 • WR-2721 • WR-44923

1.1.6.1. Amifostin

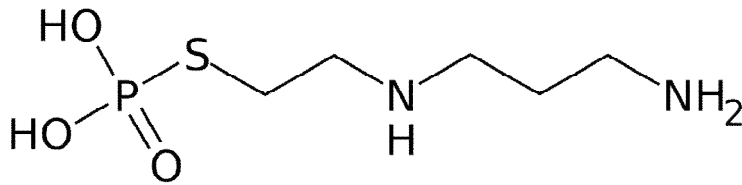
Amifostin (S-(N-(3-aminopropil)-2-aminoetiyol) sisteamin benzeri bir moleküldür. Soğuk savaş döneminde Amerikan ordusuna bağlı Walter Reed Ordu Araştırma Enstitüsü tarafından yürütülen ve askerleri cephedeki nükleer silah kaynaklı radyasyondan korumak amacıyla yapılan çalışmaların ürünüdür. Bu program çerçevesinde geliştirilen ve tiyol içeren bileşikler Walter Reed'in kısaltılmasıyla "WR" ön eki ile tanımlanmışlardır. Düşünülen amaçla kullanıma uygun olmadığı anlaşılan amifostin tıbbi araştırmalarda kullanılmaya başlanmış, bunun sonucunda radyoterapi (RT) ve kemoterapiye (KT) bağlı normal doku hasarlarının önlenmesinde etkili olduğu tespit edilmiştir (121, 122).

Amifostin, ilk kez sisplatin uygulanan ileri evre over kanserli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastalarda sisplatinin oluşturduğu kümülatif renal toksisiteyi azalttığı tespit edildiği için, 1996 yılında Amerika'da gıda ve ilaç dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Amifostin bir ön ilaç olup normal dokularda alkalen fosfataz ile defosforile olarak aktif metaboliti olan tiyole dönüşür (123, 124).

Yapılan çalışmalarda normal dokuların, özellikle kapiller seviyede olmak üzere, daha fazla alkalen fosfataza sahip oldukları gösterilmiştir (125, 126). Alkalen

fosfataz enziminin kapiller endoteldeki yerleşimi, amifostinin serbest tiyole dönüşüp normal dokular içerisine lokal olarak hızlı bir şekilde alınmasını sağlar (127). Optimum alkale fosfataz aktivitesi için nötral pH sağlanmalıdır. Tümör dokusunun pH'sı asidik iken normal dokuların pH'sı nötrdür. Bunun için amifostin tümör dokusundaki asid fosfatazca defosforile edilemez (125).

Bir ön ilaç olan amifostin WR-2721 olarak da bilinir ve açık formülü; $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{S}-\text{PO}_3\text{H}_2$ şeklindedir (Şekil 1). Yapısındaki fosfor amifostini inaktif formda tutarken, sülfür ise amifostine serbest radikalleri temizleme özelliği kazandırır. Amifostin (WR-2721), plazma endotelinin bulunduğu tüm dokularda membran bağımlı enzim olan alkale fosfataz tarafından defosforilasyona uğrayarak aktif formu olan WR-1065'e dönüşerek normal doku içine girer. WR-1065 normal hücre içine girer ve serbest radikal temizleme özelliği olan metabolitlere dönüşür. WR-1065'in oksidasyonu ile en fazla oluşan metabolit WR-33278 (simetrik disülfid)' dir (122, 128). Serbest tiyol olan WR-1065'in normal hücreyi sitotoksik tedavilerin etkilerinden koruması çeşitli mekanizmalar ile sağlanmaktadır. Serbest tiyol, intrasellüler ortamda direkt olarak alkileyici ajanların veya sisplatinin aktif ürününe bağlanır ve hasarlı hedef moleküllere hidrojen iyonu vererek sitoproteksiyon sağlar. Yapısındaki sülfidril atomu sayesinde, KT ajanları ve RT tarafından oluşturulan serbest radikaller ortadan kaldırılmadığında meydana gelen ve DNA hasarına yol açan, reaktif nükleofilleri yok eder. Selektif olarak normal dokuları koruma özelliği, normal dokularda tümör hücrelerinden daha fazla miktarda WR-1065 olmasına bağlıdır (122).



Şekil 3. Amifostinin biyokimyasal yapısı.

Moleküler seviyede amifostin, sensitif transkripsiyon faktörlerinin redoksunu, gen ekspresyonunu, kromatin stabilizasyonu ve enzimatik aktiviteyi etkiler. Hücresel boyutta hücre büyümesinin regülasyonunda ve hücre döngüsünün progresyonunda rol oynar. Amifostin farklı hücre dizilerinin proliferasyonunun sağlanmasında ve normal hücrelerin apoptozisten korunmasında etkilidir (129).

Serbest radikal temizleme özelliği WR-1065'in iki metaboliti olan sisteamin ve simetrik disülfid olan WR-33278 ile gerçekleşir. WR-33278'in radyoterapinin indüklediği sitotoksosite ile birlikte mutajenik etkisine karşı da koruyucu olduğu gösterilmiştir. Amifostin tarafından korunan normal dokular; böbrek, akciğer, yemek borusu, periferik sinirler, kemik iliği, ince bağırsak, kalın bağırsak, immün sistem, tükürük bezleri, ağız mukozası, kalp ve testisdir (130).

Over dokusundaki alkalen fosfataz varlığı deneysel çalışmalarda gösterilmiştir ve teka hücrelerinde daha fazladır, granüloza hücrelerinde ise bulunmamaktadır. Alkalen fosfataz varlığı follikül sıvısında da tespit edilmiştir (131-133). Köpek over yüzey epitelinde plasental alkalen fosfatazla boyanma tespit edilmiştir (134).

İnsanlarda amifostinin intravenöz (IV) verilmesini takiben ilk 6 dakikada amifostinin %90'ı metabolize edilmektedir. Yapılan çalışmalarda amifostinin dağılım yarı ömrünün 1 dakikadan kısa eliminasyon yarı ömrünün ise yaklaşık 8 dakika olduğu gösterilmiştir (1). WR-1065 metaboliti enjeksiyondan 10-30 dakika sonra en yüksek düzeyine ulaşır ve 30 dakikadan sonra dokudaki düzeyi azalır. Bu nedenle, normal dokuların sitoproteksiyondan optimum yarar sağlayabilmesi için radyoterapi ya da kemoterapi uygulamasından 20-30 dakika önce amifostin uygulanması gerektiği belirlenmiştir (135, 136). Yapılan bir çalışmada 200mg/kg dozdaki radyoaktif olarak işaretli amifostinin intraperitoneal olarak uygulanmasından sonraki 10-30 dakikada böbrek, akciğer, kalp ve dalak gibi normal dokularda amifostin konsantrasyonu tümör dokusuna göre 50-100 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (137).

Amifostin genel olarak iyi tolere edilir ancak doz bağımlı olarak kısa süreli geçici yan etkileri olabilir. Bunlar hipotansiyon, bulantı, kusma, hıçkırık, samnolans, infüzyon sırasında metalik tat ve nadiren allerjik reaksiyonlar (cilt döküntüsü, ateş ve anafilaktik şok) şeklindedir. Klinik olarak anlamlı yan etki çoğunlukla hipotansiyondur. Hastaların %60'ında geçici hipotansiyon gelişebilir, fakat nadiren tedaviye ara verilmesine gerek duyulur (<%5). Bulantı, kusma gibi semptomlar, amifostin öncesi antiemetik ilaç uygulanması ile giderilebilir. Geçici hipokalsemi paratiroid hormon salgılanmasının inhibisyonuna bağlıdır ve amifostin tedavisinin çok nadir görülen bir komplikasyonudur (138).

Amifostinin yetişkinlerde önerilen başlangıç dozu 910mg/m²'dir ve ilacın verilmesine kemoterapiden 30 dakika önce başlanması gerekmektedir. İntravenöz infüzyon şeklinde 15 dakikada verilmelidir (139, 140). Yan etki olarak en sık hipotansiyona neden olduğu bilindiğinden, hastalar tedaviden önce yeterince hidrate edilmeli, 24 saat önceden antihipertansif ilaçlar kesilmelidir. Ayrıca her 5 dakikada bir hastanın tansiyonu ölçülmelidir (141).

1.1.7. Antioksidanlar

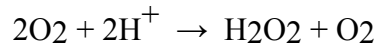
Canlı hücrelerdeki protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktiren maddelere antioksidan denir. Serbest radikal ve antioksidanların düzeylerinin dengesi korunmadığında, hücre hasarına kadar giden birçok değişiklik ortaya çıkmaktadır. Endojen antioksidanların yetersiz kaldığı durumlarda diyetle alınan antioksidanlara gerek duyulur. Kimyasal ajanlar tarafından organizmanın radyasyondan korunması, radikal süpürücü reaksiyonlar olduğu düşünülmektedir. Serbest radikaller pek çok hastalığın gidişinde, yaşlanma, karsinogenezis ve kanserin, cerrahi ve cerrahi dışı tedavileri süresince komplikasyonların oluşumunda etkilidir. Bu nedenle, serbest radikallere bağlı hastalıkların tedavisinde antioksidanlar önemli bir tedavidir (77, 78, 142, 143).

Antioksidan etki mekanizmaları; ROM oluşumunun engellenmesi, enzimsel reaksiyonlar aracılığıyla veya doğrudan serbest radikal temizlenmesi, metal iyonlarının bağlanarak radikal oluşumunun önlenmesi, hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri ve temizlenmesi gibi çeşitli şekillerde olabilmektedir.

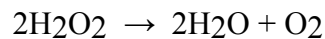
Organizmanın üç tür antioksidan stratejisi vardır:

1. Serbest oksijen radikallerini daha az toksik ürünlere dönüştüren antioksidan enzim sistemleri: Süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSHPx) gibi enzimlerin miktarının artması ya da in vitro aktivitelerinin artırılması:

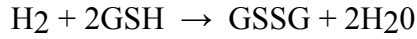
SOD oksijen yıkımını katalize eder ve hidrojen peroksid açığa çıkar:



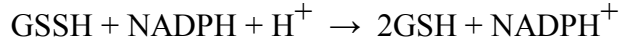
CAT ise aşağıdaki reaksiyonla peroksidazı yıkar:



GSHPx aşağıdaki reaksiyonu katalize eder:



Glutatyon redüktaz (GRD) aşağıdaki reaksiyonu katalize eder:



$O_2^{\bullet}$ serbest radikal olmasına rağmen fazla reaktif değildir, lipid zar içine geçemez, üretildiği hücre içi bölme içerisinde kalır. $O_2^{\bullet}$, SOD antioksidan enzimi ile H_2O_2 'ye yıkılır. H_2O_2 , $O_2^{\bullet}$ 'den daha zayıf bir oksitleyicidir. Önemi biyolojik zarlardan geçebilmesinden kaynaklanmaktadır. H_2O_2 , ROM oluşumunda ara madde olarak görev yapar ve yüksek konsantrasyonlarda memeli hücrelerindeki peroksizomlarda CAT aracılığıyla H_2O ve oksijene, düşük konsantrasyonlarda ise selenyum içeren GSHPx aracılığıyla H_2O 'ya dönüşür (76, 85, 86).

2. Vitamin A, C, E, selenyum, karnitin, curcumin gibi antioksidan maddeler ile radikallerin nötralize edilmesi: Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek veya ROM'ları süpürerek lipid peroksidasyonunu ve serbest radikallerin meydana getirdiği hücre tahribatını önlerler (75).

3. Radikal oluşmasını önleyen ve oluşan radikallerin yayılmasını engelleyen sistemler: H_2O_2 ve $O_2^{\bullet}$ anyonundan $OH^{\bullet}$ oluşmasını sağlayan Haber-Weiss reaksiyonunu katalize eden demir ve bakır iyonunu hücrede ve plazmada bağlayan ferritin, transferin, laktoferin ve seruloplazmin ve mitokondrilerde doğal olarak oluşan radikalleri H_2O 'ya indirgeyen mitokondriyel sitokrom oksidazdır.

1.1.7.1. Endojen antioksidanlar

Enzim olanlar: SOD, GSHPx, glutatyon-s transferaz (GST), CAT, hidroperoksidaz, mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemidir. Enzim olmayanlar ise melatonin, seruloplazmin, transferrin, miyoglobin, ferritin, hemoglobin, billuribin, glutatyon, sistein, methiyonin ve albümindir.

1.1.7.2. Eksojen antioksidanlar

Vitaminler, ilaçlar, gıda antioksidan sisteminin parçalarıdır. Vitamin E ve C, folik asit, β -karoten, ksantin oksidaz inhibitörleri, NADPH oksidaz

inhibitörleri, rekombinant süperoksit dismutaz, asetilsistein, demir redoks döngüsü inhibitörleri, nötrofil adezyon inhibitörleri, sitokinler, barbitüratlar, demir şelatörleri, sodyum benzoate eksojen antioksidan sisteminin parçalarıdır (77).

1.1.7.3. Total Antioksidan Kapasite (TAK, TAC)

Total antioksidan kapasite, güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen bir metoddur (88, 144). Bu yöntemde; Fe^{2+} -o-dianisidin kompleksi hidrojen peroksid ile Fenton tipi reaksiyon oluşturarak $OH^{\bullet}$ radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen turu indirgenerek düşük pH'da renksiz o-dianisidin molekülüyle reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidil radikallerini oluşturur. Dianisidil radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılır ve renk oluşumunu artırır. Ancak antioksidan ajanlar bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu durdurmaktadırlar. Bu reaksiyon otomatik analizörde spektrofotometrik olarak ölçülür ve sonuca bu şekilde ulaşılmaktadır. Yarılanma ömürleri oldukça kısa olduğundan serbest oksijen radikallerinin varlığının gösterilmesi kolay değildir. Antioksidan sistemlerin ayrı ayrı gösterilmesi ise, bu sistemler arasında sinerjik etkileşim olduğu için tercih edilmemektedir. Bu nedenle vücut sıvılarının Total Antioksidan Kapasitesini (TAK), (Total Antioxidant Capacity (TAC) ölçen yöntemlerin klinik ortamlarda antioksidan cevabı belirlemede yararlı olduğu ispatlanmıştır (145).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Hayvan Bakımı

Bu deneysel çalışma Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM) laboratuvarında yapılmıştır. Tüm işlemler Fırat Üniversitesi Etik onayı ile veteriner hekim kontrolünde gerçekleştirilmiştir.

Sunulan çalışmada 40 adet düzenli siklusa sahip, 190–220 gr ağırlığında, 4 aylık, erişkin dişi Winstar Albino cinsi rat kullanıldı. Ratlar 12 saat ışık (08–22), 12 saat karanlık fotoperiyodunda ve 21–23 C° sabit sıcaklıktaki odada beşerli kafeslerde tutuldu, standart pellet yemi ve şehir suyu ile beslendi. Deneyden 18 saat önce oral beslenme kesilerek, sadece su içmelerine izin verildi. Ratların beslenmesinde kullanılan yemin bileşimi Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 2. Standart rat yemi

Yem Bileşimi	
Su (en çok)	% 12
Ham protein (en az)	% 24
Ham selüloz (en çok)	% 7
Ham kül (en çok)	% 8
HCl’de çözünmeyen kül (en çok)	% 2
NaCl (en çok)	% 1
Mineral Karması*	% 1.25
Vitamin Karması**	%1.25
Metabolik enerji	2650 kcal/kg

*Mineral Karması: Kalsiyum (% 1.0-2.8), Fosfor (% 0.9), Sodyum (%0.5-0.7), Mangan (10 mg/kg), Çinko (4 mg/kg).

**Vitamin Karması: Vitamin A (300 IU/kg), Vit. D₃ (1000 IU/kg), Vit. E (60 mg/kg), Vit. B₂ (4 mg/kg).

2.2. Deneyin Yapılışı

Çalışma, deney hayvanlarının seçimi esnasında ve yapılan uygulamalar sırasında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu (17.09.2014 tarih, Toplantı Sayısı: 2014/19, Karar No: 179) onayı alınarak Fırat Üniversitesi Deneysel

Araştırmalar Birimi'nde (FÜDAM) standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yürütüldü.

Araştırmamızda 40 adet düzenli siklusa sahip, 190–220 gr ağırlığında, 4 aylık, erişkin dişi Winstar Albino cinsi rat, estrus fazında rastgele, prospektif, tek kr olarak 4 gruba ayrıldı.

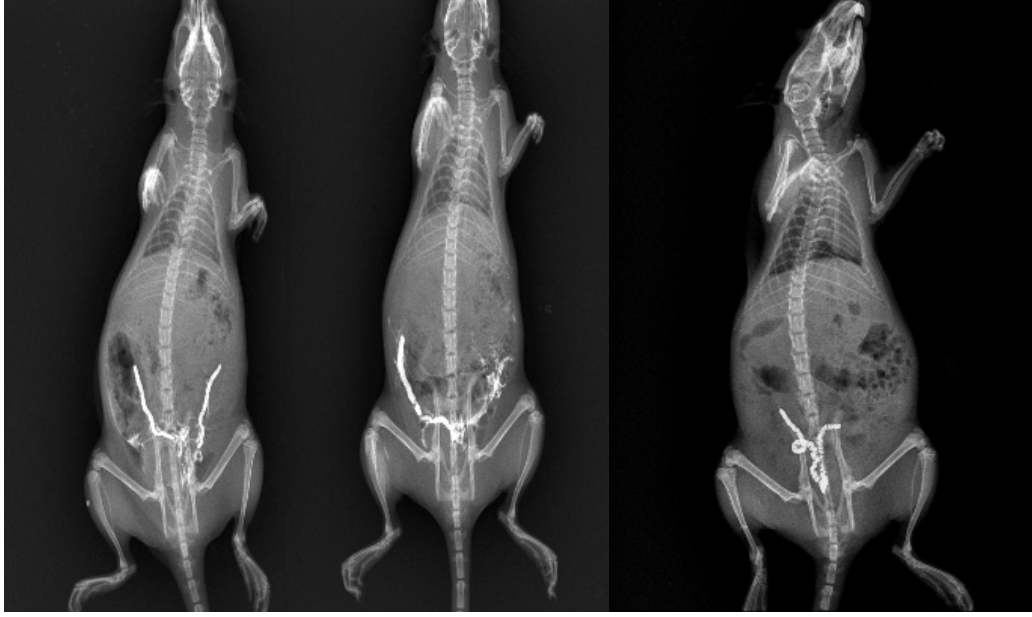
Grup 1 (n=10): Batın açılıp kapatılan ve X- ray uygulanmayan grup.

Grup 2 (n=10): Batın açılıp kapatılan ve X- ray uygulanan grup.

Grup 3 (n=10): Batın açılıp her bir uterin horna 0.1 ml ioheksol (Omnipaque 350mg/100 ml flakon) verilerek X- ray uygulanan grup.

Grup 4 (n=10): Batın açılıp işınlamadan 30 dakika önce 200 mg/kg amifostin (Redoxon-Roche) intraperitoneal (i.p.) yoldan verilerek her bir uterin horna 0.1 ml ioheksol (Omnipaque 350mg/100 ml flakon) verilerek X- ray uygulanan grup.

Ratlardaki strus dönemlerini belirlemek için Mallenby ve ark (146)'nın kullandıkları vajinal smear yöntemi uygulandı. Vajinal smear alınmadan once sıçanların vulva ve perianal bölgeleri %70'lik alkolle silinerek temizlendikten sonra steril ve disposable tahta çubuklarla vajinal duvardan tahriş etmeyecek şekilde smear alındı. Alınan sürüntü temiz bir lam üzerine yayılarak, üzerine %70'lik etilalkol damlatılarak 5 dakika bekletilerek tespit edildi. Havada kurutulan sürüntü preparatları %1'lik metilen mavisi ile 5 dakika boyandı. Vajinal sitoloji takibinde östrus fazında tespit edilen ratlara anestezi sağlamak amacıyla intramüsküler yoldan 70 mg/kg ketamin (Ketalar-Eczacıbaşi/Türkiye), 10 mg/kg xylazine (Rompun-Bayer/Türkiye) verilerek uyutulduktan sonra supin (sırtüstü) pozisyonunda sabitlendi. Steril cerrahi işlem için batın % 10'luk batikonla temizlendi. Ratlar, sırt üstü pozisyonunda operasyon masasına yatırılıp batın, orta hat insizyonla açıldı. Batınları açılıp kapatılan G2, G3, G4' deki ratlara 2'şer dakika ara ile 3 kez tüm vücut radyasyonu uygulandı (Toplam doz =15-20 miliRad, Villa-Genius HF-80. Çift masa, çift tüp röntgen cihazı. 1994, İtalya), (şekil 4). F.. Veterinerlik Fakültesi Hayvan Hastanesinde teknisyen tarafından 15-20 miliRad dozunda uygulandı. Batın tabakaları ve cilt 3/0 ipekle kapatıldı. Ratlar alışma süresince kan basıncı, kalp atımı ve ateş ölçümü için monitörize edildi.



Şekil 4. HSG çekilen ratlar

2.3. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması

Ratlar deney sonuna kadar ayrı ayrı beşerli olmak üzere kafeslerde tutuldu. Deney süresi sonunda hayvanlar steril aletler kullanılarak sakrifiye edildi. G1, G2, G3, G4 ' teki her gruptan rastgele beş rat seçildi erken dönem etkilerin araştırılması için 3 saat sonra, geri kalan her gruptaki diğer beş ratın ise 1 ay sonra batinları tekrar açıldı. Histolojik ve biyokimyasal analizler için hayvanların abdominal kaviteleri açılarak, Histolojik ve Biyokimyasal değerlendirmeler için over dokuları %0,9'luk soğuk (+4°C) sodyum klorür (NaCl) ile yıkandı ve kurutma kâğıdı ile kurutuldu. Daha sonra dokular homojenizatör ile (Ultra TurraxType T25-B, IKA Labortechnik, Germany) 0,01M'lıkPBS çözeltisi içinde (1;9,w;v), 16000 rpm'de 3 dakika homojenize edildi. Homojenizasyon bir buz kabının içerisinde gerçekleştirildi. Homojenat 5000xg'de 1 saat (+4°C'de) santrifüjlenerek süpernatantları ayrıldı ve analiz zamanına kadar -80°C'de bekletildi. TNF- α , TAS, TOS, MDA ve NO seviyeleri süpernatantta kendilerine uygun metodlarla tayin edildi.

Çıkarılan overlerin biri histolojik ve immünohistokimyasal inceleme için %10'luk formaldehitte fikse edildi, ikinci over dokuda biyokimyasal parametreler çalışmak üzere aliminyum folyoya kuru halde sarılıp -80 derecede saklandı. İntrakardiak alınan kan örnekleri analizler için jelli biyokimya tüplerine alındı. Alınan kanlar 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek (HeraeusBiofugeStratos;

KendoLaboratoryProducts, Osterode-Germany) serumları ayrıldı. Ayrılan serumlar eppendorf tüplere porsiyonlanarak -80°C’de AMH ölçümleri için saklandı.

2.4. AMH Düzeylerinin Ölçümü

AMH düzeyleri, rat AMH (Anti-Mullerian Hormone) ELISA kiti (Elabscience, katalog no; E-EL-R0640) kullanılarak kit prosedürüne uygun olarak hem serum örneklerinde hem de over doku örneklerinde çalışıldı. Absorbanslar ELX800 ELISA okuyucusunda spektrofotometrik olarak 450 nm’de okutuldu. Plate yıkamalarında ise otomatik yıkayıcı olarak Bio-tek ELX50 (BioTekInstruments, USA) kullanıldı. Sonuçlar ng/mL olarak belirtildi. Over doku AMH sonuçları sulandırma oranı göz önüne alınarak dilüsyon faktörü ile çarpılarak hesaplandı. Ölçüm aralığı 0,16-10 ng/mL, minimum ölçülebilir düzeyi 0,1 ng/mL ve CV<%10 idi.

2.5. TNF- α Düzeylerinin Ölçümü

TNF- α düzeyleri, rat TNF- α ELISA kiti (Boster Immuno leader, Boster Biological Technology Co.,Ltd. Pleasanton, CA, katalog no; EK0526) kullanılarak kit prosedürüne uygun olarak çalışıldı. Absorbanslar ELX800 ELISA okuyucusunda spektrofotometrik olarak 450 nm’de okutuldu. Plate yıkamalarında ise otomatik yıkayıcı olarak Bio-tek ELX50 (BioTekInstruments, USA) kullanıldı. Sonuçlar pg/mL olarak belirtildi. Over doku TNF- α sonuçları sulandırma oranı göz önüne alınarak dilüsyon faktörü ile çarpılarak hesaplandı. Kitin ölçüm aralığı 15,6-1000 pg/mL, sensitivitesi<1 pg/mL idi.

2.6. TAS Düzeylerinin Ölçümü

TAS düzeyleri Fırat Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı’nda otoanalizörle (Siemens Advia 2400 ChemistrySystem, Siemens, Tokyo, Japonya) Rel Assay Total Antioxidant Status Test Kiti kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar mmolTroloxEquiv./L olarak belirtildi. Kitin lineeritesi 0-2,75 mmolTroloxEquiv./L, ölçüm aralığı ise 1,20-1,50 mmol/L idi. Over doku TAS sonuçları dilüsyon katsayısı ile çarpılarak hesaplandı.

2.7. TOS Düzeylerinin Ölçümü

TOS düzeyleri Fırat Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda otoanalizörle (Siemens Advia 2400 ChemistrySystem, Siemens, Tokyo, Japonya) RelAssay Total Oxidant Status Test Kiti kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L olarak belirtildi. Kitin lineeritesi 0-33,52,75 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L, ölçüm aralığı ise 4-6 $\mu\text{mol/L}$ idi. Over doku TOS sonuçları dilüsyon katsayısı ile çarpılarak hesaplandı.

2.8. MDA Düzeylerinin Ölçümü

Serum ve süpernatantta MDA düzeyleri lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak ölçüldü. Serum ve doku örneklerindeki proteinler asitle çöktürüldükten sonra 4500x g de 5 dakika santrifüjlendi. Elde edilen supernatant üzerine TBA ayırıcı eklenerek 45 dakika 90°C su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası elde edilen TBA-MDA ürünü isobutanol ile ekstrakte edildi. Bütanol fazından 20 μl high-performance liquid chromatography (HPLC) sistemine enjekte edilerek ölçümler gerçekleştirildi. 1,1,3,3-tetraethoxypropane MDA standardı olarak kullanıldı ve sonuçlar nmol/mL olarak verildi.

2.9. NO Düzeylerinin Ölçümü

Nitrik oksit düzeyleri kolorimetrik nitrik oksit ölçüm kiti (Oxford Biomedical Research, Inc. Oxford, MI 48371 USA, Lot no: 150129) kullanılarak gerçekleştirildi. Absorbanslar ELX800 ELISA okuyucusunda spektrofotometrik olarak 540 nm'de okutuldu. Sonuçlar standart eğri grafiğinden yararlanılarak ve dilüsyon faktörü ile çarpılarak hesaplandı. Sonuçlar μM olarak belirtildi.

2.10. İmmünohistokimyasal İnceleme

Over dokusunda bax immünreaktivitesinin belirlenmesi için Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleksi yöntemi uygulandı. Boyama metodu aşağıdaki Tablo 2'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 3. İmmünohistokimyasal boyama prosedürü

Sıra	İşlem	Süre
1	Xylol I	10 dakika
2	Xylol II	10 dakika
3	Xylol	10 dakika
4	% 100 Alkol	10 dakika
5	% 96 Alkol	10 dakika
6	% 80 Alkol	10 dakika
7	Distile su	5 dakika
8	Mikrodalga	7+5 dakika
9	Oda ısısında soğutma	20 dakika
10	PBS (PhosphateBufferedSaline)	3X5 dakika
11	H ₂ O ₂	10 dakika
12	PBS	3X5 dakika
13	Normal blok solüsyonu	5 dakika
14	Primer antikor	60 dakika
15	PBS	3X5 dakika
16	Sekonder antikor	30 dakika
17	PBS	3X5 dakika
18	Streptavidin ALP(Alkalenfosfataz)	20 dakika
19	PBS	3X5 dakika
20	Fast Red	5 dakika
21	Distilesu	5 dakika
22	Zıt boya olarak Mayer's hematoksilen	10 saniye
23	Akarsu	5 dakika
24	Özel kapatma maddesi ile kapatma	

Parafin bloklardan 5–6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildikten sonra endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için H₂O₂ ile muamele edildi. Zemin boyasını engellemek için Ultra V Block solüsyonu ile muameleden sonra primer antikor (Monoclonal Mouse Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen, M0879, Dako, Baltimore, MD, USA) ile 60 dakika inkübe edildi. Primer antikor uygulanmasından sonra sekonder antikor (biyotinli anti-mouse /rabbitIgG, Diagnostic BioSystems, KP 50A, Pleasanton, USA), Streptavidin ALP ve 3 Fast Red kromojeni uygulandıktan sonra Mayer's hematoksilenle zıt boyama yapıldı. PBS ve distile sudan geçirilen dokular uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Hazırlanan

preparatlar Novel N-800M mikroskobunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı.

Boyamada immünreaktivitenin yaygınlığı (0.1: <%25, 0.4:%26-50, 0.6:%51-75, 0.9:%76 -100) ve şiddeti (0:yok, +0.5: çok az, +1:az, +2: orta, +3: şiddetli) esas alınarak histoskor oluşturuldu. Histoskor = yaygınlık x şiddet.

2.11. TUNEL Metodu

Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda Apop Tag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, catno: S7101, USA) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi.

Xylene ile deparafinize edilen dokular, dereceli alkol serilerinden geçirilerek phosphate buffered saline (PBS) ile yıkandı. 0.05% 'lik proteinase K ile 10 dakika inkübe edilen dokular, endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için % 3 hydrogen peroxide ile 5 dakika inkübe edildi. PBS ile dokular yıkandıktan sonra, 6 dakika Equilibration Buffer ile inkübe edilip, 37°C'de nemli ortamda çalışma solüsyonu (%70µl Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme) ile 60 dakika inkübe edildi. Stop/WashBuffer'da 10 dakika bekletilen dokular, Anti-Digoxigenin-Perosidaz ile 30 dakika muamele edildi. Diaminobenzidine (DAB) substratı ile apoptotik hücreler görüntülendi. Harris hematoksilin ile zıt boyası yapılan kesitler uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Pozitif kontrol için meme dokusu kullanıldı.

Hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskobunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoksilin ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Kesitlerde 10' luk büyütmede rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik en az 500 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücrelere oranlanması ile Apoptotik indeks (AI)'i hesaplanarak istatistiksel analizleri yapıldı. Skala bar: 50µm. Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 3).

Tablo 4. TUNEL boyama prosedürü

	İşlem	Süre
1	60°C etüv	Bir gece
2	Xylol	3X15 dakika
3	%100, %96, %80, %70 etil alkol	3'er dakika
4	PBS	5 dakika
5	Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.	
6	1:500 dilüsyondaki Protinaz K solüsyonu	20 dakika
7	PBS	3X5 dakika
8	Endojen peroksit blokajı (% 3 H ₂ O ₂)	3 dakika
9	PBS	3X5 dakika
10	Equilibration tampon solüsyonu	10 dakika
11	Çalışma solüsyonu (%70 µl ReactionBuffer + %30 TdTEnzyme) 37°C'de	60 dakika
12	Stop/WashBuffer (2ml) + Distile su (68ml) Oda sıcaklığında	10 dakika
13	Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
14	PBS	3X5 dakika
15	DAB DilutionBuffer + DAB Substrate	5-10 dakika
16	PBS	3X5 dakika
17	Distile su	5 dakika
18	Harris hematoksilen	1-5 dakika
19	Distile su	5 dakika
20	%80, %96 ve %100 etil alkol	1'er dakika
21	Xylol	2X5 dakika
22	Kapatma medyumu kullanılarak lamel ile kapatma.	

2.12. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme SPSS 22,0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Her değişken için normallik testi uygulanmıştır. Normal dağılıma uyan veriler için parametrik olan Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve onu takiben Tukey Post Hoc Testi uygulanmıştır. Normal dağılıma uymayanlarda nonparametrik olan Kruskal Wallis Varyans Analizi ve onu takiben Mann-Whitney U Testi kullanılmıştır. Ayrıca ilişkili değişkenler için Wilcoxon testi uygulanmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Biyokimyasal Bulgular

3.1.1. MDA Düzeyi Sonuçları

Deneyin sonunda, anestezi altındaki ratlardan alınan over dokularında MDA düzeyleri ölçüldü. MDA düzeyleri tablo 5’de gösterilmiştir. Overlerden 3. saatte alınan dokulardaki MDA düzeyleri arasında anlamlı farklılık izlenmezken ($p>0,05$), 1. ayda MDA seviyelerinde kontrol grubuna göre radyasyon ($p<0,01$) ve HSG gruplarında anlamlı ($p<0,001$) şekilde yüksek bulundu. Amifostin grubundaki MDA seviyeleri ise kontrol grubuyla benzer bulundu ($p>0,05$).

Tablo 5. MDA Düzeyi Sonuçları

Gruplar	MDA ($\mu\text{mol/L}$)	
	3. Saat	1. Ay
Kontrol (n:5)	6.30 $\pm$ 1.42	6.22 $\pm$ 0,44
Radyasyon (n:5)	5.91 $\pm$ 0.51	15.73 $\pm$ 1.21 ^{a,c}
HSG (n:5)	6.61 $\pm$ 1.21	20.21 $\pm$ 2.91 ^{b,c}
Amifostin (n:5)	5.62 $\pm$ 0.30	7.00 $\pm$ 1.21

Değerler, ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

^a $p<0,01$, kontrol ile karşılaştırıldığında

^b $p<0,001$, kontrol ile karşılaştırıldığında

^c $p<0,01$, amifostin ile karşılaştırıldığında

3.1.2. NO Düzeyi Sonuçları

Gruplardan alınan over dokularında NO düzeyleri ölçüldü. NO düzeyleri tablo 6’da gösterilmiştir. Overlerden 3. saatte alınan dokulardaki NO düzeyleri arasında anlamlı farklılık izlenmezken ($p>0,05$), 1. ayda NO seviyelerinde kontrol grubuna göre radyasyon ve HSG gruplarında anlamlı ($p<0,05$) şekilde yüksek bulundu. Amifostin grubundaki NO seviyeleri ise kontrol grubuyla benzer bulundu ($p>0,05$).

Tablo 6. NO Düzeyi Sonuçları

Gruplar	NO (μ M)	
	3. Saat	1. Ay
Kontrol (n:5)	7049 $\pm$ 527	6232 $\pm$ 526
Radyasyon (n:5)	7320 $\pm$ 390	6927 $\pm$ 350 ^a
HSG (n:5)	7182 $\pm$ 250	7719 $\pm$ 515 ^a
Amifostin (n:5)	6542 $\pm$ 1002	5469 $\pm$ 1057

Değerler, ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

^ap<0,05, kontrol ile karşılaştırıldığında

3.1.3. TOS Düzeyi Sonuçları

Gruplardan alınan overlerin homojenizasyonu ile dokuda TOS düzeyleri ölçüldü. TOS düzeyleri tablo 7’de gösterilmiştir. Overlerden 3. saatte alınan dokulardaki TOS düzeyleri gruplar arasında MDA ve NO düzeylerinde olduğu gibi anlamlı değildi (p>0,05), 1. Ayda alınan over dokularında TOS düzeylerinde kontrol grubuna göre radyasyon (p<0,01) ve HSG(p<0,001) gruplarında anlamlı şekilde yüksek bulundu. HSG grubunda TOS düzeyi radyasyon grubuna göre anlamlı düzeyde (p<0,05) daha yüksekti. Amifostin grubundaki TOS seviyeleri ise kontrol grubuyla benzer bulundu (p>0,05).

Tablo 7. TOS Düzeyi Sonuçları

Gruplar	TOS (mmol/L)	
	3. Saat	1. Ay
Kontrol (n:5)	733 $\pm$ 93	688 $\pm$ 107
Radyasyon (n:5)	671 $\pm$ 83	879 $\pm$ 55 ^{a,c}
HSG (n:5)	706 $\pm$ 66	1967 $\pm$ 206 ^{b,c}
Amifostin (n:5)	669 $\pm$ 32	561 $\pm$ 156

Değerler, ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

^ap<0,05, kontrol ile karşılaştırıldığında

^bp<0,001, kontrol ile karşılaştırıldığında

^cp<0,01, amifositin ile karşılaştırıldığında

3.1.4. TAK (TAS) Düzeyi Sonuçları

Over dokularında TAS düzeyleri ölçüldü. TAS düzeyleri tablo 8’de gösterilmiştir. Overlerden 3. saatte alınan dokulardaki TAS düzeyleri arasında anlamlı farklılık izlenmedi (p>0,05). 1. ayda TOS seviyeleri kontrol ve amifostin

gruplarında benzer ve radyasyon ile HSG gruplarına göre anlamlı şekilde yüksek ($p<0,05$) bulundu.

Tablo 8. TAK (TAS) Düzeyi Sonuçları

Gruplar	TAS (mmol/L)	
	3. Saat	1. Ay
Kontrol (n:5)	48.50±4.31	64.11±3.30
Radyasyon (n:5)	47.82±15.50	51.32±4.92 ^{a,b}
HSG (n:5)	52.63±2.01	48.13±1.11 ^{a,b}
Amifostin (n:5)	49.81±4.42	67.82±5.20

Değerler, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^a $p<0,05$, Kontrolle karşılaştırıldığında

^b $p<0,05$, Amifostin ile karşılaştırıldığında

3.1.5. TNF- α Düzeyi Sonuçları

Gruplardan alınan overlerin homojenizasyonu ile dokuda TNF- α düzeyleri ölçüldü. TNF- α düzeyleri tablo 9’da gösterilmiştir. Overlerden 3. saatte alınan dokulardaki TNF- α düzeyleri arasında kontrol grubuna göre radyasyon ve HSG grubunda anlamlı şekilde ($p<0,05$) yüksek bulundu. Amifostin düzeyi ise kontrol grubuna benzer ve radyasyon ile HSG grubuna göre şekilde ($p<0,05$) düşük bulundu. 1. ayda TNF- α seviyelerinde kontrol grubuna göre HSG grubunda anlamlı ($p<0,05$) şekilde yüksek bulundu. Radyasyon grubunda kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Amifostin grubundaki TNF- α seviyeleri ise kontrol grubuyla benzer bulundu ($p>0,05$).

Tablo 9. TNF- α Düzeyi Sonuçları

Gruplar	TNF- α (pg/mL)	
	3. Saat	1. Ay
Kontrol (n:5)	4019±545	2175±108
Radyasyon (n:5)	5040±817 ^{a,b}	2856±683
HSG (n:5)	5603±319 ^{a,b}	3080±297 ^c
Amifostin (n:5)	3861±392	2454±268

Değerler, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^a $p<0,05$, kontrol ile karşılaştırıldığında

^b $p<0,01$, amifositin ile karşılaştırıldığında

^c $p<0,001$, kontrol ile karşılaştırıldığında

3.1.6. AMH Düzeyi Sonuçları

Gruplardan alınan intra kardiak kan örneklerinin santrifüsuyle elde edilen serumlarında AMH düzeyleri ölçüldü. Serum AMH düzeyleri tablo 10'da gösterilmiştir. Tüm gruplarda AMH seviyelerinde anlamlı bir değişiklik izlenmedi ($p>0,05$).

Tablo 10. AMH Düzeyi Sonuçları

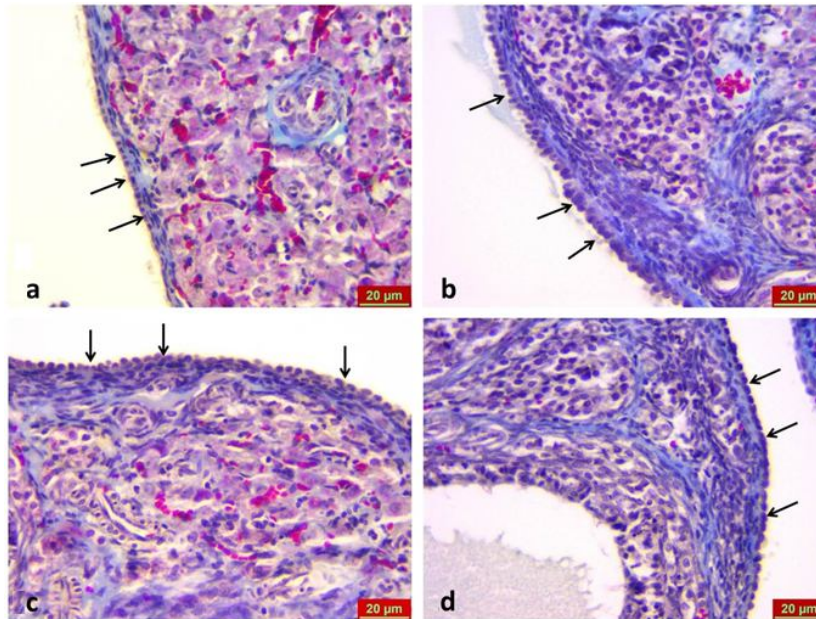
Gruplar	AMH (ng/ml)	
	3. Saat	1. Ay
Kontrol (n:5)	1.12±0.21	1.03±0.61
Radyasyon (n:5)	1.16±0.31	1.08±0.54
HSG (n:5)	1.14±0.42	0.78±0.33
Amifostin (n:5)	1.48±0.40	0.91±0.11

Değerler, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

3.2. Histolojik Bulgular

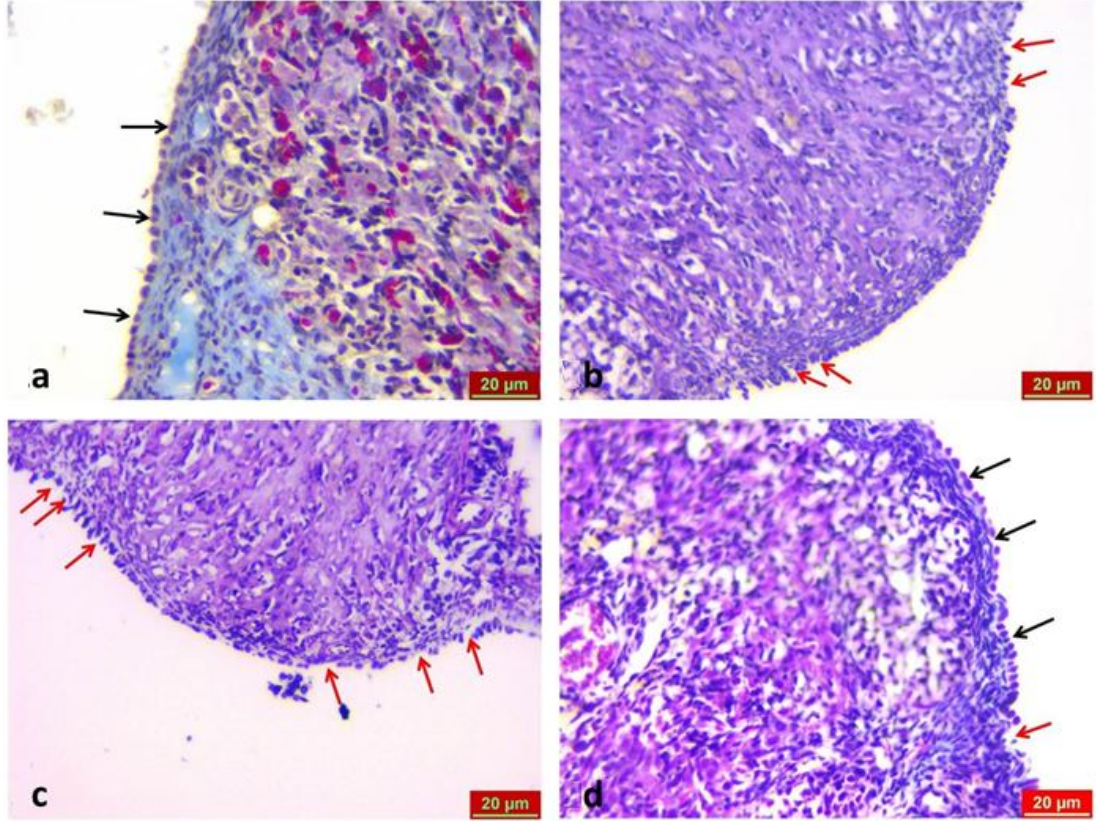
Tüm grupların masson trikrom boyalı preparatlarının ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu;

3. Saat için; Kontrol grubu (Şekil 5a) ile karşılaştırıldığında radyasyon (Şekil 5b) HSG (Şekil 5c) ve amifostin grubunda (Şekil 5d) herhangi bir değişiklik izlenmedi. (siyah ok: germinal epitel)



Şekil 5. 3. Saat. Masson trikrom. (siyah ok: germinal epitel)

1.ay için; Kontrol grubu (Şekil 6a) ile karşılaştırıldığında radyasyon (Şekil 6b) ve HSG grubunda (Şekil 6c) germinal epitel dejenerasyonu (kırmızı ok) belirgindi. HSG grubu ile kıyaslandığında ise amifostin grubunda (Şekil 6d) germinal epitel dejenerasyonunda anlamlı bir azalma vardı ve kontrole benzerdi.



Şekil 6. 1. ay. Masson trikrom. (siyah ok: germinal epitel, kırmızı ok: dejenere germinal epitel)

3.3. TUNEL Bulguları

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği tüm gruplarda over dokusunda stromal hücrelerde gözlemlendi.

3. Saat için; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında radyasyon grubunda anlamlı bir değişiklik gözlenmezken HSG grubunda anlamlı bir artış vardı ($p<0.05$). HSG grubu ile kıyaslandığında ise Amifostin grubunda anlamlı bir azalma vardı ve kontrole yakındı. ($p<0.05$).

1. ay için; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında radyasyon grubunda anlamlı bir değişiklik gözlenmezken HSG grubunda anlamlı bir artış vardı ($p<0.05$). HSG

grubu ile kıyaslandığında ise Amifostin grubunda anlamlı bir azalma vardı ve kontrole yakındı. ($p<0.05$).

Tüm grupların 3. saati ile 1. ayı, TUNEL pozitifliği açısından karşılaştırıldığında sadece HSG grubunun 1. ayında 3. saatine göre anlamlı bir artış izlendi. Tablo 11.

Tablo 11. Apoptotik indeks

Apoptotik indeks (%)		
Gruplar	3. Saat	1. Ay
Kontrol (n:5)	1.40±0.54	1.60±0.89
Radyasyon (n:5)	1.60±0.89	1.80±0.83
HSG (n:5)	6.60±0.89 ^{a,b}	14.40±2.51 ^{a,b}
Amifostin (n:5)	1.80±0.83 ^c	2.2±0.83 ^c

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

^b Radyasyon grubuna göre karşılaştırıldığında,

^c HSG grubuna göre karşılaştırıldığında, ($p<0.05$).

3.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

PCNA immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; PCNA immünreaktivitesi over dokusunda stromal hücrelerde görüldü.

3. Saat için; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında radyasyon, HSG ve Amifostin, gruplarında anlamlı bir azalma vardı.

1.ay için; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında radyasyon, HSG (Şekil 22) ve Amifostin, gruplarında anlamlı bir azalma vardı.

Tüm grupların 3. Saati ile 1.ay, PCNA immünreaktivitesi açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Tablo 12.

Tablo 12. PCNA immünreaktivitesi

Histoskor = yaygınlık x şiddet		
Gruplar	3. Saat	1. Ay
Kontrol (n:5)	2.04±0.65	1.86±0.53
Radyasyon (n:5)	0.18±0.08 ^a	0.14±0.05 ^a
HSG (n:5)	0.24±0.08 ^a	0.18±0.08 ^a
Amifostin (n:5)	0.22±0.13 ^a	0.16±0.05 ^a

Değerler, ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^a $p<0.05$, Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında.

4. TARTIŞMA

Histerosalpingografi, kadın genital anatomisinin değerlendirilmesinde, fallop tüplerinin fonksiyonları hakkında tahminde bulunmada, yapısal anomalilerin tespitinde kadın infertilitesine katkıda bulunabilecek etkin bir radyolojik prosedürdür (147, 148). Histeroskopi, laparoskopi ve magnetik rezonans gibi tanı yöntemlerine rağmen, kadınlarda infertilite araştırmalarında jineko-radyolojik olarak ilk basamak tanı aracı hala histerosalpingografidir (149, 150). İnfertilite veya tekrarlayan gebelik kayıpları nedeniyle doktora başvuran hastaların %90'nına HSG çekildiği tahmin edilmektedir (147). Ayrıca Asherman sendromunun takibi, submuköz myomların takibinde ve tubal cerrahi öncesi veya sonrasında tubal açıklığın değerlendirilmesinde de kullanılır (147, 151).

Histerosalpingografi floroskopi altında yapılır. Kontrast madde uterin kaviteye yavaşça verilerek uterin kavitenin ve tubaların doldurulması ve peritoneal dağılımın değerlendirilmesi amacıyla birkaç poz alınır. HSG operatör eşliğinde yapılır ve floroskopi altında en az 3 poz alınır. Literatürde HSG esnasında veya hemen sonrasında oluşabilecek komplikasyonlar tarif edilmiştir (151).

HSG çekimi sırasında kişi radyasyonla yaklaşık 63 saniye (17-404 saniye) süreyle karşılaşmakta iken, test sonucunun anormal olduğu bir çekimde bu süre 100 saniyeye kadar (28-172) çıkmaktadır (152). Son zamanlarda HSG işleminin potansiyel radyolojik zararları hakkında ortaya çıkan ciddi endişeler konu alınmaya başlanmıştır, çünkü bu işleme maruz kalan hastalar genelde gebelik planlayan ve gonadları radyasyona maruz kalan genç hastalardır (147). HSG işlemi için başvuran kadın hastalar işlem nedeniyle maruz kalacakları radyasyonun zararlı etkileri nedeniyle endişeli ve huzursuz olmaktadır. HSG işlemi sırasında oluşabilecek radyojenik zararlar hakkında hastalara bilgi vermek yine hekimlerin sorumluluğundadır. HSG esnasında maruz kalınan radyasyon, kadında radyasyona bağlı kanser riskini artırırken, muhtemel yakın zamanda oluşabilecek gebelik nedeni ile fetüs için de risk oluşturur (153).

Biyolojik sistemlerde iyonizan radyasyonun zararlı etkileri, çoğunlukla serbest oksijen radikalleri nedeniyle oluşur. İyonize radyasyon nedeniyle ortaya çıkan hasarın tedavi modellerinde elde edilecek kazanımların radyasyonun tipine,

dozuna ve uygulanış sıklığına göre değişkenlik gösterdiği pek çok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur (154, 155).

Amifostinin radyasyona bağlı ortaya çıkan hücresel hasarın tedavisinde etkin bir ilaç olduğu ve özellikle klinik kullanıma henüz girmemiş antioksidan özellikleri bilinen bileşiklerin radyasyon hasarına karşı olan etkileri araştırılırken, amifostinin iyi bir kıyaslamaya imkan verebileceği ve ilaç formundaki maddeler kullanılarak deneysel modellerin geliştirilmesinin anlamlı olacağı bildirilmiştir (156, 157).

Serbest radikallerin oluşumunun, antioksidan kapasiteyi aştığı durumlarda metabolik ve fonksiyonel birçok bozukluk ortaya çıkar. Dokularda, tek elektronların sürekli oksijene kayması endojen oksidatif stresi meydana getirir (158). SOR olarak bilinen ve oksijenden türeyen süperoksid, peroksid, hidroksil ve diğer serbest radikaller çok reaktiftir. Bu nedenle bunların dokuda artması membran bütünlüğünü sağlayan fosfolipidlerin, proteinlerin, DNA ve RNA gibi moleküllerin bütünlüğünü bozar (159-162). Bazı biyolojik olaylarda, örneğin antiinflamatuvar savunma, kanser, radyasyon hasarı ve yaşlanmada, serbest oksijen radikalleri devreye girerler. Sonuçta DNA baz hasarları, protein oksidasyon ürünleri, lipid peroksidasyon ürünleri açığa çıkar ve hücrenin dengesi bozularak hasar görür (158, 161, 163, 164). Özellikle hücre içerisinde artan serbest oksijen radikalleri antioksidan koruyucu mekanizmanın zayıflamasına ve oksidatif stresin artmasına neden olmaktadır (165,166).

Halliwell ve ark. (164) yaptığı çalışmalarda oksidan/antioksidan sistemi şu şekilde açıklamaktadır; belirli bir düzeye kadar oluşan oksidan molekül artışı vücutta daima belirli bir seviyede bulunan doğal antioksidan moleküller tarafından etkisiz hale getirilmektedir. Böylece sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların bunları etkisizleştirme gücü bir denge içerisinde. Oksidanlar belirli düzeyin üzerinde oluşur veya antioksidanlar yetersiz olursa yani denge antioksidanlar lehine bozulursa söz konusu oksidan moleküller organizmanın yapı elemanlarını tahrip ederek hücre organelleri ve membranındaki lipid ve protein yapısını bozarlar, hücre içi yararlı enzimleri etkisizleştirirler, DNA'yı tahrip ederler, mitokondrilerdeki aerobik solunumu bozar ve hücrede zararlı etkilere yol açarlar.

Çalışmamızda, tüm gruplara ait over dokularında TOS, MDA, NO, TAS ve TNF alfa değerlerine bakıldı. Bulgularımız Halliwell ve ark. (164). Oksidan/antioksidan değerlendirmeleri ile uyumluydu. Tüm grupların 3. saat over

dokularında radyasyona bağı oksidatif hasar göstergesi olan TOS, MDA ve NO düzeylerinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktu. Oysa kontrol grubu ile karşılaştırıldığında radyasyon ve HSG gruplarının 1.ayda alınan over dokularında TOS, MDA ve NO düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı yüksekti. Amifostin tedavi grubunda ise TOS, MDA ve NO düzeyleri kontrol grubuyla benzer olacak şekilde azalmıştı. Bu durum radyasyon ve HSG işlemi ile overin maruz kaldığı radyasyonun oksidatif hasar oluşturduğunu ve amifostin tedavisinin over dokusu üzerinde radyoprotektif ve sitoprotektif etki gösterdiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda, radyasyon ve HSG gruplarının 1. ay over doku TAS düzeyleri hem kontrol hem de amifostin tedavi grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düşük izlendi. Bu gruplarda artan oksidatif hasar parametreleri de göz önünde bulundurulduğunda radyasyonun oksidan/antioksidan dengeyi oksidatif stres yönünde değiştirdiğini ve antioksidan kapasiteyi düşürdüğünü göstermektedir. Radyasyon ve HSG gruplarına göre amifostinin tedavi ajanı olarak kullanıldığı grupta artan TAS düzeyleri amifostinin antioksidan etkinliği artırıcı, oksidatif hasarın oluşturduğu toksik etkiyi azaltıcı etkinliğini açıklamaktadır

Çalışmamızda, radyasyon ve HSG gruplarında oksidatif hasar göstergesi olarak kullandığımız MDA, TOS, NO ve antioksidan total kapasiteyi gösteren TAS düzeylerinin kontrol ve amifostin tedavi gruplarına göre özellikle akut durum olarak adlandırdığımız 3. saat yerine kronik durum olarak adlandırdığımız 1. ayda belirgin olarak değişmesi organizmanın oksidatif hasara karşı erken dönemde vücudun mevcut antioksidan savunma mekanizmalarını kullandığını geç dönemde azalan endojen savunma sistemlerinin oksidatif hasara baskın gelemediğini göstermekte ve endojen savunma sisteminin ancak amifostin gibi antioksidan tedavi ajanlarının verilmesi ile sürdürülebileceğini göstermektedir.

Chok ve ark. yaptığı deneysel bir rat modelinde, böbrek dokusunda iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulmuştur, amifostinin MDA ve apoptozis üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Bizim çalışmamızda da olduğu gibi MDA düzeylerini anlamlı şekilde düşürdüğü ve apoptozisi % 75 oranında engellediği bildirilmiştir (167).

Reither (168) yaptığı deneysel çalışmada iyonize radyasyonun oluşturduğu hasarın göstergesi olan MDA seviyelerinin yükseldiğini ve oluşan DNA hasarının onarılabilmesi için serbest radikal önleyici ve antioksidan özellikleri olan

melatoninin tedavi olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Bizim çalışmamız da serbest radikal önleyici ve antioksidan özellikleri olan amifostin iyonize radyasyonun oluşturduğu hasarın önlenmesinde etkili bulundu.

Çalışmamızda, TNF- α , 3. saatte alınan over dokularında tüm gruplarda 1. ay TNF- α düzeylerine göre yüksek bulunurken, 3. Saatte; radyasyon ve HSG gruplarında kontrol ve amifostin gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksekti. 1. Ay TNF- α düzeyleri ise genel olarak 3. Saate göre düşük iken HSG grubunda TNF- α düzeyi diğer gruplara göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu. Çalışmamızda tespit ettiğimiz bulguların, TNF- α 'nın hem proinflatuar hem anti-inflatuar cevabın oluşmasında en etkili sitokin olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Zira TNF- α Monosit, makrofaj ve T hücrelerinden salınan proinflatuar sitokinler içinde en erken salgılanan ve konakçı hücre cevabındaki en güçlü mediatördür. Radyasyona bağlı hücrede oluşan travma sonrası dolaşımda 60.dakikada belirlenmeye başlar, 4-6 saatte pik yapar, 15-18 dk da diğer sitokinleri aktive eder ve 10 gün dolaşımda kalmaktadır. TNF- α IL-1 ile birlikte santral role sahiptir. Travmada erken dönemde proinflatuar sitokinler olan IL-6, IL-8, IFN-gama'ın salınımını indüklerken hücresel hasarın oluşmaya başladığı durumlarda IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β gibi anti-inflatuar sitokinlerin salınımını indüklemeye başlar ve kendi inhibisyonunu tetikler (169-171).

Bu durumda, 3. saatte yüksek tespit edilen TNF- α düzeylerinin, tüm gruplarda olmak üzere radyasyon ve HSG grubunda daha yüksek olması, TNF- α 'nın erken dönemde hızlı bir şekilde salınmış olması ve beraberinde diğer proinflatuar sitokinlerinde salınmasını indükleyerek gerek radyasyon gerekse HSG prosedürünün oluşturduğu travmaya akut cevap olarak salınmasına bağlıdır. 1. ayda TNF- α düzeylerinin 3. saate göre daha düşük olması ve HSG grubunda amifostine göre anlamlı düzeyde yüksek olmasını iki nedenden kaynaklandığını düşünmekteyiz; ilk olarak 1 aylık süre içerisinde yarı ömrünün kısa olmasından dolayı TNF- α , anti-inflatuar sistemi devreye sokarak kendi miktarını azaltmıştır. Bu durum tüm gruplar için geçerlidir. İkinci olarak amifostinin tükenen endojen anti-inflatuar ve antioksidan mekanizmaya destek olarak HSG grubuna göre anlamlı şekilde TNF- α düzeylerini düşük tutup sitoprotektif görevini yerine getirmektedir.

Ortiz ve ark. (172) yaptığı deneysel rat modelinde bleomisinind indüklediği akciğer hasarına amifostinin etkinliği araştırılmış, bleomisinden dolayı 14. Günde yapılan incelemede amifostinin TNF- α düzeylerini anlamlı şekilde azalttığını bulmuşlardır.

Önalan ve ark. (173) ratlarda yaptığı deneysel endometriozis modelinde amifostinin serum ve endometrial TNF düzeylerini anlamlı şekilde düşük bulduklarını bildirmişlerdir

Amifostinin over dokusuna etkisini gösteren literatürdeki çalışma sayısı çok azdır. Yoon YD ve ark. (174). tarafından yapılan deneysel rat modelinde radyoterapi sırasında overde granüloza hücrelerinde programlanmış hücre ölümüne amifostinin inhibitör etkisi gösterilmiştir Amifostinin aktif metabolitine dönüşmesi için alkale fosfataza ihtiyacı vardır, overde de alkale fosfataz varlığı bilinmektedir (175).Normal dokuların kanlanması daha iyi, alkale fosfataz aktivitesi daha fazla olduğu için amifostinin hücre içerisinde aktif formu olan WR-1065, normal hücreleri daha fazla tercih eder (176). Over dokusunun da kanlanması fazladır, biz de çalışmamızda HSG işlemine bağlı pelvik bölgeye uygulanan radyonun over dokusunda oluşturduğu hücre hasarını ve amifostinin etkinliğini araştırdık.

Yapılan çalışmalarda lipid peroksidasyonu sonrası oluşan ürünlerin hücre zarı yapısına ve farklı hücre bileşenlerinde hasar oluştuğu; membran geçirgenliğini ve mikrovizkozitesini belirgin şekilde etkilediğini belirtmişlerdir (81, 177). Ayrıca oksidatif strete kalsiyum dengeleri ve mitokondrial membran potansiyeli değişmektedir. Bu değişiklik mitokondriumlarda ve DNA'da hasara yol aarak hücreyi programlı ölüme yani apoptozise sürükler (178).

Çalışmamızda Işık mikroskopisi altında yapılan histolojik değerlendirmede radyasyon, HSG ve Amifostin grubunda 3. saatte alınan over dokularında istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi. 1. ayda alınan overlerde ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında radyasyon ve HSG grubunda germinal epitel dejenerasyonu belirgindi. HSG grubu ile kıyaslandığında ise Amifostin grubunda germinal epitel dejenerasyonunda anlamlı bir azalma vardı ve kontrole benzerdi. Alınan dokularda apoptotik hcrelerin belirlenmesi aasından yapılan TUNEL boyama ile ışık mikroskopisi değerlendirmesinde ise radyasyon ve HSG gruplarındaki artmış apoptozisin oksidatif hasara bağlı olarak geliştiği ve amifostin grubunda azalmış

apoptozisin amfostinin antioksidan etkisine bağı olduğunu düşünmekteyiz. Zira over dokusunda radyasyona bağı gerçekleşen apoptozisi engellemede amifostinin etkinliğini gösteren çok az çalışmalardan biri olan Yoon YD ve ark. nın(174) yaptığı çalışma bulgularımızı desteklemektedir.

Çalışmamız ile uyumlu olarak, ratlarda yapılan bir çalışmalarda radyoterapiden önce amifostin uygulamasının böbrekte amifostinin fonksiyonel ve histopatolojik koruma sağladığını saptamışlardır (179, 180). Yine ratlarda yapılan deneysel bir modelde radyoterapi öncesi amifostin uygulanmış 10 hafta sonra histomorfolojik, immünohistokimyasal yöntemlerle özefagus hasarı değerlendirilmiş ve radyasyona bağı özefagus hasarının amifostin ile azaldığı bulunmuştur (181).

Çalışmamızda PCNA immünreaktivitesi, kontrol grubunda hem 3.saat doku örneklerinde hem de 1. ay doku örneklerinde HSG, radyasyon ve amifostin gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Radyasyon ve ilaç gibi hücrenin strese maruz kaldığı durumlarda DNA hasarı olursa, hücre bu uyarıya p53 düzeyini artırarak yanıt verir. p21'in aktivasyonu sağlanarak G₁ kontrol noktasında Rb proteinin daha fazla fosforlanması önlenerek hücre siklusu durdurulur. p21 siklin-cdk kompleksini inhibe etmesi yanında "proliferating cell nuclear antijen (PCNA)" i de inhibe eder (182). Bu durumda radyasyon ve HSG gruplarında PCNA immünreaktivitesinin düşük olması kontrol grubuna göre radyasyonun oluşturduğu hücre hasara yanıt olarak hücre proliferasyonun durduğu ve amifostinin de sitoprotektif (183) etkisinden dolayı hücre proliferasyonunu azalttığı kanısındayız. Kang Yu ve ark. (184). yaptığı çalışmalarda amifostinin farklı hücre dizilerinin proliferasyonunun uyarılmasından ve apoptozisten normal hücrelerin korunmasında önemli rol oynadığı bildirilmiştir

Çalışmamızdaki ratların hem 3. Saatte hem 1. Ayda alınan örneklerinde tüm gruplarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında AMH düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık izlenmedi. Van Beek ve ark. (185) yaptığı bir çalışmada 22 yıl boyunca Hodgkin lenfoma tanısı ile kemoterapi ve radyoterapi alan 32 hastanın AMH'nın da içerisinde olduğu over rezervi araştırılmış ve anlamlı şekilde AMH seviyeleri düşük bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise AMH seviyelerinde değişiklik olmaması hem alınan radyasyonun miktarı ve süresinin radyoterapi dozuna göre daha az olmasından kaynaklandığı düşünülebilir.

Günümüzde klinik olarak kullanımı mümkün olan tek radyoprotektif ajan olan amifostinin, HSG prosedürü esnasında maruz kalınan radyasyon dozunun over dokusunda meydana getirdiği hücre hasarını büyük ölçüde önlemiş olduğunu yapmış olduğumuz biyokimyasal ve histopatolojik incelemelerimizle ortaya koymuş bulunmaktayız. Bulgularımızın amifostin ile yapılmış benzer çalışmalarla (186, 187) uyum gösterdiği ve amifostinin beklenen koruyucu etkiyi oluşturduğunu göstermiş bulunmaktayız.

5. KAYNAKLAR

1. Diamond MP, Freeman ML. Clinical implications of postsurgical adhesions. Hum Reprod Update. 2001; 7: 567-576.
2. Baakdah H, Tulandi T. Adhesion in gynecology complication, cost, and prevention: a review. Surg Technol Int 2005; 14: 185-190.
3. Prasad KN. Rationale for using multiple antioxidants in protecting humans against low doses of ionizing radiation. Br J Radiol 2005; 78: 485-492.
4. Nakamura K, Ishiguchi T, Maekoshi H. Selective fallopian tube catheterization in female infertility: clinical results and radiation dose. Eur Radiol 1996; 6: 465-469.
5. Hospers GA, Eisenhauer EA, de Vries EG. The sulfhydryl containing compounds WR-2721 and glutathione as radio- and chemoprotective agents. Br J Cancer 1999; 80: 629-638.
6. Culy CR, Spencer CM. Amifostine: an update on its clinical status as a cytoprotectant in patients with cancer receiving chemotherapy or radiotherapy and its potential therapeutic application in myelodysplastic syndrome. Drugs 2001; 61: 641-684.
7. Sadler TW, Langman's Medikal Embriyolojisi (Çev. Başaklar A.C, Sönmez K) 7. Basım, İstanbul: Palme Yayıncılık, 2007; 1-20.
8. Karabulut O, Delilbaşı L, Oogenezis, Oosit Toplama Prosedürü, Oosit Morfolojisi in vitro Matürasyon. Delilbaşı L (Ed). IVF laboratuvar Yöntemleri 2007: 85-86
9. Eroschenko VP. Di Fiore Histoloji atlası; Fonksiyonel ilişkileriyle, 9. Baskıdan çeviri, (Çev. Ed. Demir R) 2001: 300-309.
10. Gosden RG, Oogenesis as a foundation for embryogenesis, Mol Cell Endocrinol 2002; 186: 149-153.
11. Telfer E. Natural history of the mammalian oocyte. Reproductive BioMedicine Online 2007; 15: 288-295.
12. Cooper GM, Hausman RE. The cell: a molecular approach. 3rd ed. Washington: Sinauer Associates 2003: 591-625.

13. Nowak SJ, Corces VG. Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet* 2004; 20: 214-20.
14. Muskhelishvili L, Latendresse JR, Kodell RL, Henderson EB. Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA. *J Histochem Cytochem* 2003; 51: 1681-1688.
15. Kimura M, Matsuda Y, Yoshioka T, Okano Y. Cell cycle dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/Ipl1-related protein kinase, AIK3. *J Biol Chem* 1999; 274: 7334-7340.
16. Katayama H, Brinkley WR, Sen S. The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2003; 22: 451-464.
17. Kierszenbaum A L (Ed): *Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Follikül gelişimi ve Menstrual Döngü (siklus) (Çev. R. Demir)*, Ankara: Palme Yayıncılık, 2006; 566-572.
18. http://scienceblogs.com/neurotopia/2010/02/basic_set_femalereproduction.php
19. Russel DL, Robker RL. Molecular mechanism of ovulation; coordination through the cumulus complex. *Human Reproduction Update*, 2007; 13: 289-312.
20. <http://www.endotext.org/female/female/femaleframe1.htm>
21. De La Fuente R, Eppig JJ. Transcriptional activity of Mouse oocyte genom: companion granulosa cell modulate transcription and chromatin remodeling. *Dev Biol* 2001; 229: 224-36
22. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Human Reprod* 1986; 1: 81 - 87
23. Wu YL, Chuang H, Kou YR. Regulation of LH Receptor and PGF2 α Receptor Signaling by the Regulator of G Protein Signaling 2 (RGS2) ,n Human and Mouse Granulosa Cells. *Chinese J Physiolog* 2008; 51: 282-91

24. Sela AS, Chorev E. Mitogen-activated protein kinase mediates luteinizing hormone-induced breakdown of communication and oocyte maturation in rat ovarian follicles. *Endocrinology* 2005; 146: 1236-44
25. Cottom J, Slavador LM and Maizels ET. Follicle-stimulating hormone activates extracellular signal-regulated kinase but not extracellular signal-regulated kinase kinase through a 100-kda phosphotyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 2003; 278: 7167-7179.
26. Cha KY, Chian RC. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Hum Reprod. Update* 1993; 4: 103-120
27. Sriraman V, Sharma SC, Richards JS. Transactivation of progesterone receptor gene in granulosa cells: evidence that Pp1/Sp3 binding sites in the proximal promoter play a key role in LH inducibility. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 436-449
28. Russel DL, Doyle KMh and Gonzales RI. Egr-1 induction in rat granulosa cells by FSH and luteinizing hormone: combinatorial regulation by transcription factors cyclic adenosine 3,5-monophosphate regulatory binding protein, serum response factor, spl, and early growth response factor-1. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 520-533
29. Ohnishi J, Ohnishi E, Shibuya H. Functions for proteinases in the ovulatory process. *Biochim Biophys Acta. Protein Proteomics* 2005; 10: 119-133.
30. Kılıçturgay K. Sitokinler. *İmmünoloji* 2000. 2. Baskı, Bursa: Güneş-Nobel 2000: 175-177.
31. Güner I, Bayındır OD. Sitokinler. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 1997; 17: 65-74.
32. Mazaud S, Guigon CJ, Lozach A, Coudouel N, Forest MG, Coffigny H. et al. Establishment of the reproductive function and transient fertility of female rats lacking primordial follicle stock after fetal gamma-irradiation. *Endocrinology* 2002; 143: 4775-4787.
33. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000; 21: 200-214.

34. Gaytan F, Morales C, Bellido C, Aguilar E, Sanchez-Criado JE. Ovarian Follicle Macrophages: Is Follicular Atresia in the Immature Rat a Macrophage-Mediated Event? *Biol Reprod* 1998; 58: 52-59.
35. Allen E. The oestrous cycle in the Mouse. *Amer J Anat* 1922; 30: 297-371.
36. Nelson JF, Felicio LS, Randall PK, Sims C, Finch CH. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J Mice: I. Cycle frequency, Length and vaginal cytology. *Biol Reprod* 1982; 27: 327-339.
37. Safranski TJ, Lamberson WR, Keisler DH. Correlations among three measures of puberty in mice and relationships with estradiol concentration and ovulation. *Biol Reprod* 1993; 48: 669-673.
38. Snell GD. Reproduction. Snell GD (Ed). *Biology of Mouse*. Second edition. USA. Dover Publications 1956: 55-89.
39. Petroianu A, Vasconcellos LS, Alberti LR, Nunes MB. The influence of venous drainage on autologous ovarian transplantation. *J Surg Res* 2005; 124: 175-179.
40. Champlin AK, Dorr DL. Determining the stage of the estrous cycle in the Mouse by the appearance of the vagina. *Biol Reprod* 1973; 8: 491-494.
41. Rao RP, Kaliwal BB. Monocrotophos induced dysfunction on estrous cycle and follicular development in mice. *Ind Health* 2002; 40: 237-244.
42. Campbell CS, Ryan KD, Schwartz NB. Estrous cycles in the Mouse: relative influence of continuous light and the precence of male. *Biol. Reprod* 1976; 14: 292-299.
43. Spornitz UM, Socin CD, Dravid AA. Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. *Anat Rec* 1999; 254: 116- 126.
44. Bayer AI, Wiskind AK. Adnexal Torsion: can the adnexa be saved? *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171: 1506-1510.
45. Çiçek N M, Akyürek C, Çelik Ç, Haberal A. Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi, 2. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, 2006: 1413-1435, 101-107, 1301-1332.

46. Buyalos RP, Daneshmand S, Brzechffa PR. Basal estradiol and follicle- stimulating hormone predict fecundity in women of advanced reproductive age undergoing ovulation induction therapy. *Fertil Steril* 1997; 68: 272-277.
47. Licciardi FL, Hung- Ching L, Rosenwaks Z. Day 3 estradiol serum concentrations as prognosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in-vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1992; 64: 991-994.
48. Smotrich DB, Widra EA, Gindoff PR, Levy MJ, Hall JL, Stillman RJ. Prognostic value of day 3 estradiol on in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*. 1995; 64: 1136-40.
49. Soules MR, Battaglia DE, Klein NA. Inhibin and reproductive aging in women. *Maturitas* 1998; 30: 193-204.
50. Danforth DR, Arbogast LK, Mroueh J. Dimeric inhibin: a direct marker of ovarian aging. *Fertil Steril* 1998; 70: 119-123.
51. Kahraman S, Yakın K. Ovulasyon indüksiyonu. İstanbul Memorial Hastanesi Yardımcı Üreme Teknikleri ve Reprodüktif Endokrinoloji Merkezi, 2000; 13: 12-16.
52. Hansen KR, Morris JL, Thyer AC, Soules MR. Reproductive aging and variability in the ovarian antral follicle count: application in the clinical setting. *Fertil Steril* 2003; 80: 577–583.
53. Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, et al. Isolation of the bovine and human genes for müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* 1986; 45: 685–698.
54. Rey R, Lukas-Croisier C, Lasala C, Bedecarras P. AMH (MIS); what we know already about the gene, the protein and its regulation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2003; 15: 21–31.
55. Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL. Müllerian inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* 1994; 79: 415–425.
56. Rajpert-De Meyts, E, Jorgensen N, Graem N, Müller J, Cate RL, Skakkebaek NE. Expression of anti-müllerian hormone during normal and pathological gonadal

development: association with differentiation of sertoli and granulosa cells. *J Clin Endoc Metabol* 1999; 84: 3836–3844.

57. Salmon NA, Handyside AH, Joyce IM. Oocyte regulation of anti-müllerian hormone expression in granulosa cells during ovarian follicle development in mice. *Developmental Biology* 2004; 266: 201–208.
58. Josso N, di Clemente N, Gouedard L. Anti-müllerian hormone and its receptors. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 179: 25–32.
59. Ingraham HA, Hirokawa Y, Roberts LM, Mellon SH, McGee E, Nachtigal MW, et al. Autocrine and paracrine müllerian inhibiting substance hormone signaling in reproduction. *Recent Prog Horm Res* 2000; 55: 53–67.
60. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, et al. Anti-müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 2002; 143: 1076–1084.
61. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, et al. Anti-müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 2001; 142: 4891–4899.
62. Clemente N, Goxe B, Rémy JJ, Cate RL, Josso N, Vigier B, et al. Inhibitory effect of AMH upon aromatase activity and LH receptors of granulosa cells of rat and porcine immature ovaries. *Endocrine* 1994; 2: 553–558.
63. Tsafiriri A, Picard JY, Josso N. Immunopurified anti-müllerian hormone does not inhibit spontaneous resumption of meiosis in vitro of rat oocytes. *Biol Reprod* 1988; 38: 481–485.
64. Seifer DB, MacLaughlin DT, Penzias AS, Behrman HR, Asmundson L, Donahoe PK, et al. Gonadotropin-releasing hormone agonist-induced differences in granulosa cell cycle kinetics are associated with alterations in follicular fluid müllerian-inhibiting substance and androgen content. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 711–714.
65. Lee MM, Donahoe PK, Hasegawa T, Silverman B, Crist GB, Best S, et al. Müllerian inhibiting substance in humans: Normal levels from infancy to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 571–576.

66. Cook CL, Siow Y, Taylor S, Fallat ME. Serum müllerian inhibiting substance levels during normal menstrual cycles. *FertilSteril* 2000; 73: 859–861.
67. La Marca A, De Leo V, Giulini S, Orvieto R, Malmusi S, Giannella L, et al. Anti-müllerian hormone in premenopausal women and after spontaneous or surgically induced menopause. *J Soc Gynecol Investig* 2005; 12: 545–548.
68. De Vet A, Loven JS, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC. Anti-müllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril* 2002; 77: 357–362.
69. Van Rooij IA, Tonkelaar I, Broekmans FJ, Looman CW, Schefferde GJ, Jong FH. Anti-müllerian hormone is a promising predictor for the occurrence of the menopausal transition. *Menopause* 2004; 11: 601–606.
70. Richardson SJ, Nelson JF. Follicular depletion during the menopausal transition. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 592: 13–20.
71. La Marca A, Giulini S, Orvieto R, De Leo V, Volpe A. Anti-müllerian hormone concentrations in maternal serum during pregnancy. *Hum Reprod* 2005; 20: 1569–1572.
72. Lane AH, Lee MM, Fuller AF, Jr Kehas DJ, Donahoe PK, MacLaughlin DT. Diagnostic utility of Müllerian inhibiting substance determination in patients with primary and recurrent granulosa cell tumors. *Gynecologic Oncology* 1999; 73: 51–55.
73. Long WQ, Ranchin V, Pautier P, Belville C, Denizot P, Cailla H, et al. Detection of minimal levels of serum anti-müllerian hormone during follow-up of patients with ovarian granulosa cell tumor by means of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 540–544.
74. Ötünçtemur A. Cisplatin ve siklofosfomide bağlı testis hasarında curcuminin önleyici etkisi: nükleer faktör kapa B (NFκB) ve p38 mitogene aktivatif protein kinase (MAPK) inhibisyonu. *Uzmanlık Tezi. İstanbul: Vakıf Gureba Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Anabilim Dalı, 2006.*
75. Kayaalp O.S. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji.11 baskı. Ankara: Hacettepe Taş, 2005: 616-618.

76. Baş M. Sıçanlarda ekstrakorporal şok dalga litotripsinin oluşturduğu böbrek hücre hasarına curcuminin koruyucu etkisi. Uzmanlık Tezi: İstanbul: Dr. Sadi Konuk Eğitim Araştırma Hastansı, Üroloji Anabilim Dalı, 2007.
77. Kaldır M. Ratlarda karaciğer ve böbrek dokusu üzerine aminofostinin radyoprotektif etkisinin sintigrafik, biyokimyasal ve histopatolojik olarak gösterilmesi Uzmanlık Tezi. Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fak, Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı 2006.
78. Jagetia GC, Aggarwal BB. Spicing up of the immune system by curcumin. J Clin Immunol 2007; 27: 19-35.
79. Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stres and free radical damage. Alcohol Research & Health 2003; 27: 277-284.
80. Droge W. Free radicals in physiological control of cell function. Physiol Rev 2002; 82: 47-95.
81. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol 2007; 39: 44-84.
82. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem 1995; 41: 1819-1828.
83. Hitchon CA, El-Gabalawy HS. Oxidation in rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther 2004; 6: 265-278.
84. Mimic-Oka J, Simic DV, Simic TP. Free radicals in cardiovascular diseases. Medicine and Biology 1999; 6: 11-122.
85. Girotti A.W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. J Lipid Res 1998; 39: 1529-1542.
86. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev 2002; 82: 47-95.
87. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. YYU Vet Fak Derg. 2004; 15; 91-96.

88. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem* 2004; 37: 112-119.
89. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160: 1-40.
90. Steel GG (editor). *Basic clinical radiobiology*. 3rd ed. Oxford University Press Inc. 198 Madison Avenue, New York: Edward Arnold Ltd, 2002: 2-4.
91. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: Mimoza Yayınları 1993: 38.
92. Neal R, Matthews RH, Lutz P, Ercal N. Antioxidant role of N-acetyl cysteine isomers following high dose irradiation. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 689-695.
93. Weiss JF. Pharmacologic approaches to protection against radiation-induced lethality and other damage. *Environ Health Perspect* 1997; 105: 1473-1478.
94. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 2003; 17: 1195-214.
95. Görpe A, Cantez S. *Pratik Nükleer Tıp*. İstanbul: İstanbul Tıp Fakültesi Vakfı, Nobel Tıp Kitabevi; 1992: 14-17.
96. McClellan RO. In the control of exposure of the public to Ionizing radiation in the event of accident or attack. *Bioeffect of low-level rad* 1983; 288-301.
97. Barker S, Weinfeld M, Zheng J, Li L, Murray D. Identification of mammalian proteins cross-linked to DNA by ionizing radiation. *J Biol Chem* 2005; 280: 33826-3338.
98. Hofer M, Mazur L, Pospíšil M, Weiterová L, Znojil V. Radioprotective action of extracellular adenosine on bone marrow cells in mice exposed to gamma rays as assayed by the micronucleus test. *Radiat Res* 2000; 154: 217- 221.
99. Lloyd DC, Edwards AA, Prosser JS, Corp MJ. The dose response relationship obtained at constant irradiation times for the induction of chromosome aberrations

- in human lymphocytes by cobalt-60 gamma rays. *Radiat Environ Biophys* 1984; 23: 179-189.
100. Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 1999; 424: 83-95.
 101. Philipp EE, Carrathes GB, The fallopian tube infertility. London 1981.
 102. Yussmann MA. Test of tubal patency. University of Louisville School of Medicine, Louisville, Kentucky (Vol 5, Chap 52), 1894.
 103. Siegler AM. Hysterosalpingography. 2nd ed. Medcon Pres Newyork, 1974.
 104. Saterman BG, Nunley WC, Kitchin JD. Intravation during hysterosalpingo graphy using oil-base contrast media. *Fertil Steril* 1980; 34: 439.
 105. Gillespie HW. The therapeutic aspect of hysterosalpingography. *Br J Radiol.* 1965; 38: 301.
 106. Alper MM, Garner PR Spence CEH, Quarinton AM. Pregnancy rates hysterosalpingography with oil and water soluble contrast media. *Obstet Gynecol* 1986; 68: 6-9.
 107. Schebe MG, Shopie SS, Haning RV. Histerosalpingography with oil contrast medium enchances fertility in patients with infertility of unknown etiology. *Fertil Steril.* 1983; 40: 604-606.
 108. Rasmusen F, Lindeguist S, Larsen C, Justenen P. Therapeutic effect of hysterosalpingography oil versus water soluble contrast media A randomize prospective study. *Radiology* 1991; 179: 75-77.
 109. Soules MR, Mack LA. Imaging of the reproductive tract in infertile women hysterosalpingography, ultrasonography and magnetic resonance imaging. *Infertility Evaluation and Treatment* 1995; 300-329.
 110. Rosenfeld DL. Hysterosalpingography current therapy of infertility 1984-1985; 1-3.
 111. Shirley LH. Ovarian radiation dosage during histerosalpingogram. *Fertil Steril* 1971; 22: 83-85.

112. Özalpan A. Temel Radyobioloji. 1. Basım. İstanbul: Haliç Üniversitesi Yayınları, 2001: 1-308.
113. Kelle I. Radyoprotektif etkili ajanlar. Dicle Tıp Derg 2008; 35: 69-76.
114. Prasad KN. Rationale for using high-dose multiple dietary antioxidants as an adjunct to radiation therapy and chemotherapy. J Nutr 2004; 134: 3182-3183.
115. Jagetia GC. Radioprotection and radiosensitization by curcumin. Adv Exp Med Biol 2007; 595: 301-20.
116. Shirazi A, Ghobadi G, Ghazi-Khansari MA. Radiobiological review on melatonin: a novel radioprotector. J Radiat Res 2007; 48: 263-272.
117. Gupta SK, Trivedi D, Srivastava S, Joshi S, Halder N, Verma SD. Lycopene attenuates oxidative stress induced experimental cataract development: an in vitro and in vivo study. Nutrition 2003; 19: 794-799.
118. Patt HM, Tyree EB, Straube RL, Smith DE. Cysteine protection against x-irradiation. Science 1949; 110: 213-214.
119. Varanda EA, Tavares DC. Radioprotection mechanisms and radioprotective agents including honeybee venom. J. Venom. Anim. Toxins 1998; 4: 5-21.
120. Rouhiainen P, Rouhiainen H, Salonen JT. Association between low plasma vitamin E concentration and progression of early cortical lens opacities. Am J Epidemiol. 1996; 144: 496-500.
121. Karadayı B, Akmansu M, Dirier A, Akdemir Ö. Amifostinin sitoprotektif etkinliğinin kantitatif tükürük bezi sintigrafisi ile değerlendirilmesi. Dicle Tıp Dergisi 2005; 32: 183-189.
122. Capizzi RL. Clinical status and optimal use of amifostine. Oncology (Williston Park) 1999; 13: 47-59.
123. Nieder C, Andratschke nh, Wiedenmann N, Molls M. Prevention of radiation-induced central nervous system toxicity: a role for amifostine? Semin Oncol 2004; 6: 62-66.

124. Caroline M. Spencer and Karen L. Goa. A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Potential as a Radioprotector and Cytotoxic Chemoprotector. *Drugs* 1995; 50: 1001-1031.
125. Calabro-Jones PM, Aguilera JA, Ward JF. Uptake of WR-2721 derivatives by cells in culture: Identification of the transported form of drug. *Cancer Res* 1988; 48: 3634-3640.
126. Smoluk GD, Fahey RC, Calabro-Jones PM. Radioprotection of cells in culture by WR-2721 and derivatives: Form of the drug responsible for protection. *Cancer Res* 1988; 48: 3641-3647.
127. Utley JF, Seaver N, Newton GL. Pharmacokinetics of WR-1065 in Mouse tissue following treatment with WR-2721. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1984; 10: 1525-1528.
128. Van der Vijgh WJ, Korst AE. Amifostine (Ethyol): pharmacokinetic and pharmacodynamic effects in vivo. *Semin Oncol* 1996; 4: 18-22.
129. Kang Y, Kai-Yan Y, Xing-Zhou R, Yi C; Amifostine Protects Bone Marrow from Benzene-Induced Hematotoxicity in Mice; *Int J Toxicol* 2007; 26: 315–323.
130. Cassatt DR, Fazenbacker CA, Kifle G, Bachy CM. Effects of dose and Schedule on the efficacy of ethylol: preclinical studies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005; 61: 901-907.
131. Breitenacker G, Friedrich F, Kemeter P. Further investigations on the maturation and degeneration of human ovarian follicles and their oocytes ; *Fertil Steril* 1978; 29: 336-341.
132. Bramley TA, Kent J. Mouse Ovarian Alkaline Phosphatase Activities That Respond To Gonadotropins: Histochemical And Biochemical Studies. *J Histochem Cytochem* 1976; 24: 1101-1109.
133. Kent J, Ryle M. Histochemical studies on three gonadotrophin-responsive enzymes in the infantile mouse ovary. *J Reprod Fertil* 1975; 42: 519-536.

134. Akihara Y, Shimoyama Y, Kawasako K, Komine M, Hirayama K, Terasawa A et al. Histological and Immunohistochemical Evaluation of Canine Ovary; *Reprod Dom Anim* 2007; 42: 495–501.
135. Peters GJ, Van der Vijgh WJ. Protection of normal tissues from the cytotoxic effects of chemotherapy and radiation by amifostine (WR-2721): preclinical aspects. *Eur J Cancer* 1995; 31: 1-7.
136. Shaw LM, Bonner H, Lieberman R. Pharmacokinetic profile of amifostine. *Haematologica* 1999; 84: 1035-1042.
137. Yuhas JM. Active versus passive absorption kinetics as the basis for selective protection of normal tissues by S-2-(3 aminopropylamino)-ethylphosphorothioic acid. *Cancer Res* 1980; 40: 1519-1524.
138. Kouvaris JR, Kouloulis VE, Vlahos LJ. Amifostine: The first selective-target and broad-spectrum radioprotector. *Oncologist* 2007; 12: 738-747.
139. Foster-Nora JA, Siden R. Amifostine for protection from antineoplastic drug toxicity. *Am J Health-Syst Pharm* 1997; 54: 787-800.
140. Buresh CM, Baker KS. Fever and rash after amifostine therapy. *J Pediatr Hematol Oncol* 1998; 20: 361-363.
141. Santini V, Giles F. The potential of amifostine: from cytoprotectant to therapeutic agent. *Haematologica* 1999; 84: 1035-1042.
142. Karslioglu I, Ertekin MV, Taysi S, Kocer I, Sezen O, Gepdiremen A, et al. Radioprotective effects of melatonin on radiation-induced cataract. *J Radiat Res* 2005; 46: 277-282.
143. Kocer I, Taysi S, Ertekin MV, Karslioglu I, Gepdiremen A, Sezen O, et al. The effect of L-carnitine in the prevention of ionizing radiation-induced cataracts: a rat model. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007; 245: 588-94.
144. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005; 38: 1103-1111.

145. Liu X, Zhao J, Zheng R. DNA damage of tumor-associated lymphocytes and total antioxidant capacity in cancerous patients. *Mutat Res* 2003; 539: 1–8.
146. Mallenby J, Dunyer J, Hawkins C, Hitchen C. Effects of experimental limbic on the estrus cycle and reproductive success in rats, *Epilepsia*. 1991; 34: 220-227.
147. Maubon AJ, De Graef M, Boncoeur-Martel MP, Rouanet JP. Interventional radiology in female infertility: technique and role. *Eur Radiol* 2001; 11: 771-778.
148. Perisinakis K, Damilakis J, Grammatikakis J, Theocharopoulos N, Gourtsoyiannis N. Radiogenic risks from hysterosalpingography. *Eur Radiol* 2003; 13: 1522-1528.
149. Collins JI, Woodward PJ. Radiological evaluation of infertility. *Semin Ultrasound CT* 1995; 16: 304–316.
150. Ubeda B, Paraira M, Alert E, Abuin RA. Hysterosalpingography: spectrum of normal variants and non- pathologic findings. *Am J Roentgenol* 2001; 177: 131–135.
151. Ott DJ, Fayeze JA. Hysterosalpingography. Urban and Schwarzenberg, Baltimore 1991.
152. Confino E, Friberg J, Giglia RV, Gleicher N. Sonographic imaging of intrauterine adhesions. *Obstet Gynecol*. 1985; 66: 596-598.
153. Karande VC, Levrant SG, Pratt DE, Morris RS, Balin MS, Gleicher N. What is the radiation exposure to patients during a gynaecoradiologic procedure? *Fertil Steril* 1997; 67: 401–403.
154. Karbownik M, Reiter RJ. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. *Exp Biol Med* 2000; 225: 9-22.
155. Hosseinimehr SJ. Trends in the development of radioprotective agents. *Drug Discov Today* 2007; 12: 794-805.
156. Kopjar N, Miocic S, Ramic S, Millic M, Viculin T. Assessment of the radioprotective effects of amifostine and melatonin on human lymphocytes irradiated with gamma-rays in vitro. *Arh Hig Rada Toksikol* 2006; 57: 155-163.

157. Patchen ML, MavVittie TJ, weiss JF. Combined modality radioprotection: the use of glucan and selenium with WR-2721. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990; 18: 169-75
158. Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med* 1991; 91: 2-13.
159. Dikici I, Mehmetoglu I, Dikici N, Bitirgen M, Kurban S. Investigation of oxidative stress and some antioxidants in patients with acute and chronic viral hepatitis B and the effect of interferon-alpha treatment. *Clin Biochem* 2005; 38: 1141-4.
160. Cross CE, Halliwell B, Borish ET. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987; 107: 526-545.
161. Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med*. 1994; 97: 5-13.
162. Farinati F, Cardin R, Degan P. Oxidative DNA damage in circulating leukocytes occurs as an early event in chronic HCV infection. *Free Radic Biol Med*. 1999; 27: 1284-1291.
163. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007; 45: 507-539.
164. Halliwell B. Reactive oxygen species in living system: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 1991; 91: 14-21
165. Chrobot AM, Szaflarska-Szczepanik A, Drewa G. Antioxidant defense in children with chronic viral hepatitis B and C. *Med Sci Monit*. 2000; 6: 713-718.
166. Bolukbas C, Bolukbas FF, Horoz M, Aslan M, Celik H, Erel O. Increased oxidative stress associated with the severity of the liver disease in various forms of hepatitis B virus infection. *BMC Infect Dis* 2005; 5: 95.
167. Chok MK, Conti M, Almolki A, Ferlicot S, Loric S, Dürrbach A, Benoît G, Droupy S, Eschwège P. Renoprotective potency of amifostine in rat renal ischaemia-reperfusion. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25: 3845-3851.
168. Reither RJ. Oksidative damage to nuclear DNA: amelioration by melatonin. *NEL Review: Neuroendocrinol Lett* 1999; 20: 145-150.

169. Friedmann MC, Migone TS, Russell SM, Leonard WJ. Different interleukin 2 receptor beta-chain tyrosines couple to at least two signaling pathways and synergistically mediate interleukin 2-induced proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2077-2082.
170. Baumgartner SW. Tumor necrosis factor inactivation in the management of rheumatoid arthritis. *South Med J* 2000; 93: 753-759.
171. Kilpatrick L, Harris MC. Cytokines and the inflammatory response In: Polin RA, Fox WW (eds). *Fetal and Neonatal Physiology* (9th ed). Philadelphia: WB Saunders 1998: 1967-1979.
172. Ortiz LA, Lasky JA, Safah H, Reyes M, Miller A, Lungarella G, Friedman M. Exacerbation of bleomycin-induced lung injury in mice by amifostine. *Am J Physiol* 1999; 277: 1239-1244.
173. Onalan G, Gulumser C, Mulayim B, Dagdeviren A, Zeyneloglu H. Effects of amifostine on endometriosis, comparison with N-acetyl cysteine, and leuprolide as a new treatment alternative: a randomized controlled trial. *Arch Gynecol Obstet* 2014; 289: 193-200.
174. Yoon YD, Kim JH, Lee KH, Kim JK, Amifostine has an inhibitory effect on the radiation-induced p53-branched cascade in the immature mouse ovary, *In Vivo*. 2005; 19: 509-514.
175. Diebel LN, Dulchavsky SA, Wilson RF Effect of increased intra-abdominal pressure on mesenteric arterial and intestinal mucosal blood flow. *J Trauma* 1992; 33: 45-49.
176. D. Lorusso, G. Ferrandina, S. Greggi et al; Phase III multicenter randomized trial of amifostine as cytoprotectant in first-line chemotherapy in ovarian cancer patients; *Annals of Oncology* 2003; 14: 1086-1093.
177. Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, Jareño EJ, Romero B, Marín N, Romá J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ Health Perspect Review* 1998; 106: 1229-1234.
178. Burçak G, Andican G. Oksidatif DNA hasarı ve yaslanma. *Cerrahpasa Journal of Medicine* 2004; 35: 159-169.

179. Uğuzalp-Kaldır M, Yürüt-Çaloğlu V, Coşar-Alas R, Çermik TF, Altaner Ş, Eskiocak S et al. Radyasyona bağlı oluşan karaciğer ve böbrek toksitesini önlemede amifostinin rolü. *Türk Onkoloji Dergisi* 2007; 22: 105-117.
180. Kaldır M, Cosar-Alas R, Cermik TF, Yurut-Caloglu V, Saynak M, Altaner S et al. Amifostine use in radiation-induced kidney damage. Preclinical evaluation with scintigraphic and histopathologic parameters. *Strahlenther Onkol* 2008; 184: 370-375.
181. Vujaskovic Z, Thrasher BA, Jackson IL, Brizel MB, Brizel DM. Radioprotective effects of amifostine on acute and chronic esophageal injury in rodents. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 69: 534-544.
182. Harper J, Adami G, Wei N. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75: 805-816.
183. John R. Kouvaris Vassilis E. Kouloulis, Lampros J. Vlahos, Amifostine: The First Selective-Target and Broad-Spectrum Radioprotector, *Oncologist* 2007; 12; 738-747.
184. Kang Yu, Kai-Yan Yang, Xing-Zhou Ren, and Yi Chen; Amifostine Protects Bone Marrow from Benzene-Induced Hematotoxicity in Mice. *Int J Toxicol* 2007; 26: 315–323.
185. van Beek RD, van den Heuvel- Eibrink MM. Anti-Mullerian hormone is a sensitive serum marker for gonadal function in women treated for Hodgkin's lymphoma during childhood. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 3869-3874.
186. Dorr RT. Radioprotectants: pharmacology and clinical applications of amifostine. *Semin Radiat Oncol* 1998; 8: 10-13.
187. Waddell BE, Rodrigues-Bigas MA, Lee RJ, Weber TK, Petrelli NJ. Prevention of chronic radiation enteritis. *J Am Coll Surg* 1999; 189: 611-624.

6.ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Diyarbakır'ın Kulp ilçesine bağlı bir köyde doğdum. Öğrenim hayatıma Kulp ilçesinde başladım, ilkokul eğitimimi ailevi nedenlerden dolayı 3 farklı okulda tamamladım. Ortaokulu Anadolu lisesinde, liseyi Fen lisesinde Diyarbakır'da okudum. 2001 yılında liseden mezun oldum, aynı yıl Tıp eğitimime Çukurova Üniversitesinde başladım, 2007 yılında mezun oldum. Mecburi hizmetimi yapmak üzere Diyarbakır Silvan ve Lice ilçelerinde toplam 3.5 yıl Acil servislerde çalıştım. 2010 yılında evlendikten sonra eşim dolayısı ile Elazığ'a yerleştim. 7 ay Elazığ 112 istasyonlarında çalıştıktan sonra 2011 yılında Fırat Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğinde asistan doktor olarak görev yapmaya başladım. Halen bu klinikte görev yapmaktayım. Evli ve bir çocuk babasıyım.