

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**KEMOTERAPİ UYGULAMASININ SIÇAN OVARYUM FOLLİKÜLLERİ ÜZERİNE
ETKİSİ VE ÇEŞİTLİ ANTİOKSİDANLARIN KORUYUCU ROLLERİNİN YAPISAL
VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL DÜZEYDE BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Seren Gülşen GÜRGEN

Tez Danışmanı

Prof.Dr. Deniz ERDOĞAN

ANKARA
Şubat 2009

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**KEMOTERAPİ UYGULAMASININ SIÇAN OVARYUM FOLLİKÜLLERİ ÜZERİNE
ETKİSİ VE ÇEŞİTLİ ANTİOKSİDANLARIN KORUYUCU ROLLERİNİN YAPISAL
VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL DÜZEYDE BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Seren Gülşen GÜRGEN

Tez Danışmanı

Prof.Dr. Deniz ERDOĞAN

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi tarafından G.Ü.E.T-07.016 proje numarası ile desteklenmiştir

ANKARA
Şubat 2009

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince, bilgi ve deneyimlerini paylaşarak Histoloji ve Embriyoloji bilimini öğreten, sevdiren, tezimin hazırlanmasında büyük desteğini gördüğüm danışmanım Anabilim Dalı Başkanımız Hocam Sayın Prof. Dr. Deniz Erdoğan başta olmak üzere, her zaman desteğini ve yardımını gördüğüm çok değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Candan Özoğul'a, yetişmemde katkıları olan çok değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. M. Tahir Hatipoğlu'na, Sayın Prof. Dr. Celal Ilgaz'a, Sayın Prof. Dr. Suna Ömeroğlu'na, eğitimim ve tez çalışmam süresince yardımcı ve destek olan Doç. Dr. Gülnur Take ve Doç. Dr. Çiğdem Elmas'a;

Tezimin deney aşamasında yardımlarını aldığım Doç. Dr. Çiğdem Özer'e, istatistik değerlendirmelerimi üstlenen Araş.Gör. Aynur Çetinkaya'ya, birlikte çalıştığım Uzm. Dr. Neşe Lortlar Uçankuş'a, Anabilim Dalımız personeli Şemsi Öztürk, Recep Orhan ve Tekin Koçak'a, asistanlığım boyunca benden hiçbir yardımı ve desteği esirgemeyen doktora arkadaşlarım Arş. Gör. Fatma Helvacıoğlu'na ve Arş.Gör. Güleser Göktaş'a, birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma, bana verdikleri sevgi ve emeklerle bugünlere gelmemde büyük katkıları olan sevgili babam Rengin Giray ve annem Sevinç Giray'a, daima yanımda olan kardeşim Selim Giray'a, doktora eğitimim süresince bana her zaman destek olan eşimin ailesine, tüm bu yoğun çalışmalarım boyunca bana sabır gösteren, her zaman yanımda ve yardımcı olan sevgili eşim Gökhan Gürgen'e teşekkürlerimle...

Araş.Gör. Seren Gülşen Gürgen

Şubat-2009 Ankara

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Tablolar, Grafikler, Resimler	iv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1 Ovaryum'un Gelişimi	6
2.1.1 Oogenezis	7
2.1.1.1 Doğum Öncesi (Prenatal) Olgunlaşma	7
2.1.1.2 Doğum Sonrası (Postnatal) Olgunlaşma	8
2.2 Ovarium Anatomisi	10
2.2.1 Ovarium'un yapısı	11
2.3 Ovaryum Histolojisi	13
2.3.1 Ovaryum Korteksi	13
2.3.2 Ovaryum Follikülleri	14
2.3.2.1 Primordiyal Follikül	14
2.3.2.2 Primer Follikül	14
2.3.2.3 Sekonder Follikül	15
2.3.2.4 Graaf Follikülü	16
2.3.2.5 Atretik Follikül	17
2.3.3 Ovulasyon	17
2.3.4 Korpus Luteum	18
2.3.5 Ovaryum Medullası	19
2.4 Ovaryum Fizyolojisi	20
2.4.1 Hipofiz Ön Lobu Hormonları ve Ovaryum'lar Üzerine Etkileri	20

2.4.1.1 Ovulasyonda LH'un önemi ve yükselişi	21
2.4.2 Ovaryum Hormonları Östradiol ve Progesteron'nun Yapısı ve İşlevleri	23
2.4.2.1 Östrojen'lerin Yapısı	23
2.4.2.2 Östrojen'lerin İşlevleri	25
2.4.2.3 Progestin'lerin Yapısı	27
2.4.2.4 Progesteron'un İşlevleri	28
2.4.3 Hipotalamus'tan Salgılanan GnRH	29
2.5 Ovaryum'un Follikül Gelişiminde Etkili Moleküller	30
2.5.1 Folliküler Yaşam Mekanizmasını Yürüten Moleküller	30
2.5.1.1 Dönüştürücü Büyüme Faktörü β (TGF- β)	32
2.5.1.2 Büyüme Farklılaşma Faktörü 9 (GDF-9)	33
2.5.1.3 Proliferasyon Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA)	34
2.5.2 Folliküler Ölüm Mekanizmasını Yürüten Moleküller	35
2.5.2.1 Kaspaz Ailesi	37
2.5.2.2 Proteaz-Apoptosis Aktive Edici Faktör-1 (APAF-1)	38
2.6 Kemoterapi	39
2.6.1 Siklofosamid	41
2.7 Antioksidanlar	43
2.7.1 Serbest Radikaller ve Etkileri	43
2.7.2 Antioksidan Sistemler	44
2.7.3 GSH Metabolizması ve Antioksidan Rolü	47
2.7.4 Askorbik Asit (C vitamini)	49

2.7.5 Alfa Tokoferol (E vitamini)	52
2.7.6 Selenyum	54
3. GEREÇ ve YÖNTEM	56
3.1. Deney Hayvanları ve Gruplandırma	56
3.2. İmmünohistokimyasal Yöntem	57
3.3. İmmünofloresan Yöntem	60
3.4. TUNEL Yöntemi	61
3.5. Elektron Mikroskopik Yöntem	62
3.6. İstatistiksel Yöntem	64
4. BULGULAR	65
4.1 İmmünohistokimyasal Bulgular	65
4.2 Elektron Mikroskopik Bulgular	75
4.3. İstatistiksel Bulgular	76
5. TARTIŞMA	126
6. SONUÇ	162
7. ÖZET	165
8. SUMMARY	167
9. KAYNAKLAR	169
10. ÖZGEÇMİŞ	189

TABLÖLAR, GRAFİKLER, RESİMLER

Tablo 1. Gruplar arasındaki TGF- β_1 antikorı immünreaktivitesi skorları

Tablo 2. Gruplar arasındaki GDF-9 antikorı immünreaktivitesi skorları

Tablo 3. Gruplar arasındaki PCNA antikorı immünreaktivitesi skorları

Tablo 4. Gruplar arasındaki TUNEL pozitif hücre skorları

Tablo 5. Gruplar arasındaki kaspaz-3 antikorı immünreaktivitesi skorları

Tablo 6. Gruplar arasındaki APAF-1 antikorı immünreaktivitesi skorları

Tablo 7. Gruplar arasındaki follikül sayıları skorları

Tablo 8. Deney öncesi ve sonrası sıçan ağırlıklarının karşılaştırılması

Tablo 9. Gruplar arasında deney sonrası ovaryum ağırlıklarının karşılaştırılması

Tablo 10. Gruplar arasında GSH değerlerinin karşılaştırılması

Grafik 1: Gruplar arasındaki TGF- β_1 antikorı immünreaktivitesi karşılaştırması

Grafik 2. Gruplar arasındaki GDF-9 antikorı immünreaktivitesi karşılaştırması

Grafik 3. Gruplar arasındaki PCNA antikorı immünreaktivitesi karşılaştırması

Grafik 4. Gruplar arasındaki TUNEL pozitif hücre karşılaştırması

Grafik 5. Gruplar arasındaki kaspaz-3 antikorı immünreaktivitesi karşılaştırması

Grafik 6. Gruplar arasındaki APAF-1 antikorı immünreaktivitesi karşılaştırması

Grafik 7. Gruplar arasındaki follikül sayıları karşılaştırması

Grafik 8. Deney öncesi ve sonrası sıçan ağırlıklarının karşılaştırılması

Grafik 9. Gruplar arasında deney sonrası ovaryum ağırlıklarının karşılaştırılması

Grafik 10. Gruplar arasında GSH değerlerinin karşılaştırılması

Resim 1. Kontrol grubuna ait ovaryum'da TGF- β_1 antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X400)

Resim 2. Siklofosfamid uygulanan gruba ait ovaryum'da TGF- β_1 antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X400)

Resim 3. Siklofosfamid ve askorbik asit uygulanan gruba ait ovaryum'da TGF- β_1 antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X400)

Resim 4. Siklofosfamid ve α -tokoferol uygulanan gruba ait ovaryum'da TGF- β_1 antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X400)

Resim 5. Siklofosfamid ve selenyum uygulanan gruba ait ovaryum'da TGF- β_1 antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X400)

Resim 6. Kontrol grubuna ait ovaryum'da GDF-9 antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X400)

Resim 7. Siklofosfamid uygulanan gruba ait ovaryum'da GDF-9 antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X400)

Resim 8. Siklofosfamid ve askorbik asit uygulanan gruba ait ovaryum'da GDF-9 antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X400)

Resim 9. Siklofosfamid ve α -tokoferol uygulanan gruba ait ovaryum'da GDF-9 antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X400)

Resim 10. Siklofosfamid ve selenyum uygulanan gruba ait ovaryum'da GDF-9 antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X400)

Resim 11. Kontrol grubuna ait ovaryum'da PCNA antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X40, X400)

Resim 12. Siklofosfamid uygulanan gruba ait ovaryum'da PCNA antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X40, X400)

Resim 13. Siklofosfamid ve askorbik asit uygulanan gruba ait ovaryum'da PCNA antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X40, X400)

Resim 14. Siklofosfamid ve α -tokoferol uygulanan gruba ait ovaryum'da PCNA antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X40, X400)

Resim 15. Siklofosfamid ve selenyum uygulanan gruba ait ovaryum'da PCNA antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X40, X400)

Resim 16. Kontrol grubuna ait ovaryum'da TUNEL tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X40, X400)

Resim 17. Siklofosfamid uygulanan gruba ait ovaryum'da TUNEL tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X40,X400)

Resim 18. Siklofosfamid ve askorbik asit uygulanan gruba ait ovaryum'da TUNEL tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X,40 X400)

Resim 19. Siklofosfamid ve α - tokoferol uygulanan gruba ait ovaryum'da TUNEL tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X40, X400)

Resim 20. Siklofosfamid ve selenyum uygulanan gruba ait ovaryum'da TUNEL tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X40, X400)

Resim 21. Kontrol grubuna ait ovaryum'da Kaspaz-3 antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X400)

Resim 22. Siklofosfamid uygulanan gruba ait ovaryum'da Kaspaz-3 antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X400)

Resim 23. Siklofosfamid ve askorbik asit uygulanan gruba ait ovaryum'da Kaspaz-3 antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X400)

Resim 24. Siklofosfamid ve α - tokoferol uygulanan gruba ait ovaryum'da Kaspaz-3 antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X400)

Resim 25. Siklofosfamid ve selenyum uygulanan gruba ait ovaryum'da Kaspaz-3 antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X400)

Resim 26. Kontrol grubuna ait ovaryum'da APAF-1 antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X400)

Resim 27. Siklofosfamid uygulanan gruba ait ovaryum'da APAF-1 antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X400)

Resim 28. Siklofosfamid ve askorbik asit uygulanan gruba ait ovaryum'da APAF-1 antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X400)

Resim 29. Siklofosfamid ve α - tokoferol uygulanan gruba ait ovaryum'da APAF-1 antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X400)

Resim 30. Siklofosfamid ve selenyum uygulanan gruba ait ovaryum'da APAF-1 antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X400)

I. GİRİŞ

Günümüzde malign hastalıkların tedavisinde kullanılan kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi gibi yöntemleri izleyen süreçte kadınlarda en sık görülen olgu, ovaryum yetmezliğidir.¹ Ayrıca kullanılan yöntemle bağılı olarak tedavi ile ilgili zorluklar ve toksik etkiler de ortaya çıkmaktadır.¹

Gelişmekte olan folliküllerin sayısı ovaryumda bulunan primordiyal folliküllerin sayısı ile ilişkilidir. Kanser tedavi yöntemlerinden biri olan kemoterapi, ovaryum follikül havuzundaki primordiyal folliküllerin sayısını azaltıcı etki göstererek ovaryum yaşlanmasını hızlandırıcı bir etken olarak tanımlanmaktadır.^{2,3} Kemoterapi sonrası görülen kısırlık çok sayıda kanser hastasının etkin kaldığı bir durumdur.^{2,3,4} Doğurganlığı koruyabilmek için kemoterapi öncesi follikül toplanması, IVF ve embriyo dondurulması gibi çözümler getirilmiştir⁵.

Kanser tedavilerinde kemoterapotik olarak sıklıkla kullanılan ajanlardan biri olan Siklofosfamid, immün baskılayıcı sitostatik ilaçtır. Yapılan çalışmalarda, kanser tedavisini izleyen süreçte Siklofosfamid'in, gen mutasyonlarına, kromozomal kırılmalara ve somatik hücrelerde anöploidiye neden olduğu bilinmektedir.⁶ Siklofosfamid alkali ajan olarak DNA çapraz bağlarını etkiler ve hızla çoğalan hücrelerde normal hücre bölünmesini engeller. Uzun dönem kanser tedavisi kullanımlarında üreme organlarına toksik etki ederek döllenmenin bozulmasına neden olur.⁷ Ayrıca, ovaryum folliküllerinin granüloza hücrelerinde apoptoza etki ederek ve ovaryum glutatyon düzeylerini azaltarak follikülleri ortadan kaldırır.⁸ Ovaryumdaki folliküllerin kuvvetli derecede yıkıma uğraması ovaryum fonksiyonlarını hemen etkilemekte ve kalıcı ovaryum yetmezliğine neden olmaktadır.¹ Bu nedenle kemoterapi sonrasında normal görünen genç bayanlar ilerleyen yıllarda prematüre ovaryum yetmezliği riski taşımaktadırlar.

Kemoterapinin ovaryum işlevleri üzerindeki yan etkilerinin azaltılması için yeni yöntemler ve alternatif tedaviler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Özellikle tedavi sırasında önerilen ve bitkisel gıdalarda bulunan üç grup madde; antioksidanlar, bioflavonlar ve antikanserojenler kanser riskinin ve kanserden sonra gelişen travmanın azaltılmasında son derece etkili olan maddelerdir.

Bu antioksidanlardan askorbik asit (C vitamini), kanser oluşumunun başında, devamında ve sonrasında tümör oluşum hızını ve yayılmasını geciktirici etkiye sahiptir.⁹ Özellikle kemoterapötik ilaçların yan etkilerini azalttığı ve ilacın tümör öldürücü etkisini artırarak kanser tedavisine destek verdiği bilinmektedir.⁹ Ovaryum'lar ve diğer endokrin dokular yüksek miktarda askorbik asit biriktirirler. Ovaryum'larda askorbik asit'in luteal hücreler, granüloza ve teka hücrelerinde bulunduğu ve döllenme ile ilişkili olduğu bilinmektedir.¹⁰ Ayrıca askorbik asit, ineklerde infertilite tedavisinde kullanılmıştır. Askorbik asit eksikliği dişilerde ovaryum atrofisine ve folliküler atreziyi arttırdığı için infertiliteye neden olur.¹¹ Yapılan hücre kültürü çalışmalarında kültüre eklenen askorbik asit ve diğer antioksidanların, sıçan ovaryum folliküllerinde apoptozisi baskıladıkları gösterilmiştir.¹¹ Ayrıca Graaf folikülünün bazal membranının oluşmasında askorbik asit'e gereksinim vardır ve askorbik asit yokluğunda follikül membranında dejenerasyon oluşur.¹²

Diğer antioksidan α - tokoferol (E vitamini) kemoterapi ilaçlarının özellikle normal dokuyu hasarlayan etkisini azaltmaktadır.¹³ α -Tokoferol, serbest radikalleri tutarak doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu önleyen organik bir bileşendir. Özellikle hücre zarları ve lipoproteinlerde önemli işlevler görür. Yağda çözünen vitaminler içinde en az toksik olanıdır ve üreme sistemine olan olumlu etkisi nedeniyle antisterilite vitamini de denilmektedir.¹⁴ α -Tokoferol'ün dişi üreme sistemi üzerine olumlu etkisi vardır. α -Tokoferol'ün olmadığı bir beslenme diyeti uygulanan dişi farelerde, üreme bozukluğu gözlenmiştir.¹⁴ α -Tokoferol ovaryum'da toksinlerin uzaklaştırılmasında ve reaktif oksijen bileşiklerine karşı

koruma mekanizmalarında yardımcı olmaktadır.¹⁵ Ayrıca toksik ajanların etkisiyle granüloza hücrelerinde oluşabilecek apoptozisi baskılamaktadır.¹⁶

Antioksidanlardan selenyum'un bilinen özellikleri arasında, antioksidan aktivitesi, terapötik etkisi, antiinflamatuvar ve antiviral özellikleri bulunmaktadır.¹⁷ Ayrıca selenyum'un kanser oluşmasını engelleyici etkisi de vardır. Selenyum ve döllenme arasındaki ilişki araştırılmış ve üreme bozukluklarının sadece hormonal bozuklukla ilgili olmayabileceği, besinsel eksikliklerin de üreme bozukluğuna neden olabileceği gösterilmiştir.¹⁸ Selenyum eksikliği olan ineklerde ovaryal kistlerin ve plasental kayıpların oranı artış göstermiştir.¹⁹ Ayrıca koyunlarda selenyum'un infertiliteyi azalttığı bildirilmiştir.²⁰ Nedeni açıklanamayan infertil kadınların folliküler sıvısında belirgin selenyum azalması görülmüş ve bazı düşüklerin selenyum eksikliğine bağlı olduğu gösterilmiştir.²¹ Yapılan çalışmalarda selenyum'un erken evredeki folliküllerin granüloza hücrelerinin çoğalmasını arttırdığı ve aynı hücrelerde gonadotropinlerin uyarıcı etkisini tetiklediği gösterilmiştir. Ayrıca selenyum, folliküllerden E₂ salınımını arttırmaktadır.²²

Ovaryumların temel işlevi sağlıklı nesillerin sürdürülmesi için olgun oositlerin üretilmesidir. Ayrıca ovaryumlar dişilerde cinsel olgunluk ve üreme yeteneği için gerekli olan endokrin işlevlere sahiptir.²³ Ovaryumlar oosit olgunlaşması ve follikül gelişimi gibi önemli işlevlerin yürütülmesi için çeşitli sinyal moleküllerine sahiptir.²³ Follikül gelişimi boyunca bu sinyal moleküllerinin geçici ve sınırlı düzenlenişi, follikül tipine göre değişmektedir. Sinyal moleküllerindeki herhangi bir hata ya da eksiklik oosit kalitesini, ovulasyonu ve döllenmeyi doğrudan etkilemektedir. Kemoterapi uygulamasının ovaryum dokusu üzerinde yapabileceği olumsuz etkilerin mekanizmasını saptayabilmek için öncelikle normal ovaryumdan salınan yaşam ve ölüm sinyal moleküllerinin işleyişini belirlemek gerekmektedir.

TGF- β_1 birçok memeli türünde hücre büyüme, farklılaşma ve metabolizmasının düzenlenmesinde önemli rol oynayan küçük peptid protein ailesinin bir üyesidir. TGF- β_1 'in sağlıklı insan ve fare Graaf follikül'lerinin granüloza ve teka hücrelerinde salındığı bilinmektedir.²⁴ TGF- β üst grubu üyelerinden olan GDF-9 ovaryum'da follikül gelişimi süresince granüloza hücrelerinin çoğalması ve farklılaşmasını sağlayan moleküldür. GDF-9'un follikül gelişimi süresince memeli oosit'lerinde salındığı bilinmektedir.²⁵ PCNA, hücre döngüsünün işleyişinde önemli role sahip çoğalan hücre çekirdek proteinidir. Çalışmalarda gelişim sırasında follikül genişlemeye başladığında, PCNA immünreaksiyonunda gözlenen artış, sağlıklı antral follikül'lerdeki granüloza ve teka hücrelerindeki kuvvetli çoğalma oranını göstermektedir.²⁶

Apoptozisin en önemli evrelerinden biri olan DNA parçalanması, histokimyasal olarak TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labelling) yöntemi ile gösterilmektedir.²⁷ TUNEL apoptozisin erken aşamasındaki apoptotik hücrelerin tanımlanmasını sağlayan özel bir yöntemdir.²⁷ TUNEL tepkimesi atretik follikül'lerde en çok granüloza ve teka hücrelerinde gözlenmiştir.²⁷ Bu nedenle granüloza ve teka katmanlarında TUNEL pozitif hücrelerin bol olduğu folliküller, atretik follikül olarak sınıflandırılır.²⁷ Apoptoziste etkili rol oynayan Kaspaz ailesi arasında apoptozisle en bağlantılı olan ve hücreyi ölüme götüren etkileyici enzim kaspaz-3'tür.²⁸ Ayrıca apoptoziste sonlandırıcı enzim olan kaspaz-3'ün, ovaryum'un granüloza hücrelerinde apoptozis işlemini tamamladığı bilinmektedir.²⁸ APAF-1 ise kaspaz'ların etkinliği ve kuvvetlenmesi için son derece önemli bir öncül-apoptotik moleküldür.²⁹ Apoptozisin mitokondriyal yolunda sitokrom-c sitosole salınarak APAF-1'in de katıldığı apoptozom bileşenini başlatır.³⁰ Ovaryum follikülleri ile ilgili yapılan çalışmalarda APAF-1'in insan ve fare granüloza hücrelerinde salındığı ve gonadotropin uygulanması ile APAF-1 salınımının baskılandığı gösterilmiştir.³⁰

Çalışmamızda, özellikle ergenlik evresinde alınan kemoterapi tedavilerinin, bireylerin üreme fonksiyonları üzerinde oluşturabileceği komplikasyonların önlenmesi düşüncesiyle, uygulanan antioksidanların ovaryumlar üzerine iyileştirici etkilerinin olup olmadığının incelenmesi amaçlandı

Bu çalışmada genç dişi sıçanlara, etkili bir ajan olan Siklofosfamid ile kemoterapi uygulandı. Kemoterapi uygulaması sırasında verilen antioksidanların, kemoterapotik ajanların kanserli olmayan normal dokulara verdikleri hasarı ne ölçüde azaltacağı immünohistokimyasal ve ince yapı düzeyinde incelendi. Bulgular literatür verileriyle karşılaştırmalı olarak ortaya konulmaya çalışıldı.

II. GENEL BİLGİLER

1. OVARYUM'UN GELİŞİMİ

Cinsiyetin farklanması çok sayıda genin rol oynadığı karmaşık bir süreçtir. SRY geni (Y kromozomu'nun üzerindeki seks belirleyici bölge) Y kromozomunun kısa kolunda (Yp11) bulunur ve cinsiyetin belirleyicisidir. Bu genin protein ürünü olan transkripsiyon faktörü, gelişmemiş durumdaki üreme organlarının cinsiyetini belirleyen genleri harekete geçirir. SRY geni Testis Belirleyici Faktör'dür (TBF). Bu faktörün var olması durumunda fetusun cinsiyeti erkek, yokluğunda ise kızdır. Embriyonun cinsiyeti, genetik olarak döllenme sırasında belirlenmiş olmasına karşın, gelişimin 7. haftasına değin gonadlar erkek ya da dişi yapısal özelliklerine sahip değildir.³¹

Gonadlar başlangıçta kölom epitelinin çoğalması ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşmuş, bir çift genital ya da gonadal kabartılar şeklinde belirirler. Gelişimin 6. haftasına değin bu kabartılar içinde üreme hücreleri görülmez.^{31,32}

İlkel (Primordiyal) üreme hücreleri, gelişimin 2. haftasında embriyonik primer ektodermden (epiblast) köken alırlar. Daha sonra epiblasttan ayrılarak ameboid hareketlerle vitellus kesesinin ekstraembriyonik yapılarına göç ederler. Önce embriyonun kaudalinde yerleşik ekstraembriyonik mezodermden görülürler, sonra vitellus kesesi duvarı endoderminde izlenirler. 4. haftada son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerleyerek 5. haftanın başında ilkel gonadlara ulaşırlar. 6. haftada ise genital kabartıları işgal ederler. İlkel üreme hücrelerinin izlediği bu yola germ çizgisi (hattı) denir. İlkel üreme hücreleri açık renk sitoplazmaları ve oval şekilleriyle kolayca ayırt edilirler. Alkalen fosfataz enzim işaretlemesiyle belirlenebilirler. Bu hücreler genital kabartılara ulaşamadıklarında gonadlar gelişemez. Gonadların ovaryum ya da testis'e farklılaşmalarında ilkel üreme hücrelerinin tetikleyici etkisi vardır.^{31,32}

İlkel üreme hücrelerinin ilkel gonadlara ulaşmasından hemen önce ve ulaşması sırasında, genital kabartının epiteli çoğalır ve epitel hücrelerinin altındaki mezenşimin içine gömülürler. Burada ilkel cinsiyet kordonları olarak adlandırılan düzensiz şekilli kordonları oluştururlar. Erkek ve dişi embriyonlarda bu kordonlar yüzey epiteline bağlıdır ve bu evrede erkek ya da dişi gonadlarının birbirinden ayırt edilebilmesi olanaksızdır. Bu nedenle bu evreye faklanmamış dönem, bu gonad'a ise farklanmamış gonad denir.³¹

XX kromozomlarına sahip dişi embriyonlarda, ilkel cinsiyet kordonları düzensiz hücre kümelerine ayrılır. İlkel üreme hücresi grupları içeren bu kümeler, daha çok ovaryum'un medullar bölgesinde yerleşmişlerdir. Bu hücre kümeleri bir süre sonra kaybolarak yerlerini damarlı stromaya (ovarian medulla) bırakırlar.^{31,32}

Dişi gonad'ın yüzey epiteli, erkek gonad'ının aksine çoğalmayı sürdürür. 7. haftada yüzey epitelinden köken alan hücre kordonları alttaki mezenşim içine gömülür. Bunlar yüzeye yakın yerleşirler ve ikincil kordonlar olarak adlandırılırlar. 4. ayda, bu kordonlar bir ya da daha çok sayıda ilkel üreme hücresini çevreleyen izole hücre toplulukları haline gelirler. Bu üreme hücreleri zamanla oogonyum'a dönüşürken yüzey epitelinden aşağıya göç eden ve üreme hücrelerini çevreleyen epitel hücrelerinden de folliküler hücreler oluşur.^{31,32}

Oogenezis

Doğum Öncesi (Prenatal) Olgunlaşma: İlkel üreme hücreleri, dişi gonad'a ulaşır ulaşmaz genetik olarak oogonyum'lara farklılaşırlar. Ardarda geçirdikleri mitotik bölünmelerle çoğalan oogonyum'lar 3. ayın sonunda kümeler halinde dizilir, yassı epitel hücreleriyle çevrelenirler. Bir küme içindeki oogonyum'ların tümü, olasılıkla tek bir ilkel üreme hücresinden gelişir. Oogonyum'ları çevreleyen yassı epitel hücreleri, yüzey epitelinden köken alır ve follikül hücreleri olarak adlandırılırlar.^{31,32,33}

Oogonyum'ların çoğunluğu mitozla bölünmeyi sürdürürken, bir kısmı bölünmesini I. mayoz bölünmenin profaz aşamasında durdurarak primer oosit'lere farklanırlar. 3. aydan başlayarak oogonyum'ların sayısı hızla artar. Gelişimin 5. ayında ovaryum içindeki üreme hücrelerinin sayısı ortalama 7 milyona ulaşır. Bu evreden sonra hücre ölümü başlar. Çok sayıda oogonyum ve primer oosit atretik hale gelir. 7. ayda yüzeye yakın yerleşmiş birkaç oogonyum dışında çoğu dejenere olur. Hayatta kalan primer oosit'lerin tümü, I. Mayoz bölünmenin profaz evresine girmiş ve her biri tek sıra yassı follikül hücre sırasıyla çevrelenmiştir. Ortada bir primer oosit, çevresinde birbirine desmozomlarla tutunmuş tek sıra yassı epitel hücreleriyle sarılı bu yapıya primordiyal follikül denir. Primordiyal follikül çevre dokudan belirgin bir bazal lamina ile ayrılmıştır.^{31,32,33,34}

Doğum Sonrası (Postnatal) Olgunlaşma: Doğumda tüm primer oosit'ler I. Mayoz bölünmenin profazı'nın diploten evresindedir. Bu evrede oosit I çekirdek kromatinin seyrek ve düzensiz bir yapılanma gösterdiği dinlenme evresine girer. Primer oosit'ler, puberteye değin dinlenme evresinde kalırlar ve birinci mayoz bölünmelerini tamamlamazlar. Bu süre boyunca, oosit olgunlaşması follikül hücrelerince salgılanan oosit olgunlaşmasını baskılayan madde (OMI, oocyte maturation inhibitor) ile baskılanır. Doğumda ovaryum'lardaki primer oosit sayısı 700 bin ila 2 milyon arasında değişir. Puberteye değin bunların büyük çoğunluğu atretik hale geldiğinden, puberte başlangıcındaki bu sayı 400.000'e düşer ve 500'den daha azı bir kadının üreme döngüsü içinde ovulasyonla atılır. Diğerleri çeşitli gelişim evrelerinde dejenere olup atretik folliküller haline gelir. Geç olgunlaşan oosit'lerin bazıları 40 yıl süresince I.mayoz bölünmenin profaz evresinde bekler.^{31,32,33,34}

Pubertenin başlamasıyla dişi gonad primordiyal folliküllerden beslenen bir follikül havuzu işlevi görür. Her ovaryal döngüde bu havuzdan seçilen 5 ile 15 arasında değişen sayıda primordiyal follikül, primer (preantral), sekonder (antral) ve Graaf (tersiyer, preovulatuvar) olarak adlandırılan 3 aşamadan geçerek olgunlaşmaya başlar. Bunlar arasında en uzun olanı antral follikül evresidir.

Preovulatar evre yaklaşık 37 saat sürer. I. Mayoz bölünmenin diploten evresinde dinlenme aşamasında olan primer oosit büyümeye başlar. Oosit'i çevreleyen yassı epitel hücreleri önce kübikleşir. Bu folliküle gelişen (unilaminar) primer follikül denir. Daha sonra kübik biçimli follikül hücreleri çoğalarak çok sıralı epitel katmanını oluştururlar. Buna granüloza katmanı (stratum granulozum) denir. Bu biçimi alan folliküle multilaminar (preantral) primer follikül adı verilir. Granüloza hücrelerinin çoğalması primer oosit'lerce salgılanan 'aktivin' denilen sinyal molekülünce sağlanır. Primer follikül çevresinde, stromal hücre ve bağ dokusu yoğunlaşarak teka follikülü denilen bir kılıf oluştururlar. Bu arada granüloza hücreleri ve oosit glikoprotein yapıda bir madde salgılayarak oosit'in çevresinde zona pellusida denilen bir katman oluşturur. Follikül büyümeyi sürdürürken teka follikül hücreleri, içte salgı yapan hücrelerden oluşan teka interna ve dışta fibroblast benzeri hücreler içeren bağ dokusundan yapılı, fibröz bir kapsül olan teka eksterna adlı iki belirgin katman şeklinde farklanır. Aynı zamanda oosit'in çevresindeki follikül hücreleri eldiven parmağı biçimindeki küçük sitoplazmik uzantılarını, zona pellusida'yı geçip oosit'in zarının mikrovilluslarıyla iç içe geçirirler.^{31,32,33,34}

Gelişme ilerledikçe granüloza hücreleri arasında içi sıvı dolu boşluklar belirir. Bu boşlukların birbirleriyle birleşmesiyle antrum oluşur. Bu folliküle sekonder (veziküler) follikül denir. Başlangıçta küçük hilal görünümünde olan antrum zamanla genişler. Oosit'i çevreleyen granüloza hücreleri bozulmadan kalarak kum yığını görüntüsündeki kümulus ooforus'u oluştururlar. Olgun bir sekonder follikül 25 mm ya da daha fazla çaptadır. İçte steroid salgı oluşturan hücrelerden yapılı teka interna ve dışta teka eksterna ile sarıdır. Teka eksterna derece derece ovarium stromasına karışır. Follikül ovulasyona yakın daha da büyür ve Graaf (tersiyer, preovulatar) follikül olarak adlandırılır.^{31,32,33,34}

Her menstrüal döngüde bir grup follikül gelişmeye başlarsa da, bunlardan ancak bir tanesi tam anlamıyla olgunlaşır. Diğerleri çeşitli gelişim

evrelerinde dejenere olarak atretik hale gelirler. Sekonder follikül olgunlaştıktan sonra lüteinizan hormonun (LH) etkisiyle ovulasyon öncesi (preovulatuvar) evreye girer. Primer oosit I. Mayoz bölünmeyi tamamlayarak büyüklükleri farklı, ancak her biri 23 çift yapı (2nDNA) kromozom içeren iki yavru hücre oluşturur. Bu hücrelerden biri sitoplazmanın büyük bölümünü alan sekonder oosit, diğeri ise çok az sitoplazma içeren 1. kutup cisimidir. Kutup cismi oosit'in hücre zarıyla zona pellusida arasındaki perivitellin aralıkta yer alır. I. Mayoz bölünme ovulasyondan hemen önce tamamlanır. I. Mayoz bölünmenin tamamlanmasından hemen sonra ve sekonder oosit'in çekirdeği dinlenme evresine geçmeden önce, DNA eşleşmesi olmaksızın hücre II. Mayoz bölünmeye girer. Oosit II'de bölünme mekiği oluşur. Kromozomlar ovulasyondan 3 saat önce metafaz plağında dizildiklerinde ovulasyon gerçekleşir ve oosit dışarıya atılır. II. Mayoz bölünme ancak oosit II, bir spermiyumla döllenirse tamamlanır. Döllenme olmazsa ovulasyondan 24 saat sonra oosit II dejenere olur. Bu sırada birinci kutup cisimi de ikinci kez bölünebilir. Böylece ovaryum'da oogonyum'lardan oosit II oluşuncaya değin gerçekleşen değişimlere oogenezis denir.^{31,32,33,34}

2. OVARIUM'UN ANATOMİSİ

Ovarium'lar küçük pelvis'in yan duvarında fossa ovarica'ya yerleşmiş bir çift organdır. Fossa ovarica, a.iliaca externa ile a.iliaca interna arasında bulunur. Aşağı ve ön taraftan lig.latum uteri'nin tabanı, yukarıdan a.iliaca externa ve arkadan da ureter ile sınırlıdır. Peritoneum'un altından a.-v.obturatoria ile n.obturatorius geçer. İlk hamilelikte ovarium'lar uterus ile birlikte karın boşluğuna doğru çekilir ve bir daha aynı yerine dönemezler. Doğum yapanlarda ovariumlar genelde biraz daha aşağıda bulunurlar.³⁵

Tuba uterina'nın arka ve aşağı kısmında yerleşik ovarium'lar, lig.latum uteri içinde bulunur ve uzun eksenleri de vertikal yöndedir. Pembemsi-gri renkli olan ovariumların yüzü puberteye değin peritoneum'la örtülü olup düz ve parlaktır, puberteden sonra matlaşır. Ovulasyon ve doğurmaya bağlı olarak da

üzeri pürüklü bir görünüm alır. Her bir ovarium yaklaşık 4 cm uzunluğunda, 2 cm eninde ve 0,8 cm kalınlığındadır. Ağırlığı 3-5 gramdır. Facies lateralis ve facies medialis olarak iki yüzü, extremas tubaria ve extremas uterina olarak iki ucu, margo liber ve margo mesovaricus olarak iki kenarı vardır. Extremitas tubaria komşuluğunda fimbria ovarica ile lig.ovarii suspensorium tutunur. Lig.suspensorium ovarii, iliac damarların ön tarafında yukarı doğru uzanan bir periton plikası olup, içinde a. ve v. ovarica bulunur. Extremitas uterina, aşağı pelvis döşemesine doğru yönelerek, lig.ovarii proprium aracılığı ile uterus'un cornu uteri'sine tutunur. Bu bağ gubernaculum artığının bir bölümü olup, lig.latum uteri içinde bulunur ve az olarak düz kas lifleri içerir.³⁵

Facies lateralis, fossa ovarica'yı örten pariyetal periton'a oturur. Facies medialis, dış yüze oranla daha konvektir. Bu yüzü infundibulum tubae uterinae örter. Serbest olması nedeniyle, arka kenarına margo liber denir. Ön kenara oranla daha konveks ve künt olan bu kenar, üreter ile komşuluk yapar. Ön kenarına, mesovarium tutunması nedeniyle, margo mesovaricus denir. Arka kenara göre daha ince olan ön kenarda, hilum ovarii bulunur ve a.umbilicalis'in artığı ile komşudur. Bu kenara, lig. latum uteri'nin bir bölümü olan mesovarium tutunur. Mesovarium'un iki yaprağı arasında bulunan damar ve sinirler, hilum ovarii'den ovarium'a girer ve çıkarlar. Tuba uterina, margo mesovaricus üzerinden bir kavis ile geçip, extremitas tubaria'nın üzerinden kıvrılarak, margo liber'e ve buradan da facies medialis'e gelir.³⁵

Ovarium'un Yapısı

Ovarium'u en dıştan periton örter. Bu periton da, diğer organları örten peritonlar gibi yassı epitel yapısında olup düz ve parlaktır. Ancak puberteden sonra ovarium'un periton yapısı değişir ve germinal epitelyum (Waldeyer katmanı) olarak adlandırılan kübik hücre katı ile sarılır. Bu nedenle de mat gri renge döner. Eğer erişkinlerde de normal periton yapısı korunsa idi, ovulasyon sırasında, oosit sağlam olan periton'u delerek dışarı çıkamazdı. Bu nedenle

erişkinlerde, ovariumları örten normal bir periton bulunmaz. Epitel katmanının altında, tunica albuginea olarak adlandırılan kalın bir katman bulunur. Bu katman, yaş ilerledikçe kalınlaşır. Tunica albuginea'nın içinde ovarium'un esas yapısını oluşturan stroma ovarii bulunur. Stroma ovarii de cortex ovarii ve medulla ovarii denilen farklı iki bölümden oluşur. Cortex ovarii, dış tarafta bulunur ve ovarium'un her tarafını bir kabuk şeklinde sarar. Bu bölüm içindeki bağ dokuları arasında, çeşitli gelişim evrelerinde bulunan folliküller içerir. Medulla ovarii, iç tarafta bulunur ve cortex ovarii'ye oranla daha gevşek bir yapıya sahiptir. Medulla ovarii'den gelen bağ dokusu uzantıları, hilum ovarii'de damarların çevresindeki bağ dokusu ile devam eder. Hilum ovarii'den içeri giren damarların çoğu, cortex ovarii'de dağılır. Burada gelişen folliküller çevresinde kapiller ağlar oluştururlar.^{35,36}

Ovarium'un arterleri, abdominal aortadan çıkan a.ovaricalar'dır. A.ovarica, lig. suspensorium ovarii içinde pelvis'e iner. Hilum ovarii'den ovarium'a girer ve folliküller çevresinde kılcal ağlar oluşturur.^{35,36}

Ovarium'un venleri, arterleri izleyerek hilum ovarii'den çıkar. Bu venler plexus pampiniformis denilen venöz ağı oluştururlar. Bu ağı oluşturan venler, yukarı çıktıkça birbirleriyle birleşirler ve sonunda v.ovarica'yı oluştururlar. V.ovarica, a.ovarica ile birlikte seyrederek. Sol tarafta v.renalis'e, sağ tarafta ise v.cava inferior'a açılır.^{35,36}

Ovarium'un lenf drenajı, kan damarları ile birlikte uzanır ve nodi lymphatici preaortici ve nodi lymphatici aortici lateralis'lere açılırlar.^{35,36}

Ovarium'un sinirleri, plexus hypogastricus inferior ve a.ovarica'nın çevresindeki plexus ovaricus'dan gelir. Parasempatikleri n.vagus'tan, sempatikleri ise n.splanchnicus minor ve bir kısmı torakal medulla spinalis segmentlerinden gelir. Bunların ovarium içindeki dağılımı ve görevleri tam bilinmemektedir.^{35,36}

3. OVARYUM HİSTOLOJİSİ

Ovaryum en dıştan tek sıralı yassı epitelden kübiğe (epithelium superficiale-germinativum) değişen bir epitel ile sarılmıştır. Ovaryum yüzeyindeki bu epitel katmanı, embriyonda birkaç kez çoğalarak primer ve sekonder cinsiyet kordonlarını yapan peritonal mezotelyumdan geliştiği için germinal epitel (epitelyum germinale) olarak adlandırılır. Epitelin periton'a bakan yüzünde mikrovilluslar ve az sayıda kinosilyalar bulunur. Hücre sitoplazması mitokondriyon ve pinositoz veziküllerinden zengindir. Germinal epitelin altında damardan fakir, sıkı kollajenöz bağ dokusundan yapılmış tunika albuginea bulunur. Bu katmandaki kollajen lifler ovaryum yüzeyine koşut yerleşmişlerdir. Kesitlerde her bir ovaryum'un içte medulla dışta korteks olarak iki bölümü ayırt edilir. Bu katmanlar arasında kesin bir sınır yoktur.^{33,34,37,38,39}

Medulla, kollajen demetlerden ve elastik lif ağlarından yapılmış oldukça sıkı bir bağ dokusu içinde, kan ve lenf damarları, kalın sinir demetleri ve hilus yakınında birkaç düz kas hücresi içerir.

Ovaryum Korteksi

Korteks, stroma ve çeşitli gelişim evrelerindeki ovaryum folliküllerinden oluşur. Stroma, kollajen ve elastik lifler, retiküler lif ağları ve iğ biçimli bağ dokusu hücrelerinden (fibroblastlar) yapılmıştır. Bu fibroblastlar, hormonal uyarılara diğer organların fibroblastlarından farklı yanıt verir. Korteksin bu interstisyel bağ dokusu germinal epitel altında sıkılaşıp tunika albuginea'yı oluşturur.^{33,34,37,38,39}

Kortekste stroma içinde çeşitli gelişim evrelerinde folliküller yerleşmiştir. Ovaryum follikülleri, ortada iri bir germ hücresi (oosit) ile bunu çevreleyen follikül epitelinden oluşan yapılardır.^{33,34,37,38,39}

Ovaryum Follikülleri

Bir ovaryum follikülü, bir ya da daha fazla follikül ya da granüloza hücre katmanıyla çevrili bir oosit içerir. Folliküler hücreler mezotelyal epitelden gelişen germinal epitele benzerler. Menapoz'dan sonra folliküllerin az bir kısmı kalır. Her 28 günde bir ovaryum'lardan bir oosit atılır. Bir kadının üreme süreci 30-40 yıla değin sürer. Bu süre içerisinde yaklaşık 450 oosit atılır.^{33,34,37,38,39}

Folliküler gelişimde 4 evre ayırt edilir.

1- Primordiyal Follikül

Primordiyal folliküller, fetal yaşam sırasında oluşan tek sıralı yassı follikül hücreleriyle çevrili primer oosit'leri içerir. Primer oosit'ler 25 µm çapında yuvarlak şekilli hücrelerdir. Geniş ve periferik yerleşimli çekirdekleri tek çekirdekçik kapsar. Primer oosit'ler organellerden zengindirler. Çok sayıda mitokondriyon, gelişkin Golgi kompleksi, granüllü endoplazmik retikulum tubulusları ve birkaç ribozom içerirler. Bu folliküller, korteksin en üst katmanında yer alırlar ve sayıları artmaz. Ancak cinsel yaşam süresince büyüyüp gelişirler ve çoğu dejenere olur.^{33,34}

2- Primer Follikül

Pubertenin başlamasıyla birlikte, her menstrüel döngüde 5-15 arası primordiyal follikül olgunlaşmaya başlar. I. mayoz bölünmenin diploten evresinde olan oosit I büyür, oosit'i çevreleyen follikül hücreleri önce kübikleşir ve sonra çoğalarak çok sıralı bir epitel katı oluştururlar. Bu hale gelen folliküle primer follikül denir. Primer oosit'in çapı yaklaşık 100-150 µm'dur ve genişlemiş bir çekirdek, çok sayıda Golgi kompleksi ve mitokondriyon, gelişkin granüllü endoplazmik retikulum tubulusları ve serbest ribozomlar içerir.^{33,34}

Oosit'in çevresindeki follikül hücreleri zamanla kübikleşir ve bu folliküle tek katmanlı (büyüyen, unilaminar) primer follikül denir. Follikül hücreleri çevrelerindeki stromal hücrelerden bir bazal membranla ayrılmışlardır. Folliküler hücreler çoğalmaya başladıklarında çok sıralı hale gelirler ve granüloza hücreleri olarak adlandırılırlar. Follikülün bu haline çok katmanlı (preantral, multilaminar) primer follikül denir. Granüloza hücrelerinin çoğalma yetisi primer oositce üretilen aktivin ile gerçekleştirilir. Bu evre süresince granüloza hücreleri ve oosit glikoprotein yapısında bir madde salgırlar. Bu madde oosit'in çevresinde zona pellusida olarak adlandırılan bir katman oluşturur. Zona pellusida ZP₁, ZP₂ ve ZP₃ denilen 3 farklı glikoproteinden oluşur. Ayrıca follikül hücre zarı eldiven parmağı biçiminde küçük sitoplazmik uzantılar içerir. Bunlar zona pellusidayı geçerek, oosit yüzeyindeki mikrovilluslarla sıkı bağlantı birimleri (gap junction) aracılığıyla bağlanırlar. Bu sitoplazmik uzantılar folliküler gelişim süresince iletişim kurarak besin maddelerinin follikül hücrelerinden geçişini kolaylaştırırlar.^{33,34}

Follikülün dışındaki stromal hücrelerin oluşturduğu teka follikülü de iki kata ayrılır. İçte salgı yapan hücrelerden oluşan, kan damarlarından zengin teka interna, dışta fibroblast benzeri hücreler içeren bağ dokusundan yapılı teka eksternadan oluşur. Teka internayı oluşturan hücreler hücre zarlarında LH reseptörleri içerirler. Ayrıca sitoplazmalarında çok sayıda yağ damlaları, granülsüz endoplazmik retikulum tubulusları ve tubuler kristal mitokondriyonlar kapsarlar. Teka interna hücreleri androstenedion üretirler ve bu hormon granüloza hücrelerine girerek aromataz enzimiyle östradiol'e dönüşür. Granüloza hücreleri ile teka interna hücreleri arasında kalın bir bazal lamina vardır.^{33,34}

3- Sekonder Follikül

Gelişme ilerledikçe çok katmanlı primer follikül 200 µm çapa ulaşır ve granüloza hücrelerinin arasında içi sıvı dolu boşluklar belirir. Kısa sürede boşluklar birbirleriyle birleşerek yarım ay şeklinde follikül antrum'unu oluşturur.

Bu hale gelen folliküle sekonder follikül denir. Sekonder follikül'ün granüloza hücrelerinin çoğalması hipofiz ön lobundaki bazofil hücrelerinden salınan FSH'a bağlıdır. FSH'ın etkisi altında granüloza hücrelerinin sayısı artar ve hücrelerarası boşluğa follikül sıvısı birikir. Bu sıvı glikozaminoglikan, proteoglikan ve hormon bağlayıcı proteinleri içeren kan plazması benzeridir. Ayrıca follikül sıvısı hormonlardan progesteron, östradiol, inhibin, folliostatin ve FSH ile LH'n salınımını düzenleyen aktivin içerir. Zamanla granüloza hücreleri yeniden düzenlenmeye başlar ve primer oosit bir miktar granüloza hücresiyle birlikte antrum boşluğu içinde bir kenara toplanır. Bu yapıya kumulus ooforus denir. Zona pellusida çevresinde gevşek yerleşmiş kübik ya da alçak boylu prizmatik granüloza hücreleri sitoplazmik uzantılarıyla oosit ile bağlantılarını sürdürmektedirler. Primer oosit'i çevreleyen bu tek sıralı granüloza hücre katmanına korona radiata denir. Diğer granüloza hücreleri poligonal şekillidirler. Oosit sitoplazmasında mitokondriyonlar çekirdek yakınında toplanırlar. Sitoplazmada protein-lipit yapısında vitellus oluşmaya başlar.^{33,34}

Bu evrenin sonuna doğru stromal hücreler genişlemeye başlar ve teka interna yaygın ağ oluşturmuş kapillerle beslenir. Sekonder follikül aşamasına gelmiş çoğu follikül atreziye uğrar. Ancak atretik folliküllerin bazı granüloza hücreleri dejenere olmaz ve menapoz'a değin düşük düzeylerde androjen salgılayan interstisyel bezlere dönüşür.^{33,34}

4- Graaf Follikülü

Birkaç sekonder follikül olgun follikül oluşturmak üzere gelişmeyi sürdürür ve Graaf (tersiyer, preovulatuvar) follikülü oluşturur. Graaf follikülünde granüloza hücreleri çoğalır, antrum genişler ve follikül sıvısı ile dolar. Ovulasyondan hemen önce follikülün çapı 2,5 cm'ye ulaşır. Follikül duvarındaki folliküler hücreler membrana granüloza'yı oluştururlar. Graaf follikülünde primer oosit'in çevresindeki korona radiata ve kumulus ooforus oluşumunu sürdürür ve zamanla tutunduğu yerden ayrılır ve follikül sıvısının içinde serbest kalır.

Graaf follikülü en dıştan saran bazal membran kalın, homojen ve saydamdır. Buna camsı zar denir. Graaf folliküllü döngünün başlangıcından başlayarak 10-12 günde oluşurlar.^{33,34}

5-Atretik Follikül

Atretik folliküller doğum öncesinden başlayarak menapoz'un birkaç yıl sonrasına değin ovaryum'da oluşurlar. Genelde menstrüal döngü süresince her ovulasyonda bir oosit atılır. Dişilerin tüm yaşamı boyunca, ovaryum'da yerleşik çok sayıda çeşitli evredeki folliküllerden yalnızca % 0,1'i olgunlaşıp ovulasyona uğrar. Bu nedenle ovaryum folliküllerinin büyük bölümü, follikül hücreleri ve oosit'in ölümüyle geriler ve fagositoz yapan hücrelerce ortadan kaldırılırlar. Bu işlev sırasında granüloza hücrelerinde mitoz durur, granüloza hücreleri bazal membrandan ayrılır ve dejenere olurlar.^{33,34,37,38,39}

Ovulasyon

Menstrüal döngünün 14. gününde gelişmekte olan Graaf follikülü'nün granüloza ve teka hücrelerinden salgılan östrojen nedeniyle kandaki östrojen düzeyi artar. Bu da uterus endometriyum'unun folliküler ya da proliferatif evreye girmesi, servikal mukus'un spermiyumların içeri girmesine izin verecek kadar incilmesi ve hipofiz'i LH (luteinize edici hormon) salgılaması için uyarır. LH'nin döngünün tam ortasında aniden yükselmesiyle olgunlaşmayı destekleyen etkenlerin yoğunluğu artar ve o zamana değin diploten evresinde kalmış olan primer oosit'in I. Mayoz bölünmesini tamamlamasını ve follikülün tersiyer evreye girmesini sağlar. Aynı zamanda II. Mayoz bölünme başlar ancak oosit ovulasyondan yaklaşık 3 saat öncesine değin metafaz evresinde duraklar. Bu sırada ovaryum'un yüzeyinde bir kabarıklık oluşur ve bu kabarıklığın tam tepesinde stigma olarak adlandırılan damarsız bir nokta belirir. Yüksek LH düzeyi kollajenaz yetisini artırır ve follikülün çevresindeki kollajen lifler sindirilir. LH

düzeyindeki ani artışın diğer etkisi prostaglandin miktarını arttırmasıdır. Prostaglandin ovaryum duvarında yerel kas kasılmalarına neden olur. Oosit bu kasılmalarla çevresindeki granüloza hücreleriyle birlikte, kumulus ooforus bölgesinden dışarı atılır ve ovaryum'un dışında gezinir. Fimbriya ovarika'ların hareketi ile oosit tuba uterina'nın içine alınır.^{33,34,37,38,39}

Ovulasyon puberteden menapoz'a değin 28 günde bir olaylanır. Ovulasyon iki kanama arasındaki döngünün ortasına rastlar. Ovulasyon, döngünün 14. gününde gerçekleşir. Ovulasyonda genelde bir oosit atılır. Bazen aynı anda birkaç oosit atılabilir.^{37,38,39}

Graaf follikülünde ovulasyon sonrasında bir iç basınç düşmesi gerçekleşir. Teka katmanlarından kan sızması ile kısa bir süre için follikül içine kan toplanır. Bu yapıya korpus rubrum (kırmızı cisim) denir.^{37,38,39}

Korpus Luteum

Ovulasyondan sonra yırtılan tersiyer follikülünün duvarında kalan granüloza ve teka interna hücreleri yaşamlarını çevrelerindeki damarlar yoluyla sürdürürler. Lüteinize edici hormon'un etkisiyle bu hücrelerin sitoplazmalarında sarımsı bir pigment birikmeye başlar ve büyüyerek granüloza lutein hücreleri ve teka lutein hücrelerine dönüşürler. Bu hücrelerin oluşturduğu geçici endokrin bez yapısına 'korpus luteum' (sarı cisim) denir. Korpus luteum progesteron ve östrojen hormonlarını salgılar. Progesteron, östrojenik hormonların da katkısıyla, uterus mukozasının embriyonun implante olabilmesine uygun duruma geldiği sekretuar ya da progestasyonel evreye girmesini sağlar.^{33,34,37,38,39}

Döllenme olmadığında, ovulasyonu izleyen 9. günde korpus luteum erişebileceği üst boyuta ulaşır ve ovaryum'un yüzeyinde sarımsı bir çıkıntı şeklinde izlenebilir. Bu sonra progesteron üretimi azaldığı için dejenere olur ve menstrüal kanama başlar. Buna 'menstrüasyon korpus luteumu' denir.^{37,38,39}

Oosit'in döllelenmesi durumunda, gelişmekte olan embriyonun sinsityotrofoblastlarca salgılanan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu ile korpus luteum'un dejenere olması engellenir. Böylece korpus luteum büyümesini sürdürür ve 'gebelik korpus luteumu'na (korpus luteum graviditatis) dönüşür. Bu yapı gebeliğin 3. ayının sonunda ovaryum'un 1/3 ile 1/2'si büyüklüğüne ulaşır. Sarımtırak renkteki luteal hücreler dördüncü ayın sonuna değin progesteron salgılamayı sürdürürler. Bu süreçten sonra plasenta'nın trofoblastik bileşenince salgılanan progesteron'un miktarı gebeliğin sürdürebilmesine yetecek düzeye geldiği için, luteal hücreler yavaş yavaş dejenere olurlar. 4. aydan önce gebelik korpus luteum'unun ortadan kaldırılması genelde düşükle sonuçlanır.^{33,34}

Menstruasyon ve gebelik korpus luteum'ları işlevleri sonlanınca dejenerasyona uğrarlar. Yerlerini kollajen liflerden zengin bağ dokusundan yapıllı, beyaz renkli bir yapı olan 'korpus albicans'a (beyaz cisim) bırakırlar. Bu yapı ovaryum içerisinde zamanla absorbe edilerek ortadan kalkar.^{37,38,39}

Ovaryum Medullası

Ovaryum'un merkezi olan medulla gevşekçe örgü oluşturan kollajen ve elastik lifler ile fibroblastlar içeren bağ dokusundan oluşur. Medulla ayrıca büyük kan, lenf damarları ve sinir lifleri içerir. Folliküler atrezi sırasında granüloza hücreleri ile oosit'ler dejenerasyona uğrarken, teka interna hücreleri etkin steroid salgı yapmayı sürdürürler. Medullada yerleşik bu epitelooid hücrelere 'interstisyel hücreler' denir. Bu hücreler, kümeler oluşturmak üzere biraraya gelirler ve 'interstisyel bezleri' oluştururlar. İşlevlerini puberteden başlayıp menapoz'a değin sürdürürler ve östrojen salgırlar.^{33,34}

Hilus hücreleri ovaryum medullasındaki diğer epitelooid tip hücrelerdir. Bu hücreler testislerdeki Leydig hücreleriyle eşdeğer organel içeriği ve sitoplazmik özelliğe sahiptirler. Ayrıca androjenleri salgırlar.^{33,34}

4. OVARYUM FİZYOLOJİSİ

Kadın genital hormon sistemi, üç ayrı hormon grubundan oluşur.

1. Hipotalamik-serbestleştirici bir hormon olan; Gonadotropin-Serbestleştirici Hormon (GnRH).
2. Hipofiz ön lobundaki hormonlarından Follikül Uyarıcı Hormon (FSH) ve Luteinize edici Hormon (LH). Bu hormonların her ikisi de hipotalamus'ta sentezlenen GnRH-serbestleştirici hormon'a yanıt olarak salgılanırlar.
3. Ovaryum hormonları, östrojen ve progesterondur. Bu hormonlar hipofiz ön lobundan salgılanan iki hormona (FSH, LH) yanıt olarak, ovaryum'larca salgılanır.^{40,41}

Kadında menstrüel döngü sürecinde, bu hormonların salgı miktarları değişkenlik gösterir. Döngünün farklı evrelerinde son derece farklı hızlarda salgılanırlar.^{40,41}

Hipofiz Ön Lobu Hormonları ve Ovaryum'lar Üzerine Etkileri

Menstrüel döngü sürecinde ovaryum'lardaki değişikliklerin tümü hipofiz ön lobundan salgılanan gonadotropik hormonlar, FSH ve LH'a bağlıdır. Gonadotropik hormonlarla uyarılmayan ovaryum'lar inaktif durumdadır. Ovaryum'lar fetal yaşam süresince plasenta'dan salınan, bir diğer gonadotropik hormon olan koryonik gonadotropinle (hCG) uyarıldıklarından işlev görürler. Ancak doğumdan sonra, birkaç hafta içinde bu uyarı kaybolur ve ovaryum'lar puberte öncesi evreye değin inaktif durumda kalırlar. FSH ve LH molekül ağırlıkları yaklaşık 30 bin olan küçük glikoprotein yapıda hormonlardır. Ovaryum'lardaki hedef hücreleri hücre zarlarında yerleşik son derece özgül reseptörlere bağlanarak uyarırlar. Aktive olan reseptörler, bu hücrelerin salgı, büyüme ve çoğalma hızını artırırlar. Bu uyarıcı etkilerin tümü hücre

sitoplazmasındaki ikincil haberci siklik AMP (cAMP) sisteminin aktivasyonu sonucu gerçekleşir. cAMP, protein kinaz oluşumunu sağlar, daha sonra da çeşitli fosforilasyonlarda, anahtar enzim görevi yaparak pek çok hücre içi işlevi hızlandırır.^{40,41}

Ovulasyon öncesinde, folliküllerden birisi daha fazla büyümeye başlar. Bu follikül bol miktarda östrojen salgılar ve östrojen bir follikül üzerinde pozitif geribildirim etki yaratır. FSH ve östrojen'lerin birleşimi granüloza hücrelerinde FSH ve LH reseptör sayısının artmasına neden olur. Ayrıca teka hücrelerinde daha az bir pozitif geribildirim etki yaratır. Bu etkiler birlikte, hızlı gelişen follikülün sıvı ve hormon salgısının, patlamalar şeklinde hızla yükselmesine neden olur. Ayrıca follikülden salgılanan büyük miktarlardaki östrojen, hipofiz ön lobundan daha fazla FSH salgılanmasını baskılamak için, hipotalamus'u etkiler. Bu yolla kendi pozitif geri bildirim uyarısıyla, geride kalan az gelişmiş folliküllerin, daha da gelişmesini engellediği düşünülmektedir.^{40,41}

Ovulasyonda LH'un Önemi ve Yükselişi

LH follikül büyümesinin son evresinde ve ovulasyon anında gerekli bir hormondur. Bu hormon olmadığında, çok büyük miktarlarda FSH olsa bile, follikül ovulasyon evresine değin gelişemez. Ovulasyondan yaklaşık 2 gün önce, hipofiz ön lobunun LH salgı hızı, belirgin bir şekilde yükselir. Bu artış ovulasyondan yaklaşık 16 saat önce, 6 ila 10 katıdır. FSH da aynı süreç içinde 2-3 kat artar. Böylece iki hormon aynı anda, birlikte etki ederek ovulasyon öncesi son birkaç gün içinde, follikülün hızla büyümesini sağlar. LH ayrıca granüloza ve teka hücreleri üzerine de etki ederek, bu hücreleri daha çok progesteron ve daha az östrojen salgılayan hücrelere dönüştürür. Bu nedenle, ovulasyondan yaklaşık bir gün önce, östrojen salgısı azalırken bir miktar progesteron salgılanmaya başlar.^{40,41}

Oosit'in ovaryum'dan atılmasını izleyen ilk birkaç saat içinde, geride kalan granüloza ve teka interna hücreleri hızla lutein hücrelerine dönüşür. Bu sürece luteinizasyon, oluşan yapıya ise korpus luteum denir. Korpus luteum'da granüloza hücreleri büyük miktarlarda progesteron ve östrojen salgırlar. Teka hücreleri ise androstenedion ve testosteron gibi belirli androjenleri sentezlerler. Ancak bunların çoğu granüloza hücrelerinde kadın hormonlarına dönüşür. Granüloza ve teka interna hücrelerinin lutein hücrelerine dönüşümü, başlıca hipofiz ön lobundan salgılanan LH'a bağlıdır. Granüloza hücrelerinin luteinizasyonu, aynı zamanda oosit'in ovaryum'dan atılmasına da bağlıdır. Luteinizasyon olayını, ovulasyonun sonuna değin denetleyen bir diğerk etken, follikül sıvısında bulunan, luteinizasyonu baskılayıcı faktördür. Bu nedenle ovulasyon oluncaya değin follikül içinde korpus luteum gelişmez.^{40,41}

Özellikle ovulasyon evresinde salgılanan LH öncelikle granüloza ve teka hücrelerinde luteinizasyona neden olur. Oluşan lutein hücreler çoğalma, genişleme, salgı ve dejenerasyon sırasına göre programlanırlar. Önhipofiz bezinden LH artık salgılanmasa bile, bu süreç devam eder. Ancak 4 ila 8 gün sonra olay sonlanır. Diğerk yandan, LH'ın etkisiyle korpus luteum'un büyümesi artar ve salgısı çoğalır. Gebelik gerçekleştiğinde LH'la hemen hemen aynı özelliklere sahip diğerk bir hormon olan koryonik gonadotropin (hCG) plasenta'dan salgılanır. Bu hormon korpus luteum'a etki ederek yaşamını uzatır ve genelde gebeliğin ilk 2-4 aylık süresinde devamını sağlar.^{40,41}

Menstrüal döngünün luteal evresinde, korpus luteum'dan salgılanan özellikle östrojen ve daha az oranda progesteron, hipofiz ön lobu üzerinde önemli geri bildirim etkisi yaratarak, FSH ve LH'nun düşük dozda salgılanmasını sürdürürler. Ayrıca luteal hücreler küçük miktarlarda da olsa inhibin hormonu salgırlar. Bu hormon özellikle hipofiz ön lobundan FSH salgılanmasını baskılar. FSH ve LH'nun kanda düşük düzeylere inmesi ve bu hormonların kaybolması halinde korpus luteum'un tümü dejenere olur. Bu olaya korpus luteum'un involusyonu denir. Korpus luteum'dan östrojen, progesteron ve inhibin

hormonları salgılanmadığı anda hipofiz ön lobu üzerinde baskılayıcı geri bildirim (feedback) etkisi ortadan kalkar ve bez yine bir miktar FSH ve birkaç gün sonra da daha yavaş artışlarla LH salgılamaya başlar. FSH ve LH yeni bir menstrüal döngüde yeni folliküllerin büyümesini başlatır. Ancak, bu folliküller yeterince gelişme gösteremezler, çünkü östrojen ve progesteron yokluğu uterus'ta menstruasyonu olaylatır.^{40,41}

Ovaryum Hormonları Östradiol ve Progesteron'nun Yapısı ve İşlevleri

Ovaryum'un cinsel hormonlarından olan östrojen'lerin en önemlisi östradiyol hormonu, progestinlerin en önemlisi de progesteron'dur. Östrojen'ler başlıca vücutta sekonder kadın seks karakterlerini veren özgül hücrelerin çoğalma ve büyümesini sağlarlar. Diğer yandan progestinlerin tümü uterus'un gebeliğe, meme bezlerinin de laktasyona son hazırlıklarını yürütürler.^{40,41}

Östrojen'lerin Yapısı

Gebe olmayan normal bir kadında östrojen, yüksek miktarlarda ovaryum'lardan az olarak da adrenal korteks'ten salgılanırlar. Gebelikte ise çok büyük miktarlarda plasenta'dan salınırlar. Kadın plazmasında önemli oranlarda 3 tip östrojen görülür. Bunlar 17 β östradiol, östron ve östriyol'dür. Bunlar A halkalarında 10. karbona bağlı angüler bir metil grubu ya da bir Δ^4 -3-keto yapısı içermeyen 18 karbonlu steroidlerdir.^{40,41}

Ovaryum'lardan salınan en önemli östrojen 17 β östradiol'dür. 17 β östradiol'ün östrojenik kuvveti östron'a karşın 12 kat, östriyole göre 80 kat daha fazladır. Bu nedenle östradiol'ün en önemli östrojen olduğu, buna karşın östron'un östrojenik etkisinin düşük düzeyde olduğu söylenebilir. Dolaşımdaki östradiol'ün %2'si serbesttir. Kalanı ise, %60'ı albümin'e, %38'i testosteron'u da bağlayan gonadal steroid bağlayıcı globulin (GBG) olarak proteinlere bağlıdır.^{40,41}

Östron ise çoğunlukla, adrenal korteks ve ovaryum teka hücrelerinden salgılanan androjenlerin periferik dokulardaki dönüşümlerinden kaynaklanır. Östron dolaşımında 17β östradiol ile denge halindedir. Östron daha sonra östriyol'e dönüşür. Bu dönüşümün büyük bir kısmının karaciğerde gerçekleştiği düşünülmektedir.^{40,41}

Östriyol zayıf bir östrojen'dir ve özellikle karaciğerde, östradiol ve östron'un oksidasyon ürünü olarak ortaya çıkar.^{40,41}

Östrojen'ler ovaryum'larda teka interna, granüloza hücreleri ve korpus luteum'lardan salgılanırlar. Biyosentetik yolla androjenlerden oluşurlar. Yani dolaşımdaki androstenedion'un aromatisasyonu ile sentezlenirler. Aromataz androstenedion'un östron'a, testosteron'un ise östradiol'e dönüşümünü katalizleyen enzimdir. Teka interna hücrelerinde çok sayıda LH reseptörü vardır ve LH, cAMP üzerinden etki göstererek kolesterol'ün androstenedion'a dönüşümünü artırır. Androstenedion'un bir kısmı östradiol'e dönüşür ve östradiol dolaşıma geçer. Teka interna hücreleri aynı zamanda granüloza hücrelerine de androstenedion sağlar. Androjen sağlanınca, granüloza hücreleri östradiol sentezler. Granüloza hücrelerinde ise çok sayıda FSH reseptörü vardır. FSH, cAMP üzerinden etki göstererek aromataz yetisini artırıp bu hücrelerin östradiol salgısını güçlendirir.^{40,41} Olgunlaşan granüloza hücreleri LH reseptörleri de kazanır ve LH östradiol yapımını uyarır. Ovaryum'un stromal dokusu da androjen ve östrojen sentezleyebilir. Ancak bu sentez menopoz öncesindeki normal kadınlarda ve önemsiz miktarlarda gerçekleşir.^{40,41}

Menstrüal döngü sırasında plazma östradiol düzeyinde gözlenen değişikliklerin tamamı ovaryum kökenlidir. Salgının 2 tepe değeri olup biri ovulasyondan hemen önce, diğeri luteal evrenin ortasındadır. Östradiol'ün salgılanma hızı erken folliküler evrede $36 \mu\text{g/gün}$ ($133 \mu\text{mol/gün}$), ovulasyondan hemen önce $380 \mu\text{g/gün}$, luteal evrenin ortasında $250 \mu\text{g/gün}$ 'dür. Menopozdan

sonra östrojen salgısı düşük düzeylere iner. Buna karşın, erkeklerdeki östradiol yapım hızı yaklaşık 50 µg/gün'dür (180 µmol/gün).^{40,41}

Östrojen'lerin yıkımı karaciğerde gerçekleşir. Karaciğer östrojen'leri, glukuronid ve sülfatlar halinde bağlar. Bağlı ürünlerin beşte biri safra ile geri kalanın çoğu idrarla atılır. Bunun yanında, karaciğer kuvvetli östrojenler, östradiol ve östron'u tümüyle etkisiz-östrojen olan östriyol'e dönüştürür. Bu nedenle, karaciğer işlevlerinin zayıflamasıyla, vücutta östrojen aktivitesi artarak bazen hiperöstrinizm'e yol açar.^{40,41}

Östrojen'lerin İşlevleri:

Östrojen'ler çocukluk evresinde çok az miktarlarda salgılanırlar; pubertede ise salgılanan miktar hipofiz gonadotropik hormonların etkisi altında 20 kat ya da daha yüksek oranda artış gösterir. Bu sırada kadının genital organları çocuk görüntüsünden erişkin görüntüsüne dönüşür. Puberte sonrası, birkaç yıl içinde uterus'un boyutları iki ya da üç kat artış gösterir. Östrojen'ler endometriyal stromada belirgin hücre çoğalmasına ve endometriyal bezlerde büyümeye yol açarak, daha sonraki günlerde implante olacak blastosist'in beslenmesine yardımcı olurlar. Ayrıca, östrojen'ler vajina epitelini kübik şekilden, çok sıralı epitel şekline dönüştürerek, puberte öncesine göre travma ve enfeksiyonlara karşı daha dirençli hale getirir.^{40,41}

Östrojen'ler uterus endometriyum'una yaptıkları benzer etkiyi, tuba uterinallardaki mukoza katmanlarına da yaparlar. Salgı oluşturan hücrelerin çoğalmasında ve daha da önemlisi, lümene uzanan silyalı epitel hücrelerinin sayısında ve uterus' doğru hareket sayısında artış sağlarlar.^{40,41}

Ayrıca, memede stromal dokuyu geliştirir, kanal sistemlerinin gelişmesini ve memede yağ birikmesini sağlarlar. Meme bezlerinde lobul ve alveollerin gelişimi, tek başına östrojen etkisi altında gerçekleşmez. Bu yapıların

gelişiminin tamamlanması ve işlevsel özelliklerini kazanabilmesi için progesteron ve prolaktin hormonlarının desteği gereklidir.^{40,41}

Östrojen'ler osteoblastik aktivitenin artmasına neden olurlar. Bu nedenle, pubertede kadınların üreme çağına girmesiyle birlikte birkaç yıl, büyüme hızı son derece hızlıdır. Bunun yanında, uzun kemiklerin epifizlerinin erken birleşmesine yol açar. Bu etki erkekte testosteron'un etkisine eşdeğerdir; ancak kadında çok daha kuvvetlidir. Sonuç olarak, genelde kadında büyüme olayı, erkeğin büyümesinden daha erken yıllar öncesinde kesilir.^{40,41}

Östrojen'ler total vücut proteinini hafifçe arttırlar. Östrojen uygulaması sonrasında, nitrojen dengesinin pozitif tarafa kayması da bunun kanıtıdır. Testosteron'un protein depolanmasında etkisi, östrojen'lere oranla daha yaygın ve son derece güçlüdür.^{40,41}

Östrojen'ler vücutta metabolik hızı zayıf olarak arttırlar. Bu artış, erkek seks hormonu testosteron'un etkisine göre 1/3 oranda daha düşüktür. Bunun yanında deri altı yağ dokusunu artırıcı etkisi de vardır. Östrojen'ler yağın göğüs, derialtı ve kalçalarda birikmesine yol açar.^{40,41}

Östrojen'ler puberte sonrasında pubis ve aksillar bölgede kılların çoğalmasını sağlarlar. Bu olayın başlıca yükümlüsü, puberte sonrasında kadın adrenal bezinden fazla miktarda östrojen salgılanmasıdır. Ayrıca bu hormon derinin yumuşak ve genelde düzgün olmasını sağlarlar. Derinin normale göre daha çok damarlanmasına neden olurlar. Bu durum derinin daha sıcak olmasına ve erkeğe göre kanlanmanın daha çok olmasına etki eder. Puberte sonrasında, adrenal androjenlerin artması, aksiller ter bezlerinin daha fazla salgı yapmasına ve akneye yol açar.^{40,41}

Östrojen'lerin, aldosteron ve diğer adrenokortikal hormonlar gibi, böbrek tübüllerinde sodyum ve suyun geri emilimine neden olduğu belirtilmektedir.^{40,41}

Ayrıca östrojen'ler salgılandıktan sonra, hedef hücrelere ulaşmadan önce ancak birkaç dakikalık süre içinde dolaşımda kalırlar. Hücrelere girdikten sonra 10-15 saniye içinde sitoplazmada bir reseptör proteinle birleşirler ve çekirdeğe geçerler. Bu da kromozomal DNA'nın özgül bölümüyle etkileşerek, transkripsiyon işlemini başlatır. Böylece birkaç dakika içinde RNA üretimi başlar. Buna ek olarak birkaç saat sonra yeni DNA oluşabilir ve hücre bölünmesi gerçekleşir. Sitoplazmaya diffüze olan RNA, protein oluşumunu büyük ölçüde arttırarak hücre işlevini değiştirir.^{40,41}

Progestinlerin Yapısı

Progestinler içinde en önemli hormon 21 karbonlu progesteron'dur. Ancak, düşük düzeylerde bulunan bir diğer progestin, 17 α -hidroksiprogesteron'dur. Bu hormon progesteron'la birlikte salgılanır ve aynı etkiye sahiptir. Bu nedenle progesteron tek önemli progestin olarak kabul edilmektedir.^{40,41}

Gebe olmayan normal bir kadında, progesteron menstrüal döngünün yalnız ikinci yarısında, korpus luteum'dan salgılanır. Döngünün ilk yarısında plazmada bulunan düşük düzeydeki progesteron ise eşit olarak ovaryum'lar ve adrenal korteks'ten salgılanır. Gebelik sırasında ise özellikle gebeliğin 4. ayından sonra plasenta'dan yüksek düzeylerde progesteron salgılanır. Progesteron steroid hormonları salgılayan tüm dokulardaki steroid biyosentezinin önemli bir ara ürünüdür. Düşük düzeylerdeki progesteron testis ve adrenal korteks'ten de dolaşıma katılır. Ovaryum follikülünden östrojen'ler ile birlikte 17 α -hidroksiprogesteron da salgılanır ve 17 β -östradiol'ün salgısına eşdeşdir. Dolaşımdaki progesteron'un yaklaşık %2'si serbesttir, %80'i albumin'e, %18'i ise

kortikosteroid-bağlayıcı globulin'e bağlıdır. Yarı ömrü kısa olan progesteron karaciğerde pregnanediol'e dönüştürüldükten sonra glukuronik asit ile birleştirilip idrarla atılır.^{40,41}

Plazma progesteron düzeyi erkeklerde yaklaşık 0,3 ng/ml (1nmol/L), kadınlarda menstrüel döngünün folliküler evresinde yaklaşık 0,9 ng/ml (3 nmol/L) dir. Farkın nedeni ovaryum follikül hücrelerinden düşük düzeyde progesteron salgılanmasıdır. Teka hücrelerinin granüloza hücrelerine sağladığı pregnelon burada progesteron'a dönüştürülür. Folliküler evrenin sonuna doğru progesteron salgısı artmaya başlar. Luteal evrede korpus luteum'dan yüksek düzeyde progesteron salgılanır, ovaryum kökenli salgı ise yaklaşık 20 kat artar. Sonuçta plazma progesteron düzeyi yaklaşık 18 ng/ml (60 nmol/L) olan tepe değerine yükselir. LH'nun korpus luteum'dan progesteron salgılanmasını uyarıcı etkisi adenilat siklaz'ın işlev kazanması ile başlar, bundan sonraki aşam protein sentezine bağlıdır.^{40,41}

Progesteron'un İşlevleri

Progesteron'un en önemli işlevi kadın menstrüel döngüsünün ikinci yarısında uterus endometriyumunda salgılama ile ilgili değişimleri başlatarak, uterus'u blastosist'in implantasyonuna hazırlamaktır. Ayrıca uterus kasılmalarının şiddetini ve frekansını azaltarak implante blastosist'in atılmasını engeller.^{40,41}

Progesteron aynı zamanda, tuba uterina mukozasında salgılama ile ilgili değişimleri başlatır. Salgı, döllenmeden sonra uterus tüplerinde ilerleyen zigot'un implantasyondan önce beslenmesi için gereklidir.^{40,41}

Progesteron alveol hücrelerinin çoğalmasıyla memelerdeki lobül ve alveollerin gelişimini hızlandırır. Böylece memeler büyüyerek salgılayıcı bir yapı kazanırlar.^{40,41}

Yüksek düzeylerdeki progesteron östrojen'ler, testosteron ve adrenokortikal hormonlar gibi böbrek distal tubuluslerinden sodyum, klor ve suyun geri emilimini arttırabilir. Ayrıca progesteron çok sık olarak sodyum ve su atılımını arttırır. Progesteron ve aldesteron arasında bir yakınlık vardır. Tübül epitel hücrelerinden sodyum iyonlarının taşınmasını sağlayan bu iki hormon aynı reseptör proteinlerine bağlanırlar. Progesteron protein molekülleriyle bağlandığında aldesteron bağlanamaz. Progesteron aldesteron'un etkisine göre çok daha düşük düzeyde sodyum taşınımına yol açar. Bu nedenle, progesteron böbrek tübüllerinden sodyum ve suyun geri emilimini ancak düşük düzeyde etkileyebilir.^{40,41} Hormonun etkisi daha çok, aldesteron'un etkisini baskılamaktadır. Bu şekilde vücutta belirgin bir su ve sodyum kaybı oluşur.^{40,41}

Hipotalamus'tan Salgılanan GnRH

Hipofiz ön lobu hormonlarının çoğunluğu, hipotalamus'dan salgılanan serbestleştirici hormonlarca denetlenir. Bu hormonlar hipofiz ön lobuna, hipotalamik-hipofizier portal sistem yoluyla taşınırlar. Gonadotropinlerin uyarılmasında, serbestleştirici hormon olan GnRH oldukça önemlidir. Hipotalamus'un GnRH salgılanması sürekli değildir. Salgısı her 1-3 saatte bir gerçekleşir ve birkaç dakika süreyle devam eder. GnRH sürekli uygulandığında hipofiz ön lobunun FSH ve LH salgısı kaybolur. Buna bağlı olarak, GnRH'un aralıklı salgılanması bilinmeyen nedenlerle hormonun işlevsel olması açısından önemlidir. GnRH'nun aralıklı salgılanması, aynı şekilde aralıklı LH salınımına ve FSH salgılanmasının azalmasına ya da artmasına neden olur.^{40,41}

GnRH'ın aralıklı salgılanması hipotalamus'un orta-alt bölgesinde arkuat çekirdeklerde sinirsel uyarı sonucu gerçekleşir. Bu nedenle, arkuat çekirdekler dişilerde cinsel aktivitelerin pek çoğunu denetlemektedir. Bunun yanında ön hipotalamus'un preoptik bölgesinde yerleşik nöronların orta düzeyde GnRH salgıladığı saptanmıştır.^{40,41}

5. OVARYUM'UN FOLLİKÜL GELİŞİMİNDE ETKİLİ MOLEKÜLLER

Ovaryum'ların işlevlerini sürdürebilmeleri için gerekli en önemli etken folliküler yaşam ve ölüm mekanizması arasındaki dengedir. Bu iki anahtar etken, gebeliğin gerçekleşebilmesi için kaliteli oosit'lerin seçilmesini ve ovulasyonla atılmasını sağlarlar.

Folliküler Yaşam Mekanizmasını Yürüten Moleküller;

Folliküler yaşam, endokrin ve parakrin etkenlerce düzenlenir.⁴²

Endokrin etkenler;

FSH ve LH'dır.

Parakrin etkenler;

Dönüştürücü Büyüme Faktörü β (TGF- β) ailesi,
İnsülin Büyüme Faktörü 1 (IGF-1) ve Reseptörü (IGF-1R),
Epidermal Büyüme Faktörü (EGF),
Temel Fibroblast Büyüme Faktörü (bFGF),
İnterlökin 1 β (IL-1 β),
Smadlar (smad-2,-4),
Apoptozis Ailesi İnhibitörleri (IAP),
c-KIT reseptörleri,
Prohibitin,
İntegrinler (integrin β 1, α 6),
Endothelinler (ET-1,-2,-3),
Gonadotropinler (GNRH-I ve GNRH-II),
Nörotropin (NT), Nöronal Apoptozisi Baskılayan Protein (NAIP),
GATA-4, İnterferonlar (IFN α , IFN β) (Şekil-1).

Moleküller	İşlevleri	İşlev mekanizmaları
Bcl-2	Öncül-yaşam	Apaf-1/kaspazlar/Bax etkileşimi
Bax	Öncül-apoptotik	P53/Bcl-2/Bcl-XL/c-Myc etkileşimi
Bok	Öncül-apoptotik	Bok/sitokrom c etkileşimi
Bad	Öncül-apoptotik	Bad/yaşam faktörleri etkileşimi
Bcl-x	Öncül-yaşam	Bcl-2/Mcl-1/Bax/c-Myc etkileşimi
Mcl-1	Öncül-yaşam	Bcl-2/Mcl-1/Bax/c-Myc/Mcl-1/sitokrom c etkileşimi
Bcl-XL	Öncül-yaşam	Bcl-2/Mcl-1/Bax/c-Myc etkileşimi
Boo	Öncül-yaşam	Mcl-1/Apaf-1/Kaspaz9 etkileşimi
Bak	Öncül-apoptotik	Boo-Apaf-1 parçalanması
Bik	Öncül-apoptotik	Boo-Apaf-1 parçalanması
TNF- α	Öncül-apoptotik	TNF/TNFR1/hücre içi dönüştürücüler/kaspaz Bcl-2 etkileşimi
TRAIL	Öncül-yaşam	TRAIL/TRAIL reseptörleri etkileşimi
Fas ve FasL	Öncül-apoptotik	Sistein proteazlar/ICE/kaspazlar/gonadotropin etkileşimleri
TVB	Öncül-yaşam	Ölüm reseptörleri ve bölgeleri ile etkileşim
Kaspazlar	Öncül-apoptotik	Apaf-1/hücre içi dönüştürücülerin etkileşimleri
P53	Öncül-apoptotik	Bcl2-Bax/cAMP/klustrin etkileşimleri
GATA-4	Öncül-yaşam	GATA-4/gonadotropinlerin etkileşimleri
GATA-6	Öncül-yaşam	GATA-4/gonadotropinlerin etkileşimleri
Prohibitin	Öncül-apoptotik	Mitokondriyal destabilizasyon
C-Kit	Öncül-yaşam	SCF ile etkileşim
SCF	Öncül-yaşam	c-Kit etkileşimleri
c-Myc	Öncül-apoptotik	c-Myc/Bcl-2 etkileşimleri
IAP	Öncül-yaşam	Kaspazlarla etkileşim
XIAP	Öncül-yaşam	XIAP/FSH/Nf κ B etkileşimi
Integrin	Öncül-yaşam	Diğer hücre dışı ortam proteinleriyle etkileşim
Integrin- α 6	Öncül-yaşam	Diğer hücre dışı ortam proteinleriyle etkileşim
Integrin- β	Öncül-yaşam	Diğer hücre dışı ortam proteinleriyle etkileşim
Integrin- β 4	Öncül-yaşam	Diğer hücre dışı ortam proteinleriyle etkileşim
Interferon	Öncül-apoptotik	Fas ile etkileşim
APAF-1	Öncül-apoptotik	Sitokrom c/kaspaz 9/Boo etkileşimi
Nf κ B	Öncül-yaşam	Öncül-yaşam moleküllerin değişimi ve kaspaz baskılayıcıları
Survivin	Öncül-yaşam	Kaspazların işlevlerinin baskılanması
Gonadotropinler	Öncül-yaşam	BAX/Apaf-1/Fas/P53 etkileşimi
Endotelinler	Öncül-apoptotik	2 G proteinin çiftine bağlanan reseptörler
Par-4	Öncül-apoptotik	Smad/nükleer co-represörler/transkripsiyon faktörleri
Granzim B	Öncül-yaşam	Apoptotik sinyallerin mitokondriyolara geçmesini sağlar
PGF	Öncül-apoptotik	Bilinmiyor
NAIPS	Öncül-yaşam	Gonadotropinler ile etkileşim
Inhibin	Öncül-yaşam	Bilinmiyor
Aktivin	Öncül-yaşam	Bilinmiyor
TGF- β 1	Öncül-yaşam	Smad/transkripsiyon faktörleriyle etkileşim
TGF- β 2,3	Öncül-yaşam	Smad/transkripsiyon faktörleriyle etkileşim
TGF- β RII	Öncül-yaşam	Smad/transkripsiyon faktörleriyle etkileşim
GDF-9	Öncül-yaşam	c-Kit/inhibin- α ile etkileşim
BMP	Öncül-yaşam	Bilinmiyor (Folikülogenezis)
Smad 2,4	Öncül-yaşam	Transkripsiyonel düzenleyiciler ile etkileşim
IGF	Öncül-yaşam	IGFB protein ile etkileşim
NTS	Öncül-yaşam	TrkB kinaz reseptör
NOBOX	Öncül-yaşam	GDF-9 ile etkileşim
AHR	Öncül-yaşam	Polisiklik aromatik hidrokarbon ile etkileşim

Şekil-1: Follikül gelişiminde etkili moleküller

Dönüştürücü Büyüme Faktörü β (TGF- β)

TGF- β ailesi işlevsel özelliklerine göre 35 alt gruba ayrılır. Bunların en bilinenleri; TGF- β_1 , - β_2 , - β_3 , Aktivin, İnhibin, Kemik Morfogenik Proteinleri (BMP-2,-4,-5,-6,-7), Büyüme Farklılaşma Faktörü 9 (GDF-9), Glial Hücreden Üretilen Nörotrofik Faktör (GDNF), Nodal, Anti Mülleryan Hormon (AMH)'dur.⁴³

TGF- β ailesi üyeleri hücrel çöğalmayı, farklılaşmayı ve hücre dışı ortam ile etkileşimi denetleyen çok fonksiyonlu sitokinlerdir. TGF- β öncül-hormon olarak sentezlenir ve salgı sırasında aminoasit ve bir karboksi terminal bölgesine ayrılır.⁴²

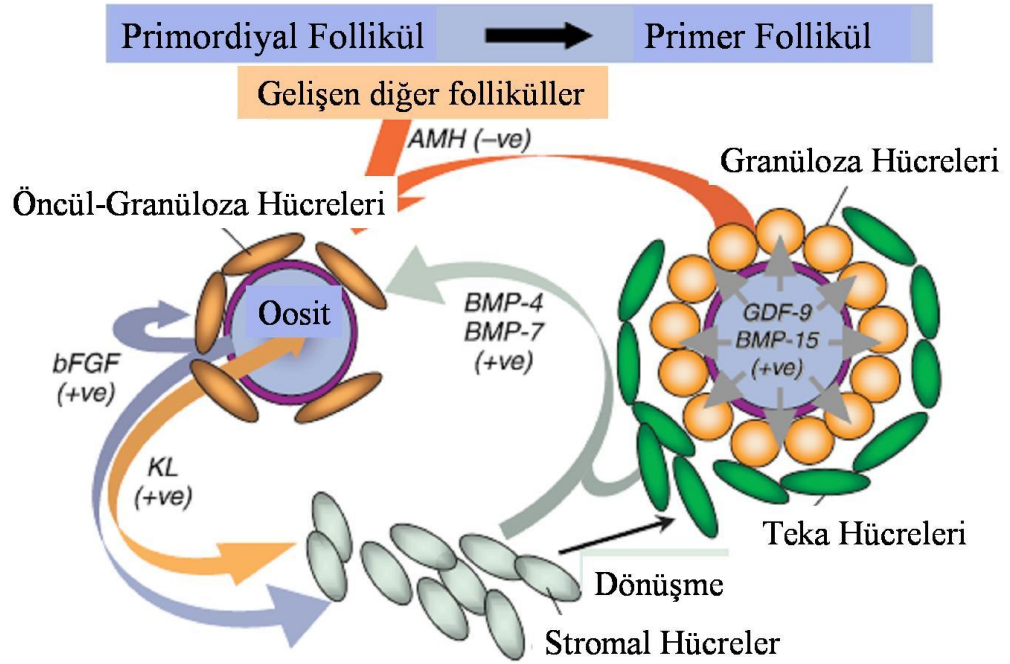
TGF- β sinyali 2 basit aşamada gerçekleşir: Reseptör ve Smad aktivasyonu. Memeliler 3 tip TGF- β ligandı içerirler (TGF- β_1 , - β_2 , - β_3). Bu ligandlar transmembran reseptörleriyle sitoplazmik serin-threonin kinaz bölgelerinin aktivasyonunu sağlayarak sinyal akışını başlatır. TGF- β ailesini oluşturan moleküllerin çoğu hedef hücrelerin yüzeylerindeki tip-I, tip-II ser/thr kinaz reseptörleriyle etkileşime girerler. Ligand bağlayan tip-II reseptör kinaz uyarılır ve tip-I reseptörlerini aktive eder. Bu fosforilasyon olayları tip-I reseptör kinaz'ın aktive olmasıyla ve sinyal akımını başlatmasıyla sonuçlanır. Bu hetero-teramerik bileşen ligandı, smadları (smad-3,-4) fosforile eder. Fosforilasyon gerçekleştiğinde ligand/reseptör smad molekülü çekirdeğe geçer ve özgül proteinlerle etkileşime girer. TGF- β 'nın tüm biyolojik etkileri smad bağımlıdır.⁴³

TGF- β_1 ovaryum korpus luteum'unda ve oosit'lerde kuvvetli olarak salınırken, teka hücrelerinde ve atretik folliküllerde salınımı zayıftır. Küçük ve orta büyüklükteki folliküllerin granüloza hücrelerinde gözlenmez. Buna karşın, TGF- β_2 , β_3 ve TGF- β tip II reseptörü antral folliküllerin granüloza hücrelerinde ve oosit'lerde salınmaktadır.⁴⁴

Büyüme Farklılaşma Faktörü 9 (GDF-9)

GDF-9, TGF- β ailesinin bir üyesidir. Memeli oosit'lerinde folliküler gelişim süresince kuvvetli düzeylerde salınır ve eksikliği follikülogenezisi baskılar. Yapılan çalışmalarda granüloza hücre çoğalmasını, tersiyer follikül büyümesini, kumulus hücre yayılmasını arttırdığı, FSH tetiklenmiş cAMP üretimini ve steroidogenezi baskıladığı gösterilmiştir.⁴³ Kültür ortamlarına GDF-9 eklenerek yüksek düzeylerde sağlıklı follikül elde edilmesi ile bu molekülün folliküllerin yaşamasındaki önemli rolü kanıtlanmıştır.⁴³ GDF-9 eksik folliküllerde teka hücre katmanının sinyal moleküllerinde (17 α -hidroksilaz, LH reseptörü ve c-kit) azalma görülmüştür.⁴⁴ Yapılan çalışmalarda kemirgen ve insan ovaryum dokuları invitro ortamda GDF-9'a etkin kaldıklarında primer follikül gelişiminin hızlandığı gösterilmiştir.⁴⁵

GDF-9 folliküler gelişim evresinde özellikle primordiyal follikülden primer folliküle geçişte son derece önemli rol oynamaktadır. Primordiyal folliküllerde, oosit'lerin çevresini saran yassı follikül hücreleri Temel Fibroblast Büyüme Faktörü (bFGF) ve Kit Ligand (KL)'ları salgırlar. Bu sinyaller hem doğrudan yassı follikül hücrelerinin kendilerine hem de oosit ve stromal/intersitisyel hücrelere büyümeyi tetikleyici etki yaprlar. Ardından stromal/intersitisyel hücreler ve çevrelerindeki teka hücreleri BMP-4 ve BMP-7'i salgırlar. TGF- β ailesinden olan BMP-4 ve BMP-7 follikül etkinliğini ve yaşamını güçlendiren sinyallerdir. Bu sinyal akımının etkisiyle primordiyal follikül, primer folliküle dönüşür. Ardından primer follikül'ün oosit'i GDF-9 ve BMP-15'i salgırlar. Bu iki sinyal molekülü oosit'in çevresini saran granüloza hücrelerinin etkinliğini ve çoğalmasını sağlar. Gelişen granüloza hücreleri ise Anti Mülleryan Hormon (AMH) salgılayarak diğer primordiyal folliküllerin gelişmesini ve primordiyal folliküllerin oosit'lerinden bFGF ile kit ligand KL'larını salgılanmalarını başlatır.⁴³ (Şekil-2)



Şekil-2: Primordiyal follikülden primer folliküle geçiş mekanizması.

Proliferasyon Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA)

PCNA hücre döngüsünü düzenlemede gerekli 36 kDa'lık bir moleküldür. DNA hasarının onarımı süresince DNA sentezinde gereklidir ve S fazında DNA polimeraz delta için ko-faktör olarak görev alır. PCNA molekülü geçici dağılıma sahip olduğu için hücre çoğalması çalışmalarında oldukça kullanışlıdır. Hücre döngüsünün G1 fazında birikmeye başlar, S fazı süresince en yüksek düzeye ulaşır ve G2/M fazında düşer.⁴⁶ Ovaryum folliküllerinin büyüme ve gelişimi granüloza hücrelerinin çoğalması ve farklılaşmasıyla tanımlanır. Folliküler büyümenin erken evresinde granüloza hücreleri son derece yavaş çoğalma gösterir. Gelişen folliküllerin granüloza hücreleri gonadotropin uyarısına karşı yanıt başlatabilir ve yüksek düzeylerde östradiol salgırlar. Gonadotropinler ve östradiol granüloza hücrelerinin çoğalma fazını başlatabilir. Fare ve sıçanlar ile yapılan çalışmalarda, granüloza hücre çoğalmasının hızlı evresinin antrum oluşumu sırasında gerçekleştiği gösterilmiştir.⁴⁶ Östradiol'ün en fazla salındığı, folliküler büyümenin son evresinde hücre çoğalması belirgin olarak azalır. Bu en geniş follikül ovulasyon öncesi aşamaya giremez ve DNA sentezi ve granüloza

hücre çoğalması baskılanarak atreziye uğrar. Ovaryum'da in vivo ve in vitro yapılan çalışmalarda sıçan, sığır ve domuzlarda PCNA salınımının başlangıç ve erken folliküllerde olaylandığı gösterilmiştir.^{46,47}

Folliküler Ölüm Mekanizmasını Yürüten Moleküller;

Doğumda ovaryum'larda yerleşik folliküllerin % 99,9'u hiçbir zaman ovulasyonla atılamaz. Bu folliküllerin çoğu apoptozis olarak adlandırılan programlı hücre ölüm mekanizmasıyla atreziye uğrar. Büyümekte olan folliküllerin karmaşık bir düzenlenim ile azaltılmasındaki en belirgin aşama granüloza hücre ölümüdür. Folliküllerin büyüme ve farklılaşması süresince olaylanan atrezi, folliküler gelişimin her aşamasında görülür.⁴²

Ovaryum'da hormonlar, büyüme faktörleri ve sitokinler gibi apoptozisi düzenleyen çok sayıda özelleşmiş molekül bulunmaktadır. Sistem follikül için ölüm kararı veriyse apoptotik ölümün yürütülebilmesi için çok sayıda alt program devreye girer. Apoptotik işlem iki genel mekanizma ile olaylanır; ölüm moleküllerinin hücre yüzey reseptörlerine bağlanmasıyla yürütülen Fas yolu (ölüm reseptör aracılı yol) ve hücre içinde gerçekleşen sinyallerle yürüyülen Bax yolu (mitokondriyon aracılı yol) (Şekil-3).^{42,48}

Fas yolu; Tümör Nekroz Ailesine (TNF) ait zar proteinleri olan TNF α ve FasL hücre zarındaki reseptörlerine bağlanarak (TNF-R1 ve FasR) Ölümü Tetikleyen Sinyal Bileşeni (DISC) ve Fas Bağlantılı Ölüm Proteini (FAAD) gibi sitoplazmik proteinlerin bağlanmasını sağlar. Bu proteinler prokaspazların etkin kaspazlara dönüşümünü gerçekleştirir. Aktive olmuş kaspazlar, sitoplazma içinde birbirine bağlı olarak bulunan kaspaz-aktive eden DNase baskılayıcısı (ICAD) ile kaspaz-aktive edilmiş DNase'ın (CAD) birbirinden ayrılmasını sağlar. Bunun sonucu olarak DNA parçalara ayrılır. Ayrıca kaspazlar DNA onarım enzimleri olan PARP (poly ADP-ribose polymerase) ve DNA protein kinaz'ı yıkarak kromatinde kırılmalara neden olur.^{49,50}

Kaspaz Ailesi

Kaspaz ailesi apoptozisin başlatılması, yürütülmesi ve sonlandırılmasında son derece önemli rol oynayan hücre içi proteazlardır. Kaspaz adını iki katalitik aktiviteden alır. ‘c’ sistein proteaz aktivitesini, ‘aspase’ ise bir aspartik asit olarak parçalama, ayırma özelliğini temsil eder. Kaspazlar bir amino-terminal bölge, küçük bir alt birim (10 kDa) ve geniş bir alt birim (20 kDa) olarak 3 bölgeden oluşur. Etkin olmayan öncül enzim olarak sentezlenir.

Kaspazlar esas olarak iki alt gruba ayrılırlar; uzun öncül-bölgeli kaspazlar (kaspaz-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11, -12, -13) ve kısa öncül-bölgeli kaspazlar (kaspaz-3, -6, -7, -14). Uzun öncül-bölgeli kaspazlar genelde hücre ölümünün başlatılmasında daha erken görev alırlar ve öncül-kaspazların etkin kaspazlara dönüşümünü sağlarlar. Bu nedenle ‘apoptozisi başlatıcı kaspazlar’ olarak isimlendirilirler. Kısa öncül-bölgeli kaspazlar ise apoptozisin başlamasından bir süre sonra görev alırlar. Poli (ADP) riboz polimerazlar (PARP), kaspaz aktive eden DNase inhibitörü (ICAD), jelsolin ve lamin gibi özel ölüm yapılarını parçalarlar. Bu nedenle bu kaspazlara yardımcı ya da etkili kaspazlar denir. Birçok başlatıcı kaspaz’ın öncül-bölgesi bir kaspaz iyileştirme bölgesi (CARD) içerir. Diğer kaspazların (kaspaz-8, -10) öncül bölgesi ise ölüm tetikleyici bölge (DED) kapsar. Başlatıcı kaspazların öncül-bölgelerinin birbirleriyle yapışması kaspaz aktivasyonu için esas etkiyi oluşturur. Herhangi bir ligandın ölüm reseptörüne bağlanması ölüm bölgesini (DD) içeren moleküllerin, DED ve CARD bölgelerini içeren uzun öncül-bölgelerin yapışmasına etki eder. Bu yapışma ‘Ölümü Tetikleyen Sinyal Bileşeni’nin (DISC) oluşmasına neden olur. DISC ise kaspaz-3’ü aktive eder. Kaspaz-9 ise APAF-1 ve sitokrom c ile apoptozom bileşenini oluşturarak aktive olur ve prokaspaz-3’ü aktive eder ⁵¹ (Şekil-3).

Ovaryum'da kaspaz-3, sağlıklı korpus luteum'ların luteal ve tekal hücrelerinden ve atretik folliküllerin granüloza hücrelerinden salındığı bilinmektedir. Bu salınım gonadotropinlerce düzenlenmektedir. Ayrıca kaspaz-3 salınımının sağlıklı folliküllerin granüloza hücrelerinde etkin olmayan şekilde (prokaspaz-3) bulunduğu bilinmektedir.⁵²

Proteaz-Apoptozis Aktive Edici Faktör-1 (APAF-1)

APAF-1 sitokrom c ve kaspaz-9'a bağlanarak apoptozisi tetikler. Kaspaz-9 ise etkin olmayan kaspazları aktive ederek hücreyi ölüme götürür. NH₂ terminal CARD bağlanma bölgesi ve COOH-terminal WD-40 tekrarlayan birimler içeren işlevsel yapıya sahiptir. Yapılan çalışmalarda CARD bölgesi ve WD-40 tekrarlayan birimlerinin kaspaz-9 ve sitokrom c ile etkileşime girerek apoptozom'u oluşturabilmesi için gerekli olduğu gösterilmiştir.^{29,30}

Ovaryum'da erken antral folliküllerin granüloza hücrelerinde APAF-1 son derece fazla salınmaktadır. APAF-1'in ovaryum'daki salınımı gonadotropinlere bağlıdır. Gonadotropin uygulamasının APAF-1'i baskıladığı, dolayısıyla granüloza hücrelerinde apoptozisi engellediği bilinmektedir.⁵⁰

6. KEMOTERAPİ

1900'lerin başlarında Paul Ehrlich, bakterilere karşı toksik kimyasal maddelerin geliştirilebileceğini düşünerek “kemoterapi” terimini kullanmıştır.⁴⁴ Paul Ehrlich, fareleri enfeksiyon modelleri olarak kullanarak antibiyotiklerin bulunuşuna yön vermiştir. Ardından George Clowes, transplante tümörleri taşıyan fare türleri geliştirmiştir.⁵³ Bu fare türleri yakın zamana değin, potansiyel kanser kemoterapotiklerinin test edilmelerini sağlayan araçlar olarak kullanılmıştır. Bu tür hayvan tümör modelleri kullanılarak, günümüze değin yaklaşık 40 yararlı anti-kanser ilaç geliştirilmiştir. İlk sitotoksik ilaç olan “nitrojen mustard” 2.Dünya Savaşı yıllarında bulunmuştur. Bu tarihten başlayarak bazı alkilleyici ajanlar, metatreksat ve 6-merkaptopürin gibi antimetabolitler, vinka alkaloidleri ve ilk tümör antibyotiği olan aktinomisin D geliştirilmiştir.⁵³

Kanserli hücrelerin çoğalması bir hücre döngüsüne bağlıdır. Bu döngüde mitoz bölünmeyi izleyerek G_1 denilen bir dinlenme evresi ve sonra yine mitoz bölünmeye hazırlık amacıyla DNA sentezinin yapıldığı S fazı vardır. S fazının hemen ardından hücrede yine G_2 denilen ikinci dinlenme fazı ve yeni mitoz gelişimi olur. Bu süreç genelde birkaç günde tamamlanır. İnsanlardaki kanserlerde, hücrelerin çoğunluğu G_0 fazı denilen uzamış dinlenme fazındadır. Çoğalma erkini geçici olarak yitirmiş olan bu hücrelerin oranı %70-90'dır. Sitotoksik ilaçların bu hücreler üzerindeki etkisi çok azdır.⁵⁴

İnsan kanserleri genelde Gompertzian modeli olarak isimlendirilen tümör büyüme kinetiğine uygun büyümektedirler. Başlangıçta bölünen hücre sayısı az olduğundan artış hızı düşüktür. Zamanla giderek hızlanan bir büyüme olur ve üst düzey tümör hacminin 1/3'üne ulaşıldığında büyüme hızı yine yavaşlar. Küçük tümörlerde oksijen ve besin gereksinimi en iyi şekilde karşılandığı için, büyüme fazladır. Sitotoksik ilaçların etkisi çoğalan hücrelere yöneliktir. Bu nedenle iyileşme şansı en çok bu erken evrede uygulanan kemoterapi ile olasıdır.⁵⁵

Hastaya kanser tanısı konulduktan ve hastalığın yaygınlığı belirlendikten sonra (evreleme) hastalığa ve evresine göre uygun tedavi yöntemleri seçilir.

Kanser tedavisinde başlıca 3 yöntem vardır:

1. İlaç tedavisi (kemoterapi, hormon tedavisi, immünoterapi, diğer yeni tedaviler)
2. Cerrahi (bölgesel)
3. Radyoterapi (RT)

Kanser tedavisinde günümüzde vazgeçilemeyecek en önemli bileşenin anti-kanser kemoterapi olduğu kabul edilmiştir. Anti-kanser kemoterapinin diğer tedavilerden en önemli farkı kanserin biyolojisi için kullanılacak ilacın klinik farmakolojik özelliklerinin iyi bilinmesi gerekir.^{53,54}

Çeşitli anti-kanser kemoterapi ajanları;

Altretamin, heksametilamin, amsakrin-AMSA, Akridinil anisidid, Anastrozol, Arsenik trioksit, Asparaginaz, Azasitidin, Bacillus Calmette-Guerin (BCG), Bekсарoten, Bevasizumab, Bleomisin, Bikalutamid, Buserelin, Busulfan, Dakarbazin, Daktinomisin, Daunorubisin, Dokсорubisin (Adriamycin), Dosetaksel, Eksemestasan, Epirubisin, Ekstramustin, Etoposid, Floksüridin, Fludarabin, Fluorourasil, Flutamid, Fulvestrant, Gefitinib, Gempitabin, Gemtuzumab, Goserelin asetat, Heksametilmelamin, Hidroksiüre, İdarubisin, İfosfamid, İmatinib mesilat, İnterferon-2a, İnterlökin-2, İrinotekan-CPT-11, Kapesitabin, Karboplatin, Kladribin, Klorambusil, Letrozol, Löprolid asetat, Medroksiprogesteron asetat, Megestrol asetat, Meklore타민, Melfalan, Merkaptopürin, Metotreksat, Mitomisin, Mitotan, Mitoksantron, Oksaliptatin, Oktreotid, Paklitaksel, Pemetreksed, Plikamisin, Prokarbazin, Raltitreksed, Rituksimab, Setuksimab, Siklofosfamid, Sisplatin, Sitarabin, Streptozin, Talidomid, Tamoksifen, Temozolomid, Tioguanin, Tiotepa, Topotekan, Trastuzumab, Vinblastin, Vindesin, Vinkristin, Vinorelbin.⁵⁵

Antikanser ajanları kanser hücrelerine etki mekanizmasına göre 3'e ayrılır.

1. DNA sentezini durduranlar: Bazı ajanlar, DNA sentezinde rol oynayan folik asit ve nükleotidleri baskırlar. Bu nedenle hücreler DNA ve RNA sentezlerini yapamazlar (Metotreksat, Fluorourasil, Hidroksiüre, Merkaptopürin).

2. Hücre çekirdeklerindeki DNA'ya doğrudan hasar verenler: Bazı ajanlar kimyasal olarak DNA ve RNA'ya hasar verirler. Böylece DNA'nın kendini kopyalaması gerçekleşemez (Siklofosfamid, Sisplatin, Doksorubicin, Etoposid).

3. Mitotik iplikçiklerin sentezini engelleyenler ya da yıkımına neden olanlar: Bazı ajanlar hücre bölünmesi sırasında mitotik iplikçiklere hasar vererek bölünmeyi durdururlar ve böylece 2 yeni hücrenin oluşmasını engellerler (Vinblastin, Vincristin, Paclitaxel).⁵³

Siklofosfamid

Siklofosfamid kanser tedavilerinde sıklıkla kullanılan kemoterapotik ve immün baskılayıcı sitostatik ajandır. Tek başına ya da diğer antineoplastik ilaçlarla birlikte özellikle, Hodgkin hastalığı, Burkitt lenfoma, akut lenfoblastik lösemi, göğüs kanseri gibi neoplastik hastalıklarda ve organ nakilleri, multiple skleroz ve bazı oto-immün hastalıklarda yaygın olarak kullanılır.⁵⁴

Kullanım: 500-1500 mg/m² i.v. 3-4 haftada bir, 60-100 mg/m²/gün p.o, 1-14 gün.

Kategori ve etki: Alkile edici ajan; DNA alkilasyonu.

Toksisite: Miyelosüpresyon, bulantı, kusma, alopesi, immünosüpresyon, sterilit, hemorajik sistit, renal tübüler süpsiyonu, akut lösemi, pulmoner fibrozis, miyokardiyal nekroz.

Metabolizma: İlaç karaciğer tarafından etkin metabolitlere dönüştürülür.

Etkili olduğu malignite: Meme kanseri, yumuşak doku sarkomları, plazma hücreli miyelom, akciğer kanseri, HDL, çocukluk çağı solid tümörleri. Siklofosfamid kombinasyon kemoterapilerinin bir bileşeni olarak da kullanılır. Bu kombinasyonların en bilinenleri, meme kanserinde adriablastina ya da fluorourasil (AC ya da CAF) ile, metotreksat ve fluorourasil (CMF) ile, ovaryum kanserinde sisplatin ile kullanılmaktadır.⁵⁵

Siklofosfamid, biyolojik olarak etkin değıldir ve metabolik aktivasyona gereksinim duyar. Sitokrom P450 enzimlerinin (CYP2A6, -2B6, -2C8, -2C9, -3A4) 4-hidroksi-siklofosfamid'e oksidasyonu yoluyla metabolik aktivasyon gösterir. 4-Hidroksi-siklofosfamid aldofosfamid'e dönüşür, ardından reaktif metabolit fosforamid mustard ve acroleine ayrışır. Bu etkin metabolitler potansiyel sitotoksik ajanlardır ve anti-kanser etkinlik gösterirler.⁵⁶ Hücre içinde önemli makro moleküllere kovalent olarak bağlanarak ovaryum gibi çeşitli organlarda toksik etkiye neden olur.

Kanser tedavisi sırasında kullanılan Siklofosfamid ve diğerkemoterapotik ajanların gen mutasyonlarına, kromozomal kırılmalara ve somatik hücrelerde anöploidiyeneden olduğu bilinmektedir.⁶ Siklofosfamid hücre döngüsüne özgü olmayan alkali ajan olarak DNA çapraz bağlarını etkiler ve hızla çoğalan hücrelerde normal hücre bölünmesini engeller. Uzun dönem kanser tedavisi kullanımlarında üreme organlarına toksik etki ederek döllenmenin bozulmasına neden olur.⁷

Ayrıca Siklofosfamid ovaryum folliküllerin granüloza hücrelerinde apoptozise etki ederek ve ovaryum glutatyon düzeylerini azaltarak ovaryum folliküllerini ortadan kaldırır.⁸ Tripeptid glutatyon (GSH) hücre içinde bol bulunan proteindir. GSH reaktif oksijen türlerinin (ROS) detoksifikasyonunda çok sayıda fizyolojik işleve sahiptir. Hücre içinde enzimler için kofaktör olarak rol alır, sistein için depo görevi görür ve proteinleri ve DNA sentezini düzenler. Hücrelerde GSH azalması apoptozisi tetikler.⁵⁷ Yetişkin sıçan ovaryum'larında

invivo olarak GSH'ın sentezinin baskılanması tersiyer follikül atrezisinin artmasına ve oluşan dejenerasyonun apoptotik sürecin başlamasına neden olduğu gösterilmiştir.⁵⁷ Bu nedenle de Siklofosfamid uygulamasının ovaryum'da GSH azalmasına ve oksidatif strese etki ederek granüloza hücrelerinde apoptozise neden olduğu bilinmektedir.

7. ANTİOKSİDANLAR

Hücrel yaşamın sürekliliği karmaşık biyokimyasal tepkimelerin denge içinde yürütmesine bağlıdır. Bu dengeyi bozacak yönde oluşan iç ya da dış kaynaklı etkenler hücre hasarına yol açarlar. Hücrede gerçekleşen radikal tepkimeleri, hücre homeostazının bir parçasıdır. Sağlıklı hücreler homeostatik olarak antioksidanların kullanılmasıyla serbest radikalleri ortadan kaldırır.⁵⁸

Antioksidanlar organik kimya ve biyoloji için son derece önemlidir. Bütün yaşayan organizmalar hücre içi ortamında oksidasyon bileşenlerince kimyasal hasardan korunmak için çeşitli antioksidanları içerirler.⁵⁸

Serbest Radikaller ve Etkileri

Hücre içinde oluşan serbest radikallerin düzeyi, antioksidanların kapasitesini aşacak olursa metabolik ve işlevsel birçok bozukluk oluşur. Dokularda, tek kalan elektronların oksijene sürekli akışı endojen oksidatif stresi oluşturur. Oksijenden türeyen süperoksit radikali, peroksit, hidroksil radikali ve diğer serbest radikaller son derece reaktiftir. Bu nedenle de hücre zarlarının bütünlüğünü sağlayan fosfolipidlerin, proteinlerin, DNA ve RNA gibi moleküllerin bütünlüğünü tehdit ederler. Çeşitli biyolojik olaylarda, örneğin; antimikrobiyal savunma, iltihaplanma, kanser, radyasyon hasarı, fotobiyolojik etkiler ve yaşlanmada reaktif oksijen türleri devreye girer. Sonuçta DNA baz

hasarları, protein oksidasyon ürünleri, lipid peroksidasyon ürünleri açığa çıkar.⁵⁸ Pasif katyon geçirgenliği ve lipid peroksidasyonu gibi etkenler hücre zarı hasarına neden olurlar.⁵⁹ Lipid peroksidasyonu bir zincir tepkimesi olup, daha ileri tepkimeyi başlatan serbest radikaller için sürekli bir kaynak sağlar. Tepkimeleri başlatan moleküler öncül madde, genelde bir hidroperoksit (ROOH) olduğundan, lipid peroksidasyonu, potansiyel olarak yıkıcı etkiler ile dallanan bir zincir reaksiyonu oluşturur.⁶⁰

Antioksidan Sistemler

Zincir kırıcı antioksidanlar, peroksid radikalleri ile doğrudan tepkimeye girerler ve zincir uzunluğunu gereken biçimde kısa tutarak peroksidasyonu engellerler. Antioksidanların işlevleri, genelde koruma, durdurma ve onarım olarak 3 şekilde sınıflandırılabilir.⁶¹

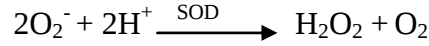
Antioksidan özelliği bulunan birçok farklı madde vardır. Bu maddelerin bir kısmı besinlerle dışarıdan alınırken, bir bölümünü vücut kendisi, serbest radikallere karşı bir savunma sistemi olarak üretir. Hücreler, reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerine karşı antioksidan savunma sistemleri ile korunurlar. Bu savunma sistemleri enzimatik ve enzimatik olmayan olarak 2 grupta toplanabilir.⁵⁸

Enzimatik sistemler; Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz (G6PD), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz, methemoglobin redüktaz, glutatyon S transferaz'dır.

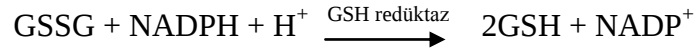
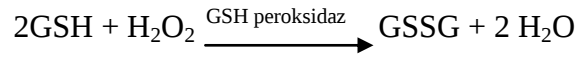
Enzimatik olmayan sistemler; Glutatyon, E vitamini, C vitamini, redükte nikotinamid adenin dinükleotit-NADH, redükte nikotinamid adenin dinükleotit fosfat-NADPH'dır.

Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz (G6PD): Pentoz-fosfat yolunun ilk aşamasını katalizler. Eksikliğinde yetersiz NADPH ve yetersiz redükte glutatyon düzeyine neden olur. (Şekil-4)

Süperoksit dismutaz (SOD): Süperoksit radikalini (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve O_2 'e dönüştürür. Süperoksit serbest radikali, oksijenin potansiyel toksik etkisinden sorumludur. Süperoksit dismutaz sitosol (Cu^{+2} ve Zn^{+2}) ve mitokondriyonda (Mn^{+2}) bulunur.



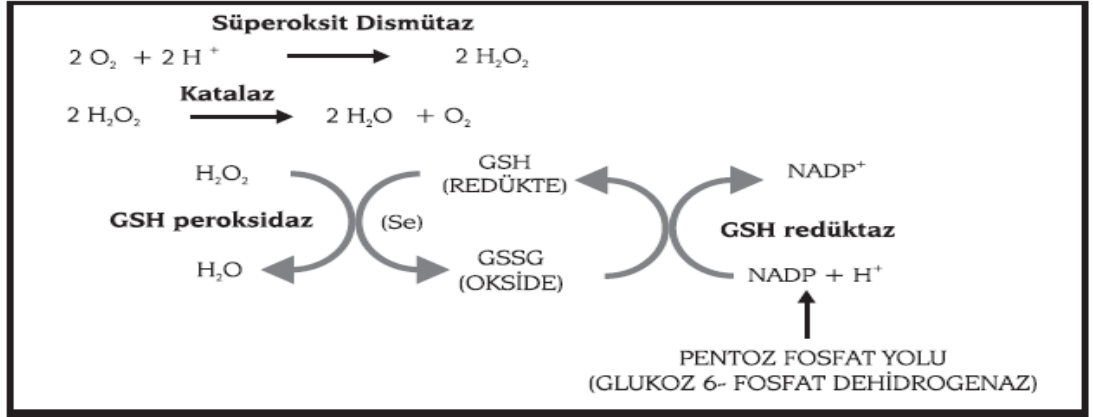
Glutasyon peroksidaz ve Glutasyon reduktaz: Glutasyon (GSH) aerobik koşullarda metabolizma ile oluşan toksik peroksitlerin uzaklaştırılması olayında görevlidir.



GSH peroksidaz etkin bölgesinde 4 adet selenyum içerir. Hücre zarı lipidlerini ve hemoglobini lipid peroksidasyonunun zararlı etkilerinden korur. GSH reduktaz ise FAD içerir.

Katalaz: Her bir alt biriminde prostetik grup olarak Fe^{+3} bulunan protoporfirin içeren bir enzimdir. Hücre içinde en bol olarak peroksizomlarda bulunur. 2 işlevi vardır:

1. Temel işlevi, süperoksit radikallerinin dismutasyonu ile ya da doğrudan oluşan H_2O_2 'nin su ve oksijene parçalanması.
2. Diğer işlevi, etanol, formik asit ve nitrit oksidasyonunu katalizlemektir.



Şekil-4: Hücre içinde gerçekleşen antioksidan mekanizması

Antioksidan savunma sistemleri, serbest oksijen radikallerine karşı 3 yolla etkilerini gösterirler: ⁶²

1- Radikal tepkimelerinin sona erdirilmesi: Bu antioksidanlar çeşitli radikalleri ortadan kaldırarak zincir reaksiyonlarının ilerlemesine engel olurlar. Bunlar; A, C, E vitaminleri, ürik asit, bilirubin, ubikinon, selenyum vb.

2- Radikal oluşumunun sınıflandırılması: Serbest radikal öncülerinin aktivasyonunu engelleyerek radikal üretimini önler. Metal iyonlarını bağlayan hücre dışı antioksidanlardır. Bunlar; transferin, albümin, seruloplazmin, haptogloblin, hemopeksin vb.

3- Oluşan radikallerin detoksifikasyonu: Memeli hücrelerinde radikal detoksifikasyonunda SAD, katalaz, GSH peroksidaz görev alır. Glutatyon'lu sistemin tamamlanması için GSH redüktaz ve Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz da devreye girer.

GSH Metabolizması ve Antioksidan Rolü

Glutatyon (GSH), biyolojik olarak iki önemli bileşen olan tiyol grubunu ve γ -glutamin bağınyı yapısında bulundurur. Glutatyon, yapısındaki sistein'in tiyol grubu içermesinden ve artan yoğunluğundan dolayı (0.1-10 mM) önemli bir antioksidandır. Hücre içinde glutatyon'un %99'dan fazlası indirgenmiş şekilde bulunur.⁶³ Bu formda tutulabilmesi pentoz fosfat metabolik yoluna bağlıdır. Bu yolda üretilen NADPH, glutatyon disülfid redüktaz (GR)'ın katalize ettiği tepkimede koenzim olarak görev alır.⁶³ Önemli bir indirgeyici olan GSH, hücre içi proteinlerin, sistein, dihidrolipoat, koenzim A gibi moleküllerin tiyol gruplarının ve askorbat, α -tokoferol gibi antioksidan moleküllerinin korunmasında etkindir. Ayrıca DNA'nın deoksiribonüklozid öncüllerinin oluşması için ribonükleotidlerin indirgenmesinde kullanılır. GSH hücrelerin oksidatif hasara, toksik bileşiklere, radyasyona karşı korunmasında, bazı ilaçların inaktivasyonunda, östrojen, prostaglandin ve lökotrienler gibi bazı endojen bileşiklerin metabolik işlemlerinde görev alır.⁶⁴

Glutatyon'un (GSH) hücre, doku ve organ sistemlerinin bütünlüğünün yapısal ve işlevsel olarak korunmasında antioksidan bir molekül olarak önemi büyüktür. Aşırı oksidatif stres ya da antioksidan potansiyelinin yetersizliğinde gözlenen oksidatif hasar sonucu, GSH düzeyi azalmakta ve serbest radikal harabiyetine bağlı olarak, patolojik durumlar oluşmaktadır. GSH, kanser, yaşlanma, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın patofizyolojisinde yer alması nedeniyle önem taşımaktadır.⁶⁴

Antioksidanların biyolojik sistem içinde çeşitli görevleri vardır. Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif hasara karşı savunma ve hücre içi önemli sinyal yollarına katılma bu görevlerden birkaçıdır. Reaktif oksijen türleri yüksek tepkime yetisine sahiptir ve lipid peroksidasyonu gibi kimyasal zincir tepkimelerle hücrelerin hasarına, apoptozis ile ölümüne ya da DNA'nın yapısını

bozarak hücrenin kanser hücreğine dönüşmesine neden olurlar. Bu nedenle tüm hücreler bu hasarlardan korunmak ya da azaltmak için antioksidan içerirler.⁶⁵

Günümüzde çok sayıda antioksidan bilinmektedir. Bunlar kimyasal özelliklerine göre çeşitli gruplar altında toplanmışlardır.⁶⁶

1- Vitaminler: A vitamini (retinol), B vitaminleri, C vitamini (askorbik asit), E vitamini (α -tokoferol)

2- Vitamin kofaktör ve mineraller: Ko enzim Q10, Manganez

3- Hormonlar: Melatonin

4- Karotenoid terpenoidler: Likopen, Lutein, Alfa karoten, Beta karoten, Zeaksantin, Astaksantin, Kantaksantin

5- Bioflavonoidler: Resveratrol, Pterostilben, Kampferol, Myrisetin, Luteolin, Apigenin, Tangeritin, Hesperetin, Naringenin, Katesin, Gallokatesin, Tiflavin, Genistein, Daidzein, Siyanidin, Malvidin, Pelargonidin, Peonidin.

6- Fenolik asitler ve esterleri: Ellacik asit, Gallik asit, Salisilik asit, Rosmarinik asit, Sınnamik asit, Klorogenik asit, Gallotannin, Ellagitannin.

7- Flavonoid olmayan fenolikler: Kurkumin, Ksantone, Silimarin, Antoksantrin

8-Diğer organik antioksidanlar: Sitrik asit, Lignan, Oksalik asit, Fitik asit, Bilirubin, Ürik asit, Alfa-Lipoik asit, N-asetil sistein.

Askorbik Asit (C vitamini)

Askorbik asit bir monosakkarit türevi olup yapıca glikoz'a ve diğer altı karbonlu monosakkaritlere benzeyen bir antioksidandır. Renksiz, beyaz, dikdörtgen biçimli, suda eriyebilen kristallerden oluşur. Askorbik asit, insanlar, yarasalar ve bazı tür domuzlarda sentezlenmediği için dışarıdan alınmak zorundadır.

Askorbik asit ile ilgili ilk bilimsel çalışmalar 1907'de Holst ve Frolich tarafından yapılmıştır. Deneylerinde, birçok besin maddesinin ve özellikle yeşil sebze ve meyvelerin skorbüt hastalığını önleyici etkileri olduğunu bulmuşlardır.⁶⁷ C. Funk 1912'de skorbüt hastalığının besinlerde bulunan bir faktörün eksikliği sonucu oluştuğunu savunmuş ve bu maddeye 'antiskorbutik vitamin' adını vermiştir.⁶⁸ 1918'de Zilva ve arkadaşları limondan antiskorbutik etkenin yoğunlaştırılması üzerinde çalışmışlar ve saf askorbik asit bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri belirlenerek izole edilmiştir.⁶⁹ Daha sonra Drummond 1920'de antiskorbutik vitamin için 'Vitamin C' adını kullanmıştır.⁷⁰ Bundan sonra birçok bağımsız araştırmacı vitaminin kimliğini belirlemek için çalışmışlar ve glikoz'dan sentezini gerçekleştirmişlerdir. 1932 yılında da 'Askorbik asit' ismi verilmiştir.

Askorbik asit oksidasyonda rol oynayan son derece önemli antioksidandır. Hidroksil radikal gibi birçok reaktif oksijen türleri eşleşmemiş elektron içerirler ve bu nedenle kuvvetli reaktiftirler. İnsan, hayvan ve bitkilerin nükleik asit, protein ve yağlarıyla tepkimeye girerek moleküler düzeyde hasar verirler. Reaktif oksijen türleri askorbik asit'ten bir elektron alarak (oksidize etmek) monodehidroaskorbat'a ardından dehidroaskorbat ve suya indirgerler. Böylece indirgenen askorbat sabit bir şekil alır ve hücrel hasarı engellemiş olur.¹¹

Besinlerdeki askorbik asit vücuda alındıktan birkaç saat sonra ince bağırsaktan emilir ve kana geçer. 100 mg ve daha az vitamin alındığında

bunun %80-90'ının emildiği belirtilmiştir. Bu sırada kandaki düzeyi kısa süre için yükselir. Kan dolaşımı ile dokulara taşınır ve fazlası böbreklerden idrarla dışarı atılır. Gereğinden fazla alınan askorbik asit'in bir bölümü de monosakkaritlerde olduğu gibi karbondioksit ve suya okside olur.⁷¹

Askorbik asit çok sayıda hidroksilasyon tepkimelerinde rol alır ve vücutta birçok kimyasal tepkimenin normal olarak yürütülmesi için gereklidir.⁷¹ Bunlar;

- 1- Kollajen sentezinde prolil ve lizil kalıntılarının hidroksilasyonu,
- 2- Tirozin yıkımı (normal aminoasit metabolizması)
- 3- Tirozinden epinefrin sentezi (adrenal hormon sentezi)
- 4- Safra asidi sentezi
- 5- Bağırsaklardan demir emilimi. Normal ferritin/hemosiderin oranlarının korunmasını sağlayarak, demirin depolanma ve dağılımını düzenler.
- 6- Antioksidan olarak çeşitli tepkimelerde (lökosit işlevleri, pek çok ilaç metabolizması) kullanılır. Moleküler oksijen, nitrat, sitokrom a ve c için indirgeyici ajandır.

Askorbik asit'in en önemli görevlerinin başında kollajen sentezinde yer alması gelir. Bu özelliği ile kan damarlarının yapısını kuvvetlendirmektedir. Vitamin yetersizliğinde kan damarları zayıflamakta ve ufak darbelerle kanamalar görülebilmektedir. Askorbik asit'in vücutta normal miktarda bulunması gebelik, zehirlenme, toksinler, enfeksiyonlar, soğuk, yaralanma gibi streslere karşı konulması için önemlidir.^{71,72}

Askorbik asit steroid hormonlarının sentezinde de görev almaktadır. Askorbik asit yetersizliğinde, böbrek üstü bezi %270 oranında büyüme göstermektedir.^{71,72}

Askorbik asit diğerk bazı besin maddelerinin vücutta kullanılması için de yardımcıdır. Demir, kalsiyum, B vitaminlerinden tiamin, riboflavin, folik asit, pantotenik asit, A ve E vitaminlerinin vücutta daha elverişli olarak kullanılabilmeleri için askorbik asit'in gerekli olduğu kanıtlanmıştır.⁷¹ Ayrıca bağırsak florasının olumlu yönde değişmesini ve dolayısı ile daha çok B vitamini sentezlenmesini sağlar. Bunun yanında aşırı askorbik asit alımının bağırsaklarda asiditeyi arttırarak B₁₂ vitamininin emilimini azalttığı da bildirilmiştir.^{71,72}

Doğada en çok askorbik asit içeren besinler: Kuşburnu (450mg/100gr), maydanoz (180mg/100gr), asma yaprağı (120mg/100gr), yeşil biber (100mg/100gr), karalahana (94mg/100gr), kivi (90mg/100gr), çilek (70mg/100gr), ıspanak (50mg/100gr), portakal (50mg/100gr), limon (50mg/100gr), greyfurt (43mg/100gr), mandalina (30mg/100gr), şeftali (28mg/100gr), domates (23mg/100gr), bögürtlen (20mg/100gr), taze fasulyedir (20mg/100gr).

Askorbik asit bazı toksik ajanların etkisini azaltmaktadır. Örneğın vücuda alınan nitritlerin kanser yapıcı nitrozom'a dönüşümünü önlemektedir.⁷¹

Askorbik asit'in dişi üreme sistemi üzerine son derece önemli etkileri olduğu bilinmektedir. Ovaryum'lar ve diğerk endokrin dokular yüksek miktarda askorbik asit biriktirirler. Ovaryum'larda askorbik asit'in luteal hücreler, granüloza ve teka hücrelerinde bulunduğu ve döllenme ile ilişkili olduğu bilinmektedir.¹⁰ Askorbik asit, ineklerde infertilite tedavisinde kullanılmıştır. Kadınlarda ovulasyonun tetiklenmesinde etkili olan klomifen'in etkisini arttırdığı bilinmektedir.¹⁰ Ancak askorbik asit'in yüksek dozu insanlarda ve sıçanlarda spontan düşüklere yol açmaktadır.¹⁰ Askorbik asit eksikliği ise dişilerde ovaryum atrofisine, folliküler atreziyi arttırdığı için de infertiliteye neden olur.¹¹ Yapılan hücre kültürü çalışmalarında kültüre eklenen askorbik asit ve diğerk antioksidanların, sıçan ovaryum folliküllerinde apoptozisi baskıladıkları gösterilmiştir.¹¹

Alfa Tokoferol (E Vitamini)

α -Tokoferol, serbest radikalleri tutarak doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu önleyen organik bir bileşendir. Özellikle hücre zarları ve lipoproteinlerde önemli işlevler gören bir antioksidandır. Yağda çözünen vitaminler içinde en az toksik olandır ve üreme sistemine olan olumlu etkisi nedeniyle antisterilite vitamini de denir. E vitamini 1922'de, beslenme ile döllenme arasındaki ilişkiyi araştıran Evans ve Bishop tarafından bulunmuştur.¹⁴ 1936'da vitamin aktivitesi sıçanlarda üreme fonksiyonlarını arttırdığı için Yunanca 'Tokoferol', yani 'gebeliğe taşıyan' olarak adlandırılmıştır. Sonraları, E vitamini aktivitesi gösteren 4 tokoferol (α , β , γ , δ) ve 4 tokotrienol'den (α , β , γ , δ) oluşan 8 bileşik bulunmuştur.¹⁴

α -Tokoferol'un çok sayıda biyolojik etkisi vardır. Sinyal iletiminde önemli bir izoenzim olan Protein Kinaz C'nin (PKC) baskılanmasında oldukça etkilidir. Pıhtılaşma sırasında trombosit yapışmasını artırır, hücre dışı sıvıların dengesini denetler ve 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-CoA) redüktaz'ın transkripsiyon sonrası baskılanmasını sağlayarak kolesterol sentezinin azaltılmasında önemli bir rol oynar. Ayrıca hücreleri oksidatif hasardan korur, bağışıklık sistemini güçlendirir. α -Tokoferol atardamar hastalıklarının ve kanserin önlenmesi için gerekli bir antioksidandır. Sinir sisteminin, kasların, hipofiz ve böbrek üstü bezi gibi endokrin bezlerin ve üreme organlarının işlevleri için önemlidir. Ayrıca nükleik asit metabolizması, askorbik asit sentezi, ve kükürtlü aminoasit metabolizmasında rol oynar. Mitokondriyonlardaki lipidin oksidatif parçalanmasını önler, keratin fosfat, adenosin trifosfat gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin de fosforilasyon işlevini düzenler.⁷³

Radikal stresin başlangıcında oluşan primer radikal, lipid radikallerin oluşumuna yol açmaktadır. Daha sonra oluşan lipid peroksil radikali, α - tokoferol radikalinin oluşumuna neden olmaktadır. Askorbik asit (vitamin C) ve α - tokoferol (vitamin E) hücre zarını oksidatif hasara karşı koruyabilen önemli antioksidanlardır. Askorbik asit, tokoferoksil radikalini indirgeyerek tokoferol'ün radikal temizleme yetisini düzenlerken, askorbik asit'in yükseltgenme-indirgenme durumu hücre içi GSH tarafından denetlenilmektedir.^{73,74} Dolayısıyla, E vitamini işlevinin sürdürülmesi ve rejenerasyonu için askorbik asit ve GSH'a gereksinim duyulmaktadır.⁷⁵

Doğada en çok α - tokoferol içeren besinler; Buğday (215,4mg/100gr), ayçiçek yağı (55,8mg/100gr), fındık (26,0mg/100gr), ceviz (20mg/100gr), zeytinyağı (12,0 mg/100gr), yumurta (10,7mg/100gr), margarin (10,2mg/100gr), yerfıstığı ve fasulye (9,0mg/100gr), mısır (2,0mg/100gr), koyun ve sığır eti (1,7mg/100gr), tavuk eti (1,6mg/100gr), yulaf (1,5mg/100gr), kestane (1,2mg/100gr), Hindistan cevizi (1,0mg/100gr), domates (0,9mg/100gr) ve havuçtur (0,6mg/100gr).

E vitamini vücutta serbest radikallerin etkisiyle oluşan hasarlara karşı koyarak, kanser gibi kronik hastalıkların gelişimini engeller. Ayrıca immün sistemi güçlendirerek de kansere karşı savaşır. Günümüzde yapılan çalışmalar kanser oranı ve E vitamini arasındaki ilişkiyi araştırmaktadır. Bazı kanıtlar fazla miktarda alınan E vitamini ve selenyum'un prostat ve meme kanserini azalttığını göstermektedir.⁷⁶

E vitamini'nin dişi üreme sistemi üzerine son derece olumlu etkisi vardır. E vitamini'nin olmadığı bir beslenme diyeti uygulanan dişi farelerde, üreme bozukluğu gözlenmiştir.¹⁴ E vitamini ovaryum'da toksinlerin uzaklaştırılmasında ve reaktif oksijen bileşiklerine karşı koruma mekanizmalarında yardımcı olmaktadır.¹⁵ Ayrıca toksik ajanların etkisiyle granüloza hücrelerinde oluşabilecek apoptozisi baskılamaktadır.¹⁶

Selenyum

Doğada inorganik ve organik olarak iki şekilde bulunur. Daha yaygın bulunan inorganik şekli genelde sodyum selenit halindedir ve oldukça zararlı etki yapabilir. Diğer organik şekli, selenometiyonin halindedir ve daha az zararlıdır.¹⁷

Selenyum'un organik şekli Glutasyon peroksidaz enziminin yapısına girer. Antioksidan olarak, C ve E vitaminleri ile yakın ilişkidir. Selenyum'un hücre zarlarını ve hücrelerin bir arada tutulmasını sağlayan antioksidan sistemi, hücreyi lipid peroksidasyon etkisinin zararlarından korur.^{17, 77}

Selenyum 1817 yılında Berzelius tarafından bulunmuştur. Yaklaşık 200 yıl sonra selenyum insan sağlığı için önemli ve gerekli element haline gelmiştir. Selenyum'un bilinen özellikleri arasında, antioksidan aktivitesi, terapötik etkisi, antiinflatuar ve antiviral özellikleri bulunmaktadır.¹⁷ Diğer metal elementler ayrıcalık olarak proteinlerle ilişki kurarak kofaktör formu alırlarken, selenyum polipeptid zincirleriyle birleşerek bir aminoasit olan selenosistein'i oluşturur. Selenoproteinler yaşamın tüm canlı zincirinde bulunurlar. Yaklaşık 30 selenoprotein türü tanımlanmıştır. Selenyum tüm memeliler için gerekli ve besleyici değeri yüksek maddedir.

Selenyum proteinlerle birleştiğinde selenosistein (Se-Cys) ve selenometiyonin (Se-Met) formunu alır. Bunlar glutasyon peroksidaz, tioredoksin reduktaz, selenoprotein P gibi selenoproteinlerin sentezinde kullanılır.¹⁷ Selenyum tedavilerinin çeşitli kanser tiplerinin gelişmesini engellediği bilinmektedir. Fazla miktarda alınması ise sitotoksik ya da karsinogeniktir. Selenoproteinlerle birleştiğinde, selenyum dokuları ve hücre zarlarını oksidatif stresten korur ve hücre redoks konumunu denetler.⁷⁷ Özellikle kan hücrelerinin kromozomlarının zarar görmesini önler. Hücrelerde ve dokularda yaşlanma olarak adlandırılan süreci yavaşlatıcı etkisi vardır.

Erkeklerde spermiyumların gelişiminde ve canlılıklarını sürdürmelerinde olumlu etkiye sahiptir. Selenyum'un protein sentezi, büyüme, beyin gelişimi ve

tiroid fonksiyonları (iyodun dolaşımdan alındıktan sonra oksidasyonu, T_4 'ün T_3 'e çevrilmesi) üzerine etkileri vardır.^{78,79}

Ayrıca selenyum'un kanser oluşmasını engelleyici etkisi bulunmaktadır. Bu etkisini nasıl gösterdiği bilimsel olarak kanıtlanamamıştır. Ağır metaller ve diğer zararlı maddelerden vücudu korur. Sigara, alkol, okside yağlar, civa, kadmiyum gibi insanlara zararlı maddelerin etkilerini azaltır.^{80,81} Çeşitli fizyolojik olayların yürütülmesi için gerekli, eksikliğinde de kardiovasküler, nöral ve immün hastalıklar görülebilen bir elementtir.

Selenyum'un glutatyon-peroksidaz (GSHpx), fosfolipid-hidroperoksid-glutatyon-peroksidaz (PH-GSHpx), iotironin 59-deiodinase (59-DI) ve selenoprotein-P bileşenleri olarak birçok biyokimyasal işlevleri vardır (14). GSHpx hücre içi ve hücre dışı hidroperoksit yoğunluğunu düzenler. PH-GSHpx yağ asidi hidroperoksitlerini fosfolipidlere indirger. Plazmadaki Selenoprotein-P serbest radikal yok edicilerindendir.⁸²

Pek çok araştırmacı selenyum ve döllenme arasındaki ilişkiyi çalışmış ve üreme bozukluklarının sadece hormonal bozuklukla ilgili olmayabileceği, besinsel eksikliklerin de üreme bozukluğuna neden olabileceğini göstermişlerdir.¹⁸ Selenyum eksikliği olan ineklerde ovaryal kistlerin ve plasental kayıpların oranı artış göstermiştir.¹⁹ Ayrıca koyunlarda selenyum'un infertiliteyi azalttığı bildirilmiştir.²⁰ Nedeni açıklanamayan infertil kadınlarda folliküler sıvıda belirgin selenyum azalması görülmüş ve bazı düşüklerin selenyum eksikliğine bağlı olduğu gösterilmiştir.²¹

Selenyum'un etkili olduğu hedef organ tam olarak bilinmemesine karşın, selenyum eksikliğinin üreme fonksiyonlarında azalmaya neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarda selenyum'un erken evredeki folliküllerin granüloza hücrelerinin çoğalmasını arttırdığı ve aynı hücrelerde gonadotropinlerin uyarıcı etkisini arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca selenyum, folliküllerden E2 salınımını arttırmaktadır^{22,17}.

III. GEREÇ VE YÖNTEM

1. Deney Hayvanları ve Gruplandırma

Bu çalışmada Hacettepe Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi'nden sağlanan Wistar Albino cinsi, 30 adet, 100-130 gr ağırlığında, genç dişi sıçanlar kullanıldı.

Denekler Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi'nde ısı 21-23°C ve ışık/zaman ayarı 14/10 saat olarak bakıma alındı.

Çalışmada kullanılan sıçanlar aşağıda belirtilen 5 gruba ayrıldı:

1. Grup (Kontrol grubu) (n:6) : 20 gün süresince 1.,2.,7.,14. ve 20. günlerde tek doz intraperitoneal (İ.P) 75 µg/kg fosfat tamponlu salin (PBS) uygulandı.
2. Grup (Siklofosfamid grubu) (n:6): 20 gün süresince 1.,2.,7.,14. ve 20. günlerde tek doz intraperitoneal (İ.P) 75 µg/kg Siklofosfamid uygulandı.
3. Grup (Siklofosfamid + askorbik asit grubu) (n:6): 20 gün süresince her gün oral olarak 200 µg/kg askorbik asit ve 1.,2.,7.,14. ve 20. günlerde tek doz intraperitoneal (İ.P) 75 µg/kg Siklofosfamid uygulandı.
4. Grup (Siklofosfamid + α-tokoferol grubu) (n:6): 20 gün süresince her gün oral olarak 150 µg/kg α-tokoferol ve 1.,2.,7.,14. ve 20. günlerde tek doz intraperitoneal (İ.P) 75 µg/kg Siklofosfamid uygulandı.
5. Grup (Siklofosfamid + selenyum grubu) (n:6): 20 gün süresince her gün oral olarak 40 µg/kg selenyum ve 1.,2.,7.,14. ve 20. günlerde tek doz intraperitoneal (İ.P) 75 µg/kg Siklofosfamid uygulandı.

20. günün sonunda sıçanlar intraperitoneal ketamin (44mg/kg) ve ksilazin enjeksiyonu ile uyutularak ötenazi gerçekleştirildi. Ötenazi sonrası deneklerin abdominal bölgeleri açılarak ovaryumları çıkarıldı. Alınan doku örnekleri ışık mikroskopik inceleme için %10'luk nötral formalin ve elektron mikroskopik inceleme için pH 7.4'de 1/15 M fosfat tamponlu %2,5'lik gluteraldehid tespit solüsyonu içine konuldular. Işık mikroskopik inceleme için 1 cm³ büyüklüğünde kesilen doku örnekleri %10'luk nötral formalinde 72 saat tespit edildiler. Daha sonra alışlagelmiş izleme yöntemlerden geçirilerek parafine gömüldüler.

2. İmmünohistokimyasal Yöntem

Çalışmada ovaryumlardaki granüloza hücrelerinde yaşam sinyallerini belirleyebilmek için Santa Cruz GDF-9-goat poliklonal primer antikor (Cat= sc-7407, Lot= E2206), ile Normal Eşek Serum (Cat= sc-2044, Lot= C1907) ile FITC (Cat= sc2024, Lot= J1107) ve Santa Cruz TGF- β -tavşan poliklonal primer antikor (Cat = sc-146, Lot = A1306), ile Ultra Vision Detection System Zymed Polivalent sekonder antikor (Cat= 85-9043, Lot=1396691) ile HRP/AEC (Cat= 00-2007, Lot= 319293A) ve Labvision PCNA(PC10)-fare monoklonal primer antikor (Cat= RB-9263-PO, Lot= 106P602A), ile Ultra Vision Detection System Anti-Polyvalent HRP (Cat= TP-125-HL, Lot= PBN70509) ile HRP/AEC (Cat= TA-007-HAC, Lot= 007HAC13565) kullanıldı.

Ovaryumlardaki granüloza hücrelerinde apoptozisi belirleyebilmek için Lab Vision APAF-tavşan poliklonal primer antikor (Cat = RB-9263-P, Lot= 9063P610F) ile Ultra Vision Detection System Anti-Polyvalent HRP (Cat= TP-125-HL, Lot= PBN70509) ile HRP/AEC (Cat= TA-007-HAC, Lot= 007HAC13565) ve Labvision Kaspaz-3-rabbit primer antikor (Cat = RB-1197-P, Lot= 1197P708A), ile Ultra Vision Detection System Anti-Polyvalent HRP (Cat= TP-125-HL, Lot= PBN70509) ile HRP/AEC (Cat= TA-007-HAC, Lot= 007HAC13565) kullanıldı. Granüloza hücrelerinde DNA parçalanmasını

belirleyebilmek için Apoptag kit (TUNEL Apoptag Plus Peroxidase In Situ) (Cat= S7101, Lot= VP135269) kullanıldı.

Kesitler 37° C'deki etüvde bir gece tutuldular daha sonra deparafinizasyonu kolaylaştırmak için etüv ısısı 57° C'ye çıkarılarak bu ısıda 1 saat bekletildiler.

Camlar deparafinizasyonu tamamlamak ereğiyle 2 kez 15'er dakika ksilol'e etkin bırakıldı. Daha sonra 10'ar dakika sırasıyla %100, %96 ve % 80'lik alkol serilerinden geçirildiler.

Dehidrate edilen dokular alkolden arındırılmak ereğiyle iki kez 5'er dakika distile sudan geçirildikten sonra, doku içerisinde formaldehit'in kapattığı reseptör bölgelerinin açığa çıkarılmasını sağlamak amacıyla 1M sitrat tamponu pH 6.0 (cat= AP-9003-500, Lab Vision, Fremont, USA) ile mikrodalga fırında retriver işlemi gerçekleştirildi. TGF- β_1 primer antikoru immün boyamasında retriver aşaması gerekmediğinden bu aşama uygulanmadı.

Daha sonra, 15 dakika %3'lük hidrojen peroksit (TA-015-HP, Lab Vision, USA) ile etkin bırakılan dokulardan endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. İşlem sonrasında PBS (phosphate buffer saline) (Lab Vision) (pH 7.4) ile camlar yıkandı.

Yıkanan camlara 5 dakika UltraV block (TA-015-UB Lab Vision, Fremont, CA, USA, 85-9043 Zymed, USA) uygulanarak özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Bu işlemten sonra dokular yıkanmadan primer antikor aşamasına geçildi.

Bu amaçla kesitler PCNA primer antikoru (monoklonal anti-mouse), (Lab Vision, Fremont, USA), TGF- β_1 primer antikoru (poliklonal anti-rabbit) (Santa Cruz, USA), APAF-1 primer antikoru (poliklonal anti-rabbit) (Lab Vision,

Fremont, USA), Kaspaz-3 primer antikoru (poliklonal anti-rabbit) (Lab Vision, Fremont, USA) ile 60 dakika oda ısısında bekletildi.

Daha sonra PBS ile yıkanan camlara 20 dakika biyotinli sekonder antikor (TR-015-BN, Lab Vision, Fremont, USA), (85-9043, Zymed,USA) uygulanarak primer antikora bağlanması sağlandı. PBS ile yıkanan camlar 20 dakika streptavidin peroksidaz enzim kompleksine (TS-015-HR, Lab Vision, Fremont, USA) (85-9043, Zymed, USA) etkin bırakıldı, böylece dokularda enzimin biyotin'e bağlanması sağlandı.

Son olarak ortama kromojen AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) (TA-015-HAS, Lab Vision,USA), (Cat=00-2007, Lot=50481594, Zymed, USA) eklenerek yaklaşık 10 dakika bekletildi ve gözle görülebilir immün tepkimenin ortaya çıkması sağlandı.

Zemin boyası olarak Mayer'in hematoksilen'i (OB24092, Merck) kullanıldı. Negatif boyama primer antikor aşamasında yapıldı. Boyanan camlar ultramount ile lamelle kapatılıp, bilgisayar donanımlı foto-ışık mikroskopta (DCM 4000, Leica, Germany) değerlendirildi.

3. İmmünofloresan Yöntemi

Kesitler immünohistokimya yöntemiyle eşdeş olarak 37° C'deki etüvde bir gece tutuldu ve deparafinizasyonu kolaylaştırmak için etüv ısısı 57° C'ye çıkarılarak bu ısıda 1 saat bekletildi. Deparafinizasyonu tamamlamak ereğiyle 2 kez 15'er dakika ksilol'e etkin bırakıldı. Daha sonra 10'ar dakika sırasıyla %100, %96 ve % 80'lik alkol serilerinden geçirildi.

Dokular alkolden arındırılmak ereğiyle iki kez 5'er dakika distile sudan geçirildikten sonra, 15 dakika %3'lük hidrojen peroksit (TA-015-HP, Lab Vision, USA) ile etkin bırakılan dokulardan endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. İşlem sonrasında PBS (pH 7.4) ile camlar yıkandı.

Yıkanan camlara 20 dakika Normal Eşek Serumı (sc-2044 Zymed, USA) uygulandı. Bu işlemten sonra dokular PBS ile yıkandı ve primer antikör aşamasına geçildi.

Kesitler GDF-9 primer antikoru (poliklonal anti-tavşan), (sc-7407 Zymed, USA) ile 60 dakika oda ısısında bekletildi.

Daha sonra PBS ile yıkanan camlara 45 dakika Eşek anti-keçi IgG-FITC sekonder antikoru (sc-2024, Zymed, USA) uygulandı. PBS ile yıkanan camlar ultramount ile lamelle kapatılıp, bilgisayar donanımlı floresan ataçmanlı mikroskopta (DCM 4000, Leica, Germany) resimlendirilerek değerlendirildi.

4. TUNEL Yöntemi

DNA parçalanması ve apoptotik hücre ölümünün belirlenmesi için in situ apoptozis saptama kiti kullanıldı. Kesitler 37° C'deki etüvde bir gece tutuldu daha sonra deparafinizasyonu kolaylaştırmak için etüv ısısı 57° C'ye çıkarılarak bu ısıda 1 saat bekletildiler.

Camlar deparafinizasyonu tamamlamak ereğiyle 2 kez 15'er dakika ksilol'e etkin bırakıldı. Daha sonra 10'ar dakika sırasıyla %100, %96 ve % 80'lik alkol serilerinden geçirildi.

Kesitler alkolden arındırılmak ereğiyle iki kez 5'er dakika distile sudan geçirildikten sonra 10 dakika 20 µg/ml proteinaz K ile inkübe edildi. PBS ile yıkama aşamasından sonra 15 dakika %3'lük hidrojen peroksit (TA-015-HP, Lab Vision, USA) ile etkin bırakılan dokularda endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. PBS ile yıkanan kesitler 10-15 dakika dengeli tamponda ve 60 dakika 37° C nemli ortamda TdT enziminde (77 µL Reaksiyon Buffer + 33 µL TdT Enzim, 1µl TdT enzim) inkübe edildi. Ardından oda sıcaklığında önceden ısıtılmış durdurma/yıkama tamponunda 10 dakika bekletildi ve Anti-Digoxigenin'de 45 dakika inkübe edildi. Her aşamada PBS ile dikkatle yıkama yapıldı. Yıkamanın ardından TUNEL pozitif hücreleri belirleyebilmek için DAB ile boyama yapıldı. Zemin boyaması için 5 dk süreyle Metil yeşili uygulandı.

Boyanan camlar artan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildikten sonra 20 dk şeffaflaştırma amacı ile ksilolde bekletildiler. Ardından entellan ve lamelle kapatılıp, bilgisayar donanımlı foto-ışık mikroskopta (DCM 4000, Leica, Germany) değerlendirildi.

5. Elektron Mikroskopik Yöntem

Tespit:

Sorenson' un fosfat solüsyonu:

Sol. A: Potasyum fosfat monobazik (KH_2PO_4).....0.098gr

Distile su.....100ml

Sol. B: Sodyum fosfat dibazik ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).....1.188gr

Distile su.....100ml

18.2ml Sol. A + 81.8ml Sol. B = 100ml (pH: 7.4)

Gluteraldehit tespit solüsyonunun hazırlanması:

9.2cc Sorenson fosfat tamponu + 0.8cc Gluteraldehit = 10cc

Dokular, bu solüsyona 30 dakika etkin bırakılıp sertleşmeleri sağlandıktan sonra, 1mm küplük parçalara bölünüp ve 1 saat daha gluteraldehit solüsyonunda bekletilerek ilk tespitleri sağlandı.

Osmiyum Tetroksit tespiti:

Osmiyum tetroksit (OsO_4).....0.1gr

Distile su.....5cc

1 kısım Sorenson fosfat tamponu + 1 kısım osmiyum tetroksit

Dokular bu şekilde hazırlanmış %1'lik osmiyum tetroksit solüsyonuna 1 saat etkin bırakıldılar. Böylece tespit ve boyanmaları sağlanmış oldu.

Dehidrasyon ve blok oluşturulması:

Dokular osmiyumla tespitten sonra, fazla suyun uzaklaştırılması için, artan derecelerdeki etil alkol serilerinden geçirildiler.

%50'lik alkol.....10 dakika

%60'lık alkol.....10 dakika

%70'lik alkol.....10 dakika

Uranil asetat.....30 dakika (1gr uranil asetat + 50ml %80'lik alkol, karışım hazırlandıktan sonra süzülerek 10 dakika bekletildi)

%80'lık alkol.....2 kez yıkandı ve 10 dakika bekletildi
%90'lık alkol.....10 dakika
%96'lık alkol..... 10 dakika
%100'lük alkol.....15 dakika
Propilen oksit.....30 dakika
Propilen oksit + gömme materyali.....30 dakika (gömme materyalinin doku içine geçişi sağlandı)

Daha sonra dokular;

Araldit CY 212..... 10cc

DDSA.....10cc içinde 1 gece 40°C de bekletildiler. Bir gün sonra,

Gömme materyali:

Araldit CY 212.....10cc

DDSA.....10cc

BDMA.....0.4cc

Dibütil fitalat.....1cc

Bu karışıma alınan dokular 2 saat rotatorda oda ısısında, 2 saat 40°C'de etüvde bekletildiler. Son olarak dokular aynı karışım ile 00 numara jelatin kapsüle gömüldüler. Blok içindeki havanın çıkması için 1 saat oda ısısında bekletilen kapsüller, polimerizasyon için 24 saat 45 derecede, 48 saat 60 derecede etüvde bekletildi. Süre sonunda etüv kapatılarak dokular etüv içinde soğuyuncaya değin bırakıldılar.

Hazırlanan bloklarda LKB Leica ultramikrotom ile kalın kesitler alındı ve toluidin mavisi ile boyandı. Bilgisayar donanımlı fotoışık mikroskobu (DCM 4000, Leica, Germany) ile incelenen kalın kesitler resimlendirildi ve uygun bölgeler işaretlenerek formvar kaplı bakır gridler üzerine 200 A'luk ince kesitleri alındı. Kontrast sağlamak için alınan kesitler, uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyanarak Carl Zeiss EM 900 elektron mikroskopta değerlendirilerek resimlendirildiler.

6. İstatistiksel Yöntem

Tüm kontrol ve deney gruplarına ait ovaryum kesitlerinde PCNA, TGF- β 1, APAF-1 ve kaspaz-3 primer antikorları ile yapılan immünohistokimyasal boyamalarda her bir camda X400 büyültmede rasgele beş alan seçilerek tutulumların yoğunluğuna ve tutulum miktar yüzdesine göre H skoru hesaplandı. Tutulum yoğunluğu semi kantitatif olarak 0 (0, tutulum yok), 1 (+, zayıf immünreaktivite), 2 (+ + , orta düzeyde immünreaktivite), 3 (+ + +, kuvvetli düzeyde immünreaktivite) olarak skorlandırıldı. Tutulum miktar yüzdesi immünreaktivitenin bulunduğu hücre/yapıların toplam hücre/yapılara oranlanması ile; 1 (%0 – 10 arası, fokal), 2 (%11 – 50 arası, bölgesel) ve 3 (%51-100 arası, diffüz) olarak skorlandı. Her bir alan için bulunan yoğunluk ve miktar skorları $\sum P_i(i+1)$ (P_i = tutulum miktar yüzdesi, i = tutulum yoğunluğu) formülü ile hesaplandı. Sonuçlar toplanarak o cam için tek bir değere ulaşıldı.

İmmünofloresan yöntemi ile GDF-9 antikoru kullanılarak boyanan dokularda ise, her kesitten rasgele seçilen 5 ayrı alanda tutulum gözlenen oositler sayıldı. Boyanan oosit sayısı gruplara göre oranlanarak yüzdesi alındı.

TUNEL boyamalarda her kesitten gelişigüzel seçilen 5 ayrı alanda yaklaşık olarak 100 hücre sayıldı. Kahverengi boyanan apoptotik hücreler ‘TUNEL Pozitif Hücre’ olarak tanımlandı ve her 100 hücreden boyanan hücreler oranlanarak yüzdesi alındı.

Her boyama yönteminde ayrı olarak gruplar arasındaki karşılaştırma için Kruskal Wallis – testi kullanıldı. İkili grup karşılaştırmalarında ise Mann Whitney U testi kullanıldı. Sıçanların kemoterapi öncesi ve sonrası ağırlık dağılımına One Sample Kolmogorov Smirnov testi ile bakıldı. Gruplar arasındaki karşılaştırmalarda ANOVA testi kullanıldı. Yine ikili grup karşılaştırmalarında ise Mann Whitney U testi kullanıldı. İstatistiksel analiz SPSS Version 13.0 istatistik paket programı ile yapıldı. Anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak dikkate alındı.

IV. BULGULAR

İmmünohistokimyasal Bulgular

Kontrol grubuna ait TGF- β_1 immünohistokimya boyamasında primordiyal ve tek sıralı primer follikülден başlayarak çok sıralı ve antrum oluşmaya başlamış sekonder folliküllerde tutulum oosit sitoplazmasında ve çekirdeğinde yoğun olarak izlendi. Granüloza hücrelerinde ise çekirdeklerinde yoğun, sitoplazmada orta dereceli reaktivite gözlemlendi ($p<0,05$) (Tablo 1, Grafik 1). Ovaryum epitelinde yine oldukça yoğun boyanma ilgiyi çekiyordu. Teka katmanlarında tutulum, teka internada orta dereceliyken teka eksternada izlenmiyordu. Korpus luteumda tutulum yine çekirdek ve sitoplazma düzeyinde yoğun-orta şiddette gözleniyordu. ($p<0,05$) (Tablo 1, Grafik 1) (Resim 1a). Kumulus ooforus'un biçimlendiği ve antrumun genişlediği Graaf folliküllerde granüloza hücre sitoplazmasında tutulum yoğun iken, çekirdeğinde tutulum diğer folliküllere göre azdı. Yine bu folliküllerde oosit sitoplazması oldukça yoğun boyanmıştı (Resim 1b). Atretik folliküllerin oosit sitoplazmalarında ve antrum boşluğu içine dökülen granüloza hücrelerinde tutulum orta derecedeydi. ($p<0,05$) (Tablo 1, Grafik 1). Stromal hücrelerde ve damar endotelinde de tutulum belirgindi (Resim 1c).

Kemoterapotik ajan Siklofosfamid uygulamasına ait ovaryum örneklerinin TGF- β_1 immünohistokimyasal boyamasında, TGF- β_1 etkinliğinin kontrol grubuna karşı anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi ($p<0,05$) (Tablo 1, Grafik 1). Ovaryum dokusunda tek sıralı ve çok sıralı primer, erken ve geç sekonder ve atretik folliküllerde granüloza hücre tutulumlarının kontrol grubuna karşı orta-zayıf dereceli olduğu ($p<0,05$) (Tablo 1, Grafik 1), teka interna tutulumunun ise bunlardan biraz daha fazla olduğu dikkati çekti. Oosit sitoplazmasında ise tutulumun kontrol grubuna karşı daha minimal olduğu ancak çekirdek boyanmasının yoğun olduğu saptandı. Korpus luteumun bazı hücrelerinde boyanma yoğun iken, bazılarında hiç boyanma gözlenmedi. Yüzey epitelinde boyanma kontrollere karşı daha az düzeydeydi (Resim 2a,2b,2c). Atretik folliküllerde ise oosit çevresindeki ve antrum boşluğuna dökülen granüloza

hücrelerinde son derece az tutulum dikkati çekti (Resim 2d). Bu tutulumun diğer gruplara karşın az olması istatistiksel olarak anlamlı idi. ($p<0,05$) (Tablo 1, Grafik 1).

Siklofosfamid ve askorbik asit uygulanan gruba ait TGF- β_1 immünohistokimya boyanmasında, Siklofosfamid grubu ile karşılaştırıldığında boyanma özelliklerinin kontrol grubuna yakın değiştiği dikkati çekti ($p<0,05$) (Tablo 1, Grafik 1). Tutulum tüm gelişim aşamalarındaki folliküllerin granüloza hücrelerinde, teka interna ve korpus luteum düzeyinde gözlemleniyordu. Oositlerde ise sitoplazmik boyanmanın kontrollere karşın daha az ve çekirdek zarı düzeyinde olduğu ve çekirdekte boyanmanın yoğun olduğu izlendi (Resim 3a,3b,3c). Atretik folliküllerin granüloza hücrelerinde TGF- β_1 tutulumu kontrol grubu ile aynı idi. ($p=0,05$) (Tablo 1, Grafik 1). Lümende bulunan dejenere hücrelerde orta derecede boyanma dikkati çekiyordu (Resim 3d).

Siklofosfamid ve α -tokoferol uygulanan gruba ait TGF- β_1 immünohistokimya boyanmasında Siklofosfamid uygulamasının neden olduğu dejeneratif değişikliklerin anlamlı derecede azaldığı dikkati çekti ($p<0,05$) (Tablo 1, Grafik 1). Tutulum primordiyal folliküllerden başlayarak, tek sıralı ve çok sıralı primer folliküllerin oosit sitoplazmalarında ve granüloza hücrelerinde ortadan kuvvetliye değişmekte idi. Korpus luteuma ait hücrelerin çekirdeklerinde gözlenen kuvvetli immünreaksiyon dikkat çekiciydi (Resim 4a). Sekonder folliküllerin ise oosit sitoplazmalarında, granüloza hücrelerinde ve özellikle teka interna tabakalarında kuvvetli boyanma saptandı (Resim 4b). Bu gruptaki atretik folliküllerin sayısının Siklofosfamid ve antioksidan uygulanan diğer gruplara göre az olması dikkat çekiciydi (Tablo 7, Grafik 7). Ayrıca atretik folliküllerin oosit sitoplazmasında, bazı granüloza hücrelerinde ve teka interna katmanında kuvvetli TGF- β_1 tutulumu gözleniyordu ($p<0,05$) (Tablo 1, Grafik 1). (Resim 4c).

Siklofosfamid ve selenyum uygulanan gruba ait TGF- β_1 immünohistokimya boyanma bulguları kontrol grubuna eşdeğer gözlemlendi. ($p=0,05$)

(Tablo 1, Grafik 1). Primordiyal ve tek sıralı primer follikülden başlayarak çok sıralı ve antrum oluşmaya başlamış sekonder folliküllerde tutulum oosit sitoplazmasında ve çekirdeklerinde oldukça yoğun olarak saptandı. Benzer şekilde granüloza ve teka hücrelerinde de kuvvetli immünreaksiyon dikkati çekti. Korpus luteumda tutulum yine çekirdek ve sitoplazma düzeyinde yoğun-orta şiddette gözleniyordu ($p<0,05$) (Tablo 1, Grafik 1). Stromal hücrelerde ve damar endotellerinde de tutulum belirgindi (Resim 5a, 5b). Antrumun genişlediği Graaf folliküllerde granüloza hücrelerindeki tutulum kontrol grubu ile benzer şekilde kuvvetliydi ($p<0,05$) (Tablo 1, Grafik 1). Teka katmanlarında tutulum, teka internada orta dereceli iken teka eksternada izlenmiyordu. Ovaryum epitelinde oldukça yoğun boyanma belirlendi. (Resim 5c). Atretik folliküllerde ise oosit sitoplazmasında ve granüloza hücrelerinde kuvvetliden ortaya değişen tutulum dikkati çekti (Resim 5d).

Kontrol grubuna ait GDF-9 antikoru ile yapılan immünofloresan boyamada tüm folliküllerin oosit sitoplazmasında tutulumun kuvvetli olduğu gözlendi. Primordiyal, tek sıralı primer ve çok sıralı primer folliküllerde GDF-9 tutulumunun özellikle oosit çekirdek zarında yoğunlaştığı dikkati çekti (Resim 6a, 6b). Sekonder ve Graaf folliküllerin oositlerinde tutulum çekirdek zarında ve sitoplazmada gözlendi (Resim 6c,6d). Atretik folliküllerin dejenere oositlerinde GDF-9 salınımının anlamlı derecede daha az olduğu saptandı ($p<0,05$) (Tablo 2, Grafik 2). (Resim 6d).

Siklofosfamid uygulanan ovaryum  rneklerinin GDF-9 immünofloresan boyamasında tüm gelişim aşamasındaki folliküllerin oositlerinde tutulumun kontrol grubuna karşın anlamlı derece az olduğu gözlemlendi ($p<0,05$) (Tablo 2, Grafik 2). Imm nreaksiyonun çoğunlukla antrum oluşmuş geç sekonder follikül oositlerinde izlenmesi ilgiyi çekti (Resim 7a,7b,7c). Atretik folliküllerde immünreaksiyonun yok denecek kadar az olması dikkat çekiciydi (Resim 7d).

Siklofosfamid ve askorbik asit uygulanan gruba ait GDF-9 immüno Floresan boyanmasında tüm gelişim aşamasındaki folliküllerde oosit sitoplazmasının kontrol grubuyla eşdeğer denebilecek salınımı gerçekleştirdiği gözlemlendi ($p<0,05$) (Tablo 2, Grafik 2), (Resim 8a,8b,8c,8d). Kuvvetli immünreaksiyon tüm folliküllerde aynı iken korpus luteumda ise hiçbir tutulum gözlenmiyordu (Resim 8b). Ayrıca atretik folliküllerin dejenere oosit sitoplazmasında son derece az tutulum dikkati çekti (Resim 8e).

Siklofosfamid ve α -tokoferol uygulanan gruba ait GDF-9 immüno Floresan boyanmasında E vitamini'nin tüm gelişim aşamasındaki folliküllerin oosit sitoplazmasında GDF-9 salınımını arttırdığı belirlendi (Resim 9a,9b,9c,9d). Bazı Graaf folliküllerde ise oosit zarında kuvvetli tutulum izlendi. GDF-9 salınımının bazı Atretik folliküllerde oosit sitoplazmasının yanı sıra granüloza ve teka hücrelerine de yayıldığı dikkati çekti (Resim 9e) ($p<0,05$) (Tablo 2, Grafik 2).

Siklofosfamid ve selenyum uygulanan grupta selenyum'un tüm gelişim aşamalarındaki folliküllerin oosit sitoplazmasında GDF-9 salınımını Siklofosfamid grubuna karşı anlamlı derecede arttırdığı belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 2, Grafik 2) (Resim 10a,10b,10c,10d). Ancak granüloza hücre düzeyinde ve teka internada tutulumun az olduğu gözlemlendi (Resim 10d). Atreziye giden folliküllerde tutulumun sitoplazmada azalarak oosit zarında yoğunlaştığı dikkati çekti (Resim 10e).

Kontrol grubuna ait PCNA antikoru ile yapılan immünohistokimya boyamasında küçük büyültmelerde tüm gelişim aşamalarındaki folliküllerin granüloza hücrelerinde yoğun PCNA tutulumu olduğu, atreziye giden folliküllerde azaldığı ayırt edildi (Resim 11a). Büyük büyültmelerde tek sıralı primer folliküllerin granüloza hücrelerinde PCNA tutulumu az iken, çok sıralı primer ve sekonder folliküllerde granüloza hücrelerinin son derece yoğun immünreaksiyonu dikkati çekti ($p<0,05$) (Tablo 3, Grafik 3) (Resim 11b,11c,11d). Oosit-1 ise primordiyal follikülde başlayarak tüm folliküllerde oldukça yoğun

boyanmıştı. Bu boyanma sitoplazmada zayıftan ortaya değişir iken çekirdekte ise yoğun pozitifliği (Resim 11b,11c,11d,11e). Özellikle gelişimin ileri aşamalarındaki bazı folliküllerin oosit sitoplazmalarında orta şiddette tutulum dikkati çekti. Bu durum, folliküllerin atreziye gidebileceğinin göstergesi olarak belirlendi (Resim 11d,11e). Teka interna hücrelerinin de kuvvetli tutulum gösterdiği dikkati çekti (Resim 11d).

Siklofosfamid uygulanan ovaryum örneklerinin PCNA immünohistokimya boyamasında küçük büyültmelerde PCNA tutulumu gösteren folliküllerin sayısının kontrol grubuna karşı azaldığı, korpus luteum ve atreziye giden folliküllerin sayısının ise oldukça arttığı dikkati çekti ($p<0,05$) (Tablo 7, Grafik 7) (Resim 12a). Sağlıklı folliküllerin oosit sitoplazmasında kontrole karşı artmış tutulum gözlenirken, granüloza ve özellikle teka interna katmanlarında PCNA tutulumu gösteren hücreler belirlendi. (Resim 12b,12c). Ancak atretik folliküllere ait dejenere oositlerin sitoplazmasında immünreaksiyon oldukça kuvvetliydi. Bu folliküllere ait teka interna katmanlarında tutulum ortadan kuvvetliye değişmekteydi (Resim 12d).

Siklofosfamid ve askorbik asit uygulanan gruba ait PCNA immünohistokimya boyanmasında sağlıklı follikül sayısının Siklofosfamid grubuna göre anlamlı derecede arttığı dikkati çekti. Atretik follikül sayısının yine Siklofosfamid grubuyla karşılaştırıldığında daha az olduğu belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 7, Grafik 7) (Resim 13a). Primordiyal folliküllerden başlayarak gelişimin tüm aşamalarındaki sağlıklı folliküllerin oosit çekirdeklerinde ve granüloza hücrelerinin çekirdeklerinde immünreaksiyon anlamlı derecede kuvvetli idi ($p<0,05$) (Tablo 3, Grafik 3) (Resim 13b,13c,13d). Özellikle tek sıralı ve çok sıralı primer folliküllerin oosit çekirdeklerinde, bazı granüloza ve teka hücrelerinin çekirdeklerinde son derece yoğun tutulum dikkati çekiyordu (Resim 13b,13e). Bazı Graaf folliküllerinin ise dış granüloza katmanında PCNA tutulumu yoğun olarak izlendi (Resim 13d). Atreziye giden folliküllerin granüloza hücre çekirdeklerinde immünreaksiyon daha azdı (Resim 13e).

Siklofosfamid ve α - tokoferol uygulanan gruba ait PCNA immünohistokimya boyanmasında, kontrol ve askorbik asit uygulanan gruba eşdeş olarak sağlıklı folliküllerin granüloza hücrelerinde atretik folliküllere karşın daha fazla tutulum belirlendi ($p=0,05$) (Tablo 7, Grafik 7) (Resim 14a). Primordiyal folliküllerden başlayarak tüm sağlıklı folliküllerin oosit çekirdeklerinde ve teka interna katmanındaki bazı hücrelerde kuvvetli tutulum dikkati çekti (Resim 14b,14c,14d). Küçük folliküllerin granüloza katmanında PCNA tutulumu gösteren hücrelerin sayısı az iken sekonder follikülden başlayarak büyük folliküllerin granüloza hücrelerinde tutulumun anlamlı derecede fazla olduğu belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 3, Grafik 3) (Resim14b,14c,14d). Ayrıca Atretik folliküllerin oosit sitoplazmasının sağlıklı folliküllerden farklı olarak daha kuvvetli boyanması ve korpus luteumda çekirdek tutulumunun orta düzeyde olması dikkat çekiciydi (Resim 14e,14b).

Siklofosfamid ve selenyum uygulanan grupta da PCNA immünohistokimya boyanması kontrol ve antioksidan uygulanan diğer gruplarla eşdeşti. ($p=0,05$) (Tablo 3, Grafik 3). Siklofosfamid uygulanan gruba göre sağlıklı folliküllerin sayısının arttığı, atretik folliküllerin sayısının anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 7, Grafik 7) (Resim 15a). Küçük folliküllerin granüloza katmanında PCNA tutulumu gösteren hücrelerin sayısı az iken, antrum oluşmaya başlamış folliküllerde ve büyük folliküllerin granüloza katmanlarında tutulum gösteren hücrelerin sayısının son derece fazla olduğu belirlendi (Resim 15b,15c,15d). Ayrıca bu grupta da atreziye giden folliküllerin oosit sitoplazmalarında tutulumun oldukça arttığı ve ileri atrezi aşamasında tamamen azaldığı dikkati çekti (Resim 15e).

Kontrol grubuna ait ovaryum dokularının TUNEL boyamasında, tüm gelişim aşamasındaki sağlıklı folliküllerde TUNEL tutulumu hemen hemen hiç gözlenmezken bazı atreziye giden Graaf folliküllerin granüloza katmanında az

sayıda TUNEL pozitif hücre dikkati çekti ($p<0,05$) (Tablo 4, Grafik 4) (Resim 16a,16b,16c,16d).

Siklofosfamid uygulanan ovaryum örneklerinin TUNEL boyamasında atreziye giden Graaf folliküllerin sayısında artış izlenirken, bu atretik folliküllerin granüloza katmanında çok sayıda TUNEL pozitif hücre belirlendi (Resim 17a). Ayrıca çok katlı primer, sekonder ve Graaf folliküllerde çok sayıda TUNEL pozitif hücre varlığının gözlemlenmesi istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,05$) (Tablo 4, Grafik 4) (Resim 17a,17b). Bazı atretik folliküllerin oositlerinde ve granüloza hücrelerinde gözlenen kuvvetli tutulum dikkat çekiciydi (Resim 17c).

Siklofosfamid ve askorbik asit uygulanan grubun ovaryum dokularının kemoterapotik ajanın dejeneratif etkisinden nispeten korunmuş olduğu izlendi. Doku genelinde sağlıklı folliküllerin fazla, atretik folliküllerin azalmış olduğu gözlemlendi (Resim 18a). Tek katlı primer folliküllerde TUNEL pozitif hücreler gözlenmezken, çok katlı primer folliküllerde orta dereceli olduğu belirlendi (Resim 18b). Atreziye gidecek Graaf folliküllerinde ise TUNEL pozitif hücrelerin sayısının anlamlı derecede arttığı dikkati çekti ($p<0,05$) (Tablo 4, Grafik 4) (Resim 18c).

Siklofosfamid ve α - tokoferol uygulanan grubun ovaryum dokularının askorbik asit uygulanan gruba eşdeğer olarak iyi korunduğu ve atretik folliküllerin sayısının azaldığı belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 4, Grafik 4) (Resim 19a). TUNEL pozitif hücreler özellikle atreziye giden folliküllerde izlenirken, çeşitli gelişim aşamalarındaki diğer folliküllerde gözlenmedi (Resim 19b,19c).

Siklofosfamid ve selenyum uygulanan grupta da diğer antioksidan uygulanan gruplarla eşdeğer olarak ovaryumun doku genelinde atretik folliküllerin yok denecek kadar az olduğu dikkati çekti (Resim 20a). TUNEL pozitif hücreler primordiyal ve tek sıralı primer folliküllerde gözlenmezken, çok sıralı primer

folliküllerden başlayarak atreziye giden folliküllerin granüloza hücrelerinde belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 6, Grafik 6) (Resim 20b,20c).

Tüm grupların primordiyal ve primer folliküllerinde yok denecek kadar az gözlenen TUNEL pozitif hücre sayılarının arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p>0,05$) (Tablo 4, Grafik 4)

Kontrol grubuna ait kaspaz-3 antikoruna ile yapılan immünohistokimya boyamasında, gelişim aşamasında olan tüm folliküllerde granüloza hücre katmanında az düzeyde ($p<0,05$) (Tablo 5, Grafik 5), teka interna katmanındaki hücrelerde orta düzeyde tutulum gözlemlendi (Resim 21a,21b,21c). Atreziye giden folliküllerde ise granüloza hücre katmanında ve antrum sıvısına dökülen bazı hücrelerde yoğun immünreaktivite izlenirken, oosit sitoplazmasında da bir miktar tutulum dikkati çekti (21d).

Siklofosfamid uygulanan gruba ait ovaryum örneklerinde tüm gelişim aşamalarındaki folliküllerin granüloza hücrelerinde anlamlı derecede yoğun kaspaz-3 tutulumu belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 5, Grafik 5) (Resim 22a,22b). Ayrıca atretik folliküllerin granüloza hücrelerinde ve oosit sitoplazmasında kuvvetli, korpus luteumda ise artmış immünreaksiyon istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,05$) (Tablo 5, Grafik 5) (Resim 22c) Ayrıca tüm folliküllerin teka interna katmanlarında gözlenen kuvvetli kaspaz-3 tutulumu oldukça dikkat çekiciydi (Resim 22a,22b,22c).

Siklofosfamid ve askorbik asit uygulanan gruba ait kaspaz-3 antikoruna ile yapılan immünohistokimya boyamasında, Siklofosfamid'in neden olduğu yapısal düzeyde olumsuz etkiyi askorbik asit'in kısmen düzelttiği gözlemlendi. Bazı folliküllerin oosit sitoplazmalarında tutulum hiç gözlenmezken, granüloza ve teka hücrelerinde ise orta dereceli olarak tutulum izlendi ($p<0,05$) (Tablo 5, Grafik 5) (Resim 23a,23b,23c). Atretik folliküllerde ise hem granüloza hem teka

katmanındaki hücrelerde, hem de oosit sitoplazmasında kaspaz-3 tutulumunun arttığı dikkati çekti (Resim 23d).

Siklofosfamid ve α - tokoferol uygulanan gruba ait kaspaz-3 tutulumunun askorbik asit uygulanan gruba eşdeş olduğu dikkati çekti ($p=0,05$) (Tablo 5, Grafik 5). Bazı folliküllerin granüloza ve teka hücrelerinde orta dereceli tutulum izlenirken, oosit sitoplazmalarında hiç gözlenmedi (Resim 24a,24b). Atretik folliküllerde ise granüloza ve teka katmanındaki hücreler ile oosit sitoplazmasında kaspaz-3 tutulumunun askorbik asit uygulanan gruba karşın anlamlı derecede az olduğu dikkati çekti ($p<0,05$) (Tablo 5, Grafik 5) (Resim 24c).

Siklofosfamid ve selenyum uygulanan gruba ait kaspaz-3 antikoru ile yapılan immünohistokimya boyamasında, diğer vitamin uygulanan gruplarla eşdeş olarak kaspaz-3 tutulumunun tüm gelişim aşamasındaki folliküllerin oosit sitoplazmasında, granüloza ve teka hücre katmanlarında oldukça az olduğu dikkati çekti ($p=0,05$) (Tablo 5, Grafik 5) (Resim 25a,25b,25c). Benzer şekilde atretik folliküllerin granüloza hücrelerinde ve oosit sitoplazmasında da minimal düzeyde tutulum gözlendi (Resim 25d).

Ayrıca tüm grupların çok sıralı primer folliküllerinde kaspaz-3 tutulumu karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p>0,05$) (Tablo 5, Grafik 5).

Kontrol grubuna ait APAF-1 antikoru ile yapılan immünohistokimya boyamasında folliküllerin tüm gelişim aşamalarında APAF-1'in granüloza hücre tutulumu orta dereceliyken, oosit sitoplazmalarında hiç tutulum izlenmedi ($p<0,05$) (Tablo 6, Grafik 6) (Resim 26a). Atreziye giden folliküllerin granüloza hücrelerinde artmış APAF-1 tutulumu gözlenirken, oositin zayıftan ortaya giden tutulumu belirgindi (Resim 26b).

Siklofosfamid uygulanan gruba ait APAF-1 antikoru ile yapılan immünohistokimya boyamasında, tüm gelişim aşamasındaki folliküllerin granüloza hücrelerinde tutulumun anlamlı derecede artmış olduğu gözlemlendi ($p<0,05$) (Tablo 6, Grafik 6). Korpus luteumda ise yer yer bazı hücrelerde orta dereceli tutulum dikkati çekti (Resim 27a). Özellikle Graaf folliküllerin granüloza hücrelerinde ve atretik folliküllerin oosit sitoplazmasında immünreaksiyonun anlamlı derecede arttığı belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 6, Grafik 6) (Resim 27b,27c).

Siklofosfamid ve askorbik asit uygulanan gruba ait APAF-1 antikoru ile yapılan immünohistokimya boyamasında, tutulumun kontrole eşdeğer olduğu dikkati çekti. Atretik folliküllerde dahil olmak üzere tüm gelişim aşamasındaki folliküllerin granüloza hücrelerindeki APAF-1 tutulumu orta dereceliydi ($p<0,05$) (Tablo 6, Grafik 6) (Resim 28a,28b). Sağlıklı folliküllerin oosit sitoplazmalarında tutulum gözlenmezken, atreziye giden folliküllerde tutulum bir miktar artmıştı (Resim 28c). Korpus luteum hücrelerinin orta derecede immünreaksiyon gösterdiği dikkati çekti (Resim 28a).

Siklofosfamid ve α - tokoferol uygulanan gruba ait APAF-1 antikoru ile yapılan immünohistokimya boyamasında, gelişen follikül aşamalarında tutulum minimum düzeyde iken, atreziye giden bütün folliküllerin granüloza hücrelerinde tutulum gözlemlendi ($p<0,05$) (Tablo 6, Grafik 6) (Resim 29a,29b,29c). Korpus luteum hücrelerinde ise orta derecede APAF-1 immünreaksiyonu belirlendi (Resim 29a).

Siklofosfamid ve selenyum uygulanan gruba ait APAF-1 antikoru ile yapılan immünohistokimya boyamasında tutulum folliküllerin tüm gelişim aşamalarındaki granüloza hücrelerinde orta dereceliyken oosit sitoplazmalarında zayıftı. ($p<0,05$) (Tablo 6, Grafik 6) (Resim 30a,30b). Atreziye giden folliküllerin oosit ve granüloza hücre sitoplazmalarında immünreaksiyonun arttığı dikkati çekti (Resim 30c).

Elektron Mikroskopik Bulgular

Kontrol grubuna ait elektron mikroskopik incelemelerde oosit sitoplazma ve çekirdeği ile zona pellusida ve granüloza hücre katmanları belirgin olarak gözlemlendi. Oosit sitoplazmasının organelden fakirliği dikkat çekiciydi. Sitoplazmada tek tük mitokondriyonlar, granüllü endoplazmik retikulum tubulusları izlenirken, çekirdek ökromatik olarak ayırt edildi. Zona pellusidanın elektron yoğun boyandığı dikkati çekerken, granüloza hücrelerinin koyu ve açık sitoplazmalı olduğu belirlendi. Zona pellusidaya yakın granüloza hücrelerinin prizmatik şekilli, orta katmanda bulunan hücrelerin poligonal şekilli olduğu gözlemlendi (Resim 31). Açık sitoplazmalı granüloza hücrelerinde mitokondriyonlar ve yer yer vakuoller dikkati çekerken, koyu sitoplazmalı hücrelerde granüllü endoplazmik retikulum tubuluslarının yer yer genişlediği gözlemlendi. Hücreler arası bağlantı birimleri ise normal yapıdaydı (Resim 32).

Siklofosfamid uygulanan grupta oosit yapısını korumuş iken zona pellusida yoğunluğunun kontrol grubuna karşın azaldığı ve granüloza hücre katmanının oldukça dejeneratif görünüm sergilediği belirlendi (Resim 33). Koyu granüloza hücrelerinde apoptozise giden hücre görünümü izlenirken, açık hücrelerin sitoplazmasında vakuolizasyonun, geniş ve boş alanların arttığı dikkati çekti (Resim 34).

Siklofosfamid ve askorbik asit uygulanan grupta oosit ve zona pellusida yapısının korunduğu gözlemlendi (Resim 35). Granüloza hücrelerindeki dejenerasyonun kısmen engellendiği dikkati çekerken, apoptotik yoğun sitoplazmalı hücrelerin varlığı ayırt edildi. Bazı açık renk sitoplazmalı hücrelerde vakuolizasyon saptandı (Resim 36).

Siklofosfamid ve α - tokoferol uygulanan grupta ise kemoterapotik ajanın olumsuz etkisine karşın oosit ve zona pellusida ince yapısının oldukça korunduğu ayırd edildi (Resim 37). Koyu renk sitoplazmalı hücrelerin son derece azaldığı, açık renk sitoplazmalı hücrelerde ise vakuolizasyonun nispeten az olduğu gözlemlendi (Resim 38).

Siklofosfamid ve selenyum uygulanan grubun oosit ve zona pellusidasındaki ince yapı değişiklikleri, E vitamini uygulanan grup ile aynıydı (Resim 39). Koyu sitoplazmalı granüloza hücrelerinin azaldığı belirlendi (Resim 40). Teka interna incelemelerinde ise tüm gruplarda belirgin bir değişim gözlenmedi.

İstatistiksel Bulgular

Çalışmamızda istatistiksel olarak deney grupları arasında folliküler gelişim sürecine göre TGF- β_1 , PCNA, kaspaz-3 ve APAF-1 tutulumlarının H skorları ve GDF-9 ve TUNEL tutulum yüzdeleri karşılaştırılarak boyanma şiddetine göre bir fark gösterip göstermediği değerlendirildi.

Yapılan ölçümler ve değerlendirmeler sonucunda; H skor değerlerinin immünohistokimyasal bulguları desteklediği saptandı. ($p<0,05$) (Tablo 1,2,3,4,5,6 Grafik 1,2,3,4,5,6)

Çalışmamızda sıçanların ovaryum follikül sayıları karşılaştırıldığında, tüm gruplar arasında primordiyal follikül ve diğer follikül değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$). Korpus Luteum ve Atretik Follikül değerleri yönünden ise tüm deney grupları arasındaki fark istatistiksel düzeyde anlamlıydı ($p<0.05$). En yüksek korpus luteum ve Atretik follikül sayısı Siklofosfamid uygulanan grupta saptanırken en düşük korpus

luteum sayısı Siklofosfamid ve selenyum uygulanan grupta, en düşük atretik follikül sayısı Siklofosfamid ve askorbik asit uygulanan grupta gözlemlendi ($p<0.05$). (Tablo 7, Grafik 7)

Çalışmamızda sıçanların deney öncesi ve sonrası ağırlıklarının ortalamaları Tablo 8’de karşılaştırıldı. Kemoterapi öncesi gruplar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında sıçan ağırlıkları yönünden anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p>0.05$). Kemoterapi sonrası gruplar incelendiğinde ise kontrol grubuna karşın diğer deney gruplarında sıçan ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$) (Tablo 8, Grafik 8). Siklofosfamid, Siklofosfamid+ α -tokoferol ve selenyum gruplarında kemoterapi sonrası anlamlı derecede ağırlık artışı gözlemlendi. ($p<0.05$). Siklofosfamid+askorbik asit grubundaki ağırlık artışı ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildi ($p>0.05$) (Tablo 8, Grafik 8). Yapılan ikili grup karşılaştırmalarına göre kontrol grubuna göre en düşük ağırlık Siklofosfamid+askorbik asit uygulanan gruptaydı. Diğer düşük ağırlığa sahip grup ise Siklofosfamid+selenyum uygulanan grup olarak belirlendi ($p<0.05$) (Tablo 8, Grafik 8).

Deney sonrası ovaryum ağırlıklarının ortalamaları Tablo 9’da karşılaştırıldı. Tüm gruplar arasında yapılan analizde istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$) (Tablo 9, Grafik 9).

Çalışmamızda deney sonrası sıçanların GSH değerleri Tablo 10’da karşılaştırıldı. Gruplar arasında yapılan analizde istatistiksel düzeyde anlamlı bir fark saptandı ($p<0.05$) (Tablo 10, Grafik 10). Gruplar arasında en yüksek GSH değeri kontrol grubunda gözlemlenirken, en düşük GSH değeri Siklofosfamid grubundaydı. Antioksidan uygulanan gruplar arasında kontrol grubuna en yakın Siklofosfamid+askorbik asit ve α -tokoferol uygulanan gruplar iken, selenyum uygulanan grupta GSH değeri kontrol grubuna karşın daha düşüktü ($p<0.05$) (Tablo 10, Grafik 10).

Tablo 1. Gruplar arasındaki TGF- β_1 antikoru immünreaktivitesi skorları

GRUPLAR	ÇPF		SF		GF		AF		KL	
	Ort±SS	p*	Ort±SS	p*	Ort±SS	p	Ort±SS	p	Ort±SS	p
Kontrol TGF- β_1	168.00±4.24	0.000	181.16±9.28	0.001	227.50±4.41	0.000	183.50±4.41	0.003	243.50±4.41	0.003
Siklofosfamid TGF- β_1	79.66±2.94		101.00±3.74		104.33±2.94		44.00±3.57		120.50±5.16	
Siklofosfamid +Ask TGF- β_1	157.50±5.61		180.50±4.41		212.50±4.41		182.50±4.41		244.50±5.61	
Siklofosfamid + α Tkf TGF- β_1	148.50±3.14		174.50±4.41		213.00±4.24		180.00±4.24		239.50±4.41	
Siklofosfamid +selen TGF- β_1	159.00±4.24		183.00±4.24		215.00±4.89		178.50±5.61		244.00±5.58	

Tablo 2. Gruplar arasındaki GDF-9 antikoru immünreaktivitesi skorları

GRUPLAR	PDF		TPF		ÇPF		SF		GF		AF	
	Ort±SS	p*	Ort±SS	p*	Ort±SS	Ort±SS	p*	P	Ort±SS	p	Ort±SS	p*
Kontrol GDF-9	52.33±1.63	0.001	66.50±1.87	0.000	75.33±1.86	0.000	83.33±2.16	0.002	86.33±2.16	0.005	36.33±1.96	0.001
Siklofosfamid GDF-9	19.50±1.87		23.50±1.87		27.16±1.94		36.66±2.16		36.66±2.16		15.83±2.63	
Siklofosfamid +A.A GDF-9	50.50±1.37		57.50±1.87		68.50±1.87		81.66±1.63		86.50±1.87		35.50±1.87	
Siklofosfamid + α -Tk GDF-9	49.16±1.47		59.16±1.47		71.50±1.87		81.50±1.87		87.50±1.87		36.00±1.41	
Siklofosfamid +Slny GDF-9	48.33±4.32		64.83±1.47		69.50±1.87		80.83±1.47		87.33±1.63		38.00±1.41	

Tablo 3. Gruplar arasındaki PCNA antikoru immünreaktivitesi skorları

GRUPLAR	ÇPF		SF		GF		AF		KL	
	Ort±SS	p*	Ort±SS	p*	Ort±SS	p	Ort±SS	p	Ort±SS	p
Kontrol PCNA	161.33±7.86	0.000	350.00±7.48	0.000	329.33±8.64	0.001	166.66±8.64	0.001	183.33±5.88	0.000
Siklofosfamid PCNA	62.66±6.53		134.00±7.48		170.66±7.00		61.50±5.61		99.00±4.24	
Siklofosfamid +Ask PCNA	132.00±7.15		336.66±9.26		320.66±5.88		158.00±7.48		162.00±7.48	
Siklofosfamid + α Tkf PCNA	126.66±6.53		324.00±5.65		314.66±11.21		159.33±5.88		150.00±7.48	
Siklofosfamid +selen PCNA	157.50±6.74		348.66±5.88		325.33±4.84		168.00±5.65		176.00±5.65	

Tablo 4. Gruplar arasındaki TUNEL pozitif hücre skorları

GRUPLAR	PDF		TPF		ÇPF		SF		GF		AF	
	Ort±SS	p*	Ort±SS	p*	Ort±SS	Ort±SS	p*	P	Ort±SS	p	Ort±SS	p*
Kontrol TUNEL	2.16±1.69	0,749	3.16±1.16	0,817	5.16±1.47	0.000	9.16±1.47	0.000	18.33±2.16	0.000	57.50±1.87	0.001
Siklofosamid TUNEL	3.00±1.41		3.83±1.16		28.16±2.78		48.00±2.60		60.00±1.41		88.33±2.58	
Siklofosamid +A.A TUNEL	2.33±1.21		3.33±1.21		19.00±1.41		21.50±1.87		32.50±1.87		60.50±1.87	
Siklofosamid +α-TkTUNEL	2.50±1.04		3.50±1.04		21.50±1.87		20.00±1.41		31.50±1.87		59.16±1.47	
Siklofosamid +Slny TUNEL	2.83±1.16		3.16±1.16		23.16±1.47		19.50±1.87		32.50±1.87		59.66±1.63	

* Kruskall Wallis testi p değeri

Tablo 5. Gruplar arasındaki kaspaz-3 antikoru immünreaktivitesi skorları

GRUPLAR	ÇPF		SF		GF		AF		KL	
	Ort±SS	p*	Ort±SS	p*	Ort±SS	p	Ort±SS	p	Ort±SS	p
Kontrol Kaspaz-3	119.00±3.74	0,005	121.00±3.74	0,002	136.66±4.32	0.001	166.50±5.61	0.000	123.66±3.88	0.001
Siklofosamid Kaspaz-3	217.50±5.61		178.50±5.61		227.50±4.41		268.33±6.83		157.50±5.61	
Siklofosamid +A.A Kaspaz3	121.00±3.74		123.66±3.66		139.00±4.85		165.50±7.91		129.00±3.74	
Siklofosamid +α-TkKaspaz3	127.00±18.79		121.66±2.94		139.66±4.63		119.00±6.48		130.66±4.32	
Siklofosamid +SlnyKaspaz3	121.00±3.74		126.00±4.56		133.00±3.74		108.50±12.78		125.66±3.44	

* Kruskall Wallis testi p değeri

Tablo 6. Gruplar arasındaki APAF-1 antikoru immünreaktivitesi skorları

GRUPLAR	ÇPF		SF		GF		AF		KL	
	Ort±SS	p*	Ort±SS	p*	Ort±SS	p	Ort±SS	p	Ort±SS	p
Kontrol Apaf-1	125.00±3.74	0,000	122.00±2.82	0,000	127.33±2.42	0.000	168.50±4.41	0.000	127.00±3.74	0.001
Siklofosamid Apaf-1	219.83±5.74		119.50±5.61		226.50±5.61		277.00±6.48		155.00±4.89	
Siklofosamid +A.A Apaf-1	127.00±4.14		124.33±2.94		129.00±3.74		175.50±5.61		132.66±4.32	
Siklofosamid +α-Tk Apaf-1	127.00±3.74		123.33±3.26		132.33±4.96		179.00±4.89		131.66±2.94	
Siklofosamid +Slny Apaf-1	135.00±3.74		129.33±3.50		139.00±4.74		185.00±7.97		131.66±2.94	

Tablo 7. Gruplar arasındaki follikül sayıları skorları

GRUPLAR	Korpus Luteum		Diğer Follikül		Atretik Follikül		Primordiyal follikül	
	Ort±SS	p*	Ort±SS	p*	Ort±SS	p*	Ort±SS	p*
Kontrol	14.33±1.63	0.015	22.33±10.17	0.751	2.00±1.26	0.001	13.16±2.92	0.266
Siklofosfamid	21.67±5.79		19.33±8.09		7.50±2.42		9.16±3.76	
Siklofosfamid +A.A	14.00±3.41		15.83±3.31		1.66±0.81		9.66±3.07	
Siklofosfamid +α-Tk	13.67±3.39		21.00±6.72		4.00±1.41		10.00±2.09	
Siklofosfamid +Slny	12.33±1.63		20.83±2.75		2.16±1.94		11.50±1.87	

* Kruskall Wallis testi p değeri

Tablo 8. Deney öncesi ve sonrası sıçan ağırlıklarının karşılaştırılması

GRUPLAR	Kemoterapi Öncesi	p*	Kemoterapi Sonrası	p**
	Ort±SS		Ort±SS	
Kontrol	120.70±13.68	0.0737	180.01±10.17	0,034
Siklofosfamid	119.10±13.70		164.08±10.06	
Siklofosfamid + askorbik asit	116.25±10.49		133.81±60.32	
Siklofosfamid+ α-tokoferol	113.16±9.45		167.35±14.83	
Siklofosfamid + selenyum	120.80±8.31		155.38±17.54	

*ANOVA testi p değeri

**Kruskall Wallis testi p değeri

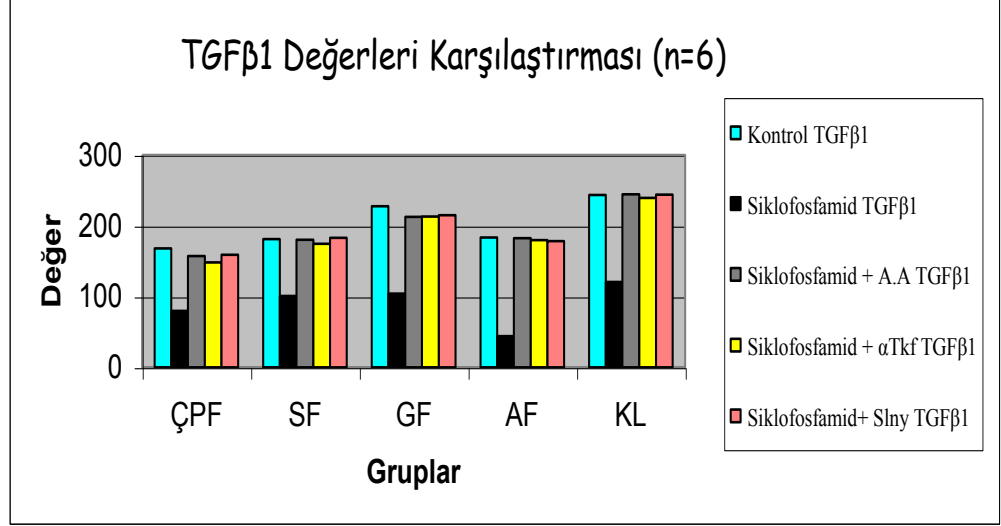
Tablo 9. Gruplar arasında deney sonrası ovaryum ağırlıklarının karşılaştırılması

GRUPLAR	Ovaryum Ağırlığı	p*
	Ort±SS	
Kontrol	0,083850000E-02±1,2957893E-02	0.124
Siklofosfamid	0,089950000E-02±2,2327987E-02	
Siklofosfamid + askorbik asit	0,104783330E-02±2,0669341E-02	
Siklofosfamid+ α-tokoferol	0,106033330E-02±2,3640530E-02	
Siklofosfamid + selenyum	0,079900000E-02±2,6449802E-02	

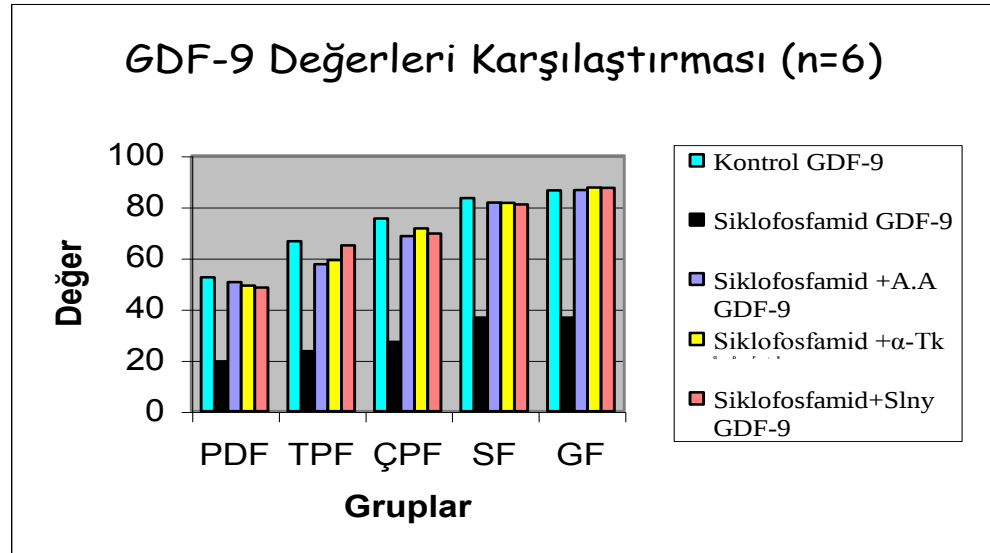
Tablo 10. Gruplar arasında GSH değerlerinin karşılaştırılması

GRUPLAR	GSH Değeri	p*
	Ort±SS	
Kontrol	506.63±46.05	0.000
Siklofosfamid	265.12±55.72	
Siklofosfamid + askorbik asit	435.35±43.33	
Siklofosfamid+ α-tokoferol	419.49±39.67	
Siklofosfamid + selenyum	319.47±82.03	

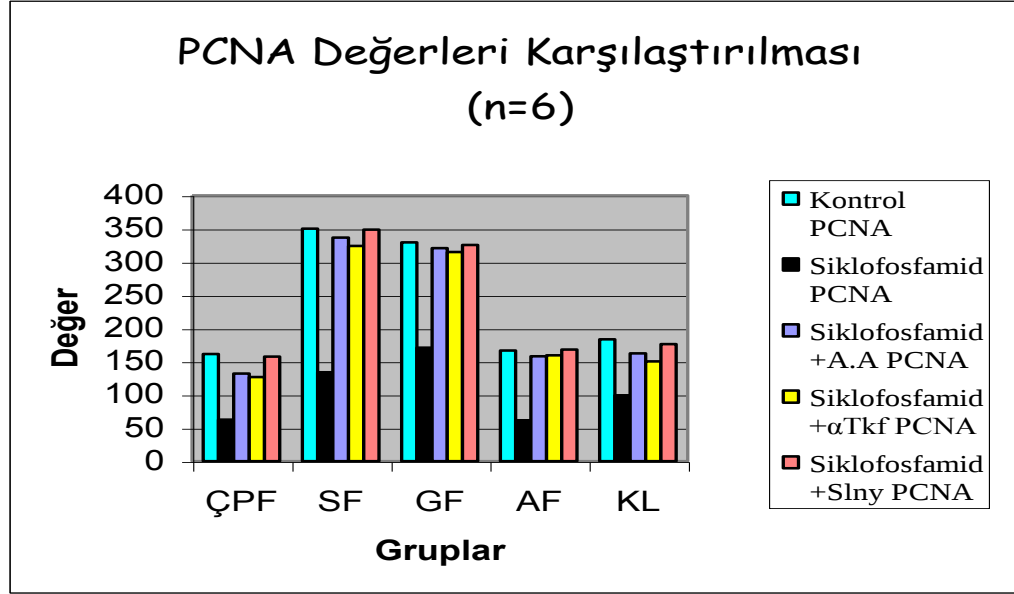
* Kruskall Wallis testi p değeri (Tablo 9,10)



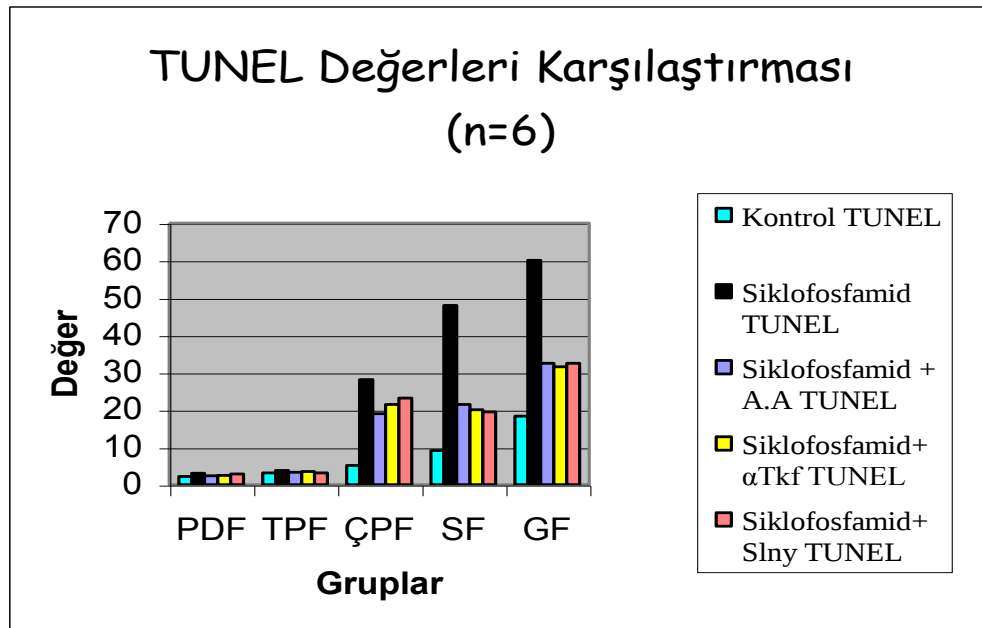
Grafik 1: Gruplar arasındaki TGF-β₁ antikor immunreaktivitesi karşılaştırması



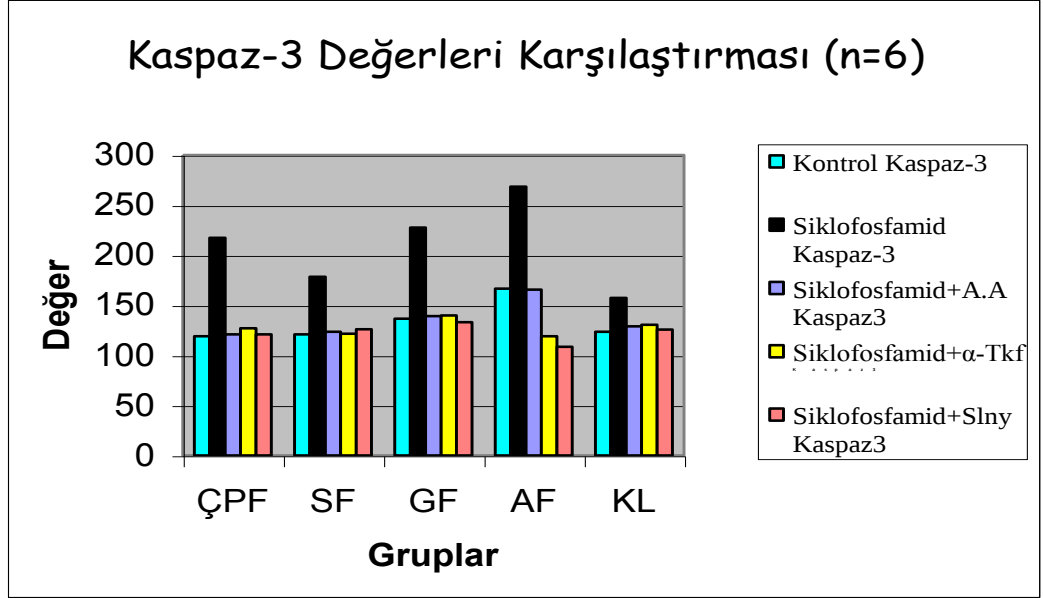
Grafik 2: Gruplar arasındaki GDF-9 antikor immunreaktivitesi karşılaştırması



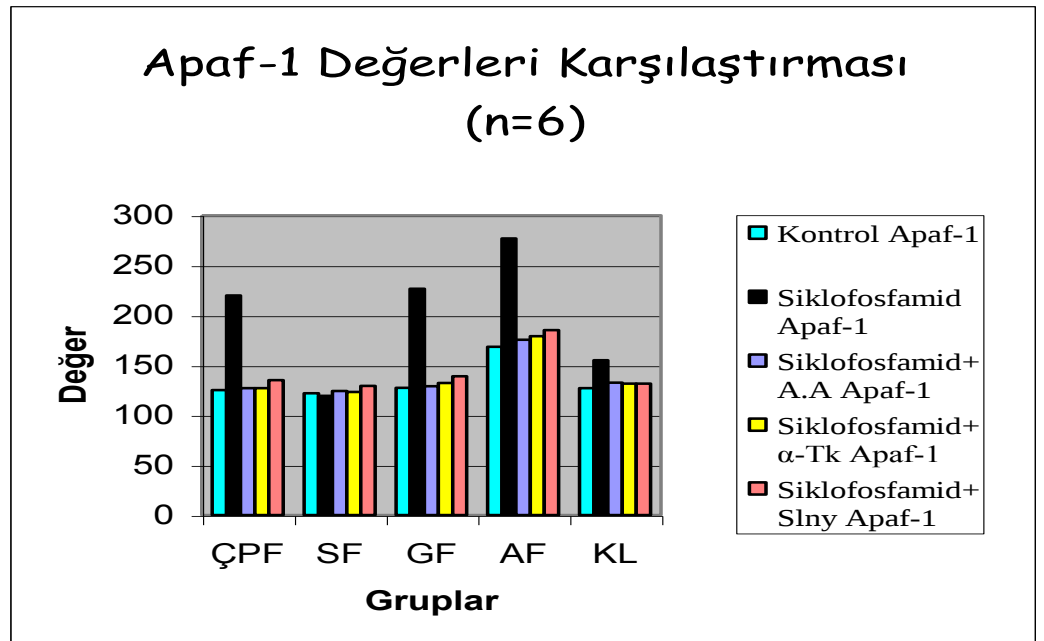
Grafik 3: Gruplar arasındaki PCNA antikoru immünreaktivitesi karşılaştırması



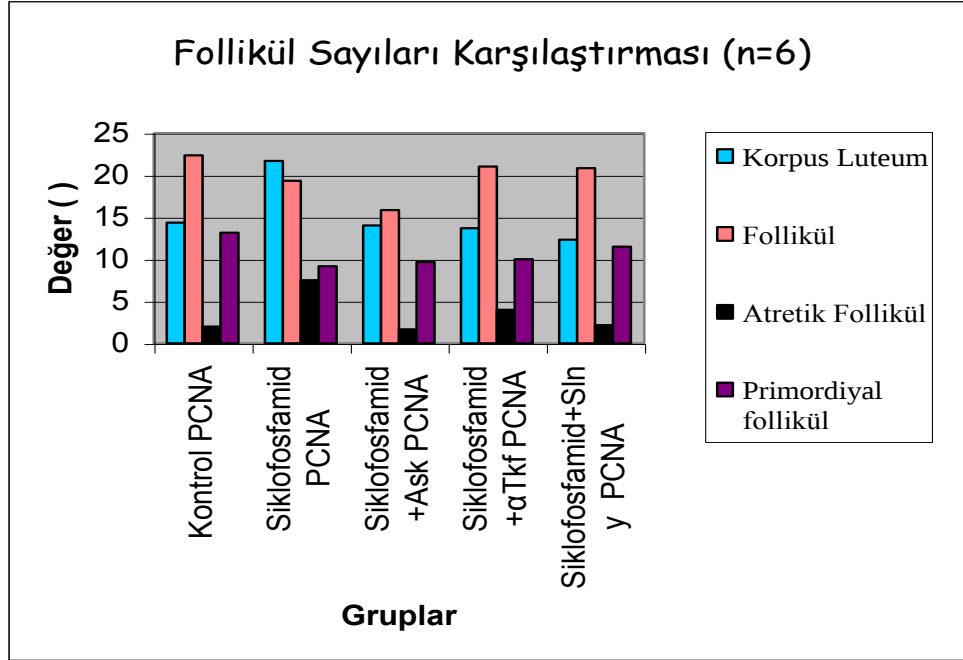
Grafik 4: Gruplar arasındaki TUNEL pozitif hücre karşılaştırması



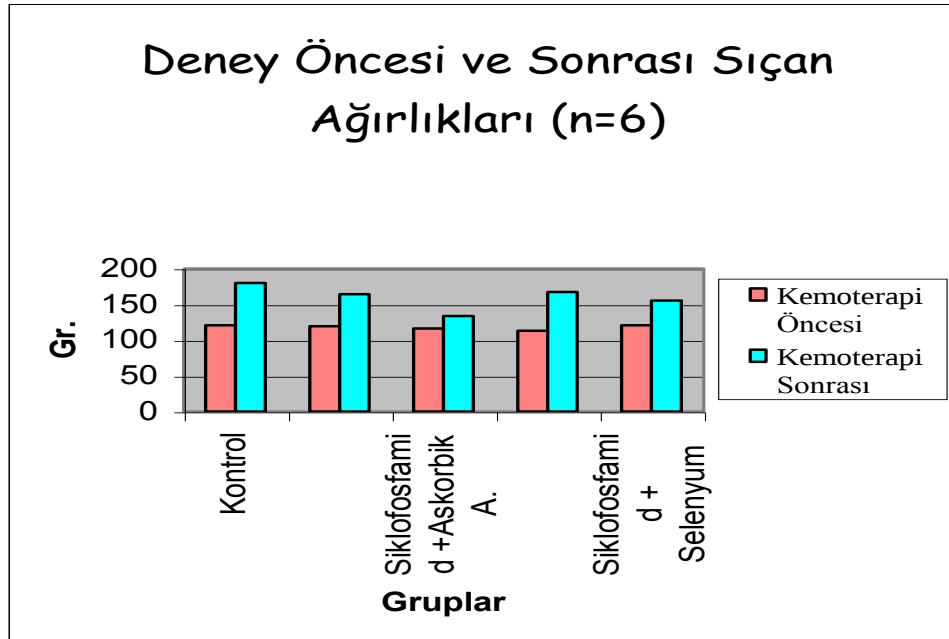
Grafik 5: Gruplar arasındaki kaspaz-3 antikoru immünreaktivitesi karşılaştırması



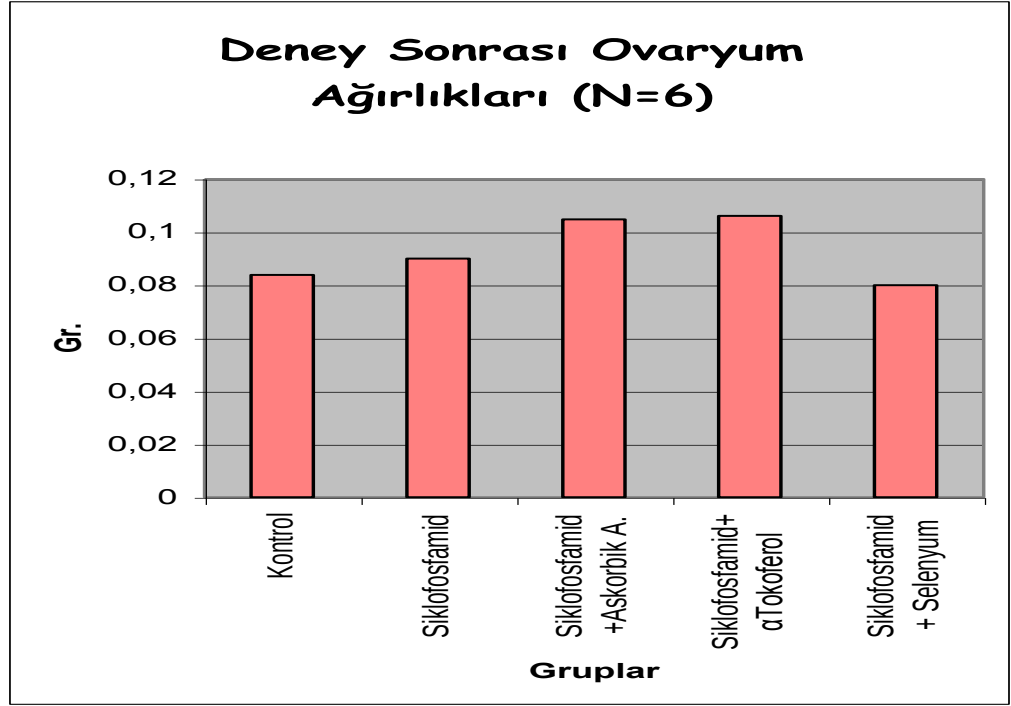
Grafik 6: Gruplar arasındaki APAF-1 antikoru immünreaktivitesi karşılaştırması



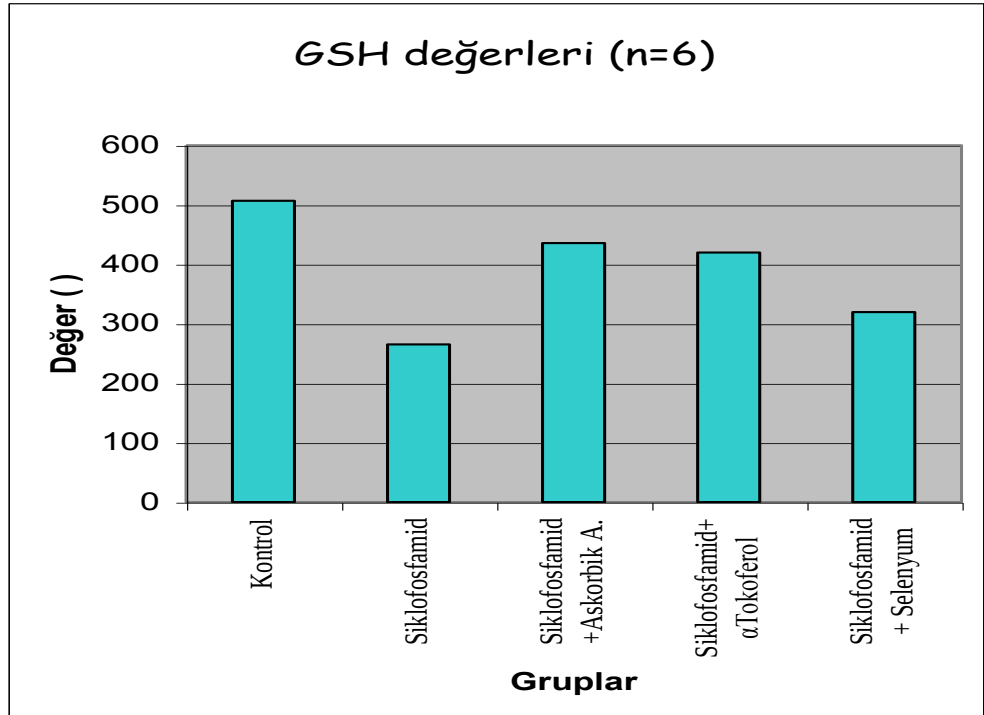
Grafik 7. Gruplar arasındaki follikül sayıları karşılaştırması



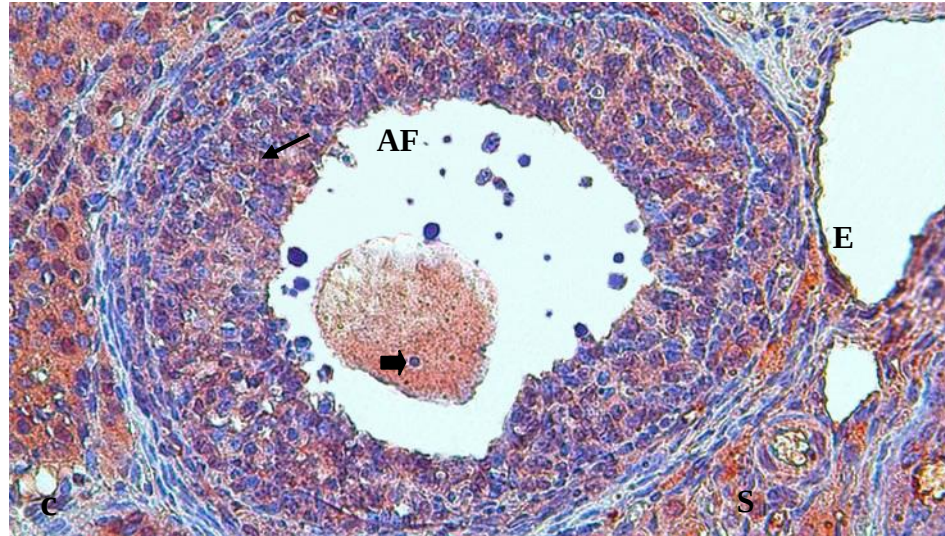
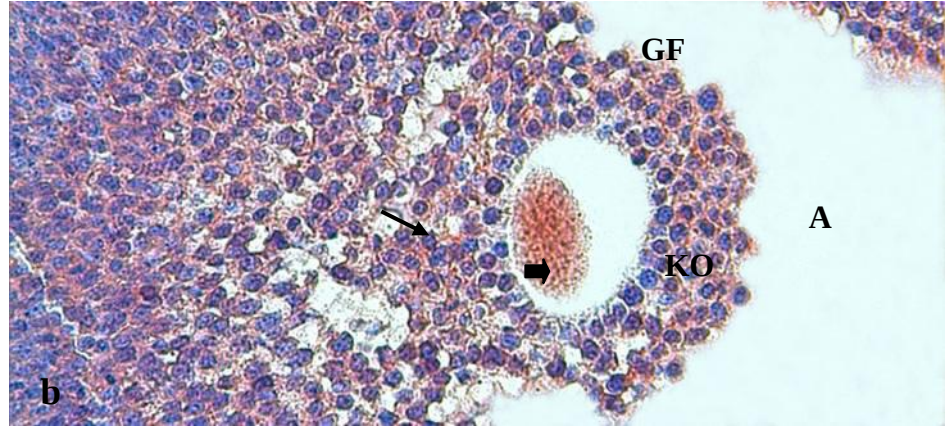
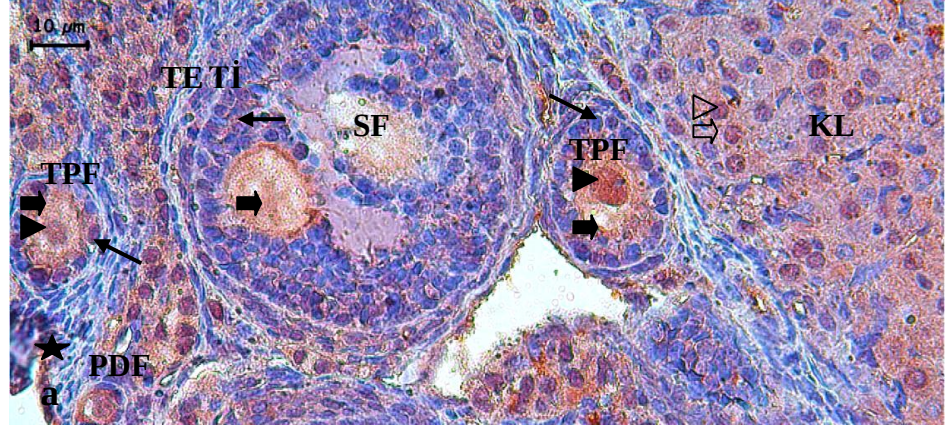
Grafik 8 . Deney öncesi ve sonrası sıçan ağırlıklarının karşılaştırılması



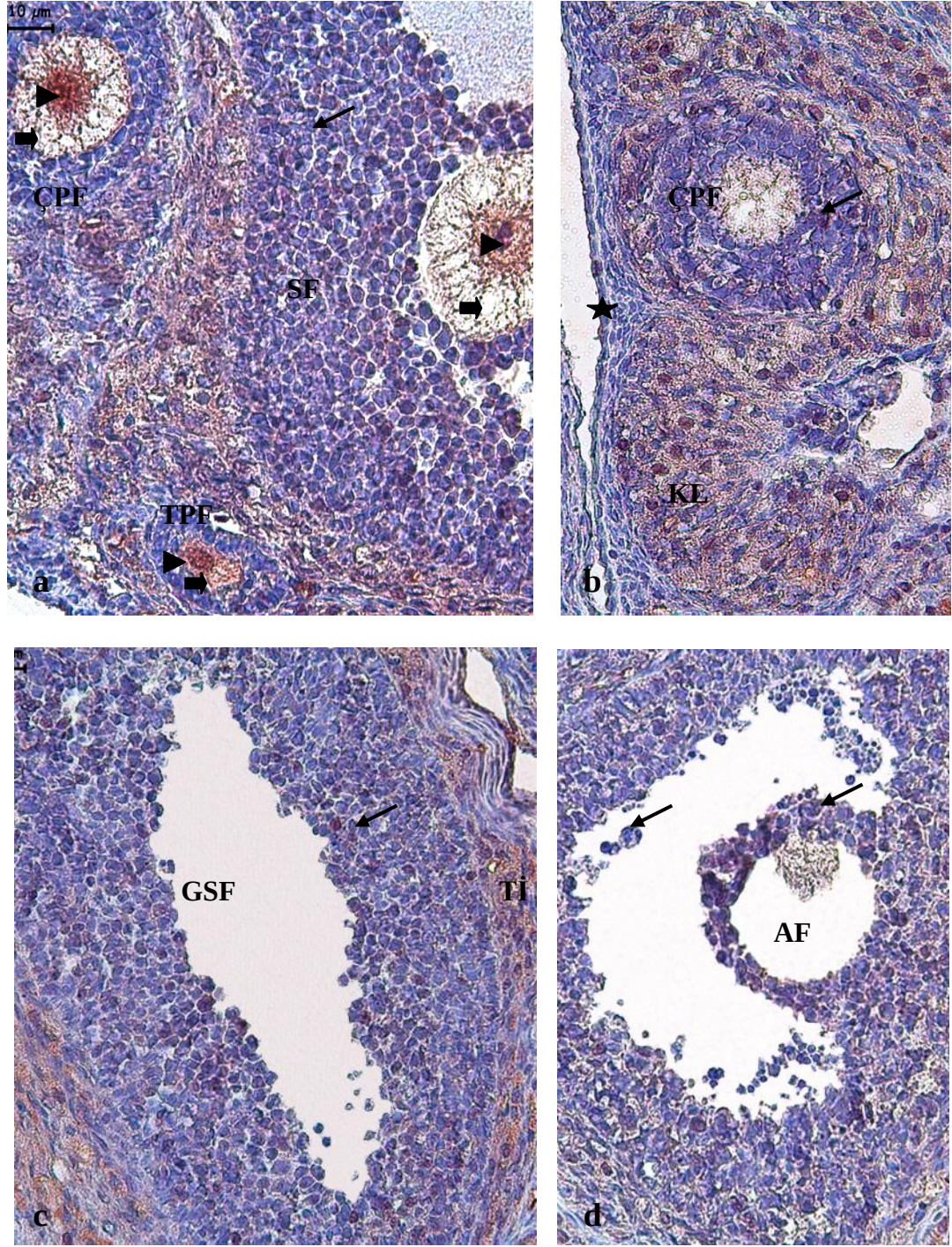
Grafik 9. Gruplar arasında deney sonrası ovaryum ağırlıklarının karşılaştırılması



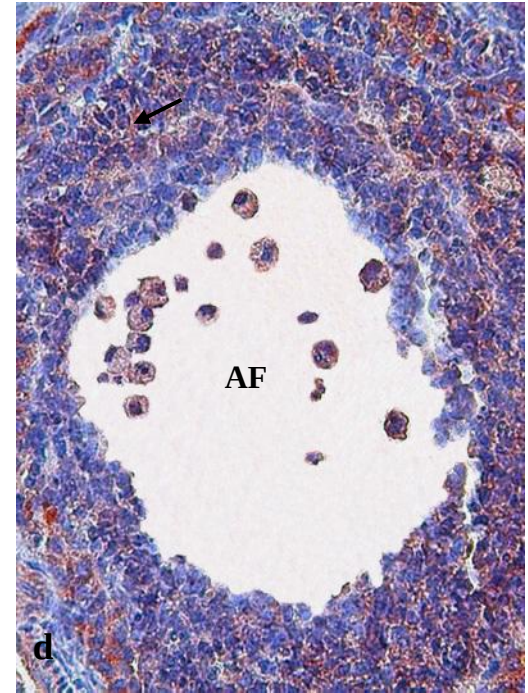
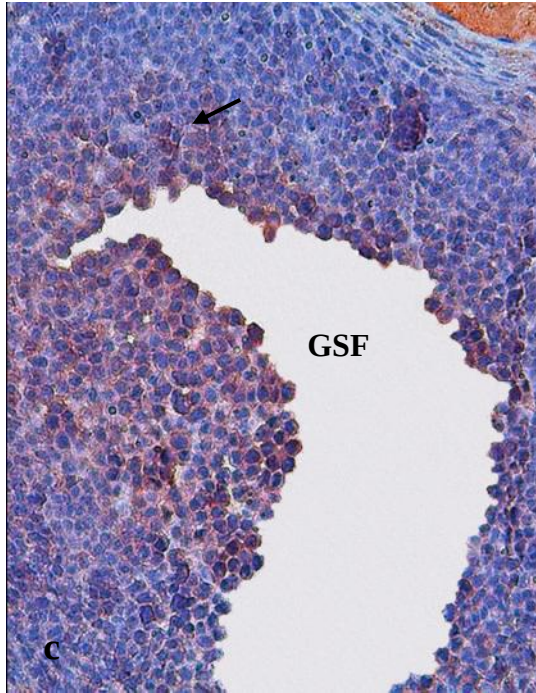
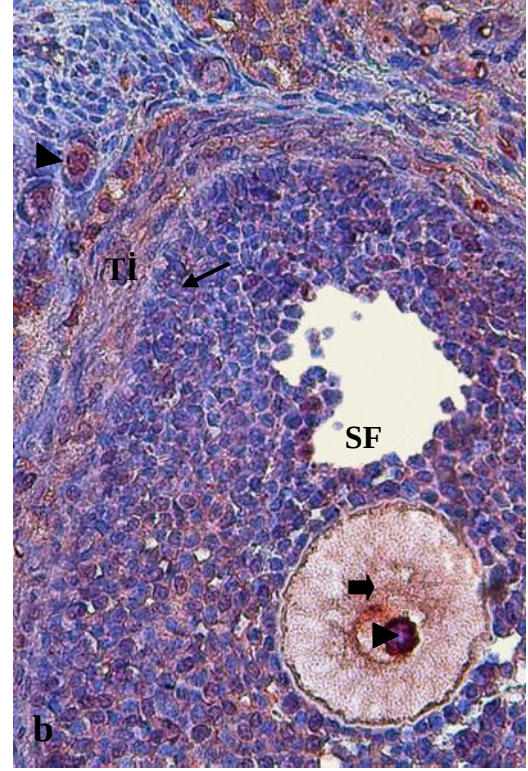
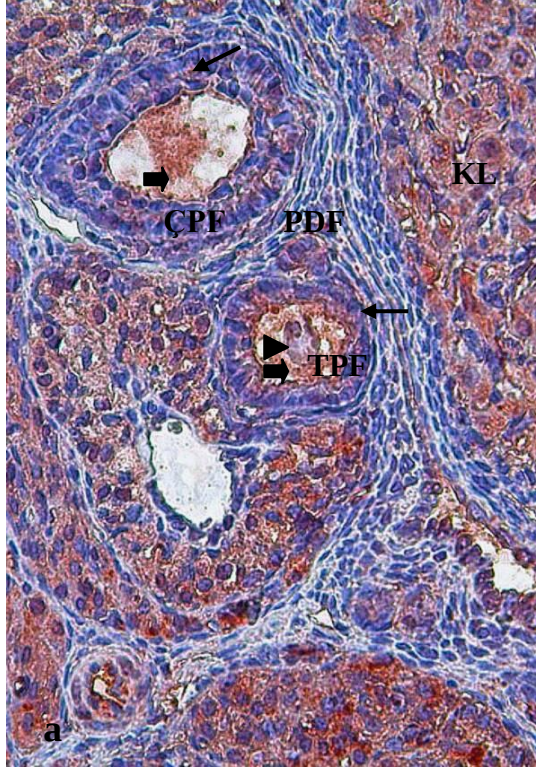
Grafik 10. Gruplar arasında GSH değerlerinin karşılaştırılması



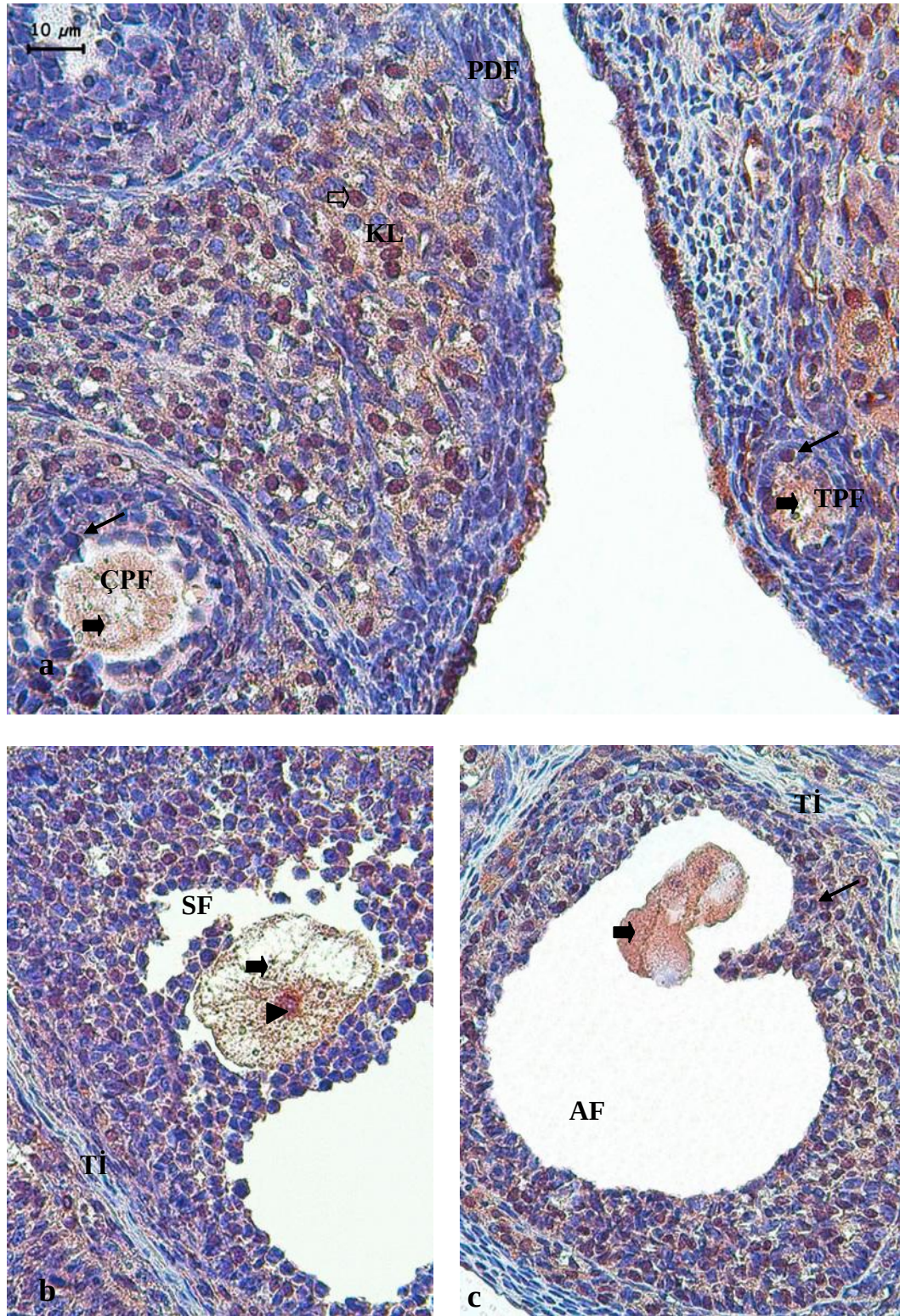
Resim 1: TGF- β_1 boyaması yapılan kontrol grubuna ait ovaryum'da a) Primordiyal follikül (PDF), Tek sıralı Primer follikül (TPF), Sekonder Follikül (SF), Oosit sitoplazması (➤), Oosit çekirdeği (➡), Granüloza hücresi (➡), Epitel (★), Teka interna (Tİ), Teka Eksterna (TE), Korpus luteum (KL), KL Çekirdek (➤), KL Sitoplazma (➡), b) Graaf follikül (GF), Antrum (A), Kumulus ooforus (KO), Granüloza hücresi (➡), Oosit sitoplazması (➤), c) Atretik follikül (AF), Oosit sitoplazması (➤), Granüloza hücresi (➡), Stromal hücre (S), Damar endoteli (E) (İmmünperoksidadz-Hematoksilen a,b,c X400)



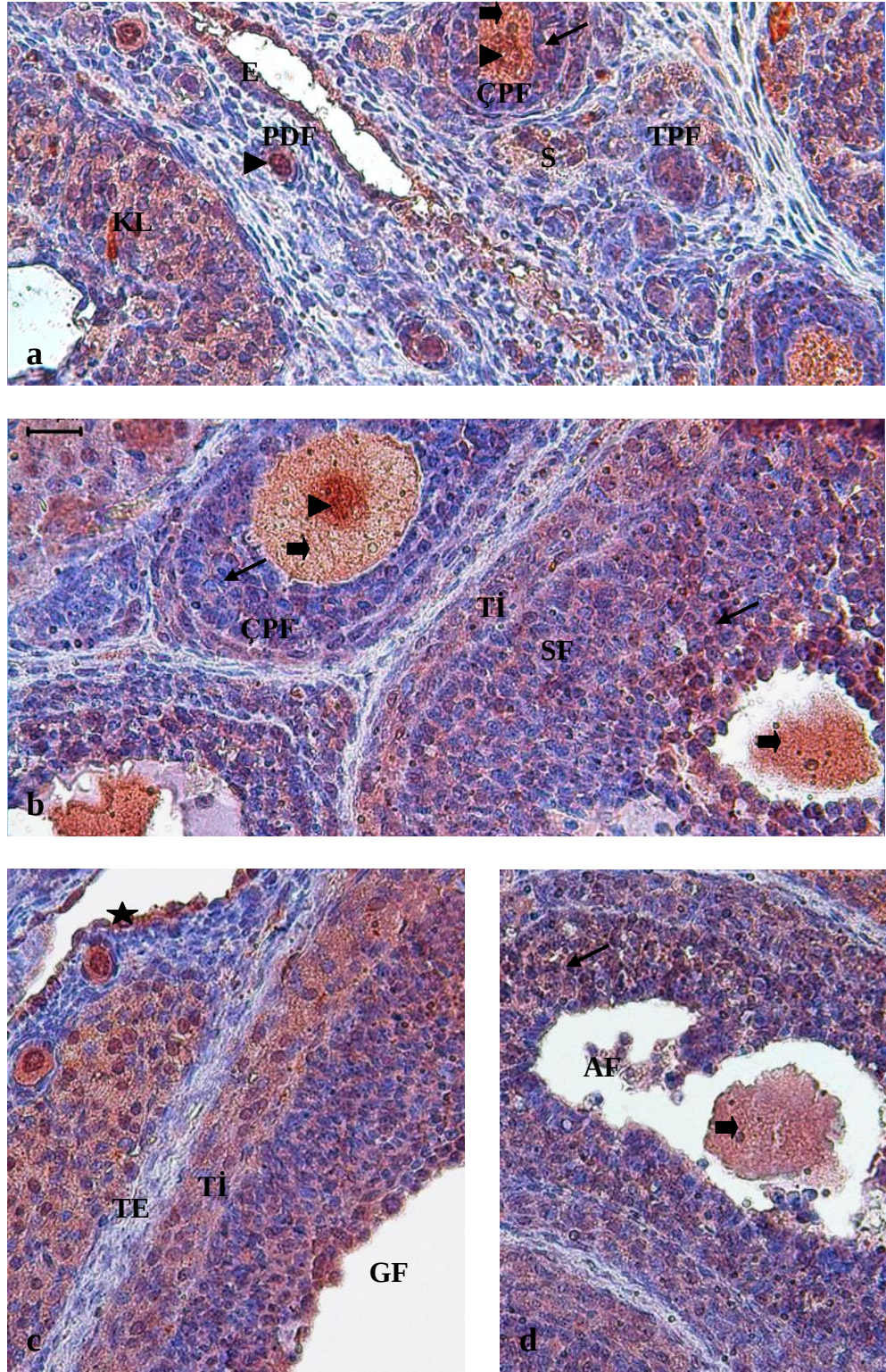
Resim 2: TGF- β_1 boyaması yapılan Siklofosfamid uygulanan gruba ait ovaryum'da a) Tek sıralı Primer follikül (TPF), Çok sıralı primer follikül (ÇPF), Sekonder Follikül (SF), Oosit Çekirdeği (►), Oosit sitoplazması (►), Granüloza hücresi (→), b) Çok sıralı Primer follikül (ÇPF), Korpus luteum (KL), Yüzey epiteli (★), c) Geç sekonder follikül (GSF), Teka interna (Tİ), Granüloza hücresi (→), d) Atretik follikül (AF), Granüloza hücresi (→). (İmmünperoksidaz-Hematoksilen a,b,c,d X400)



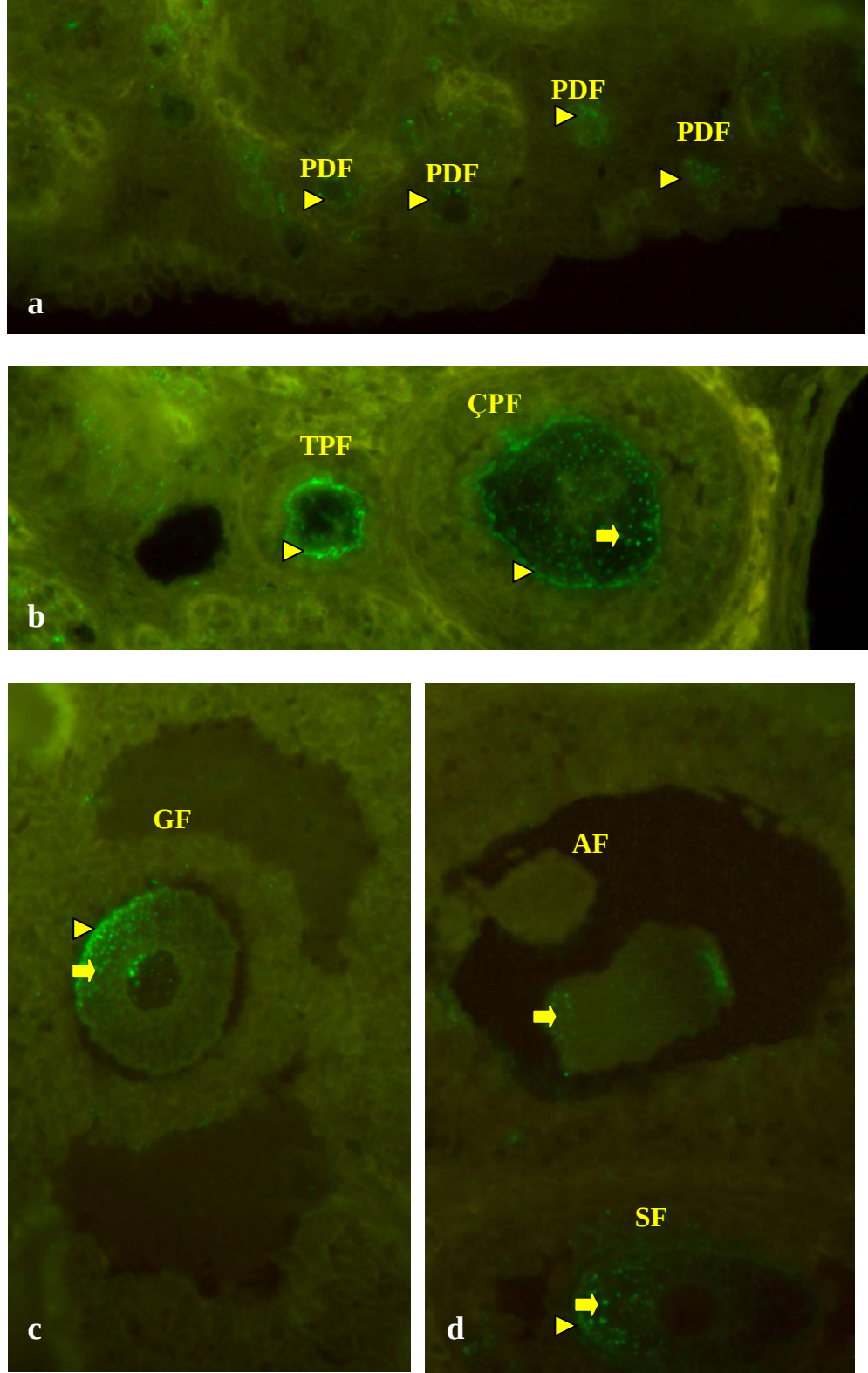
Resim 3: TGF- β_1 boyaması yapılan Siklofosfamid ve askorbik asit uygulanan gruba ait ovaryum'da a) Primordiyal follikül (PDF), Tek sıralı primer follikül (TPF), Çok sıralı primer follikül (ÇPF), Korpus Luteum (KL), Oosit Çekirdeği (►), Oosit sitoplazması (➡), Granüloza hücresi (→), b) Sekonder follikül (SF), Teka interna (Tİ), Oosit Çekirdeği (►), Oosit sitoplazması (➡), Granüloza hücresi (→), c) Geç sekonder follikül (GSF), d) Atritik follikül (AF). (İmmünperoksidaz-Hematoksilen a,b,c,d X400)



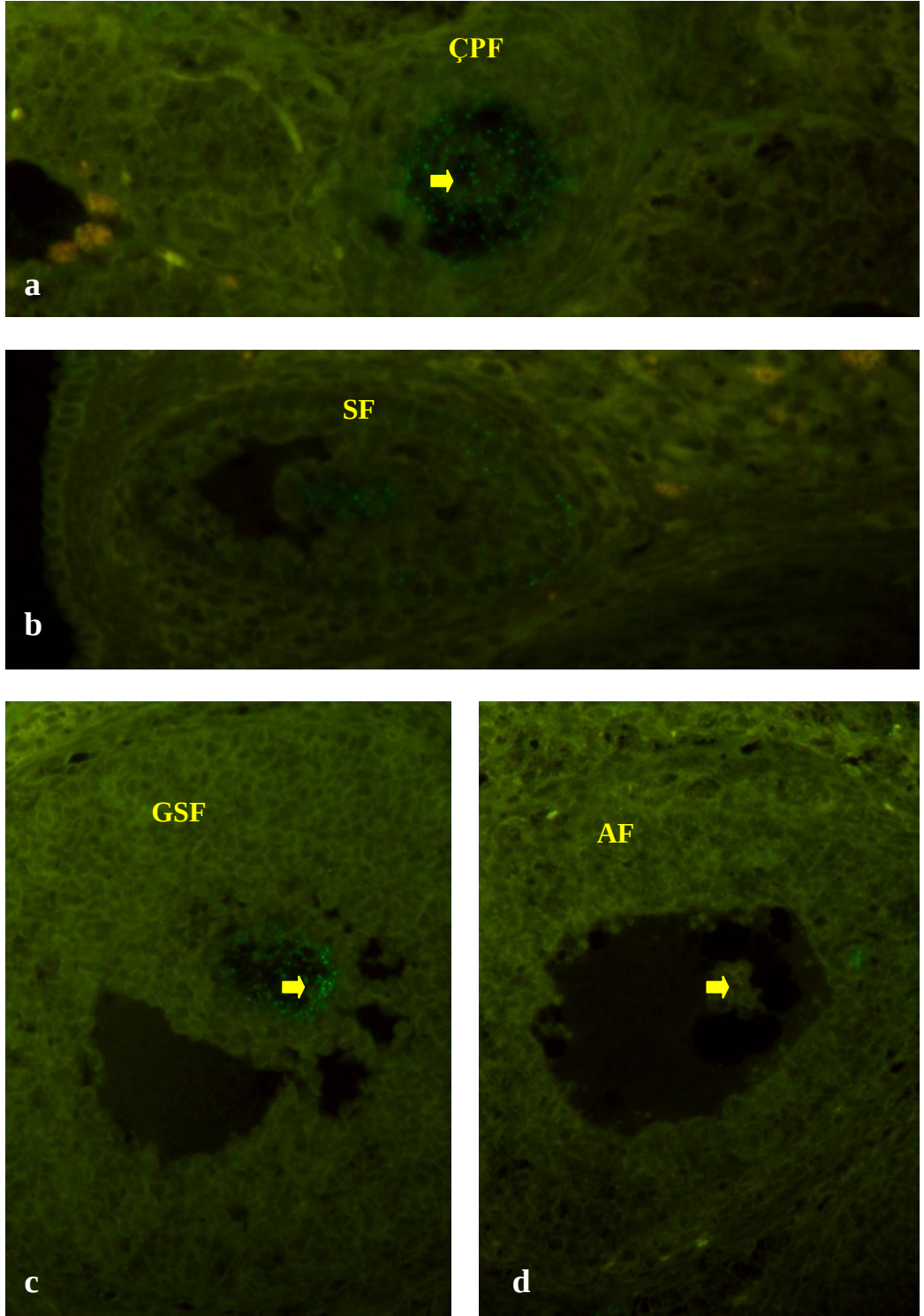
Resim 4: TGF- β_1 boyaması yapılan Siklofosfamid ve α -tokoferol uygulanan gruba ait ovaryum'da
a) Primordiyal follikül (PDF), Tek sıralı primer follikül (TPF), Çok sıralı primer follikül (ÇPF), Oosit sitoplazması (➡), Granüloza hücresi (➡), Korpus Luteum (KL), KL hücre çekirdeği (➡), b) Sekonder follikül (SF), Oosit Çekirdeği (➡), Oosit sitoplazması (➡), Teka interna (Tİ), c) Atretik follikül (AF), Oosit sitoplazması (➡), Granüloza hücresi (➡), Teka interna (Tİ). (İmmünperoksidaz-Hematoksilen a,b,c X400)



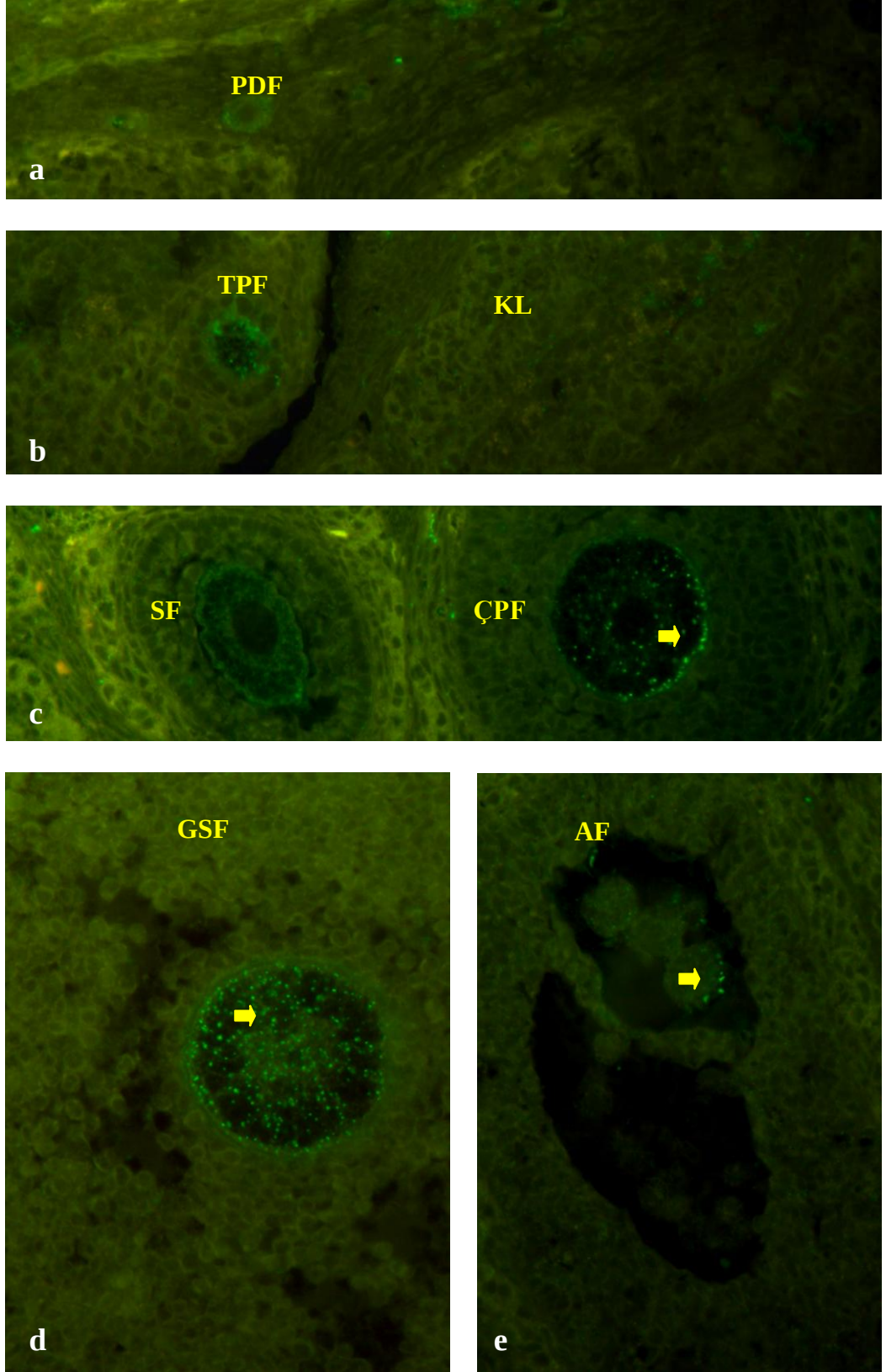
Resim 5: TGF- β_1 boyaması yapılan Siklofosamid ve selenyum uygulanan gruba ait ovaryum'da
a) Primordiyal follikül (PDF), Tek sıralı primer follikül (TPF), Çok sıralı primer follikül (ÇPF), Oosit sitoplazması (➡), Oosit Çekirdeği (▶), Granüloza hücresi (➔), Korpus Luteum (KL), Stromal hücre (S), Damar endoteli (E), b) Sekonder follikül (SF), Çok sıralı primer follikül (ÇPF), Teka interna (Tİ), Oosit Çekirdeği (▶), Oosit sitoplazması (➡), c) Graaf folikülü (GF), Teka interna (Tİ), Teka eksterna (TE), Ovaryum epiteli (★), d) Atretik follikül (AF), Oosit sitoplazması (➡), Granüloza hücresi (➔). (İmmünperoksidaz-Hematoksilen a,b,c,d X400)



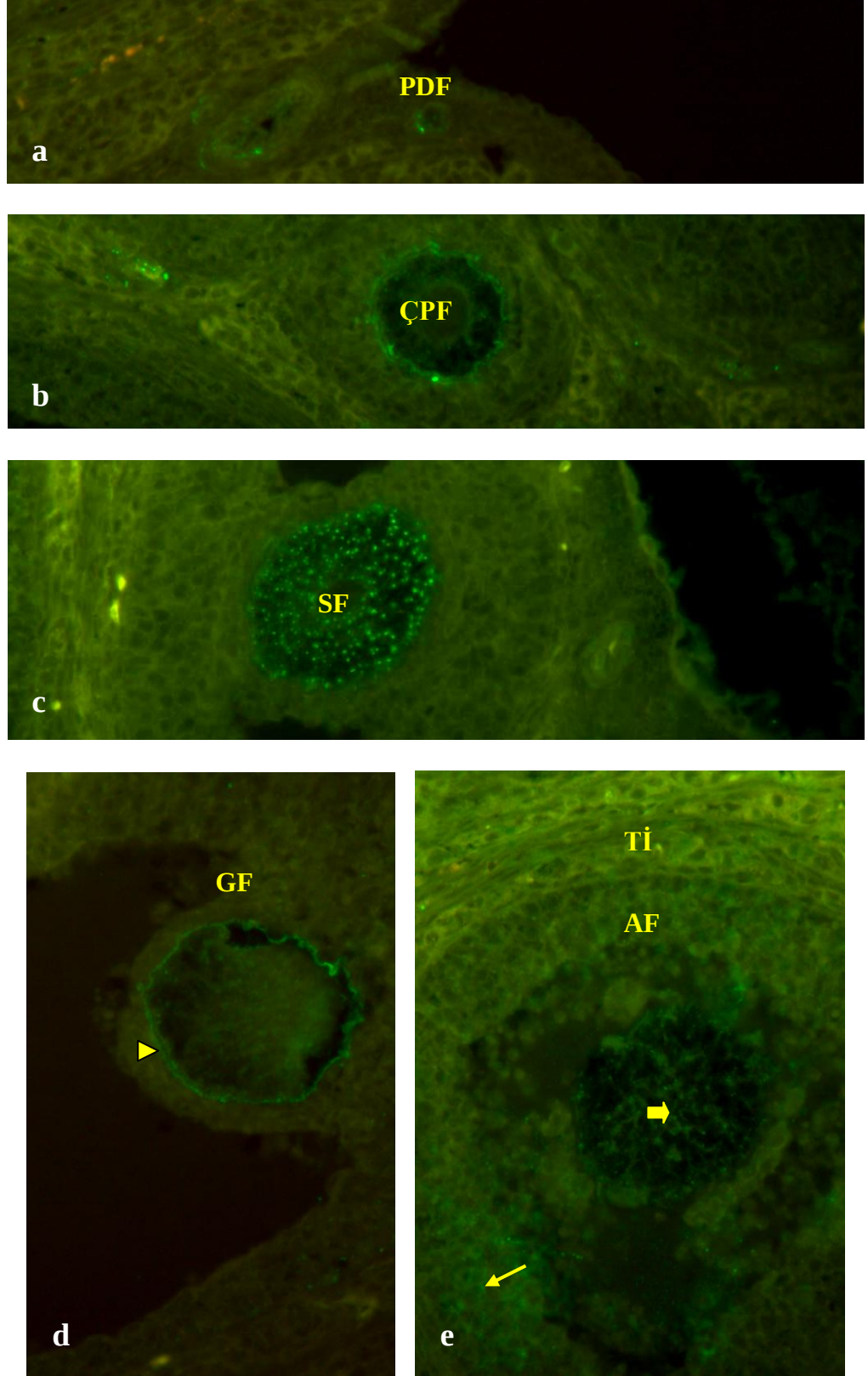
Resim 6: GDF-9 boyaması yapılan kontrol grubuna ait ovaryumda a) Primordiyal follikül (PDF), Oosit zarı (►), b) Tek sıralı primer follikül (TPF), Çok sıralı primer follikül (ÇPF), Oosit zarı (►), Oosit sitoplazması (►), c) Graaf follikülü (GF), Oosit zarı (►), Oosit sitoplazması (►), d) Sekonder follikül (SF), Atretik follikül (AF), Oosit zarı (►), Oosit sitoplazması (►), (İmmüno Floresan-FITC a,b,c,d X400)



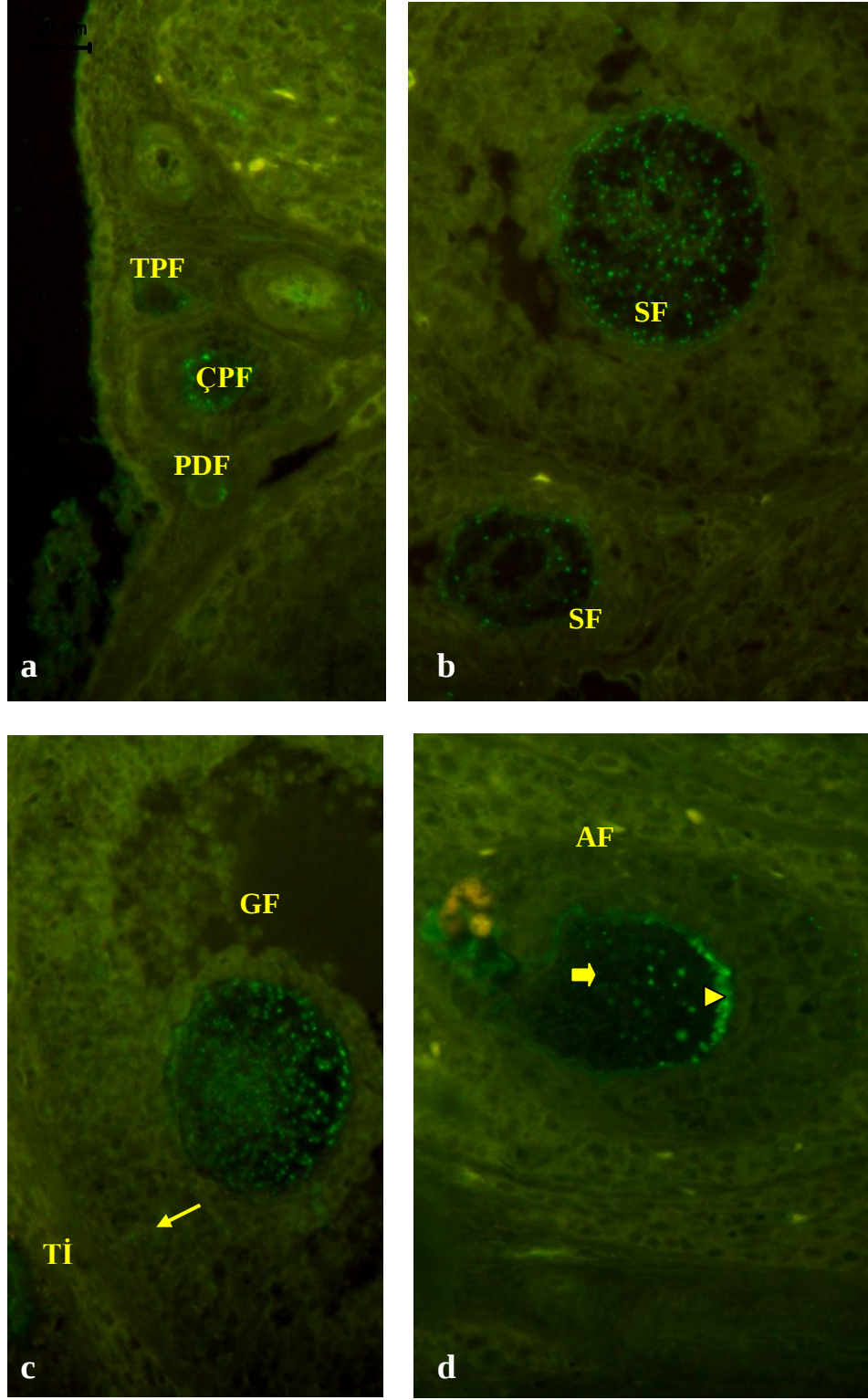
Resim 7: GDF-9 boyaması yapılan Siklofosfamid grubuna ait ovaryum'da a) Çok sıralı primer follikül (ÇPF), Oosit sitoplazması (➡), b) Sekonder follikül (SF), c) Geç sekonder follikül (GSF), Oosit sitoplazması (➡), d) Atretik follikül (AF), Oosit sitoplazması (➡) (İmmüno Floresan-FITC a,b,c,d X400)



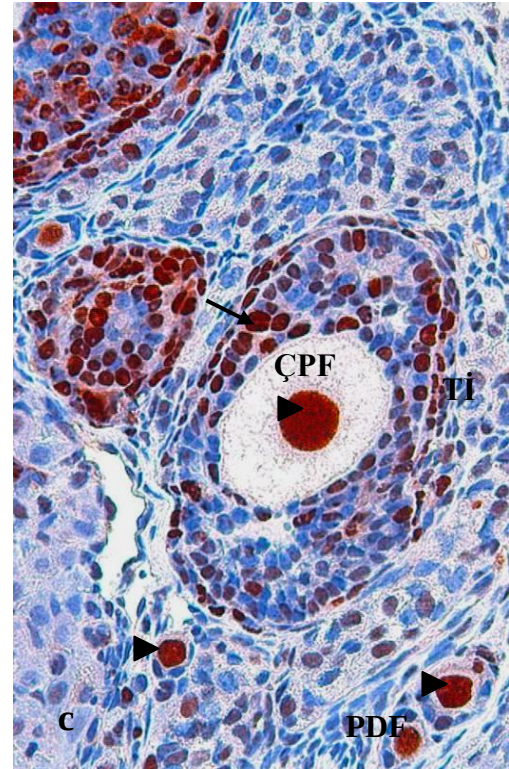
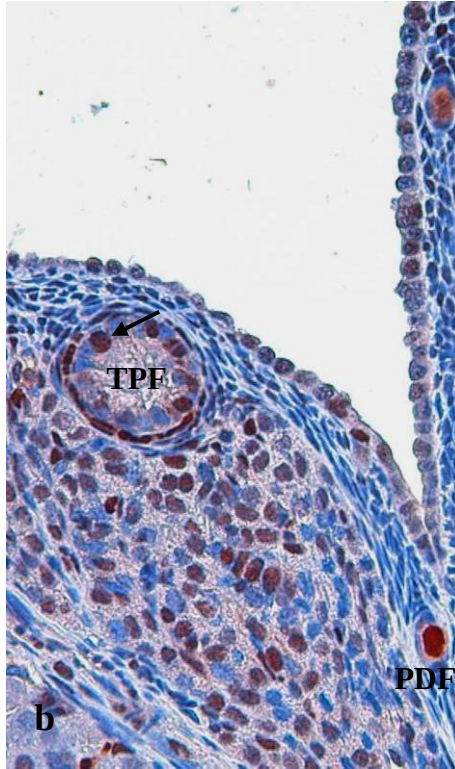
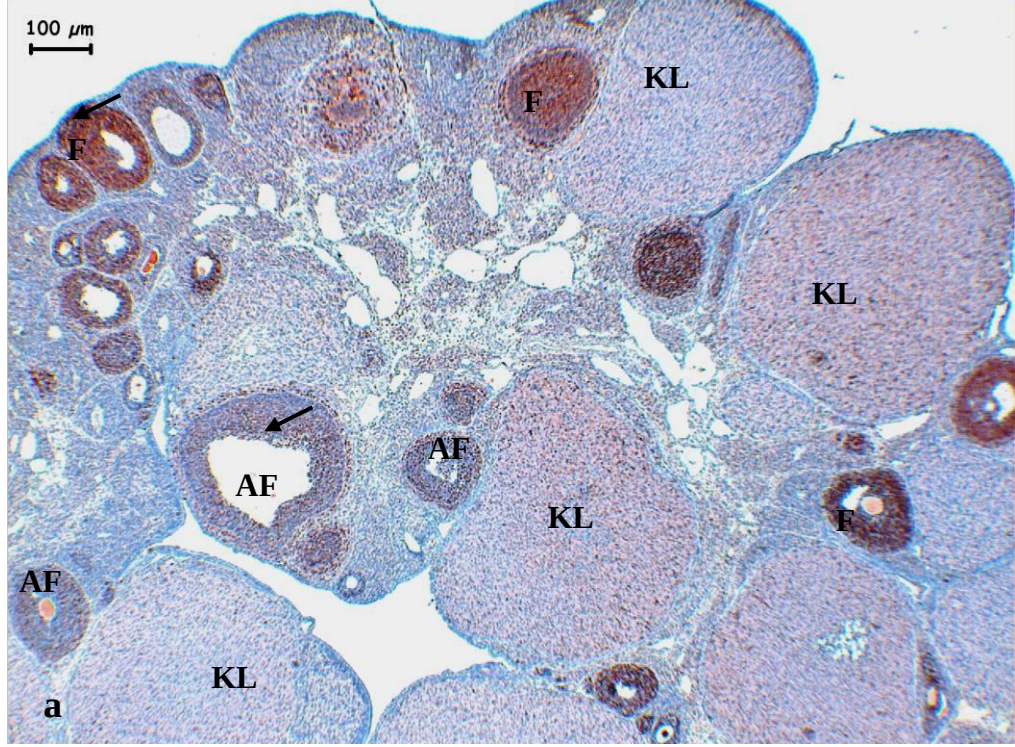
Resim 8: GDF-9 boyaması yapılan Siklofosamid ve askorbik asit uygulanan gruba ait ovaryum'da a) Primordiyal follikül (PDF), b) Tek sıralı primer follikül (TPF), Korpus luteum (KL) c) Çok sıralı primer follikül (ÇPF), Oosit sitoplazması (➡), Sekonder follikül (SF), d) Geç sekonder follikül (GSF), Oosit sitoplazması (➡), e) Atretik follikül (AF), Oosit sitoplazması (➡), (İmmüno Floresan-FITC a,b,c,d X400)



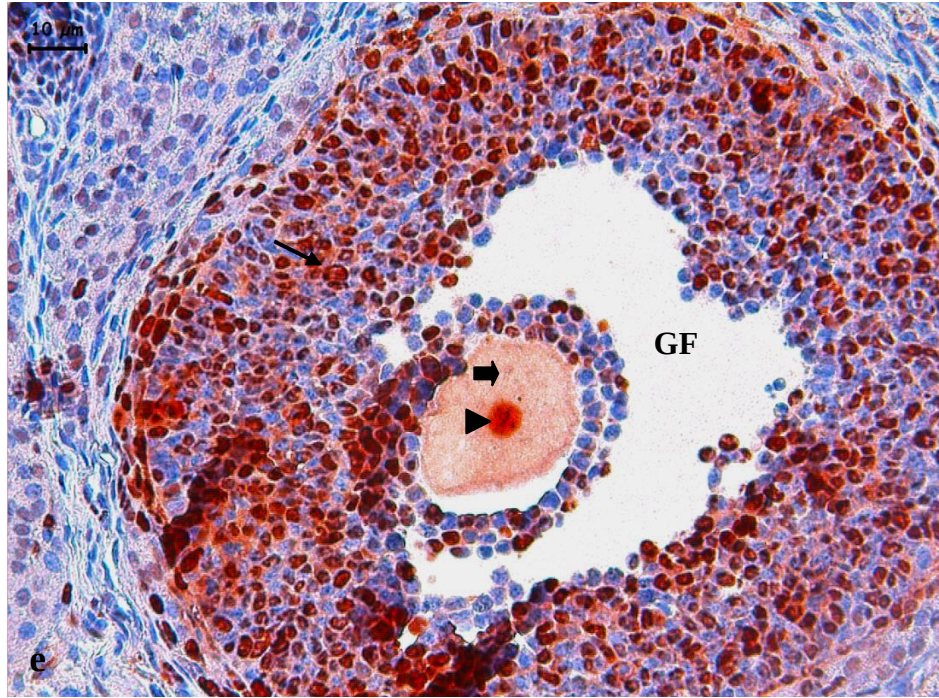
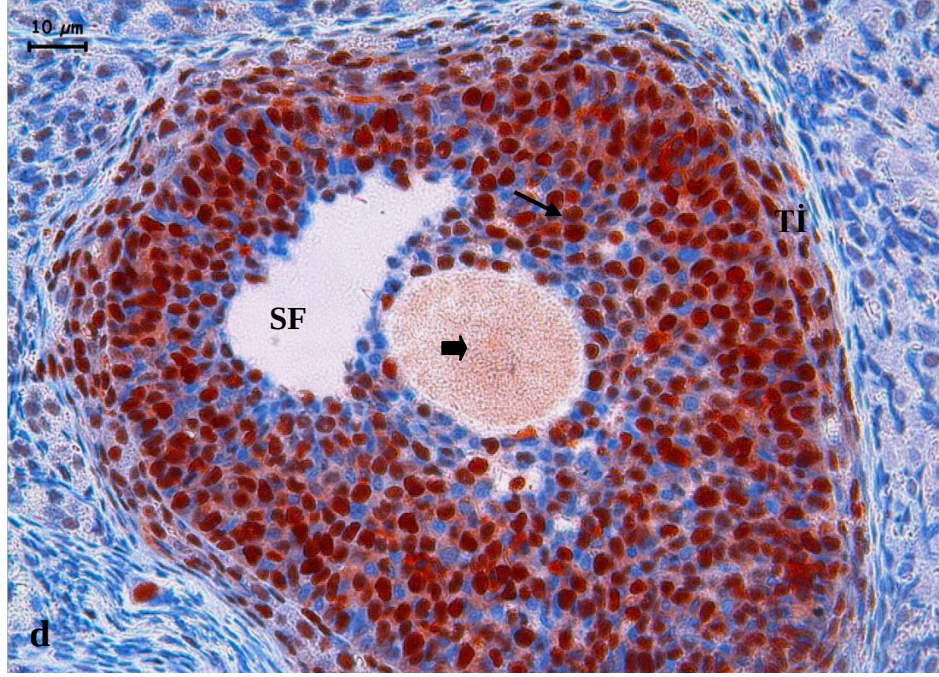
Resim 9: GDF-9 boyaması yapılan Siklofosfamid ve α -tokoferol uygulanan gruba ait ovaryum'da a) Primordiyal follikül (PDF), b) Çok sıralı primer follikül (ÇPF), c) Sekonder follikül (SF), d) Graaf follikül (GF), Oosit zarı (►), e) Atretik follikül (AF), Oosit sitoplazması (►), Granüloza hücresi (→), Teka interna (Tİ) (İmmüno Floresan-FITC a,b,c,d X400)



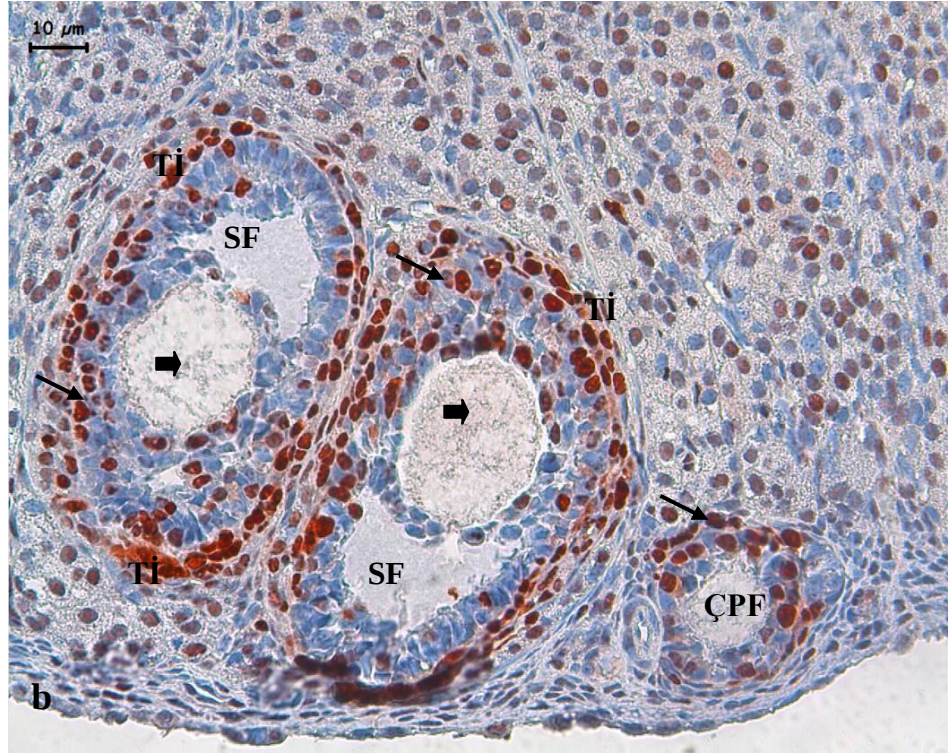
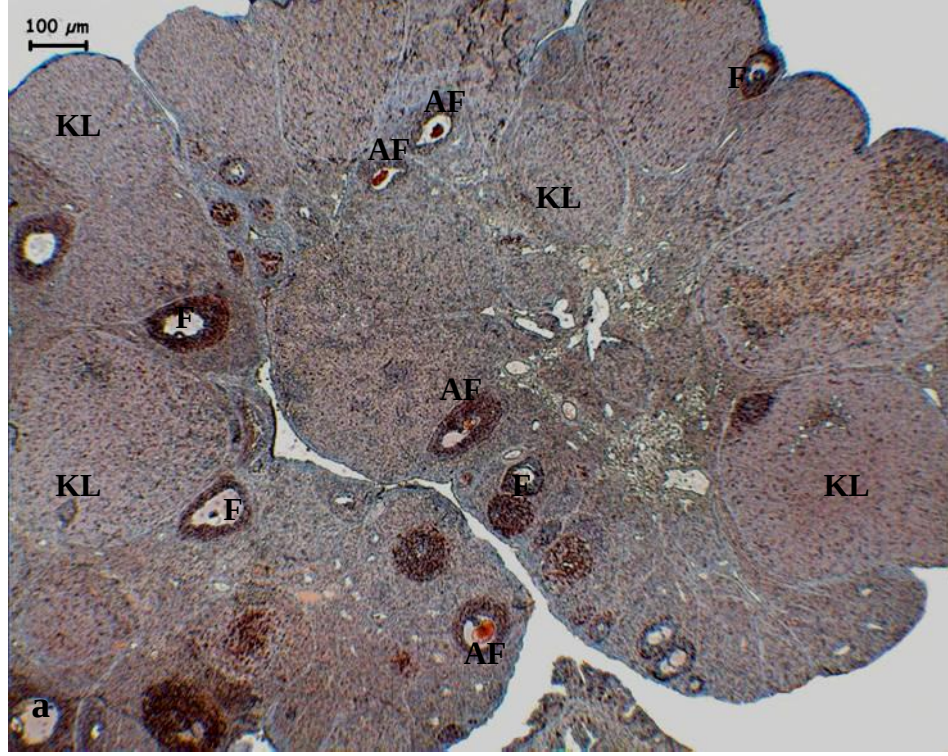
Resim 10: GDF-9 boyaması yapılan Siklofosfamid ve selenyum uygulanan gruba ait ovaryum'da a) Primordiyal follikül (PDF), Tek sıralı primer follikül (ÇPF), Çok sıralı primer follikül (ÇPF), b) Sekonder follikül (SF), c) Graaf follikül (GF), Granüloza hücresi (→), Teka interena (Tİ), d) Atreziye giden follikül (AF), Oosit sitoplazması (→), Oosit zarı (▶) (İmmüno Floresan-FITC a,b,c,d X400)



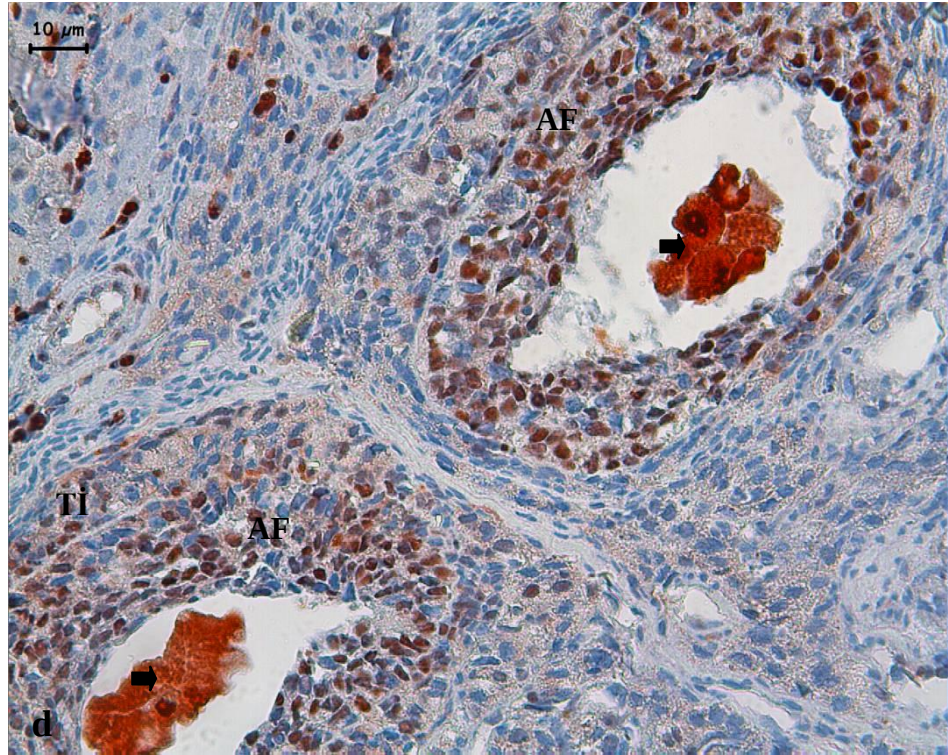
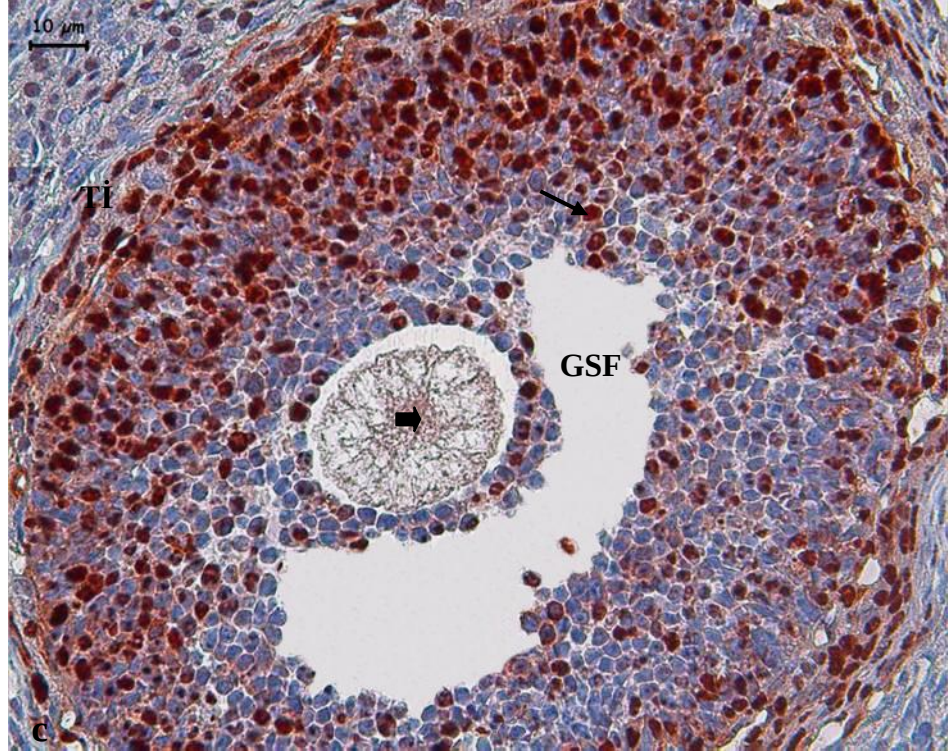
Resim 11: PCNA boyaması yapılan kontrol grubuna ait ovaryum'da a) Gelişmekte olan folliküller (F), Atreziye giden folliküller (AF), Granüloza hücresi (→), Korpus Luteum (KL), b) Primordiyal follikül (PDF), Tek sıralı primer follikül (TPF), Granüloza hücresi (→), c) Çok sıralı primer follikül (ÇPF), Oosit çekirdeği (►), Granüloza hücresi (→) Teka İnterna (Tİ). (İmmünperoksidaz-Hematoksilen aX40, b,cX400).



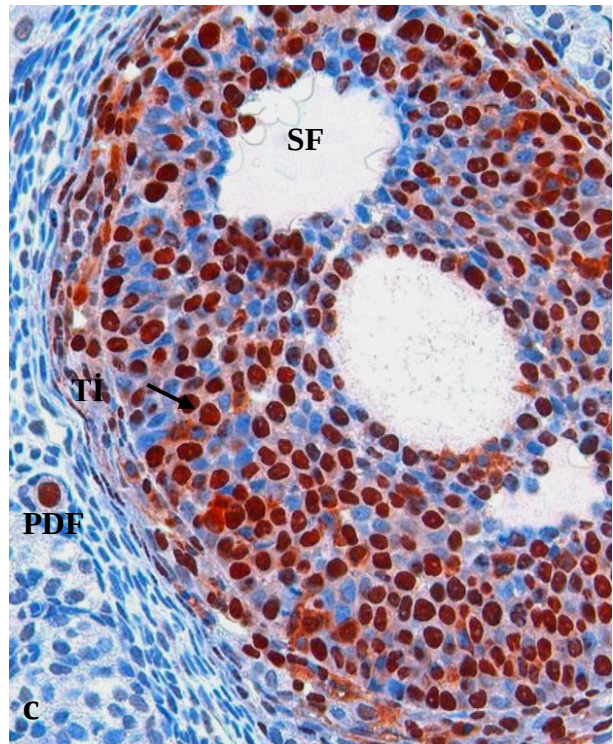
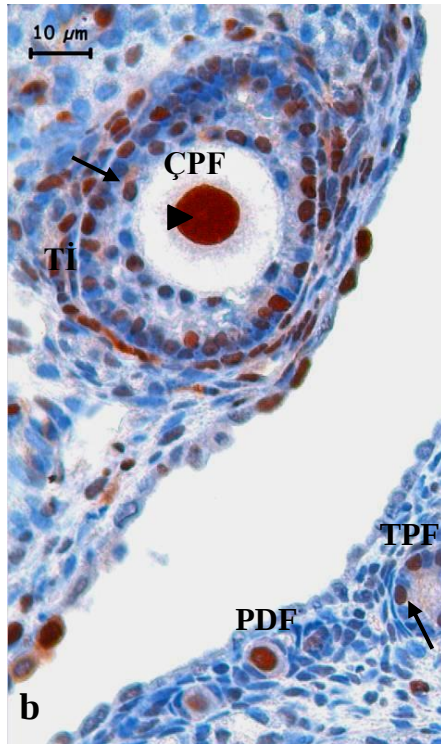
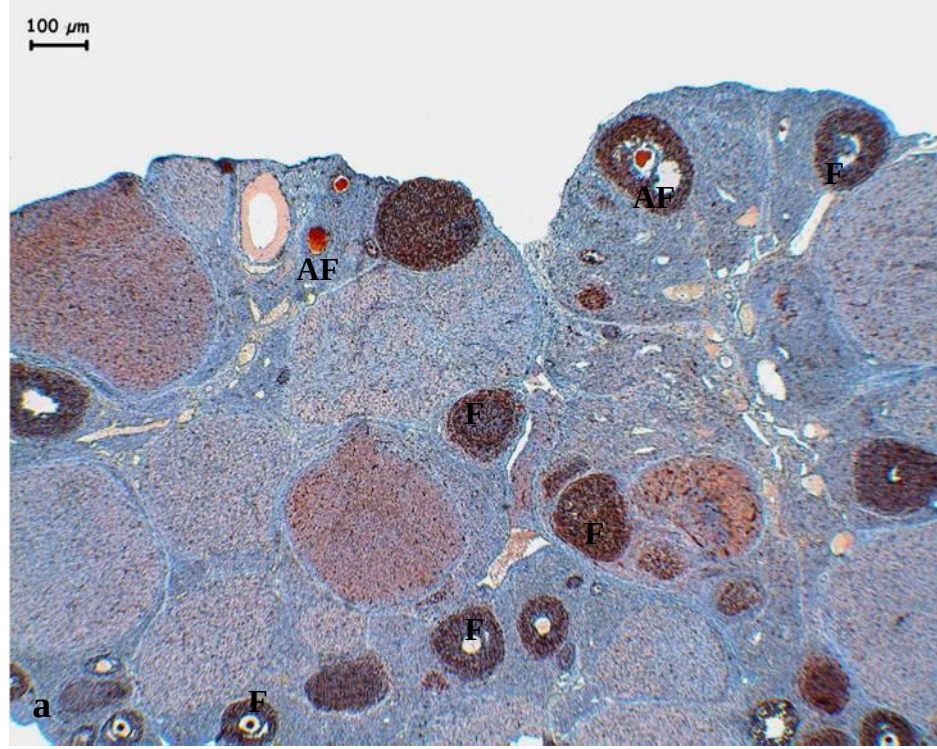
Resim 11: PCNA boyaması yapılan kontrol grubuna ait ovaryum'da d) Sekonder follikül (SF), Oosit sitoplazması (→), Granüloza hücresi (→), Teka interna (Tİ), e) Graaf folikülü (GF), Oosit çekirdeği (▶), Oosit sitoplazması (→), Granüloza hücresi (→). (İmmünperoksidaz-Hematoksilen d,e X400)



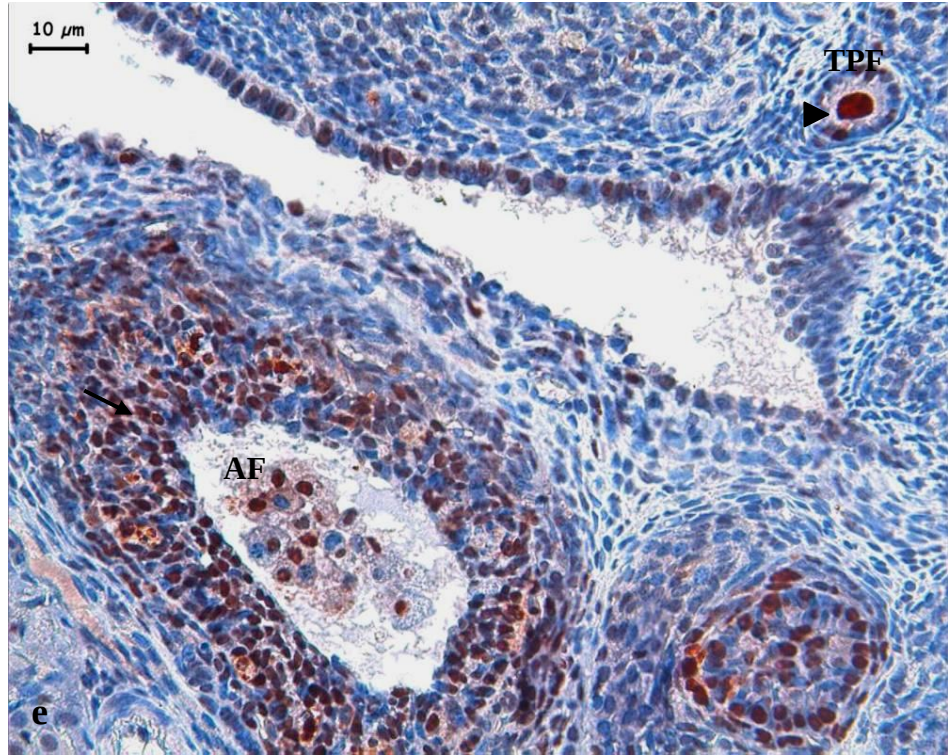
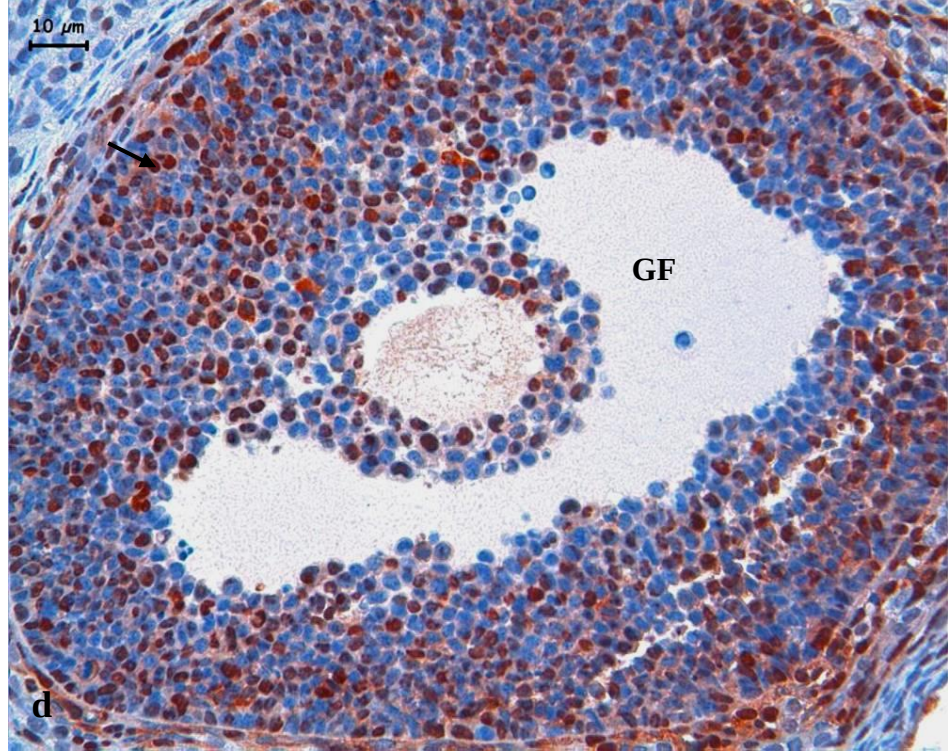
Resim 12: PCNA boyaması yapılan Siklofosamid grubuna ait ovaryum'da a) Gelişmekte olan folliküller (F), Atreziye giden folliküller (AF), Korpus luteum (KL), b) Çok sıralı primer follikül (ÇPF), Sekonder follikül (SF), Oosit sitoplazması (➡), Granüloza hücresi (➡), Teka interna (Tİ) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen aX40, bX400).



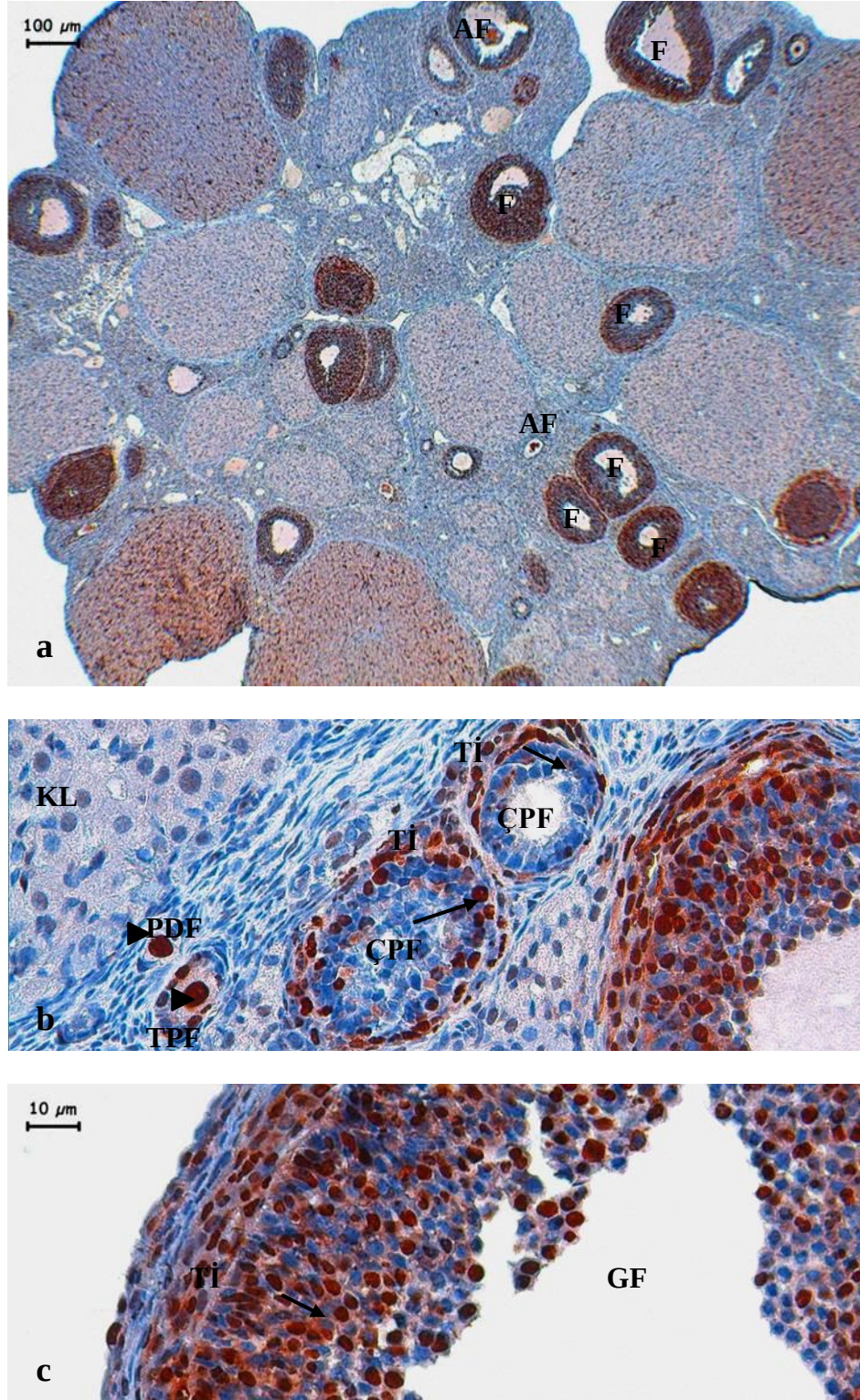
Resim 12: PCNA boyaması yapılan Siklofosfamid grubuna ait ovaryum'da c) Geç sekonder follikül (GSF). Teka interna (TI), Oosit sitoplazması (➡), Granüloza hücresi (➡), d) Atretik follikül (AF), Oosit sitoplazması (➡), Teka interna (TI). (İmmünperoksidaz-Hematoksilen c,d X400)



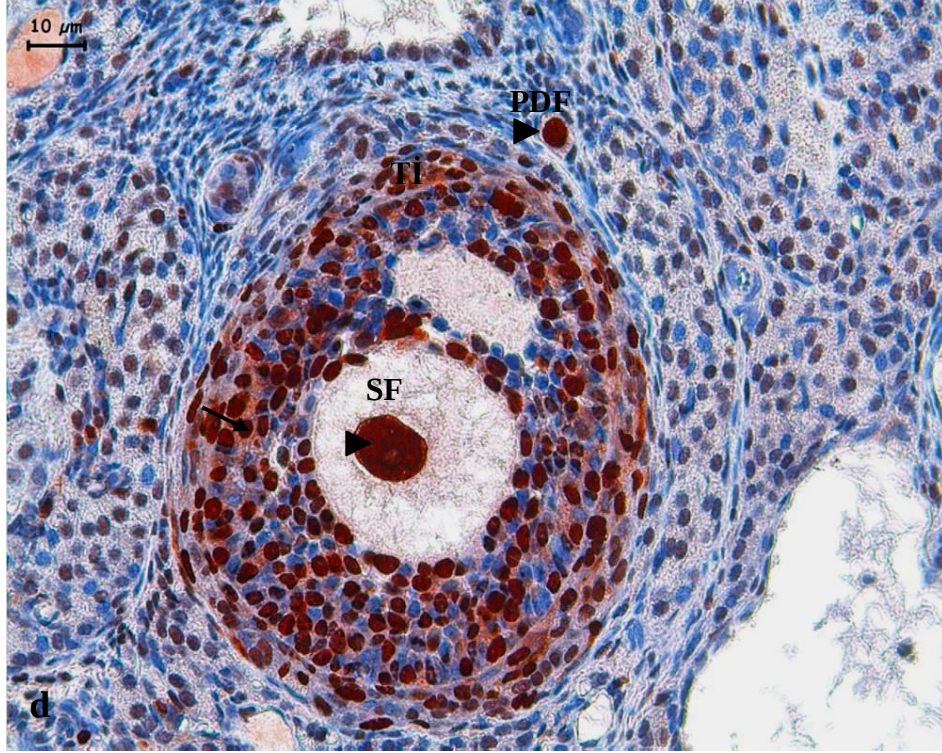
Resim 13: PCNA boyaması yapılan Siklofosamid ve askorbik asit uygulanan gruba ait ovaryum'da a) Gelişmekte olan folliküller (F), Atreziye giden folliküller (AF), b) Primordiyal follikül (PDF), Tek sıralı primer follikül (TPF), Çok sıralı primer follikül (ÇPF), Oosit çekirdeği (►), Granüloza hücresi (→), Teka interna (Tİ) c) Sekonder follikül (SF), Granüloza hücresi (→), Teka interna (Tİ) (İmmünoperoksidaz-Hematoksilen aX40, b,cX400).



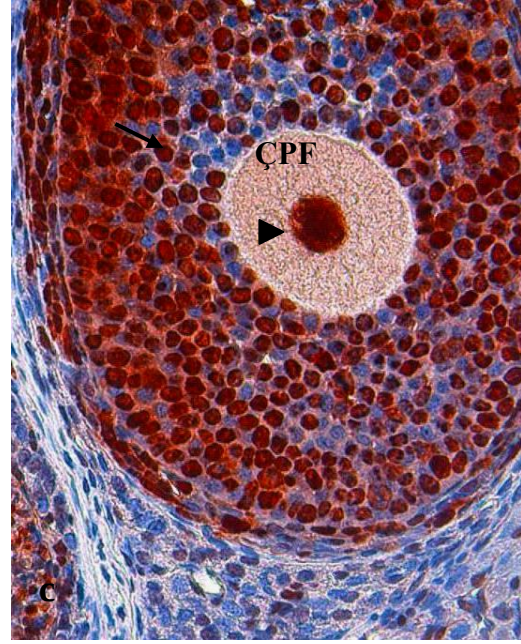
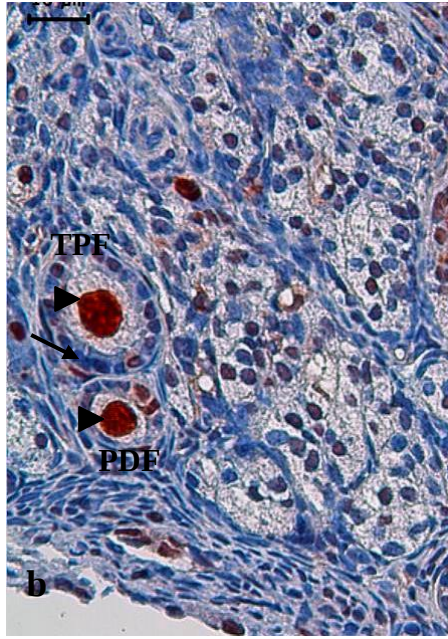
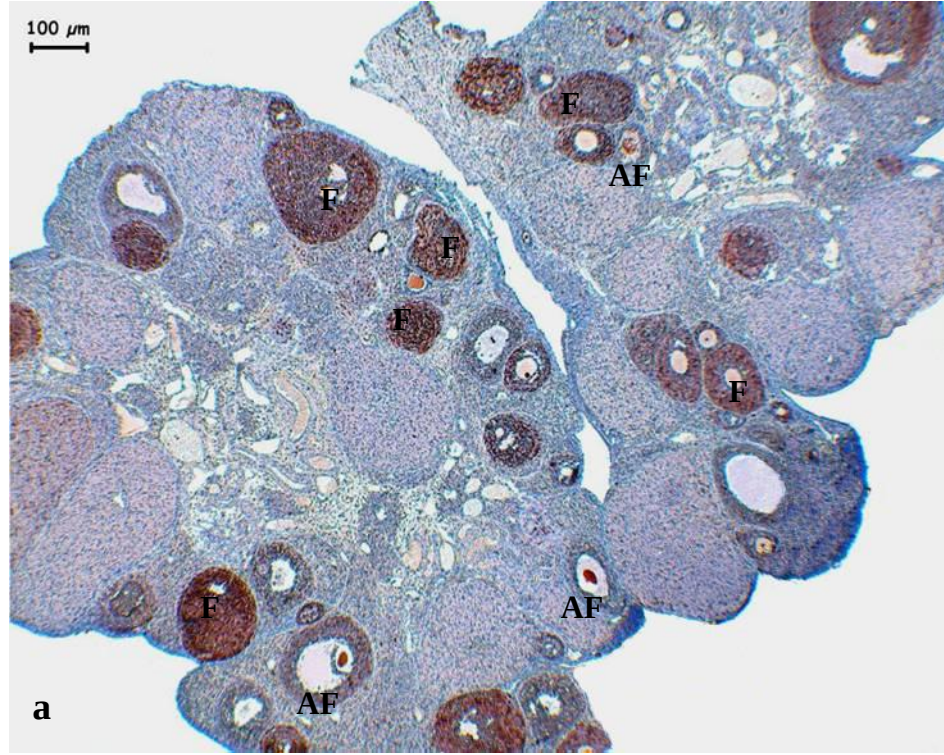
Resim 13: PCNA boyaması yapılan Siklofosfamid ve C vitamini uygulanan gruba ait ovaryum'da d) Graaf follikül (GF), Granüloza hücresi (→), e) Atretik follikül (AF), Granüloza hücresi (→), Tek sıralı primer follikül (TPF), Oosit çekirdeği (►) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen d,e X400)



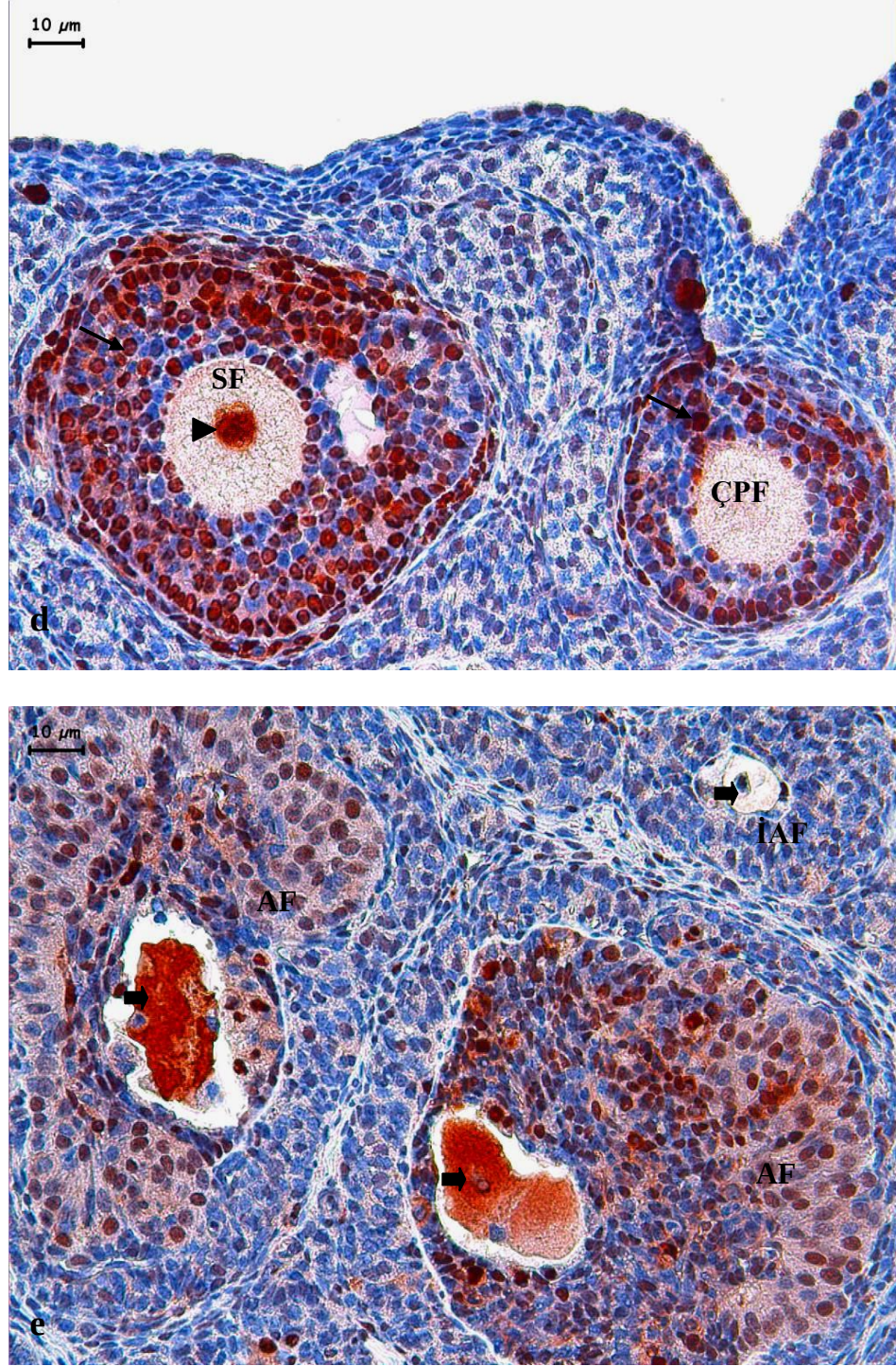
Resim 14: PCNA boyaması yapılan Siklofosamid ve α -tokoferol uygulanan gruba ait ovaryum'da a) Gelişmekte olan folliküller (F), Atreziye giden folliküller (AF), b) Primordiyal follikül (PDF), Tek sıralı primer follikül (TPF), Çok sıralı primer follikül (ÇPF), Oosit çekirdeği (►),Teka interna (Tİ), Granüloza hücresi (→), Korpus luteum (KL) c) Graaf follikül (GF), Granüloza hücresi (→), Teka interna (Tİ) (İmmünoperoksidaz-Hematoksilen aX40, b,cX400).



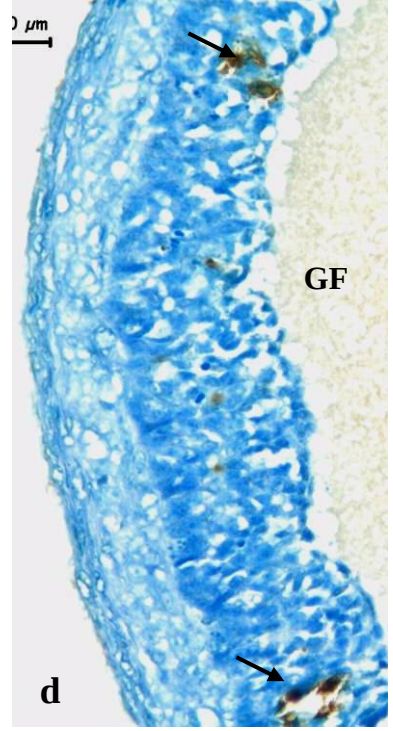
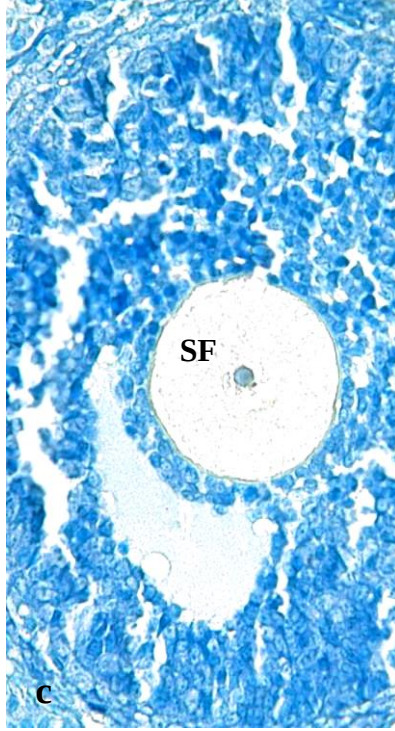
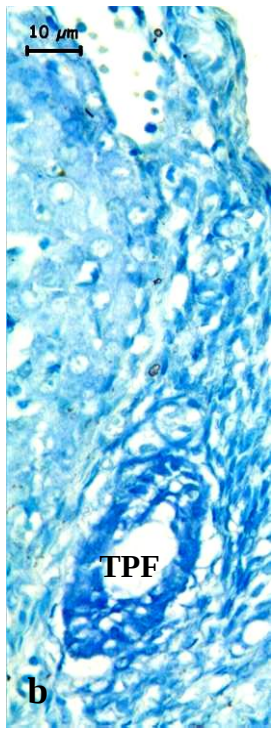
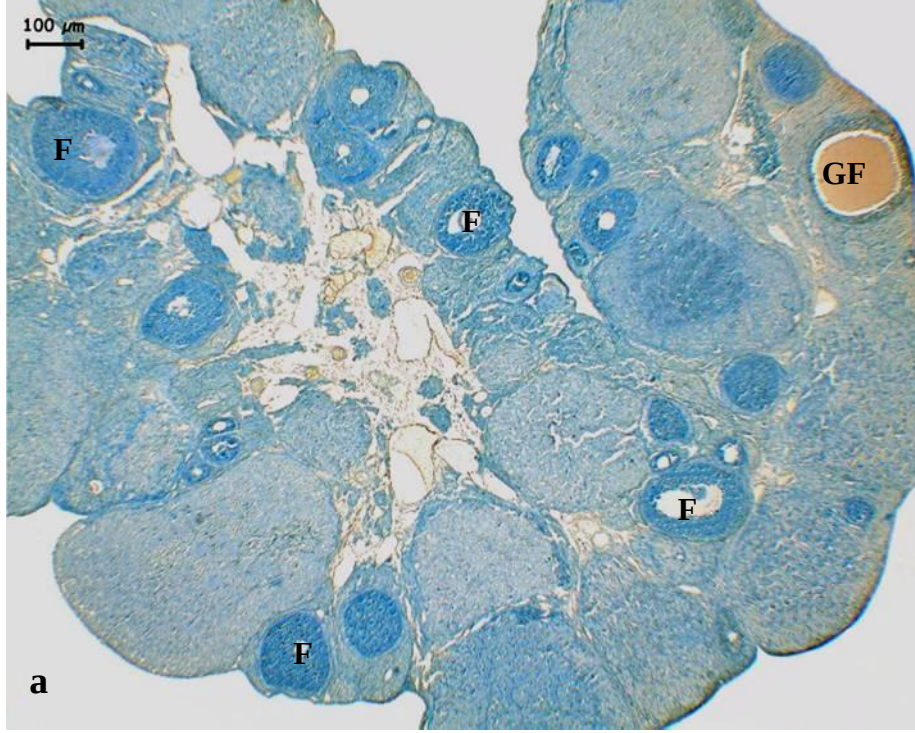
Resim 14: PCNA boyaması yapılan Siklofosfamid ve α -tokoferol uygulanan gruba ait ovaryum'da d) Sekonder follikül (SF), Granüloza hücresi ($\rightarrow$), Teka interna (Tİ), Primordiyal follikül (PDF), oosit çekirdeği ($\blacktriangleright$) e) Atretik follikül (AF), Oosit sitoplazması ($\blacktriangleright$) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen d,e X400)



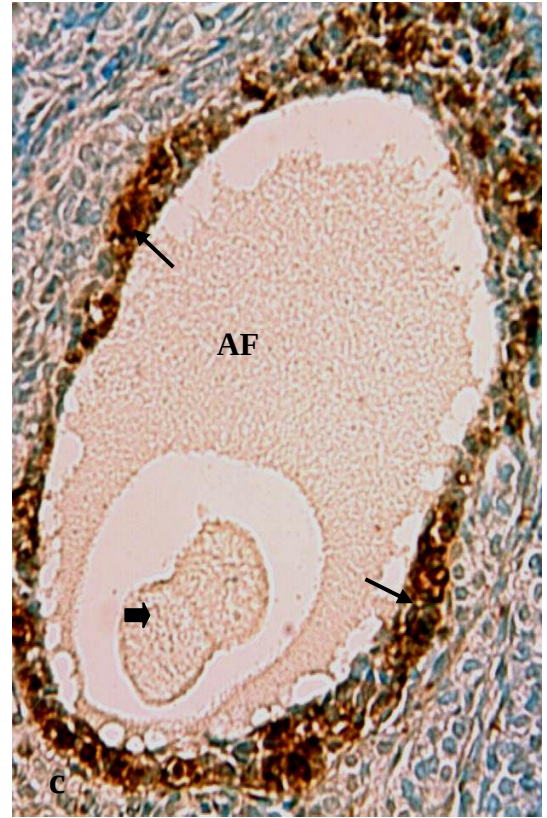
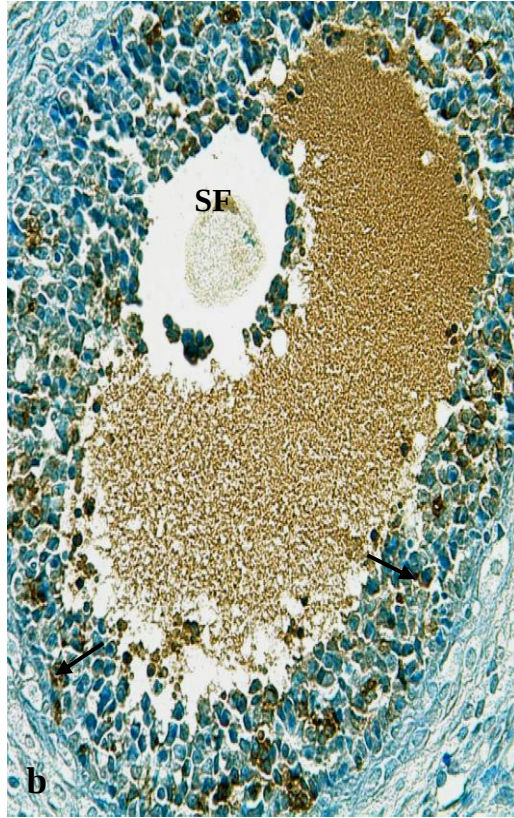
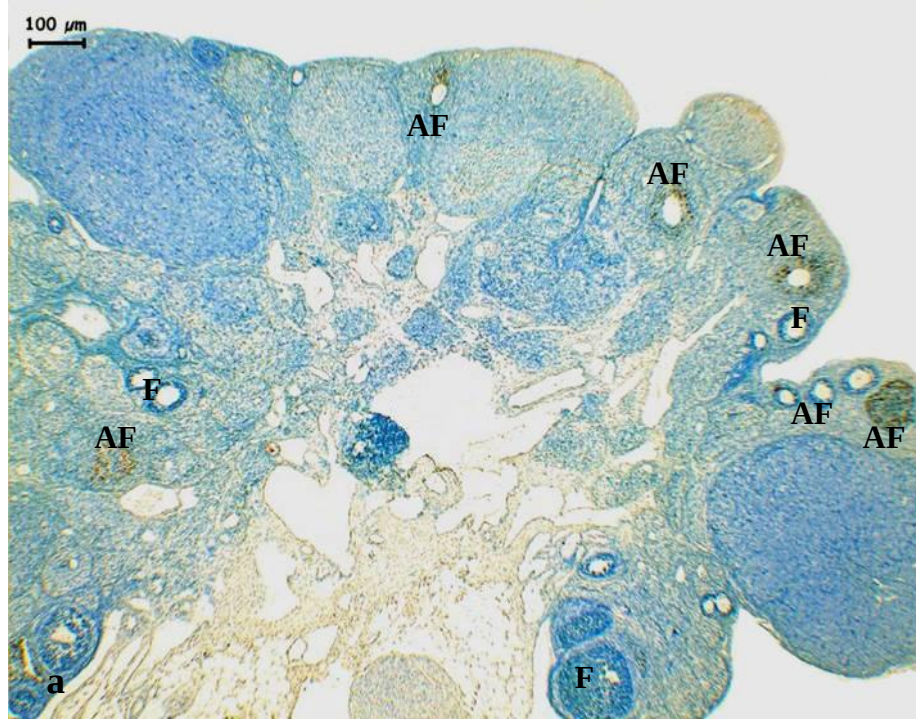
Resim 15: PCNA boyaması yapılan Siklofosfamid ve selenyum uygulanan gruba ait ovaryum'da a) Gelişmekte olan folliküller (F), Atreziye giden folliküller (AF), b) Primordiyal follikül (PDF), Tek sıralı primer follikül (TPF), Oosit çekirdeği (►), Granüloza hücresi (→), c) Çok sıralı primer follikül (ÇPF), Oosit çekirdeği (►), Granüloza hücresi (→) (İmmünoperoksidaz-Hematoksilen aX40, b,cX400).



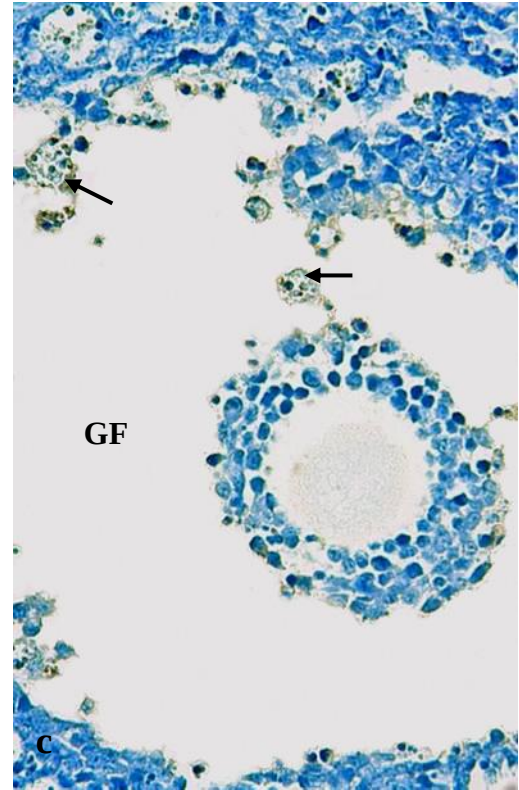
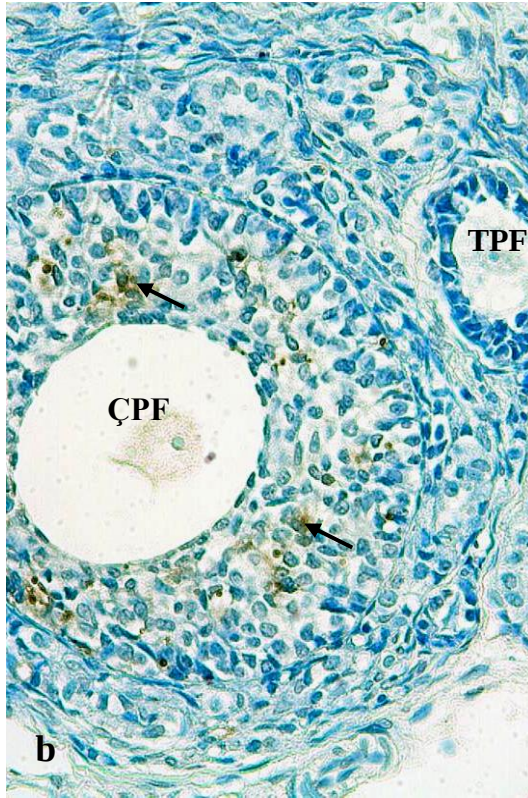
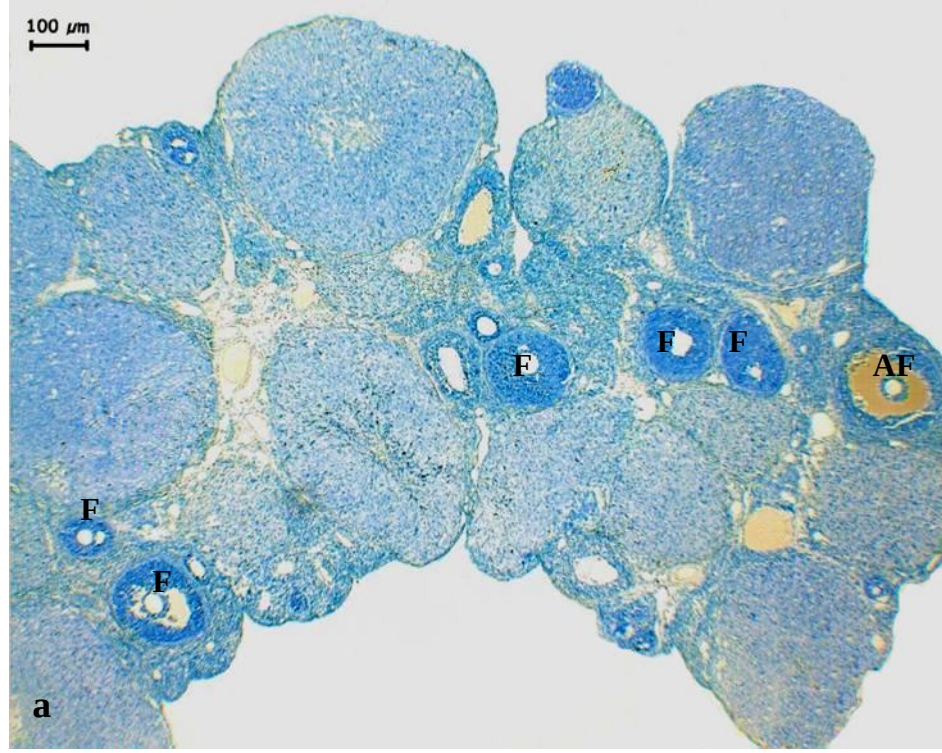
Resim 15: PCNA boyaması yapılan Siklofosfamid ve selenyum uygulanan gruba ait ovaryum'da d) Sekonder follükül (SF), Oosit çekirdeği (►), Granüloza hücresi (→), Çok sıralı primer follükül (ÇPF), Granüloza hücresi (→) e) Atretik follükül (AF), Oosit sitoplazması, (►) İleri atretik follükül (İAF), Oosit sitoplazması (►) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen d,e X400)



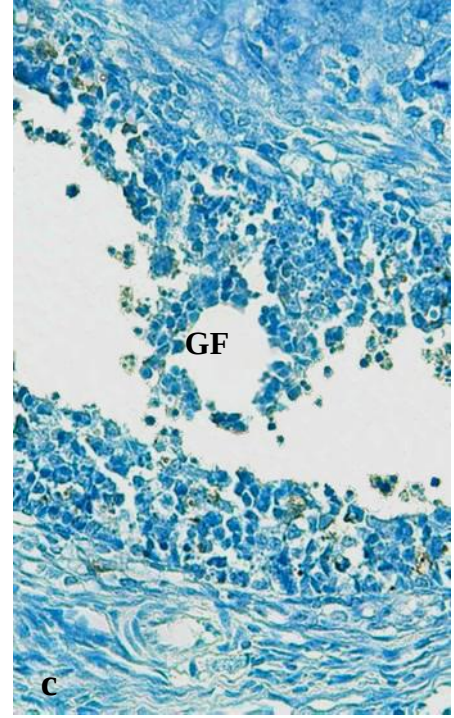
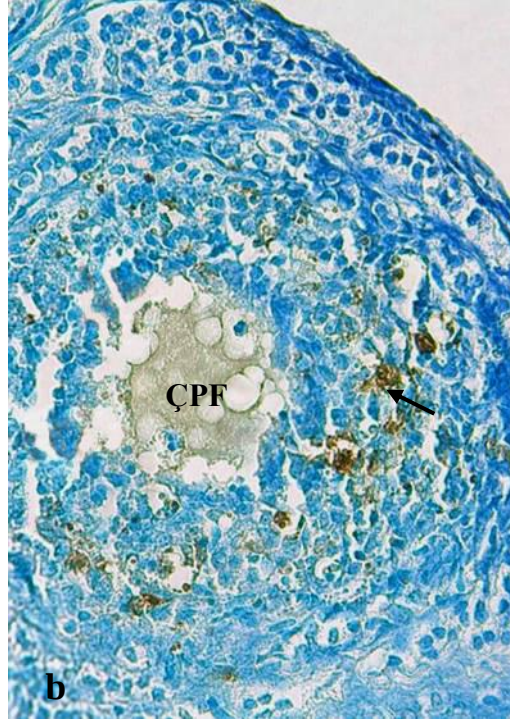
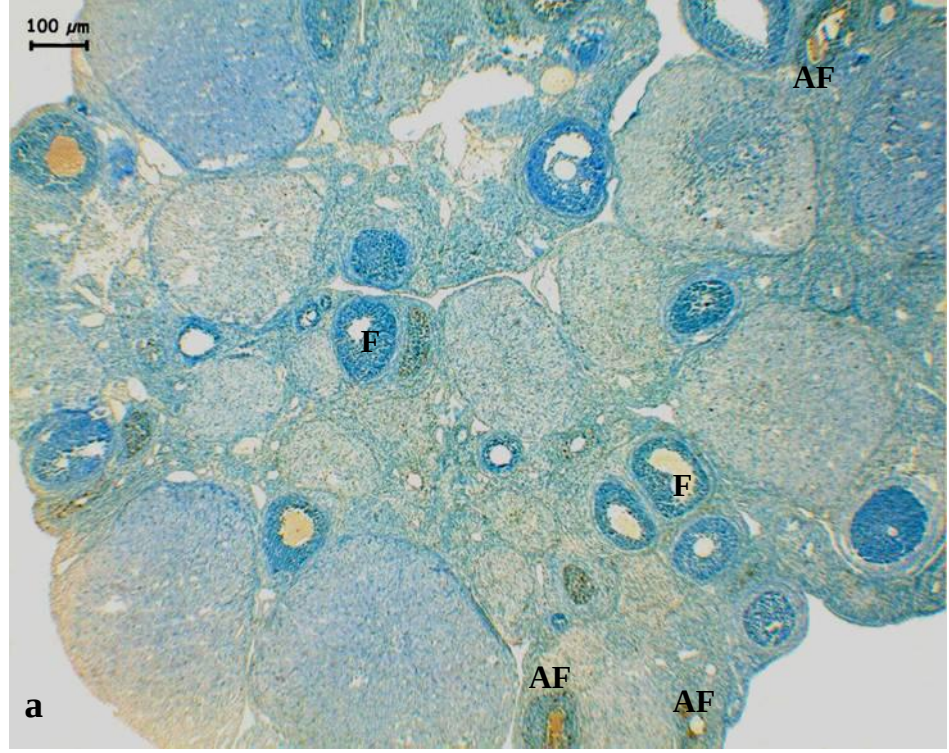
Resim 16: TUNEL boyaması yapılan kontrol grubuna ait ovaryum'da a) Gelişmekte olan folliküller (F), Graaf follikül (GF), b) Tek sıralı primer follikül (TPF), c) Sekonder follikül (SF), d) Graaf follikül (GF), TUNEL pozitif hücre (→) (TUNEL-Metil yeşili aX40, b,c,dX400).



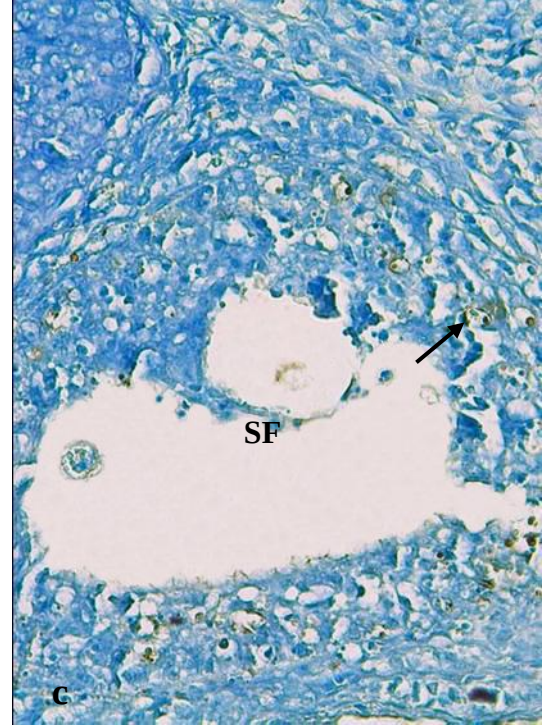
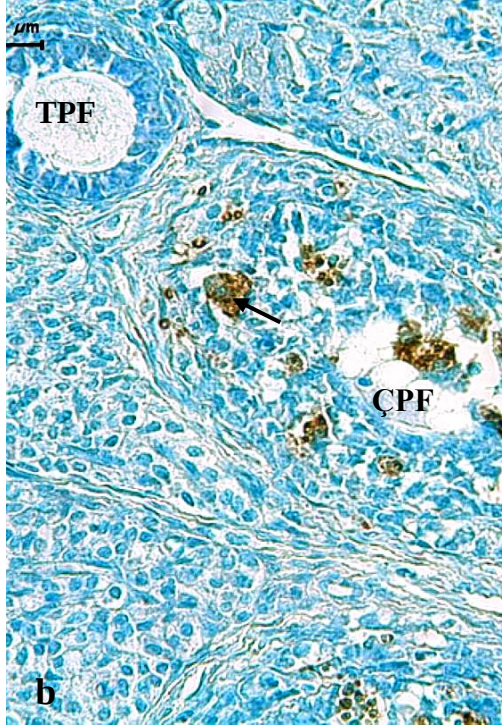
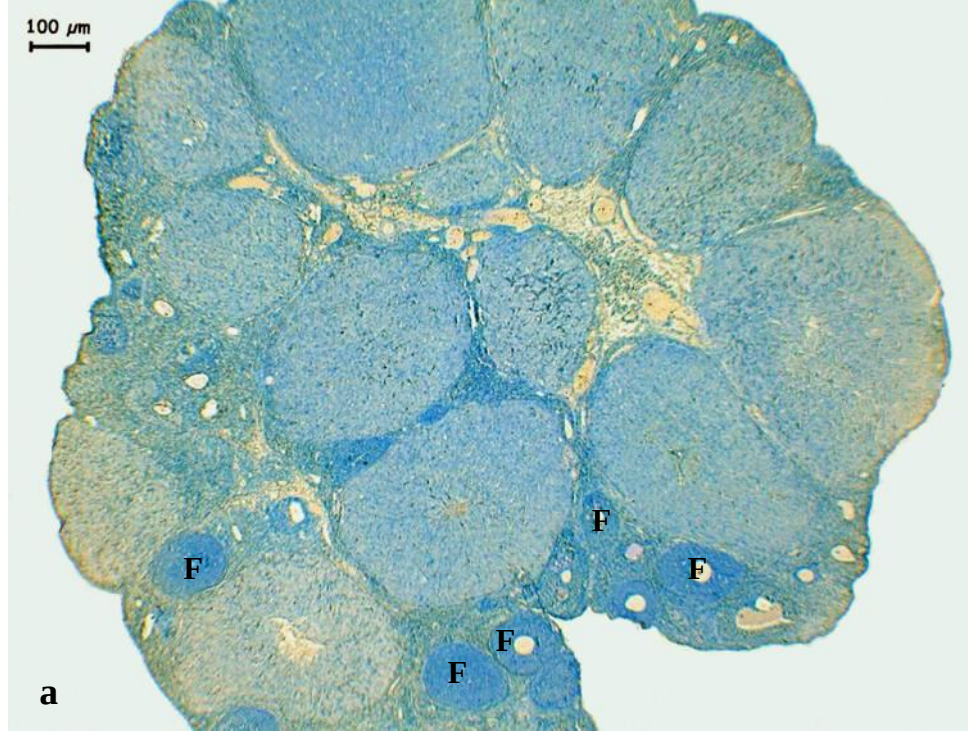
Resim 17: TUNEL boyaması yapılan Siklofosfamid grubuna ait ovaryum'da a) Gelişmekte olan folliküller (F), Atretik follikül (AF), b) Sekonder follikül (SF), TUNEL pozitif hücre (→), c) Atretik follikül (AF), TUNEL pozitif hücre (→), Oosit sitoplazması (➡) (TUNEL-Metil yeşili aX40, b,cX400).



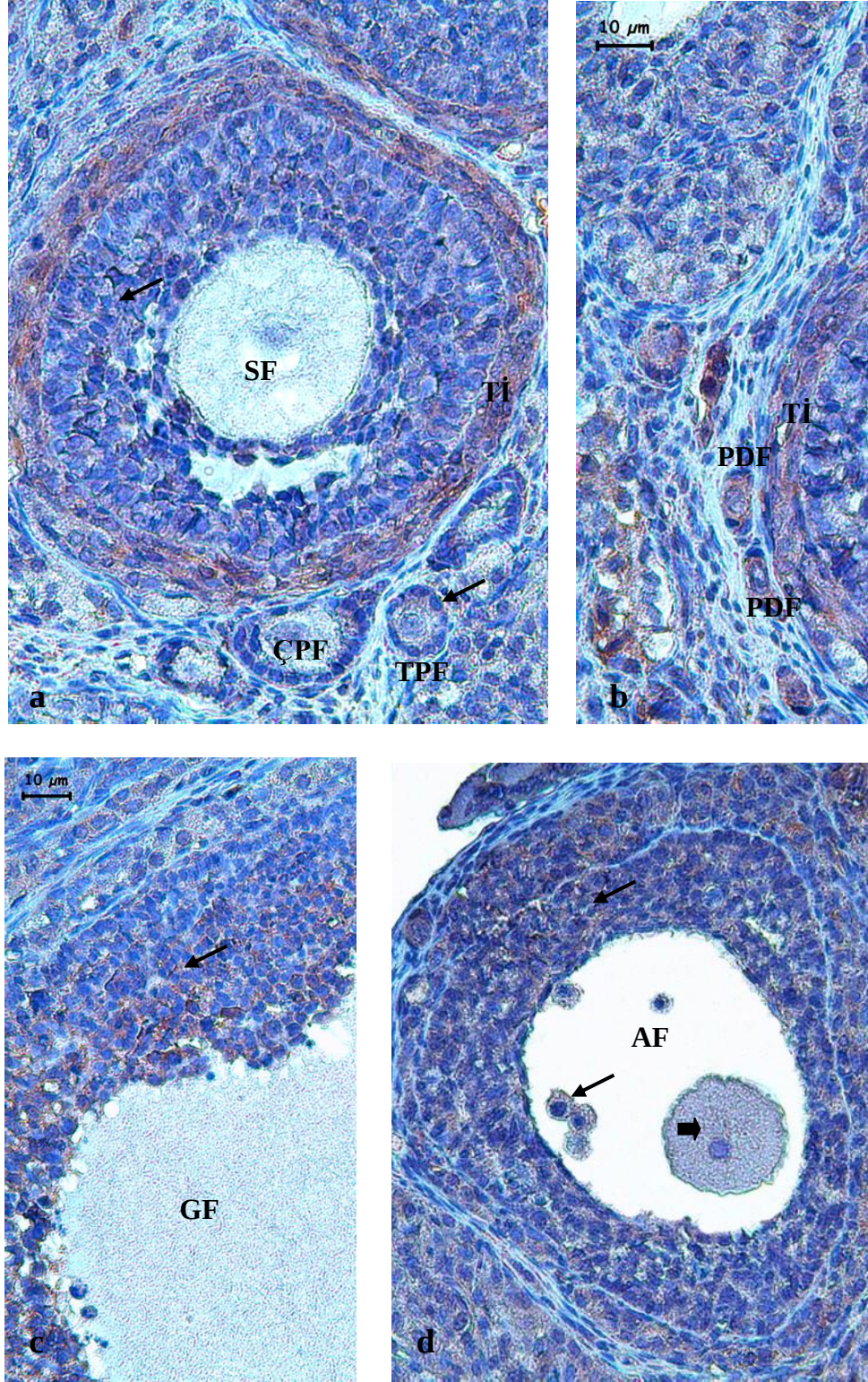
Resim 18: TUNEL boyaması yapılan Siklofosfamid ve askorbik asit uygulanan gruba ait ovaryum'da a) Gelişmekte olan follüküller (F), Atretik follükül (AF), b) Tek sıralı primer follükül (TPF), Çok sıralı primer follükül (ÇPF), TUNEL pozitif hücre (→), c) Graaf follükül (GF), TUNEL pozitif hücre (→) (TUNEL-Metil yeşili aX40, b,cX400).



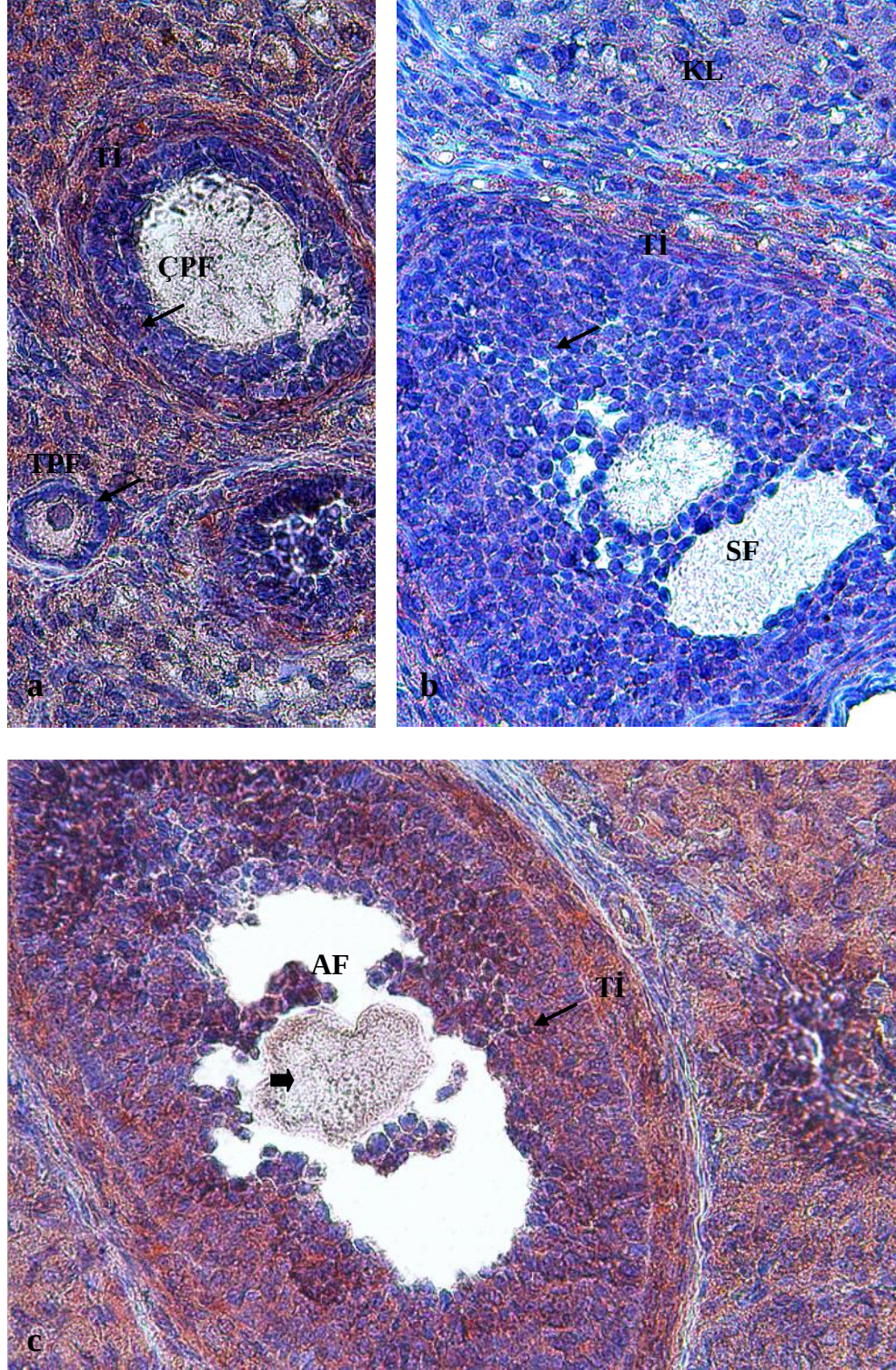
Resim 19: TUNEL boyaması yapılan Siklofosfamid ve α -tokoferol uygulanan gruba ait ovaryum'da a) Gelişmekte olan folliküller (F), Atretik follikül (AF), b) Atreziye giden çok sıralı primer follikül (ÇPF), TUNEL pozitif hücre ($\rightarrow$), c) Graaf follikül (GF), (TUNEL-Metil yeşili aX40, b,cX400).



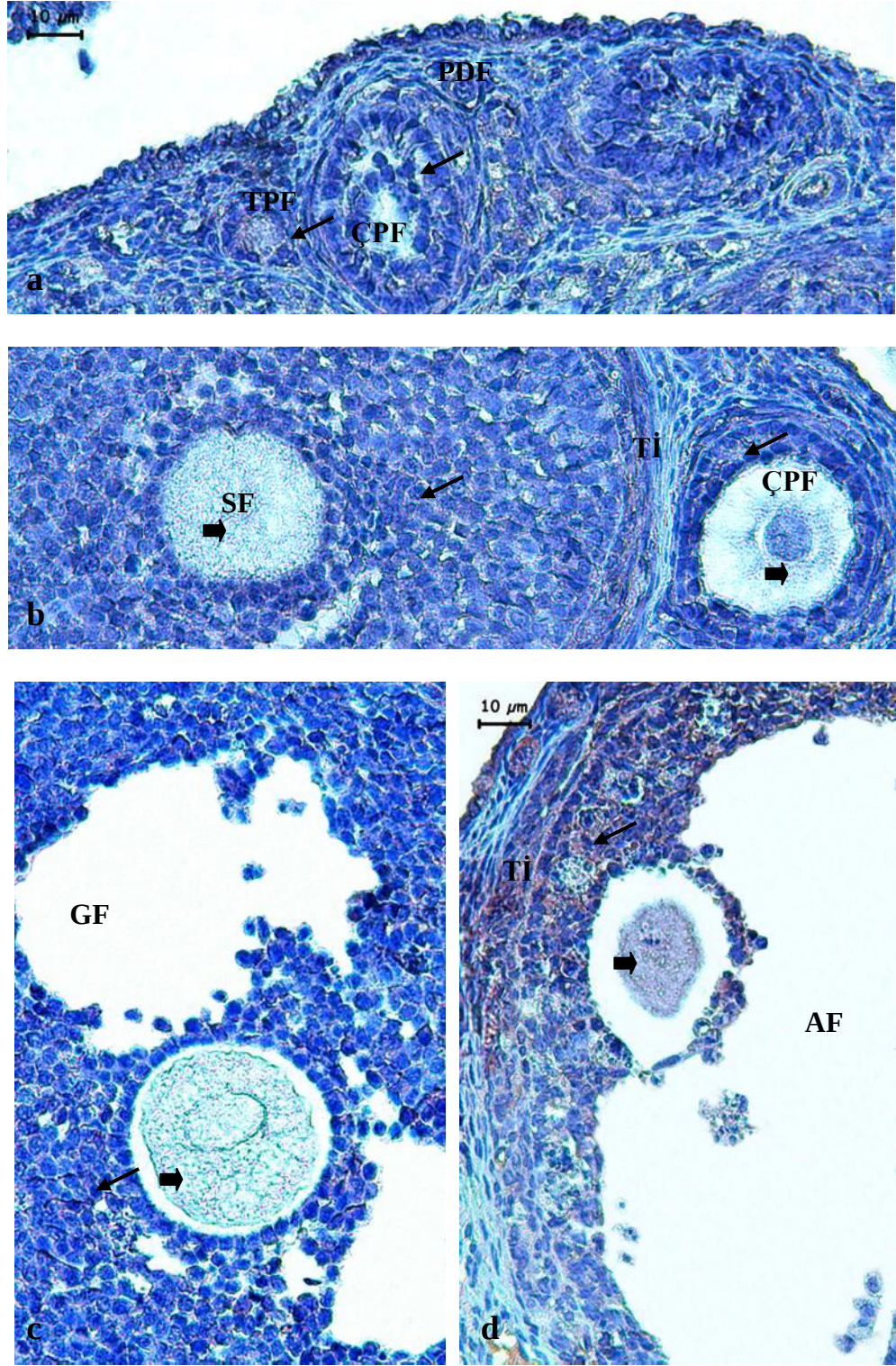
Resim 20: TUNEL boyaması yapılan Siklofosfamid ve selenyum uygulanan gruba ait ovaryum'da a) Gelişmekte olan folliküller (F), b) Tek sıralı primer follikül (TPF), Çok sıralı primer follikül (ÇPF), TUNEL pozitif hücre (→), c) Sekonder follikül (SF), TUNEL pozitif hücre (→) (TUNEL-Metil yeşili aX40, b,cX400).



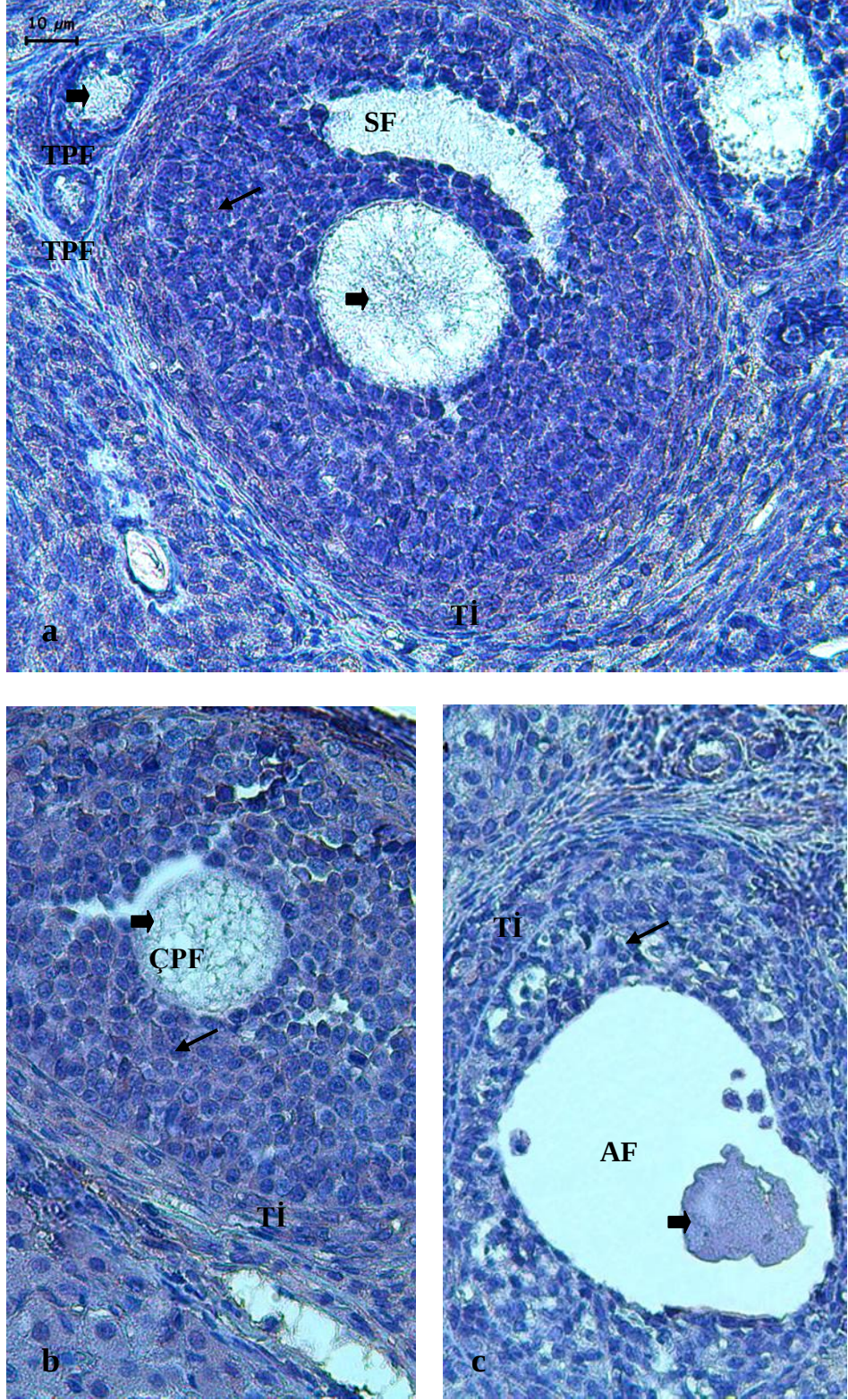
Resim 21: Kaspaz-3 boyaması yapılan kontrol grubuna ait ovaryum'da a) Tek sıralı primer follikül (TPF), Çok sıralı primer follikül (ÇPF), SF (Sekonder follikül), Granüloza hücresi (→), Teka interna (Tİ), b) Primordiyal follikül (PDF), Teka interna (Tİ), c) Graaf follikül (GF), Granüloza hücresi (→), d) Atretik follikül (AF), Granüloza hücresi (→), Oosit sitoplazması (➡) (İmmünoperoksidaz-Hematoksilen a,b,c,d X400)



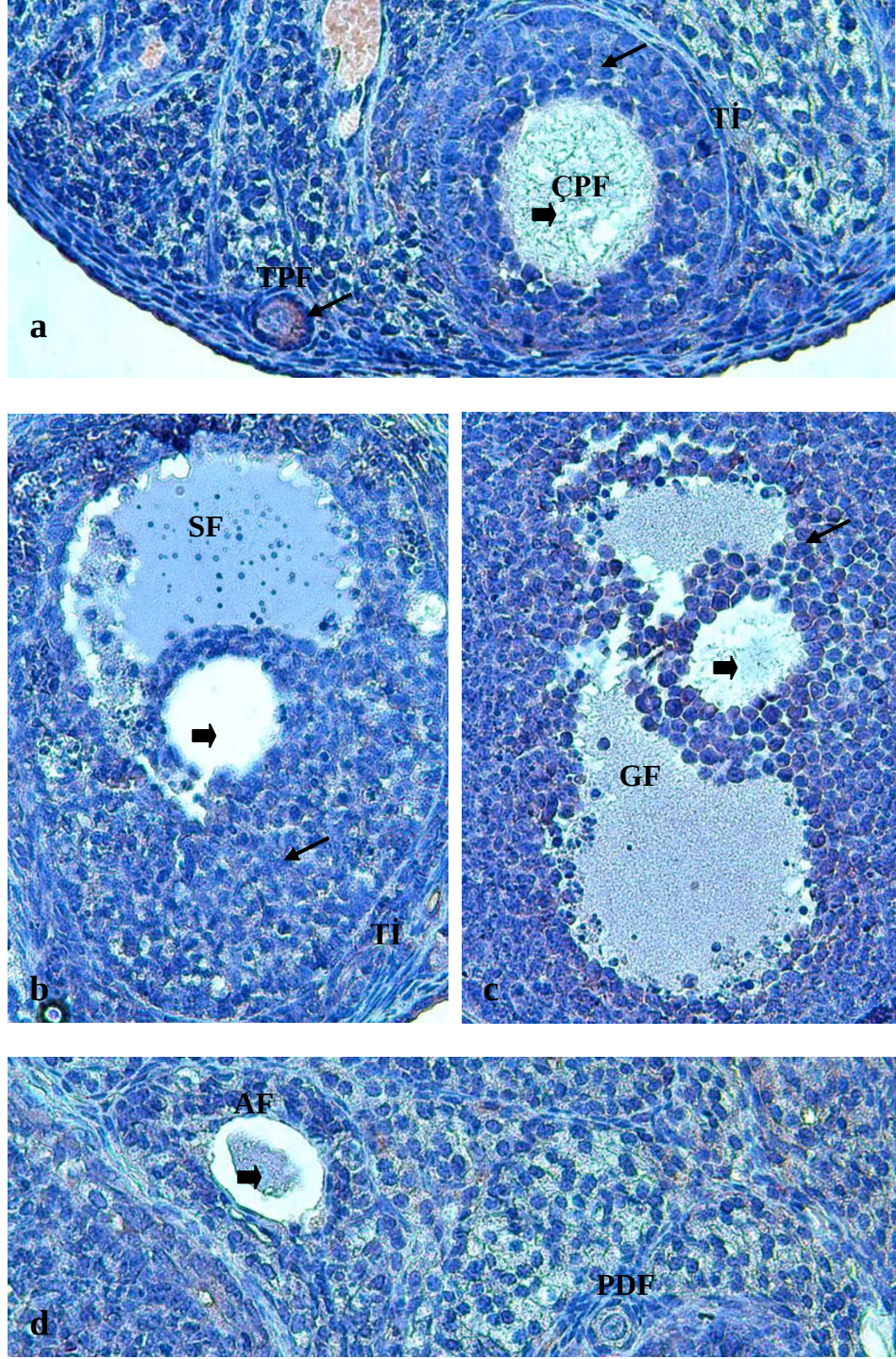
Resim 22: Kaspaz-3 boyaması yapılan Siklofosfamid grubuna ait ovaryum'da a) Tek sıralı primer follikül (TPF), Çok sıralı primer follikül (ÇPF), Granüloza hücresi (→), Teka interna (Tİ), b) SF (Sekonder follikül), Granüloza hücresi (→), Korpus luteum (KL) Teka interna (Tİ), c) Atretik follikül (AF), Oosit sitoplazması (➡), Granüloza hücresi (→), Teka interna (Tİ) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen a,b,c X400)



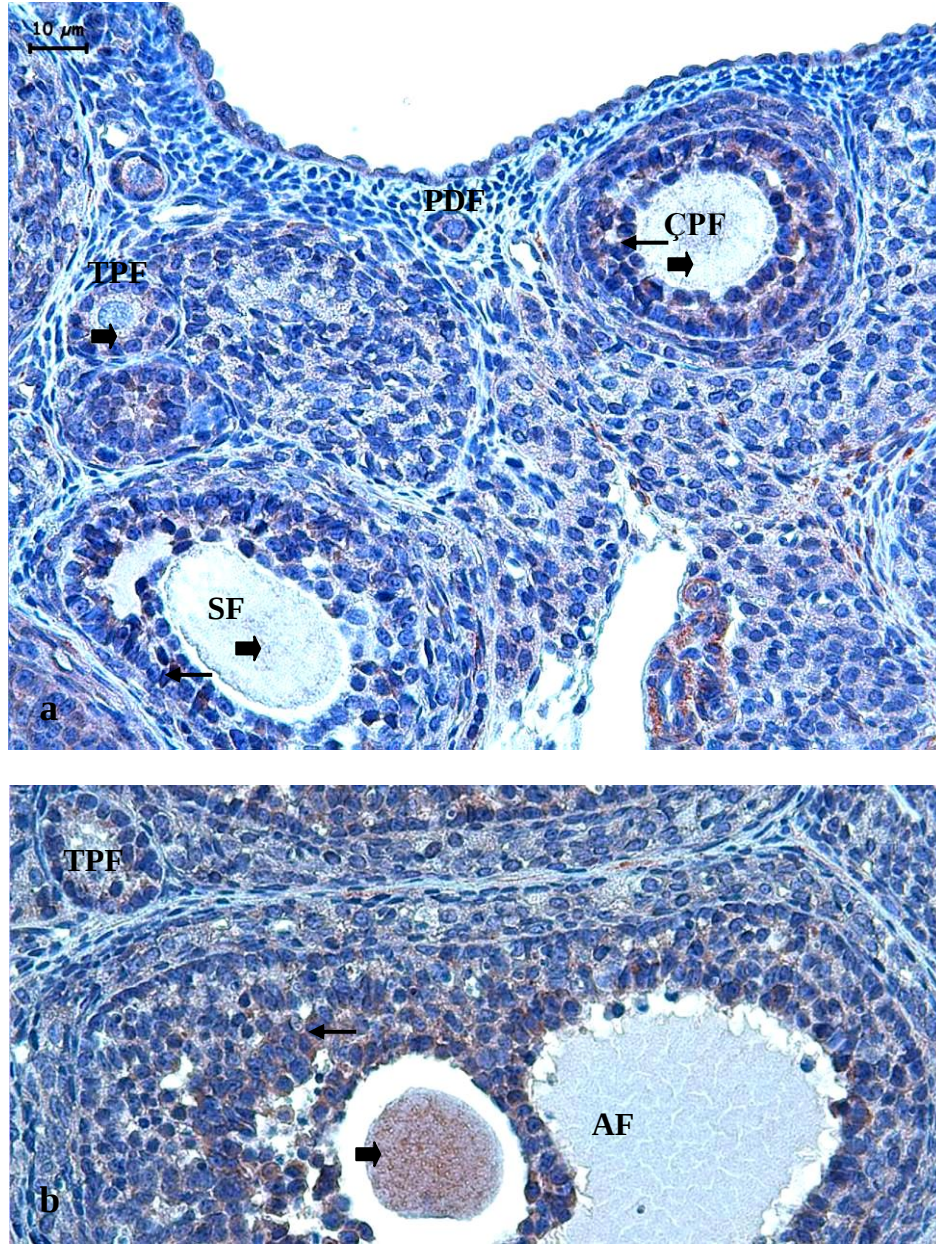
Resim 23: Kaspaz-3 boyaması yapılan Siklofosfamid ve askorbik asit uygulanan gruba ait ovaryum'da a) Primordiyal follikül (PDF), Tek sıralı primer follikül (TPF), Çok sıralı primer follikül (ÇPF), Granüloza hücresi (→), Oosit sitoplazması (➡), b) SF (Sekonder follikül), Çok sıralı primer follikül (ÇPF), Oosit sitoplazması (➡), Granüloza hücresi (→), Teka interna (Tİ) c) Graaf follikülü (GF), Oosit sitoplazması (➡), Granüloza hücresi (→), d) Atretik follikül (AF), Granüloza hücresi (→), Teka interna (Tİ), Oosit sitoplazması (➡). (İmmünperoksidaz-Hematoksilen a,b,c,d X400)



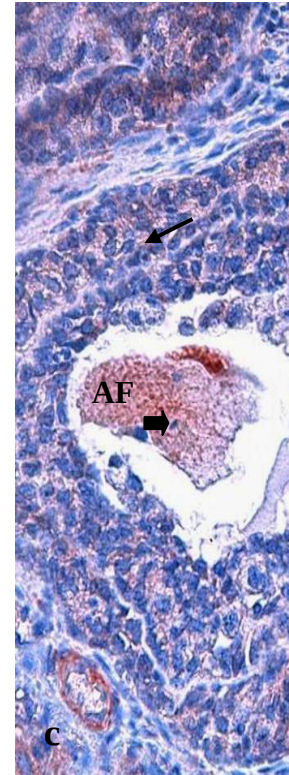
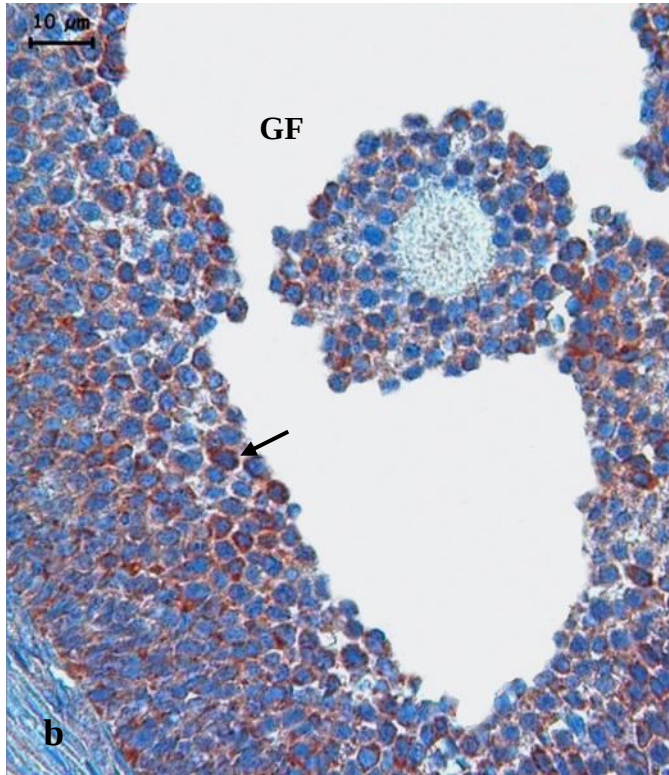
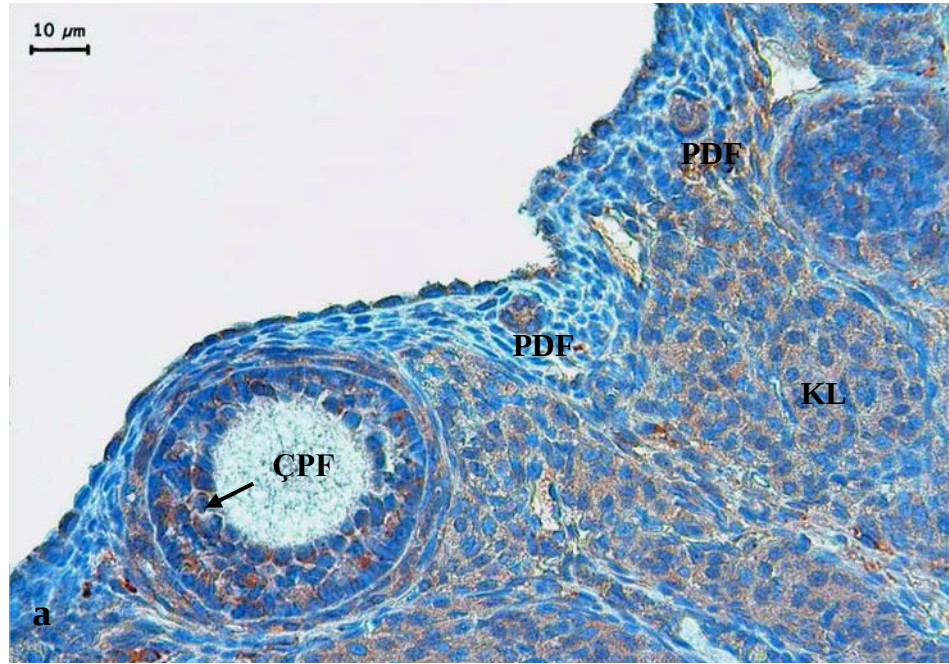
Resim 24: Kaspaz-3 boyaması yapılan Siklofosamid ve α -tokoferol uygulanan gruba ait ovaryum'da a) Tek sıralı primer follikül (TPF), SF (Sekonder follikül), Granüloza hücresi (→),Teka interna (Tİ), Oosit sitoplazması (↗), b) Çok sıralı primer follikül (ÇPF), Granüloza hücresi (→), Teka interna (Tİ), Oosit sitoplazması (↗), c) Atretik follikül (AF), Granüloza hücresi (→), Teka interna (Tİ), Oosit sitoplazması (↗) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen a,b,c X400)



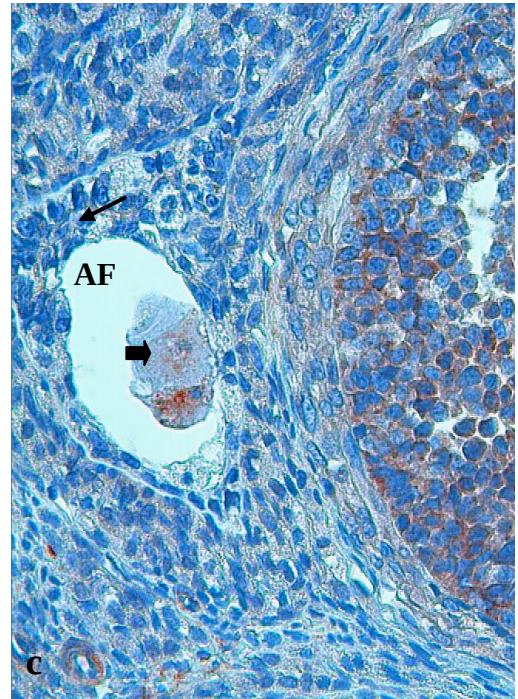
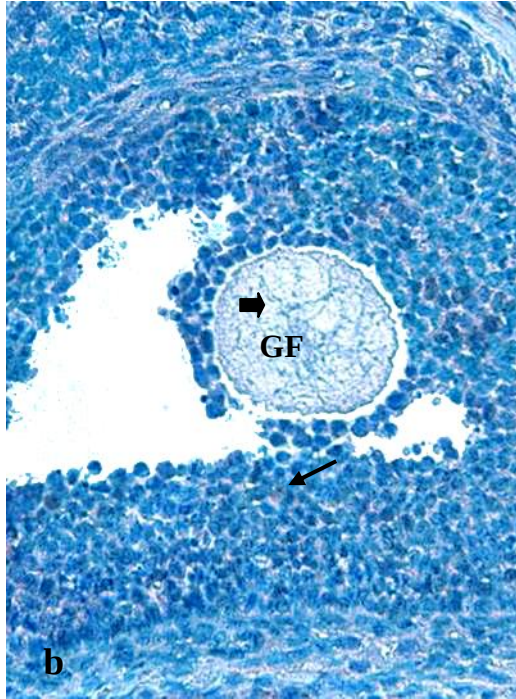
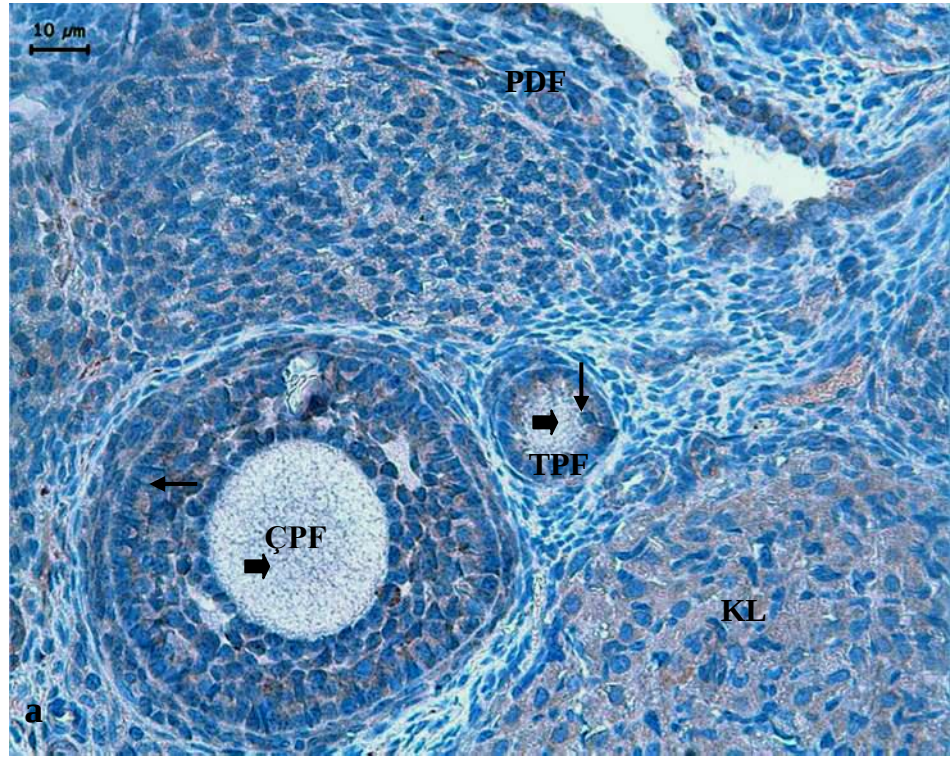
Resim 25: Kaspaz-3 boyaması yapılan Siklofosfamid ve selenyum uygulanan gruba ait ovaryum'da a) Tek sıralı primer follikül (TPF), Çok sıralı primer follikül (ÇPF), Oosit sitoplazması (➡), Granüloza hücresi (➡), Teka interna (Tİ), b) Sekonder follikül (SF), Oosit sitoplazması (➡), Teka interna (Tİ), Granüloza hücresi (➡), c) Graaf follikül (GF), Oosit sitoplazması (➡), Granüloza hücresi (➡), d) Atretik follikül (AF), Oosit sitoplazması (➡), Primordiyal follikül (PDF) (İmmünoperoxidaz-Hematoksilen a,b,c,d X400)



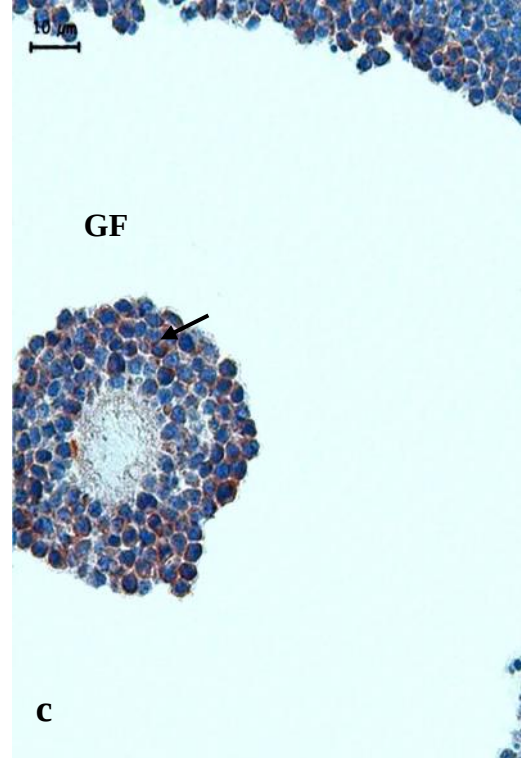
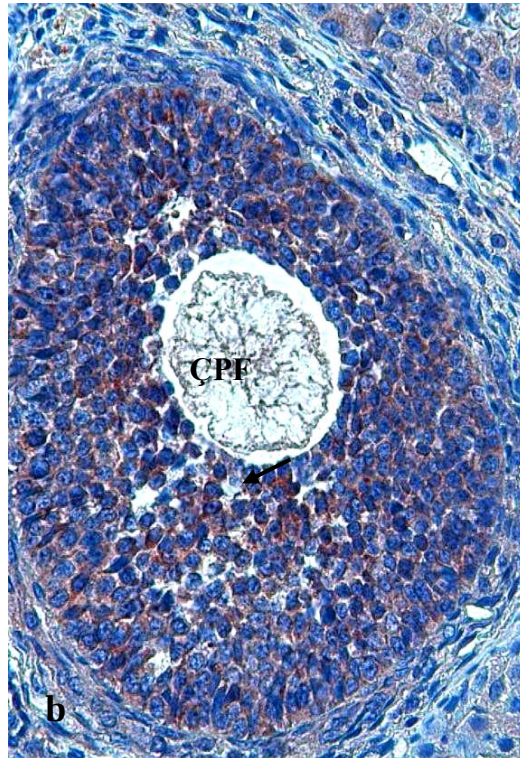
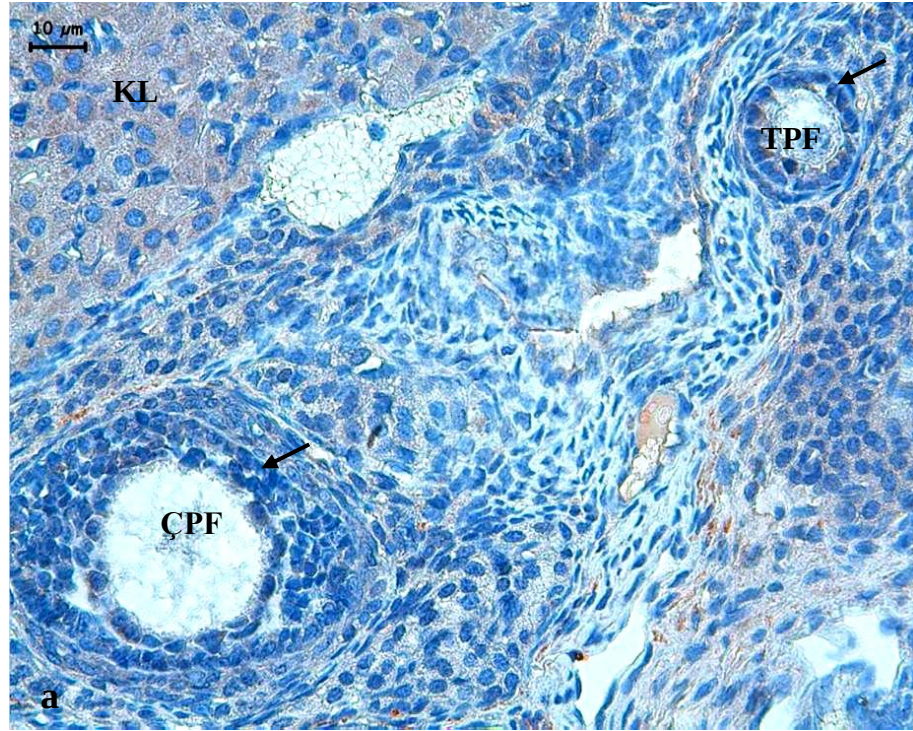
Resim 26: APAF-1 boyaması yapılan kontrol grubuna ait ovaryum'da a) Primordiyal follikül (PDF), Tek sıralı Primer follikül (TPF), Çok sıralı primer follikül (ÇPF), Sekonder Follikül (SF), Granüloza hücresi (→), Oosit sitoplazması (➡), b) Atretik follikül (AF), Oosit Sitoplazması (➡), Granüloza hücresi (→) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen a,b X400)



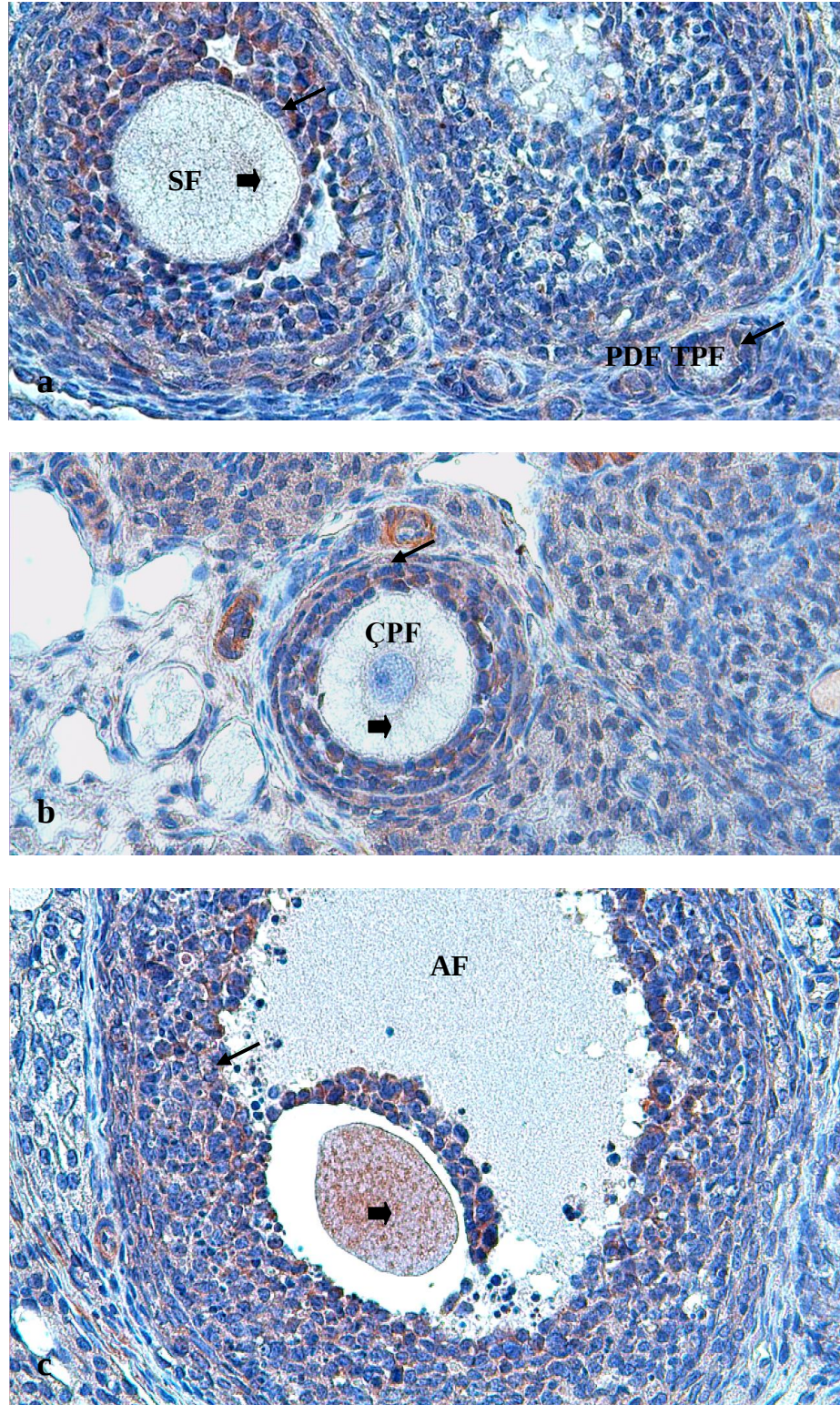
Resim 27: APAF-1 boyaması yapılan Siklofosfamid uygulanan gruba ait ovaryum'da a) Primordiyal follikül (PDF), Çok sıralı primer follikül (ÇPF), Granüloza hücresi (→), Korpus luteum (KL), b) Graaf folikülü (GF), Granüloza hücresi (→), c) Atretik follikül (AF), Oosit sitoplazması (➤), Granüloza hücresi (→). (İmmünperoksidaz-Hematoksilen a,b,c X400)



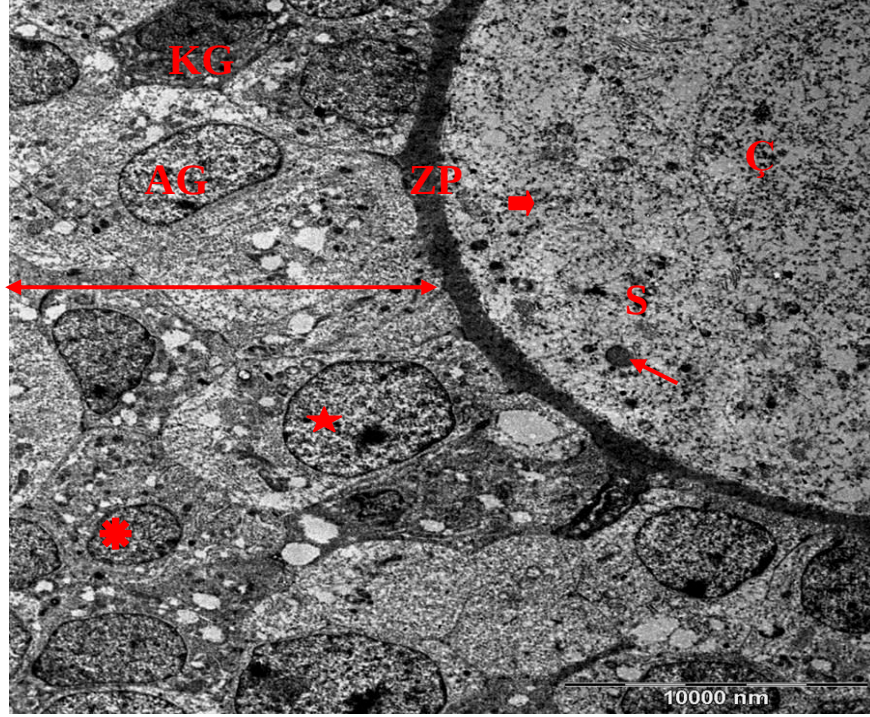
Resim 28: APAF-1 boyaması yapılan Siklofosfamid ve askorbik asit uygulanan gruba ait ovaryum'da a) Primordiyal follikül (PDF), Tek sıralı primer follikül (TPF), Çok sıralı primer follikül (ÇPF), Granuloza hücresi (→), Oosit sitoplazması (➡), Korpus luteum (KL), b) Graaf follikülü (GF), Granuloza hücresi (→), Oosit sitoplazması (➡), c) Atretik follikül (AF), Oosit sitoplazması (➡), Granuloza hücresi (→). (İmmünperoksidaz-Hematoksilen a,b,c X400)



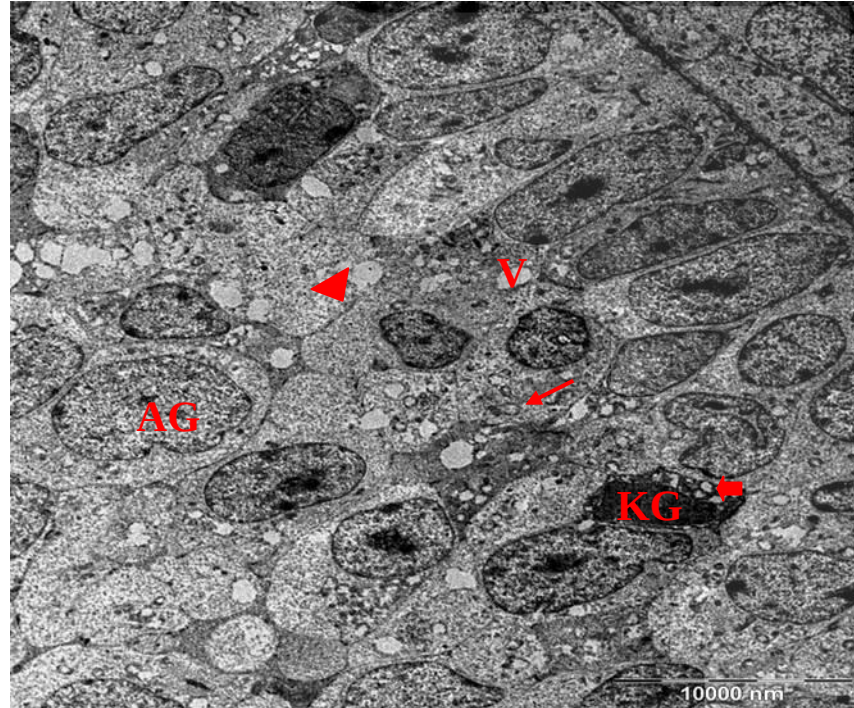
Resim 29: APAF-1 boyaması yapılan Siklofosfamid ve α -tokoferol uygulanan gruba ait ovaryum'da a) Tek sıralı primer follikül (TPF), Çok sıralı primer follikül (ÇPF), Granüloza hücresi ($\rightarrow$), Korpus luteum (KL), b) Atreziye giden Çok sıralı primer follikül (ÇPF), Granüloza hücresi ($\rightarrow$), c) Atreziye giden Graaf folikülü (GF), Granüloza hücresi ($\rightarrow$) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen a,b,c X400)



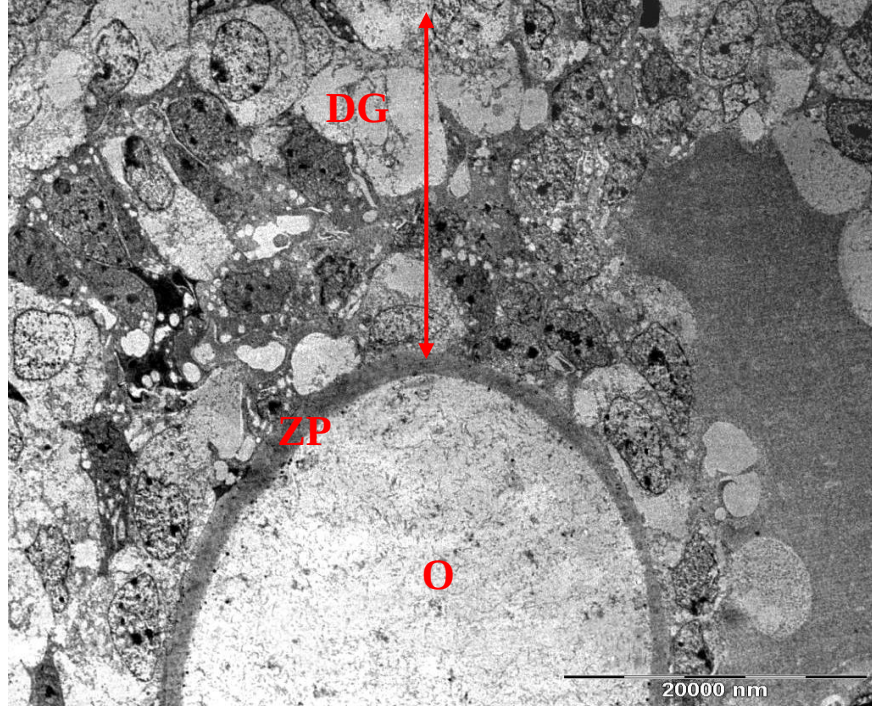
Resim 30: APAF-1 boyaması yapılan Siklofosamid ve selenyum uygulanan gruba ait ovaryum'da
a) Primordiyal follikül (PDF), Tek sıralı primer follikül (TPF), SF (Sekonder follikül), Granüloza hücre (→), Oosit sitoplazması (➡), b) Çok sıralı primer follikül (ÇPF), Granüloza hücre (→), Oosit sitoplazması (➡), c) Atretik follikül (AF), Granüloza hücre (→), Oosit sitoplazması (➡) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen a,b,c X400)



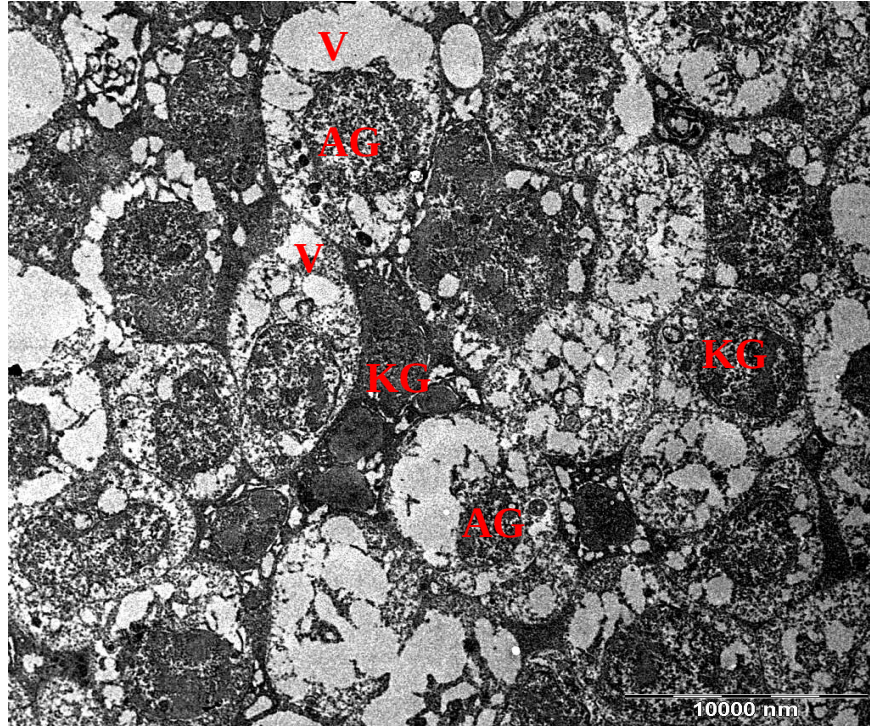
Resim 31: Kontrol grubunun ovaryum'unda; Oosit sitoplazması (S), Oosit çekirdeği (Ç), Zona pellusida (ZP), Granüloza hücre katmanı (↔), Mitokondriyon (→), Granüllü endoplazmik retikulum tubulusları (➡), Koyu sitoplazmalı granüloza hücresi (KG), Açık sitoplazmalı granüloza hücresi (AG), Prizmatik granüloza hücresi (★), Poligonol şekilli granüloza hücresi (*) Uranil asetat-Kurşun sitrat.



Resim 32: Kontrol grubuna ait ovaryum'un granüloza katmanında; Açık sitoplazmalı granüloza hücresi (AG), Mitokondriyon (→), Vakuoller (V), Koyu sitoplazmalı granüloza hücresi (KG), Granüllü endoplazmik retikulum tubülüsleri (➡), Hücreler arası bağlantı birimleri (▶) Uranil asetat-Kurşun sitrat.



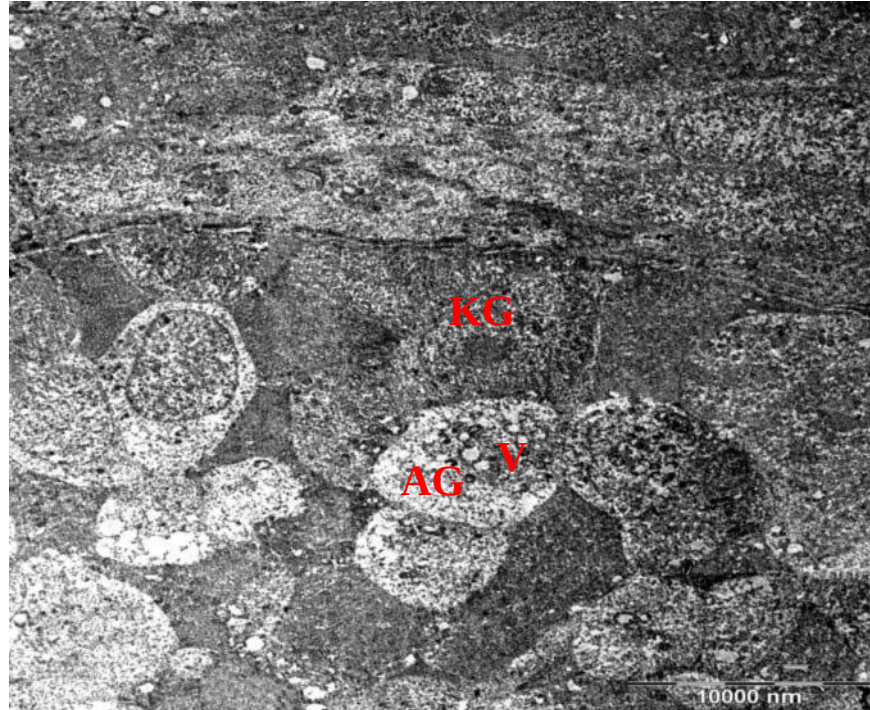
Resim 33: Siklofosfamid grubunun ovaryum'unda; Oosit (O), Zona pellusida (ZP), Granüloza hücre katmanı (↔), Dejeneratif granüloza hücresi (DG) Uranil asetat-Kurşun sitrat.



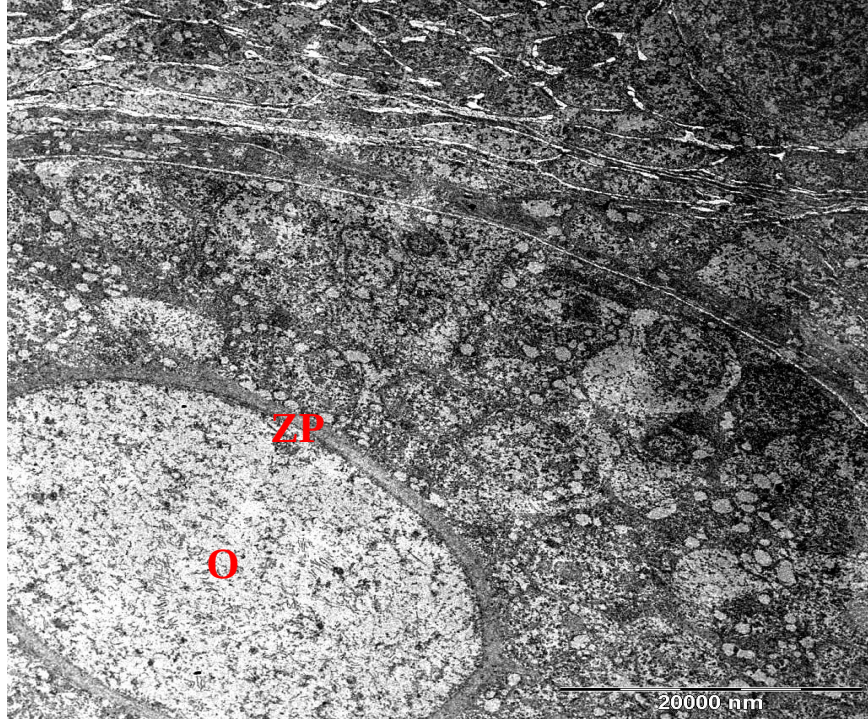
Resim 34: Siklofosfamid grubuna ait ovaryum'un granüloza katmanında; Koyu sitoplazmalı granüloza hücresi (KG), Açık sitoplazmalı granüloza hücresi (AG), Vakuoller (V), Uranil asetat-Kurşun sitrat.



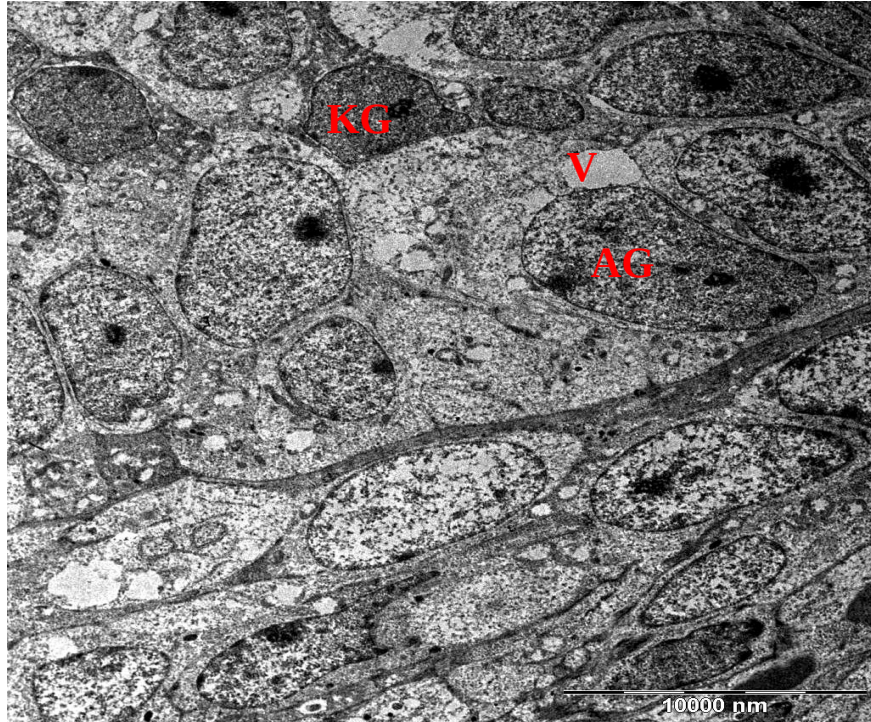
Resim 35: Siklofosfamid ve askorbik asit uygulanan grubun ovaryum'unda; Oosit (O), Zona pellusida (ZP), Uranil asetat-Kurşun sitrat.



Resim 36: Siklofosfamid ve askorbik asit uygulanan gruba ait ovaryum'un granüloza katmanında; Koyu sitoplazmalı granüloza hücresi (KG), Açık sitoplazmalı granüloza hücresi (AG), Vakuoller (V), Uranil asetat-Kurşun sitrat.



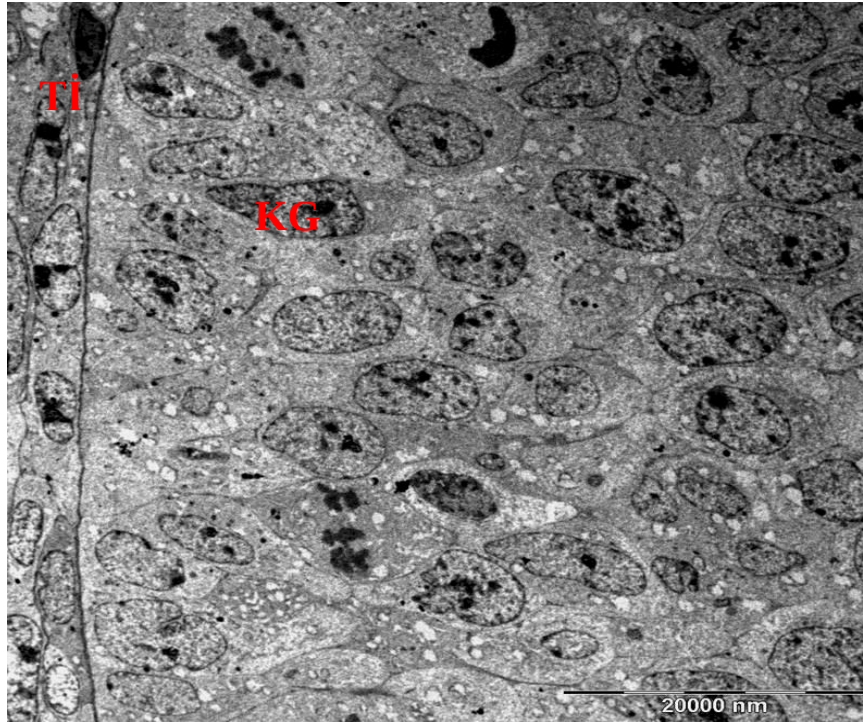
Resim 37: Siklofosfamid ve α -tokoferol uygulanan grubun ovaryum'unda; Oosit (O), Zona pellusida (ZP), Uranil asetat-Kurşun sitrat.



Resim 38: Siklofosfamid ve α -tokoferol uygulanan gruba ait ovaryum'un granuloza katmanında; Koyu sitoplazmalı granuloza hücresi (KG), Açık sitoplazmalı granuloza hücresi (AG), Vakuoller (V). Uranil asetat-Kurşun sitrat.



Resim 39: Siklofosfamid ve selenyum uygulanan grubun ovaryum'unda; Oosit (O), Zona pellusida (ZP), Uranil asetat-Kurşun sitrat.



Resim 40: Siklofosfamid ve selenyum uygulanan gruba ait ovaryum'un granüloza katmanında; Koyu sitoplazmalı granüloza hücresi (KG), Teka İnterna (Tİ). Uranil asetat-Kurşun sitrat.

V-TARTIŞMA

Kanser, çağımızın en önemli sağlık sorunlarından biridir. 20. yüzyılın başlarında ölüme neden olan hastalıklar arasında yedinci ve sekizinci sıralarda yer alırken, bugün dünyanın birçok ülkesinde ve Türkiye’de kalp hastalıklarından sonra ikinci sıradadır.⁸³ Günümüzde kanserin doğası anlaşılmış ve tedavide son derece önemli ilerlemeler kaydedilmiştir.⁸⁴ Kanser tedavisi yöntemleri genelde kemoterapi, radyoterapi, cerrahi ve immünoterapidir. Kanser tanısı konulan hastaların bireysel özellik ve hastalık durumuna göre bu yöntemlerden bir ya da birkaçı tedavide kullanılmaktadır. Bu yöntemler ile hastaların yaşam süresinin uzaması ve daha nitelikli yaşaması amaçlanmaktadır. Kullanılan yöntemlere bağlı olarak tedavi ile ilgili zorluklar ve toksik etkiler de ortaya çıkmaktadır. Kemoterapi özellikle kemik iliği, deri, bağırsaklar ve üreme organları gibi hızlı çoğalan normal hücrelere son derece zarar vermektedir.⁵⁶

Kemoterapi’nin olumsuz etkilediği organların başında hızlı bir hücresel döngüye sahip olan ovaryum’lar gelmektedir. Uzun süren kemoterapi tedavileri, doğurganlık döneminde olan çoğu kadını etkilediği gibi ergenlik öncesi evredeki genç nesli de etkilemektedir.² Bu genç kadınların ovaryum’larındaki primordiyal follikül’lerden beslenen follikül havuzu kemoterapiden doğrudan etkilendiği için, ilerleyen yaşlarda ciddi ovaryum yetmezliği ve üreme bozukluklarıyla karşılaşmaktadır.³

Ovaryum’ların temel işlevi, sağlıklı nesillerin sürdürülebilmesi için folliküler büyüme ve olgun oosit’lerin üretilmesidir. Folliküler büyüme, gelişim aşamalarına ve gonadotropin bağımlılığına göre 3 evreye ayrılır⁸⁵; 1) primordiyal, primer ve sekonder aşamalar süresince folliküler büyüme (gonadotropin-bağımsız evre), 2) öncül-antral evreden erken antral aşamaya geçiş (gonadotropinlere yanıt veren evre). Bu folliküllerin büyümesi öncelikli olarak ovaryum içi mekanizmayla denetlenir ve FSH ile tetiklenir.⁸⁵ 3) Erken antral aşamadan sonraki sürekli büyüme aşaması (gonadotropin bağımlı evre). Bu evre ayrıca follikül seçimini ve

ovulasyonu içerir.⁸⁵ Memelilerde ovaryum döngüsü süresince bir ya da az sayıda cins hücreleri ovulasyona uğrarken, çoğu follikül, hücre apoptozisi ile atreziye uğrar.^{85,86} Bu seçimde sadece sağlıklı ve yaşam şansı en yüksek olan oosit'ler atılır.⁸⁷ Büyümesi için seçilen folliküllerin yaşamı gonadotropinlerden salınan doğru sinyaller ve bölgesel olarak üretilen büyüme faktörlerince sürdürülür, ancak büyüme desteğindeki yetersizliğin sonucu olarak da folliküler atrezi gerçekleşir.⁵⁰ Folliküler gelişimin tüm aşamalarında apoptozis gerçekleşmesine karşın, erken antral follikül'ler (sıçanlarda 200-400 µm, insanlarda 2-5 mm) atretogenik sinyallerden son derece fazla etkilenirler.⁸⁵ Buna karşın en az atrezi ya da granüloza hücre apoptozisi öncül-antral ve en küçük antral follikül'lerde gerçekleşir (sıçanlarda <200µm, insanlarda <2mm)(7,12). Follikülogenezisde oosit-somatik hücre etkileşiminin, dinlenmekte olan folliküllerin aktivasyonunda ve son farklılaşmasında kritik rol oynadığı bilinmektedir. Ancak öncül-antraldan erken antrala geçme evresinde yani follikülün kaderinin belirlenmesinde oosit'in hücre apoptozisini düzenleyip düzenlemediği ile ilgili ise net bir bilgi yoktur.⁸⁸ Ayrıca gelişim süresince oosit'ten türeyen etkenlerin, granüloza hücre katmanının bütünlüğünü parakrin faaliyetlerle etkileyip etkileyemeyeceği henüz kesin bilinmemektedir.⁸⁸

Kemoterapi uygulamasının ovaryum dokusu üzerinde oluşturabileceği olumsuz etkilerin mekanizmasını saptayabilmek için öncelikle normal ovaryumdan salınan yaşam ve ölüm sinyal molekülerinin işleyişini belirlemek gerekmektedir.

Ovaryum'da follikül gelişimi üzerine en etkili sinyal moleküllerinden biri, büyüme faktörü ailesinden olan Dönüştürücü Büyüme Faktörü beta (TGF-β)'dir. TGF-β proteinleri birçok memeli türünde hücre büyüme, farklılaşma ve metabolizmasının düzenlenmesinde önemli rol oynayan küçük peptid (25-kd) protein ailesidir.⁸⁹ TGF-β proteinlerinin hücre döngüsü, hücre dışı ortam ve diğer peptid büyüme faktörleri ile reseptörleri üzerine çok çeşitli etkileri vardır.⁹⁰

Ayrıca bazı doku ve hücre türleri (özellikle epitel hücresi) üzerine de baskılayıcı etki yaparlar.^{89, 90}

TGF- β alt birimleri çeşitli canlı türlerine ait ovaryum'ların özel hücre tiplerinde ayrıcalıklı olarak salınırlar. Yapılan çalışmalarda TGF- β 'nın insan ovaryum follikül sıvısında ölçülebildiği ve granüloza ile teka hücrelerince üretildiği gösterilmiştir.⁹¹ Ayrıca TGF- β_1 'in insan ve fare Graaf follikül'lerinin granüloza ve teka hücrelerinde salındığı gösterilmiştir.²⁴

İn situ hibridizasyon çalışmalarında en önemli TGF- β_1 mRNA sinyallerinin, fare Graaf folliküllerinin granüloza hücre katmanının dış katında bulunduğu belirlenmiştir.⁹² Domuzlarda in situ hibridizasyon yöntemi ile TGF- β_1 mRNA salınımı granüloza ve teka hücrelerinde gösterilmiş ancak TGF- β_1 proteininin sadece teka hücrelerince salındığı belirlenmiştir.⁹³

İmmünohistokimyasal çalışmalarda sıçan, domuz ve Hamster gibi çeşitli memeli türlerinde de östrus döngüsü süresince TGF- β_1 'in salındığı gösterilmiş, özellikle granüloza ve teka hücrelerinde daha baskın biçimde bulunduğu belirtilmiştir.^{93,94,95} Bazı çalışmalara göre sıçanlarda TGF- β_1 özellikle Graaf follikül'lerinin teka ve interstisyel hücrelerinde daha kuvvetli salınmaktadır.^{95, 105} Ghiglieri ve arkadaşlarına göre farelerde TGF- β_1 tutulumu ise küçük ve orta büyüklükteki folliküllerin teka ve granüloza hücrelerinde gözlenmez iken, büyük folliküllerin aynı hücrelerinde saptanmıştır.^{96, 97}

Bizim çalışmamızda, kontrol grupların ovaryumlarında önceki çalışma bulgularıyla uyumlu olarak kumulus ooforus'un biçimlendiği ve antrumun genişlediği Graaf follikül'lerinin granüloza hücre sitoplazmasında kuvvetli TGF- β_1 tutulumu gözlemlendi. Bu bulguların yanı sıra primordiyal, tek ve çok sıralı primer follikül ve antrum oluşmaya başlamış sekonder folliküllerde de granüloza hücre çekirdeklerinde yoğun, sitoplazmada orta dereceli TGF- β_1 tutulumu dikkat çekiciydi. Teka katmanlarında tutulum, teka internada orta dereceli iken teka

eksternada izlenmiyordu. Literatürde oosit ve TGF- β_1 tutulumu ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Biz çalışmamızda primordiyal follikülünden başlayarak tüm gelişim aşamasındaki sağlıklı folliküllerin oosit sitoplazmasında ve çekirdeğinde yoğun immünreaktivite belirledik. Atretik folliküllerin oosit sitoplazmalarında ve antrum boşluğu içine dökülen granüloza hücrelerinde tutulumun azalması dikkat çekiciydi.

Ovaryum'da follikül gelişimi süresince granüloza hücrelerinin çoğalması ve farklılaşmasını sağlayan bir diğer önemli sinyal TGF- β üst grubu üyelerinden biri olan Büyüme Farklılaşma Faktörü 9 (GDF-9)'dur. GDF-9'un ovaryum'da LH reseptörünün arttırılması, teka hücrelerinde androjen sentezi, sıçan granüloza hücrelerinde inhibin üretimi ve farelerde kumulus genişlemesi gibi birçok işlevi vardır.⁹⁸

GDF-9'un follikül gelişimi süresince memeli oosit'lerinde salındığı bilinmektedir.²⁵ GDF-9 granüloza hücre çoğalmasını, öncül antral follikül gelişimini ve kumulus hücre genişlemesini arttırması gibi özelliklerinin yanında, FSH bağlantılı cAMP ve steroid üretimini baskılar.⁹⁹

GDF-9 apoptozis karşıtı etkidir ve granüloza hücre apoptozisini PI3K/Akt yoluyla baskılamaktadır.⁹⁹ Gelişen folliküllerde, öncül antral follikül'den erken antral follikül aşamasına geçiş GDF-9 gibi ovaryum içi düzenleyicilerce denetlenir, ancak bu FSH'nin etkisi altındadır ve erken antral aşamadan sonraki büyümenin sürdürülmesi gonadotropin bağımlıdır.¹⁰⁰ Bu varsayımı doğrulamak için Wang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, antral follikül'leri FSH içermeyen kültür ortamına almışlar ve apoptozisin artarak folliküler büyümenin durduğunu göstermişlerdir.¹⁰¹ Çalışmanın devamında FSH olmayan ancak GDF-9 eklenen kültür ortamında öncül-antral follikül'lerin büyümeyi sürdürdüğü ve oldukça az apoptozis izlendiği kaydedilmiştir. Buradan yola çıkarak GDF-9'un hücre yaşamının sürdürülmesinde ve erken gelişim aşamasındaki folliküllerin büyümesinde son derece önemli işleve sahip olduğu

sonucuna varmışlardır. Bunlara ek olarak GDF-9'un in vitro ortamda insan ovaryum folliküllerinin yaşamını ve gelişimini arttırdığı gösterilmiştir.¹⁰²

Yapılan çalışmalarda GDF-9 kedi, koyun, domuz ve kemirgenlerin, primer ile Graaf follikül'lerinin oosit'lerinde gösterilmiştir.^{103,104,25} Fare ve koyunlarda GDF-9 geni yok edilerek yapılan çalışmalarda, erken follikül gelişiminin durması nedeniyle, bu molekülün üreme için oldukça önemli bir etken olduğu belirlenmiştir.¹⁰⁰ İnsan ve kedi gibi tek ovulasyon geçiren memeli türlerinde GDF-9'un granüloza hücreleri üzerine işlevi hakkında oldukça az bilgi vardır. Ancak sıçanlarda GDF-9'un granüloza hücre çoğalması üzerine doğrudan etkisi olduğu gösterilmiştir.⁹⁹ Ayrıca sıçanlarda olgun folliküllerin granüloza hücrelerinin, olgunlaşmamış olanlarına karşın GDF-9'a daha duyarlı olduğu saptanmıştır.⁹⁹ Bunun da büyük folliküllerin granüloza hücrelerinin, küçüklere göre GDF-9'dan daha fazla etkilenmeleri nedeniyle olduğu öne sürülmüştür.⁹⁹

Nilsson ve Skinner fare GDF-9'unun in vitro olarak neonatal sıçan ovaryum'larında primer follikül'lerin gelişimini arttırdığını, ancak primordiyal follikül'lerin gelişimi üzerine etkisinin olmadığını göstermişlerdir.¹⁰⁵ Ayrıca son çalışmalarda GDF-9'un in vitro olarak sıçanlarda öncül-antral follikül'lerin gelişimini ve tekal hücre farklılaşmasını arttırdığı belirlenmiştir.¹⁰² Bu çalışmalar sonucunda araştırmacılar GDF-9'un primer follikül aşamasından sonraki gelişimi etkilediği sonucuna varmışlardır. Bu görüşten ayrıcalı olarak yapılan diğer bir çalışmada, kültür ortamındaki fetal hamster ovaryum'una rekombinant sıçan GDF-9'u uygulaması sonucu primordiyal follikül'lerin gelişimini arttırdığı bulunmuştur.¹⁰⁶ Ayrıca, in vitro ortamda fetal hamster ovaryum'larına FSH uygulanmasının GDF-9 salınımını arttırdığı gösterilmiştir.¹⁰⁶

Dong ve arkadaşlarının yaptıkları immünohistokimyasal çalışmalar fare ve sıçanların oosit'lerinden GDF-9 protein salınımının ilk olarak primer follikül evresinde gerçekleştiğini ortaya koymuştur.¹⁰⁰ Yine Elvin ve arkadaşlarının yaptıkları bir diğer çalışmaya göre fare ovaryum'unda GDF-9 mRNA'sı ve

proteini primordiyal follikül'lerde salınmamaktadır, ancak erken primer follikül'den başlayarak kuvvetli salınmaya başlar.¹⁰⁷ Aksine hamster oosit'lerinde ise GDF-9 protein salınımı, doğum sonrası ilk 4.günde yani primordiyal follikül aşamasında iken gözlenmiştir.¹⁰⁶

Bizim çalışmamızda kontrol grubuna ait GDF-9 antikoru ile yapılan immünofloresan boyamasının sonucuna göre tüm folliküllerin oosit sitoplazmasında tutulumun kuvvetli olduğu gözlenmiştir. Dong ve Evlin'in farelerde yaptıkları çalışmadan ayrıcalı olarak sıçan ovaryumlarının primordiyal folliküllerinde GDF-9 tutulumunun gerçekleştiği ve özellikle oosit çekirdek zarında yoğunlaştığı dikkatimizi çekmiştir. Ayrıca tek sıralı primer folliküllerin özellikle oosit çekirdek zarında ve çok sıralı primer folliküllerden başlayarak sekonder ve Graaf folliküllerinin oositlerinin sitoplazmasında ve çekirdek zarında kuvvetli tutulum gözlenmiştir. Atretik folliküllerin dejenere oositlerinde GDF-9 salınımının daha az düzeyde olduğu saptanmıştır. Bu bulgular, GDF-9'un hücre apoptozisini baskılayan molekül olarak işlevini artık yitirdiğini ve atretik follikül aşamasında apoptozisi baskılayamadığını göstermektedir.

Ovaryum folliküllerinin büyümesi ve gelişimi granüloza hücre çoğalması ve farklılaşması ile tanımlanır. Folliküler gelişimin erken evresinde granüloza hücre çoğalması oldukça yavaştır.²⁶ Gelişen folliküllerin granüloza hücreleri gonadotropin uyarılarına yanıt vermeye başlar ve artan miktarlarda östradiol salgırlar.¹⁰⁸ Gonadotropinler ve östradiol'e etkin kalan granüloza hücreleri hızlıca çoğalma evresini başlatırlar.¹⁰⁸ Folliküler gelişimin son evresinde ise östradiol'ün üretimi en üst düzeyde gerçekleşir ve buna koşut olarak hücre çoğalması durdurulur.¹⁰⁸

Çoğalan hücre çekirdek antijeni (PCNA), hücre döngüsünün işleyişinde önemli role sahip, 36 kDa'luk, çekirdek proteindir. PCNA DNA hasarı onarımında, DNA sentezi süresince ve S-evresinde DNA polimeraz için ko-faktör olarak görev alır.¹⁰⁹ PCNA salınımının geçici bir yayılımı olması, hücre çoğalma

çalışmalarında kullanılmasını sağlamaktadır. Eğer G1 evresi süresince uygun tetikleme gerçekleşirse PCNA birikmeye başlar, S evresi süresince en yüksek düzeye ulaşır ve diğer önemli düzenleyici olan D siklinler ile eşleşir.¹¹⁰ Bunu izleyerek G2 evresinde sabit kalırken M evresi süresince azalır.¹¹¹ Bu özelliği nedeniyle PCNA çoğalan hücreler için iyi bir işaretleyicidir. D2 siklin normal ovaryum işlevleri için oldukça gereklidir. FSH'a bağlı çoğalma bozukluğu olan dişi infertil farelerde D2 siklin geninde bozukluk saptanmıştır.¹¹² PCNA D siklin ile bileşen şekli olarak (siklin bağımlı kinaz'lar ve siklin bağımlı kinaz inhibitör p21) hücre döngüsünün G1 ve S evresini etkileyebilir.¹¹²

Wandji ve arkadaşlarına göre gelişen oosit'lerde PCNA salınımindaki artışın nedeni bilinmemektedir ve bu artış hücre çoğalmasıyla bağlantılı değildir.¹¹³ Fötüs doğduğunda insanlarda tüm oosit'ler ve kemirgenlerde oosit'lerin %96'sı ilk mayoz bölünmenin diploten (G2) aşamasındadır. Mayoz bölünmesi durmuş memeli oosit'leri aslında durağan değildir. Nükleer RNA sentezlemeye başlarlar ve primordiyal follikül'ü gelişim evresine taşırlar.¹¹⁴ PCNA hücre döngüsünde içerilmesinin yanı sıra, DNA sentezi ve onarımında DNA polimeraz delta'ya yardımcı protein olarak görev alır.¹¹⁵ Gelişen oosit'lerde yeni DNA sentezi gerçekleşmemesine karşın, gelişimi için seçilen oosit'lerde genetik materyalin olası hasarının onarılmasında DNA polimeraz delta aktive edilebilir. İnsan ovaryum'larında mitokondriyal DNA delesyonlarının yaşla birlikte arttığı gösterilmiştir. Bu delesyonlar granüloza hücreleri ve oosit'lerde oluşabilmektedir.¹¹⁶ Oosit'ler gibi uzun yaşayan hücreler hızlı çoğalan granüloza hücreleriyle kıyaslandıklarında, DNA hasarlanıp kendini onarırken, DNA delesyonlarına daha eğilimlidirler. Oosit çekirdeklerinde artmış PCNA salınımı durgun hücrelerden salınan çeşitli büyüme faktörlerinin etkisiyle daha da artmaktadır.¹¹⁷

Tomanek ve arkadaşları, domuz primordiyal follikül'lerinin oosit'lerinde PCNA salınımı saptamamışlardır.¹¹⁸ Bunu da primordiyal follikül'lerin oosit'lerinin hareketsiz olmasına ve henüz herhangi bir genomik DNA eşleşmesi

ve metabolik yeti göstermemelerine bağlamışlardır. Aynı araştırmacılar domuz oosit'lerinin çekirdeklerinde PCNA salınımını primer, sekonder ve erken antral evrelerde belirlemişlerdir.¹¹⁸ Özellikle öncül-antral follikül evresinde oldukça fazla sayıdaki granüloza hücrelerinde PCNA tutulumu izlenmektedir.

Fare ve sıçan çalışmalarında granüloza hücre çoğalmasının en hızlı gerçekleştiği zaman aralığı antrum evresi olarak belirlenmiştir.¹¹⁸ Ancak Hirshfield'a göre granüloza hücrelerindeki hızlı çoğalma antrum evresinden önceki öncül-antral follikül evresinde gerçekleşmektedir.²⁶ Gelişim sırasında follikül genişlemeye başladığında, PCNA immünreaktivitesinde gözlenen artış sağlıklı antral follikül'lerin granüloza ve teka hücrelerindeki kuvvetli çoğalma oranını göstermektedir. Ayrıca, gonadotropin tetiklemesine yanıt olarak granüloza ve teka hücreleri steroidogenik işlevlerini geliştirir ve artan miktarlarda steroid hormon üretirler. Geniş folliküllerde steroid üretimindeki artış hücre çoğalmasındaki azalmayı ve atreziyi göstermektedir. Feranil ve arkadaşları PCNA'ni bir işaretleyici olarak kullanarak, Buffalo ve kedi ovaryum'larında sağlıklı folliküllerin PCNA tutulumunun erken ve geç atretik follikül'lerin tutulumundan daha fazla olduğunu bulmuşlardır.¹¹⁹ Ayrıca atrezi süresince teka hücrelerinde PCNA tutulumunun oldukça azaldığını göstermişlerdir.

PCNA'nin invivo olarak sıçanlarda, in vitro çalışmalarla da inek ve Babun'ların ovaryum'larında salındığı belirlenmiştir.¹²⁰ İmmünohistokimyasal olarak PCNA'nin sıçan ve fare ovaryum'larının granüloza hücrelerinde salınımı gösterilmiştir.⁴⁷ Ayrıca PCNA salınımı primordiyal follikül büyümesinin başlangıcında in vitro olarak kedi ve Babunlarda tanımlanmıştır.¹²⁰ Oktay ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada sıçanlarda, PCNA immünreaktivitesi primordiyal follikül'lerde gözlenmemiş ancak bir granüloza hücresi bile gelişmeye başladığında immünreaktivite belirlenmiştir.⁴⁷ Daha sonraki toksikolojik çalışmalarda PCNA salınımı, fare ovaryum'larının follikül gelişiminde hücreler arası iletişime ve bozulmaya odaklanarak follikül sayımı ve bioassay için incelenmiştir.¹²¹

Bizim çalışmamızda kontrol grubunun ovaryumunda PCNA tutulumunun önceki çalışmaların bulgularıyla uyumlu olduğu gözlenmiştir. Tek sıralı primer folliküllerin granüloza hücrelerinde PCNA tutulumu az iken, çok sıralı primer ve sekonder folliküllerin granüloza hücrelerinde son derece yoğun immünreaksiyon izlenmiştir. Ancak primordiyal folliküllerin oositlerinde hiçbir tutulum saptamayan Oktay ve arkadaşlarından ayrıcalı olarak çalışmamızda tüm primordiyal folliküllerin oositlerinde yoğun PCNA tutulumu ayırt edilmiştir. Bunun yanında gelişim aşamasındaki tüm folliküllerin oositleri de oldukça yoğun boyanmıştı. Bu boyanma sitoplazmada zayıftan ortaya değişir iken çekirdekte ise yoğun pozitif olarak belirlenmiştir. Gelişmekte olan folliküllerin oosit çekirdeğindeki bu kuvvetli boyanma ve sitoplazmadaki zayıf boyanma, sağlıklı gelişimin ve DNA sentezinin göstergesi olarak kabul edilmektedir. Özellikle gelişimin ileri aşamalarındaki bazı folliküllerin oosit sitoplazmalarında gözlenen orta şiddette tutulum dikkat çekiciydi. Bu durum, folliküllerin atreziye gidebileceğinin göstergesi olarak kabul edilmiştir. Çok sıralı primer follikülden başlayarak teka interna hücrelerinin de kuvvetli tutulum göstermesi ilgimizi çekmiştir.

Bir follikülün geleceği hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve apoptozisini düzenleyen etkenlerin salınımındaki hassas dengeye bağlıdır.¹⁰³ Ovaryum'lar üreme döneminde hormonal olarak aktif organlardır. Bu dönemde granüloza ve teka hücrelerinde apoptozis oldukça yoğundur. Apoptozis ovaryum folliküllerinin sayısını ve gelişimini sınırlayarak ovulasyondan önce atreziye uğramalarına neden olur.¹⁰⁷ Bu doğal ve fizyolojik olgu organ dengesini sağlar ve hücreleri hatalı işlevlerden korur.^{103,107}

Apoptozisin en önemli özelliklerinden olan DNA parçalanması, endonükleazlarca internükleozomal birimlerin ayrılması sonucu gerçekleşir. DNA parçalanması histokimyasal olarak TUNEL (Terminal deoxynükleotidyl transferase-mediated dUTP nick end- labelling) yöntemi ile gösterilmektedir.²⁷

TUNEL apoptozisin erken aşamasındaki apoptotik hücrelerin tanımlanmasını sağlayan özel bir yöntemdir.¹²²

TUNEL yöntemi çeşitli canlılarda folliküler atrezi süresince DNA parçalanmasını göstermek için de kullanılmaktadır.^{48,123} Isobe ve arkadaşlarına göre TUNEL tepkimesi atretik follikül’lerde en fazla granüloza ve teka hücrelerinde gözlenmiştir.¹²⁴ Bu nedenle granüloza ve teka katmanlarında TUNEL pozitif hücrelerin bol olduğu folliküller, atretik follikül olarak sınıflandırılır.¹²⁴

Yapılan çalışmalarda atretik follikül’lerde TUNEL pozitif ve aktif kaspaz-3 tutlumu gösteren hücrelerin büyük çoğunluğunu granüloza hücrelerinin oluşturduğu bulunmuştur.¹²⁵ Sağlıklı folliküllerle karşılaştırıldığında atretik follikül’lerde Fas ligand (özellikle teka hücreleri, bir miktar granüloza hücreleri), Bax (sadece teka hücreleri), TUNEL (özellikle granüloza hücreleri) ve kaspaz-3’ün kuvvetli salınımı gösterilmiştir.¹²⁶ Bunlara ek olarak Jiang ve arkadaşlarına göre folliküler atrezi süresince tekal hücrelerin çevresindeki damarlanmada kayıp gerçekleşir. Teka katmanındaki mikro-damarsal çevre granüloza hücre katmanına besin ve gazların sağlanmasında önemli rol oynayarak yaşam ya da ölümü denetler.¹²⁷ Bu nedenle de atrezinin başlaması ile kan damarlarında gerçekleşen değişiklik, apoptotik sürecin önce granüloza hücrelerinde başlamasına neden olmaktadır.¹²⁸

Boone ve arkadaşlarına göre ovaryum folliküllerindeki hücre ölümü TUNEL yöntemi ile incelendiğinde apoptozis ve nekrozis arasında fark gözlenmemektedir.¹²⁵ Domuz ovaryum’larında yapılan biyokimyasal çalışmaya göre antral follikül atrezisinde en fazla granüloza hücrelerinde apoptozise rastlanmıştır. TUNEL yöntemi kullanıldığında ise DNA parçalanması teka hücrelerinde belirlenmiştir. Buradan yola çıkarak granüloza hücre katmanı ve teka katmanında fizyolojik olarak farklı apoptotik yolların yürütüldüğü sonucuna varmışlardır.¹²³

Yetişkin insan ovaryum'larıyla yapılan çalışmalarda Graaf ve sekonder follikül'lerin granüloza hücrelerinde TUNEL tutulumu belirlenmiştir.^{129,130} Makrigiannakis ve arkadaşlarına göre insan primordiyal ve primer follikül'lerinde TUNEL pozitif hücreler saptanırken, öncül-antral follikül'lerinde herhangi bir TUNEL tutulumu izlememişlerdir.¹³¹ Vaskivuo ve arkadaşları da yetişkin ovaryum'larında 22 sekonder follikül'ün 2 tanesinde TUNEL pozitif hücrelere rastlamışlardır.¹²⁹ Glamoclija ve arkadaşları insan ovaryum'larında TUNEL yöntemi ve kaspaz-3 immün boyaması ile yaptıkları bir çalışmada erken follikül aşamasında oldukça seyrek atretik follikül'e rastlamışlardır.¹³² Bunun nedeni olarak da erken aşama folliküllerde kaspaz-3 ve TUNEL yöntemiyle apoptozisin gösterilemeyeceğini ileri sürmüşlerdir.¹³²

Wu ve arkadaşlarına göre ise insan olgun oosit'lerinde DNA parçalanmasının yaşla bağlantılı olduğu belirtilmektedir.¹³³ Folliküler atrezi follikül gelişiminin tüm aşamalarında gerçekleşebilir ancak dinlenme evresinde olan folliküller, atreziden en fazla etkilenenlerdir. Mortia ve arkadaşlarına göre de primordiyal ve primer follikül'ler gonadotropin bağımsızdır. Bu nedenle apoptozis gibi fizyolojik olaylar, ovaryum'un hormonal çevresinden ve hücre genomundan bağımsızdır.¹³⁴

Depalo ve arkadaşları apoptotik DNA parçalanmasını insan ovaryum'larında primordiyal ve primer follikül'lerin oosit'lerinde saptamışlardır. Buradan yola çıkarak 'dinlenme evresindeki folliküllerde apoptozis önce oosit'lerde başlar ardından granüloza hücrelerinde ilerler' varsayımını kurmuşlardır.¹³⁵ Buna karşın diğer çalışmalarda olgunlaşmakta olan ya da tam olgunlaşmış folliküllerin atrezisi sırasında granüloza hücre apoptozisinin oosit dejenerasyonundan önce gerçekleştiği saptanmıştır.^{48,126} Araştırmacılara göre olgunlaşmamış folliküller oosit içi sinyallerden ve lokal etkenlerden özellikle daha çabuk etkilenip hasar görmektedirler. Gelişim aşamasında olan folliküllerin

ise stromal hücrelerden gelen sinyallere daha duyarlı oldukları düşünülmektedir.¹³⁵

Domuzlarda yapılan ikili immünohistokimyasal çalışmada ise TUNEL, sağlıklı folliküllerin granüloza ve teka katmanlarında görülmezken, bazı antral follikül'lerde ve erken atretik follikül'lerde kaspaz-3 tutulumu oldukça kuvvetli izlenmiştir.¹²³ Bu nedenle bu bulgular folliküler atrezinin denetimi ya da hayatta kalmanın her folliküler aşama için aynı olmadığını ortaya koymaktadır.

Dhaeseller ve arkadaşlarına göre ineklerin farklı döngü evrelerinde apoptotik hücreler primordiyal, primer ve sekonder follikül'lerde seyrek, tersiyer follikül'lerde ise oldukça boldur. Bu bulgularına göre atrezi gelişmekte olan folliküllerin herhangi bir aşamasında gerçekleşebilir ancak, tersiyer follikül aşamasında daha fazla oluşarak yüzlerce follikül ovulasyonla atılamamaktadır.¹³⁶

Durlinger ve arkadaşları ovulasyon öncesi sıçan ovaryum folliküllerinde yapısal ve apoptotik değişiklikleri incelemişler ve granüloza katmanında atretik hücreler oluşurken kumulus hücrelerinin en son piknotik olmaya başladığını bildirmişlerdir.¹³⁷ Diğer bir çalışmada ise sıçan ovaryum'larında gelişmekte olan erken folliküllerin granüloza hücrelerinde apoptozisin progesteron tarafından engellendiği savunulmuştur.¹³⁸

Bizim çalışmamızda kontrol grubuna ait ovaryum dokularının TUNEL boyamasında, literatüre koşut olarak tüm gelişim aşamasındaki sağlıklı folliküllerde TUNEL tutulumu hemen hemen hiç gözlenmemiştir. Isobe ve arkadaşlarının bulgularına benzer şekilde bazı atreziye giden Graaf follikül'lerinin granüloza katmanında az sayıda TUNEL pozitif hücre ayırt edilmiştir.

DNA parçalanması apoptotik yolun son aşamasıdır. Bu aşama Ca^{+2}/Mg^{+2} bağımlı endojen endonükleazlar olan kaspazlar tarafından tetiklenir.¹²³ Bu enzimler öncül-apoptotik sinyallere yanıt başlatarak, proteinlerde yarıklanmaya

neden olur ve sonuçta hücreyi parçalara ayırarak apoptozisin aşamalarına katılırlar. Bu sitoplazmik proteazlar başlatıcı (kaspaz-8, -9 ve -10) ve etkileyici (kaspaz-3,-6,-7) olarak sınıflandırılır. Uygun uyarıcının etkisiyle, başlatıcı kaspazlar endojenöz endonükleazları aktive eden ve DNA'nın parçalanmasını sağlayan etkileyici kaspazları aktive ederler.¹³⁹ Bu kaspazlar arasında apoptozisle en bağlantılı olan ve hücreyi ölüme götüren etkileyici enzim kaspaz-3'tür.¹⁴⁰ Ayrıca apoptozisin sonlandırıcı enzimi olan kaspaz-3'ün, ovaryum'un granüloza hücrelerinde apoptozis işlemini tamamladığı bilinmektedir.²⁸

Foliküler gelişimin ilk evresinde follikül, gonadotropinlerden etkilenmez. Zamanla gonadotropin etkisiyle antrum ve teka katmanları uyarılır ve steroidler üretilmeye başlar.⁴² Gonadotropinlerin antral follikül'lerin granüloza hücrelerinde apoptozisi baskıladığı bilinmektedir.⁴² Atretik follikül'lerin granüloza hücrelerindeki kaspaz-3'ün granüloza hücrelerince düzenlendiği düşünülmektedir.¹³¹

Kaspaz-3, çoğu hücrede aktif olmayan zimojen etkili kaspazdır. Aktif kaspaz-3 insan ve farelerin atretik antral follikül'lerinde salınım göstermektedir.¹⁴¹ Berardinelli ve arkadaşları tarafından domuzların atretik follikül'lerinin granüloza hücrelerinde kuvvetli kaspaz-3 tutulumu gösterilmiştir.¹²³ Ayrıca yapılan çalışmalarda sağlıklı folliküllerin granüloza hücreleri kaspaz-3'ün aktif olmayan şekli öncül-kaspaz-3 içerirken, sadece atretik antral follikül'lerin kaspaz-3'ün aktif formunu içerdiği gösterilmiştir.^{141,142} Bu bulgulara göre atretik olmayan folliküllerin aktif kaspaz-3 ve TUNEL tutulumu göstermediği sonucu çıkarılmıştır.

Kaspaz-3 geni yokedilmiş farelerde yapılan çalışmalarda, bu enzimin granüloza hücre apoptozisi için öncelikli öneme sahip olduğu ancak cins hücre gelişimi için önemli olmadığı saptanmıştır.¹⁴¹ Aktif kaspaz-3 salınımı farelerde atretik follikül'lerin oosit ve granüloza hücrelerinde gözlenirken, primordiyal follikül'lerde izlenmemiştir.¹⁴³ Benzer şekilde Glamoc'lija ve arkadaşları insan

primordiyal ve primer follikül'lerinde kaspaz-3 aktivasyonu saptamamışlardır. Buradan yola çıkarak, kaspaz-3 salınımının en erken küçük antral aşamada granüloza hücrelerinde gerçekleşmesinden dolayı, apoptozisin antrumun oluşmasıyla başladığı savını ileri sürmüşlerdir.¹³² Ayrıca Glamoc'lija ve arkadaşları geniş antral follikül'lerde oldukça az TUNEL pozitif hücreler gözlerken, kaspaz-3 immünreaktivitesini çoğu apoptotik granüloza hücresinde yaygın olarak belirlemişlerdir. Kaspaz-3'ün öncelikli olarak sitoplazmada bulunduğunu daha sonra da çekirdeğe geçerek nükleer elementlere katıldığını düşünmektedirler.¹³² Ayrıca apoptotik granüloza hücrelerinde kaspaz-3'ün DNA parçalanmasından daha uzun bir evreye sahip olduğu fikri ileri sürülmektedir.¹³²

Bizim çalışmamızda da gelişim aşamasında olan küçük folliküllerde kaspaz-3 tutulumu, granüloza hücre katmanında az düzeyde, teka interna katmanındaki hücrelerde orta düzeyde gözlenmiştir. Atreziye giden folliküllerde ise granüloza hücre katmanında ve antrum sıvısına dökülen bazı hücrelerde yoğun immünreaktivite izlenirken, oosit sitoplazmasında da bir miktar tutulum dikkati çekmiştir.

APAF-1 kaspaz'ların etkinliği ve kuvvetlenmesi için son derece önemli bir öncül-apoptotik moleküldür.²⁹ Apoptozisin mitokondriyal yolunda sitokrom-c sitosole salınarak APAF-1'in apoptozom bileşenini başlatır. Apoptozom kaspaz-9'un ve sırasıyla sonlandırıcı kaspaz-3 ve kaspaz-8'in etkinliğini düzenleyerek hücreyi proteolizle öldürür.¹⁴⁴ Ovaryum'larda apoptozis karşıtı proteinlerin, öncül-apoptotik Bcl-2 proteinleri (Bad, Bod, Bax) ile heterodimerize olarak bu proteinlerle eşleşip sitokrom-c'nin salınımının olaylanmasını ve ovaryum'daki APAF-1 ile bağlanarak kaspaz etkinliğinin düzenlenmesini sağladıkları bilinmektedir.²⁹

Diğer yapılan biyokimyasal çalışmalarda, APAF-1'in aktivasyonu için sitokrom c'nin mitokondriyondan salınması gerektiği vurgulanmıştır.³⁰ Sitokrom c'nin varlığında APAF-1 öncül-kaspaz-9 ile etkileşime girebilmek için uygun

değişikliklere uğrar. Bu etkileşim kaspaz-9'un aktivasyonunu ve yürütülmesini sağlar.³⁰ Sonuç olarak APAF-1 mitokondriyal sitokrom c'nin salınmasıyla aktive edilir. Kaspaz aşamalarının sırayla aktive olmasıyla da granüloza hücrelerinin ölümünü gerçekleştirir.³⁰

Son çalışmalarda APAF-1 etkinliğinin bazı ovaryum kanserlerinde apoptozisin düzenlenmesinde önemli olduğu gösterilmiştir. Kanser hücrelerinin kaspaz aktivitesini azaltabildiği ve sitokrom-c salınımını düşürerek apoptozis mekanizmasına direnç gösterdiği bulunmuştur. Sitokrom-c'nin azalması da APAF-1'in etkinliğini ortadan kaldırır. Bu nedenle sitokrom-c ve APAF-1 proteinleri tümör baskılayıcıları olarak rol oynamaktadırlar.¹⁴⁰

Evans ve arkadaşları ise çalışmalarında follikül içi östradiol yoğunluğunun düşmesine koşut olarak östradiol hedef genlerinin salınımının azaldığını ve östradiol tarafından baskılanan apoptozis-hücre ölüm genlerinin (COX-1, TNF- α , CAD, APAF-1, P58 vb) salınımının arttığını saptamışlardır.¹⁴⁵

Ovaryum follikülleri ile ilgili yapılan çalışmalarda APAF-1'in insan ve fare granüloza hücrelerinde salındığı ve gonadotropin uygulanması ile APAF-1 salınımının baskılandığı gösterilmiştir.³⁰ Eşdeğer olarak diğer bir çalışmada, kemirgenlerin puberte öncesi ovaryum'larında invivo gonadotropin uygulamasının granüloza hücre apoptozisi ve folliküler atrezi üzerine baskılayıcı etkisi olduğu gösterilmiştir.¹⁴⁶ Robles ve arkadaşları ergenlik öncesi farelerden topladıkları geç ve erken antral follikül'lerin gonadotropin desteği olmadığında atreziye uğradıklarını saptamışlardır.³⁰ APAF-1 ile yaptıkları immünohistokimyasal boyamada geç, erken antral ve atretik follikül'lerin bazı granüloza hücrelerinde kuvvetli tutulum belirlemişlerdir.³⁰

Bizim çalışmamızda tüm gelişim aşamalarındaki folliküllerin granüloza hücrelerinde orta dereceli APAF-1 tutulumu belirlenmiştir. Robles ve arkadaşlarıyla eşdeğer olarak atreziye giden folliküllerin oositlerinde zayıftan ortaya

değişen tutulum gözlenirken, granüloza hücrelerinde artmış APAF-1 tutulumu dikkatimizi çekmiştir. Bu durum bize APAF-1 ve kaspaz-3'ün olgunlaşmış folliküllerin granüloza hücrelerinde ölmeden önce biriktiğini, çünkü bu birikimin atreziye götüren apoptozisin yürütülmesi için hücre içi mekanizmayı desteklediğini düşündürmüştür.

Çeşitli kemoterapotik ajanların üremeyi ileri derecelerde etkilediği bilinmektedir, bunların arasından alkilasyon ajanları en hasar verenleridir.¹⁴⁷ Alkilasyon ajanları alkil gruplarının önemli hücresel bileşenlere geçişinde rol oynar, özellikle DNA'nın guanin bileşenlerinin alkilasyonuna neden olarak DNA kodlamasının bozulmasına ve bağlarının ayrılmasına neden olmaktadır.

Alkilasyon ajanları arasında en sık kullanılan Siklofosfamid kuvvetli toksik etkili immün-baskılayıcı ilaçtır. Sitokrom P450 enzimleri olan 4-hydroxycyclophosphamide (CYP2A6, -2B6, -2C8,-2C9 ve -3A4) ile oksidasyon yoluyla metabolik aktivasyona gereksinim duyar. 4-Hydroxycyclophosphamide zinciri açılır ve 2 reaktif metabolit; fosforamid mustard ve akrolein'e ayrışır. Bu iki metabolit de sitotoksik ajandır, önemli hücresel büyük moleküllere bağlanarak biyolojik etki gösterirler. Fosforamid mustard ve akrolein birlikte kendiliğinden ya da glutatyon S-transferaz aracılı bileşik GSH tarafından detoksifiye edilir. Fosforamid mustard DNA-alkilasyon yetisine sahiptir ve genelde Siklofosfamid'in terapötik olarak belirgin sitotoksik metabolitlerindendir. Fosforamid mustard'ın fare ovaryum'unda follikül hasarına neden olan bir metabolit olduğu gösterilmiştir. Siklofosfamid uygulamasının ayrıca doz bağımlı olarak karaciğer, akciğer kemik iliği ve ovaryum'da GSH düzeyinin azalmasına neden olduğu bilinmektedir.^{148,149}

Siklofosfamid uygulaması tümör hücrelerinde apoptozise neden olduğu gibi, ovaryum, testis, kıl follikülü, kemik iliği ve timus gibi diğer normal dokuları da olumsuz etkilemektedir.^{150,151,152} Gelişim aşamasında olan embriyonlara Siklofosfamid uygulanarak bu ajanın dokulara mitokondriyal apoptotik yolla

hasar verdiği, mitokondriyondan sitoplazmaya sitokrom c geçmesi ve kaspaz-9 ile kaspaz-3'ün aktive olmasıyla kanıtlanmıştır.¹⁵³ Birçok alışmada Siklofosfamid ve diğer kemoterapotik ajanların gen mutasyonlarına, kromozomal kırılmalara ve somatik hücrelerde anöploidi'ye neden olduğu gösterilmiştir.¹⁵⁴ Siklofosfamid tedavisi üreme organlarında follikül hasarı, gonadal bozukluk, folliküler olgunlaşmanın hızlanması, folliküler azalma ve tükenmeye neden olurken, yüksek doz uygulanması, erken menapoz ve kısırılık ile sonuçlanabilmektedir.⁶ Ayrıca Siklofosfamid'in üreme hücrelerinde oluşturduğu hasar, aktarılabılır genetik hasara neden olur ve bu durum ciddi sonuçlanan düşüklere, doğum defektlerine, genetik ve neoplastik hastalıklara yol açar.⁶

Literatürde Siklofosfamid uygulamasının ovaryumlar üzerine yaptığı olumsuz etkiler ve kanser olmayan dokuları Siklofosfamid'in dejeneratif etkilerinden koruyabilecek antioksidanlar ile ilgili immünohistokimyasal ve yapısal araştırmalar oldukça sınırlıdır. Bu nedenle çalışmamızın bir grubunda Siklofosfamid uygulanmış sıçanlardan elde edilen ovaryumlarda anti-TGF- β_1 , anti-PCNA, anti-GDF-9, anti-TUNEL, anti-Kaspaz-3 ve anti-APAF-1 antikorları immünohistokimyasal olarak değerlendirilirken aynı zamanda bu ovaryum örnekleri ultrastrüktürel olarak da incelenmiştir.

Siklofosfamid uygulamasından sonra ovaryum'larda dejenere folliküllerin histolojik görüntüsü folliküllerin doğal dejenerasyon süreci olan atreziye benzemektedir. Granüloza hücre çekirdeklerinde piknozis ve kumulus hücrelerinin oosit'ten ayrıldığı izlenir.¹⁵⁵ Ovaryum apoptozisinin diğer belirleyicisi olan oligonükleozomal DNA bölünmesi Siklofosfamid uygulamasından sonra çok fazla araştırılmamıştır. Ancak tedaviden sonra hayatta kalan granüloza hücrelerinin çoğu, hücre döngüsünün S evresinden önce DNA biriktirdikleri için, çekirdeklerinin daha büyük olduğu bilinmektedir.¹⁵⁶

Siklofosfamid'in folliküler gelişim üzerindeki etkisi ya doğrudan olmakta ya da hepatik oksidasyondan sonra aldehit türevleri follikülün granüloza hücreleri ya da bazal membran üzerine etkili olmaktadır. Raz ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma bu varsayımı desteklemektedir. Araştırmacılar insan ovaryum korteks dokusunu Siklofosfamid ile kültüre ettiklerinde, toksik etkinin folliküllerin granüloza hücrelerine ve bazal membranına hasar verdiğini göstermişlerdir.¹⁵⁷

Kemoterapinin insan ovaryum'u üzerine etkilerini araştıran histolojik çalışmalarda ovaryum atrofisinin arttığı ve primordiyal follikül'lerin azaldığı bildirilmektedir.¹⁵⁸ Benzer olarak Braw ve arkadaşları Siklofosfamid ile tedavi edilen hastalardan alınan ovaryum biyopsilerinde folliküllerin azaldığını göstermişlerdir.¹⁵⁹ Ataya ve arkadaşları Siklofosfamid enjeksiyonundan 16 ve 24 saat sonra her ovaryum için granüloza hücre sayısında ve follikülerin ortalama çaplarında istatistiksel olarak belirgin bir azalma saptamışlardır.¹⁵⁶ Ayrıca Siklofosfamid'in insan granüloza hücrelerindeki steroid üretimini azalttığını göstermişlerdir. Bu nedenle de granüloza hücrelerinin ovaryum toksisitesinde önemli hedef yapılar olarak kabul edildiklerini savunmuşlardır.

Bunun yanında bazı klinik çalışmalara göre üreme bozukluğu olmayan hastaların kemoterapi sonrası normal üreme gösterdikleri vurgulanmaktadır.¹⁶⁰ Önceki çalışmalarda kemoterapinin yüksek dozda olsa bile kadınlarda ovaryum işlevlerine olumsuz etkisinin, daha çok yaşla bağlantılı olduğu belirtilmektedir.¹⁶¹ Kemoterapi uygulamasının yaşlı kadınlarda gençlere karşın daha çok ovaryum bozukluklarına ve kalıcı kısırlığa neden olduğu çalışmalarda kesinleştirilmiştir.¹⁶² Doğumda insan ovaryum'larında yaklaşık 2×10^6 follikül bulunmaktadır ancak sürekli gerçekleşen atrezi ile zamanla bu follikül havuzunda belirgin bir azalma olur. Bu nedenle ileri yaşlarda uygulanan kemoterapi, zaten az olan folliküler kaynağı daha da azaltarak ovaryum bozukluklarına ve erken menapoz'a neden olmaktadır.¹⁴⁷

Kemirgenlerle yapılan çalışmalarda Siklofosfamid'in insanlarda olduğu gibi doz ve zaman bağımlı olarak ovaryum folliküllerini azaltıp ovaryum işlevlerine engel olduğu gösterilmiştir.¹⁵⁵ Siklofosfamid kemirgenlerde primordiyal ve primer folliküllerde olduğu kadar, öncül-antral ve antral folliküllerinin de kaybına neden olur.¹⁵⁵ Primordiyal ve küçük primer follikül'lerde apoptotik yıkım için oosit hedef olsa da, büyük folliküllerde hedef granüloza hücre apoptozisidir ve ardından oosit ölümü gerçekleşir.¹⁶³

Bizim de çalışmamızın elektron mikroskopik incelemelerinde Siklofosfamid uygulanmış ovaryum dokularında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında özellikle çok sıralı primer folliküllerde yoğun dejeneratif değişiklikler saptanmıştır. Kontrol grubunda zona pellusidanın elektron yoğun boyandığı dikkati çekerken, granüloza hücrelerinin koyu ve açık sitoplazmalı olduğu gözlenmiştir. Siklofosfamid uygulanan grupta oosit yapısını korumuş iken zona pellusida yoğunluğunun kontrol grubuna karşın azaldığı ve granüloza hücre katmanının oldukça dejeneratif görünüm sergilediği belirlenmiştir. Koyu granüloza hücrelerinde apoptozise giden hücre görünümü izlenirken, açık hücrelerin sitoplazmasında vakuolizasyonun, geniş ve boş alanların arttığı dikkati çekmiştir.

Meirow ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada aynı yaştaki genç farelere 50 ve 75 mg/kg dozlarda uyguladıkları Siklofosfamid'in ardından, ovaryum'larında belirgin hasar ve primordiyal follikül'lerde %50 oranda azalma saptamışlardır. Ancak ovulasyonun çiftleşme ve gebelik oranlarını etkilemeyerek üreme performansını değiştirmediğini gözlemlemişlerdir. Bunun nedenini de, genç yaşlarda primordiyal follikül topluluğunun bol olması ve ovaryum'ların kemoterapinin zararlı etkilerine karşı toleransının yüksek olmasına bağlamışlardır.¹⁴⁷ Kemoterapi uygulamasıyla doğrudan primordiyal follikül topluluğunun azalmasının mekanizması henüz çözülebilmemiş değildir. İn vitro insan ve kemirgen çalışmalarından elde edilen verilere göre primordiyal follikül'lerin hasarlanması ya da azalmasındaki doğrudan mekanizma apoptozis

sinyal yollarıyla bağlantılıdır. Primordiyal follikül'lerin hasarlanmasındaki ilk aşama olan kaspaz etkinliği ve DNA parçalanması öncül-granüloza hücrelerinde ve oosit'lerde görülmektedir.¹⁶⁴

Siklofosfamid uygulamasının farklı evredeki follikülleri hedef alması türlere göre değişmektedir. Çeşitli çalışmalarda Siklofosfamid farelerde primordiyal follikül'leri hedef alırken, sıçanlarda antral follikül'lerin primordiyal follikül'lerden daha duyarlı olduğu bulunmuştur.^{163,165} Jarrel ve arkadaşları Siklofosfamid uygulamasından 14 gün sonra sıçan ovaryum'larında yaygın bir folliküler atrezi saptamışlardır. Bu ajanın ovaryum folliküllerinin toplam sayısında özellikle de antral follikül'lerinkinde belirgin bir azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir.¹⁶⁵ Davis ve Heindel proöstrus evresindeki sıçanlara tek doz Siklofosfamid uygulamışlar ve 24 saat sonra 150-390 µm çapındaki öncül-antral ve küçük antral olarak sınıflandırılan tüm folliküllerde dejenerasyon belirlemişlerdir.¹⁵⁵ Lopez ve arkadaşları diğer çalışmalarla eşdeğer olarak Siklofosfamid uygulamasından 24 saat sonra öncül-antral ve antral follikül'lerde artmış TUNEL pozitif folliküller izlerken primer ya da primordiyal follikül'lerde bunu belirleyememişlerdir.⁵⁶

Bizim çalışmamızda Jarrel ve Davis'in bulgularıyla uyumlu olarak Siklofosfamid uygulanmış ovaryum dokusunda primordiyal ve tek sıralı primer folliküllerde TUNEL pozitif hücre gözlenmez iken, çok sıralı primer, sekonder ve Graaf folliküllerinde çok sayıda TUNEL pozitif hücrenin varlığı gözlemlenmiştir. Ayrıca bu bulgularımız özellikle çok sıralı primer folliküllerde dejenerasyonu ortaya koyan elektron mikroskop bulgularımızı da desteklemektedir. Literatürde Siklofosfamid uygulanmış ovaryumlarda apoptotik sinyal molekülleri kaspaz-3 ve APAF-1 salınımını inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda Siklofosfamid uygulanan gruba ait ovaryum örneklerinde tüm gelişim aşamalarındaki folliküllerin granüloza hücre sitoplazmalarında yoğun kaspaz-3 ve APAF-1 tutulumu belirlenmiştir. Ayrıca atretik ve Graaf folliküllerin granüloza hücrelerinde ve oosit sitoplazmasında kuvvetli, korpus luteumda ise

artan immünreaksiyon dikkatimizi çekmiştir. Bu bulgular kaspaz-3 ve APAF-1'in öncelikli olarak sitoplazmada bulunduğunu daha sonra da çekirdeğe geçtiğini düşündürmektedir. Ayrıca apoptotik granüloza hücrelerinde kaspaz-3'ün DNA parçalanmasından daha uzun bir evreye yayıldığını bu nedenle de kaspaz-3'ü TUNEL işaretlemesine karşın daha çok follikülde immünreaksiyon verdiğini ortaya koymaktadır.

Siklofosfamid'in sıçanlarda özellikle yüksek mitotik yetiye sahip hücreler olan granüloza hücrelerine zarar verdiği çalışmalarla gösterilmiştir.¹⁶⁵ Siklofosfamid'in granüloza hücre apoptozisine neden olması, bir alkali ajan olarak DNA'ya hasar vermesiyle ilişkilidir.¹⁴⁸ Ayrıca Siklofosfamid uygulamasının oksidatif strese neden olduğu da çalışmalarla gösterilmiştir.¹⁶⁶

Ataya ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Siklofosfamid enjeksiyonundan 24 saat sonra serum östradiol'ünde azalma belirlemişler ve buna koşut olarak bu ajanın granüloza hücre işlevlerini engelleyebileceğini düşünmüşlerdir. Granüloza hücreleri serum östradiol'ünün ana kaynağıdır. Serum östradiol'ü geniş follikül çapı ve granüloza hücre sayısı ile bağlantılı olarak artar.¹⁵⁶ Ataya ve arkadaşlarına göre Siklofosfamid'in yineleyen şekilde (günlük) verilmesi granüloza hücrelerinin uzun süre alkilasyona etkin kalmasına neden olmuştur. Endojenöz gonadotropinler negatif geri bildirim mekanizmayla östrojen'lerle bağlantılıdır. Yani, azalan östrojen düzeylerine yanıt olarak gonadotropinler artar.¹⁵⁶ Artmış FSH salgısı Siklofosfamid'e duyarlı follikül havuzundaki folliküler gelişimi hızlandırabilir. Granüloza hücrelerinin bölünme aşamalarının S ve diğer evrelerinin FSH tarafından kısaldığı bilinmektedir. Siklofosfamid hızla bölünen granüloza hücrelerine saldırarak gelişen follikülleri ortadan kaldırır ve steroid salgılarını azaltır. Azalan steroid salgısı hipofiz'den gonadotropin salınımını artırır. Bu durum bozulmadan geride kalmış follikül havuzundaki hassas olgun follikülleri iyileştirir ve bu mekanizma bozuk olan döngüyü sürdürür. Sonuçta Siklofosfamid'in, küçük follikülleri bir sonraki evre olan gelişim ve büyüme aşamasında olan follikül havuzuna geçmek için zorlayabileceği düşünülmektedir.

Östrojen ve FSH'nin negatif geri bildirim mekanizması insanlar için de geçerlidir.¹⁵⁶

Bizim çalışmamızda Siklofosfamid uygulanan ovaryum dokularında PCNA tutulumu gösteren folliküllerin kontrol grubuna göre azaldığı, korpus luteum ve atreziye giden folliküllerin sayısının ise oldukça arttığı dikkatimizi çekmiştir. Sağlıklı folliküllerde oosit tutulumu son derece az gözlenirken, granüloza ve özellikle teka interna katmanlarında PCNA tutulumu gösteren hücreler belirlendi. Siklofosfamid grubunda PCNA tutulumu gösteren sağlıklı folliküllerin az sayıda olup korpus luteumun fazla sayıda olması, Siklofosfamid'in follikülleri hızlıca çoğalmaya ve ovulasyona zorlayarak, bir sonraki basamak olan korpus luteum oluşumuna neden olduğunun bir göstergesi kabul edilebilir. Yine bazı folliküllerin granüloza ve özellikle teka hücrelerinde gözlenen PCNA pozitif hücrelerin varlığı kemoterapotik ajanın teka hücreleri üzerinden follikülün gelişimini olumsuz yönde tetiklemesinin bir kanıtı olarak düşünülebilir. En dikkat çekici bulgularımızdan biri ise, atretik folliküllere ait dejenere oositlerin sitoplazmasında immünreaksiyon oldukça kuvvetli gözlendi. Literatürde toksik ajanlara etkin kalmış ovaryumların atretik folliküllerinin oositlerinde PCNA tutulum mekanizmasını inceleyen araştırma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda sağlıklı folliküllerin oosit sitoplazmasında oldukça zayıf PCNA tutulumu gözlenirken, atretik folliküllerin oosit sitoplazmasındaki bu artışın 2 nedeni olabileceğini düşünmekteyiz; çoğalmakta olan hücre antijeni PCNA hücre döngüsünün işleyişinde önemli role sahip çekirdek proteini olarak, DNA hasarı onarımında, DNA sentezi süresince ve S-evresinde DNA polimeraz için ko-faktör olarak görev aldığı bilinmektedir. Siklofosfamid uygulamasıyla oosite G1 evresi süresince uygun tetiklenme gerçekleşmediği için PCNA birikmeye başlar, ve hücre döngüsünün M evresinde azalması gerekir iken aksine birikim sitoplazmaya yayılmaya başlamış olabilir. Diğer varsayımımız ise yine Siklofosfamid'in toksik ajan olması nedeniyle yoğun DNA hasarına neden olduğu için PCNA birikimi DNA sentezi için değil DNA onarımı için artmaktadır kanısındayız.

PCNA bulgularımızı desteklemek amacıyla kullandığımız GDF-9 ve TGF- β_1 immünohistokimya sonuçlarına göre Siklofosfamid uygulanan ovaryum örneklerinin GDF-9 immünofloresan boyamasında tüm gelişim aşamasındaki folliküllerin oositlerinde tutulumun kontrol grubuna karşın son derece az olduğu gözlemlenmiştir. Atretik folliküllerde ise immünreaksiyonun hiç olmaması dikkatimizi çekmiştir. Bu da Siklofosfamid uygulamasından sonra özellikle gelişimin son aşamasındaki folliküller ile atretik folliküllerde oositin yaşam sinyal moleküllerini sentezleyemediğinin ve bu nedenle follikülogenezisin baskılandığının göstergesi olabilir kanısındayız. Aynı şekilde, tek sıralı ve çok sıralı primer, erken ve geç sekonder ve atretik folliküllerde granüloza hücre TGF- β_1 tutulumlarının kontrol grubuna karşın orta-zayıf dereceli olduğu, teka interna tutulumunun ise biraz daha fazla olduğu dikkati çekmiştir. Oosit sitoplazmasında ise tutulumun kontrol grubuna karşın daha az olduğu ancak çekirdek boyanmasının yoğun olduğu saptanmıştır. Atretik folliküllerde ise oosit çevresindeki ve antrum boşluğuna dökülen granüloza hücrelerinde son derece az tutulum gözlenmiştir.

Burkl and Schicchi yaptıkları çalışmada kısa süreli Siklofosfamid uygulanan sıçanların histolojik kesitlerinde sekonder ve antral follikül'lerin yok olduğunu göstermişlerdir.¹⁶⁷ Folliküler epitelde DNA inklüzyonları içeren dejenere hücreler saptamışlar ayrıca gelişim aşamasında olan folliküllerin granüloza hücre katmanlarının sayısında artma olmadığını ortaya koymuşlardır.¹⁶⁷

Ataya ve arkadaşları Siklofosfamid'in pubertedeki sıçanların östradiol düzeylerini azaltabileceğini göstermişlerdir.¹⁵⁶ Ayrıca Siklofosfamid uygulamasından 24 saat sonra granüloza hücrelerinin DNA'larının çapraz bağları ve diğer büyük moleküller (enzimler, proteinler) üzerine olumsuz etkisini saptamışlardır. Lopez ve arkadaşları çalışmalarında sıçanlara 300 mg/kg Siklofosfamid uygulayarak ovaryumdaki GSH'ı %24 baskılamışlar ve öncül-ovulatuvar follikül'lerde apoptozisin belirgin olarak arttığını ve ovulasyon sonrası tuba uterinalarda oosit-kumulus bileşenine rastlamadıklarını bildirmişlerdir.

Bunun yanında 50mg/kg Siklofosfamid uygulamasının ovaryumdaki GSH düzeyini baskılamadığını ancak istatistiksel olarak folliküler apoptozisi arttırdığını saptamışlardır. Bu nedenle Siklofosfamid uygulamasından sonra ovaryum GSH azalmasının, folliküler apoptozis ile atreziyi arttırdığı ve kemoterapi sonrası follikül azalmasına neden olan mekanizmalardan birini açıklayabileceği varsayımını ileri sürmüşlerdir.⁵⁶

Biz de çalışmamızda 75 mg/kg Siklofosfamid uygulamasının ardından sıçanların GSH değerlerini ölçerek, Siklofosfamid'in kontrol grubuna karşın GSH düzeyini azalttığını saptadık. Bu da Siklofosfamid uygulanan grupta folliküler apoptozis ve atrezinin artmasıyla uyumlu bulunmuştur.

Diğer bir çalışmada sıçanlara yüksek doz Siklofosfamid uygulamasından 24 saat sonra östrus sabahı progesteron düzeylerinin belirgin olarak azaldığı bulunmuştur. Bu çalışmada Siklofosfamid uygulamasının progesteron düzeylerinin artışını engellediği sonucuna varılmıştır. Bu da ovulasyon öncesi evrede LH'nin aniden yükselmesini etkilemektedir.⁶ Bu nedenle Siklofosfamid uygulamasıyla öncül-ovulatuar denge bozulduğu için ovulasyonun engellendiği sonucuna varılmıştır.¹⁶⁸

Kemoterapi uygulamasının ovaryum'da GSH azalmasına ve oksidatif strese etki ederek granüloza hücrelerinde apoptozise neden olduğu bilinmektedir. Bu kimyasal süreçle oluşan hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyon (O_2^-) ve hidroksil radikal gibi serbest radikaller ($\cdot OH$) reaktif oksijen türlerinden birkaçıdır. Yüksek derecede reaktif olan bu serbest radikaller farklı moleküller ile kolayca tepkimeye girebilir ve böylece hücrelere zarar verebilirler.¹⁶⁹

Normal koşullarda ovulasyon ve luteolizis gibi işlemler için de sağlıklı ovaryum'larca reaktif oksijen türleri ve lipid peroksidazlar üretilmektedir.¹⁷⁰ Ovaryum'da hidrojen peroksit'in üretimi prostaglandin $F2\alpha$ tarafından artırılır. Artan hidrojen peroksit, gonadotropin ve steroid üretimini baskılayan etkinlikleri

harekete geçirir.¹⁷¹ Bu nedenle hidrojen peroksit ovaryum'un siklik yapılanmasında önemli bir düzenleyicidir. Ovaryum'larda oluşan bu reaktif oksijen türlerine karşı korunma, enzim indirgenmesi (katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz) ve moleküler onarım antioksidanlarca gerçekleştirilir. Antioksidanlar serbest radikallerle kimyasal tepkimeye girerek hücrelerin zarar görmesini engelleyen kimyasallardır. Bu özellikleriyle hücrelerin anormalleşme ve tümör oluşturma risklerini azalttıkları gibi, hücre yıkımını da azaltırlar.¹⁷¹

Önemli antioksidanlardan biri olan askorbik asit, suda çözünen ve serbest radikalleri indirgeyici bir ajandır.¹⁷² Askorbik asit'in hücre metabolizmasında rolü olan birçok etken ile ilişkisi olmasına karşın bu etkileşimlerden birçoğunun gerçek mekanizması henüz yeterince açıklanamamıştır.¹⁷³

Ovaryum'lar ve diğer endokrin organların yüksek miktarlarda askorbik asit biriktirdikleri bilinmektedir. Askorbik asit ovaryumlarda oosit sitoplazması, granüloza hücreleri, tekal ve luteal hücrelerde birikmektedir.¹⁷⁴ Granüloza hücrelerinin askorbik asit biriktirmelerinin nedeni folliküler atreziyi önlemektir.¹⁷⁵ Hücre kültürü çalışmalarıyla askorbik asit'in folliküllerdeki granüloza hücrelerinde apoptozisi baskıladığı gösterilmiştir.¹⁷⁵ Koyun ovaryum'ları ile yapılan bir çalışmada, iskemik dokulara 24 saat askorbik asit uygulandıktan sonra apoptozisin azaldığı ancak 48 saat uygulandığında azalma izlenmediği belirtilmiştir.¹⁷⁶ Kim ve arkadaşlarının bu bulgularına göre uzun süreli iskemilerde gerçekleşebilecek fazla miktardaki serbest radikallere karşı askorbik asit yoğunluğunun etkili olmadığını savunmuşlardır. Kullandıkları askorbik asit dozunun (50mg/ml) follikül kültüründe etkili olduğu ancak bu dozun doku kültüründe apoptozisi engelleyici en uygun doz olmayabileceğini kaydetmişlerdir.¹⁷⁶ Yaptıkları çalışmada askorbik asit'in transplantasyon sonrası ovaryum dokusunu oluşabilecek iskemiden koruyabileceğini belirtmişlerdir.

Bizim çalışmamızda Siklofosamid ve askorbik asit birlikte uygulanan grubun ovaryum dokularında sağlıklı folliküllerin, atretik folliküllere karşın daha fazla sayıda olduğu gözlemlendi. Tek katlı primer folliküllerde TUNEL pozitif hücreler gözlenmezken, çok katlı primer folliküllerde orta dereceli olduğu belirlendi. Atreziye gidecek Graaf folliküllerde ise TUNEL pozitif hücrelerin sayısının arttığı dikkati çekti. Bu da c vitaminin, kemoterapötik ajanın neden olduğu apoptotik etkiyi azalttığını göstermektedir. TUNEL bulgularına koşut olarak kaspaz-3 ve APAF-1 tutulumlarının Siklofosamid ve askorbik asit uygulanan grupta kontrole yakın olduğu gözlemlendi.

Askorbik asit'in eksikliği ise ovaryum atrofisine, yaygın folliküler atreziye ve mayoz bölünmenin durmasına neden olmaktadır.¹⁷⁷ Kramer ve arkadaşları tarafından askorbik asit eksikliğinin skorbütik Guinea pig'lerde folliküler atrezi, implantasyon hataları, artmış düşüklere neden olarak üreme bozukluğu oluşturduğu gösterilmiştir.¹⁷⁷

Askorbik asit'in uzun süreli yokluğu ise korpus luteum'un yapısal gerilemesine ve dejenerasyon enzimlerinin aktivasyonuna neden olmaktadır.¹⁷⁸ Bununla birlikte luteal gerileme sırasında reaktif oksijen türlerinin oluşumunun LH'nin hareketini baskıladığı ve steroid üretimini blokladığı bilinmektedir.¹⁷⁹ Baskılanmış LH, askorbik asit'in daha da azalmasına ve follikülerin hücresel bileşen işlevlerinin etkilenmesine neden olur. Azalmış olan askorbik asit nedeniyle oluşan süperoksit gibi radikaller mayoz bölünmenin kaldığı yerden sürdürülmesini tetikler.¹⁷⁹

Ovaryum'lardaki askorbik asit içeriği menstrual döngü süresince değişmektedir. Ovulasyon öncesi LH'nin aniden yükselmesine yanıt olarak, ovaryum'larda artan düzeylerde progesteron üretilir. Bunun sonucu olarak ovaryum'lardaki askorbik asit'in atırılması durdurulur ve dokudaki içeriği azaltılır.¹⁸⁰ Luteinize granüloza hücreleri ile yapılan çalışmalar askorbik asit'in progesteron üretimini tetiklediğini ve artmış progesteron yoğunluğunun askorbik

asit'in arttırılmasını engellediğini göstermektedir.¹⁸¹ Bu nedenle araştırmacılar tarafından, ovaryum döngüsü süresince LH'nin hareketinin dolaylı olarak askorbik asit dalgalanmasını denetleyebildiği düşünülmektedir. Ayrıca, askorbik asit ovaryum'lardan salgılanan oksitosin'nin düzenlenmesi gibi bazı proteinlerin ko-faktörü olarak da rol oynamaktadır.¹⁸¹ Östradiol ile askorbik asit arasındaki ilişki ise araştırmacılar tarafından oldukça karmaşık olarak tanımlanmaktadır. Dolaşımdaki askorbik asit yoğunluklarının doğum kontrol hapı kullanan kadınlarda oldukça düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir, bunun nedeni de östradiol'ün sindirim sisteminden askorbik asit emilimini baskılaması olarak ortaya konulmuştur.¹⁸² Murray ve arkadaşları ise askorbik asit'in östradiol'ün üretimine etkisinin olmadığını belirtmişlerdir.¹⁰ Ancak bulguları, in vitro ortama askorbik asit uygulanmasının aromataz yetisini ters etkileyerek PH'ı değiştirdiğini savunan diğer çalışmalarla uyumsuzdur.¹⁸³

Askorbik asit taşınımının arttırılması tirozine-özgü protein kinaz bağımlı yoldan FSH, IGF-1 ve GNRH tarafından sağlanır. Granüloza hücreleri gelişimin geç öncül-antral aşamasında, gonadotropinlere karşı yanıt yeteneği edinirler ve hızla gelişirler, bu nedenle de askorbik asit biriktirme erki kazanırlar. Özellikle FSH ve IGF-1 granüloza hücrelerinde askorbik asit'in biriktirilmesini sağlar, bu da granüloza hücrelerinin farklılaşmasında birbirine koşut etki gösterir.¹⁸⁴ Folliküler sıvısı yüksek yoğunlukta östradiol içeren Graaf follikül'lerinde askorbik asit biriktiği de gösterilmiştir.¹⁸⁵

Askorbik asit çok önceleri üreme bozukluğu olan ineklerde tedavi amaçlı kullanılmıştır.¹⁸⁶ Ayrıca kadınlarda ovulasyon indüksiyonunda kullanılan klomifen sitrat'ın etkisini arttırdığı bilinmektedir.¹⁸⁷ Ancak yüksek dozlarda askorbik asit uygulanması insanlarda ve sıçanlarda kendiliğinden düşüklere neden olmaktadır.¹⁸⁸ Ayrıca askorbik asit'in yüksek yoğunluğunun kolesterol yan zincirinin yarıklanmasını engellediği ve androjen üretimini etkileyerek aromataz yetisini doğrudan düşürdüğü gösterilmiştir.¹⁸⁹

Guinea pig’lerde askorbik asit eksikliği ovaryum atrofisi, folliküler atrezi ve mayoz bölünmenin kaldığı yerden sürdürülmesi gibi üreme bozukluklarına neden olmaktadır, insanlar da guinea pigler gibi askorbik asit’i dışarıdan almak zorundadırlar.¹⁷⁹

Askorbik asit’in işlevlerinden biri de hem gen düzeyinde hem de salgıda ko-faktör olarak kollajen sentezini arttırmaktır.¹⁹⁰ Folliküler bazal membranın ana bileşenlerinden olan kollajen IV, granüloza ve teka hücrelerince sentezlenmektedir.¹⁹¹ Ovaryum’lar doku yenilenmesinin en yoğun olduğu organlar olduğu için, folliküler gelişim, ovulasyon ve korpus luteum oluşumu süresince, bazal membran ile hücre dışı ortam sürekli bir yenilenmeye uğrarlar ve yüksek miktarlarda kollajen sentezine gereksinimleri vardır.¹⁰ Bu nedenle askorbik asit’in gelişim aşamasında olan folliküler bazal membranların bütünlüğünün sürdürülmesinde önemli bir yeri vardır.¹⁰

Önceki çalışmalarda Graaf follikülü’nün bazal membranının düzenlenmesinde askorbik asit’in rolü araştırılmış, azalması follikül membranında dejenerasyona, yüksek dozu ise olgun folliküllerde kollajenolitik yetinin baskılanmasına neden olduğu gösterilmiştir.¹⁷⁷ Ayrıca C vitamini eksikliğinin plasental membranda yırtılma ile bağlantılı olabileceği bildirilmiştir.¹⁹² Askorbik asit bazal membran yenilenmesini ve düzenlenmesini sağlayan MMP-2 ile TIMP-1’in üretimini de arttırmaktadır.¹⁰ Ayrıca yapılan diğer bir çalışmada koyun follikülerinin serum içeren ortamına askorbik asit eklenmesinin bazal membran bütünlüğünün yüzdesini arttırdığı gösterilmiştir.¹⁰

Askorbik asit birikimi insanların Graaf follikül’lerinde bulunduğu kadar, Buffalo’ların küçük folliküllerinde, farelerin gelişimin tüm aşamalarındaki folliküllerinde ve özellikle öncül-antral follikül’lerinde saptanmıştır.¹⁸⁹

Murray ve arkadaşları farelerde yaptıkları çalışmada kültür ortamında askorbik asit bulunmadığında 24 saatlik kültür süresince öncül-antral follikül'lerde apoptozisin tetiklendiğini, askorbik asit içeren ortamdaki folliküllerde ise apoptozisin azaldığını belirlemişlerdir. Murray ve arkadaşları yaptıkları çalışmada askorbik asit'in fare ovaryum'unun folliküler gelişimi üzerine çok yönlü işlevsel etkisinin olduğunu vurgulamışlardır. Askorbik asit'in follikülün büyüme oranına ya da yapısına son derece büyük etkisini saptamamalarına karşın follikülün bazal membran bütünlüğünün korunmasında oldukça önemli rolü olduğunu izlemişlerdir. Kültür ortamında 6 gün sonunda askorbik asit olmadan sadece %33 follikül'ün membran bütünlüğünü koruyabildiği, 280 µmol askorbik asit içeren kültür ortamında ise %88 follikülün sağlam membrana sahip olduğunu göstermişlerdir.¹⁰

Takami ve arkadaşları sıçan oosit kumulus kompleksinin eldesinden yaptıkları hücre kültürü çalışmalarında, oosit olgunlaşmasının başlamasının hemen ardından askorbik asit'in aniden azaldığını izlemişlerdir. Mayoz bölünmenin yeniden başlamasından önce ise öncül-ovulatuvar follikül'lerde gonadotropinlerin askorbik asit'i azalttığını saptamışlardır.¹¹ Benzer bir çalışmada hücre dışı askorbik asit'in germinal vezikül yıkımını baskılamadığı, oosit içi enjeksiyonu ile oosit olgunlaşmasını engellediği gözlenmiştir.¹⁷³ Ayrıca hücre dışı askorbik asit'in oosit'in içine enjekte edilmediği sürece oosit olgunlaşmasına etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır.¹⁷³

Aten ve arkadaşları sıçan ovaryum'larında yaptıkları çalışmada, ovaryum'un farklı evrelerinde luteotropik ve luteolitik ajanlara yanıt olarak antioksidan vitaminlerin düzeylerinde belirgin değişiklikler bulmuşlardır.¹⁶⁹ Bu bulgularına dayanarak ovaryum'larda antioksidan vitaminlerin birikiminin endokrin düzenlemenin denetimi altında gerçekleştiği varsayımını ortaya koymuşlardır.¹⁶⁹ Ovaryum'larda antioksidan birikiminin reaktif oksijen türlerine karşı korunmak için durağan olmayan, hareketli ve düzenleyici bir işlem olduğunu

savunmuşlardır.¹⁶⁹ Behrman ve arkadaşlarına göre de sıçan granüloza hücrelerinde askorbik asit'in arttırılması hormonal yolla düzenlenmektedir.¹⁹³

Yapılan oosit kültür çalışmalarında askorbik asit ve diğer antioksidanların sıçanlarda folliküler apoptozisi baskıladığı bilinmektedir.¹⁷⁵ Tilly ve arkadaşlarının sıçanlarda yaptıkları ovaryum kültür çalışmalarında FSH'ın granüloza hücre apoptozisini baskılayarak folliküler atreziyi önlediği gösterilmiştir.¹⁷⁵ Askorbik asit ve diğer oksidatif stres baskılayıcılarının da granüloza hücrelerinde apoptozisi baskılayan FSH'ı taklit ettiğini saptamışlardır.¹⁷⁵ Diğer çalışmalarda da benzer olarak askorbik asit'in, sıçan granüloza hücrelerinde apoptozisin düzenlenmesinde, baskın follikülün seçilmesinde ve atrezi ya da apoptozisten korunmasında doğal bir rol oynadığı gösterilmiştir.²⁰⁸

Bizim çalışmamızda sağlıklı folliküllerden salınan TGF- β_1 , GDF-9 ve PCNA'nin Siklofosfamid ve askorbik asit uygulanan grupta kontrole eşdeğer olması bu antioksidanın toksik ajana etkin kalan folliküller üzerine olumlu etkisini göstermektedir. Askorbik asit uygulanan grupta biyokimyasal olarak GSH değerlerinin Siklofosfamid uygulanan gruptan yüksek ve kontrol grubuna yakın çıkması askorbik asit'in oksidatif stresi baskılayarak granüloza hücrelerinde ve oositte apoptozisi önlediğini düşündürmektedir.

Diğer bir önemli antioksidan olan α - tokoferol serbest radikalleri temizleyerek ve lipid peroksidasyonunu sonlandırarak hücrelerin korunmasını sağlar. Hücrelerin yağ içeren ve akışkan kısımlarında (örneğin membran) bulunur. Ayrıca askorbik asit'in yokluğunu hızlıca doldurur. Bu antioksidan, α - tokoferol (E vitamini) eksikliği olan sıçanlarda üreme hücrelerinin işlevlerini sürdürebilmek için bulunmuştur.¹⁹⁴

Korpus luteum'da yüksek miktarlarda α -tokoferol bulunduğu ve serbest radikalleri temizleyip, oksidasyonu baskıladığı bilinmektedir.¹⁹⁵ α -Tokoferol'un birikimindeki mekanizma LH ile tetiklenmiş lipoprotein aracılığıyla korpus luteum tarafından arttırılarak gerçekleşir.¹⁹⁶ α -Tokoferol şilomikronlar ve lipoproteinler aracılığıyla kana geçer.¹⁹⁴ Yapılan çalışmalara göre dışarıdan besinlerle alınan α -tokoferol ince bağırsaklardan emilir, şilomikronlarla birleşir ve karaciğere taşınır. Lipoprotein reseptörleri ve lipoprotein lipazlar α -tokoferol'un korpus luteum tarafından biriktirilmesine yardımcı olurlar. Özellikle lipoprotein lipazlar ve hepatik lipazlar damar endotelinin yüzeyinde bağlıdırlar ve evre dokulara α -tokoferol ile kolesterol'un geçişini sağlarlar.^{194,197}

Antioksidan enzim düzeylerinin yenilenmesi α -tokoferol tarafından denetlenmektedir. Halliwell ve arkadaşları α -tokoferol'un invivo ortamda peroksidasyona karşı koruyucu işlev gördüğünü saptamışlardır. α -Tokoferol'un hidrofobik olarak membranda biriktiğini, reaktif oksijen türlerini ve lipid peroksil radikallerinin peroksidasyon zincir tepkimelerini sonlandırdığını belirtmişlerdir.¹⁹⁸

α -Tokoferol ovaryum epitelini ovulasyon nedenli oksidatif DNA hasarından korur ve ovulasyon sonrası aşamada yüzey epitelinin onarımı sırasında uygunsuz çoğalmasını engelleyerek ovaryum kanseri riskini azaltıcı yarar sağlar. Ayrıca α -tokoferol ovaryum dokularında iskemi-reperfüzyon nedeniyle oluşacak hasarları azaltmaktadır.¹⁹⁹ α -Tokoferol'un oksidan yok edici özelliği yanında çeşitli mekanizmalara da katıldığı bilinmektedir (protein kinaz c'nin baskılanması, fosfataz 2A'nın aktivasyonu, diasilgliserol kinaz yolu gibi). Ayrıca endotelial hücrelerden nitrik oksit üretimi ve lökositlerden süperoksit salınımı α -tokoferol tarafından baskılanmaktadır.²⁰⁰

Vierk ve arkadaşları koyunlara östrus döngülerinin 10. gününde luteolitik dozlarda PGF2 α uygulamışlardır. Daha sonra koyunlara sistemik dozlarda α -tokoferol vermişler ve luteal dokularda apoptozisin ve DNA parçalanmasının

azaldığını göstermişlerdir. Bu araştırmacılara göre E vitamini normal ovaryum fizyolojisinin doğal bileşenidir.²⁰¹

Literatürde Siklofosfamid uygulamasının ovaryum üzerine yaptığı olumsuz etkilerin α - tokoferol ile birlikte verilerek azaltılması üzerine histolojik bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda Siklofosfamid ve α - tokoferol'ün birlikte uygulandığı gruba ait TUNEL boyamasında, atretik folliküllerin sayısının azaldığı belirlenmiştir. TUNEL pozitif hücreler özellikle atreziye giden folliküllerde izlenirken, çeşitli gelişim aşamalarındaki diğer folliküllerde gözlenmemiştir. Bu da α - tokoferol'ün apoptozis ve DNA parçalanmasını azalttığına bir kanıtı olarak kabul edilebilir. TUNEL bulgularına koşut olarak kaspaz-3 ve APAF-1 antikoru ile yapılan immünohistokimya boyamaları sonucunda, gelişen follikül aşamalarında tutulum minimum düzeyde iken, atreziye giden bütün folliküllerin granüloza hücrelerinde tutulum gözlenmiştir. Buradan α - tokoferol'ün Siklofosfamid'in ovaryum follikülleri üzerine zararlı etkilerini azalttığı sonucuna varılmıştır.

1940 yılından beri α - tokoferol eksikliğinin üreme bozukluğuna neden olduğu özellikle de implantasyonun gerçekleşmesini etkilediği bilinmektedir. Ancak bunun nedenleri tam olarak açıklanamamıştır.^{14,202} Araştırmacılara göre östrojen ve α - tokoferol arasında etkin biyolojik bir ilişki vardır.²⁰³ α - Tokoferol'den yoksun beslenen farelerin uterus ağırlıklarında belirgin azalma ve serum düzeylerinde de belirgin düşüş saptanmıştır.²⁰⁴

Martin ve Moore'a göre uzun süreli α - tokoferol yokluğunda sıçanların östrus döngüleri bozularak gebe kalmaları engellenmektedir.²⁰⁵ Das ve Chowdhury yaptıkları çalışmada dişi sıçanları α - tokoferol eksik diyet ile 70 gün beslemişler ve ovaryum'da hasarlı folliküler saptamışlardır.²⁰⁴ Bu araştırmacılar uterus ve ovaryum gelişiminin en hassas evresi olduğu için ergenlik öncesi (30 günlük) evredeki sıçanları incelemişler ve α - tokoferol eksikliğinin üreme organlarının gelişimini son derece olumsuz etkilediğini saptamışlardır.²⁰⁴ Benzer

çalışma erkek sıçanlarda da yapılmış ve α -tokoferol eksikliğinin spermatogenezisi etkilerken hormonal dengeyi değiştirmedeği belirlenmiştir.²⁰⁶ Araştırmacılar α -tokoferol işlevinin gonadotropinler üzerindeki etkisinin dişi ve erkek sıçanlarda farklı olmasının nedeninin açıklanamadığını belirtmişlerdir. Ancak dişi sıçanlardaki pozitif ve negatif geri-bildirim sistemlerinin ince bir ayara bağlı olması nedeniyle döngünün kolayca bozulabileceğini vurgulamışlardır. Cooper ve arkadaşlarına göre de erkek ve dişi sıçanların üreme hücreleri α -tokoferol eksikliğinden olumsuz etkilenmektedir. α -Tokoferol eksikliğinden erkek sıçanların özellikle sekonder spermatositleri ve spermatidleri etkilenmektedir.²⁰⁶

Ovaryum'larda luteal gerileme sırasında oluşan oksidatif stres nedeniyle serbest oksijen radikallerinin artması, glutatyon ve α -tokoferol düzeylerini düşürmektedir.²⁰⁷ Glutatyon peroksidaz çeşitli organik hidroperoksidazların indirgenmesini katalizler, glutatyon reduktaz ise oksidize glutatyon'un glutatyon'a indirgenmesini katalizlemektedir.¹⁹⁵ Aten ve arkadaşları yalancı gebelik oluşturulan sıçanlarda korpus luteum gerilemesi süresince ovaryum'daki α -tokoferol ve glutatyon düzeylerini ölçmüşlerdir. Gerileyen luteal hücrelerde α -tokoferol düzeylerinin arttığını, ancak glutatyon düzeylerinin sadece geçici olarak arttığını saptamışlardır.¹⁶⁹ Aten ve arkadaşları sonraki çalışmalarında işlevsel gerileme süresince ovaryumlardaki α -tokoferol düzeyini ölçmüşler ve belirgin olarak arttığını ancak plazma α -tokoferol düzeylerinin değişmediğini belirlemişlerdir.¹⁵

α -Tokoferol düzeylerindeki artış ovaryum'lardaki yaşlanmayı engellemekte ve luteolizis süresince reaktif oksijen türlerinden korumaktadır. Yeh ve arkadaşlarına göre sıçanlarda üreme organlarının yaşlanmasıyla, oksijen radikallerine karşı ovaryum'larda α -tokoferol düzeyleri arttırılmakta, bunun kanıtı olarak da düşük glutatyon reduktaz düzeyleri gösterilmektedir.²⁰⁸ Aten ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada yüksek miktarda luteinizasyon gösteren sıçanların ovaryum'larında α -tokoferol birikiminin arttığı gözlenmiştir. Bu

sıçanların ovaryum ağırlığında ya da korpus luteum boyutunda bir değişiklik izlenmediği vurgulanmıştır.¹⁵

Bizim alışmamızda Siklofosfamid ile 150mg/kg α -tokoferol uygulanan sıçanlarda biyokimyasal olarak GSH düzeyleri askorbik asit uygulanan gruba eşdeş ve kontrol grubuna yakın olarak gözlenmiştir. Bu da Siklofosfamid nedeniyle artmış olan oksidatif stresi indirgeyebilmek amacıyla antioksidan gruplarında GSH'ın arttığını düşündürmektedir.

Selenyum doğada geniş yayılımı olan ancak elde edilmesi sınırlı bir elementtir. Ayrıca çeşitli fizyolojik işlemlerin yürütölmesi için gereklidir. Yokluğunda kanser, kardiyovasküler, nörolojik ve immün hastalıklar ile romatoid artirit görölür.²⁰⁹ Birçok araştırmacı selenyum ile doğurganlık arasındaki bağlantıyı araştırmışlar ve üreme ile ilgi hastalıkların sadece hipofiz ya da cinsiyet hormonlarının normal olmayan salgısından değil, eser elementleri içeren beslenme ile ilgili eksikliklerden kaynaklandığını saptamışlardır.²¹⁰ Bazı araştırmacılara göre testis selenyum için ana hedef organdır ve bu element erkek üreme sisteminde önemli rol oynamaktadır.²¹¹

Selenyum'un üreme sistemi işlevi üzerinde olumlu etkisinin yanı sıra üreme ile ilgili hastalıkları nasıl önlediği ve biyokimyasal mekanizması tam olarak bilinmemektedir.^{212,244} Selenyum'un glutatyon peroksidaz (GSHpx), fosfolipid-hidroperoksit-glutatyon peroksidaz (PH-GSHpx), iyodotironin 59-deiodinize (59-DI) ve selenoprotein-P'nin bileşeni olarak birçok biyokimyasal işlevi tanımlanmıştır.²¹³ Glutatyon peroksidaz'ın hücre içi ve dışı hidroperoksit yoğunluğunu düzenlediği bilinmektedir.²¹³ Fosfolipid-hidroperoksit-glutatyon peroksidaz yağ asidi hidroperoksit esterlerini fosfolipide indirger. Selenoprotein-P plazma serbest radikal temizleyicisi olduğu düşünölmemtedir.²¹⁴

Selenyum eksikliği olan ineklerin üreme sisteminde ovaryum kisti ve ayrılmayan plasenta görülme sıklığının oldukça yüksek olduğu ve selenyum'un koyunlarda üreme bozukluğunu azalttığı bilinmektedir.^{19,20} Ayrıca Paszkowsky ve arkadaşları açıklanamayan infertilitesi olan kadınların folliküler sıvılarında belirgin olarak selenyum azalması saptamışlardır.²¹ Barrington ve arkadaşları ise nedeni bilinmeyen düşüklerin sebebinin selenyum eksikliği olduğunu vurgulamışlardır.²¹²

Yapılan çalışmalarda selenyum eksik çiftlik hayvanlarının bulunduğu farklı ülkelerde çeşitli problemlerle karşılaşılmasıyla birlikte, yiyeceklere selenyum eklenerek uygun çözüme ulaşılmıştır.²¹⁵

Dişilerde üreme yeteneğinin oluşması ve yürütülmesinin büyük bir oranda östrodiol'ün etkisiyle gerçekleştiği bilinmektedir.²¹⁶ Selenyum'un granüloza hücrelerinden E2'nin üretilmesini arttırdığı, ayrıca FSH'n küçük follikül granüloza hücreleri üzerine uyarıcı etkisinin selenyum'un varlığında gerçekleştiği bildirilmektedir.²² Behne ve arkadaşlarına göre erkek sıçanlarda selenyum eksikliği testosteron salınımını baskılamaktadır. Ayrıca selenyum eksikliğinde LH reseptörlerinin salınımının baskılandığı bilinmektedir.²¹⁷ Bu nedenle FSH reseptörlerinin salınımı ve E2 biyosentez yolu selenyum tarafından bazı yollardan etkilenebilir. Selenyum'un etkisi incelendiğinde, ilk inkübasyon süresince etkisizdir, çünkü olasılıkla bu evre selenyum'un biyolojik işlevinden sorumlu selenoproteinlerin biyosentezi için gereklidir.²¹⁸ Başlama evresinden sonra, selenyum etkisi belirgin olmaya başlar, E2 üretiminin artışı tetiklerken NO (nitrik oksit) üretimini baskılar. Ayrıca selenyum, küçük folliküllerden alınan hücrelerde FSH tetikli NO üretimini baskılayarak E2 üretimini artırır. Selenyum'un NO üretimi üzerine baskılayıcı etkisi birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir.²¹⁹ Kang ve arkadaşları sıçan ve tavşanlarda selenyum'un NO sentezini baskılayarak NOS sentezini ve yetisini azalttığını göstermişlerdir.²¹⁹

Kamada and Ikumo in vitro ortamda selenyum'un koyun luteal hücrelerinde hidrojen peroksit'lerin zararlı etkisini azaltarak hücre çoğalmasını arttırdığını bildirmişlerdir.²²⁰ Basini ve arkadaşları selenyum'un küçük folliküllerin granüloza hücrelerinin yaşama ve çoğalma yeteneğini arttırıp, FSH'ın aynı hücreler üzerinde etkinliğini arttırdığını göstermişlerdir.¹⁸ Büyük folliküllerde selenyum'un yeterince etkin olmadığını belirlemişler ve buna farklılaşmış işlevlerin salınımının neden olabileceğini ileri sürmüşlerdir.¹⁸ Kamada ve Ikumo luteal hücrelerde P4 üretimini saptamışlar ancak selenyum'un FSH'lı ya da FSH'sız etkisini gösterememişlerdir.²²⁰ Ancak bu hücrelerde kültür süresince P4'ün üretiminin artmadığını belirlemişlerdir. Bu nedenle luteinizasyonun yokluğunda, selenyum'un yaşlanmayı önleyici etkisinin kanıtlanamayabileceğini ileri sürmüşlerdir.²²⁰

Selenyum'un üreme fonksiyonları üzerine olumlu etkisiyle ilgili bir çok araştırma yapılmasına karşın literatürde kemoterapi uygulaması ile birlikte selenyum kullanılması üzerine bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda selenyum uygulamasının ardından diğer antioksidan uygulanan gruplarla eşdeğer olarak ovaryumun doku genelinde atretik folliküllerin yok denecek kadar az olduğu dikkati çekmiştir. TUNEL pozitif hücreler primordiyal ve tek sıralı primer folliküllerde gözlenmezken, çok katlı primer folliküllerden başlayarak atreziye giden folliküllerin granüloza hücrelerinde belirlendi. Kaspaz-3 ve APAF-1 tutulumunun ise tüm gelişim aşamasındaki folliküllerin oosit sitoplazmasında, granüloza ve teka hücre katmanlarında oldukça az olduğu dikkati çekti. Benzer şekilde atretik folliküllerin granüloza hücrelerinde ve oosit sitoplazmasında da oldukça az düzeyde tutulum gözlemlendi. Yine büyüme faktörlerinden TGF- β_1 , GDF-9 ve PCNA tutulumları primordiyal ve tek sıralı primer follikülde başlayarak çok sıralı ve antrum oluşmaya başlamış sekonder folliküllerin oosit sitoplazmasında ve çekirdeklerinde oldukça yoğun olarak saptandı. Benzer şekilde granüloza ve teka hücrelerinde de kuvvetli immünreaksiyon dikkati çekti. Bu bulgular toksik ajan Siklofosfamid'e karşın selenyum'un ovaryum dokuları üzerine koruyucu etkisini göstermektedir.

VI. SONUÇ

Sonuç olarak çalışmamızda; Siklofosfamid uygulanan grupta, tek sıralı ve çok sıralı primer ile erken ve geç sekonder folliküllerin granüloza hücrelerinde TGF- β_1 tutulumlarının kontrol grubuna karşın orta-zayıf dereceli olarak azaldığı belirlendi. Siklofosfamid grubunda tüm gelişim aşamasındaki folliküllerin oositlerinde GDF-9 tutulumun kontrol grubuna karşın son derece az olduğu gözlemlendi. İmmünreaksiyon küçük folliküllerin oositlerinde az iken, çoğunlukla antrum oluşmuş follikül oositlerinde kuvvetliydi. TGF- β_1 ve GDF-9 ile yapılan her iki boyamada da atretik folliküllerde immünreaksiyon hiç saptanmadı. Siklofosfamid uygulanan grupta PCNA tutulumu gösteren folliküllerin ise kontrol grubuna karşın azaldığı, korpus luteum ve atreziye giden folliküllerin sayısının ise oldukça arttığı izlendi. Sağlıklı folliküllerde oosit tutulumu son derece az gözlenirken, granüloza ve özellikle teka interna katmanlarında kuvvetli tutulum gösteren hücreler belirlendi. Ayrıca atretik folliküllere ait dejenere oositlerin sitoplazmasında immünreaksiyon oldukça kuvvetli gözlemlendi.

Apoptotik sinyaller bakımından Siklofosfamid uygulanan grup ile kontrol grubuna ait ovaryumlar karşılaştırıldığında, Siklofosfamid grubunda atreziye giden Graaf follikül'lerinin sayısında kontrole karşın artış ve bu atretik folliküllerin granüloza katmanında çok sayıda TUNEL pozitif hücre saptandı. Ayrıca çok katlı primer, sekonder ve Graaf follikül'lerde çok sayıda TUNEL pozitif hücrenin varlığı gözlemlendi. Bazı atretik folliküllerin oositlerinde ve granüloza hücrelerinde kuvvetli tutulum saptandı. Çalışmamızda ayrıca Siklofosfamid uygulanan gruba ait ovaryum örneklerinde tüm gelişim aşamalarındaki folliküllerin granüloza hücre sitoplazmalarında yoğun kaspaz-3 ve APAF-1 tutulumu belirlendi. Atretik ve Graaf follikül'lerinin granüloza hücrelerinde ve oosit sitoplazmasında kuvvetli, korpus luteumda ise artan immünreaksiyon gözlemlendi.

Çalışmamızda Siklofosfamid ve askorbik asit birlikte uygulanan grubun ovaryum dokularında, sağlıklı folliküllerdeki TGF- β_1 , GDF-9 ve PCNA

tutulumlarının kontrol grubuna eşdeğer olması bu antioksidanın toksik ajana etkin kalan folliküller üzerindeki koruyucu etkisini gösterdi. Ayrıca askorbik asit uygulanan grupta sağlıklı follikül sayılarının atretik folliküllere karşın oldukça artmış olduğu gözlemlendi. Tek katlı primer folliküllerde TUNEL pozitif hücreler gözlenmezken, çok katlı primer folliküllerde orta dereceli olduğu belirlendi. Atreziye gidecek Graaf folliküllerde ise TUNEL pozitif hücrelerin sayısının arttığı dikkati çekti. Bu da askorbik asit'in, kemoterapotik ajanın neden olduğu apoptotik etkiyi azalttığını düşündürdü. TUNEL bulgularına koşut olarak kaspaz-3 ve APAF-1 tutulumlarının Siklofosfamid ve askorbik asit uygulanan grupta kontrole yakın olduğu belirlendi.

Çalışmamızda Siklofosfamid ve α -tokoferol'ün birlikte uygulandığı gruba ait TUNEL boyamasında, atretik folliküllerin sayısının azaldığı belirlendi. TUNEL pozitif hücreler özellikle atreziye giden folliküllerde izlenirken, çeşitli gelişim aşamalarındaki diğer folliküllerde gözlenmedi. Bu da α -tokoferol'ün apoptozis ve DNA parçalanmasını azaltabileceğini düşündürdü. TUNEL bulgularına koşut olarak kaspaz-3 ve APAF-1 antikoru ile yapılan immünohistokimya boyamaları sonucunda, gelişen follikül basamaklarında tutulum en az düzeyde iken, atreziye giden bütün folliküllerin granüloza hücrelerinde tutulum gözlemlendi. Büyüme faktörlerinden TGF- β_1 , GDF-9 ve PCNA tutulumu primordiyal ve tek sıralı primer follikülden başlayarak çok sıralı ve antrum oluşmaya başlamış sekonder folliküllerde oldukça yoğun olarak saptandı.

Çalışmamızda selenyum uygulamasının, diğer antioksidan uygulanan gruplarla eşdeğer olarak ovaryumun doku genelinde atretik follikülleri yok denecek kadar azalttığı gözlemlendi. TUNEL pozitif hücreler primordiyal ve tek sıralı primer folliküllerde gözlenmezken, çok katlı primer folliküllerden başlayarak atreziye giden folliküllerin granüloza hücrelerinde belirlendi. Kaspaz-3 ve APAF-1 tutulumunun ise tüm gelişim aşamasındaki folliküllerin granüloza ve teka hücre katmanlarında oldukça az olduğu dikkati çekti. Benzer şekilde atretik folliküllerin granüloza hücrelerinde ve oosit sitoplazmasında da minimal düzeyde tutulum

izlendi. Yine büyüme faktörlerinden TGF- β_1 , GDF-9 ve PCNA tutulumları primordiyal ve tek sıralı primer follikülден başlayarak çok sıralı ve antrum oluşmaya başlamış sekonder folliküllerde oldukça yoğun olarak saptandı. Bu bulgular toksik ajan Siklofosfamid'e karşı selenyum'un ovaryum dokuları üzerine koruyucu etkisi olabileceğini kanıtladı.

Çalışmamızın elektron mikroskopik incelemelerinde Siklofosfamid uygulanmış ovaryum dokuları kontrol grubuyla kıyaslandığında özellikle çok sıralı primer folliküllerde yoğun dejeneratif değişiklikler saptandı. Oosit yapısını korumuş iken zona pellusida yoğunluğunun kontrol grubuna karşın azaldığı ve granüloza hücre katmanının oldukça dejeneratif görünüm sergilediği belirlendi. Koyu granüloza hücrelerinde apoptozise giden hücre görünümü izlenirken, açık hücrelerin sitoplazmasında vakuolizasyonun, geniş ve boş alanların arttığı izlendi. Antioksidan uygulanan 3 grupta da eşdeğer olarak ovaryumda oosit ve zona pellusida yapısının korunduğu gözlemlendi. Granüloza hücrelerindeki dejenerasyonun kısmen engellendiği ve koyu renk sitoplazmalı hücrelerin son derece azaldığı saptandı. Açık renk sitoplazmalı hücrelerde ise vakuolizasyonun Siklofosfamid uygulanan gruba göre nispeten az olduğu belirlendi.

Çalışmamızda grupların glutatyon (GSH) düzeyleri değerlendirildiğinde, Siklofosfamid uygulanan grupta GSH düzeyinin kontrol grubuna karşın belirgin olarak azaldığı saptandı. Bu azalmanın Siklofosfamid uygulanan grupta folliküler apoptozis ve atrezinin artmasına koşut olarak gerçekleştiği kanısına varıldı. Askorbik asit ve α -tokoferol uygulanan grupta GSH değerleri kontrol grubuna yakın düzeyde seyrederken, selenyum uygulamasında diğer iki antioksidan uygulanan gruba göre GSH düzeyinin daha az artış gösterdiği belirlendi.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara göre, kemoterapi tedavisi sırasında antioksidan alımının oluşabilecek serbest radikalleri en az düzeye indirerek, normal ovaryum dokusundaki gelişmekte olan follikülleri toksik etkiden koruyabileceği sonucuna varıldı.

VII. ÖZET

Kanser tedavi yöntemlerinden biri olan kemoterapi, ovaryum follikül havuzundaki gelişmekte olan folliküllerin sayısını azaltıcı etki göstererek, ovaryum yetmezliği ve kısırlığa neden olmaktadır. Kanser tedavilerinde kemoterapotik olarak sıklıkla kullanılan ajanlardan biri olan Siklofosfamid, DNA çapraz bağlarını etkileyerek hızla çoğalan hücrelerde bölünmeyi engeller. Uzun dönem kanser tedavisi kullanımlarında üreme organlarına toksik etki ederek döllenmenin bozulmasına neden olur. Kemoterapinin ovaryum işlevleri üzerindeki yan etkilerinin azaltılması için yeni yöntemler ve alternatif tedaviler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Özellikle tedavi sırasında yararlanılan ve bitkisel gıdalarda bulunan antioksidanlar kanser riskinin ve kemoterapiden sonra gelişen travmanın azaltılmasında son derece etkili olan maddelerdir.

Çalışmamızda kemoterapotik ajan Siklofosfamid'in normal ovaryum dokusunda olaylandırdığı dejeneratif etkiler üzerine askorbik asit, α -tokoferol ve selenyum'un olası antioksidan etkilerini immünohistokimyasal ve elektron mikroskopik düzeyde değerlendirmeyi amaçladık. Bu nedenle yaşam ve gelişim sinyal moleküllerinden TGF- β_1 , GDF-9, PCNA, apoptozis sinyal moleküllerinden kaspaz-3, APAF-1 primer antikorumları ve hücrelerdeki DNA hasarını belirlemek için TUNEL yöntemi kullandık.

Siklofosfamid uygulamasından sonra ovaryum dokusunda tüm gelişim aşamasındaki folliküllerin granüloza hücrelerinde TGF- β_1 , PCNA, oositlerde ise GDF-9 tutulumlarının kontrol grubuna karşı oldukça azaldığı ve kaspaz-3, APAF-1 tutulumlarının ise belirgin olarak arttığı belirlendi. Ayrıca TUNEL yöntemi ile bu grupta atretik folliküllerin sayısının arttığı ve bazı Graaf folliküllerde DNA hasarı olan hücrelerin kontrol grubuna göre kuvvetli tutulum gösterdiği saptandı. Siklofosfamid ile birlikte antioksidan uygulanan grupların gelişmekte olan folliküllerinde ise TGF- β_1 , PCNA, oositte ise GDF-9 immünreaksiyonun kontrol grubuna yakın olarak arttığı, kaspaz-3, APAF-1,

TUNEL tutulumlarının belirgin olarak azaldığı ve doku genelinde atretik folliküllerin sayısının anlamlı derecede azaldığı saptandı.

Elektron mikroskopik bulgularımız da immünohistokimyasal bulgularımızla eşdeğer olarak; Siklofosfamid uygulanmış ovaryum dokularında özellikle çok sıralı primer folliküllerin granüloza hücrelerinde kontrol grubuna karşın yoğun dejeneratif değişiklikler saptandı. Koyu granüloza hücrelerinde apoptozise giden hücre görünümü izlenirken, açık hücrelerin sitoplazmasında vakuolizasyonun arttığı izlendi. Antioksidan uygulanan 3 grupta ise ovaryumun oosit ve zona pellusida yapısının korunduğu gözlemlendi. Granüloza hücrelerindeki dejenerasyonun kısmen engellendiği ve koyu renk sitoplazmalı hücrelerin son derece azaldığı saptandı. Açık renk sitoplazmalı hücrelerde ise vakuolizasyonun Siklofosfamid uygulanan gruba göre kısmen azaldığı belirlendi.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara göre, kemoterapi tedavisi sırasında normal ovaryum dokusunda oluşan serbest radikallerin neden olduğu dejeneratif etkilerin antioksidanlar ile en az düzeye indirilerek baskılanabileceği ve toksik etkilerden korunabileceği sonucuna varıldı.

VIII. SUMMARY

Chemotherapy -one of the treatments of cancer- causes ovarian failure and infertility by decreasing the number of follicles at the ovarian follicular reserve. One of the most common chemotherapeutic agents that is used in cancer treatment is cyclophosphamide; that prevents cell proliferation in rapidly proliferating cells by affecting DNA cross-boundings. Again cyclophosphamide has toxic effects on female reproductive organs and causes fertilization failure in long term cancer therapy. Researches are still being made in both new methods and alternative treatments in reducing the side effects of chemotherapy on ovarian function. Antioxidants, that are especially taken by the time of treatment and found in the vegetables, are highly efficient in both reducing the risk of cancer and post chemotherapeutic trauma.

In our study, we aimed to immunohistochemically and electron microscopically evaluate the possible antioxidant effects of ascorbic acid, α -Tocopherol and selenium, on the degenerative effects of cyclophosphamide on normal ovarian tissue. To this end we used TGF- β_1 , GDF-9, PCNA as developmental signal molecules; Caspase-3, APAF-1 as apoptotic signal molecules. TUNEL method is used in order to evaluate the DNA damage caused at the cell level.

Following cyclophosphamide application, we observed a decrease in TGF- β_1 , PCNA immunoreaction in the granulosa cells of developing follicles and a decrease in GDF-9 immunoreaction in oocytes and a distinctive increase in caspase-3 and APAF-1 immunoreaction when compared to control group. Besides an increase in atretic follicles and in some Graaf follicles's cells with DNA damage had showed a strong immunopositive reaction when compared to control group in TUNEL analysis. TGF- β_1 and PCNA immunoreactivity of developing follicles and GDF-9 immunoreaction of oocytes was similar to the control group whereas Caspase-3 and APAF-1 immunoreaction in TUNEL

analysis showed a distinctive decrease in both cyclophosphamide and antioxidant treated group. Again in the same group the number of atretic follicles have found out to decrease significantly.

Following electron microscopical examinations, we have observed intense degenerative changes in the multi layer primary follicles's granulosa cells in cyclophosphamide treated group, which is an alike finding with immunohistochemical part of the study. Dark granulosa cells showed a head for apoptosis whereas an increase in vacuolisation was observed in the cytoplasm of pale granulosa cells. In all of the three antioxidant treated groups, both ovaries and zona pellucida of the oocytes remained the same. Degeneration at the granulosa cells was moderately inhibited and there was quite a few decrease in the number of cells with dark cytoplasm. When it comes to the cells with pale cytoplasm; it was found that vacuolisation was partially decreased when compared to the cyclophosphamide treated group.

According to our observations, we have concluded that, degenerative changes at the ovaries caused by the free radicals during the chemotherapy treatment can be repressed or degraded to minimum by the help of antioxidants and may maintain a protection from the toxic side effects at the same time.

IX. KAYNAKLAR

1. Howell S, Shalet S. Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 1998; 27: 927–943.
2. Yucebilgin MS, Terek MC, Ozsaran A, Akercan F, Zekioglu O, Isik E, Erhan Y. Effect of chemotherapy on primordial follicular reserve of rat: an animal model of premature ovarian failure and infertility. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol* 2004; 44:6–9.
3. Meirow D. Ovarian injury and modern options to persevere fertility in female cancer patients treated with high dose radio-chemotherapy for hematological neoplasias and other cancers. *Leuk Lymphoma* 1999; 33:65-76.
4. Apperley JF, Reddy N. Mechanism and management of treatment-related gonadal failure in recipients of high dose chemoradiotherapy. *Blood Rev.* 1995; 9:93-116.
5. Brown JR, Modell E, Obasaju M, King YK. Natural cycle in-vitro fertilization with embryo cryopreservation prior to chemotherapy for carcinoma of the breast. *Hum Reprod.* 1996;11:197-199.
6. Meirow D, Epstein M, Lewis H, Nugent D, Gosden RG. Administration of cyclophosphamide at different stages of follicular maturation in mice: effects on reproductive performance and fetal malformations. *Hum Reprod.* 2001;16:632-637.
7. Oh MS, Chang MS, Park W, Kim do R, Bae H, Huh Y, Park SK. Yukmijihwang-tang protects against cyclophosphamide-induced reproductive toxicity. *Reprod Toxicol.* 2007;24:365-370.
8. Dirven H, Van Ommen B, Van Bladeren PJ. Involvement of human glutathione S-transferase isoenzymes in the conjugation of cyclophosphamide metabolites with glutathione. *Cancer Res.* 1994;54:6215-6220.
9. Shekelle P, Hardy ML, Coulter I, Udani J, Spar M, Oda K, Jungvig LK, Tu W,

- Suttorp MJ, Valentine D, Ramirez L, Shanman R, Newberry SJ. Effect of the supplemental use of antioxidants vitamin C, vitamin E, and coenzyme Q10 for the prevention and treatment of cancer. *Evid Rep Techno Assess*. 2003;75:1-3.
10. Murray AA, Molinek MD, Baker SJ, Kojima FN, Smith MF, Hillier SG, Spears N. Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles in vitro. *Reproduction*. 2001;121:89-96.
 11. Takami M, Preston SL, Toyloy VA, Behrman HR. Antioxidants reversibly inhibit the spontaneous resumption of meiosis. *Am J Physiol*. 1999;276:684-688.
 12. Thomas FH, Leask R, Srsen V, Riley SC, Spears N, Telfer EE. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. *Reproduction*. 2001; 3:487-495.
 13. Koizumi M, Nishimura T, Kagiya T. Clinical trial of adverse effect inhibition with glucosides of vitamin C and vitamin E in radiotherapy and chemotherapy. *J Cancer Res Ther*. 2005; 4:239.
 14. Evans HM, Bishop KS: On the existence of a hitherto unrecognized dictatory factor essential for reproduction. *Science* 1922; 56: 650–651,
 15. Aten RF, Kolodecik TR, Behrman HR. Ovarian vitamin E accumulation: evidence for a role of lipoproteins. *Endocrinology*. 1994;135:533-539.
 16. Duleba AJ, Foyouzi N, Karaca M, Pehlivan T, Kwintkiewicz J, Behrman HR. Proliferation of ovarian theca-interstitial cells is modulated by antioxidants and oxidative stress. *Hum Reprod*. 2004;19:1519-1524.
 17. Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9:775-806.
 18. Basini G, Tamanini C. Selenium stimulates estradiol production in bovine granulosa cells: possible involvement of nitric oxide. *Domest Anim Endocrinol*. 2000;18:1-17.
 19. Harrison JH, Hancock DD, Conrad HR. Vitamin E and selenium for reproduction of the dairy cow. *J Dairy Sci* 1984;67:123–132.

20. Hartley WJ. Selenium and ewe fertility. *Proc New Zealand Soc Anim Reprod* 1963; 23:20–27.
21. Paszkowski T, Traub AI, Robinson SY, McMaster D. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin Chem Acta* 1995;236:173–180.
22. Euybov IZ, Shirinov NM, Rzaev RI. Effect of selenium on reproductive organs and fertility of animals. *Trud Azerbaiz Nauch Inst Vet* 1983;28:103–5.
23. Pangas SA, Matzuk MM: Genetic models for transforming growth factor beta superfamily signaling in ovarian follicle development. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 225:83-91.
24. Chegini N, Flanders KC. Presence of transforming growth factor-beta and their selective cellular localization in human ovarian tissue of various reproductive stages. *Endocrinology* 1992; 130:1707–1715.
25. McGrath SA, Esquela AF, Lee SJ. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol* 1995;9:131–136.
26. Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 1981;124: 43-101
27. Tilly, JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh AJW. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 1991;129, 2799–2801.
28. Ojala M, Erkkila K, Tuuri T, Sjoberg J, Suomalainen L, Suikkari AM, Pentikainen V, Dunkel L. Cell death and its suppression in human ovarian tissue culture. *Mol Hum Reprod*, 2002; 8: 228-236.
29. Hsu SY, Hsueh AJ. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm. *Physiol Rev.* 2000;80:593-614.
30. Robles R, Tao XJ, Trbovich AM, Maravel DV, Nahum R, Perez GI, Tilly KI, Tilly JL. Localization, regulation and possible consequences of apoptotic protease-activating factor-1 (APAF-1) expression in granulosa cells of the Mouse ovary. *Endocrinology.* 1999;140:2641-2644.
31. Sadler T W. *Medikal Embriyoloji (Türkçe Çeviri) 7. Baskı.* Palme Yayıncılık. Ankara. 1996. S:328-340.

32. Moore KL, Persaud T V N. İnsan Embriyolojisi (Türkçe Çeviri) 6. Baskı 2002 S:325-345.
33. Gardner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. Saunders 2001. S:461-72.
34. Ross M H, Kaye G I, Pawlina W. Histology a Text and Atlas. Lippincott Williams&Wilkins 2003. S:727-742.
35. Arıncı K, Elhan A. Anatomi 1.Cilt. Güneş Kitabevi Lmt. Ankara 2001. S:337-345.
36. Strandring S. Gray's Anatomy. Churchill Livingstone 2004. S:1321-1326.
37. Erdoğan D, Hatipoğlu M T, Görgün M, Ilgaz C. Özel Histoloji. Hatipoğlu 2007. S:175-181.
38. Junqueira, Carneiro J. Temel Histoloji (Türkçe Çeviri). Nobel 2006 S:449-458
39. Kierszenbaum A L. Histoloji ve Hücre Biyolojisi (Türkçe Çeviri). Palme Yayıncılık 2006 S:565-576.
40. Guyton A C, Hall J E. Text Book of Medical Physiology, International Edition, W.B. Saunders 2006 S: 906-1026.
41. Ganong W F. Tıbbi Fizyoloji Nobel Tıp Kitabevleri, 20.baskı 2002 S:419-433.
42. Markström E, Svensson ECh, Shao R, Svanberg B, Billig H. Survival factors regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation. Reproduction. 2002; 123: 23-30.
43. Knight P G, Glister C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. Reproduction. 2006; 132:191-206.
44. Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. Reproduction. 2001;122:829-838.
45. Orisaka M, Orisaka S, Jiang JY, Craig J, Wang Y, Kotsuji F, Tsang BK. Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. Mol Endocrinol. 2006;20:2456-2468.
46. Tománek M, Chronowska E. Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the pig ovary. Folia Histochem Cytobiol. 2006; 44: 269-274.
47. Oktay K, Schenken RS, Nelson JF. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. Biol Reprod. 1995; 53:295-301.

48. Tilly JL. Apoptosis and ovarian function. *Rev Reprod.* 1996;1:162-72.
49. Amsterdam A, Sasson R, Keren-Tal I, Aharoni D, Dantes A, Rimón E, Land A, Cohen T, Dor Y, Hirsh L. Alternative pathways of ovarian apoptosis: death for life. *Biochem Pharmacol.* 2003;66:1355-1362.
50. Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Update.* 2005;11:162-177.
51. Peluffo MC, Busman L, Stouffer RL, Tesone M. Expression of caspase-2,-3,-8 and -9 proteins and enzyme activity in the corpus luteum of the rat at different stages during the natural estrous cycle. *Reproduction.* 2006;132:465-475.
52. Feranil J, Isobe N, Nakao T. Apoptosis in the antral follicles of swamp buffalo and cattle ovary: TUNEL and caspase-3 histochemistry. *Reprod Domest Anim.* 2005;40:111-116.
53. Harrison's Principles of Internal Medicine. 14.th. Ed Chapter 86. Principles of cancer therapy. S: 523-536.
54. Chu E, DeVita VT. Principles of cancer management: Chemotherapy. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA; eds. *Cancer: Principles and Practice of Oncology.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001;25-39
55. Perry MC. *The Chemotherapy Source Book.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001;128-137.
56. Lopez SG, Luderer U. Effects of cyclophosphamide and buthionine sulfoximine on ovarian glutathione and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 2004; 36:1366-1377.
57. Tsai-Turton M, Luong BT, Tan Y, Luderer U. Cyclophosphamide-induced apoptosis in COV434 human granulosa cells involves oxidative stress and glutathione depletion. *Toxicol Sci.* 2007;98:216-230
58. Bast A, Haenen GRM, Doelman CJA. Oxidants and Antioxidants. State of the Art. *Am J Med* 1991;91:2-13.
59. Zee JVD, Dubbelman TMAR, Steveninck JV. Peroxide-induced Membrane Damage in Human Erythrocyte. *Biochim Biophys Acta* 1985; 818: 38-44.
60. Gutteridge JMC. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819-1828.

61. Sies H. Oxidative stress: From Basic Research to Clinical Application. *Am J Med* 1991; 91: 31-38.
62. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 1999; 31: 261-272.
63. Meister A. Glutathione Metabolism. *Methods Enzymol* 1995; 251: 3-7.
64. Meister A. Methods for selective modification of Glutathione Metabolism and Study of Glutathione Transport. *Methods Enzymol.* 1985 ; 113: 571-585.
65. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408 : 239-247.
66. Matill HA. Antioxidants. *Annu Rev Biochem* 1947; 16: 177-192.
67. Rajakumar K. Infantile scurvy: a historical perspective. *Pediatrics.* 2001;1084:70-76.
68. Funk C. The effect of a diet of polished rice on the nitrogen and phosphorus of the brain. *J Physiol.* 1912;44:50-53.
69. Harden A, Zilva SS. The Antiscorbutic Factor in Lemon Juice. *Biochem J.* 1918;12:259-269.
70. Drummond JC. The Nomenclature of the so-called Accessory Food Factors (Vitamins). *Biochem J.* 1920;14:660.
71. Linster CL, Van Schaftingen E. Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS J.* 2007;274:1-22.
72. Bsoul SA, Terezhalmay GT. Vitamin C in health and disease. *J Contemp Dent Pract.* 2004;5:1-13. Review.
73. Sies H, Stahl W, Sundquist AR. Antioxidant Functions of Vitamins. *Annals New york Academy of Sciences* 1992 ; 669: 7-21.
74. Sharma MK, Buettner GR. Interaction of Vitamin C and Vitamin E During Free Radical Stress in Plasma: An ESR Study. *Free Radic Biol & Med* 1993; 14: 649-653.
75. Brownlee NR, Huttner JJ, Panganamala RV, Cornwell DG. Role of Vitamin E in Glutathione-induced Oxidant Stress: Methemoglobin, lipid peroxidation and hemolysis. *J Lipid Res* 1977; 18: 635-644.

76. Helzlsouer K, Huang H, Alberg A, Hoffman S, Burke A, Norkus E, Morris J, Comstock G. Association between alpha-tocopherol, gamma-tocopherol, selenium and subsequent prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000;24:2018-23.
77. Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet* 2000;356: 233–241.
78. Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, Flohe L. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* 1999;285:1393–1396.
79. Whanger PD. Selenium and the brain: a review. *Nutr Neurosci* 2001;4:81–97.
80. Rikiishi H. Apoptotic cellular events for selenium compounds involved in cancer prevention. *J Bioenerg Biomembr.* 2007;39:91-98.
81. Rayman MP. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proc Nutr Soc.* 2005;64:527-542.
82. Calvo A, Xiao N, Kang J, Best CJ, Leiva I, Emmert-Buck MR, Jorcyk C, Green JE. Alterations in gene expression profiles during prostate cancer progression: functional correlations to tumorigenicity and down-regulation of selenoprotein-P in Mouse and human tumors. *Cancer Res* 2002;62:5325–35.
83. Harrison et al The impact of cancer on key relatives. *European journal of Cancer*, 1995;31:1736-1740.
84. Cleton, F.J. *Cancer Therapy. Odyssey*, 1995;1: 18-19.
85. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000; 21:200–214.
86. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev.* 1996;17:121–155.
87. Johnson AL Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. *Anim Reprod Sci* 2003;78:185–201.
88. Salustri A, Fulop C, Camaioni A, Hascall VC Oocyte-granulosa cell interreaction. In: Leung PKC, Adashi EY, eds. *The ovary*. 2nd ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2004; 131–143
89. Massague´ J, Cheifetz S, Laiho M, Ralph DA, Weis FM, Zentella A. Transforming growth factor-beta. *Cancer Surv* 1992;12:81–103.

90. Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J Cell Biol* 1992;119:1017–1021.
91. Ruegsegger Veit C, Assoian RK. Identification of transforming growth factor-b in human ovarian follicular fluid. *Endocrinology* 1988;122:1227.
92. Schmid P, Cox D, van der Putten H, McMaster GK. Expression of TGF-beta s and TGF-beta type II receptor mRNAs in mouse folliculogenesis: Stored maternal TGF-beta message in oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;201:649–656.
93. May JV, Frost JP, Schomberg DW. Differential effects of epidermal growth factor, somatomedin-C/insulin-like growth factor I, and transforming growth factor b on porcine granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and proliferation. *Endocrinology* 1988;100: 1108–1120.
94. Roy SK, Ogren C, Roy C, Lu B. Cell-type-specific localization of transforming growth factor-beta 2 and transforming growthfactor-beta 1 in the hamster ovary: Differential regulation by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Biol Reprod* 1992;46:595–606.
95. Levacher C, Gautier C, Saez JM, Habert R. Immunohistochemical localization of transforming growth factor beta 1 and beta 2 in the fetal and neonatal rat ovary. *Differentiation* 1996;61:45–51.
96. Christopher B. Immunolocalization of transforming growth factor-beta1 during follicular development and atresia in the Mouse ovary. *Endocr J*. 2000;47:475–480.
97. Ghiglieri C, Khatchadourian C, Tabone E, Hendrick JC, Benahmed M, Menezo Y. Immunolocalization of transforming growth factorbeta 1 and transforming growth factor-beta 2 in the mouse ovary during gonadotrophin-induced follicular maturation. *Hum Reprod*. 1995;10:2115–2119.
98. Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol* 1999;13:1035–1048.
99. Vitt UA, Hayashi M, Klein C, Hsueh AJ Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-

induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol Reprod* 2000;62:370–377.

100. Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996;383:531–535.
101. Wang Y, Rippstein PU, Tsang BK. Role and gonadotrophic regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein expression during rat ovarian follicular development in vitro. *Biol Reprod* 2003;68:610–619.
102. Hreinsson JG, Scott JE, Rasmussen C, Swahn ML, Hsueh AJW, Hovatta O. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:316–321.
103. Sendai Y, Itoh T, Yamashita S, Hoshi H. Molecular cloning of a cDNA encoding a bovine growth differentiation factor-9 (GDF-9) and expression of GDF-9 in bovine ovarian oocytes and in vitro-produced embryos. *Cloning* 2001;3: 3–10.
104. Prochazka R, Nemcova L, Nagyova E, Kanka J. Expression of growth differentiation factor 9 messenger RNA in porcine growing and preovulatory ovarian follicles. *Biology of Reproduction* 2004;71:1290–1295.
105. Nilsson EE, Skinner MK. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. *Biol Reprod* 2002; 67:1018–1024.
106. Wang J, Roy SK. Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster: modulation by follicle stimulating hormone. *Biol Reprod* 2004;70:577–585.
107. Elvin JA, Yan C, Matzuk MM. Oocyte-expressed TGF- β superfamily members in female fertility. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 159:1–5.
108. Britt KL, Sauders PK, McPherson SJ, Misso ML, Simpson ER and Findlay JK. Estrogen actions on follicle formation and early follicle development. *Biol Reprod* 2004; 71: 1712-1723.

109. Bravo R, McDonald-Bravo H. Existence of two populations of cyclin proliferating cell nuclear antigen during the cell-cycle-association with DNA-replication sites. *J Cell Biol* 1987;105: 1549-1554.
110. Xiong Y, Zhang H, Beach D. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 1992; 71:505-514.
111. Peters H, Byskov AG, Grinsted J. Follicular growth in fetal and prepubertal ovaries of humans and other primates. *Clin.Endoc.&Metab.*1978;7:469-483.
112. Ashcroft GS, Horan MA, Ferguson MW. The effects of aging on cutaneous wound healing in mammals. *J Anat* 1995; 187:1–26.
113. Wandji SA, Sršeò V, Voss AK, Eppig JJ, Fortune JE. Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. *Biol Reprod* 1996; 55: 942-948.
114. Bakken AH, McClanahan M. Patterns of RNA synthesis in early meiotic prophase oocytes from fetal mouse ovaries. *Chromosoma* 1978; 67:21-40.
115. Liu Y, Marraccino RL, Keng PC. Requirement for proliferating cell nuclear antigen expression during stages of the Chinese hamster ovary cell cycle. *Biochemistry* 1989; 28:2967-2974.
116. Kitagawa T, Suganuma N, Nawa A, Kikkawa F, Tanaka M, Ozawa T, Tomoda Y. Rapid accumulation of deleted mitochondrial deoxyribonucleic acid in postmenopausal ovaries. *Biol Reprod* 1993; 49:730-736.
117. Jaskulski D, Gatti C, Travali S, Calabretta B, Baserga R. Regulation of the proliferating cell nuclear antigen cyclin and thymidine kinase mRNA levels by growth factors. *J Biol Chem* 1988; 263:10175-10179.
118. Tomanek M, Chronowska E. Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the pig ovary *Folia Histochemica Et Cytobiologica* 2006;44: 269-274.
119. Feranil JB, Isobe N, Nakao T. Cell proliferation in the atretic follicles of buffalo and cattle ovary. *Reprod Domest Anim* 2004; 39: 405-409.
120. Wandji SA, Sršeò V, Nathanielsz PW, Eppig JJ, Fortune JE. Initiation of growth of baboon primordial follicles. *Hum Reprod* 1997;12: 1993-2001.

121. Gittens JEI, Barr KJ, Vanderhyden BC, Kidder GM. Interplay between paracrine signaling and gap junctional communication in ovarian follicle. *J Cell Sci* 2005;118: 113-122.
122. Abir R, Orvieto R, Dicker D, Zukerman Z, Barnett M, Fisch B. Preliminary studies on apoptosis in human fetal ovaries. *Fertil Steril*. 2002; 78: 259-264.
123. Berardinelli P, Russo V, Martelli A, Nardinocchi D, Di Giacinto O, Barboni B. Colocalization of DNA fragmentation and caspase-3 activation during atresia in pig antral follicles. *Anat Histol Embryol* 2004;33:23–27.
124. Isobe N, Yoshimura Y. Localization of apoptotic cells in the cystic ovarian follicles of cows: a DNA-end labeling histochemical study. *Theriogenology* 2000; 53, 897–904.
125. Boone DL, Tsang BK. Caspase-3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression. *Biology of Reproduction* 1998; 58:1533–1539.
126. Slot K, Voorendt M, Boer-Brouwer M, Vugt H, Teerds K. Estrous cycle dependent changes in expression and distribution of Fas, Fas ligand, Bcl-2, Bax, and pro- and active caspase-3 in the rat ovary. *Journal of Endocrinology* 2006;188:179–192.
127. Jiang JY, Macchiarelli G, Tsang BK, Sato E. Capillary angiogenesis and degeneration in bovine ovarian antral follicles. *Reproduction* 2003;125, 211–223.
128. Berardinelli P, Martelli A, Russo V, Nardinocchi D, Turriani M, Barboni B, Mattioli M, Scapolo PA, Clavenzani P. Correlation between VEGF production and blood vessels density in steroidogenic activated pig antral follicles. *Ital J Anat Embryol* 2002; 107, 115–126.
129. Vaskivuo TE, Anttonen M, Herva R, Billig H, Dorland M, Te Velde ER, Stenback H, Heikinheimo M, Tapanainen JS. Survival of human ovarian follicles from fetal to adult life: apoptosis, apoptosis-related proteins, and transcription factor GATA-4. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3421–3429.
130. Quirk SM, Cowan RG, Joshi SG, Henrikson KP. Fas antigen-mediated apoptosis in human granulosa/luteal cells. *Biol Reprod*. 1995;52:279-287.

131. Makrigiannakis A, Coukos G, Christofidou-Solomidou M, Gour BJ, Radice GL, Blaschuk O and Coutifaris C. N-cadherin-mediated human granulosa cell adhesion prevents apoptosis: a role in follicular atresia and luteolysis? *Am J Pathol* 1999;154:1391–1406.
132. Glamoclija V, Vilovic K, Saraga-Babic M, Baranovic A, Sapunar D. Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells. *Fertil Steril* 2005;83:426–431.
133. Wu J, Zhang L, Wang X. Maturation and apoptosis of human oocytes in vitro are age-related. *Fertil. Steril* 2000;74:1137-1141.
134. Morita Y, Perez GI, Paris F. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1 phosphate therapy. *Nat. Med.* 2000;6:1109-1114.
135. Depalo R, Nappi L, Loverro G, Bettocchi S, Caruso ML, Valentini AM, Selvaggi L. Evidence of apoptosis in human primordial and primary follicles. *Hum Reprod.* 2003;18:2678-82.
136. D'haeseleer M, Cocquyt G, Van Cruchten S, Simoens P, Van den Broeck W. Cell-specific localisation of apoptosis in the bovine ovary at different stages of the oestrous cycle. *Theriogenology.* 2006;65:757-772..
137. Durlinger ALL, Kramer P, Karels B, Grootegeed JA, Uilenbroek J Th J, Themmen APN Apoptotic and proliferative changes during induced atresia of pre-ovulatory follicles in the rat. *Hum Reprod* 2000;15:2504-2511.
138. Peluso JJ. Progesterone as a regulator of granulosa cell viability. *J Steroid Biochem* 2003;85:167–173.
139. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312–1317.
140. Krajewska MH, Wang G, Krajewski S, Zapata JM, Shabaik A, Gascoyne R, Reed JC. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res.* 1997;57:1605–1613.
141. Matikainen T, Perez GI, Zheng TS, Kluzak TR, Rueda BR, Flavell RA, Tilly JL. Caspase-3 gene knockout defines cell lineage specificity for

- programmed cell death signaling in the ovary. *Endocrinology* 2001;142:2468–2480.
142. Johnson AL, Bridgham JT. Caspase-mediated apoptosis in the vertebrate ovary. *Reproduction* 2002;124:19–27.
 143. Fenwick MA, Hurst PR. Immunohistochemical localization of active caspase-3 in the mouse ovary: growth and atresia of small follicles. *Reproduction* 2002;124:659–665.
 144. Wolf BB, Schuler M, Li W, Eggers-Sedlet B, Lee W, Tailor P, Fitzgerald P, Mills GB, Green DR. Defective cytochrome c-dependent caspase activation in ovarian cancer cell lines due to diminished or absent apoptotic protease activating factor-1 activity. *J Biol Chem.* 2001;276:34244–34251.
 145. Evans AC, Ireland JL, Winn ME, Lonergan P, Smith GW, Coussens PM, Ireland JJ. Identification of genes involved in apoptosis and dominant follicle development during follicular waves in cattle. *Biol Reprod.* 2004;70:1475–1484.
 146. Tilly JL, Tilly KI, Kenton ML, Johnson AL. Expression of members of the bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-xlong Messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology.* 1995;136:232–241.
 147. Meirow D, Assad G, Dor J, Rabinovici J. The GnRH antagonist cetrorelix reduces cyclophosphamide-induced ovarian follicular destruction in mice. *Hum Reprod.* 2004;19:1294–1299.
 148. Gamcsik MP, Dolan ME, Andersson BS, Murray D. Mechanisms of resistance to the toxicity of cyclophosphamide. *Curr. Pharm. Des.* 1999;5:587–605.
 149. Plowchalk DR, Mattison DR. Phosphoramidate mustard is responsible for the ovarian toxicity of cyclophosphamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1991;107:472–481.

150. Botchkarev VA, Komarova EA, Siebenhaar F, Botchkareva NV, Komarov PG, Maurer M, Gilchrest BA, Gudkov AV. p53 is essential for chemotherapy-induced hair loss. *Cancer Res.* 2000;60:5002– 5006.
151. Cai L, Hales BF, Robaire B. Induction of apoptosis in the germ cells of adult male rats after exposure to cyclophosphamide. *Biol. Reprod.* 1997;56:1490–1497.
152. Wang GJ, Cai L. Relatively low-dose cyclophosphamide is likely to induce apoptotic cell death in rat thymus through Fas/ Fas ligand pathway. *Mutat. Res.* 1999; 427:125–133.
153. Little SA, Mirkes PE. Teratogen-induced activation of caspase-9 and the mitochondrial apoptotic pathway in early postimplantation mouse embryos. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2002;181:142– 151.
154. Povirk LF, Shuker DE. DNA damage and mutagenesis induced by nitrogen mustards. *Mutat Res.* 1994;318:205-226.
155. Davis BJ, Heindel JJ. Ovarian toxicants: multiple mechanisms of action. In: Korach, K. S., ed. *Reproductive and developmental toxicology*. New York: Dekker; 1998;373– 395.
156. Ataya KM, Valeriote FA, Ramahi-Ataya AJ. Effect of cyclophosphamide on the immature rat ovary. *Cancer Res.* 1989;49:1660-1664.
157. Raz A, Fisch B, Okon E, Feldberg D, Nitke S, Raanani H, Abir R. Possible direct cytotoxicity effects of cyclophosphamide on cultured human follicles: an electron microscopy study. *J Assist Reprod Genet* 2002;19:500-506.
158. Familiari G, Caggiati A, Nottola SA, Ermini M, Di Benedetto MR, Motta PM. Ultrastructure of human ovarian primordial follicles after combination chemotherapy for Hodgkin's disease. *Hum Reprod* 1993;8:2080-2087.
159. Himmelstein-Braw R, Peters II, Faber I. Morphologic study of the ovaries of leukemic children. *Br. J. Cancer.* 1978;38:82-87.
160. Arnon J, Meirow D, Lewis-Roness H, Ornoy A. Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. *Hum Reprod Update* 2001;7:394-403.

161. Wallace WH, Shalet SM, Tetlow LJ, Morris-Jones PH. Ovarian function following the treatment of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Med Pediatr Oncol* 1993;21:333-339.
162. Sanders JE, Hawley J, Levy W, Gooley T, Buckner CD, Deeg HJ, Doney K, Storb R, Sullivan K, Witherspoon R, Appelbaum FR. Pregnancies following high-dose cyclophosphamide with or without high-dose busulfan or total-body irradiation and bone marrow transplantation. *Blood* 1996;87:3045-3052.
163. Desmeules P, Devine PJ. Characterizing the ovotoxicity of cyclophosphamide metabolites on cultured mouse ovaries. *Toxicol. Sci.* 2006;90:500–509.
164. Perez GI, Knudson CM, Leykin L, Korsmeyer SJ, Tilly JL. Apoptosis-associated signalling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction. *Nat Med* 1997;3:1228-1232.
165. Jarrell JF, Bodo L, YoungLai EV, Barr RD, O'Connell GJ. The short-term reproductive toxicity of cyclophosphamide in the female rat. *Reprod Toxicol* 1991;5:481-485.
166. Murata M, Suzuki T, Midorikawa K, Oikawa S, Kawanishi S. Oxidative DNA damage induced by a hydroperoxide derivative of cyclophosphamide. *Free Radic. Biol. Med.* 2004;37:793–802.
167. Burkl W, Schiechl H. The growth of follicles in the rat ovary under the influence of busulphan and endoxan. *Cell Tissue Res.* 1978;186:351-359.
168. Freeman ME. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: Knobil, E.; Neill, J., eds. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Pres. 1994;613–658.
169. Aten RF, Duarte KM, Behrman HR. Regulation of ovarian antioxidant vitamins, reduced glutathione, and lipid peroxidation by luteinizing hormone and prostaglandin F₂ alpha. *Biol Reprod.* 1992;46:401-407.
170. Behrman HR, Romero K. Prostaglandins and prostaglandin-like products in reproduction: eicosanoids, peroxides and oxygen radicals. In: Jaffe RB, Yen SC (eds.), *Reproductive Endocrinology*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Co., 1991.

171. Behrman HR, Preston SL Luteolytic actions of peroxide in rat ovarian cells
Endocrinology 1989;124:2895-2900.
172. Rose RC, Bode AM. Biology of free radical scavengers: an evaluation of
ascorbate. FASEB J 1993;7:1135–1142.
173. Guarnaccia MM, Takami M, Jones EE, Preston SL, Behrman HR.
Luteinizing hormone depletes ascorbic acid in preovulatory follicles. Fertil
Steril. 2000;74:959-963.
174. Deane HW. Histochemical observation on the ovary and oviduct of the
albino rat during the estrus cycle American Journal of Anatomy
1952;91:363–413.
175. Tilly JL, Tilly KI. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-
stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles.
Endocrinology 1995;136:242–252.
176. Kim SS, Yang HW, Kang HG, Lee HH, Lee HC, Ko DS, Gosden RG.
Quantitative assessment of ischemic tissue damage in ovarian cortical tissue
with or without antioxidant (ascorbic acid) treatment. Fertil Steril.
2004;82:679-685.
177. Kramer MM, Harman MT, Brill AK. Disturbances of reproduction and
ovarian changes in the guinea-pig in relation to vitamin C deficiency. Am J
Physiol 1933;106:611–622.
178. Meister A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. J Biol
Chem 1994;269:9397– 9400.
179. Levine M, Morita K. Ascorbic acid in endocrine systems. Vitam Horm
1985;42:1– 64.
180. Parlow AF. A rapid bioassay method for LH and factors stimulating LH
secretion Federation Proceedings 1958;85:501–520.
181. Byrd JA, Pardue SL, Hargis BM. Effect of ascorbate on luteinizing hormone
stimulated progesterone biosynthesis in chicken granulosa cells in vitro.
Comparative Biochemistry and Physiology C 1993;104: 279–281.

182. Kuo SM, Lin CP. 17 β -estradiol inhibition of ascorbic acid accumulation in human intestinal Caco-2 cells *European Journal of Pharmacology* 1998;361:253–259.
183. Milewich L, Chen GT, MacDonald PC, Peterson JA. Ascorbic acid inhibition of aromatase activity in human placenta tissue *Journal of Steroid Biochemistry* 1981;14:185–193
184. Costrici N, Elberg G, Lunenfeld B, Pariente C, Dor J, Kanety H, Karasik A. A cytosolic protein tyrosine kinase activity is induced by follicle stimulating hormone and insulin like growth factor-1 in human granulosa cells. *Endocrinology* 1995;136:4705-4708.
185. Paszkowski T, Clarke RN. The Graafian follicle is the site of L-ascorbate accumulation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 1999;16:41–45.
186. Phillips PH, Lardy HA, Boyer PD, Werner GM. The relationship of ascorbic acid to reproduction in the cow *Journal of Dairy Science* 1941;24:153–158.
187. Igarashi M. Augmentative effect of ascorbic acid upon induction of human ovulation in clomiphene-ineffective anovulatory women *International Journal of Fertility* 1977;22:168–173.
188. Samborskaia EP, Ferdman TD. Mechanism of abortion induced by ascorbic acid *Biulletin Eksperimentalnoi Biologii I Meditsiny* 1966;62:96–98.
189. Sanyal S, Datta S. Effect of ascorbic acid in in vitro rat adrenal and ovarian steroidogenesis *Indian Journal of Experimental Biology* 1979;17:86–88.
190. Pinnell SR. Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid: a review *Yale Journal of Biology and Medicine* 1985;58:553–559.
191. Rodgers HF, Lavranos TC, Vella CA, Rodgers RJ. Basal lamina and other extracellular matrix produced by bovine granulosa cells in anchorage-independent culture *Tissue Research* 1995;282:463–471.
192. Pfeffer F, Casenueva E, Kamar J, Guerra A, Perichart O, Vadillo-Ortega F. Modulation of 72-kilodalton type IV collagenase (matrix metalloproteinase-2) by ascorbic acid in cultured human amnion- derived cells *Biology of Reproduction* 1998;59:326–329.

193. Behrman HR, Preston SL, Aten RF, Rinaudo P, Zreik TG. Hormone induction of ascorbic acid transport in immature granulosa cells. *Endocrinology*. 1996;137:4316-4321.
194. Drevon CA. Absorption, transport and metabolism of vitamin E. *Free Rad Res Commun* 1991;14:229-246.
195. Behrman HR, Kodaman PH, Preston SL, Gao S. Oxidative stress and the ovary. *J Soc Gynecol Invest* 2001;8:40–42.
196. MacGregor LC, Gwynne JT Uptake of high density lipoproteins by rat ovaries in vivo and dispersed ovarian cells in vitro. Direct correlation of high density lipoprotein uptake with steroidogenic activity. *J Steroid Biochem* 1982; 52:515-531.
197. Traber MG, Olivecrona T, Kayden HJ Bovine milk lipoprotein lipase transfers tocopherol to human fibroblasts during triglyceride hydrolysis in vitro. *J Clin Invest* 1985;75:1729-1734
198. Halliwell B, Gutteridge JMC: *Free radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, 1989, p.
199. Nugent D, Newton H, Gallivan L, Gosden RG. Protective effect of vitamin E on ischaemia-reperfusion injury in ovarian grafts. *J Reprod Fertil* 1998;114:341–346.
200. Azzi A, Ricciarelli R, Zingg JM. Non-antioxidant molecular functions of alpha-tocopherol (vitamin E). *FEBS Lett* 2002;519:8–10.
201. Vierk JE, Hansen TR, Austin KJ, Van Kirk EA, Hess BW, Murdoch WJ. Inhibition by tocopherol of prostaglandin-induced apoptosis in ovine corpora lutea. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 1998;56:265–276.
202. Pan SY, Van Dyke HB, Kaunitz H, Slanetz CA: Effect of vitamin E deficiency on amount of gonadotrophin in the anterior pituitary of rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1949;72: 325–326.
203. Beerstecher E, Edmonds EJ. The function of vitamin E. *Tex Rep Biol Med*. 1951;9:681-683.

204. Tarín JJ, Pérez-Albalá S, Cano A. Oral antioxidants counteract the negative effects of female aging on oocyte quantity and quality in the mouse. *Molecular Reproduction and Development*. 2002;6:385-397.
205. Martin AJP, Moore T. Some effects of prolonged vitamin-E deficiency in the rat. *J Hygiene* 1939;39:643–645.
206. Cooper DR, Kling OR, Carpenter MP. Effect of vitamin E deficiency on serum concentrations of follicle stimulating hormone and testosterone during testicular maturation and degeneration. *Endocrinology* 1987;120:83–90.
207. Sawada M, Carlson JC. Intracellular regulation of progesterone secretion by the superoxide radical in the rat corpus luteum. *Endocrinology* 1996;137:1580–1584.
208. Yeh J, Bowman MJ, Browne RW, Chen N. Reproductive aging results in a reconfigured ovarian antioxidant defense profile in rats. *Fertil Steril*. 2005;84:1109-1113.
209. Wasantwisut E. Nutrition and development: other micronutrients' effect on growth and cognition. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1997;28:78–82.
210. Hansen JC, Deguchi Y. Selenium and fertility in animals and man - a review. *Acta Vet Scand* 1996;37: 19–30.
211. Oldereid NB, Thomassen Y, Purvis K. Selenium in human male reproductive organs. *Hum Reprod* 1998;13:2172– 2176.
212. Barrington JW, Lindsay P, James D, Smith S, Roberts A. Selenium deficiency and miscarriage: a possible link? *Br J Obstet Gynaecol* 1996;103:130–132.
213. Takahashi K, Cohen HJ. Selenium-dependent glutathione peroxidase protein and activity: immunological investigations on cellular and plasma enzymes. *Blood* 1986;68:640–645.
214. Burk RF, Hill KE, Read R, Bellew T. Response of rat selenoprotein P to selenium administration and fate of its selenium. *Am J Physiol* 1991;261:26–30.

215. Nebbia C. Selenium in veterinary medicine. *Riv Zoot Vet* 1982;10:246–278.
216. LaPolt PS, Hong LS. Inhibitory effects of superoxide dismutase and cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate on estrogen production in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1995;136:5533–5539.
217. Behne D, Weiler H, Kyriakopoulos A. Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. *J Reprod Fertil* 1996;106:291–297.
218. Wichtel JJ. A review of selenium deficiency in grazing ruminants. Part 1: new roles for selenium in ruminant metabolism. *NZ Vet J* 1998;46:47–52.
219. Kang BP, Bansal MP, Mehta U. Selenium supplementation and diet induced hypercholesterolemia in the rat: changes in lipid levels, malonyldialdehyde production and the nitric oxide synthase activity. *Gen Physiol Biophys* 1998;17:71–78.
220. Kamada H, Ikumo H. Effect of selenium on cultured bovine luteal cells. *Anim Reprod Sci* 1997;46:203–211.

X. ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Manisa’da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi aynı ilde tamamladım. 1995 yılında Celal Bayar Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’e girdim ve 1999 yılında mezun oldum. Aynı yıl Dokuz Eylül Üniversitesi’nde 1 yıl İngilizce hazırlık eğitimi yaptım. 2000 yılında Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde Sağlık Bilimleri Enstitüsü’nün Histoloji ve Embriyoloji programında yüksek lisansa başladım. 2000 yılında aynı Enstitü’nün araştırma görevlisi kadrosuna atandım. 2003 yılında yüksek lisans eğitimimi tamamlayarak Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Histoloji ve Embriyoloji Bölümü’nde Öğretim Görevlisi olarak göreve başladım. 2004 yılında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde Sağlık Bilimleri Enstitüsü’nün Histoloji ve Embriyoloji programında doktora başladım. Halen aynı Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım. Evliyim.