



**METOTREKSATIN OLUŖTURDUĐU OVARYUM HASARI
ÜZERİNE D VİTAMİNİNİN ETKİSİ**

Belemir GÜLHAN

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Elif KARACA**

Yüksek Lisans Tezi – 2023

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**METOTREKSATIN OLUŞTURDUĞU OVARYUM HASARI
ÜZERİNE D VİTAMİNİNİN ETKİSİ**

Belemir GÜLHAN

**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Elif KARACA**

**MALATYA
2023**

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

ETİK BEYANI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak Doç. Dr. Elif KARACA danışmanlığında hazırlayıp sunduğum METOTREKSATIN OLUŞTURDUĞU OVARYUM HASARI ÜZERİNE D VİTAMİNİNİN ETKİSİ başlıklı Yüksek Lisans tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.
...../...../20...

Belemir GÜLHAN

İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Over Embriyolojisi	2
2.2. Over Anatomisi.....	4
2.3. Ovaryum Histolojisi.....	5
2.4. Yumurtalık Rezervi Anti Müllerian Hormon (AMH)	11
2.5. Over Fizyolojisi	12
2.6. Metotreksat	16
2.7. Vitamin D	18
3. MATERYAL VE METOT	21
3.1. Hayvanlar.....	21
3.2. Kullanılan Ajanlar.....	21
3.3. Etik Beyan.....	21
3.4. Deneysel Düzen ve Uygulama Süreci	21
3.4.1. Menstrual Siklus Evrelerinin Tespiti	22
3.5. Histolojik Teknikler.....	24
3.5.1. Doku Takibi ve Kesit Alma	24
3.5.2. Histolojik Doku Takip İşlemleri	25
3.5.3. Mayer's Hematoxylen-Eozin (HE) Metodu	25
3.5.4. Masson Trikrom Boyama Metodu	26
3.5.5. İmmünohistokimya Boyama Metodu	26
3.5.6. Toluidin Mavisi Boyama Metodu.....	27
3.5.7. Cresyl Violet Boyama Metodu	27
3.6. Histolojik Analizler.....	28
3.7. Biyokimyasal Tahlil.....	29
3.8. İstatiksel Analiz	30

4. BULGULAR.....	31
4.1. Hayvanların Ağırlıklarının Değerlendirilmesi.....	31
4.2. Ovaryum Ağırlıklarının Değerlendirilmesi	31
4.3. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Bulgular	32
4.4 Biyokimyasal Bulgular	61
5. TARTIŞMA	64
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	69
KAYNAKLAR	71
EKLER.....	80
EK-1. Özgeçmiş.....	80
EK-2. Etik Kurul İzni.....	81



TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimimin başından sonuna kadar sabır ve özveriyle bana yol gösteren tez danışmanım saygıdeğer hocam Doç. Dr. Elif KARACA başta olmak üzere, bilgi ve deneyimleri ile hayatımda her zaman büyük desteği olan ve yetişmemde katkıları olan Anabilim Dalı Başkanımız saygıdeğer hocam Prof. Dr. Nigar VARDI'ya desteklerini esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. Mehmet GÜL'e, Prof. Dr. Aslı TAŞLIDERE ve Dr. Öğr. Üyesi Azibe YILDIZ'a

Tezimin istatistiksel analizinde yardımcı olan hocam Doç. Dr. Harika Gözde GÖZÜKARA BAĞ'a, biyokimya çalışmalarımda yardımcı olan hocam Prof. Dr. Elif GÜREL ve Nurcan GÖKTÜRK'e

Tezimi oluşturma aşamasında yardımlarını aldığım Berna ÖZDEM'e, Dr. Öğr. Üyesi Semir GÜL'e, Uzm. Dr. Rümeyza Hilal CIRIK'a, Ecz. Mehmet ÇOLAK'a

Ayrıca TYL-2022-2818 nolu projeme maddi katkılarından dolayı İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne

Bana verdikleri emeklerle bugünlere gelmemde katkısı olan sevgili aileme teşekkürlerimle...

Arş. Gör. Belemir GÜLHAN

Eylül 2023

ÖZET

Metotreksatın Oluşturduğu Ovaryum Hasarı Üzerine D Vitamininin Etkisi

Amaç: Çalışmamızda metotreksatın neden olduğu over hasarına karşı vitamin D'nin etkilerini histopatolojik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal değerlendirme ile araştırmayı amaçladık.

Materyal ve Metot: 36 adet *Wistar Albino* sıçan kontrol ve VD grubunda 8, MTX ve MTX+ D grubunda 10 adet olarak gruplara ayrıldı. 14 günlük deney süresinin sonunda sıçanlardan vajinal smear alınarak proestrus evresinde olan sıçanlar sakrifiye edilerek ovaryum dokuları alındı. Ovaryum dokularına H-E, Masson trikrom, toluidin mavisi, kaspaz-3 ve VDR boyamaları yapıldı. Folikül sayımı yapılarak over rezervi değerlendirildi. Biyokimyasal parametrelerde TOS, TAS, AMH, FSH, LH, östrojen, VD, Ca ve P düzeyleri ELISA kitleri spektrofotometrik yöntemler kullanılarak ölçüldü.

Bulgular: Histopatolojik olarak MTX grubunda atretik folikül sayısında, over stromasında bağ dokusunda, inflamatuvar hücre birikiminde, mitotoik arreste giden hücrelerde, apoptotik cisimciklerde artışı gözlemledik. Ayrıca folikül sayıları bakımından gruplar arasında bir fark olmadığını gözlemledik. Toluidin mavisi ile boyanan kesitlerde MTX grubunda mast hücrelerin arttığını fakat istatistiksel anlamlı olmadığını, kaspaz-3 immünoreaktivitesinin MTX grubunda arttığı, VDR immünoreaktivitesinin azaldığı tespit edildi. VD verilen tedavi grubunda folikül sayısında değişiklik gözlenmedi. MTX+D grubunda kaspaz-3 immünoreaktivitesinin azaldığı, VDR immünoreaktivitesinin arttığı, mast hücre sayısının değişmediği bulgularına ulaşıldı. Biyokimyasal olarak MTX grubunda TOS seviyesi artış gösterirken VD uygulamasının TOS'u düşürdüğü fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi. Biyokimyasal parametrelerde VD seviyesindeki artış dışındaki parametrelerde değişiklik gözlenmedi.

Sonuçlar: MTX'in oksidatif stresi artırarak over hasarı oluşturduğunu fakat primordiyal folikül sayısında ve AMH seviyesinde değişikliğe neden olmadığını gösterdi. Diğer yandan atretik folikül ve apoptotik hücre sayısında artışa neden oldu. Sıçanlara, VD uygulamasının ise tüm parametreler incelendiğinde beklenen iyileştirici etkiyi göstermediğini tespit ettik.

Anahtar Kelimeler: D Vitamini, MTX, Over

ABSTRACT

Effect of Vitamin D on Ovary Damage Caused by Methotrexate

Aim: We aimed to investigate the effects of vitamin D on methotrexate induced ovarian damage histopathological, immunohistochemical, and biochemical evaluations.

Material and Method: Thirty-six *Wistar Albino* rats were divided into four groups: control, VD, MTX and MTX+D groups. After 14-day experimental period, vaginal smear samples were obtained from the rats, and those determined to be in the proestrus phase were sacrificed for ovarian tissue collection. Histopathological HE, Masson's trichrome, toluidine mavis, caspase-3, VDR, were performed on ovarian tissues. Follicle counts were conducted to evaluate ovarian reserve. Biochemical parameters including TOS, TAS, AMH, FSH, LH, estrogen, VD, calcium, and phosphate levels were measured using ELISA kits and spectrophotometric methods.

Results: MTX group showed increased atretic follicles, connective tissue, inflammatory cell accumulation, and apoptotic bodies in granulosa cells. Mast cells increased (not statistically significant), caspase-3 immunoreactivity rose, while VDR immunoreactivity decreased. MTX+D group had no changes in follicle numbers but showed decreased caspase-3 immunoreactivity and increased VDR immunoreactivity. VD administration reduced MTX-induced TOS levels, but this decrease was not statistically significant. Serum VD levels increased.

Conclusion: This study demonstrated that MTX increases oxidative stress and causes ovarian damage, but it does not result in changes in the number of primordial follicles and AMH levels. On the other hand, it led to an increase in the number of atretic follicles and apoptotic cells. Moreover, we found that the treatment of VD to the rats did not demonstrate the expected therapeutic effect when all parameters were examined.

Keywords: Vitamin D, Methotrexate, Ovary

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMH	: Anti müllerian hormon
Ca	: Kalsiyum iyonu
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
ddH₂O	: <i>Double</i> distile su
DHF	: Dihidrofolat
DHFR	: Dihidrofolat redüktaz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
E	: Östrojen
E1	: Östron
E2	: Östradiyol
E3	: Östriol
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
FSH	: Folikül stimulan hormon
GnRH	: Gonadotropin salgılayıcı hormon
HCG	: <i>Human</i> koryonik gonadotropin
HE	: Hematoksilen eozin
i.p	: Damar içi
i.v	: Kas içi
IGF	: İnsülin bezleri büyüme faktörü
IHC	: İmmünohistokimya
LH	: Lüteinizan hormon
MT	: Masson's trikrom
MTX	: Metotreksat
OMI	: Oosit maturasyon inhibitör
OSİ	: Oksidatif stres indeks
P	: Fosfor
PAS	: Peryodik asit shift
PTH	: Parathormon
TAS	: Total antioksidan stres
TGF	: Transforming growth factor
THF	: Tetrahidrofolat
TOS	: Total oksidatif stres

VD : Vitamin D
WHO : World health organization
ZP : Zona pellusida



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Farklılaşmamış gonadlardan testis ve ovaryum gelişimi	2
Şekil 2.2. Ovaryum Anatomisi	4
Şekil 2.3. Puberte sonrası dişi bireydeki ovaryum yapısı	6
Şekil 2.4. AMH'ın folikül üzerindeki etkisi	12
Şekil 2.5. Menstruel döngü.....	13
Şekil 2.6. Dişi cinsiyet hormonlarının sentezi.....	15
Şekil 2.7. Östrojen üretiminde teka ve granüloza hücrelerindeki hücresel değişiklik ...	16
Şekil 2.8. Metotreksat'ın molaküler yapısının şematik gösterimi	17
Şekil 2.9. Folik asit'in molekül yapısının şematik gösterimi	17
Şekil 2.10. Metotreksatın hücre içi mekanizması.....	18
Şekil 2.11. D vitamininin fizyolojisinin şematik gösterimi.....	19
Şekil 3.1. Gruplara ayrılan vajinal smear örnekleri.....	23
Şekil 3.2. Kuruyan smear örneklerinin cresyl violet boyası ile boyanması	23
Şekil 4.1. Kontrol grubu. Ovaryum dokusunun genel histolojik görünümü MT X40. ..	32
Şekil 4.2. Kontrol grubu. Tunika albuginea (yıldız) ve germinal epitelin (oklar) görünümü. MT X400.	34
Şekil 4.3. Kontrol grubu (A) Primordiyal folikül (ok), (B) Primer folikül (ok), (C) Sekonder folikül (ok), (D) Tersiyer folikül (ok) MT X400.....	35
Şekil 4.4. Kontrol grubu. Mast hücrelerin görünümü (oklar) Toluidin mavisi X400. ...	36
Şekil 4.5. Kontrol grubu. Kaspaz-3 pozitif hücrelerin görünümü (oklar) Kaspaz-3 X200.	36
Şekil 4.6. Kontrol grubu. Kaspaz-3 pozitif hücrelerin görünümü (oklar) Kaspaz-3 X400.	37
Şekil 4.7. Kontrol grubu. VDR pozitif hücrelerin görünümü (oklar) VDR X400.	37
Şekil 4.8. D Vit grubu. Ovaryum dokusunun genel histolojik görünümü MT X40.....	38
Şekil 4.9. D Vit grubu. Tunika albuginea (yıldız) ve germinal epitelin (oklar) görünümü. MT X400.	38
Şekil 4.10. D Vit grubu. (A) Primordiyal folikül (ok), (B) Primer folikül (ok), (C) Sekonder folikül (ok), (D) Tersiyer folikül (ok) MT X400.....	39
Şekil 4.11. D Vit grubu. Mast hücrelerin görünümü (oklar) Toluidin mavisi X400.....	40

Şekil 4.12. D Vit grubu. Kaspaz-3 pozitif hücrelerin görünümü (oklar)	
Kaspaz-3 200.	40
Şekil 4.13. D Vit grubu. Kaspaz-3 pozitif hücrelerin görünümü (oklar)	
Kaspaz-3 X400.....	41
Şekil 4.14. D Vit grubu. VDR pozitif hücrelerin görünümü (oklar) VDR X400.....	41
Şekil 4.15. MTX grubu. Ovaryum dokusunun genel histolojik görünümü MT X40.....	42
Şekil 4.16. MTX grubu. Antral boşlukta ölü granüloza hücre artıklarının görünümü (yıldız). MT X400.....	43
Şekil 4.17. MTX grubu. Granüloza hücrelerinde vakuolizasyon (oklar) ve antral boşluklarında ölü granüloza hücre artıklarının (yıldız) görünümü. MT X400.....	43
Şekil 4.18. MTX grubu. Hücrel ayrışmalar ve granüloza hücrelerinde vakuolizasyonlar (oklar). MT X400.	44
Şekil 4.19. MTX grubu. Granüloza hücrelerinde vakuolizasyonlar (oklar). MT X400.....	44
Şekil 4.20. MTX grubu. Bozulmuş zona pellusidanın görünümü (ok) MT X400.	45
Şekil 4.21. MTX grubu. Over stromasında bağ doku artışı (yıldız) ve inflamatuvar hücre birikimi (oklar). MT X400.	45
Şekil 4.22. MTX grubu. Apoptotik hücrelerin görünümü (oklar). H-E X400.	46
Şekil 4.23. MTX grubu. Apoptotik hücrelerin görünümü (oklar). H-E X1000.	46
Şekil 4.24. MTX grubu. Mitotik arreste giden hücrelerin görünümü (oklar). H-E X400.....	47
Şekil 4.25. MTX grubu. Mitotik arreste giden hücrelerin. H-E X1000.	47
Şekil 4.26. MTX grubu. Mast hücrelerin görünümü (oklar) Toluidin mavisi X400.....	48
Şekil 4.27. MTX grubu. Kaspaz-3 pozitif hücrelerin görünümü (oklar) Kaspaz-3 X200.....	49
Şekil 4.28. MTX grubu. Kaspaz-3 pozitif hücrelerin görünümü (oklar) Kaspaz-3 X400.....	49
Şekil 4.29. MTX grubu. VDR pozitif hücrelerin görünümü (oklar) VDR X400.....	50
Şekil 4.30. MTX+D grubu. Ovaryum dokusunun genel histolojik görünümü MT X40.....	51
Şekil 4.31. MTX+D grubu. Granüloza hücrelerinde vakuolizasyon (oklar) ve antral boşluklarında ölü granüloza hücre artıklarının (yıldız) görünümü. MT X400.....	52

Şekil 4.32. MTX+D grubu. Bozulmuş zona pellusidanın görünümü (oklar) MT X400.....	52
Şekil 4.33. MTX+D grubu. Over stromasında bağ doku artışı (yıldız) ve inflamatuvar hücre birikimi (oklar). MT X400.....	53
Şekil 4.34. MTX+D grubu. Apoptotik hücrelerin görünümü (oklar). H-E X1000.	53
Şekil 4.35. MTX+D grubu. Mitotik arreste giden hücrelerin görünümü (oklar). H-E X400.	54
Şekil 4.36. MTX+D grubu. Mitotik arreste giden hücrelerin görünümü (oklar) H-E X1000.	54
Şekil 4.37. MTX+D grubu. Mast hücrelerin görünümü (oklar) Toluidin mavisi X400.	55
Şekil 4.38. MTX+D grubu Kaspaz-3 pozitif hücrelerin görünümü (oklar) Kaspaz-3 X200.....	56
Şekil 4.39. MTX+D grubu Kaspaz-3 pozitif hücrelerin görünümü (oklar) Kaspaz-3 X400.....	56
Şekil 4.40. MTX+D grubu VDR pozitif hücrelerin görünümü (oklar) VDR X400.....	57
Şekil 4.41. Gruplar arası primordiyal folikül sayısı	58
Şekil 4.42. Gruplar arası primer, sekonder, graaf folikül sayısı	58
Şekil 4.43. Gruplar arası korpus luteum ve atretik folikül sayısı	59
Şekil 4.44. Gruplar arası primordiyal, primer, sekonder, graaf, korpus luteum sayısı...	59
Şekil 4.45. Gruplar arası mast hücre sayısı	60
Şekil 4.46. Gruplar arası TAS, TOS, OSI analizlerinin değerlendirilmesi	62
Şekil 4.47. Gruplar arası FSH, LH, Östrojen, AMH analizlerinin değerlendirilmesi	63
Şekil 4.48. Gruplar arası VD, Ca, P analizlerinin değerlendirilmesi.....	63

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 3.1. Histolojik doku takip işlemleri sıralaması	25
Tablo 3.2. Mayer's hematoxylen-eozin (HE) metodu	25
Tablo 3.3. Masson trikrom boyama metodu	26
Tablo 3.4. İmmünohistokimya boyama metodu	26
Tablo 3.5. Toluidin mavisi boyama metodu	27
Tablo 3.6. Cresyl violet boyama metodu	27
Tablo 3.7. Biyokimya analizinde kullanılan ELISA kitleri	29
Tablo 4.1. Deney başlangıcı ve deney sonu hayvan ağırlıklarının karşılaştırılması	31
Tablo 4.2. Deney başlangıcı ve deney sonu ovaryum ağırlıklarının karşılaştırılması ...	31
Tablo 4.3. HE boyama metodu uygulanmış kesitlerde folikül sayımı	57
Tablo 4.4. Toluidin mavisi ile mast hücresi değerlendirme	60
Tablo 4.5. VDR ve Kaspaz-3 immünohistokimyasal değerlendirme	60
Tablo 4.6. Biyokimya analizlerinin değerlendirilmesi	61

1. GİRİŞ

Metotreksat lösemi, lenfoma, akciğer kanseri ve pekçok kanser çeşidinde kullanılan bir folik asit analoğudur. Antineoplastik bir ajan olarak kullanılmasının yanı sıra sarkoidoz, romatoid artrit, dermatomiyozit ve psöriasis gibi inflamatuvar hastalıkların tedavisinde yaygın şekilde kullanılmaktadır (1). Çocukluk ve üreme çağındaki kanserlerin tedavisi sırasında kemoterapötik ajanların uzun süreli kullanımı yumurtalık yetmezliği ve kısırlık gibi çeşitli komplikasyonlara yol açabilmektedir (2).

Metotreksat hücrede etkilerini dihidrofolat redüktaz enzimini geri dönüşümlü olarak baskılayarak gösterir. Dihidrofolatın tetrahidrofolata dönüşümünü engeller böylece folat antagonisti gibi davranır. Tetrahidrofolat inhibisyonu pirimidin timidilat ve pürin nükleotidlerinin biyosentezinin durmasına yol açar. Bu yapıtaşlarının üretilmemesi hücre çoğalması için gerekli olan DNA ve RNA'nın transkripsiyonu için kullanılan ATP yapımını da inhibe ederek durmasına neden olur. Böylece MTX hastalarda antineoplastik ve immünsüpresif olarak kullanılmaktadır (3). Kullanım dozunun üzerinde antineoplastik olarak kullanılırken düşük dozlarda immünsüpresif ve antiinflamatuvar olarak kullanılır. Metotreksatın özellikle yüksek dozlarda yumurtalık fonksiyon bozukluğuna neden olduğu daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (4).

Kemoterapi alan hastalarda infertiliteyi önleyecek yöntemlerin araştırılması giderek önem kazanmaktadır. Vitamin D (VD), temel olarak ultraviyole ile deride sentezlenen, yağda çözünen steroid bir prohormondur. Karaciğer ve böbrekte hidroksile olarak aktif forma dönüşmesi gerekir (5). VD temel olarak vücutta kalsiyum ve fosfat metabolizmasında rol almasının yanı sıra, anti-fibrotik, anti-oksidatif ve anti-inflamatuvar etkileri gibi çeşitli sitoprotektif özelliklere sahiptir (6, 7).

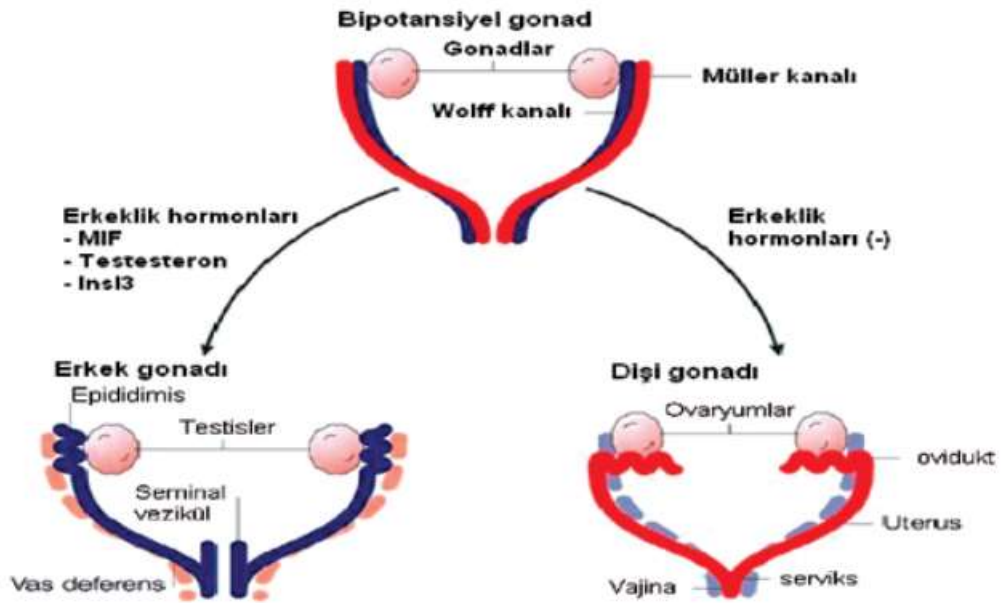
Çalışmamızın amacı sık kullanılan kemoterapötik bir ilaç olan metotreksatın neden olduğu over hasarı üzerine VD'nin koruyucu, iyileştirici etkilerinin histolojik, biyokimyasal olarak araştırılması ve literatüre katkı sağlanmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Over Embriyolojisi

Embriyonun cinsiyeti döllenme gerçekleştiğinde belirlenmesine karşın intrauterin gelişimin 7. haftasına kadar gonadlar dişi veya erkek yapısal karakteri kazanmamıştır. Genital sistem gelişiminin bu evresine farklılaşmamış dönem denir.

Gonadlar; mezotel, mezenkim ve primordiyal germ hücreleri olmak üzere üç yapıdan oluşmuştur. Gonadal kabartıların oluşumu mezonefrozun medial kenarındaki sölom epitelinin altındaki mezenşimde çoğalması ve sıkışması ile mezenkimal blastemi oluşturmaktadır. Bu farklılaşma sonucunda mezonefroz ve dorsal mezenter hattı arasında, uzunlamasına bir çift kabartı oluşur ve bu alan gonadal kabartı bölgesini oluşturur. İntrauterin gelişiminin 6. haftasına kadar gonadal kabartıların içerisinde üreme hücreleri bulunmaz (8, 9).



Şekil 2.1. Farklılaşmamış gonadlardan testis ve ovaryum gelişimi (10)

Primordiyal germ üreme hücreleri, intrauterin gelişimin 2. haftasında primer endoderm adı verilen epiblasttan köken alırlar. İntrauterin gelişiminin 5. haftasında primordiyal germ hücreleri epiblast tabakasından ayrılarak vitellüs kesesinin ekstraembriyonik bölgelerine doğru göç ederler. Bu göç sırasında öncelikle embriyonun ekstraembriyonik mezoderminde sonra vitellüs kesesinin endoderminde görülürler (11).

Primordiyal germ hücreleri intrauterin gelişimin 4. haftasında arka barsağın (hindgut) dorsal mezenteri boyunca göç ederler. 4. haftanın sonu 5. haftanın başlarında çöлом ve mezenkim hücrelerinin çoğalmasının sonucunda ürogenital sırtın medial (orta) hattı üzerinde kalınlaşmış çöлом epiteli gelişir ve bu yapıya gonadal kabartı denir. 5. haftanın başlarında embriyonun lumbur bölgesindeki ilkel gonadal kabatılara ulaşırılar. Göçleri esnasında mitoz bölünme ile sayılarını arttıırırlar. 6. haftada ise primordiyal germ hücreleri altındaki mezenşim içerisine girerek burada genital kabartılara yerleşirler. Primordiyal germ hücre göçünün izlediğı bu yola germ çizgisi denir ve bu hücreler sitoplazmalarının açık renkli olması ile alkalen fosfataz enzim işaretlemesiyle belirlenirler (12, 13).

Pirmordiyal germ hücrelerinin ilkel gonadlara ulaşmasıyla birlikte gonadal kabartı epiteli çoğalarak epitel hücrelerinin altında bulunan mezenşim içerisine gömülürler ve primitif cinsiyet kordonu adı verilen düzensiz kordon yapılarını oluştururlar. Farklılaşmamış gonadlarda dişi veya erkek karakterlerinin ayrılması mümkün olmamakla birlikte sadece periferde korteks ve merkezi medulla bölgesi fark edilmektedir. 46 XY karyotipe sahip embriyoda gonadın medullar kısmı gelişerek testisi oluştururken korteksin gelişimi geriler. 46 XX karyotipe sahip embriyoda gonadın medullar kısmı geriler ve korteks kısmı gelişir (8).

Embriyonun cinsiyeti 7. haftada gonadal seks Y kromozomundaki Testis Determining Faktör (TBF) bölgesinin SRY gen ürünü testislerin gelişimini başlatır. Dişi embriyoda ise SRY geni yokluğunda WNT4 geni aktive olur ve overlerin gelişimi başlamış olur. SRY farklılaşmamış dönemdeki farklılaşmamış gonadların destek hücrelerinin çekirdeklerinde bulunur (14).

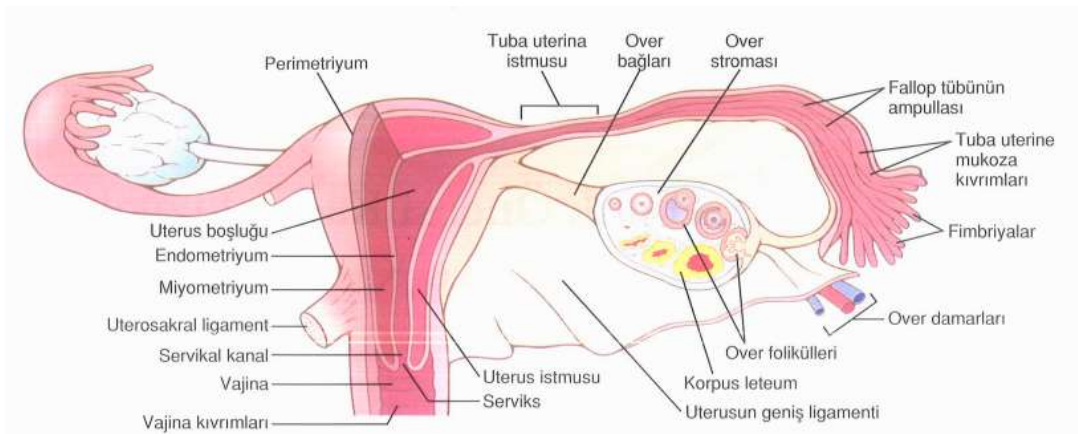
XX kromozomuna sahip dişi embriyolarda ilkel cinsiyet kordonları düzensiz kümeleri meydana getiriler ve bu kümeler ovaryumun medullar bölgesinde belli süre kaldıktan sonra dejenere olarak kaybolurlar. İntrauterin gelişiminin 7. haftasında yüzey epiteli orjinli hücre kordonları mezenşimde gömülürler. Kortikal kordonların boyutları da arttıkça primordiyal germ hücreleri içerisine doğru invajine olurlar. 4. ayda bu kordonlar bir veya birden çok sayıda primordiyal germ hücrelerini sarmış izole halde bir grup düzensiz hücre topluluklarını meydana getirirler. Zamanla bu hücre toplulukları oogoniumları oluştururken yüzey epitelinden aşağıya göç eden ve üreme hücrelerini sarmalayan epitel hücrelerinden de primordiyal folikül adı verilen tek tabakalı yassı folikül hücreleri oluşur (8). İntrauterin dönemdeki oogonyumlar mitoz bölünmenin yanı sıra mayoz bölünme de geçiriler. İntrauterin dönemin 5. ayında overlerdeki germ

hücrelerinin sayısı yaklaşık 7 milyona ulaşır ve bu evreden sonra apoptoz başlayarak bu sayı azalır. Hayatta kalan primer oositlerin tümü 1. mayoz bölünme aşamasının profaz evresinin diploten aşamasında bekler. Merkezi yerleşimde bir primer oosit ve etrafı birbirleriyle hücre bağlantı kompleksleri ile tutunmuş tek sıra yassı epitel hücresi ile çevreli, etrafındaki dokudan kesin hatlarla belirgin ayrı bir bazal laminaya sahip bu yapıya primodriyal folikül adı verilir.

Doğumda overlerdeki oositlerin sayısı 600 bin ila 2 milyon arasında değişir. Puberteye gelinceye kadar bu sayı atreziyle azalır ve 400.000'e düşer. Doğumda tüm primer oositler 1. duraksama adı verilen 1. mayoz bölünmenin profazının diploten evresinde çekirdek zarının içerisinde kardeş olmayan kromozomlar arasında parça değişimi yapılmış halde duraksar. Primer oositler puberteye kadar uzun bekleme döneminde ve bu bekleme *oocyte maturation inhibitor* (OMI) adı verilen folikül hücrelerinden sentezlenen maddedir. Bu bekleme dönemi pubertede adenohipofizden salgılanan LH'nin etkisinde OMI'nin etkisi ortadan kalkması ve ovulasyonun gerçekleşmesidir. Ovulasyon döneminde primer oosit bekleme döneminden çıkarak 1. mayoz bölünmeyi tamamlar. Hemen ardından 2. mayoz bölünmeye girer fakat bölünmeyi tamalamadan metafaz evresinde duraksar. Bu duraksama dönemi ise fertilizasyonun gerçekleşmesiyle tamamlanır. Fertilizasyon gerçekleşmediği takdirde menstrasyon ile 2. mayoz bölünmede bekleyen oosit atılır (15).

2.2. Over Anatomisi

Erkeklerdeki testislerin karşılığı olan ovaryumlar pelvis lateral duvardaki *a.v. iliaca interna* ile *a.v. iliaca externa* arasında bulunan *fossa ovarica*da lokalize olan grimsi pembe renkli oval bir çift organdır. Ovaryum yaklaşık 4 gram ağırlığında, 3-4 santimetre uzunluğunda 2 santimetre genişliğinde ve 1 santimetre kalınlığındadır.



Şekil 2.2. Ovaryum Anatomisi (16)

Ovaryumun *facies lateralis* ve *facies medialis* olmak üzere iki yüzü, *e. superior (tubaria)* ve *e. inferior (uterina)* olmak üzere iki ucu, *margo anterior (mesovaricus)* ve *margo posterior (liber)* olmak üzere iki kenarı vardır. Ön kenarında hilum ovarii bulunur ve burdan ovaryuma damar ve sinirler girer veya çıkarlar. Lateral yüzü parietal periton ile örtülü olup medial yüzü örtülü değildir.

Ovaryum ligamentleri 3 çeşittir ve yerinde kalmasına yardımcı olurlar:

- Mesovaryum; ligamentum latum uterinin ovaryumun ön kenarına yakın olan kısmıdır.
- Ligamentum uteroovarikum; uterus ile ovaryum arasında olup düz ve elastik lifler içermektedir.
- Ligamentum suspensoryum ovari; ovaryum üst ucu ile pelvis duvarları arasında bulunur. Bu ligament ovaryumu pelvis yan duvarlarına bağlar ve sinir dalları içerir.

Ovaryum arter, ven ve sinirleri:

- **Arterler:** 2 çeşittir; **a. ovarica**, aorta abdominalisten çıkıp ovaryuma gelir. **r. ovaricus**, a. uterinadan çıkıp a. ovarica ile anastamoz yapar.
- **Venler:** Plex. Venosus ovaricus adı verilen bir ağ yapar. **V. Ovarica** adı ile sağ tarafa vena cava inferiora sol tarafta ise venosus renalis sinistraya dökülürler.
- **Lenf damarları:** Para aortik lenf nodlarına açılırlar.

Sinirleri: Parasempatik sinirler n. vagustan sempatik sinirler ise m. splanchnicus minör aortico-renal gangliondan gelir ve postsinaptik lifler a. ovarica ile ovaryuma ulaşır (17).

2.3. Ovaryum Histolojisi

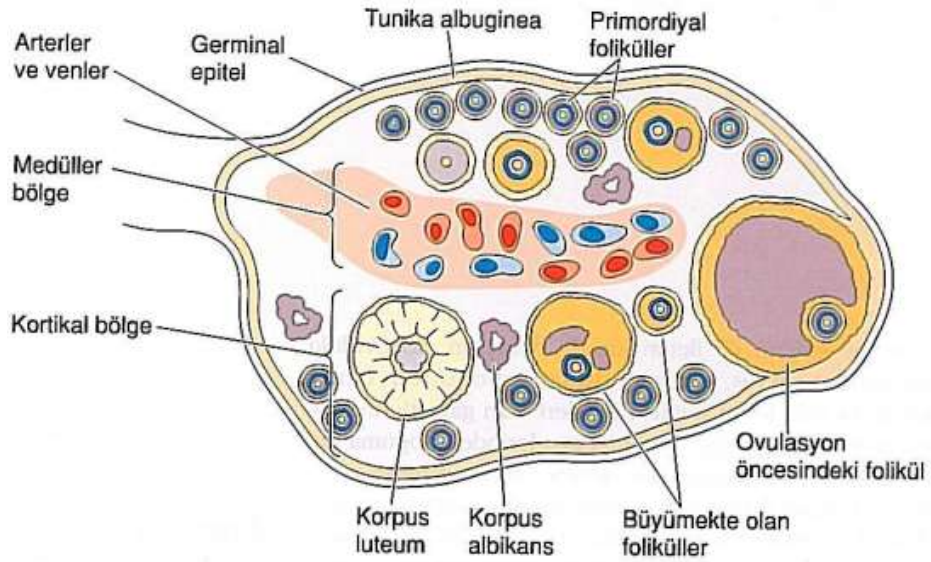
Ovaryumun dışı germinatif epitel ile çevrili tek katlı kübik epitelle örtülüdür. Sıkı fibröz bağ dokusundan oluşan tunika albuginea tabakası germinatif epitelin hemen altında yerleşim gösterir. Tunika albuginea tabakasının altında rezerv olarak yer alan primordiyal foliküller yer almaktadır.

Ovaryum dışta korteks içte medulla olarak sınırları keskin sınırla belirli olamayan iki bölümden oluşur. Kortikal bölge ovaryumun periferinde medullayı çevreleyen bağ dokusunun, düz kas liflerinin, ovaryan foliküllerinin ve korpus luteumunda bulunduğu bölgedir. Medullar bölge ovaryumun merkezi konumunda olup gevşek bağ dokusu, sinir, kan ve lenf damarları içermektedir. Damar ve sinirlerin ovaryuma girip çıktığı bölgeye hilus denir. Bu bölgede bulunan hiler hücreleri damar boşlukları ve miyelinsiz sinir lifleri

ile bağlantılıdır. Bu hücrelerde reinke kristaloidleri adı verilen kristaller vardır. Reinke kristaloidleri gebelik ve menopoz başlangıcından önce hormonal değişikliklere cevap oluşturmaktadır (18).

Ovaryum temel olarak birbiriyle ilişkili iki temel fonksiyonu yürüten organdır. Gametogenez adı verilen gamet üretimi (oosit gelişimi) ve steroid hormon sentez mekanizmasıdır. Gamet üretimi ile ekzokrin, hormon sentezi ve sekresyon özelliği ile endokrin bez olarak kabul edilmektedir. Gametogenez, dişilerde pubertede başlayan gelişmekte olan oositlerin olgun ovum haline gelmesi sürecidir. Östrojen ve progesteron steroid hormonları sınıfında yer alan hormonlardır. Bu özelliği ile de parakrin bir organdır. Östrojen temel dişi karakter oluşumunda, iç ve dış genital organın gelişiminde, meme gelişimini desteklemekte rol almaktadır. Progesteron dişilerde puberte ile aktivasyonu başlayan endometriumdaki menstrual siklus değişiklikleri takiben uterusu gebelik için hazırlar. Aynı zamanda meme bezindeki laktasyonun başlamasında temel rol oynar. Her iki steroid hormonun siklus değişikliklerle birlikte döllenmiş ovumun uterusu implante olmasında görevlidir (19, 20).

Ovaryum folikülleri içerisinde bir tane oosit içerir ve korteksin stromasında dağınık şekilde yerleşmişlerdir. Ayrıca ovaryum folikülleri gelişmekte olan oositler için uygun mikroçevreyi sağlarlar. Doğumdan sonra dişi bireyde ortalama 600.000-800.000 kadar primer oosit vardır. Primer oositler birinci mayotik bölünmede arreste uğramıştır. Puberte ile birlikte bir grup foliküller halinde maturasyona uğrarlar (19).



Şekil 2.3. Puberte sonrası dişi bireydeki ovaryum yapısı (21)

Foliküller gelişim evresine göre histolojik olarak üç evrede tanımlanır:

- Primordiyal folikül
- Büyümekte olan foliküller: primer ve sekonder folikül
- Olgun (Graaf) folikül

Primordiyal Folikül: Folikül gelişiminin en erken evresi olmakla birlikte ovaryumdaki rezerv folikül havuzunu temsil etmektedir. Fetal gelişim döneminin üçüncü ayında ortaya çıkarlar, ovaryumun kortikal bölgesinde tunika albugineanın bitmesiyle hemen aşağısında yerleşmiş halde bulunur. Oositi tek katlı yassı folikül hücreleri çevrelemiştir. Oosit 25-30 µm çapında ince dağılmış kromatin ve bir ya da birden fazla nükleolus içeren büyük bir nükleusa sahiptir. Oositin sitoplazması da özel bir isme sahip olup ooplazma olarak adlandırılır ve içerisinde balbiani cisimciği adı verilen aslında endoplazmik retikulum, golgi vezikül ve membranları, lizozomların ve mitokondriyumların bir arada bulunduğu özelleşmiş organel topluluğudur.

Primer Folikül: Primordiyal foliküllerin yassı folikül hücrelerinin proliferasyon olarak ilk adımda kübik sonrasında prizmatik hücrelere dönüşmesiyle birlikte bu foliküllere primer folikül adı verilir. Primer folikül, folikül gelişiminin ilk evresinde görülen folikül tipidir.

Primer oosit büyüyerek 50-80µm çapına ulaştığında özel bir protein olan glikoprotein ve glikozaminoglikanları çevresine sentezler. Özel proteinlerde birleşerek zona pellusida (ZP) adı verilen oosit ile folikül hücreleri arasında bulunan ekstraselüler bir yapıyı meydana getirirler. Zona pellusida (ZP) üç glikoproteinden oluşmuştur ZP-1, ZP-2 ve ZP-3'dür. Zona pellusidanın fertilizasyondan önce ve fertilizasyondan sonra çeşitli fonksiyonları bulunmaktadır.

Fertilizasyondan önce oositin beslenmesini, spermiyumların tutunmasını ve akrozomal reaksiyonu başlatır. Fertilizasyondan sonra polisperminin engellenmesi, blastomerin dağılmasını engellemesi ve zararlı maddelerin girişine engel olması gibi çeşitli fonksiyonlara sahiptir.

Folikül hücreleri hem birbirlerine hem de oosit ile gap junctionlar ile bağlantılı olarak tutunurlar. Böylece folikül hücreleri oosite besinsel ve mekanik destek sağlamış olur. Folikül hücrelerinin arasında bulunan gap junctionlar puberte başlayana kadar oosit maturasyon inhibitör faktörünü etkileyerek mayotik arreste destek sağlar. Ovulasyondan hemen önce gonadotropinlerden salgılanan Lüteinizan Hormonun (LH) artışı ile gap junctionların bağlantıları zayıflar ve oositin salgılanan bazı faktörler çevreye yayılarak folikül epitel hücrelerinin gelişmesine olanak tanır. Folikül epitelinin değişimi ile birlikte aldığı isim de değişir ve stratum granulosum adını alır.

Tek katlı epitel içeren foliküle unilaminar primer folikül denir.

Stratum granulozum olarak isimlendirilen çok katlı epitele dönüşen foliküle multilaminar primer folikül denir.

Foliküldeki mitotik aktivitenin yanı sıra folikülü çevreleyen bağ dokusunda da değişiklikler gerçekleşir. Bu yapıya teka folikülü adı verilir. Teka folikülünden salgılanan anjiyogenetik faktörler damarlanmayı tetikler ve hızlı mitotik aktiviteye sahip granüloza hücrelerinin beslenmesini salgılamaktadır. Folikülün gelişmesiyle birlikte teka kılıfı özelleşip iki yapıyı oluştururlar:

- Teka interna sekretuar hücrelerden, kan damarlarından zengin olup iç katmanı oluşturmak üzere organize olmuştur.
- Teka externa koruyucu kapsülü oluşturmak üzere düz kas hücreleri ve kollejen fibril demetlerinin organizasyonu ile koruyucu kapsül olan dış tabakayı oluşturmaktadır.

Teka internada bulunan LH reseptörlerinin varlığı ovulasyon sırasında önemli rol oynamaktadır. LH östrojen prekürsörleri olan androstenedion üretirler. Granüloza hücrelerinden salgılanan FSH aromataz enzimi üretir ve bu enzim ile birlikte androstenedion östrojene dönüşür. Östrojen teka externadaki kan damarları vasıtasıyla tüm vücuda dağılır.

Folikül hücrelerinden çıkan parmak uzantısı şeklindeki sitoplazmik uzantılar zona pellusidayı geçerek perivitellin aralığına doğru çıkıntı yaparak oosit membranı ile etkileşim kurar. Bu sayede oosite folikül hücrelerinden madde taşınması gerçekleşmektedir.

Oosit olgunlaşmaya devam ettikçe Balbiani cisimciğinde yer alan golgi kompleksinin elemanları stoplazmaya yayılır ve organellerin dağılımında değişiklikler gerçekleşir. Folikül içerisinde serbest ribozom, mitokondriyon, veziküller ve endoplazmik retikulumların sayısı artar. Memeli oositlerinde membranın hemen altında yer alan sekresyon yapmak için özelleşmiş kortikal granüller bulunur. Bu granüllerin zengin proteaz içerikleri oositin spermle buluşması sırasında ekzositozla salınır ve polispermi olarak adlandırılan durumun önlenmesinde rol oynar (15).

Sekonder Folikül: Multilaminar primer folikül gelişmeye devam eder ve çapını 200 µm'nin üzerine çıkartır. Bu duruma sahip oosit ve folikül gelişiminin devamı için Folikül stimule edici hormon (FSH), epidermal büyüme faktörleri (EGF), insülin benzeri büyüme faktörü I (IGF-I), kalsiyum iyonları (Ca²⁺) gibi çeşitli faktörler gereklidir. Stratum granulozum tabakasında 8-12 hücre sayısına ulaşıncaya granüloza hücreleri arasında içi sıvı

ile dolu kaviterler gözlenir. Bu foliküle likör folikülü adı verilir. Likör folikülü glikozaminoglikan, proteoglikan, steroid bağlayıcı protein ve hiyaluronik asit içerir. Hiyalüronik asit yüksek su tutma özelliğine sahip olduğundan dolayı folikül çapının artmasında rol oynamaktadır. Bu sıvı başlangıçta granüloza hücreleri tarafından sentezlenirken ilerleyen aşamalarda plazmadan sentezlenmektedir. Sıvının folikül içerisinde artmasıyla boşluklar birleşmeye başlar ve hilal görünümünde antrum adı verilen içerisi folikül sıvısı ile dolu boşluk meydana gelir. Oluşan bu foliküle sekonder ya da antral folikül adı verilir. Hilal şeklindeki folikül sıvısının kenara doğru çıkıntı yaptığı primer oositin çevresindeki granüloza hücreleri yeniden düzenlenir ve oluşan bu gruba kumulus ooforus adı verilir. Zona pellusidanın bitişiğindeki gevşek düzenlenmiş kübik granüloza hücreleri oositin biraz uzaklaşır fakat primer oosit ile temasını sürdürür. Primer oositi çevreleyen tek tabakalı granüloza hücrelerine ise korona radiata denir. Bu aşamada granüloza hücreleri özelleşmiş görevleri yapmak üzere ikiye ayrılmıştır:

- Membrana granüloza
- Kumulus granüloza hücreleri

Korona radiata hücreleri yüzeyindeki mikrovilluslarla oosit yüzeyindeki mikrovilluslar arasında hücreleri birbirlerine bağlayan aynı zamanda hücreler arası transportu sağlayan *gap junction* tipi bağlantı kompleksleri yer almaktadır. Bu bağlantı kompleksleri gonadotropinlerden salınan hormonların ovulasyon öncesindeki artışı ile oositin salınan çeşitli faktörlerin kumulus ooforus hücrelerine geçişini sağlar ve bu hücreleri hiyalüronik asit salgılama yönünde uyarır. İntersellüler ortamda PAS+ boyanma özelliği gösteren aslında granüloza hücreleri tarafından sentezlenen proteoglikan ve hiyaluronik asitlerdir. Proteoglikan ve hiyaluronik asit içeren bu cisimciklere Call-Exner cisimcikleri denir.

Bu dönemde oositin çapı 125 µm çapa ulaşır ve granüloza hücreleri tarafından folikül sıvısına sentezlenen OMI tarafından oositin büyümesi inhibe edilir. Bu inhibasyon süreci pubertenin başlamasından itibaren ortadan kalkar (15, 22).

Matür (Graaf) Folikül: Granüloza hücrelerindeki proliferasyon folikül çapının 10 mm boyutuna ulaşan foliküle matür (Graaf) folikül adı verilir. Graaf folikül ovaryum yüzeyine doğru çıkıntı yapar. Foliküldeki büyüme devam ettikçe granüloza hücrelerindeki mitotik aktivite yavaşlar ve stratum granulozum tabakası inceler. Granüloza hücreleri arasındaki kaviterler genişlemeyi sürdürürerek oosit ve kumulus ooforus hücreleri arasındaki mesafe artar. Graaf folikülü halindeyken teka tabakaları daha belirgindir. Teka interna hücrelerinin sitoplazmasında steroid sentezleme özelliğine sahip lipid damlacıkları

görölmeye başlar. Puberte ile başlayan gonadotropinlerin etkisi sitimölasyonu ile LH teka interna hücrelerini androjen sentezlemeleri için stimüle eder. Bir kısım androjen granölöza hücrelerinde bulunan granölsüz endoplazmik retikulum tarafından paketlenir ve taşınır. FSH'ın granölöza hücrelerini uyarmasıyla birlikte androjenin östrojene dönüşüm işleml başlar. Östrojenin varlığı granölöza hücrelerinin çoğalmasını, büyümesini ve folikölün boyutunu arttırmak olmak üzere görevleri vardır. Hipofiz bezinin ön lobundan (adenohipofiz) salgılanan FSH veya LH salınımının ani artışı ovulasyondan yaklaşık 24 saat önce uyarır. LH'nın pikine bağı olarak granölöza hücrelerindeki LH reseptörü sayısı düşer ve bununla ilişkili olarak östrojen üretimi olmaz. LH'nın ani artışı pirimer oositin I. mayoz bölünmesini tamamlaması ve II. mayoz bölünmenin metefaz evresinde duraksama evresine girmesine sebep olur. Böylece sekonder oosit ve I. polar cisimciğı olarak adlandırılan kutup cismi oluşur (15, 19, 22).

Korpus Luteum: Ovulasyon sonrası geriye kalan foliköl hücreleri korpus luteum (sarı cisim) halinde yeniden düzenlenir. Korpus luteum endokrin fonksiyon olarak görev yapan özelleşmiş hücre topluluğıdur. İlk olarak meydana gelen değışiklik teka internadaki kapillerlerin foliköl lümenine doğı kanama yapması ile başlamaktadır. Oluşan bu yapıya korpus hemorajikum denilmektedir. Granölöza hücre grubundan kaynaklanan hücelere granölöza lutein, teka interna hücre grubundan kaynaklanan hücelere teka lutein adı verilmektedir. Bu şekilde korpus luteum farklı fonksiyonları yapabilmek için iki tip hücre grubunu içermiş bulunmaktadır. Granölöza lutein hücreleri geniş veziköler nükleusa sahip hücelere olup, sitoplazmalarında lipid damlacıkları bulundurlar. Lipid damlacıklarının özellikleri steroid yapıdaki progesteron sentezi yapmalarıdır. Teka lutein hücelere granölöza lutein hücelere kıyasla daha küçö olup ovulasyon öncesinde yaptığı gibi östrojen sentezi yapmaktadır.

Korpus luteumda sentezlenen hormonlar gebeliğın gerçekteşmesi halinde uterus endometriyumunu zigotun implante olabilmesi için hazırlar. Plasentadaki sinsityotrofoblast hücelere tarafından sentezlenen human koryonik gonadotropin (hCG) korpus luteumdan salgılanan progesteronun gebeliğın üçüncü ayına kadar devam etmesini sağılamaktadır. Gebelik durumu gerçekteşmezse korpus luteum gerileyerek dejenere olmaktadır. Bu yapıya menstruasyon korpus luteumu denilmektedir (15, 19, 22).

Atretik Foliköl: Ovarum gelişim döneminde farklı tip foliköl içermektedir. Foliköllerin büyük çoğunluğu prenatal dönemde başlayıp menepoz dönemine kadar atreziye uğrarlar. Gelişim evresinde olmayan primordiyal foliköllerin atrezisi granölöza hücelereinin apoptozu ile ilişkilidir. Foliköl atreziye uğrarken oosit ilk aşamada büzülmektedir. Daha

sonrasında foliküller dejenere olmaktadır. Bağ dokusu ise atreziye uğramış foliküllerin yerini doldurur.

Gelişim evresine başlamış ancak ovulasyona uğramayan foliküllerin atrezisi, gelişim evresine başlamamış foliküllerle benzemektedir. İlk olarak oosit dejenere olur, zona pellusida şişer, teka interna hücreleri ile folikül hücreleri arasındaki bazal membran kalınlaşıp hiyalinize bir bant şeklinde gözlenen camsı membranı oluşturur. Daha sonrasında folikül hücreleri apoptoza uğrar. Ortadan kalkan hücrelerin yerini bağ dokusu alır ve oluşan skar dokusu korpus albikansa benzemektedir. Korpus albicans küçülür fakat her zaman ovaryumda kalır hiçbir zaman atılmaz (15, 18, 19).

2.4. Yumurtalık Rezervi Anti Müllerian Hormon (AMH)

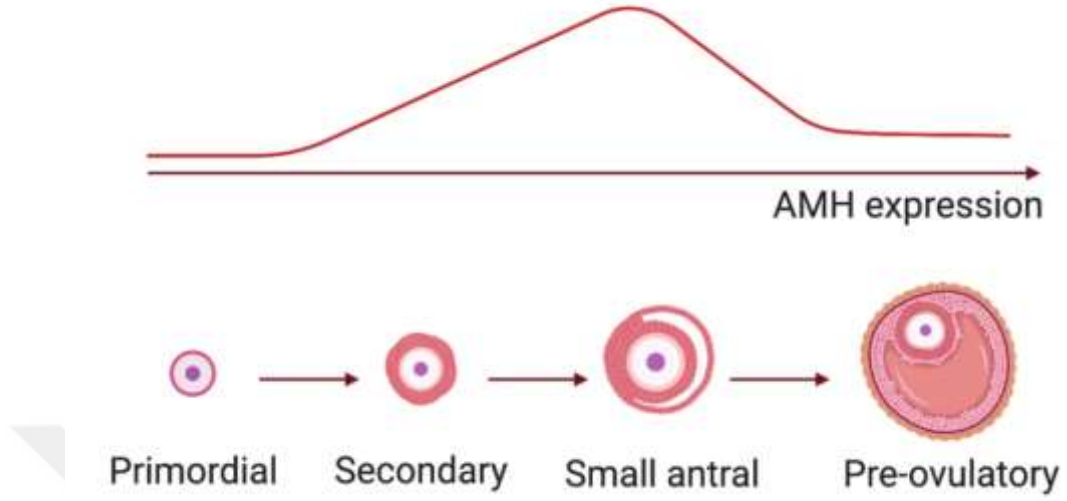
Yumurtalık rezervi dişi üreme sisteminin fonksiyonel işlevi olarak tanımlanmaktadır ve yumurtalıklarda bulunan rezerv oosit sayısının bir belirtecidir. Fetal dönemin 6. Haftasında 10 bin, 8. haftada 600 bin, 20. haftada ise 6 milyon primordiyal germ hücresi bulunur. Bu sayı 20. Haftadan itibaren hızla azalarak doğumda 1 milyon, pubertede 40.000 primer oosit bulunmaktadır.

Pubertenin başlamasıyla birlikte her menstrual siklusa bir oosit olgunlaşarak atılır. Menapoz dönemi başlamadan önceki yıllarda menstrual sikluslar düzensizleşir ve 100 ila 1000 arasında değişen oosit sayısı ile menopoz dönemi başlamaktadır (14, 23).

Primordiyal foliküller puberteden başlayarak menopoz dönemine kadar devamlı olarak ortalama 28 gün sürede bir üreme siklusuna girerler. Bu siklus hipotalamustaki nörosekretuar hücreler yardımıyla gonadotropin salgılayıcı hormon (GnRH) sentezlenmesiyle başlar. GnRH adenohipofizde hipofiz portal sistem aracılığıyla taşınır. GnRH denohipofizde sekresyonu olan ayrıca ovaryumlara etki eden iki hormonun sekresyonunu tetikler. Bu hormonlar folikül stimule eden hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH) dir. FSH ovaryum folikülünün gelişimi ve folikül hücreleri tarafından östrojen salınımını stimüle eder. LH sekonder oositin atılmasını uyarırken aynı zamanda folikül hücreleri ve korpus luteumu uyarak progesteron üretimini sağlar (24).

Mülleryen inhibiting substans (MIS) ismi ile de anılan AMH hormon, Transforming büyüme faktör- β (TGF- β) protein ailesi sınıfından olup, 19. Kromozomda lokalizedir. Birbirine disülfid bağları ile bağlı 70 kDa'dan oluşmuş iki monomerin bir araya geldiği homodimerik bir glikoproteindir (25).

Over rezervini değerlendirmek amacıyla rutin serum analizinde kullanılan FSH, LH ve progesteron hormon analizlerinin yanı sıra AMH son zamanlarda giderek artan incelemeler arasında yer almıştır (26).



Şekil 2.4. AMH'ın folikül üzerindeki etkisi (27)

2.5. Over Fizyolojisi

Dişi hormonal sistem birbirleri ile ilişkili üç temel hormondan oluşmaktadır.

- Hipotalamus tarafından serbestleyici hormon; gonadotropin-serbestleştirici hormon (GnRH)
- Adenohipofizden sentezlenen folikül-uyarıcı hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH). Bu iki hormon heterodimerik yapıda bir glikoproteindir.
- Östrojen ve progesteron hormonları ise ovaryumdan salgılanan hormonlardır.

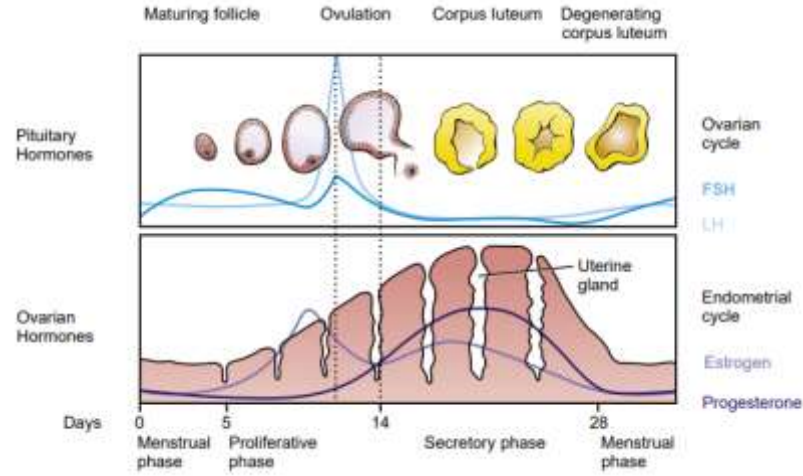
FSH ve LH GnRH'a cevaben salgılanırken; östrojen ve progesteron, FSH ve LH'ya cevaben salgılanmaktadır. Dişilerde menstrual siklusa bağlı olarak bu hormonların salgılanma miktarları değişiklik göstermektedir.

Aylık Ovaryum Döngüsü (Menstruel Döngü)

Üreme çağındaki dişi bireyde, dişi üreme sisteminde görülen fizyolojik değişimler, dişilik karakterize edilen hormonların aylık salgılanma oranındaki değişimler dişilerde menstrual döngü olarak adlandırılır. Menstruel döngü yaklaşık 28 gündür ve bu süre dişi bireyler arasında değişiklik gösterebilmektedir. Menstruel döngünün iki önemli sonucu vardır;

1. Overlerden bir tane ovum gelişir

2. Döllenmiş ovumun implante olması için uterus endometriyumu adenohipofizden salgılanan hormonların etkisiyle her döngüde farklı faz aşamalardan geçerek yenilenir.



Şekil 2.5. Menstruel döngü (28)

Gonadotropik Hormonların Ovaryum Üzerindeki Etkileri

Ovaryumdaki menstural siklustaki değişiklikler hipofizin ön lobundan sentezlenen gonadotropinler olan FSH ve LH'ya bağlıdır. FSH ve LH ile uyarılmayan overler inaktif durumdadır. Bu dönem dişi bireyde 9-12 yaşları arasında menarşın başlaması ile son bulur. FSH ve LH ovaryumdaki hücre zarındaki spesifik reseptörlere bağlanarak aktivasyonu sağlarlar. Aktive olan ovaryum hücresi ovaryumu büyüme ve çoğalma üzerine teşfik eder. LH ve FSH ile birlikte ovaryumdaki inaktivasyonu destekleyici siklik AMP (cAMP) sisteminde değişiklikler meydana gelmesiyle bir dizi enzimin fosforilasyonu sonucu ovaryum aktive olur.

Ovulasyon başlamadan önce ovaryumdaki rezerv folikül havuzundan birkaç tane folikül gelişmeye başlar. Bu foliküllerden bir tanesi daha fazla büyür ve geriye kalan foliküller atrezi adı verilen gerilemeye başlayarak küçülür. Büyümekte olan en büyük folikül daha fazla östrojen salgılar ve hipotalamusta etki ederek ön hipofiz bezinden FSH ve LH salınımının artmasına neden olur.

Büyümesinin son aşamasına gelen bir folikülün LH'nın etkisiyle ovulasyon basamağına gelir. Ovulasyondan 2 gün önce ön hipofiz bezinden LH salınımı ani artış gösterir ve FSH ile birlikte folikülün hızla şişmesini sağlayarak ovulasyon öncesi folikülün 6-10 kat daha genişlemesini sağlar. Aynı zamanda LH granüloza hücreleri ve teka hücrelerine etki ederek bu hücrelerden progesteron salınımını gerçekleştirir. Bu

aşamaya kadar artan östrojen seviyesinin düşmesi ve progesteron seviyesindeki artış ovulasyonun gerçekleşmesini sağlamaktadır.

Oositin folikülden atılmasından sonra ovaryumun içerisinde kalan granüloza hücreleri ve teka interna hücreleri lutein adı verilen salgı hücrelerine dönüşürler. Salgı hücreler büyümeye başladıkça içerisinde biriken steroid yapıda lipid damlacıklarının birikmesi sonucu sarı renkte olurlar. Yeni sentez yeteneği kazanan bu hücre topluluğuna korpus luteum adı verilir. Korpus luteumun gelişmesiyle birlikte damarlaşmada artar.

Granüloza hücreleri sentez yeteneklerinin artmasından dolayı yoğun endoplazmik retikulumlara sahiptir ve başlıca görevi progesteron ve östrojen salgılayan dişi hormonları sentezler. Teka interna hücreleri ise androjen yapıda olan androstenedion ve testosteron salgılar. Androstenedion granüloza hücrelerinde androjen üretilmesini sağlar. Granüloza ve teka interna hücrelerindeki salgı işlevinin başlıca kaynağı adenohipofizden salgılanan LH'a bağlıdır. Gebelik gerçekleştiğinde ise LH'la eşdeğer özelliklere sahip human koryonik gonadotropin (HCG) hormondur. HCG gebeliğin 8-16 haftalık sürecine kadar plasentadan sentezlenerek korpus luteumun devamlılığını gerçekleştirir.

Menstrual siklusun luteal faz döneminde korpus luteum tarafından sekresyonu yapılan östrojen ve progesteron adenohipofize etki ederek FSH ve LH'nın düşük miktarda salınımını sürdürürler. Luteal hücrelerin aynı zamanda inhibin hormonu salgılama özelliğide bulunmaktadır. İnhibin adenohipofize etki ederek FSH salınımını baskılayarak FSH ve LH'nın kanda düşük seviyeye gelerek kaybolmasıyla birlikte korpus luteumun tamamen dejenere olmasına sebep olur. Korpus luteumdan salgılanan östrojen, progesteron ve inhibin adenohipofize etki ederek baskılayıcı geri bildirim ortadan kalkar ve yavaş artışla FSH ve LH'nın dinlenme halindeki rezerv foliküllerin büyümesini destekleyerek menstrual siklusun başlamasını sağlar.

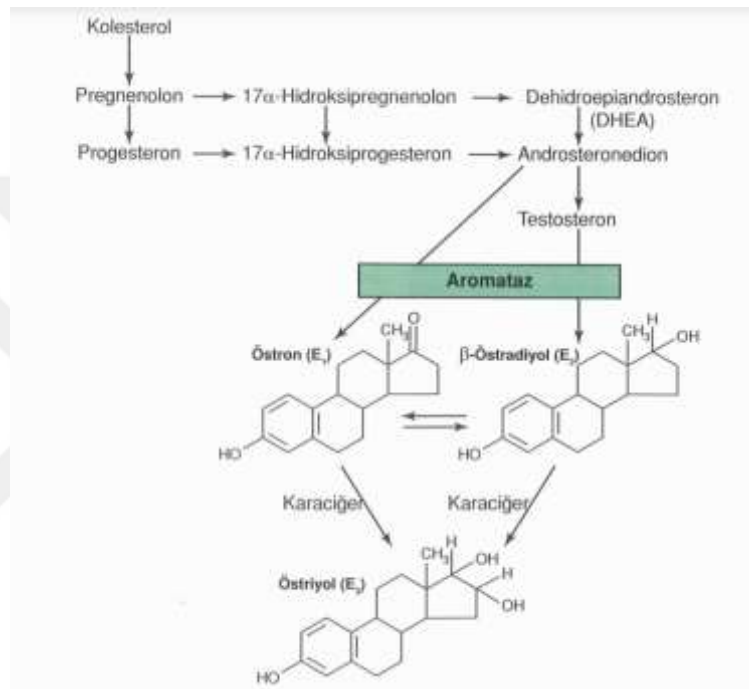
Östradiyol ve Progesteron

Overlerden salgılanan östrojen ve progesteron seks hormonudur. Östrojen sekonder seks karakterini oluşturur ve özgül hücrelerin çoğalmasında görev alır. Progesteron uterusu gebeliğe, meme bezlerini laktasyona hazırlar.

Östrojenler

Gebeliğin gerçekleşmediği kadınlarda östrojen overlerden ve az miktarda adrenal korteksten salgılanırlar. Gebelik gerçekleştiğinde ise 16. haftanın sonlarına doğru plasentadaki sinsityal trofoblastlar tarafından progesteron salgılanır.

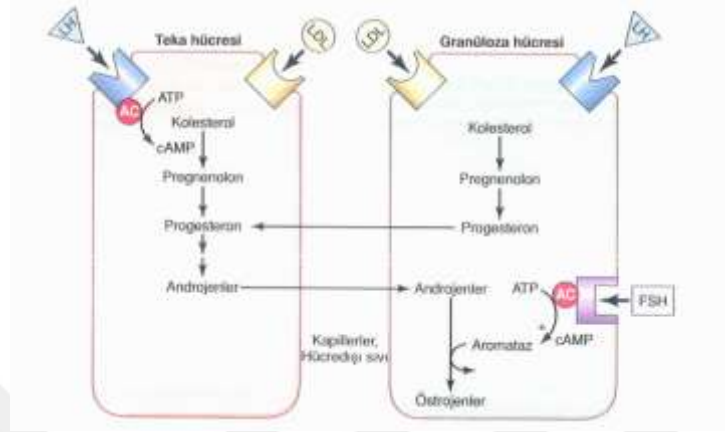
Kan plazmasında üç farklı çeşitte östrojen vardır; östron (E_1), β – östradiyol (E_2) ve östriyol (E_3)’dur. Overlerden salgılanan östrojen tipi β – östradiyol olup az miktarda da östron da salgılanır. Östriyol zayıf östrojen olup östron ve β – östradiyol’ün karaciğerde gerçekleşen oksidatif ürünüdür.



Şekil 2.6. Dişi cinsiyet hormonlarının sentezi (16)

Östojenlerin dolaşımında taşınması plazma albümini ve özel globülinlerle olur. Östrogen çeşitleri; overlerde, teka interna hücrelerinde, granüloza hücrelerinde ve korpus luteumdan salgılanır. Östrogenler androstenedionun aromatisasyonu ile biyosentetik yolla androjenlerden oluşurlar. Aromataz enzimi androstenedionun östrona, testosteronun ise östradiole dönüşümünü katalizleyen enzimdir. Teka interna hücrelerinde bulunan LH reseptörleri LH'nın cAMP üzerindeki etkisiyle kolesterol'den androstenedion'a dönüşmesini artırır. Androstenedion'un da östradiol'e dönüşerek dolaşım sistemine geçer. Teka interna hücrelerinin aynı zamanda granüloza hücrelerine androstenedion salgılar. Androstenedion'un etkisi ile granüloza hücreleri östradiol sentezler. Granüloza hücrelerindeki FSH reseptörleri FSH'ın cAMP üzerinden etki ederek aromataz aktivitesini arttırarak östradiol salgılanmasını önemli ölçüde arttırır. Olgunlaşan folikül

ve granüloza hücreleri LH reseptörü kazanır ve LH östradiol salgılanmasını teşvik eder. Ovulasyonun aktif olduğu dönemlerde ovaryumun stromal dokusunda da östrojen sentezinin gerçekleştiği ancak menapoz döneminde bu sentez eser miktarda gerçekleşmektedir.



Şekil 2.7. Östrojen üretiminde teka ve granüloza hücrelerindeki hücresel değişiklik (16)

Östrojen’ler dişilerde çocukluk döneminde az salgılanmasına karşın menarşın başlamasıyla birlikte yüksek artış göstermektedir. Bu durum dişi genital organların gelişmesine olanak sağlar. Endometriyal bezlerin büyümesi, gebelik gerçekleştiğinde blastokistin beslenmesine yardımcı olurlar.

Östrojen’lere sülfatlar ve glukuronid bağlanarak karaciğerde bir kısmının yıkımı gerçekleşir. Kalan östrojenler safra yolu ve idrar ile atılır.

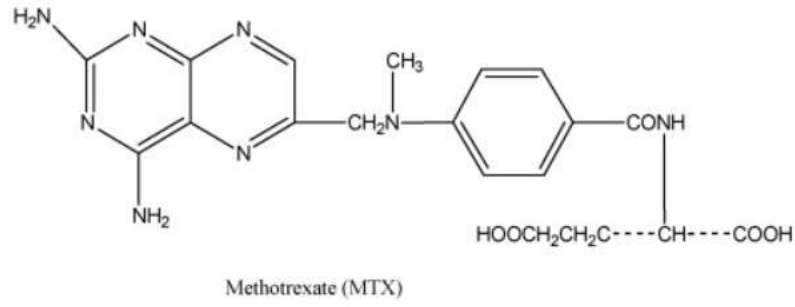
Progrestinler

Progrestin aile sınıfından olan en önemli progrestin progesterondur. Progesteronun en önemli işlevi gebeliğin gerçekleşmediği kadınlarda menstrual siklusun ikinci yarısında uterus endometriyumda salgılamayı başlatarak gebeliğin gerçekleşmesi durumunda blastokistin uterusu implantasyonuna hazırlamaktır. Gebeliğin 16. haftasından itibaren plasentadan yüksek düzeyde progesteron salgılanmaktadır.

Gebeliğin gerçekleştiği durumda göğüslerin büyümesi ve meme bezlerinin salgılayıcı özelliği kazanmasını progesteron hızlandırır (16, 29).

2.6. Metotreksat

Metotreksat, antineoplastik ilaç grubu olan antimetabolit grubundandır. MTX başta otoimmün hastalıklarda inflamasyonu azaltmak üzere lenfoma, akut lenfoblastik lösemi, akut miyeloid lösemi gibi 700 kanser türü tedavisinde 1940’lı yıllarda kullanılmaya başlayan ilaçtır (30).

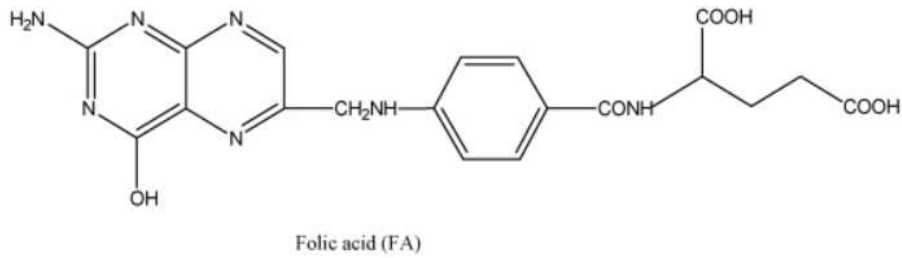


Şekil 2.8. Metotreksat'ın molaküler yapısının şematik gösterimi (31)

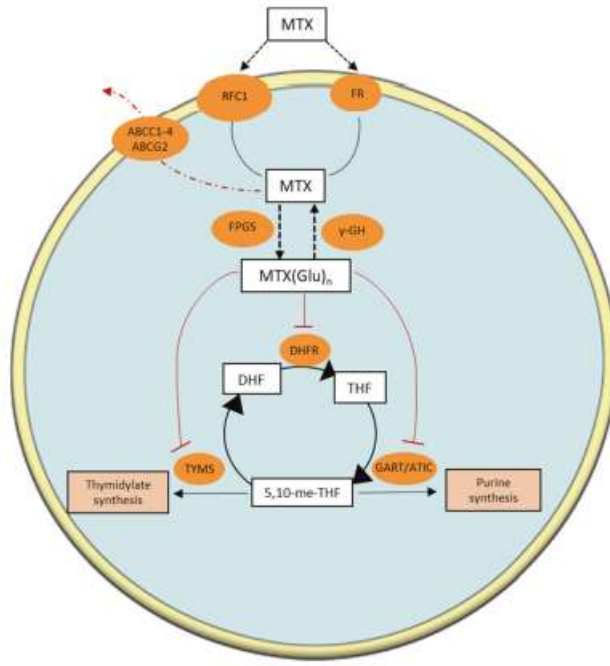
MTX oral, kas içi (iv), damar içi (ip) veya deri altı (sc) olarak uygulanabilir. Gastrointestinal sistemde emilen MTX, aktif transportla ya da N5 – metil FH4'ün taşınmasını sağlayan aktif transport hücre geçişi ile hücre içine girebilir. MTX plazma proteinlerine bağlanarak sistemik dolaşıma katılırlar. MTX'in yarılanma süresi 2 saat olup atılım yarı süresi 6-8 saat arasındadır. MTX büyük oranda böbrekler tarafından atılırken, az miktarda feçes ve safra ile atılımı gerçekleşir (30).

Metotreksat Etki Mekanizması

MTX, Dihidrofolat (DHF) 4-amino-N10-metil antagonistidir. MTX Dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimine bağlanarak enzimin etkinliğini durdurarak inhibe eder ve DHF'nin tetrahidrofolata (THF) dönüşümünü engelleyerek folik asit antagonisti olarak davranır.



Şekil 2.9. Folik asit'in moleküler yapısının şematik gösterimi (31)



Şekil 2.10. Metotreksatın hücre içi mekanizması (32)

DHFR'nin inhibasyonu sonucu hücrede folat koenziminin azalmasına ve biyosentezi için bu koenzimlere bağımlı olan bileşiklerin sentezinin azalmasına neden olur. Bu bileşikler; adenin, guanin, timin nükleotidleri; metiyonin ve serin amino asitleridir. Bu pürin ve piriminid prekürsörleri DNA ve RNA replikasyonu için temel yapıtaşlarıdır ve eksiklikleri hücrede DNA ve RNA replike işlevini yerine getirememesi ile sonuçlanır (33).

MTX kemik iliğinin baskılanması, hepatolojik toksisite, gastrointestinal sistem, üriner sistem, solunum sistemi dahil olmak üzere birçok organ üzerinde potansiyel toksik etkisi bulunmaktadır (34).

Molar gebelik, PKOS sahip dişi bireylerde MTX'in tedavi etkisi bulunmaktadır. Buna karşı sıçanlarda yapılan deneysel çalışmada MTX'in overde gelişmekte olan foliküllerde dejenerasyon ve inflamasyon artışına sebep olduğu bildirilmiştir. Bu durum gelişmekte olan foliküllerin DNA replikasyonundaki işlevi yerine getirememesinden kaynaklı olduğunu göstermektedir (34).

2.7. Vitamin D

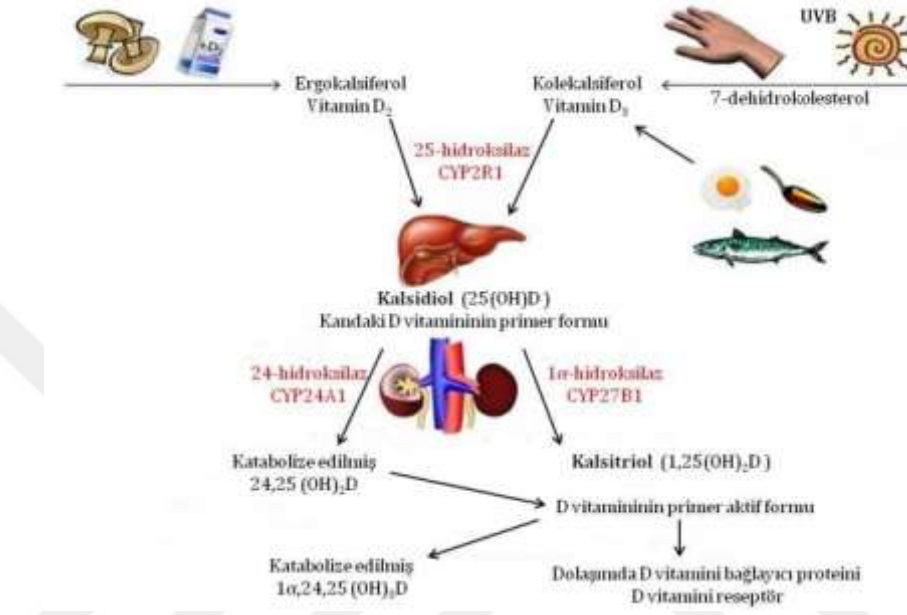
Vitamin D (VD), biyolojik ortamda sentezlenebilmesi ile steroid bir hormon olan aynı zamanda yağda eriyen vitamin sınıfında yer alan parathormondur.

VD, Parathormon (PTH) ile birlikte Ca^{2+} ve fosfat metabolizmasını düzenleyen ikinci büyük hormondur. VD ve PTH çalışma mekanizmaları farklılık göstermektedir.

PTH plazmadaki Ca^{2+} seviyesini koruyup yaptığı işleve göre konsantrasyonu ayarlamaktır (35).

Vitamin D sentezi

VD (kolekalsiferol) bir hormon olup vücutta iki kaynağı vardır. Birinci kaynak diyetle alınır ikincisi ise deride ultraviyole ışık varlığında 7-hidroksikolesterolden sentezlenmektedir.



Şekil 2.11. D vitamininin fizyolojisinin şematik gösterimi (36)

Kolekalsiferol fizyolojik olarak inaktif formda bulunmaktadır. VD'nin dolaşımdaki aktif forma gelebilmesi için ilk olarak karaciğerde inaktif formda olan 25-OH-kolekalsiferole hidroksilenir. Bu hidroksilasyon enerji gerektirdiği için hücrenin endoplazmik retikulumda oluşur ve NADPH, O_2 ve Mg^{2+} gibi kaynaklara ihtiyaç duyar. 25-OH-kolekalsiferol böbrekte iki hidroksilasyon yolundan birine girer. Biri aktif form olan 1,25-(OH)₂-kolekalsiferol plazmada 1α-hidroksilaz enzimi ile C1 pozisyonunda mitokondride katalize edilerek dolaşımdaki aktif formunu kazanmış olur. Diğer inaktif formda olan 24,25-(OH)-kolekalsiferol'dür (35).

25-OH-kolekalsiferol'un aktif veya inaktif metabolit üretmesi böbrek hücrelerinde gerçekleşir ve vücuttaki Ca^{2+} konsantrasyonuna bağlıdır.

Vitamin D Etkileri

25-OH-kolekalsiferol genel rolü hem Ca^{2+} ve fosfat konsantrasyonlarını arttırmak hem de yeni kemiğin minerilizasyonunu sağlamaktır. VD'nin bağırsak, böbrek ve kemik üzerindeki etkileri aynıdır.

1,25-(OH)₂-kolekalsiferol'ün esas etkisi bağırsaklar üzerinde gerçekleşir ve Ca²⁺ emilimini arttırmaktadır. 1,25-(OH)₂-kolekalsiferol bağırsaklarda Ca²⁺ iyonunu bağlayabilen kalbindin D-28K olarak bilinen sitozolik bir VD bağımlı Ca²⁺ bağlayıcı protein sentezini uyarır.

1,25-(OH)₂-kolekalsiferol'ün böbrek üzerindeki etkisi aynı bağırsaklarda gerçekleşen Ca²⁺ ve fosfat emilimini uyarır.

Kemilerde 1,25-(OH)₂-kolekalsiferol'ün rolü kemik rezorpsiyonunu uyarmak için osteoklast aktivitesini PTH ile birlikte eşdeğer hareket eder. Bu mekanizma ters etki olabileceği düşünülse bile yeni kemik yapımını uyarabilmek için eski kemiğin rezorbe edilmesi gereklidir (35).

1,25(OH)₂D'nin spesifik reseptörü VDR sadece bağırsak, böbrek, kemikte değil hemen hemen tüm doku nükleuslarında bulunmaktadır. VD'nin bilinen etkisi Ca²⁺hemostazının sağlanması ve kemik rezorbsiyonunun yanı sıra üreme hücreleri üzerinde de etkisi bulunmaktadır. VDR'nin overde, endometriyumda, plasentada fallop epitel hücrelerinin nükleuslarında eksprese edildiğinden VD'nin dişi üreme sistemi üzerinde etkisi bulunabileceği düşünülmüştür. Klinik çalışmalarda Polikistik Over Sendromu (PCOS) olan bireylerde VD'nin normal ovaryum rezervine sahip bireylerden daha düşük olduğu görülmüştür (37). Yapılan çift kör randomize çalışmasında D₃ takviyesinin infertilite üzerinde olumlu etkisi bulunduğu kanıtlanmıştır (38).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Hayvanlar

Yapmış olduğumuz çalışmada, İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 36 adet, 12 haftalık 170-240 g ağırlığında *Wistar albino* türü dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar, 22-24°C'lik sıcaklık ve bağıl nemde, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık odalarda, dörderli ve beşerli gruplar olacak şekilde ayrıldı. Tüm sıçanlar *ad libitum* standart pellet ve çeşme suyu ile beslendi.

3.2. Kullanılan Ajanlar

Metotreksat için Koçak Farma 15 mg/1.5 ml ve D vitamini için Deva 300.000 IU/ml Devit-3 ampul uygulanmıştır.

3.3. Etik Beyan

Çalışmamızda İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Araştırmaları Etik Kurulu 12874 HAYBİS kayıt numarası ile onaylanmış ve İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Koordinasyon Birimi'nden TYL-2022-2818 proje koduyla desteklenmiştir.

3.4. Deneysel Düzen ve Uygulama Süreci

Sıçanlar rastgele seçilerek kontrol ve D vitamini grubuna 8 adet, MTX ve MTX+D vitamini grubuna 10 adet olmak üzere toplamda 4 gruba ayrıldı ve sıçanların vücut ağırlıkları ölçülerek deney başlangıcındaki ağırlıkları kaydedildi.

Her gruptaki sıçanlar vajinal smear testi için bireysel olarak değerlendirildiğinden kuyruğundan boya kalem ile işaretlendi ve her grup için farklı boya kalemleri kullanıldı.

Gruplar;

- 1. Kontrol Grubu (n=8):** Bu gruba iki hafta haftada iki gün olacak şekilde çözücü ajan i.p uygulandı.
- 2. D Vitamin Grubu (n=8):** Bu gruba haftada iki gün ikişer gün ara iki hafta süre olacak şekilde i.p olarak 10 mg/kg D vitamini uygulandı. D vitamini dozu ve uygulama süresi Yalçın ve ark. yaptığı çalışma referans alındı (39).
- 3. MTX Grubu (n=10):** Bu grup 20 mg/kg tek doz MTX i.p uygulandı. Ayrıca bu gruba iki hafta haftada iki gün olacak şekilde çözücü ajan i.p uygulandı.

Metotreksat dozu ve uygulama süresi Kurt ve ark. ile Mahmoud ve ark. yaptığı çalışma referans alındı (40, 41).

- 4. MTX+D Grubu (n=10):** Bu grup 20 mg/kg tek doz MTX i.p uygulandı ve ertesı gün D vitamini haftada iki gün iki hafta olacak şekilde 10 mg/kg i.p uygulandı.

İki haftalık deney uygulama süresinin ardından sıçanlardan vajinal smear örneği alınarak proestrus evresinde olduğu tespit edilenler aynı gün 1.2g/kg i.p etil karbonat anestezisi altında kan numuneleri ve ovaryum dokuları alındıktan sonra sıçanlar sakrifiye edildi. Takip eden dört gün içerisinde proestrusda olan tüm sıçanlardan histolojik inceleme yapılması için sağ ovaryum etrafındaki yağ dokusu dikkatlice temizlendikten sonra %10'luk formaldehit solüsyonuna alınarak fiksasyonu sağlandı. Sol ovaryum biyokimya analizi için -80 °C'de muhafaza edildi.

Anestezi altında olan sıçanların orta hat boyunca batınları açılarak *Vena cava inferiordan* biyokimyasal analizler için kan örnekleri alındı. Kan örnekleri steril, antikoagölasyonlu kan tüplerinde on dakika bekledikten sonra 3000 rpm'de on dakika santrifüj edildi. Elde edilen serum örnekleri biyokimyasal analizde kullanılmak üzere steril ependorf tüplere alınarak -80°C'de muhafaza edildi.

3.4.1. Menstrual Siklus Evrelerinin Tespiti

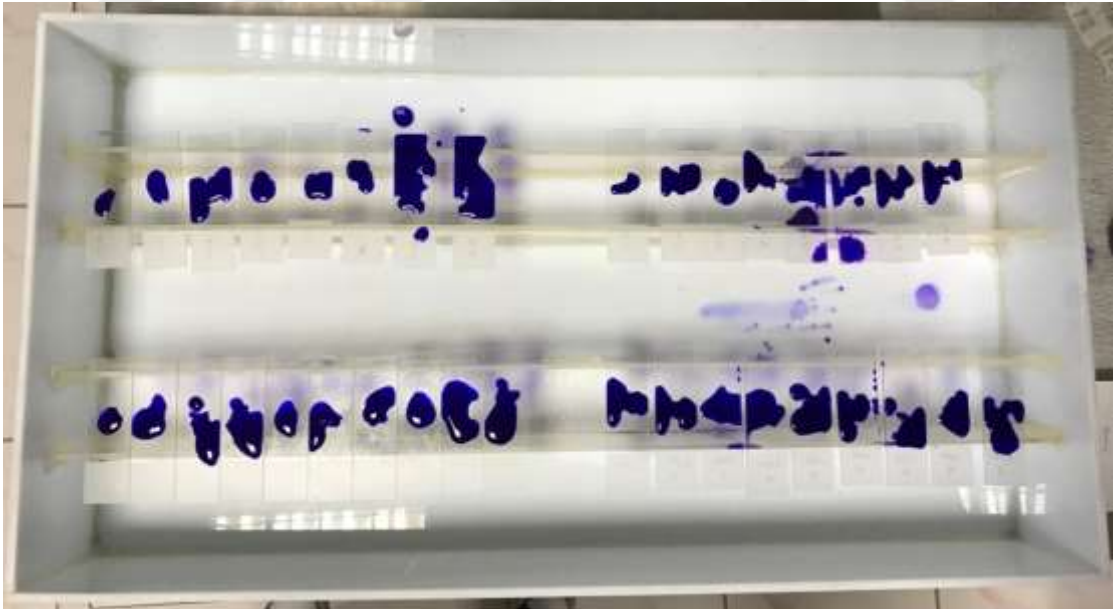
Hayvanların vajinal smear testine hazırlanması için sakrifiye edilme sürecinden bir hafta önce vajinal smear testine başlandı. İki haftalık çalışma sürecinin bitmesini takiben tüm sıçanlardan her gün aynı saatte vajinal smear testi yapıldı.

Vajinal plak açıklığı tespit edilen sıçanlara, pastör pipet ile 0.5 ml double distile su (ddH₂O) verildi ve sıçanlar ile aynı numaraya sahip lamaların orta düzlemine örnekler yayıldı ve oda sıcaklığında kuruması sağlandı.



Şekil 3.1. Gruplara ayrılan vajinal smear örnekleri

Lamlar kurduktan sonra krezil violet boyası ile üç dakika boyama işleminin ardından çeşme suyunda yıkanan numuneler kurutulduktan sonra ışık mikroskopunda incelendi. Proestrous evresinde olan sıçanlar tespit edilip ayrıldıktan sonra sakrifiye edildi.



Şekil 3.2. Kuruyan smear örneklerinin krezil violet boyası ile boyanması

Rat menstrual siklusu literatürde belirtilen kriterlere göre yapılmıştır.

1. **Proestrous evresi:** LH'nın yüksek olduğu dönemde ovulasyonun gerçekleştiği dönemdir. Östradiol seviyesinde azalma gerçekleşir. Işık mikroskopik incelemede kümeler halinde epitel hücreleri izlenir.
2. **Estrous evresi:** Ovulasyonun gerçekleştiği dönemdir. Vajinal lümende döküntüler olduğu için çekirdeği olmayan keratinize epitelyal hücreler görülmeye başlar.
3. **Metestrous evresi:** Uterusun superfisyalis tabakasındaki epitel tabakada yoğun nötrofil göçü yaşandığından dolayı vajinal smear örneklerinde dejenere epitel hücreleri ve yoğun nötrofil lökositler izlenir.
4. **Diestrous evresi:** Epitel hücrelerinin rejenerasyonu socunda normal epitel hücrelerinde azalma ve lökosit hücreleri izlenir (42).

3.5. Histolojik Teknikler

3.5.1. Doku Takibi ve Kesit Alma

Ovaryum dokuları 24-36 saat %10 formaldehit solüsyonunda fiksasyon işlemini tamamladıktan sonra Tissue-Tek VIP marka doku takip cihazında, rutin doku takip basamakları işlemine tabi tutuldu. Doku takip işlemi tamalanan ovaryum dokuları Leica EG 1160 cihazda parafin bloklara gömüldü. Ovaryum folikül sayımı için, parafin bloklara gömülü ovaryum dokularından, Leica RM2145 marka mikrotomu ile 3 µm kalınlığında 10 seri kesit alındı. Alınan birinci, beşinci ve onuncu kesitlere hematoksilen-eosin boyama yapılarak foliküller sayıldı. VDR ve caspase-3 İmmünohistokimyasal (IHC) değerlendirme için seri kesitten sonra alınan kesitler polilizin kaplı lamlara alındı. Masson Trikrom üçlü boyama metodu kullanılarak bazal membran analizi yapıldı. Mast hücrelerinin sayımı için Toluidin Mavisi boyası kullanıldı.

3.5.2. Histolojik Doku Takip İşlemleri

Tablo 3.1. Histolojik doku takip işlemleri sıralaması

Histolojik Doku Takip İşlemleri Sıralaması	
1. Musluk suyu	40 dakika
2. %10 Formalin	40 dakika
3. %80 Alkol	1 saat
4. %96 Alkol	1 saat
5. %96 Alkol	1 saat
6. Absolü alkol	1 saat
7. Absolü alkol	1 saat
8. Ksilen	1 saat
9. Ksilen	1 saat
10. Ksilen	1 saat
11. Parafin	1 saat
12. Parafin	1 saat
13. Parafin	1 saat
14. Parafin	1 saat

3.5.3. Mayer's Hematoxylen-Eozin (HE) Metodu

Tablo 3.2. Mayer's hematoxylen-eozin (HE) metodu

Mayer's Hematoxylen-Eozin Metodu Sıralaması	
1. İnkübasyon (60 °C)	1 saat
2. Ksilen	5 dakika x 3
3. Absolü alkol	3 dakika
3. %96 Alkol	3 dakika x 4
4. %80 Alkol	3 dakika
5. %70 Alkol	3 dakika
6. Çeşme suyu	5 dakika
7. Distile su	5-10 saniye
8. Mayer's hematoxylen	15 dakika
9. Çeşme suyu	5 dakika x 3
10. Eosin	2 dakika
11. %96 alkol	3 dakika x 4
12. Absolü alkol	3 dakika x 2
13. Ksilen	5 dakika x 3

3.5.4. Masson Trikrom Boyama Metodu

Tablo 3.3. Masson trikrom boyama metodu

Masson Trikrom Boyama Metodu Sıralaması	
1. İnkübasyon (60 °C)	1 saat
2. Ksilen	5 dakika x 3
3. %96 Alkol	3 dakika x 4
4. Distile su	1 dakika
5. Boin fiksatif (60 °C)	1 saat
6. Çeşme suyu	1 dakika
7. Demirli hematoksilen	5 dakika
8. Çeşme suyu	4 dakika
9. Biebrich-scarlet asit fuksin	7 dakika
10. Çeşme suyu	30 saniye
11. Distile su	30 saniye
12. Fosfofungustik asit	2 dakika
13. Distile su	30 saniye
14. Light green (%2)	4 dakika
15. %5 Fosfofungustik asit	45 saniye
16. %96 Alkol	30 saniye
17. Absolü alkol	30 saniye
18. Ksilen	2 dakika

3.5.5. İmmünohistokimya Boyama Metodu

Tablo 3.4. İmmünohistokimya boyama metodu

İmmünohistokimya Boyama Metodu Sıralaması	
1. İnkübasyon (60 °C)	1 saat
2. Ksilen	5 dakika x 3
3. %96 Alkol	3 dakika x 4
4. Distile su	1 dakika
5. Antijen geri kazanımı	Sitrat Tamponunda, 121 °C, 15 dakika
6. Distile su	1 dakika
7. PBS	1 dakika
8. Hidrojen peroksit blok	15 dakika
9. PBS	1 dakika
10. Protein blok (UV block)	5 dakika
11. Primer antikor	60-90 dakika
12. PBS	1 dakika
13. Sekonder antikor	15 dakika
14. PBS	1 dakika

15. Streptevadin Peroksidaz	15 dakika
16. PBS	1 dakika
17. AEC Kromojen	10 dakika
18. PBS	1 dakika
19. Distile su	1 dakika
20. Mayer's hemotoksilen	5 dakika
21. Musluk suyu	1 dakika
22. Distile su	1 dakika

3.5.6. Toluidin Mavisi Boyama Metodu

Toluidin mavisi solüsyon hazırlama prosedürü;

- 0.5 gr Toluidin mavisi ve 200 cc ddH₂O çözdürülür ve 1 ml glasiyal asetik asit eklenir.

Tablo 3.5. Toluidin mavisi boyama metodu

Toluidin Mavisi Boyama Metodu Sıralaması	
1. İnkübasyon (60 °C)	1 saat
2. Ksilen	5 dakika x 3
3. %96 Alkol	3 dakika x 4
4. Distile su	1 dakika
5. Toluidin mavisi solüsyonu	4 dakika
6. Musluk suyu	1 dakika
7. %96 alkol	30 saniye
8. Absolu alkol	30 saniye
9. Ksilen	2 dakika

3.5.7. Krezil Violet Boyama Metodu

Krezil Violet solüsyon hazırlama prosedürü;

- 0.1g krezil violet ve 100 ml ddH₂O çözdürülür ve filtrasyon yapmadan önce 0.3 ml glasiyal asetik asit eklenir.

Tablo 3.6. Krezil violet boyama metodu

Krezil Violet Boyama Metodu Sıralaması	
1. Krezil violet	3 dakika
2. Çeşme suyu	1 dakika

3.6. Histolojik Analizler

Folikül Sayımı

Tissue-Tek VIP/SAKURA marka cihaz kullanılarak doku takibi yapılan ovaryum dokuları parafin bloklara gömüldükten sonra Leica RM2145 marka mikrotom cihazıyla 3 µm'lik kesitler alındı. Bütün sıçanların ovaryumlarından alınan 1. 5. ve 10. kesitler Leica Autostainer XL marka cihazda H-E boyama yapıldıktan sonra Leica – CV 5030 marka preparat kapama cihazı kullanılarak entellan ile kapatıldı. Preparatlar Leica DCF280 ışık mikroskobu ve Leica Q görüntüleme analiz sisteminde incelenerek primordiyal, primer, sekonder, tersiyer ve atretik foliküllerin sayımı Pedersen sınıflandırmasına göre yapıldı (43).

Primordial folikül: Tek katlı yassı epitelle sarılı foliküller

Primer folikül: Tek katlı kübik granüloza hücreleri ile çevrili veya birden çok granüloza hücre tabakası ile çevrili foliküller

Sekonder folikül: Granüloza hücre tabakasında antrum bulunan foliküller

Graaf folikül: Geniş antrumu olan ve kumulus ooforusu oluşan foliküller

Atretik folikül: Oosit ve folikül hücrelerinin dejenerasyona uğradığı foliküller

Mast hücre sayımı

Over dokusunda toluidin mavisi ile boyanmış mast hücrelerinin sayısını belirlemek amacıyla her preparatta 10 farklı alan X400 büyütmede incelendi.

İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Over dokusunda pozitif immünoreaktiviteyi değerlendirmek için her kesitteki 5 farklı alan X400 büyütmede incelendi. İncelemede ortalama kaspaz-3 ve VDR immünopozitif hücre sayıları beş farklı alanda sayılarak değerlendirildi.

3.7. Biyokimyasal Analiz

Biyokimyasal analizlerin yapılacağı gün -80°C'den çıkarılan serum numuneleri +4°C'de muhafaza edildi. Çalışmada spesifik ELISA kitleri kullanıldı.

Tablo 3.7. Biyokimya analizinde kullanılan ELISA kitleri

	MARKA	KATOLOG NO
1. TAS	Rel Assay, Türkiye	EK21122A
2. TOS	Rel Assay, Türkiye	KM2116O
3. FSH	SunRed, China	201-11-0183
4. LH	SunRed, China	201-11-0180
5. Östrojen (E)	SunRed, China	201-11-0177
6. AMH	SunRed, China	201-11-1246
7. Vitamin D (VD)	SunRed, China	201-11-0016
8. Kalsiyum (Ca)	SunRed, China	201-11-0949
9. Fosfor (P)	Rel Assay, Türkiye	EK2101P

FSH, LH, AMH, E, VD, Ca ölçümü yapılması için numuneler kendi monoklonal antikorlu kalplı 96 well plate içerisine 40 µl numune, seri dilüsyondan geçirilmiş 50 µl standart olacak biçimde kuyucuklara eklendi ve kör kuyucuk boş bırakıldı. Numune kuyucukların içine 10 µl sekonder antibody ve 50 µl Streptavidin-HRP konjugat ilave edildi. Plate'nin yüzeyi kapatılarak 37°C de bir saat inkübasyon için bekletildi ve immün reaksiyon kurması sağlandı. Her kuyucuğa 350 µl yıkama solüsyonu eklendi ve tüm kuyucuklara eklenmesinden sonra plate ters çevrilerek kuyucuklar boşaltıldı. Yıkama işlemi 5 kez tekrarlandıktan sonra immün reaksiyon veremeyen enzimler uzaklaştırıldı. Yıkama sonrası plate tamamen kurutulduktan sonra 50'şer µl kromojen A ve kromojen B

solüsyonu eklenerek plate'nin yüzeyi şeffaf etiket ile kapatılarak 37°C de 10 dakika inkübasyon için bekletildi. İnkübasyon sonunda rengi değişip mavi rengini alan kuyucuklar içerisine 50 µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyonun durdurulması sağlandı. Reaksiyonun durdurulması ile beraber kuyucukların içerisindeki renk maviden sarı halini aldı. Stop solüsyonunun eklenmesini takiben yaklaşık 10 dakika içerisinde ELISA reader cihazında plate'ler 450 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak sonuçlar kit protokolüne göre değerlendirildi.

Fosfat (P) tayini için, asitde amonyum molibdatın inorganik fosfat ile reaksiyon sonucu sarı renkli fosfomolibdat forma dönüşür. Oluşan renk 340 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülerek inorganik fosfat tayini yapıldı (44).

Toplam oksidan seviye (TOS) ölçümünde kitin çalışması, numunedeki oksidanların ferröz iyon-o-dianisidine kompleksini ferrik iyonla oksidasyonu sonucu gerçekleşmesidir. Oksidasyonun gerçekleşebilmesi için reaksiyon medyumunda gliserol molekülü bulunması gereklidir. Asidik ortamda ferrik iyonlar, xlenol orange kromojeniyle oluşturduğu renkli kompleksin yoğunluğu 530 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülür (45).

Total antioksidan seviye (TAS) ölçümünde kit pH'ı 3.6, 30 mmol/L asidik asetat tamponunda hidrojen peroksitin de eklenmesiyle redükte bulanık mavi-yeşil renkteki ABTS radikalini renksiz indirgenmiş ABTS^{•+} okside formuna dönüşür. Asetat tamponunda bulanık mavi-yeşil ABTS^{•+} molekülleri bir süre kararlı kalırken asetat tamponunun dilüe edildiğinde solüsyonun rengi açık renge dönüşmeye başlar. Tepkime sonrası rengin açılma dercesi numunede bulunan toplam antioksidan kapasitesi ile doğru orantılıdır. Toplam antioksidan kapasitesi, E vitamini analogu trolox solüsyonu ile kalibre edilir. Bu kalibrasyon sonunda reaksiyon 600 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüm yapılır (46).

3.8. İstatiksel Analiz

Tüm gruptaki gözlem sayısı 10'un üzerinde olmadığı için karşılaştırmalarda parametrik olmayan testler kullanılmıştır. Sayısal bulgular medyan, minimum ve maksimum değerler ile özetlenmiştir. Bağımsız grup karşılaştırmalarında Kruskal-Wallis testi ve sonrasında Conover ikili karşılaştırma yöntemi kullanılmıştır. Bağımlı iki grup karşılaştırmaları Wilcoxon eşleştirilmiş iki örneklem testi ile yapılmıştır. Tüm testlerde iki-yönlü anlamlılık düzeyi 0.05 olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Hayvanların Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Tüm gruptaki hayvanlar deney başlangıcından hemen önce ve deney sonlanmasını takiben kilo alımı karşılaştırıldığında MTX+D grubu hariç gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$). Hayvan kilo alımlarının karşılaştırılması Tablo 4.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Deney başlangıcı ve deney sonu hayvan kilo alımlarının karşılaştırılması

	Deney Başlangıcı Hayvan Ağırlığı	Deney Sonu Hayvan Ağırlığı	Farkın İstatistiği	p
Kontrol	186.5 (177-194)	208 (200-218)	18 (-10-38)	0.017
D Vit	208 (191-218)	225 (203-240)	21.5 (6-33)	0.012
MTX	205 (200-211)	224 (215-236)	17 (9-36)	0.008
MTX+D	219 (211-253)	237.5 (220-276)	21 (-33-44)	0.059
p=0.537				

4.2. Ovaryum Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deney sonu ovaryum ağırlıkları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P>0.05$). Ovaryum ağırlıklarının karşılaştırılması Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.

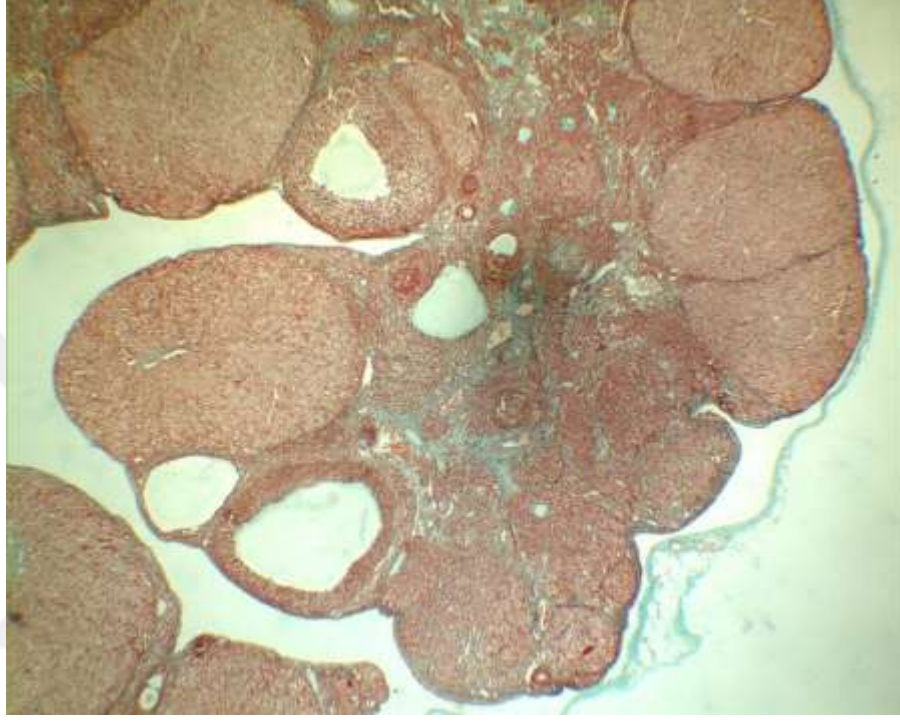
Tablo 4.2. Ovaryum ağırlıklarının karşılaştırılması

	Kontrol	D Vit	MTX	MTX+D	p
Ovaryum Ağırlığı	0.125 (0.1-0.24)	0.135 (0.11-0.20)	0.12 (0.09-0.15)	0.12 (0.11-0.59)	0.474

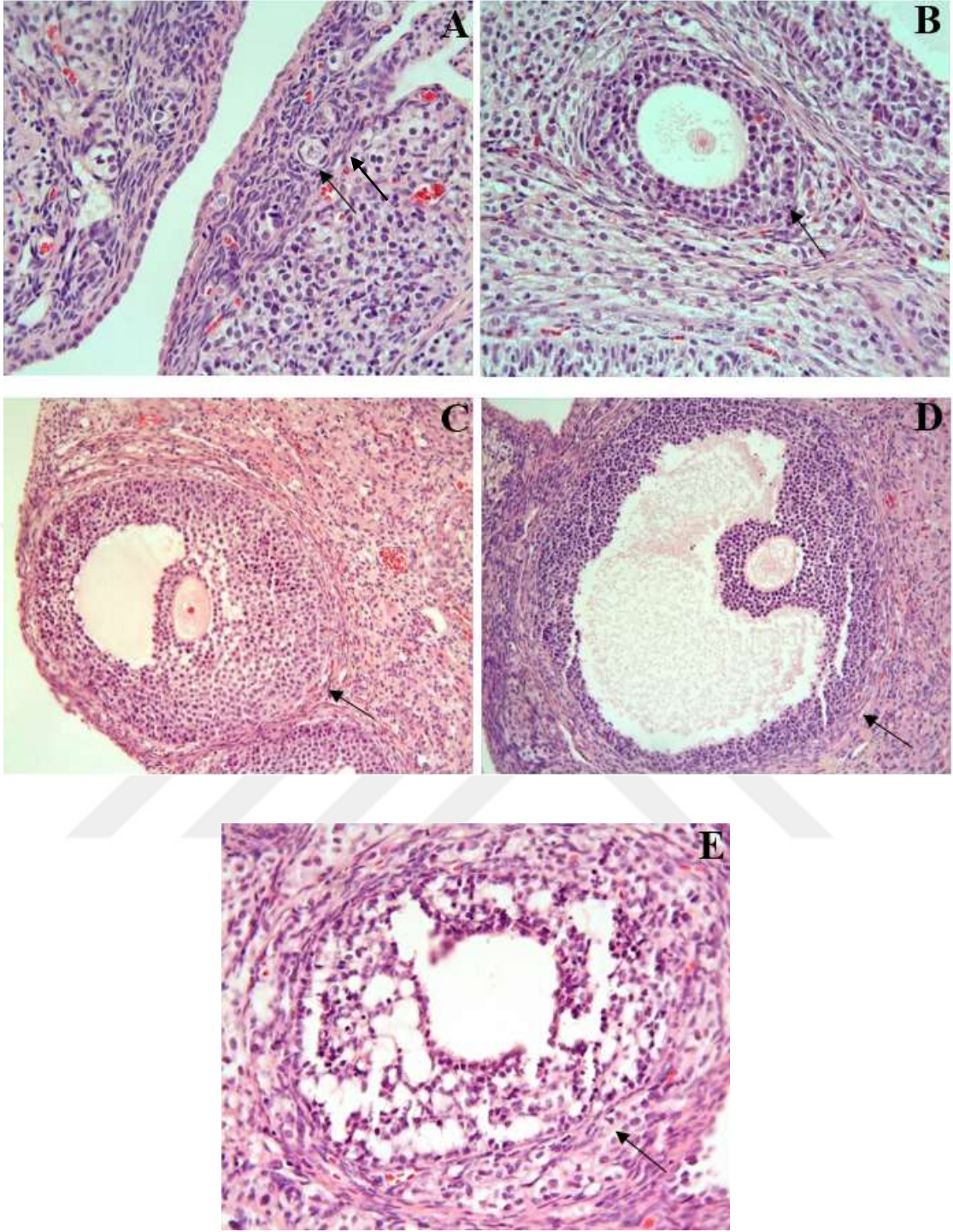
4.3. Histopatoloji ve İmmünohistokimyasal Bulgular

Kontrol Grubu

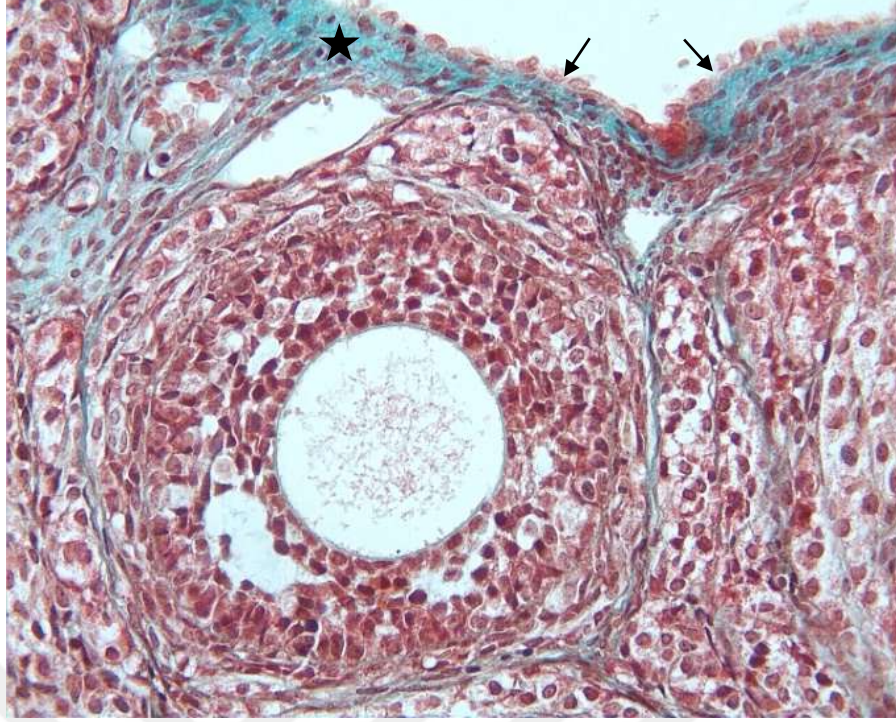
Masson's trikrom boyama metodu uygulanmış kesitlerde ovaryum ince fibröz bağ dokudan oluşan bir kapsül ile çevrelenmişti (Şekil 4.1, Şekil 4.2). Üst kısmında germinal epitel kübik şekilli hücrelerden oluşmaktaydı (Şekil 4.3).



Şekil 4.1. Kontrol grubu. Ovaryum dokusunun genel histolojik görünümü MT X40.



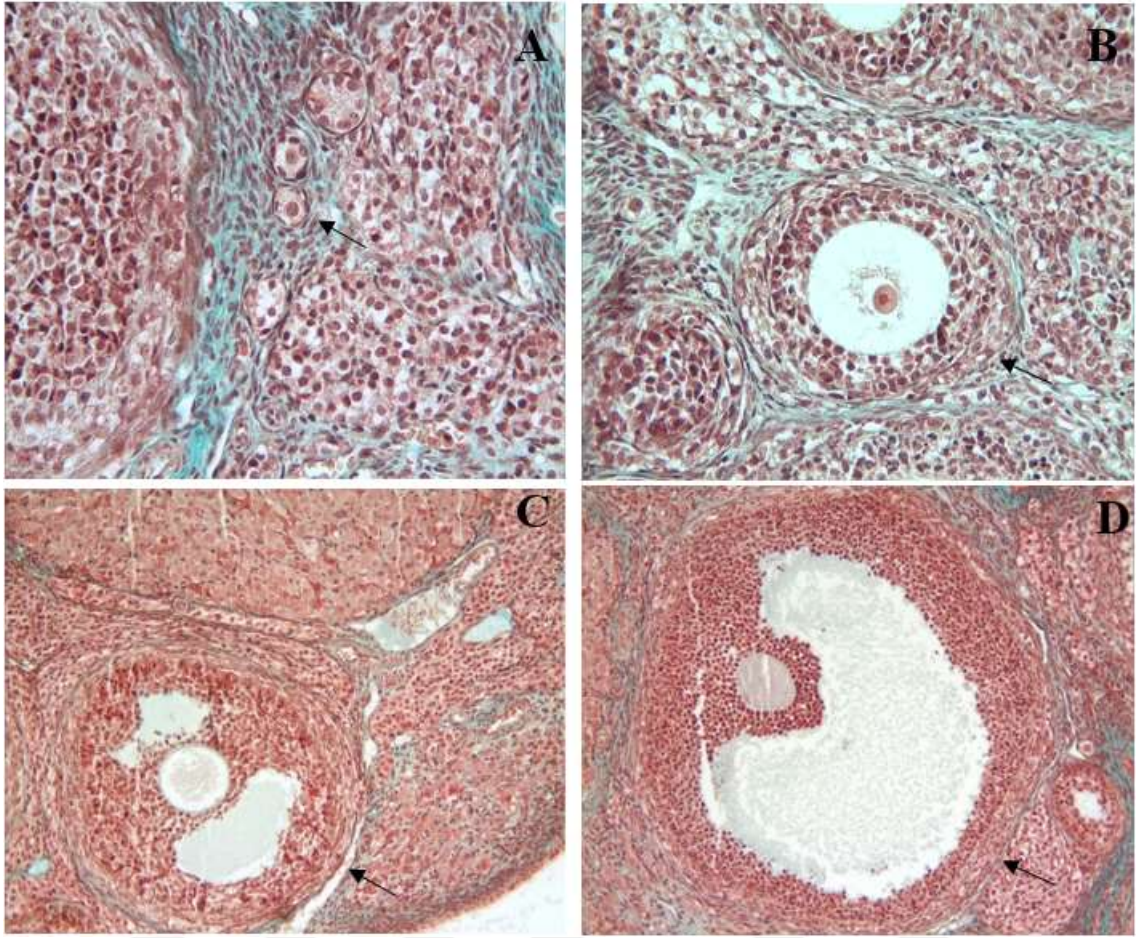
Şekil 4.2. Kontrol grubu. (A) Primordiyal folikül (ok), (B) Primer folikül (ok), (C) Sekonder folikül (ok), (D) Graaf folikül (ok) ve (E) Atretik Folikül (ok). H-E X400.



Şekil 4.3. Kontrol grubu. Tunika albuginea (yıldız) ve germinal epitelin (oklar) görünümü. MT X400.

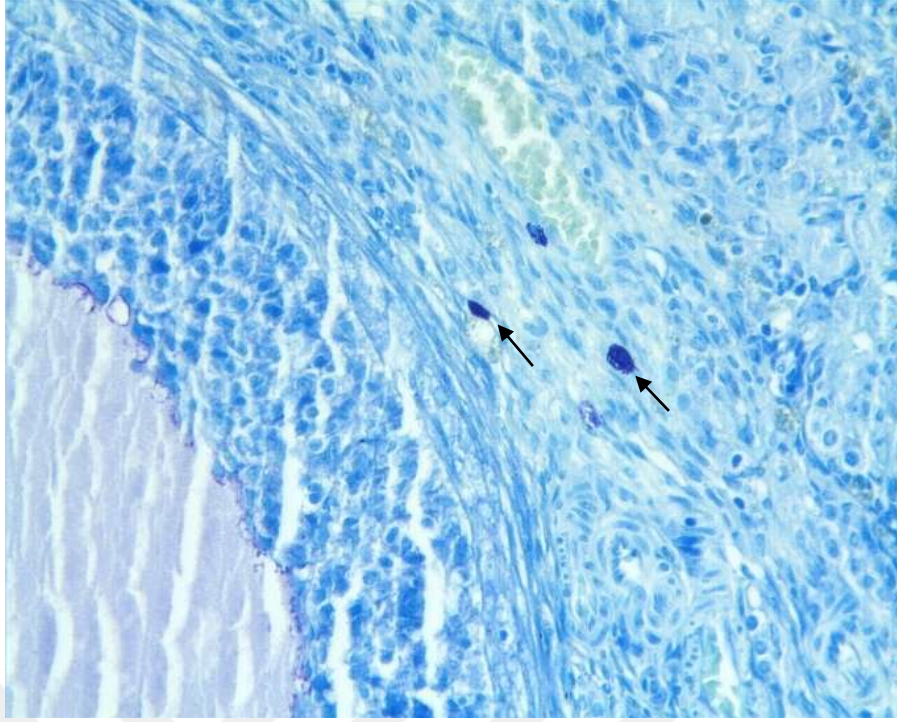
Korteks bölgesinde ovaryum dokusu içerisinde primordiyal foliküller, çeşitli büyüklüklere sahip primer, sekonder ve graaf foliküller ile birlikte korpus luteum yer almaktaydı (Şekil 4.2, Şekil 4.4). Foliküllerde bulunan oosit ve zona pellusida düzenli ve normal görünümdeydi. Foliküllerin etrafında bulunan granüloza hücreleri poligonal, eozinofilik sitoplazmalı olup nükleusları kromatinden zengin ve yuvarlaktı. Stroma içinde foliküller arasında yerleşmiş interstisyel hücreler bulunmaktaydı. Vasküler yapılar normal olarak gözlemlendi. Bazı kesitlerde atrezik foliküllere rastlandı.

Bu grupta ortalama folikül sayısı; primordiyal folikül 58, primer folikül 24.5, sekonder folikül 23, graaf folikül 27, korpus luteum 38.5, atretik folikül 2.5 olarak ölçüldü (Tablo 4.3, Şekil 4.45).



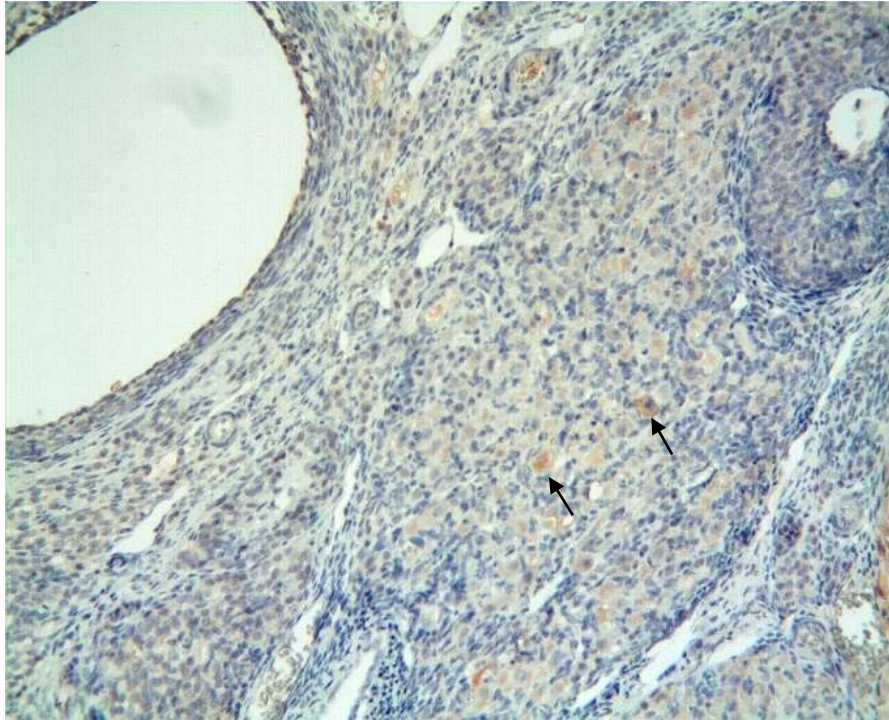
Şekil 4.4. Kontrol grubu (A) Primordiyal folikül (ok), (B) Primer folikül (ok), (C) Sekonder folikül (ok), (D) Graaf folikül (ok) MT X400.

Toluidin mavisi boyama metodu uygulanan kesitlerde, mast hücreleri menekşe renginde boyanan granülleri ile ayırt edildi (Şekil 4.5). Bu grupta ortalama mast hücre sayısı 3.5 olarak tespit edildi (Tablo 4.4, Şekil 4.46).

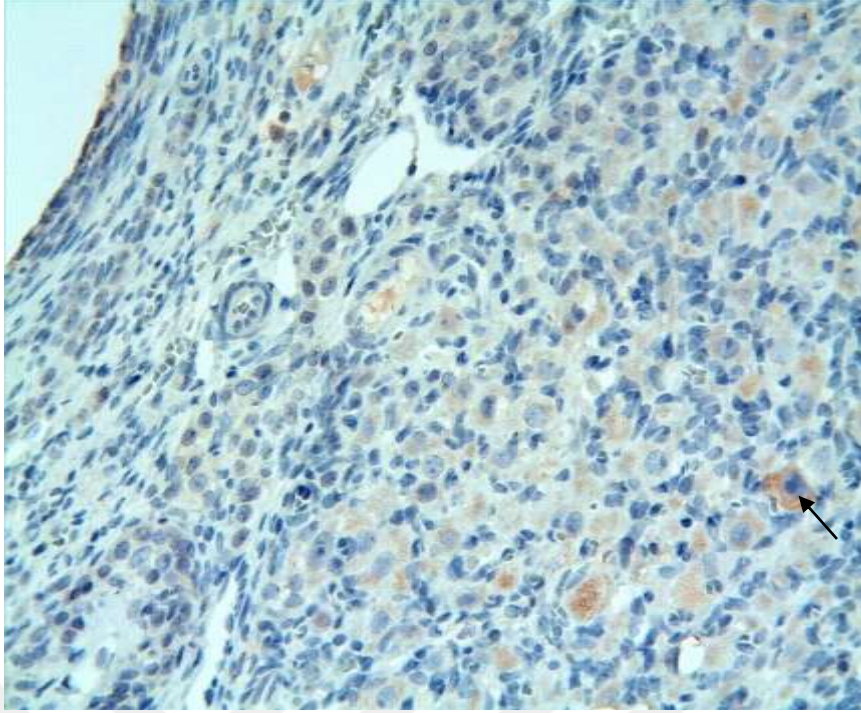


Şekil 4.5. Kontrol grubu. Mast hücrelerin görünümü (oklar) Toluidin mavisi X400.

Kaspaz-3 immün boyama yöntemi ile pozitif immünoreaktivitede bulunan hücrelerin sitoplazmaları kahverengi tonlarında boyandılar (Şekil 4.6, Şekil 4.7). Bu grupta ortalama kaspaz-3 (+) hücre sayısı 39.6 olarak tespit edildi (Tablo 4.5).

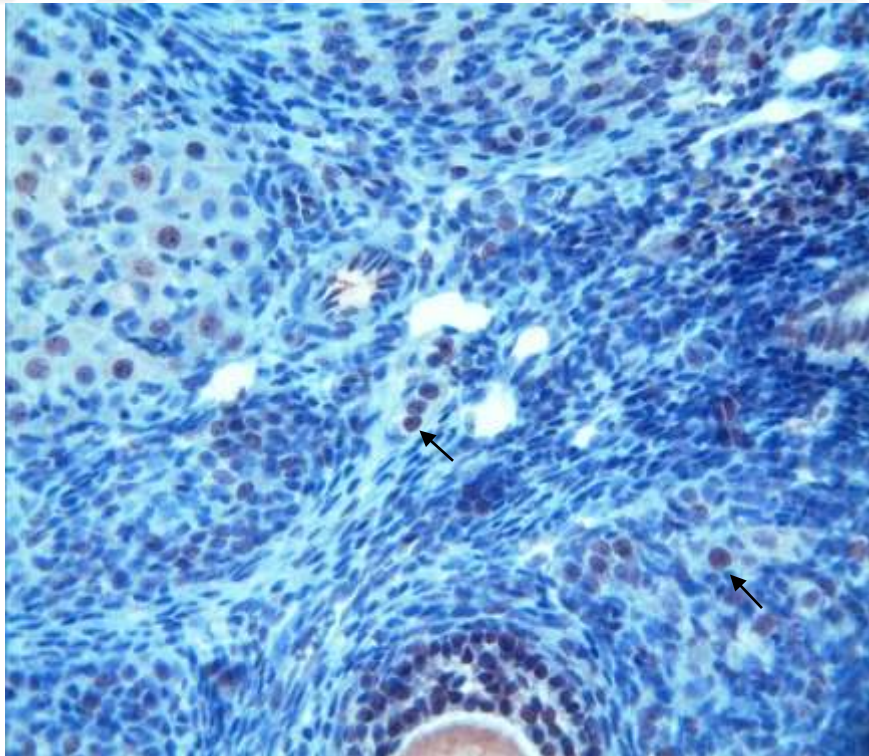


Şekil 4.6. Kontrol grubu. Kaspaz-3 pozitif hücrelerin görünümü (oklar) Kaspaz-3 X200.



Şekil 4.7. Kontrol grubu. Kaspaz-3 pozitif hücrelerin görünümü (ok) Kaspaz-3 X400.

VDR immün boyama yöntemi ile pozitif reaksiyon gösterilen hücrelerin nükleusları kahverengi tonlarında boyandılar (Şekil 4.8). Bu grupta ortalama VDR (+) hücre sayısı 22 olarak tespit edildi (Tablo 4.5).



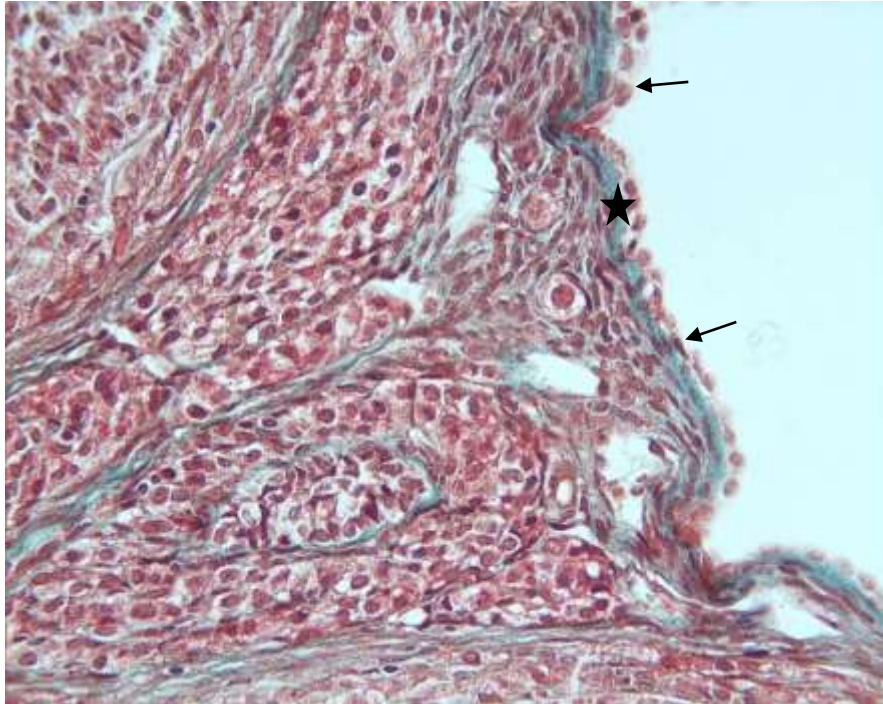
Şekil 4.8. Kontrol grubu. VDR pozitif hücrelerin görünümü (oklar) VDR X400.

D vitamini Grubu

Bu grupta ovaryum, normal histolojik görünümüne sahipti. Kontrol grubuna benzer şekilde ince fibröz bağ dokudan oluşan bir kapsül ile çevrelenmişti (Şekil 4.9). Üst kısmında germinal epitel kübik şekilli hücrelerden oluşmaktaydı (Şekil 4.10).

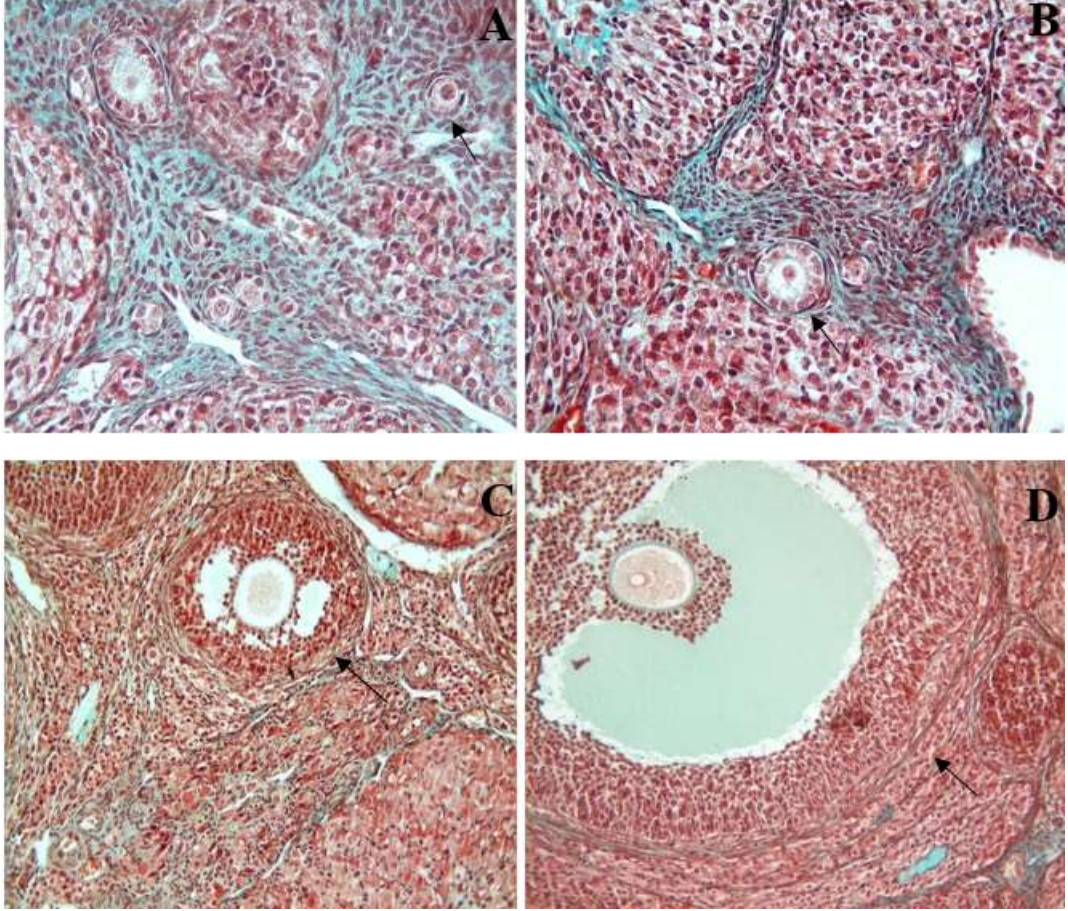


Şekil 4.9. D Vit grubu. Ovaryum dokusunun genel histolojik görünümü MT X40.



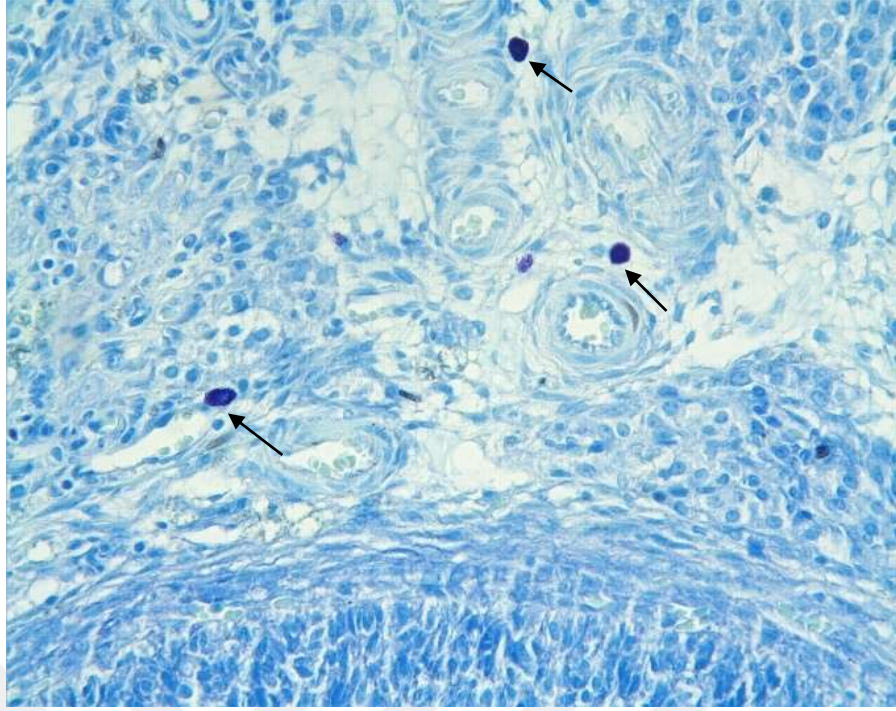
Şekil 4.10. D Vit grubu. Tunika albuginea (yıldız) ve germinal epitelin (oklar) görünümü. MT X400.

Kortekste ovaryum dokusu içerisinde primordiyal folliküller, çeşitli büyüklüklerde primer, sekonder ve graaf folliküller ile birlikte korpus luteum yer almaktaydı (Şekil 4.11). Folliküllerde bulunan oosit ve ona ait zona pellusida düzenli ve normal görünümdeydi. Bu grupta ortalama folikül sayısı primordiyal folikül 68.5, primer folikül 31, sekonder folikül 25, graaf folikül 34.5, korpus luteum 58, atretik folikül 7.5 olarak ölçüldü (Tablo 4.3, Şekil 4.45). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında folikül sayısı bakımından gruplar arasında fark gözlenmedi ($p>0.05$).



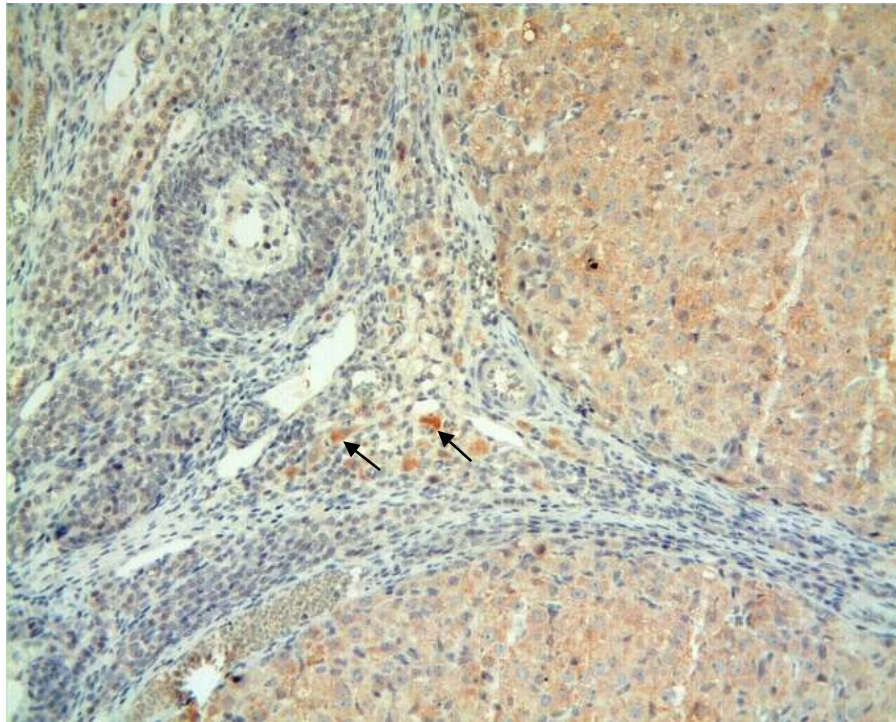
Şekil 4.11. D Vit grubu. (A) Primordiyal folikül (ok), (B) Primer folikül (ok), (C) Sekonder folikül (ok), (D) Graaf folikül (ok) MT X400.

Toluidin mavisi boyama metodu uygulanan kesitlerde, mast hücreleri menekşe rengine boyanan granülleri ile ayırt edildi (Şekil 4.12). Bu grupta ortalama mast hücre sayısı 7 olarak tespit edildi (Tablo 4.4, Şekil 4.46). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında mast hücre sayısı bakımından gruplar arasında fark gözlenmedi ($P>0.05$).

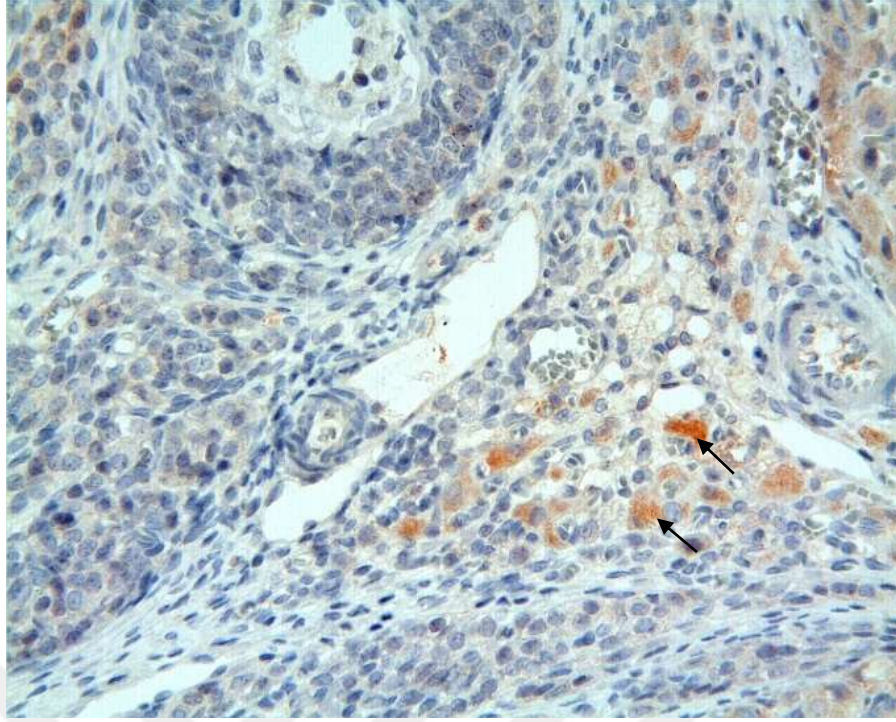


Şekil 4.12. D Vit grubu. Mast hücrelerin görünümü (oklar) Toluidin mavisi X400.

Kaspaz-3 immün boyama yöntemi ile pozitif immünorektivitede bulunan hücrelerin sitoplazmaları kahverengi tonlarında boyandılar (Şekil 4.13, 4.14). Bu grupta ortalama kaspaz-3 (+) hücre sayısı 61.2 olarak tespit edildi (Tablo 4.5). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kaspaz-3 (+) sayısı bakımından gruplar arasında fark gözlenmedi ($P>0.05$).

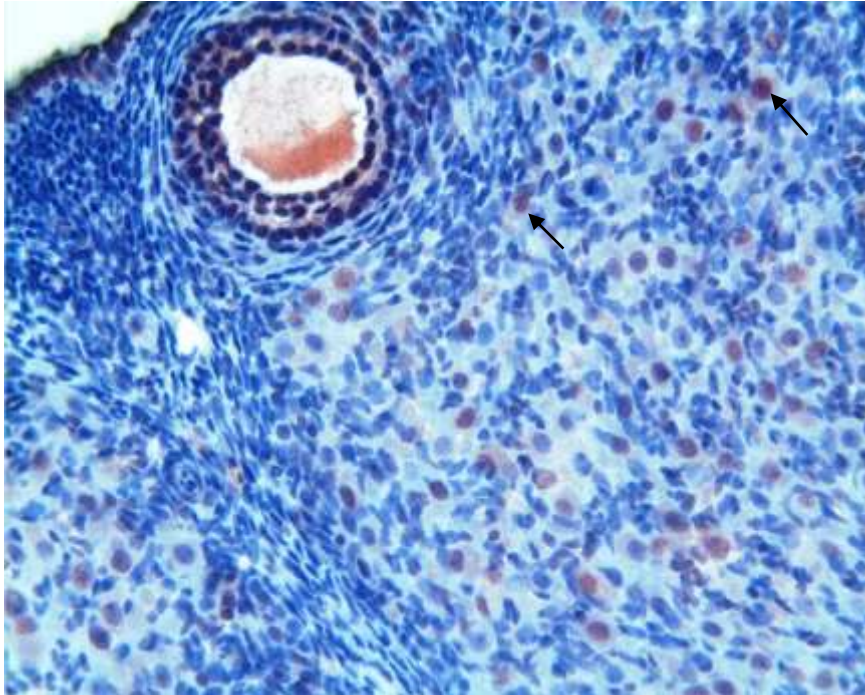


Şekil 4.13. D Vit grubu. Kaspaz-3 pozitif hücrelerin görünümü (oklar) Kaspaz-3 X200.



Şekil 4.14. D Vit grubu. Kaspaz-3 pozitif hücrelerin görünümü (oklar) Kaspaz-3 X400.

VDR immün boyama yöntemi ile pozitif reaksiyon gösterilen hücrelerin nükleusları kahverengi tonlarında boyandılar (Şekil 4.15). Bu grupta ortalama VDR (+) hücre sayısı 67 olarak tespit edildi (Tablo 4.5). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta VDR (+) hücre sayısının istatistiksel olarak arttığı gözlemlendi ($P < 0.05$).



Şekil 4.15. D Vit grubu. VDR pozitif hücrelerin görünümü (oklar) VDR X400.

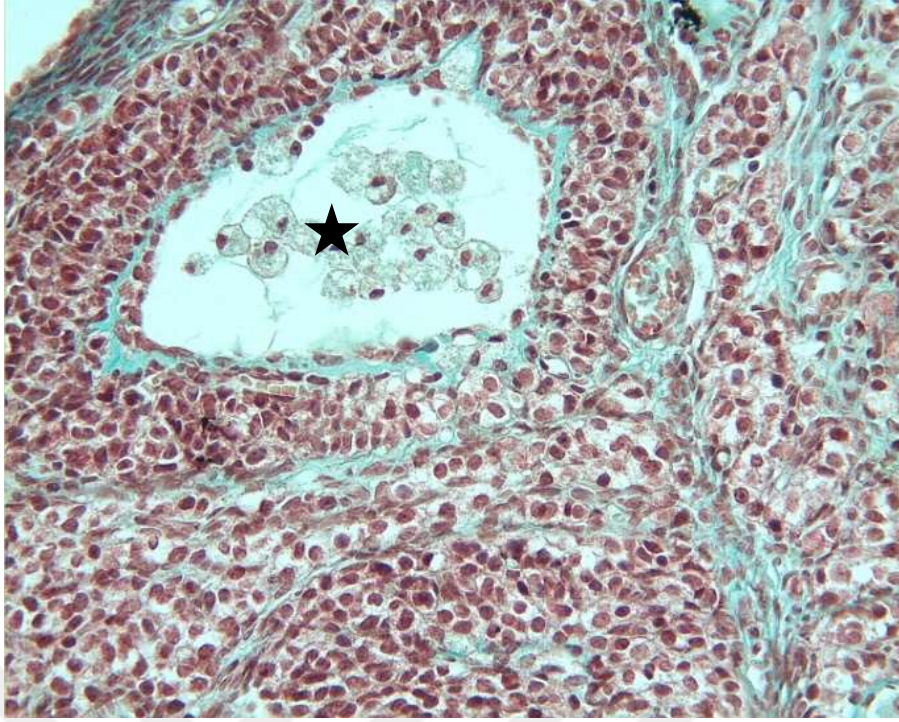
Metotreksat Grubu

Masson's trikrom boyama metodu uygulanmış kesitlerde farklı matürasyon aşamalarındaki foliküllerin sayılarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta belirgin değişiklik olmadığı görülürken ($p>0.05$), graaf ve atretik follikül sayılarında artış (Şekil 4.43, Şekil 4.44) mevcuttu ($p<0.05$). (Şekil 4.16). Bu grupta ortalama folikül sayısı primordiyal folikül 75, primer folikül 22, sekonder folikül 27, graaf folikül 44, korpus luteum 68, atretik folikül 24 olarak ölçüldü (Tablo 4.3, Şekil 4.45).

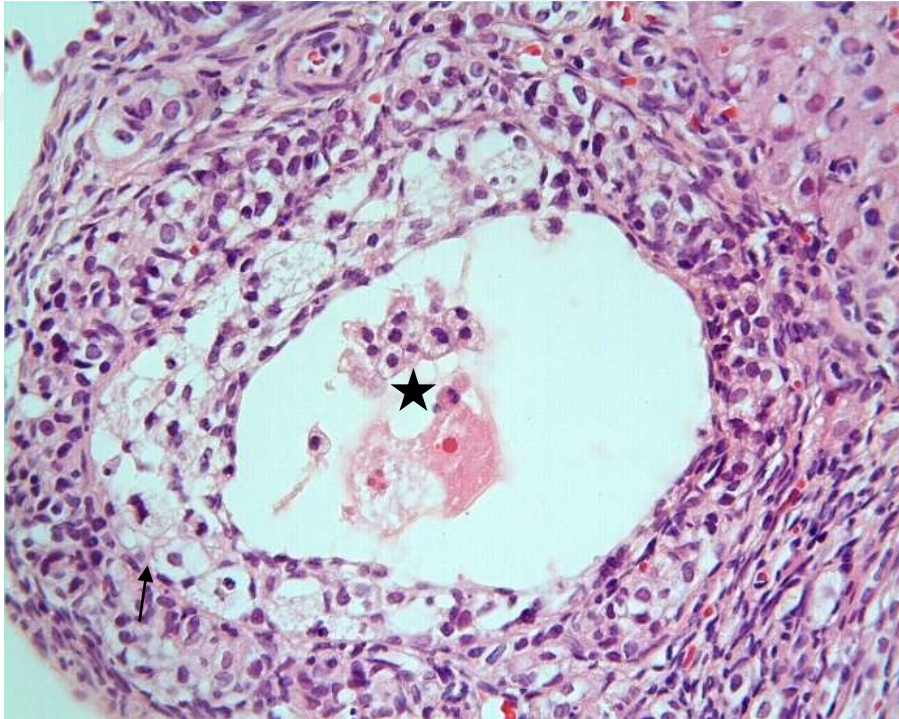


Şekil 4.16. MTX grubu. Ovaryum dokusunun genel histolojik görünümü MT X40

Bu grupta atreziye giden bazı foliküllerin antral boşluklarında dejenere granüloza hücre artıkları gözlemlendi (Şekil 4.17, Şekil 4.18).

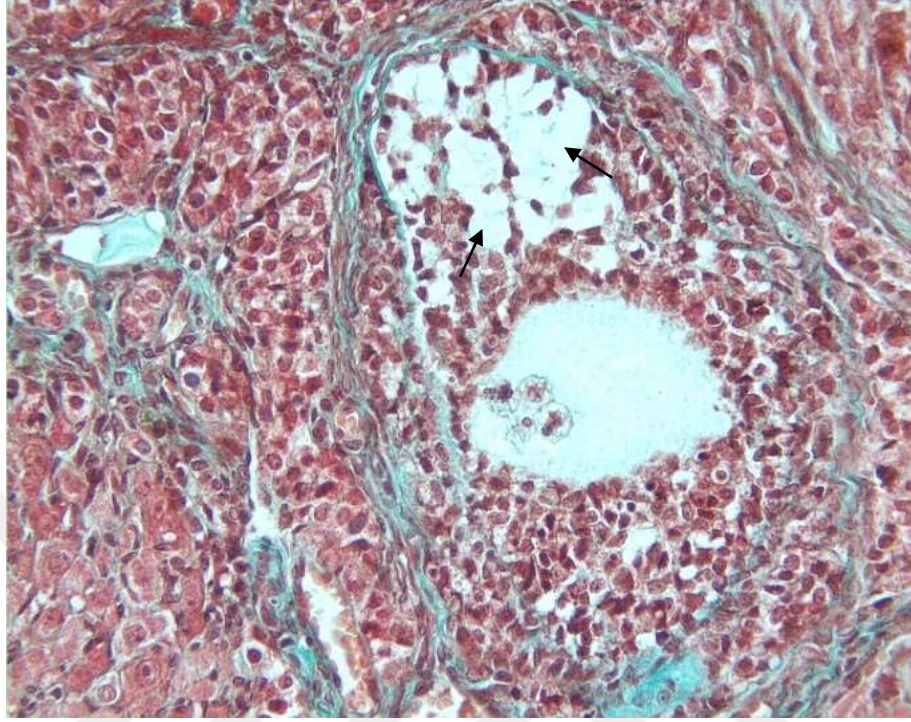


Şekil 4.17. MTX grubu. Antral boşlukta dejenere granüloza hücre artıklarının görünümü (yıldız). MT X400.

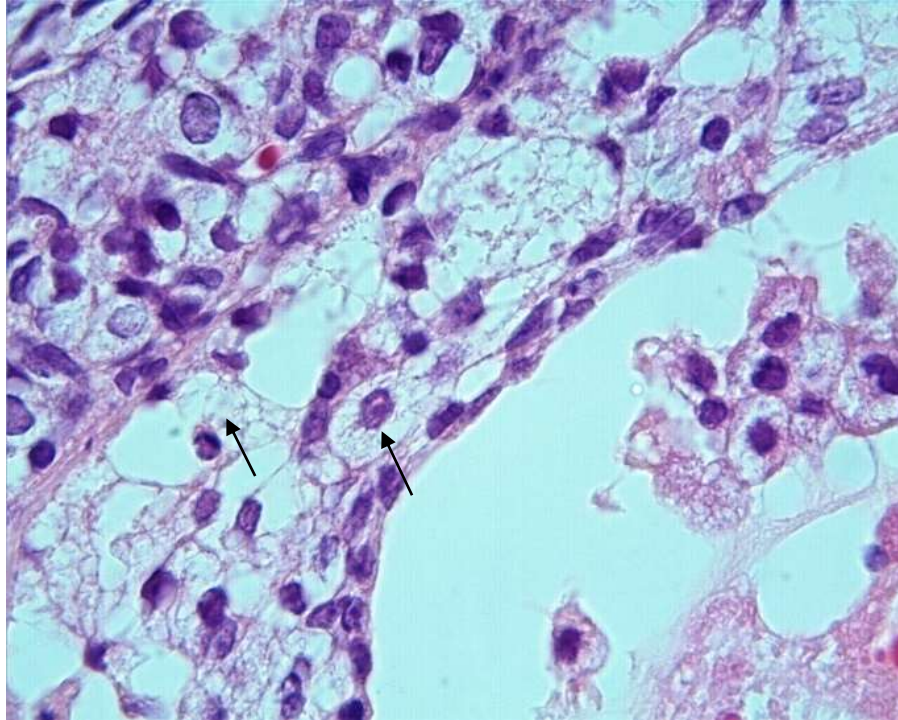


Şekil 4.18. MTX grubu. Antral boşluklarında dejenere granüloza hücre artıklarının (yıldız) görünümü. H-E X400.

Ayrıca dejenere olmuş foliküllerde granüloza hücreleri arasında yan yüz bağlantılarının kaybına bağlı olarak hücresel ayrışmalar ve granüloza hücrelerinde vakuolizasyonlar tespit edildi (Şekil 4.19, Şekil 4.20).

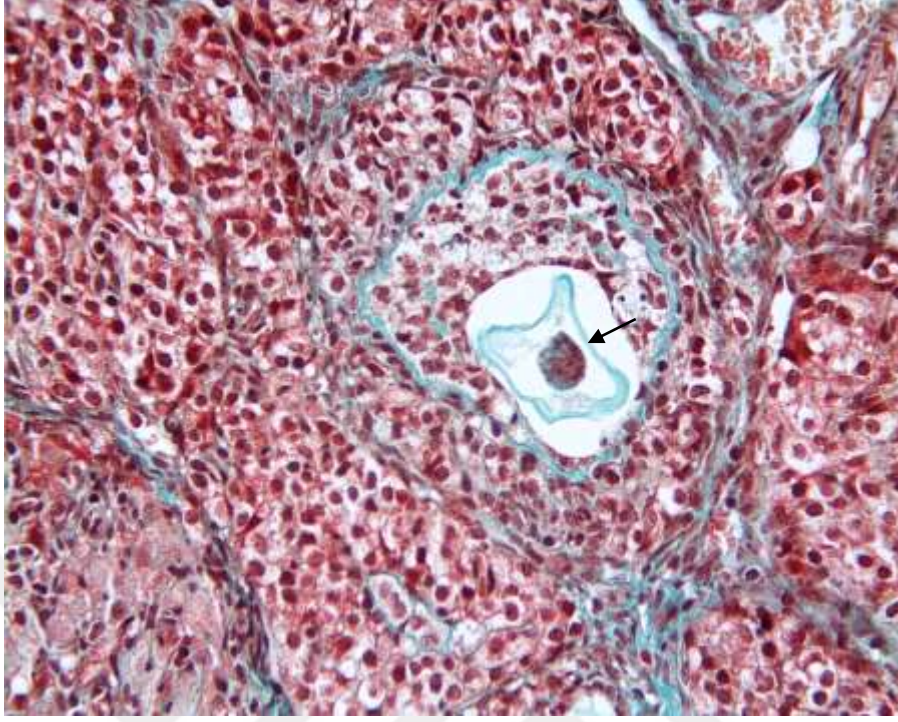


Şekil 4.19. MTX grubu. Hücresel ayrışmalar ve granüloza hücrelerinde vakuolizasyonlar (oklar). MT X400.



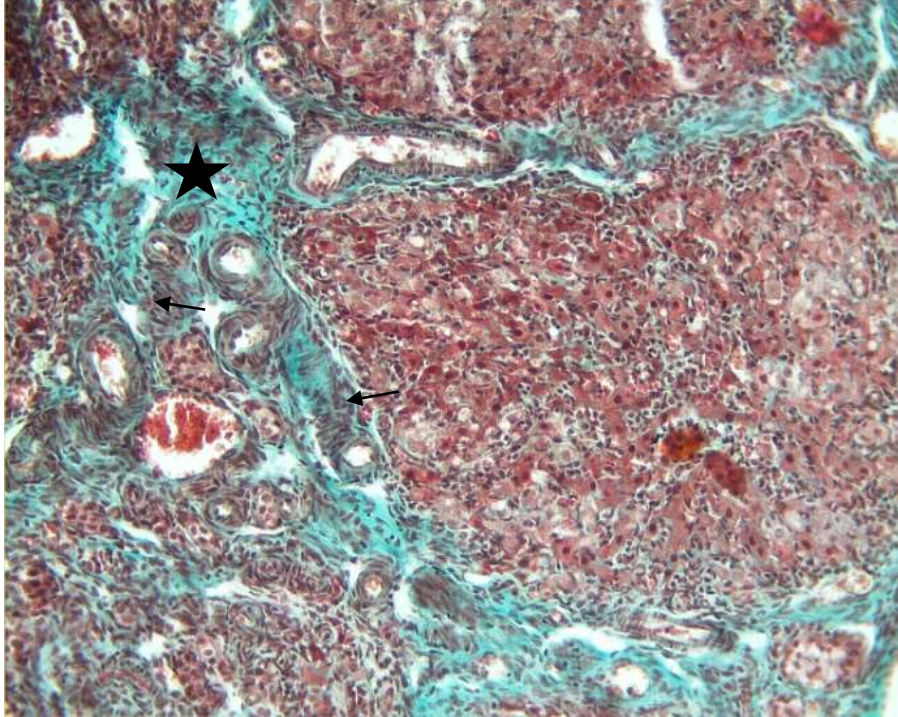
Şekil 4.20. MTX grubu. Granüloza hücrelerinde vakuolizasyonlar (oklar). H-E X400.

Bazı foliküllerde oositi çevreleyen zona pellusidanın yapısının bozulduğu ve düzensizleştiği izlendi (Şekil 4.21).



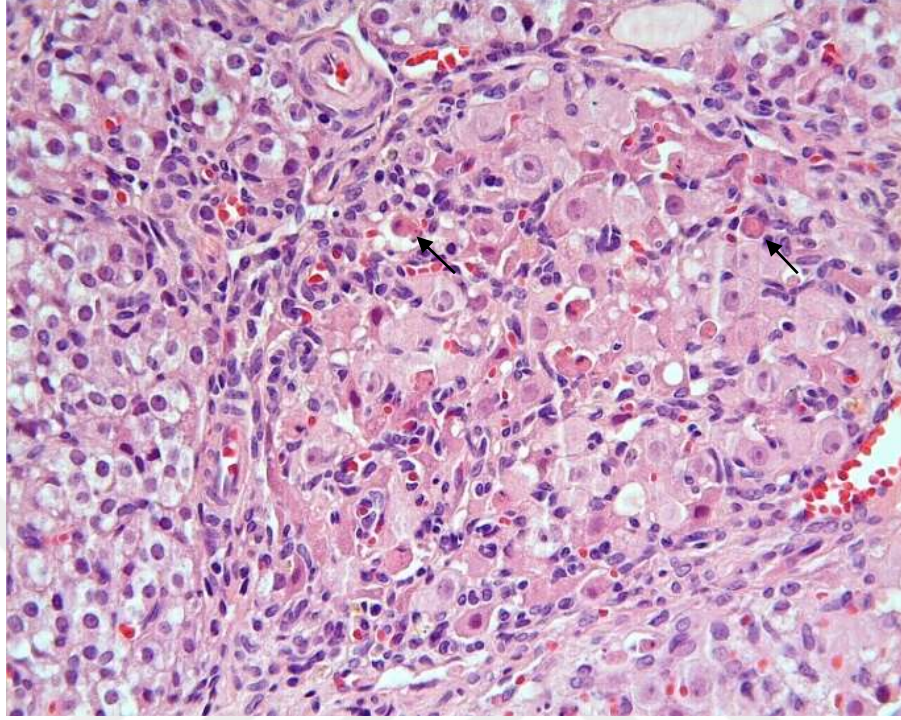
Şekil 4.21. MTX grubu. Bozulmuş zona pellusidanın görünümü (ok) MT X400.

Bu grupta ayrıca over stromasında bağ doku artışı ve hafif inflamatuvar hücre birikimi (Şekil 4.22) tespit edildi.

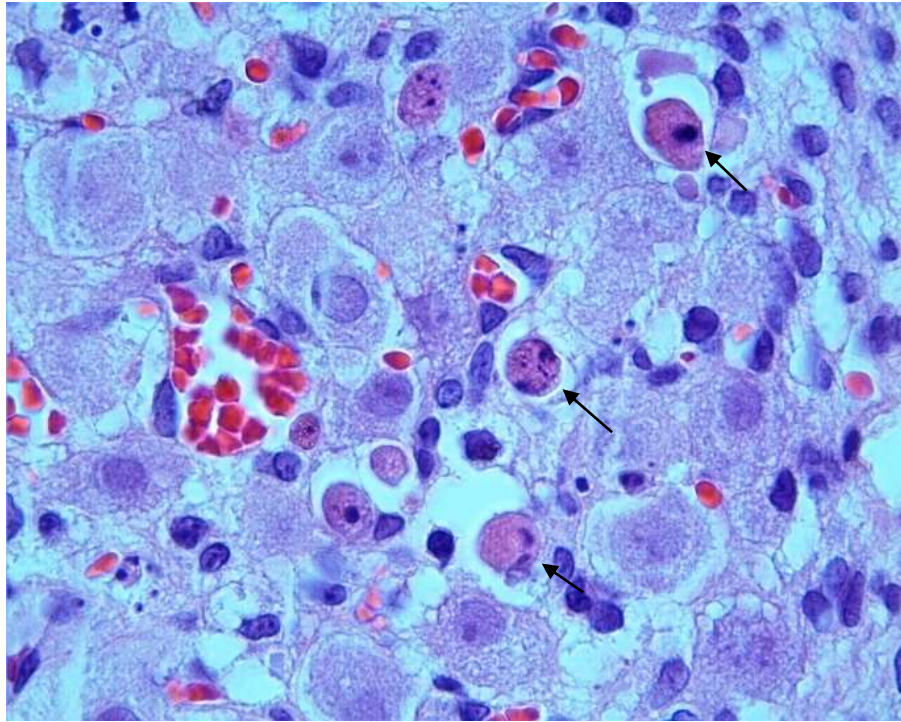


Şekil 4.22. MTX grubu. Over stromasında bağ doku artışı (yıldız) ve hafif inflamatuvar hücre birikimi (oklar). MT X400.

Ayrıca granüloza hücrelerinde apoptotik cisimlere rastlandı. Apoptotik hücreler, etraflarındaki hücrelerden belirgin bir halo ile ayrılan eozinofilik sitoplazması ve piknotik nükleusu ile ayırt edildi (Şekil 4.23, Şekil 4.24).

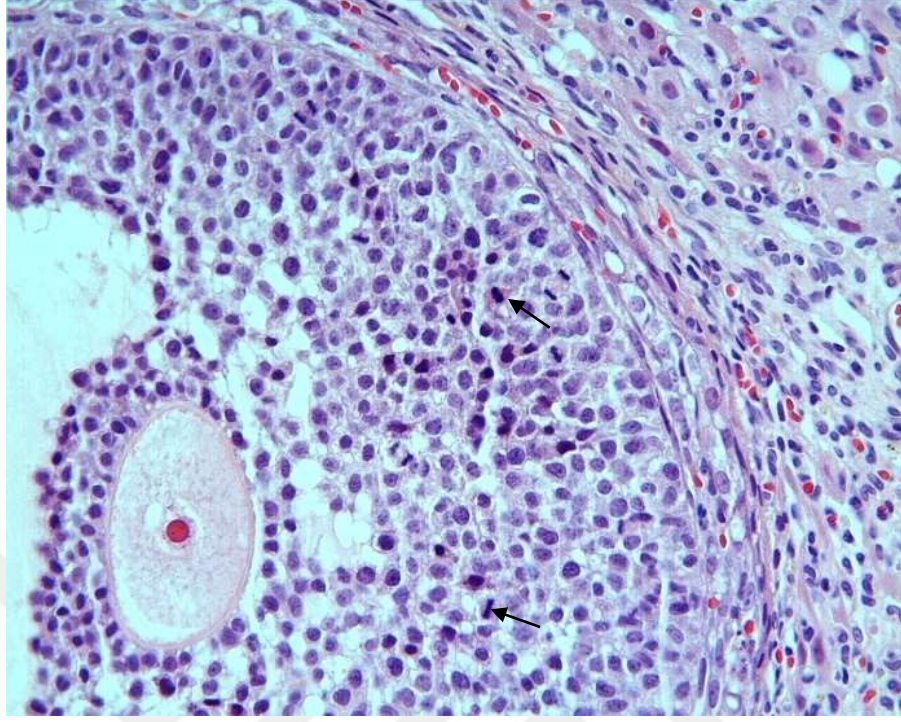


Şekil 4.23. MTX grubu. Apoptotik hücrelerin görünümü (oklar). H-E X400.

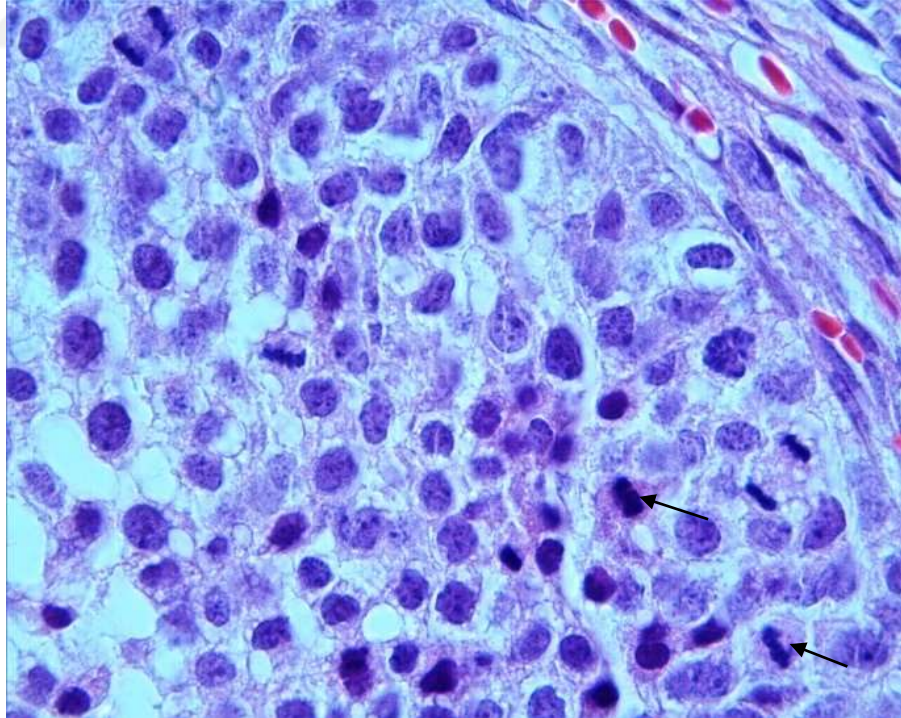


Şekil 4.24. MTX grubu. Apoptotik hücrelerin görünümü (oklar). H-E X1000.

Dikkat çeken diğer bir bulgu, oositin etrafını saran granüloza hücreleri arasında mitotik arreste giden hücrelerin görülmesiydi (Şekil 4.25, Şekil 4.26).



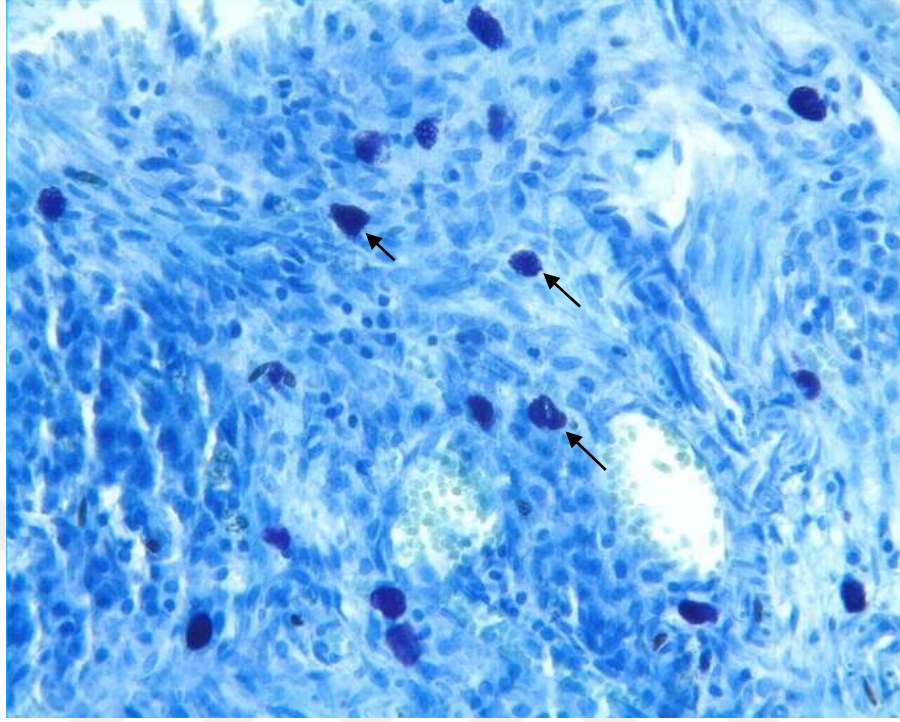
Şekil 4.25. MTX grubu. Mitotik arreste giden hücrelerin görünümü (oklar). H-E X400.



Şekil 4.26. MTX grubu. Mitotik arreste giden hücrelerin görünümü. H-E X1000.

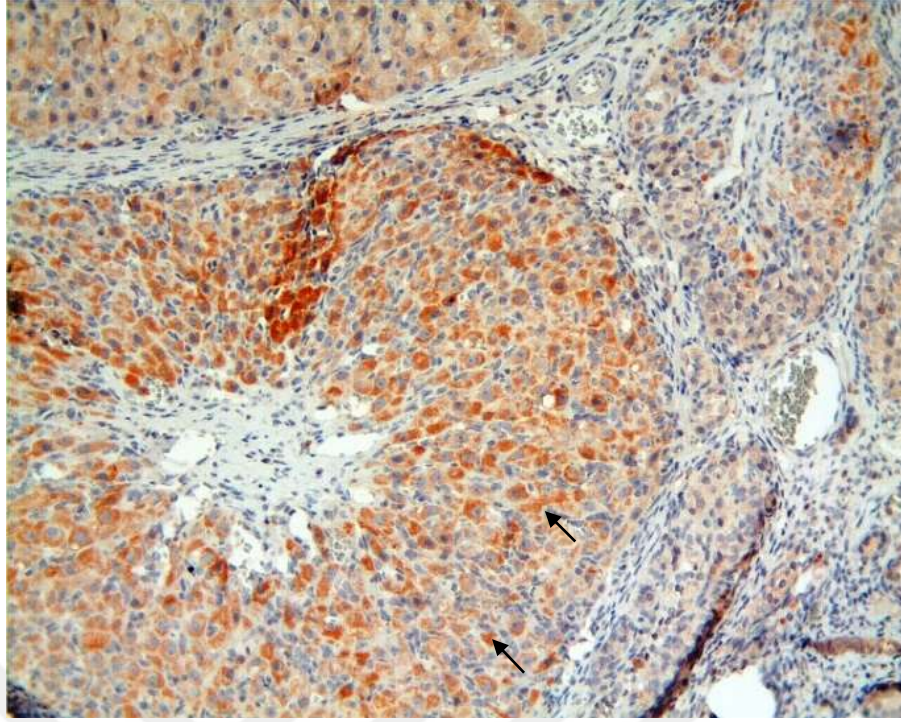
Toluidin mavisi boyama metodu uygulanan kesitlerde, mast hücreleri menekşe renginde boyanan granülleri ile ayırt edildi (Şekil 4.27). Bu grupta ortalama mast hücre

sayısı 13 olarak tespit edildi (Tablo 4.4, Şekil 4.46). Kesitlerde pozitif boyanan mast hücre yoğunluğunun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artış gösterdiği fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı derecede olmadığı gözlemlendi ($P>0.05$).

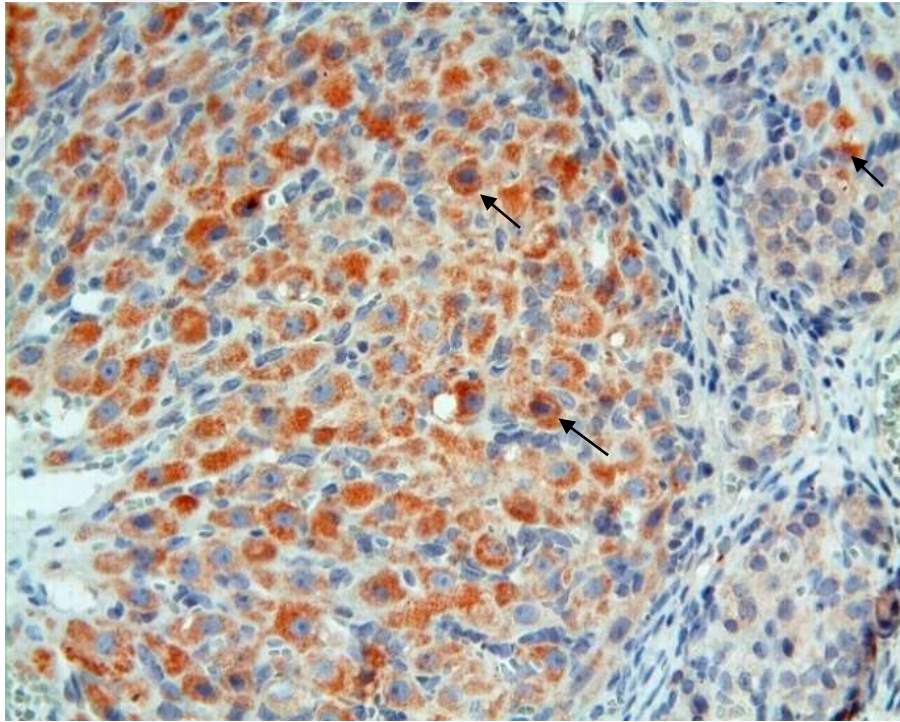


Şekil 4.27. MTX grubu. Mast hücrelerin görünümü (oklar) Toluidin mavisi X400.

Kaspaz-3 immün boyama yöntemi ile pozitif immünorektivitede bulunan hücrelerin sitoplazmaları kahverengi tonlarında boyandılar (Şekil 4.28, Şekil 4.29). Bu grupta ortalama kaspaz-3 (+) hücre sayısı 137.2 olarak tespit edildi (Tablo 4.5). Kesitlerde pozitif boyanan hücrelerin yoğunluğunun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlemlendi ($P<0.05$).



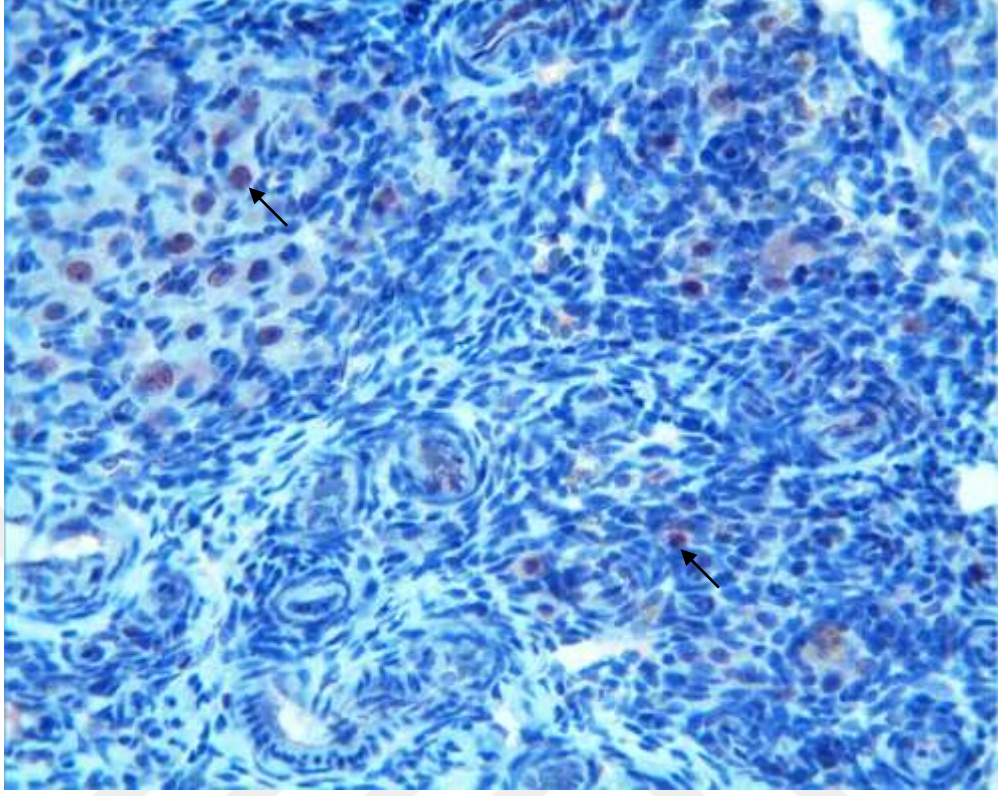
Şekil 4.28. MTX grubu. Kaspaz-3 pozitif hücrelerin görünümü (oklar) Kaspaz-3 X200.



Şekil 4.29. MTX grubu. Kaspaz-3 pozitif hücrelerin görünümü (oklar) Kaspaz-3 X400.

VDR immün boyama yöntemi ile pozitif reaksiyon gösteren hücrelerin nükleusları kahverengi tonlarında boyandılar (Şekil 4.30). Bu grupta ortalama VDR (+) hücre sayısı 8 olarak tespit edildi (Tablo 4.5). Kesitlerde pozitif boyanan hücrelerin yoğunluğunun

kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi ($P<0.05$).



Şekil 4.30. MTX grubu. VDR pozitif hücrelerin görünümü (oklar) VDR X400.

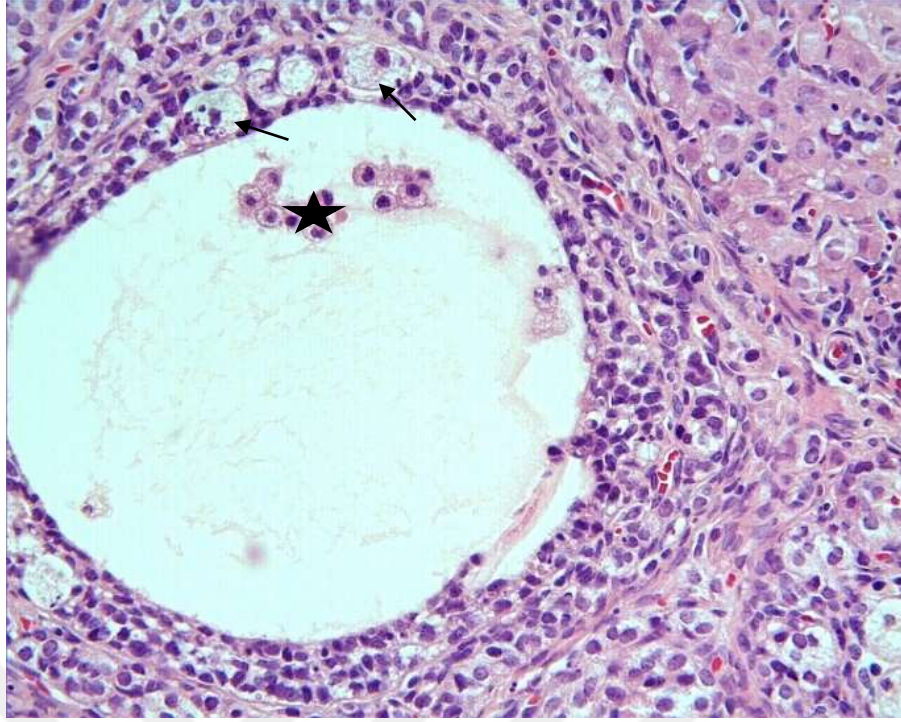
Metotreksat+D vit grubu

Bu grupta ortalama folikül sayısı primordiyal folikül 86, primer folikül 29.5, sekonder folikül 16.5, graaf folikül 79, korpus luteum 64.5, atretik folikül 20.5 olarak ölçüldü ($P<0.05$) (Tablo 4.3, Şekil 4.45). MTX ve diğer gruplar ile karşılaştırıldığında folikül sayısı bakımından gruplar arasında fark gözlenmedi ($P>0.05$). (Şekil 4.31).



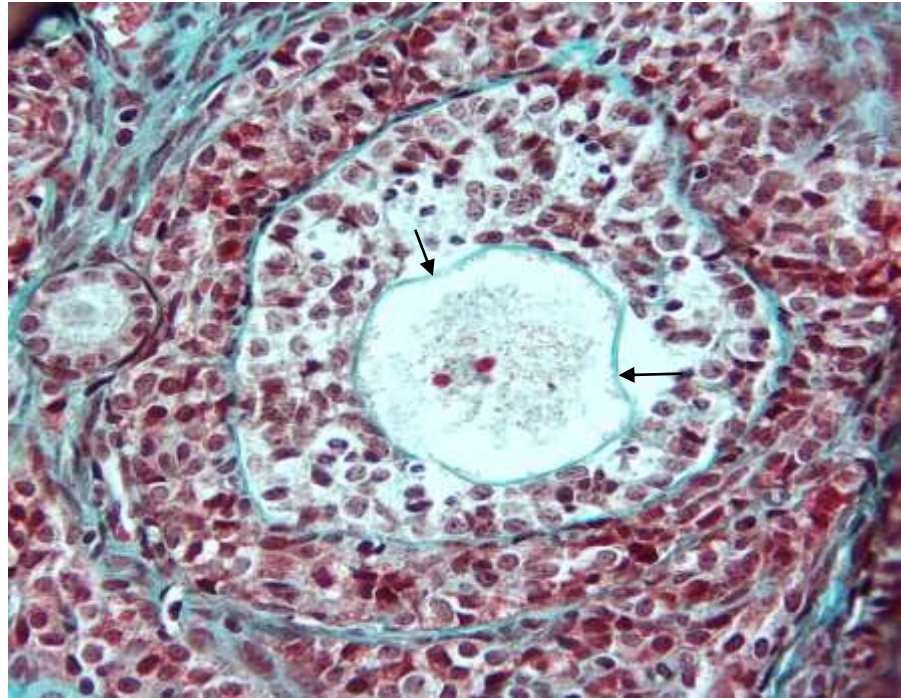
Şekil 4.31. MTX+D grubu. Ovaryum dokusunun genel histolojik görünümü MT X40

MTX grubuna benzer şekilde bazı folliküllerin granüloza hücrelerinde vakuolizasyonlar ve antral boşluklarında ölü granüloza hücre artıkları gözlemlendi (Şekil 4.32).



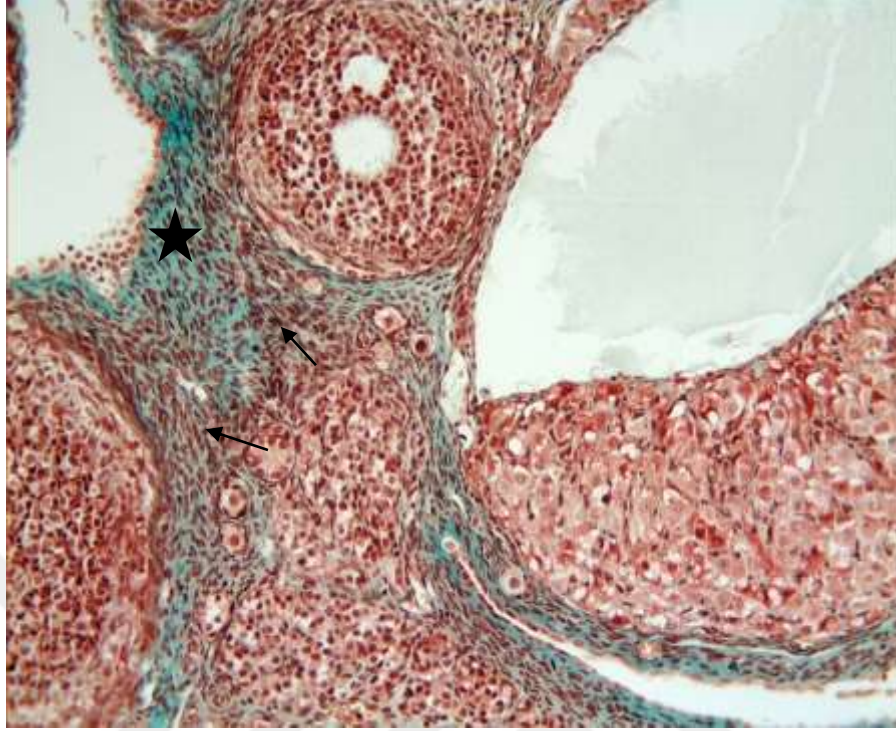
Şekil 4.32. MTX+D grubu. Granüloza hücrelerinde vakuolizasyon (oklar) ve antral boşluklarında dejenere granüloza hücre artıklarının (yıldız) görünümü. H-E X400.

Yine MTX grubuna benzer şekilde bazı foliküllerde oositi çevreleyen zona pellusidanın yapısının bozulduğu ve düzensizleştiği izlendi (Şekil 4.33).



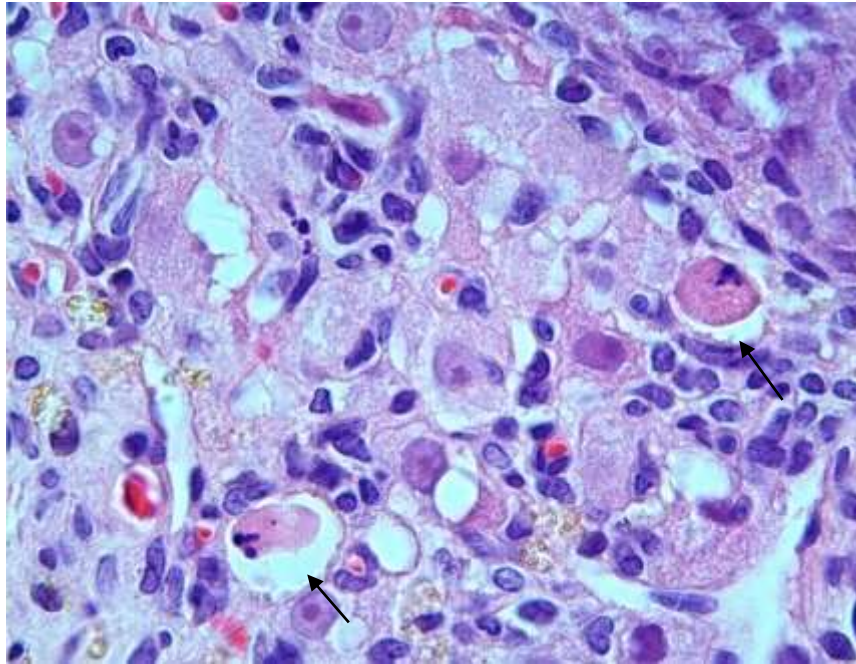
Şekil 4.33. MTX+D grubu. Bozulmuş zona pellusidanın görünümü (oklar) MT X400.

Bu grupta ayrıca MTX grubunda görülen over stromasındaki bağ doku artışı ve hafif inflamatuvar hücre birikiminin (Şekil 4.34) izlenmeye devam ettiği tespit edildi.



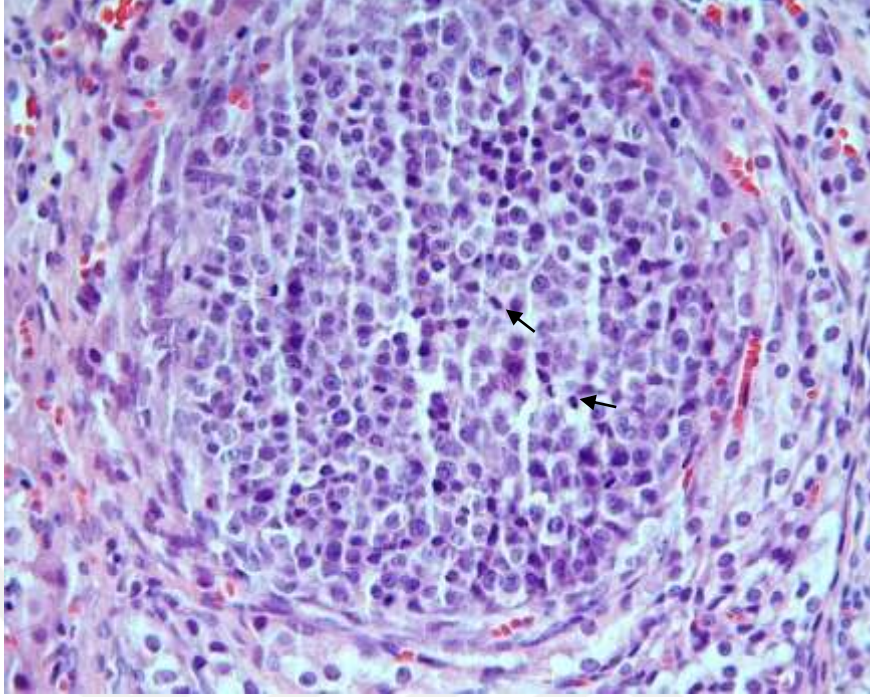
Şekil 4.34. MTX+D grubu. Over stromasında bağ doku artışı (yıldız) ve hafif inflamatuvar hücre birikimi (oklar). MT X400.

Ayrıca bu grupta granüloza hücrelerinde apoptotik cisimlere rastlandı. Apoptotik hücreler, etraflarındaki hücrelerden belirgin bir halo ile ayrılan eozinofilik sitoplazması ve piknotik nükleusu ile ayırt edildi (Şekil 4.35).

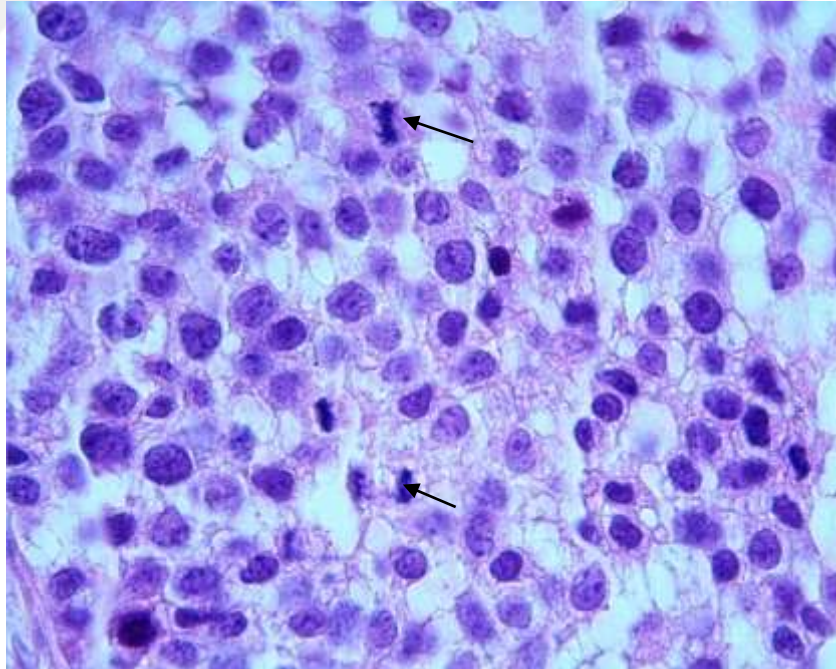


Şekil 4.35. MTX+D grubu. Apoptotik hücrelerin görünümü (oklar). H-E X1000.

Dikkat çeken diğer bir bulgu, granüloza hücreleri arasında mitotik arreste giden hücrelerin görülmesiydi (Şekil 4.36, Şekil 4.37).



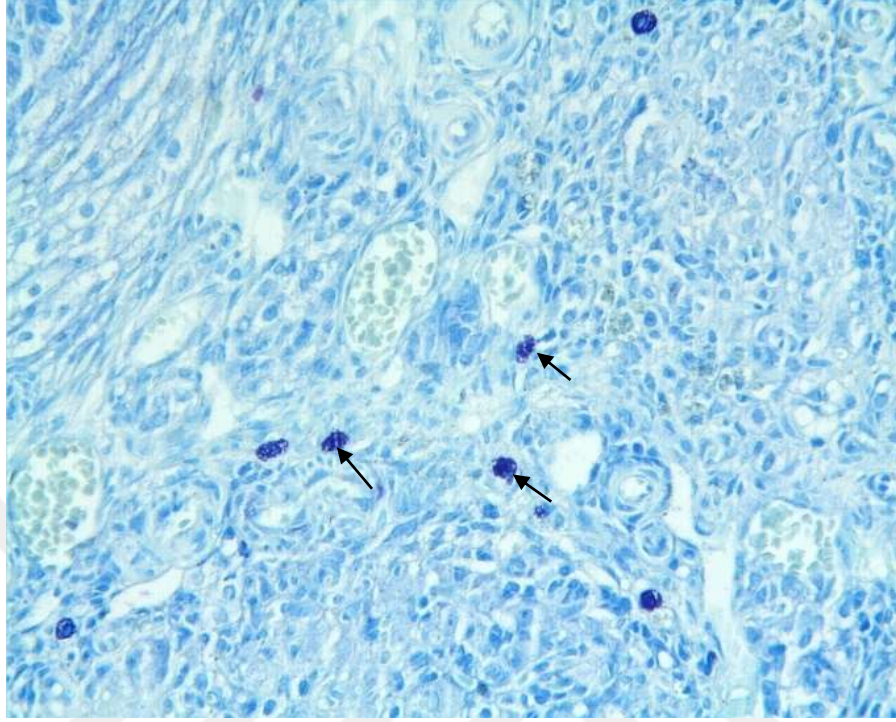
Şekil 4.36. MTX+D grubu. Mitotik arreste giden hücrelerin görünümü (oklar). H-E X400.



Şekil 4.37. MTX+D grubu. Mitotik arreste giden hücrelerin görünümü (oklar) H-E X1000.

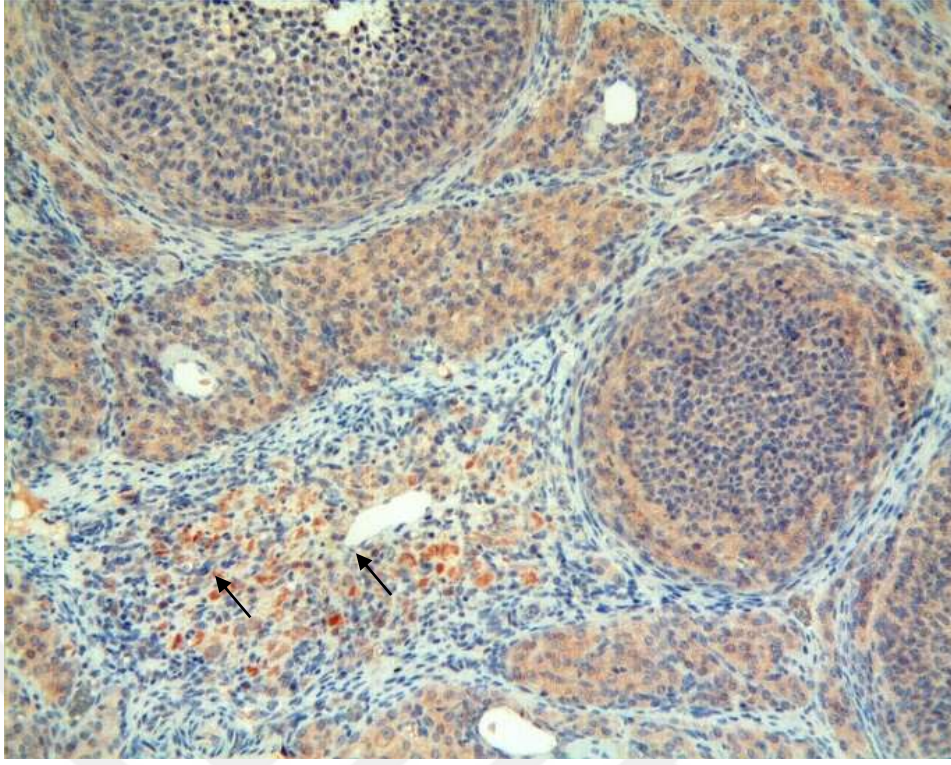
Toluidin mavisi boyama metodu uygulanan kesitlerde, mast hücreleri menekşe renginde boyanan granülleri ile ayırt edildi (Şekil 4.38). Bu grupta ortalama mast hücre

sayısı 15.5 olarak tespit edildi (Tablo 4.4, Şekil 4.46). Kesitlerde pozitif boyanan mast hücre yoğunluğunun MTX grubu ile karşılaştırıldığında aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi ($P>0.05$).

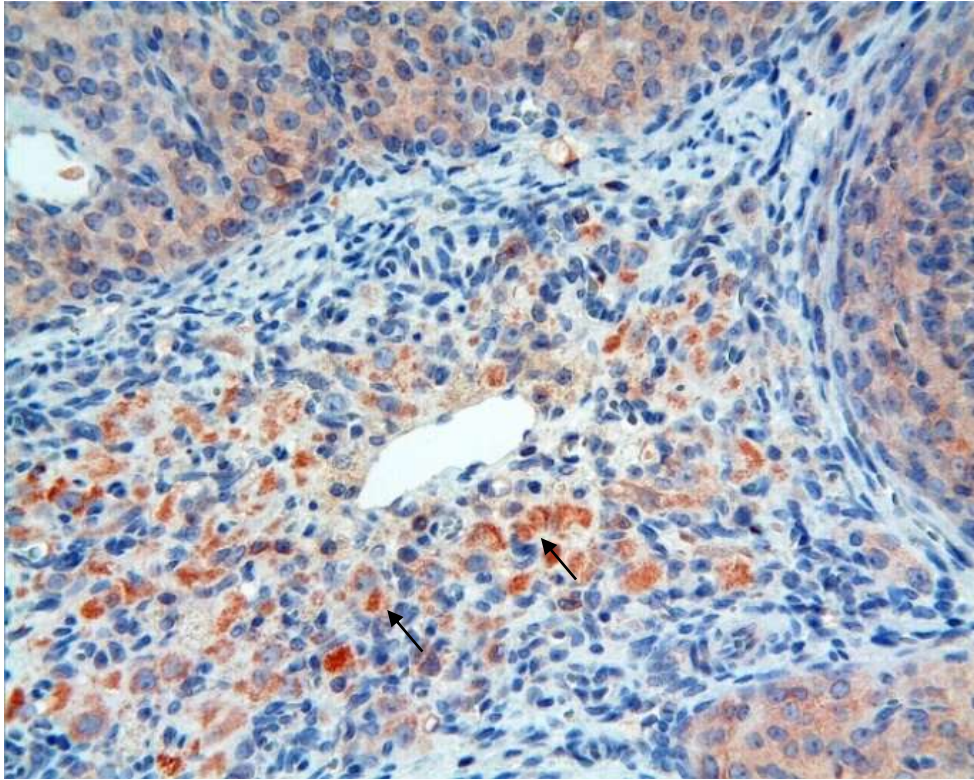


Şekil 4.38. MTX+D grubu. Mast hücrelerin görünümü (oklar) Toluidin mavisi X400.

Kaspaz-3 immün boyama yöntemi ile pozitif immünorektivitede bulunan hücrelerin sitoplazmaları kahverengi tonlarında boyandılar (Şekil 4.39, Şekil 4.40). Bu grupta ortalama kaspaz-3 hücre sayısı 43.4 olarak tespit edildi (Tablo 4.5). Kesitlerde pozitif boyanan hücrelerin yoğunluğunun MTX grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi ($P<0.05$).

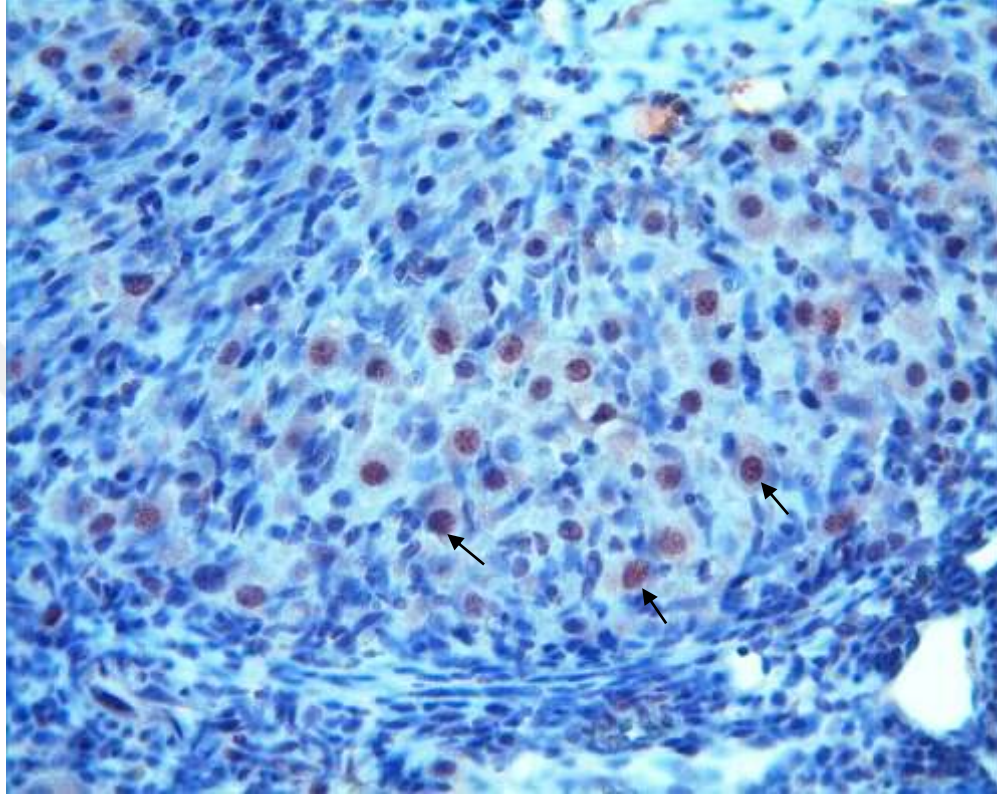


Şekil 4.39. MTX+D grubu Kaspaz-3 pozitif hücrelerin görünümü (oklar) Kaspaz-3 X200.



Şekil 4.40. MTX+D grubu Kaspaz-3 pozitif hücrelerin görünümü (oklar) Kaspaz-3 X400.

VDR immün boyama yöntemi ile pozitif reaksiyon gösteren hücrelerin nükleusları kahverengi tonlarında boyandılar (Şekil 4.41). Bu grupta ortalama VDR (+) hücre sayısı 45 olarak tespit edildi (Tablo 4.5). Kesitlerde pozitif boyanan hücrelerin yoğunluğunun MTX grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlemlendi ($P<0.05$).

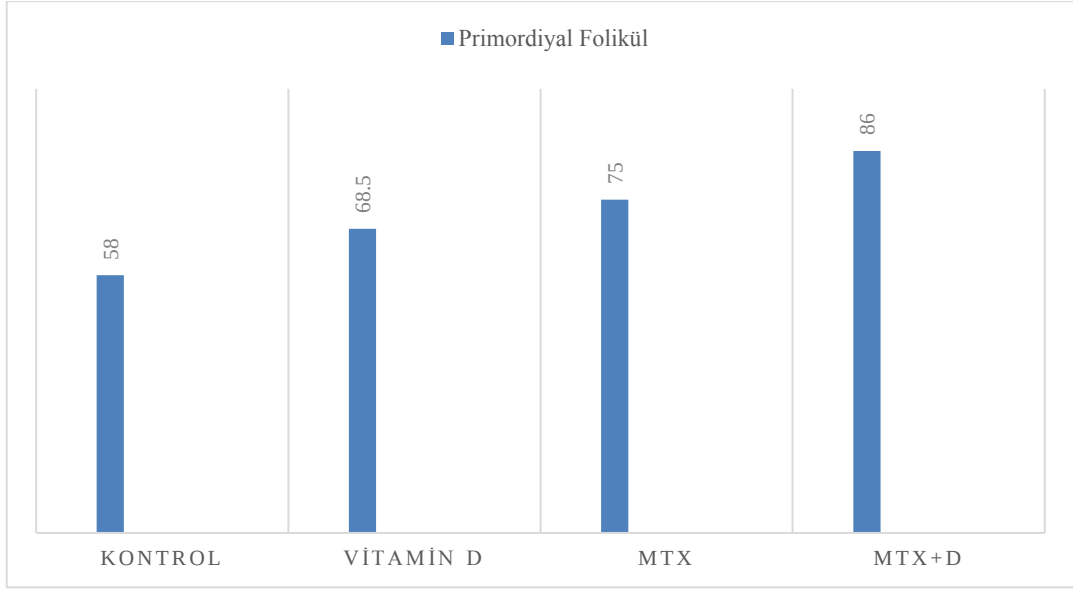


Şekil 4.41. MTX+D grubu VDR pozitif hücrelerin görünümü (oklar) VDR X400.

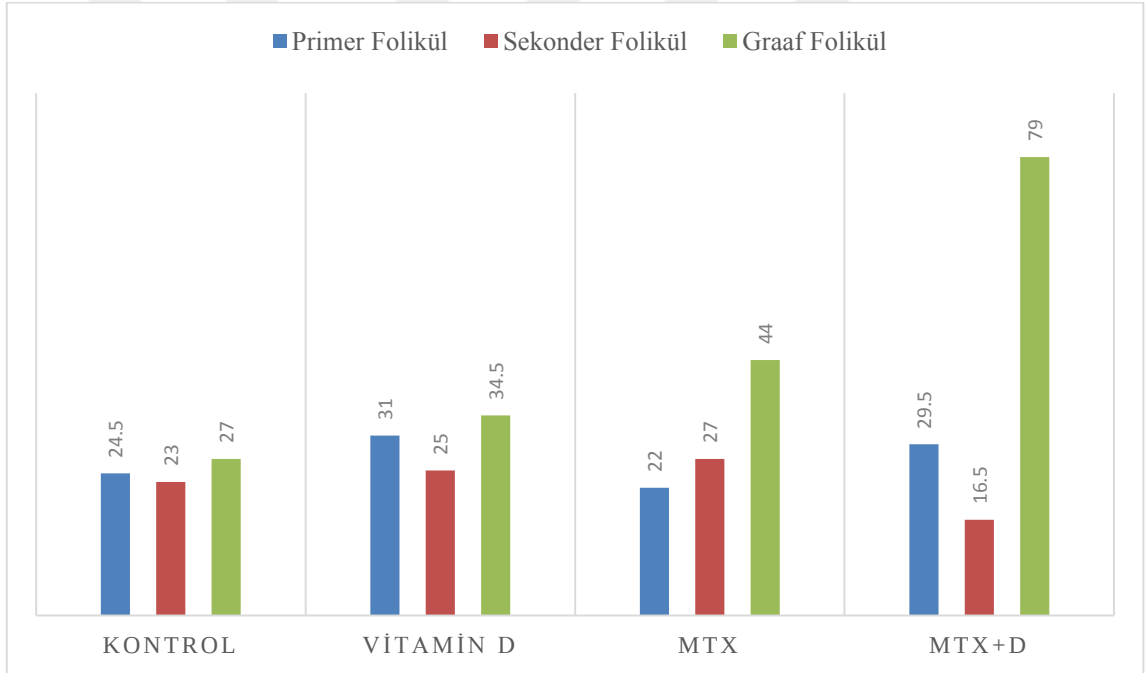
Tablo 4.3. HE boyama metodu uygulanmış kesitlerde folikül sayımı

	Kontrol	D Vit	MTX	MTX+D	p
Primordiyal Folikül	58(6-125)	68.5(51-174)	75(44-144)	86(15-152)	0.429
Primer Folikül	24.5(0-54)	31(18-59)	22(2-56)	29.5(15-56)	0.320
Sekonder Folikül	23(0-46)	25(22-58)	27(1-47)	16.5(6-55)	0.245
Graaf Folikül	27 ^a (0-58)	34.5 ^a (30-51)	44 ^{ab} (10-90)	79 ^b (37-110)	0.013
Korpus Luteum	38.5(18-68)	58(17-87)	68(29-101)	64.5(22-115)	0.076
Atretik Folikül	2.5 ^a (0-11)	7.5 ^a (2-18)	24 ^b (6-58)	20.5 ^b (12-26)	<0.001

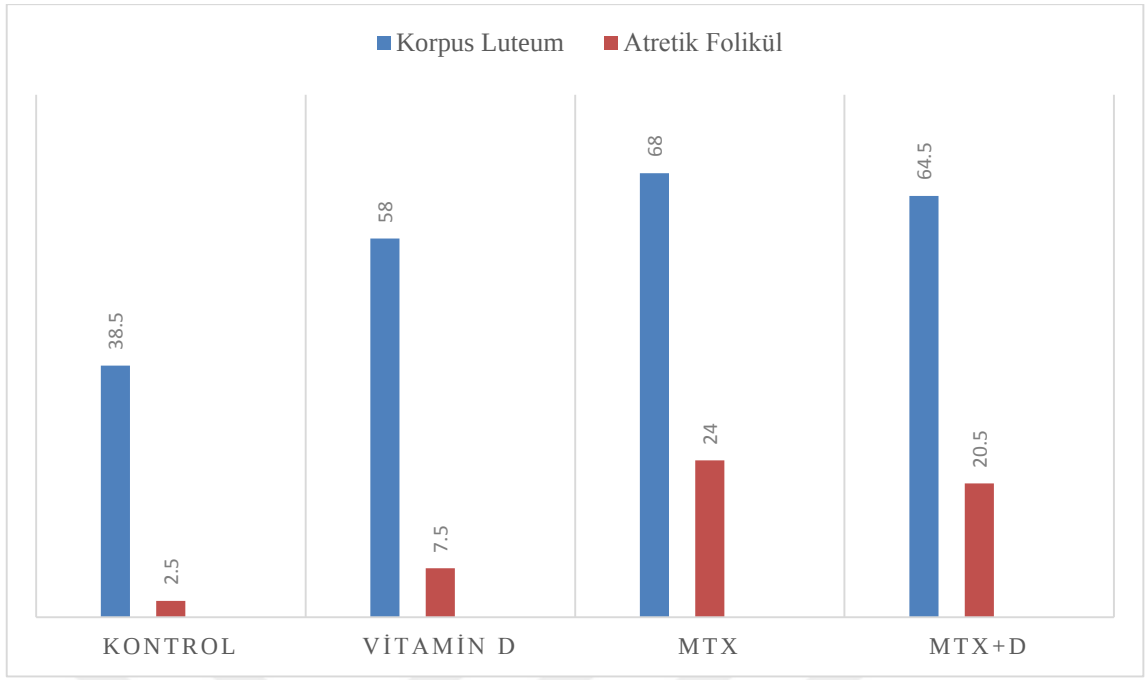
*Farklı üst simgeye sahip gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur.



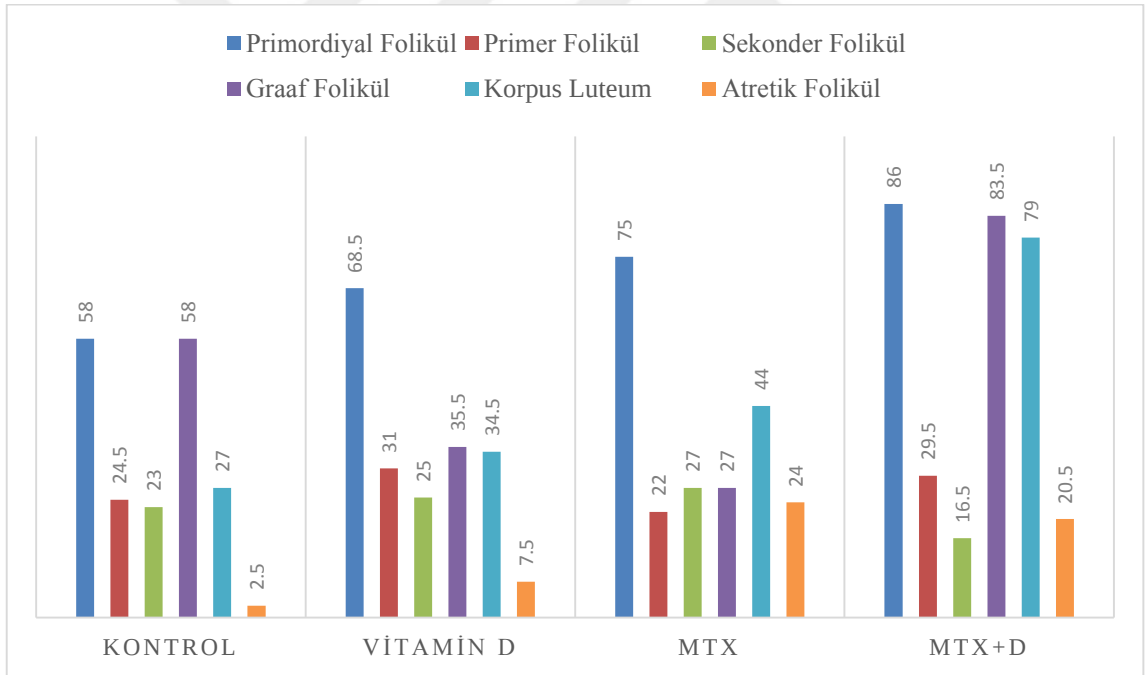
Şekil 4.42. Gruplar arası primordiyal folikül sayısı



Şekil 4.43. Gruplar arası primer, sekonder, graaf folikül sayısı



Şekil 4.44. Gruplar arası korpus luteum ve atretik folikül sayısı

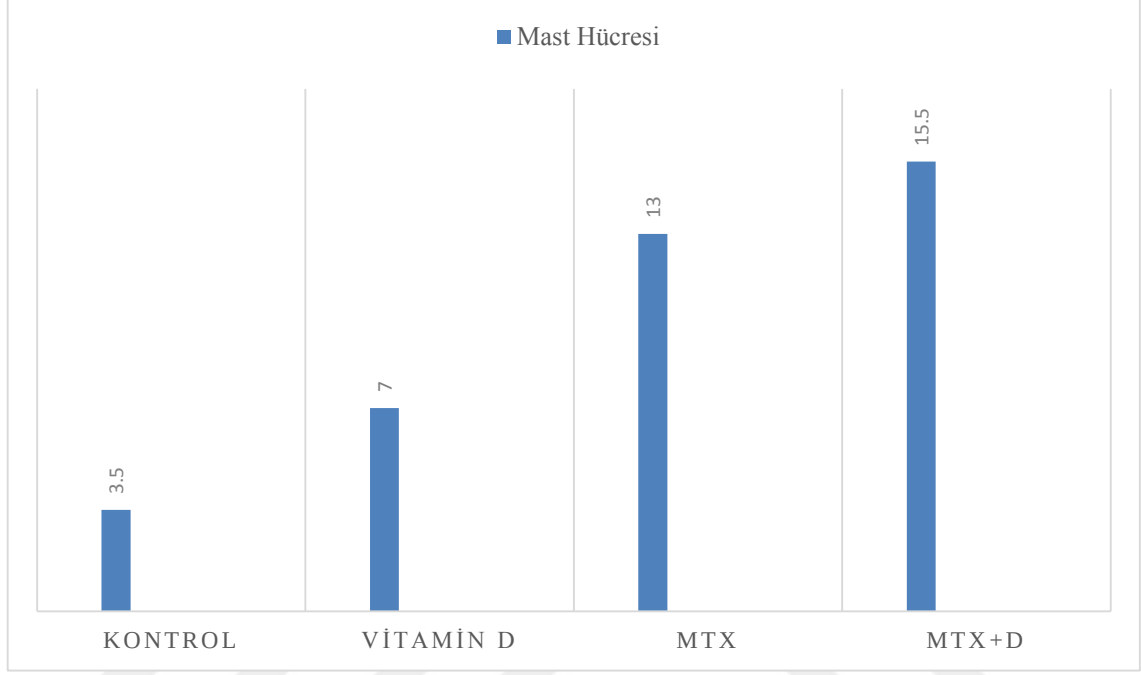


Şekil 4.45. Gruplar arası primordiyal, primer, sekonder, graaf, korpus luteum sayısı

Tablo 4.4. Toluidin mavisi ile mast hücresi değerlendirme

	Kontrol	D vit	MTX	MTX+D	p
Mast Hücresi	3.5(1-74)	7(1-31)	13(6-37)	15.5(1-67)	0.263

Gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır.

**Şekil 4.46.** Gruplar arası mast hücre sayısı**Tablo 4.5.** VDR ve Kaspaz-3 immünohistokimyasal değerlendirme

	Kontrol	VD	MTX	MTX+D	p
VDR					
immünohistokimya	22 ^{ab} (8-39)	67 ^c (50-96)	8 ^a (4-39)	45 ^a (23-61)	0.012*
Kaspaz-3					
immünohistokimya	31 ^a (8-94)	66 ^a (39-91)	155 ^b (80-163)	45 ^a (23-61)	0.008*

*Farklı üst simgeye sahip gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

4.6 Biyokimyasal Bulgular

Tablo 4.6. Biyokimya analizlerinin değerlendirilmesi

	Kontrol	VD	MTX	MTX+D	p
TAS (umol/l)	0.91(0.60-1.19)	0.93(0.86-1.20)	0.94(0.76-1.12)	1.01(0.88-1.34)	0.516
TOS (pg/ml)	6.07 ^a (4.30-10.52)	6.04 ^b (4.52-12.82)	8.59 ^b (7.78-11.56)	5.89 ^b (3.78-7.11)	0.017*
FSH (iu/l)	11.23(9.43-13.25)	13.78(9.59-15.63)	13.35(10.05-16.54)	12.57(12.19-13.83)	0.060
LH (mu/ml)	8.61(6.03-10.99)	9.19(6.81-10.86)	9.35(6.27-10.95)	9.97(7.11-13.05)	0.385
Östrojen(ng/l)	29.71(18.30-36.91)	29.48(24.21-36.33)	31.92(17.69-34.56)	30.36(25.62-36.37)	0.925
AMH(ng/ml)	4.28(3.62-4.99)	4.23(3.55-5.28)	4.41(3.06-5.78)	4.42(2.83-5.20)	0.983
VD(ng/l)	778.65 ^a (774.05-791.05)	870.09 ^b (788.77-987.47)	820.17 ^c (790.77-860.85)	872.84 ^b (820-969.22)	0.001*
Ca(nmol/ml)	3.14(2.70-4.36)	3.76(3.35-5.69)	4.46(2.76-5.14)	3.74(3.11-5.38)	0.183
P(mg/ml)	7.85(4.75-9.79)	7.04(5.52-7.82)	7.39(5.38-9.91)	6.65(5.64-8.28)	0.983

*Farklı üst simgeye sahip gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur.

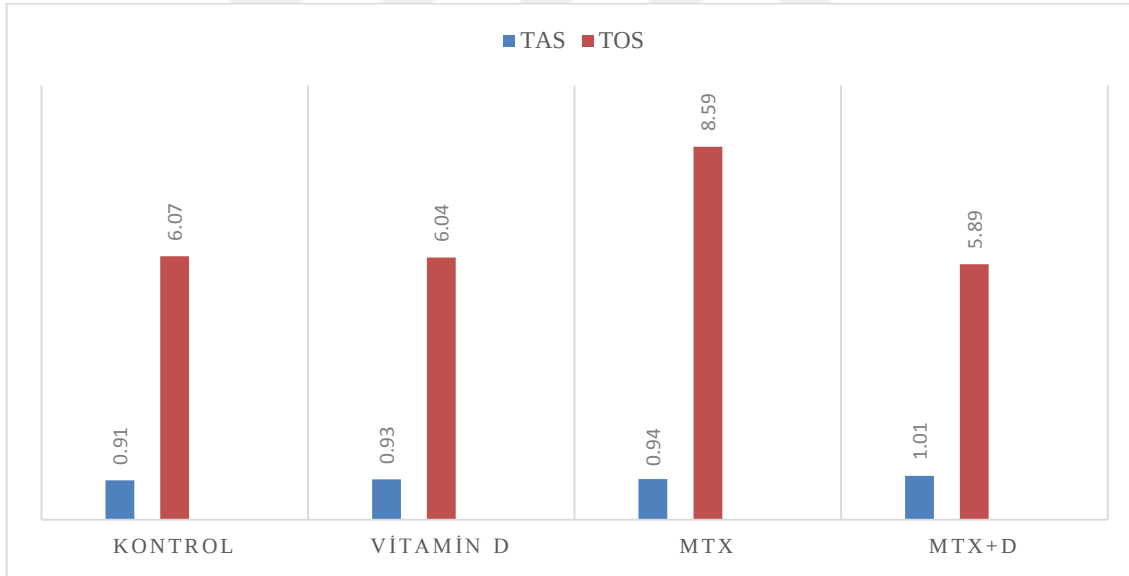
TOS, TAS, AMH, VD, Ca, P, FSH, LH ve östrojen, seviyelerinde elde edilen bulgular Tablo 4.6’da verilmiştir.

Yapılan değerlendirmeler sonucunda MTX verilen sıçanlarda oksidatif hasarın göstergesi olan Total oksidan stres (TOS) kontrol ve diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı izlendi ($p=0.017$). Bu bulgulara ilaveten VD uygulamasının MTX’in neden olduğu TOS artışını azalttığı fakat bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı gözlemlendi ($P>0.05$).

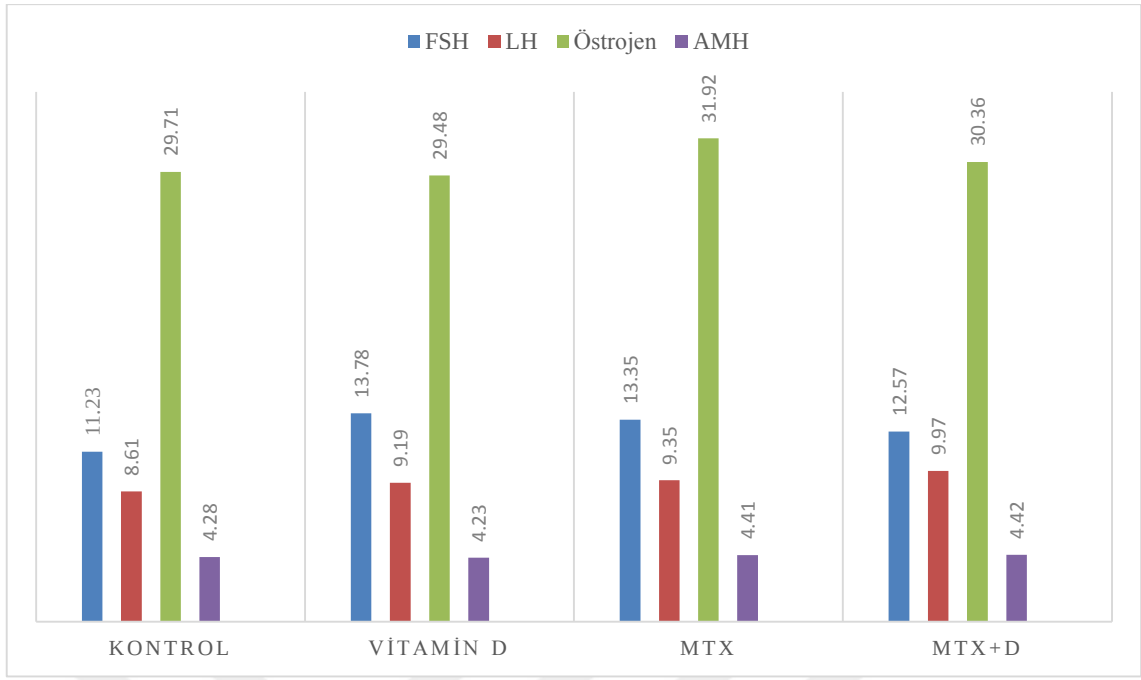
Total antioksidan stres (TAS) yönünden gruplar arasında anlamlı fark izlenmedi ($P>0.05$).

Serum FSH, LH, östrojen, progesteron, AMH seviyesi yönünden gruplar arasında istatistiksel fark gözlenmedi ($P>0.05$).

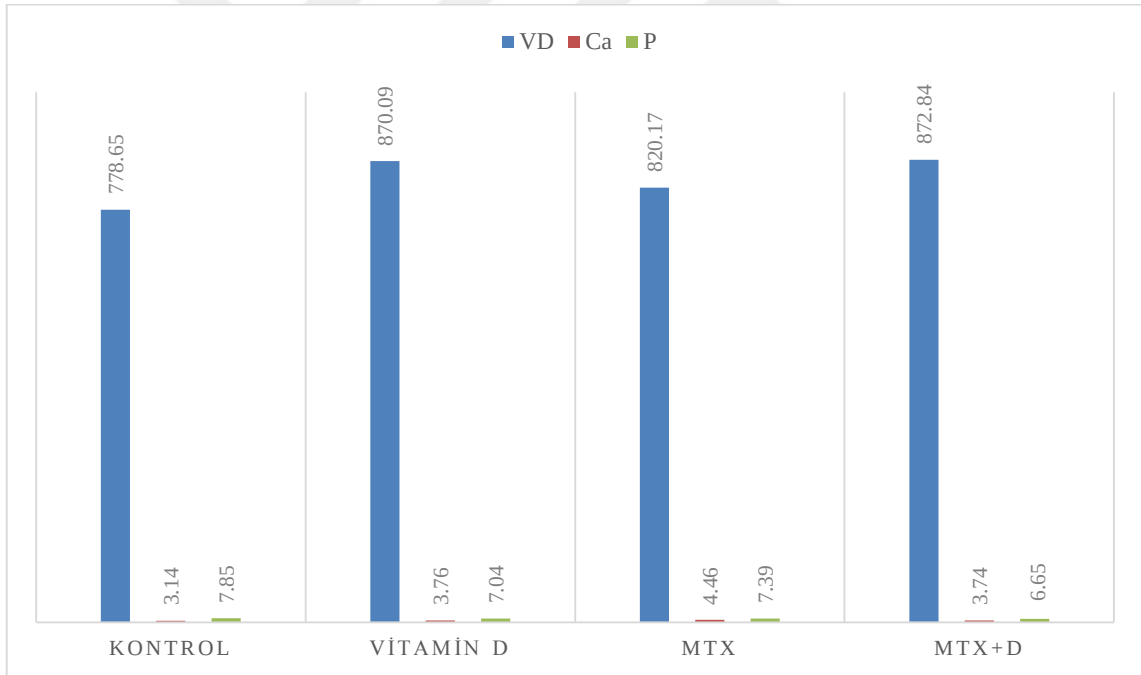
Serum VD seviyesinin MTX uygulanan sıçanlarda VD gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı kontrol grubuna göre ise arttığı gözlemlendi ($P<0.001$). VD ve MTX+D gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı. Serum Ca ve P seviyesi yönünden gruplar arasında fark izlenmedi ($P>0.05$).



Şekil 4.47. Gruplar arası TAS ve TOS analizlerinin değerlendirilmesi



Şekil 4.48. Gruplar arası FSH, LH, Östrojen, AMH analizlerinin değerlendirilmesi



Şekil 4.49. Gruplar arası VD, Ca, P analizlerinin değerlendirilmesi

5. TARTIŞMA

Çocukluk çağında ve reproduktif dönemde uzun süreli kemoterapötik ajan kullanımı over yetmezliği ve infertilite gibi çeşitli komplikasyonlara yol açabilmektedir (2). Bu nedenle kemoterapi alan hastalarda infertiliteyi önleme yöntemlerinin araştırılması giderek daha önemli hale gelmektedir (48).

Metotreksat temel olarak neoplazmalarda kullanılan bir folik asid antimetabolitidir ve yapısal olarak folik asite benzerlik göstermektedir (49). DNA, RNA, protein ve pek çok hücre bileşiğindeki sentez mekanizmalarının adımlarında substrat veya koenzim gibi çeşitli rollere sahip olan antimetabolitler doğal metabolitlerin analogudur. Antimetabolitler, yüksek bölünme özelliğine sahip tümörlere karşı kullanılır (4). Metotreksat bu etkilerini DHF'ı, THF'a çeviren DHFR enzimini inhibe ederek gösterir (3, 32). Tetrahidrofolat pürin ve pirimidin sentezinin önemli bir parçası olan timidilatın üretiminde görevlidir (50). Pürin ve pirimidin nükleotidleri DNA ve RNA replikasyonunda görev alırlar. Bu nedenle MTX, THF eksikliğine sebebiyet vererek temel olarak pürin, pirimidin metabolizması ve DNA sentezini içeren pek çok metabolik işlevi engeller. MTX'in, metabolik işlevleri etkilemek üzere yaptığı değişiklikler ile hem tedavi edici etkileri hem de toksik etkileri bulunmaktadır (4).

Ektopik ve molar gebelik tedavilerinde sıklıkla kullanılan MTX'in serbest oksijen radikallerini ve proinflatuvar moleküllerini artırdığı saptanmıştır (51). MTX'in aynı zamanda gonadotoksik olduğu ve yumurta foliküllerinin sayısını azalttığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu sebeple özellikle genç hastalarda kısırlığa neden olduğu düşünülmektedir (2, 52). Ektopik gebelik tedavisi için kullanılan düşük doz MTX, yumurtalık rezervini etkilemese de kemoterapide yüksek doz MTX kullanımının overler üzerine olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir (53). Çalışmamızda tek yüksek doz MTX uygulamasının ovaryum dokusunda sebep olduğu hasarı histopatolojik ve biyokimyasal parametreleri değerlendirerek incelemeyi planladık.

Vitamin D'nin vücutta Ca/P homeostazisini regülasyon özelliğine karşın anti-oksidatif ve anti-inflatuvar özellikleri de bulunmaktadır (6, 7). Vitamin D reseptörü VDR vücutta pek çok hücrede bulunur. Yapılan çalışmalarda over dokusunda, endometriyumda, fallop epiteline ve plasentada VD ekspresyonunun olduğu gösterilmiştir (54, 55). D vitamininin dişi sıçanların üreme kapasitesi üzerindeki etkilerine ilişkin herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu sebeple yapmış olduğumuz

çalışmamızda, VD'nin MTX'e bağlı ovaryum toksisitesi üzerine etkilerini histopatolojik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal parametrelerde detaylı olarak araştırmayı amaçladık.

Yapılan çalışmalar, MTX'in neden olduğu birçok yan etkinin reaktif oksijen radikallerinin (ROS) sebep olduğu oksidatif hasar nedeniyle meydana geldiğini göstermiştir (56-59). MTX'in ovaryumda sebebiyet verdiği oksidatif hasarın ve VD'nin koruyuculuğunun belirlenmesi için çalışmamızda serumdan alınan örneklerde oksidatif hasar ve antioksidan etkinliğin göstergesi olan TOS ve TAS biyokimyasal belirteçleri değerlendirilmiştir. Daha önceki çalışmaların değerlendirmeleri sonucu olarak MTX verilmesinin ardından lipid peroksidasyon seviyesinde artışa ve antioksidan seviyesinde düşüşe sebebiyet verdiği rapor edilmiştir (60). Ata ve ark. yapmış oldukları çalışmada, sıçanlara MTX uygulamasının MDA düzeyini artırdığını, antioksidatif parametrelerden tGSH ve SOD düzeylerini ise azalttığını belirtilmişlerdir (61). ROS birikiminin nükleer ve sitoplazmik olgunlaşmayı engellediği ve hücre ölümüne yol açtığı bilinmektedir (62). Yapmış olduğumuz çalışmada, MTX grubunda TOS seviyesinin kontrol ve diğer gruplara göre anlamlı olarak arttığı, TAS seviyesinin ise diğer gruplarla benzer olduğu izlendi. Mokhatari-Zaer ve ark. üç farklı VD dozu (100 IU/kg, 1000 IU/kg, 10.000 IU/kg) ile uyguladıkları 21 günlük deney sonucu, VD uygulamasının hasar grubunda artan MDA seviyesini azalttığını, antioksidatif parametrelerden CAT ve SOD düzeylerini ise artırdığını rapor etmişlerdir (63). Yapmış olduğumuz çalışmada MTX+D grubunda MTX grubuna göre TOS seviyesinin düştüğünü fakat bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit ettik.

Yapılan birçok çalışmada MTX uygulamasının vücut ve over ağırlıklarında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (64). Benzer olarak Karri ve ark. yapmış olduğu çalışmada MTX'e maruz kalmış grup ile kontrol grubu kıyaslandığında vücut ağırlıkları ve over ağırlıkları yönünden anlamlı bir azalmanın olduğunu ileri sürmüşlerdir (65). Yapmış olduğumuz çalışmada ise deney öncesi ve deney sonrası kilo alımı değerlendirildiğinde MTX'e maruz kalmış gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir kilo kaybının olmadığı ayrıca over ağırlıkları yönünden de gruplar arasında anlamlı bir farkın bulunmadığı tespit edildi. Behmanesh ve ark. yapmış olduğu çalışmada VD ile tedavi edilen PKOS'lu sıçanlarda ovaryum ağırlığının arttığını rapor etmişlerdir (66). Çalışmamızda gruplar arası ovaryum ağırlıkları farkı açısından karşılaştırıldığında MTX+D grubu hariç gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$).

Ovaryum rezervi folikülogenez ve steroidogenez fizyolojik süreçlerini tamamlamak üzere foliküllerin kantitatif ve kalitatif durumunu gösteren ve ovaryumun potansiyel yetisini belirleyen bir tanımdır. Primordiyal folikül havuzu, over rezervinin tespiti için kullanılan en önemli ölçektir (67, 68). Yapılan çalışmalarda yumurtalık rezervinin değerlendirilmesi amacıyla çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Bunlar primordiyal folikül sayımı, serum AMH, FSH, LH, östrodiol, progesteron seviye ölçümüdür (69).

Çalışmamızda H-E ile boyanmış histolojik kesitlerde folikül sayıları hesaplanarak gruplar arası karşılaştırma yapıldı (43). Gol ve ark. dişi farelerde yüksek doz MTX uygulamasının primordiyal folikül üzerindeki etkisini araştırmış ve primordiyal folikül sayısının MTX grubunda azaldığını tespit etmişlerdir (70). Ata ve ark. *Wistar albino* ratlardaki MTX ovaryum hasarı bakıldığında dejenere sekonder foliküllerin sayısındaki artış ve ödemli yapıların varlığı görülmüştür. Diğer yandan yapılan bazı çalışmalarda MTX'in over rezervi ve fertilité üzerine olumsuz etkilerinin bulunmadığı rapor edilmiştir (72). Çalışmamızda MTX grubunda primordiyal folikül sayılarında azalmanın olmadığı (Şekil 4.41), atretik folikül sayısının MTX grubunda arttığını gözlemledik ($P<0.001$) (Şekil 4.43). Ayrıca histolojik olarak kesitlerde atreziye giden foliküllere özgü morfolojik deformasyonların bulgularına ulaşıldı (Şekil 4.18). Dejenere foliküllerde granüloza hücreleri arasında yan yüz bağlantılarının kaybına bağlı olarak hücresel ayrışmalar ve granüloza hücrelerinde vakuolizasyonlar gözlemlendi (Şekil 4.19). Bazı foliküllerde oositi çevreleyen zona pellusidanın yapısının bozulduğu ve düzensizleştiği ayrıca antral boşluklarında ölü granüloza hücre artıkları olduğunu izledik (Şekil 4.20). Dikkat çeken diğer bulgular over stromasındaki bağ dokusu artışı ve inflamatuvar hücre birikmesiydi (Şekil 4.21). Ayrıca granüloza hücrelerinde apoptotik cisimlere ve granüloza hücreleri arasında mitotik arreste giden hücrelere rastladık (Şekil 4.24, Şekil 4.25).

Anti-mülleryan hormon (AMH) pitüiter FSH'nın etkisiyle ve overyan granüloza hücrelerinden preantral ve küçük antral foliküllerden salınım yaptığı gösterilmiştir. AMH baskın follikül için seçilebilecek büyüklüğe ve değişim evresine gelene kadar sentezi devam eder. İnsanlardaki süreci follikülün 4-6 mm çapa sahip olmasına kadar sürmektedir. AMH teka hücresi ve atretik folliküllerden sentezlenmemektedir (73). Son çalışmalarda preantral, geç pre-antral ve preovulatuvar folliküllerde AMH mRNA seviyelerinin oositin gelişim evreleriyle paralel olarak düzenlendiği, AMH'nın intra ve inter-folliküler koordinasyonda önemli görevleri olduğu gösterilmiştir (74). AMH sentezini regüle eden hücresel aktiviteler kesin olarak anlaşılamamıştır. AMH'nın

granüloza hücreleri üzerinde reseptörlerinin tespit edilmesi overyan fizyolojisinde rolü bulunduğunu düşündürmektedir (75). Anđın ve ark yapmış oldukları çalışmalarında MTX uyguladıkları gruplarda AMH seviyesinin kontrol grubuna gre düştüğünü rapor etmişlerdir (76). Benzer şekilde, Ulug ve Oner yaptıkları çalışmada tek doz 50 mg MTX uygulanan dişi sıçanlarda AMH seviyesinin düştüğünü rapor etmişlerdir (77). Diğer yandan, Oriol ve ark. 25 kadın hastada ektopik gebelik için kullanılan 1mg/kg MTX'in AMH düzeyi üzerine etkisini incelemiş ve MTX ncesi serumdaki AMH seviyesinin tedavi sonrası değişmediğini bulmuşlardır (72). Bizde alışmamızda gruplar arasında AMH değerleri arasında farkın olmadığını tespit ettik.

Çalışmamızda granüloza hücrelerindeki hasarı tespit etmek için serum östrojen düzeyleri ölçüldü ve MTX grubu kontrol ve diğer gruplar ile kıyaslandığında östrojen seviyesinin benzer olduğu gözlendi. Ayrıca FSH, LH ve progesteron sonuçları değerlendirildiğinde gruplar arasında fark olmadığı görüldü. Shamberger ve ark. klinik çalışmasında osteosarkom hastalarına yüksek doz MTX tedavisinden sonra ovaryum fonksiyonlarına bakılmış ve serum FSH, LH, strojen, progesteron hormon seviyesinde bir değişiklik olmadığını rapor etmişlerdir (78).

MTX trofoblast hücreleri, kan kök hücrelerini ve gonadal hücreler gibi hızla bölünen hücreleri özellikle etkiler (79, 80). Yapılan deneysel hayvan çalışmalarında MTX'in hücrelerin metafazda durmasına neden olduğu gösterilmiştir (69). Benzer şekilde çalışmamızda granüloza hücreleri arasında mitotik arreste giden hücrelerin olduğunu gözlemledik.

Çalışmamızda ışık mikroskopik olarak over stroması içerisinde çok sayıda apoptotik hücrelere rastladık. Buna ilaveten yaptığımız çalışmada apoptotik hücreler, immünohistokimyasal metot olan kaspaz-3 immnoreaksiyonu kullanılarak belirlendi. Kaspazlar, hücre intiharı olarak bilinen apoptoz sürecinde temel rol alan sistein-proteinaz grubu enzimlerdir ve apoptoz sırasında meydana gelen bazı hücresel değişiklikler bu enzimlerin etkin olduğu durumlar sonucunda gerçekleşir (81).

Ovaryum kesitlerinde yapılan mikroskopik değerlendirme sonucu, apoptotik hücrelere antral foliküller, graaf folikülü, olgun korpus luteum ve gerilemiş korpus luteumda rastlanmıştır. Antrum oluşmasında, ovulasyonun gerçekleşmesinde ve korpus luteumun gerilemesinde hücrelerin apoptoza uğraması olağan bir durum olarak rapor edilmiştir (82-87). Carlson ve ark. oksidatif stres ve apoptozisin steroidojenik hücrelerin ölmeleri ve korpus luteumun gerilemesinde anahtar rol oynadığını bildirmişlerdir. Karri ve ark. yapmış olduğu çalışmadaki histolojik görüntülerde granüloza hücrelerinde

apoptoza giden hücreler olduğunu gözlemlemişlerdir (65). Ural ve ark yapmış oldukları çalışmalarında MTX uyguladıkları grupta kaspaz-3 pozitif hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğunu rapor etmişlerdir (88). Benzer şekilde yapmış olduğumuz çalışmada MTX grubu kontrol grubuyla kıyaslandığında kaspaz-3 pozitif hücre sayısının anlamlı olarak arttığı tespit edildi. Çalışmamızda MTX ve MTX+D grubu kıyaslandığında ise kaspaz-3 pozitif hücre sayısının azaldığı gözlemlendi ($P<0.05$).

Mast hücreleri sitoplazmik granüllerinde histamin, heparin, triptaz, kimaz, eozinofil kemotaktik faktör-A (ECF-A) gibi serin proteinler bulunduran bağ dokusunun immünolojik hücrelerindendir. Mast hücreleri organizmada özellikle dış ortam ile bağlantılı doku ve organ kompartmanlarında ve özellikle kan damarları yakınlarında lokalize olma eğilimi gösteren hücrelerdir (89, 90). Mast hücreleri, granüllerinde bulunan sülfatlanmış glikozaminoglikanların (heparin) varlığı nedeniyle bazik (TB, metilen mavisi, tiyonin vb.) boyalar ile boyandığında metakromazi gösterirler (91). Yapılan çalışmalarda, menstural siklusa bağlı olarak ovaryum ve uterusu mast hücresi dağılımının farklılık gösterdiği rapor edilmiştir (90). Çalışmamızda, mast hücrelerini değerlendirebilmek amacıyla kesitlere Toluidin mavisi boyama yöntemi uygulandı. MTX grubu kontrol grubuyla kıyaslandığında mast hücre sayısının artış gösterdiği fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı derecede olmadığı gözlemlendi. MTX ve MTX+D grubu kıyaslandığında ise mast hücre sayılarının benzer olduğu izlendi.

Çalışmamızda serum VD düzeyinin MTX uygulanan sıçanlarda kontrol grubuna göre azaldığı ancak anlamlı bir fark olmadığı, fakat VD uygulanan gruplar MTX ve kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında VD seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gözlemlendi. Çalışmamızda serum Ca ve fosfor düzeyi bakımından ise gruplar arasında fark gözlenmedi. Yılmaz ve ark romatoid artrit tedavisi için MTX kullanılan hastalar üzerinde yaptığı klinik çalışmaya göre MTX kullanan hastaların serum Ca ve P seviyesinin değişiklik göstermediğini rapor etmişlerdir (92).

Ayrıca çalışmamızda VD etkinliğini göstermek amacıyla kesitlere immünohistokimyasal olarak VDR boyaması uygulandı. MTX grubunda kontrol grubuna kıyasla VDR pozitifliğinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı tespit edildi. MTX+D grubunda ise MTX grubuna göre VDR pozitifliğinin anlamlı derecede arttığı izlendi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmanın sonucunda, histopatolojik olarak MTX grubunda folikül sayılarında azalmanın olmadığı, atretik folikül sayısının ise MTX grubunda arttığını gözlemledik. Ayrıca histolojik olarak kesitlerde atreziye giden foliküllere özgü morfolojik değişiklikler tespit ettik. Dejenere foliküllerde granüloza hücreleri arasında yan yüz bağlantılarının kaybına bağlı olarak hücresel ayrışmalar ve granüloza hücrelerinde vakuolizasyonlar izledik. Bazı foliküllerde oositi çevreleyen zona pellusidanın yapısının bozulduğu ve düzensizleştiği ve antral boşluklarında ölü granüloza hücre artıkları olduğunu gözlemledik. Dikkat çeken diğer bulgular over stromasındaki bağ dokusu artışı ve inflamatuvar hücre birikmesiydi. Ayrıca granüloza hücrelerinde apoptotik cisimlere ve granüloza hücreleri arasında mitotik arreste giden hücrelere rastladık. Toluidin mavisi ile boyanan kesitlerde ise MTX grubunda mast hücre sayısının arttığını fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını tespit ettik. İmmunohistokimyasal değerlendirmede, MTX grubunda kaspaz-3 pozitif hücre sayısının arttığı, VDR pozitif hücre sayısının ise azaldığı izlendi. Biyokimyasal analizlerde, MTX grubunda TOS seviyelerinde artış gözlenirken, AMH, TAS, FSH, LH, Ca, fosfat seviyelerinde ise değişiklik izlenmedi. Serum VD seviyesinin D vitamini uygulanan gruplarda kontrol ve MTX gruplarına göre arttığı tespit edildi.

Histopatolojik olarak VD verilen tedavi grubunda folikül sayısında değişiklik gözlenmezken atretik foliküllerin sayısının azaldığı fakat bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi. İmmunohistokimyasal değerlendirmede, MTX+D grubunda kaspaz-3 pozitif hücre sayısının azaldığı, buna karşın VDR pozitif hücre sayısının ise arttığı gözlemlendi. Ayrıca MTX+D grubunda mast hücre sayısı yönünden değişiklik izlenmedi. Biyokimyasal olarak çalışmamızda VD uygulamasının MTX'in neden olduğu TOS artışını azalttığı fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı görüldü. TAS, AMH, testosteron, östrojen, FSH ve LH, Ca ve fosfat seviyelerinde ise VD uygulamasının değişiklik yapmadığı tespit edildi.

Sonuç olarak bu çalışma, MTX'in oksidatif stresi artırarak over hasarı oluşturduğunu fakat over rezervinin göstergesi olan primordiyal folikül sayısında ve AMH seviyesinde değişikliğe neden olmadığını gösterdi. Diğer yandan atretik folikül ve apoptotik hücre sayısında artışa yol açtı. Sıçanlara VD uygulamasının ise tüm parametreler değerlendirildiğinde Kaspaz-3 pozitif hücre sayısını azaltması ve VDR

pozitif hücre sayısını artırması dışında beklenen iyileştirici etkiyi göstermediğini tespit ettik. Bununla birlikte, VD'nin farklı süre ve dozlarda kullanım şekilleri üzerine daha ileri çalışmaların yapılmasına ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.



KAYNAKLAR

1. Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Kantarceken B. N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats. *Medical science monitor. International Med Sci Monit* 2006, 12: 274-8
2. Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in female patients. *Hum Reprod Update* 2004, 10: 251-66
3. Dutz JP, Ho VC. Immunosuppressive Agents in Dermatology: An Update. *Dermatol Clin* 1998, 16: 235-51
4. Jolivet J, Cowan KH, Curt GA, Clendeninn NJ, Chabner BA. The Pharmacology and Clinical Use of Methotrexate. *New Engl J Med* 1983, 309: 1094-104
5. Basalamah MA, Abdelghany AH, El-Boshy M, Ahmad J, Idris S, Refaat B. Vitamin D alleviates lead induced renal and testicular injuries by immunomodulatory and antioxidant mechanisms in rats. *Scientific Reports* 2018, 8: 1-13
6. Debb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signaling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2007, 7: 684-700
7. Krishnan AV, Feldman D. Mechanisms of the anti-cancer and anti-inflammatory actions of vitamin D. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2011, 51: 311-36
8. Rey R. Embryology and endocrinology of genital development. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1998, 12: 17-33
9. Wilson JD. Sexual Differentiation. *Annual Reviews Physiol* 1978, 40: 279-306
10. Demirtaş A, Pişkin İ. Memelilerde cinsiyet gelişimi ve hormonal kontrolü. *Vet Hekim Der* 2009, 80: 23-8
11. Kuyuncu Y, Tap Ö. Oosit Olgunlaşma Süreci ve Düzenleyici Faktörler. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 2009, 18: 227-40
12. Gürgeç S.G. Kemoterapi Uygulamasının Sıçan Ovaryum Folikülleri Üzerine Etkisi ve Çeşitli Antioksidanların Koruyucu Rollerinin Yapısal ve İmmünohistokimyasal Düzeyde Belirlenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi, 2009.

13. Bowles J, Feng CW, Miles K, Ineson J, Spiller C, Koopman P. ALDH1A1 provides a source of meiosis-inducing retinoic acid in mouse fetal ovaries. *Nature Communications* 2015, 7: 11-8
14. Sadler TW, Thomas W. *Langman Medikal Embriyoloji*. Başaklar AC (Çeviren). 13. Baskı, Ankara: Palme Yayınevi, 2022: 7-13
15. Eşrefoğlu M. *Embriyoloji*, 1. Baskı. İstanbul Tıp Kitapevi, 2017: 24-36
16. Guyton A.C, Hall M.E. *Guyton and Hall Tıbbi Fizyoloji*. Yeğen B.Ç. (Çeviren). 14. Baskı, Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri, 2021: 1011-34
17. Arifoğlu Y. *Her Yönüyle Anatomi*, 3.Baskı. İstanbul Tıp Kitabevleri, 2021: 506-10.
18. Kierszenbaum AL, Tres LL. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*. Demir R (Çeviren). 14. Baskı, Ankara: Palme Yayınevi, 2021: 567-72
19. Ross MH, Wojciech P. *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas*. Baykal B. (Çeviren). Palme Yayıncılık, Ankara, 2014, 830-40
20. Eşrefoğlu M. *Özel Histoloji*, 3. Baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevleri, 2021: 291
21. Junqueira LC, Carneiro J. *Temel Histoloji Text & Atlas*. Aytekin Y, Solakoğlu S. (Çeviren). 10. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2006: 457
22. Gartner LP, Hiatt JL. *Color Textbook of Histology*, 3th ed. Philadelphia, Saunders Elsevier, 2007: 468-70
23. Demir M. Over Rezerv Tayininde En İyi Belirteç: Anti-Müllerien Hormon (AMH). *Türk Biyokimya Dergisi* 2013, 11: 79-85
24. Moore KL, Persaud TVN. *Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi*. Yıldırım M (Çeviren). 6. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002: 28
25. Wilson C, Di Clemente N, Ehrenfels C, Pepinsky R, Jossen N, Vigier B, Cate R. Müllerian inhibiting substance requires its N-terminal domain for maintenance of biological-activity, a novel finding within the transforming growth-factor-beta superfamily. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 247-57
26. Van DJ, Lambalk CB, Kwee J, Looman CW, Eijkemans MJ, Fauser BC, Broekmans FJ. Comparison of inter- and intra-cycle variability of anti-Müllerian hormone and antral follicle counts. *Hum Reprod* 2010, 25: 221-7

27. Moolhuijsen LME, Visser JA. Anti-Müllerian Hormone and Ovarian Reserve: Update on Assessing Ovarian Function. *J Clin Endocrinol Metab* 2020, 105: 3361-73
28. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. *Larsen's Human Embriology*, 5th ed. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2015: 25
29. Köylü H. *Klinik Anlatımlı Tıbbi Fizyoloji*, 1. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, 2014: 475-81
30. Armağan İ. Metotreksat'ın karaciğer ve böbrekte neden olduğu hasarda oksidatif stresin rolü. *SDÜ Tıp Fak Derg* 2015, 22: 151-5
31. Padmanabhan S, Tripathi DN, Vikram A, Ramarao P, Jena GB. Methotrexate-induced cytotoxicity and genotoxicity in germ cells of mice: Intervention of folic and folinic acid. *Mutat Res* 2009, 673: 43-52
32. Zarou MM, Vazquez A, Helgason GV. Folate metabolism: a re-emerging therapeutic target in haematological cancers. *Leukemia* 2021, 35: 1539-51
33. Akyol Y. Farelerde Metotreksatla İndüklenen Oksidatif Stress Üzerine Apigeninin Koruyucu Etkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Burdur: Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, 2020
34. Ata N, Kulhan NG, Kulhan M, Turkler C, Kiremitli T, Kiremitli S, Cimen FK, Suleyman H, Toprak V. The effect of resveratrol on oxidative ovary-damage induced by methotrexate in rats (Resveratrol oxidative ovary-damage). *Gen. Physiol. Biophys.* 2019, 38: 519-24
35. Costanzo L.S. *Fizyoloji*. Öztürk L (Çeviren). 6.Baskı, Ankara: Hipokrat Kitabevi, 2018: 455-58
36. Duman İ, Ün İ. Sekosteroid bir hormon olarak D vitamini ve kanser ilişkisi. *Lokman Hekim Dergisi* 2019, 9: 19-29
37. Cappy H, Giacobini P, Pigny P, Bruyneel A, Billiard ML, Dewailly D, Jonard SC. Low vitamin D3 and high anti-Müllerian hormone serum levels in the polycystic ovary syndrome (PCOS): Is there a link?. *Ann Endocrinol* 2016, 77: 593-9

38. Fatemi F, Mohammadzadeh A, Sadeghi MR, Akhondi MM, Mohammadmoradi S, Kamali K, Lackpour N, Jouhari S, Zafadoust S, Mokhtar S, Giahi L. Role of vitamin E and D₃ supplementation in Intra-Cytoplasmic Sperm Injection outcomes of women with polycystic ovarian syndrome: A double blinded randomized placebo-controlled trial. *Clin Nutr ESPEN* 2017, 18: 23-30
39. Yalcin A, Aydin H, Turk A, Dogukan M, Eser N, Onderci M, Uckardes F, Yoldas A, Yilmaz E, Keles H. Vitamin D: An effective way to combat methotrexate-induced testis injury. *Med Science* 2020, 9: 998-1003
40. Kurt Ş, Erişgin Z, Tekelioğlu Y, Akman AU, Türedi S. Sıçanlarda Metotreksat ile İndüklenen Testis Hasarına Karşı E Vitamininin Koruyucu Etkileri: Histopatolojik ve Akım Sitometrik Çalışma. *Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2020, 7: 278-84
41. Mahmoud RH, Mohammed MA, Said ES, Morsi EM, Abdelaleem OO, Abdel All MO, Elsayed RM, Abdelmeguid EA, Eldosoki DE. Assessment of the cardioprotective effect of liraglutide on methotrexate induced cardiac dysfunction through suppression of inflammation and enhancement of angiogenesis in rats. *Eur Revi Medi Pharmacol Sci* 2021, 25: 6013-24
42. Köylü A, Ömeroğlu S, Dizdar SÖK, Demirel MA. Sıçanlarda Vajinal Yayma Örneklerinin Sitolojik Değerlendirilmesi. *MJAVLS* 2021,11: 94-9
43. Pedersen T, Peters H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J Reprod Fertil* 1968: 830-63
44. Fosfat kiti Xu H, Yang D, Jiang D, Chen HY. Phosphate Assay Kit in One Cell for Electrochemical Detection of Intracellular Phosphate Ions at Single Cells. *Front Chem* 2019, 7: 1-6
45. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005; 38: 1103-11
46. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004; 37: 277-85.
47. Oktay K, Buyuk E, Libertella N, Akar M, Rosenwaks Z. Fertility preservation in breast cancer patients: A prospective controlled comparison of ovarian stimulation

- with tamoxifen and letrozole for embryo cryopreservation. *J Clin Oncol* 2005, 23: 4347-53
48. Mercantepe T, Kalkan Y, Tumkaya L, Sehitoglu İ, Mercantepe F, Yıldırım S. Protective effects of tumor necrosis factor alpha inhibitors on methotrexate-induced pancreatic toxicity. *Adv Clin Expl Med* 2018, 27: 715-20
49. Flores F, Kerdel FA. Other novel immunosuppressants. *Dermatol Clinics* 2000, 18: 475-83
50. Yucel Y, Oguz E, Kocarslan S, Tatli F, Gozeneli O, Seker A, Sezen H, Buyukaslan H, Aktumen A, Ozgonul A, Uzunkoy A, Aksoy N. The effects of lycopene on methotrexate-induced liver injury in rats. *Bratisl Lek Listy*. 2017, 118: 212–6.
51. Uyar I, Yucel OU, Gezer C, Gulhan I, Karis B, Hanhan HM, Ozeren M. Effect of single-dose methotrexate on ovarian reserve in women with ectopic pregnancy. *Fert Steril* 2013, 100: 1310–3.
52. Boots CE, Gustofson RL, Feinberg EC. Does methotrexate administration for ectopic pregnancy after in vitro fertilization impact ovarian reserve or ovarian responsiveness?. *Fert Steril* 2013, 100: 1590–3.
53. Buggio L, Roncella E, Somigliana E, Vercellini P. Vitamin D and benign gynaecological diseases: a critical analysis of the current evidence. *Gynecol Endocrinol* 2016, 32: 259-63
54. Vuolo L, Somma CD, Faggiano A, Colao A. Vitamin D and cancer. *Front Endocrinol* 2012, 23: 58-71
55. Babiak RMV, Campello AP, Carnieri EGS, Oliveira MB. Methotrexate: pentose cycle and oxidative stress. *Cell Biochem Funct* 1998, 16: 283–93
56. Kolli VK, Abraham P, Isaac B, Selvakumar D. Neutrophil infiltration and oxidative stress may play a critical role in methotrexate-induced renal damage. *Chemotherapy* 2009, 55: 83-0
57. Al-abdaly YZ, Saeed MG, Al-Hashemi HM. Effect of methotrexate and aspirin interaction and its relationship to oxidative stress in rats. *Iragi J Veterinary Scienc* 2021, 35: 151-6

58. Tedeschi PM, Lin H, Gounder M, Kerrigan JE, Abali EE, Kaathleen S, Bertino JR. Suppression of Cytosolic NADPH Pool by Thionicotinamide Increases Oxidative Stress and Synergizes with Chemotherapy. *Mol Pharmacol* 2015, 88: 720–7
59. Gunyeli I, Saygin M, Ozmen O. Methotrexate-Induced toxic effects and the ameliorating effects of astaxanthin on genitourinary tissues in female rat model. *Ach Gynecol Obstet* 2021, 304: 985-97
60. Ata N, Kulhan NG, Kulhan M, Turkler C, Kiremitli T, Kiremitli S, Cimen FK, Suleyman H, Toprak V. The effect of resveratrol on oxidative ovary-damage induced by methotrexate in rats (Resveratrol oxidative ovary-damage). *Gen Physiol Biophys* 2019, 38: 519-24
61. Tatemoto H, Sakurai N, Muto N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during in vitro maturation: role of cumulus cells. *Biology Reproduct* 2000, 63: 805-10
62. Mohtari-Zaer A, Hosseini M, Salmani H, Arab ZO, Zareian P. Vitamin D₃ attenuates lipopolysaccharide-induced cognitive impairment in rats by inhibiting inflammation and oxidative stress. *Life Scienc* 2020, 253: 1-8
63. Patel NN, Ghodasara DJ, Pandey S, Ghodasara PD, Khorajiya JH, Joshi BP, Dave CJ. Subacute toxicopathological studies of methotrexate in Wistar rats. *Veterinary World* 2014, 7: 489-95
64. Karri S, Vanithakumari G. Effect of methotrexate and leucovorin on female reproductive tract of albino rats. *Cell Biochem Funct* 2010, 29: 1-21
65. Behmanesh N, Abedelahi A, Charoudeh HN, Alihemmati A. Effects of vitamin D supplementation on follicular development, gonadotropins and sex hormone concentrations, and insulin resistance in induced polycystic ovary syndrome. *Turk J Obstet Gynecol* 2019, 16: 143-50
66. Lass A. Assessment of ovarian reserve - is there a role for ovarian biopsy?. *Human Reproduct* 2001, 16: 1055-7
67. Seifer DB, Lambert MG, Hogan JW. Day 3 serum inhibin-B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. *Fertil and Steril* 1997, 67: 110-4

68. Benian A, Guralp O, Uzun DD, Okyar A, Sahmay S. The effect of repeated administration of methotrexate (MTX) on rat ovary: measurement of serum antimüllerian hormone (AMH) levels. *Gynecol Endocrinol* 2013, 29: 226-9
69. Gol M, Koyuncuoglu M, Uslu T. Influence of high-dose methotrexate therapy on the primordial follicles of the mouse ovary. *J Obstet Gynaecol Res* 2009, 35: 429-33.
70. Ata N, Kulhan NG, Kulhan M, Turkler C, Kiremitli T, Kiremitli S, Cimen FK, Suleyman H, Toprak V. The effect of resveratrol on oxidative ovary-damage induced by methotrexate in rats (Resveratrol oxidative ovary-damage). *Gen. Physiol. Biophys.* 2019, 38: 519-24
71. Oriol B, Barrio A, Pacheco A, Serna J, Zuzuarregui JL, Garcia-Velasco JA. Systemic methotrexate to treat ectopic pregnancy does not effect ovarian reserve. *Fertil and Steril* 2008, 90: 1579-82
72. Meyts ERD, E, Jorgensen N, Graem N, Müller J, Cate RL, Skakkebaek NE. Expression of anti-müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84: 3836–44.
73. Salmon NA, Handyside AH, Joyce IM. Oocyte regulation of anti-müllerian hormone expression in granulosa cells during ovarian follicle development in mice. *Dev Biol* 2004, 266: 201–8.
74. Josso N, Clemente N, Gouedard L. Anti-müllerian hormone and its receptors. *Mol Cell Endocrinol* 2001, 179: 25–32.
75. Anđın AD, Çöğendez E, Gün İ, Sakin Ö, Çıkman MS, Başak K, Kaptanağası AO, Alan Y, Alna M, Beyan E. The Effect of Dehydroepiandrosterone on Ovarian Reserve in Ovarian Damage Caused by Methotrexate. *Med Labor Technol J* 2020, 6: 1-13.
76. Ulug P, Oner G. Evaluation of the effects of single or multiple dose methotrexate administration, salpingectomy on ovarian reserve of rat with the measurement of anti-Müllerian hormone (AMH) levels and histological analysis. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol* 2014, 181: 205-9
77. Shamberger RC, Rosenberg SA, Seipp CA, Sherins RJ. Effect of High-Dose Methotrexate and Vincristine on Ovarian and Testicular Functions in Patients

- Undergoing Postoperative Adjuvant Treatment of Osteosarcoma. *Cancer Treat Reps* 1981, 65: 739-46
78. Tian N, Yu J, Zhang S, Ma WY, Wang T, Wang YM. Effects of methotrexate on the quality of oocyte maturation in vitro. *Eur Biophys J* 2018, 47: 249-60
79. Bayram M, Ozogul C, Ercan ZS, Dilekoz E, Soyer C, Bayram O. Examination of the rescue effects of folic acid on derangement of the tubo-ovarian ultrastructural architecture caused by methotrexate. *Adv Ther* 2006, 23: 772-7
80. Özatik FY, Özatik O, Yiğitaslan S, Ünel ÇÇ, Erol K. Protective role of resveratrol on testicular germ cells in mice with testicular toxicity. *Turk J of Urol* 2017, 43: 444-50
81. Behrman HR, Kodaman PH, Preston SL, Gao S. Oxidative stress and the ovary. *J Soc Gynecol Investig* 2001, 8: 40-2.
82. Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Onoda N, Satake K. Immunohistochemical detection of 8- hydroxydeoxyguanosine, a marker of oxidative DNA damage, in human chronic cholecystitis. *Histopathology* 2002, 40: 531-5
83. Rodriguez CAM, Larios HM, Valdez MLS, Mendoza NM, Cruz ME, Lopez PA, Arroyo IC, Dominguez R, Cerbon M. C-fos and estrogen receptor gene expression pattern in the rat uterine epithelium during the estrous cycle. *Mol Reprod and Dev* 2003, 64: 379-88.
84. Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clinica Chimica Acta* 2004, 339: 1-9.
85. Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Repro Update* 2005, 11: 162-78.
86. Sato J, Hashimoto S, Doi T, Yamada N, Tsuchitani M. Histological characteristics of the regression of corpora lutea in wistar hannover rats: the comparisons with spraguedawley rats. *Journal Toxicol Pathol* 2014, 27: 107-13
87. Ural ÜM, Gürlek B, Alver A. Prospective effect of edaravone against radiation-induced ovarian injury: a histopathological and immunohistochemical evaluation in an experimental rat model. *Arch Gynecol Obstet* 2021, 303: 1009-16

88. Koçak Harem M. Mast hücre proteazları ve biyolojik nemi. *Sağlık Bilimleri Dergisi* 2005, 14: 61-7
89. Karaca T, Yrk M, Uslu S. Distribution and quantitative patterns of mast cells in ovary and uterus of rat. *Arch Med Vet* 2007, 39: 135-9
90. zcan O, Irmak MK, Dalcık H. Metakromazi. *T Klin J Med Sci* 1995, 15: 316-8
91. Yılmaz L, zoran K, Gndz OH, Uan H, Ycel M. Alendronate in rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate and glucocorticoids. *Rheumatol Int* 2001, 20: 65-9



EKLER

EK-1. Özgeçmiş



EK-2. Etik Kurul İzni

