

**T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PREMATÜRE OVARYAN YETMEZLİK (POY) MODELİNDE
FERULİK ASİDİN APOPTOZ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Nurşin KARAMAN

ORCID: 0000-0003-3444-0402

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Histoloji ve Embriyoloji yüksek lisans programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR

HAZİRAN-2022

TEZ KODU: DEU.HSL.MSc-2018970201

**T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PREMATÜRE OVARYAN YETMEZLİK (POY) MODELİNDE
FERULİK ASİDİN APOPTOZ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

**Nurşin KARAMAN
ORCID: 0000-0003-3444-0402**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Histoloji ve Embriyoloji yüksek lisans programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Serap CİLAKER MIÇILI
ORCID: 0000-0002-9830-0989**

İZMİR

HAZİRAN-2022

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
ETİK BEYAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum “Prematüre Ovaryan Yetmezlik (POY) Modelinde Ferulik Asidin Apoptoz Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı Yüksek Lisans tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeler akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçlar bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimi çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Nurşin KARAMAN

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
ŞEKİL DİZİNİ	iv
TABLO DİZİNİ	vi
GRAFİKLER	vii
KISALTMALAR	viii
TEŞEKKÜRLER	x
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	3
1.GİRİŞ VE AMAÇ	5
2.GENEL BİLGİLER	9
2.1. Dişi Genital Sistemi	9
2.1.1. Ovaryum.....	10
2.1.1.1. Ovaryumun Embriyolojisi ve Gonadların Gelişimi	10
2.1.1.2. Ovaryumun Anatomisi, Kan desteği ve İnervasyonu.....	11
2.1.1.3. Ovaryum Histolojisi	12
2.1.1.4. Foliküler Gelişim ve Ovulasyon.....	13
2.1.1.4.1. Foliküler gelişim (Folikulogenez).....	13
2.1.1.4.2. Ovulasyon.....	20
2.2. Primer Over Yetmezlik (POY).....	23
2.2.1. POI teşhisi	24
2.2.2. POI'nin Kliniği	25
2.2.3. Poy'da Ovaryumların Histolojisi	25
2.3. Apoptoz	27
2.3.1. Apoptoz Morfolojisi.....	28
2.3.2. Apoptozun Biyolojik Mekanizması	29
2.3.2.1. Ekstrinsik yol.....	29
2.3.2.2. İntrinsik yol	30
2.3.2.3. Perforin/granzim yolu	31
2.4. Bcl-2 ve Bax.....	32
2.5. Nitrik Oksit, iNOS ve eNOS.....	33

2.6. Proliferasyon Hücre Nükleer Antijeni (PCNA) ve Ovaryum	34
2.7. Toplam Oksidan Seviyesi (TOS) ve Toplam Antioksidan Seviyesi (TAS)	35
2.8. Siklofosfamid	35
2.9. Ferulik Asit	38
2.9.1. Ferulik Asit özellikleri	38
2.9.2. Ferulik Asidin Antioksidatif Aktivitesi	39
2.9.3. Ferulik asidin anti-inflamatuar etkisi	40
2.9.4. Ferulik asidin anti-fibroz etkisi	40
2.9.5. Ferulik asidin anti-apoptotik etkisi	41
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	42
3.1. Araştırmanın Tipi	42
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	42
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Gruplar	43
3.4. Çalışma Materyali	44
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	44
3.6. Veri Toplama Araçları	44
3.6.1. Kullanılan Cihazlar.....	44
3.6.2. Kullanılan Sarf Malzemeler	45
3.6.3. Araştırmada Kullanılan Yöntemler	46
3.6.3.1. Deneklerin Menstrual Sikluslarının Belirlenmesi	46
3.6.3.2. Deneklerin Ağırlık Ölçümü	47
3.6.3.3. Histokimyasal Değerlendirmeler	47
3.6.3.3.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü	48
3.6.3.3.2. PAS (Periodic Acid Schiff) Boyama Protokolü.....	49
3.6.3.3.3. Masson Trikrom Boyama Protokolü	51
3.6.3.4. Foliküller ve Korpus Luteum Sayımı.....	52
3.6.3.5. İmmünohistokimyasal İncelemeler.....	53
3.6.3.5.1. İmmünohistokimya Boyama Protokolü	53
3.6.3.5.2. İmmünohistokimyasal Skorelama	53
3.6.3.6. Biyokimyasal İncelemeler	55
3.6.3.6.1. Doku Hazırlığı-Homojenizasyon.....	55

3.6.3.7. İstatistiksel Analiz	56
3.7. Etik Kurul Onayı	56
4.BULGULAR	57
4.1. Denek Ağırlıkları	57
4.2. Deney Süresince Vaginal Smear Değerlendirilmesi	58
4.2.1. Siklofosfamid ve Siklofosfamid+Ferulik Asit Gruplarında Östrus Döngüsü Değişiklikleri.....	58
4.3. Histokimyasal Bulgular.....	59
4.3.1. Ovaryum Dokusuna Ait Hematoksilen & Eozin Boyama Değerlendirilmesi.....	59
4.3.2. Folikül Sayılarının Değerlendirilmesi	65
4.3.3. Ovaryum Dokusuna Ait PAS Boyama Değerlendirmesi.....	67
4.3.4. Ovaryum Dokusuna Ait Masson 's Trikrom Boyası Değerlendirmesi	70
4.4. Biyokimyasal Bulgular.....	72
4.5. İmmünohistokimyasal Bulgular	73
4.5.1. Aktive Kaspaz-3 İmmünohistokimya Boyaması Bulguları	73
4.5.2. Bcl-2 İmmünohistokimya Boyaması Bulguları	77
4.5.3. Bax İmmünohistokimya Boyaması Bulguları	81
4.5.4. iNOS İmmünohistokimya Boyaması Bulguları	84
4.5.5. eNOS İmmünohistokimya Boyaması Bulguları.....	88
4.5.6. PCNA İmmünohistokimya Boyaması Bulguları	92
5.TARTIŞMA	96
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	102
7.KAYNAKLAR	103
8.EKLER	109
8.1. Ek-1 Etik Kurul Onayı	109
8.2. Ek-2 Özgeçmiş	110

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Dişi iç genital organların şematik çizimi	9
Şekil 2: Üç haftalık (üst) ve altı haftalık (alt) embriyoların kesitleri	11
Şekil 3: Ovaryum Histolojisi.....	13
Şekil 4: Primordiyal folikül mikrofotoğrafı	14
Şekil 5: Primer folikül mikrofotoğrafı.	15
Şekil 6: Çok tabakalı primer folikülün mikrofotoğrafı	16
Şekil 7: Sekonder folikül mikrofotoğrafı	17
Şekil 8: Graaf folikülünün mikrofotoğrafı	19
Şekil 9: POY ovaryumuna karşı normal ovaryumda ovulasyon ve folikülogenez	26
Şekil 10: Apoptik sinyal yolları.....	32
Şekil 11: Siklofosfamid; 2-bis (kloroetil) amino tetrahidro-2H-1,2,3- oksazofosforin 2-oksit	37
Şekil 12: Siklofosfamid mekanizması.....	38
Şekil 13: Ferulik asidin kimyasal yapısı	39
Şekil 14: Siklus döngüsüne ait H&E boyama	59
Şekil 15: Kontrol grubuna ait H&E boyama genel görünümü.....	61
Şekil 16: Kontrol grubuna ait H&E boyama.....	61
Şekil 17: Ferulik Asit grubuna ait H&E boyama genel görünümü.....	62
Şekil 18: Ferulik Asit grubuna ait H&E boyama.	62
Şekil 19: Siklofosfamid grubuna ait H&E boyama genel görünümü	63
Şekil 20: Siklofosfamid grubuna ait H&E boyama.....	63
Şekil 21: Siklofosfamid grubuna ait H&E boyama.....	64
Şekil 22: Siklofosfamid + Ferulik asit grubuna ait H&E boyama genel görünümü ..	64
Şekil 23: Siklofosfamid + Ferulik asit grubuna ait H&E boyama	65
Şekil 24: Kontrol grubuna ait PAS boyama	68
Şekil 25: Ferulik Asit grubuna ait PAS boyama	68
Şekil 26: Siklofosfamid grubuna ait PAS boyama.....	69
Şekil 27: Siklofosfamid + Ferulik asit grubuna ait PAS boyama	69
Şekil 28: Kontrol grubuna ait Masson Trikrom boyama	70
Şekil 29: Ferulik Asit grubuna ait Masson Trikrom boyama.....	71
Şekil 30: Siklofosfamid grubuna ait Masson Trikrom boyama	71

Şekil 31: Siklofosfamid + Ferulik asit grubuna ait Masson Trikrom boyama.....	72
Şekil 32: Kontrol grubuna ait Kaspaz-3 immünohistokimya boyaması	75
Şekil 33: FA grubuna ait Kaspaz-3 immünohistokimya boyaması.....	75
Şekil 34: SF grubuna ait Kaspaz-3 immünohistokimya boyaması	76
Şekil 35: SF+FA grubuna ait Kaspaz-3 immünohistokimya boyaması	76
Şekil 36: Kontrol grubuna ait Bcl-2 immünohistokimya boyaması.....	78
Şekil 37: FA grubuna ait Bcl-2 immünohistokimya boyaması.....	79
Şekil 38: FA grubuna ait Bcl-2 immünohistokimya boyaması.....	79
Şekil 39: SF+FA grubuna ait Bcl-2 immünohistokimya boyaması	80
Şekil 40: Kontrol grubuna ait Bax immünohistokimya boyaması	82
Şekil 41: FA grubuna ait Bax immünohistokimya boyaması	82
Şekil 42: SF grubuna ait Bax immünohistokimya boyaması	83
Şekil 43: SF+FA grubuna ait Bax immünohistokimya boyaması.....	83
Şekil 44: Kontrol grubuna ait iNOS immünohistokimya boyaması	85
Şekil 45: FA grubuna ait iNOS immünohistokimya boyaması.....	86
Şekil 46: SF grubuna ait iNOS immünohistokimya boyaması	86
Şekil 47: SF+FA grubuna ait iNOS immünohistokimya boyaması.....	87
Şekil 48: Kontrol grubuna ait eNOS immünohistokimya boyaması.....	89
Şekil 49: FA grubuna ait eNOS immünohistokimya boyaması	90
Şekil 50: SF grubuna ait eNOS immünohistokimya boyaması.....	90
Şekil 51: SF+FA grubuna ait eNOS immünohistokimya boyaması	91
Şekil 52: Kontrol grubuna ait PCNA immünohistokimya boyaması.....	93
Şekil 53: FA grubuna ait PCNA immünohistokimya boyaması	93
Şekil 54: SF grubuna ait PCNA immünohistokimya boyaması.....	94
Şekil 55: SF+FA grubuna ait PCNA immünohistokimya boyaması	94

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Araştırma planı	42
Tablo 2: Kullanılan cihazlar	44
Tablo 3: Doku takibi protokolü	47
Tablo 4: Hematoksilen & Eozin boya protokolü.	48
Tablo 5: PAS boyama protokolü	50
Tablo 6: Masson Trikrom boyama protokolü.	51
Tablo 7: İmmünohistokimyasal boyama protokolü.	54
Tablo 8: Folikül sayımlarının gruplar arası ortalaması.	66



GRAFİKLER

Grafik 1: Deney başında ve deney sonunda grupların kendi içindeki ağırlıklarının karşılaştırılması	57
Grafik 2: Gruplara göre folikül sayıları dağılımı	66
Grafik 3: Biyokimyasal olarak serumda TOS değerlendirme sonucu	72
Grafik 4: Biyokimyasal olarak serumda TAS değerlendirme sonucu	73
Grafik 5: Gruplara göre Aktive Kaspaz-3 immünohistokimya boyanması H-score dağılımı	77
Grafik 6: Gruplara göre Bcl-2 immünohistokimya boyanması H-score dağılımı	80
Grafik 7: Gruplara göre Bax immünohistokimya boyanması H-score dağılımı	84
Grafik 8: Gruplara göre Bax immünohistokimya boyanması H-score dağılımı	87
Grafik 9: Gruplara göre eNOS immünohistokimya boyanması H-score dağılımı	91
Grafik 10: Gruplara göre PCNA immünohistokimya boyanması H-score dağılımı ..	95

KISALTMALAR

- AIF:** Apoptoz İndükleyici Faktör
- AMH:** Anti-Müllerian hormon
- APAF-1:** Apoptoz Proteaz Aktive Edici Faktör-1
- ARDS:** Akut solunum sıkıntısı sendromu
- BMP15:** Kemik morfogenetik protein 15
- CAD:** Kaspaz aktive edici DNaz
- CTL:** Sitotoksik T lenfositler
- DC:** Dendritik hücre
- E2:** Östradiol
- eNOS:** Endotelyal Nitritoksit Sentetaz
- ESM:** Ekstrasellüler matrik
- FA:** Ferulik asit
- FADD:** Fas ile ilişkili ölüm alanı proteini
- FAM:** Fosforamid mustard
- FSH:** Folikül uyarıcı hormon
- GH:** Granüloza hücreleri
- H&E:** Hematoksilen ve Eozin
- hCG:** İnsan koryonik gonadotropin hormonu
- HRT:** Hormon replasman tedavisi
- ICAD:** İnaktif kaspaz aktive edici DNaz
- iNOS:** İndüklenebilir Nitritoksit Sentetaz
- i.p.:** İntraperitoneal
- KL:** Korpus luteum
- KO:** Kumulus ooforus

LH: Luteinize edici hormon

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NO: Nitrik oksit

nNOS: Nöronal Nitritoksit Sentetaz

OMI: Oosit maturasyon inhibitörü

OS: Oksidatif stres

PAMP: Patojen ile ilişkili moleküler patern

PAS: Periodic Acid Schiff Boyama

PGH: Primiordial germ hücreleri

PCNA: Proliferasyon Hücre Nükleer Antijeni

ROS: Reaktif oksijen türleri

SF: Siklofosfamid

TAS: Toplam Antioksidan Seviyesi

TE: Teka eksterna

TEM: Transmisyon elektron mikroskobu

TI: Teka interna

TP: Tek katlı primer folikül

TRADD: TNF reseptörü ile ilişkili olan ölüm alanı

ZP: Zona pellusida

TEŞEKKÜRLER

Yüksek Lisans eğitim ve öğretim sürecim boyunca bilgi ve tecrübelerini paylaşan, karşılaştığım her zorlukta yanımda olup yol gösteren, desteğini her koşulda hissettiğim, tezimin hipotezinin kurulmasında, şekillenmesinde ve tüm deneylerim süresince yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocalarım Doç. Dr. Serap CİLAKER MIÇILI ve Prof. Dr. Güven ERBİL'e,

Histoloji ve Embriyoloji eğitimime katkılarını sağlayan Prof. Dr. Ülker CANKURT, Prof. Dr. Çetin PEKÇETİN, Prof. Dr. Başak BAYKARA, Prof. Dr. Işıl TEKMEK, Prof. Dr. H. Alper BAĞRIYANIK, Prof. Dr. Bekir ERGÜR ve Doç. Dr. Seda ÖZBAL'a

Tezime değerli katkılarından dolayı Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Zahide ÇAVDAR ve Araştırma görevlisi Cemre URAL'a

Yüksek Lisans eğitimim boyunca desteklerini her zaman hissettiğim Selma AYDEMİR, Gökçen BİLİCİ GÜLER, Nevin ERSOY, Meltem AKINCI, Ali Rıza KARABULUT ve diğer bölüm arkadaşlarıma,

Hayatımın her sürecinde sevgi ile tüm zorlukları aşmamı sağlayan Leyla KARAMAN, Fırat KARAMAN, kardeşlerim, annem ve babam Mehmet KARAMAN'a

Beni her zaman desteklediğini bildiğim, hayatımda olduğu gibi tez sürecimde de zorlukları benimle üstlenen, bu süreçte sonsuz sevgi ve şefkatiyle sabreden değerli yol arkadaşım Celil KARAHASANOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

PREMATÜRE OVARYAN YETMEZLİK (POY) MODELİNDE FERULİK ASİDİN APOPTOZ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Nurşin KARAMAN

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Prematüre ovaryan yetmezlik (POY), 40 yaşından önce normal ovaryum fonksiyonunun kaybıdır ve 40 yaşın altındaki kadınların yaklaşık % 1'ini ve 30 yaşın altındaki kadınların % 0.1'ini etkileyen bir durumdur. Menopozu hızlandıran yetersiz ovaryan cinsiyet hormonları ve azalmış folikül sayısı ile karakterizedir ve bu durum genellikle infertilite ile sonuçlanır.

Siklofosfamid (SF), çeşitli kanser türlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir kemoterapötik ajandır ve dişi üreme organları, özellikle ovaryum üzerinde zararlı bir etkiye sahiptir. Çalışmamızda SF kullanarak POY modeli oluşturulan sıçanların ovaryumlarında antiapoptotik, antifibrotik ve antioksidan özellikleri olduğu bilinen Ferulik asidin (FA) histokimyasal, immunohistokimyasal ve biyokimyasal etkilerini incelemeyi amaçladık.

Çalışmamızda, 24 adet 200-250 gr ağırlığında Wistar albino türü dişi sıçan Kontrol, FA, SF, SF+FA olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Sıçanlara her gün vajinal smear uygulandı. Kontrol grubuna 1., 7. ve 14. günlerde 1 mL/kg intraperitoneal serum fizyolojik verildi. Ferulik asit grubu sıçanlara 2 hafta boyunca her gün 50 mg/kg FA oral gavaj yoluyla verildi. SF grubu deneklere deneyin 1.günü 75 mg/kg ip siklofosfamid uygulandı. Ardından 7. ve 14.günlerde 1 mL/kg ip serum fizyolojik verildi. SF+FA grubu deneklerine deneyin 1. günü 75 mg/kg ip siklofosfamid uygulandı ve 7. ve 14.günlerde 1 mL/kg ip serum fizyolojik verildi. 15. günden 30. güne kadar 2 hafta boyunca her gün 50 mg/kg FA oral gavaj ile verildi. Deney sürelerinin sonunda denekler sakrifiye edildi.

Histokimyasal analizler için, H&E, Masson trikrom ve PAS boyamaları; immünohistokimyasal analizler için Aktive-Kaspaz-3, Bcl-2, Bax, iNOS, eNOS ve PCNA immün boyamaları yapıldı. Biyokimyasal analizler için serumda TOS ve TAS ölçümleri yapıldı.

Histomorfolojik incelemelerde Kontrol grubu ve FA grubunda normal ovaryum yapısı gözlenirken, SF grubunda primer ve primordiyal folikül sayısında azalma, atretik folikül sayısında artış gözlemlendi. SF+FA grubu deneklerde folikül sayılarında artış, atretik folikül sayısında azalma ve kontrol grubuna yakın morfoloji gözlemlendi.

İmmunohistokimyasal boyamalarda SF grubunda artmış aktive-kaspaz-3 ve azalmış Bcl2/Bax oranları gözlemlendi. iNOS, FA grubunda azalma, SF grubunda artış gösterirken, eNOS SF grubunda azalmıştı. Proliferasyon belirteci PCNA ise SF grubunda azalmıştı. Tüm bu değerler SF+FA grubunda Kontrol grubuna yakın özellik gösterdi.

Biyokimyasal olarak TOS seviyeleri SF grubunda Kontrol ve FA gruplarına göre anlamlı olarak arttı, FA grubunda ise azaldı. FA tedavisinde ise SF grubuna göre anlamlı azalma gözlemlendi. TAS değeri ise FA grubunda Kontrol ve SF grubuna göre anlamlı olarak artış gösterdi.

Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda, gonadotoksik etkisi bilinen siklofosfamid etkisiyle folikül kaybı, doku hasarı, apoptoz ve oksidatif stres artışı gözlenen ovaryumlarda, FA'nın folikül rezervini koruyucu, doku hasarını azaltıcı ve antiapoptotik ve antioksidan özellikleri olduğu ve FA'nın SF'nin etkilerine karşı kullanılmasının over yetmezliğinde olumlu etkileri olabileceği gösterilmiş oldu.

Anahtar Kelimeler: apoptoz, ferulik asit, ovaryum, prematüre ovaryan yetmezlik, siklofosfamid

Tezin sayfa sayısı: 125

Danışman: Doç. Dr. Serap CİLAKEK MİÇİLİ

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF FERULIC ACID ON APOPTOSIS IN A MODEL OF PREMATURE OVARIAN FAILURE (POF)

Master Thesis

Nurşin KARAMAN

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Department of Histology and Embryology

ABSTRACT

Premature ovarian failure (POF) is the loss of normal ovarian function before the age of 40 and is a condition that affects approximately 1% of women under 40 and 0.1% of women under 30 years of age. It is characterized by insufficient ovarian sex hormones and a decreased number of follicles that precipitate menopause, which often results in infertility.

Cyclophosphamide (SF) is a chemotherapeutic agent widely used in the treatment of various types of cancer and has a detrimental effect on the female reproductive organs, especially the ovary. In our study, we aimed to examine the histochemical, immunohistochemical and biochemical effects of Ferulic acid (FA), which is known to have antiapoptotic, antifibrotic and antioxidant properties, in the ovaries of rats for which a POY model was created using SF.

In our study, 24 Wistar albino female rats weighing 200-250 g were divided into 4 groups as Control, FA, SF, SF+FA. Vaginal smears were applied to the rats daily. The control group was given 1 mL/kg of intraperitoneal saline on the 1st, 7th and 14th days. Ferulic acid group rats were given 50 mg/kg FA by oral gavage every day for 2 weeks. SF group subjects were administered 75 mg/kg ip cyclophosphamide on the first day of the experiment. Then, on the 7th and 14th days, 1 mL/kg ip serum physiologic was given. SF+FA group subjects were administered 75 mg/kg ip cyclophosphamide on the 1st day of the experiment and 1 mL/kg ip saline was given on the 7th and 14th days. From day 15 to day 30, 50 mg/kg FA was administered by oral gavage every day for 2 weeks. At the end of the experimental period, the subjects were sacrificed.

H&E, Masson trichrome and PAS stains for histochemical analysis; For immunohistochemical analyzes, Activated-Caspase-3, Bcl-2, Bax, iNOS, eNOS and PCNA immunostaining were performed. For biochemical analyses, TOS and TAS measurements were made in serum.

In the histomorphological examinations, normal ovarian structure was observed in the Control and FA groups, while a decrease in the number of primary and primordial follicles and an increase in the number of atretic follicles were observed in the SF group. An increase in the number of follicles, a decrease in the number of

atretic follicles and a morphology close to the control group were observed in the SF+FA group.

In immunohistochemical staining, increased Activated-caspase-3 and decreased Bcl2/Bax ratios were observed in the SF group. While iNOS decreased in the FA group and increased in the SF group, eNOS decreased in the SF group. The proliferation marker PCNA was decreased in the SF group. All these values were close to the Control group in the SF+FA group.

Biochemically, TOS levels increased significantly in the SF group compared to the Control and FA groups, but decreased in the FA group. A significant decrease was observed in the FA treatment compared to the SF group. TAS value increased significantly in the FA group compared to the Control and SF groups.

In line with the results we obtained, in ovaries with follicle loss, tissue damage, apoptosis and increase in oxidative stress due to the effect of cyclophosphamide, which is known to have a gonadotoxic effect, FA protects the follicle reserve, reduces tissue damage, has anti-apoptotic and antioxidant properties. It has been shown that it can have positive effects in ovarian failure.

Keywords: apoptosis, ferulic acid, ovary, premature ovarian failure, cyclophosphamide

Page number: 125

Advisor: Assoc. Dr. Serap CİLAKER MIÇILI

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite bir yıl korunmadan ve düzenli cinsel ilişki olmasına rağmen gebeliğin gerçekleşmemesi durumudur. Bütün ülkelerde üreme yaşındaki çiftlerin yaklaşık olarak %8-12'sini etkilemektedir. Gebeliğin kendiliğinden gerçekleşmesini engelleyen üç ana faktör, hastalık sebebiyle oluşan kısırlık, kadının yaşı ve istenmeyen gebe kalmama süresidir. Kadınlarda 25-30 yaşlarında doğurganlık azalmaya başlar bu nedenle de kendiliğinden hamile kalma olasılığı yaş ilerledikçe azalmaktadır. Her iki cinsiyette de hastalığa bağlı infertilite doğurganlık üzerinde etkilidir. İki cinsiyette de hiperprolaktinemi, kistik fibroz, hipogonadotropik hipogonadizm, siliyer fonksiyon bozuklukları, sistemik hastalıklar, yaşam tarzı ve enfeksiyonlar doğurganlığı etkileyen hastalıklar/föktörlerdir. Kadın kısırlığında endometriyal polipler, primer over yetmezlik, rahim fibroidleri, polikistik over sendromu ve endometriozis rol oynayabilir (1).

Prematüre ovaryan yetmezlik (POY) adetlin beklenen menopoza yaşından önce kesilmesi durumu olarak tanımlanır (2). Bu yaş ortalama olarak 40 yaşından önce olarak tanımlanır ve prematüre ovaryan yetmezlik için kullanılan test belirteci Folikül stimüle edici hormon (FSH) ve östradiol (E2)'dür. Bu vakalar yüksek gonadotropin folikül uyarıcı hormon (değeri 40 IU/L'nin üzerinde) ve düşük estradiol seviyeleri (hipoöstrojenizm) (estradiol seviyesi <50pg/ml) gösterirler (3,4). POY terimi ilk kez Fuller Albright tarafından 1942 yılında kullanılmıştır ve bu hastalık ile ilgili düşünceler tıpkı bu hastalığa verilen isim gibi zaman içerisinde oldukça değişkenlik göstermiştir. İlk zamanlardan beri farklı şekillerde, "Savage" veya "direnci yumurtalık" sendromu, hipergonadotropik hipogonadizm, prematüre ovaryan yetmezlik, hipergonadotropik amenore ve birincil hipogonadizm olarak adlandırılmıştır (5).

Rezidüel folikül sayısı ovaryumda eşiğin altına düştüğünde (1.000'den az), foliküllerde düzenli aktivasyon bozulduğu için gelişim aşamasındaki foliküllerin alımı durur bunun sonucunda da anovulasyon ve amenore tablosu ortaya çıkar (6). POY semptomları arasında menopoza görülen semptomlara benzer olarak ürogenital bozukluk, cinsel isteksizlik, gece terlemeleri, kısırlık, sıcak basması,

vajinal kuruluk, uyku problemleri ve ruh halindeki hızlı değişimler yaygın olarak gözlenebilir (3,7). POY’lu hastalarda ovaryum rezervi oldukça hızlı tükenmektedir bu nedenle çoğu hasta teşhis aldığı zaman zaten rezervi tükenmiş bir ovaryumla başvurumaktadırlar ve POY için standart bir tedavi mevcut değildir (8). POY gelişimine katkıda bulunan ve POY’a sebep olan nedenler arasında enfeksiyon, metabolik, genetik, etiyolojik mekanizmalar, iyatrojenik ve otoimmünite yer almaktadır (4).

Etkili tarama yöntemleri, erken teşhis ve kemoterapötikler kanser hastalarında kanserli hücrelerin çoğalmasının önüne geçerek sağkalımda artışlara katkı sağlamaktadır. Kemoterapötik ajanlar kanser hücreleriyle savaşırken sağlıklı hücrelerin de yaşamını tehdit eder veya ölümüne yol açabilmektedir. Uzun vadeli yan etkileri nedeniyle kemoterapötiklerin sınırlı uygulamaları vardır. En sık kullanılan kemoterapötik ajanlar siklofosfamid (SF), 5-fluorourasil, metotreksat ve 6-merkaptopurin’dir. Siklofosfamid; kronik lenfositik lösemi, katı tümörler, pediatrik kanser, miyelom ve lenfoma gibi hastalıklarda yaygın olarak kullanılır. Kanser tedavisi görmüş kadınlarda iyatrojenik prematüre ovaryan yetmezlik nedeniyle oluşan infertilite ve ovaryum hasarı kemoterapötiklerin uzun vadeli yan etkileridir (9–11). Antitümör ve bağışıklık baskılayıcı özellikleri olan siklofosfamid bir oksazofosforindir ve ancak metabolik olarak aktif olduğu zaman onkosidal etki göstermektedir. Siklofosfamidin “hepatik mikrozomal karma fonksiyon oksidaz” sistemi fosforamid mustard (FAM)’ı verir ve kanserostatik etkisi bu metabolizması ile ilişkilidir (12). Siklofosfamid etkilerini ilaç özelliklerinden ziyade metabolitleri ile göstermektedir. Reaksiyon sonucunda meydana gelen metabolitler veya ara ürünlerin; genotoksisite, gonadotoksisite, teratojenite, sistemik toksisite, kanserojenite veya mutagenite gibi etkileri olabilmektedir (12,13).

Tüm canlılarda yaşamının belli bir dengesi ve belli başlı bölümleri vardır. Bu bölümler; doğmak, büyümek, üremek, yaşlanmak ve ölmektir. Tüm bu evreler süresince canlıdaki hücrelerin bir kısmı ölürken bir kısmı da yenilenir veya yeni hücreler oluşur. Böylece homeostaz korunmuş olur. Bu hücreler apoptoz, piroptoz, nekroz gibi çeşitli hücre ölüm yolları ile yok olmaktadır (14). Apoptoz kelimesi Yunancada “ayrı” anlamı anlamına gelen apo ve “düşmüş” anlamına

gelen ptosis kelimelerinin birleşiminden oluşmaktadır. Bu terimin ilk kez kullanılışı Edinburg Üniveristesinde 1972 senesinde Alastair R Curie, Andrew H Wyllie ve John Kerr tarafından hücre ölümünü fizyolojik olarak tanımlamak içindir. Apoptoz; bağışıklık gelişimi, normal doku döngüsü ve embriyogenez gibi canlı yaşamının devamı için kritik olan olaylarda, spesifik hücrel sinyaller ve protein sentezi gerektiren genetik olarak kontrol edilen programlı ve fizyolojik bir hücre ölümü şeklidir. Biyolojik görevini tamamlamış, hasarlı veya organizmanın ihtiyaç duymadığı hücreler apoptoz ile ortadan kaldırılır (15,16). Apoptozun son derece karmaşık olan biyolojik mekanizmasının eksiksiz olarak devam edebilmesi için sinyal dönüştürücü ve bazı proteinlerin yanında sinyal yollarının da sıralı bir şekilde devam edebilmesi gerekir. Ekstrinsik (dışsal), intrinsik (içsel) ve Perforin/granzim yolu olmak üzere üç ana apoptoz yolu bulunmaktadır. Bu yollarda Aktif Kaspaz-3 ve Bcl-2 geni ailesinden olan Bax ve Bcl-2 proteinleri de bulunmaktadır (17–20).

Güçlü bir vazodilatör olan nitrik oksit (NO), ilkel dünyadan beri varlığını korur ve çeşitli biyolojik etkilere sahip, neredeyse tüm dokularda bulunan kısa ömürlü gaz halinde bir serbest radikaldır (21,22). Memelilerde en yaygın terminoloji ile; nöronal, indüklenebilir ve endotelial NOS olmak üzere farklı genler tarafından NOS'un üç farklı izoformu kodlanır. Aktiviteleri kalsiyuma bağlı olan ve yapısal olarak eksprese edilen NOS formları; vasküler endotelial hücrelerde ilk bulunan ve vasküler homeostazı bir dengede tutan izoform olan endotelial (Tip III, Nos-III, Nos-3) ve nöronal dokuda ilk bulunan, nöronal fonksiyon ve nörolojik düzenlemeler üzerinde önemli bir etkiye sahip olup baskın olan izoform nöronal NOS'tur (Tip I, NosI, Nos-I). Patojen ile ilişkili moleküler paternlere (PAMP'ler) ve/veya inflamatuvar mediatörlere yanıt olarak yüksek düzeylerde NO üreten ve aktivite yönünden kalsiyuma bağlı olmayan diğer izoform ise çeşitli hücre ve dokularda indüklenebilen NOS (Tip II, Nos-II, Nos-2,)’tur (22–25).

Güçlü bir antioksidan olan Ferulik asit (FA) ([E]-3-[4-hidroksi-3-metoksi-fenil] prop-2-enoik asit), fenolik asit grubuna dahil bir fitokimyasaldır. Ferulik asit; vanilin, sinapin, p-kumarik ve sirit asitleri gibi doğada en yaygın olarak bulunan ve birçok fizyolojik fonksiyonda yer alan bir sinnamik asit türevidir (26,27). Ferulik asit en fazla tahıl tohumlarında (yulaf, arpa, buğday, pirinç ve çavdar), ıspanak, üzüm,

kepekli tahıllar, maydanoz ve bitki hücrelerinin duvarında bulunur. Antioksidan özellikleri fenolik asitlerin en önemli rollerinden birisidir ayrıca antikanser, antitrombotik, anti-inflamatuar, antiapoptotik, antiaritmik ve antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Gıda ve eczacılıkta da oldukça yaygın bir kullanımı olan ferulik asit kas yorgunluğunu kas dokusundaki serbest radikalleri nötralize etme özelliği ile hafifletmektedir bu nedenle sporcular için ek takviye gıda olarak kullanılabilir. Kozmetikte de geniş bir kullanım alanı olan FA ciltte güneş koruyucu, parlatici ve yaşlanmayı geciktirici ajan olarak kullanılabilir. Son çalışmalar ferulik asidin serbest radikalleri ve serbest radikaller üreten enzimleri süpürme (=nötralizasyon), nitrojen oluşumunun ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) inhibasyonunu ve oksidatif hasara direnmeyi içeren karmaşık bir antioksidan etki mekanizması olduğunu göstermiştir. Ek olarak şelat ajanı görevi vardır, örneğin protonlanmış metal iyonlarının (örneğin Fe (II) ve Cu (II)) şelatlanmasını üstlenir (27–29).

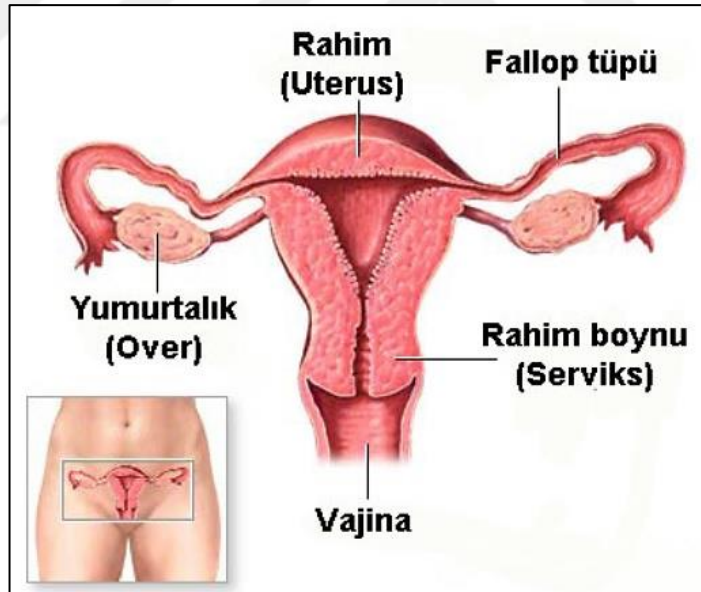
Tüm bu bilgiler ışığında tezimizin amacı; Siklofosfamid ajanı ile oluşturulan POY modeli sıçanlarda FA'nın ovaryum dokusunda apoptoz ve oksidatif stres üzerine olan etkilerinin histolojik ve biyokimyasal olarak incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dişi Genital Sistemi

Dişi genital sistemi dış (eksternal genitalia) ve iç (internal genitalia) genital organlar olmak üzere ikiye ayrılır. İç genital organlar olan vajina, uterus, ovaryum ve tuba uterina, pelvik kavite içinde ve perineumda yerleşim gösterirler. Dış genital organların yer aldığı bölge ise vulva olup labium majuslar ve minuslar, mons pubis, klitoris, vajina açıklığı ve vestibül, himen ve dış üretra ağzından oluşmaktadır. Dişi üreme organlarından ovaryum ve tuba uterina çift olarak bulunurken diğer organlar ise tektir (30) (Şekil 1).

Dişi genital sisteminin görevi gametleri (oositler) üretmek, fertilizasyon için ortam sağlamak ve embriyoyu fetal aşamadan doğuma kadar taşımaktadır. Ayrıca ovaryumların üreme sistemi organlarını kontrol eden ve diğer organları etkileyen steroidal seks hormonları üretmesi de dişi genital sisteminin görevleri arasındadır (31).



Şekil 1: Dişi iç genital organların şematik çizimi (32).

2.1.1. Ovaryum

2.1.1.1. Ovaryumun Embriyolojisi ve Gonadların Gelişimi

Genetik olarak embriyonun cinsiyeti fertilizasyon sırasında belirlenir. Buna rağmen, 7. haftaya kadar gonadların henüz dişiye veya erkeğe ait morfolojik özellikleri yoktur. Epitel proliferasyonu ve altındaki mezenşimin birikmesiyle oluşan gonadlar, çift olarak gonadal veya genital sırt halinde ortaya çıkarlar. Germ hücreleri 6. haftaya kadar gonadal sırtlar içinde gözlenmez. Primordiyal germ hücrelerinin göçü başlar ve primitif çizgi boyunca devam eder.

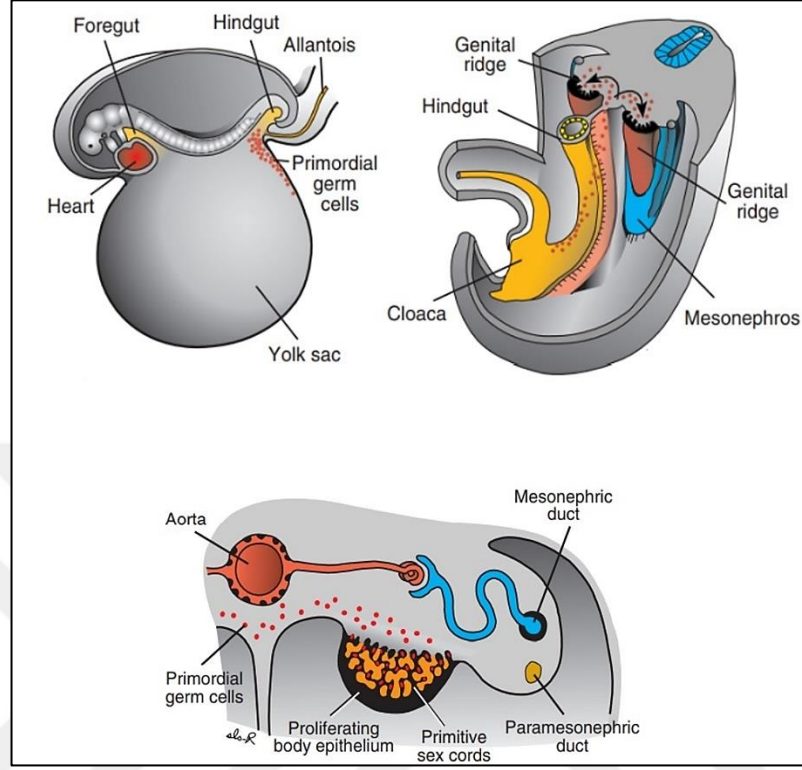
Epiblast kökenli bu germ hücreleri 3 haftada yolk kesesi duvarında endoderm hücreleri arasında yerleşir. Ameboid şekilde hareket eden germ hücreleri 4. haftada sonbağırsak mezenterinin dorsali boyunca ilerlerler ve primitif gonadlara ulaşması 5. hafta başında gerçekleşir. 6. haftada gonadal sırtları işgal ederler. Primordiyal germ hücrelerinin gonadlar üzerindeki önemi ise indükleyici etkileri ile gonadların testis veya overlere farklılaşmasıdır.

Primitif cinsiyet kordonları, primordiyal germ hücrelerinin primitif gonadlara ulaştıkları sırada oluşur. Bu düzensiz kordonlar gonadal sırttaki epitel hücrelerinin proliferasyonu sonrası alt kısımlarındaki mezenşim içine yerleşmeleriyle oluşur. Yüzey epiteline bağlı olan bu kordonlar erkek ve dişi embriyolarda aynıdır ve bu dönemde gonad ayrımının yapılamamasından dolayı farklılaşmamış gonad olarak isimlendirilirler.

Dişi embriyolar XX cinsiyet kromozomlarına sahip olup, Y kromozomundan yoksundurlar. Dişi embriyoların primitif cinsiyet kordonları primitif germ hücresi grupları içeren düzensiz hücre kümelerine ayrılır. Vasküler stroma (ovaryan medulla) ise ovaryan medullar bölgesinde lokalize olan ve bir süre sonra kaybolmaya başlayan bu hücre kümelerinin yerini alır.

Erkek gonadının aksine proliferasyonu devam eden dişi gonadın yüzey epiteli ikici nesil kordonlar geliştirir. Bu kordonlar 7. haftada gelişir ve kortikal kordonlar adını alır. Bunlar altta yer alan mezenşim içine doğru gömülse de yüzey kısmına yakın kalırlar. Kordonlar ilk olarak 3. ayda izole hücre kümelerine bölünür ve daha sonra proliferer olurlar. Epitel hücre tabakaları oogonyumların etrafını sararlar.

Foliküler hücreler olarak adlandırılan bu epitel hücreleri ile birlikte oogonyumlara primordiyal folikül denir (33) (Şekil 2).



Şekil 2: Üç haftalık (üst) ve altı haftalık (alt) embriyoların kesitleri (33)

2.1.1.2. Ovaryumun Anatomisi, Kan desteği ve İnnervasyonu

Erkeklerdeki testisin homoloğu olan ovaryumlar dışide temel üreme organı olup pelvis minorun dış yan duvarlarında fossa ovarica'lar içerisinde yer alır. Şekil olarak bademe benzeyen her bir ovaryumun ağırlığı 3-5 gr arasında, 1-1,5 cm uzunluğunda, 3x2x1 cm boyutlarında olup grimsi pembe bir rengi vardır.

Ovaryumlar periton boşluğundadır ve üst uç kısma lig. suspensorium ovarii ve fimbria ovarica'ya tutunur. Lig. suspensorium ovarii içinden ovaryum duvarına a. v. ovarica ve plexus ovaricustan gelen dallar vardır. Ovaryum, lig. ovarii proprium ile uterus dış duvarına bağlanırken, lig. latum uterinin arka yüzüne ise periton plikası olan mesovarium aracılığıyla bağlanır. Sinirler, arter, ven ve lenfatikler mesovaryumun iki yaprağı arasından yol alıp ovaryuma hilum ovarii'den girerler. Ovaryum kompakt bir bağ dokusu olan tunika albuginea ve onu da saran peritonun mezotelyumu olan ve bir

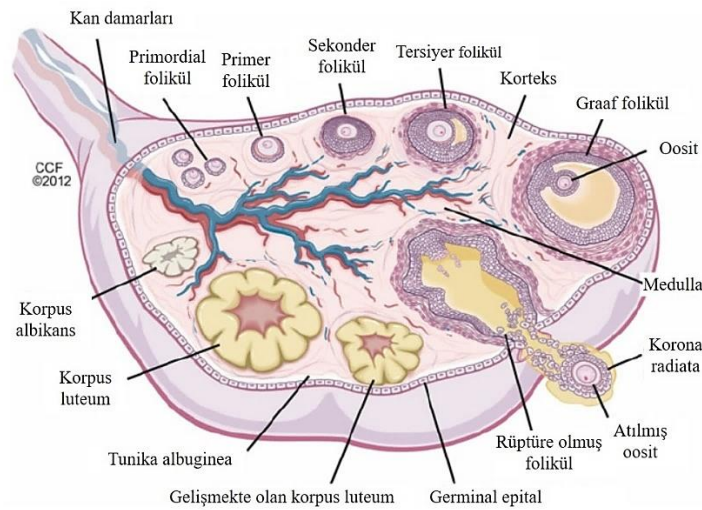
serbest dış yüz olan epitelyum superficiale (Germinal tabaka-Waldeyer tabakası) ile sarılmıştır.

Ovaryumun iki tabakası vardır; bunlar dışta (tunika albugineanın altında) cortex ovarii (zona parenchymatosa), içte ise medulla ovarii (zona vasculosa)'dır. Ovaryumun cortex ovarii'si her menstrual siklusa bir folikülden ovum yapar. Bu foliküler aşama primordiyal folikül ile başlar ve primer, sekonder ve tersiyer (Graaf follikülü) olmak üzere ilerleyen aşamalardan geçer. Tersiyer folikül sonrası en son aşama olgun follikül olup ovulasyon ile sonuçlanır.

Ovaryumları besleyen a. ovarica'ların, aorta abdominalisten ayrıldıkları seviye L2 vertebra seviyesidir. Sol v. ovarica v. renalise, sağ v. ovarica v. cava inferior'a dökülür (34,35).

2.1.1.3. Ovaryum Histolojisi

Histolojik olarak ovaryum yüzey epiteli tek katlı kübik ve bazı yerlerde de yassı epitel ile döşelidir. Ovaryumun bu hücresel tabakasına germinal epitel denir. Bu epitel mezovaryumu döşeyen mezotelyum ile devam etmektedir (30). Sıkı bağ dokusu yapısındaki tunika albuginea germinal epitelin altında korteksin yoğunlaşmasıyla oluşur (36). Enine kesitlerde, ovaryumun iki kısmı ayırt edilir: İçte medulla ya da medullar bölge, dışta medullayı hilusa kadar saran korteks ya da kortikal bölgedir. Bu bölgelerin sınırları net olarak ayırt edilememektedir (30) (Şekil 3).



Şekil 3: Ovaryum Histolojisi (37).

Ovaryum korteksi, folikülleri içeren hücreden zengin düzensiz sıkı bağ dokusu yapısındadır. Dağınık düz kas lifleri korteksteeki foliküllerin etrafındaki stromada yerleşim gösterir (30). Stromayı aynı zamanda fibroblastlar, retiküler fibril ağları kolajen ve elastik fibriller oluşturmaktadır. Kortikal bölgeden medullar bölgeye geçişte belirgin bir sınır yoktur (36).

Ovaryum medullası ise korteksin derinlerinde, yüksek düzeyde vaskülarize ve gevşek bağ dokusu yapısındadır. Ovaryumun merkezi bölgesinde bulunan medulla, sinirleri, kıvrımlı büyük kan damarlarını ve lenf damarlarını içermektedir (30,38).

2.1.1.4. Foliküler Gelişim ve Ovulasyon

2.1.1.4.1. Foliküler gelişim (Folikülogenez): Ovaryum korteksinde farklı büyüklüklerde, gelişimin farklı aşamalarında ve yalnızca bir oosite sahip olan foliküller stromada dağınık halde bulunurlar. Oositin gelişim aşamasını belirlemede folikül boyutu baz alınır (30). Fetal hayatta yüksek oranda mitoz bölünmeler gerçekleşir ve bu dönem oogenezin erken evreleridir. Oogonyumlar fetal yaşamda yüksek düzeyde mitotik bölünmeler nedeniyle sayıca oldukça fazladırlar. Gelişimin 3. ayı itibari ile oluşan oogonyumlar mayoz bölünmeye başlarlar. Bölünmeye başlayan oogonyumlar profaz evresinde dururlar ve puberteye kadar mayoz bölünme ilerlemez. Arreste uğrayan bu hücreye primer oosit ismi verilir (30,31).

Ergenlik döneminde dışide hipotalamus tarafından kontrol edilen düzenli siklik döngüler başlar. Hipotalamus tarafından üretilen gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), hipofiz bezinin ön lobunun (adenohipofiz) hücreleri üzerinde etki eder, daha sonra adenohipfizden gonadotropinler salgılanır. Bu hormonlar, FSH ve luteinize edici hormon (LH), ovaryumdaki siklik değişiklikleri uyarır ve kontrol eder (39). Ovaryumdan her siklusta yalnızca bir tane oosit tam olarak olgunlaşıp salınır.

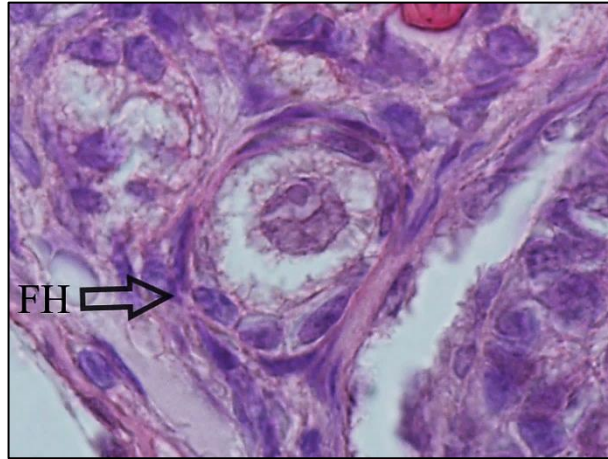
Ovaryum folikülleri histolojik olarak gelişim aşamalarına göre 3 temel kategoriye ayrılabilir:

1. Primordiyal foliküller,

2. Büyümekte olan foliküller,
 - a. Primer foliküller
 - i. Unilaminar (tek tabakalı) primer follikül
 - ii. Multilaminar (çok tabakalı) primer follikül
 - b. Sekonder foliküller
3. Olgun folikül ya da Graaf folikülleri (30,40).

1.Primordiyal Foliküller

Foliküler gelişim aşaması primordiyal foliküllerin farklanması ile başlar. Erken gelişimleri gonadotropin stimülasyonuna bağlı olmayan bu foliküller ilk olarak fetal dönemin 3. ayında ortaya çıkarlar. Ovaryumda bulunma yerleri kortekste tunika albuginea'nın hemen altındadır. Tek sıra yassı folikül hücreleriyle çevrili olan primordiyal foliküllerin en fazla sayıda bulunduğu dönem doğum öncesidir. Bu dönemde primer oositler yaklaşık olarak 30 mikrometre büyüklüğündedir ve merkezden uzak (eksentrik) geniş bir nukleus ve bir ya da birden fazla nukleolus içerirler. Folikül hücrelerinin dış yüzeyi zayıf bir bazal lamina üzerine oturmuştur (Şekil 4).



Şekil 4: Primordiyal folikül mikrofotografı. Tek tabakalı yassı folikül hücreleri (FH) tarafından çevrelenmiş oosit gösterilmektedir.

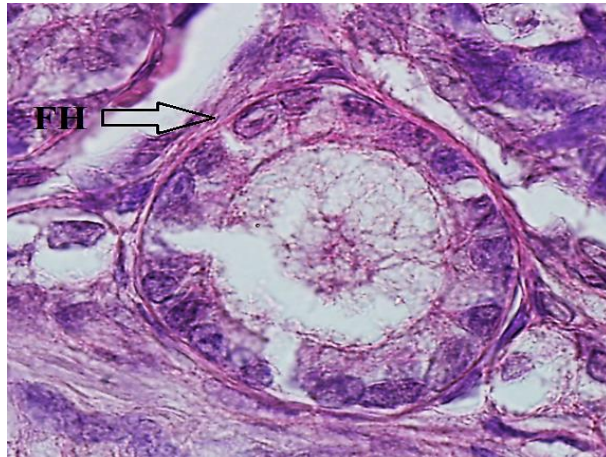
Oositin sitoplazmasına ooplazma adı verilir ve organel bakımından zengindirler. Ooplazma, GER keselerinin, Golgi kompleksinin membranları ve veziküllerinin, lizozomların ve bir çok mitokondriyonun birlikte oluşturduğu Balbiani cisimciği adı

verilen bir kümeyi içermektedir. Bu küme esas olarak bu organellerin ışık mikroskopik düzeyde yoğunlaştığı sitoplazma bölümleridir (30,31,36,40).

2.Büyümekte Olan Foliküller

Primer Folikül

Primordiyal foliküllerin büyüme evresinde ilk oluşan foliküle primer folikül adı verilir. Büyüme evrelerinde öncelikle oositte olmak üzere folikül hücrelerinde ve stromada değişiklikler meydana gelir. İlk aşamada oosit büyür ve primordiyal foliküllerin yassı hücreleri proliferasyon olarak önce kübik daha sonra prizmatik şekil alırlar. Folikül hücreleri tek tabakalı kübik bir hal aldıkları bu evrede primer folikül olarak isimlendirilirler (30,40). Folikül hücreleri tek tabakalı epitel içerdiği için bu foliküle ayrıca unilaminar veya tek tabakalı primer folikül denir (Şekil 5). Mitoz bölünmeye devam eden foliküller çok katlı granuloza tabakasını (stratum granulosum) meydana getirirler. Bu aşamadaki foliküllere multilaminar veya çok katlı primer folikül denir. Foliküller birbirleriyle gap junctionlar aracılığıyla iletişim kurarlar (41) (Şekil 6).

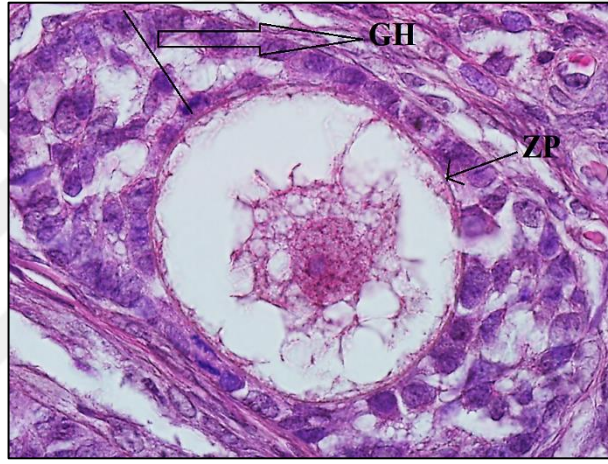


Şekil 5: Primer folikül mikrofotografı. Oositi çevreleyen tek katlı kübik folikül hücre (FH) tabakası gösterilmektedir.

Henüz matür olmayan oosit büyüdükçe çevresine glikozaminoglikanları ve glikoproteinleri salgılar. PAS ile kuvvetle pozitif boyanan ve oositi çevreleyen bu örtüye zona pellusida adı verilir. Zona pellusida folikül hücreleri ile oosit arasında

ortaya çıkan yapısal olarak kalın bir örtüdür. Zona pellusida oluşurken granüloza hücreleri ve oosit arasındaki aralığa perivitellin aralık denir. Bu aralığa doğru folikül epitel hücrelerinin ve oositin yüzeyinde yer alan çok sayıda mikrovilluslar birbirlerine uzanıp, iç içe geçerler (30,40,41).

Zona pellusida (ZP) en az üç farklı sülfatlı glikoproteinden oluşur. Bunlar 80-120 kilodalton ağırlığında ZP-1, 73 kilodalton ağırlığında ZP-2 ve 59-65 kilodalton ağırlığındaki ZP-3'tür. Bu üç asidik glikoprotein arasından akrozom reaksiyonunu başlatma ve sperm bağlama reseptörü olma gibi özellikleriyle en önemlisi ZP-3'tür (30).



Şekil 6: Çok tabakalı primer folikülün mikrofotoğrafı. Oositi çevreleyen çok katlı granüloza hücreleri (GH) görülmektedir. Oosit ile folikül hücreleri arasında zona pellusida (ZP) yapısı bulunmaktadır.

Tüm bu değişiklikler sırasında folikül hücrelerini çevreleyen bazal laminanın dışındaki bağ dokusunda da farklılaşmalar gerçekleşir. Burada stroma sıkılaşıp bazal laminanın dışında teka folikülü olarak adlandırılan bölgeyi oluşturur. Bu bağ dokusu kılıfı daha sonra iki tabakaya farklılaşmaktadır.

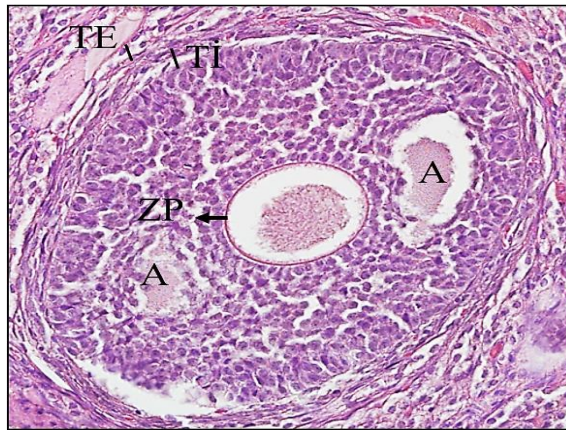
- Teka interna, kübik hücrelerden oluşan oldukça vaskülarize bir tabakadır. Bu tabaka hücreleri farklılaştıklarında steroidleri üreten hücrelerle bazal düzeyde aynı özellikleri sergilerler. Bunlar; çok sayıda lipid damlacıkları, tübüler kristaya sahip mitokondriler ve bol miktarda bulunan düz endoplazmik retikulumdur. Teka interna hücrelerinin aynı zamanda çok miktarda luteinizan

hormon reseptörleri vardır. LH uyarımına yanıt olarak androjen üretirler ve salgılarlar, bu hormonda granüloza hücreleri tarafından aromataz enzimi aracılığıyla östradiole çevrilir.

- Teka eksterna ise düz kas hücrelerinden ve kolajen kümelerinden oluşan bir dış bağ dokusu hücreleri katmanıdır (30,41).

Sekonder Folikül

Primer folikül aşamasında granüloza hücreleri proliferasyona devam eder ve primer folikülün hacimce büyüyüp oval bir şekil almasına neden olur. Bu büyümede granüloza hücrelerinin hem sayısında hem de büyüklüğünde artış olmaktadır. Gelişim devam ettikçe primer folikül korteksin periferik kısımlarından derinlere doğru hareket eder. Sekonder folikülde granüloza tabakası 6-12 katmana ulaştığında bu hücreler arasında yer yer düzensiz ve içi sıvı dolu kaviteler meydana gelir. Bu esnada oluşan bu kavitelere hyaluronandan zengin bir sıvı olan folikül sıvısı (likör folikülü) birikir. Folikül büyüdükçe bu küçük boşluklar birleşir, sıvı miktarı artar ve at nalı şeklini alır. Oluşan bu sıvı dolu boşluğa antrum ya da folikül boşluğu adı verilir. Bu şekilde antrumun oluşmasıyla içi sıvı dolu kese haline gelen bu foliküle sekonder ya da antral folikül denir (Şekil 7).



Şekil 1: Sekonder folikül mikrofotografı. GH tabakası içinde bulunan ve foliküler sıvı ile dolu olan antrum (A) görülmektedir. Sekonder folikülün bazal laminası dışında teka interna hücreleri (TI) ve teka eksterna hücrelerinin (TE) oluşturduğu çok katlı tabakalar görülmektedir.

Folikül sıvısı steroid bağlayıcı proteinleri, yüksek konsantrasyonda östrojen, androjen ve progesteronları, glikozaminoglikanları, aktivin, inhibin, büyüme faktörleri ve östrodiol içermektedir.

Bu evrede sekonder folikül 125 µm büyüklüğünde oosite sahiptir. Oosit eksantrik yerleşimlidir, son büyüklüğüne ulaşmıştır ve daha fazla büyümmez. Oositin büyümesini engelleyen faktör granüloza hücrelerinden salgılanan oosit maturasyon inhibitörüdür (OMI). Oositi içeren stratum granülozum tabakası oosit dışındaki bölgelerde aynı kalınlıktadır. Oositi içeren kısımda ise antruma doğru kabartı yapan bir çıkıntı oluşur buna kumulus ooforus (KO) adı verilir. Burada direkt olarak oositi çevreleyen tek sıra halinde dizilen kumulus ooforus hücrelerine ise korona radiata adı verilmektedir. Ovulasyonda bu folikül hücreleri oosit ile birlikte atılırlar (30,41–43).

3.Graaf (Olgun) Folikül

Sekonder foliküller genital siklusun 14. gününde likör folikülünün gittikçe artması sonucunda maksimum büyüklüklerine ulaşırlar. Ovaryumun tüm kalınlığını kaplayan bu foliküller, içi sıvı dolu veziküller oluştururlar ve büyük bir basınç gösterirler. Artan basınç nedeniyle ovaryum yüzeyinde çıkıntılar oluştururlar. Bu evrede folikülün çapı 10 mm ya da daha fazladır. Bu foliküllere olgun ya da graaf (preovulatuvar) folikül denir, (30,42) (Şekil 8). Antrumun büyümesi ile granüloza hücrelerinin çoğalması orantılı olmadığı için stratum granülozum tabakası antrum büyüdükçe inceler. Granüloza hücreleri arasındaki boşlukların artıp birleşmesi sonucunda kumulus ooforus ve granüloza hücreleri arasındaki bağlantı gevşer. Oosit etrafındaki tek sıralı ve zona pellusida ile yakın temasta olan kumulus hücreleri korona radiatayı oluşturur. Korona radiata oosit ovaryumdan atılırken oositle kalır (30,41,43).



Şekil 8: Graaf folikülünün mikrofotoğrafı. İçi sıvı dolu geniş antrum (A) yapısının etrafını çevreleyen granüloza hücre tabakası (GH) ve kumulus ooforus (KO) yapısı gösterilmiştir.

Gelişimin bu evresinde teka foliküli daha belirgin hale gelir ve son gelişimine ulaşır. Teka interna hücreleri sitoplazmalarında lipid biriktirirler, polihedral bir yapı kazanırlar ve steroid üreten hücrelerle benzer özellikleri gösterirler. Granüloza hücreleri progesteron, östrojen ve steroid olmayan gonadostatini, teka interna hücreleri ve ovaryumdaki interstisyel hücreler östrojen hormonlarını salgılar (30,43).

Oogenezis

Oogenezis ilkel dişi germ hücrelerinin olgunlaşarak oositlere gelişmesi olayıdır. Bu süreç doğum öncesi ve doğum sonrası olarak ikiye ayrılmaktadır.

Doğum öncesi (preantral) olgunlaşma döneminde, primordiyal germ hücreleri (PGH) gonadlara vardığında genetik olarak oogonyumlara farklılırlar. Burada bir dizi mitotik bölünmeler geçirip üçüncü ayda tek tabaka epitel ile sarılırlar. Mitoz bölünme buradaki oogonyumların büyük çoğunluğunda devam etse de bir kısım oogonyum büyür ve primer oositleri oluştururlar. Hemen DNA'ları replike olur ve I. mayoz bölünmenin profaz evresinin diploten aşamasında dururlar. Mitoz bölünme sonraki aylarda da devam eder ve böylece oogonyumların sayısında en geç beşinci aya kadar artışlar olur. Beşinci ayda ovaryumda, üreme hücrelerinin sayısı 7.000.000'dur. Primer oositler ve oogonyumlarda gelişimin bu evresinde gerilemeye (atrezi) uğrarlar yani spontan olarak ölürlar. Sekizinci ayda oogonyumların büyük bir çoğunluğu

dejenere olur. Atreziye uğramamış ve dejenere olmamış oositlerin hepsi birinci mayoz bölünmenin profaz evresine girerler. Tek katlı bir epitel ile sarılıp primordiyal folikülleri oluştururlar ve bu evrede arreste uğrarlar (43).

Doğum sonrası (postnatal) olgunlaşmada ilk evre doğuma yakın zamanda bütün primer oositlerin birinci mayoz bölünmenin profaz evresinin diploten aşamasına girmesidir. Metafaz evresine geçmek yerine puberteye kadar uzun bir süre arreste uğrarlar. Birinci mayoz bölünmelerini pubertede ovulasyon olmadan hemen önce tamamlarlar. Primer oositlerin birinci mayoz bölünmelerini puberteden önce bitirmelerini engelleyen faktör ise granüloza hücrelerinden salgılanan küçük, 1-2 kilodaltonluk bir peptit olan OMI'dir (30,43). Doğumdan sonra primer oositler oluşmaya devam etmez ve doğum sırasındaki sayıları değişkenlik göstererek yaklaşık olarak 700.000 ile 2.000.000 arasındadır. Oositlerin çoğu çocukluk döneminde atretiktir bu nedenle bir genç kız ergenliğe geldiğinde ovaryumundaki primordiyal foliküller de dahil olmak üzere primer oosit sayısı yaklaşık 400.000'dir (43).

Ovulasyondan hemen önce tamamlanan birinci mayoz bölünme sonunda kromozomlar kardeş hücreler arasında eşit dağılır. Sitoplazma ise bölünme sonucunda oluşan 2 oosit arasında eşit olarak dağılmaz. Sekonder oositlerden biri neredeyse sitoplazmanın hepsini alırken diğer oosit birinci kutup cismi olur. Birinci kutup cismi çok küçüktür ve nukleus ile az miktarda sitoplazmaya sahiptir. Ovaryumun korteks bölgesinde yer alan oosit birinci kutup cismi atıldıktan sonra ikinci mayoz bölünmeye geçer. Bu bölünme de tıpkı birinci mayoz bölünme gibi tamamlanmaz ve metafaz evresinde durur. 2. mayoz bölünme ancak fertilizasyon gerçekleşirse tamamlanır. Fertilizasyon spermin oosite girmesinden ibarettir. Fertilizasyon ile diploid kromozom sayısına ulaşılır (41).

2.1.1.4.2. Ovulasyon

Ovulasyon olgun bir dişide ergenlik döneminden menopoza kadar yaklaşık 28 günde bir yenilenen periyodik bir olaydır. Genital siklusun 14. gününde (ortasında) FSH ve LH etkisi ile sekonder oositin graaf folikülünden atıldığı süreçtir. Atılacak olan bu folikül menstrual siklusta primer oositler arasından seçilir. Sekonder oositin atılmasında bazı enzimler ve hormonlar da etkilidir. Bunlar:

- Antrum sıvısının basınç ve hacminin yükselmesi
- Aktive plazminojenlerin enzimatik etkileri ile folikül duvarının proteolizi
- Foliküler hücreler ile oosit-kumulus kompleksi arasına hormonların etkisi ile glikozaminoglikanların salgılanması
- Prostaglandinlerin teka eksterna tabakasını uyarak buradaki düz kas liflerinin kasılmasını sağlaması (30).

Kandaki östrojen düzeyi menstrual siklusun 14. gününde artar. Östrojen düzeyinin artışı sağlayan hücreler graaf folikülünün teka ve granüloza hücreleridir. Kana östrojen verilince FSH salınması baskılanır, LH hormonunun salgılanması uyarılır ve uterusun endometrium tabakası proliferasyon evresine girer. Ovaryumdaki kanlanma, kanda LH hormonunun artışına bağlı olarak artar ve ödem meydana gelir. Ödem oluşması postkapiller venüllerden ve kapillerlerden plazma proteinlerinin (vazopressin, histamin, kolajenaz ve prostaglandinler) sızmasından dolayı oluşur. Kolajenaz enzim miktarı yüksek LH hormon seviyesine bağlı olarak artarken kolajen yıkım miktarını da arttırmaktadır. Bu süreçte granüloza hücrelerinden hyaluronik asit üretme miktarındaki artış granüloza hücrelerinin daha gevşek bir düzenlenmeye geçişine neden olur. Tunika albuginea'da kolajen yıkımı, bazı hücrelerin ölümü ve iskemi gerçekleşir. Sonuç olarak yine stratum granulozum tabakasında hücreler daha gevşekçe düzenlenirler. Prostaglandin hormonunu antral sıvının ve LH hormonunun artması etkisiyle düz kasların kasılmasını sağlar ve gevşemiş duvardan oositin atılmasıyla ovulasyona yol açar.

Ovulasyonun gerçekleşeceğine dair işaret ovulasyondan önce folikül çıkıntısının üzerinde ovaryan yüzeyde saydamlık ve renkte lokal bir değişiklik gerçekleşir ve bu küçük alanda kan akışı durur. Ovaryumdaki bu değişiklik foliküler stigma'dır (makula pellusida). Germinal epitelin bu bölümü balon şeklinde şişer, yükselir ve sonra rüptüre olur (yırılır). Bu aşamada oosit birinci mayoz bölünmesini bitirmiş ve ikinci mayoz bölünmenin metafaz evresinde arreste uğramıştır. Sekonder oosit, ovaryum yüzeyinde açılmış olan küçük bir delikten çevrelenmiş olduğu kumulus ooforus ve korona

radiyata hücreleri ile birlikte folikülden atılır. Tuba uterinanın huni şeklindeki uç kısmı olan fimbriya ovarikalar ovulasyon sırasında ovaryum yüzeyine iyice yaklaşır. Ovaryumdan atılan bu kumulus kütlesi fimbriyaların saçak şekillerinin de yardımıyla tuba uterinaya doğru süpürülür. Oositin periton boşluğuna geçişini önlemek için kumulus kütlesi fimbriyalara sıkıca tutunur ve tuba uterina epitelinde bulunan silli hücrelerin taşıması ve kas kontraksiyonu aracılığıyla ovum tuba uterinanın infundibulumuna girer. Bu olaya ovulasyon denir. Tuba uterinada sekonder oositin ilerleyişi yaklaşık olarak 4 gündür. Bu yolculuk sürecinde oosit bir sperm ile karşılaşp fertilizasyon gerçekleşirse II. mayoz bölünmeyi de tamamlar. Eğer fertilizasyon gerçekleşmez ise oosit yaklaşık 24 saatte dejenere olur (30,41–43).

Korpus Luteum

Ovulasyon sonrası boşalmış olan folikül duvarı, teka ve granüloza hücrelerinden oluşur. Bu folikül duvarı içeriye doğru katlantılar ve büzülmeler yapar ve korpus luteum (sarı cisim) veya luteal bez olarak adlandırılan geçici bir özel iç salgı bezine değişir. Bu endokrin bez kortikal bölgede yerleşir ve östrojen ve progesteron salgılar. Progesteron hormonu ovaryumdaki diğer foliküller üzerinde etki eder, ovulasyonu engellemek için foliküllerin gelişmelerine engel olur. Derin katlanmalar sonrası teka internadaki kapillerler yırtılır, folikül lümenine doğru bir kanama meydana gelir ve merkezde bir kan pıhtısı oluşur. Kırmızı cisim anlamına gelen bu yapıya korpus hemorojikum veya korpus rubrum adı verilir. Daha sonra ovaryum stroma bağ dokusu eski folikül duvarına yayılır. Teka interna ve granüloza tabakalarının hücre boyutları artar luteinizasyon denen bir sürece geçerler ve bu dönemde sitoplazmalarında lipid ve lipidte çözünen lutein (lipokrom) pigmenti biriktirirler. Lipokrom ile bu foliküller yeni alınan kesitlerde sarı renkli görünürler. Steroid hormon salgısı yapan hücrelerin özellikleri olan tübüler kristal mitokondriyonlar ve aER açısından zengin hücreler olarak ani değişimlere uğrarlar. Luteal hücreleri ikiye ayırmak mümkündür. Bunlar:

- **Granüloza lutein hücreleri** büyük boyutlu, merkezi olarak yerleşen 30 µm çapındaki granüloza tabaka kaynaklı hücreler

- Teka interna tabakası kaynaklı **teka lutein hücreleri** ise 15 µm çapında, daha küçük boyutlu, koyu renk boyanan ve korpus luteum duvarının katlantılarına yerleşen hücrelerdir.

Korpus luteumun ilk oluştuğu zamanda teka internanın lenfatik damarları ve kan kapillerleri hızlı bir şekilde sarı cismin iç kısmına doğru gelişirler böylece bu yapının zengin vasküler ağını meydana getirir. Oluşan bu vasküler ağdan salgılanan östrojen ve progesteron hormonları, uterus mukozasını uyarır, sekretuar evreye girmesini sağlar ve fertilizasyon olması ihtimali için oluşacak zigotun implantasyonuna zemin hazırlar.

Eğer gebelik meydana gelmemiş ve insan koryonik gonadotropin hormonu (hCG) ve diğer luteotropinler salgılanmaz ise korpus luteum hormonlarının salgılanmasında azalma olur. Böyle iyi gelişmiş durumda yalnızca 14 gün kadar aktif kalır ve bu durumda menstruasyon korpus luteumu olarak adlandırılır. Ovulasyondan sonra 10-12. günlerde menstruasyon korpus luteumunun boyutu küçülür, hücreler nötral yağlar biriktirir, dejenerasyon başlar ve bu bölge bağ dokusundan oluşan bir nedbe (scar) ile kaplanır. Oluşan bu beyazımsı yapıya korpus albicans (beyaz cisim) denir. Korpus albicans da zamanla küçülür, kortekste derin kısımlara gömülür ve stromaya karışarak zamanla kaybolur (30,36,41,42).

2.2. Primer Over Yetmezlik (POY)

İnfertilite, klinik tanım olarak 12 ay boyunca korunma yöntemi olmadan düzenli cinsel ilişkiye girildiği halde gebelik olmaması durumudur. Tüm dünyada gebe kalma ve doğurganlık hızı özellikle çevresel faktörler başta olmak üzere birçok etkene bağlı olarak azalmaktadır (44). Prematüre Ovaryan yetmezliği (POY) ya da prematüre menopoza olarak da adlandırılan birincil yumurtalık (over) yetmezliği 40 yaşından önce ovaryum folikül rezervinin azalması, çok az ya da hiç folikül kalmaması, yetersiz over sex hormonları ve menstrual döngünün kesilmesi durumudur.

2.2.1. POI teşhisi

Menopoz yaşından (40) önce POY hastası olan kişilerin rezidüel folikül sayısı 1.000'den az (eşik değer) sayıya düşer, foliküllerde aktivasyon ve ovulasyon gerçekleşmez ve sonuç olarak amenore tablosu ortaya çıkar. Bütün bunlar, menstrual döngüde düzensizliklere ve ileri durumda gebelikte başarısızlıklara neden olan hipoöstrojenizm adı verilen ve kısırlığa neden olan düşük hormon seviyeleri ile ilgilidir. Toplumun %1'ine 40 yaşından önce, %0,1'ine 30 yaş öncesinde tanı konulur ve bu tanı genel olarak FSH düzeyleri ile doğrulanır. Yaş arttıkça POY görülme sıklığı artsa da çalışmalar prevalansın daha az kesin olduğunu belirtmektedir. İnsidans oranı tahmini olarak yaşa göre değişkenlik gösterse de 40 yaşında vaka oranı 1:100, 35 yaşında oran 1:250, 30 yaşında oran 1:1.000 ve 18-25 yaşları arasında vaka oranı 1:10.000'dir. Ayrıca yapılan epidemiyolojik çalışmalara göre etnik kökene bağlı olarak da POY insidansı değişiklik göstermektedir. POY için etiyolojiler gruplandırıldığında iyatrojenik (radyasyon, kemoterapi alma, ovaryum cerrahisi vb.), otoimmün yumurtalık hasarı ve genetik (X kromozomu veya bazı spresifik genleri içeren genetik anormallikler) olarak ayrılabilir (7,45,46). Ayrıca POY'da nedeni henüz tanımlanamayan vakalar da mevcuttur. Genetik nedenler üzerindeki çalışmalar transgenik hayvanlar ile yapılmıştır ve bu çalışmalar POY'de kemik morfogenetik protein 15 (BMP15) ve fragil X zeka geriliği gibi bazı genlerin rol oynadığını göstermiştir (47).

Prematüre ovaryan yetmezlik için kullanılan test belirteci FSH'dır. Bu vakalar yüksek gonadotropin FSH (değeri 40 IU/l'nın üzerinde) ve düşük E2 seviyeleri (hipoöstrojenizm) (estradiol seviyesi <50 pg/ml) gösterirler. Minimum iki kere 4 haftadan daha uzun aralıklarla serum E2 ve FSH değerleri ölçülür ve sürekli olarak yüksek FSH değerlerine sahip olan hastalara POY teşhisi konabilmektedir. Menopozda ovaryum folikülleri ve rezervi tamamen tükenmiş iken, POY'lu hastaların yaklaşık %5-10'u tedavi sonrası gebe kalabilmektedirler (3,4,7). Anti-Müllerian hormon (AMH) ise foliküllerin gelişimi (folikülogenez) ile ilişkili bir hormondur. AMH granüloza hücrelerinden salgılanır ve görevi büyümekte olan folikülleri engelleyerek folikül alımının düzenlenmesinde görev yapmaktır. POY için ovaryum patolojisinde ortaya çıkmış yeni bir test yöntemidir (48).

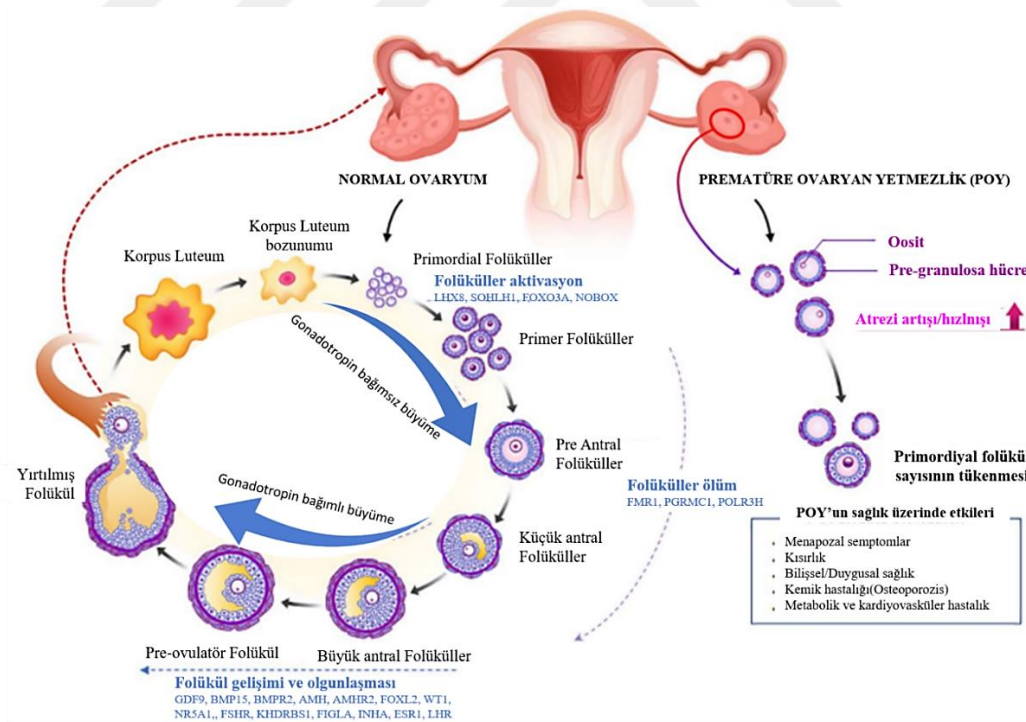
2.2.2. POI'nin Kliniği

Klinik bulgular POY teşhisi almış kadınlarda oldukça değişkenlik göstermektedir. Menopoza yeni girmiş kadınlarda olduğu gibi vajinal kuruluk ve enfeksiyon, cinsel isteksizlik, kuru gözler, uyku problemleri, dispareni, gece sıcak basmaları ve ruh halindeki hızlı değişimler POY hastalarında da görülmektedir. POY tanısı almış kadınlar ayrıca, bazen perdeli boyun, kısa boy, dördüncü ve beşinci metakarpal kemiklerinin kısa olması, geniş taşıma açılı dirsek, düşük saç çizgisi, kalkan benzeri göğüs ve düşük görünümlü saç çizgisi gibi Turner sendromunda görülen belirtileri gösterebilirler. POY'un en yaygın olan genetik nedeni Turner sendromudur. POY, bazı otoimmün hastalıkların (adrenal otoimmünite ve tiroid gibi.) klinik sonuçlarıyla da ilişkilendirilmiştir. Bu sonuçlar arasında; saçın erken ağarması, tırnak distrofisi, noktasal kellik, kandidiyazis ve düzensiz cilt pigmentasyonu sayılabilir. Ayrıca bu kadınlarda adrenal yetmezlik semptomları arasında olan; ortostatik hipotansiyon, iştahsızlık, kasık ve koltuk altı bölgelerinde kıl dökülmeleri, karın ağrısı, hiperpigmentasyon ve tuza aşırma görülebilir. Kritik olarak, azalmış veya artmış kalp atım hızı, şişkin gözler ve guatr gibi tiroid hastalığında görülen belirtileri de görülebilmektedir. POY tanısı alan kadınlarda diğer kadınlara kıyasla östrojen hormon düzeyleri erken yaşlarda düşüş gösterdiği için nörobilişsel bozukluklar, düşük kemik yoğunluğu (osteoporoz) ve kalp ve damar hastalıklarına daha fazla eğilim göstermektedirler. Psikolojik yönden ele alındıklarında ise doğurganlıklarını ve kadınlığını kaybetme algısı POY hastalarında ciddi psikolojik rahatsızlıklara ve depresyona girmelerine neden olmaktadır. (3,7). POY'da en sık kullanılan tedavi yöntemi ise hormon replasman tedavisidir (HRT) (49).

2.2.3. Poy'da Ovaryumların Histolojisi

POY'da histolojik olarak çoğu folikül atretiktir, antral foliküller anormaldir ve bazen de granüloza hücreleri tamamen yoktur. POY tanısı almış kadınlarda serum AMH varlığı, ovaryumlarında 15 veya daha az folikülün var olması ile ilişkilendirilebilmektedir. POY'da ovaryum histolojisi, over rezervinin ve folikül koşullarının değerlendirilmesinde kullanılan kesin bir yöntemdir. Yapılan histolojik çalışmalar iki tip POY bulunabileceğini göstermiştir: küçük ovaryuma sahip olup

folikül rezervinin olmadığı kadınlar ve normal büyüklükte ovaryuma sahip ve kısmi foliküler olgunlaşmanın olduğu kadınlar. Folikül rezervinin olmadığı tipte aktif primordiyal ve atretik foliküller olmamasına rağmen, ovaryumda korpus albicans ve kolajen bakımından hâlâ zengin bir bağ dokusu kapsülü ile çevrelenmiş histolojik olarak eozinofilik bir kütleden oluşan stroma bulunur. Bunun yanında foliküler tipte, çok sayıda aktif primordiyal folikül içermesine rağmen gelişmekte olan ve büyüyen folikülleri içermemektedir. Işık ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile POY'lu ovaryumlarda birkaç korpus albicans, yoğun bir bağ dokusu ve ovaryumun korteks ve medullasının keskin bir sınır olmadan birleştiği görülür. Hücrelerin ve fibriler elementlerin dağılımı homojen olarak gözlenmez, bazı bölgeler hücresel elementi bazı bölgeler ise kolajen birikimini daha fazla gösterir. Ayrıca TEM ile stromada kolajen ve fibroblast yüksek konsantrasyonda gözlenir. Ultrason taramalarında POY'lu kadınlarda, birkaç primordiyal folikülün, kolajen ve fibroblastların ve karışık çoklu kan damarlarının ovaryumda heterojen olarak dağıldığını göstermiştir (7) (Şekil 9).



Şekil 9: POY ovaryumuna karşı normal ovaryumda ovulasyon ve folikülogenez. (referans (4)'ten modifiye edilmiştir.)

Tüm bunların yanında POY gelişimi için net bir mekanizma bilinmemekle beraber nedenleri arasında şunlar olabilir: a) hızlanmış folikül atrezisi; b) primordiyal folikül rezervinde azalma; c) primordiyal foliküllerin anormal olgunlaşması. POY nedenleri arasında ayrıca kusurlu folikül olgunlaşması, değişen apoptoz hızı, mevcut olan foliküllerin sayıca hızlanmasına veya azalmasına sebep olan primordiyal folikülleri aktive etmek için gereken mekanizmanın anormallikleri ve hızlanmış foliküler atrezi olabilir. Sonuç olarak, POY mekanizmasının başlamasına neden olan faktörler heterojendir ve otoimmün, iyatrojenik, kromozomal enfeksiyöz, metabolik faktörler ve genetik mutasyonların bir sonucu olabilir (4). POY modeli oluşturmak için en yaygın kullanılan etkenler; kuyruk damarı (intravenöz) veya intraperitoneal (i.p.) yollarla uygulanabilen sisplatin, siklofosfamid, 4- vinylcyclohexene diepoxide (VCD), murin ZP3 330-342 peptitleri (ZP3) ve bisülfan ile kimyasal indüksiyon ile hayvanlarda oluşturulmuştur (7).

Biz de çalışmamızda, sıçanlarda POY modeli oluşturmak için literatürde sıklıkla kullanılan siklofosfamidi kullandık.

2.3. Apoptoz

Tüm canlılarda yaşamının belli bir dengesi ve belli başlı bölümleri vardır. Bu bölümler; doğmak, büyümek, üremek, yaşlanmak ve ölmektir. Tüm bu evreler süresince canlıdaki hücrelerin bir kısmı ölürken bir kısmı da yenilenir veya yeni hücreler oluşur. Böylece homeostaz korunmuş olur. Bu hücreler apoptoz, piroptoz, nekroz gibi çeşitli hücre ölüm yolları ile yok olmaktadır (14).

Apoptoz kelimesi Yunancada ‘‘ayrı’’ anlamı anlamına gelen apo ve ‘‘düşmüş’’ anlamına gelen ptosis kelimelerinin birleşiminden oluşmaktadır. Bu terimin ilk kez kullanılışı Edinburg Üniveristesinde 1972 senesinde Alastair R Curie, Andrew H Wyllie ve John Kerr tarafından hücre ölümünü fizyolojik olarak tanımlamak içindir. Apoptoz; bağışıklık gelişimi, normal doku döngüsü ve embriyogenez gibi canlı yaşamının devamı için kritik olan olaylarda, spesifik hücresel sinyaller ve protein sentezi gerektiren genetik olarak kontrol edilen programlı bir hücre ölümü şeklindedir (15). DNA’sı zarar görmüş, görevini tamamlamış ya da ciddi hasar gören hücreler biyokimyasal, morfolojik ve fizyolojik olarak bağlantılı oldukları hücre ve dokulara

zarar vermeden apoptoz tarafından ortadan kaldırılmaktadırlar.

Apoptoz embriyonik dönemden başlayarak tüm hayat boyunca vücutta pek çok sistemde (gastrointestinal, deri, immün sistem) mitoz ile dengededir. Mitoz bölünme hücre çoğalması ile apoptoz ise hücre ölümü ile organizmada homeostaz sağlamaktadır. Apoptoz mekanizmasını birçok mediyatör kontrol etmektedir. Enzimler (Kaspaz), iyonlar (kalsiyum), organeller (mitokondri ve endoplazmik retikulum), genler (c-myc, p53) ve moleküller (seramid) bunların arasında başlıca rol oynayan mediyatörlerdir (50). Apoptoz kabaca bir hormonun ya da bir büyüme faktörünün geri çekilmesi nedeniyle ve hücre yüzeyinde eksprese olan bir Fas proteini (hücre yüzey etkileşimleri) ve apoptoz reseptörleri etkileşimi yoluyla başlayabilir. Bunlara ek olarak apoptoz, hücre siklusu veya metabolik döngünün kırılması, toksik ve radyoaktif maddelere kronik olarak maruz kalma gibi intrinsik faktörler ya da uyarılar ile uyarılabilir. Apoptoz başladıktan sonra bunu hücre ölüm yollarını aktive eden kaskadlar takip eder (15).

2.3.1. Apoptoz Morfolojisi

Apoptoz sürecinde hücrede meydana gelen değişimler elektron ve ışık mikroskobu ile tanımlanmıştır (51). En erken evrede hücre hacimce küçülüp büzülürken hücre içindikiler daha yoğun paketlenmeler sergiler ve sitolazma yoğunudur. Apoptozun en erken evresinde eş zamanlı olarak piknotik (kromatinin geri dönüşümsüz yoğunlaşması) bir çekirdek ve kromatinin çekirdek zarı çevresinde çok yoğun bir hal aldığı görülür (15). Piknoz apoptozun en karakteristik özelliğidir ve elektron mikroskobu ile iyi gözlenirken ışık mikroskobu ile de diğer hücre değişiklikleri kolaylıkla görselleştirilebilir (17,51). Bu değişiklikleri nukleusta parçalanma ve “apoptotik cisimcikler” olarak adlandırılan küçük veziküllerin oluşumu takip eder. Çekirdeğin parçalanması karyoksis olarak adlandırılmaktadır. Daha sonra hücrede yüzeye doğru tomurcuk veya veziküller oluşur. Çalışmalar karyoksisin apoptotik hücrelerin küçük apoptotik cisimlere ayrılıp hücre zarının daha fazla veziküllendiği hallerde görüldüğünü gösterir. Daha sonra hücre içeriğinin perifer yayılmasını engelleyen ve inflamatuvar cevabı engelleyen neoplastik, parankimal ve dendritik hücreler (DC’ler), nötrofiller ve makrofajlar tarafından apoptotik cisimlerin

fagositozu gerçekleşir. Tehlikeli maddelerin çevreye yayılmasını engellediği için apoptozun son adımının fagositoz olduğuna inanılır (15,17,51).

Hematoksilen ve eosin (H&E) ile boyanan apoptotik hücrelerin incelenmesi sonucu, sitoplazmanın koyu eozinofilik, nukleusun ise yoğun mor boyanan kromatin fragmanları ile oval ya da yuvarlak bir kütle halinde izlendiği görülmüştür. Tek hücre veya küçük hücre kümelerini içeren apoptotozun elektron mikroskobu ile hücre içi değişikliklerinin daha iyi görüldüğü ve tanımlandığı sonucuna varılmıştır (51).

2.3.2. Apoptozun Biyolojik Mekanizması

Son derece karmaşık olan bu mekanizmanın eksiksiz olarak devam edebilmesi için sinyal dönüştürücü ve bazı proteinlerin yanında sinyal yollarının da sıralı bir şekilde devam edebilmesi gerekir. Ekstrinsik (dışsal), intrinsik (içsel) ve Perforin/granzim yolu olmak üzere üç ana apoptoz yolu bulunmaktadır (Şekil 10).

2.3.2.1. Ekstrinsik yol

Hücre zarındaki reseptörler aracılığıyla başlatılan apoptotik yola ekstrinsik yol veya ekstrinsik sinyal adı verilir ve bunların tümü transmembran bölgeriyle zara bağlanırlar. Bu ligandların hücre içine alınma yolu ise hücre zarında bulunan ölüm sinyallerinin sitoplazmik ölüm alanlarını kullanarak hücre içine taşınması ile gerçekleşir. Apoptoz mekanizmasında görev alan membran reseptörleri tümör nekroz faktör ailesine aittir, bunlar iki ana majör ligand tarafından aktive edilir: TNF ve Fas.

TNFR-1 ve TNFR2, TNF reseptörleridir ve birlikte TNF yolu isimli büyük bir apoptoz yolunun başlamasından sorumlu reseptörlerdir. Ölüm sinyallerinin iletilebilmesi için, TNF ve reseptörleri arasındaki etkileşimin yanı sıra iki adaptör proteinin de bu süreçte görev alması gerekir: Fas ile ilişkili ölüm alanı proteini [FADD (Fas-associated death domain protein)] ve TNF reseptörü ile ilişkili olan ölüm alanı [TRADD (TNF receptor-associated death domain)] ve kaspazların hareketi yoluyla apoptozu etkiler. TNF ligandları hücre zarında yer alan reseptörleri (TNF reseptörleri) ile ekileşime geçince homotrimerleri oluştururlar. Bağlanma sonrası, adaptör proteinler (TRADD, FADD), kendi üzerlerindeki ölüm alanlarının reseptörler

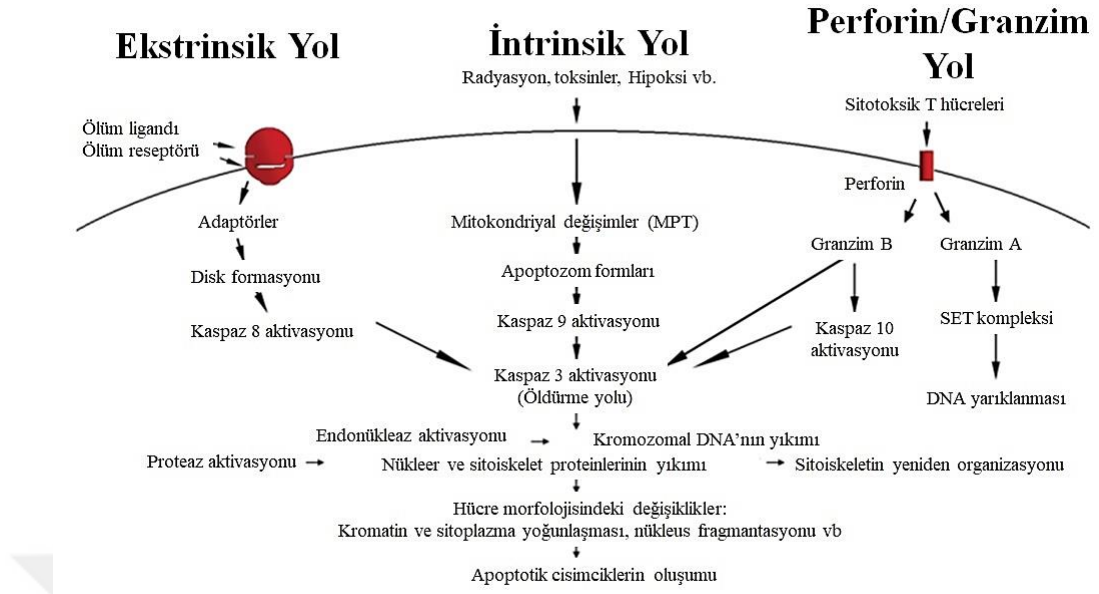
üzerindeki muadilleri ile etkileşime girdiği sitoplazmik tarafta bulunan TNF reseptörlerine alınır. Ölüm efektör alanlarının homotipik etkileşimi üzerine FADD prokaspaz-8'i yeni üye olarak işe alır. Aşağı akış etkileşimcisi olan Prokaspaz-8, aktif kaspaz-8'i oluşturmak için otomatik olarak bölünmeye tabi tutulur. Aktif kaspaz-8 ise hücre ölümünü yürütme aşamasında başlatıcı olarak görev alır. Kaspaz-8, proteolitik bölünme yoluyla aktif kaspaz-3'ü oluşturmak için prokaspaz-3'ü parçalamaktadır. Aktif kaspaz-3 ise hücre içindeki proteinlerin son olarak bozulmasından sorumlu esas faktördür (17).

2.3.2.2. İntrinsik yol

İntrinsik apoptoz yolağında hücre içinden gelen bir uyarı sonrası Bid, Bcl-2'yi inaktif forma dönüştürür. Bcl-2 bir anti-apoptotik Bid ise proapoptotik bir proteindir. Bid, Bcl-2'yi inaktive ederken Bak ve Bax'ı ise aktif duruma getirir. Mitokondriyon memranı porlarından bazı faktörlerin salınımı için aktifleşen proteinler por oluşumunu indükler ve zardaki potansiyeli değiştirirler. Porlardan salınımı uyarılan faktörler Endo-G (Endonukleaz-G), Smac (Second mitokondria-derived Activator of Caspase), sitokrom-c, AIF (Apoptoz indükleyici faktör) ve Ca^{++} 'dur. SMAC inhibitör apoptotik faktör olan IAF'i kaspaz-8 ve kaspaz-3'ün aktivasyonunu engellediği için inhibe eder ve bu inhibasyon aynı zamanda apoptoz hızını artırır. Oksidatif fosforilasyon için sitokrom-c elektron taşıma görevini üstlenir. Endo-G'nin görevi DNA'yı parçalara ayırmak iken AIF ise daha sonra çekirdeğe taşınır ve çekirdeği parçalara ayırır. Sitokrom-c'nin diğer bir görevi apoptozom kompleksi oluşturmaktır. Bu kompleksi sitozolde, ATP ve apoptotik proteaz aktive eden faktör (Apaf-1)'ün katılmasıyla oluşturur. Apoptozomun görevi kaspaz-9'u kesip aktif hale gelmesini sağlamaktır. Daha sonra görevi kaspaz-9 üstlenerek aktif kaspaz-3 oluşturmak için prokaspaz-3 üzerine etki eder. Aktifleşen kaspaz-3 ise inaktif kaspaz aktive edici DNaz (ICAD)'ı inaktif hale getirir ve çekirdekte kromatinin yoğunlaşmasında rol oynayan kaspaz aktive edici DNaz (CAD)'ı serbestleştirir. CAD aynı zamanda DNA'nın fragmentasyonuna da sebep olur (14).

2.3.2.3. Perforin/granzim yolu

Tümör hücrelerinin ve patojenlerle enfekte olmuş hücrelerin yok edilebilmesi için diğer bir yol ise Granzim-perforin yoludur. Bu yol antijen taşıyan hücrelerin CD8+ hücreleri tarafından öldürüldüğü tip IV aşırı duyarlılığın bir çeşididi olan T hücresi aracılı sitotoksitedir. Apoptozun baskın yolu ve yöntemi olan FasL/FasR etkileşimi, sitotoksik T lenfositler (CTL) ile indüklenir ve CTL'ler hedeflenmiş hücreleri ekstrinsik yoldan öldürebilir. Sitotoksik T lenfositler bunlara ek olarak virüslü hücreler ve tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerini, transmembran gözenek oluşturuçu molekül perforinin salgılanması yoluyla da gösterebilirler. Bu yol, membranda perforin tarafından açılmış dairesel pordan Ca^{++} girişinin artışına neden olan ve sitoplazmada bulunan granüllerin ekzofitik (dışa doğru) salınımını içeren yeni bir yoldur. T lenfositler ve Natural Killer hücrelerinin sitoplazmik granüllerinde bulunan en kritik faktörler granzim A ve B ve perforinlerdir, bunlar serin proteazlardır. Veziküllerden granzim B serbest kalır ve daha sonra proteinleri aspartat kalıntılarında parçalayıp prokaspaz-10'un aktifleşmesine ve ICAD (Caspaz Activated DNase inhibitörü) gibi faktörleri parçalamasına yol açar. Ek olarak yapılan çalışmalar granzim B'nin mitokondriyal bir yolu kullanıp ölüm sinyalini çoğaltabileceğini de göstermiştir. Granzim B direkt olarak kaspaz-3'ü de aktive edebilmektedir. Sonuç olarak granzim B sitotoksikite yöntemi kaspaz aktivasyonuna neden olur ve DNA'nın fragmente olmasını sağlayarak apoptoza yol açmış olur (14,51).



Şekil 10: Apoptik sinyal yolları (referans (13)'ten modifiye edilmiştir.)

Tezimizde, apoptotik mekanizmanın geri dönüşümsüz aşamasını gösterebilmek amacıyla Kaspaz-3 için immünohistokimyasal boyama yapıldı.

2.4. Bcl-2 ve Bax

Birbirine zıt 2 gruptan oluşan Bcl-2 geni ailesinin Bid, Bad, Bax, BclXs, Bak, Bim, Puma ve Noxa üyelerinden oluşan grubu apoptozu tetiklerken (proapoptotik), Bcl-2, Bcl-xl ve Mcl-1 üyelerinden oluşan grubu ise apoptozu inhibe etmektedir (antiapoptotik). Proapoptotik üyeler sitozolde, antiapoptotik üyeler ise çekirdek zarında, mitokondrinin dış zarında ve endoplazmik retikulumda lokalize olurlar. Bcl-2 proteinin ilk keşfi insan B hücreli foliküler lenfomadır ve Bcl-2 genlerinin homo veya heterodimer yapısı bir hücrenin apoptoza eğilimli olup olmadığını göstermektedir. Bir hücrenin bünyesinde proapoptotik proteinler daha çok bulunuyorsa hücre apoptoza eğilimli iken, antiapoptotik proteinler daha çok bulunuyorsa hücre apoptoza daha az eğilimlidir (14,50).

Bcl-2 mitokondride iyon transportunda görev alır ve sitokrom c'nin de salınmasını önlemektedir. Bcl-2 APAF-1'e bağlıdır ve intrinsik bir apoptoz sinyali APAF1'in zardan ayrılmasına ve sonuç olarak geçirgenlikte artış olmasına sebep olur.

Bu esnada bir proapoptotik olan Bax hücrede sitozolde lokalize olurken apoptoz sinyali alınmasının ardından mitokondri zarına tutunduğu ve burada porlar oluşturduğu görülür. Mitokondride bulunan Apoptoz İndükleyici Faktör (AİF) ve sitokrom c porlardan sitoplazmaya geçer. Daha sonra apoptoz indükleyici faktör nukleusa geçer. Sitokrom c sitoplazmada ancak Kazpaz 9, ATP ve APAF1 ile birleşirse apoptoz kompleksi oluşur. Bad normal bir hücrede mitokondri dış membranında lokalize olurken apoptoz gerçekleşirse Bcl-xl'nin Bad'dan ayrıldığı esnada Bax farklılaşma geçirir (50).

Apoptozis mekanizmasında mitokondriyal yolak aktivasyonu ile gözlenen Bcl-2/Bax oranının, hücrenin ölüm yaşam oranını belirlemesi nedeniyle, tezimizde Bcl-2 ve Bax için immünohistokimyasal boyama yapıldı.

2.5. Nitrik Oksit, iNOS ve eNOS

Güçlü bir vazodilatör olan nitrik oksit (NO), ilkel dünyadan beri varlığını korur ve çeşitli biyolojik etkilere sahip, neredeyse tüm dokularda bulunan kısa ömürlü gaz halinde bir serbest radikaldir. Memeliler, ökaryotik organizmalar, omurgasızlar ve bitkiler de dahil birçok türde geniş kapsamda bulunmaktadır. Geçmişten beri NO savunma mekanizmalarında yer almıştır ve evrimsel süreçte varlığını sürdürmesinin ana sebepleri; toksik O₃'ü nötralize etmek ve reaktif oksijen türleri (ROS) için bir temizleyici olarak görev yapmaktır (21–23). NO düşük ekspresyonlarda (nanomolar ve pikomolar) hayatta kalmayı ve hücre çoğalmasında iyi yönde etkilediği gözlenirken yüksek ekspresyonları (mikromolar) nitrostatik ve oksidatif streslerin artmasından dolayı patolojik sonuçlar doğurmaktadır. İmmün ve inflamatuvar yanıtların düzenlenmesinde kritik bir role sahip olan NO, nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) varlığında L-argininin NO'ya dönüştürülmesiyle memeli hücrelerinde bir parakrin aracısı olarak katalize edilir (22–24). Yüksek düzeyde eksprese olan NO apoptoza neden olurken, düşük ekspresyonlarda hücreleri apoptozdan koruduğu gözlenmiştir (52).

Memelilerde en yaygın terminoloji ile anıldığında; nöronal, indüklenabilir ve endotelial NOS olmak üzere farklı genler tarafından NOS'un üç farklı izoformu kodlanır. Aktiviteleri kalsiyuma bağlı olan ve yapısal olarak eksprese edilen NOS

formları; vasküler endotelial hücrelerde ilk bulunan ve vasküler homeostazı bir dengede tutan izoform olan endotelial (Tip III, Nos-III, Nos-3) ve nöronal dokuda ilk bulunan, nöronal fonksiyon ve nörolojik düzenlemeler üzerinde önemli bir etkiye sahip olup baskın olan izoform nöronal NOS'tur (Tip I, NosI, Nos-1). Patojen ile ilişkili PAMP'lar ve/veya inflamatuvar mediatörlere yanıt olarak yüksek düzeylerde NO üreten ve aktivite yönünden kalsiyuma bağlı olmayan diğer izoform ise çeşitli hücre ve dokularda indüklenebilen NOS (Tip II, Nos-II, Nos-2)'tur. iNOS inflamasyon durumunda ve patojenik koşullarda konak savunması için makrofajlarda eksprese olmaktadır bununla birlikte jelatinaz ve elastaz granüllerinde, sitozolde ve dinlenme durumundaki nötrofillerin organellerinde de bulunduğundan bu enzimin insan ve fare nötrofillerinde yapısal olarak var olabileceği düşünülmüştür (22-24).

Tezimizde apoptozis ile ilişkili oksidatif stres oranlarına değinildiği için iNOS ve eNOS için immünohistokimyasal boyama yapıldı.

2.6. Proliferasyon Hücre Nükleer Antijeni (PCNA) ve Ovaryum

1970'lerin sonlarında keşfedilen PCNA (Proliferating cell nuclear antigen), fetal ve yetişkin yumurtalıklarında, bazı memelilerde ve eklembacaklılarda farklı şekillerde eksprese edilen moleküler ağırlığı 36 kDa olan bir proteindir. İlk keşfi sistemik lupus eritromatozuslu hastalardan elde edilen bir otoimmün antikorun hedefi olarak tanımlansa da, süregelen çalışmalar bunun dönüştürülmüş ve çoğalan hücrelerde eksprese edilen bir protein olduğunu kanıtlamıştır. Ek olarak ovaryum foliküllerinin gelişimi ve büyümesinde primer düzenleyici olarak görev yapan, histon olmayan asidik bir nükleer proteindir. PCNA ekspresyonu oosit ve foliküllerin büyümesi ve olgunlaşması sırasında artış göstermektedir ve stratum granulozumda bir proliferasyon işaretleyici olarak kabul edilmiştir. 1980'lerin ortalarında PCNA'nın, boyama modelleri kullanılarak DNA replikasyonu gibi biyolojik süreçlerde rol oynadığı önerilmiştir. Daha sonra kardeş kromatit uyumu, hücre siklusunu kontrol etme, epigenetik kalıtım, DNA'da hasar riskini önleme, DNA onarımı gibi süreçlerde rol oynayan ve DNA sentezi bölgelerindeki olayları organize eden kritik bir protein olduğu kanıtlandı. PCNA'nın, ovaryumda folikül sayısını gösterdiği ve folikül gelişim aşamalarının bütün süreçlerinde tespit edildiği görülmüştür (53,54).

Tezimizde, tüm gruplardaki proliferasyonu belirlemek amacıyla PCNA için immünohistokimyasal boyama yapıldı.

2.7. Toplam Oksidan Seviyesi (TOS) ve Toplam Antioksidan Seviyesi (TAS)

Serbest radikaller organizmada doğal olarak oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları ile endojen olarak oluşabildiği gibi çeşitli dış kaynakların etkisiyle eksojen olarak da oluşabilir. Hücredeki farklı organeller farklı miktarda radikal oluşumuna sebep olabilir. Normal fizyolojik şartlar altında organizmada endojen veya eksojen nedenlerle oluşan serbest radikaller ve bunlara bağlı oluşan oksidatif stres ile mücadele eden kompleks bir antioksidan defans sistemine sahiptir (55). Oluşan oksidan durumlara karşı redoks ayarının sürdürebilmesinde antioksidanların bütün vücuda taşınmasını ve dağıtılmasını sağlayan kan doku çok önemlidir. Total antioksidanlara en büyük katkı plazmadaki antioksidan moleküllerden gelir. Plazmada serbest demiri toplayan transferin ve seruloplazminin yanısıra serbest radikalleri yakalayan antioksidanlara ek olarak albümin, ürik asit ve askorbik asit insan plazmasındaki total antioksidanların büyük bir oranını oluşturur (56,57). Plazmada antioksidanlar etkileşim içindedir. Bu etkileşimden dolayı bileşenlerin tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla bir etki oluşmaktadır. Total antioksidan durumunun ölçümü, antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli bilgiler verebilir. Bu yüzden kanın antioksidan durumunu saptamada bireysel antioksidanlardan ziyade bunların toplam antioksidan değerini veren toplam antioksidan kapasite ölçümü yaygın olarak kullanılmaktadır (58).

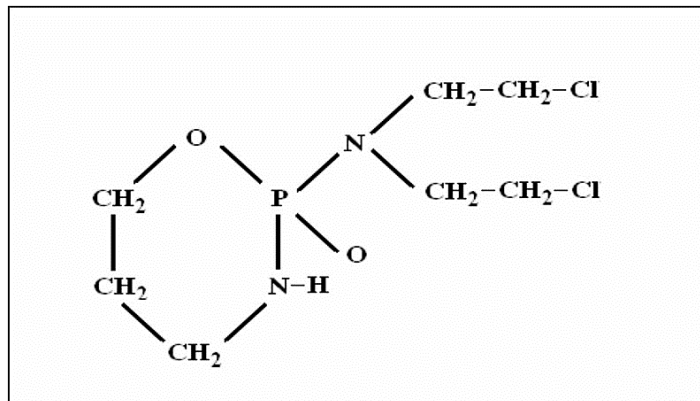
2.8. Siklofosfamid

Etkili tarama yöntemleri, erken teşhis ve kemoterapötikler kanser hastalarında kanserli hücrelerin çoğalmasının önüne geçerek sağkalımda artışlara katkı sağlamaktadır. Kemoterapötik ajanlar kanser hücreleriyle savaşırken sağlıklı hücrelerin de yaşamını tehdit eder veya ölümüne yol açabilmektedir. Uzun vadeli yan etkileri nedeniyle kemoterapötiklerin sınırlı uygulamaları vardır. En sık kullanılan kemoterapötik ajanlar siklofosfamid, 5-fluorourasil, metotreksat ve 6-merkaptopurin'dir. Siklofosfamid; kronik lenfositik lösemi, katı tümörler, pediatrik kanser, miyelom ve lenfoma gibi hastalıklarda yaygın olarak kullanılır. Kanser

tedavisi görmüş kadınlarda iyatrojenik prematüre ovaryan yetmezlik nedeniyle oluşan infertilite ve ovaryum hasarı kematerapötiklerin uzun vadeli yan etkileridir.

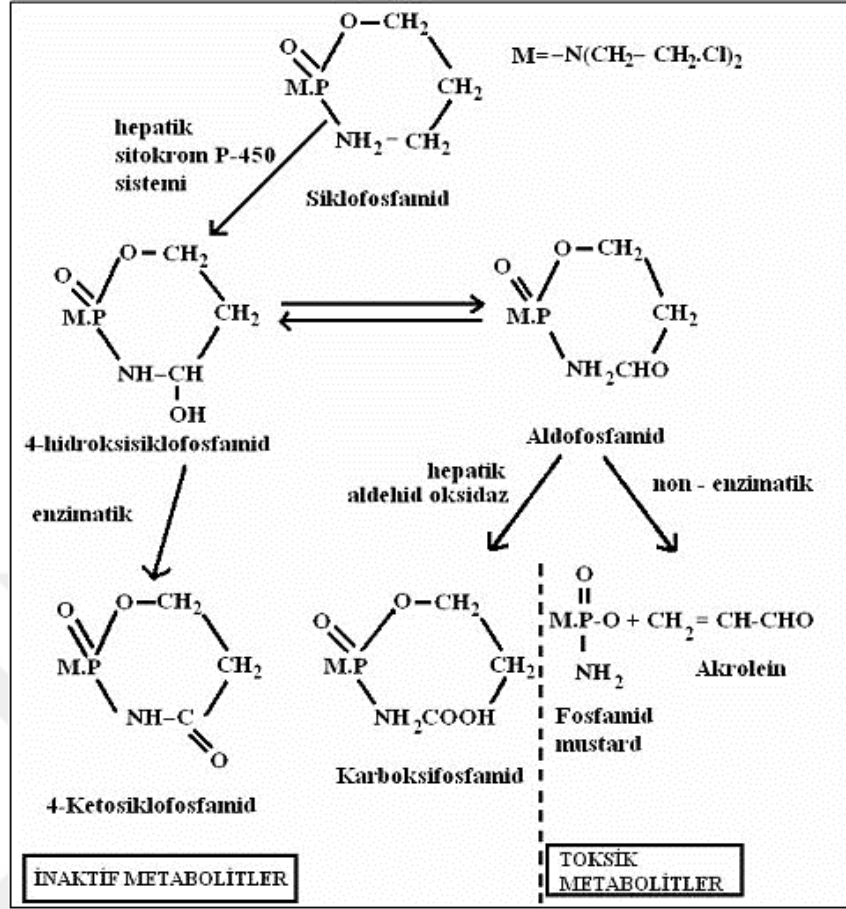
Gonadlar üzerine olan toksik etkilerine göre kematerapötikler düşük, orta, yüksek riskli ajanlar olarak 3 gruba ayrılırlar. Yüksek risk sınıfında yer alan ajanlar arasında siklofosfamid, bisülfan, kloambusil ve prokarbazinler vardır. Bunlar alkilleyicilerdir, alkilleyiciler maksimum hasara yol açarken, kematerapötikler ovaryumda folikül sayısını azaltır ve POY'a neden olurlar. Siklofosfamid primer olarak DNA sentezini inhibe eder, fonksiyonunu baskılar ve DNA' da çift zincir kopmaları ve çapraz bağlama yoluyla, DNA da hasar oluşmasına neden olur. Buna ek olarak, sitokrom c' nin sitozole geçmesini ve mitokondriyal yol üzerinden endoplazmik retikulum stresinin aktivasyonuna neden olan yol ile apoptozu da indükleyebilmektedir. Pro-oksidanlar, antioksidanlar ve serbest radikaller arasında dengesizliğe yol açar, oksidatif stresi indükler, hücre ve doku hasarına ve biyokimyasal ve histolojik değişikliklere yol açar. Siklofosfamidin ovaryum üzerine etkileri incelendiğinde, apoptozu başlatarak granüloza hücre sayısı, primordiyal folikülleri ve oositleri azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca, ovaryumda atrofinin indüklenmesi ile ovaryum kanının azalması ve damar oluşumunun baskılanması da siklofosfamidin etkileri arasındadır (9,10).

Antitümör ve bağışıklık baskılayıcı özellikleri olan siklofosfamid bir oksazofosforindir ve ancak metabolik olarak aktif olduğu zaman onkosidal etki göstermektedir. Siklofosfamidin 'hepataik mikrozomal karma fonksiyon oksidaz' sistemi FAM'ı verir ve kanserostatik etkisi bu metabolizması ile ilişkilidir. Siklofosfamidin kimyasal yapısı şekil 11'de gösterilmiştir (12).



Şekil 11: Siklofosfamid; 2-bis (kloroetil) amino tetrahidro-2H-1,2,3-oksazofosforin 2-oksit. (12)

Siklofosfamid etkilerini ilaç özelliklerinden ziyade metabolitleri ile göstermektedir. Başlangıçta, siklofosfamidin hepatik sitokrom P450 monooksijenaz sistemi ile tautomeri aldofosfamid ile birlikte bulunan 4-hidroksisiklofosfamide metabolizasyonu gerçekleşir. Daha sonra oluşan ürün yeniden düzenlenme ve enzimatik olmayan bir yol ile aldofosfamide dönüştürülür. Bu metabolitten ise akrolein ve FAM olarak 2 farklı ürün oluşur. Akrolein bazı güçlü moleküllere ait sülfidril gruplarıyla hızlı bir reaksiyon göstererek etki eder ve siklofosfamidin esas toksik etkilerinden biri olan hemorajik sistite neden olmaktadır. FAM ise hücre bölünmesini inhibe etmek için DNA'ya bağlanır, DNA çapraz bağlarını üretir ve antitümör olarak aracılık etmektedir. Reaksiyon sonucunda meydana gelen metabolitler veya ara ürünlerin; genotoksisite, gonadotoksisite, teratojenite, sistemik toksisite, kanserojenite veya mutajenite gibi etkileri olabilmektedir. Siklofosfamid mekanizması şekil 12'de gösterilmiştir (12,13).



Şekil 12: Siklofosfamid mekanizması (12).

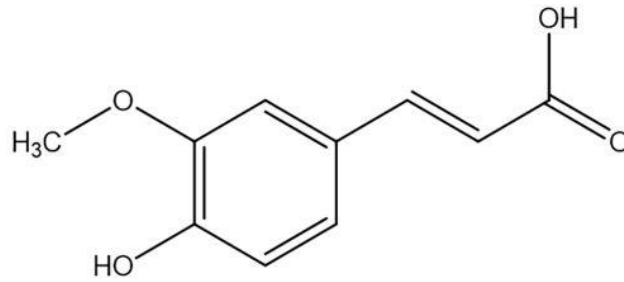
2.9. Ferulik Asit

2.9.1. Ferulik Asit özellikleri

Güçlü bir antioksidan olan Ferulik asit (FA) ([E]-3-[4-hidroksi-3-metoksi-fenil] prop-2-enoik asit), fenolik asit grubuna dahil bir antioksidan fitokimyasaldır. Bitki dokularında oldukça yaygın bir şekilde yer alan fenolik asitler, ikincil metabolit grubuna dahildirler ve biyolojik ve kimyasal yapıları değişkendir. Kimyasal yapılarına göre metoksi ve hidroksil gruplarının yerleşimi ve sayısı açısından benzoik ve sinamik asit türevleri ve fenolik asitlere ayrılabilirler. Ferulik asit; vanilin, sinapin, p-kumarik ve sirit asitleri gibi doğada en yaygın olarak bulunan ve bir çok fizyolojik fonksiyonda yer alan bir sinamik asit türevidir (26,27).

Ferulik asit en fazla tahıl tohumlarında (yulaf, arpa, buğday, pirinç ve çavdar), ıspanak, üzüm, kepekli tahıllar, maydanoz ve bitki hücrelerinin duvarında bulunur.

Antioksidan özellikleri fenolik asitlerin en önemli rollerinden birisidir ve bu aktiviteleri fenil halkasına bağlı olan metoksi ve hidroksil gruplarının sayısına bağlıdır. Diğer fenolik asitlere göre vücuda daha kolay emilen ve kanda daha uzun süre kalan ferulik asit; antikanser (örneğin cilt, meme, akciğer ve kolon), antitrombotik, anti-inflamatuar, antiaritmik ve antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Bunların yanında, hasar görmüş hücrelerin rejenerasyonuna ve nöronlarda hasarı azaltmaya yardımcı olduğu görülmüş ve ayrıca, immünostimülan ve antidiyabetik etkileri de çalışmalarla kanıtlanmıştır. Gıda ve eczacılıkta da oldukça yaygın bir kullanımı olan ferulik asit kas yorgunluğunu kas dokusundaki serbest radikalleri nötralize etme özelliği ile hafifletmektedir bu nedenle sporcular için ek takviye gıda olarak kullanılabilir. Kozmetikte de geniş bir kullanım alanı olan FA ciltte güneş koruyucu, parlatici ve yaşlanmayı geciktirici ajan olarak kullanılabilir. Ferulik asidin kimyasal yapısı şekil 13’de gösterilmiştir (27).



Şekil 13: Ferulik asidin kimyasal yapısı (28).

2.9.2. Ferulik Asidin Antioksidatif Aktivitesi

Vücut yaşam boyunca oksijenle temas halindedir, bu nedenle içeriğinde oksijen barındıran maddelerden biri olan ROS (Reactive oxygene species) vücutta sürekli olarak üretilir ancak vücudun sahip olduğu anti-oksidasyon mekanizması sayesinde vücut reaktif oksijene direnebilir ve birikimini önleyerek hasarı onarabilir (28). Vücutta var olan oksidatif ve antioksidatif dengenin bozulmasına oksidatif stres (OS) adı verilir, bu durumda oksidasyonda artma eğilimi olur ardından nötrofiller dokuya göç eder, proteaz sekresyonunda artışlar olur ve sonuç olarak oksidasyon ara ve son ürünlerin üretilmesine ve birikmesine yol açar. Bu artış sonucunda dokuda erken yaşlanma, dejenerasyon, kanser, apoptoz ve hücre transformasyonu görülür. Son

alışmalar ferulik asidin serbest radikalleri ve serbest radikaller üreten enzimleri süpürme (=ntralizasyon), nitrojen oluşunun ve ROS inhibasyonunu ve oksidatif hasara direnmeyi içeren karmaşık bir antioksidan etki mekanizması olduğunu göstermiştir (27,28). Ek olarak şelat ajanı görevi vardır, örneğin protonlanmış metal iyonlarının (rneğin Fe (II) ve Cu (II)) şelatlanmasını üstlenir.

Ferulik asidin antioksidan mekanizması, lipid peroksidasyonunun önlenmesi, demir gibi geçiş metalllerinin bağlanması, oksidatif serbest radikallerin süpürülmesi ile ilgilidir ve bu mekanizmasının yeteneği antioksidan molekülünün serbest radikal molekülü ile tepkimeye girmesi ve kararlı fenoksil radikalleri ürün olarak oluşturmasıdır. Bu da oksidatif serbest radikallerin oluşma kaskadının durmasına yol açar. Aynı zamanda bu asit serbest radikallere doğrudan atom verebilir ve bu yönüyle de hidrojen donörü olarak davranabilir. Bu da özellikle hücre zarındaki lipid asitlerinde meydana gelen otooksidasyon tepkimelerinden korunması açısından önemlidir. İkincil olarak ferulik asidin ve bu asidin ilgili bileşikleri geçiş metalllerini bağlama özelliği ile toksik hidroksil radikallerin ekspresyonunu inhibe eder ve bu yönüyle de radikallerin hücre zarında meydana getirdiği peroksidasyonun oluşumunu engellemiş olur (27). Farelerde yapılan bir çalışmada FA'nın (50 mg/kg), yüksek doz glikoz sonrası glomerüler podositlerde artan ROS üretimini ve hasarı azalttığı gözlenmiştir.

2.9.3. Ferulik asidin anti-inflamatuvar etkisi

Literatürde yer alan bir çok çalışmada FA'nın akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS), endometrit, böbrek ve karaciğer fonksiyon bozukluğu ve testis yaralanması gibi çok çeşitli hastalıklarda anti-inflamtuvar etkisinin oldukça güçlü olduğu gösterilmiştir. FA'nın inflamasyon üzerinde temel mekanizması; inflamasyona direnmek, iyileştirmek ve inflamasyon ile ilgili olan moleküler yolaklardaki faktörlerin ekspresyonunu ve salgılanmasını inhibe etmektir.

2.9.4. Ferulik asidin anti-fibroz etkisi

Fibrozis, yaralanma sonrası organ ve dokularda ekstrasellüler matrik (ESM) ekspresyonunun fazla olduğu ve organın bağ dokusunda biriktiği, kan damarları ve yaralı organlarda skar dokusu oluşturan bir anormal yara iyileşmesi durumudur. Ara

maddenin ve fibrillerin fazla biriktiği bu organlarda işlev ve organ yapısı bozulur. Rocky ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre fibrozis 4 aşamadan oluşur. Birinci aşamada büyük organın hasarı yer alır ve onu efektör hücrelerin aktive olması takip eder. Üçüncü olarak ekstrasellüler matriksin artışı ve son aşamada fibrozisin ilerlemesini teşvik etmek yer alır. Tüm bunların sonunda organ yetmezliği görülebileceğinden hastalıkların önlenmesi için fibrozis oluşumunun önüne geçilmesi ve tersine çevrilmesi oldukça kritik ve önemlidir. FA ile ilgili literatürde yer alan son çalışmalar, renal, karaciğer ve akciğer fibrozu üzerinde FA'nın oldukça güçlü bir anti-fibroz etkisi olduğunu ve bir çok hastalığın belirtici olan kolajen birikimini önlediği için FA'nın anti-fibrotik olarak kullanılabileceğini önermişlerdir.

2.9.5. Ferulik asidin anti-apoptotik etkisi

Apoptoz, vücutta yaşlanan veya artık görevini yerine getiremeyen hücreleri uzaklaştırmak veya öldürmek için gerekli doğal bir yöntemdir. Apoptoz mekanizması vücutta hücre sayısını dengede tutmaktadır ve homeostaza katkıda bulunmaktadır. Ancak, apoptozun az veya çok olması durumunda, otoimmün ve nörodejeneratif hastalıklar, iskemik yaralanma ve çeşitli kanser türleri dahil olmak üzere bir çok hastalığa yol açmaktadır. Ölüm reseptörlerinin aracı olduğu eksojen ve mitokondrinin aracı olduğu endojen yol olmak üzere apoptoza iki yol aracılık etmektedir. Literatürde bulunan çalışmalar FA'nın anti-apoptotik etkisini farklı hedefler üzerinden göstererek hastalıkların tedavisinde rol oynayabileceğini savunmuşlardır (28).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma deneysel ve in vivo niteliktedir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Proje içeriği ile ilgili ilk araştırmalara Ağustos 2021 tarihinde başlanmış olup detaylı literatür taraması Ekim 2021’de tamamlandı. Kasım 2021’de Etik Kurul onayı alındı. 4 Ocak 2022-4 Şubat 2022 tarihleri arasında projenin deneysel kısmı Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı Laboratuvarında yapıldı. Projenin laboratuvar kısmında histokimyasal ve immünohistokimyasal değerlendirmeleri Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında, biyokimyasal değerlendirmeleri ise Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Laboratuvarında (ARLAB) gerçekleştirildi. (Tablo 1)

Tablo 1: Araştırma planı

Ağustos-Ekim 2021	Proje içeriğinin belirlenmesi
	Literatür taraması
Kasım 2021	Etik kurul onayı
4 Ocak-4 Şubat 2022	Deneklerin temin edilmesi
	Enjeksiyon, besleme ve smear yapılması
	Sakrifikasyon ve dokuların toplanması
Mart-Mayıs 2022	Dokuların homojenizasyonu ve serumdaki değerlerin belirlenmesi
	Histokimyasal ve immünohistokimyasal boyamaların yapılması
Nisan-Mayıs 2022	Elde edilen değerlerin istatistiksel olarak analizi
	Tez yazımı

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Gruplar

Bu çalışmada denekler 4 gruba ayrılmıştır. Grupların düzenlenişi aşağıdaki gibidir.

1. **Kontrol grubu (K) (n=6):** Bazal değerlerin belirlenmesi için oluşturulmuş bir gruptur. Bu gruptaki sıçanlara 1., 7. ve 14. günlerde 1 mL/kg intraperitoneal %0.9 serum fizyolojik verildi. Sıçanlar 15. gün sakrifiye edildi.
2. **Ferulik asit grubu (n=6):** Bu gruptaki sıçanlara 2 hafta boyunca her gün 50 mg/kg ip FA oral gavaj yoluyla verildi. 14 gün boyunca FA alan sıçanlar 15. günde sakrifiye edildi. Yalnızca ferulik asit verilmesinin sebebi verilen ajanın sıçanlarda toksik bir etki yapıp yapmadığını gözlemleyebilmek ve diğer gruplar arasındaki histolojik ve biyokimyasal farklılığı değerlendirmektir.
3. **SF grubu (n=6):** Bu gruptaki deneklere deneyin 1.günü 75 mg/kg intraperitoneal siklofosfamid uygulandı. Ardından 7. Ve 14.günlerde 1 mL/kg intraperitoneal %0.9 serum fizyolojik verildi. Sıçanlara her gün vajinal smear uygulandı ve Hematoksilen ve Eozin boyama ile siklusun hangi evresinde (proöstrus, östrus, metöstrus, diöstrus) oldukları saptandı. 15. günde sıçanlar sakrifiye edildi.
4. **SF+FA grubu (n=6):** Tedavi grubu deneklerine SF grubu deneklerinde olduğu gibi deneyin 1. günü 75 mg/kg intraperitoneal siklofosfamid uygulandı ve 7. ve 14. günlerde 1 mL/kg intraperitoneal %0.9 serum fizyolojik verildi. Sıçanlara her gün vajinal smear uygulandı ve siklusun hangi evresinde oldukları saptandı. 15. günden başlayarak 30. güne kadar 2 hafta boyunca her gün 50 mg/kg ip FA verildi. 31. günde sıçanlar sakrifiye edildi.

3.4. Çalışma Materyali

Çalışmamızda, Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı'ndan temin edilen, 24 adet 200-250 gr ağırlığında Wistar albino türü dişi sıçanlar kullanıldı. Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, Wistar albino türü dişi sıçan bulunmasından dolayı ve literatürdeki kaynaklarla uyumlu olması sebebiyle bu tür seçildi. Tüm hayvanlar deney sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarlarında 12/12 saat aydınlık/karanlık periyodunda, 20–22°C oda ısısında standart hayvan oda ve kafeslerinde tutuldu. Hayvanlar bekletilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile beslendi (ad libitum). Deneyde kullanılan istatistiksel analizin anlamlı olması için, her alt grupta 6 sıçan olacak şekilde planlandı.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı değişken: Kaspaz-3, Bax, Bcl2, iNOS, eNOS ve PCNA, Serum TOS/TAS seviyeleri ölçümü.

Bağımsız değişken: Prematüre Ovaryan Yetmezlik (POY) modeli ve Ferulik asittir.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Kullanılan Cihazlar

Araştırmamızda kullanılan cihazlar Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2: Kullanılan cihazlar

Işık mikroskobu	Marka - Kod	Kullanım amacı
Hassas terazi	Sartorius – GC803S-0CE	Dokular ve çalışmalarda hazırlanan solüsyonlar için tartım işlemlerinde kullanıldı.
-80°C derin dondurucu	Sanyo, MDF-U5386S	Dokuların dondurulup saklanması amacıyla kullanıldı.
+4°C buzdolabı	Ariston – MTB511NFTK	Antikorların, Boya kitlerinin ve solüsyonların saklanması için kullanıldı.

-20°C derin dondurucu	Arçelik – 2031D	Antikorları ve solüsyonları belli bir soğuklukta muhafaza etmek için kullanıldı.
Distile su cihazı	Milipore – TANKMPK01	Distile su ihtiyacı için kullanıldı.
60°C inkübatör	Elektromag – M6040BP	Doku takip aşamalarında ve preparatların deparafinizasyon aşamasında kullanıldı.
Mikrotom	Leica-RM 2255	Deneklerin bloklanmış dokularından kesit almak amacıyla kullanıldı.
37°C inkübatör	Wisecube-Wig-105	Preparatları belli bir ısıda belli bir süre muhafaza etmek ve histolojik boyaların bazı adımlarını uygulamak için kullanıldı.
Vorteks cihazı	Velp scientifica - 220220176	Kullanılacak solüsyonları karıştırmak için kullanıldı.
Otomatik pipet seti	Eppendorf, ISOLAB, CAPP autoclavable, Thermo	Reaktifleri hazırlamak ve deney kitlerini uygulamak için kullanıldı.
Manyetik karıştırıcı	IKA–RCT classic	Hazırlanmış solüsyonların karıştırılması için kullanıldı.
Homojenizatör		Biyokimyasal olarak doku homojenizatlarının hazırlanması amacıyla kullanıldı.
Su banyosu (mikrotom için)	Termofin-3000459	Mikrotom ile kesit alırken parafinin belli bir ısıda erimesi ve dokunun lama buruşmadan alınmasını sağlamak için kullanıldı.
Santrifüj cihazı	Sigma,1-14	Dokulardaki süpernatantı ayırabilmek amacıyla kullanıldı.
Monokromatik sistemli mikropilaka okuyucu	BioTEK – PMT 49984	ELISA testleri ile protein tayini için kullanıldı.
Işık mikroskobu	OLYMPUS – PM-PB20	Histokimyasal analizler için kullanıldı.
Mikrodalga cihazı	Galanx – WP800J20-2	Sitrat tamponu içerisindeki dokuları belirli bir süre ve ısıda sitrata maruz bırakmak için kullanıldı.

3.6.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

Projede kullanılan sarf malzemeler şırınga, pastör pipeti, steril gaz kompres, lam, lamel, vajinal smear çubuğu, kağıt havlu, cryo tüp, entellan, çelik ve plastik doku takip/parafin kaseti, beher, erlen, mezür (dreceli silindir), deney tüpü, cam balon, balon joje, huni, parafilm, parafin, petri kutusu, eldiven, çalar saat, manyetik balık

kaplı, manyetik balık tutucu, bistüri ve ucu, plastik deney tüpü, cerrahi set, mikropipet ucu, plastik mikrosantrifüj tüpü, numune kabı, plastik piset, metal ve plastik spatül, tartım kabı, tüp standı, alüminyum folyo, asetat kalem, kurşun kalem, lam boyama kabı (şale), lam taşıma/saklama kutuları, etiket, dikdörtgen cam kaplar, ependorf tüpü (1,5 ve 2 ml), filtre kağıdı, çelik ve plastik lam sepeti, pipet ucu kutusu.

Kullanılan primer antikorlar ise Kaspaz-3 (AB3623, Milipore), Bax (sc-7480, Santa Cruz Biotechnology), Bcl2 (bs-4563R, Bioss), iNOS (bs-2072R, Bioss), eNOS (bs-0163R, Bioss) ve PCNA (sc-56, Santa Cruz Biotechnology)'dır. Sekonder antikor ise Novex (859043)'dir.

3.6.3. Araştırmada Kullanılan Yöntemler

Deney bitiminde deneklerden elde edilen dokulara rutin doku takibi prosedürü uygulandı, lamlara 5 mikronluk kesitler alındı. Histokimyasal ve immünohistokimyasal boyalar yapıldı. Deneyde yapılan histokimyasal boyamalar; Hematoksilen & Eozin, Periyodik Asit Schiff, Masson Trikrom, immünohistokimyasal değişiklikler için ve apoptozun moleküler düzeyde belirlenebilmesi Kaspaz-3, Bax, Bcl2, iNOS, eNOS ve PCNA primer antikorları ile immünohistokimya boyamaları yapıldı.

3.6.3.1. Deneklerin Menstrual Sikluslarının Belirlenmesi

Deney gruplarından SF ve SF+FA gruplarına deney başlangıcından sakrifiye edildikleri güne kadar vajinal smear uygulandı. Vajinal smear ile alınan smear çubuğu üzerindeki hücre örnekleri lam üzerine ince bir tabaka halinde yayılarak havada kuruması için beklendi. Preparat üzerindeki hücrelerde kayıp yaşanmaması için damlama yöntemi ile boyama yapıldı. Öncelikle hücrelerin fiksasyonu için preparatlara %96'lık alkol damlatıldı ve 10 dakika beklendi. Preparatlara üç kez art arda distile su damlatılıp akıtıldı. Daha sonra Hematoksilen damlatıldı, 4 dakika beklendi ve akarsu damlatılıp boyanın fazlası uzaklaştırıldı. Lamlara eozin damlatılıp 10 saniye beklendi ve son olarak %70'lik, %80'lik ve %96'lık artan alkol serilerinden damlatıldı, havada kurutuldu, entellan ile kapatıldı ve preparatlar incelendi.

3.6.3.2. Deneklerin Ağırlık Ölçümü

Deneklerin günlük fiziksel değişimleri gözlemlendi ve deney başlangıcından deney sonuna kadar her gün tartım yapıldı.

3.6.3.3. Histokimyasal Değerlendirmeler

Sakrifikasyondan sonra deneklerin sol ovaryumu histolojik incelemeler için %10'luk formolde 4-5 gün bekletilerek fikse edildi. Ardından bir gece akarsu altında bekletilerek fiksatifin fazlası uzaklaştırıldı. Bu aşamadan sonraki tüm işlemler 60°C'lik etüvde gerçekleştirildi. Dokular sırasıyla %70, %80 ve %96'luk etil alkol serilerinde 20'şer dakika dehidratasyon amacıyla bekletildi. Daha sonra 20'şer dakika 4 farklı aseton serilerinde tutuldu. İki farklı ksilende de 30'ar dakika şeffaflaştırma amacıyla tutuldu. Yumuşak parafin ile 1'er saat 2 kez olmak üzere immersiyonu sağlandı. Son olarak dokular parafin bloklar içerisine gömüldü. Rotary mikrotom aracılığı ile 5µ kalınlığında kesitler alındı (Tablo3).

Tablo 3: Doku takibi protokolü.

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Fiksasyon	%10'luk formol	24-48 saat
Fiksatiften Uzaklaştırma	Akarsu	1 gece
Dehidratasyon	%70-80-96'luk alkol serileri	20'şer dakika
Post Fiksasyon	Aseton 1-2-3-4	20'şer dakika
Şeffaflandırma	Xylol 1-2	30'ar dakika
Parafin emdirme	Yumuşak parafin 1-2	1'er saat
Bloklama	Sert parafin	

3.6.3.3.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

Parafin bloktan lamlara alınan doku kesitlerine boyama yapılmadan 1 gece önce deparafinizasyon işlemi için 60°C'lik etüvde bekletildi. Ardından ilk ksilol içinde etüvde 20 dakika diğer iki ksilolde ise oda sıcaklığında 20'şer dakika tutuldu. Daha sonra azalan alkol serilerinden (absolü - %70) geçirilip hidratasyon işlemi yapıldı. Kesitler distile su ile çalkalandı ve 10 dakika boyunca hematoksilen (05- 06002L, Bio-Optica, Milano, İtalya) ile nukleusların boyanması sağlandı. Hematoksilenin fazlasını dokudan uzaklaştırmak için 5 dakika akarsuda yıkama yapıldı ve hücre sitoplazmasının boyanması için 30 saniye eozin (05-10003L, Bio-Optica, Milano, İtalya) boyası ile boyandı. Boyamadan sonra dehidratasyon işlemi için artan alkol serisinden (%70, %80, %96 ve absolü) geçirilen kesitler 20'şer dakika 3 farklı ksilolde tutulup şeffaflaştırma yapıldı. Son olarak lam üzerindeki dokular entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 4).

Tablo 4: Hematoksilen & Eozin boya protokolü.

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilol 1 (Etüvde)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 2	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 3	20 Dakika
Hidratasyon	Absolu Alkol (2 değişim)	Çalkalama
Hidratasyon	%96'lık Alkol	Çalkalama
Hidratasyon	%80'lik Alkol	Çalkalama
Hidratasyon	%70'lik Alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Bioptica Hematoksilen	10 Dakika
Yıkama	Akarsu	5 Dakika

Boyama	Eozin	30 Saniye
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%80'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol (2 değişim)	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilol 1(x3 değişim)	20 Dakika
Kapama	Entellan	

3.6.3.3.2. *PAS (Periodic Acid Schiff) Boyama Protokolü*

Alınan parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bekletildi. Ardından ilki 1 saat (etüvde) diğer ikisi 30'ar dakikalık üç farklı ksilole tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için azalan alkol serilerinden geçirildi, distile su ile çalkalandıktan sonra PAS boyama (04-130802 Bio-Optica, Milano, İtalya) içerisinde periyodik asit solüsyonundan 10 damla damlatıp 10 dakika bekletilerek oksidasyon işlemi sonucunda aldehit gruplarının oluşması sağlandı. Ardından kesitler distile suda çalkalanarak üzerlerine 10 damla schiff reagent damlatılarak 20 dakika bekletildi. Böylece schiff reagentin içerdiği sülfür fuksin, bazik fuksine benzer çözünmeyen işaretli bileşiklerdeki 2 komşu aldehit gurubunun değişmesini sağladı. Daha sonra kesitler distile suda yıkanarak üzerlerine potasyum metabisülfid solüsyonundan 10 damla damlatılarak 2 dakika bekletildi. Kesitler yıkanmadan üzerlerine 10 damla fiksatif solüsyonundan damlatılarak 2 dakika bekletildi. Kesitler distile suda iyice çalkalandıktan sonra Mayer's hematoksilen solüsyonundan 10 damla damlatılarak 3 dakika bekletildi. Böylece nukleusların boyanması sağlandı. Sonrasında 5 dakika akar suda yıkandı. Daha sonra dehidratasyon işlemi için artan alkol serilerinden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilolde tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 5).

Tablo 5: PAS boyama protokolü.

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilol 1 (Etüvde)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 2	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 3	20 Dakika
Dehidratasyon	Absolu Alkol (2 değişim)	Çalkalama
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%80'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Solüsyon A	10 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Solüsyon B	20 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Solüsyon C	2 Dakika
Boyama	Solüsyon D	2 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Solüsyon E	3 Dakika
Yıkama	Akarsu	5 Dakika
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%80'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol (2 değişim)	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilol 1 (x3 değişim)	20 Dakika
Kapama	Entellan	

3.6.3.3.3. Masson Trikrom Boyama Protokolü

Deparafinizasyon için 1 gece 60°C'lik etüvde bekletilen kesitler biri etüvde olmak üzere üç farklı ksilolde tutuldu. Daha sonra azalan alkol serilerinden geçirildi. Distile suda çalkalandıktan sonra Masson Trikrom boyama seti (5022, GBL, İstanbul, Türkiye) içerisinde dokular üzerine 5 damla Weigert demirli hematoksilen A solüsyonu ile 5 damla Weigert demirli hematoksilen B solüsyonu damlatılarak nükleusların boyanabilmesi için 10 dakika bekletildi. Yıkama işlemi yapılmadan preparatlar 5 dakika kurutulduktan sonra Pikrik asit alkolik çözeltisi C solüsyondan 10 damla damlatılarak 4 dakika bekletildi ve eritrositlerin boyanması sağlandı. Distile su ile hemen (3-4 saniye) yıkandıktan sonra kesitlere uygulanan 10 damla Gelincik kıvılcı fuksin çözeltisi D solüsyonu 4 dakika bekletilerek hücre sitoplazmalarının boyanması sağlandı. Sonra preparatlar distile su ile yıkandıktan sonra Fosfomolibdik asit çözeltisi E solüsyonundan 10 damla damlatılarak 10 dakika bekletildi. Yıkama yapılmadan preparatlar 5 dakika kurutuldu. Masson anilin mavisi çözeltisi F solüsyonundan 10 damla Trisu ile yıkanan kesitler artan alkol serilerinden geçirildi. Ksilol ile şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 6).

Tablo 6: Masson Trikrom boyama protokolü.

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilol 1 (Etüvde)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 2	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 3	20 Dakika
Dehidratasyon	Absolu Alkol (2 değişim)	Çalkalama
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%80'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama

Boyama	Solüsyon A + Solüsyon B	10 Dakika
Boyama	Solüsyon C	4 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Solüsyon D	4 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Solüsyon E	10 Dakika
Boyama	Solüsyon F	5 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%80'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol (2 değişim)	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilol 1 (x3 değişim)	20 Dakika
Kapama	Entellan	

3.6.3.4. Foliküller ve Korpus Luteum Sayımı

Çalışmamızda tüm gruplara ait ovaryumlardan doku görünmeye başladığı andan itibaren ard arda 5 µm'lik 10 adet kesit alındı ve 40 kesit atlanarak tekrar 10 kesit alındı. Ovaryum boyunca bu şekilde kesit alınarak tüm ovaryum sistematik bir şekilde tarandı ve her 10'luk kesitin 1 numaralı preparatı Hematoksilen&Eozin ile boyanarak tüm ovaryumda bulunan folikül sayımı için önceden oluşturulmuş tabloya primordiyal, primer, sekonder, graaf, atretik folikül ve korpus luteum sayıları yazıldı. Daha sonra folikülleri içeren bu tablonun istatistiksel analizi yapıldı (Kruskal Wallis Varyans Analizi testi). Mann-Whitney-U testi grupların ikili karşılaştırılmasında kullanıldı. İstatistiksel olarak p<0.05 olan değerler anlamlı kabul edildi.

3.6.3.5. İmmünohistokimyasal İncelemeler

3.6.3.5.1. İmmünohistokimya Boyama Protokolü

İmmünohistokimyasal olarak Kaspaz-3, Bcl2, Bax, iNOS, eNOS ve PCNA primer antikörleri kullanılmıştır. Alınan kesitler öncelikle 60 °C’lik etüvde bir gece bekletildi sonrasında şeffaflaştırma amacıyla ilki etüvde diğer ikisi oda ısısında olmak üzere 30’ar dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Azalan alkol serilerinden geçirilip distile suda çalkalandı. Daha sonra dokular %10’luk Sitrat tamponunda beş dakika mikrodalgada kaynatıldıktan sonra soğumaya bırakıldı. Soğuyan dokuların etrafı Pappen (Z672548-1EA Sigma Tokyo, Japonya) ile çizildi ve üzerlerine dokuların kurumaması amacı ile PBS koyuldu. Ardından üç kez PBS ile yıkanan kesitler, 10 dakika oda ısısında H₂O₂ ile bekletilerek dokuda endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Tekrar PBS ile yıkama yapıldı ve 20 dakika bloklama (A) solüsyonu (İnvitrogen, LOT 1155338A) ile bekletildi. Yıkama yapılmadan primer antikör rat spesifik Kaspaz-3, Bax, Bcl2, iNOS, eNOS ve PCNA ile + 4 °C’ de bir gece bekletildi. Ertesi gün PBS ile yapılan yıkamadan sonra anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz sekonder antikör (B) solüsyonu ile 30 dakika bekletildi. Tekrar yıkama yapıldıktan sonra C solüsyonunda 20 dakika bekletildi. Yine PBS ile yıkanan kesitler oluşturulan immünohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB ile muamele edildi. Distile su ile yıkanan kesitlere Biooptica’nın hematoksileni ile ardaalan boyaması sağlandıktan sonra akarsu ile yıkandı. Artan alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra entellan ile kapatıldı (Tablo 7).

3.6.3.5.2. İmmünohistokimyasal Skorlama

İmmünohistokimyasal analizlerde, pozitif hücre boyanma yoğunluğu (i değeri), 0 (boyanma yok), 1 (zayıf, ancak saptanabilir boyanma), 2 (orta düzeydeki boyanma) ve 3 (yoğun boyanma) şeklinde kategorize edildi.

H-skor değerini saptayabilmek için her bir kesitte 40x büyütmede rastgele beş alan tarandı, mikroskopik olarak değerlendirildi ve yüzdelерinin toplamı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$H - score = \sum P_i(i + 1)$$

Boyama yoğunluğuna göre kategorize edilen pozitif hücre sayıları (P_i), i değerinin bir fazlası ($i+1$) ile çarpıldı ve H değeri elde edildi (183).

Tablo 7: İmmünohistokimyasal boyama protokolü.

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilol 1 (Etüvde)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 2	20 Dakia
Deparafinizasyon	Ksilol 3	20 Dakika
Dehidratasyon	Absolu Alkol (2 değişim)	Çalkalama
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%80'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Dokuların Etrafını Çizme	Pappen	
Yıkama	PBS	3 x 5 Dakika
Antijen teşhiri	Sitrat solüsyonu (mikrodalgada)	5 Dakika
Soğutma		20 Dakika
Yıkama	PBS	3 x 5 Dakika
Endojen peroksidaz aktivesinin bloklanması	H ₂ O ₂	20 Dakika
Primer Antikor	Kaspaz-3, Bcl2, Bax, iNOS, eNOS ve PCNA	1 Gece (4°C'de)
Yıkama	PBS	3 x 5 Dakika

Enzim Kompleksi	Streptavidin Biotin Kompleksi	15 Dakika
Yıkama	PBS	3 x 5 Dakika
Kromojen	DAB	
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Zemin Boyası	Mayer's Hematoksilen	
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%80'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol (2 değişim)	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilol 1 (x3 değişim)	20 Dakika
Kapama	Entellan	

3.6.3.6. Biyokimyasal İncelemeler

3.6.3.6.1. Doku Hazırlığı-Homojenizasyon

Bütün sıçanlardan eter anestezisi altında serumda biyokimyasal incelemeler yapılması için kalpten yaklaşık olarak iki mililitre kan alındı ve ovaryum dokuları disekte edildi. Her sıçana ait sağ ovaryum dokusu serum fizyolojik ile yıkandı ve biyokimyasal ölçümler için homojenize edildi. Doku örnekleri ultrasonik homojenizatörde (Bandelin Sonopuls, Germany) fosfatlı tampon içinde homojenize edildi. Homojenizasyon işlemleri soğuk fosfat tamponu (pH 7.4) içinde yapıldı. Doku örnekleri homojenizasyon işlemleri sırasında buz üstünde tutulacaktır. Homojenatlar +4°C'de 10.000 g'de 20 dk süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatant ölçümler için ayrılarak -80 °C'de saklandı. Doku hasarını göstermek için Total oksidan seviyesi (TOS) ve Total antioksidan seviyesi (TAS) ticari kitlerle kit prosedürlerine göre kolorimetrik yöntem ile ölçüldü. Sonuçlar mmol Trolox Equivalent/L ve $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equivalent/ L olarak ifade edildi.

3.6.3.7. İstatistiksel Analiz

Deneklerin deney başı ve deney sonu ağırlıkları Wilcoxon sıralı değerler testi ile, ikili gruplar arasındaki istatistikler Menn-Whitney U testi kullanılarak, gruplar arası ortalama farkları SPSS programında nonparametrik Kruskal Wallis Waryans testi kullanılarak değerlendirildi. $p < 0.05$ değerleri anlamı olarak kabul edildi.

3.7. Etik Kurul Onayı

Araştırmamız Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunca 62/2021 Protokol no ile etik açıdan uygun olduğu bulunmuştur. Etik kurul onayı Ek-1 olarak teze eklenmiştir.

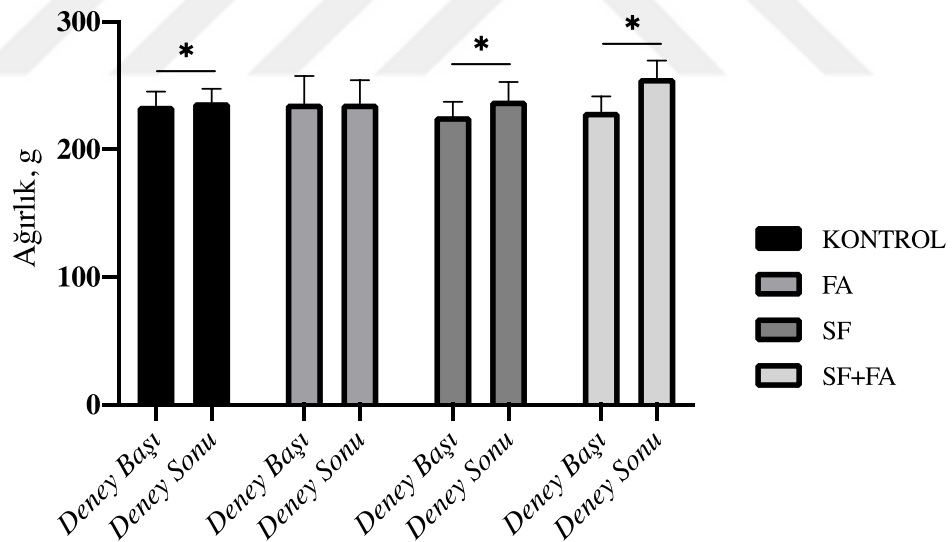
4. BULGULAR

4.1. Denek Ağırlıkları

Grupların deney başlangıç ağırlık ortalamaları; Kontrol grubunda 234,4 g, FA grubunda 236,8 g, SF grubunda 226,2 g, SF+FA grubunda 229,6 g olarak bulundu. Deney başında grupların birbiri ile ağırlık farkları incelendiğinde anlamlı fark gözlenmedi ($p=0,535$).

Deney sonunda ağırlık ortalamaları ise; Kontrol grubunda 237,1 g, FA grubunda 236,2 g, SF grubunda 238,4 g, VCD+ALA grubunda 256,0 g olarak saptandı.

Grupların kendi içinde deney başı ve deney sonu ağırlıkları değerlendirildiğinde Kontrol grubunda anlamlı artış gözlendi ($p=0,04$), FA grubunda anlamlı artış gözlenmedi ($p=0,34$), SF grubunda anlamlı artış gözlendi ($p=0,01$) ve SF+FA grubunda anlamlı artış gözlendi ($p=0,02$) (Grafik 1).



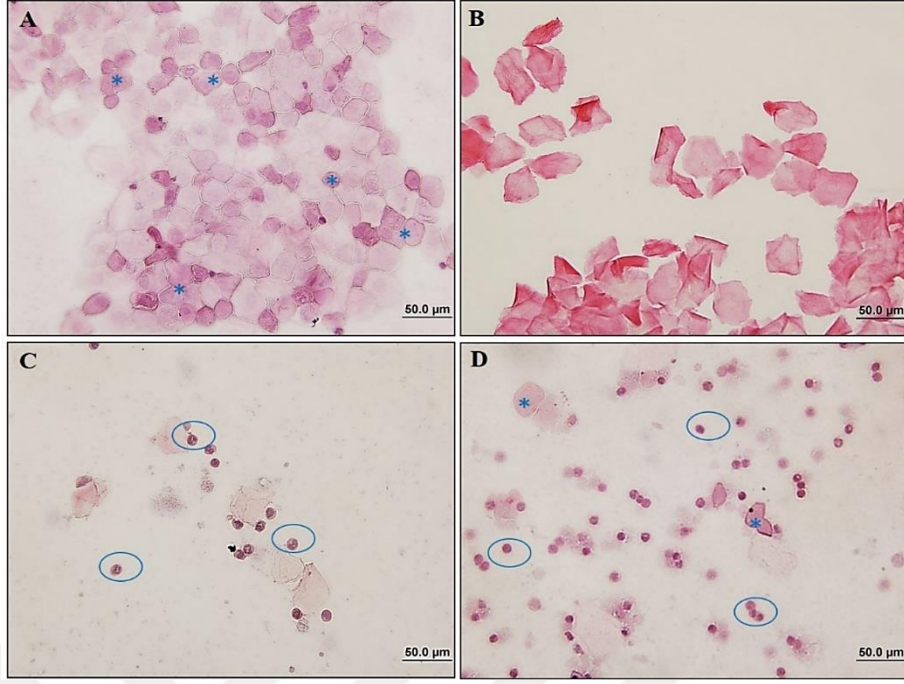
Grafik 1: Deney başında ve deney sonunda grupların kendi içindeki ağırlıklarının karşılaştırılması

4.2. Deney Süresince Vaginal Smear Değerlendirilmesi

4.2.1. Siklofosfamid ve Siklofosfamid+Ferulik Asit Gruplarında Östrus Döngüsü Değişiklikleri

Vaginal smear yaymaları değerlendirildiğinde kemirgenlerin siklus döngüsüne göre dört faz belirlendi. Bunlar; proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrusdur (Şekil 14). Siklofosfamid grubu sıçanların 2 hafta boyunca her gün, Siklofosfamid+Ferulik asit grubu sıçanların ise 1 ay boyunca her gün vajinal yayma yöntemi ile östrus döngü durumları belirlendi. Kontrol grubu sıçanlarda östrus döngüsünün süresi 4.5-5.5 gündü. Smear sonuçlarına göre intraperitoneal siklofosfamid enjeksiyonu sonrası yaklaşık 4 ve 5. günlerde her iki gruptaki sıçanlarda östrus döngüsünün bozulduğu gözlemlendi. Döngülerin bozulmasını takip eden günlerde döngüde düzensizlik ve zaman zaman tekrarlar görüldü. Siklofosfamid grubundan 2 ve 3 numaralı denekler 3 gün üst üste diöstrus, 4 numaralı denek 10 gün üst üste östrus gösterirken, SF+FA grubundan 5 numaralı denek proöstrus-diöstrus-proöstrus şeklinde düzensiz bir döngü gösterdi.

SF+FA grubunun smear sonuçlarına göre sıçanlar ferulik asit almaya başladıktan yaklaşık 1 hafta sonra östrus döngülerinde düzensizliğin ve tekrarların azaldığı gözlemlendi. Bunlara ek olarak 2. haftanın sonuna doğru 2 numaralı denek hariç diğer 5 denekte siklik döngünün düzeldiği gözlemlendi. 2 numaralı denek ise 2. haftanın sonunda 4 gün boyunca östrus fazında takılı kaldı.



Şekil 14: Siklus döngüsüne ait H&E boyama. **(A)** Proöstrus fazı (40x), **(B)** Östrus fazı ve bu fazda görülen keratinleşmiş süperfisyal hücreler (40x), **(C)** Metöstrus fazı (40x), **(D)** Diöstrus fazı (40x). Mavi yıldız: parabazal ve intermediyer hücreleri, Mavi çember: lökositleri göstermektedir.

4.3. Histokimyasal Bulgular

4.3.1. Ovaryum Dokusuna Ait Hematoksilen & Eozin Boyama Değerlendirilmesi

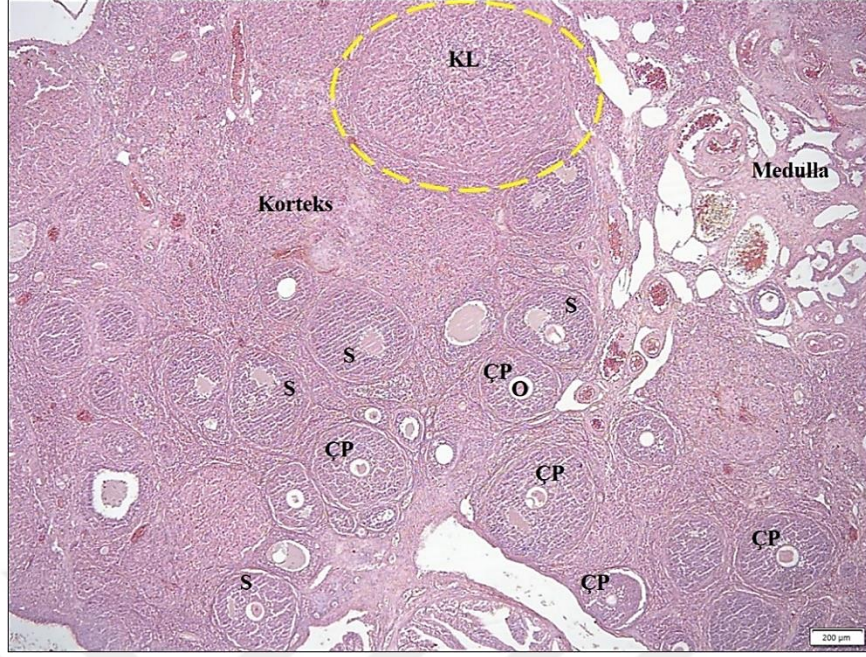
Kontrol grubuna ait ovaryum kesitlerinde, ovaryum yüzeyinde tek katlı kübik ve yer yer prizmatik epitel ile döşeli bir germinal epitel gözlemlendi. Sıkı bağ dokusu tabakası olan tunika albuginea fibröz bağ dokusu lifleri ve hücreleri ile birlikte epitelin hemen altında yer alıyordu. Ovaryan medulla; kan damarı, lenf damarı ve sinirleri içeren gevşek bağ dokusu yapısında ve bol stromal hücreli olarak gözlemlendi. Kortekste farklı boyut ve aşamalarda ve değişken sayıda foliküller (primordiyal, primer, sekonder ve graaf folikülleri) ve korpus luteum bulunmaktaydı. Graaf folikülleri; antrum, oosit, kumulus ooforus, granüloza hücreleri ve teka hücrelerinden oluşuyordu. Korpus luteum, asidofilik köpüklü sitoplazma ve soluk çekirdekler gösteren hücrelere sahipti. Oosit ve çevresinde bulunan zona pellusida normal görünümdeydi. Oositi çevreleyen

folikül hücreleri poligonal şekilli ve kromatinden zengin çekirdekleri olduğu görüldü. Korteks stromasında yer alan ve foliküllerin arasını dolduran bağ dokusu hücrelerinin asidofilik bir sitoplazması, büyük bir nukleusu ve oval bir şekillerinin olduğu görüldü, vasküler yapılar normal görünümdeydi (Şekil 15,16).

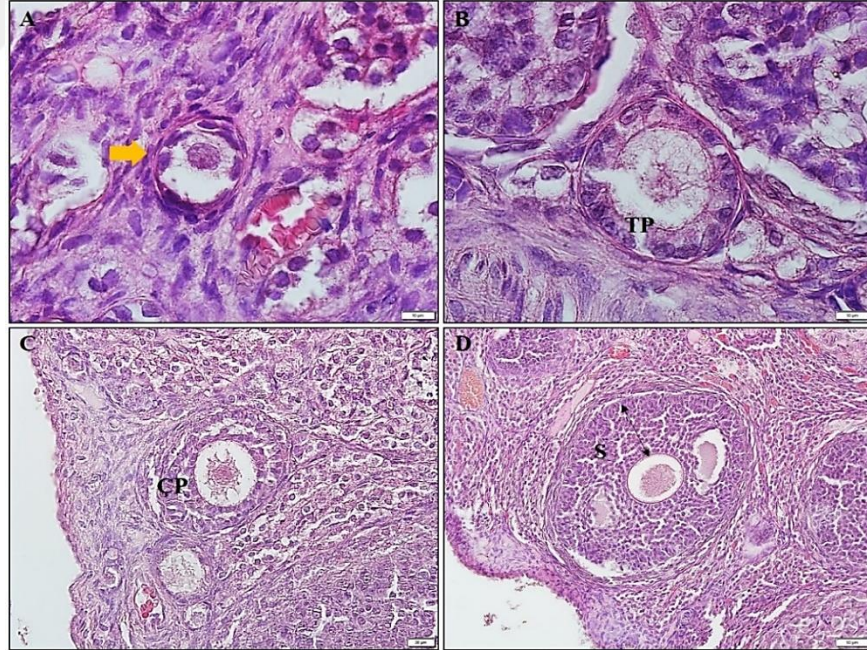
SF grubuna ait ovaryum kesitlerinde normal ovaryum görüntüsünün dramatik bir kaybı gözlemlendi. Öncelikle, kortekse dağılmış olan farklı aşamalardaki foliküller incelendiğinde primordiyal foliküllerde azalma ve korpus luteum sayısında artış olduğu gözlemlendi. Atretik yapıda primer oositler ve sayıca artmış olan kistik foliküller görüldü. Çoğu folikül granüler hücrelerinin azalmasıyla dejenere olmuştu. Ayrıca ovaryum stromasında vakuoller ve dilate kan damarları da görüldü (Şekil 17,18).

FA grubunun; Kontrol grubuna benzer morfolojik özellikler sergilediği gözlemlendi. Farklı sayı ve boyutta, sağlıklı yapıda foliküllerin bulunduğu bir korteks tabakası ve sağlıklı ve hücreden zengin medulla tabakasına sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 19,20,21).

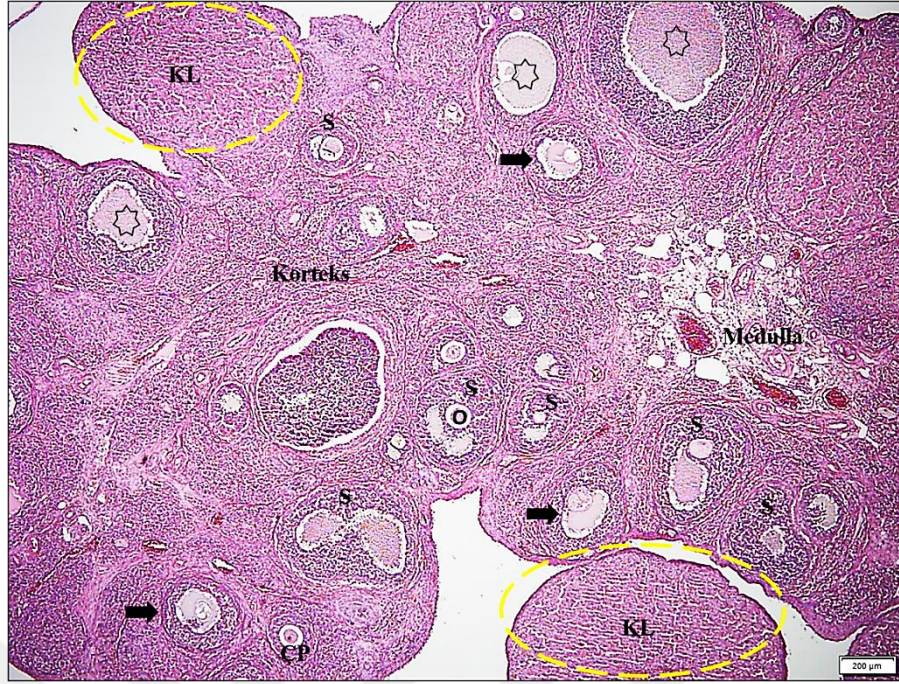
SF+FA grubunun ovaryum kesitlerinde, sağlıklı ve farklı aşamalardaki foliküller gözlemlendi. Atretik folikül sayısında ve vakuolasyon oranında SF grubuna oranla azalmalar olduğu belirlendi. Oositi saran teka interna, ekstrana ve stratum granulozum tabakaları düzenliydi (Şekil 22,23).



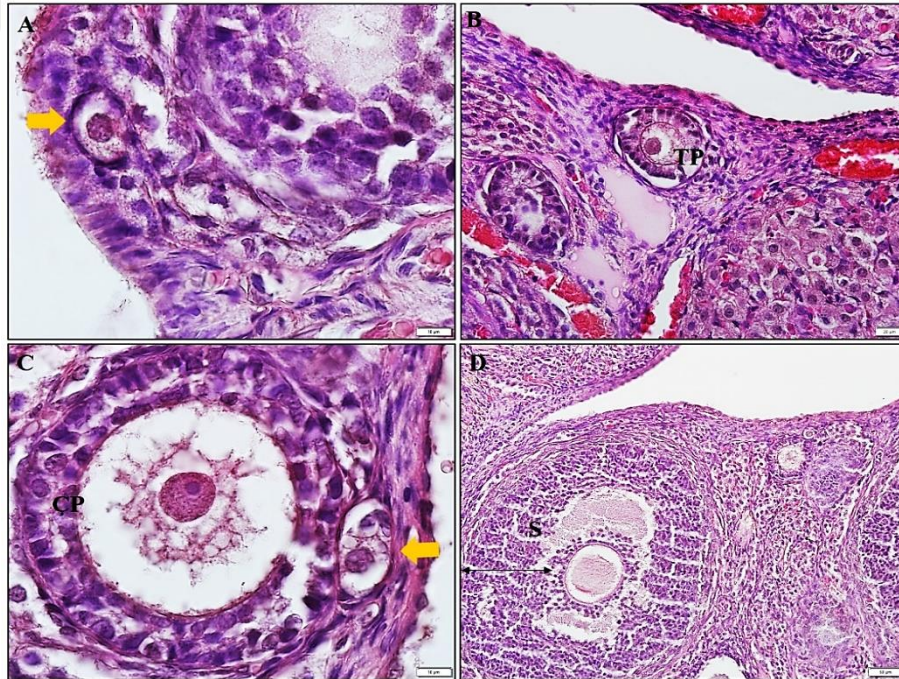
Şekil 15: Kontrol grubuna ait H&E boyama genel görünümü (10x). **ÇP:** Çok katlı primer folikül, **KL:** Korpus Luteum, **O:** oosit, **S:** sekonder folikül, **Kesikli turuncu çizgi:** korpus luteumun sınırlarını göstermektedir.



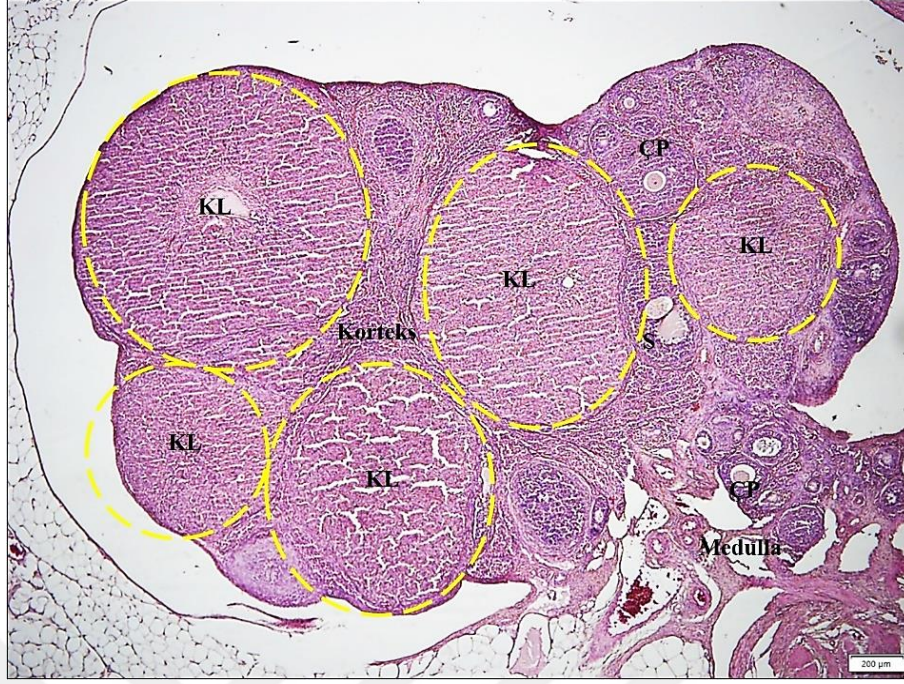
Şekil 16: Kontrol grubuna ait H&E boyama. **(A)** primordiyal folikül (100x), **(B)** tek katlı primer folikül (100x), **(C)** çok katlı primer folikül (40x), **(D)** sekonder folikül (20x). **Turuncu ok:** primordiyal folikülü, **iki başlı ok:** granüloza hücrelerini göstermektedir. **TP:** tek katlı primer folikül, **ÇP:** çok katlı primer folikül, **S:** sekonder folikül.



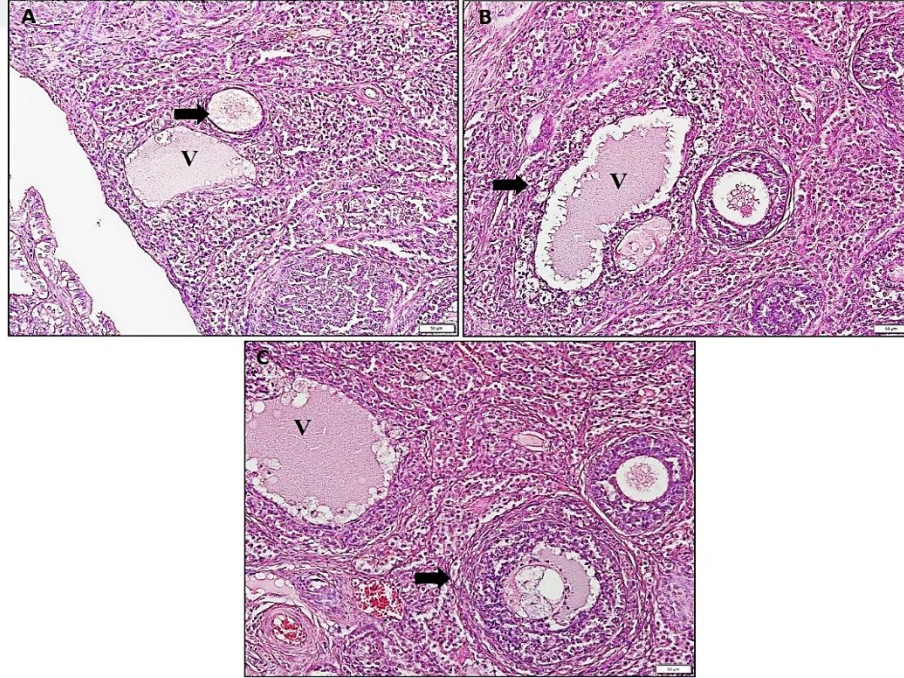
Şekil 17: Ferulik Asit grubuna ait H&E boyama genel görünümü (4x). **ÇP:** Çok katlı primer folikül, **KL:** Korpus Luteum, **S:** sekonder folikül, **kesikli turuncu çizgi:** korpus luteumun sınırlarını, **yıldız:** antrumu göstermektedir.



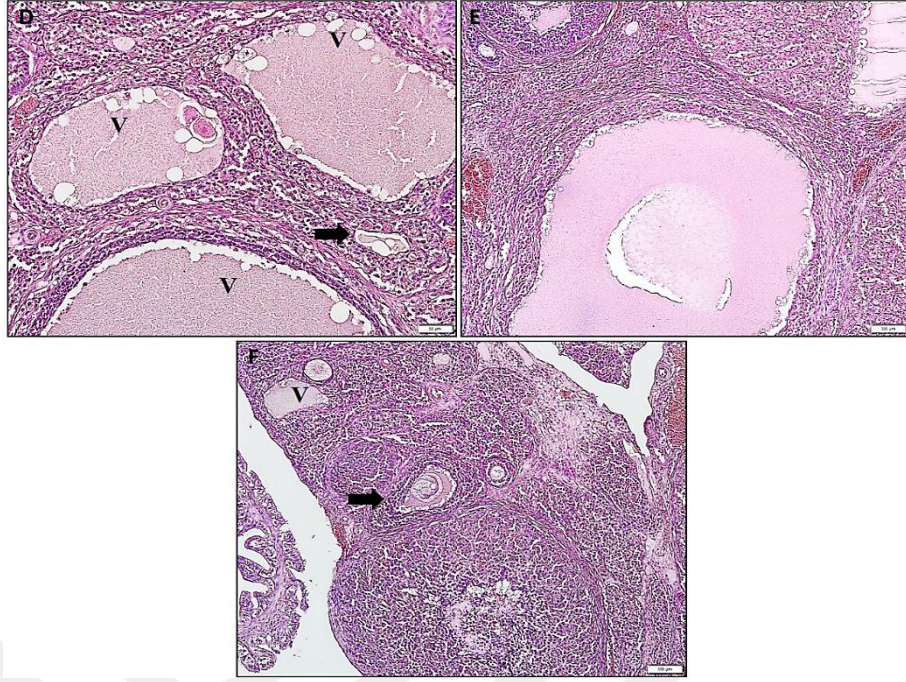
Şekil 18: Ferulik Asit grubuna ait H&E boyama. **(A)** primordiyal folikül (100x), **(B)** tek katlı primer folikül (40x), **(C)** çok katlı primer folikül (100x), **(D)** sekonder folikül (20x).



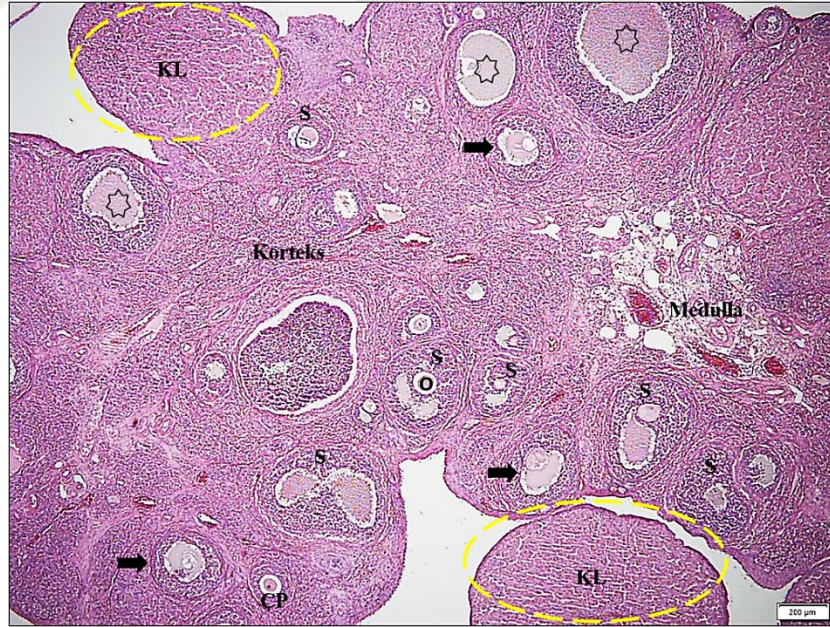
Şekil 19: Siklofosfamid grubuna ait H&E boyama genel görünümü (4x). **ÇP:** Çok katlı primer folikül, **KL:** Korpus Luteum, **S:** sekonder folikül, **kesikli turuncu çizgi:** korpus luteumun sınırlarını göstermektedir.



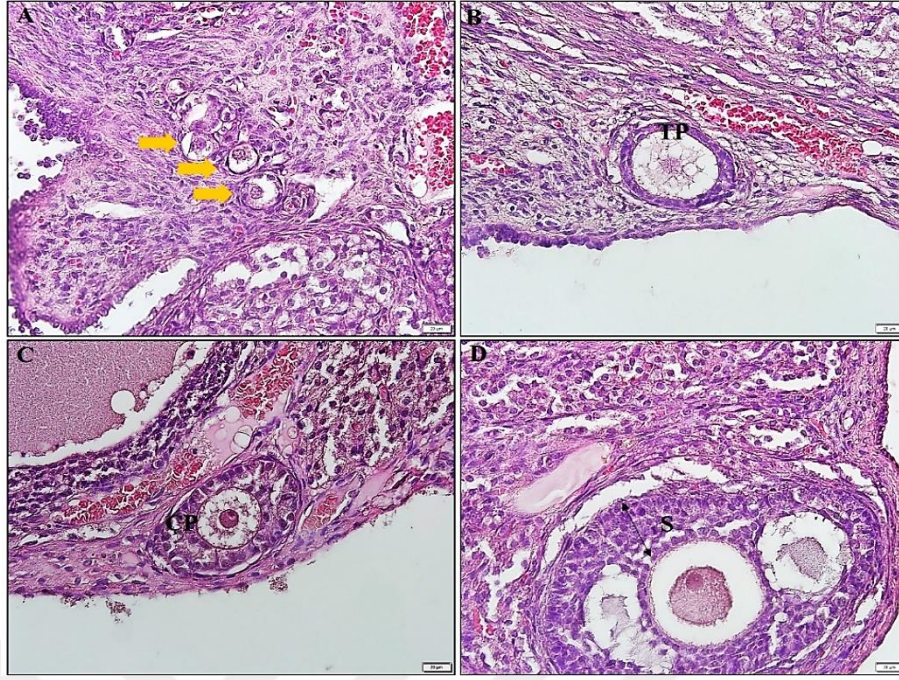
Şekil 20: Siklofosfamid grubuna ait H&E boyama. **(A), (B)** vakuolizasyonlu folikül ve atretik folikül (20x), **(C)** vakuolizasyonlu folikül ve oositi kollabe olmuş atretik sekonder folikül (20x). **V:** vakuolizasyon, **Siyah ok:** atretik folikülü göstermektedir.



Şekil 21: Siklofosfamid grubuna ait H&E boyama. **(D)** vakuolizasyonlu folikül ve atretik folikül (20x), **(E)** oositi atılmış bir folikül (10x), **(F)** vakuolizasyonlu folikül ve atretik folikül (10x). **V:** vakuolizasyon, **siyah ok:** atretik folikülü göstermektedir.



Şekil 22: Siklofosfamid + Ferulik asit grubuna ait H&E boyama genel görünümü (4x). **ÇP:** Çok katlı primer folikül, **KL:** Korpus Luteum, **O:** oosit, **S:** sekonder folikül, **kesikli turuncu çizgi:** korpus luteumun sınırlarını, **Siyah ok:** atretik folikülü göstermektedir.



Şekil 23: Siklofosfamid + Ferulik asit grubuna ait H&E boyama. **(A)** primordiyal foliküller (40x), **(B)** tek katlı primer folikül (40x), **(C)**, çok katlı primer folikül (40x), **(D)** sekonder folikül (40x). **TP:** tek katlı primer folikül, **ÇP:** çok katlı primer folikül, **S:** sekonder folikül. **İki başlı ok:** granüloza hücrelerini **Turuncu ok:** primordiyal folikülleri göstermektedir.

4.3.2. Folikül Sayılarının Değerlendirilmesi

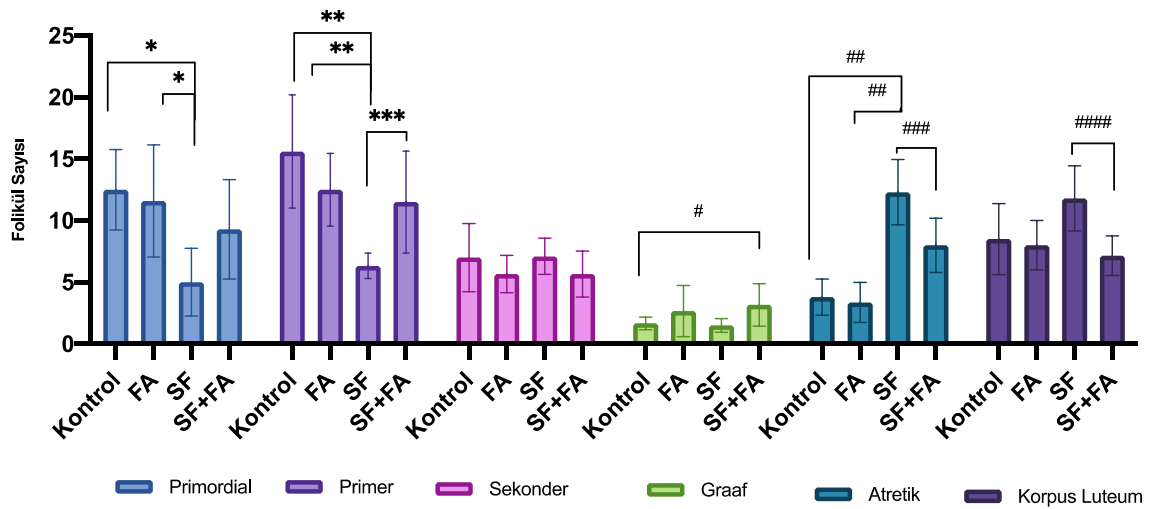
Tüm gruplara ait ovaryumlardan doku görünmeye başladığı andan itibaren ard arda 5 µm'lik 10 adet kesit alındı ve 40 kesit atlanarak tekrar 10 kesit alındı. Ovaryum boyunca bu şekilde kesit alınarak tüm ovaryum sistematik bir şekilde tarandı ve her 10'luk kesitin 1 numaralı preparatı Hematoksilen&Eozin ile boyanarak tüm ovaryumda bulunan folikül sayımı için önceden oluşturulmuş tabloya primordiyal, primer, sekonder, graaf, atretik folikül ve korpus luteum sayımları yazıldı. Daha sonra folikülleri içeren bu tablonun istatistiksel analizi yapıldı.

Primordiyal ve primer foliküllerin sayısı SF grubunda, Kontrol ve FA gruplarına göre anlamlı olarak azalmıştı. SF+FA grubunda primer folikül sayısında SF grubuna göre anlamlı artış gözlemlendi. Sekonder folikül sayısında gruplar arasında farklılık gözlemlenmedi. Graaf folikülü sayımlarında sadece Kontrol ve SF+FA grubu arasında

anlamli farklilik gözlemlendi. Atretik foliküller SF grubunda Kontrol ve FA grubuna göre anlamli artış gösterirken, SF+FA grubunda SF grubuna göre anlamli azalma gözlemlendi. Korpus luteum sayımlarında ise SF grubunda Kontrol ve FA grubuna göre anlamli olmayan bir artış gözlemlenirken SF+FA grubunda SF grubuna göre anlamli azalma gözlemlendi (Tablo 8, Grafik 2).

Tablo 8: Folikül sayımlarının gruplar arası ortalaması.

	Primordiyal Folikül	Primer Folikül	Sekonder Folikül	Graaf Folikülü	Atretik Folikül	Korpus luteum
K	12,5±3,27	15,6±4,67	7,00±2,75	1,66±0,51	3,83±1,47	8,50±2,88
FA	11,6±4,54	12,5±2,94	5,66±1,50	2,66±2,06	3,66±1,63	8,00±2,00
SF	5,00±2,75	6,33±1,03	7,16±1,47	1,50±0,54	12,3±2,65	11,8±4,07
SF+FA	9,33±4,03	11,5±4,13	5,66±1,86	3,16±1,72	8,00±2,19	7,16±1,60



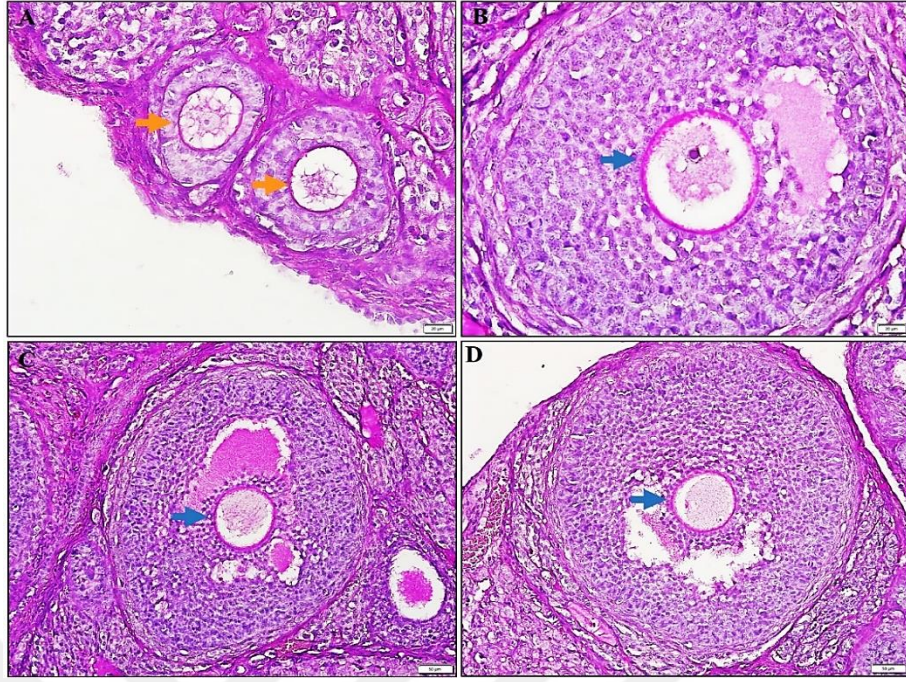
Grafik 2: Gruplara göre folikül sayıları dağılımı. *: SF grubunda Kontrol ve FA grubuna göre primordiyal foliküllerin sayısında anlamli bir azalma ($p=0,006$) ($p=0,024$). **: SF grubunda Kontrol ve FA grubuna göre primer foliküllerin

sayısında anlamlı bir azalma ($p=0,006$) ($p=0,004$, $p=0,004$). ***: SF+FA grubunda SF grubuna göre primer foliküllerin sayısında anlamlı bir artış ($p=0,010$). #: SF+FA grubunda Kontrol grubuna kıyasla graaf foliküllerinin sayısında anlamlı artış ($p=0,049$). ##: SF grubunda Kontrol ve FA grubuna göre atretik foliküllerin sayısında anlamlı bir artış ($p=0,004$, $p=0,004$) ####: SF+FA grubunda SF grubuna göre atretik folikül sayısında anlamlı azalma ($p=0,022$). #####: SF+FA grubunda SF grubuna göre korpus luteum sayısında anlamlı azalma ($p=0,043$).

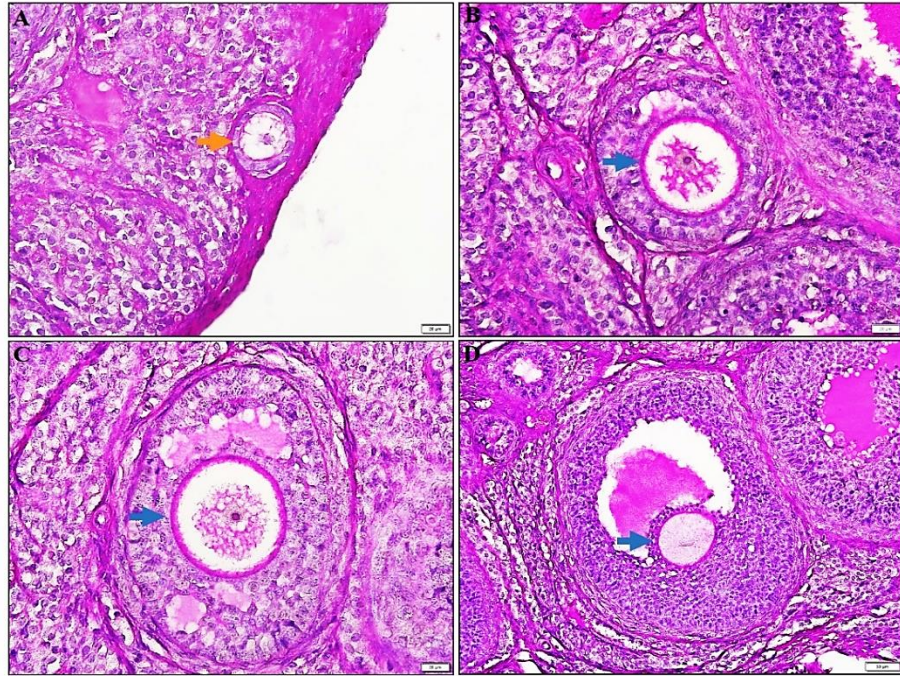
4.3.3. Ovaryum Dokusuna Ait PAS Boyama Değerlendirmesi

Ovaryum boyunca sistematik şekilde alınan her 10'luk kesitin 2 numaralı preparatı PAS boyası ile boyandı ve zona pellusida ve foliküler bazal membranlar morfolojik olarak değerlendirildi.

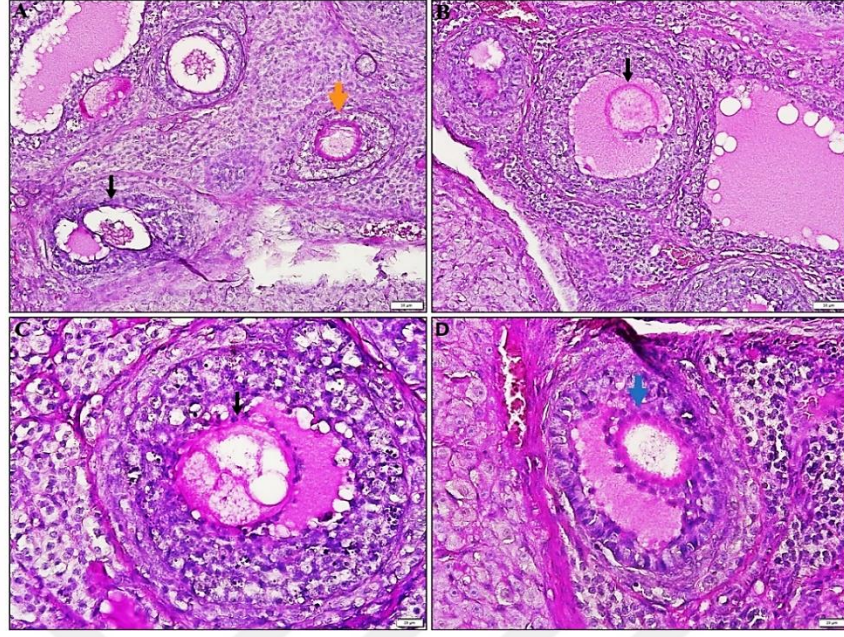
Kontrol grubu deneklerinin PAS boyamasında kortikal bölgede bulunan primer, sekonder ve graaf foliküllerinde pozitif reaksiyon gözlemlendi ve zona pellusida yapısının normal, sağlıklı ve intakt yapıda olduğu görüldü (Şekil 24). FA grubunda zona pellusida yapısı, kontrol grubuna benzer özellikteydi (Şekil 25). SF grubunda atreziye uğrayan foliküllerde zona pellusidanın intakt yapısının bozulduğu ve dejenere olduğu gözlemlendi (Şekil 26). SF+FA grubunda ise zona pellusidanın PAS+ reaksiyon gösterdiği ve çoğunlukla normal morfolojiye sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 27).



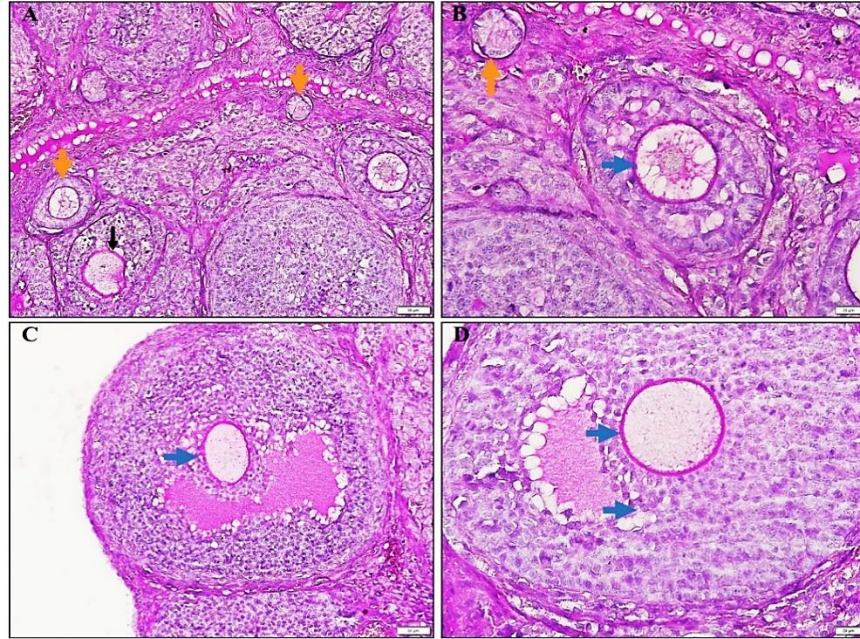
Şekil 24: Kontrol grubuna ait PAS boyama. **(A)** primer foliküller (40x), **(B)** sekonder folikül (40x), **(C), (D)** sekonder folikül (20x). **Turuncu ok:** primer foliküle ait zona pellusidayı, **Mavi ok:** sekonder foliküle ait zona pellusidayı göstermektedir.



Şekil 25: Ferulik Asit grubuna ait PAS boyama. **(A)** primer folikül (40x), **(B), (C)** sekonder folikül (40x), **(D)** sekonder folikül (20x). **Turuncu ok:** primer foliküle ait zona pellusidayı, **Mavi ok:** sekonder foliküle ait zona pellusidayı göstermektedir.



Şekil 26: Siklofosfamid grubuna ait PAS boyama. **(A)** primer folikül ve atretik folikül (20x), **(B)**, **(C)** atretik sekonder folikül (100x), **(D)** sekonder folikül (100x). **Turuncu ok:** primer foliküle ait zona pellusidayı, **Mavi ok:** sekonder foliküle ait zona pellusidayı, **Siyah ok:** atretik foliküle ait zona pellusidayı göstermektedir.



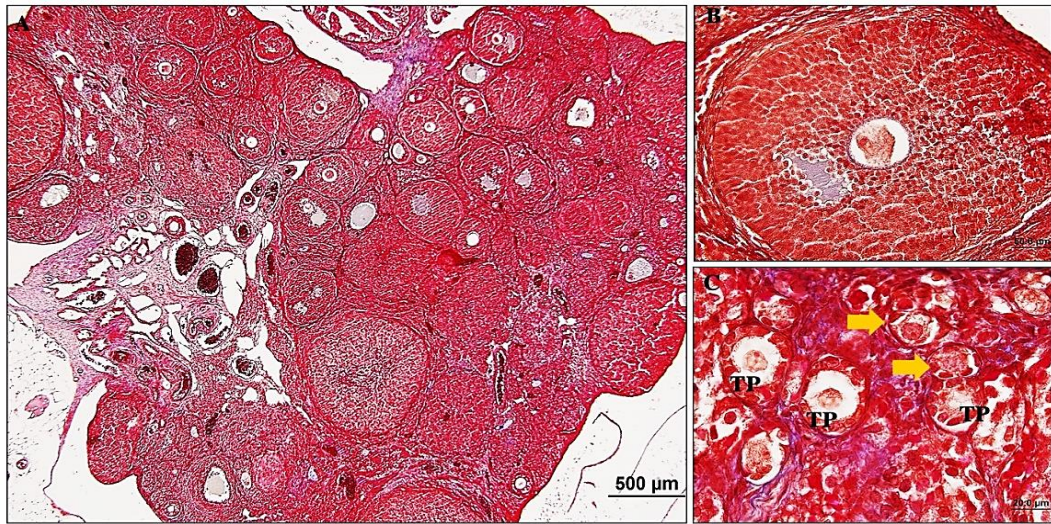
Şekil 27: Siklofosfamid+Ferulik asit grubuna ait PAS boyama. **(A)** primer ve atretik foliküller (20x), **(B)** primer ve sekonder foliküller (40x), **(C)** sekonder folikül (20x), **(D)** sekonder folikül (40x). **Turuncu ok:** primer foliküle ait zona pellusidayı, **Mavi**

ok: sekonder foliküle ait zona pellusidayı, **Siyah ok:** atretik foliküle ait zona pellusidayı göstermektedir.

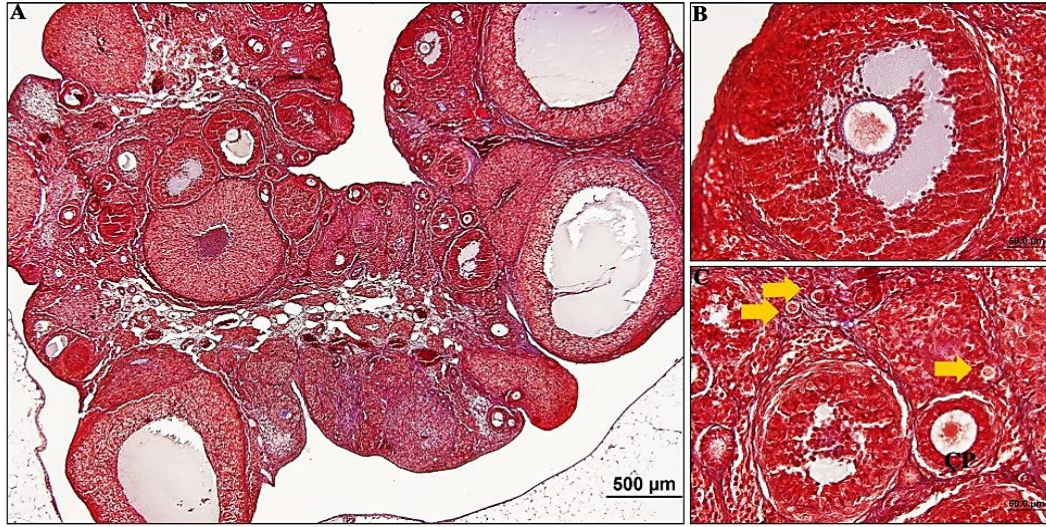
4.3.4. Ovaryum Dokusuna Ait Masson's Trikrom Boyası Değerlendirmesi

Ovaryum boyunca sistematik şekilde alınan her 10'luk kesitin 3 numaralı preparatı Masson Trikrom boyası ile boyandı. Bağ doku farklılıklarını belirlemek için yapılan bu boyamada kolajen ve mukus mavi, nukleuslar siyah, sitoplazma kırmızı renkte gözlendi.

Kontrol ve FA gruplarında Masson Trikrom boyanan kesitler normal görünümdeydi (sırasıyla Şekil 28,29). SF grubunda kortikal fibrosiz gözlendi. Özellikle atreziye uğrayan foliküllerin çevresinde stromada kolajen artışı gözlendi (Şekil 30). SF+FA grubunda ise fibrozisin azaldığı ve kontrol grubuna benzer sonuçların olduğu görüldü (Şekil 31).

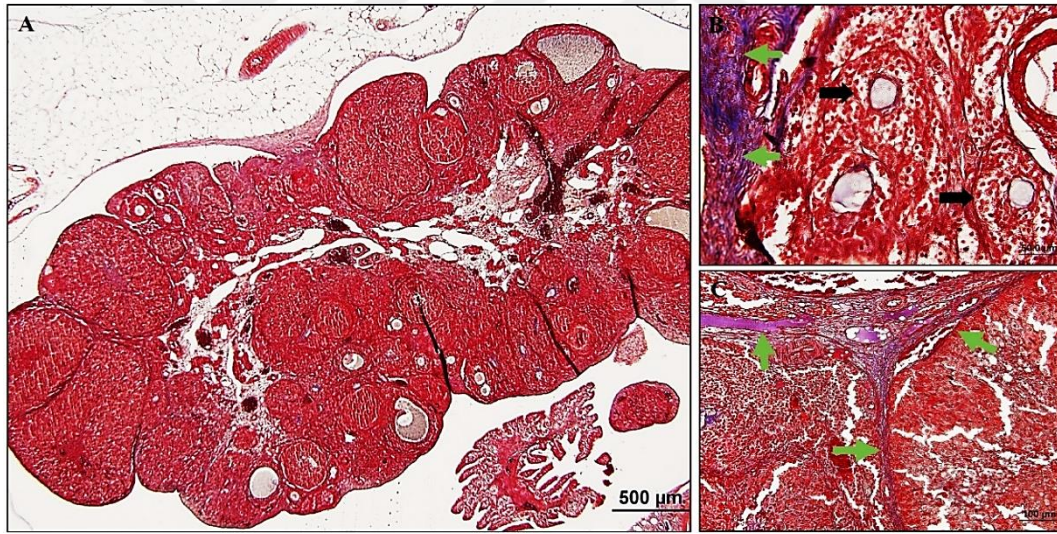


Şekil 28: Kontrol grubuna ait Masson Trikrom boyama. **(A)** Ovaryum genel görünümü (4x), **(B)** sekonder folikül (40x), **(C)** tek katlı primer ve sekonder foliküller (100x). **TP:** tek katlı primer folikül, **Turuncu ok:** primordiyal folikülü göstermektedir.

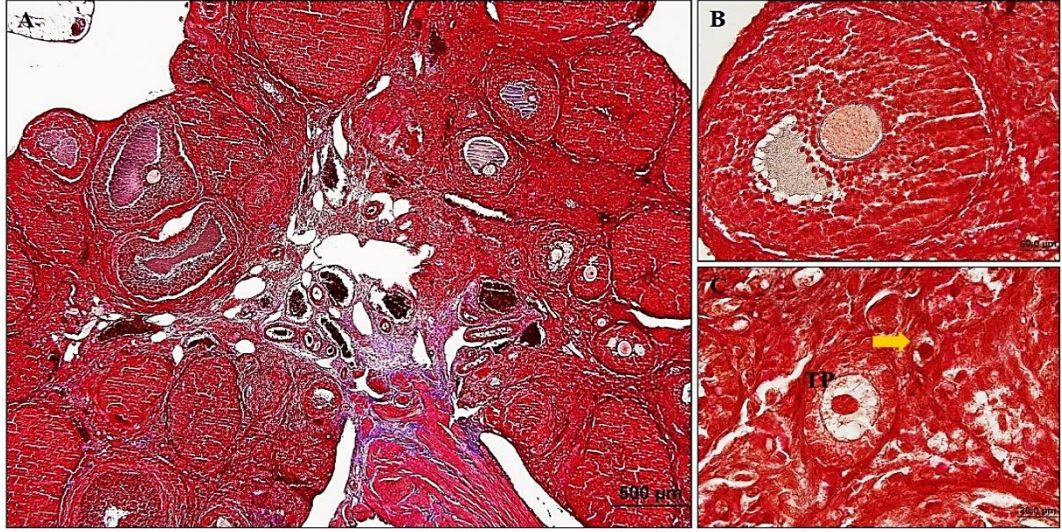


Şekil 29: Ferulik Asit grubuna ait Masson Trikrom boyama. **(A)** Ovaryum genel görünümü (4x), **(B)** Sekonder folikül (40x), **(C)** primer ve sekonder foliküller (40x).

Turuncu ok: primordiyal folikülü, **TP:** tek katlı primer folikülü göstermektedir



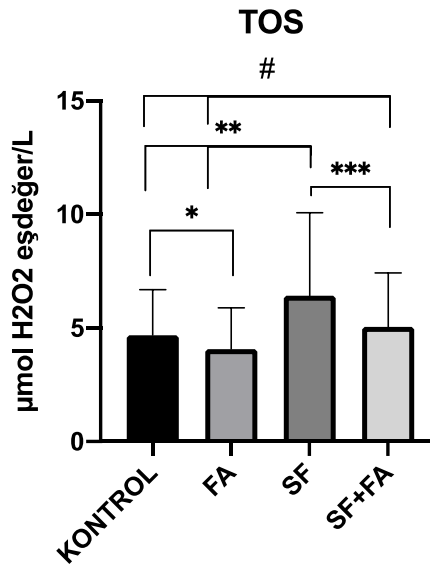
Şekil 30: Siklofosfamid grubuna ait Masson Trikrom boyama. **(A)** Ovaryum genel görünümü (4x), **(B)** kortekste bağ dokusu artışı ve atretik foliküller (40x), **(C)** kortekste bağ dokusu artışı (20X). **Yeşil ok:** bağ dokusu artışı, **Siyah ok:** atretik folikülü göstermektedir.



Şekil 31: Siklofosfamid+Ferulik asit grubuna ait Masson Trikrom boyama. **(A)** Ovaryum genel görünümü (4x), **(B)** sekonder folikül (40x), **(C)** primordiyal ve tek katlı primer folikül (100x). **Turuncu ok:** primordiyal folikülü, **TP:** tek katlı primer folikülü göstermektedir.

4.4. Biyokimyasal Bulgular

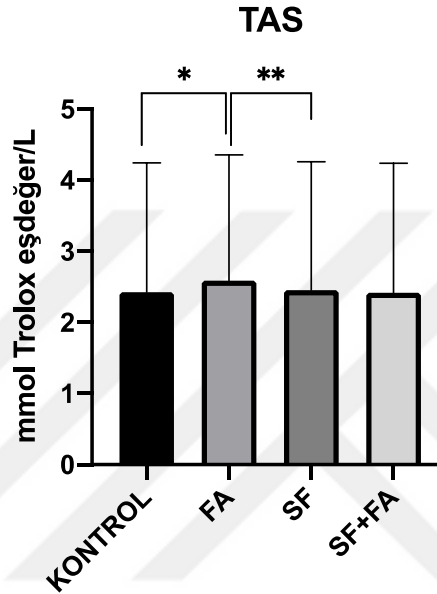
Biyokimyasal olarak serumda oksidatif stres belirteci olan TOS ve antioksidan belirteci olan TAS değerlendirildi. (Grafik 3).



Grafik 3: Biyokimyasal olarak serumda TOS değerlendirme sonucu; *: FA grubu deneklerde Kontrol grubuna göre TOS anlamlı olarak azalmıştır. (p=0,004). **: SF

grubu deneklerde Kontrol ve FA gruplarına göre TOS anlamlı olarak artmıştır. Sırasıyla ($p=0,006$), ($p=0,006$). ***: SF+FA grubu deneklerde SF grubuna göre TOS anlamlı olarak azalmıştır. ($p=0,006$). #: SF+FA grubu deneklerde Kontrol ve FA gruplarına göre TOS anlamlı olarak artmıştır. Sırasıyla ($p=0,010$), ($p=0,004$).

Biyokimyasal olarak serumda TAS değerlendirildi (Grafik 4).



Grafik 4: Biyokimyasal olarak serumda TAS değerlendirme sonucu; *: FA grubu deneklerde Kontrol grubuna göre TAS anlamlı olarak artmıştır. ($p=0,004$). **: SF grubu deneklerde FA grubuna göre TAS anlamlı olarak artmıştır ($p=0,006$).

4.5. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.5.1. Aktive Kaspaz-3 İmmünohistokimya Boyaması Bulguları

Apoptotik hücreleri tüm gruplarda gösterebilmek için alınan ovaryum kesitleri immünohistokimyasal olarak Aktive Kaspaz-3 ile boyandı. Apoptotik hücreler gelişimin farklı aşamalarında olan foliküllerin teka interna, granüloza, korpus luteum yapısında ve primer oositte yer aldığı görüldü.

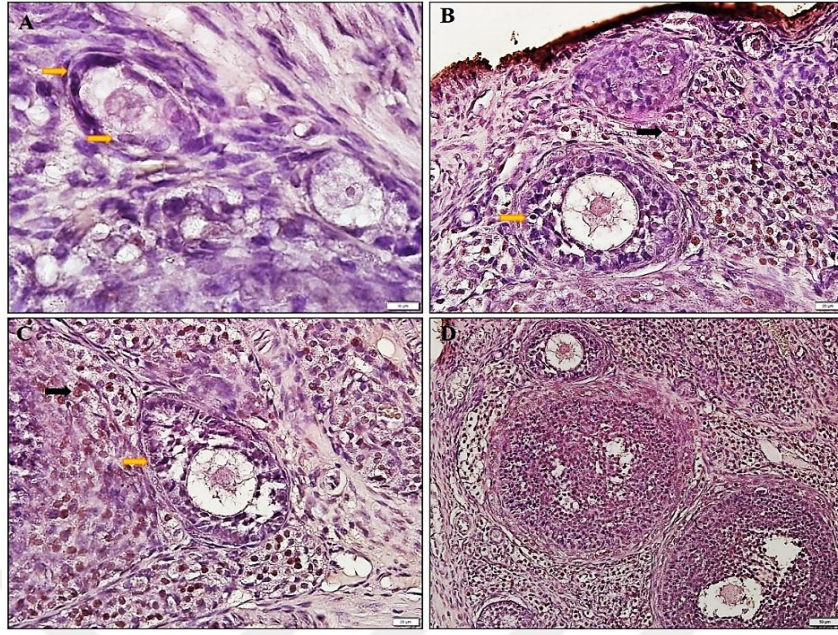
Kontrol grubunda Aktive Kaspaz-3 boyanması incelendiğinde teka interna ve granüloza hücrelerinin sitoplazmalarında boyanma bazal düzeyde gözlemlendi. Gelişimin farklı aşamalarında olan foliküllerde yer alan primer ve sekonder oositlerde kaspaz-3

için zayıf bir immün boyanma gözlendi. Korpus luteum hücrelerinde ise granüloza hücrelerine göre daha kuvvetli bir boyanma görüldü (ekil 32, Grafik 5).

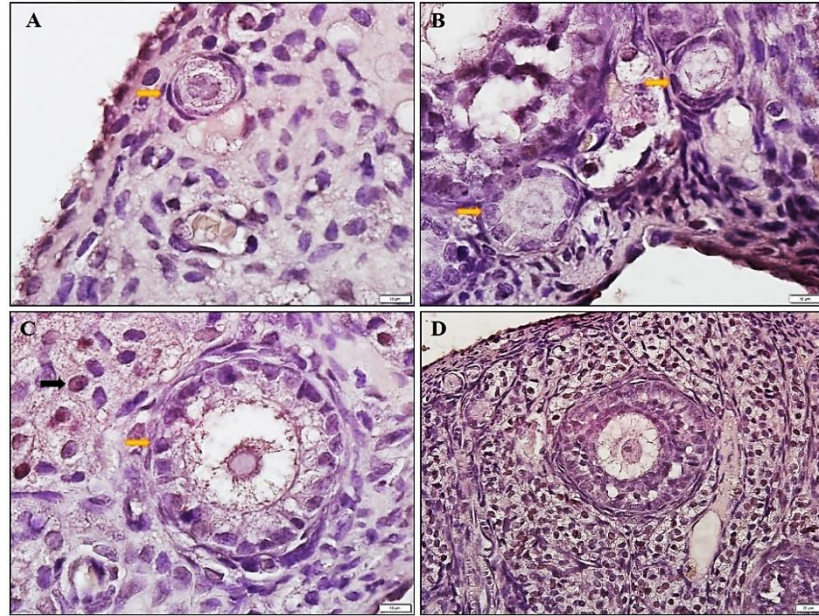
FA grubu deneklerin ovaryum seri kesitleri Kaspaz-3 immün boyanması için incelendiğinde, farklı gelişim aşamalarındaki foliküllerin teka interna ve granüloza hücrelerinin zayıf ve bazal düzeyde boyanma gösterdiği görüldü. Boyanma derecesi Kontrol grubu deneklerin ovaryumları ile benzer olarak gözlendi (ekil 33, Grafik 5).

SF grubu deneklerin ovaryum seri kesitlerinde Kaspaz-3 immün reaktivitesi incelendiğinde güçlü bir boyanma ve pozitif hücre sayısında Kontrol ve FA grubuna göre artmış olduğu görüldü. Farklı aşamalardaki foliküllerin granüloza hücrelerinde ve teka internada, tek katlı primer folikülün kübik hücrelerinde ve korpus luteumda immünpozitivite görüldü (eki34, Grafik 5).

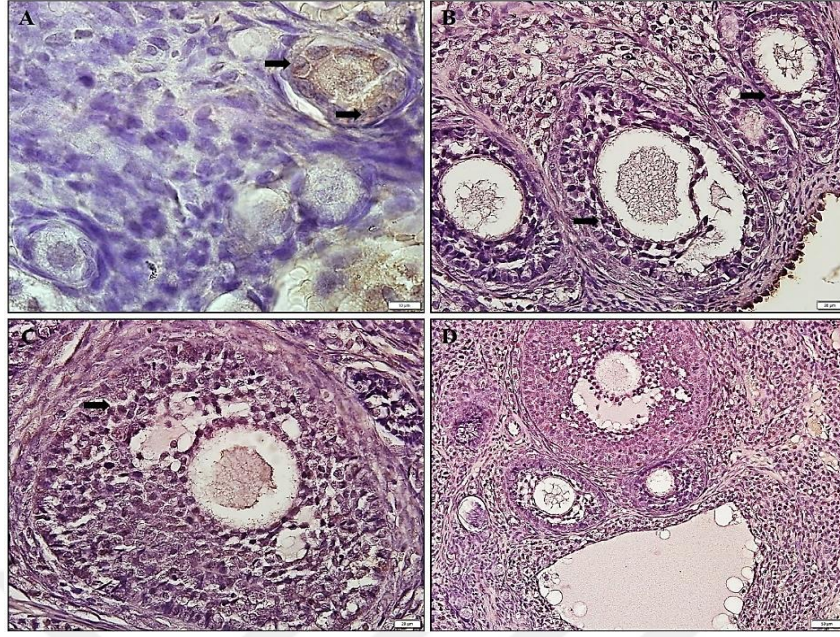
SF+FA grubuna ait ovaryum seri kesitlerinde Kaspaz-3 immünreaktivitesi incelendiğinde, granüloza ve korpus luteum hücrelerinde ve oositte SF grubuna göre daha zayıf bir boyanma gözlendi. Foliküllerde immünreaktivite Kontrol ve FA grubuna benzer olarak gözlendi (ekil 35, Grafik 5).



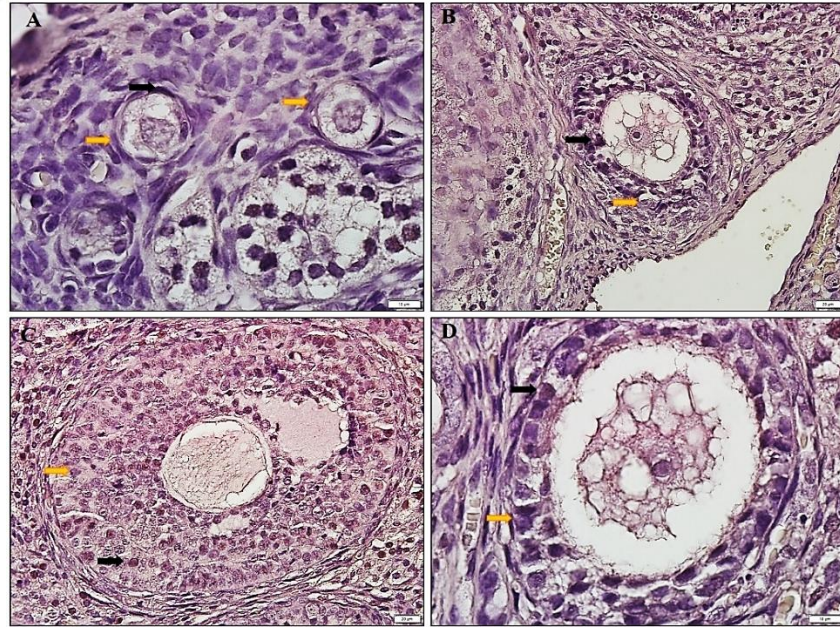
Şekil 32: Kontrol grubuna ait Kaspaz-3 immünohistokimya boyaması. **(A)** Primordiyal folikül (100x), **(B)** Çok katlı primer folikül (40x), **(C)** Sekonder folikül (40x), **(D)** Gelişimin farklı aşamalarında olan foliküller (20x). **Turuncu ok:** immün negatif hücreleri, **Siyah ok:** immün pozitif hücreleri göstermektedir.



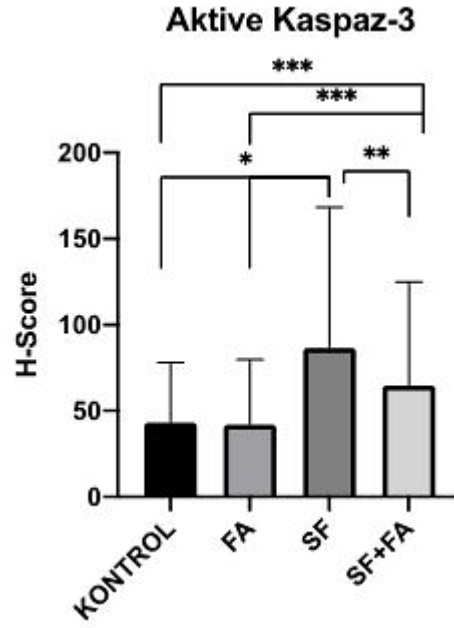
Şekil 33: FA grubuna ait Kaspaz-3 immünohistokimya boyaması. **(A)** Primordiyal folikül (100x), **(B)** Primordiyal ve tek katlı primer folikül (100x), **(C)** Tek katlı primer folikül (100x), **(D)** Çok katlı primer folikül (40x).



Şekil 34: SF grubuna ait Kaspaz-3 immünohistokimya boyaması. **(A)** Tek katlı primer folikül (100x), **(B)** Gelişimin farklı aşamalarında olan foliküller (40x), **(C)** Sekonder folikül (40x), **(D)** Gelişimin farklı aşamalarında olan foliküller ve oositi atılmış antrum (20x).



Şekil 35: SF+FA grubuna ait Kaspaz-3 immünohistokimya boyaması. **(A)** Primordiyal foliküller (100x), **(B)** Çok katlı primer folikül (40x), **(C)** Sekonder folikül (40x), **(D)** Çok katlı primer folikül (40x).



Grafik 5: Gruplara göre Aktive Kaspaz-3 immünohistokimya boyanması H-score dağılımı. *: Kaspaz-3 immün boyanması SF grubunda Kontrol ve FA gruplarıyla karşılaştırıldığında her iki gruba göre anlamlı olarak arttı. Sırasıyla ($p=0,004$) ve ($p=0,004$). **: Kaspaz-3 immün boyanması SF+FA grubunda SF grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldı. ($p=0,004$). ***: Kaspaz-3 immün boyanması SF+FA grubunda Kontrol ve FA gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak arttı. Sırasıyla ($p=0,004$) ve ($p=0,004$).

4.5.2. Bcl-2 İmmünohistokimya Boyaması Bulguları

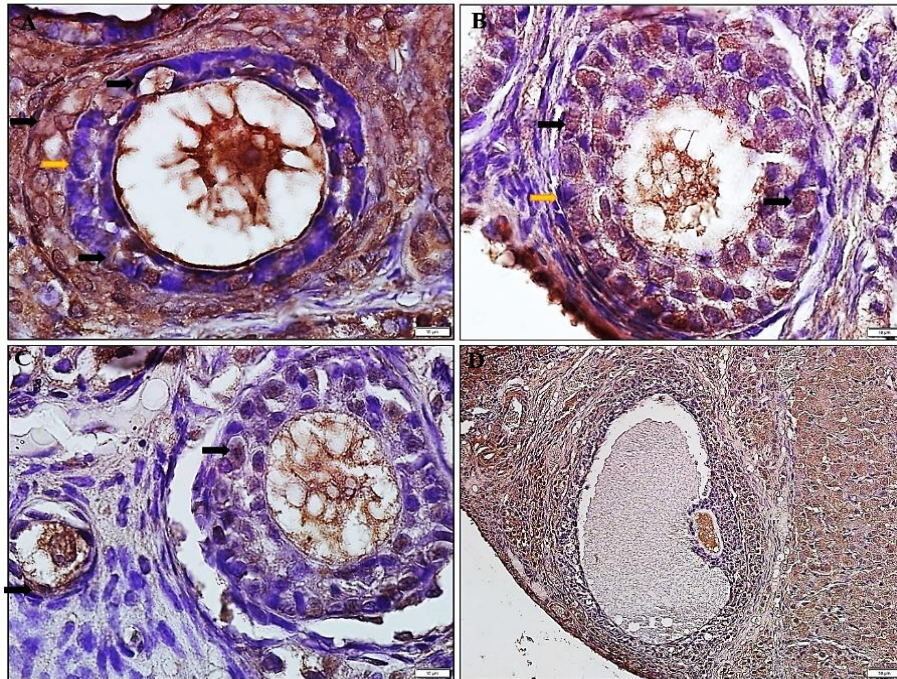
Bcl-2 ekspresyonunu tüm gruplarda gösterebilmek için alınan ovaryum seri kesitlerine immünohistokimyasal boyama yapıldı. Bcl-2'nin teka interna ve eksternada, granüloza hücrelerinde, oositte ve korpus luteum hücrelerinde eksprese olduğu görüldü.

Kontrol grubu deneklerin ovaryum doku kesitlerinde gelişimin bütün aşamalarındaki foliküllerde, granüloza hücrelerinde, teka eksterna ve internada ve primer ve sekonder oositte Bcl-2 immünpozitivite gözlemlendi. Tek katlı primer foliküllerin kübik hücrelerinde ve primer oositinde de güçlü bir immünreaktivite görüldü (Şekil 36, Grafik 6).

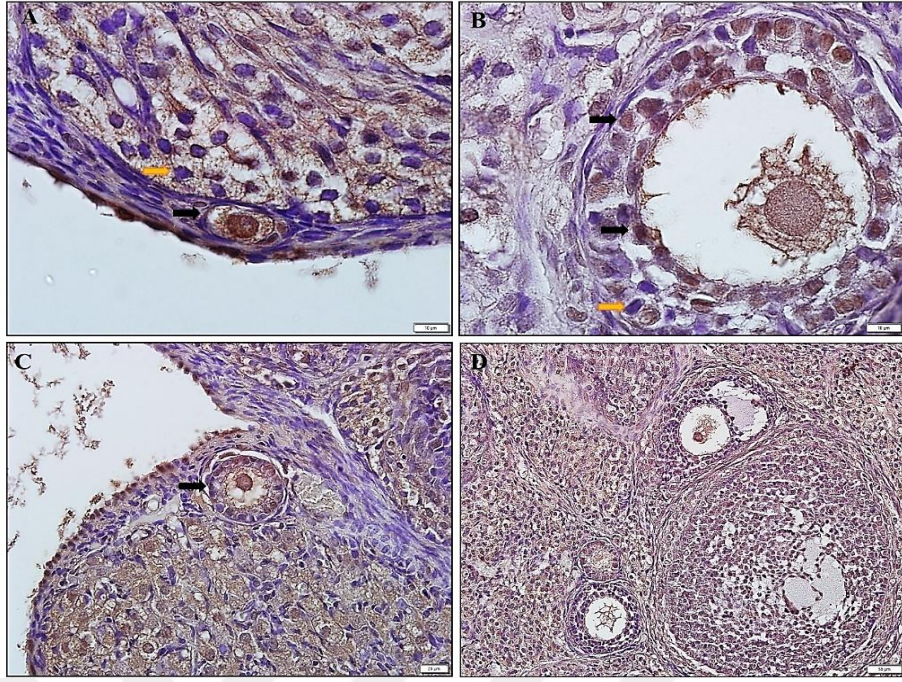
FA grubu deneklerin ovaryum seri kesitlerinde Bcl-2 immünreaktivitesi kontrol grubuna benzer ve yer yer bazı foliküllerde daha güçlü tutulumların olduğu görüldü (Şekil 37, Grafik 6).

SF grubu deneklerin ovaryum dokularında Kontrol ve FA grubuna göre, Bcl-2 için oldukça zayıf bir immünreaktivite olması dikkat çekiciydi. Primordiyal ve primer foliküllerde oositlerin ve teka tabakalarının immün negatif olduğu görüldü. Ayrıca primer oositlerin granüloza hücrelerinde oldukça zayıf bir boyanma gözlemlendi (Şekil 38, Grafik 6).

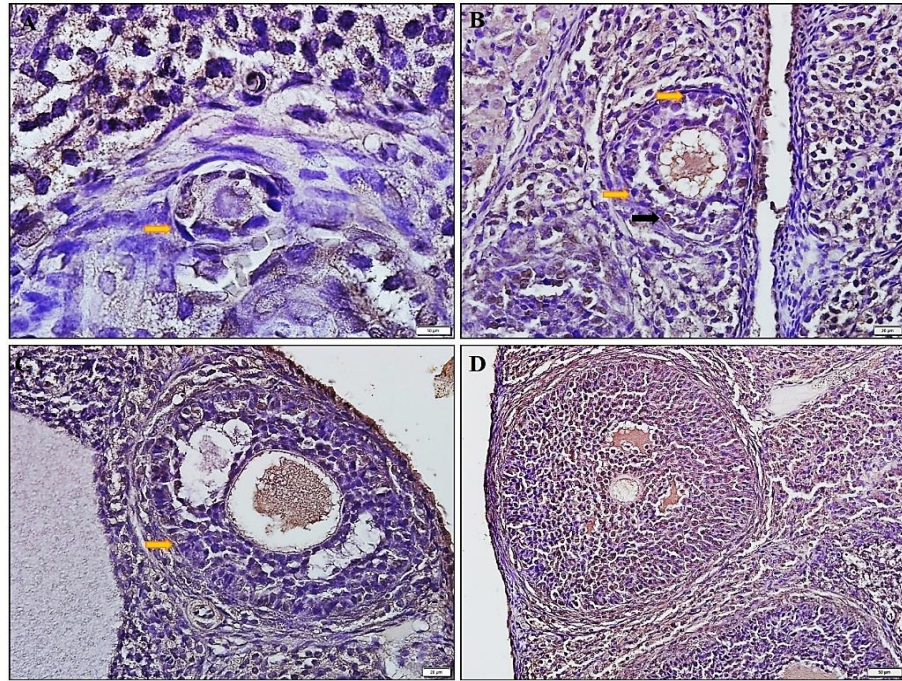
SF+FA grubunda Bcl-2 için boyanan ovaryum kesitlerinin immünpozitivitesinin SF grubuna göre daha güçlü Kontrol ve FA grubuna göre ise daha zayıf olduğu görüldü. Primordiyal, primer ve sekonder foliküllerdeki oositler ve bunların granüloza hücreleri immün pozitif olarak gözlemlendi. Teka tabakalarında ise SF grubuna göre daha güçlü bir immünreaktivite olduğu görüldü (Şekil 39, Grafik 6).



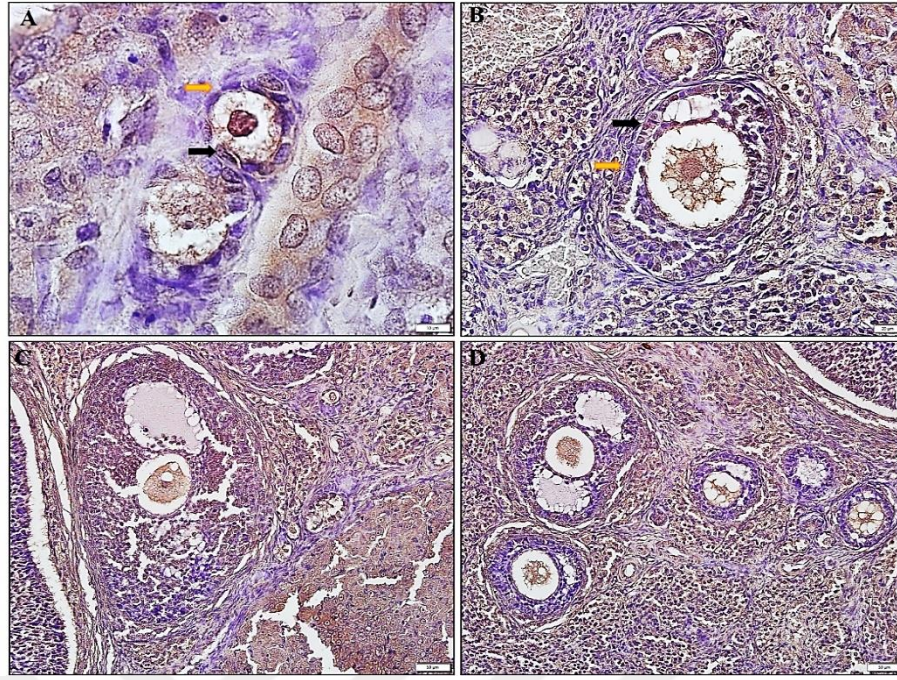
Şekil 36: Kontrol grubuna ait Bcl-2 immünohistokimya boyaması. **(A)** Tek katlı primer folikül (100x), **(B)** Çok katlı primer folikül (100x), **(C)** Primordiyal ve tek katlı primer folikül (100x), **(D)** Graaf folikülü (20x). **Turuncu ok:** immün negatif hücreleri, **Siyah ok:** immün pozitif hücreleri göstermektedir.



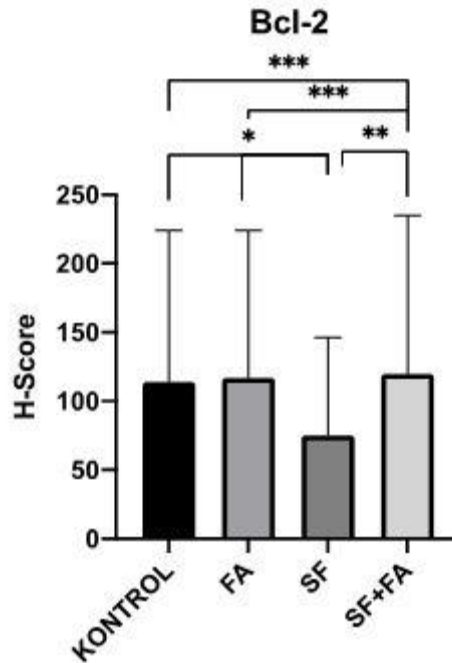
Şekil 37: FA grubuna ait Bcl-2 immünohistokimya boyaması. **(A)** Primordiyal folikül (100x), **(B)** Çok katlı primer folikül (100x), **(C)** Tek katlı primer folikül (40x), **(D)** Gelişimin farklı aşamalarında olan foliküller (20x).



Şekil 38: FA grubuna ait Bcl-2 immünohistokimya boyaması. **(A)** Tek katlı primer folikül (100x), **(B)** Çok katlı primer folikül (40x), **(C)** Sekonder folikül (40x), **(D)** Sekonder folikül (20x).



Şekil 39: SF+FA grubuna ait Bcl-2 immünohistokimya boyaması. **(A)** Primordiyal folikül (100x), **(B)** Sekonder folikül (40x), **(C)** Sekonder folikül (20x), **(D)** Gelişimin farklı aşamalarında olan foliküller (20x).



Grafik 6: Gruplara göre Bcl-2 immünohistokimya boyanması H-score dağılımı. *: Bcl-2 immün boyanması SF grubunda Kontrol ve FA gruplarıyla karşılaştırıldığında her iki gruba göre anlamlı olarak azaldı. Sırasıyla ($p=0,004$), ($p=0,004$). **: Bcl-2

immün boyanması SF+FA grubunda SF grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak arttı. (p=0,004). ***: Bcl-2 immün boyanması SF+FA grubunda Kontrol ve FA gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak arttı. Sırasıyla (p=0,004), (p=0,006).

4.5.3. Bax İmmünohistokimya Boyaması Bulguları

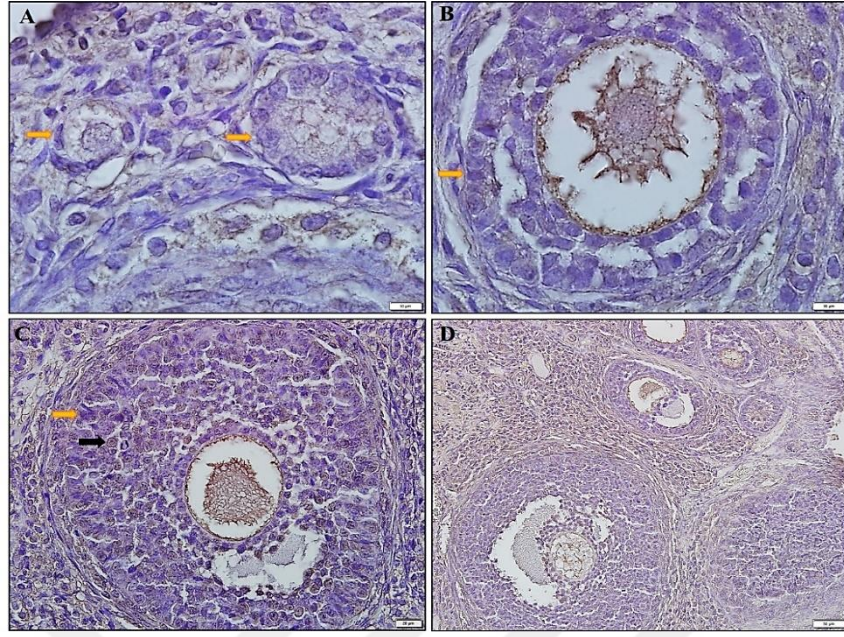
Bax ekspresyonunu tüm gruplarda gösterebilmek için alınan ovaryum seri kesitlerine immünohistokimyasal boyama yapıldı. Bax'ın teka interna ve eksternada, granüloza hücrelerinde, oositte ve korpus kuteum hücrelerinde eksprese olduğu görüldü.

Kontrol grubunda Bax boyanması incelendiğinde teka interna ve granüloza hücrelerinin sitoplazmalarında boyanma bazal düzeyde gözlemlendi. Gelişimin farklı aşamalarında olan foliküllerde yer alan primer ve sekonder oositlerde Bax için zayıf bir immün boyanma gözlemlendi. Korpus luteum hücrelerinde ise granüloza hücrelerine göre daha kuvvetli bir boyanma görüldü (Şekil 40, Grafik 7).

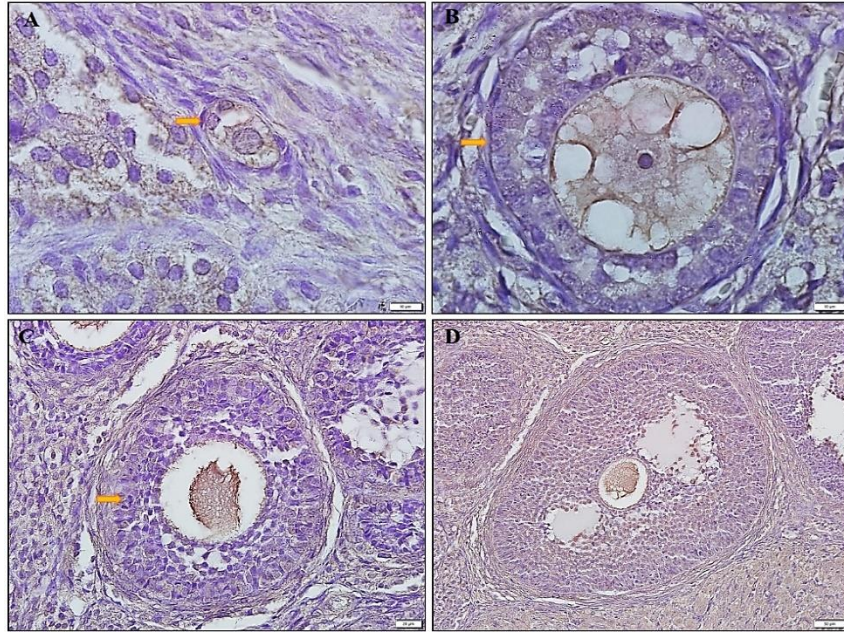
FA grubu deneklerin ovaryum seri kesitlerinde Bax immünreaktivitesi kontrol grubuna ait ovaryum seri kesitlerine benzer olduğu görüldü. Gelişimin farklı aşamalarında olan foliküllerde yer alan primer ve sekonder oositlerde, teka interna ve granüloza hücrelerinin sitoplazmalarında boyanma bazal düzeyde gözlemlendi (Şekil 41, Grafik 7).

SF grubu deneklerin ovaryum seri kesitlerinde Bax immünreaktivitesi incelendiğinde güçlü bir boyanma ve pozitif hücre sayısının Kontrol ve FA grubuna göre artmış olduğu görüldü. Farklı aşamalardaki foliküllerin granüloza hücrelerinde ve oositlerinde, teka eksternada, tek katlı primer folikülün kübik hücrelerinde ve korpus luteumda oldukça güçlü immünpozitivite görüldü (Şekil 42, Grafik 7).

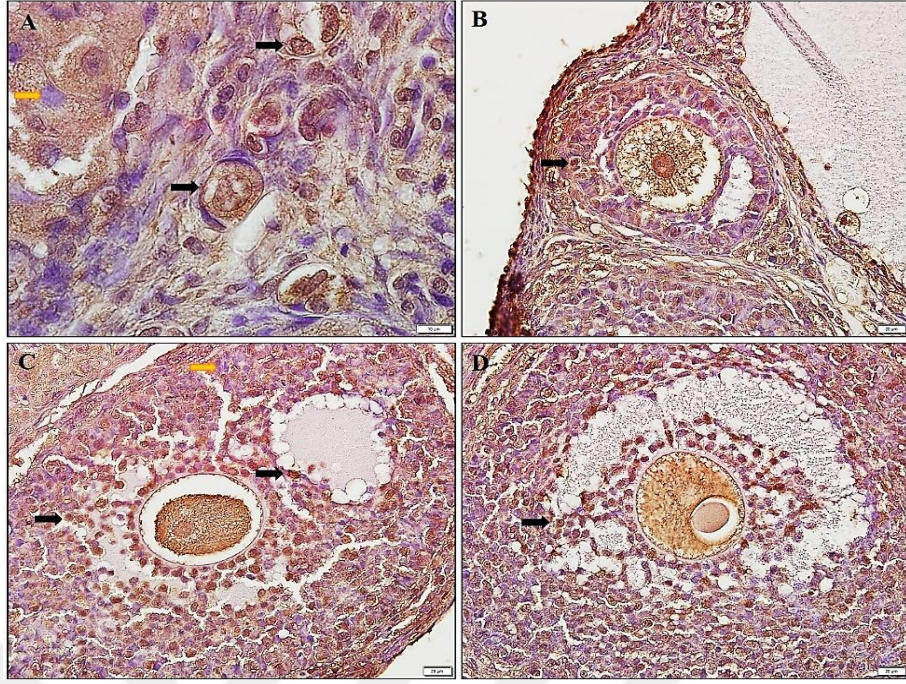
SF+FA grubuna ait ovaryum seri kesitlerinde Bax immünreaktivitesi incelendiğinde, granüloza hücrelerinde, teka eksternada ve oositte SF grubuna göre daha zayıf bir boyanma gözlemlendi. Foliküllerde immünreaktivite Kontrol ve FA grubuna benzer ancak daha fazla olduğu görüldü (Şekil 43, Grafik 7).



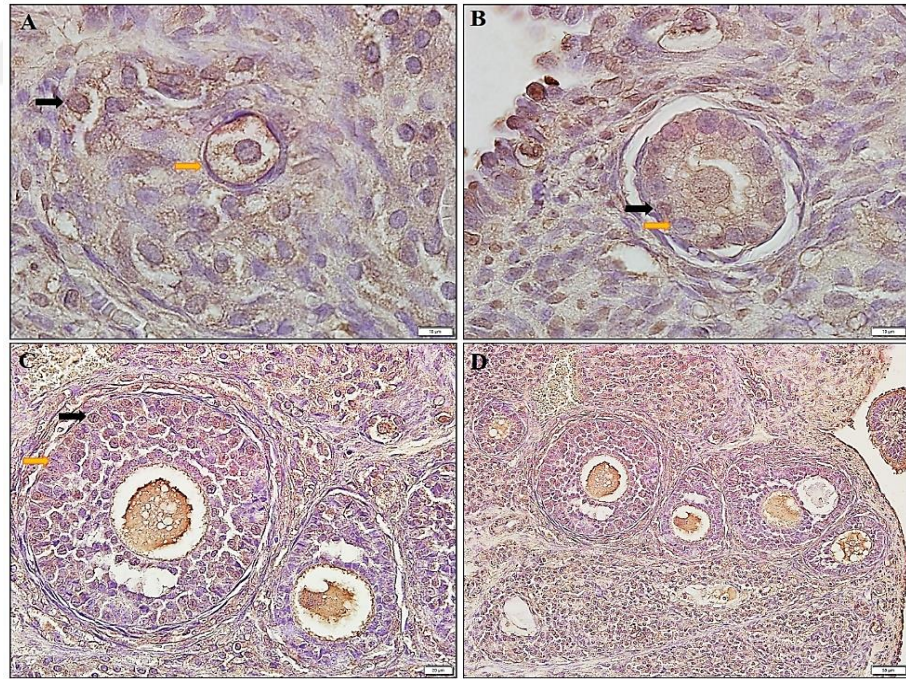
Şekil 40: Kontrol grubuna ait Bax immünohistokimya boyaması. **(A)** Primordiyal ve tek katlı primer folikül (100x), **(B)** Çok katlı primer folikül (100x), **(C)** Sekonder folikül (100x), **(D)** Gelişimin farklı aşamalarında olan foliküller (20x). **Turuncu ok:** immün negatif hücreleri, **Siyah ok:** immün pozitif hücreleri göstermektedir.



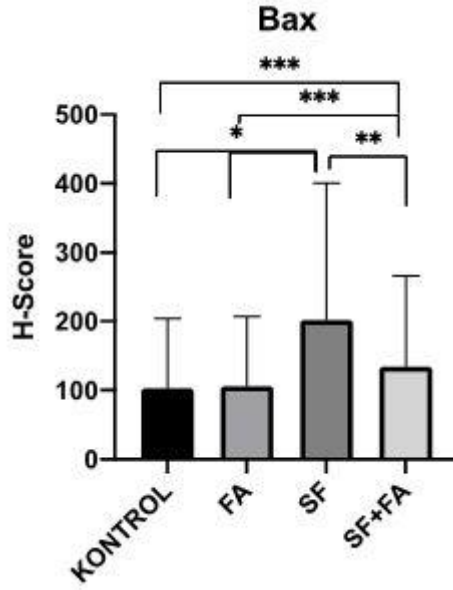
Şekil 41: FA grubuna ait Bax immünohistokimya boyaması. **(A)** Primordiyal folikül (100x), **(B)** Çok katlı primer folikül (100x), **(C)** Çok katlı primer folikül (40x), **(D)** Sekonder folikül (20x).



Şekil 42: SF grubuna ait Bax immünohistokimya boyaması. **(A)** Primordiyal folikül (100x), **(B), (C), (D)** Sekonder folikül (40x).



Şekil 43: SF+FA grubuna ait Bax immünohistokimya boyaması. **(A)** Primordiyal folikül (100x), **(B)** Tek katlı primer folikül (100x), **(C)** Sekonder foliküller (40x), **(D)** Gelişimin farklı aşamalarında olan foliküller (20x).



Grafik 7: Gruplara göre Bax immünohistokimya boyanması H-score dağılımı. *: Bax immün boyanması SF grubunda Kontrol ve FA gruplarıyla karşılaştırıldığında her iki gruba göre anlamlı olarak arttı. Sırasıyla ($p=0,004$), ($p=0,004$). **: Bax immün boyanması SF+FA grubunda SF grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldı. ($p=0,004$). ***: Bax immün boyanması SF+FA grubunda Kontrol ve FA gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak arttı. Sırasıyla ($p=0,004$) ve ($p=0,004$).

4.5.4. iNOS İmmünohistokimya Boyanması Bulguları

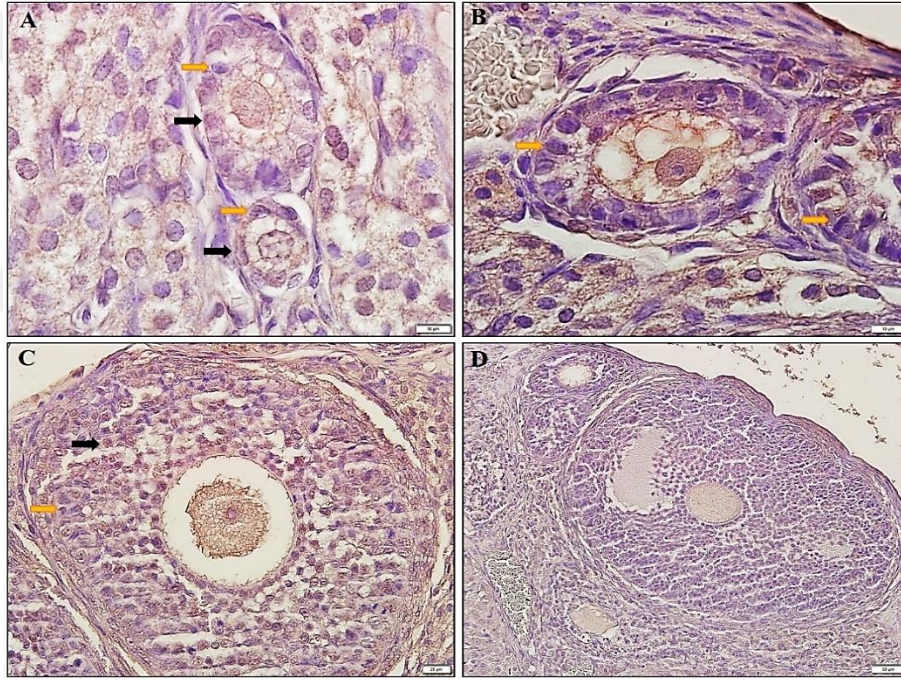
iNOS ekspresyonunu tüm gruplarda gösterebilmek için alınan ovaryum seri kesitlerine immünohistokimyasal boyama yapıldı. iNOS'un granüloza hücrelerinde, oositte ve korpus luteum hücrelerinde eksprese olduğu görüldü.

Kontrol grubunda iNOS boyanması incelendiğinde granüloza hücrelerinin sitoplazmalarında boyanma bazal düzeyde gözlemlendi. Gelişimin farklı aşamalarında olan foliküllerde yer alan primer ve sekonder oositlerde tek katlı primer folikülde iNOS için zayıf bir immün boyanma gözlemlendi (Şekil 44, Grafik 8).

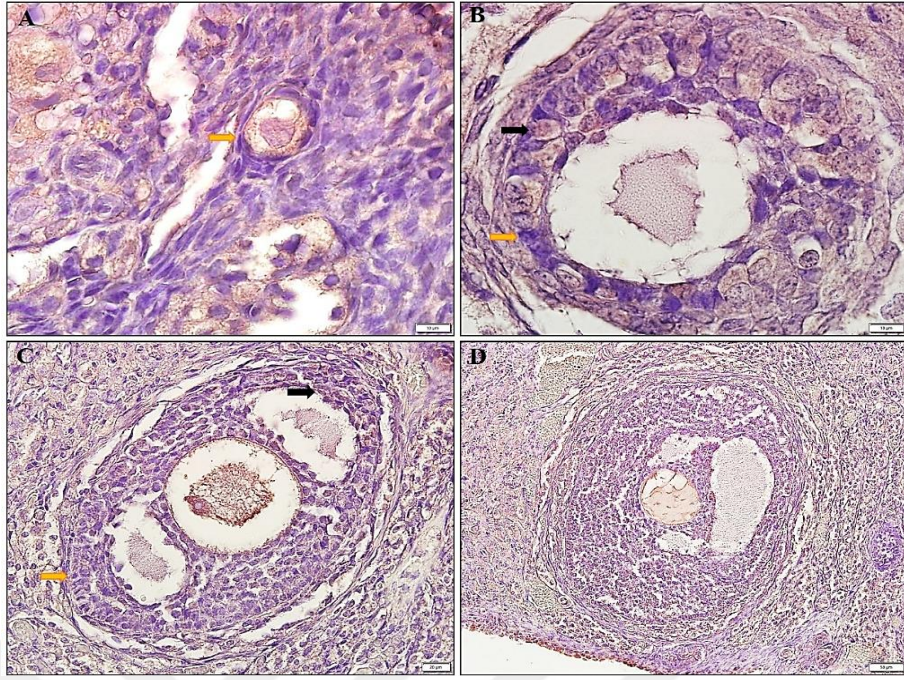
FA grubu deneklerin ovaryum seri kesitlerinde iNOS immünreaktivitesi kontrol grubundan daha zayıf bir boyanma gösterdi. Granüloza hücrelerinde pozitif hücre sayısı ve oositlerde kontrol grubuna göre boyanma oldukça azdı (Şekil 45, Grafik 8).

SF grubu deneklerin ovaryum seri kesitlerinde iNOS immünreaktivitesi incelendiğinde güçlü bir boyanma ve pozitif hücre sayısının Kontrol ve FA grubuna göre artmış olduğu görüldü. Farklı aşamalarındaki foliküllerin granüloza hücrelerinde ve oositlerinde, tek katlı primer folikülün kübik hücrelerinde, primordiyal folikülün tek katlı yassı epitelinde ve korpus luteumda oldukça güçlü immünpozitivite görüldü (Şekil 46, Grafik 8).

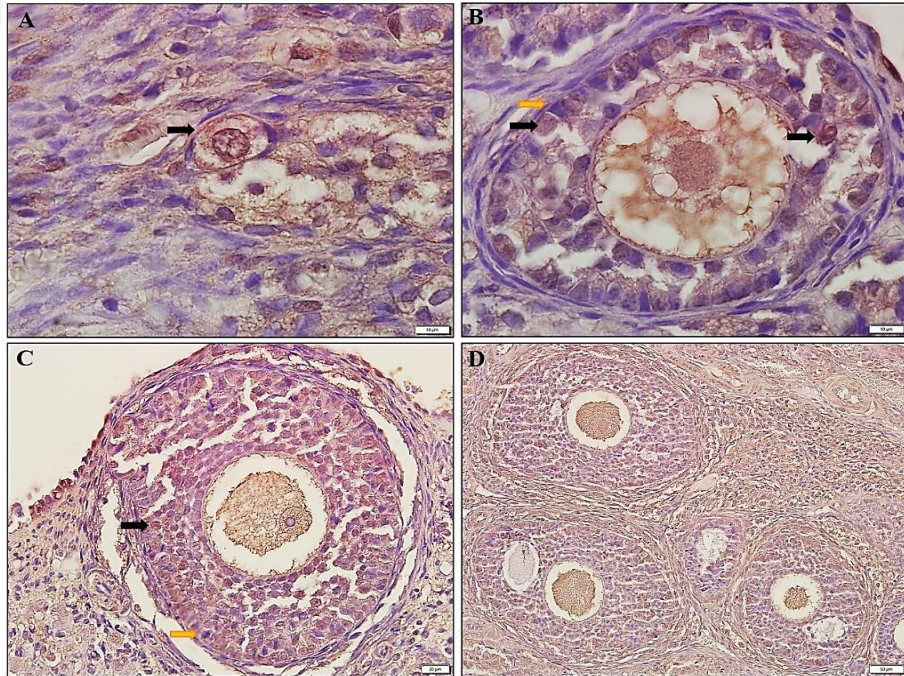
SF+FA grubuna ait ovaryum seri kesitlerinde iNOS immünreaktivitesi incelendiğinde, granüloza hücrelerinde, tek katlı primer folikülün kübik hücrelerinde ve oositte SF grubuna göre daha zayıf bir boyanma gözlemlendi. Foliküllerde immünreaktivite Kontrol grubuna benzer olduğu görüldü (Şekil 47, Grafik 8).



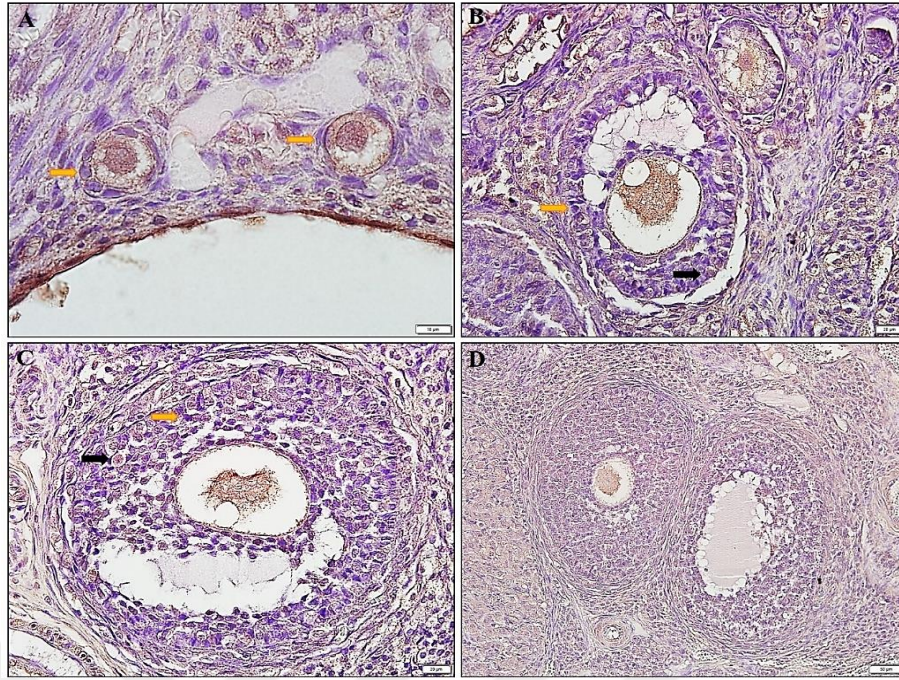
Şekil 44: Kontrol grubuna ait iNOS immünohistokimya boyaması. **(A)** Primordiyal ve tek katlı primer folikül (100x), **(B)** Çok katlı primer folikül (100x), **(C)** Çok katlı primer folikül (40x), **(D)** Sekonder folikül (20x). **Turuncu ok:** immün negatif hücreleri, **Siyah ok:** immün pozitif hücreleri göstermektedir.



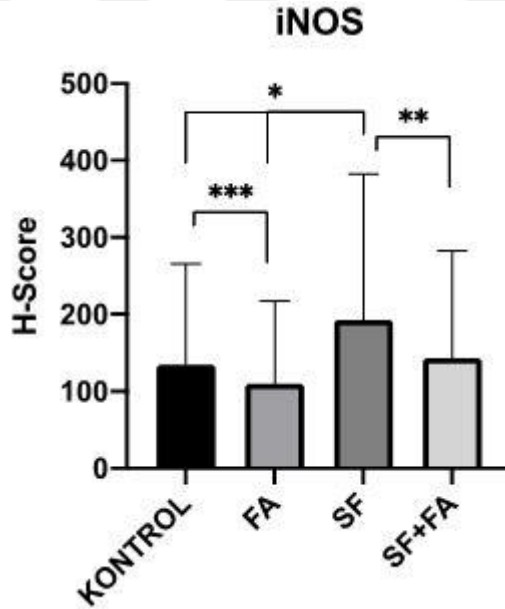
Şekil 45: FA grubuna ait iNOS immünohistokimya boyaması. **(A)** Primordiyal folikül (100x), **(B)** Çok katlı primer folikül (100x), **(C)** Sekonder folikül (40x), **(D)** Sekonder folikül (20x).



Şekil 46: SF grubuna ait iNOS immünohistokimya boyaması. **(A)** Primordiyal folikül (100x), **(B)** Çok katlı primer folikül (100x), **(C)** Çok katlı primer folikül (40x), **(D)** Primer ve sekonder foliküller (20x).



Şekil 47: SF+FA grubuna ait iNOS immünohistokimya boyaması. **(A)** Primordiyal ve tek katlı primer folikül (100x), **(B), (C)** Sekonder folikül (40x), **(D)** Primer ve sekonder folikül (20x).



Grafik 8: Gruplara göre iNOS immünohistokimya boyanması H-score dağılımı. *: iNOS immün boyanması SF grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı. (p=0,004). *: iNOS immün boyanması SF grubunda FA grubuna göre anlamlı olarak arttı. (p=0,004). **: iNOS immün boyanması SF+FA grubunda SF grubuna göre

anlamli olarak azaldi. ($p=0,004$). ***: iNOS immün boyanması FA grubunda Kontrol grubuna göre anlamli olarak azaldi. ($p=0,010$). ****: iNOS immün boyanması SF+FA grubunda Kontrol grubuna göre anlamli olarak arttı. ($p=0,004$). iNOS immün boyanması SF+FA grubunda FA grubuna göre anlamli olarak arttı. ($p=0,004$).

4.5.5. eNOS İmmünohistokimya Boyaması Bulguları

eNOS ekspresyonunu tüm gruplarda gösterebilmek için alınan ovaryum seri kesitlerine immünohistokimyasal boyama yapıldı. eNOS'un teka interna ve eksternada, granüloza hücrelerinde, oositte, primordiyal folikülün tek katlı yassı epitelinde ve korpus luteum hücrelerinde eksprese olduğu görüldü.

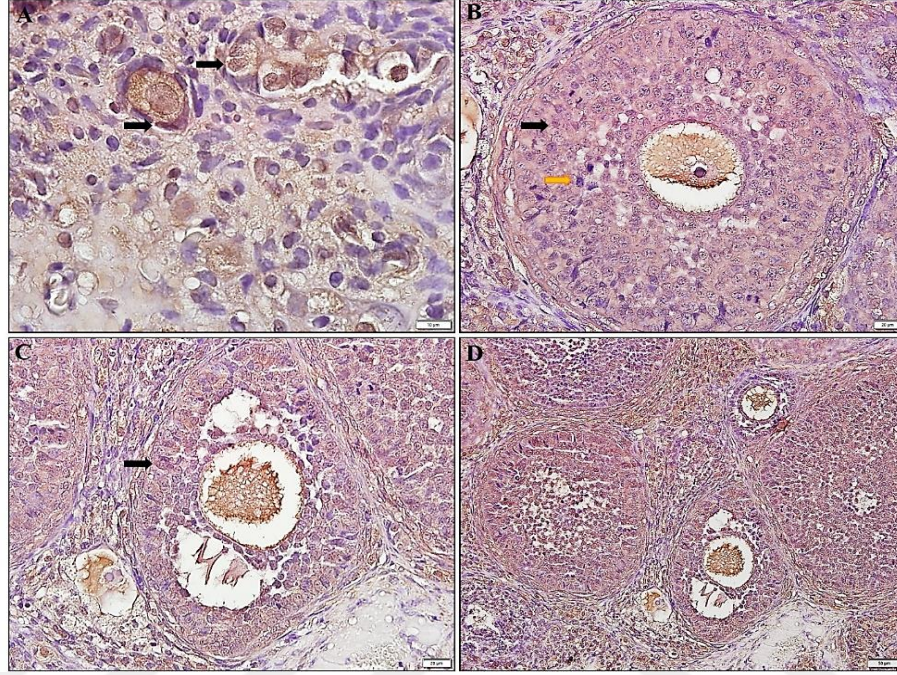
Kontrol grubu deneklerin ovaryum doku kesitlerinde gelişimin bütün aşamalarındaki foliküllerde, granüloza hücrelerinde, teka eksterna ve internada, primordiyal folikülün tek katlı yassı epitelinde ve primer ve sekonder oositte eNOS immünpozitivite gözlemlendi. Tek katlı primer foliküllerin kübik hücrelerinde ve primer oositinde ve korpus luteum hücrelerinde güçlü bir immünreaktivite görüldü (Şekil 48, Grafik 9).

FA grubu deneklerin ovaryum seri kesitlerinde eNOS immünreaktivitesi kontrol grubuna benzer ve yer yer bazı foliküllerde daha güçlü tutulumların olduğu görüldü (Şekil 49, Grafik 9).

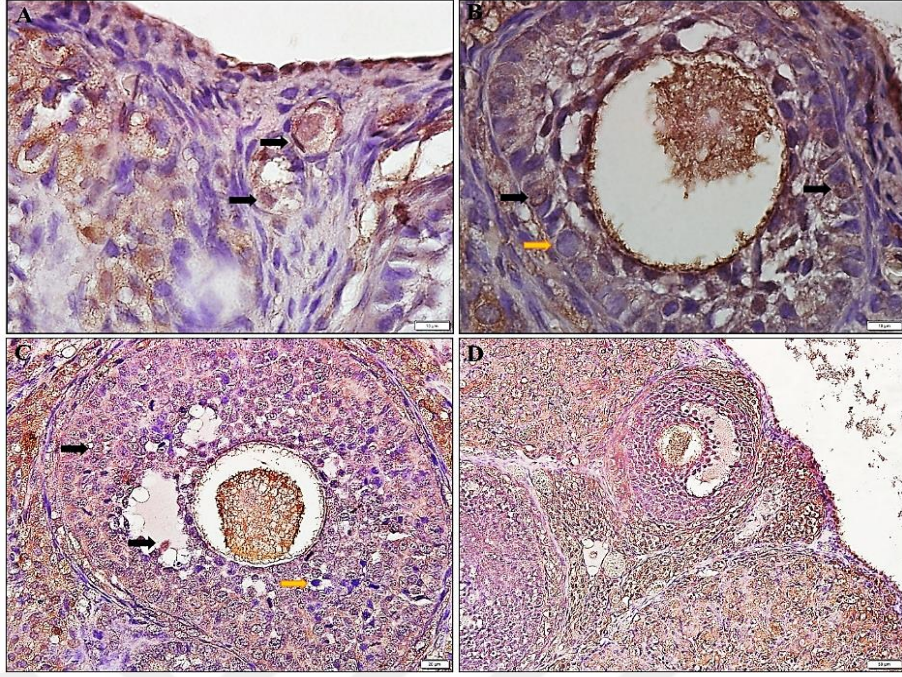
SF grubu deneklerin ovaryum dokularında Kontrol ve FA grubuna göre, eNOS için oldukça zayıf bir immünreaktivite olması dikkat çekiciydi. Gelişimin farklı aşamalarında olan foliküllerin granüloza hücrelerinde, oositlerde, primordiyal folikülde ve teka tabakasında önemli derecede azalmış eNOS ekspresyonu olduğu görüldü (Şekil 50, Grafik 9).

SF+FA grubunda eNOS için boyanan ovaryum kesitlerinin immünpozitivitesinin SF grubuna göre daha güçlü Kontrol ve FA grubuna göre ise daha zayıf olduğu görüldü. Primordiyal, primer ve sekonder foliküllerdeki oositler ve bunların granüloza hücreleri immün pozitif olarak gözlemlendi ve pozitif hücre sayısında

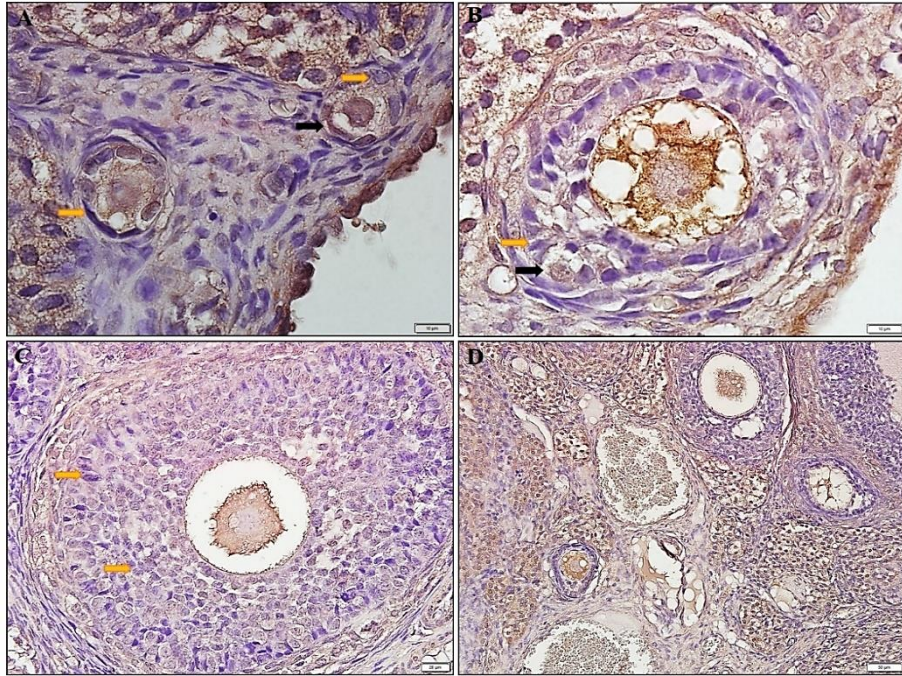
da artış görüldü. Teka tabakalarında ise SF grubuna göre daha güçlü bir immünreaktivite olduğu görüldü (Şekil 51, Grafik 9).



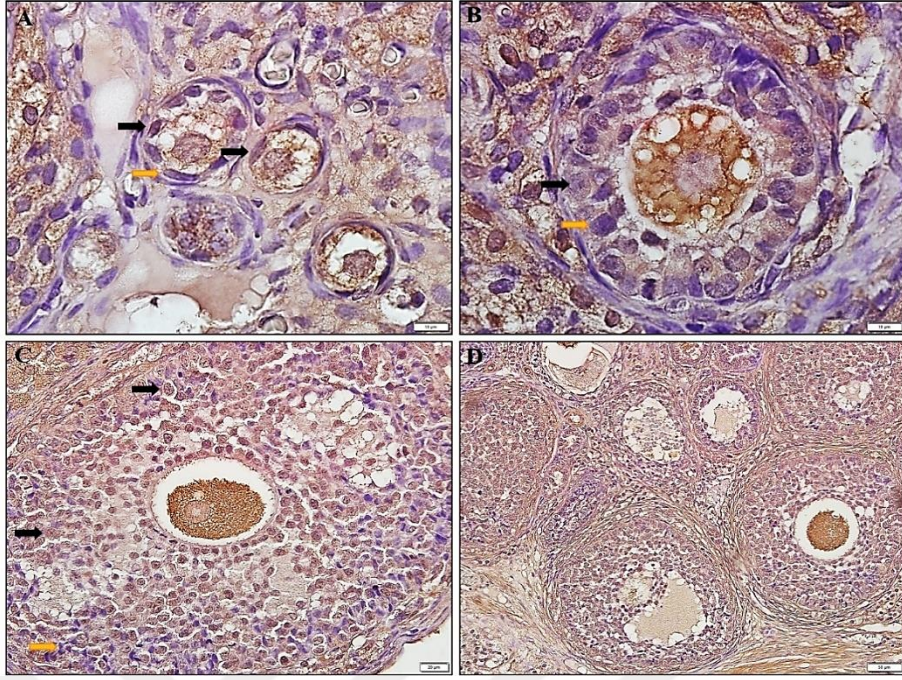
Şekil 48: Kontrol grubuna ait eNOS immünohistokimya boyaması. **(A)** Primordiyal folikül (100x), **(B)** Çok katlı primer folikül (40x), **(C)** Sekonder folikül (40x), **(D)** Gelişimin farklı aşamalarında olan foliküller (20x). **Turuncu ok:** immün negatif hücreleri, **Siyah ok:** immün pozitif hücreleri göstermektedir.



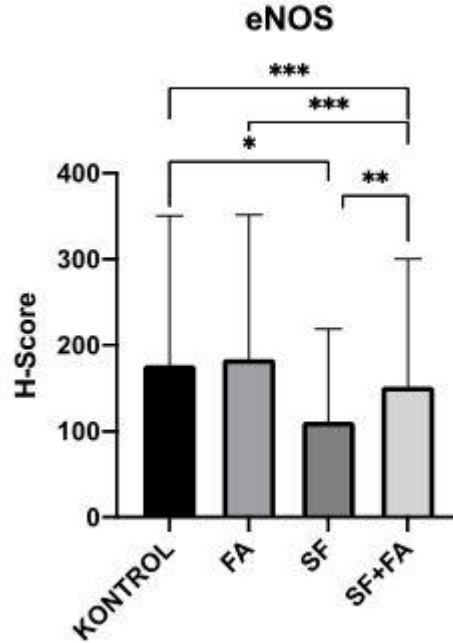
Şekil 49: FA grubuna ait eNOS immünohistokimya boyaması. **(A)** Primordiyal folikül (100x), **(B)** Çok katlı primer folikül (100x), **(C)** Sekonder folikül (40x), **(D)** Sekonder folikül (20x).



Şekil 50: SF grubuna ait eNOS immünohistokimya boyaması. **(A)** Tek katlı primer folikül (100x), **(B)** Çok katlı primer folikül (100x), **(C)** Sekonder folikül (40x), **(D)** Primer ve sekonder foliküller (20x).



Şekil 51: SF+FA grubuna ait eNOS immünohistokimya boyaması. **(A)** Primordiyal ve primer foliküller (100x), **(B)** Çok katlı primer folikül (100x), **(C)** Sekonder folikül (40x), **(D)** Gelişimin farklı aşamalarında olan foliküller (20x).



Grafik 9: Gruplara göre eNOS immünohistokimya boyanması H-score dağılımı. *: eNOS immün boyanması SF grubunda Kontrol ve FA gruplarıyla karşılaştırıldığında her iki gruba göre anlamlı olarak azaldı. Sırasıyla ($p=0,004$), ($p=0,004$). **: eNOS

immün boyanması SF+FA grubunda SF grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak arttı. ($p=0,004$). ***: eNOS immün boyanması SF+FA grubunda Kontrol ve FA gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldı. Sırasıyla ($p=0,004$), ($p=0,004$).

4.5.6. PCNA İmmünohistokimya Boyaması Bulguları

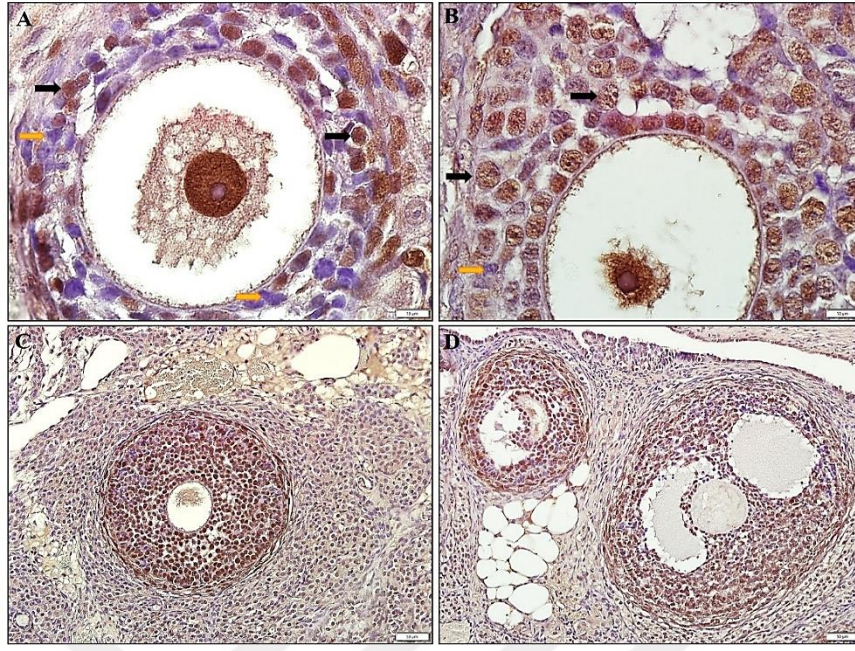
PCNA ekspresyonunu tüm gruplarda gösterebilmek için alınan ovaryum seri kesitlerine immünohistokimyasal boyama yapıldı. PCNA'nın teka eksternada, granüloza hücrelerinde, oositte ve korpus luteum hücrelerinde eksprese olduğu görüldü.

Kontrol grubu deneklerin ovaryum doku kesitlerinde gelişimin bütün aşamalarındaki foliküllerde, granüloza hücrelerinde, teka eksterna ve internada, primer ve sekonder oositte güçlü bir PCNA immünpozitivite gözlemlendi. Tek katlı primer foliküllerin kübik hücrelerinde ve primer oositinde ve korpus luteum hücrelerinde güçlü bir immünreaktivite görüldü (Şekil 52, Grafik 10).

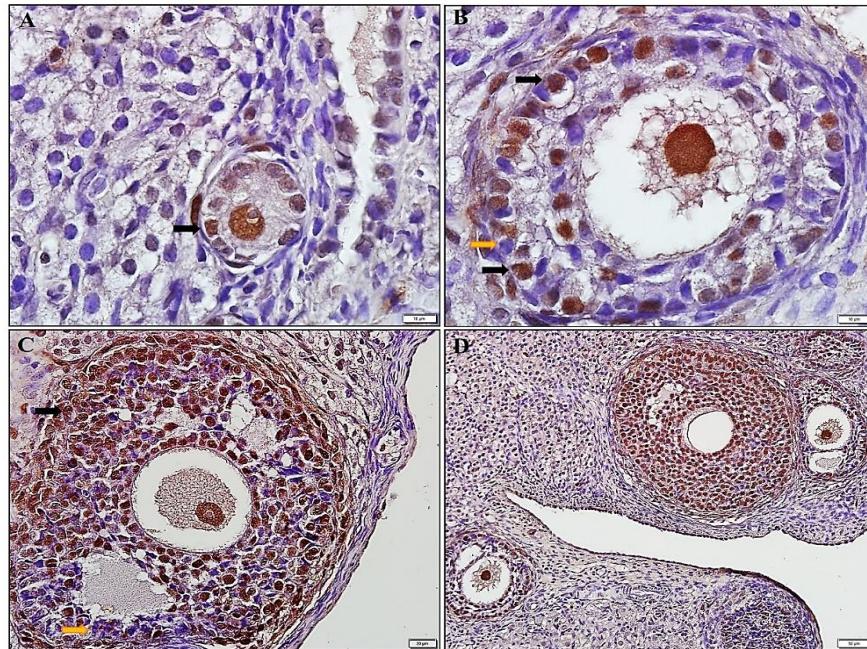
FA grubu deneklerin ovaryum seri kesitlerinde PCNA immünreaktivitesi kontrol grubuna benzer olarak görüldü (Şekil 53, Grafik 10).

SF grubu deneklerin ovaryum dokularında Kontrol ve FA grubuna göre, PCNA için oldukça zayıf bir immünreaktivite olduğu görüldü. Gelişimin farklı aşamalarında olan foliküllerin granüloza hücrelerinde, primordiyal folikülde ve teka tabakasında önemli derecede azalmış PCNA ekspresyonu olduğu gözlemlendi. Foliküllerde yer alan oositlerin PCNA ekspresyonu azalmış olsa da Kontrol ve FA ile benzer bir immünreaktivite görüldü (Şekil 54, Grafik 10).

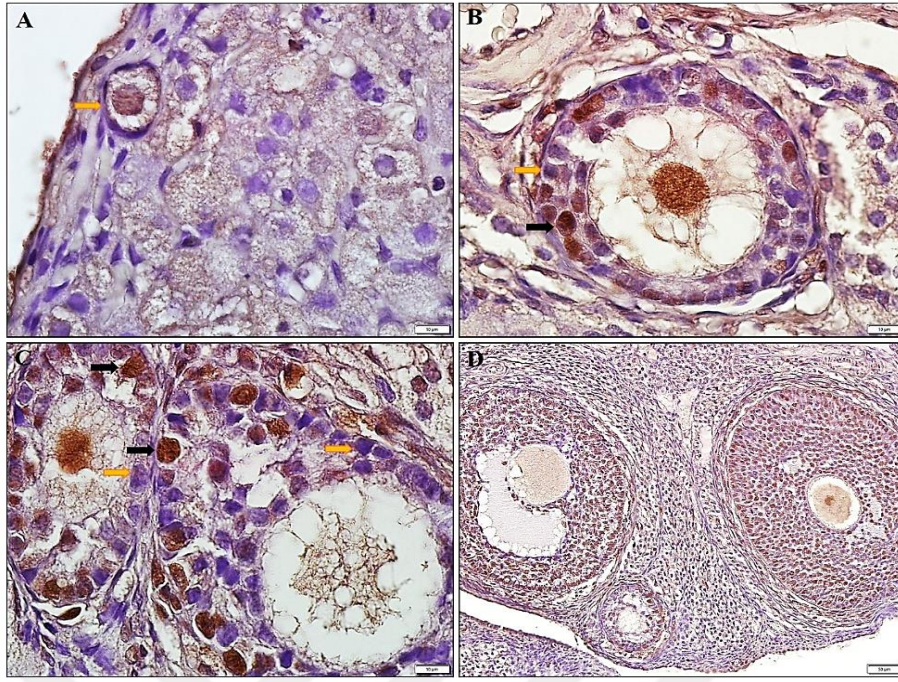
SF+FA grubunda PCNA için boyanan ovaryum kesitlerinin immünpozitivitesinin SF grubuna göre daha güçlü Kontrol ve FA grubuna göre ise daha zayıf olduğu görüldü. Primordiyal, primer ve sekonder foliküllerdeki oositler ve bunların granüloza hücreleri immün pozitif olarak gözlemlendi ve pozitif hücre sayısında da artış görüldü (Şekil 55, Grafik 10).



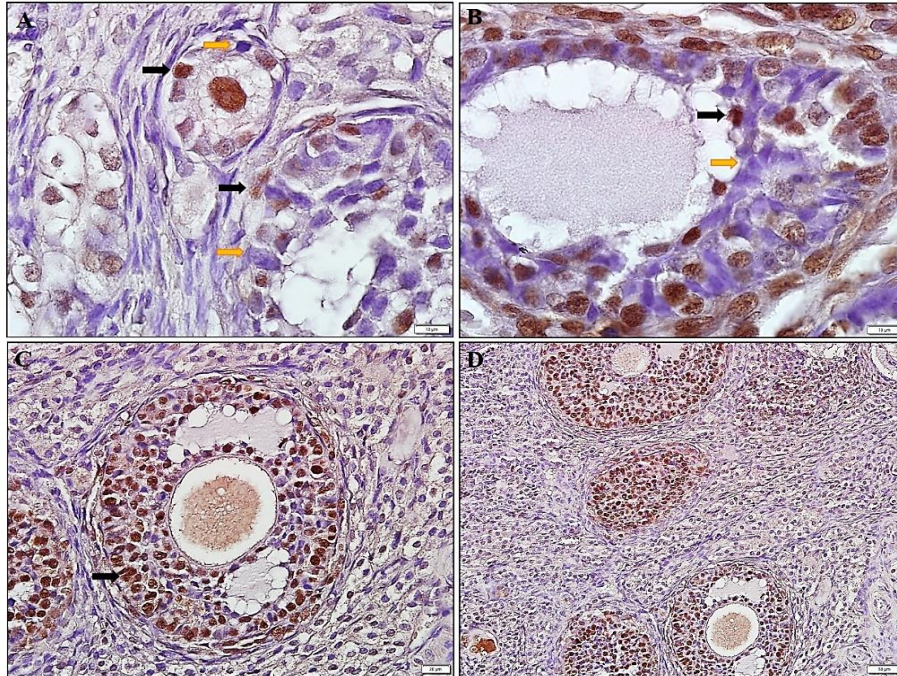
Şekil 52: Kontrol grubuna ait PCNA immünohistokimya boyaması. **(A)** Çok katlı primer folikül (100x), **(B)** Sekonder folikül (100x), **(C)** Çok katlı primer folikül (20x), **(D)** Sekonder foliküller (20x). **Turuncu ok:** immün negatif hücreleri, **Siyah ok:** immün pozitif hücreleri göstermektedir.



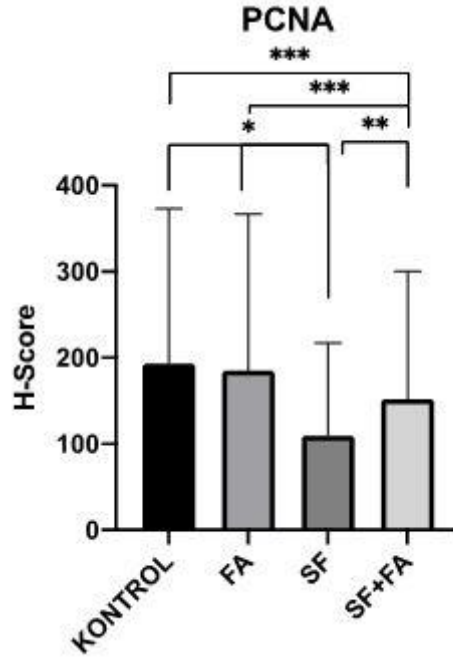
Şekil 53: FA grubuna ait PCNA immünohistokimya boyaması. **(A)** Tek katlı primer folikül (100x), **(B)** Çok katlı primer folikül (100x), **(C)** Sekonder folikül (40x), **(D)** Sekonder foliküller (20x).



Şekil 54: SF grubuna ait PCNA immünohistokimya boyaması. **(A)** Primordiyal folikül (100x), **(B)** Çok katlı primer folikül (100x), **(C)** Sekonder foliküller (100x), **(D)** Gelişimin farklı aşamalarında olan foliküller (20x).



Şekil 55: SF+FA grubuna ait PCNA immünohistokimya boyaması. **(A)** Tek katlı primer folikül (100x), **(B)** Sekonder folikül (100x), **(C)** Sekonder foliküller (40x), **(D)** Gelişimin farklı aşamalarında olan foliküller (20x).



Grafik 10: Gruplara göre PCNA immünohistokimya boyanması H-score dağılımı. *: PCNA immün boyanması SF grubunda Kontrol ve FA gruplarıyla karşılaştırıldığında her iki gruba göre anlamlı olarak azaldı. Sırasıyla ($p=0,004$), ($p=0,004$). **: PCNA immün boyanması SF+FA grubunda SF grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak arttı. ($p=0,004$). ***: PCNA immün boyanması SF+FA grubunda Kontrol ve FA gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldı. Sırasıyla ($p=0,004$), ($p=0,004$).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, hızlı foliküler atrezi nedeni ile oosit sayılarının ciddi miktarda azaldığı ve ovaryan fonksiyonların erken kaybı ile osteoporoz, kardiyovasküler hastalıklar gibi ciddi sağlık sorunları ve infertiliteye yol açan POY'a neden olduğu düşünülen siklofosfamid toksisitesinde, fitokimyasal, güçlü bir antioksidan ve etkili bir serbest radikal temizleyici olan ferulik asidin ovaryan doku hasarını önlemedeki etkinliği değerlendirildi. Ferulik asidin ovaryumda fibrozisi, ovaryan folliküllerde granüloza hücreleri ve stromal hücrelerde apoptotik aktivasyonu azalttığı, proliferasyonu arttırdığı ve nitrik oksit metabolizmasını iyileştirici etkileri olduğu gösterildi. Bu çalışma siklofosfamidin oluşturduğu gonadotoksik etkiye karşı ferulik asidin koruyucu etkilerinin gösterildiği ilk çalışmadır.

Araştırmamız kapsamında siklofosfamid ile gonadotoksisite indüklendi. Deneysel süre boyunca siklus sonuçlarını değerlendirmek için alınan vaginal smear sonuçlarında siklofosfamid grubunda siklusun düzensizleştiği, bazen aynı fazlarda takılı kaldığı gözlemlendi. Ferulik asit tedavisinde ise yaklaşık bir hafta sonra düzensizliğin ve faz tekrarlarının azaldığı belirlendi. Düzenli olarak yapılan ağırlık ölçümlerinde gruplarda deney başı ve deney sonunda siklofosfamid grubu haricinde anlamlı kilo artışı gözlemlendi. Bu artışın nedeni deney süresi ile ilişkilendirildi. Siklofosfamid grubunda ise deney sürecince anlamlı ağırlık artışı gözlenmedi.

POY terimi 40 yaşın altındaki kadınlarda amenore, yüksek FSH, düşük östrojen ve bunların sonucunda gelişen infertilite ile karakterizedir. Önceleri erken menopoz olarak tanımlansa da ovaryan aktivitenin aralıklı olarak devam ettiğinin gözlenmesi nedeniyle prematüre ovaryan yetmezlik olarak tanımlanmıştır. Temel olarak primordiyal folikül sayısında azalma, atretik folikül sayısında artış ve foliküler olgunlaşmanın gerçekleşmemesi gözlenir ve etiyojisi tam olarak açıklanamamıştır.

Deneysel olarak yapılan POY çalışmalarında birçok farklı ajan kullanılmıştır ve kliniğe en uygun deneysel modeli oluşturmak oldukça önemlidir. Literatür incelendiğinde genellikle siklofosfamid ile oluşturulmuş POY hayvan modelleri görülmüştür. Siklofosfamid, şimdiye kadar sentezlenen en başarılı antikanser ajanlarından biridir ancak en önemli yan etkilerinden biri ovaryan rezerv üzerine olan olumsuz etkisidir. Kanser tedavisi sırasında yumurtalık rezervinin korunması,

doğurganlığın korunması ve hayatta kalanların yaşam kalitesinin iyileştirilmesi için büyük bir endişe kaynağıdır. Kemoterapi ile indüklenen POY klinik olarak kalıcıdır. Genç kadınlarda siklofosfamid ile tedavi sonrasında %84 amenore gözlenmiş ve hastaların %50'sinde POY geliştiği bildirilmiştir (59).

Çalışmamızda siklofosfamidin gonadotoksik etkilerine karşı ferulik asit kullanıldı. Ferulik asit fenilalanin ve tirozin metabolizmasında rol alan bir bitki bileşenidir. Genellikle buğday, pirinç ve brokolide bulunan, çok yüksek radikal süpürücü aktivite ve çeşitli biyolojik ve farmakolojik özelliklere sahip bir antioksidandır. Düşük maliyeti, yüksek biyoyararlanımı ve düşük toksisitesi nedeniyle en iyi seçeneklerden biri olarak kabul edilir. Bu nedenle, ferulik asit çok umut verici bir in vitro antioksidan aktiviteye sahiptir (27).

Ferulik asidin çeşitli akut ve kronik patolojilere karşı yararlı etkiler gösterdiği bildirilmiştir (60). Literatürde farklı dokular üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Kassab ve ark. kadmiyum toksisitesi oluşturulan sıçanların testis dokusunda PCNA-pozitif germinal hücrelerde azalma olduğunu, ferulik asit ile ön tedavi yapıldığında ise antioksidan etkisinden dolayı olabilen spermatojenik hücrelerde PCNA ekspresyonunu arttırdığını bildirmişlerdir (61). Daha önceki çalışmalarda da diyabet, testikuler hasar, iskemi reperfüzyon ve inflamasyon gibi çeşitli hastalık modellerinde artan oksidatif stres ve hücre hasarlarına karşı koruyucu rolü gösterilmiştir (62–65). Bizim çalışmamızda da literatürdeki etkilerine benzer şekilde siklofosfamid gonadotoksitesisi üzerinde anti-apoptotik, proliferatif ve oksidatif stres önleyici özellik göstermiştir.

Siklofosfamidin farmakolojik mekanizmasının incelendiği çalışmalarda, ilk hedef olarak proliferasyon fazında olan hücrelerde apoptozu başlattığı ve hücre büyümesini inhibe ettiği gözlenmiştir (66,67). Bu nedenle ovaryumlarda görülen hasarın proliferasyon aşamasındaki foliküllerin atreziye gitmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Araştırmalarda kemoteropatik ajanların, primordiyal foliküllerin apoptoza gidişini aktive ederek POY modeli olduğu gösterilmiştir (65,68). Ancak karşıt çalışmalarda siklofosfamid tedavisinin büyüyen foliküller üzerine etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Bu mekanizmada primordiyal foliküllerin geliştiğini ancak gelişen folikül aşamasında apoptoza uğrayarak primordiyal folikül havuzunun “yok

edildiği” (burn-out) ileri sürülmektedir (69,70). Bizim çalışmamızda Nguyen ve ark. benzer şekilde siklofosfamidin özellikle primordiyal ve primer folikülleri hedefleyerek bu foliküllerin sayısında anlamlı bir azalmaya neden olduğu gözlemlendi. Siklofosfamid grubunda özellikle gelişmekte olan foliküllerdeki granüloza hücreleri ve oositlerde artmış dejenerasyon olduğu belirlendi. Bu durum granuloza hücreleri ile oosit arasındaki bağlantıların bozularak folikül gelişimini geriletmesi olarak değerlendirildi. Folikülde oosit ve granüloza hücreleri karşılıklı olarak etkileşim içinde oldukları düşünüldüğünde granüloza hücrelerinde gelişen hasarın oosit gelişimi ve matürasyonunu da olumsuz yönde etkileyeceği görülmektedir. Granüloza hücrelerinde ortaya çıkan hasarların granüloza hücreleri ile oositler arasındaki bilgi ve besin alışverişini etkileyerek folikülün atreziye gitmesine neden olacağı da muhtemeldir. Sekonder ve graaf folikül sayılarında ise siklofosfamid grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık gözlenmezken atretik folikül ve korpus luteum sayısında Jin Liu ve ark. benzer şekilde anlamlı artış gözlemlendi (71). Foliküler atrezi normal şartlarda ovaryumların fizyolojik bir fonksiyonu olmakla birlikte, oosit ve granüloza hücreleri düzeyinde oluşan hasarların neden olduğu folikül atrezisinin ovaryan yetmezliğe yol açtığı düşünüldü.

Normal şartlarda ovaryan fibrozis yaşlılıkla ortaya çıkan, kolajenin yapısal organizasyonunda bozukluk sonucu gelişen bir durumdur (72). Yapılan araştırmalarda siklofosfamide maruz kalmanın doku hasarını tetiklediği, dokuda hemoraji, hücrel vakuolizasyon, konjesyon ve aynı zamanda fibroze neden olduğu bildirilmiştir (64). Melekoğlu ve ark. yaptıkları bir çalışmada siklofosfamid ile indükledikleri POY modelinde orta şiddetli hemorajik alanlar gözlemlemişlerdir ve bu durumu artmış oksidatif stres ile ilişkilendirmişlerdir (73). Biz de çalışmamızda bağ doku boyası olan Masson Trikrom boyası ile siklofosfamidin ovaryum dokusunda fibrozis artışına neden olduğunu gösterdik. Zona pellusida ve bazal membranların gösterilmesi amacıyla yaptığımız PAS boyası ile de kontrol grubundaki intakt zona pellusida yapısına karşın siklofosfamid grubunda düzensiz ve kalınlaşmış zona pellusida yapısı gözlemlendi. Ferulik asit tedavisinde ise fibrozisin azaldığı, zona pellusida yapısının kontrol grubuna benzer özellikte olduğu belirlendi. Ferulik asidin fibrozisin neden olabileceği foliküllerin gelişimini engelleyici ve inflamasyona neden olabilecek mikroçevrenin yaratılmasını önleyici etkisi olduğu düşünüldü.

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlar özellikle çoğalan hücelere karşı seçici öldürücü etkileri olan, doğal ya da sentetik olarak üretilen çeşitli biyolojik ajanlar ve hormonlarla yapılan tedavi şeklidir. Tümör hücelerini hedef almanın yanı sıra normal dokuya zarar vermeden kanser hücelerini öldüren ideal bir kanser ilacı hala bulunamamaktadır. Temel olarak kanser kemoterapilerinin amacı hücre ölümünü apoptozis yolu ile uyarmaktır. Bu amaçla kullanılan ajanların istenmeyen yan etkisi de tüm vücutta olduğu gibi overde de apoptozisin uyarılması ile sonuçlanır (74). Ovaryumlardaki primordiyal foliküllerin sayısı ovaryum rezervini belirlediği için özellikle primordiyal folikülleri hedef alan herhangi bir toksik uyarıcı reproduktif yaşam süresini kısaltarak prematüre over yetmezliğini tetikleyebilir (75). Oositleri çevreleyerek koruyan, gelişimlerini destekleyen ve steroid üreten hücelere olan granuloza ve teka hücelerinin apoptozisi ovaryan yetmezlik ile doğrudan ilişkilidir.

Hücrede apoptotik aktivasyonun değerlendirilmesi sürecinde farklı hücresel mekanizmalar dikkate alınır. Apoptozun geri dönüşümsüz basamağı olan kaspaz-3 aktivasyonu ya da mitokondriyal yolla aktive olan Bcl-2 ailesi üyelerinin aktivasyonları ile belirlenebilir. Bcl-2 protein ailesi anti-apoptotik (örneğin Bcl-2, Bcl-XL, and Mcl-1) ve pro-apoptotik (örneğin Bax, Bak, Bid, ve Bad) üyelerden oluşur ve Bcl-2/Bax oranı hücrenin yaşam/ölüm oranını belirler. Kaya ve ark. siklofosfamid ile oluşturdukları gonadotoksisite modelinde özellikle antral foliküllerde Kaspaz-3 ve DNA kırıklarını gösteren TUNEL pozitif hücelerin istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığını rapor etmişlerdir (76). Zhao ve ark. siklofosfamid ile indüklenen fareleri Tilipia balık derisi peptitleri (Tilisia skin peptides,TSP) ile tedavinin granuloza hücelerinin apoptozunu azalttığını ve Bcl-2/Bax/kaspaz-3 apoptoz yolunu düzenlediğini bildirmişlerdir (77). Barekati ve ark. ile Nie ve ark. da benzer şekilde siklofosfamidin olumsuz etkilerine karşı farklı tedavi ajanların uygulanmasının Kaspaz-3 ve Bax ekspresyonlarında azalmaya neden olduğunu, özellikle primer ve preantral foliküllerde TUNEL pozitif hücre sayısını düşürdüğünü bildirmişlerdir (78, 79). Haopeng ve ark. prematüre ovaryan yetmezlik modeli oluşturulan diğere bir ajan olan VCD ile oluşturdukları modelde düşük yoğunluklu darbeleri ultrason ile doku onarımını inceledikleri çalışmalarında granuloza hücelerinde antiapoptotik Bcl-2'nin tedavi ile arttığını ve proapoptotik Bax proteininin azaldığını ve hücelerin yaşam/ölüm dengelerini koruduğunu

göstermişlerdir (80). Özel ve ark. VCD ile oluşturulan primer ovaryan yetmezlik modelinde Kaspaz-3 pozitif hücrelerin arttığını göstermişlerdir. Liu ve ark. da siklofosfamid ile indüklenen ovaryan hasarda siringik asit ile artan kaspaz-3 oranının azalıp, azalan Bcl-2 oranının arttığını bildirmişlerdir (71). Biz de çalışmamızda literatür ile benzer şekilde siklofosfamid ile oluşan ovaryan hasarda özellikle primordiyal ve primer foliküllerde granuloza hücrelerinde Kaspaz-3 ve Bax immünreaktivitesinin arttığını, Bcl-2 immünreaktivitesinin ise azaldığını gözlemledik. Ferulik asit tedavisi ise bu değerleri hücrenin yaşamı yönünde değiştirdi.

Artan nitrik oksit (NO) üretimi, siklofosfamid ile indüklenen organ hasarında bir rol oynuyor gibi görünse de, farklı NO sentaz (NOS) izoformlarının altında yatan mekanizmalar tam olarak açığa kavuşmamıştır (81). iNOS, vücutta nitrik oksit (NO) oluşumunda kullanılan bir enzimdir. Fazla miktarda NO, GSH, proteinler, lipidler ve DNA gibi makromolekülleri bir süperoksit anyonu ile oksitlemek ve nitratlamak için reaksiyona girer ve hücreye zarar veren radikal peroksinitriti oluşturur (82,83). Liu ve ark. siklofosfamid ile indükledikleri ovaryumlarda inflamatuvar mediatörleri incelediklerinde iNOS seviyesinin siklofosfamid ile artış gösterdiğini ve siringik asit tedavisi ile azaldığını bildirmişlerdir (71). Özel ve ark. VCD ile oluşturulan primer ovaryan yetmezlik modelinde uterusu VCD grubunda eNOS'un azaldığını, iNOS'un arttığını ve alfa lipoik asit etkisi ile bu değerlerin kontrol grubuna benzer özellik gösterdiğini bildirmişlerdir (84). Biz de ferulik asit ile tedavi ettiğimiz ovaryumlarda siklofosfamid etkisi ile artan iNOS seviyelerinin azaldığını gösterdik. Ancak bizim çalışmamızda kontrol grubu ile sadece ferulik asit uygulanan grup arasında iNOS açısından bulduğumuz anlamlı farkın FA'nın anti-inflamatuvar etkisinden kaynaklandığını düşündük.

PCNA 36 kilodalton ağırlığında DNA sentez ve replikasyonunda rol alan nükleer bir proteindir. PCNA salınımı hücre siklusunun G1 fazında artmaya başlar, erken S fazında en yüksek düzeyine ulaşır. G2 boyunca düşer ve M fazı ile, çoğalmayan hücrelerde en düşük düzeyde gözlenir. Aref Delkhosh ve ark. siklofosfamid etkisinin PCNA ve FSHR'nin mRNA ekspresyonunu, IVF oranını ve embriyo gelişimini azalttığını, CoQ10 uygulamasının ise bu faktörleri başarıyla tersine çevirdiğini gösterdiler (54). Ovaryan granuloza, teka interna ve stromal hücrelerde kaspaz-3 immün boyamasını önemli ölçüde arttıran ve anti-proliferasyon hücre

nükleer antijen immün boyama ile belirtilen hücrelerin proliferasyon aktivitesinde önemli ölçüde anlamlı bir azalma ortaya koyan bizim bulgularımızla uyumludur (85)

TOS ve TAS malondialdehit, glutatyon peroksidaz gibi tek antioksidan bileşikler ve oksidan bileşikleri saptamak yerine serumdaki tüm antioksidan ve oksidan dengeyi gösterebilir. Çalışmamızda siklofosfamidin hasar verici etkisi sonucunda TOS seviyelerinin arttığı gözlemlendi. Siklofosfamid ile birlikte uygulanan ferulik asit ile azalması, ferulik asit varlığında antioksidan enzim aktivitelerinin artışı ve serbest oksijen radikallerinin azalması ile açıklanabilir. Ferulik asit grubunda TOS seviyelerinin azalması ise ferulik asidin antioksidan etkisini desteklemektedir. Ferulik asit grubunda Kontrol grubuna göre TAS değerlerinin de anlamlı olarak artması ferulik asidin antioksidatif özelliğinden kaynaklanmaktadır. SF grubu TAS değerinin Kontrole yakın çıkması oksidatif hasara karşı organizmanın sistemik antioksidan mekanizmasının devreye girmesi sonucu olduğu düşünüldü. Bu verilerin literatür ile benzer olduğu gözlemlendi (86,87).

Sonuç olarak, bu çalışmada ovaryumlar üzerinde gonadotoksik etkisi bilinen siklofosfamidin, ovaryumda gözlenen doku hasarı ve folikül kaybını arttırdığını ve ferulik asit tedavisi ile doku hasarının azaldığı ve folikül rezervinin korunduğu gösterilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda siklofosfamid ile oluşturulan POY modelinde ferulik asidin ovaryum üzerindeki morfolojik, antiapoptotik ve antioksidan özellikleri histokimyasal, immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak ilk kez incelendi. Elde ettiğimiz verilerde ferulik asidin antikanserojen bir ajan olan siklofosfamide karşı folikül rezervini koruyucu, doku hasarını azaltıcı, antiapoptotik ve antioksidan özellikleri olduğunu gözlemledik.

Antiikanserojen ajanların oluşturduğu ovaryan yetmezlik ve bunun sonucu karşımıza çıkan erken menapozun meydana getirdiği komplikasyonlar ve infertiliteye karşı ferulik asidin tedavi edici etkisi olabileceği ancak moleküler çalışmalarla bu bilgilerin desteklenmesi gerektiği düşünüldü.

7. KAYNAKLAR

1. Vander Borcht M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem.* 2018; 62: 2-10.
2. Laven JSE. Primary Ovarian Insufficiency. *Semin Reprod Med.* 2016; 34 (4): 230–4.
3. Chand AL, Harrison CA, Shelling AN. Inhibin and premature ovarian failure. *Hum Reprod Update.* 2010; 16 (1): 39–50.
4. Kumar N, Manesh I. Premature Ovarian Insufficiency: Aetiology and Long-Term Consequences. *Women's Health.* 2017; 3 (2): 45–58.
5. Rebar RW, Keator CS. Expanding our knowledge of premature ovarian insufficiency. *Fertil Steril.* 2021; 115 (2): 328–9.
6. Kawamura K, Kawamura N, Hsueh AJW. Activation of dormant follicles: A new treatment for premature ovarian failure? *Cur Opin Obstet Gynecol.* 2016; 28 (3): 217–22.
7. Chon SJ, Umair Z, Yoon MS. Premature Ovarian Insufficiency: Past, Present, and Future. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9: 672890.
8. Zhang X, Han T, Yan L, Jiao X, Qin Y, Chen ZJ. Resumption of Ovarian Function After Ovarian Biopsy/Scratch in Patients With Premature Ovarian Insufficiency. *Reprod Sci.* 2019; 26 (2): 207–13.
9. Ozcan P, Takmaz T, Tok OE, Islek S, Yigit EN, Ficicioglu C. The protective effect of platelet-rich plasma administrated on ovarian function in female rats with Cy-induced ovarian damage. *J Assist Reprod Genet.* 2020; 37 (4): 865–73.
10. Ayna A, Özbolat SN, Darendelioglu E. Quercetin, chrysin, caffeic acid and ferulic acid ameliorate cyclophosphamide-induced toxicities in SH-SY5Y cells. *Mol Biol Rep.* 2020; 47 (11): 8535–43.
11. Brodsky RA. High dose cyclophosphamide treatment for autoimmune disorders. *ScientificWorldJournal.* 2002; 28 (2): 1808–15.
12. Bayramoğlu G. Sıçanlarda siklofosfamid ile oluşturulmuş oksidatif strese karşı silimarinin olası koruyucu etkileri [doktora tezi]. Eskişehir: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi; 2007.
13. Emadi A, Jones RJ, Brodsky RA. Cyclophosphamide and cancer: Golden anniversary. *Nat Rev Clin Oncol.* 2009; 6 (11): 638–47.
14. Gülfidan Coşkun, Hülya Özgür. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması [İnternet]. 2011 [Erişim tarihi 1 Eylül 2011]. Erişim adresi: https://dergipark.org.tr/tr/pub/aktd/issue/2215/29409#article_cite
15. Fleisher TA. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1997; 78 (3): 249–50.
16. Motyl T, Grzelkowska K, Zimowska W, Skierski J, Wareński P, Płoszaj T ve ark. Expression of bcl-2 and box in TGF-β1-induced apoptosis of L1210 leukemic cells. *Eur J Cell Biol.* 1998; 75 (4): 367–74.
17. Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: Disease message and

therapeutic target potentials. *Biosci Rep.* 2019; 18,39 (1): BSR20180992.

18. Li N, Liu L. Mechanism of resveratrol in improving ovarian function in a rat model of premature ovarian insufficiency. *J Obstet Gynaecol Res.* 2018; 44 (8): 1431–8.
19. Hoetelmans R, Van Slooten HJ, Keijzer R, Erkeland S, Van de Velde CJ, Dierendonck JH. Bcl-2 and Bax proteins are present in interphase nuclei of mammalian cells. *Cell Death Differ.* 2000; 7 (4): 384-92.
20. Dhaliwal J, Dhaliwal N, Akhtar A, Kuhad A, Chopra K. Beneficial effects of ferulic acid alone and in combination with insulin in streptozotocin induced diabetic neuropathy in Sprague Dawley rats. *Life Sci.* 2020; 15; 255: 117856.
21. Du L, He F, Kuang L, Tang W, Li Y, Chen D. ENOS/iNOS and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the placentas of patients with preeclampsia. *J Hum Hypertens.* 2017; 31 (1): 49–55.
22. Spiller F, Oliveira Formiga R, Fernandes da Silva Coimbra J, Alves-Filho JC, Cunha TM, Cunha FQ. Targeting nitric oxide as a key modulator of sepsis, arthritis and pain. *Nitric Oxide.* 2019; 1; 89: 32–40.
23. Elhessy HM, Eltahry H, Erfan OS, Mahdi MR, Hazem NM, El-Shahat MA. Evaluation of the modulation of nitric oxide synthase expression in the cerebellum of diabetic albino rats and the possible protective effect of ferulic acid. *Acta Histochem.* 2020; 122 (8): 151633.
24. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001; 1;357(Pt 3): 593-615.
25. Mantawy EM, Said RS, Abdel-Aziz AK. Mechanistic approach of the inhibitory effect of chrysin on inflammatory and apoptotic events implicated in radiation-induced premature ovarian failure: Emphasis on TGF- β /MAPKs signaling pathway. *Biomed Pharmacother.* 2019; 109: 293–303.
26. Mahmoud AM, Hussein OE, Hozayen WG, Bin-Jumah M, Abd El-Twab SM. Ferulic acid prevents oxidative stress, inflammation, and liver injury via upregulation of Nrf2/HO-1 signaling in methotrexate-induced rats. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2020; 27 (8): 7910–21.
27. Zduńska K, Dana A, Kolodziejczak A, Rotsztejn H. Antioxidant properties of ferulic acid and its possible application. *Skin Pharmacol Physiol.* 2018; 31 (6): 332–6.
28. Li D, Rui Y-X, Guo S-D, Luan F, Liu R, Zeng N. Ferulic acid: A review of its pharmacology, pharmacokinetics and derivatives. *Life Sci.* 2021; 1; 284: 119921.
29. Bento-Silva A, Vaz Patto MC, do Rosário Bronze M. Relevance, structure and analysis of ferulic acid in maize cell walls. *Food Chem.* 2018; 25; 246: 360–78.
30. Ross MH, Pawlina W. Dişi Üreme Sistemi. Editör Barış Baykal. *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas.* 6. Baskıdan çeviri. Ankara: Palme Yayıncılık; 2014. 830–840.
31. Mescher AL. *The Female Reproductive System.* Junqueira's Basic Histology Text and Atlas. 13. Baskı. McGraw-Hill Medical; 2013. 449
32. Anormal Kanamalarda Tanı ve Kanamalar [İnternet]. Erişim adresi:

33. Sadler TW. Ürogenital sistem. Editör A. Can Başaklar. Medikal Embriyoloji. 13. Baskıdan çeviri. Ankara: Palme Yayıncılık; 2017. 261–263.
34. Yıldırım M. Kadın üreme sistemi. İnsan Anatomisi. 3. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 1997. 194–195.
35. Şimşek C. Genital sistem. Anatomi. 3. Baskı. Ankara: Atlas Kitapçılık; 2006. 292.
36. Şeftalioğlu A. Erkek ve dişi genital sistemi. Genel İnsan Embriyolojisi. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi; 1991. 38–53.
37. Bedri N. Juvenil dönemde yüksek fruktoz içerikli diyetle beslenmenin perilipin ekspresyonu üzerinden polikistik over sendromu gelişimi ile ilişkisi [Yüksek lisans tezi]. İstanbul Medipol Üniversitesi; 2016.
38. Eroschenko VP. Female Reproductive System. diFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations. 11. Baskı. Lippincott Williams & Wilkins; 2007. 439.
39. Sadler TW. Urogenital system. Langman's Medical Embryology. 12. Baskı. Lippincott Williams & Wilkins; 2012. 29.
40. Eşrefoğlu M. Dişi genital sistemi. Histoloji Atlası. İstanbul: İstanbul Tıp Kitapevleri; 2018. 318.
41. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Dişi üreme sistemi. Aytekin Y, Solakoğlu S, Ahışhalı B, Editörler. Temel Histoloji. 8. Baskıdan çeviri. İstanbul: Barış Kitapevi; 1998. 423–431.
42. Erkoçak A. Genital sistemi. Özel Histoloji. 5. Baskı. İzmir: Rekfo; 1984. 195–200.
43. Paker Ş. Dişi genital sistemi. Histoloji. 2. Baskı. Uludağ Üniversitesi Basımevi; 1993. 38–42.
44. Starc A, Trampuš M, Pavan Jukić D, Rotim C, Jukić T, Polona Mivšek A. Infertility and Sexual Dysfunctions: A Systematic Literature Review. Acta Clin Croat. 2019; 58 (3): 508–15.
45. Laven JSE. Primary Ovarian Insufficiency. Semin Reprod Med. 2016; 34 (4): 230–4.
46. Kawamura K, Kawamura N, Hsueh AJW. Activation of dormant follicles: A new treatment for premature ovarian failure? Curr Opin Obstet Gynecol. 2016; 28 (3): 217–22.
47. Lin J, Li X-L, Song H, Li Q, Wang M-Y, Qiu X-M ve ark. A general description for Chinese medicine in treating premature ovarian failure. Chin J Integr Med. 2017; 23 (2): 91–7.
48. Zhang H, Luo Q, Lu X, Yin N, Zhou D, Zhang L ve ark. Effects of hPMSCs on granulosa cell apoptosis and AMH expression and their role in the restoration of ovary function in premature ovarian failure mice. Stem Cell Res Ther. 2018; 31;9 (1): 20.
49. Sullivan SD, Sarrel PM, Nelson LM. Hormone replacement therapy in young

women with primary ovarian insufficiency and early menopause. *Fertil Steril*. 2016; 106 (7): 1588–99.

50. Dinçel GÇ. Patolojik Apoptozis Ve Tanı Yöntemleri [İnternet]. 2016 [Erişim tarihi 1 Ocak 2016]. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/gumussagbil/issue/23825/253820>

51. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35 (4): 495–516.

52. Derici MK, Demirel-Yilmaz E. Nitrik oksitin kanser gelişimi ve metastaz üzerine etkileri [İnternet]. 2017 [Erişim tarihi 1 Haziran 2017]. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/thdbd/issue/64016/968502>

53. Boehm EM, Gildenberg MS, Washington MT. The Many Roles of PCNA in Eukaryotic DNA Replication. *Enzymes*. 2016; 39: 231–54.

54. Delkhosh A, Delashoub M, Tehrani AA, Bahrami AM, Niazi V, Shoorei H ve ark. Upregulation of FSHR and PCNA by administration of coenzyme Q10 on cyclophosphamide-induced premature ovarian failure in a mouse model. *Journal of Biochem Mol Toxicol*. 2019; 33 (11): e22398.

55. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010; 4 (8): 118–26.

56. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*. 2005; 38 (12): 1103–11.

57. 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 (4): 277–85.

58. Shoaibinobarian N, Eslamian G, Mirmohammadali SN, Rouhani S, Noormohammadi M, Malek S. Dietary total antioxidant capacity and risk of polycystic ovary syndrome: A case-control study. *Int J Fertil Steril*. 2021.

59. Xiao GY, Cheng CC, Chiang YS, Cheng WTK, Liu IH, Wu SC. Exosomal miR-10a derived from amniotic fluid stem cells preserves ovarian follicles after chemotherapy. *Sci Rep*. 2016; 16; 6: 23120.

60. Kim JK, Park SU. A recent overview on the biological and pharmacological activities of ferulic acid. *EXCLI J*. 2019; 5; 18: 132–8.

61. Kassab RB, Lokman MS, Daabo HMA, Gaber DA, Habotta OA, Hafez MM ve ark. Ferulic acid influences Nrf2 activation to restore testicular tissue from cadmium-induced oxidative challenge, inflammation, and apoptosis in rats. *J Food Biochem*. 2020; 44 (12): e13505.

62. Asano T, Matsuzaki H, Iwata N, Xuan M, Kamiuchi S, Hibino Y ve ark. Protective effects of ferulic acid against chronic cerebral hypoperfusion-induced swallowing dysfunction in rats. *Int J Mol Sci*. 2017; 18 (3): 550.

63. Ren Z, Li Y, Zhang R, Li Y, Yang Z, Yang H. Ferulic acid exerts neuroprotective effects against cerebral ischemia/reperfusion-induced injury via antioxidant and anti-apoptotic mechanisms in vitro and in vivo. *Int J Mol Med*. 2017; 40 (5): 1444–56.

64. Zhang Q, Bu S, Sun J, Xu M, Yao X, He K ve ark. Paracrine effects of human amniotic epithelial cells protect against chemotherapy-induced ovarian damage. *Stem Cell Res Ther.* 2017; 28; 8 (1): 270.
65. Nankar R, Prabhakar PK, Doble M. Hybrid drug combination: Combination of ferulic acid and metformin as anti-diabetic therapy. *Phytomedicine.* 2017; 15; 37: 10–3.
66. Nguyen QN, Liew SH, Findlay JK, Hickey M, Hutt KJ, Zerafe N. Cisplatin- and cyclophosphamide-induced primordial follicle depletion is caused by direct damage to oocytes. *Mol Hum Reprod.* 2019; 1; 25 (8): 433-44.
67. Bellusci G, Mattiello L, Iannizzotto V, Ciccone S, Maiani E, Villani V ve ark. Kinase-independent inhibition of cyclophosphamide-induced pathways protects the ovarian reserve and prolongs fertility. *Cell Death Dis.* 2019; 10 (10): 726.
68. Jang H, Lee OH, Lee Y, Yoon H, Chang EM, Park M ve ark. Melatonin prevents cisplatin-induced primordial follicle loss via suppression of PTEN/AKT/FOXO3a pathway activation in the mouse ovary. *J Pineal Res.* 2016; 60 (3): 336–47.
69. Kalich-Philosoph L, Roness H, Carmely A, Fishel-Bartal M, Ligumsky H, Paglin S ve ark. Cyclophosphamide triggers follicle activation and "burnout "; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. *Sci Transl Med.* 2013; 15; 5 (185): 185ra62.
70. Chang EM, Lim E, Yoon S, Jeong K, Bae S, Lee DR ve ark. Cisplatin induces overactivation of the dormant primordial follicle through PTEN/AKT/FOXO3a pathway which leads to loss of ovarian reserve in mice. *PLoS ONE.* 2015; 14; 10 (12): e0144245.
71. Liu J, Wang W, Chen L, Li Y, Zhao S, Liang Y. Chemoprotective effect of syringic acid on cyclophosphamide induced ovarian damage via inflammatory pathway. *J Oleo Sci.* 2021; 70 (5): 675–83.
72. McCloskey CW, Cook DP, Kelly BS, Azzi F, Allen CH, Forsyth A ve ark. Metformin abrogates age-associated ovarian fibrosis. *Clin Cancer Res.* 2020; 26 (3): 632–42.
73. Melekoglu R, Ciftci O, Eraslan S, Cetin A, Basak N. Beneficial effects of curcumin and capsaicin on cyclophosphamide-induced premature ovarian failure in a rat model. *J Ovarian Res.* 2018; 26; 11 (1): 33.
74. Oktem O, Oktay K. A novel ovarian xenografting model to characterize the impact of chemotherapy agents on human primordial follicle reserve. *Cancer Res.* 2007; 1; 67 (21): 10159–62.
75. Koyama H, Wada T, Nishizawa Y, Iwanaga T, Aoki Y. Cyclophosphamide-induced ovarian failure and its therapeutic significance in patients with breast cancer. *Cancer.* 1997; 39 (4): 1403-9.
76. Kaya H, Desdicioglu R, Sezik M, Ulukaya E, Ozkaya O, Yilmaztepe A ve ark. Does sphingosine-1-phosphate have a protective effect on cyclophosphamide- and irradiation-induced ovarian damage in the rat model? *Fertil Steril.* 2008; 89 (3): 732–5.

77. Zhao YT, Yin H, Hu C, Zeng J, Shi X, Chen S ve ark. Tilapia skin peptides restore cyclophosphamide-induced premature ovarian failure via inhibiting oxidative stress and apoptosis in mice. *Food Funct.* 2022; 7; 13 (13): 1668-79.
78. Nie Z, Zhang L, Chen W, Zhang Y, Wang W, Hua R ve ark. The protective effects of resveratrol pretreatment in cyclophosphamide-induced rat ovarian injury: an vivo study. *Gynecol Endocrinol.* 2021; 37 (10): 914-9.
79. Barekati Z, Golkar-Narenji A, Totonchi M, Radpour R, Gourabi H. Effects of amifostine in combination with cyclophosphamide on female reproductive system. *Reprod Sci.* 2012; 19 (5): 539-46.
80. Xu H, Xia Y, Qin J, Xu J, Li C, Wang Y. Effects of low intensity pulsed ultrasound on expression of B-cell lymphoma-2 and BCL2-Associated X in premature ovarian failure mice induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Reprod Biol Endocrinol.* 2021; 20; 19 (1): 113.
81. Sancho M, Ferrero JJ, Triguero D, Torres M, Garcia-Pascual A. Altered neuronal and endothelial nitric oxide synthase expression in the bladder and urethra of cyclophosphamide-treated rats. *Nitric Oxide.* 2014; 30; 39: 8-19.
82. Diaconeasa Z, Leopold L, Rugină D, Ayvaz H, Socaciu C. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin rich extracts from blueberry and blackcurrant juice. *Int J Mol Sci.* 2015; 22; 16 (2): 2352-65.
83. Rhode J, Fogoros S, Zick S, Wahl H, Griffith KA, Huang J ve ark. Ginger inhibits cell growth and modulates angiogenic factors in ovarian cancer cells. *BMC Complement Altern Med.* 2007; 20; 7: 44.
84. Özel F, Kiray M, Göker A, Aydemir S, Mıcılı SC. Protective effect of alpha lipoic acid on 4-vinylcyclohexene diepoxide induced primary ovarian failure in female rats. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2020; 59 (2): 293-300.
85. Abogresha NM, Mohammed SS, Hosny MM, Abdallah HY, Gadallah AM, Greish SM. Diosmin mitigates cyclophosphamide induced premature ovarian insufficiency in rat model. *Int J Mol Sci.* 2021; 22 (6): 3044.
86. Cengiz M, Kutlu HM, Peker Cengiz B, Ayhancı A. Escin attenuates oxidative damage, apoptosis and lipid peroxidation in a model of cyclophosphamide-induced liver damage. *Drug Chem Toxicol.* 2022; 45 (3): 1180-7.
87. Çelebi F, Cengiz İ, Cınar A, Şengül E. Siklofosfamidle İndüklenmiş Ratlarda Serbest Radikaller ve Antioksidanlar Üzerine Naringinin Protektif Etkileri. 2020 [Erişim tarihi 31 Aralık 2020]. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/ataunivbd/issue/59343/700017>

88. EKLER

88.1. Ek-1 Etik Kurul Onayı

 DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Gündem No/Toplantı No/Yıl : 10/07/2022 35340, Inciraltı, İzmir-232 4122234
Toplantı Tarihi 08 Haziran 2022

Sayın, Doç Dr Serap Cilaker Mıçılı
DEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

62/2021 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Prematüre Ovaryan Yetmezlik (POY) Modelinde Ferulik Asidin Apoptoz Üzerine Etkilerinin İncelenmesi" isimli projede Zahide Çavdar, Cemre Ural, Nurgün Karaman'ın araştırmacı olduğu projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof. Dr. Usman YILMAZ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı	Prof. Dr. Nazan ÜYSAL HÂRZADIN Başkan Vekili
Prof. Dr. Ali Necati GÖKMEN Üye	Prof. Dr. Hatice Nur OLGUN Üye
Prof. Dr. Nergiz DURMUŞ SÜTÇİDELER Üye	Prof. Dr. Pembe UYGUN KEŞKİNOĞLU Danışman
Prof. Dr. Gamze ÇAPA KAYA Üye	Prof. Dr. Çetin PEKÇETİN Üye (Toplantıya katılmadı)
Prof. Dr. Ayşe Aydan ÖZKUTUK Üye	Prof. Dr. Pınar AKAN Üye (araştırmacı)
Öğr. Gör. Dr. Şevim KANDİŞ Üye	Doç. Dr. Kadri KUŞUOĞLU Üye
Öğr. Gör. Dr. Aslı ÇELİK Üye	Vet. Hekim Adnan SERPEN Üye
Zehra KINAM Üye	

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde bold karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

88.2. Ek-2 Özgeçmiş



NURŞİN KARAMAN

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi
Telefon
E-posta
İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

01 Şubat 2019 - Şu Anda (3 yıl 6 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (YL)
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.67 / 4.0

01 Eylül 2013 - 01 Temmuz 2018 (4 yıl 11 ay)
Lisans, Anadolı/Normal Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN FAKÜLTESİ, BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
Diploma Numarası: 2017/04/0579
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 75.82 / 100.0

Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Şubat 2019 - Şu Anda (3 yıl 6 ay) (Tam Zamanlı)
DİĞER, YÜKSEK LİSANS ÖĞRENCİSİ, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
İdari Görev: DİĞER

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

ALMANCA (Okuma: Başlangıç, Yazma: Başlangıç, Konuşma: Başlangıç)

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Anahtar Kelimeler

Histoloji ve Embriyoloji
Siklofosfamid
Ferülik Asit
Ovaryum Follikülleri

Ar-Ge Yetkinlik

Sayfa 1 / 2

Oluşturma Zamanı: 26 Temmuz 2022 14:16:01

Projeler

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Ratlarda bitkisel veya hayvansal kaynaklı yağ ve protein alımının intraabdominal basınç artışı sonrası vasküler yapılar, batin içi organlar ve kan biyokimyasal değerleri üzerine etkisinin araştırılması, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: bap (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş) (Yurt içi) (Devam ediyor) .

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Ön çapraz bağ rekonstrüksiyonu sırasında tünel drilleme devir hızının tünel genişlemesi ve greft iyileşmesine etkisinin incelenmesi, Yürütülen Kuruluş: BAP (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), Destek Alınan Kuruluş: BAP (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş) (Yurt içi) (Devam ediyor) .

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Sıçan Modelinde Radyoterapiye Bağlı Oluşturulacak Cilt Hasarının Tedavisinde Pioglitazon ve Yağ Greftinin Etkilerinin Karşılaştırılması, Yürütülen Kuruluş: dokuz eylül tıp fakültesi (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), Destek Alınan Kuruluş: bap (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş) (Yurt içi) , 01 Haziran 2021, 01 Eylül 2021.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Panelistlik /İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0