

T.C
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA METOTREKSAT İLE OLUŞTURULAN
OVARYAN DOKU HASARI ÜZERİNE KURKUMİNİN
ETKİLERİ

NESİBE KARAOLUK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ METE KEÇECİ

ZONGULDAK

2022

T.C
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA METOTREKSAT İLE OLUŞTURULAN
OVARYAN DOKU HASARI ÜZERİNE KURKUMİNİN
ETKİLERİ

NESİBE KARAOLUK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ METE KEÇECİ

ZONGULDAK

2022

ÖNSÖZ

Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda almış olduğum lisansüstü eğitimim süresince bana bilgi ve tecrübelerinin yanı sıra sabır ve anlayışlarını esirgemeyen başta tez danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mete KEÇECİ'ye, anabilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Meryem AKPOLAT FERAH'a ve bölüm hocalarımızdan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Habib KHOSVAGHTI'ye sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tez projemin deneysel sürecinde vermiş olduğu desteklerden dolayı Sayın Vet. Hekim Osman CENGİL'e ayrıca teşekkür ederim. Tez yazım ve verilerin analizi sürecinde bilgi ve tecrübeleriyle desteğini esirgemeyen Sayın Öğr. Gör. Salih ERDEM'e teşekkür ederim.

Akademik eğitimim süresince beni teşvik edip yönlendiren ve manevi desteklerini hep hissettiren biricik aileme, tüm zorlu süreçlerimde sevgisini ve desteğini hiç esirgemeyen çalışma arkadaşım Mine ÇAKIR'a ve ders dönemimde birlikte olmaktan mutluluk duyduğum tüm arkadaşlarıma teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Bu tez çalışması Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2021-98210206-01).

Nesibe KARAOLUK
ZONGULDAK, 2022

ÖZET

Nesibe Karaoluk, Sıçanlarda Metotreksat İle Oluşturulan Ovaryan Doku Hasarı Üzerine Kurkuminin Etkileri. Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak, 2022

Metotreksat (MTX), bazı kanser ve otoimmün hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir folik asit antagonistidir. Artan konsantrasyonlar ve kronik MTX kullanımı DNA sentezi inhibisyonuna ve hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) seviyesinde bir yükselmeye yol açabilir. Çalışmamızda MTX kullanan hastaların oksidatif strese bağlı folikülogenez sürecinde meydana gelen değişiklikler ve bu süreçte güçlü bir antioksidan olan kurkuminin etkilerini araştırmak amaçlanmıştır. Bu amaçla 32 adet Wistar albino türü dişi sıçanlar rastgele seçilerek biri kontrol, üçü deney grubu olmak üzere toplam 4 gruba ayrılmıştır. MTX, 28 gün boyunca 0,35 mg/kg/gün dozda i.p yolla grup 3 ve 4 sıçanlarına uygulanmıştır. Grup 4 denekleri 28 gün boyunca 200 mg/kg/gün, intragastrik gavaj yoluyla verilen kurkumin ile tedavi edilmiştir. Deney sonunda kurban edilen deneklerden elde edilen ovaryum dokusunun histopatolojik analizleri için kesitler alınmış ve ovaryan dokunun ve foliküllerin genel özelliklerini ortaya koyabilmek için Hematoksilen-Eozin (H-E), Periyodik asit-Schiff (PAS) ve Masson'un üçlü boyaması uygulanmıştır. Ayrıca DNA hasarı ve apoptoz belirteci olarak PARP-1 ve p53 ekspresyon düzeyleri immünohistokimyasal yöntemle analiz edilmiştir. Oksidatif stres belirteci olan malondialdehit (MDA) ve majör antioksidanlardan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) analizleri ticari ELISA kitler kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel değerlendirmede parametrik veriler için One way Anova ve post hoc Tukey testi yapılmıştır. Parametrik olmayan verilerin analizi için Kruskal-Wallis varyans analizi kullanılmıştır. Tüm değerlendirmeler için $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir. MTX uygulaması atretik folikül sayısını kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artırmıştır ($p=0.011$). Kurkumin tedavisi atretik folikül sayısını MTX grubuna göre anlamlı düzeyde azaltmıştır ($p=0.043$). Kurkumin tedavisi artmış MDA düzeylerini ($p=0.031$) ve azalan SOD değerlerini ($p=0.005$) MTX grubuna göre anlamlı düzeyde değiştirmiştir. MTX, p53 ve PARP-1 ekspresyonunu grup 1 ($p=0.017$) ve grup 2'ye ($p=0.002$) göre anlamlı düzeyde arttırmış, kurkumin tedavisi PARP-1 ekspresyonunu

MTX grubuna göre ($p=0.025$) anlamlı düzeyde azaltmıştır. Çalışmamızdan ortaya çıkan sonuçlar MTX'in oksidatif stres hasarı mekanizmaları ve DNA sentez inhibisyonu üzerinden folikülogenez üzerinde olumsuz etkilerinin olduğunu ve bu olumsuz etkilerin güçlü bir antioksidan olan kurkumin ile tedavi edilebileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Metotreksat, Kurkumin, Ovaryum, Oksidatif stres, PARP-1, p53



ABSTRACT

Nesibe Karaoluk, The Effects of Curcumin on Methotrexate-induced Ovarian Tissue Damage in Rats. Zonguldak Bülent Ecevit University, Institute of Health Sciences, Department of Histology and Embryology, Master Thesis, Zonguldak, 2022

Methotrexate (MTX) is a folic acid antagonist widely used in the treatment of certain cancers and autoimmune diseases. Increased concentrations and chronic use of MTX can lead to inhibition of DNA synthesis and an elevation of intracellular reactive oxygen species (ROS). In our study, it was aimed to investigate the changes in the folliculogenesis process due to oxidative stress in patients using MTX and the effects of curcumin, a powerful antioxidant, in this process. For this purpose, 32 Wistar albino female rats were randomly selected and divided into 4 groups, one control group and three experimental group. MTX was administered i.p. to rats of groups 3 and 4 at a dose of 0.35 mg/kg/day for 28 days. Group 4 subjects were treated with curcumin at 200 mg/kg/day administered by intragastric gavage for 28 days. At the end of the experiment, sections were taken for histopathological analysis of the ovarian tissue obtained from the sacrificed subjects, and Hematoxylin-Eosin (H-E), Periodic acid-Schiff (PAS) and Masson's triple staining were applied to reveal the general characteristics of the ovarian tissue and follicles. In addition, PARP-1 and p53 expression levels as markers of DNA damage and apoptosis were analyzed by immunohistochemical method. The analyzes of malondialdehyde (MDA), which is an oxidative stress marker, and superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), which are major antioxidant enzymes, were performed using commercial ELISA kits. One way Anova and post hoc Tukey tests were used for parametric data in statistical evaluation. Kruskal-Wallis analysis of variance was used for the analysis of non-parametric data. A value of $p < 0.05$ was considered significant for all evaluations. MTX application significantly increased the number of atretic follicles compared to the control group ($p = 0.011$). Curcumin treatment significantly decreased the number of atretic follicles compared to the MTX group ($p = 0.043$). Curcumin treatment significantly changed the increased MDA levels ($p = 0.031$) and decreased SOD values ($p = 0.005$) compared to the MTX group. MTX significantly increased the expression of p53 and PARP-1 compared to group 1 ($p = 0.017$) and group 2 ($p = 0.002$), and curcumin treatment

significantly decreased PARP-1 expression compared to the MTX group ($p=0.025$). The results of our study showed that MTX has negative effects on folliculogenesis through oxidative stress damage mechanisms and DNA synthesis inhibition, and these negative effects can be treated with curcumin, a powerful antioxidant.

Keywords: Methotrexate, Curcumin, Ovary, Oxidative stress, PARP-1, p53



İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY:.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
TABLO DİZİNİ.....	xi
ŞEKİL DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Ovaryumların Yapısı ve İşlevi	4
2.2. Ovaryum Histolojisi	5
2.2.1. Ovaryum korteksi	6
2.2.2. Ovaryum medullası.....	6
2.3. Ovaryum Folliküllerinin Gelişimi (follikülogenezis).....	6
2.3.1. Folikül tipleri	8
2.3.1.1. Primordiyal follikül.....	8
2.3.1.2. Primer follikül	9
2.3.1.3. Sekonder (antral) folikül	11
2.3.1.4. Olgun (tersiyer, graaf) folikül	12
2.3.2. Anti-müllerian hormon (AMH)	13
2.4. Metotraksat.....	15
2.5. Apoptoz	17
2.6. Kurkumin.....	19
2.7. Poli(ADP-riboz) polimeraz (PARP-1)	21
2.8. P53.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Deney Hayvanları ve Deney Grupları	24
3.2. Dokuların Alınması ve Kimyasallar	25
3.3. Histopatolojik Analizler	26
3.4. İmmünohistokimyasal Analizler	27

3.5. Biyokimyasal Analizler	28
3.6. İstatistiksel Analiz	28
4. BULGULAR	29
4.1. Vücut Ağırlıkları	29
4.2. Kurkumin ve MTX Uygulamasının Ovaryum Ağırlıklarına Etkisi	29
4.3. Histopatolojik Bulgular	30
4.3.1. Kurkumin ve MTX uygulamasının folikül sayılarına etkisi	30
4.3.1.1. Kontrol grubuna ait ışık mikroskopik bulgular	32
4.3.1.2. Kurkumine ait ışık mikroskopik bulgular	35
4.3.1.3. Metotreksat grubuna ait ışık mikroskopik bulgular	38
4.3.1.4. Metotreksat+ Kurkumin grubuna ait ışık mikroskopik bulgular ..	42
4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular	46
4.4.1. Kurkumin ve MTX uygulamasının p53 ve PARP-1 üzerine etkisi	46
4.4.1.1. PARP-1 için yapılan immünohistokimyasal boyama bulguları	48
4.4.1.2. P53 için yapılan immünohistokimyasal boyama bulguları	48
4.5. Biyokimyasal Bulgular	49
4.5.1. Kurkumin ve MTX uygulamasının MDA, SOD ve CAT düzeylerine etkisi	49
4.5.2. Kurkumin ve MTX uygulamasının serum AMH düzeylerine etkisi	52
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇLAR	60
7. KAYNAKLAR	61
8. EKLER.....	76
Ek 1: Etik Kurul Onayı.....	76
9. ÖZGEÇMİŞ.....	77

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DHFR	: Dihidrofolat Redüktaz
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
FSH	: Folükül Uyarıcı Hormon
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
H+E	: Hematoksilen+Eozin
KAT	: Katalaz
LH	: Luteinizan Hormon
MDA	: Malondialdehit
Mg	: Miligram
mL	: Mililitre
MnSOD	: Manganez süperoksit dismutaz
MTX	: Metotreksat
Nf-kB	: Nuclear Factor kappa B
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksik Sentaz
NQO1	: NAD(P)H: kinon oksiredüktaz
PARP	: Poly ADP Ribose Polymerase
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
THF	: Tetrahidrofolik Asit
ZP	: Zona Pellucida
μ	: Mikron
β	: Beta

TABLO DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1. Ovaryan foliküllerin sınıflandırılmasında kullanılan kriterler	26
2. Folikül sayılarının gruplar arası karşılaştırılması.....	31
3. p53 ve PARP-1 gruplar arası karşılaştırılması	46
4. Doku MDA, SOD ve CAT gruplar arası karşılaştırılması	50



ŞEKİL DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1. Dişi iç üreme organları	5
2. Follikülogenezis aşamaları	7
3. Primordiyal folikül	9
4. Unilaminar (tek katmanlı) primer folikül.....	10
5. Multilaminar (preantral, çok katmanlı) primer folikül.....	11
6. Sekonder (antral) folikül	12
7. Olgun (tersiyer, graaf) folikül	13
8. Metotreksatın kimyasal formülü	15
9. Metotreksatın etki mekanizması	16
10. Apoptoz mekanizması	19
11. <i>Curcuma longa</i> L. Bitkisi ve Kurkuminoidlerin Kimyasal Yapısı	20
12. Deney Grupları.....	25
13. Vücut ağırlıklarının karşılaştırılması	29
14. Sağ ovaryumun vücut ağırlığına oranı	30
15. Sol ovaryumun vücut ağırlığına oranı.....	30
16. Primordiyal folikül sayılarının karşılaştırılması.....	31
17. Atretik folikül sayılarının karşılaştırılması	32
18. Kontrol grubu ovaryumunda korpus luteum ve antral folikül.	33
19. Kontrol grubu ovaryumunda primer folikül.....	34
20. Kontrol grubu ovaryumunda erken antral folikül.	34
21. Kontrol grubu ovaryumunda primordial folikül.	35
22. Kurkumin grubu ovaryumunda primer folikül ve tersiyer folikül.	36
23. Kurkumin grubu ovaryumunda primer folikül ve primordial folikül..	37
24. Kurkumin grubu ovaryumunda germinal epitel altında primer folikül ve primordial folikül..	37
25. Kurkumin grubu ovaryumunda kortikal stroma içerisinde primordial folikül topluluğu.	38
26. MTX grubu ovaryumunda sekonder foliküller.	39
27. MTX grubu ovaryumunda atretik folikül.....	40
28. MTX grubu ovaryumunda atretik folikülde apoptotik cisimcikler	40
29. MTX grubu ovaryumunda erken evre atretik primordiyal folikül..	41

30. MTX grubu ovaryumunda atretik primordial folikül topluluğu.	41
31. MTX grubu ovaryumunda adiposit.....	42
32. MTX+KUR grubu ovaryumunda atretik ve sekonder folikül.....	43
33. MTX+KUR grubu ovaryumunda normal görünümlü sekonder folikül.....	43
34. MTX+KUR grubu ovaryumunda primer ve sekonder folikül.	44
35. MTX+KUR grubu ovaryumunda erken antral ve primordial folikül.	44
36. MTX+KUR grubu ovaryumunda normal görünümlü germinal epitel ve primordial folikül.	45
37. Tüm gruplara ait ovaryum kesitlerinin PAS boyanma görüntüleri..	45
38. p53 immunohistokimyasal ifadesinin gruplar arası karşılaştırılması.....	47
39. PARP-1 immunohistokimyasal ifadesinin gruplar arası karşılaştırılması	47
40. Tüm gruplara ait ovaryum kesitlerinde PARP-1 için yapılan immünohistokimyasal boyama görüntüleri.....	48
41. Tüm gruplara ait ovaryum kesitlerinde P53 için yapılan immünohistokimyasal boyama görüntüleri.	49
42. MDA düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması.....	50
43. SOD düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması	51
44. CAT düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması	51
45. Serum AMH düzeylerinin karşılaştırılması	52

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Memeli ovaryumları üreme yaşamları boyunca foliküllerin büyük çoğunluğunun etkin bir şekilde elimine edildiği son derece dinamik bir organdır. Memeli ovaryumlarında foliküler büyümeyi ve atreziyi düzenleyen mekanizmaların hormonlar (gonadotropinler) tarafından sistemik olarak düzenlenmelerinin yanı sıra büyüme faktörleri, sitokinler ve hücre içi proteinler tarafından da düzenlendiği açıklığa kavuşturulmuştur. Özellikle granüloza hücrelerinin, foliküler büyüme ve gelişim için gerekli moleküllere hizmet etmenin yanı sıra foliküler atrezi ile sonuçlanan apoptotik bir süreçle kendilerini öldürerek foliküllerin kaderine karar vermede önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir.

Metotreksat (MTX), romatoid artrit, kanser ve bazı otoimmün hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan folik asit antagonistidir ve dihidrofolat redüktaz enzim aktivitesini baskılayarak timidilat ve pürin sentezini bloke eder (1). Artan konsantrasyonlar ve sürekli MTX maruziyetinin hem DNA hem de RNA sentezini ve ayrıca ikincil protein üretimini inhibe ettiği ve dolayısıyla hem G (1, 2 veya 0) hem de S fazlarındaki hücreler için öldürücü olduğu gösterilmiştir (2). MTX kullanımının gastrointestinal sistem bozuklukları, hepatoksitite, kemik iliği süpresyonu ve ovaryumlarda ciddi yan etkilerinin olduğu bilinmektedir. Ayrıca MTX, DNA sentezi inhibisyonu, antioksidanların tükenmesi ve mitokondriyal disfonksiyon nedeniyle hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) seviyesinde bir yükselmeye yol açabilir ve overlerde histopatolojik değişikliklere neden olabilir. Metotraksatın bu olumsuz etkilerinde bir antioksidan takviyesinin, MTX ile uyarılan sitotoksitide ovaryum ve oositler üzerindeki histopatolojik etkisini önleyebileceğini düşündürmektedir.

Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP-1), ADP-ribozun hedef proteinlere transferini katalize eden enzimler ailesidir. PARP-1 ailesi kromatin yapısının düzenlenmesi, transkripsiyon, replikasyon, rekombinasyon ve DNA onarımı dahil olmak üzere çeşitli hücresel işlemlerde önemli bir rol oynar (3). PARP-1, DNA hasarı yanıtında yer alan, DNA ipliği kırılmalarını tespit eden ve ilk yanıt veren ayrıca genomik bütünlüğün korunmasında rol oynayan bir nükleer DNA onarım enzimidir (4–7). p53 tümör baskılayıcının ana işlevi DNA'daki hasar kalıtsal mutasyona dönüştürülmeden önce anormal veya strese maruz kalan hücreleri kısıtlamaktır. p53, DNA hasarının indüksiyonunun sonucu olarak bir post-translasyonel düzenleyici

mekanizma tarafından regüle edilir. Ayrıca, G1 fazı blokajını indükleyen ve böylece DNA onarımını sağlayan bir transkripsiyon faktörüdür (7,8).

Oksidatif stres, antioksidan savunma sistemi yoluyla ROS üretimi ve uzaklaştırılması arasındaki dengesizliğin bir sonucudur (9,10). Serbest radikal toksisitesini azaltmak için hücre ve doku düzeyinde endojen antioksidanlar bulunmaktadır. Bunlar, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz, glutatyon S-transferaz, katalaz (KAT), tiyoredoksin redüktaz, peroksi redoksinler (Prx) ve NAD(P)H: kinon oksiredüktaz (NQO1) gibi antioksidan enzimlerdir. Antioksidan savunma sistemi kapasitesinin aşılması ve süperoksit radikalının ortamda aşırı bulunması ROS oluşmasıyla sonuçlanır. Lipit peroksidasyonu, memeli hücre zarlarında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehytler, hidroksi yağ asitleri, etan, pentan, malondialdehit (MDA) gibi çeşitli ürünlere yıkılması tepkimesidir. Endojen ROS, DNA hasarının ana kaynağıdır ve kromozom kararsızlığına, mutasyonlara ve delesyonların birikmesine katkıda bulunan önemli bir faktördür (11). Düşük ROS seviyelerinde p53, hücrenin hayatta kalmasını sağlayan serbest radikalleri ortadan kaldırmak için antioksidan aktivite sergiler, ancak yüksek oksidatif strese yanıt olarak hücre ölümünü indükleyebilir (12). Son yapılan çalışmalar bazı dokularda ROS'un aşırı üretiminin ve antioksidan enzimlerin azalmasının MTX'in etkileriyle ilişkili olduğunu bulmuştur (13–15). MTX, lipid peroksidasyonunun ana ürünü olan malondialdehit (MDA) düzeylerini artırır. Lipid peroksidasyonu, membran geçirgenliğinde azalmaya, nörotransmitter-reseptör etkileşiminde azalmaya hücre apoptozunun indüklenmesine neden olur (16–18).

Kurkumin, *Curcuma longa* bitkisinin rizomlarından üretilen doğal polifenol bir bileşiktir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar Kurkuminin antikanser, antiviral, antiartritik, antiamiloid özelliklerinin yanı sıra güçlü bir antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerinin olduğunu da göstermiştir (8,19–22). Kurkuminin bu tedavi edici etkilerinin moleküler mekanizmasında transkripsiyon faktörleri (Nf-kB), endotel hücre büyüme faktörleri, inflamatuvar sitokinler ve protein kinazların aracılık ettiği bildirilmiştir (23–25). Kurkumin ile yapılan bir çalışmada benzopren ile indüklenen P53 aracılı apoptoziste kurkumin'in resvaratrol ile sinerjistik etki gösterdiği, proapoptotik proteinlerin ekspresyonlarını (cleaved caspase 3, 8 ve 9, cleaved PARP-1, Apaf1, FasL, tBid.) ve P53 aracılı germ hücresi apoptozu ile P53 ilişkili gen ürünü ekspresyonlarını (Fas, FasL, Bax, Bcl2, ve Apaf1) azalttığı gösterilmiştir (26).

Kurkumin yapısındaki β -diketon grubu nedeniyle antioksidan olarak kabul edilir. Deneysel hayvan çalışmaları Kurkuminin süperoksit radikallerini, hidrojen peroksit ve nitrik oksit radikallerini inhibe ederek oksidatif stres hasarını engellediği bildirilmiştir (19,21,27,28).

Yapılan çalışmalar kronik MTX kullanımının ROS üretimini aşırı arttırdığını ve antioksidan enzim seviyelerini azaltarak oksidatif stres hasarına neden olduğunu göstermiştir.

Bizde çalışmamızda MTX kullanan hastaların oksidatif strese bağlı folikülogenez sürecini ve bu süreçte güçlü bir antioksidan olan kurkuminin etkilerini araştırmayı amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryumların Yapısı ve İşlevi

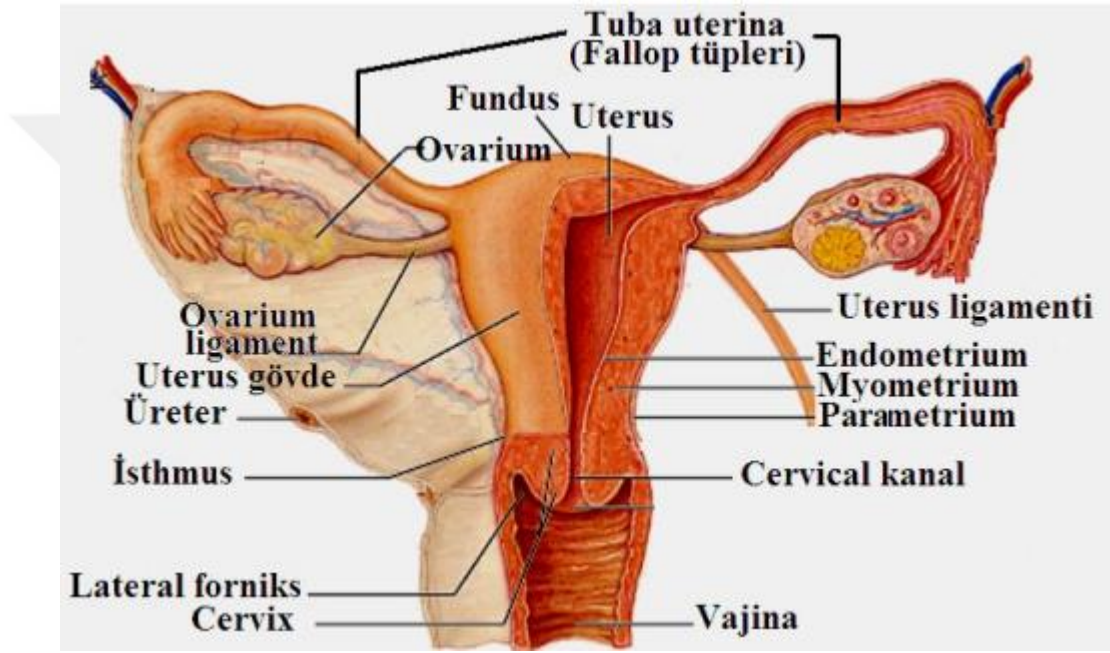
Dişi üreme sistemi, gonadlardan (ovaryumlar), fallop tüplerinden, uterus, serviks, vajina, dış genital bölge ve meme bezlerinden oluşur ve yüksek beyin merkezlerinin kontrolü altında hipotalamus-hipofiz-gonadal eksen tarafından üretilen hormonlar tarafından kontrol edilir (Şekil 1).

Ovaryumlar, uterusun her iki yanında birer tane olmak üzere üst pelvik boşlukta bulunan organlardır. Fallop tüplerinin uçları doğrudan ovaryumlara bağlanmaz, ancak onlara yakın olan karın boşluğuna açılır. Her fallop tüpünün açıklığı huni şeklindedir ve siliyer epitel ile kaplı parmak benzeri çıkıntılar (fimbriae) ile çevrilidir. Uterus, idrar kesesi ile rektum arasında uzanan içi boş, kalın duvarlı, kaslı bir organdır. Uterus gebelikte fetüsün geliştiği yerdir. Uterusun alt kısmı servikstir ve küçük bir açıklık ile vajinal kanalla rahimden dışarıya açılır.

Ovaryumlar oogenez (fetal dönemde gamet üretimi), oositin olgunlaşması, olgun oositin çıkarılması (yumurtlama) ve dişi steroid hormonlarının (östrojen ve progesteron) yanı sıra peptit hormonu inhibinin salgılanması gibi işlevlere sahiptir. Yumurtlamadan önce ovaryumların oosit ve endokrin fonksiyonlarının olgunlaşması tek bir yapıda, folikülde gerçekleşir. Yumurtlamadan sonra, artık yumurtasız olan folikül, yalnızca endokrin işlevi olan bir korpus luteuma dönüşür. Olgun folikül antral sıvısını ve yumurtasını boşalttıktan sonra antrum etrafına çöker ve hızlı bir dönüşüme uğrar. Granüloza hücreleri büyür ve oluşan tüm bez benzeri yapıya östrojen, progesteron ve inhibin salgılayan korpus luteum denir. Östrojen foliküler fazda esas olarak granüloza hücreleri tarafından kana salınır. Yumurtlamadan sonra östrojen korpus luteum tarafından salınır. Diğer önemli ovaryum steroid hormonu olan progesteron, yumurtlamadan hemen önce granüloza ve teka hücreleri tarafından çok küçük miktarlarda sentezlenir ve salınır, ancak ana kaynağı korpus luteumdur. Bir peptit hormonu olan inhibin, hem granüloza hücreleri hem de korpus luteum tarafından salgılanır.

Ovaryum fonksiyonunu kontrol eden ana faktörler hipotalamik nöroendokrin hücrelerden Gonadotropin Salgılatıcı Hormonun (GnRH) pulsatil salgılanmasına bağlıdır. Hipotalamustan salınan GnRH, ön hipofizden Folikül Uyarıcı Hormon (FSH) ve Lüteinizan Hormon (LH) salınımını uyarır. Ovaryum döngüsü temel olarak

folikülogenez, ovulasyon, korpus luteum oluşumu ve atrezisi şeklinde gerçekleşir. Geçici olarak ovaryum döngüsü foliküler ve luteal faz olmak üzere iki ana aşama içerir. Foliküler faz, korpus luteum dejenere olduktan hemen sonra başlar, yumurtlama ile sona erer. Luteal faz yumurtlama ile başlar, korpus luteum dejenere olduğunda sona erer. FSH, foliküler fazın erken kısmında artar ve daha sonra sürekli olarak azalır. LH, foliküler fazın çoğunda sabittir ancak döngü ortasında artış (LH artışı) gösterir ve yumurtlamadan yaklaşık 18 saat önce pik yapar. Bunu, luteal faz sırasında hızlı bir düşüş ve ardından daha yavaş bir düşüş izler.



Şekil 1. Dişi iç üreme organları (29)

2.2. Ovaryum Histolojisi

Ovaryumun en dış kısmı tek katlı yassı epitelden kübiğe değişen bir germinal epitel ile sarılmıştır. Ovaryum yüzeyinde bulunan bu epitel tabakası, embriyoda birkaç kez çoğalarak primer ve sekonder cinsiyet kordonlarını yapan peritonal mezotelyumdan geliştiği için “germinal epitel” (epitelyum germinale) olarak adlandırılır. Epitelin peritona bakan tarafında mikrovilluslar ve az sayıda kinosilyumlar bulunur. Hücre sitoplazmasında mitokondri ve bol miktarda pinositoz vezikülleri bulunur. Germinal epitel ile korteks arasında tunika albuginea tabakası yer alır. Tunika albuginea tabakası sıkı bağ dokusu yapısında olup, kollajen lifler yüzeye

paralel demetler oluşturmuş şekildedir. Damardan fakirdir. Tunika albuginea'nın hemen altında ise, foliküllerin görüldüğü korteks olarak adlandırılan kısım ve daha iç kısımda gevşek bağ dokusu yapısında zengin damar yatağı içeren medulla bulunur (30–33).

2.2.1. Ovaryum korteksi

Korteks, stroma ve farklı gelişim evrelerindeki ovaryum folliküllerinden oluşur. Stroma kollajen ve elastik lifler, retiküler lifler ve bağ dokusu hücreleri olan fibroblastları içerir . Bu fibroblastlar, hormonal uyarılara diğer dokularda bulununan fibroblastlardan farklı yanıt verir. Stromal hücreler hormon salgılayan teka interna hücrelerine dönüşebilirler (30–33).

2.2.2. Ovaryum medullası

Medulla ovaryumun merkez bölgesinde olup kan, lenf damarları ve sinirden zengin, gevşek bağ dokusu yapısındadır. Medullada östrojen salgılayan epitelooid intersitisyel hücreler bulunur. Bu hücreler biraraya gelerek intersitisyel bezleri oluşturur ve östrojen salgırlar. Yine küçük adacıklar halinde medullada bulunan hilus hücreleri de diğer epitelooid tip hücrelerdir. Hilus hücreleri, testiste bulunan Leydig hücrelerine benzerler ve androjen salgırlar (32,34–36).

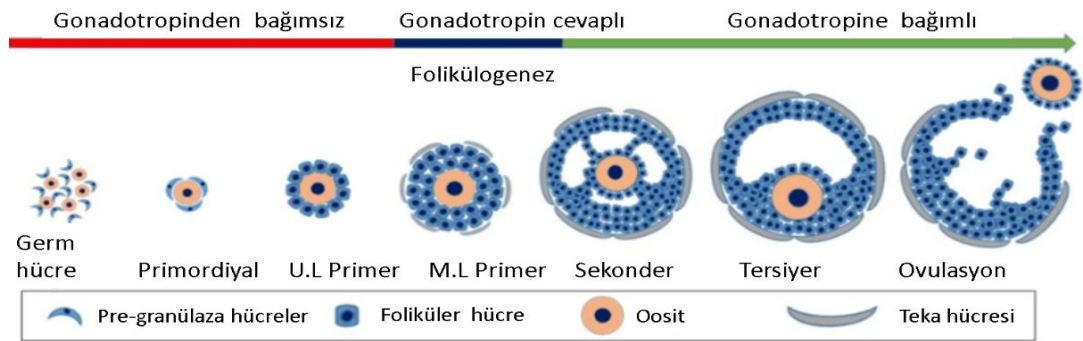
2.3. Ovaryum Folliküllerinin Gelişimi (follikülogenezis)

Folikülogenez süreci, foliküllerin gelişmesinden ve dişinin üreme yaşamı boyunca sabit bir aralıktaki bir veya daha fazla oositin salınmasından sorumludur. Ovaryum korteksinin en iç kısmında başlar ve çevresine yayılır. Memelilerde foliküler gelişim ve yumurtlama süreçleri, hücrel metabolizmadaki önemli değişiklikler nedeniyle lokal biyokimyasal değişiklikleri içerir (37).

Ovaryum folikülü gelişimi, folikülleri seçmek için koordineli olarak hareket eden çeşitli endokrin, parakrin ve otokrin faktörler tarafından düzenlenen bir süreçtir. Foliküllerin büyük çoğunluğu (tüm foliküllerin %99'undan fazlası) yumurtlama öncesi aşamaya ulaşamaz, bunun yerine atrezi adı verilen dejeneratif süreçten geçer (38). Hipotalamo-hipofiz-ovaryum ekseninin endokrin mekanizmaları aydınlatıldıktan

sonra, granüloza hücreleri, foliküler büyüme ve atrezi mekanizmalarını inceleyen çok sayıda çalışmanın ilgi odağı olmuştur. İn vivo ve in vitro deneylerden, gonadal steroidler, büyüme faktörleri ve sitokinler dahil olmak üzere granüloza hücrelerinden salgılanan faktörlerin, granüloza hücrelerinin hayatta kalması ve nihai foliküler büyümesi için gerekli olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, granüloza hücreleri, atretik foliküllerde oositlerden ve teka hücrelerinden daha önce apoptoz geçiren ilk hücre popülasyonları olarak gözlenmiş ve bu foliküler atrezinin başlatıcısı olarak rollerini ortaya koymuştur. Şimdiye kadar granüloza hücrelerinde ifade edilen apoptoz ile ilişkili faktörlerin, foliküler büyüme ve atrezinin kesin olarak düzenlenmesi için çok önemli olduğu gösterilmiştir.

Embriyonik gelişim sırasında 3. hafta sonunda primordial germ hücreleri yolk kesesinden farklılaşmamış gonad taslaklarının bulunduğu genital sırtta göç eder ve bölünerek oogoniumlara dönüşürler. Oogonium olarak adlandırılan bu germ hücreleri, insanda gebeliğin 20. haftasında mitoz yoluyla 6-7 milyona ulaşana kadar kitlesel olarak çoğalır ve skuamöz (yassı) pregranüloza hücreleriyle çevrili çoklu oogonium içeren eşey hücre yuvalarına dönüşür. Eşey hücre yuvalarına yerleştikten sonra oogoniumlarda mitoz sona erer ve mayoz bölünme başlar. Oogoniumlar oosit haline gelir ve oositler mayoz 1'in profazının diploten aşamasında duraksarlar. Primer oosit adını alan ve yassı folikül hücreleri ile çevrelenmiş bu yapı primordial folikülleri oluşturur (Şekil 2). Aslında gebeliğin 6-7. ayında oogonium sayısı yaklaşık 6 milyon civarındadır. Eşey hücre yuvasının parçalanması ve primordial folikül oluşumu nedeniyle, yeni doğanda yaklaşık bir milyon folikül mevcuttur. Bunlardan sadece 200.000'i puberteye ulaşır ve sadece 300'ü ovülasyon ile atılır. Bu folikül kaybının nedeni, atrezinin, embriyonik gelişim sırasında bile dişinin tüm yaşamı boyunca meydana gelen dinamik bir süreç olmasıdır (30,39).



Şekil 2. Follikülogenezis aşamaları (40)

2.3.1. Folikül tipleri

Kortekste histolojik olarak 4 tip folikül bulunur.

1- Primordiyal Folikül

2- Primer Follikül

a.Unilaminar (tek katmanlı) primer Folikül

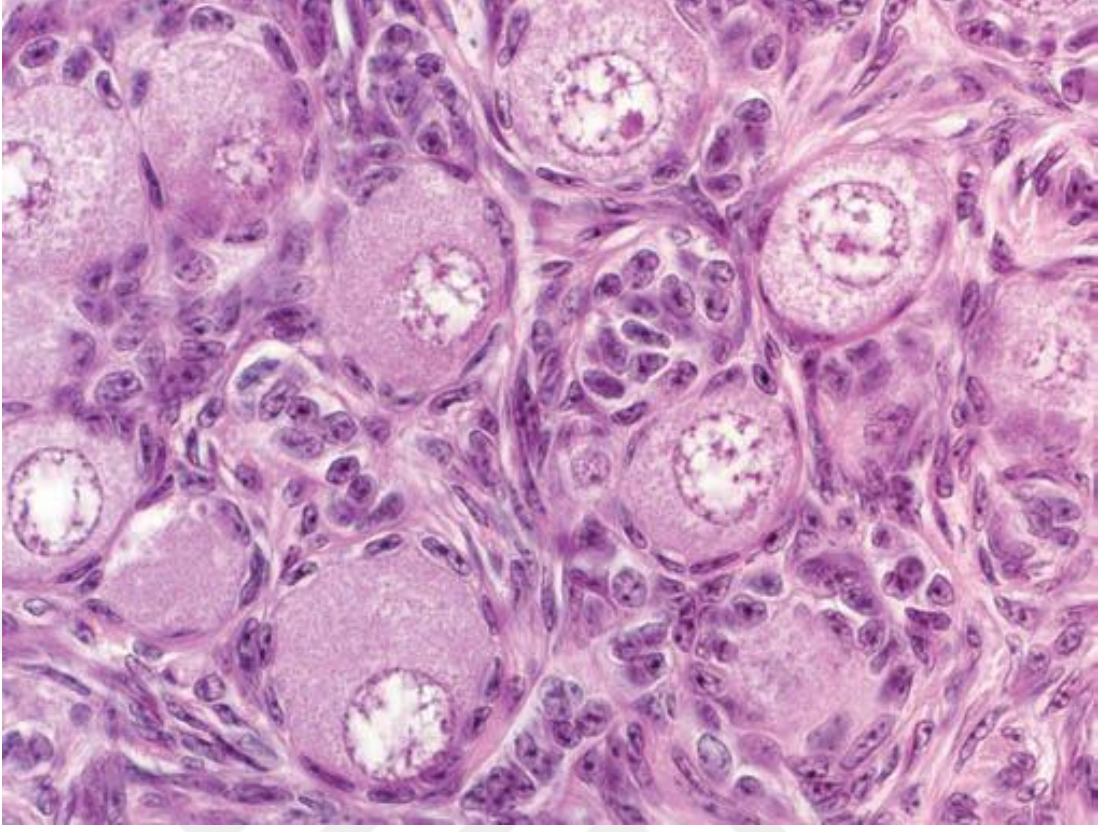
b.Multilaminar (preantral, çok katmanlı) primer Folikül

3- Sekonder (antral) Folikül

4- Olgun (tersiyer, graaf) Folikül

2.3.1.1. Primordiyal follikül

Primordial foliküller, tek bir yassı hücre tabakasıyla çevrili, zona pellusida içermeyen, mayoz I'in profazında duraksamış bir primer oositten oluşur (Şekil 3). Folikül içindeki primer oosit yaklaşık 25-30 µm çapındadır. Oosit belirgin ökromatik bir nükleus ve bir ya da birkaç nukleolus içerir (33). Follikül hücreleri arasında desmozom ve Gap Junction oluşmuştur. Tek katlı yassı folliküler hücreleri çevre bağ dokudan ayıran bazal lamina da oluşmuştur (41). Bu foliküller, kadınlarda 40 yıla kadar uzun süre bu durumda kalabilir ve esas olarak stromal kortekste bulunur (42). Foliküller ve oosit büyümeye başladıkça, ovaryum korteksinin derinliklerine doğru hareket eder. Yetişkinlerde her gün birkaç primordiyal folikül aktive olur, oosit büyümeye başlar ve follikül hücreleri bölünür (43).



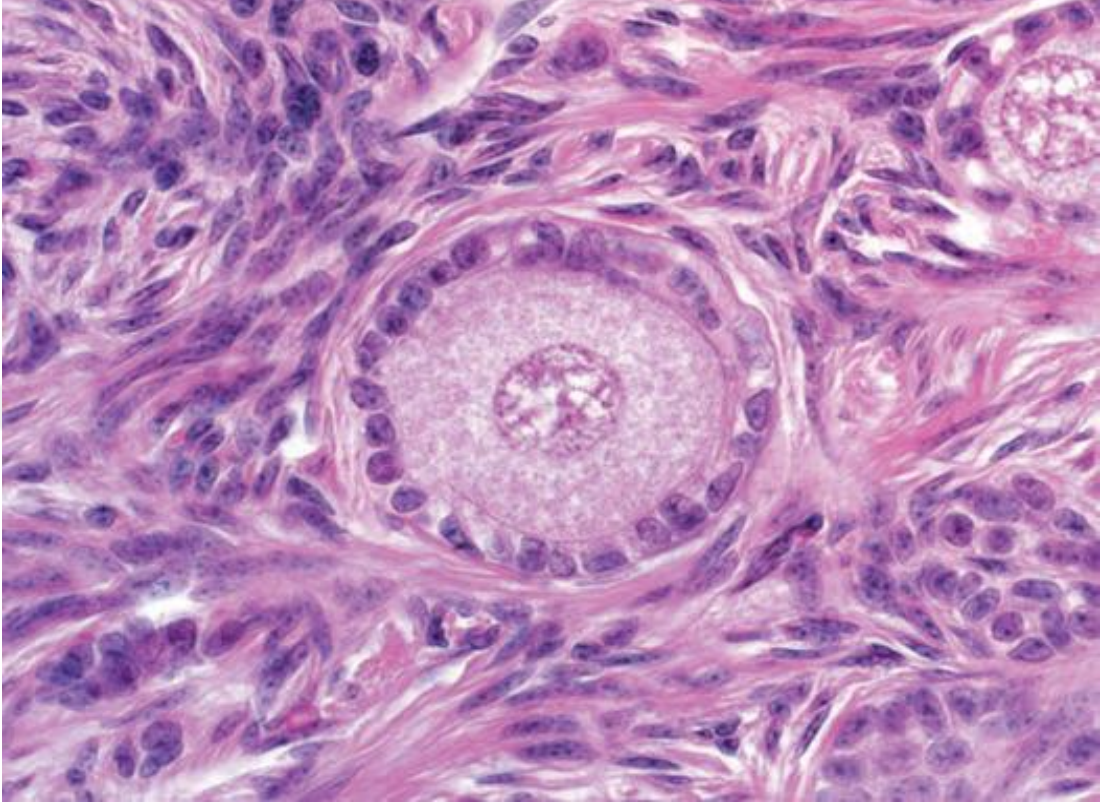
Şekil 3. Primordiyal folikül (her bir primordiyal folikül, çevresinde tek bir yassı folikül hücresi katmanını bulanan bir primer oosit içerir) (44)

2.3.1.2. Primer follikül

Pubertede gonadotropinlerin etkisi ile follikül hücreleri önce tek katlı kübik ardından çok katlı kübik hücreler halini alarak primer follikülleri oluşturur. Oosit büyümesinin en hızlı olduğu dönem, foliküler büyümenin birinci evresidir. Primordiyal foliküldeki ilk değişiklik, follikül hücrelerinin morfolojisinin küboidal şekle dönüşmesidir. Oositin çapı da boyut olarak artar 125-150 μm 'ye kadar ulaşır ve oosit büyüdükçe özel proteinlerden oluşmuş, döllenme için gerekli olan ve oositi çevreleyen ekstrasellüler bir zar olan zona pellucida'yı oluşturur.

a.Unilaminar (tek katmanlı) primer folikül

Folikül, tek bir küboidal follikül hücresi katmanı ile çevrilidir (Şekil 4).

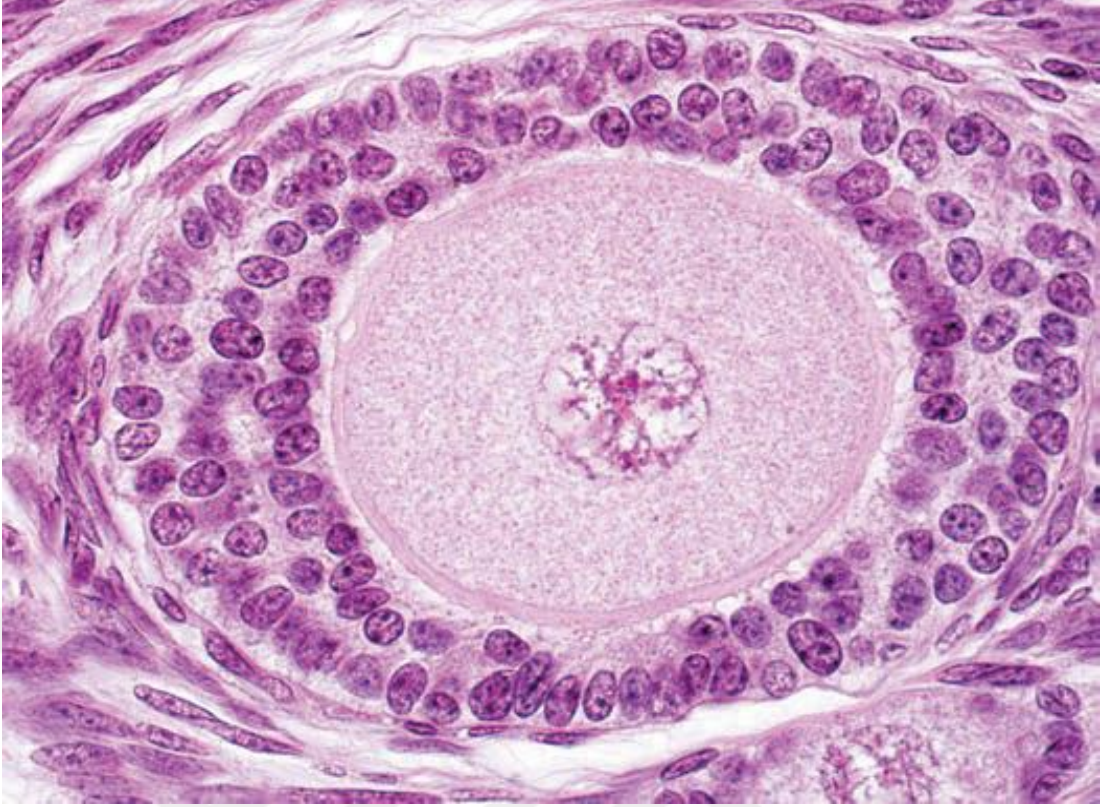


Şekil 4. Unilaminar (tek katmanlı) primer folikül (44)

b.Multilaminar (preantral, çok katmanlı) primer folikül

Folliküler hücreler primer follikülün granüloza tabakasını oluşturmak için mitoz ile çoğalarak çok katlı kübik hücreler haline gelirler ve granüloza hücreleri olarak adlandırılırlar. Birbirlerine gap junctionlar ile bağlanmıştır. Folliküle bu aşamada“multilaminar (preantral, çok katmanlı) primer follikül “ denir.

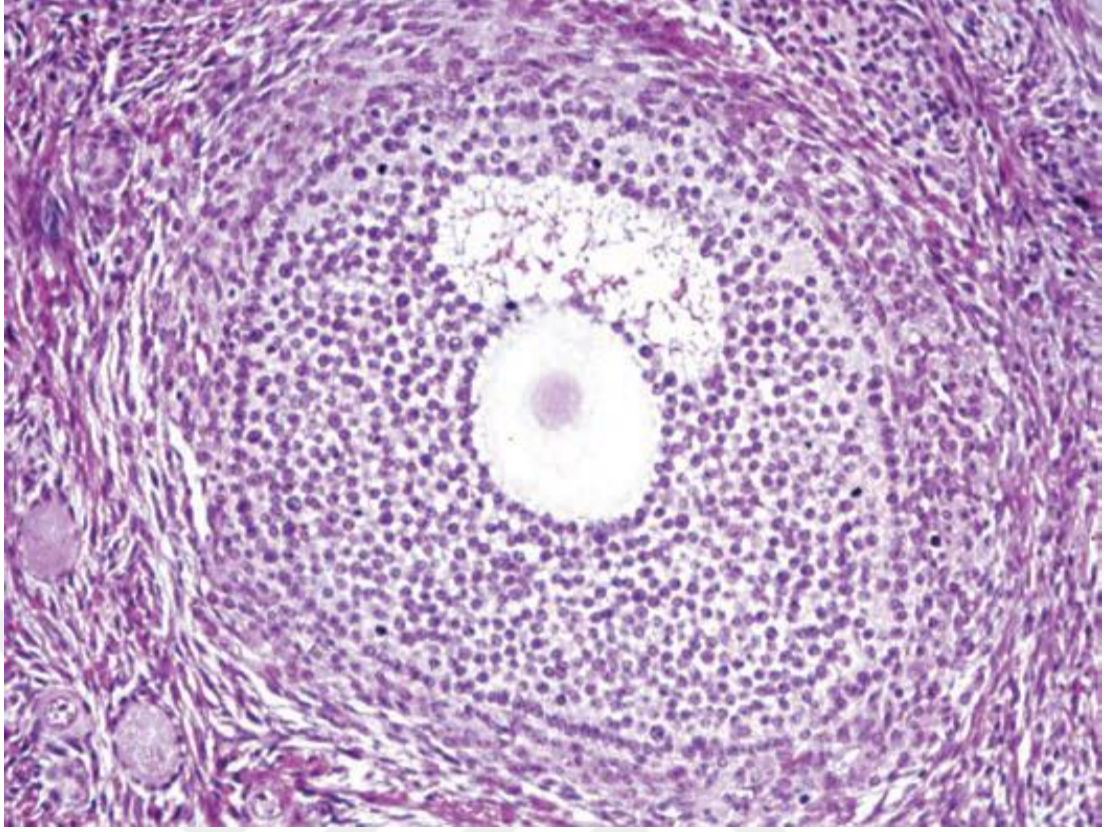
Granüloza hücreleri artarken, stromal hücreler de teka folikülü katmanını oluşturur. Teka folikülü iki tabakaya ayrılır. İç kısımda bulunan teka interna tabakası damardan zengindir ve salgı yapan küboidal şekilli hücrelerden oluşmuştur. Bu hücreler lüteinizan hormon (LH) reseptörlerinden zengindir ve LH uyarımına cevap olarak östrojen öncüleri olan androjenleri salgırlar. Ayrıca bunlardan farklı olarak yine teka internada fibroblastlar ve kollajen lifler de bulunmaktadır. Teka eksterna, bağ dokusu hücrelerine sahip dış tabakadır. Düz kas hücreleri ve kollajen demetleri içerir. Yer yer ovaryum stromasıyla karışmaktadır (Şekil 5) (30,33,41,42,45,46).



Şekil 5. Multilaminar (preantral, çok katmanlı) primer folikül (44)

2.3.1.3. Sekonder (antral) folikül

Folikül büyümeye devam ettikçe çok katmanlı primer folikül yaklaşık 200 μm çapına ulaşır. Granüloza hücreleri arasında boşluklar oluşur, bu boşluklarda likör foliküli toplanır ve tek bir boşluk olan yarım ay şeklinde follikül antrumunu oluşturur. Artık foliküle sekonder veya antral follikül adı verilir. Granüloza hücreleri folikül duvarının bir tarafında yoğunlaşırlar. Antrumun içine doğru uzanan ve oositi de içeren bu yapıya “kumulus ooforus” denir. Birtakım granüloza hücreleri ise oositi çevreleyerek korona radiatayı oluştururlar (Şekil 6) (30,47,48).



Şekil 6. Sekonder (antral) folikül (44)

2.3.1.4. Olgun (tersiyer, graaf) folikül

Gelişim ilerledikçe her menstrual döngüde bir folikül dominant hale gelerek olgun folikül ya da graaf folikülü (tersiyer folikül)'nü oluşturur. Graaf folikülü yaklaşık 2.5 cm çapındadır. Oosit bu aşamada granüloza hücrelerinden oluşmuş ince birkaç sıra ile folikül duvarına bağlanır. Teka tabakası kalınlaşmıştır, granüloza tabakası ise antrum ile aynı oranda büyümediği için daha ince gözlemlenir (Şekil 7). Hemen ovulasyon öncesi primer oosit folikül içinde eksantrik bir konum alır ve I. mayoz tamamlanır. Granüloza hücreleri büyümeye devam eden folikülde androjelerin östrojenlere dönüşümünü katalizler. Ovulasyondan 24 saat önce hipofizden salınan luteinleştirici hormon (LH) düzeyinde ani artış olur ve ovulasyon için uyarı oluşturur. Ovulasyonun hemen öncesinde artık 1. Mayozu tamamlamış olan sekonder oosit 2. mayoz girer fakat metafazında durur. 2. Mayoz fertilizasyonun gerçekleşmesi ile tamamlanır ve 2. kutup cismi oluşur. Ovulasyon sonrasında geriye kalan teka ve granüloza hücreleri ise korpus luteumu oluşturmak üzere farklılaşırlar (33,34,47,49).



Şekil 7. Olgun (tersiyer, graaf) folikül (44)

2.3.2. Anti-müllerian hormon (AMH)

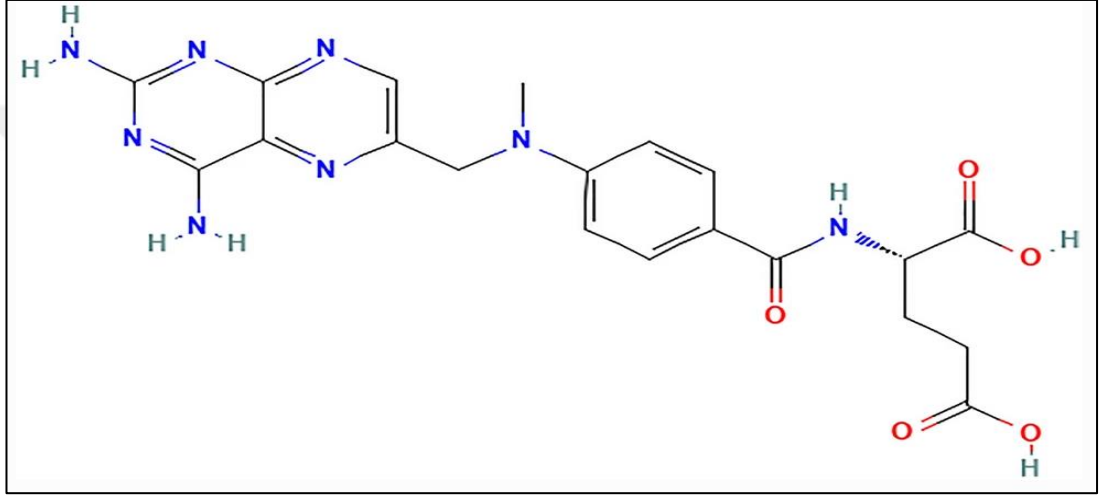
Anti-Müllerian Hormon (AMH), Dönüştürücü Büyüme Faktörü β (TGF- β) ailesinden, gonadların gelişimi ve üremenin düzenlenmesinde önemli role sahip glikoprotein yapısında bir hormondur. Müllerian Inhibiting Substance (MIS) olarak da bilinen Anti-Müllerian Hormon (AMH), ilk olarak 1946'da Alfred Jost tarafından erkek fetüste Müllerian kanallarının gerilemesine neden olan salgılanmış bir testis faktörü olarak tanımlanmıştır (50,51). AMH, testis farklılaşmasının başlangıcında Sertoli hücreleri tarafından üretilir ve erkek fetüste fenotipik cinsiyet farklılaşmasının ilk belirtisi olan Müllerian kanallarının (uterus, fallop tüpleri, serviks ve vajinanın üst kısmı) gerilemesini indükler. İnsanlarda, AMH veya AMH tip II reseptör geninin mutasyonları, otozomal resesif interseks bozukluğunun nadir bir formu olan, Müllerian kanallarının gerilememesi ile karakterize kalıcı Müllerian kanal sendromuna (PMDS) yol açar (52). Kadınlarda AMH'nin folikülogenez üzerinde iki farklı etkisi olduğu düşünülmektedir. İlk olarak, primordial folikülden primer foliküle geçişte inhibe edici bir rol oynayarak folikülogenezi negatif olarak düzenler. İkincisi,

FSH'a bağılı foliküler fazda folikülün FSH'ye duyarlılığını azaltarak FSH ile uyarılan folikül büyümesini de inhibe edebilir (53,54). Durlinger ve ark.'nın yaptığı çalışmada AMH'nin folikülogenezde gonadotropinden bağımsız bir yol izlediği ortaya konmuştur. Çalışmada in vivo olarak, AMH geni eksikliği olan fareler, kontrol farelerine kıyasla preantral folikül aşamasından sonra gelişen foliküller de dahil olmak üzere tüm aşamalarda büyüyen folikül sayısında önemli bir artış göstermiş olup yine AMH geni eksik farelerden alınan folikülleri içeren hücre kültürü ortamına AMH eklenmesinin, FSH varlığında bile foliküler büyümeyi yavaşlattığını ve bunun da AMH'nin FSH'ye bağılı granüloza hücrelerinin proliferasyonu üzerinde inhibe edici bir etkisi olduğunu ortaya koymuştur (54). AMH'nin inhibitör etkisi esas olarak FSH tarafından indüklenen foliküler büyüme fonksiyonlarından, özellikle aromataz indüksiyonunu etkiler. AMH'nin bu inhibitör etkisi giderek azalır ve FSH tarafından aromatazın indüklenmesine izin verir ve bunun sonucunda östradiol sentezi artar. Bu da büyük antral foliküllerde AMH sekresyonunun hızla tükenmesine yol açar (55). Böylece aşırı foliküler büyümeyi engelleyerek, folikülogenezde sınırları belirler ve folikül rezervinin hızla tükenmesini engeller (56).

Ovaryumlarda AMH, primer foliküllerde daha az olmak üzere preantral ve antral folikülerin granüloza hücreleri tarafından eksprese edilir. FSH'a bağılı fazdan sonra ise preovulatar foliküllerin kümülüs hücrelerinde bir miktar eksprese edilmesine rağmen, AMH ekspresyonu kaybolur. Ayrıca atretik foliküllerde ve korpus luteumda da AMH ekspresyonu yoktur. 8 mm'ye kadar olan foliküllerde artan AMH ekspresyon seviyeleri tespit edilir ve >8 mm olan foliküllerde ekspresyon yoktur. Bu ekspresyon paterni, foliküler sıvıdaki AMH konsantrasyonları ile pozitif olarak koreler ve 8 mm'ye kadar foliküllerde en yüksek seviyeleri gösterirken daha sonra keskin bir düşüş gösterir (57). Bu özel ifade modeline dayanarak yapılan çalışmalarda, AMH'nin, primordial folikül alımını ve büyüyen foliküllerin FSH duyarlılığını inhibe edici bir şekilde düzenleyen ovaryan büyüme faktörlerinden biri olduğu ve serum AMH seviyelerinin büyüyen folikül sayısı ile ilişkili olduğu gösterildiği için AMH'nin, ovaryan foliküler rezervin tahmin edilmesinde bir belirteç olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (58).

2.4. Metotraksat

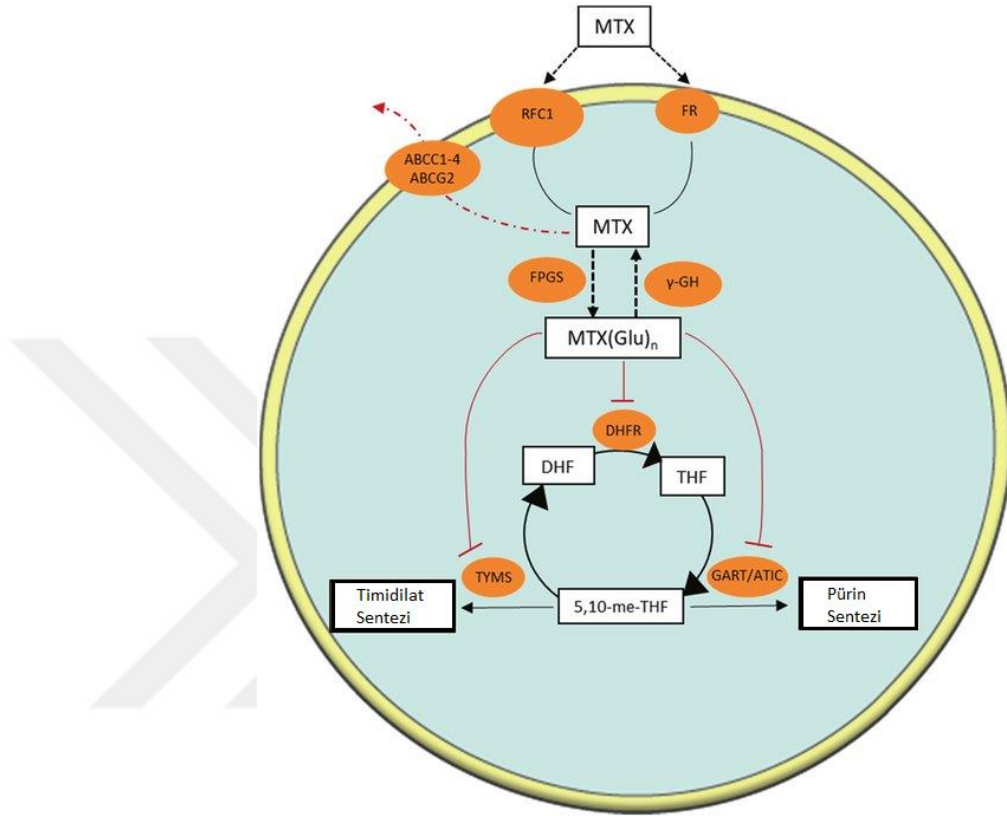
Metotreksat (MTX), dihidrofolatın tetrahidrofolata dönüşümünü katalize eden bir enzim olan dihidrofolat redüktaz enziminin inhibisyonuna neden olan bir folat antagonistidir (Şekil 8). Metotreksat benzersiz antiproliferatif, antimetabolik ve anti-inflamatuar özelliklere sahip olduğu için çeşitli maligniteleri ve sistemik otoimmün hastalıkları tedavi etmek için kullanılır (59). Romatoid artrit tedavisinde genellikle düşük doz metotreksat yaygın olarak tercih edilmektedir (60,61).



Şekil 8. Metotreksatın kimyasal formülü (62)

Metotreksat (MTX) hücreye indirgenmiş folat taşıyıcısı (RFC1) ve bir folat reseptörü (FR) ile reseptör aracılı endositoz yoluyla girer. MTX, folik poliglutamat sentaz (FPGS) tarafından poliglutamatlanır (MTX(Glu)_n). MTX'in poliglutamatları, MTX'e kıyasla üstün bir antifolat ajandır ve dihidrofolat redüktazı (DHFR) oldukça güçlü bir şekilde geri dönüşümsüz olarak inhibe eder. Ayrıca, MTX, timidilat sentaz ve GART/ATIC (fosforibosilglisinamid formiltransferaz / 5-aminoimidazol-4-karboksamid ribonükleotid formiltransferaz IMP siklohidrolaz) gibi diğer enzimlerin inhibisyonunu indükler, sonuçta de novo timidilat ve pürin sentezlerini bloke eder. γ -glutamil hidrolaz (γ -GH) glutamat kalıntılarını MTX'ten uzaklaştırırken, ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcıları MTX'in hücreden atılmasına yardımcı olur (63,64) (Şekil 9). Metotreksat poliglutamatlar, dihidrofolik asidin tetrahidrofolik aside dönüşümünü katalize eden çok önemli bir enzim olan DHFR'yi inhibe eder. Çeşitli metabolik işlemler için gerekli olan folatlar, tetrahidrofolattan elde edilir (65). Folatlar,

metionin, pürinler ve timidilat oluşumu için gerekli olan 'tek karbon' birimlerinin transferini kolaylaştırır (66). Tetrahidrofolat eksikliği, önemli yardımcı faktörlerin mevcudiyetini azaltarak DNA ve RNA sentezini engelleyebilir (67). MTX, antitümör etkilerini birçok kanserde apoptoz indüksiyonu yoluyla gösterir (68–70).



Şekil 9. Metotreksatın etki mekanizması (64)

MTX gibi kemoterapi ilaçları esas olarak kanser hücrelerinin çoğalmasını engellemek için kullanılsa da, aynı zamanda sağlıklı dokuları ve hücreleri de etkileyerek hem somatik hem de üreme hücrelerinde işlevsel bozukluklara neden olur (71,72). Çeşitli otoimmün ve inflamatuvar bozukluklarda yaygın kullanımına rağmen, düşük doz MTX ilaç toksisitesinden muaf değildir. MTX ile ilgili en yaygın advers reaksiyonlar gastrointestinal belirtiler (bulantı, kusma, stomatit, iştahsızlık) ve hepatotoksisitedir (73). Genel olarak, MTX tedavisinin kesilmesinin ana nedeni etkinlik eksikliği değil, toksisitedir (73). Dikkatli ve uygun hasta izlemesi (kan hücresi sayımı, karaciğer enzimleri, kreatinin) periyodik olarak yapılmalıdır ve bunun MTX kullanımıyla ilişkili riskleri en aza indirdiği görülmektedir (74).

MTX toksisitesinin mekanizmaları belirsizliğini korumaktadır. Sitopeni, gastrointestinal intolerans ve stomatit gibi bazı toksisiteler, folat eksikliği belirtilerini taklit eder ve folik veya folinik asit takviyesi ile önlenabilir veya hafifletilebilir (75). Folat eksikliği ile ilişkili olmayan toksisiteler arasında nodüloz, pulmoner fibroz, uyuşukluk, yorgunluk ve böbrek yetmezliği yer alır (76). MTX'in moleküler etki mekanizmalarının anlaşılması, MTX ile ilişkili toksisitelerin çoğunu açıklamaya yardımcı olabilir (76). Kronik MTX uygulamasının böbrek dokusunda MTX poliglutamatlarının birikmesine ve oksidatif strese artış yaparak ciddi glomerüler ve tübüler hasara neden olduğu gösterilmiştir (77). MTX kaynaklı karaciğer hasarı, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ile ilgili olabilir. MTX'in sıçanlarda karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonunu artırarak ve antioksidan enzimlerin seviyesini azaltarak oksidatif doku hasarına neden olduğu gösterilmiştir (78).

MTX ile indüklenen apoptozda reaktif oksijen türleri (ROS), çok önemli bir rol oynar (79). MTX'in immünosupresif etkilerinin önemli bir mekanizması olarak redoks değiştirici özellikleri öne sürülmüştür (80,81). Düşük doz MTX'in, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi kaynaklı T hücrelerinin apoptozunu indüklediği bulunmuştur (80,81).

ROS sadece hücre ölümüyle ilgili değildir, aynı zamanda sitokin üretiminin baskılanması ve hücre proliferasyonu gibi farklı hücre fonksiyonlarını da modüle eder (80). MTX ile indüklenen ROS oluşumuna tetrahidrobiopterin tükenmesi aracılık edebilir. MTX, DHFR'nin güçlü bir inhibitörüdür. DHFR, dihidrobiopterinin nitrik oksit sentazlar (NOS'lar) tarafından NO sentezi için gerekli bir kofaktör olan tetrahidrobiopterine indirgenmesini katalize eder (82). Tetrahidrobiopterinin tükenmesi NOS'u ayırarak NO sentezinin kaybına ve ROS üretiminde artışa neden olur (82).

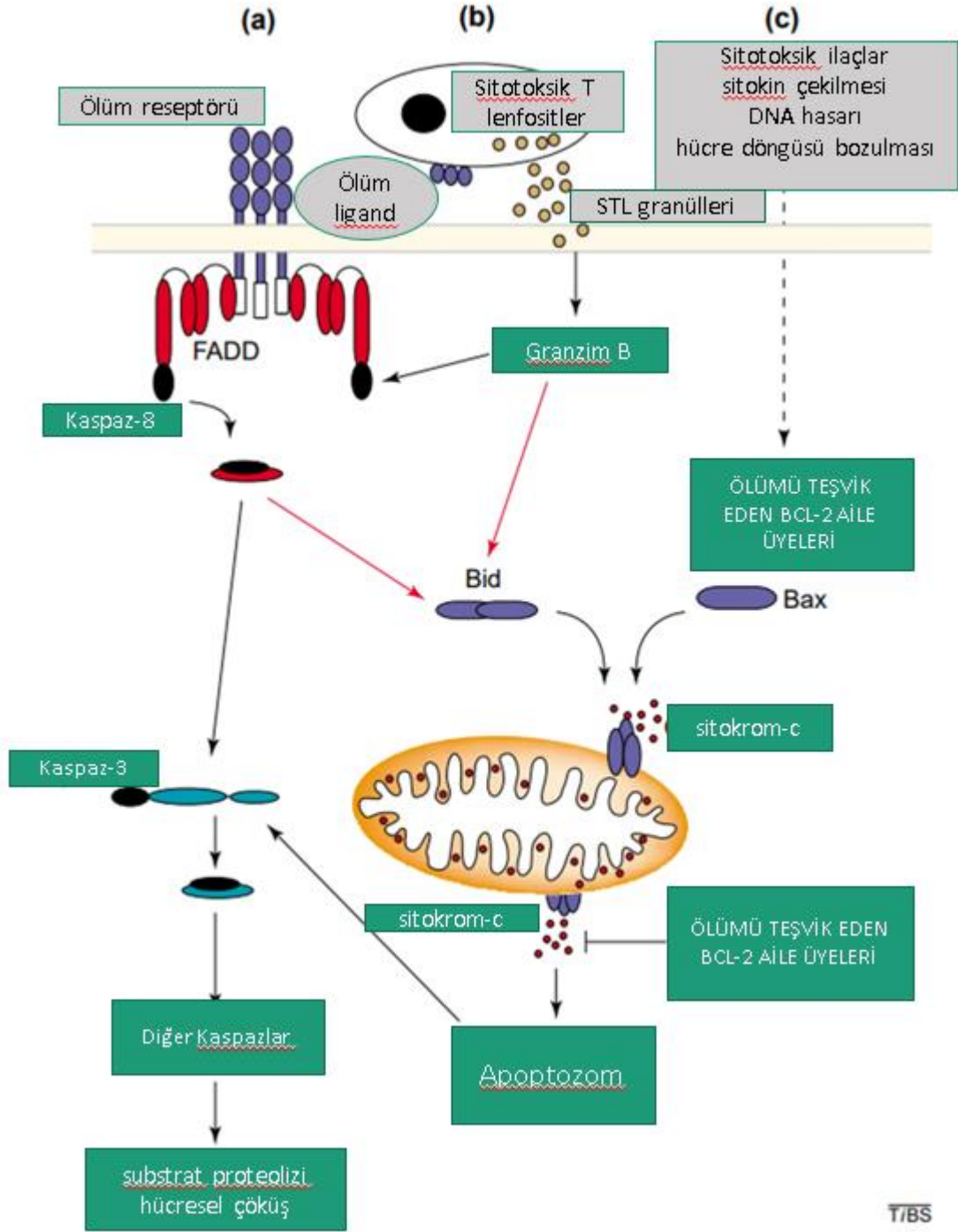
2.5. Apoptoz

Apoptoz hücrelerin genetik olarak belirlenmiş eliminasyonunu içeren “programlanmış” hücre ölümünün ayırt edici ve önemli bir modu olarak kabul edilir. Apoptoz normal olarak gelişme ve yaşlanma sırasında ve dokulardaki hücre popülasyonlarını korumak için bir homeostatik mekanizma olarak ortaya çıkar. Apoptoz ayrıca bağışıklık reaksiyonlarında veya hücreler hastalık veya zararlı ajanlar tarafından hasar gördüğünde olduğu gibi bir savunma mekanizması olarak da ortaya çıkar. Apoptozu tetikleyebilecek hem fizyolojik hem de patolojik çok çeşitli uyaran ve

koşullar olmasına rağmen, tüm hücreler aynı uyarana yanıt olarak mutlaka ölmeyecektir. Radyasyon veya kanser kemoterapisi için kullanılan ilaçlar, bazı hücrelerde DNA hasarına neden olur ve bu da p53'e bağlı bir yoldan apoptotik ölüme yol açabilir (83).

Prensipte, apoptozu başlatan iki alternatif yol vardır; hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri aracılı ekstrinsik yol ve diğeri mitokondri aracılı 'intrinsik yol' olarak adlandırılır. Her iki yolda da, hücresel substratları parçalayan sistein aspartile-spesifik proteazlar (kaspazlar)'ın aktivasyonu apoptozun özelliği olan biyokimyasal ve morfolojik değişikliklere yol açar (83).

Ekstrinsik (ölüm reseptör aracılı) yol hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerine (Fas, TNFR, DR5) FasL, TNF-alfa, TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) bağlanması sonucunda başlar (84). İntrinsek veya mitokondriyal seviyedeki ölüm ise mitokondriyal membranın uyarılmasıyla (henüz tam olarak tanımlanmamıştır) başlatılır ve mitokondrinin intermembranöz boşluğundan sitokrom c ve diğer apoptojenik faktörlerin salınmasıyla ilerler. Sitozolde sitokrom c, APAF1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör-1), ATP ve inaktif başlatıcı kaspaz prokaspaz-9 ile bir kompleks oluşturur. Apoptozom olarak bilinen bu kompleks içinde kaspaz-9 aktive edilir (85). Ek olarak T-hücresi aracılı sitotoksiteyi ve perforin-granzime bağlı hücre ölümünü içeren ek bir yol daha vardır. Perforin/granzim yolu, granzim B veya granzim A yoluyla apoptozu indükler (83). Ekstrinsik, intrinsik ve granzim B yolları tek bir yolda birleşir. Bu yol, kaspaz-3'ün bölünmesiyle meydana gelir ve DNA parçalanması, hücre iskeleti ve nükleer proteinlerin bozulması, proteinlerin çapraz bağlanması, apoptotik cisimlerin oluşumu, fagositik hücre reseptörleri için ligandların ekspresyonu ve son olarak fagositik hücreler tarafından alınması ile sonuçlanır. Granzim A yolu, tek sarmallı DNA hasarı yoluyla aynı, kaspazdan bağımsız bir hücre ölüm yolunu aktive eder (86) (Şekil 10).



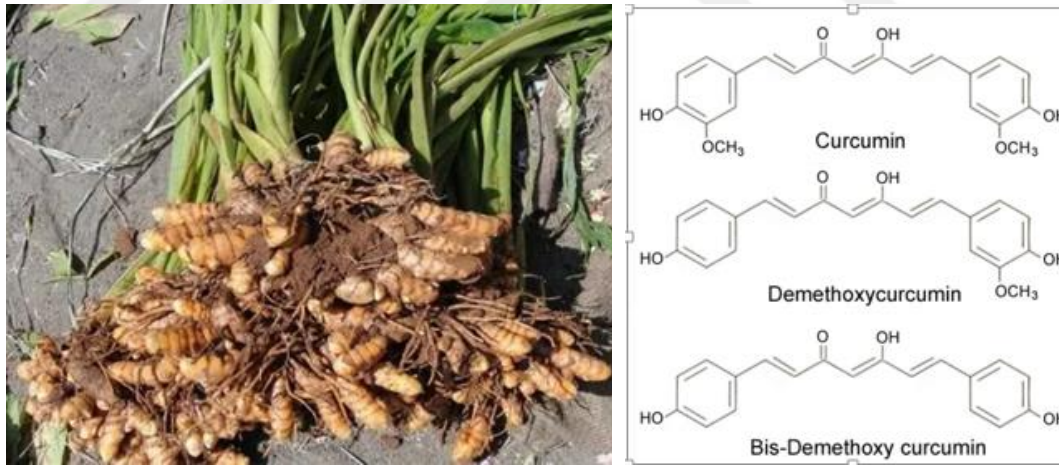
Şekil 10. Apoptoz mekanizması (87).

2.6. Kurkumin

Kurkumin (diferuloyl metan), Zingiberaceae familyasının bir üyesi olan *Curcuma longa*'nın rizomlarından elde edilen zerdeçalın önemli bir bileşenidir (88) (Şekil 11). Zerdeçal rizomları karbonhidratlar (%69.4), proteinler (%6.3), yağ (%5.1)

ve mineraller (%3.5) içerir. Rizomların ana aktif bileşenleri, uçucu olmayan kurkuminoidler ve uçucu yağdır (89). *Curcuma longa*'nın biyolojik olarak aktif bir ana bileşeni, kimyasal formülü ile diferuloilmetan [1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion] olarak bilinen kurkumoids kurkumin ve polifenolik türevleri ve metabolitleri, demethoxykurkumin ve bisdemethoxykurkumin (90) zerdeçal yağlarının ana bileşenleri seskiterpenoidler ve monoterpenoidlerdir (89). *C. longa*'dan üç ana kurkuminoid izole edilmiştir. Bunlar kurkumin, detoksikurkumin ve bisdemetoksikurkumindir. Kurkumin, zerdeçalın biyolojik aktivitelerinden sorumlu olan en önemli fraksiyondur (88).

Zerdeçalın sarı rengi, içeriğindeki kurkuminoidlerden kaynaklanmaktadır (91). Kurkumin, renklendirici ajan olarak da yaygın olarak kullanılmaktadır. DSÖ, 0-3 mg/kg aralığında gıda katkı maddesi olarak kabul edilebilir günlük kurkumin alımını belirtmiştir (92). Hindistan ve Güney Çin, Güneydoğu Asya, Papua Yeni Gine ve Kuzey Avustralya dahil olmak üzere tropikal Asya'da kolayca bulunur (89). Kurkumin DMSO, etanol, metanol veya aseton gibi organik çözücülerde oldukça çözünür olmasına rağmen, sulu çözücülerde zayıf çözünür (93).



Şekil 11. *Curcuma longa* L. bitkisi ve kurkuminoidlerin kimyasal yapısı.

Zerdeçal inflamasyon (94), gastrointestinal rahatsızlıklar (95), karaciğer rahatsızlıkları (96), diyabetik yaralar (97), romatizma (98), cilt yaraları ve sinüzit (99) tedavisinde geleneksel bir ilaç olarak kullanılmıştır. Kurkuminin antioksidan (100), anti hiperlipidemik (101), anti-viral(102), anti-mikrobiyal (103), anti-apoptotik (104), anti anjiyogenik (105), immünomodülatör (106), antitrombotik (107), anti-diyabetojenik (108) etkileri olduğu iddia edilmektedir.

Birçok rapor, kurkuminin kan şekeri seviyelerini düzenleyebileceğini, kan basıncını düşürebileceğini, sinir hücrelerini koruyabileceğini ve bağışıklığı artırabileceğini göstermektedir. Bu nedenle kurkumin, diyabet ve diyabetik komplikasyonlar gibi yaşa bağlı bozuklukların yanı sıra nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde yaşlılar için de faydalı olabileceğini düşündürmektedir (109).

Yine kurkuminin antioksidant olarak çevresel kirlenmelerin zararlı etkisini azaltabildiği veya önleyebilir olduğu gösterilmiştir. Bu bağlamda genotoksisiteyi, nefrotoksisiteyi, üreme toksisitesini, nörotoksisiteyi ve arsenik immünotoksitesini azalttığı gösterilmiştir (110). Antioksidant olan kurkumin, reaktif oksijen türlerini bağlayabilir ve bu nedenle, nükleik asitlerin, peptitlerin, lipidlerin peroksidasyonunu ve bozulmasını ve bunun sonucunda sağlıklı hücrelerin apoptozunu, yaşlanmasını ve maligniteye dönüşümünü önleyebilir (111). Ayrıca yapılan bir diğer çalışmada ovaryum detorsiyonu öncesi kurkumin verilmesinin yumurtalık dokularındaki oksidatif stres belirteçlerinde önemli bir azalma sağladığı raporlanmıştır (112).

Kurkumin ile tedavinin, folliküllerin farklı gelişim evrelerinde folikül sayısını arttırdığı, oositlerin histolojik görünümünü iyileştirdiği ve atretik folikülleri, lipid peroksidasyonunu, korpus luteum çevresindeki kanamayı ve ovaryum stromasındaki damar tıkanıklığını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Yine kurkuminin oositlerin mayotik olgunlaşmasındaki bozuklukları önemli ölçüde azalttığı, immünokompetan organlarda nekroz ile ölen hücre sayısını azaltıp ve inflamatuvar reaksiyonu hafiflettiği açıklanmıştır (113).

2.7. Poli(ADP-riboz) polimeraz (PARP-1)

Poli (ADP-riboz) sentetaz (PARS) olarak da bilinen poli (adenosin difosfat-riboz) polimeraz (PARP-1), DNA hasarına hücrel yanıtta rol oynayan nükleer enzimdir.(114,115). DNA hasarında PARP-1 koruyucu bir rol oynar (116). Oksidatif stresin neden olduğu DNA hasarından sonra, PARP-1 aktivasyonu programlanmış hücre ölümünde önemli bir etkinliğe sahiptir (117–119). PARP-1'in aktivasyonu, DNA'daki tek zincir kırıkları tarafından tetiklenir ve daha sonra hücre içi nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) ve adenosin trifosfatın (ATP) hızlı bir şekilde tükenmesiyle sonuçlanır ve büyük bir PAR gövdesi oluşturur. Bu, glikoliz ve mitokondriyal solunum hızını yavaşlatır ve sonunda hücrel işlev bozukluğuna ve

hücre ölümüne yol açar (118,119). PARP-1 aktivasyonu, oksidatif stres ile ilgili çeşitli patolojik durumlarda doku hasarının önemli bir mekanizmasını temsil eder (120–127). Önceki çalışmalar oksidatif stresin MTX ile indüklenen toksisitenin gelişimine katkıda bulunabileceğini iddia etmiştir (128–131). Bu bilgiler artan oksidatif stresin bir sonucu olarak PARP-1 yolunun aktivasyonu MTX ile tedavi edilen sıçanlarda ovaryum hasarını açıklayabileceğini düşündürmektedir.

2.8. P53

P53 proteini, TP53 geni tarafından kodlanır. P53; tümör baskılayıcı, DNA hasarının onarımı, hücre döngüsünün düzenlenmesi, apoptoz, anjiyogenez ve yaşlanma gibi hücreyel yollarda rol alan anahtar bir transkripsiyon faktörüdür (132,133).

P53 proteini, normal hücre döngüsünü düzenleyen genleri özellikle hücre döngüsü kontrol noktasıyla ilgili genleri ve ayrıca genomik bütünlüğün korunmasını sağlayan genleri aktive eder. Böylece, p53, DNA hasarına karşı transkripsiyon faktörü görevinde ya da farklı proteinlerle koordineli olarak, hücre döngüsünün durdurarak tamirinin yapılmasını ve ya apoptozu indükler (134).

İyonize radyasyon ve ya kemoterapötik ajanların hücrede oluşturduğu genotoksik stresler sonucunda DNA onarımı sağlanamaz ise p53 seviyesi artar. P53 aktive edildiğinde, G1-S veya G2/M kontrol noktasında p21 (Waf1, Cip-1) ve Gadd45 gibi hücre döngüsü proteinlerinin ifadesini proapoptotik proteinleri (Puma, Noxa, Bad, Bax, Bak, p53AIP1); ölüm reseptörlerini (Fas, Dr4, Killer/Dr5); apoptoz yürütme faktörlerini (Apaf1, kaspaz 6, Bnip3L) veya PIGs, IGF-BP3 ifadesini indükleyebilir (134–136). Ayrıca P53 DNA hasarına, oksidatif strese veya telomer erozyonuna yanıt olarak p21-Rb-E2F yolu aracılığıyla hücreyel yaşlanmanın uyarılması, p53 aktivasyonunun tümörjenik süreçleri engellediği başka bir mekanizmadır (137,138).

Anti-proliferatif ve pro-apoptotik p53ün, normal hücrelerde çok yüksek miktarda ifade edilmesi hücre büyümesinde sıkıntılar oluşturabileceğinden, p53 seviyesinin kontrol altında tutulması son derece önemlidir (134).

Mdm2 (Mouse double minute 2 homolog) proteini (bir onkogen olarak ta işlev gören protein) negatif regülatör olarak tümör baskılayıcı p53'ü bağlar ve p53 aracılı gen transaktivasyonunu doğrudan inhibe eder (139–141).

Mdm2 proteazomal bozulmayı sürdürmek için bir E3 ligazı (ubikitin ligaz enzimi) görevi görür ve p53'ü çekirdekten sitozolde bulunan ubikitin proteozom sistemine (UPS) gönderir, hücrede yıkıma uğratar ve p53'ün hücrede bazal seviyede tutulmasını düzenler (142,143).

Yapılan bir çalışmada MTX uygulamasının kontrol grubu içinde ölçülen seviyelere kıyasla P53 mRNA ekspresyonunun seviyesinde önemli bir artışa neden olduğu belirtilmiştir (144).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları ve Deney Grupları

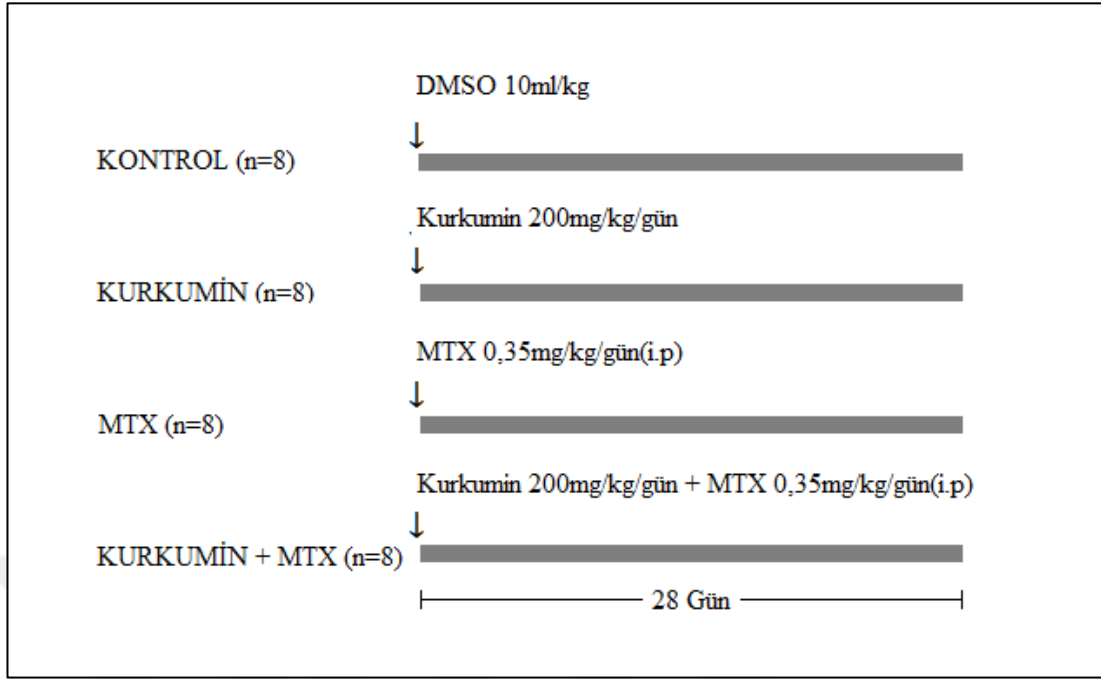
Bu tez çalışması Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi (ZBEÜ) Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında gerçekleştirildi. Çalışma için ZBEÜ Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'ndan 03.09.2020 tarihinde 2020-22-03/09 protokol numaralı etik kurulu onayı alındı. Gerçekleştirilen tüm deneysel işlemler, etik kurul yönergesinde belirtilen kurallar çerçevesinde yürütüldü.

Çalışmada kullanılan deney hayvanları ZBEÜ Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında üretildi. Bu deneyde 32 adet 8-12 haftalık, 250 – 300 gr. ağırlığında Wistar albino türü dişi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar rastgele, biri kontrol grubu üçü deney grubu olmak üzere toplam 4 gruba ayrıldı. Tüm denekler deney süresi boyunca optimum laboratuvar koşullarında (sıcaklık 22 ± 1 °C, nem oranı $55 \pm 8\%$, 12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde), günlük içme suyu ve %21 ham protein içerikli pellet yemlerle ad libitum olarak beslendi.

Deney prosedürü

Deney grupları aşağıdaki şekilde oluşturuldu;

- I. Kontrol (n=8): 28 gün boyunca her gün kurkumin çözücüsü Dimetilsülfoksit(DMSO) (10ml /kg) intragastrik gavaj yolu ile ve MTX çözücüsü Phosphate-Buffered Saline(PBS) intraperitoneal yol ile verildi ve doku örnekleri alındı.
- II. Kurkumin (n=8): DMSO içerisinde çözülerek 28 gün boyunca, 200 mg/kg/gün, intragastrik gavaj yoluyla verildi.
- III. MTX (n=8): PBS içerisinde çözülerek 28 gün boyunca 0,35 mg/kg/gün dozda i.p yolla metotreksat verildi.
- IV. MTX + Kurkumin (n=8): PBS içerisinde çözülerek 28 gün boyunca 0,35 mg/kg/gün dozda i.p yolla MTX ve DMSO içerisinde çözülerek 28 gün boyunca 200 mg/kg/gün, intragastrik gavaj yoluyla Kurkumin uygulaması yapıldı



Şekil 12. Deney grupları.

3.2. Dokuların Alınması ve Kimyasallar

Deney süresince sıçanların vücut ağırlıkları günlük olarak tartıldı. Dört haftalık deney prosedürü sonunda sıçanlar ketamin (90 mg/kg) + ksilazin (10 mg/kg) ile anestezi edilerek tüm deneklerin over dokuları ve kan örnekleri alındı. Alınan ovaryum dokularının ağırlıkları ölçülerek, her bir grup için ortalama ovaryum ağırlığı (mg)/100 g vücut ağırlığı hesaplandı.

Metotraksat (Koçak Farma) 50mg / 5 mL enjektabl solüsyon içeren flakon olarak temin edildi. Kurkumin olarak, Sigma firmasına ait C1386 Curcuma longa (Turmeric) powder adlı ürünü kullanıldı ve deney sürecinde kullanılana kadar üreticinin tavsiye ettiği şekilde -20 °C’de buzdolabında saklandı. Dimetil Sülfoksit (DMSO), sigma firmasına ait 276855- 250ml DMSO ürünü kullanıldı. Sakrifikasyon sırasında deneklerin ağrı duymaması için i.p. yoldan, 10 mg/kg dozda ksilazin (Rompun, Bayer) ve yine i.p. yoldan 90 mg/kg ketamin (Ketalar, Eczacıbaşı) kullanılarak derin anestezi gerçekleştirildi.

3.3. Histopatolojik Analizler

Dokuların ışık mikroskopik inceleme için işlemlendirilmesi, Zonguldak BEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirildi. Anestezi altında sakrifiye edilen deneklerden çıkarılan ovaryum dokuları nötral formalin ile fikse edilerek ve ardından rutin doku takip prosedürleri uygulanarak bloklandı. Hazırlanan parafin bloklardan, Shandon Finesse 325 marka silindirik mikrotom kullanılarak 5 mikron kalınlığında bloğun tamamı bitene kadar seri kesitler alındı. Tüm kesitler arasında 1/4 oranında örnekleme yapılarak gruplardaki her bir denek için sağlıklı ve atretik folikül yoğunluğunun semi-kantitatif olarak değerlendirilmesinde kullanılacak kesitler belirlendi. Kesitlere ovaryum dokusunun genel özelliklerini ve folikülogenez sürecini ortaya koyabilmek için Hematoksilen-Eozin (H-E), Periodik asit-Schiff (PAS) ve Masson'un üçlü boyaması uygulandı. Hazırlanan preparatlar, Zeiss marka Axio Lab A1 görüntüleme sistemli ışık mikroskobu altında değerlendirilerek, bulguların fotoğrafları çekildi.

Tüm gruplardan alınan ovaryum kesitleri ışık mikroskobu ile morfolojik olarak incelendi ve Devine ve ark. (2004)'nın kriterlerine uygun olarak folliküller sınıflandırıldı (145)(Tablo 1).

Tablo 1. Ovaryan foliküllerin sınıflandırılmasında kullanılan kriterler

Folikül	Morfolojik Özellikleri
Primordiyal Folikül	ZP'sı olmayan oositler etrafında tek tabaka yassı, granüloza progenitor hücrelerine sahip follikül.
Primer Folikül	Oositler etrafında bir ya da birden çok tabaka kübik granüloza hücreleri bulunan folikül.
Sekonder (Antral) Folikül	Oositler etrafında iki ya da daha fazla sayıda granüloza hücre tabakasının bulunduğu ve bu hücreler arasındaki boşluklarda folikül sıvısı birikiminin başladığı folikül.
Tersiyer (Graaf) Folikül	Sayısı azalmış granüloza hücrelerinin çevrelediği, folikül sıvısı ile dolu büyük bir antruma sahip, oositin ise kumulus hücreleri denilen granüloza hücreleri ile çevrelediği folikül.

3.4. İmmünohistokimyasal Analizler

DNA hasarının göstergesi olarak ovaryum dokusunda DNA onarıcı bir enzim olan PARP-1 ekspresyonu ve DNA hasarı sonucu post-translational düzenleyici mekanizmalar tarafından artan p53 ekspresyonu immünohistokimyasal yöntem ile gösterildi.

İmmünohistokimyasal analizler Zonguldak BEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı İmmünohistokimya Laboratuvarında yapıldı. Parafin bloklardan elde edilen 5 µm kalınlığında kesitler pozitif şarjlı lamlara alındı. Deparafiniasyon ve suya indirme işlemlerinden sonra antijenik bağlanma bölgelerinin açığa çıkması amacıyla sitrat tamponu içerisine alınan kesitlere 15 dakika mikrodalga fırında ısı ile muamele edildi. Daha sonra kesitler distile suya alınıp 20 dk oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. PBS ile yapılan 3 yıkamadan sonra çevresi hidrofobik kalemle çizilen kesitlere endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak amacıyla %3 H₂O₂ ile 10 dakika muamele edildi. Nonspesifik bağlanma bölgelerini bloklamak amacıyla 7 dakika Ultra V block (LabVision, TA-015-UB) uygulaması ardından primer antikorlar; anti-P53 ab (Abcam, Rabbit polyclonal p53) ve anti-PARP-1 ab (Abcam, Rabbit polyclonal PARP-11) ile +4 °C'de 24 saat inkübe edilen kesitler ardından PBS içerisine alınarak yıkama yapıldı. Yıkama sonrası sekonder antikor (Biotinylated Link, Dako, K0609) oda sıcaklığında 30 dakika uygulandı. PBS ile yapılan yıkamanın ardından kesitlere 10 dakika Streptavidin peroksidaz (Streptavidin HRP, Dako, K0609) uygulandı. Tekrar PBS ile yıkanan kesitlere mikroskop altında istenilen boyanma yoğunluğu elde edilinceye kadar diaminobenzidine (DAB) kromojen solüsyonu (Vector, SK-4100) ile muamele edildi ve hematoksin ile zıt boyama yapıldı. Tüm inkübasyonlar sırasında dokular, kurumayı ve bunun sonucunda oluşabilecek zemin boyanmasını önlemek adına nemli ortamda tutuldu. Entellan ve lamel kullanılarak kapatılan kesitler ışık mikroskobu altında incelendi. Tüm inceleme ve bulguların fotoğraflanmasında, Zeiss Axio Lab. A1 marka foto-mikroskop kullanıldı. İmmünohistokimyasal sonuçları tanımlamak için histolojik skorlama (H skoru) yapıldı ve 0: boyama yoğunluğu yok; 1+: zayıf ancak saptanabilir boyama yoğunluğu; 2+: orta veya farklı boyama yoğunluğu; 3: yoğun boyama olarak skorlandı. Her kesit için, her boyama yoğunluğu seviyesindeki hücrelerin yüzdesi hesaplandı. İstatistiksel analiz için ortalama puan değerleri kullanıldı.

3.5. Biyokimyasal Analizler

Biyokimyasal analizler için -80'de saklanan doku örneklerinden, serumda AMH ve yaş over doku örneklerinde majör antioksidanlardan süperoksit dismutaz (SOD), malondialdehit (MDA) ve katalaz (CAT) analizi ticari ELISA kitler kullanılarak yapıldı.

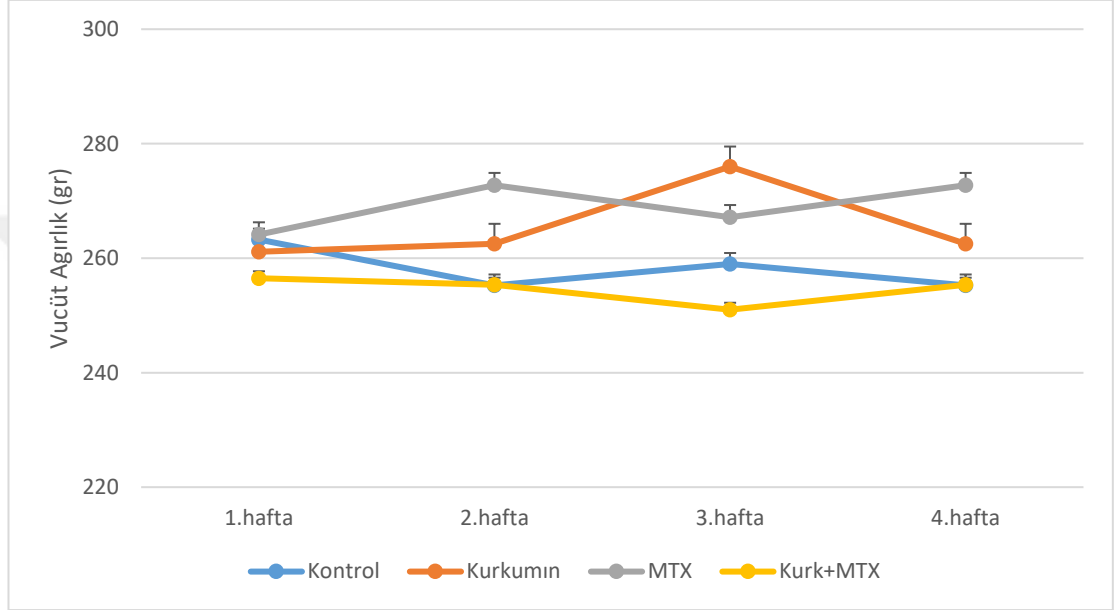
3.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılarak yapıldı. Verilerin normallik analizi Kolmogorov-Smirnov testi ile yapıldı. Normal dağılım gösteren verilerin tanımlayıcı istatistiği ortalama±standart sapma olarak diğer veriler ise ortanca (minimum-maksimum) olarak ifade edildi. Parametrik veriler için One way Anova ve post hoc Tukey testi yapıldı. Parametrik olmayan verilerin analizi için Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı. Kruskal-Wallis varyans analizinde alt grupların ikişerli karşılaştırılması ise Dunn testi ile yapıldı ve tüm değerlendirmeler için $p<0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Vücut Ağırlıkları

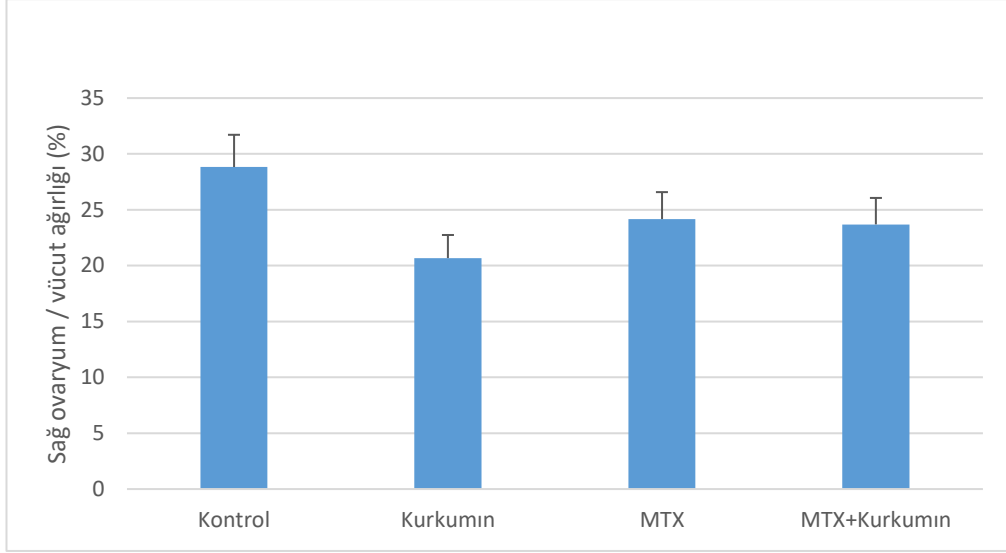
Deney prosedürü öncesi ve sonrası sıçanlar tartıldı. Hayvan ağırlıklarında grup içinde ve gruplar arası istatistiksel bir fark yoktu ($p>0.05$). Tüm gruplarda deney öncesi ve sonrası sıçan ağırlıklarındaki fark anlamlı değildi ($p>0.05$) (Şekil 13).



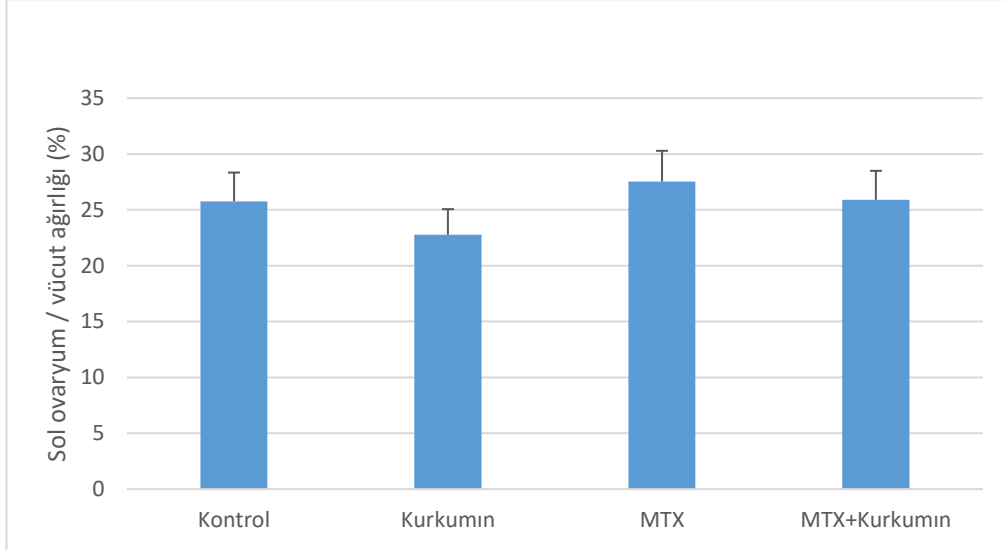
Şekil 13: Vücut ağırlıklarının karşılaştırılması.

4.2. Kurkumin ve MTX Uygulamasının Ovaryum Ağırlıklarına Etkisi

Deney sonunda sıçanlardan sağ ve sol ovaryum dokuları alınarak tartıldı ve her 100 gram vücut ağırlığı başına sağ ve sol over ağırlıkları hesaplandı (ovaryum ağırlığı/vücut ağırlığı x 100). Elde edilen verilerin istatistiksel analizinde gruplar arasında anlamlı fark yoktu ($p>0.05$)(Şekil 14,15).



Şekil 14. Sağ ovaryumun vücut ağırlığına oranı



Şekil 15. Sol ovaryumun vücut ağırlığına oranı

4.3. Histopatolojik Bulgular

4.3.1. Kurkumin ve MTX uygulamasının folikül sayılarına etkisi

Gruplar arası primordial, primer, sekonder, tersiyer ve atretik folikül sayıları karşılaştırıldı. Kurkumin tedavisi primordial folikül sayısını MTX ($p=0.001$) ve MTX + Kurkumin ($p=0.009$) gruplarına göre anlamlı arttırdı (Tablo 1) (Şekil 16). MTX

uygulamasını primordiyal folikül sayısını kontrol grubuna göre azalttı fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.127$) (Tablo 2).

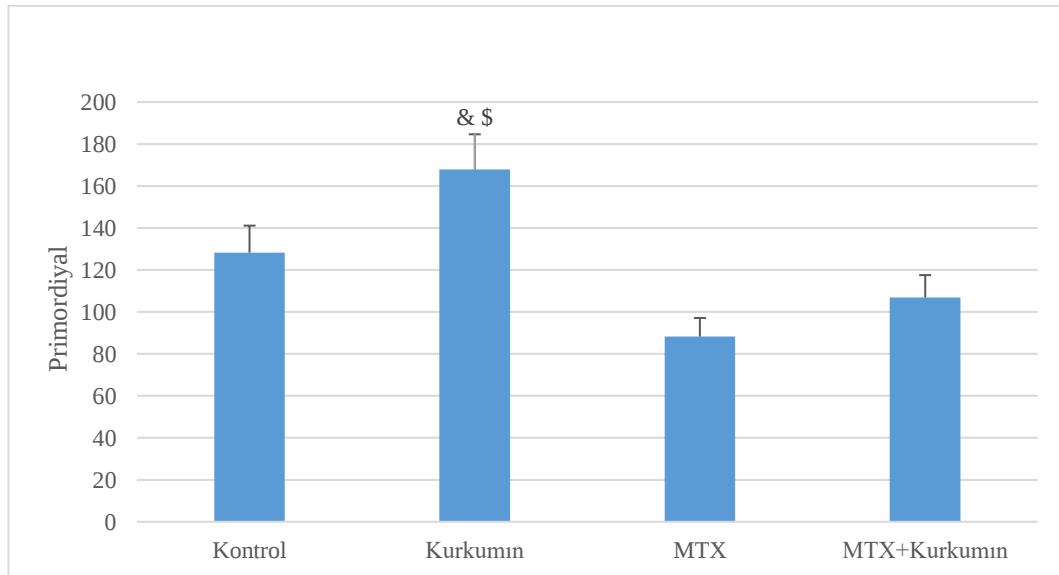
MTX atretik folikül sayısını kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı arttırdı ($p=0.011$). Kurkumin tedavisi atretik folikül sayısını MTX grubuna göre anlamlı azalttı ($p=0.043$) (Tablo 2)(Şekil 17).

Primer, sekonder ve tersiyer folikül sayıları açısından gruplar arasında anlamlı fark yoktu ($p>0.05$)(Tablo 2).

Tablo 2. Folikül sayılarının gruplar arası karşılaştırılması

	Kontrol n=7	Kurkumin n=7	MTX n=7	MTX+Kurk n=7	p
Primordial	128.29±13.91	167.86±16.62^{&\$}	88.29±12.19	106.86±14.73	0.001
Primer	50.29±9.99	65.43±23.23	46.57±20.05	67.71±21.86	0.13
Sekonder	4.43±3.2	8.14±4.29	7±3.55	9.86±3.18	0.061
Tersiyer	0.43±0.78	1.29±0.9	0.29±0.04	0.43±0.05	0.126
Atretik	37.57±5.25	43±5.37	64±7.35^{*\$}	42.29±6.46	0.01

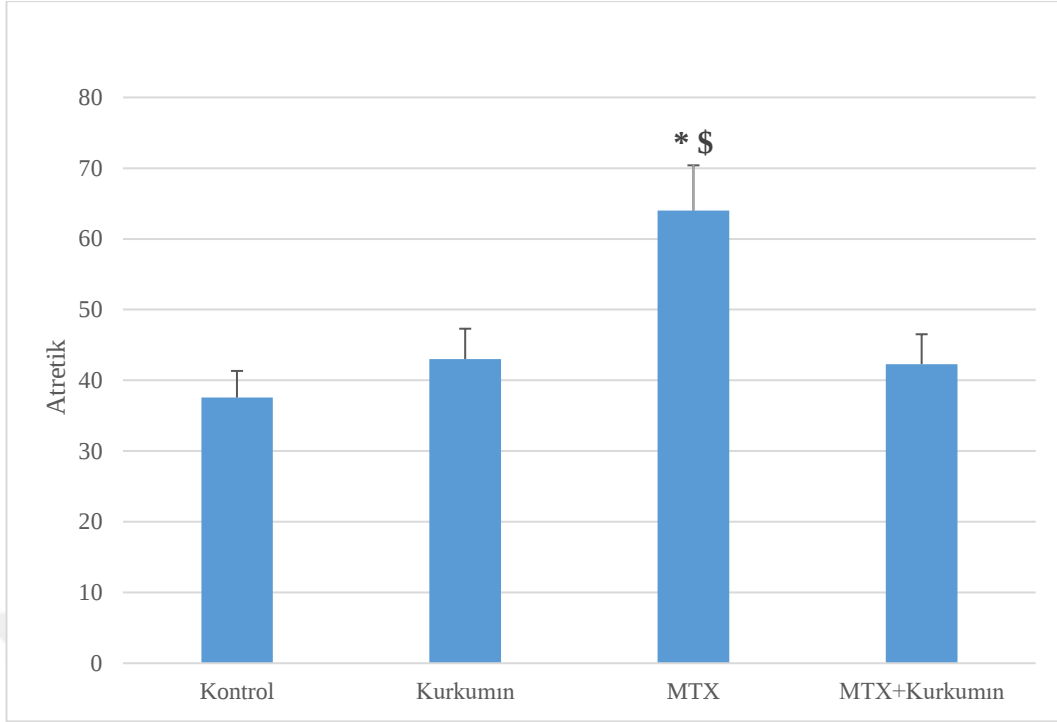
Değerler ortalama±standart sapma olarak alınmıştır. *: kontrole göre, &: MTX'e göre, \$:MTX+kurkumin grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir. $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.



Şekil 16. Primordiyal folikül sayısının karşılaştırılması

Değerler ortalama ± standart sapma olarak alınmıştır.

&: MTX'e göre, \$:MTX+kurkumin grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir. $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.



Şekil 17. Atretik folikül sayısının karşılaştırılması

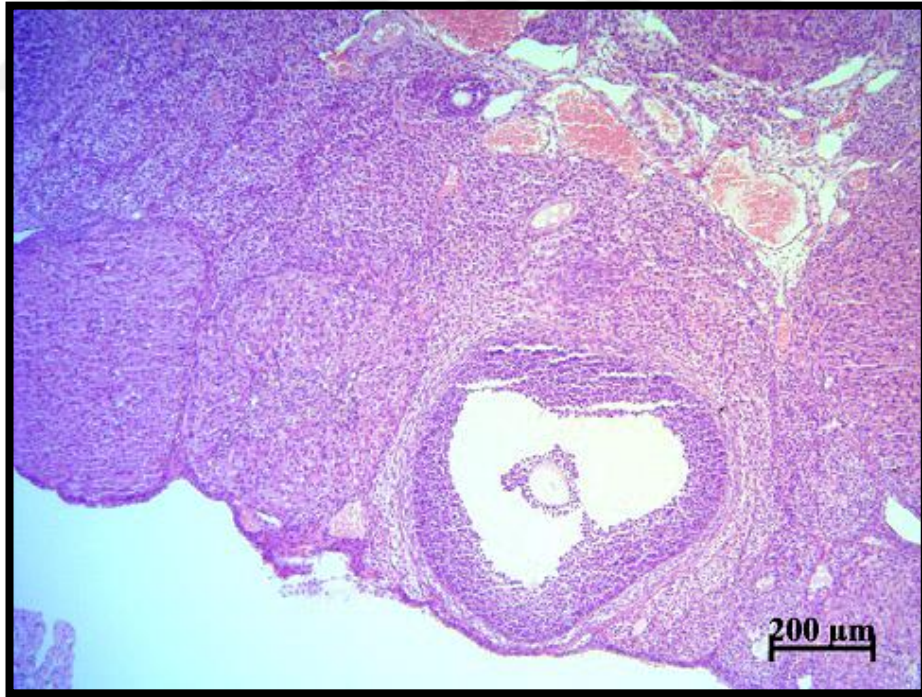
Değerler ortalama±standart sapma olarak alınmıştır. *: kontrole göre, \$:MTX+kurkumin grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir. $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4.3.1.1. Kontrol grubuna ait ışık mikroskopik bulgular

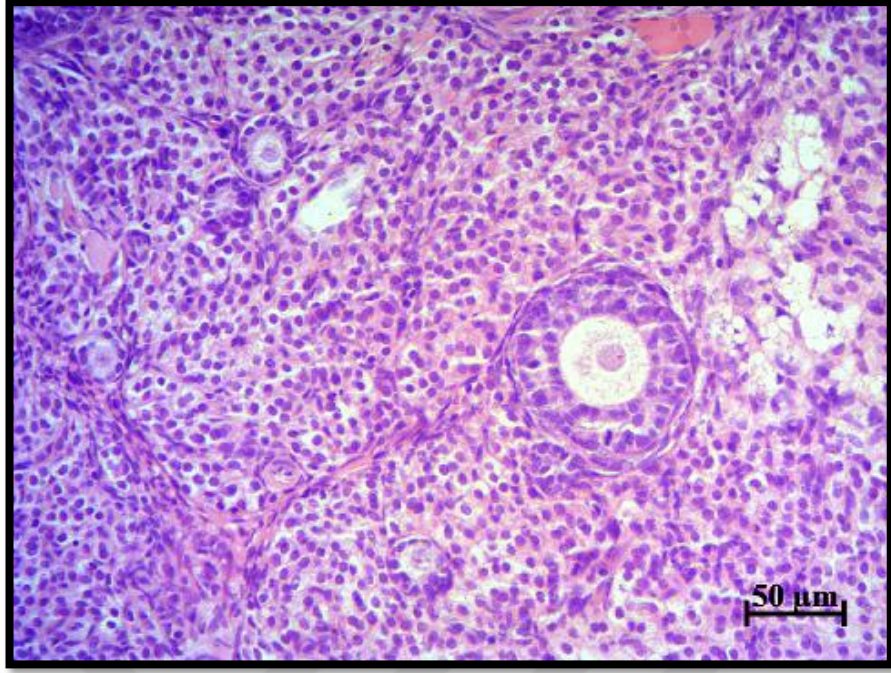
Kontrol grubu deneklerinin ovaryum kesitleri incelendiğinde dıştan tek katlı kübik ya da prizmatik hücrelerden oluşan germinal epitel ve altındaki tunica albuginea ile döşeli ovaryan kortekste farklı gelişim aşamalarında çok sayıda ovaryan folikül mevcuttu (Şekil 18). Sayıca diğer folikül tiplerinden açıkça daha fazla olan ve tek katlı yassı folikül epitel hücreleri ile döşeli primordial foliküllerin yer yer gruplar oluşturdukları gözlemlendi (Şekil 21). Yine normal görünümlü granüloza hücreleri ile çevrili ve ZP içeren unilaminar ve multilaminar foliküller de çok sayıda idi (Şekil 19). Bu foliküllerde granüloza hücrelerinin birbirlerine sıkıca bağlandıkları dikkat çekiciydi. Ayrıca oositler normal görünümlü çekirdekleri ve sitoplazmaları ile bütünlüklerini korumaktaydı. Call-Exner cisimciklerinin görülmeye başladığı preantral foliküller ile belirgin bir antruma sahip antral foliküller de gözlenmekteydi (Şekil 20). Bazı sekonder foliküllerde marjinalize olmuş bir oosit ve bunu çevreleyen ZP, korona radiata hücreleri ile bu yapıları henüz çok incelememiş ve membrana granüloza denilemeyecek folikül hücrele tabakasına bağlayan kumulus ooforus hücrelerinin şekillendiği ve böylece tersiyer folikül olma yolunda ilerledikleri görülmüştür. Unilaminar primer foliküllerde şekillenen bir tabaka olsa da multilaminar

primer folikül aşamasından itibaren net bir şekilde seçilebilen teka tabakası da olağan görünümdeydi. Bu tabakanın folikül duvarına yakın olan kısmında kan damarları içerisinde eritrositler seçilmekte iken tabakanın dış kısmını ovaryan stromadan ayırmak güçtü. Stroma içerisinde ayrıca soluk ve geniş sitoplazmaları ile steroid hormon sentesi yapan hücre özellikleri gösteren hücrelerden oluşan çok sayıda korpus luteumlara da rastlandı. Bununla birlikte foliküler gelişimin bir parçası olan atrezinin göstergesi olarak granüloza hücre tabakası içerisinde apoptotik cisimciklere rastlanan yine bu apoptotik cisimciklerin antrum kenarı boyunca dizildiği ya da serbestçe antrumda yüzdüğü, oosit sitoplazmalarının ise yer yer vakuolizasyon gösterdiği atretik foliküller de normal görünümlü foliküller arasında seçilebilmekteydi. arasında seçilebilmekteydi. seçilebilmekteydi. vakuolizasyon gösterdiği atretik foliküller de normal görünümlü foliküller arasında seçilebilmekteydi.

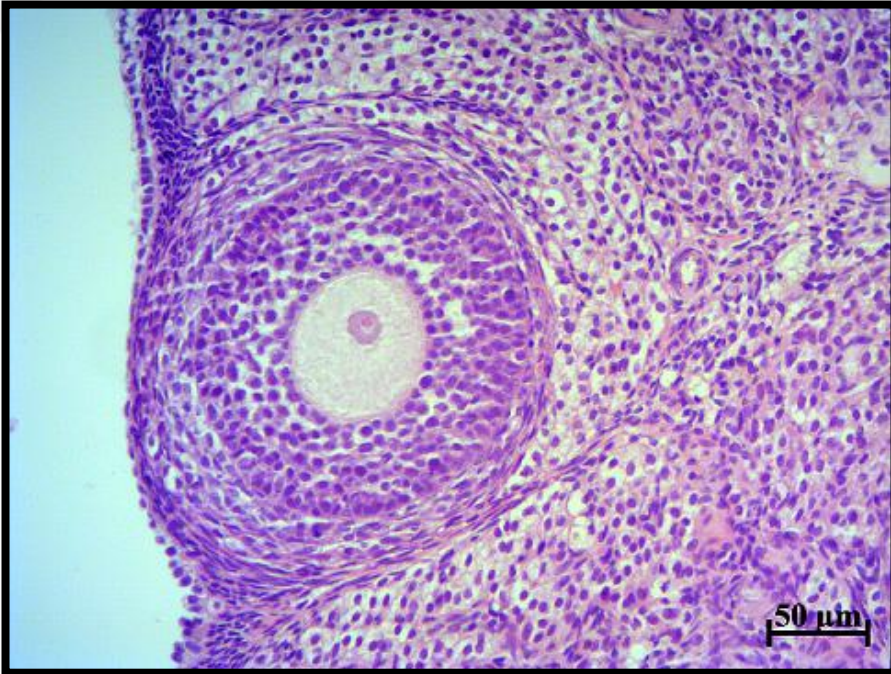
Kontrol grubu deneklerin ovaryum doku kesitlerinde ZP'yı gözlemlemek adına yapılan PAS boyamasında bu gruptaki çok sayıda normal görünümlü foliküllerin ZP'sının foliküler bazal membran ile oosit arasında düzenli bir yapıda olduğu gözlemlendi (Şekil 37A).



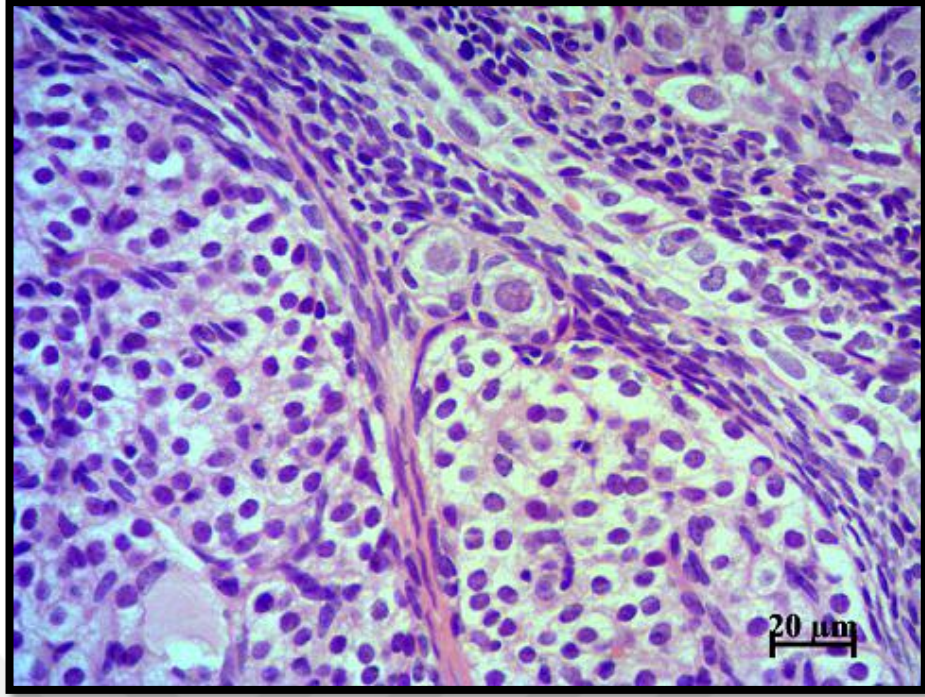
Şekil 18. Kontrol grubu ovaryumunda korpus luteum ve antral folikül gösterilmesi. Kontrol grubuna ait kesitin H+E boyamasında kortekste korpus luteumlar ile birlikte normal görünümlü ve tersiyer foliküle evrilmek üzere olan bir antral folikül görünmekte.



Şekil 19. Kontrol grubu ovaryumunda primer folikül gösterilmesi. Kontrol grubuna ait kesitin H+E boyamasında ovaryan kortekste normal görünümlü unilaminar ve multilaminar primer foliküller görünmekte.



Şekil 20. Kontrol grubu ovaryumunda erken antral folikül gösterilmesi. Kontrol grubuna ait kesitin H+E boyamasında Oosit çekirdeği de seçilebilen ve granüloza hücreleri arasında Call-Exner cisimciklerinin görülmeye başladığı bir erken antral folikül izlenmekte.



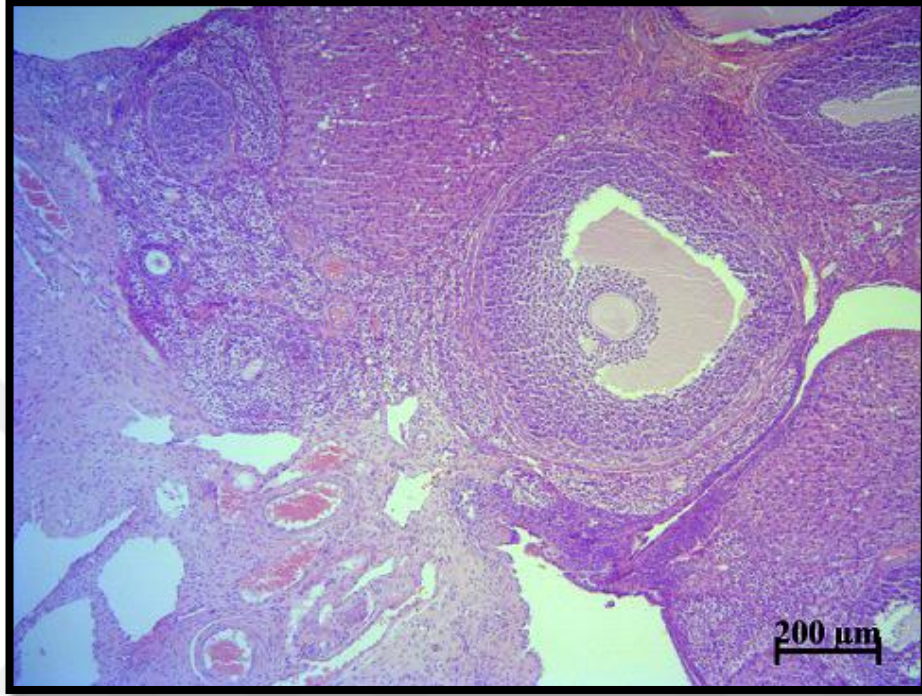
Şekil 21. Kontrol grubu ovaryumunda primordial folikül gösterilmesi. Kontrol grubuna ait kesitin H+E boyamasında kortekste normal görünümlü germinal epitelin hemen altında tek katlı yassı folikül hücreleri ile dikkat çeken iki primordial folikül izlenmekte.

4.3.1.2. Kurkumine ait ışık mikroskopik bulgular

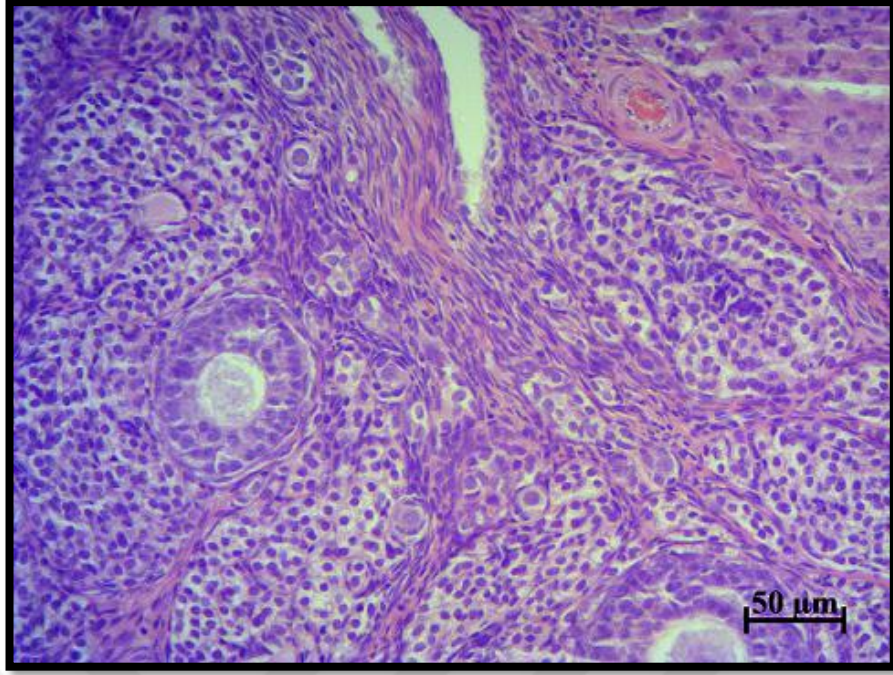
Bu grup deneklerinin ovaryum doku kesitlerinde yapılan H+E boyamasında histolojik görünümün kontrol grubuna çok benzediği ve ovaryan korteksin farklı

gelişim aşamalarındaki çok sayıda normal görünümlü folikül içerdiği gözlemlendi (Şekil 22,23,24,25).

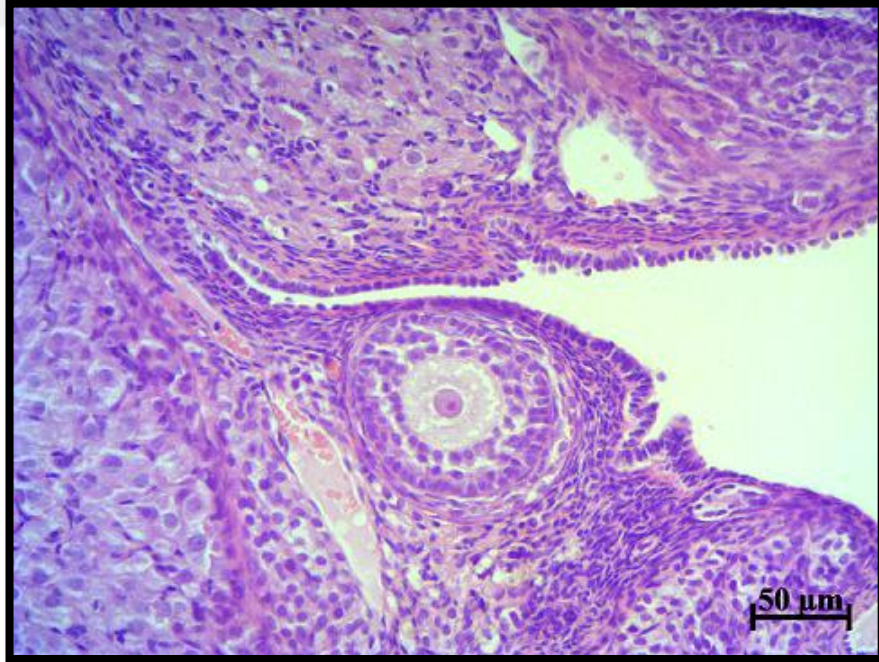
PAS boyamasında kurkumin grubuna ait görüntüde ZP'nın kontrol grubuna benzer özellik sergilediği görülmektedir (Şekil 37B).



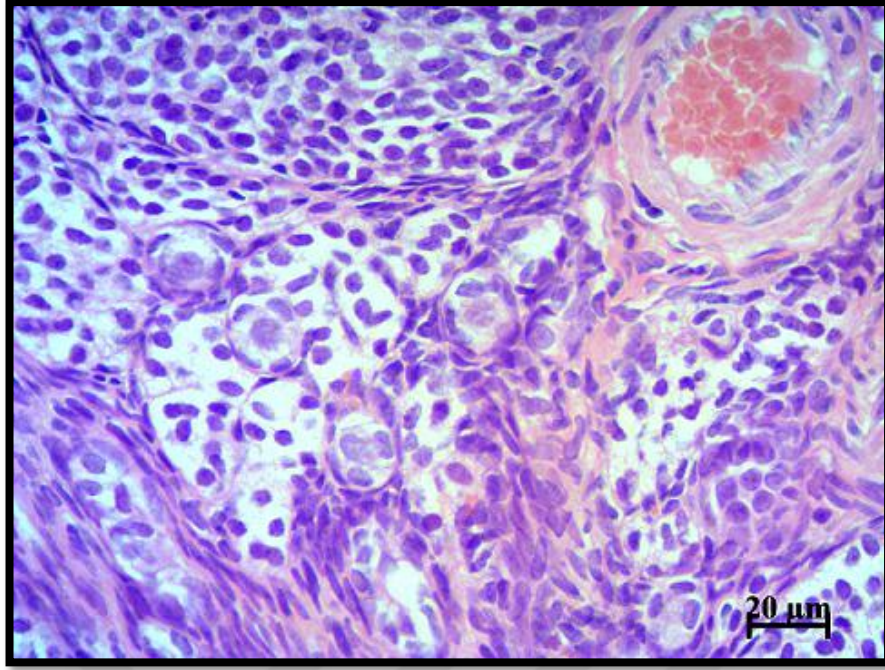
Şekil 22. Kurkumin grubu ovaryumunda primer folikül ve tersiyer folikül gösterilmesi. Kurkumin grubuna ait kesitin H+E boyamasında kortekste korpus luteumlar ile birlikte normal görünümlü bir primer folikül ile bir tersiyer folikül görünmekte.



Şekil 23. Kurkumin grubu ovaryumunda primer folikül ve primordial folikül gösterilmesi. Kurkumin grubuna ait kesitin H+E boyamasında kortekste çok sayıda normal görünüm arz eden primordial folikül ile bir multilaminar primer folikül görünmekte.



Şekil 24. Kurkumin grubu ovaryumunda germinal epitel altında primer folikül ve primordial folikül gösterilmesi. Kurkumin grubuna ait kesitin H+E boyamasında normal görünümlü germinal epitel altında bir primordial folikül ile bir multilaminar primer folikül görünmekte.



Şekil 25. Kurkumin grubu ovaryumunda kortikal stroma içerisinde primordial folikül topluluğunun gösterilmesi. Kurkumin grubuna ait kesitin H+E boyamasında kortikal stroma içerisinde grup oluşturmuş tek katlı yassı folikül hücreleri ile çevrili ve oosit çekirdekleri de belirgin olan normal görünümlü primordial folikül topluluğu izlenmekte.

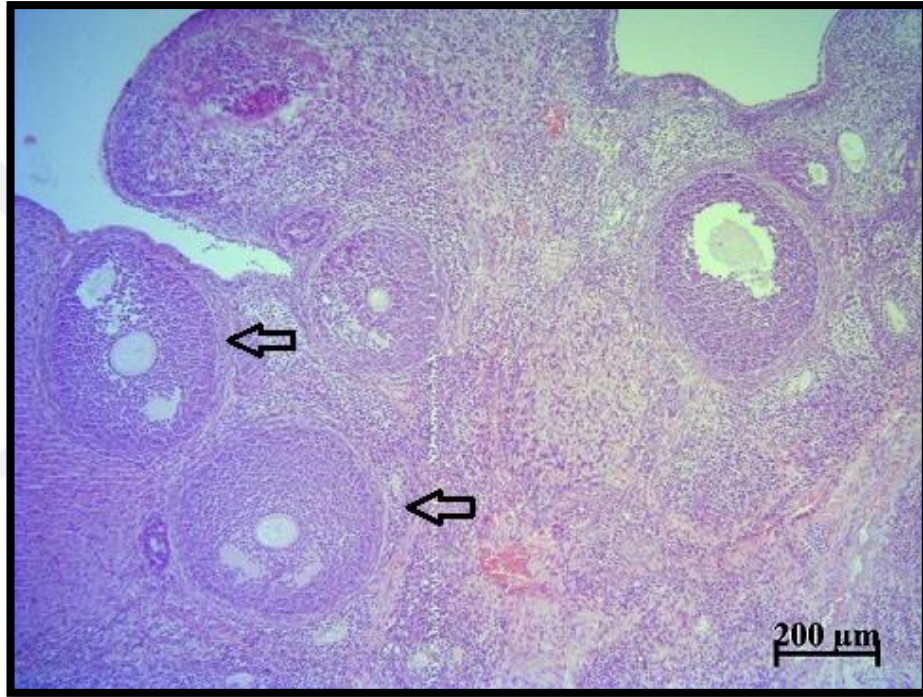
4.3.1.3. Metotreksat grubuna ait ışık mikroskopik bulgular

Metotreksat deneklerin ovaryum doku kesitlerinde yapılan H+E boyamasında kontrol ve kurkumin gruplarıyla karşılaştırıldığında ilk bakışta atratik foliküllerin çok sayıda olması dikkat çekiydi. Atratik foliküller granüloza hücreleri arasındaki bağlantıların gevşemesi ve birbirlerinden uzaklaşmaları, granüloza hücre tabakasında apoptotik cisimciğin gözlenmesi, apoptotik cisimciklerin yer yer antrum sınırı boyunca dizilmesi ve yer yer antrumda serbestçe yüzmesi ile kolayca ayırt edilebilmekteydi (Şekil 27,28). Bazı atratik foliküllerde oosit sitoplazmasındaki vakuolizasyon dikkat çekiciydi (Şekil 30).

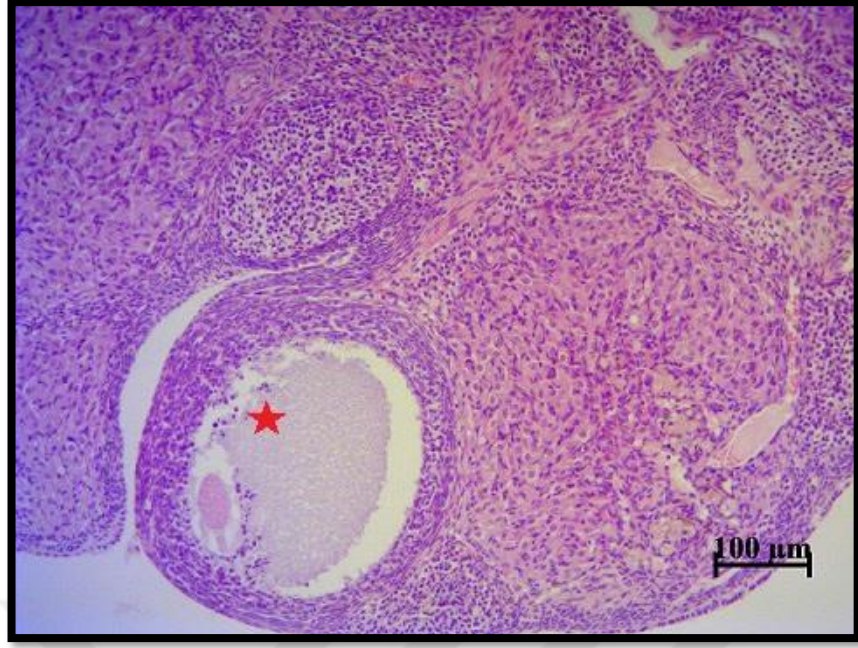
Kontrol ve kurkumin grupları karşılaştırıldığında germinal epitelin bu gruplara benzer şekilde bütünlüğünü koruduğu gözlemlendi. Yine bu gruplara benzer şekilde stroma da ödem veya hemorajiye rastlanmadı. Bununla birlikte korteksdeki bazı primordial folikül kümelerinde piknotik çekirdekleri ve iğisi görünümleriyle erken evre foliküler atrofiye işaret eden çok sayıda primordial folikül mevcuttu (Şekil 29). Yine bazı primordial foliküllerin ise oosit sitoplazmasında vakuolizasyon ve oosit

çekirdeklerin kaybı gibi ileri evre atrezi bulgularını sergilediği gözlemlendi. Bu grupta karşılaştığımız ilginç bir bulgu ise normal görünümlü sekonder foliküllerin sayısının kontrol ve kurkumine göre daha fazla olmasıydı (Şekil 26). Ayrıca MTX grubunda kortikal stroma içerisinde çok sayıda adiposit gözlenmektedir (Şekil 31).

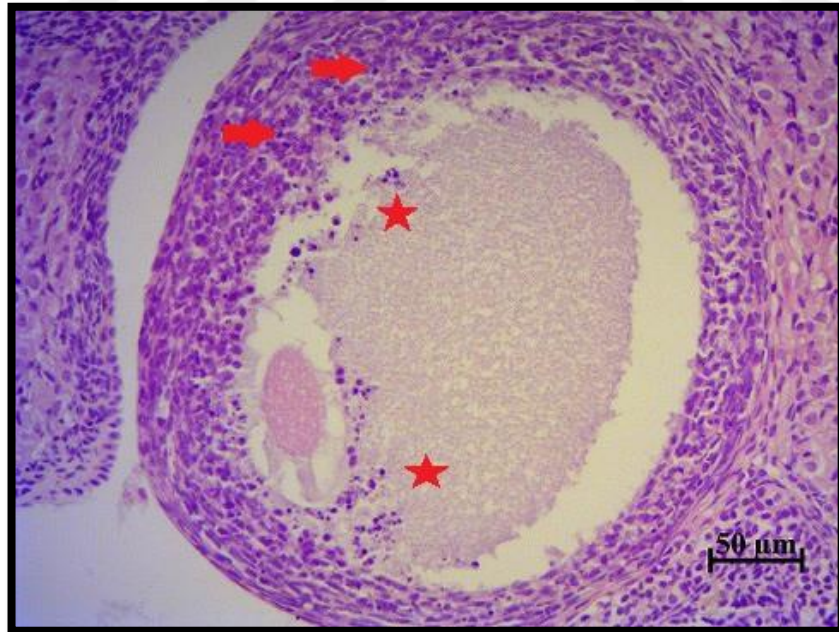
Bu grubun deneklerin ovaryan kesitlerinde yapılan PAS boyamasında çok sayıdaki atretik foliküllerde ZP'nın bazal membrandan ayrıldığı, ZP kalınlığının hojenliğini kaybettiği ve yer yer çok incelendiği, dalgalı bir seyir izleyerek antrumda serbestçe yüzdüğü gözlenmiştir (Şekil 37C).



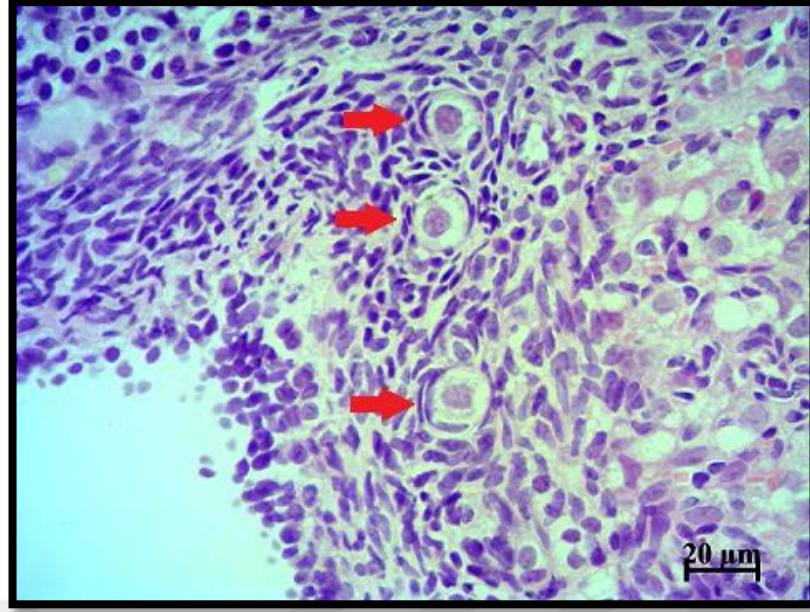
Şekil 26. MTX grubu ovaryumunda sekonder foliküllerin gösterilmesi. MTX grubuna ait kesitin H+E boyamasında kortekste atretik foliküllerin yanısıra normal görünümlü sekonder foliküller dikkat çekmekte (siyah oklar)



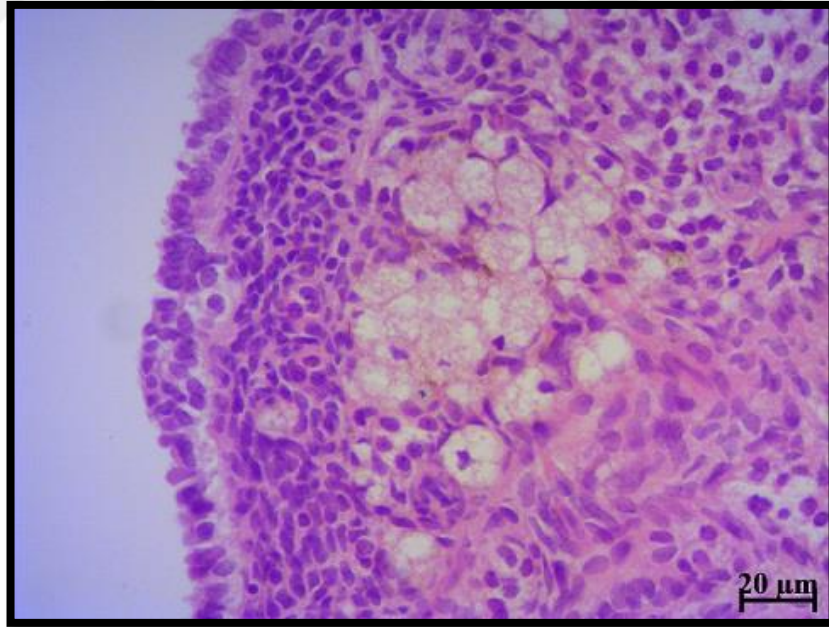
Şekil 27. MTX grubu ovaryumunda atretik folikül gösterilmesi. MTX grubuna ait kesitin H+E boyamasında kortekste erken evre atretik değişiklikler gösteren bir tersiyer folikül izlenmekte. Foliküler atrezinin işareti olan apoptotik cisimcikler antrum sınırı boyunca yüzmekte (kırmızı yıldız).



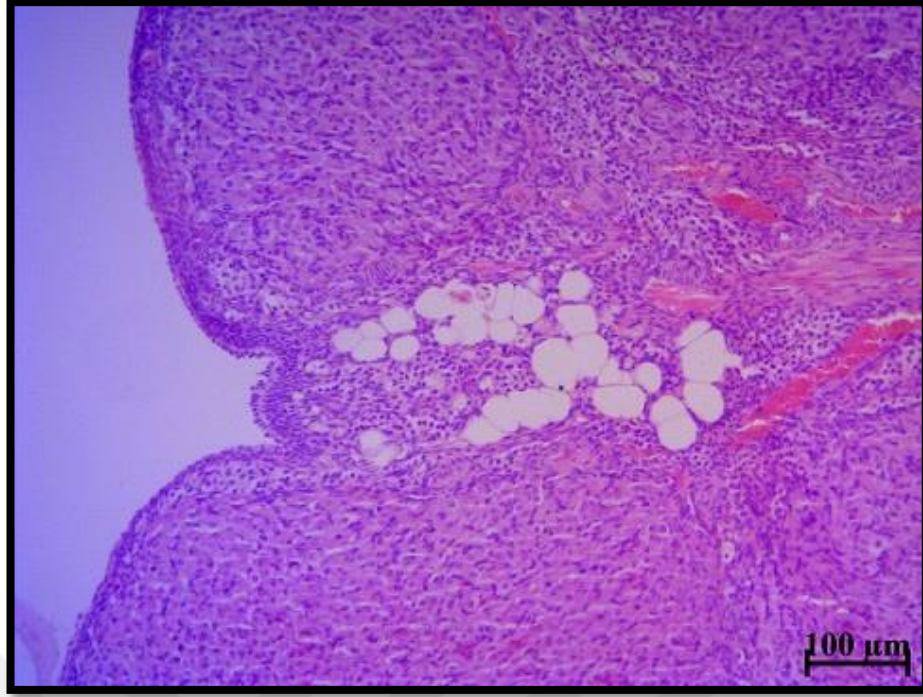
Şekil 28. MTX grubu ovaryumunda atretik folikülde apoptotik cisimciklerin gösterilmesi. Mtx grubuna ait kesitin H+E boyamasında germinal epitelin hemen altında yerleşmiş atretik tersiyer folikülün granüloza hücre tabakasında (kırmızı oklar) ve antrum içerisinde (kırmızı yıldızlar) apoptotik cisimcikler gözlenmekte



Şekil 29. MTX grubu ovaryumunda erken evre atretik primordiyal folikül gösterilmesi. Mtx grubuna ait kesitin H+E boyamasında normal görünümlü germinal epitel altında kortikal stromada apoptozun ilk işareti olarak piknotik çekirdekleri rahatlıkla seçilen iğsi görünümlü folikül hücreleri ile çevrili erken evre atretik primordial foliküller.



Şekil 30. MTX grubu ovaryumunda atretik primordial folikül topluluğu gösterilmesi. MTX grubuna ait kesitin H+E boyamasında normal görünümlü germinal epitel altında kortikal stroma içerisinde oosit çekirdekleri seçilemeyen ve oosit sitoplazmaları belirgin vakuolizasyon gösteren, kondanse çekirdekli ve iğ biçimli folikül hücreleri ile dşeli çok sayıda atretik primordial folikül gözlenmekte.



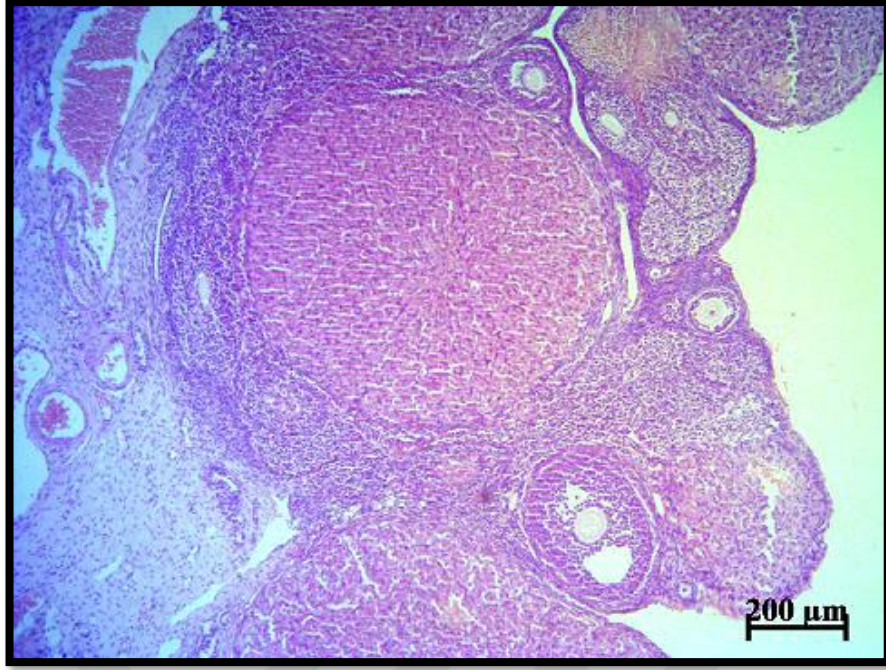
Şekil 31. MTX grubu ovaryumunda adiposit hücre gösterilmesi. MTX grubuna ait kesitin H+E boyamasında kortikal stroma içerisinde çok sayıda adiposit gözlenmekte.

4.3.1.4. Metotreksat+ Kurkumin grubuna ait ışık mikroskopik bulgular

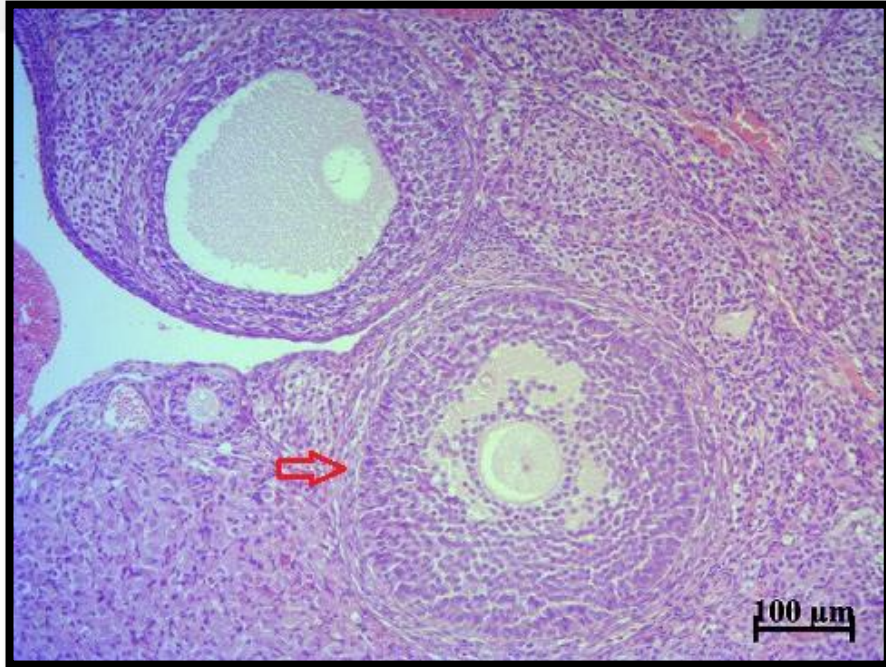
MTX+KUR grubu deneklerin ovaryum doku kesitlerinde yapılan H+E boyamasında normal görünümlü germinal epitel altında çok sayıda atretik folikül bulunduğu gözlemlendi (Şekil 32). Bununla birlikte yalnızca MTX verilen gruba göre normal görünümlü primordial folikülün sayısının daha fazla olduğu ve yine MTX grubuna benzer şekilde bu grupta bütünlüğünü korumuş granüloza hücre tabakası ve normal görünümlü oositi ile sağlıklı sekonder foliküllerin kontrol ve kurkumin grubuna göre daha fazla sayıda olduğu dikkat çekiciydi (Şekil 33,34).

MTX+KUR grubuna ait kesitin H+E boyamasında Call-Exner cisimciklerinin gözlenmeye başladığı bir erken antral folikül ile yine normal görünümlü iki primordial folikül (Şekil 35). ve olağan görünümlü germinal epitel altında kortikal stroma içerisinde yerleşmiş normal görünümlü bir primordial foliküllerde görüldü (Şekil 36).

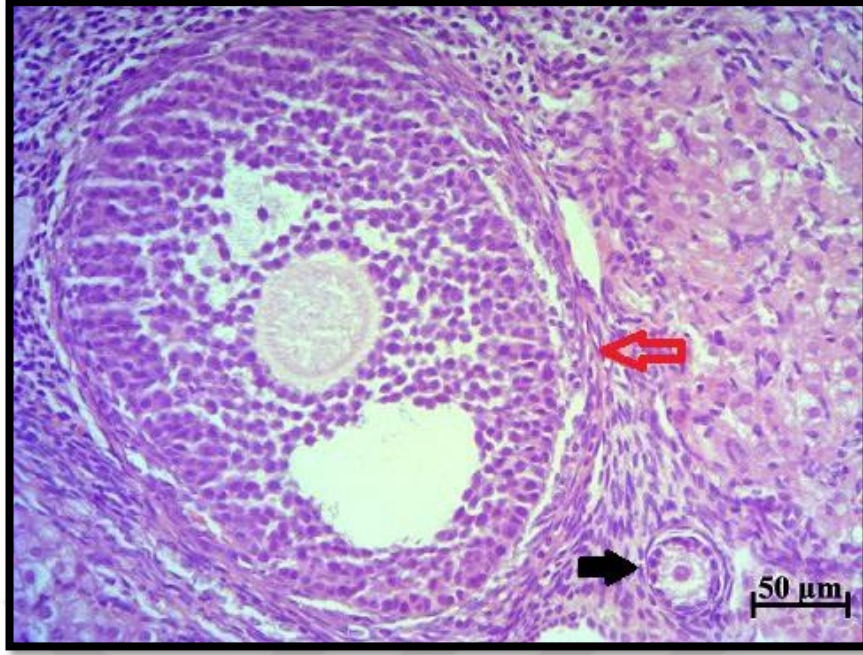
MTX+KUR grubu deneklerin ovaryum kesitlerinde yapılan PAS boyamasında ZP'nın çoğunlukla kontrol ve kurkumin gruplarına benzer özellik sergilediği, homojen kalınlıkta olduğu ve bazal membran ile oosit arasında düzgün bir seyir izlediği gözlenmiştir (Şekil 37D).



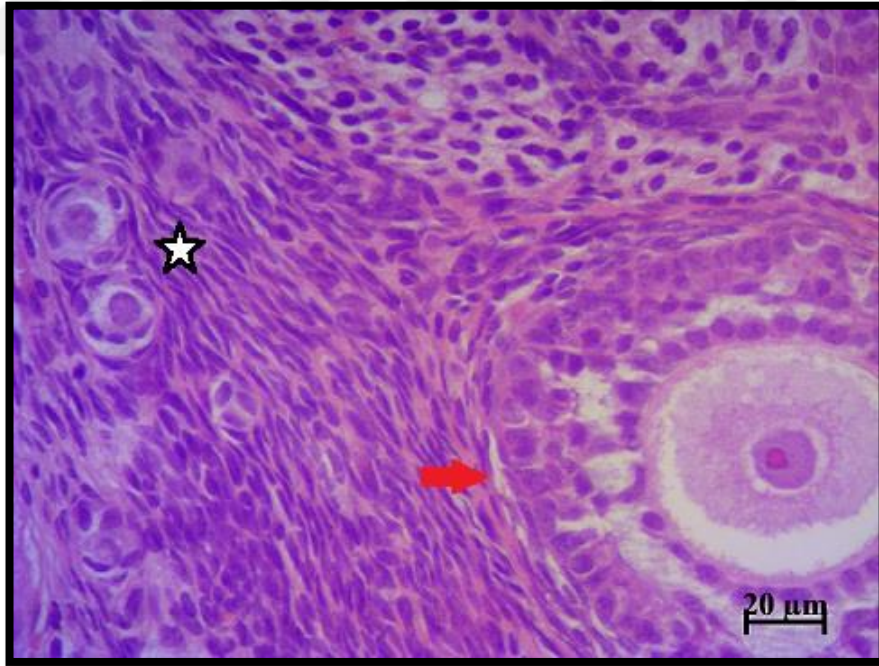
Şekil 32. MTX+KUR grubu ovaryumunda atretik ve sekonder folikül gösterilmesi. MTX+KUR grubuna ait kesitin H+E boyamasında kortekste erken ve ileri evre atretik foliküller ve normal görünümlü bir sekonder folikül.



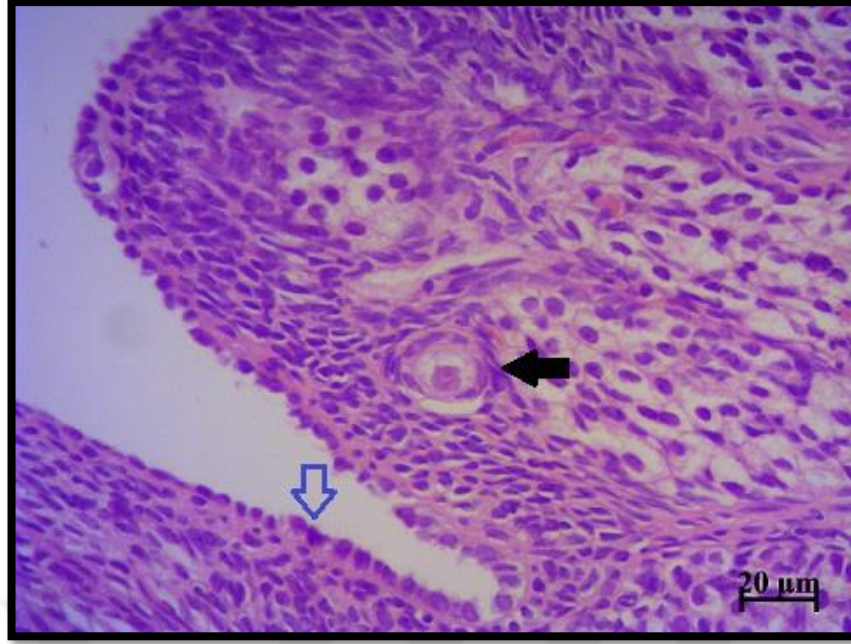
Şekil 33. MTX+KUR grubu ovaryumunda normal görünümlü sekonder folikül gösterilmesi. MTX+KUR grubuna ait kesitin H+E boyamasında çekirdeği belirgin, sitoplazmasında vakuolizasyon göstermeyen normal bir oosit ile birlikte normal görünümlü granüloza hücreleri içeren bir sekonder folikül.



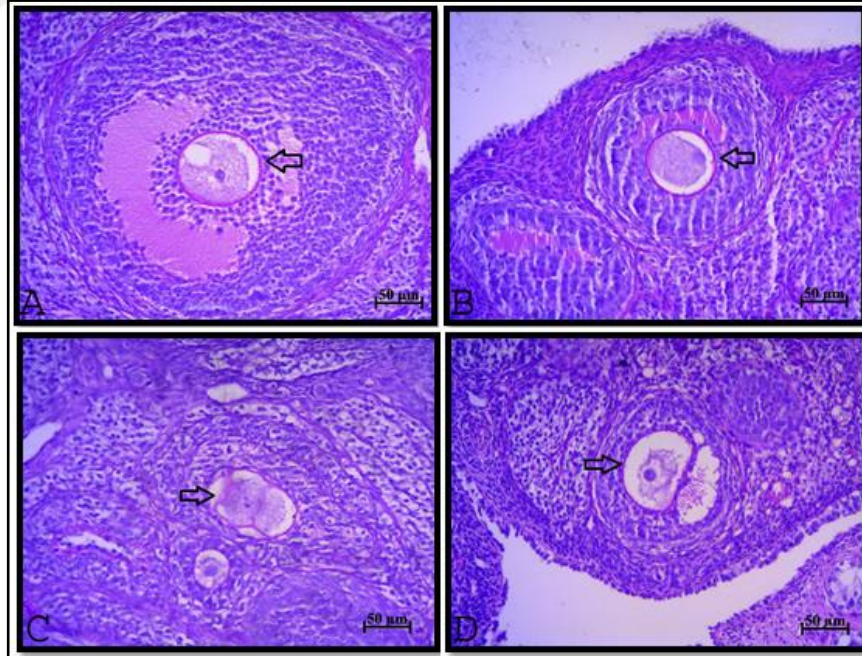
Şekil 34. MTX+KUR grubu ovaryumunda primer ve sekonder folikül gösterilmesi. MTX+KUR grubuna ait kesitin H+E boyamasında normal görünümlü bir unilaminar primer folikül (siyah ok) ve sekonder folikül (kırmızı ok) görünmekte.



Şekil 35. MTX+KUR grubu ovaryumunda erken antral ve primordial folikül gösterilmesi. MTX+KUR grubuna ait kesitin H+E boyamasında Call-Exner cisimciklerinin gözlenmeye başladığı bir erken antral folikül (kırmızı ok) ile yine normal görünümlü iki primordial folikül (yıldız)



Şekil 36. MTX+KUR grubu ovaryumunda normal görünümlü germinal epitel ve primordial folikül gösterilmesi. MTX+KUR grubuna ait kesitin H+E boyamasında olağan görünümlü germinal epitel (mavi ok) altında kortikal stroma içerisinde yerleşmiş normal görünümlü bir primordial folikül (siyah ok).



Şekil 37. Tüm gruplara ait ovaryum kesitlerinin PAS boyanma görüntüleri. A: Kontrol grubuna ait görüntüde ZP'nın granüloza hücreleri ve oosit membranı ile sıkı ilişkisini koruduğu, homojen kalınlıkta ve düzgün seyirli olduğu gözlenmekte. B: Kurkumin grubuna ait görüntüde ZP'nın kontrol grubuna benzer özellik sergilediği görülmekte.

C: MTX grubuna ait görüntüde ZP'nın granüloza hücreleri ve oosit ile olan ilişkisini kaybederek dalgalı görünüm arz ettiği, antrumda salındığı ve heterojen kalınlıkta olduğu gözlenmekte. D: MTX+KUR grubuna ait görüntüde ZP'nın kontrol ve kurkumin gruplarına benzer şekilde granüloza hücreleri ve oosit ilişkisini sıkı bir şekilde devam ettirdiği ve homojen kalınlıkta olduğu görünmekte.

4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

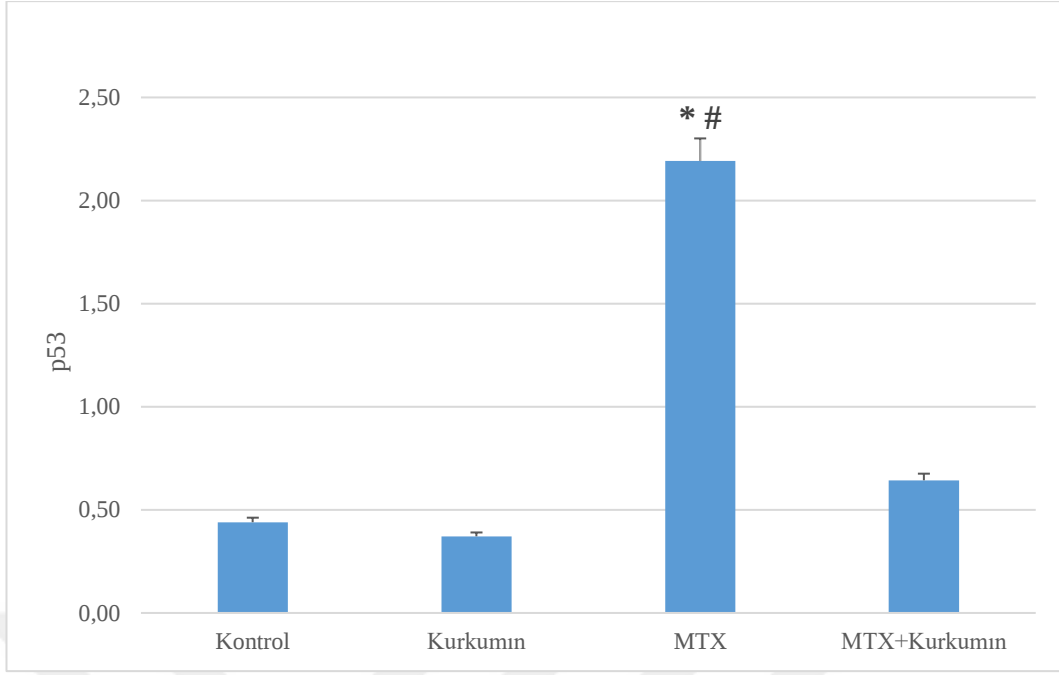
4.4.1. Kurkumin ve MTX uygulamasının p53 ve PARP-1 üzerine etkisi

İmmünohistokimyasal analiz bulgularına göre gruplar arası farklılıklar biyoistatistiksel olarak anlamlı görülmüştür. p53 ekspresyonu MTX grubunda kontrol ($p=0.017$) ve kurkumin($p=0.004$) grubuna göre anlamlı artmıştır (Tablo 3)(Şekil 38). PARP-1'da benzer etkiler göstererek MTX uygulanan grupta kurkumin ($p=0.002$) ve MTX+kurkumin (0.025) gruplarına göre anlamlı artış gösterdi (Tablo 3)(Şekil 39).

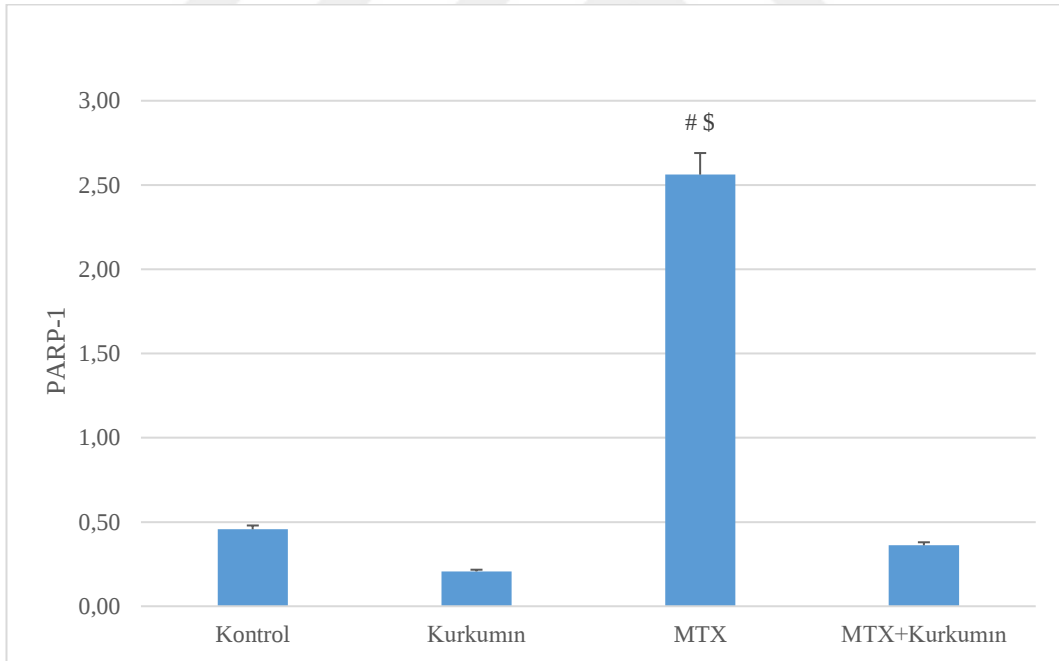
Tablo 3. p53 ve PARP-1 gruplar arası karşılaştırılması

	Kontrol n=7	Kurkumin n=7	MTX n=7	MTX+KUR n=7	p
p53	0.5(0.2-0.53)	0.25(0.1-0.83)	2.17(1.6-2.85) *#	0.55(0.07-1.2)	0.003
PARP-1	0.45(0.1-0.99)	0.085(0-0.9)	2.55(2.44-2.72) #&	0.285(0.02-0.92)	0.002

Değerler ortanca(min-max) olarak alınmıştır. *: kontrole göre, #: kurkumine göre, &: MTX'e göre, \$: MTX+kurkumin grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir. $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.



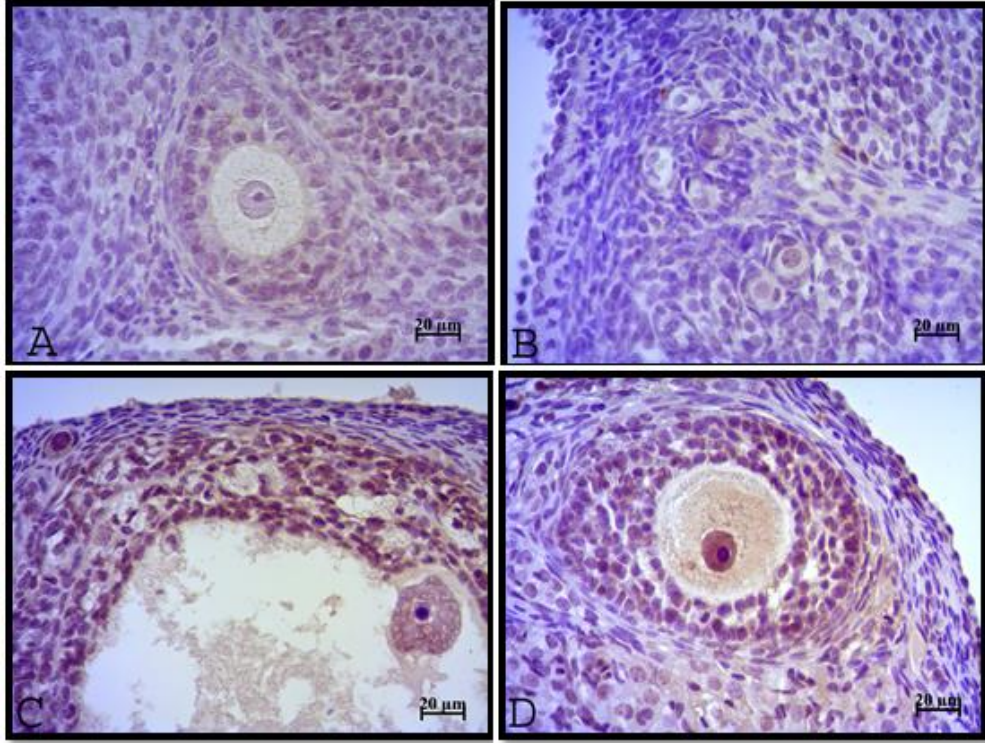
Şekil 38. p53 immunohistokimyasal ifadesinin gruplar arası karşılaştırması



Şekil 39. PARP-1 immunohistokimyasal ifadesinin gruplar arası karşılaştırması

4.4.1.1. PARP-1 için yapılan immünohistokimyasal boyama bulguları

PARP-1 immünreaktivitesini belirlemek için yapılan immünohistokimyasal boyamalardan elde edilen H-skor verilerinin istatistiksel analizinde Mtx grubu ile MTX+KUR grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0,002$) (Tablo 4)(Şekil 40).

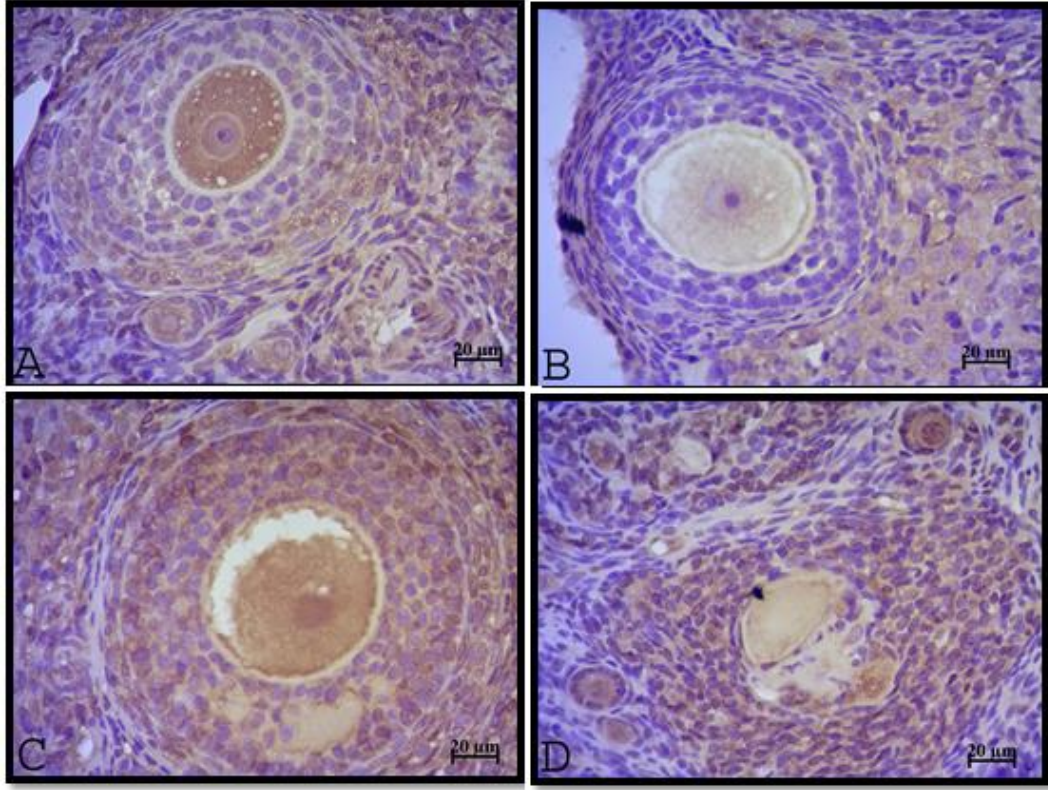


Şekil 40. Tüm gruplara ait ovaryum kesitlerinde PARP-1 ekspresyonları için yapılan immünohistokimyasal boyama görüntüleri. A: Kontrol, B: Kurkumin, C: Mtx, D: MTX+KUR.

4.4.1.2. P53 için yapılan immünohistokimyasal boyama bulguları

P53 immünreaktivitesini belirlemek için yapılan immünohistokimyasal boyamalardan (Şekil 34) elde edilen H-skor verilerinin istatistiksel analizinde kontrol ve kurkumin grupları arasında fark bulunamadı. Mtx verilen gruplar ile kontrol ve kurkumin grupları arasında P53 ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,003$) (Tablo 4) (Şekil 41). Mtx ve MTX+KUR grupları arasında da

istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Bununla birlikte MTX+KUR grubunda P53 ekspersyonu Mtx grubuna göre daha zayıftı ve bu durum H-skor değerlerine de yansdı.



Şekil 41. Tüm gruplara ait ovaryum kesitlerinde P53 ekspresyonları için yapılan immünohistokimyasal boyama görüntüleri. A: Kontrol, B: Kurkumin, C: Mtx, D: MTX+KUR

4.5. Biyokimyasal Bulgular

4.5.1. Kurkumin ve MTX uygulamasının MDA, SOD ve CAT düzeylerine etkisi

Biyokimyasal analizlerde oksidatif stres belirteci olan MDA düzeyleri ve antioksidan SOD ve CAT düzeyleri gruplar arasında karşılaştırıldı.

Doku MDA düzeyleri MTX uygulanan grupta kurkumin ($p=0.003$) ve MTX+kurkumin ($p=0.002$) gruplarına göre anlamlı artış gösterdi (Tablo 4)(Şekil 42).

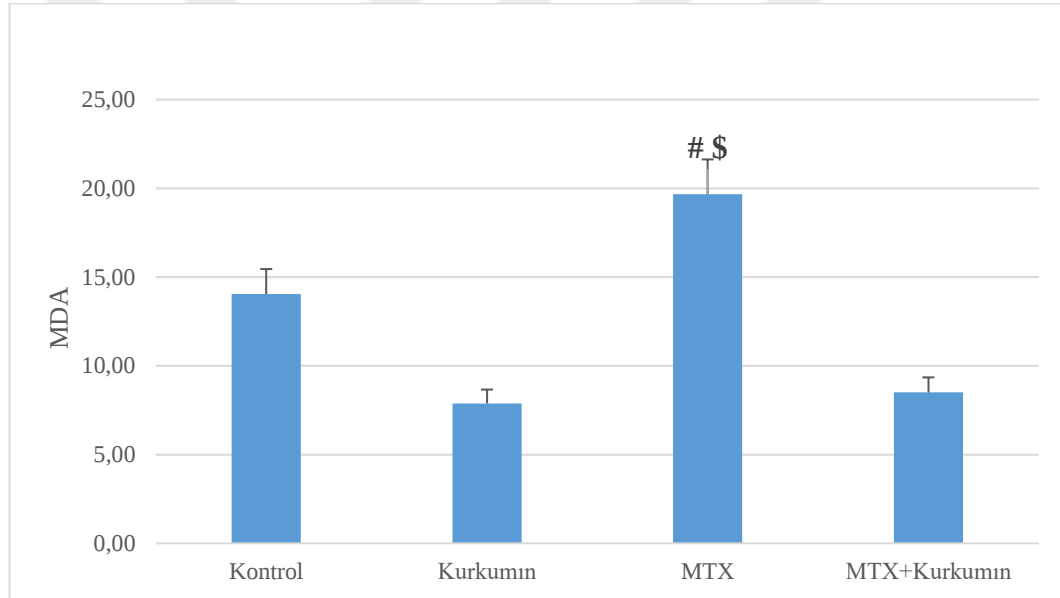
Antioksidan parametrelerde gruplar arası anlamlı farklılıklar gözlemlendi. MTX grubu SOD düzeyleri kurkumin($p=0.004$) ve MTX+kurkumin ($p=0.036$) gruplarına göre anlamlı azaldı (Tablo 4)(Şekil 43). CAT düzeylerinin gruplar arası

karşılaştırılmasında MTX+kurkumin grubu kontrol ($p=0.019$) grubuna göre anlamlı olarak artış gösterdi (Tablo 4)(Şekil 44).

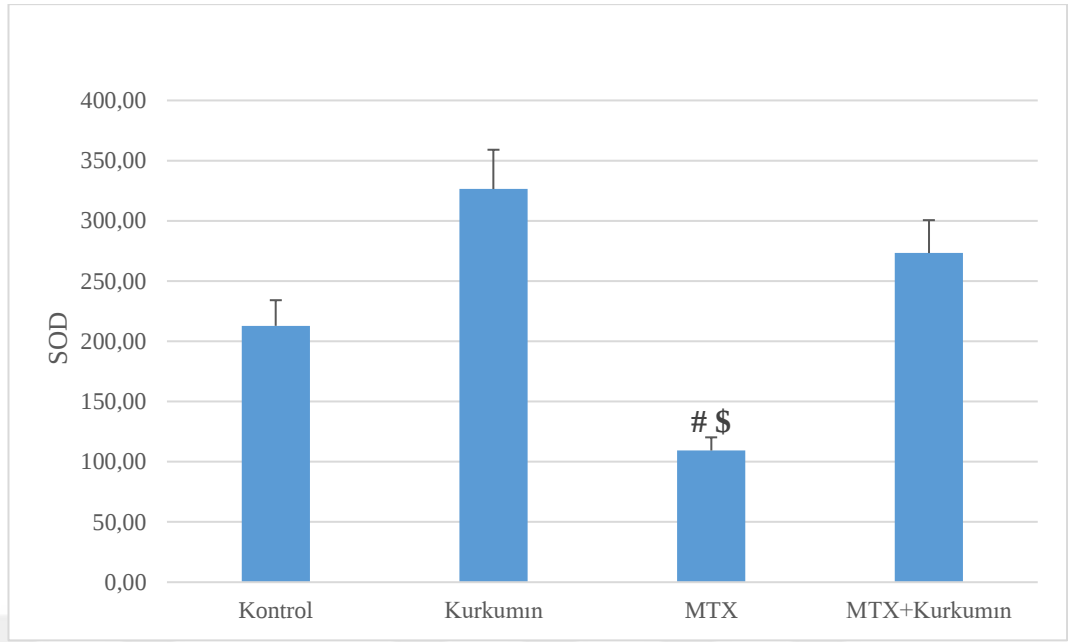
Tablo 4. Doku MDA, SOD ve CAT gruplar arası karşılaştırılması

	Kontrol n=7	Kurkumin n=7	MTX n=7	MTX+Kurk n=7	<i>p</i>
MDA	14±3.51	7.87±2.2	19.66±3.62[#]^{\$}	8.5±1.4	0.031
SOD	212.85±21	326±40	109.34±13.4[#]^{\$}	273.28±33.08	0.005
CAT	199.14±17.3	255±28	278.71±36.23	420.29±51[*]	0.026

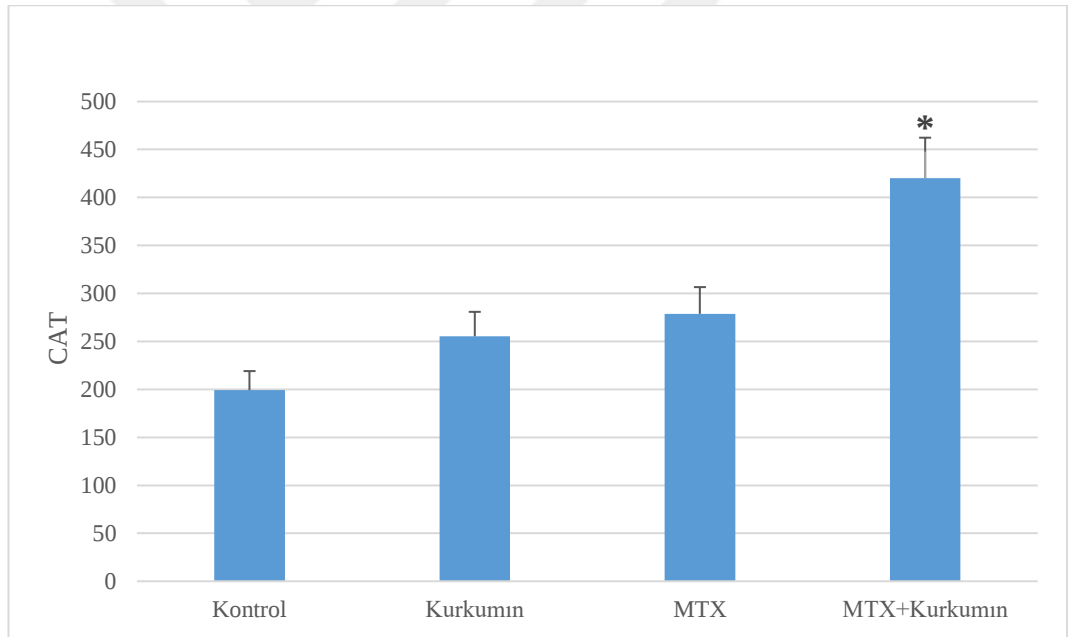
Değerler ortalama±standart sapma olarak alınmıştır. *: kontrole göre, #: kurkumine göre, &: MTX'e göre, \$: MTX+kurkumin grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir. $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.



Şekil 42. MDA düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması



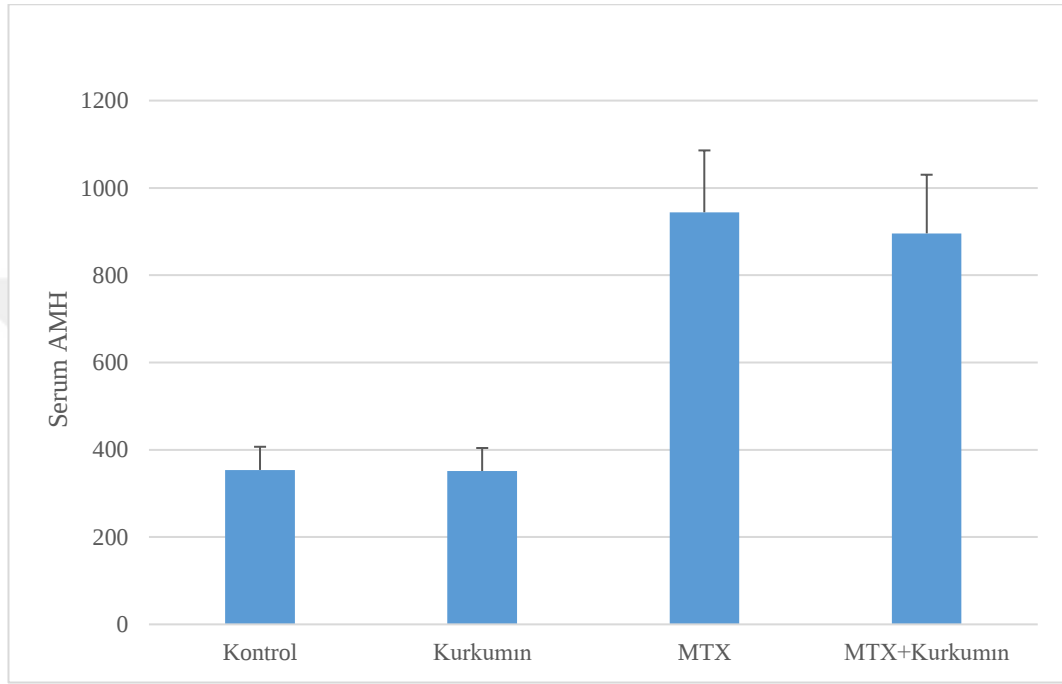
Şekil 43. SOD düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması



Şekil 44. CAT düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması

4.5.2. Kurkumin ve MTX uygulamasının serum AMH düzeylerine etkisi

Serum AMH düzeyleri MTX uygulanan gruplarda artış gösterdi. Kurkumin tedavisi MTX gruplarında AMH düzeylerini değiştirmedi. AMH düzeylerinde bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.058$) (şekil 45).



şekil 45. Serum AMH düzeylerinin karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda sıçanlarda metotreksat maruziyeti sonucu oluşan ovaryan doku hasarı ve folikülogenezde meydana gelen bozulma üzerine kurkuminin etkisini inceledik. Bu doğrultuda folikülogenezi değerlendirmek adına folikül sayımı, oksidan-antioksidan dengedeki değişiklikleri değerlendirmek için SOD, MDA ve CAT enzim düzeylerinin ölçümü ve moleküler düzeyde PARP-1 ve P53 ekspresyon düzeylerindeki değişiklikleri gösterebilmek için immunohistokimyasal boyama gerçekleştirdik. Yine gruplarda serum AMH düzeyi ölçümü ile hormonal değişiklikleri inceledik.

Metotreksat çeşitli otoimmün hastalıklar ve malignitelerin tedavisinde sıklıkla kullanılan sitotoksik bir ajandır. Bir folik asit antagonisti olan metotreksatın söz konusu sitotoksik etkisi metotreksat tedavisinde devamlılığın bozulmasının ve başarısızlığın en önemli nedenidir (146,147). MTX'in küratif etkisinin oksidan-antioksidan dengesi oksidanlar lehine değiştirmesine bağlayan çalışmalar mevcuttur. Gressier ve ark. MTX maruziyeti sonucu nötrofillerde peroksit düzeylerindeki artışa hücresel düzeyde glutatyon seviyelerindeki düşüşün eşlik ettiğini göstermiştir (131,148).

Darren ve ark.(2003) İnsan T-hücreli lösemi hücre hattı ve insan monosit hücre hatları (U937) ile yaptıkları in vitro çalışmada ortama MTX eklendiğinde T hücreleri ve monositlerin apoptoza yönlendirildiği, buna karşın MTX ile birlikte N-asetil sistein ve Glutatyon gibi antioksidan moleküllerin ortama ilavesinin apoptoza giden hücre sayısını azaltarak viabiliteyi arttırdığını göstermiştir (81).

Çok sayıda çalışma ovaryan mikroçevrede meydana gelen oksidatif stres artışının oosit mayozunda arrest, granüloza hücre apoptozu, korpus luteum disfonksiyonu gibi patolojileri tetikleyebileceğini göstermiştir.

Ata ve ark. (2019) dişi wistar albino sıçanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada MTX'in ovaryum dokusunda yarattığı oksidatif stres üzerine bir antioksidan olan resveratrol'ün etkisini değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda sağlıklı kontrol ve MTX ile birlikte resveratrol verilen gruplar kıyaslandığında MTX verilen sıçanlarda MDA düzeylerinin anlamlı derecede yükseldiği, SOD ve GSH düzeylerinin ise anlamlı düşüş gösterdiği gözlenmiştir. Böylece MTX'in ovaryan doku için de bir oksidatif stres nedeni olduğu ve antioksidan resveratrolün bu oksidatif strese karşı ovaryum

dokusunu koruyabileceğini ortaya koymuşlardır (149). Yine Kiremitli ve ark.(2021) dişi Wistar albino sıçanlarda MTX ile ovaryum dokusunda oluşturulan oksidatif strese, elektron transport zinciri anahtar moleküllerinden biri ve aynı zamanda güçlü bir antioksidan olan koenzim Q10(Co Q10)'in etkisini değerlendirmişlerdir. Bu çalışma sonucunda da MTX ile birlikte Co Q10 verilen grupta MDA ve Miyeloperoksidaz düzeylerinde yalnızca MTX verilen gruba göre anlamlı düşüş olduğunu, yine aynı gruplar arasında glutasyon düzeyleri açısından Co Q10 grubu lehine anlamlı bir artış gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir (150).

Biz de çalışmamızda ovaryum dokusunda MTX maruziyeti ile indüklenen oksidatif stres üzerine bir antioksidan olan kurkumin'in etkisini göstermek adına doku düzeyinde MDA, SOD ve CAT parametrelerini değerlendirdik. Çalışmamızın sonucunda tedavi grubunda MDA düzeyi MTX grubuna göre anlamlı düşüş gösterirken SOD ve CAT düzeyleri ise anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Oksidan-antioksidan parametreler açısından çalışmamızın sonuçları yukarıda sıralanan literatür ile benzerlik göstermektedir.

Bcl-2 Mitokondrial membran potansiyelinin devamlılığını sağlayarak antiapoptotik etki gösteren bir proteindir. Miyashita ve ark. S49.1 ve WEH17.2 mürin lenfoid hücre hatlarında Bcl-2 ekspresyonlarındaki artışın MTX, 1-β-D-arabinofuranosylcytosine ve Vinkristin aracılı apoptoza karşı direnç oluşturduğunu göstermiştir (151). Papaconstantinou ve ark. Sıçan intestinal hücre hattı (RIE-1) ile yaptıkları çalışmada kültür ortamında yalnız MTX bulunan hücrelerde apoptotik hücre ölümünün arttığı buna karşın ortama MTX ile birlikte eklenen Z-VAD florometil keton (bir genel kaspaz inhibitörü) varlığında apoptoza giden hücre sayısında ve kaspaz 2, 3 ve 9 ekspresyonlarında anlamlı azalma olduğunu göstermişlerdir (152).

PARP enzimi insanda PARP geni tarafından kodlanır. PARP-1 kromatin bütünlüğü ve transkripsiyonu, kromozomların organize edilmesi, DNA metilasyonu ve imprintingi gibi olaylar ile ilişkilendirilmiştir. Daha da önemlisi PARP-1 DNA onarımı ve programlanmış hücre ölümü süreçlerine de katılır ve bu yol ile genomik stabiliteyi sağlar (153).

Serbest radikallerin hücre içerisindeki hedeflerinden biri de DNA'dır. PARP-1 oksidatif strese karşı geliştirilen hücresel yanıtta ve serbest radikaller tarafından hasarlanan DNA molekülünün tamirinde de anahtar rol oynar. PARP-1 aktivitesinde meydana gelen artış DNA hasarının çok önemli bir göstergesidir. DNA molekülündeki daha ılımlı hasarlara bağlı PARP-1 aktivasyonu histon proteinlerinin Poli ADP

ribozilasyonu aracılığı ile kromatin iplikçiklerinin açılmasına ve DNA onarımının başlamasına yola açar. Ancak aşırı PARP-1 aktivasyonu enerjetiklerin tükenmesi yolu ile hücreleri ölüme de götürebilir (154–156). Xueqing ve ark. (2010) *T. Cruzi* ile enfekte kardiyomiyositlerde mitokondri kaynaklı ROS artışının PARP-1 aktivitesini arttırdığını ve PARP-1'in daha sonra NFκB aktivasyonunu sağlayarak inflamasyonu tetiklediğini göstermiştir (157). Wei ve arkadaşları (2013) domuz ovaryumlarında apoptotik granüloza hücrelerinde PARP-1 aktivasyonunun arttığını immunohistokimyasal olarak göstermiş ve kaspaz-3 aracılı PARP-1 aktivasyonunun granüloza hücre apoptozunda anahtar mekanizma olabileceğini ileri sürmüştür (158).

Çalışmamızda sıçanların over dokularında PARP-1 için gerçekleştirilen immunohistokimyasal boyama sonrası yapılan H-skorundan elde edilen verilerin istatistiksel analizinde tedavi grubunda PARP-1 ekspresyonlarının MTX grubuna göre anlamlı düşüş gösterdiği bulunmuştur. Bu bulgu kurkumin'in güçlü antioksidan aktivitesi ile ROS'a bağlı DNA hasarını önleyerek PARP-1 aktivasyonunu düşürdüğü şeklinde yorumlanmaktadır ve yukarıda sıralanan literatür ile uyumludur.

DNA hasarı, hücrelerdeki DNA'da genetik bilginin yorumlanmasını ve iletilmesini etkileyebilecek fiziksel veya kimyasal değişiklikleri ifade eder. DNA, kimyasallar, radyasyon, serbest radikaller ve kemoterapötikler olmak üzere, her biri farklı hasar biçimlerine neden olan çeşitli eksojen ve endojen etkilere dolaylı hasar görebilir (159). Reaktif oksijen türleri (ROS), DNA hasarını indükleyebilen ve DNA hasar yanıtını etkileyebilen yüksek oranda reaktif oksijen içeren moleküller grubudur (160). ROS'un kemoterapötik ajanların ve iyonlaştırıcı radyasyonun neden olduğu genotoksik stresi etkilediğine dair kesin çalışmalar literatürde gösterilmiştir. ROS, DNA hasarının ana kaynağıdır ve kromozom kararsızlığına ve kansere yol açabilecek mutasyon ve delesyonların birikmesine sebep olan önemli bir faktördür (11). ROS birikimi ayrıca mitokondriyal DNA hasarına ve zincir kırılmalarına da neden olarak mitokondriyal DNA'nın bozulmasına neden olur (161).

DNA hasarı, hücre siklusunun durması, DNA onarım mekanizmalarının aktive olması ve hasar çok ağır ve onarılamaz olduğunda da apoptotik hücre ölümü gibi mekanizmaları harekete geçirir. Bir tümör baskılayıcı gen olan P53'ün DNA hasarı sonrası tetiklenen bu mekanizmaların merkezinde yer alan anahtar molekül olduğuna dair çok sayıda çalışma mevcuttur. p53 protein düzeyi normal hücrelerde saptanamayacak kadar düşük iken, genomik hasara neden olan çeşitli stres sinyallerine yanıt olarak hızla artar (162,163). Bu durumda p53, apoptozda işlev gören

proapoptotik proteinler olan Bax, Apaf-1 ve Fas transkripsiyonunu aktive ederken, antiapoptotik proteinler olan Bcl-2 ve Bcl-xL'yi baskılar ve apoptozu indükler (164).

MTX, dihidrofolat redüktaz için rekabetçi bir inhibitör olup, nükleik asit sentezi dahil olmak üzere çeşitli metabolik yolların bozulmasına neden olur ve bu nedenle apoptozun indüklenmesine ve hücre ölümüne yol açabilir. Fu ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada MTX'in ROS üretiminin p53 ve p21 ekspresyonunun arttırarak apoptozu indüklediği ana mekanizma olarak gösterilmiştir .Çalışmada MTX uygulamasının in vitro olarak granüloza hücrelerinin apoptozunu ve yüksek oranda oosit dejenerasyonunu gözlemlemiş olup MTX grubu fare folliküllerinde atretik foliküllerin artışı ile uyumlu olduğunu bildirmişlerdir (165).

Ayrıca MTX'in seminifer tübül dejenerasyonu ve p53 ve Bax/Bcl-2 yolları yoluyla germ hücrelerinin apoptozisi ile karakterize testis hasarını indükleyebildiğini (166) oksidatif stres yoluyla apoptotik süreci hızlandırıldığını ve spermatogenez üzerindeki zararlı etkileri nedeniyle infertiliteye neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (167).

Yine Suping Xiong ve ark.(2020) hücre kültüründe fare spermatosit hücre hattını (GC2) kullanarak yaptıkları çalışmada MTX'in hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini, otofaji ve apoptozu tetikleyerek fare spermatosit hücre hattında ROS aracılığıyla ciddi sitotoksisteye neden olduğunu GC2 hücrelerinde apoptozu tetiklediğini göstermişlerdir (168).

Çalışmamızda sıçanların over dokularında p53 için gerçekleştirilen immunohistokimyasal boyama sonrası yapılan H-skorundan elde edilen verilerin istatistiksel analizinde MTX grubunda p53 ekspresyonlarının kontrol ve kurkumin gruplarına göre anlamlı olarak arttığını bulduk. Bu bulgu MTX'in ROS'a bağlı oksidatif hasar yoluyla p53 aktivasyonu artırarak apoptozu indüklediği şeklinde yorumlanmaktadır ve yukarıda sıralanan literatür ile uyumludur.

Göl ve arkadaşlarının Balb/c fareler üzerinde yaptıkları çalışmada her birinde 9 denek bulunan mtX ve kontrol olmak üzere iki grup oluşturulmuş ve kontrol grubuna ip tek doz salin verilirken MTX grubuna 5mg/kg tek doz mtX uygulanmıştır. 7 gün sonra sakrifiye edilen deneklerden çıkarılan over dokularında gerçekleştirilen folikül sayımı sonucunda primordial folikül sayısının MTX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş gösterdiğini bildirmişlerdir (169).

Karri ve ark. (2011) Wistar albino ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada düşük ve yüksek doz MTX uygulamasının (sırasıyla 0,05 mg/kg ve 0,15 mg/kg), yine yüksek

doz MTX uygulamasında lökovorin tedavisinin ve son olarak MTX uygulamasının geri çekilmesinin (yüksek doz MTX uygulamasından sonra verilen 20 günlük ara sonrası denekler sakrifiye edilerek) ovaryan doku ve folikülogenez üzerine etkilerini de erlendirmi lerdir. Çalışma sonucunda MTX verilen gruplarda doz bağımlı olarak primordial, preantral ve antral foliküllerde atrezi oranının kontrol grubuna göre arttığı buna karşın lökovorin tedavisinin ve MTX geri çekilmesinin özellikle yüksek doz MTX verilen gruba göre atretik folikül sayılarında anlamlı d     g zlendi ini bildirmişlerdir. Bununla birlikte MTX  ekilme grubunda oosit çekirdek yokluğu, zona pellusida ve ovaryan stromadaki dejenerasyonun devam ettiğini de belirtmişlerdir (170).

Hortu ve ark. Sprague–Dawley sıçanlar ile yaptıkları bir çalışmada MTX ile oluşturulan ovaryan hasar üzerine oksitosinin etkisini ara tırmı lardır. Çalışma sonucunda MTX'in stromal fibrozis yolu ile plazma AMH düzeyini d   rd  n  ve TGF-  düzeyini arttırarak ovaryan hasarı tetiklediğini bulmuştur (171).

Jingbo ve ark. (2021) ICR suç fareler üzerinde yaptıkları çalışmada kontrol, mtx (8 gün, gün aşırı, 10 mg/kg MTX, ip yol ile 20 gün geri çekilme uygulanmış) ve folik asit (8 gün, gün aşırı, 10 mg/kg mtx, ip yol ile sonraki 20 gün boyunca gün aşırı, 10 mg/kg, intragastrik folik asit uygulanmış) olmak üzere üç grup olu turmu , gruplar arası kar ıla tırmada hem doğal hem de invitro fertilizasyon oranlarının MTX ve folik asit tedavili grupta kontrol grubuna anlamlı d     gösterdiğini, MTX grubunda folik asit tedavili gruba kıyasla atretik folikül sayısının anlamlı artış gösterdiğini, preantral ve antral folikül sayılarının ise anlamlı düzeyde azaldığını göstermişlerdir. Çalışmada primordial ve primer folikül sayıları açısından gruplararası anlamlı fark bulunmamıştır. Deneklerin ovaryumlarından elde edilen granüloza hücreleri kültüre edilmiş ve P53 mRNA düzeyleri real time PCR ile değerlendirilmiştir. P53 mRNA düzeylerinin MTX grubunda folik asit grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunduğunu raporlamışlardır. Son olarak AMH düzeylerini ELISA ile değerlendiren araştırmacılar folik asit tedavili grupta anlamlı olmamakla birlikte MTX grubuna göre AMH düzeyinde artış bulmuşlardır (172).

Mahboobeh ve ark. (2020) ektopik gebelik tanısı almış 20 hasta üzerinde yaptıkları klinik çalışmada tek doz 50 mg/kg intramüsküler MTX tedavisi öncesi ve sonrası AMH düzeylerini kar ıla tırmı lar ve MTX uygulamasından önce ve sonra  l  len AMH düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamamışlardır (173).

Benian ve ark. (2013) Wistar Albino sıçanlarda kurguladıkları bir çalışmada deney başlamadan önce plazmada ELISA metodu ile ölçülen AMH düzeyleri ile 1., 3., 5. ve 7. Günlerde intramüsküler uygulanan 1 mg/kg MTX uygulamalarının her birinden 24 saat sonra yine ELISA ile ölçülen plazma AMH düzeylerini karşılaştırmışlardır. Çalışma sonucunda ilk ve son MTX uygulaması sonrası ölçülen plazma AMH düzeyleri arasında son gün ölçülen AMH düzeyi lehine istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulmuşlardır (ilk gün ölçülen AMH median değeri 70,60, son gün ölçülen AMH median değeri 104,70) (174).

Bizim çalışmamız sonucunda primordial ve primer folikül sayıları açısından MTX ve MTX+KUR grupları arasında anlamlı fark olmasa da MTX+KUR grubunda her iki folikül sayısı da MTX grubuna göre yüksekti. Primordial folikül sayısı kurkumin grubunda MTX ve MTX+KUR gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu. Yine MTX grubunda atretik folikül sayısı MTX+KUR grubuna göre anlamlı düzeyde yüksekti. Çalışmamızın folikül sayıları açısından dikkat çekici bir bulgusu ise gruplar arasında sekonder folikül sayısı açısından anlamlı fark olmamasına rağmen MTX verilen gruplarda kontrol grubuna göre sekonder folikül sayılarının yüksek olmasıydı.

AMH düzeyleri açısından değerlendirildiğinde çalışmamızın sonuçları ilgi çekiciydi. Sekonder folikül sayılarında karşılaştığımız tabloya benzer şekilde MTX verilen gruplarda kontrol ve kurkumin gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da AMH düzeylerinin daha yüksek olduğu gözlemlendi.

AMH'nın özellikle preantral ve antral folikül aşamalarındaki ovaryan foliküllerin granüloza hücrelerinden salındığı bilinen bir gerçektir. Bunun dışındaki foliküler evrelerde ise AMH ekspresyonu ya çok düşüktür ya da tamamen kaybolmuştur (57).

Bu bilgi ışığında çalışmamızda MTX verilen gruplarda antal folikül sayısının diğer gruplara göre yüksek olması yine bu gruplarda AMH yüksekliğini açıklamaktadır.

Ovaryan steroidogenez kolesterolün teka interna hücrelerinde androjenlere dönüşmesi ile başlar ve bu androjenlerin granüloza hücrelerinde östrojenlere dönüşümü ile tamamlanır (175). Mitokondri, steroid hormon biyosentezi için hayati önem taşıyan bir organeldir. Adrenal, gonad, plasenta ve beynin steroidojenik hücrelerindeki mitokondri, kolesterol yan zincir parçalama enzimi P450scc (side-chain cleavage enzyme)'yi ve onun iki elektron transfer partneri

olan ferredoksin redüktaz ve ferredoksini içerir. Bu enzim sistemi, kolesterolü pregnenolon'a dönüştürür ve net steroidojenik kapasiteyi belirler (176). Mitokondri, elektronların mitokondriyal membrana gömülü bir dizi elektron taşıyıcısı yoluyla aktarılmasıyla oluşturulan elektrokimyasal proton gradyanı ile ATP'nin yüksek enerjili fosfat bağlarını oluşturur. Elektronların moleküler O₂'ye transferi sıkı bir şekilde kontrol edilen bir süreçtir ve bu süreçte elektron transport zincirinden(ETZ) kaçan elektronların sadece %1-2'si O₂ ile reaksiyona girerek O₂⁻ ile sonuçlanır. Yani mitokondrial ETZ'ni kendisi de bir ROS kaynağıdır (177).

Mitokondride lokalize olmuş Manganez süperoksit dismutaz (MnSOD) majör ROS detoksifikasyon enzimlerindendir (178) Her ne kadar ROS'un düşük ve yüksek seviyeleri için bir eşik değeri tanımlanmamış olsa da düşük ROS seviyelerinin, ROS' bağlı artan TNF- α ve dolayısıyla TNFR1 (TNF Reseptör-1) üzerinden NF- κ B transkripsiyonunu arttırdığı ve bunun da MnSOD ekspresyonunu tetiklediği, buna karşın yüksek ROS düzeylerinin ise JNK (c-Jun N-terminal kinase) yolağı üzerinden hücreleri apoptoza yönlendirdiğini bildiren çalışmalar mevcuttur.

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda granüloza hücre yükü, dolayısıyla steroidogenez aktivitesi ve mitokondri sayısı diğer foliküler aşamaların granüloza hücrelerine göre daha fazla olan sekonder foliküllerin sayısının, her ne kadar anlamlı bir artış göstermese de MTX gruplarında diğer gruplara göre fazla olması, sekonder foliküllerin granüloza hücreleri içerisinde yoğun mitokondri ve dolayısıyla MnSOD varlığının ve üstelik MnSOD'un ROS artışı ile tetikleniyor olmasının sekonder folikülleri MTX kaynaklı ROS oluşumuna karşı avantajlı bir konuma getirmiş olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda MTX ile oluşturulan ovaryan hasarlı sıçanlarda atretik folikül sayısının arttığı görülmüştür. MTX maruziyeti ile oluşan apoptozun oksidatif stres hasarı yoluyla etkisini görebilmek adına doku düzeyinde değerlendirdiğimiz MDA, SOD ve CAT seviyelerinde doku MDA düzeyleri MTX uygulanan grupta anlamlı artış göstermiştir. Kurkumin ile tedavi grubunda MDA düzeyi MTX grubuna göre anlamlı düşüş gösterirken SOD ve CAT düzeyleri ise anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Bir antioksidan olan kurkumin atretik folikül sayısını MTX grubuna göre anlamlı olarak azaltarak folikülleri ROS'a bağlı apoptozdan korumuştur.

İmmünohistokimyasal analiz sonuçlarımıza göre p53 ve PARP-1 ekspresyonunun gruplar arasındaki farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. p53 ekspresyonu MTX grubunda kontrol ve kurkumin grubuna göre anlamlı artmıştır. PARP-1 de benzer şekilde MTX uygulanan grupta kurkumin ve MTX+KUR gruplarına göre anlamlı artış göstermiştir. Yine ovaryum rezervini değerlendirmek amacıyla kullanılan serum AMH düzeyinin MTX uygulanan gruplarda artış göstermiştir. Kurkumin tedavisi MTX gruplarında AMH düzeylerini değiştirmemiştir. Fakat AMH düzeylerindeki bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Bir çok otoimmün hastalıklar ve malignitelerin tedavisinde sıklıkla kullanılan MTX 'in dişi üreme sisteminde oksidatif stres yolu ile sitotoksiteyi artırmış ve bir antioksidan olarak kullanılan kurkuminin MTX maruziyeti sonucu hücrede meydana gelen serbest oksijen türlerini temizleyerek, oksidan-antioksidan dengenin korunmasına ve iyileştirmesine katkı sağlamıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Yan H, Li Z, Yan Z, Li X, Li X, Yu L, et al. Methotrexate Induces Apoptosis of Postpartum Placental Cytotrophoblasts. *Cells Tissues Organs*. 2017;203(4):231–42.
2. Jason G. Knott, Paul and S. Transcriptional Regulators of the Trophoblast Lineage in Mammals with Hemochorial Placentation. *Reproduction*. 2014;148(6):121–36.
3. Morales JC, Li L, Fattah FJ, Dong Y, Bey EA, Patel M, et al. Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2014;24(1):15–28.
4. Wang Y, Luo W, Wang Y. PARP-1 and its associated nucleases in DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*. 2019;81:1–18.
5. Guo TL, Miller MA, Shapiro IM, Shenker BJ. Mercuric chloride induces apoptosis in human T lymphocytes: Evidence of mitochondrial dysfunction. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1998;153(2):250–7.
6. Joashi UC. Poly(ADP ribose) polymerase cleavage precedes neuronal death in the hippocampus and cerebellum following injury to the developing rat forebrain. *Eur J Neurosci*. 1999;11(1):91–100.
7. Akpolat M, Oz ZS, Gulle K, Hamamcioglu AC, Bakkal BH, Kecici M. X irradiation induced colonic mucosal injury and the detection of apoptosis through PARP-1/p53 regulatory pathway. *Biomed Pharmacother*. 2020;127(November 2019).
8. Akpolat M, Gulle K, Topcu-Tarlacalisir Y, Safi Oz Z, Bakkal BH, Arasli M, et al. Protection by L-carnitine against radiation-induced ileal mucosal injury in the rat: Pattern of oxidative stress, apoptosis and cytokines. *Int J Radiat Biol*. 2013;89(9):732–40.
9. Ting-Ting Huang, David Leu and YZ. Oxidative stress and redox regulation on hippocampaldependent cognitive functions. *Arch Biochem Biophys*. 2015;(576):2–7.

10. G. SF and B. Redox Environment Of The Cell As Viewed Through The Redox State Of The Glutathione Disulfide/Glutathione Couple. *Free Radic Biol Med.* 2001;30(11):1191–212.
11. Jackson AL, Loeb LA. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen.* 2001;477(1–2):7–21.
12. Sablina AA, Budanov A V., Ilyinskaya G V., Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med.* 2005;11(12):1306–13.
13. Uzar E, Sahin O, Koyuncuoglu HR, Uz E, Bas O, Kilbas S, et al. The activity of adenosine deaminase and the level of nitric oxide in spinal cord of methotrexate administered rats: Protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Toxicology.* 2006;218(2–3):125–33.
14. Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Kantarceken B. N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats. *Med Sci Monit.* 2006;12(8):274–8.
15. Mahoney DH, Shuster JJ, Nitschke R, Lauer SJ, Steuber CP, Winick N, et al. Acute neurotoxicity in children with B-precursor acute lymphoid leukemia: An association with intermediate-dose intravenous methotrexate and intrathecal triple therapy - A Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 1998;16(5):1712–22.
16. Volinsky R, Kinnunen PKJ. Oxidized phosphatidylcholines in membrane-level cellular signaling: From biophysics to physiology and molecular pathology. *FEBS J.* 2013;280(12):2806–16.
17. Chauhan A, Chauhan V. Oxidative stress in autism. *Pathophysiology.* 2006;13(3):171–81.
18. Prasad MR, Lovell MA, Yatin M, Dhillon H, Markesbery WR. Regional membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* 1998;23(1):81–8.
19. Boonla O, Kukongviriyapan U, Pakdeechote P, Kukongviriyapan V, Pannangpetch P, Prachaney P, et al. Curcumin improves endothelial dysfunction and vascular remodeling in 2K-1C hypertensive rats by raising nitric oxide availability and reducing oxidative stress. *Nitric Oxide - Biol Chem.* 2014;42:44–53.

20. Fleenor BS, Sindler AL, Marvi NK, Howell KL, Zigler ML, Yoshizawa M, et al. Curcumin ameliorates arterial dysfunction and oxidative stress with aging. *Exp Gerontol.* 2013;48(2):269–76.
21. Özgen SÇ, Dökmeci D, Akpolat M, Karadağ ÇH, Gündüz Ö, Erbaş H, et al. The protective effect of curcumin on ionizing radiation-induced cataractogenesis in rats. *Balkan Med J.* 2012;29(4):358–63.
22. Topcu-Tarladaçalisir Y, Akpolat M, Uz YH, Kizilay G, Sapmaz-Metin M, Cerkez-kayabekir A, et al. Effects of curcumin on apoptosis and oxidoinflammatory regulation in a rat model of acetic acid-induced colitis: The roles of c-Jun N-Terminal Kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Med Food.* 2013;16(4):296–305.
23. Akpolat M, Tarladaçalışır YT, Hülya Uz Y, Metin MS, Kizilay G. Kanser Tedavisinde Curcuminin Yeri. *Yeni Tıp Derg.* 2010;27:142–7.
24. Sankrityayan H, Majumdar AS. Curcumin and folic acid abrogated methotrexate induced vascular endothelial dysfunction. *Can J Physiol Pharmacol.* 2015;94(1):89–96.
25. Hesari AR, Ghasemi F, Salarinia R, Biglari H, Tabar Molla Hassan A, Abdoli V, et al. Effects of curcumin on NF- κ B, AP-1, and Wnt/ β -catenin signaling pathway in hepatitis B virus infection. *J Cell Biochem.* 2018;119(10):7898–904.
26. Banerjee B, Chakraborty S, Ghosh D, Raha S, Sen PC, Jana K. Benzo(a)pyrene induced p53 mediated male germ cell apoptosis: Synergistic protective effects of curcumin and resveratrol. *Front Pharmacol.* 2016;7(AUG):1–20.
27. Chandra AK, Chatterjee A, Ghosh R, Sarkar M. Effect of curcumin on chromium-induced oxidative damage in male reproductive system. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2007;24(2):160–6.
28. Noorafshan A, Ashkani-Esfahani S. A Review of Therapeutic Effects of Curcumin. *Curr Pharm Des.* 2013;19(11):2032–46.
29. Elaine N Marieb KH. Human Anatomy. 11th ed. Human Anatomy & Physiology. Pearson; 2018.
30. Junqueira, LC, Carneiro J. Temel Histoloji. 2006. 449–458 p.
31. Erdoğan D, Hatipoğlu MT, Görgün M İC. Özel Histoloji. 2007. 175–181 p.
32. Gartner LP HJ. Color Textbook of Histology. 3rd ed. 2007. 463 p.

33. Lippincot Williams, Wilkins. Histology: A Text and Atlas. 6th ed. 2014. 830–875 p.
34. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. 2006. 531–588 p.
35. Young B HJ. Wheater’s Functional Histology a Text and Colour Atlas. 341–348 p.
36. Tekelioglu M. Özel Histoloji ince Yapı ve Gelistirme. 2002.
37. Hsueh AJW, Billig H, Tsafiri A. Ovarian Follicle Atresia: A Hormonally Controlled Apoptotic Process. *Endocr Rev.* 1994;15(6):707–24.
38. Matsuda F, Inoue N, Manabe N, Ohkura S. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: Regulation by survival and death of granulosa cells. *J Reprod Dev.* 2012;58(1):44–50.
39. Patrick R Hannon and Thomas E Curry. Folliculogenesis.
40. Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev.* 2009;30(6):624–712.
41. Motta PM, Makabe S, Nottola SA. The ultrastructure of human reproduction. 1. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary. *Hum Reprod Update.* 1997;3(3):281–97.
42. Carlson BM. Human Embryology And Developmental Biology. 4th ed. 2009.
43. Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol.* 1991;124:43–101.
44. Michael H. Ross. A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology. 6th ed. 2014.
45. Sadler TW. Langman Medikal Embriyoloji. 2005.
46. Schoenwolf C, Bleyl B BR. Larsen’s Human Embryology. 4th ed. 2009.
47. Keith L Moore TP. Embriyoloji ve doğum defektlerinin temelleriNo Title. 2009. 163–189 p.
48. Ovalle, WK, Nahirney P. Netter Temel Histoloji. 2009. 399–425 p.
49. Snell SR. Tıp Fakültesi Öğrenci İçin Klinik Anatomi. 5th ed. 1998.
50. Howard JA, Hart KN, Thompson TB. Molecular mechanisms of AMH signaling. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13.
51. Jost A. The age factor in the castration of male rabbit fetuses. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1947;66(2):302–3.

52. Josso N, Belville C, Picard JY, Fauser B. Persistence of Müllerian derivatives in males. *Mol Biol Reprod Med*. 2003;575–86.
53. Carlsson IB, Scott JE, Visser JA, Ritvos O, Themmen APN, Hovatta O. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. *Hum Reprod*. 2006;21(9):2223–7.
54. Durlinger ALL, Gruijters MJG, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, et al. Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*. 2001;142(11):4891–9.
55. Dewailly D, Robin G, Peigne M, Decanter C, Pigny P, Catteau-Jonard S. Interactions between androgens, FSH, anti-Müllerian hormone and estradiol during folliculogenesis in the human normal and polycystic ovary. *Hum Reprod Update*. 2016;22(6):709–24.
56. Durlinger A, Visser J, Themmen A. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction*. 2002;
57. Jeppesen J V, Anderson RA, Kelsey TW, Christiansen SL, Kristensen SG, Jayaprakasan K, et al. Which follicles make the most anti-Müllerian hormone in humans? Evidence for an abrupt decline in AMH production at the time of follicle selection. *MHR Basic Sci Reprod Med*. 2013;19(8):519–27.
58. Lie Fong S, Visser JA, Welt CK, De Rijke YB, Eijkemans MJC, Broekmans FJ, et al. Serum anti-müllerian hormone levels in healthy females: a nomogram ranging from infancy to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(12):4650–5.
59. Gutierrez JC, Hwang K. The toxicity of methotrexate in male fertility and paternal teratogenicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2017;13(1):51–8.
60. Kumar A, Marwaha V. New therapies for rheumatoid arthritis. *Med Journal, Armed Forces India*. 2003;59(2):90.
61. Rau R, Herborn G. Benefit and risk of methotrexate treatment in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2004;22:S83–94.
62. Shariatifar H, Ranjbarian F, Hajiahmadi F, Farasat A. A comprehensive review on methotrexate containing nanoparticles; an appropriate tool for cancer treatment. *Mol Biol Rep*. 2022;49(11):11049–60.
63. Galivan J, Balinska M. Studies of formation and efflux of methotrexate polyglutamates with cultured hepatic cells. In: *Folyl and Antifolyl Polyglutamates*. Springer; 1983. p. 235–46.

64. Zarou MM, Vazquez A, Vignir Helgason G. Folate metabolism: a re-emerging therapeutic target in haematological cancers. *Leukemia*. 2021;35(6):1539–51.
65. Refsum H. Extracellular homocysteine as an indicator of methotrexate pharmacodynamics. *Anal methods, Vitro Exp Clin Stud thesis, Dep Pharmacol Toxicol Univ Bergen, Norw.* 1990;
66. Whittle SL, Hughes RA. Folate supplementation and methotrexate treatment in rheumatoid arthritis: a review. *Rheumatology*. 2004;43(3):267–71.
67. van Ede AE, Laan RFJM, Blom HJ, De Abreu RA, van de Putte LBA. Methotrexate in rheumatoid arthritis: An update with focus on mechanisms involved in toxicity. In: *Seminars in arthritis and rheumatism*. Elsevier; 1998. p. 277–92.
68. Pawlak A, Kutkowska J, Obmińska-Mrukowicz B, Rapak A. Methotrexate induces high level of apoptosis in canine lymphoma/leukemia cell lines. *Res Vet Sci*. 2017;114:518–23.
69. Wei C, Yu Y, Chen Y, Hung Y, Yiang G. Anticancer effects of methotrexate in combination with α -tocopherol and α -tocopherol succinate on triple-negative breast cancer. *Oncol Rep*. 2019;41(3):2060–6.
70. Kern S, Truebenbach I, Höhn M, Gorges J, Kazmaier U, Zahler S, et al. Combined antitumoral effects of pretubulysin and methotrexate. *Pharmacol Res Perspect*. 2019;7(1):e00460.
71. Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril*. 2003;80(6):1420–30.
72. Choudhury RC, Ghosh SK, Palo AK. Cytogenetic toxicity of methotrexate in mouse bone marrow. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2000;8(3):191–6.
73. Romão VC, Lima A, Bernardes M, Canhao H, Fonseca JE. Three decades of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis: can we predict toxicity? *Immunol Res*. 2014;60(2):289–310.
74. Braun J. Optimal administration and dosage of methotrexate. *Clin Exp Rheumatol*. 2010;28(Suppl 61):S46–51.
75. Bannwarth B, Labat L, Moride Y, Schaefferbeke T. Methotrexate in rheumatoid arthritis. *Drugs*. 1994;47(1):25–50.
76. Tian H, Cronstein BN. Understanding the Mechanisms of Action of Methotrexate. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2007;65(3).

77. Li X, Abe E, Yamakawa Y, Yoneda G, Fujino R, Yamashita M, et al. Effect of administration duration of low dose methotrexate on development of acute kidney injury in rats. *J Kidney*. 2016;2(3):3.
78. Vardi N, Parlakpınar H, Cetin A, Erdogan A, Cetin Ozturk I. Protective effect of β -carotene on methotrexate-induced oxidative liver damage. *Toxicol Pathol*. 2010;38(4):592–7.
79. Shen Y, Yang J, Zhao J, Xiao C, Xu C, Xiang Y. The switch from ER stress-induced apoptosis to autophagy via ROS-mediated JNK/p62 signals: A survival mechanism in methotrexate-resistant choriocarcinoma cells. *Exp Cell Res*. 2015;334(2):207–18.
80. Herman S, Zurgil N, Deutsch M. Low dose methotrexate induces apoptosis with reactive oxygen species involvement in T lymphocytic cell lines to a greater extent than in monocytic lines. *Inflamm Res*. 2005;54(7):273–80.
81. Phillips DC, Woollard KJ, Griffiths HR. The anti-inflammatory actions of methotrexate are critically dependent upon the production of reactive oxygen species. *Br J Pharmacol*. 2003;138(3):501–11.
82. Chalupsky K, Cai H. Endothelial dihydrofolate reductase: critical for nitric oxide bioavailability and role in angiotensin II uncoupling of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102(25):9056–61.
83. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495–516.
84. Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci*. 2001;26(1):61–6.
85. Martinou J-C, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(1):63–7.
86. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*. 2005;22(3):355–70.
87. Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci*. 2001;26(6):390–7.
88. Cikrikci S, Mozioglu E, Yilmaz H. Biological activity of curcuminoids isolated from *Curcuma longa*. *Rec Nat Prod*. 2008;2(1):19.
89. Dosoky NS, Setzer WN. Chemical composition and biological activities of essential oils of *Curcuma* species. *Nutrients*. 2018;10(9):1196.

90. Lestari ML, Indrayanto G. Curcumin. Profiles Drug Subst. Excip. Relat. Methodol. 39, 113–204. doi: 10.1016. B978-0-12-800173-8.00003-9; 2014.
91. Akram M, Shahab-Uddin AA, Usmanghani K, Hannan A, Mohiuddin E, Asif M. Curcuma longa and curcumin: a review article. Rom J Biol Plant Biol. 2010;55(2):65–70.
92. Joint FAO, Additives WHOEC on F, Organization WH. Evaluation of certain food additives and contaminants: sixty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organization; 2004.
93. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as “Curecumin”: from kitchen to clinic. Biochem Pharmacol. 2008;75(4):787–809.
94. Kohli K, Ali J, Ansari MJ, Raheman Z. Curcumin: a natural antiinflammatory agent. Indian J Pharmacol. 2005;37(3):141.
95. Rafatullah S, Tariq M, Al-Yahya MA, Mossa JS, Ageel AM. Evaluation of turmeric (*Curcuma longa*) for gastric and duodenal antiulcer activity in rats. J Ethnopharmacol. 1990;29(1):25–34.
96. Kiso Y, Suzuki Y, Watanabe N, Oshima Y, Hikino H. Antihepatotoxic principles of *Curcuma longa* rhizomes. Planta Med. 1983;49(11):185–7.
97. Sidhu GS, Mani H, Gaddipati JP, Singh AK, Seth P, Banaudha KK, et al. Curcumin enhances wound healing in streptozotocin induced diabetic rats and genetically diabetic mice. Wound Repair Regen. 1999;7(5):362–74.
98. Joe B, Rao UJSP, Lokesh BR. Presence of an acidic glycoprotein in the serum of arthritic rats: modulation by capsaicin and curcumin. Mol Cell Biochem. 1997;169(1):125–34.
99. Ammon HPT, Anazodo MI, Safayhi H, Dhawan BN, Srimal RC. Curcumin: a potent inhibitor of leukotriene B₄ formation in rat peritoneal polymorphonuclear neutrophils (PMNL). Planta Med. 1992;58(02):226.
100. Sharma OP. Antioxidant activity of curcumin and related compounds. Biochem Pharmacol. 1976;25(15):1811–2.
101. Pandit AP, Joshi SR, Dalal PS, Patole VC. Curcumin as a permeability enhancer enhanced the antihyperlipidemic activity of dietary green tea extract. BMC Complement Altern Med. 2019;19(1):1–10.
102. Jennings MR, Parks RJ. Curcumin as an antiviral agent. Viruses. 2020;12(11):1242.

103. Adamczak A, Ożarowski M, Karpiński TM. Curcumin, a natural antimicrobial agent with strain-specific activity. *Pharmaceuticals*. 2020;13(7):153.
104. Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: the Indian solid gold. *Mol targets Ther uses curcumin Heal Dis*. 2007;1–75.
105. Gururaj AE, Belakavadi M, Venkatesh DA, Marmé D, Salimath BP. Molecular mechanisms of anti-angiogenic effect of curcumin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;297(4):934–42.
106. Srivastava RM, Singh S, Dubey SK, Misra K, Khar A. Immunomodulatory and therapeutic activity of curcumin. *Int Immunopharmacol*. 2011;11(3):331–41.
107. Shah BH, Nawaz Z, Pertani SA, Roomi A, Mahmood H, Saeed SA, et al. Inhibitory effect of curcumin, a food spice from turmeric, on platelet-activating factor-and arachidonic acid-mediated platelet aggregation through inhibition of thromboxane formation and Ca^{2+} signaling. *Biochem Pharmacol*. 1999;58(7):1167–72.
108. Den Hartogh DJ, Gabriel A, Tsiani E. Antidiabetic properties of curcumin I: Evidence from in vitro studies. *Nutrients*. 2020;12(1):118.
109. Tang C, Li L, Shi J, Wu D, Wang M, Wu Y, et al. Curcumin in age-related diseases. *Die Pharm Int J Pharm Sci*. 2020;75(11):534–9.
110. Tossetta G, Fantone S, Giannubilo SR, Marzioni D. The multifaced actions of curcumin in pregnancy outcome. *Antioxidants*. 2021;10(1):126.
111. Mohebbati R, Anaeigoudari A, Khazdair MR. The effects of *Curcuma longa* and curcumin on reproductive systems. *Endocr Regul*. 2017;51(4):220–8.
112. Sak ME, Soydinc HE, Sak S, Evsen MS, Alabalik U, Akdemir F, et al. The protective effect of curcumin on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *Int J Surg*. 2013;11(9):967–70.
113. Tüfekci KK. Beneficial effects of curcumin in the diabetic rat ovary: A stereological and biochemical study. 2022;
114. Mayeux PR. Pathobiology of lipopolysaccharide. *J Toxicol Environ Health*. 1997;51(5):415–35.
115. McDonald MC, Mota-Filipe H, Wright JA, Abdelrahman M, Threadgill MD, Thompson AS, et al. Effects of 5-aminoisoquinolinone, a water-soluble, potent inhibitor of the activity of poly (ADP-ribose) polymerase on the organ injury and dysfunction caused by haemorrhagic shock. *Br J Pharmacol*. 2000;130(4):843–50.

116. Spina-Purrello V, Patti D, Giuffrida-Stella AM, Nicoletti VG. PARP and cell death or protection in rat primary astroglial cell cultures under LPS/IFN γ induced proinflammatory conditions. *Neurochem Res.* 2008;33(12):2583–92.
117. David KK, Andrabi SA, Dawson TM, Dawson VL. Parthanatos, a messenger of death. *Front Biosci (Landmark Ed.* 2009;14:1116.
118. Berger NA. Poly (ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiat Res.* 1985;101(1):4–15.
119. Schraufstatter IU, Hinshaw DB, Hyslop PA, Spragg RG, Cochrane CG. Oxidant injury of cells. DNA strand-breaks activate polyadenosine diphosphate-ribose polymerase and lead to depletion of nicotinamide adenine dinucleotide. *J Clin Invest.* 1986;77(4):1312–20.
120. Liaudet L, Soriano FG, Szabó É, Virág L, Mabley JG, Salzman AL, et al. Protection against hemorrhagic shock in mice genetically deficient in poly (ADP-ribose) polymerase. *Proc Natl Acad Sci.* 2000;97(18):10203–8.
121. Pacher P, Liaudet L, Soriano FG, Mabley JG, Szabó E, Szabó C. The role of poly (ADP-ribose) polymerase in the development of cardiovascular dysfunction in diabetes mellitus. In: *FASEB JOURNAL. FEDERATION AMER SOC EXP BIOL* 9650 ROCKVILLE PIKE, BETHESDA, MD 20814-3998 USA; 2002. p. A945–A945.
122. Pacher P, Mabley JG, Soriano FG, Liaudet L, Komjáti K, Szabó C. Endothelial dysfunction in aging animals: the role of poly (ADP-ribose) polymerase activation. *Br J Pharmacol.* 2002;135(6):1347–50.
123. Tasatargil A, Dalaklioglu S, Sadan G. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibition prevents homocysteine-induced endothelial dysfunction in the isolated rat aorta. *Pharmacology.* 2004;72(2):99–105.
124. Tasatargil A, Dalaklioglu S, Sadan G. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase prevents vascular hyporesponsiveness induced by lipopolysaccharide in isolated rat aorta. *Pharmacol Res.* 2005;51(6):581–6.
125. Tasatargil A, Aksoy NH, Dalaklioglu S, Sadan G. Poly (ADP-ribose) polymerase as a potential target for the treatment of acute renal injury caused by lipopolysaccharide. *Ren Fail.* 2008;30(1):115–20.

126. Tasatargil A, Tekcan M, Celik-Ozenci C, Ece Gungor N, Dalkiran B. Aldosterone-induced endothelial dysfunction of rat aorta: role of poly (ADP-ribose) activation. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst.* 2009;10(3):127–37.
127. Dalaklioglu S, Tekcan M, Gungor NE, Celik-Ozenci C, Aksoy NH, Baykal A, et al. Role of the poly (ADP-ribose) polymerase activity in vancomycin-induced renal injury. *Toxicol Lett.* 2010;192(2):91–6.
128. Devrim E, Çetin R, Kılıçoğlu B, Imge Ergüder B, Avcı A, Durak İ. Methotrexate causes oxidative stress in rat kidney tissues. *Ren Fail.* 2005;27(6):771–3.
129. Öktem F, Yilmaz HR, Ozguner F, Olgar S, Ayata A, Uzar E, et al. Methotrexate-induced renal oxidative stress in rats: the role of a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. *Toxicol Ind Health.* 2006;22(6):241–7.
130. Abraham P, Kolli VK, Rabi S. Melatonin attenuates methotrexate-induced oxidative stress and renal damage in rats. *Cell Biochem Funct.* 2010;28(5):426–33.
131. Babiak RM V, Campello AP, Carnieri EGS, Oliveira MBM. Methotrexate: pentose cycle and oxidative stress. *Cell Biochem Funct Cell Biochem its Modul by Act agents or Dis.* 1998;16(4):283–93.
132. Muller PAJ, Vousden KH. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell.* 2014;25(3):304–17.
133. Nag S, Qin J, Srivenugopal KS, Wang M, Zhang R. The MDM2-p53 pathway revisited. *J Biomed Res.* 2013;27(4):254.
134. Vousden KH, Prives C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell.* 2009;137(3):413–31.
135. Mendoza-Rodriguez CA, Cerbon MA. Tumor suppressor gene p53: mechanisms of action in cell proliferation and death. *Rev Invest Clin.* 2001;53(3):266–73.
136. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 1993;75(4):817–25.
137. Sionov RV, Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene.* 1999;18(45):6145–57.

138. Shangary S, Wang S. Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2009;49:223–41.
139. Zhang R, Wang H. MDM2 oncogene as a novel target for human cancer therapy. *Curr Pharm Des.* 2000;6(4):393–416.
140. Kubbutat MHG, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature.* 1997;387(6630):299–303.
141. Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* 1993;7(7a):1126–32.
142. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature.* 1997;387(6630):296–9.
143. Ofir-Rosenfeld Y, Boggs K, Michael D, Kastan MB, Oren M. Mdm2 regulates p53 mRNA translation through inhibitory interactions with ribosomal protein L26. *Mol Cell.* 2008;32(2):180–9.
144. Abdelaziz RM, Abdelazem AZ, Hashem KS, Attia YA. Protective effects of hesperidin against MTX-induced hepatotoxicity in male albino rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2020;393(8):1405–17.
145. Devine PJ, Sipes IG, Hoyer PB. Initiation of delayed ovotoxicity by in vitro and in vivo exposures of rat ovaries to 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Reprod Toxicol.* 2004;19(1):71–7.
146. Abelson HT, Fosburg MT, Beardsley GP, Goorin AM, Gorka C, Link M, et al. Methotrexate-induced renal impairment: clinical studies and rescue from systemic toxicity with high-dose leucovorin and thymidine. *J Clin Oncol.* 1983;1(3):208–16.
147. Schmitt J, Singh JA. Methotrexate use and liver disease--a causal relationship? *Br J Dermatol.* 2014 Jul;171(1):6–7.
148. Genestier L, Paillot R, Fournel S, Ferraro C, Miossec P, Revillard J-P. Immunosuppressive properties of methotrexate: apoptosis and clonal deletion of activated peripheral T cells. *J Clin Invest.* 1998;102(2):322–8.
149. Ata N, Kulhan N, Kulhan M, Türkler CAN, Kiremitli T, Kiremitli S, et al. The effect of resveratrol on oxidative ovary-damage induced by methotrexate in rats (Resveratrol oxidative ovary-damage). *Gen Physiol Biophys.* 2019;38(6).

150. Kiremitli T, Kiremitli S, Akselim B, Yilmaz B, Mammadov R, Tor IH, et al. Protective effect of Coenzyme Q10 on oxidative ovarian and uterine damage induced by methotrexate in rats. *Hum Exp Toxicol*. 2021 Sep;40(9):1537–44.
151. Miyashita T, Reed JC. bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49. 1 and WEHI7. 2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. *Cancer Res*. 1992;52(19):5407–11.
152. Papaconstantinou HT, Xie C, Zhang W, Ansari NH, Hellmich MR, Townsend Jr CM, et al. The role of caspases in methotrexate-induced gastrointestinal toxicity. *Surgery*. 2001;130(5):859–65.
153. Beneke S, Bürkle A. Poly (ADP-ribose) ation in mammalian ageing. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(22):7456–65.
154. Infante J, Sánchez-Juan P, Mateo I, Rodríguez-Rodríguez E, Sánchez-Quintana C, Llorca J, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) genetic variants are protective against Parkinson's disease. *J Neurol Sci*. 2007;256(1–2):68–70.
155. Pieper AA, Verma A, Zhang J, Snyder SH. Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol Sci*. 1999;20(4):171–81.
156. El-Khamisy SF, Masutani M, Suzuki H, Caldecott KW. A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(19):5526–33.
157. Ba X, Gupta S, Davidson M, Garg NJ. Trypanosoma cruzi induces the reactive oxygen species-PARP-1-RelA pathway for up-regulation of cytokine expression in cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 2010;285(15):11596–606.
158. Wei Q, Shi F. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase-1 is involved in the process of porcine ovarian follicular atresia. *Anim Reprod Sci*. 2013;138(3–4):282–91.
159. Curtin NJ. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(12):801–17.
160. Commoner B, Townsend J, Pake GE. Free radicals in biological materials. *Nature*. 1954;174(4432):689–91.
161. Shokolenko I, Venediktova N, Bochkareva A, Wilson GL, Alexeyev MF. Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(8):2539–48.

162. Yoshida K. Nuclear trafficking of pro-apoptotic kinases in response to DNA damage. *Trends Mol Med.* 2008;14(7):305–13.
163. Shieh S-Y, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell.* 1997;91(3):325–34.
164. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(8):594–604.
165. Fu J, Liu Y, Wang C, Zhang H, Yu B, Wang Y, et al. Persistent follicular granulosa cell senescence and apoptosis induced by methotrexate leading to oocyte dysfunction and aberrant embryo development. *Clin Transl Sci.* 2021;14(5):2043–54.
166. Sheikhabaei F, Khazaei M, Rabzia A, Mansouri K, Ghanbari A. Protective effects of thymoquinone against methotrexate-induced germ cell apoptosis in male mice. *Int J Fertil Steril.* 2016;9(4):541.
167. Daggulli M, Dede O, Utangac MM, Bodakci MN, Hatipoglu NK, Penbegul N, et al. Protective effects of carvacrol against methotrexate-induced testicular toxicity in rats. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7(12):5511.
168. Xiong S, Song D, Xiang Y, Li Y, Zhong Y, Li H, et al. Reactive oxygen species, not Ca^{2+} , mediates methotrexate-induced autophagy and apoptosis in spermatocyte cell line. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2020;126(2):144–52.
169. Gol M, Saygili U, Koyuncuoglu M, Uslu T. Influence of high-dose methotrexate therapy on the primordial follicles of the mouse ovary. *J Obstet Gynaecol Res.* 2009;35(3):429–33.
170. Karri S. Effect of methotrexate and leucovorin on female reproductive tract of albino rats. *Cell Biochem Funct.* 2011;29(1):1–21.
171. Hortu I, Ozceltik G, Ergenoglu AM, Yigitturk G, Atasoy O, Erbas O. Protective effect of oxytocin on a methotrexate-induced ovarian toxicity model. *Arch Gynecol Obstet.* 2020;301(5):1317–24.
172. Fu J, Liu Y, Wang C, Zhang H, Yu B, Wang Y, et al. Persistent follicular granulosa cell senescence and apoptosis induced by methotrexate leading to oocyte dysfunction and aberrant embryo development. *Clin Transl Sci.* 2021;14(5):2043–54.

173. Shirazi M, Pooransari P, Hajiha N, Shaker Z, Ghazi M, Tanha FD, et al. Effect of single-dose methotrexate treatment on ovarian reserve in women with ectopic pregnancy undergoing infertility treatment: a single-center experience. *Int J Fertil Steril*. 2020;14(1):23.
174. Benian A, Guralp O, Uzun DD, Okyar A, Sahmay S. The effect of repeated administration of methotrexate (MTX) on rat ovary: measurement of serum antimullerian hormone (AMH) levels. *Gynecol Endocrinol*. 2013;29(3):226–9.
175. Tucker EJ, Jaillard S, Sinclair AH. Chapter 19 - Genetics and Genomics of Primary Ovarian Insufficiency. In: Leung PCK, Qiao JBT-HR and PG, editors. Academic Press; 2019. p. 427–45.
176. Miller WL. Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Mol Cell Endocrinol*. 2013;379(1–2):62–73.
177. Handy DE, Loscalzo J. Redox regulation of mitochondrial function. *Antioxid Redox Signal*. 2012;16(11):1323–67.
178. Miao L, Clair DKS. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(4):344–56.

8. EKLER

Ek 1: Etik Kurul Onayı



T.C.
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



TOPLANTI TARİHİ : 03/09/2020
TOPLANTI NO : 2020/07

- 2- Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 2020-22-03/09 Protokol no'lu "Sıçanlarda Metotreksat ile Oluşturulan Ovaryan Doku Hasarı Üzerine Kurkuminin Etkileri" konulu çalışmasının Etik Kurul İlkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR

Prof. Dr. Emine YILMAZ CAN
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı

9. ÖZGEÇMİŞ

Nesibe KARAOLUK, 2009 yılında yılında Anadolu Üniversitesi Laborant Ve Veteriner Sağlık bölümünü, 2017 yılında Bülent Ecevit Üniversitesi/Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji ve Kimya bölümlerini bitirdim. 2019 yılında Bülent Ecevit Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimime başladım. Halen aynı anabilim dalında çalışmalarımı sürdürmekteyim.

