

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA SİKLOFOSFAMİD İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL
OVARYUM HASARI ÜZERİNE GALLİK ASİT'İN ETKİLERİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Elif KOYUN ALVUROĞLU

TRABZON - 2024

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA SİKLOFOSFAMİD İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL
OVARYUM HASARI ÜZERİNE GALLİK ASİT'İN ETKİLERİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Elif KOYUN ALVUROĞLU

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Derya ÖZTÜRK OKATAN

TRABZON - 2024

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez sürecimde her türlü maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen kıymetli tez hocam Dr. Öğr. Üyesi Derya ÖZTÜRK OKATAN'a, uzmanlık eğitimim boyunca geniş bilgi ve deneyimiyle birlikte anlayışını bizlerden esirgemeyen Prof. Dr. Engin YENİLMEZ hocama, çok değerli Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU, Prof. Dr. Esin YULUĞ, Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU hocalarıma, Biyokimya Anabilim Dalı'ndan değerli hocamız Prof. Dr. Ahmet ALVER ve Dr. Elif ŞAHİN'e her türlü katkılarından dolayı teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda koca bir aile olduğumuz çok kıymetli çalışma arkadaşlarım; Arş. Gör. Dr. Semanur IŞIK, Arş. Gör. Dr. Tenzile Beyza DURMUŞ, Moleküler Biyolog Ayşen Cemre AYDIN, Arş. Gör. Ali KULABER, Arş. Gör. Dr. Esmâ Betül KARA, Arş. Gör. Dr. Gülten AYDIN, Arş. Gör. Dr. Seval KUVVET KURT, Uzm. Dr. Sedanur YILMAZ DOĞAN, Uzm. Dr. Abdülkadir KUTLU, Uzm. Dr. Ayşe Firuze BIYIK, Arş. Gör. Dr. Mert SAĞLAM'a teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Büyük özveri ile beni yetiştiren, bugünlere gelmeme vesile olan, varlıklarını ve dualarını hep yanımda hissettiğim biricik annem Sebahat KOYUN, canım babam Mehmet KOYUN, değerli kardeşlerim Esra KOYUN ve Gülbahar CİVİL'e sonsuz teşekkür eder, sevgilerimi sunarım. Asistanlık sürecinde bana hep destek olan yoldaşım, göz aydınlığım, çok kıymetli eşim Abdullah ALVUROĞLU'na, ruhumun ruhu yavrularım Erva Hatice ve Zeynep'e teşekkür eder, kucak dolusu sevgilerimi sunarım.

Dr. Elif KOYUN ALVUROĞLU

ÖZET

Sıçanlarda Siklofosfamid ile Oluşturulan Deneysel Ovaryum Hasarı Üzerine Gallik Asit'in Etkileri

Amaç: Bu çalışmada; sıçanlarda CP uygulanması ile oluşan ovaryum hasarına karşı GA'nın profilaktik etkilerinin histolojik ve biyokimyasal yöntemlerle araştırılması amaçlandı.

Metotlar: Araştırma için 32 adet Sprague Dawley ırkı erişkin dişi sıçan rastgele 4 eşit gruba (Kontrol, CP, GA, CP+GA) ayrıldı. Tüm denekler deneyin 1. ve 8. gününde tartıldı. Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmadı. CP grubuna deneyin 7. gününde 150mg/kg intraperitoneal CP uygulandı. GA grubuna deneyin 1. gününden itibaren 7 gün boyunca günlük 20mg/kg GA oral gavaj yoluyla uygulandı. CP+GA grubuna deneyin 1. gününden itibaren 7 gün boyunca, oral gavaj yoluyla günlük 20mg/kg GA ve 7. günde 150mg/kg intraperitoneal CP uygulandı. Deneyin 8. günü sıçanlardan kan örnekleri alındı ve ovaryumları çıkarıldı. Sağ ovaryum histopatolojik değerlendirmeler için sol ovaryum biyokimyasal analiz için kullanıldı. Kesitler hematoksilen-Eozin, Masson trikromu, Periyodik Asit-Schiff ve TUNEL yöntemiyle boyandı. Histopatolojik değerlendirmeler, folikül sayımı ve skorlama yapıldı. Biyokimyasal analizde glutatyon peroksidaz (GPX), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), malondialdehit (MDA), doku anti Müllerian hormon (AMH), serum AMH düzeylerine bakıldı.

Bulgular: CP grubunda foliküler hücre dejenerasyonu, kontrol ve GA grubuna göre anlamlı olarak artmıştı. CP+GA grubunda foliküler hücre dejenerasyonu, CP grubuna göre anlamlı olarak azalmış olup, kontrol ve GA grubuna göre yüksekti. GA grubu kontrol grubuna benzer morfolojideydi. CP grubunda Aİ kontrol ve CP+GA gruplarına göre artmıştı. Primordiyal folikül sayısı CP grubunda, kontrol ve CP+GA gruplarına göre azalmıştı. CP grubunda kontrol ve GA gruplarına göre unilaminar primer folikül sayısı azalmış, atretik folikül sayısı artmıştı. CP+GA grubunda unilaminar primer folikül sayısı kontrol grubuna göre azalmış olup atretik folikül sayısı kontrol ve GA gruplarına göre yüksekti. CP grubunda MDA kontrol ve GA gruplarına göre yüksekti. CP+GA grubunda MDA seviyesi CP grubuna göre azalmıştı. SOD aktivitesi; CP grubunda kontrol, CP+GA ve GA gruplarına göre azaldı. CAT aktivitesi, CP+GA ve GA gruplarındaki diğer gruplara göre yüksekken, CP grubunda kontrol grubuna göre azalmıştı. Doku AMH değerleri CP grubunda kontrol grubuna göre azaldı. Serum AMH değeri GA grubunda diğer gruplarına göre yüksekti.

Sonuçlar: CP'nin erişkin sıçan ovaryumunda neden olduğu folikül hücre hasarını önlemede GA'nın etkili olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Siklofosfamid, Gallik Asit, Ovaryum, İnfertilite.

SUMMARY

Effects of Gallic Acid On Ovarium Damage Experimentally Created with Cyclophosphamide in Rats

Objective: In this study, it was aimed to investigate the prophylactic effects of GA against ovarian damage caused by CP administration in rats by histological and biochemical methods.

Methods: For the research, 32 adult female Sprague Dawley rats were randomly divided into 4 equal groups (Control, CP, GA, CP+GA). All subjects were weighed on the 1st and 8th days of the experiment. The Control group received no treatment. The CP group was administered 150 mg/kg intraperitoneal CP on the 7th day of the experiment. The GA group was given 20 mg/kg GA daily via oral gavage for 7 days starting from the 1st day of the experiment. The CP+GA group received 20 mg/kg GA daily via oral gavage for 7 days starting from the 1st day of the experiment and 150 mg/kg intraperitoneal CP on the 7th day. On the 8th day of the experiment, blood samples were collected from the rats, and their ovaries were removed. The right ovary was used for histopathological evaluations, while the left ovary was used for biochemical analyses. Sections were stained with Hematoxylin-Eosin, Masson's Trichrome, Periodic Acid-Schiff, and TUNEL methods. Histopathological evaluations, follicle counting, and scoring were performed. Biochemical analyses included measurements of glutathione peroxidase (GPX), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), malondialdehyde (MDA), tissue anti-Müllerian hormone (AMH), and serum AMH levels.

Results: In the CP group, follicular cell degeneration was significantly increased compared to the Control and GA groups. In the CP+GA group, follicular cell degeneration was significantly reduced compared to the CP group but remained higher than in the Control and GA groups. The GA group exhibited a morphology similar to the Control group. In the CP group, anti-Müllerian hormone (AMH) levels were higher compared to the Control and CP+GA groups. The number of primordial follicles was decreased in the CP group compared to the Control and CP+GA groups. The number of unilaminar primary follicles was reduced, and the number of atretic follicles was increased in the CP group compared to the Control and GA groups. In the CP+GA group, the number of unilaminar primary follicles was reduced compared to the Control group, and the number of atretic follicles was higher compared to the Control and GA groups. Malondialdehyde (MDA) levels were higher in the CP group compared to the Control and GA groups. MDA levels were reduced in the CP+GA group compared to the CP group. Superoxide dismutase (SOD) activity was decreased in the CP group compared to the Control, CP+GA, and GA groups. Catalase (CAT) activity was higher in the CP+GA and GA groups compared to the other groups, but was decreased in the CP group compared to the Control group. Tissue AMH values were lower in the CP group compared to the Control group. Serum AMH levels were higher in the GA group compared to the other groups.

Conclusions: It was concluded that GA may be effective in preventing follicular cell damage caused by CP in adult rat ovaries.

Key Words: Cyclophosphamide, Gallic Acid, Ovary, Infertility.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR.....	I
ÖZET.....	II
SUMMARY	III
İÇİNDEKİLER	IV
KISALTMALAR DİZİNİ.....	VI
TABLolar DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
RESİMLER DİZİNİ.....	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Ovaryum Morfolojisi	3
2.1.1. İnsan Ovaryumunun Embriyolojisi.....	3
2.1.2. Ovaryum anatomisi.....	4
2.1.3. İnsan Ovaryumunun Histolojisi	5
2.1.4. Ovaryumun Görevleri	13
2.2. Siklofosfamid.....	16
2.2.1. Emilimi, Metabolizması ve Atılımı	16
2.2.2. Etki Mekanizması	17
2.2.3. Tıpta Kullanım Endikasyonları.....	18
2.2.4. Yan Etkileri.....	18
2.3. Gallik Asit.....	19
2.4. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar	20
3. MATERYAL VE METOT	22
3.1. Etik Kurul Onayı ve Finansal Kaynak	22
3.2. Deney Hayvanları, Gruplar ve Deneysel Çalışma Planı	22
3.3. Kan ve Doku Numunelerinin Toplanması	24
3.4. Histomorfolojik Analiz	25
3.4.1. Formalin Tespit Solüsyonunun Hazırlanışı	25
3.4.2. Işık Mikroskopik İnceleme için Dokuların Hazırlanması.....	25
3.4.3. Hematoksilen Eozin Boyama Yöntemi.....	26
3.4.4. Ovaryum Foliküllerinin Değerlendirilmesi	27

3.4.5. Periyodik Asit-Schiff Boyama Yöntemi.....	28
3.4.6. Masson Trikrom Boyama Yöntemi	29
3.4.7. İmmünohistokimyasal İşlemler.....	30
3.5. Biyokimyasal Analiz.....	31
3.5.1. GPX Aktivite Ölçümü	32
3.5.2. AMH Ölçümü	32
3.5.3. SOD Enzim Aktivitesi Ölçümü	33
3.5.4. CAT Enzim Aktivitesinin Ölçümü	35
3.5.5. MDA Ölçümü	36
3.5.6. Protein Tayini	37
3.6. İstatiksel Analiz	38
4. BULGULAR	39
4.1. Vücut ve Ovaryum Ağırlıklarına Ait Bulgular	39
4.1.1. Vücut Ağırlığı Bulguları	39
4.1.2. Ovaryum Ağırlıkları Bulguları	40
4.2. Morfolojik Bulgular	40
4.2.1. Folikül Sayısı	40
4.2.2. Histopatolojik Değerlendirme.....	42
4.2.3. Apoptotik İndeks.....	53
4.3. Biyokimyasal Parametrelere Ait Bulgular	57
4.3.1. Doku Biyokimyası	57
4.3.2. Serum Biyokimyası	60
5. TARTIŞMA	62
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	67
7. KAYNAKLAR	69

KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar

A	: Arteria
AI	: Apoptotik indeks
AMH	: Anti Müllerian hormon
Ark	: Arkadaşları
CAT	: Katalaz
CP	: Siklofosfamid
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
FSH	: Folikül stimüle edici hormon
GA	: Gallik asit
GPX	: Glutasyon peroksidaz
GF	: Graaf folikül
GnRH	: Gonadotropin releasing hormone
HCG	: İnsan koryonik gonadotropini
H&E	: Hematoksilen eozin
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HOCl	: Hipokloröz asit
i.p.	: İntraperitoneal
i.v.	: İntravenöz
KTÜ	: Karadeniz Teknik Üniversitesi
LH	: Luteinizan hormon
Lig	: Ligament
MDA	: Malondialdehid
MPF	: Multilaminar primer folikül
OH-	: Hidroksil radikali
O-	: Tekli oksijen
O₂-	: Süperoksit anyonu
OOR	: Peroksil

PAS	: Periyodik Asit-Schiff
PCOS	: Polikistik over sendromu
PF	: Primordiyal folikül
PGH	: Primordiyal germ hücreleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
SF	: Serum fizyolojik
TBA	: Tiyobarbiturik asit
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt) deoxyuridine triphosphate nick end labeling assay
TNF-α	: Tümör nekroz faktör- α
UPF	: Unilaminar primer folikül
UV	: Ultraviyole
ZP	: Zona pellusida

Simgeler

°C	: Santigrad derece
cm	: Santimetre
cm³	: Santimetre küp
dk	: Dakika
gr	: Gram
nm	: Nanometre
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
µm	: Mikrometre

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Rutin Gece Doku Takip Programı.....	26
Tablo 2. Hematoksilen-Eozin Boyama Prosedürü	27
Tablo 3. Deparafinizasyon Programı.....	29
Tablo 4. PAS Boyama Protokolü	29
Tablo 5. Masson Trikrom Boyama Protokolü	30
Tablo 6. TUNEL Boyama Protokolü.....	31
Tablo 7. SOD Aktivitesi Ölçümü İçin Kullanılan Reaktifler ve Miktarları	34
Tablo 8: Katalaz Aktivitesi Ölçümü İçin Reaksiyon Karışımı.....	36
Tablo 9. Doku MDA Seviyesi Ölçümü İçin Yapılan Reaksiyon Karışımı	37
Tablo 10. Ağırlık Verilerinin Ortalama ve Standart Sapma Değerleri.....	39
Tablo 11. Gruplardaki Ovaryum Folikül Sayılarının İstatistik Verileri	41
Tablo 12. Histopatolojik Skorum Ortalamaları	43
Tablo 13. Grupların Apoptotik Hücre Oranları (%).....	54
Tablo 14. Doku Biyokimya Verileri.....	57
Tablo 15. Grupların Serum AMH Seviyeleri	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. CP Metabolizması. İnaktivasyon Yolları Yatay Olarak, CP Aktivasyonu Dikey Olarak Gösterilmiştir (62).....	17
Şekil 2. Gallik Asitin Kimyasal Yapısı (91).....	19
Şekil 3. Ovaryum Dokularında GPX Aktivitesini Hesaplamak İçin Kullanılan Standart Grafiği	32
Şekil 4. Ovaryum Dokularında AMH Aktivitesini Hesaplamak İçin Kullanılan Standart Grafiği	33
Şekil 5. Ovaryum Dokularında SOD Aktivitesini Hesaplamak İçin Kullanılan Standart Grafiği	35
Şekil 6. Ovaryum Dokularında MDA Aktivitesini Hesaplamak İçin Kullanılan Standart Grafiği	37
Şekil 7. Ovaryum Dokularında Protein Seviyelerini Hesaplamak İçin Kullanılan Standart Grafiği	38
Şekil 8. Deney Gruplarına Ait Vücut Ağırlıkları	39
Şekil 9. Ovaryum Ağırlıkları	40
Şekil 10. Gruplara Ait Ovaryum Primordiyal Folikül, Unilaminar ve Multilaminar Primer Folikül Sayılarının İstatistiksel Grafiği	41
Şekil 11. Gruplara Ait Ovaryum Sekonder Folikül, Graaf Folikülü ve Atretik Folikül Sayılarının İstatistiksel Grafiği	42
Şekil 12. Gruplara Ait Ovaryum Foliküler Hücre Dejenerasyonu İstatistiksel Grafiği	43
Şekil 13. Gruplara Ait Vasküler Konjesyon İstatistiksel Grafiği	44
Şekil 14. Gruplara Ait Korpus Luteum Etrafında Hemoraji İstatistiksel Grafiği	44
Şekil 15. Gruplara Ait Germinal Epitel Dejenerasyonu İstatistiksel Grafiği	45
Şekil 16. Gruplara Ait Teka Tabakasında İncelme İstatistiksel Grafiği.....	45
Şekil 17. Grupların Apoptotik İndeks Seviyeleri	54
Şekil 18. Grupların Doku MDA Seviyeleri	58
Şekil 19. Grupların Doku SOD Seviyeleri	58
Şekil 20. Grupların Doku GPX Seviyeleri	59
Şekil 21. Grupların Doku CAT Seviyeleri	59
Şekil 22. Grupların Doku AMH Seviyeleri	60
Şekil 23. Grupların Serum AMH Seviyeleri	61

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No

Resim 1.	Primordiyal Folikül (H&E, ×400), Sarı ok: Primordiyal folikül, Mavi çentikli ok başı: Germinal epitel (Resim çalışmamızdaki sıçan dokularından elde edilen prepratlerden alınmıştır.)	7
Resim 2.	Primer Folikül (H&E, X400), Yeşil ok: Unilaminar primer folikül, Kırmızı ok: Multilaminar primer folikül, Çift yönlü mavi ok: Zona granüloza, Çift yönlü sarı ok: Teka tabakası, Yeşil yıldız: Oosit (Resim çalışmamızdaki sıçan dokularından elde edilen prepratlerden alınmıştır.)	8
Resim 3.	Sekonder folikül (H&E, X200), Mavi yıldız: Folikül kavitesi, Çift yönlü mavi ok: Zona granüloza, Çift yönlü kırmızı ok: Teka tabakası (Resim çalışmamızdaki sıçan dokularından elde edilen prepratlerden alınmıştır.)	9
Resim 4.	Graaf Folikülü (H&E, X200), Çift yönlü mavi ok: Zona granüloza, Çift yönlü kırmızı ok: Teka tabakası, Mavi yıldız: Antrum, Mavi oklar: Korona radiata, Sarı yıldızlar: Zona pellusida, Mavi ok başı: Kumulus ooforus (Resim çalışmamızdaki sıçan dokularından elde edilen prepratlerden alınmıştır.)	10
Resim 5.	Korpus luteum (H&E, X100), Yıldız: Korpus luteum Kırmızı ok: Multilaminar primer folikül (Resim çalışmamızdaki sıçan dokularından elde edilen prepratlerden alınmıştır.)	11
Resim 6.	Atretik Folikül (H&E X200), Mavi Ok: Atretik Folikül.....	12
Resim 7.	Sıçanların Çalışma Süresince Barındırıldığı Standart Tip III Kafesler	23
Resim 8.	Deneklerin Oral Gavaj ve i.p. Uygulamaları. A. Oral Gavaj Uygulaması. B. İntraperitoneal Uygulama.....	24
Resim 9.	Deneklere Ait Ovaryum Dokusunun Çıkarılması	25
Resim 10.	Kontrol Grubu (H&E, X100), Primordiyal folikül (PF), Unilaminar primer folikül (UPF), Sekonder folikül (sf), atretik folikül (AF), Korpus luteum (CL)	46
Resim 11.	Kontrol Grubu (H&E, X400), Yeşil Ok: Granüloza hücresi.....	46
Resim 12.	CP Grubu (H&E, X100), Primordiyal folikül (PF), Multilaminar primer folikül (MPF), Atretik folikül (af), dejeneratif folikül (DF), Korpus luteum (CL)	47
Resim 13.	CP Grubu (H&E, X400), Kırmızı ok başı: Dejenere Hücre, yeşil ok: granüloza hücresi	47
Resim 14.	GA Grubu (H&E, X100), Unilaminar primer folikül (UPF), Multilaminar primer folikül (MPF), Sekonder folikül (SF), Atretik folikül (AF), Korpus luteum (CL).....	48
Resim 15.	GA Grubu (H&E, X400), Yeşil ok: Granüloza hücresi	48

Resim 16.	CP+GA Grubu (H&E, X100), Multilaminar primer folikül (MPF), Sekonder folikül (SF), Atretik folikül (AF), Korpus luteum (CL).....	49
Resim 17.	CP+GA Grubu (H&E, X400), Kırmızı ok başı: Dejenere hücre, Yeşil ok: Granüloza hücresi	49
Resim 18.	Kontrol Grubu (Masson Trikrom, X 200). Sarı çentikli ok başı: Bağ dokusu, Mavi ok: (ZP) Zona pellusida.....	50
Resim 19.	CP Grubu (Masson Trikrom, X 200). Kırmızı ok başı: Dejenere hücre, Sarı çentikli ok başı: Bağ dokusu, UPF: Unilaminar primer folikül, , Mavi ok: (ZP) Zona pellusida.....	50
Resim 20.	GA grubu (Masson Trikrom, X200). Sarı çentikli ok başı: Bağ dokusu, Mavi ok: (ZP) Zona pellusida.....	51
Resim 21.	CP+GA Grubu (Masson Trikrom, X 200). Sarı çentikli ok başı: Bağ dokusu, Mavi ok: (ZP) Zona pellusida.....	51
Resim 22.	Kontrol Grubu (PAS, X400), Mavi ok: Zona pellusida intakt, Kırmızı ok: Bazal membran	52
Resim 23.	CP Grubu (PAS, X400), Mavi ok: Zona pellusida intakt, Kırmızı ok başı: Dejenere hücre, Kırmızı ok: Bazal membran	52
Resim 24.	GA Grubu (PAS, X400), Mavi ok: Zona pellusida intakt, Kırmızı ok: Bazal membran.....	53
Resim 25.	CP+GA Grubu (PAS, X400), Mavi ok: Zona pellusida intakt, Kırmızı ok: Bazal membran	53
Resim 26.	Kontrol Grubu (TUNEL, X400), Kırmızı çentikli ok başı: Normal hücre, Mavi ok başı: Apoptotik hücre	55
Resim 27.	CP Grubu (TUNEL, X400), Kırmızı çentikli ok başı: Normal hücre, Mavi ok başı: Apoptotik hücre.....	55
Resim 28.	GA Grubu (TUNEL, X400), Kırmızı çentikli ok başı: Normal hücre, Mavi ok başı: Apoptotik hücre	56
Resim 29.	CP+GA Grubu (TUNEL, X400), Kırmızı çentikli ok başı: Normal hücre, Mavi ok başı: Apoptotik hücre	56

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser tanı ve tedavilerindeki önemli gelişmeler çocukların ve genç yetişkinlerin hayatta kalma oranlarını arttırmıştır. Ancak, bu tedavilerin üreme fonksiyonu üzerine potansiyel zararlı etkileri de artık açıkça belirlenmiştir (1). Kemoterapiye maruz kalma prematür ovaryan yetmezlik için risk faktörü olarak kabul edilir ve menstrüel bozukluklara, metabolik anormalliklere, infertiliteye neden olur (2). Gametleri kemoterapi veya radyoterapinin gonadotoksik etkilerinden korumak için, oosit, embriyo kriyoprezervasyonu veya ovaryum korteksinin kriyoprezervasyonu gibi çeşitli fertilitiyi koruyucu yöntemler önerilmektedir (1). Ancak, bu yöntemlerin uygulanmasını hastanın yaş, puberte durumu, hastalık ve acil durumlar sınırlandırabilir (1).

Bu kemoterapötiklerden olan siklofosfamid (CP); Hodgkin ve non-Hodgkin lenfoma, lenfositik lenfoma, küçük lenfositik lenfoma, Burkitt lenfoma, multipl miyelom gibi malignitelerin yanı sıra multipl skleroz gibi otoimmün hastalıklarda da kullanım endikasyonu olan alkileyici bir ajandır (3,4). CP antineoplastik etkisini çoğunlukla ilacın karaciğerdeki sitokrom P-450 enzimiyle metabolizasyonu sonucu oluşan metaboliti fosforamid mustard ile göstermektedir (5). Diğer metaboliti olan akrolein ise antioksidan sistemi inhibe ederek reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırır böylece CP'nin yan etkilerinin oluşmasına sebep olur. Literatürde CP'nin kardiyotoksikite, ürotoksikite, gonadal toksikite, hematolojik toksikite ve akciğer hasarı yaptığı gösterilmiştir (6,7). Dokularda oksidatif stresi indüklemesi CP'nin oluşturduğu bu hasarların sebeplerinden biri olabileceği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (8,9).

CP ovaryumda primordiyal, primer, sekonder, antral folikülde azalma ve atretik folikülde artış yapmaktadır (10,11). Foliküllerdeki azalmayı; apoptoz indüksiyonu, korpus luteum ve foliküllerin mikrovaskülarizasyonunun azalması yoluyla folikül kaybına geri dönüşümsüz bir şekilde neden olarak yaptığı düşünülmektedir (12). Ovaryumda süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) aktivitelerinde azalma, ROS ve malondialdehit (MDA) düzeyinde ise artış yapmaktadır (13,14). Serum Anti Müllerian hormon (AMH) değerlerinin azalmasına ek olarak CP ovaryum ve vücut ağırlığında önemli azalmalara sebep olur (15,16). Son

yapılan alışmalar CP'nin granüloza hüresi apoptozunu artırarak ovaryum hasarına sebep olduğunu göstermiştir (17). Bozulmuş antioksidan mekanizması ve aşırı ROS üretiminin tetiklediği granüloza hüresinin apoptozunun, foliküler atrezinin ana nedeni olduğu ileri sürülmektedir (18,19). CP'nin indüklediği hasara bağlı olarak primordiyal folikül havuzu tükenir, buna bağlı olarak erken menapoz ve infertilite görülür (20).

Gallik asit (GA); findık, kiraz, ahududu, nar, üzüm, soğan gibi farklı meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan antioksidandır (21). Güçlü bir antioksidan olan GA aynı zamanda kanser önleyici, antimikrobiyal, antiviral, antiinflamatuvar, antidiyabetik, antihipertansif, nörodejeneratif bozukluklar ve yaşlanma karşıtı faaliyetler göstermektedir. Aynı zamanda kardiyovasküler, Alzheimer ve Parkinson hastalıklarını önlemede etkili olduğu kanıtlanmıştır (22-33).

CP'nin ovaryum üzerindeki olumsuz etkilerinin önlenmesi, insan sağlığının korunması ve infertilitenin önlenmesi açısından oldukça mühim bir konudur. Literatüre baktığımızda güçlü bir antioksidan olan GA'nın CP'nin ovaryum üzerinde oluşturduğu hasarın önlenmesinde koruyucu ya da tedavi edici etkisini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Biz de çalışmamızın literatürdeki bu boşluğa katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryum Morfolojisi

2.1.1. İnsan Ovaryumunun Embriyolojisi

Gonadal gelişim dişi embriyolarında yavaş olur (34). Genetik açıdan embriyonun cinsiyeti fertilizasyon sırasında belirlenmiştir. Ancak gelişimin 7. haftasına kadar gonadların dişiye veya erkeğe ait morfolojik özellikleri yoktur. Gonadlar uzunlamasına, gonadal (genital) sırt halinde ortaya çıkarlar. Epitel altındaki mezenşimin yoğunlaşması ve epitel proliferasyonu ile oluşurlar. Genital sırtlar içinde embriyonik gelişimin 6. haftasına kadar germ hücreleri yoktur (35).

Primordiyal germ hücreleri epiblasttan köken alır ve primitif çizgi boyunca göç ederek 3. haftada yolk kesesinin duvarındaki hücrelerin arasına yerleşirler. Ameboid hareketle 4. haftada sonbağırsak mezenterinin dorsali boyunca ilerler. Primitif gonadlara 5. haftanın başında ulaşırlar. 6. haftada gonadal sırtta yerleşirler (35).

Ovaryumlar histolojik olarak, 10. haftaya kadar ayırt edilemezler. Medullaya doğru sokularak rete ovariiyi oluşturan gonadal kordonlar belirgin değildir. Rete ovarii ve gonadal kordonlar dejenere olarak kaybolurlar. 7. haftada dişi gonadın yüzey epitelinden kortikal kordonlar gelişir ve alttaki mezenkimin içerisine girer (34,35). Primordiyal germ hücreleri kortikal kordonların içine yerleşir. 16. haftada kortikal kordonlar izole hücre kümelerine ayrılırlar. Kümelerdeki hücreler prolifer olmaya devam ederler. Primordiyal germ hücrelerinden köken alan oogoniumun etrafını epitel hücreleri tabakası sarar. Bu tabaka yüzey epiteli kökenli yassılaştırmış foliküler hücreleri içerir. Oogoniumlar foliküler hücrelerle birlikte primordiyal folikülü oluştururlar. Ovaryumlarda fetal hayatta, oogoniumdaki mitoz sonucu, binlerce primordiyal folikül oluşur (34,35).

Postnatal dönemde oogonium oluşmamaktadır. Doğumdan önce pek çok hücre dejenere olur. Primer oositleri oluşturmak üzere iki milyon civarında hücre kalır. Postnatal dönemde ovaryumun yüzeyindeki epitel tek tabakalı hale gelir ve düzleşir. Periton mezoteli ile ovaryum hilumunda devamlılık kazanırlar. Tunika albuginea,

korteksteki foliküllerden, yüzey epitelini ayıran ince fibröz bir kapsüldür. Ovaryumlar mezonefrozdaki ayrılırlar ve mezovarium ile bağlanırlar (34).

2.1.2. Ovaryum anatomisi

Ovaryumlar erkekteki testisin homoloğu olan, dışı pelvis duvarı ile uterus arasına bağlarıyla asılmış bir çift üreme organıdır. Pelvis yan duvarında arteria (a). iliaca interna ve externa arasındaki fossa ovaricaya yerleşmiştir (36,37). Fossa ovaricayı yukarıdan a. iliaca externa, arkadan ureter, aşağı ve ön taraftan ligamentum (lig). latum uteri sınırlar (36). Ovaryum elips şeklindedir (38).

İlk gebelikte ovaryumlar karın boşluğuna çekilirler. Bu yüzden doğum yapmış kadınlarda ovaryum biraz daha aşağıda bulunur. Ovaryumlar lig. latum uteri içinde, tuba uterinanın aşağı ve arka kısmında bulunur. Puberteye kadar ovaryumların dış yüzü pembemsi-gri renkli, düz ve parlak olan peritonla örtülüdür. Puberte sonrası periton matlaşır. Doğum ve ovulasyon sonrası da üzeri pürüzlü bir hal alır. Bir ovaryum yaklaşık 2 cm eninde, 0,8 cm kalınlığında, 4 cm uzunluğunda ve 4-6 gr ağırlığındadır (36). Menarş öncesi kızlarda ortalama ovaryum hacmi 3 cm³, adet gören kadınlarda 9,8 cm³ ve menopoz sonrasında 5,8 cm³'dir (39). Ovaryumun facies medialis ve facies lateralis olmak üzere iki yüzü, extremitas inferior (uterina) ve extramitas superior (tubaria) olmak üzere iki ucu, margo anterior (mesovaricus) ve margo posterior olmak üzere iki kenarı vardır (40).

Ovaryumun uterusu bakan ucu (extremitas uterina) ile uterusun üst dış köşesi arasında uzanan bağa lig. ovari proprium denir. Lig. latum uteri içinde bulunan bu bağ gubernaculum artığı olup biraz da çizgisiz kas lifi içermektedir. Ovaryumu besleyen damarların (a. ovarica, vena (v.) ovarica) etrafını periton sardığı için bir ligament şeklini almıştır. Bu ligament lig. ovari suspensorium olup ovaryumu asıcı bir rol üstlenir. Facies lateralis yüzü parietal peritona oturur ki bu periton fossa ovaricayı örtmektedir. Dış yüze oranla daha konveks olan facies medialis infundibulum uterinae örter. Arka kenarına margo liber denilir ve ön kenara oranla daha konveks ve kütüttür. Margo liber ureter ile komşuluk yapar. Mesovariuma tutunan ön kenarına margo mesovaricus denilir (36). Ön kenarında bulunan hilum ovarii içinden ovaryuma damarlar ve sinirler girer ve çıkar (40).

Arterleri: A. ovarica ovaryumu besler. Lig. suspensorimu ovarii içinden pelvise inen a. ovarica abdominal aortun dalıdır. Ovaryuma hilum ovariden girer ve korteksteki foliküllerin çevresinde kılcal ağlar oluşturur (36).

Venleri: Hilum ovariden çıkan ovaryum venleri arterleri takip ederler. Plexus pampiniformis denilen venöz ağı oluşturan bu venler yukarı çıktıkça birbiriyle birleşirerek v. ovaricayı oluştururlar. V. ovarica ile a. ovarica birlikte seyretmektedir. Sol taraftaki v. ovarica v. renalis, sağ taraftaki v. ovarica ise v. cava inferiora dökülür (36).

Lenf drenajı: A. ovarica boyunca uzanan ovaryum lenfleri nodi lymphatici preaortici ve nodi lymphatici aortici laterallere drene olurlar (36).

Sinirleri: Ovaryuma ait sinirler a. ovaricanın etrafında bulunan plexus ovaricus ve plexus hypogastricusdan gelir. Sempatik lifler nervus (n.) splanchnicus minörden ve medulla spinalisin torakal segmentlerinden gelir. Parasempatik lifler ise n. vagustan gelir (36).

2.1.3. İnsan Ovaryumunun Histolojisi

Ovaryum nulliparlarda bir çift badem şekilli 3 cm boyunda, 1,5 cm eninde ve 1 cm kalınlığında yapılardır. Ovaryumun yüzeyi bazı bölgelerde yassılaştıran tek katlı kübik epitel özelliğindeki germinal epitel ile döşelidir (41). Germinal epitel altında ise sıkı bağ dokusu yapısında tunika albuginea yer alır (42). Tunika albuginea kollajen bakımından zengindir ve ovulasyondan önce yeniden şekillenir (43).

Ovaryum çoğunluğu korteks olmak üzere içte medulla, dışta korteks olacak şekilde iki bölümden oluşur. İki bölüm arasında keskin bir sınır yoktur (44). Korteksi, aşırı hücreli bağ dokusundan oluşan stroma ve ovaryum folikülleri oluşturmaktadır. Yine kortekste reproduktif dönemde korpus albicans, korpus luteum ve atretik foliküller de görülür (42). Medullayı ise kan damarları ve gevşek bağ dokusu oluşturur (44). Ovaryum stromasının merkezi bölgesi medulla oldukça vaskülerdir (45). Korteksin stromasına dağılmış olarak bulunan farklı boyutlardaki foliküllerin her biri tek oosit içerir. Fetal hayatta erken evreleri gerçekleştiren oogeneze, çok sayıdaki mitotik bölünmeler oogoniumların sayısını artırmıştır. Birinci mayotik bölünmenin profazının diploten evresinde bekleyen primer oositler doğumda ovaryumda bulunur.

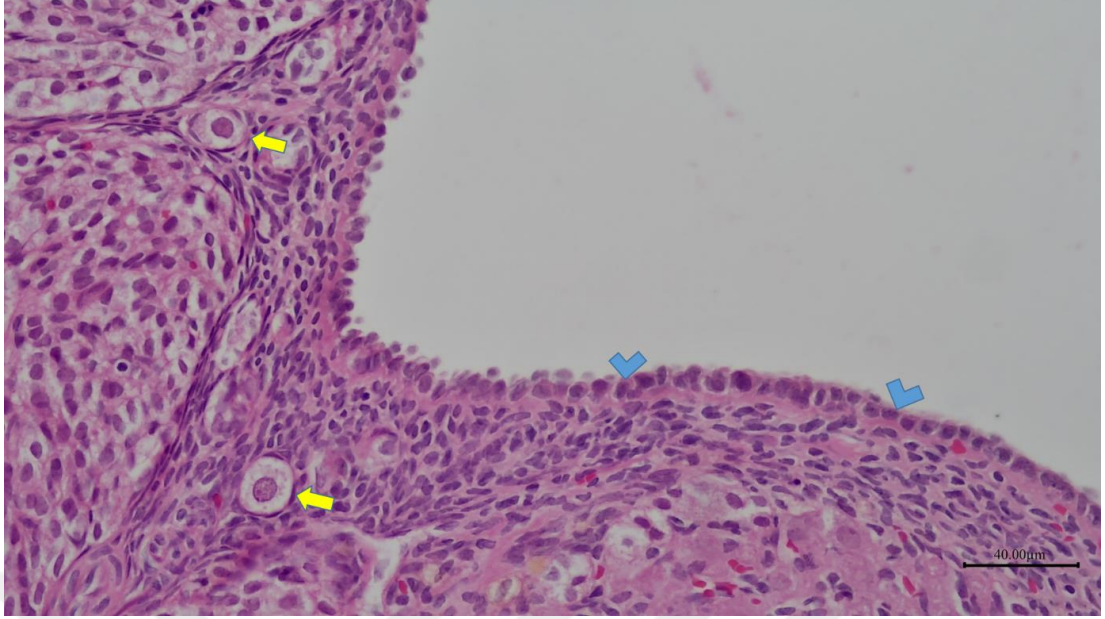
Foliküller puberte sırasında küçük gruplar halinde maturasyona ve siklik büyümeye uğrarlar (41). Foliküler gelişim ve ovulasyon, işlevsel bir mikrodolaşım ağına bağlıdır. Ovulasyon; Luteinizan hormon (LH) artışı ile steroidler, prostoglandinler ve peptitler gibi lokal faktörler arasındaki dinamik etkileşimin bir sonucu olarak meydana gelir. LH artışı, Graaf folikülünün yırtılmasına yol açan yapısal ve biyokimyasal değişiklikleri tetikleyerek sekonder oositin dışarı atılmasına ve ardından korpus luteumun gelişmesine neden olur (41,46). Ovulasyonla atılan sekonder oosit ikinci mayotik bölünmenin metafazında bekler (41). Puberte döneminde ovaryumlarda 300.000 oosit bulunur. Mensturasyon döngüsü sırasında genellikle bir oositte mayoz bölünme devam eder. Kadınlarda üreme çağı 30-40 yıl kadar sürdüğü için yaklaşık 450 oosit ovaryumlardan atılır, diğer oositler atreziye uğrarlar (44).

Folikül Gelişimi

Histolojik gelişim evrelerine göre ovaryum folikülleri 3 tipte incelenir:

- 1-Primordiyal folikül
- 2-Büyümekte olan foliküller: Primer ve sekonder (ya da antral) folikül
- 3-Olgun folikül: Graaf folikülü

Primordiyal folikül: Fetal hayatın üçüncü ayında oluşmaya başlar (41). Foliküler gelişimin ilk basamağıdır. Lokalizasyonları korteks bölgesinde ve tunika albugineanın altındadır. Primordiyal folikülü tek sıra yassı folikül hücreleri çevreler ve içerisinde olgunlaşmamış bir oosit bulunmaktadır (42), (Resim 1). Oositin çekirdeği birinci mayozun profazındaki kromozomları içerir (44). Folikül içinde çapı 30 mikrometre (μm) olan oosit bulunmaktadır. Oositin sitoplazmasına ooplazma denir ve içerisinde Balbiani cisimciği vardır. Balbiani cisimciği lizozomların, birçok mitokondriyonun, Golgi membranlarının ve veziküllerinin, endoplazmik retikulumun oluşturduğu bir yapıdır. İlave olarak, insan oositleri küre şeklinde küçük mitokondriyonlar ve anüler lameller içerirler (41).

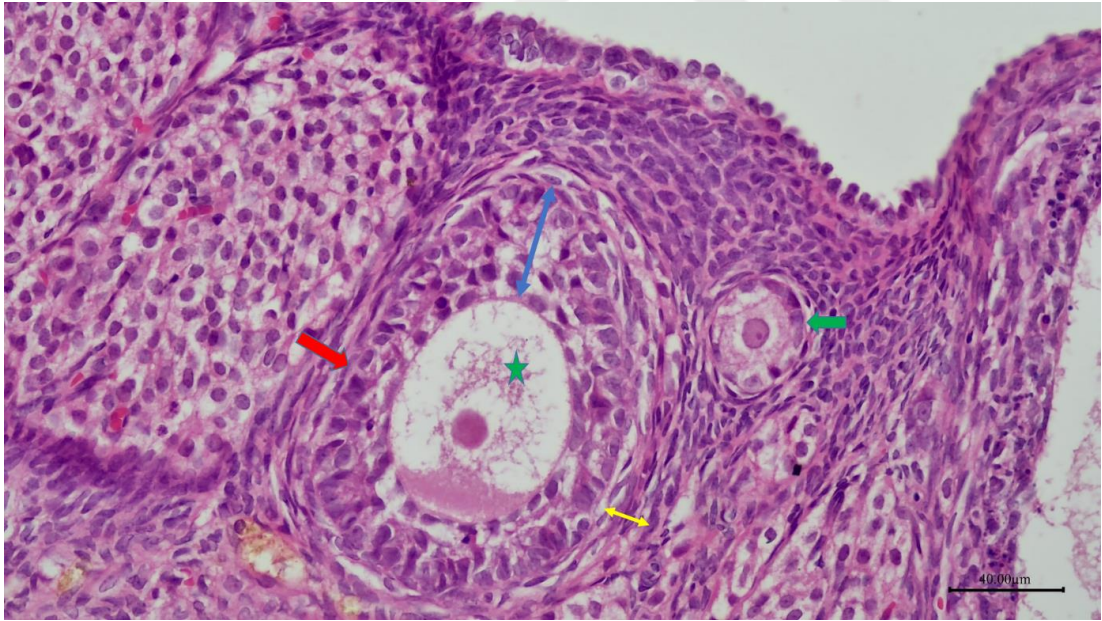


Resim 1. Primordiyal Folikül (H&E, ×400), Sarı ok: Primordiyal folikül, Mavi çentikli ok başı: Germinal epitel (Resim çalışmamızdaki sıçan dokularından elde edilen prepratlerden alınmıştır.)

Primer Folikül (Preantral Folikül): Primordiyal folikülde tek sıra yassı halde olan foliküler hücreler çoğalarak kübik şeklini alırlar. Bu aşamadaki folikül **primer folikül** olarak isimlendirilir. Folikül içindeki oosit büyürken bazı glikoproteinleri ve glikozaminoglikanları salgılar. Bu salgılar folikül hücreleri ile oosit arasında zona pellusidayı oluşturur (41). Zona pellusida 5-10 μm kalınlığındadır ve dört çeşit glikoprotein içerir (44). Zona pellusida PAS boyasıyla boyanır. Zona pellusida tabakası sperm için reseptör içermektedir (42). Zona pellusida glikoprotein çeşitleri ZP-1, ZP-2, ZP-3'tür (41). ZP-3 bunlar arasında en önemli olandır. ZP-3'ün spermatozoa bağlanma reseptörü ile akrozom reaksiyonu indüklemeye görevi vardır. Oositlerin mikrovillusları ile folikül hücrelerinden çıkan uzantılar zona pellusida içine uzanırlar ve 'oluklu bağlantılar' aracılığıyla iletişime geçerler (41). Oosit etrafındaki hücreler proliferasyon olarak stratum granulozum epitelini oluştururlar (42). Bu aşamadan sonra folikül hücreleri granuloza hücreleri olarak isimlendirilir. Oluklu bağlantılar granuloza hücreleri arasında folikül büyümesi esnasında gelişir (41). Tek katmanlı (unilaminar) primer foliküller tek katlı epitel içeren foliküllerdir. Çok katlı epitel içeren foliküller ise çok katmanlı (multilaminar) primer foliküllerdir (Resim 2), (44).

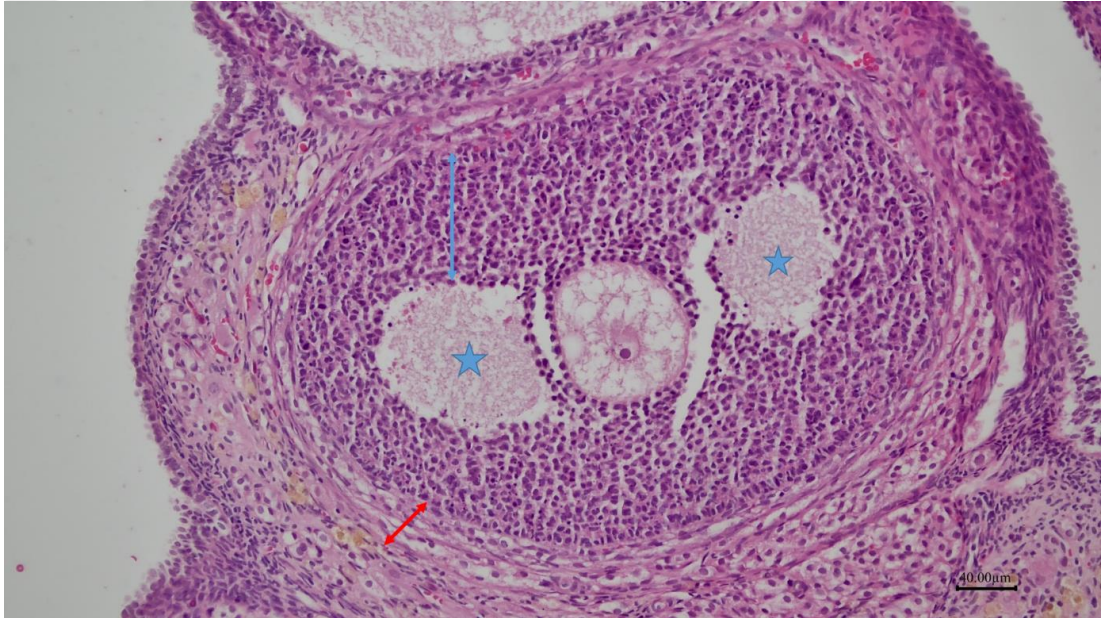
Büyüyen primer foliküllerin etrafında stromal hücrelerden farklılaşarak oluşan teka folikülü vardır. Teka folikülü iki tabaka şeklinde farklılanır. Teka interna

damarlanma gösteren, kübik şekilli salgı hücreleri olan tabakadır (41). Teka interna tabakası androstenedion salgılayan endokrin bir dokudur. Salgılanan bu öncül molekül aromataz enzimi ile granüloza hücreleri içinde östrojene çevrilir. Östrojen stromaya ve tekaya geri dönerek buradan kapiller aracılığıyla tüm vücuda dağılır (44). Teka interna ile granüloza tabakası arasında bazal lamina sınır oluşturmaktadır. Bazal lamina damarlanma göstermeyen granüloza tabakası ile kapillerden zengin teka internayı birbirinden ayırır. Teka eksterna ise kollajen liflerden ve düz kas hücrelerinden zengin bir tabakadır. Primer folikül gelişirken içerisindeki oosit de olgunlaşmaya devam eder. Oosit geliştikçe içerisindeki organellerin oranları değişir. Golgi kompleksi elemanları Balbiani bölgesinden sitoplazmaya dağılır. Granüller endoplazmik retikulum yaygınlaşır, serbest ribozomların, veziküler ve multiveziküler cisimciklerin ve mitokondriyonların sayısı artar. Oosit plazma membranına oolemma denir. Oolemmmanın altında proteazlardan zengin granüller belirir. Bunlara kortikal granüller denir ve oosit sperm ile karşılaştığında proteazdan zengin salgı yaparlar (41,42).



Resim 2. Primer Folikül (H&E, X400), Yeşil ok: Unilaminar primer folikül, Kırmızı ok: Multilaminar primer folikül, Çift yönlü mavi ok: Zona granulosa, Çift yönlü sarı ok: Teka tabakası, Yeşil yıldız: Oosit (Resim çalışmamızdaki sıçan dokularından elde edilen prepratlerden alınmıştır.)

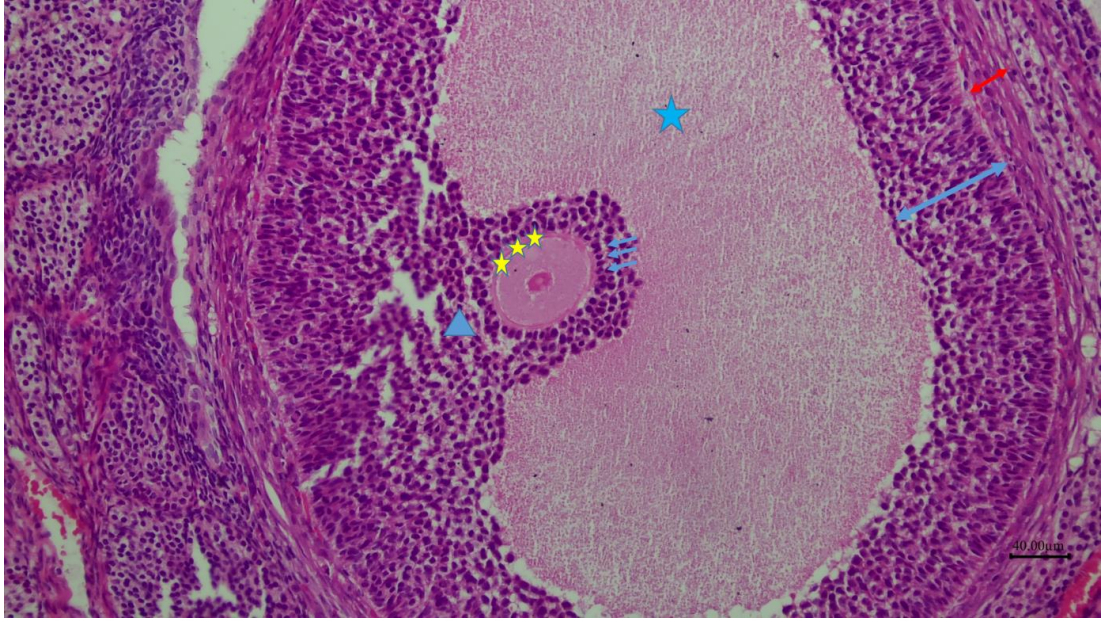
Sekonder folikül: Granüloza hücrelerinin proliferasyonu ile 6-12 hücre tabakası kalınlığında stratum granulozum oluşur. Granüloza hücreleri arasında sıvı dolu boşluklar oluşmaya başlar. Likör folikülü olarak adlandırılan ve hyaluronan açısından zengin sıvı içeren bu boşluklar sıvı biriktikçe birleşir ve ileride antrum denen hilal şeklinde tek bir boşluğu oluşturur. Bu aşamalardan sonra folikül sekonder folikül ya da antral folikül olarak adlandırılır (Resim 3). Sekonder folikülün içerisindeki oositin çapı 250 µm'ye ulaşmıştır. Boşluklar içerisindeki sıvıdaki hyaluronan su tutarak folikül çapını artırır. Call-Exner cisimcikleri granüloza hücreleri tarafından salgılanan, koyu boyanan, PAS pozitif, proteoglikanlar ve hyaluronan içeren yapılardır (41,42).



Resim 3. Sekonder folikül (H&E, X200), Mavi yıldız: Folikül kavitesi, Çift yönlü mavi ok: Zona granüloza, Çift yönlü kırmızı ok: Teka tabakası (Resim çalışmamızdaki sıçan dokularından elde edilen prepratlerden alınmıştır.)

Graaf folikülü: Graaf folikülünün çapı yaklaşık 10 mm'dir. Korteks kalınlığı boyunca devam eden bu büyük foliküller ovaryum yüzeyinde de çıkıntı yaparlar (41). Tek ve büyük bir boşluk olan Graaf folikülünün antrumu foliküler sıvıyı depolar (44). Folikül genişledikçe stratum granulozum tabakası inceler ve granüloza hücrelerin mitotik aktivitesi azalır. Granüloza hücreleri oosit etrafında, antruma doğru çıkıntı olacak şekilde kumulus ooforus yapısını oluşturur. Ovulasyonda oositle birlikte atılan, oosit etrafını saran kumulus ooforus hücrelerine korona radiata denir. Teka tabakaları

Graaf folikülünde daha belirginleşir. LH hormonu insanlarda teka internada östrojen öncülleri olan androjenleri üretmek için uyarıcıdır. Folikül stimüle edici hormon (FSH) granüloza hücrelerini uyararak androjenlerin östrojenlere dönüşümünü sağlar. Östrojenler granüloza hücrelerini uyararak proliferasyonla birlikte Graaf folikülünün boyutları artar (Resim 4), (41).

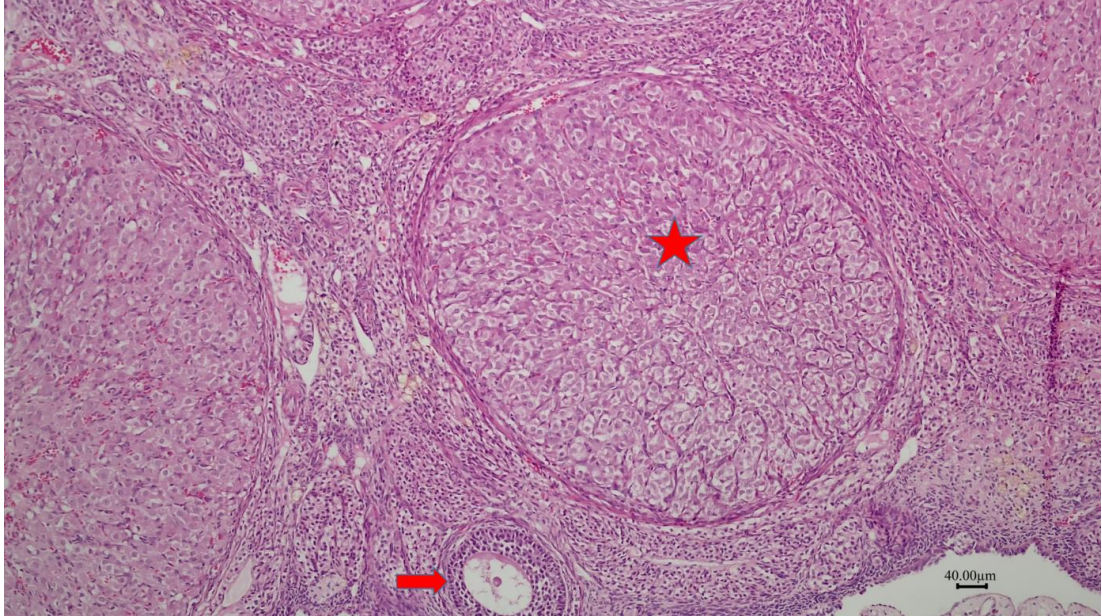


Resim 4. Graaf Folikülü (H&E, X200), Çift yönlü mavi ok: Zona granüloza, Çift yönlü kırmızı ok: Teka tabakası, Mavi yıldız: Antrum, Mavi oklar: Korona radiata, Sarı yıldızlar: Zona pellusida, Mavi ok başı: Kumulus ooforus (Resim çalışmamızdaki sıçan dokularından elde edilen preperatlardan alınmıştır.)

Korpus Luteum: Ovulasyon sonrası folikülün teka interna ve granüloza hücreleri yeniden organize olarak kortekste endokrin bir bez olan korpus luteumu oluştururlar (44). Teka interna tabakasındaki hasar gören kapillerdeki kan antrumda pıhtı şeklinde birikir. Oluşan bu yapıya korpus hemorajikum denir. Teka interna ve granüloza hücreleri luteinizasyon sonrası teka lutein ve granüloza lutein hücrelerini oluştururlar. Bu hücrelerin içerisinde yağ damlacıkları bulunur ve boyutları artar. Sitoplazmada bulunan ve yağda çözünen bir madde olan lipokrom sayesinde taze preperatlarda sarı görünürler. Steroid salgılayan hücrelerde olduğu gibi tübüler kristal mitokondriyonlar ve bol granülsüz endoplazmik retikulum içerirler. Granüloza lutein hücreleri ve teka lutein hücreleri olmak üzere iki çeşit luteal hücre vardır (41). Granüloza lutein hücreleri soluk boyanan, geniş ve veziküler nükleuslu yapılardır.

Teka lutein hücreleri daha küçük, heterokromatik nükleuslu periferik yerleşimli hücrelerdir (42). Teka interna tabakasındaki vasküler yapılar granüloza tabakasına doğru büyüyerek korpus luteum içinde zengin damar ağı oluşturur. Ovaryumun korteksinde bulunan damardan zengin bu yapı östrojen ve progesteron salgılar. Bu hormonlar uterusun iç tabakası olan endometriumu olası bir gebeliğe hazırlar. Korpus luteum fertilizasyon ve implantasyon gerçekleşmemesi halinde 14 gün aktif kalır (41). Menstrüasyon siklusu boyunca aktif kalan bu korpus luteuma menstrüasyon korpus luteumu denir (Resim 5), (44). Korpus luteum ovulasyondan 10-12 gün sonrasında gerilemeye başlar. Korpus luteum menstrüasyon ya da gebelik sonrasında involusyona uğrar. Korpus luteum hücreleri dejenere olur ve intraselüler hyalin madde birikimi görülür. Otolize uğramış, lipid birikimi olan ve boyutları küçülmüş hücrelere sahip olan bu yapıya korpus albicans adı verilir. Ovaryum korteksinin derinliklerine gömülen korpus albicans birkaç ay içinde yok olur (41).

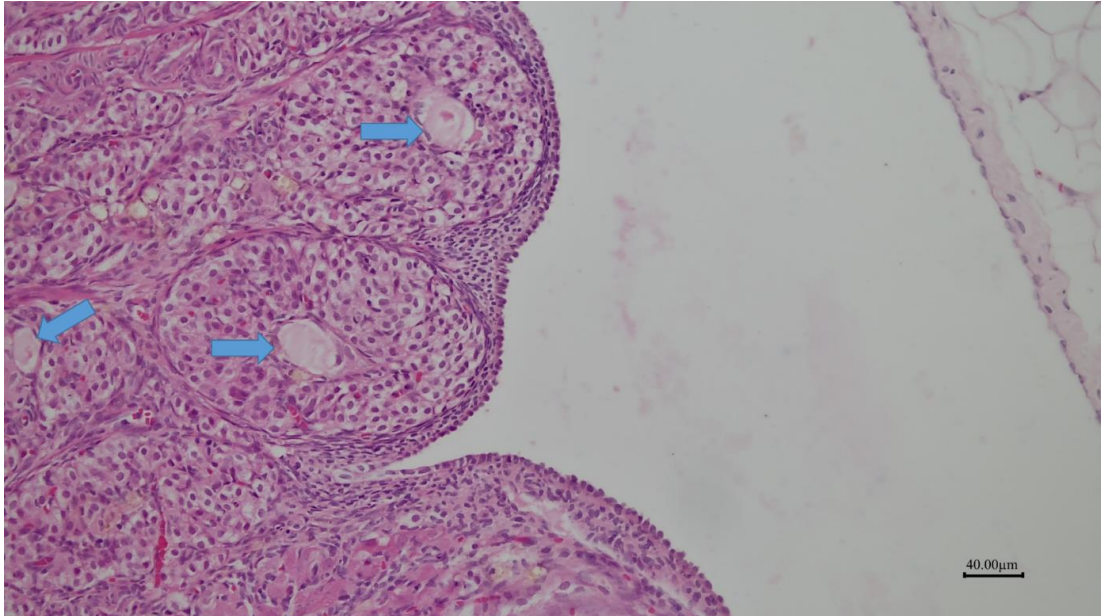
Gebelik oluşması halinde dolaşımdaki progesteronun düşmemesi için embriyonun trofoblast hücreleri insan koriyonik gonadotropin (HCG) adı verilen bir hormon sentezlerler. HCG hormonu korpus luteumun dejenere olmasını engeller ve büyütür. Böylece gebelik korpus luteumu oluşur (44).



Resim 5. Korpus luteum (H&E, X100), Yıldız: Korpus luteum Kırmızı ok: Multilaminar primer folikül (Resim çalışmamızdaki sıçan dokularından elde edilen prepratlardan alınmıştır.)

Atretik Folikül: Ovaryumda bulunan foliküllerin birçoğu granüloza hücrelerinin apoptozu sonucunda atreziye uğrarlar (41). Atrezi; granüloza hücrelerinin ayrılmasını, apoptozu, oositin otolizini ve zona pellusidanın dejenerasyonunu kapsamaktadır (Resim 6), (44). Ovaryan foliküler atrezi olarak adlandırılan bu olay fetal dönemde, erken postnatal dönemde ve pubertede gerçekleşmektedir. Puberte sonrasında menstrüel dönemde baskın folikül gelişir ve ovulasyon gerçekleşir. Diğer foliküller maturasyonlarının herhangi bir döneminde atreziye uğrayabilirler. Atretik foliküller ovaryum stromasında kaybolurlar. Stromal hücreler folikül hücrelerinin önceden bulunduğu boşluğa göç ederek folikülün varlığı ile ilgili iz bırakmazlar. Gelişmeye devam eden büyük foliküllerin atrezisinde oosit dejenerasyonu gecikir. Foliküler atrezisi sırasında granüloza hücrelerinde mitoz bölünme durur, apoptoz başlar. Granüloza tabakasını bol vaskülarize bağ dokusu kaplar (41). Granüloza tabakasına makrofaj ve nötrofil invaze olur (42). Teka interna tabakasındaki hücreler hipertrofiye uğrar (42). Folikül antrumunu bağ dokusu kaplar (41).

Teka interna ile foliküler hücrelerin arasında bulunan bazal membranın kalınlığı artarak dalgalı hyalin tabakayı oluşturur (42). Bu tabakaya camsı membran denir. Atrezinin geç dönemde olduğunun göstergesidir (41).



Resim 6. Atretik Folikül (H&E X200), Mavi Ok: Atretik Folikül

2.1.4. Ovaryumun Görevleri

Ovaryumun iki ana görevi vardır.

1- Steroidogenez (steroidlerin üretilmesi):

2- Gametogenez (gametlerin üretilmesi): Ovaryumda gamet oluşumuna oogeneze denir. Gelişim aşamasında olan gamete oosit, gelişimini tamamlamış gamete ise ovum denir (41).

Ovaryumdan salgılanan en önemli cinsiyet hormonları östrojenler ve progestinlerdir (47).

Östrojenler: Östrojenler gebe olmayan kadınlarda büyük oranda ovaryumdan, az miktarda da adrenal bezden salgılanır. Gebelik durumunda aynı zamanda plasentadan da salgılanır. Kadın vücudunda üç çeşit östrojen bulunmaktadır. Bunlar östriol, östron ve β -östradiyol olarak bilinir. β -östradiyol ovaryumlardan salgılanan en önemli östrojendir. β -östradiyolün östrojenik gücü en fazladır. Östradiyol ve östrondan sentezlenen oksidatif hormon östriyoldur. Az miktar östron ovaryumdan salgılanır (47). Üç östrojen içinden en az potent olan östrondur. Östron menopoz sonrası kadında baskındır. Östron, östradiyol ve androstenodionun periferik dokuda dönüştürülmesi sonucu üretilir(48).

Progestinler: Progesteronlar içlerinde en önemli olanıdır. $17\text{-}\alpha$ -hidroksiprogesteron ise az miktarda bulunan progestindir. Progesteron gebelik olmayan kadınlarda ovaryum döngüsünün ikinci yarısında salgılanır. Gebe kadınlarda ise özellikle 4. aydan sonra plasentadan salgılanmaktadır (47).

Östrojen ve progestinlerin sentezi: Bu hormonlar kanda bulunan kolesterolden ve asetil koenzim-A'dan ovaryumlarda üretilmektedir. İlk aşamada progesteron ve androjenler sentezlenir. Sonrasında sentezlenen bu hormonlar granüloza hücrelerinde bulunan aromataz enzimi ile östrojene dönüşür. Teka tabakasında aromataz enzimi bulunmadığından östrojen sentezlenemez (47).

Östrojenlerin görevleri: Ergenlik döneminde, salgılanan östrojen miktarı artar. Östrojen hormonu etkisiyle kadın iç ve dış genital organlar büyür. Meme dokusunda ise kanal sisteminin artmasını, memelerde yağ birikmesini ve stromal dokuların gelişmesini sağlar. Kemik dokusunda osteoklastik aktiviteyi baskılar. Böylece kemik dokusunun gelişimini sağlar. Uzun kemiklerin epifizi ile gövdesinin

erken birleşmesine yol açar. Vücuttaki protein depolarının az miktarda artmasını sağlar. Östrojen az miktarda da olsa metabolizmayı hızlandırır. Memede, üst bacaklarda, kalçalarda ve deri altında yağ birikimini artırır. Böylece tipik kadın görünümünün oluşumunu sağlar. Östrojenler derinin yumuşak ve düzgün olmasını sağlar. Az miktarda olsa böbrek tübüllerinden sodyum ve su tutulumuna neden olur (47).

Progesteronun görevleri: Progesteron uterusu sekretuar değişikliklerle endometriumu embriyo için implantasyona hazır hale getirir. Uterustaki kasılmaların sıklığını ve şiddetini azaltarak embriyonun uterus içinde kalmasını sağlar. Fallop tüpünde salgıların artmasına katkıda bulunur. Embriyo fallop tüpünden geçerken bu salgılar sayesinde beslenir. Memelerde alveol hücrelerinin çoğalmasını ve lobül gelişimini sağlar. Memeyi laktasyon öncesi hazırlar (47). Foliküllerin FSH duyarlılığını düşürerek folikül gelişimini düzenler.

Anti Müllerian hormon: AMH, erkek fetüste cinsel farklılaşma sırasında Müllerian kanalların fizyolojik involüsyonunu sağlar (49). AMH kadınlarda primer ve antral foliküllerdeki granüloza hücrelerinden salgılanır (50). AMH sentezi yaşla beraber azalır, menopozla birlikte ölçülemeyecek hale gelir (51). AMH menstrüel döngü sırasında dalgalanmalar göstermediği için ovaryum rezervi göstergesi olarak kullanılır (52). AMH folikülogenezin önemli bir düzenleyicisidir (53). AMH, primordial foliküllerin gelişmeye başlamasını ve antral aşamaya geçmesini engeller. Foliküllerin gelişmesini sağlayan FSH'ın etkisini azaltarak foliküllerin olgun aşamaya geçmesine engeller ve böylece ovaryumdaki folikül rezervinin korunmasına yardımcı olur (54).

Polikistik over sendromu (PCOS) olan kadınlarda ovulasyonu olan kadınlara kıyasla serum AMH seviyeleri 2-3 kat yükselir, bu da PCOS'taki artan küçük antral folikül sayısı ile tutarlıdır. (55,56). PCOS ovaryumlarının daha fazla sayıda preantral ve küçük antral folikül içerdiği iyi bilinmektedir (57-59). Bu da AMH üretiminin en yüksek olduğu aşamada foliküler gelişimin durduğunu gösterir (54). Normal ovaryumların granüloza hücrelerine kıyasla anovulatuvar PCOS'un granüloza hücrelerinde granüloza hücresi başına AMH üretimi ortalama 75 kat artmıştır (60). AMH'daki bu yükseklik PCOS'daki anormal folikül sayısı ile ilişkili olabilir (54).

İnhibin: FSH salınımını baskılayan bu hormon korpus luteumdan salınmaktadır (61).

Relaksin: Relaksin hormonu ovaryumdan ve plasentadan salgılanır. Pelvik ligamanları uyarır ve serviksi yumuşatır. Böylece doğumu kolaylaştırır (48).

Puberte sonrasında hipofizden daha fazla FSH ve LH salgılanmaya başlar. FSH ve LH artışıyla 11-15 yaşları arasında normal menstrüel döngü başlamış olur. Menstrüel döngü sağlıklı bir kadında ortalama 28 gün sürmektedir. En kısa 20 gün en uzun 45 gün olacak şekilde bazı kadınlarda değişiklik gösterebilir. Bu döngü sayesinde her ay tek bir oosit atılmış olur. Ovaryum döngüsünün üç aşaması vardır; foliküler faz, ovulasyon, luteal faz.

Foliküler Faz (Folikülogenez): Puberte sonrası FSH ve LH etkisiyle primer foliküller gelişmeye ve büyümeye başlar. Menstrüel siklusun 5-7. günlerinde dominant folikül seçimi olur (41). Folikül gelişiminde özellikle FSH etkilidir. Her menstrüel döngüde 6-12 primer folikül FSH etkisiyle hızlı büyür. Hormon granüloza hücrelerinin çoğalmasını hızlandırır ve granüloza tabakasının oluşumunu sağlar. Teka tabakaları da bu hormon vesilesiyle oluşur (47). Teka ve granüloza hücreleri FSH tarafından uyarılır. Böylece başta östrojen olmak üzere steroid hormonlar folikül lümenine salgılanır (41). Granüloza hücreleri östrojenden zengin foliküler sıvı salgılar. Foliküler sıvı oluşumuyla antrum denen folikül içinde boşluklu yapı oluşur. Primer folikülün olgun folikül haline gelmesinde FSH uyarısı etkilidir. Östrojen, granüloza hücre yüzeylerinde FSH reseptörü sayısını artırır. Östrojenler ve FSH salgısı aynı zamanda granüloza hücrelerinin üzerindeki LH reseptörü sayılarını da artırır. Ön hipofizden salgılanan LH'nın ve folikülden salgılanan östrojenin uyarısıyla foliküldeki teka tabakası kalınlaşır. Antral foliküllerin çapı üç dört kat artarak büyür (47).

Ovulasyon: 28 günlük menstrüel döngüye sahip olan kadınlarda menstürasyonun başlangıcından 14 gün sonra ovulasyon gerçekleşir. Ovulasyondan önce folikülün dış duvarı dışa doğru kabarır, stigma adı verilen bir çıkıntı oluşturur. Folikül sıvısı oluşan yırtıktan stigmaya doğru sızıntı yapar. Dışarı sızan bu visköz sıvı korona radiatayla birlikte oositi içerir (47).

Folikül büyümesi ve ovulasyon için LH hormonu gereklidir. LH ve FSH birlikte folikülün büyümesini sağlar. LH aynı zamanda teka ve granüloza hücrelerini etkileyerek bunların östrojen üreten hücrelere dönüşümünü sağlar. Böylece

ovulasyondan bir gün önce östrojen salgısı azalırken progesteron salgısı artar. Bu durumda folikül hızla büyür, östrojen hormonu azalır, progesteron hormonu artar ve ovulasyon gerçekleşir. Ovulasyon LH pikinden yaklaşık 36 saat sonra gerçekleşir (47).

Ön hipofizden salgılanan LH, foliküllerden içerisinde progesteron olan steroidlerin salgılanmasını sağlar. Ovulasyon için gerekli olan iki olay sırayla gerçekleşir. İlki teka eksternanın lizozomlarında bulunan proteolitik enzimlerin salgılanmasıdır. Böylece kapsül duvarı incelir ve tüm folikül daha fazla şişerek stigma dejenere olur. İkincisi ise folikül duvarlarında anjiogenez görülür ve prostoglandinler salgılanır. Stigmanın dejenerasyonu ve folikülün şişmesi sonucunda folikül yırtılarak oosit dışarı atılır (47).

Luteal faz: Ovulasyondan sonra rüptüre olan foliküldeki teka ve granüloza hücreleri korpus luteumu oluşturur. Korpus luteumdan çoğunluğu progesteron olmak üzere östrojen ve progesteron sentezlenir. Oositin döllenmesi durumunda bu hormonlar sayesinde uterus endometriumunun gebeliğe hazırlanması için sekretuar faz başlar. Oosit döllenmezse hormon seviyeleri düşer. Korpus luteum dejenere olur. Fertilizasyon durumunda korpus luteum korunur ve hormon salgılamaya devam eder (41).

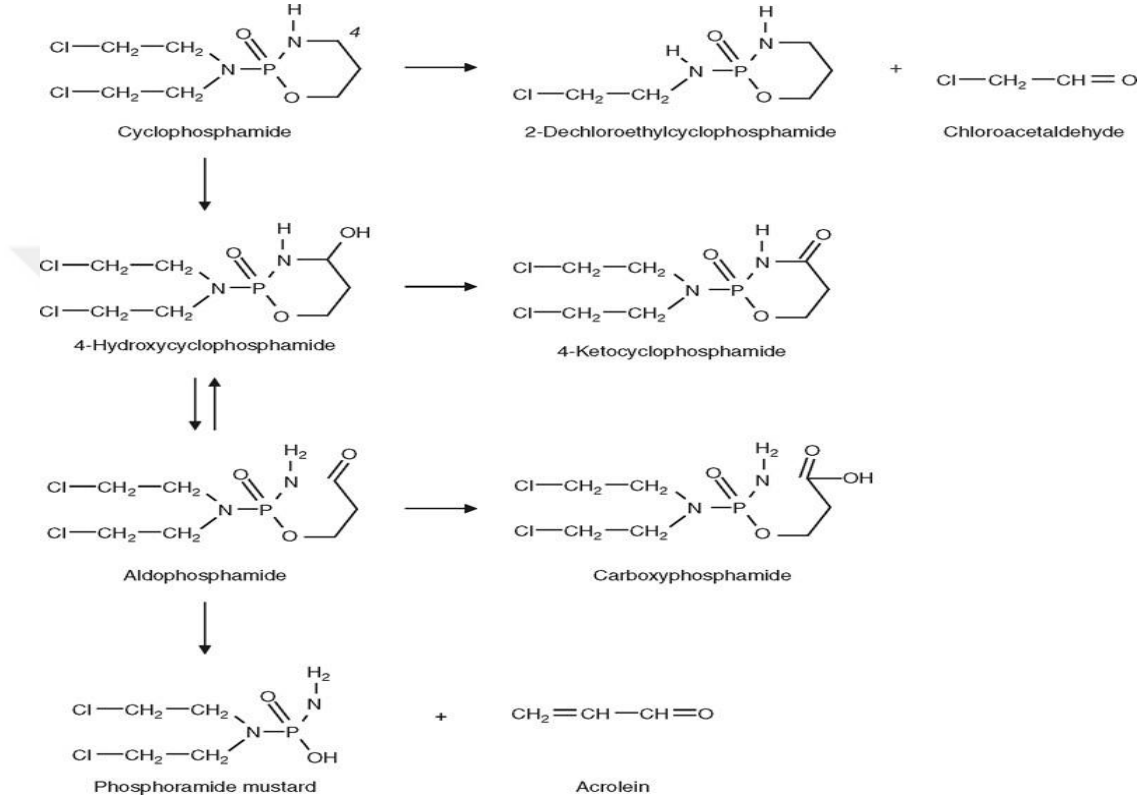
2.2. Siklofosfamid

CP, çeşitli malignitelerin özellikle hematolojik malignitelerin tedavisinde aynı zamanda otoimmün hastalıklarda uzun süredir kullanılan alkilleyici bir ajandır (62-64). Aktif formuna karaciğerde ve daha az oranda diğer organlarda dönüşen bir ön ilaçtır (65). CP'nin toksik etkileri arasında kemik iliği baskılanması, kardiyak ve gonadal toksisite, hemorajik sistit ve karsinogenez yer almasına rağmen yaygın klinik kullanımı vardır (6).

2.2.1. Emilimi, Metabolizması ve Atılımı

Oral yoldan verildiğinde Emilimi daha iyi olan CP, intravenöz (i.v.) ve subkutan olarak da uygulanabilir (66,67). CP, hem aktif hem de inaktif metabolitlere kapsamlı bir şekilde metabolize olan bir ön ilaçtır. Yani inaktif olarak uygulanır ve

karaciğerin sitokrom P-450 sistemi tarafından aldofosfamid ile dengede kalan 4-hidroksisiklofosfamid oksitlenir (68,69). 4-hidroksisiklofosfamid hücrelere girer ve kendiliğinden aktif olan fosforamid mustard ve toksik olan akroleine ayrışır (Şekil 1), (70). CP'nin yarılanma ömrü yaklaşık 6,5 saat olup enjekte edilen ilacın %20'si idrar ile bozulmadan atılır (71).



Şekil 1. CP Metabolizması. İnaktivasyon Yolları Yatay Olarak, CP Aktivasyonu Dikey Olarak Gösterilmiştir (62).

2.2.2. Etki Mekanizması

CP metozbolizması sonrasında oluşan fosforamid mustard alkile edici ajan olarak işlev görür. Fosforamid mustard, aziridinil iyon ara ürünleri oluşturarak nükleofilleri alkile eder (72,73). Hem zincir içi hem de zincirler arası deoksiribonükleik asit (DNA) çapraz bağları ve DNA-protein çapraz bağları oluşturarak DNA'yı alkiler. DNA'yı alkilleyerek DNA replikasyonunu engeller. Böylece hücre döngüsü seçiciliği yapmadığı için tüm hücrelerde etki gösterir (74). Alkilleme işlemi daha çok guaninin 7. pozisyonundaki azot atomuna olmaktadır (75).

2.2.3. Tıpta Kullanım Endikasyonları

CP hem hematolojik malignitelerde hem de solid tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Lösemi, lenfoma, meme kanseri, ovaryum kanseri, retinoblastoma, küçük hücreli akciğer karsinomları, rabdomiyosarkom ve nöroblastoma gibi hastalıkların tedavisinde antineoplastik ajan olarak kullanılmaktadır (6). CP'nin immunosupresif etkinliği olduğu için sistemik lupus eritematozis, skleroderma, multipl skleroz, Behçet hastalığı, romatoid artrit, trombositopenik purpura, nefrotik sendrom gibi otoimmün hastalıklarda kullanılmaktadır. Organ nakillerinden sonra rejeksiyonu kontrol altına almak amacıyla da kullanılmaktadır (76-79).

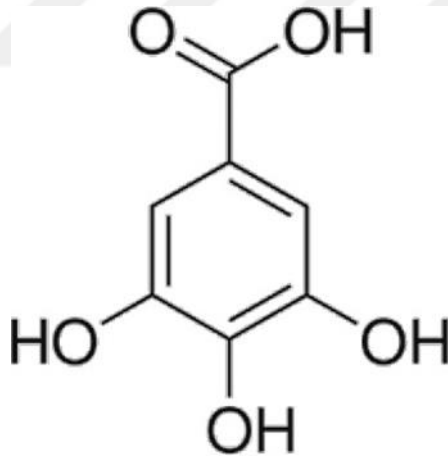
2.2.4. Yan Etkileri

Mide bulantısı, kusma, anoreksi, diyare ve stomatit genellikle oral ve i.v. CP uygulaması sonrası görülen gastrointestinal yan etkilerdir (62,80). CP'nin en sık görülen yan etkilerinden biri de kemik iliği supresyonudur. Bunun sonucunda en sık lökopeni olmak üzere trombositopeni ve anemi görülebilir (62,80). Üriner sisteme ait yan etkileri hemorajik sistit ve mesane kanseridir (81,82). Kardiyovasküler sistemde miyokardit, konjestif kalp yetmezliğine sebep olurken solunum sisteminde ise nadiren de olsa interstisyel pnömoni ve pulmoner fibroza sebep olabilir (80). Alopesi ile deride, dişlerde, tırnaklarda ve mukoza zarlarında oluşan hiperpigmentasyon yan etkileri arasındadır (83,84). CP'nin immunosupresif etkisinden dolayı fırsatçı enfeksiyonlarda artış görülebilir (85,86). CP kullanan hastaların takibinde sekonder malignitelerde artış uzun vadede görülen yan etkilerdendir (87). Gonadal yetmezlik, özellikle kadınlarda CP uygulamasının önemli bir yan etkisidir (6). Hastanın tedavi sırasındaki yaşı, kümülatif doz ve uygulama şeması bu yan etki için başlıca belirleyicilerdir (6). Kadınlarda prematür ovaryan yetmezlik ve amenoreye neden olabilir. Bu menstrüel bozukluklar kadınlarda infertilite nedeni olabilir. Erkeklerde ise azoospermi ve infertiliteye sebep olabilir (88,89).

2.3. Gallik Asit

GA; 3,4,5 trihidroksibenzoin asit olarak bilinen bir polifenolik benzoik asittir (21). Kimyasal formülü $C_6H_2(OH)_3COOH$ 'dir (90). Fındık, kiraz, ahududu, nar, üzüm gibi farklı meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunur. GA; hidroksil (OH^-), süperoksit (O_2^-), peroksil (OOR) radikalleri, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hipokloröz asit ($HOCl$) dahil olmak üzere biyolojik sistemlerde karşılaşılan birçok reaktif türden koruma sağlar (21). GA; renksiz veya hafif sarı, kristalli bir katıdır. Su, alkol, eter ve gliserolde çözünür, benzen ve kloroformda çözünmez (91).

Deneyisel ve teorik çalışmalarda güçlü bir antioksidan olduğu tespit edilmiştir (92-94). Aynı zamanda antikanser özelliklere sahip bitkilerde önemli bir bileşendir ve türevlerinin kanserli hücrelerin apoptozunu indüklediği bulunmuştur (21). GA'nın bu özelliği esas olarak onun prooksidan olması ile ilişkilidir ve dolayısıyla GA hem antioksidan hem de prooksidandır (95). GA'da bulunan üç alkollü OH grubu sayesinde redoks reaksiyonu için radikaller üretir ve radikal süpürücü görevi görür (96).



Şekil 2. Gallik Asitin Kimyasal Yapısı (91)

Antioksidan özelliği yanında birçok farmakolojik aktivite göstermiştir (31,97). Bunlar arasında kanser önleyici, antimikrobiyal, antiviral, antiinflamatuvar, antidiyabetik, antihipertansif, nörodejeneratif bozukluklar ve yaşlanma karşıtı etkiler sayılabilir (22-30,98). GA, çok sayıda biyomedikal uygulama ve ilaç tasarımı için önemli bir moleküldür. Öte yandan, kardiyovasküler hastalıkların yanı sıra Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının önlenmesinde de etkili olduğu kanıtlanmıştır (31-33).

2.4. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar

Serbest radikaller, dış yörüngede eşleşmemiş bir elektrona sahip, reaktif kimyasal türlerdir ve aynı zamanda bağımsız olarak var olma yeteneğine sahiptirler (99-101). Serbest radikallerin, hücresel solunum, fagosit aktivasyonunu içeren mikrobiyal enfeksiyonlara maruz kalma gibi aerobik süreçlerde, yoğun fiziksel aktivite sırasında veya sigara dumanı, alkol, iyonlaştırıcı ve UV radyasyonları, böcek ilaçları ve ozon gibi toksinlerin etkisi altında üretimi artmaktadır (102). Bu kimyasallar, proteinleri, DNA'yı ve lipidleri olumsuz olarak değiştirebilir bu durum insan hastalıklarına ve yaşlanmaya sebep olabilir (8,103).

ROS olarak adlandırılan süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH^\cdot$), tekli oksijen ($O^\cdot$) maddeleri oksijenin eksik indirgendiği bir takım kimyasallardır (104). Reaktif nitrojen, demir, bakır ve kükürt türlerine de rastlanmaktadır (101,104). ROS üretimi reoksijenasyon ve hipoksi için karakteristiktir. ROS, süperoksit (O_2^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2), hem demirle katalizlenmiş Fenton reaksiyonu, hem de lipooksijenazlar, peroksidazlar, ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz gibi çeşitli enzimler tarafından bir dizi hücresel reaksiyon ile üretilir (8,103). $OH^\cdot$, üretildiği yerde çoğu organik ve inorganik molekülle (DNA, proteinler, lipitler, amino asitler, şekerler ve metaller) etkileşime girebilen en güçlü oksitleyici radikal olarak rapor edilmiştir. (105)

Oksidatif stres ilk olarak Sies tarafından “prooksidan-antioksidan dengesinin oksidan türler lehine bozulması ve potansiyel hasara yol açması” olarak tanımlanmıştır (106). Oksidatif stres, ROS üretimi ve tükenmesi arasındaki dengesizliğin sonucu olan aşırı miktarda ROS oluşumudur. Bu nedenle, oksidatif stres, artmış bir serbest radikal oluşumunun, fakat aynı zamanda koruyucu antioksidan savunma sisteminin azalmış aktivitesinin görüldüğü bir durumdur (100). Oksidatif stres; nörodejeneratif hastalıklar, amfizem, kardiyovasküler hastalıklar, inflamatuvar hastalıklar, katarakt ve kanser gibi birçok kronik hastalığa yol açabilmesi sebebiyle çalışmalara konu olmuştur (106-109).

Antioksidan; substratın oksidasyonunu geciktiren veya önleyebilen, oksidatif stres, DNA mutasyonlarını, malign transformasyonları, hücre hasarının diğer parametrelerini azaltabilen, reaktif oksijen radikallerinin etkilerini kontrol altına alan

endojen ve ekzojen kaynaklı maddelerdir (102). Hücresinin redoks homeostazı, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPX) gibi endojen antioksidan enzimleri ve glutatyon gibi enzimatik olmayan bileşikleri, proteinleri ve ürik asit, koenzim Q ve lipoik asit gibi düşük moleküler ağırlıklı temizleyicileri içeren karmaşık endojen antioksidan savunma sistemi tarafından sağlanır (100).



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Etik Kurul Onayı ve Finansal Kaynak

Çalışmamızın etik kurul izni, Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nda onaylanmıştır (Tarih:21.09.2021; Protokol No:2021/46). Bu çalışma KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TTU-2021-9805).

3.2. Deney Hayvanları, Gruplar ve Deneysel Çalışma Planı

Araştırma için Sprague Dawley ırkı erişkin 32 dişi sıçan kullanıldı. KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen sıçanlar, nem oranı %50, sıcaklığı $22\pm1^{\circ}$ C'de olan odalarda ve düzenli olarak 12 saat karanlık/aydınlık periyodunda kalacak şekilde takip edildi. Deney boyunca standart Tip III kafeslerde barındırılan sıçanların beslenmesi için standart sıçan yemi (Bayramoğlu Yem ve Un Sanayi Tic. A.Ş. Erzurum, Türkiye), içme suyu olarak çeşme suyu verildi.

Deneyin bütün uygulamaları, sıçanların bakımı, sakrifikasyonu, çevresel stres ve uyum problemi yaşanmaması için KTÜ Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapıldı.

Sıçanlar aşağıda belirtildiği gibi 4 gruba ayrıldı. Bu çalışmada uygulanan CP (Endoxan, Baxter -Eczacıbaşı İlaç Pazarlama, İstanbul, Türkiye) ve GA (536954-5 g, 96% Sigma-Aldrich Chemie GmbH) dozları literatüre uygun olarak belirlendi (110,111).

1.Grup: Kontrol grubu (n:8): Herhangi bir uygulama yapılmadı.

2. Grup: CP grubu (n:8): Deneyin 7. gününde 150 mg/kg dozunda intraperitoneal (i.p.) CP uygulandı.

3. Grup: GA grubu (n:8): Deneyin 1. gününden itibaren 7 gün boyunca (1 gr GA 100 ml serum fizyolojik içinde çözülüp) günlük 20 mg/kg olacak şekilde GA oral gavaj yolu ile uygulandı.

4. Grup: CP+GA grubu (n:8): Deneyin 1. gününden itibaren 7 gün boyunca oral gavaj yolu ile günlük dozu 20 mg/kg olacak şekilde GA ve 7. günde 150 mg/kg dozunda CP i.p. yoluyla uygulandı.



Resim 7. Sıçanların Çalışma Süresince Barındırıldığı Standart Tip III Kafesler

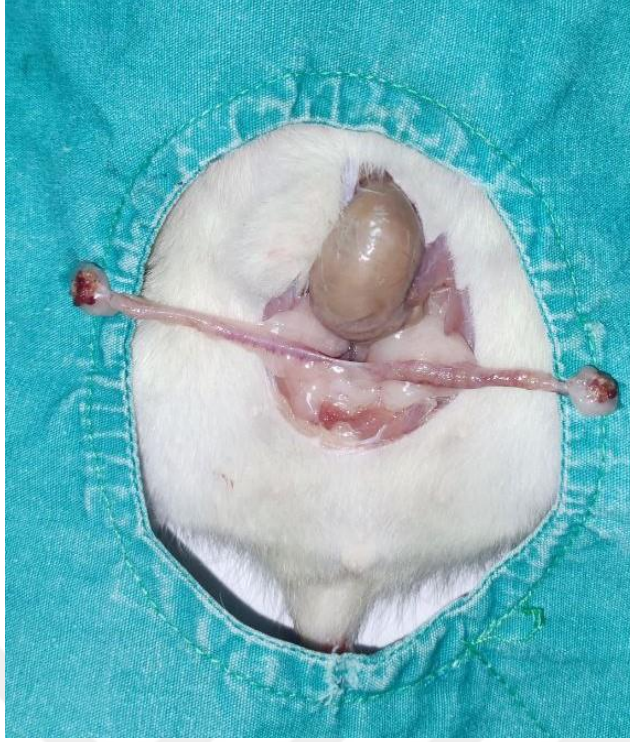


Resim 8. Deneklerin Oral Gavaj ve i.p. Uygulamaları. A. Oral Gavaj Uygulaması. B. İntraperitoneal Uygulama.

Denekler; deneyin 1. günü ve deneklerin sakrifiye edildiği 8. gün tartılarak vücut ağırlığı takibi yapıldı.

3.3. Kan ve Doku Numunelerinin Toplanması

Deney süresinin sonunda (8. günde) sıçanlar anestezi altındayken (ketamin 90 mg/kg) kansızlaştırma yoluyla sakrifiye edildi. Alınan kan örneği biyokimyasal parametreler için EDTA'lı (Etilen diamin tetra asetik asit) tüpe konuldu; vakit geçirmeden hızlıca sıçanların alt abdominal bölgesinin orta hattı kesildi. Önce sağ ovaryum çıkartıldı. Tartıldıktan sonra tespit işlemi için %10'luk formalin solüsyonuna alındı. Sol ovaryumlar ise biyokimyasal değerlendirmeler için Eppendorf tüplerine alınıp -80°C'de saklandı.



Resim 9. Deneklere Ait Ovaryum Dokusunun Çıkarılması

3.4. Histomorfolojik Analiz

3.4.1. Formalin Tespit Solüsyonunun Hazırlanışı

Dokuların fiksasyonunda kullanılacak %10'luk formaldehit solüsyonu aşağıdaki oranda hazırlandı;

- %10 Formaldehit solüsyonu
- %90 Distile su

Hazırlanan çözeltide dokular 7 gün bekletildi.

3.4.2. Işık Mikroskopik İnceleme için Dokuların Hazırlanması

Deneklerden alınan sağ ovaryum, hazırlanan %10'luk formaldehit çözeltisinde oda sıcaklığında ve karanlıkta 7 gün fiks edildi. Bu işlem sonunda sağ ovaryum dokularına, doku takibi cihazında (Thermo Scientific Excelsior AS, İngiltere) rutin gece doku takibi programı uygulandı (Tablo 1).

Tablo 1. Rutin Gece Doku Takip Programı

Uygulama	Süre
Formaldehit	1 saat
Etanol (30°C)	50 dakika
Etanol (30°C)	1 saat
Etanol (30°C)	1 saat
Etanol (30°C)	1 saat
Etanol (30°C)	1 saat
Etanol (30°C)	1,5 saat
Ksilen (30°C)	1 saat
Ksilen (30°C)	1 saat
Ksilen (30°C)	1 saat
Parafin (58°C)	1 saat
Parafin (58°C)	1 saat
Parafin (58°C)	1,5 saat

Takip sonrası dokular kasetlerden çıkarılarak bloklama cihazında (Leica HistoCare Arcadia H, Çin) parafin bloklara gömüldü ve oda sıcaklığında soğutuldu. Hazırlanan doku blokları kesit almaya uygun hale gelene kadar +4 °C’de buzdolabında bekletildi. Tam otomatik mikrotom cihazıyla (Leica RM 2255, Almanya) 5 µm’lik kesitler alınarak benmaride (Apex Instruments, USA) bekletilen 37 °C’ deki suya bırakıldı. Kesitler kırıksıklık giderilene kadar su üzerinde bekletilerek lam üzerine alındı. Lamlar kurutma kağıdı üzerine alınarak Hematoksilen Eozin (H&E), Masson trikrom ve periyodik asit Schiff (PAS), Terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt) deoxyüridine triphosphate nick end labeling assay (TUNEL) boyamaları için hazır hale getirildi.

3.4.3. Hematoksilen Eozin Boyama Yöntemi

Sağ ovaryumun tamamından her 50 µm’de bir 5 µm’lik kesitler alındı. Alınan bu kesitler otomatik boyama cihazında (Leica Autostainer XL, Almanya) tablo 2’deki prosedüre uygun olarak H&E boyandı (112). Boyama cihazından alınan preparatlar kapama medyumunu (Entellan) damlatılarak lamelle kapatıldı. Seviye farkını önlemek için üzerine ağırlık koyularak bir gün bekletildi. KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji

Embriyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan DP 71 (Olympus, Japan) kameralı dijital fotoğraf makinasına sahip ışık mikroskopunda (Olympus, BX51, Japan) her kesitin bütün alanında primordiyal folikül, unilaminar primer folikül, multilaminar primer folikül, sekonder folikül, Graaf folikülü, atretik folikül sayımı, histopatolojik değerlendirmeler ve skorlama yapıldı. Kesitlerden fotoğraf çekimi yapılarak dijital ortama aktarıldı (113).

Tablo 2. Hematoksilen-Eozin Boyama Prosedürü

Uygulama	Süre
Fırın (60°C)	45 dakika
Ksilen	5 dakika
Ksilen	5 dakika
Ksilen	5 dakika
%100 Etanol	5 dakika
%96 Etanol	5 dakika
%70 Etanol	5 dakika
Distile Su (Yıkama)	1 dakika
Hematoksilen	2 dakika
Distile Su (Yıkama)	1 dakika
Asit Etanol	1 saniye
Distile Su (Yıkama)	1 dakika
Amonyaklı Su	10 saniye
Distile Su (Yıkama)	1 dakika
Eozin	1,5 dakika
Distile Su (Yıkama)	1 dakika
%96 Etanol	5 saniye
%100 Etanol	5 dakika
Ksilen	5 dakika
Ksilen	5 dakika

3.4.4. Ovaryum Foliküllerinin Değerlendirilmesi

Her denekten alınan sağ ovaryum dokusundan hazırlanan bloklardan 50 µm'de 5 µm'lik kesitler alınıp H&E ile boyandı. Hazırlanan preparatlarda kesitlerin bütün alanında primordiyal folikül, unilaminar primer folikül, multilaminar primer folikül, sekonder folikül, Graaf folikülü, atretik folikül sayımı yapılarak kaydedildi. Aşağıda yer alan kriterlere göre foliküllerin ayrımı yapıldı (113,114).

Primordiyal folikül: Tek katlı yassı folikül hücreleri ile çevrili primer oosit.

Unilaminar primer folikül: Tek katlı kübik folikül hücreleri ile çevrili primer oosit.

Multilaminar primer folikül: Çok katlı kübik folikül hücreleriyle çevrili primer oosit. Zona granüloza etrafında teka eksterna ve teka interna tabakası bulunabilir.

Sekonder folikül (antral folikül): Çok katlı kübik folikül hücreleriyle (zona granüloza) çevrili primer oosit. Teka interna ve teka eksterna tabakaları zona granüloza etrafında mevcuttur. Zona granülozada içi folikül sıvısıyla dolu boşluklar vardır.

Graaf folikülü: Eksantrik yerleşim gösteren primer oosit etrafında korona radiata ve kumulus hücreleri vardır. Zona granülozada bulunan boşluklar birleşmiş, antrum olarak adlandırılan tek boşluk oluşmuş. Teka tabakaları zona granüloza etrafında bulunur.

Atretik folikül: Büyük foliküllerde granüloza hücrelerinde apoptoz. Granüloza tabakasının makrofaj, nötrofil, vaskülarize bağ dokusu kordonlarıyla invazyonu. Antruma dökülmüş granüloza hücreleri. Folikül ve zona pellusida kollabe olur. Camsı membran görünümü.

Hazırlanan preparatlarda yapılan histopatolojik incelemelerde; vasküler konjesyon, foliküler hücre dejenerasyonu, korpus luteum etrafında hemoraji, germinal epitel dejenerasyonu ve teka tabakasında incelleme değerlendirildi. Her bir preparat, bu kriterler için 0 ile 3 arasında değişen yarı kantitatif bir ölçek ile puanlandırıldı. Buna göre 0: Hiç hasar yok; 1: hafif hasar, odaksal ve hafif değişiklikler; 2: orta hasar, çok odaklı, önemli değişiklikler ve 3: şiddetli hasar, yaygın değişiklikler olarak skorlandırıldı (115).

3.4.5. Periyodik Asit-Schiff Boyama Yöntemi

Hazırlanan preparatlar zembile dizilerek otomatik boyama cihazında (Leica Autostainer XL, Almanya) Tablo 3'te ayrıntılı olarak basamakları gösterilen deparafinizasyon programı uygulanarak deparafinize edildi. Dokular üretici firma direktifleri doğrultusunda kit (PAS McManus Boyama Kiti, GBL, Türkiye) protokolüne uygun olarak PAS boyası ile boyandı (Tablo 4). Boyanan preparatlar kapama medyumuna damlatılarak lamelle kapatılıp, kurumaya bırakıldı.

Tablo 3. Deparafinizasyon Programı

Uygulama	Süre
Fırın	45 dakika
Ksilen	5 dakika
Ksilen	5 dakika
Ksilen	5 dakika
%100 Etanol	5 dakika
%96 Etanol	5 dakika
%70 Etanol	5 dakika
Yıkama	30 saniye
Su	Çıkış

Tablo 4. PAS Boyama Protokolü

Uygulama	Süre
Periyodik Asit Çözeltisi (A)	10 dakika
Distile Su (Yıkama)	2 dakika
Schiff Ayıracı McManus (B)	20 dakika
Distile Su (Yıkama)	2 dakika
Sodyum Metabisülfid Çözeltisi (C)	2 dakika
Tespit Çözeltisi (D)	2 dakika
Distile Su (Yıkama)	2 dakika
Mayer Hemalum Çözeltisi (E)	3 dakika
Distile Su (Yıkama)	5 dakika
%70 Etanol	30 saniye
%96 Etanol	30 saniye
%100 Etanol	30 saniye
Ksilen	1 dakika

Periyodik Asit-Schiff (PAS) ile boyanan kesitlerde zona pellusida, bazal membran ve genel histopatolojik değerlendirmeler yapıldı.

3.4.6. Masson Trikrom Boyama Yöntemi

Masson Trikrom Boyası Boyama Protokolü: Masson Trikrom boyamak için hazırlanan preparatlar otomatik boyama cihazında (Leica Autostainer XL, Almanya) Tablo 3'te basamakları gösterilen deparafinizasyon programı uygulanarak deparafinize edildi. Dokular üretici firma direktifleri doğrultusunda kit (Masson Trikrom Boyama Kiti, GBL, Türkiye) protokolüne uygun olarak boyandı (Tablo 5).

Boyanan preparatlar kapama medyumu damlatılarak lamelle kapatılıp, kurumaya bırakıldı.

Tablo 5. Masson Trikrom Boyama Protokolü

Uygulama	Süre
Weigert'in Demirli Hematoksileni (A+B)	10 dakika
Kurutma	45 dakika
Distile Su (Yıkama)	5 saniye
Pikrik Asit Alkolik Çözeltisi (C)	4 dakika
Distile Su (Yıkama)	5 saniye
Gelincik Kızılı Fuksin Çözeltisi (D)	4 dakika
Distile Su (Yıkama)	5 saniye
Fosfomolibdik Asit Çözeltisi (E)	10 dakika
Kurutma	5 dakika
Distile Su (Yıkama)	5 saniye
Masson Anilin Mavisini Çözeltisi (F)	5 dakika
Distile Su (Yıkama)	30 saniye
%70 Etanol	30 saniye
%96 Etanol	30 saniye
%100 Etanol	30 saniye
Ksilen	1 dakika

Masson trikrom ile boyanan kesitlerde bağ dokusu ve kollajen yoğunluğu değerlendirildi.

3.4.7. İmmünohistokimyasal İşlemler

TUNEL boyama için hazırlanan preparatlar otomatik boyama cihazında (Leica Autostainer XL, Almanya) deparafinize edildi (Tablo3). Dokular üretici firmanın önerisi doğrultusunda in situ cell death detection POD kit (Roche, 11684817910, Berlin, Germany) protokolüne uygun olarak boyandı (Tablo 6).

Tablo 6. TUNEL Boyama Protokolü

Uygulama	Özellikli Ortam	Süre
Phosphate Buffered Saline (PBS)	-	2x5 dakika
Hydrogen Peroxide Block (Thermo Scientific/TA-125-HP)	-	15 dakika
Distile Su (Yıkama)	-	5 dakika
PBS	-	2x5 dakika
Ultra V Block (Thermo Scientific/TA-125-UB)	-	10 dakika
Enzyme Solution (TdT) + Label Solution (fluorescein-dUTP) (Roche/11684817910)	37 °C, nemli	1,5 saat
PBS	-	2x5 dakika
Converter Peroxidase (antifluorescein antibody-peroxidase) (Roche/11684817910)	37 °C, nemli	30 dakika
PBS	-	3x5 dakika
DAB Kromojen Kit (Thermo Scientific/TA-125-HD)	Karanlık	2 dakika
Distile Su (Yıkama)	-	5 dakika
Hematoksilen	-	2 dakika
Distile Su (Yıkama)	-	5 dakika
%70 Etanol	-	5 dakika
%96 Etanol	-	5 dakika
%100 Etanol	-	5 dakika
Ksilen	-	5 dakika

TUNEL tekniğiyle boyama ovaryumdaki apoptozu değerlendirmek için yapıldı. Çekirdekleri kahverengiye boyanan hücreler TUNEL (+) hücreler olarak tanımlandı (116). Her sıçan için aynı kesitte beş farklı alanda foliküllerde granüloza hücrelerinde ve teka hücrelerinde apoptotik ve normal hücreler sayıldı. Apoptotik indeks (AI) hesaplandı (AI: TUNEL (+) hücre sayısı / toplam hücre sayısı X100), (117).

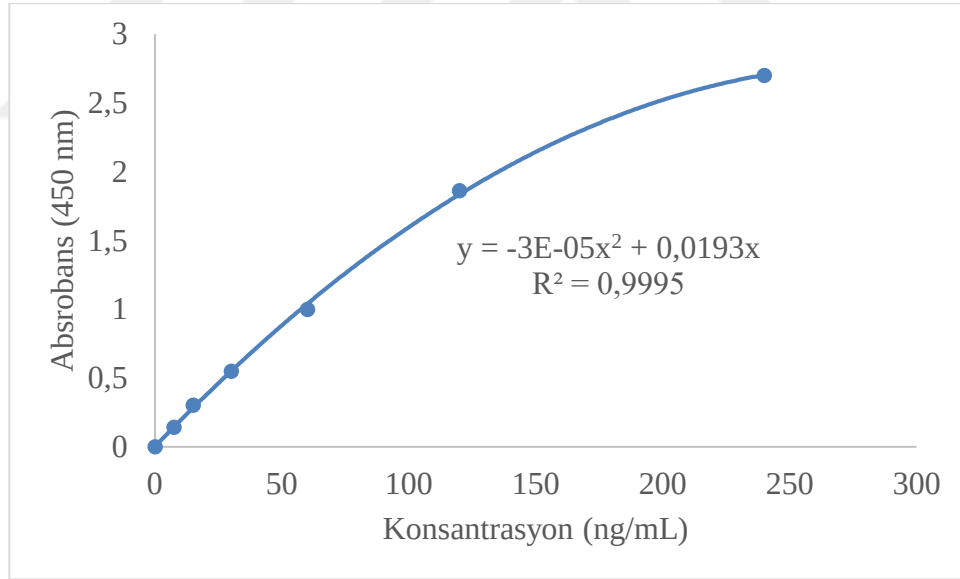
3.5. Biyokimyasal Analiz

Deney sonunda sakrifiye edilen sıçanlardan alınan ovaryum dokuları serum fizyolojikle yıkandı, fazla kan uzaklaştırıldı ve GPX, AMH, SOD, CAT, Malondialdehit (MDA) ve protein tayinlerini gerçekleştirmek için analiz gününe kadar -80°C’de saklandı. Kan örnekleri serum separatörlü jel içeren kan alma tüplerine alındı. Pıhtılaşması için 15 dakika kadar beklendi. 3000xg’de 15 dakika boyunca

santrifüj edildi. Elde edilen serum örnekleri ayrı bir tüpe aktarıldı ve serum AMH seviyelerini ölçmek için analiz gününe kadar -80°C’de saklandı. Analiz gününde doku örneklerinde belirlenen parametreleri ölçmek için, doku üzerine pH 7,4 olan PBS’den 1,5 ml ilave edildi ve el homojenatörü yardımı ile 20 saniye boyunca homojenize edildi. Homojenat 5000 xg’de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlarda istenilen ölçümler gerçekleştirildi.

3.5.1. GPX Aktivite Ölçümü

Üretici firmanın önerilerine uyularak, E1242Ra katalog numaralı ticari ELISA kiti kullanılarak (BT LAB, Zhejiang, China) ovaryum dokularından elde edilen süpernatantlarda GPX aktivitesi belirlendi. Şekil 3’teki grafik kullanılarak ovaryum dokularından elde edilen protein fazlarda toplam GPX aktiviteleri hesaplandı. Sonuçlar ng/mg protein birimiyle ifade edildi.

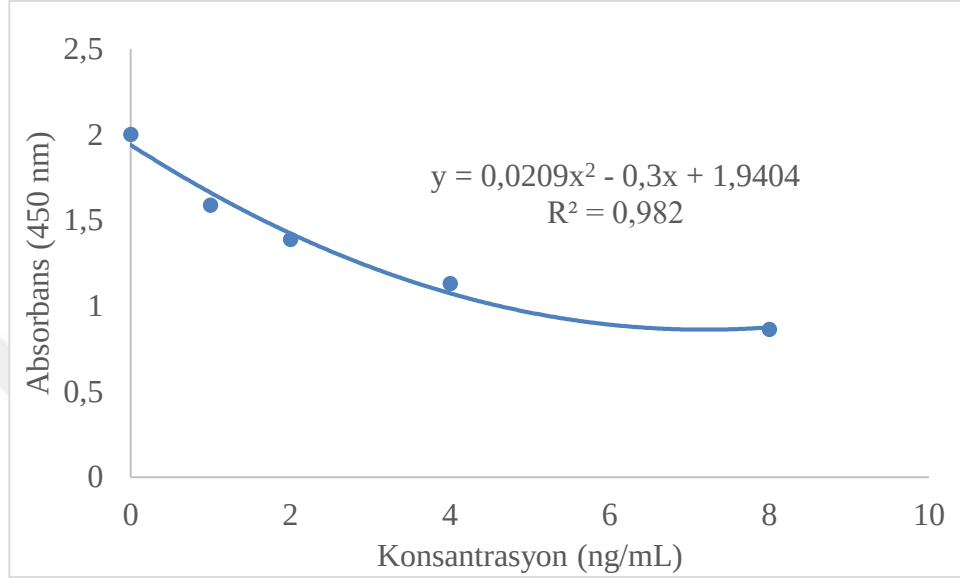


Şekil 3. Ovaryum Dokularında GPX Aktivitesini Hesaplamak İçin Kullanılan Standart Grafiği

3.5.2. AMH Ölçümü

Serum örneklerinde ve ovaryum dokularından elde edilen süpernatantlarda AMH seviyeleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda EA0083Ra katalog numaralı

ticari ELISA kiti kullanılarak (BT LAB, Zhejiang, China) belirlendi. Toplam AMH aktiviteleri ovaryum dokularından elde edilen protein fazlarda Şekil 4’teki standart grafik kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar serum örnekleri için ng/mL, doku örnekleri için ng/mg olarak hesaplandı.



Şekil 4. Ovaryum Dokularında AMH Aktivitesini Hesaplamak İçin Kullanılan Standart Grafiği

3.5.3. SOD Enzim Aktivitesi Ölçümü

SOD enzim aktivitesi Sun ve Oberley’in (118) geliştirdiği yöntem modifiye edilerek belirlendi. Bu yöntem, ksantin-ksantin oksidaz sistemiyle oluşturulan $O_2^{\cdot-}$ ’lerinin nitroblue tetrazoliumu indirgemesi sonucu oluşan mor renkli formazan molekülünün 560 nm’de verdiği absorbansın ölçülmesi esasına dayanan bir yöntemdir. Aşağıda SOD enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan çözeltiler yer almaktadır.

SOD Reaktif Karışımı: 3,65 mg ksantin, 8,93 mg etilendiamintetraasetik asit, 1,01 g Na_2CO_3 , 12 mg BSA tartıldı ve hacmi 156 ml’ye tamamlandı.

2 M $(NH_4)_2SO_4$ Çözeltisi: 2,64 g $(NH_4)_2SO_4$ 10 ml saf suda çözüldü. Ksantin oksidaz enziminin hazırlanmasında kullanıldı.

0.8 mM $CuCl_2$ Çözeltisi: 6,82 mg $CuCl_2$ alındı ve 50 ml deiyonize suda çözüldü. Spektrofotometrik ölçümden hemen önce oluşan reaksiyonu durdurmak için kullanıldı.

167 U/L Ksantin Oksidaz Çözeltisi: 3,3 U/ml'lik orijinal şişeden 101 µl alınıp 2 ml'ye (NH₄)₂SO₄ çözeltisi ile tamamlandı. Günlük hazırlanan ksantin oksidaz çözeltisi kullanılmıştır.

150 µM Nitroblue Tetrazolium Çözeltisi: 4,9 mg nitroblue tetrazolium 40 ml deiyonize suda çözülerek elde edildi. Nitroblue tetrazolium çözeltisinin ışıktan korunması sağlandı.

100 U/ml'lik stok SOD standardından 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 U/ml' lik SOD standartları deiyonize su kullanılarak hazırlandı. Ovaryum dokusunda 2 kat seyreltme yapıldı. SOD aktivitesi ölçümü Tablo 7'ye göre gerçekleştirildi.

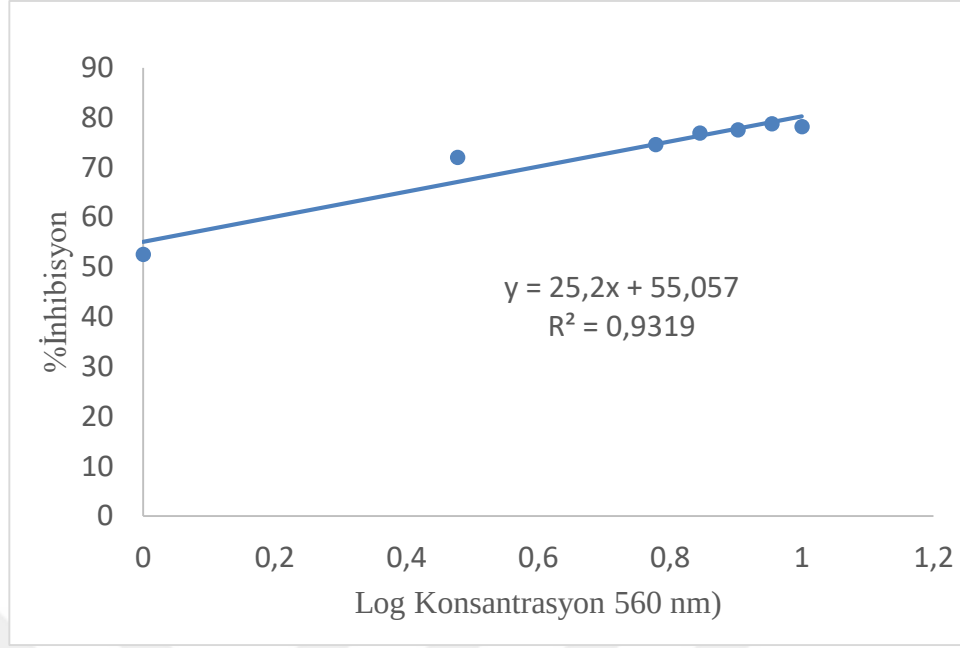
Tablo 7. SOD Aktivitesi Ölçümü İçin Kullanılan Reaktifler ve Miktarları

Reaktifler	Hacim (µl)
Numune, Standart, Kör	200
SOD Reaktif Karışımı	796
Nitroblue Tetrazolium	204
Ksantin Oksidaz	20
25 °C'de 20 dk inkübasyon	
CuCl ₂	400
560 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.	

SOD aktivitesi hesabında kullanılan % inhibisyonu belirlemek için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\% \text{ inhibisyon} = ((Abs \text{ Kör} - Abs \text{ Numune}) \div (Abs \text{ Kör})) \times 100$$

Standart grafiği, % inhibisyona karşılık gelen konsantrasyonların logaritması belirlenerek Şekil 5'te gösterildiği gibi çizildi. Standart grafiğinde belirlenen denklem kullanılarak numunelerin % inhibisyonlarına karşılık gelen SOD aktivitelerinin logaritmik değeri hesaplandıktan sonra bunların anti logaritmaları alınarak numunelerin SOD aktiviteleri hesaplandı. Ovaryum dokularından elde edilen protein fazlarda toplam SOD aktiviteleri Şekil 5'teki standart grafik kullanılarak hesaplandı. Belirlenen SOD aktiviteleri, toplam protein miktarına bölünerek sonuçlar U/mg protein olarak hesaplandı.



Şekil 5. Ovaryum Dokularında SOD Aktivitesini Hesaplamak İçin Kullanılan Standart Grafiği

3.5.4. CAT Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Hidrojen peroksitin oksijen ve suya hidrolizini katalizleyen katalaz aktivitesinin tayininde Aebi (119) metodu modifiye edilerek kullanıldı. Bu metodun esası, H_2O_2 'nin CAT tarafından parçalanması sonucu 240 nm'deki absorbans düşüşüne dayanmaktadır.

Katalaz Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması:

1) 50 mM fosfat tamponu (pH: 7.00): 3,405 g KH_2PO_4 ve 4,45 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 500'er ml saf suda çözüldüler. Bu çözeltiler sırasıyla 1:1,5 oranında karıştırıldı ve pH'sı 7,0'a ayarlandı.

2) % 0,216 lık hidrojen peroksit (H_2O_2): 0,36 ml % 30'luk H_2O_2 alınarak fosfat tamponu ile 50 ml'ye tamamlandı. Günlük hazırlandı. Doku homojenatları 20 kat seyreltildi ve Tablo 8'de belirtildiği gibi pipetleme yapıldı.

Tablo 8: Katalaz Aktivitesi Ölçümü İçin Reaksiyon Karışımı

Reaktifler	Kör (ml)	Numune (ml)
Fosfat tamponu	0.25	-
Numune	0.50	0.50
H ₂ O ₂	-	0.25

Kuartz küvete hidrojen peroksit ilave edilir edilmez 30 saniye boyunca 10 saniye aralıklarla 240 nm'deki absorbanstaki düşüş izlendi. Absorbanstaki düşüş 30 saniye de 0,03 den az 0,2 den fazla olmamasına dikkat edildi. Katalaz aktivitesinde birim olarak birinci derece reaksiyon hız sabiti (k) kullanıldı. 10 saniyelik zaman aralığı için aşağıdaki eşitlikten yararlanılarak aktivite hesaplandı.

A1= Başlangıç absorbans

A2= 10 sn sonraki absorbans

$k = (2.3/10) \times \log (A1/A2) \text{ sn}^{-1}$

3.5.5. MDA Ölçümü

MDA ölçümü Mihara ve Uchiyama yöntemine (120) göre yapıldı. Bu metodun esası, MDA'nın asidik ortamda tiyobarbitürik asitle oluşturduğu rengin 532 nm'de absorbanstasının ölçülmesine dayanmaktadır.

Kullanılan Çözeltiler:

1- %1'lik H₃PO₄ çözeltisi: Bir miktar saf su üzerine 2,94 ml %85'lik H₃PO₄ alındı ve son hacim distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

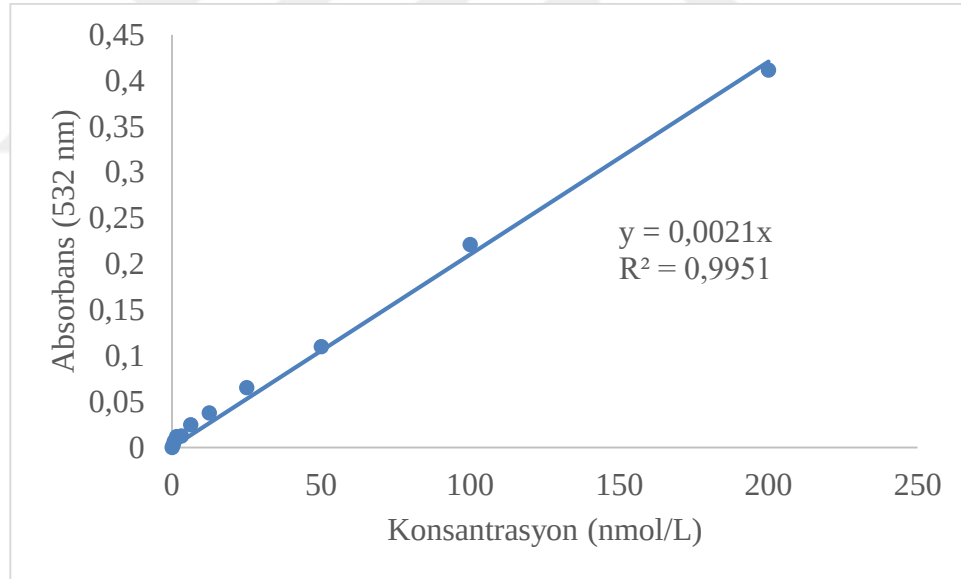
2- %0,67'lik Tiyobarbitürik asit (TBA) çözeltisi: 0,67 g TBA tartıldı ve 50 ml distile suda magnetik bar yardımıyla 30 dakika ısıtılarak karıştırıldı. Bu karışımın üzerine 50 ml asetik asit eklendi.

3- Standart çözeltiler: 8,3 µl tetrametoksipropan 0,01 M HCl çözeltisine eklendi ve 50 °C'de 1 saat inkübe edildi. Bu oluşan 10 µmol/ml'lik ara stok çözeltiden dilüsyonlar yapılarak 50, 40, 30, 20, 10 ve 5 nmol/ml'lik standart çözeltiler hazırlandı.

Tablo 9. Doku MDA Seviyesi Ölçümü İçin Yapılan Reaksiyon Karışımı

Reaktifler	Hacim (µl)
Protein faz, Standart, Kör	200
%1'lik H ₃ PO ₄ Çözeltisi	1200
TBA Çözeltisi	400
100 °C'de 45 dakika inkübasyon	
532 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.	

Tablo 9'da verilen karışım vortekslendi. Ardından 100°C'de etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 4000 rpm'de 10 dk santrifüj yapıldı. Süpernatantlar ELISA pleytine pipetlendikten sonra 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı. Şekil 6'daki standart grafik kullanılarak MDA konsantrasyonu hesaplandı. Sonuçlar ise nmol/g protein olarak hesaplandı.

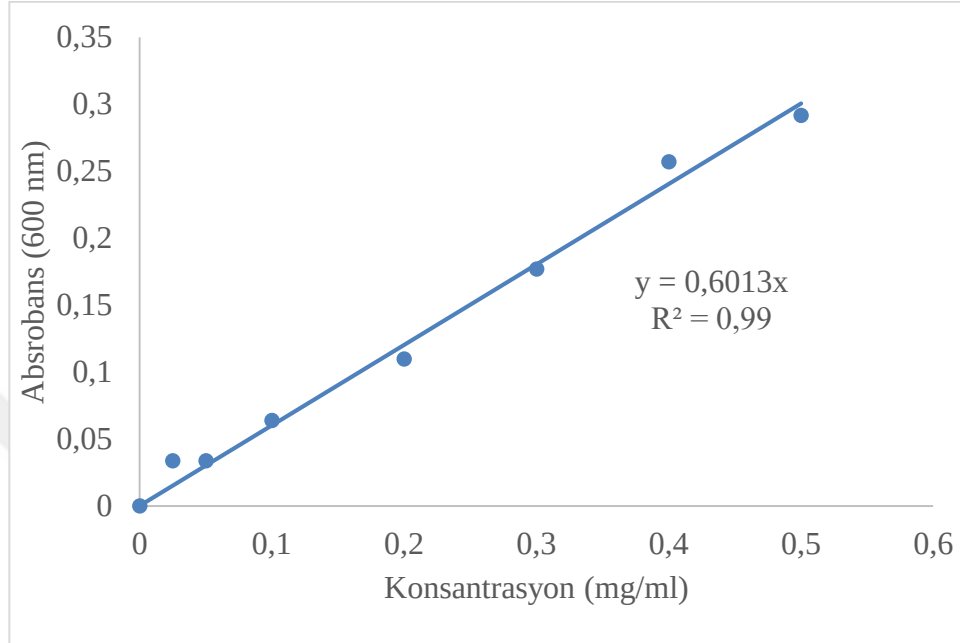


Şekil 6. Ovaryum Dokularında MDA Aktivitesini Hesaplamak İçin Kullanılan Standart Grafiği

3.5.6. Protein Tayini

Elde edilen doku homejenatlarında protein tayini Bradford metodu (121) ile yapıldı. Bu metodun prensibi; organik bir boya olan Coomassie Brilliant Blue G250'nin fosforik asitli ortamda proteinlere bağlanması ve oluşan mavi renkli

kompleksin 600 nm’de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır. Şekil 7’deki standart grafik kullanılarak prtoein konsantrasyonu hesaplandı. Sonuçlar ise mg/ml olarak hesaplandı.



Şekil 7. Ovaryum Dokularında Protein Seviyelerini Hesaplamak İçin Kullanılan Standart Grafiği

3.6. İstatiksel Analiz

Elde ettiğimiz veriler SPSS 23.0 istatistik programına aktarılarak analiz yapıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. Grupları karşılaştırmak için Kruskal Wallis varyans analizi yapıldı. Bonferroni düzeltmeli post hoc olarak Mann Whitney U testi kullanıldı. $P < 0,05$ değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Vücut ve Ovaryum Ağırlıklarına Ait Bulgular

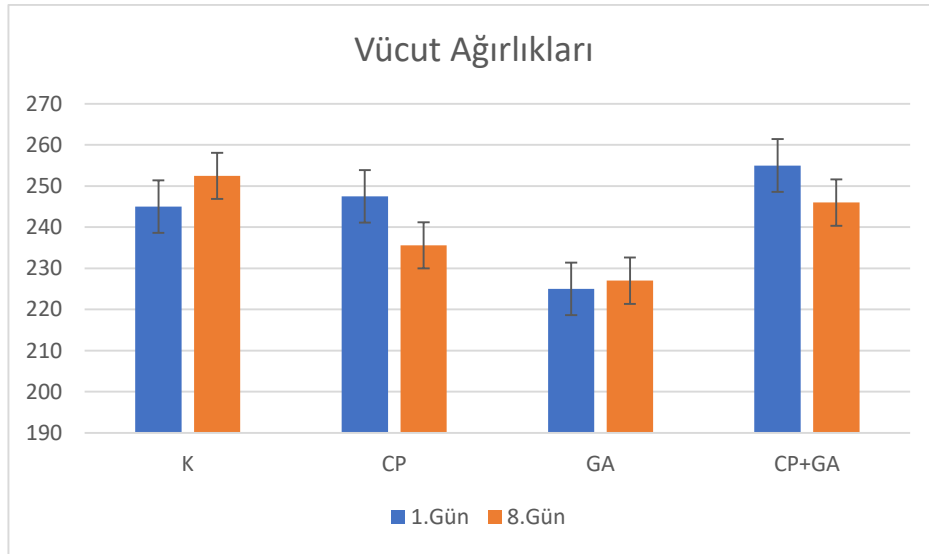
4.1.1. Vücut Ağırlığı Bulguları

Deneyin 1. ve 8. günlerinde ölçülen vücut ağırlıklarının ve ovaryum ağırlıklarının ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 10’da verilmiştir. Sıçanların vücut ağırlıklarının deney sonunda istatistiksel olarak karşılaştırılmasında, gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 8).

Tablo 10. Ağırlık Verilerinin Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

	K Ort±SD	CP Ort± SD	GA Ort± SD	CP+GA Ort± SD
Vücut Ağırlığı 1. gün	245 ± 20	247,5 ± 27,9	225 ± 36,6	255 ± 37
Vücut Ağırlığı 8. gün	252,5 ± 20,7	235,6 ± 31,6	227 ± 15	246 ± 27,3
Ovaryum Ağırlığı	0,073 ± 0,017	0,068 ± 0,019	0,061 ± 0,008	0,061 ± 0,008

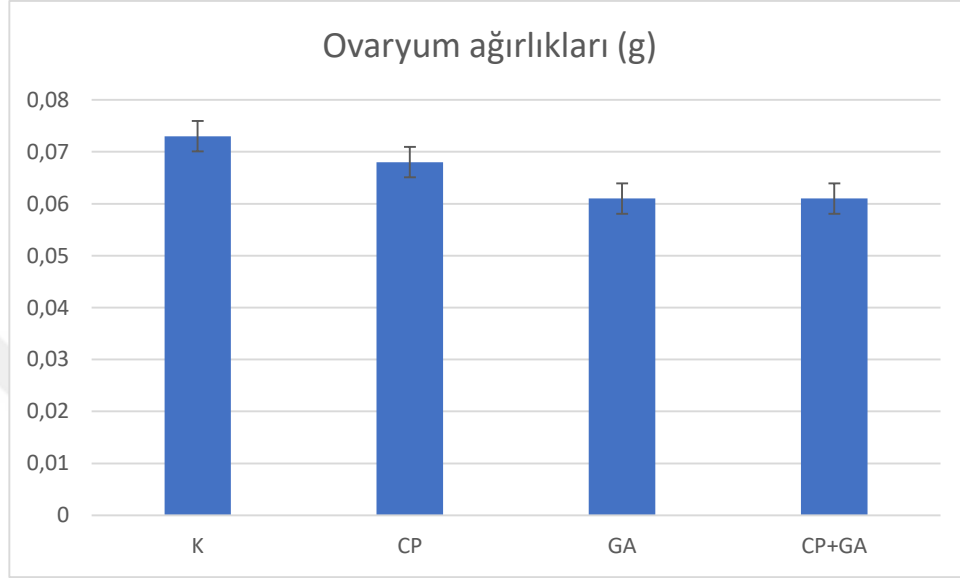
Veriler, ortalama ± standart sapma (Ort.± SD) olarak verilmiştir. K: Kontrol grubu, CP: Siklofosfamid grubu, GA: Gallik asit, CP+GA: Siklofosfamid+Gallik asit



Şekil 8. Deney Gruplarına Ait Vücut Ağırlıkları

4.1.2. Ovaryum Ağırlıkları Bulguları

Sıçanların sağ ovaryum ağırlıkları karşılaştırıldı. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Şekil 9).



Şekil 9. Ovaryum Ağırlıkları

4.2. Morfolojik Bulgular

4.2.1. Folikül Sayısı

Kontrol, CP, GA ve CP+GA gruplarında sağ ovaryumun tamamından 50 µm'de bir örnekleme yapılarak alınan kesitler H&E ile boyanarak folikül sayımı yapıldı. Primordiyal folikül sayılarının istatistiksel değerlendirmesinde CP grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı ($p=0,015$); CP+GA grubunda CP grubuna göre anlamlı olarak arttığı ($p=0,029$) belirlendi. Unilaminar primer folikül sayılarının istatistiksel değerlendirmesinde CP grubunda kontrol ve GA gruplarına göre anlamlı azalma (sırasıyla $p<0,001$, $p=0,008$) görüldü. Yine CP+GA grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı azalma gözlemlendi ($p=0,009$). Multilaminar primer folikül ($p=0,065$), sekonder folikül ($p=0,72$) ve Graaf foliküllerinin ($p=0,44$) istatistiksel değerlendirmesinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı. Atretik folikül sayılarının istatistiksel değerlendirmesinde, CP grubunda kontrol ve GA gruplarına

göre anlamlı artış görüldü (sırasıyla $p<0,001$, $p=0,001$). CP+GA grubunda da kontrol ve GA gruplarına kıyasla yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,009$, $p=0,008$), (Tablo 11, Şekil 10, Şekil 11).

Tablo 11. Gruplardaki Ovaryum Folikül Sayılarının İstatistik Verileri

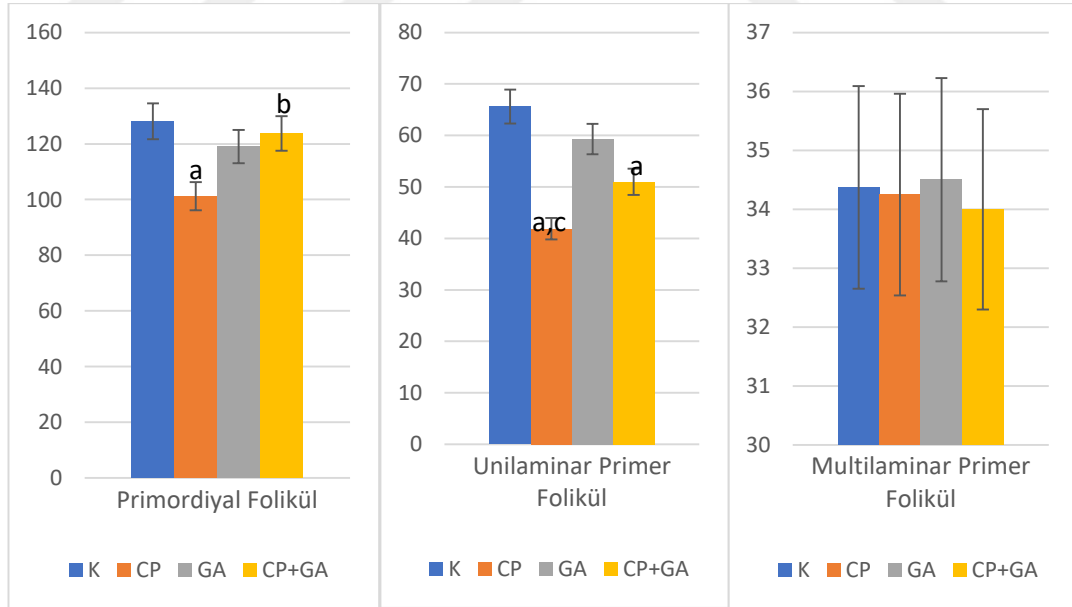
	K Ort± SD	CP Ort± SD	GA Ort± SD	CP+GA Ort± SD
Primordiyal Folikül	128,12 ± 21,37	101,25 ± 14,17 ^a	119 ± 7,48	123,71 ± 18,55 ^b
Unilaminar Primer Folikül	65,62 ± 5,62	41,87 ± 13,06 ^{a,c}	59,3 ± 10,4	51 ± 9,98 ^a
Multilaminar Primer Folikül	34,37 ± 2,77	34,25 ± 4,74	34,5 ± 1,04	34 ± 1,41
Sekonder Folikül	31,37 ± 6,9	29,37 ± 5,8	32,66 ± 5	28,42 ± 3,55
Graaf Folikülü	31,37 ± 5,47	30,75 ± 6,94	31,33 ± 5,08	33,85 ± 2,73
Atretik Folikül	312,75 ± 41,44	438,75 ± 69,33 ^{a,c}	261,83 ± 31,16	397,57 ± 63,66 ^{a,c}

Veriler, ortalama ± standart sapma (Ort.± SD) olarak verilmiştir. K: Kontrol grubu, CP: Siklofosfamid grubu, GA: Gallik asit, CP+GA: Siklofosfamid + Gallik asit

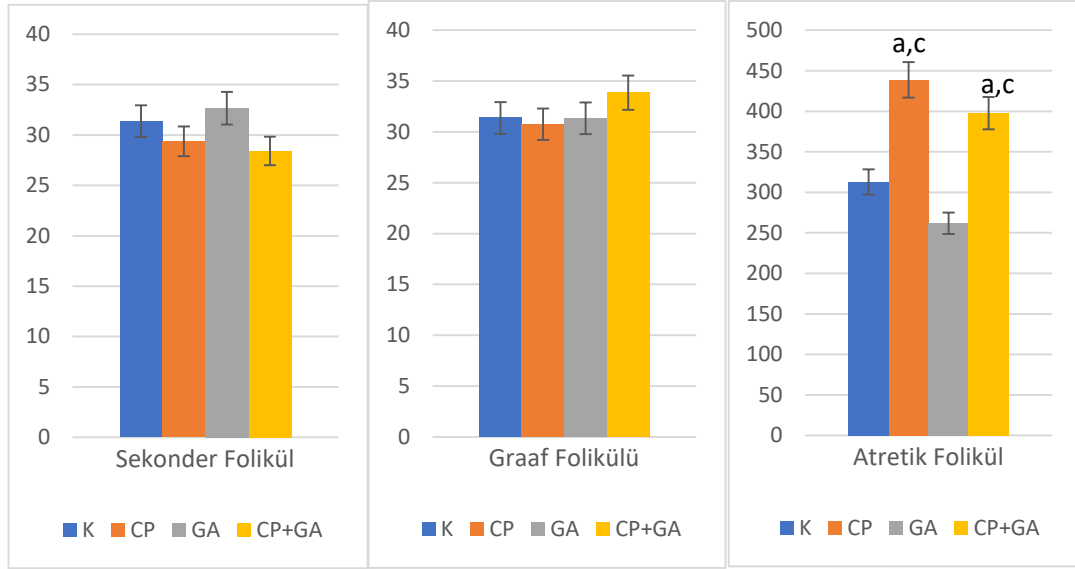
^aK grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)

^bCP grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)

^cGA grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)



Şekil 10. Gruplara Ait Ovaryum Primordiyal Folikül, Unilaminar ve Multilaminar Primer Folikül Sayılarının İstatistiksel Grafiği



Şekil 11. Gruplara Ait Ovaryum Sekonder Folikül, Graaf Folikülü ve Atretik Folikül Sayılarının İstatistiksel Grafiği

4.2.2. Histopatolojik Değerlendirme

Hematoksilen-Eosin Boyalı Kesitlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi

Kontrol grubu kesitlerin değerlendirilmesinde korteks ve medulla normal görünümdeydi. Germinal epitel, folikül hücreleri, teka tabakaları, korpus luteum yapıları normal morfolojideydi (Resim10,11). CP grubunda foliküler hücre dejenerasyonu gözlemlendi (Resim 12,13). CP grubunda foliküler hücre dejenerasyonu kontrol ve GA grubuna göre anlamlı artmıştı ($p<0,001$). CP+GA grubunda foliküler hücre dejenerasyonu, CP grubuna göre anlamlı olarak azalmış bulundu ($p=0,003$). CP+GA grubunda foliküler hücre dejenerasyonu kontrol ve GA grubuna göre anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla $p=0,005$, $p=0,015$), (Resim16-17), (Şekil 12). GA grubu kontrol grubuna benzer morfolojideydi (Resim 14,15). Yarı kantitatif histopatolojik skorlamalarda vasküler konjesyon, korpus luteum etrafında hemoraji, germinal epitel dejenerasyonu, teka tabakasında inceltme açısından gruplar arasında anlamlı fark görülmedi (Tablo 12), (Şekil 13-16). Kontrol, CP, GA, CP+GA gruplarında belirgin bir inflamasyon bulgusu yoktu.

Tablo 12. Histopatolojik Skorlama Ortalamaları

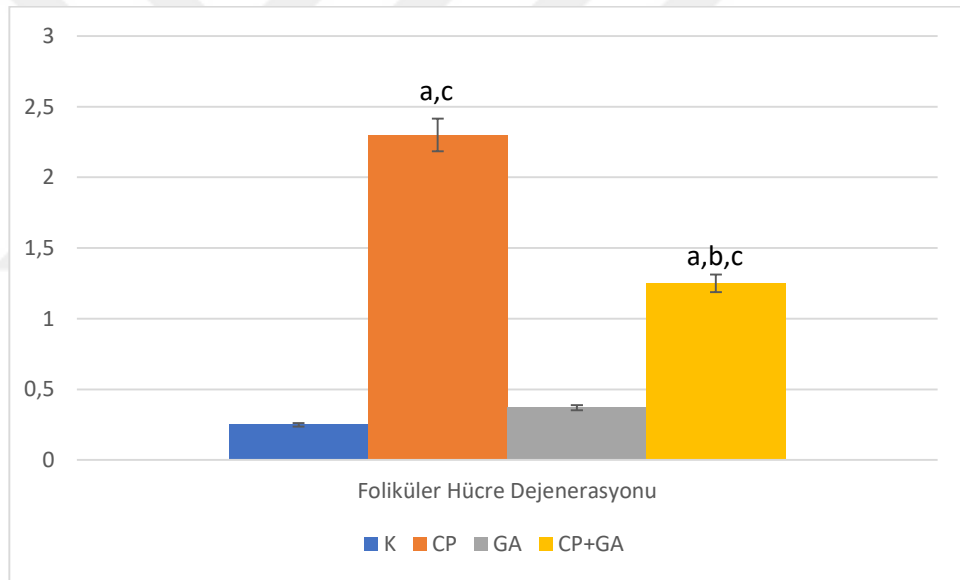
	K Ort± SD	CP Ort± SD	GA Ort± SD	CP+GA Ort± SD
Vasküler konjesyon	1,25±0,46	1,5 ±0,53	1,12±0,35	1,25±0,46
Foliküler Hücre Dejenerasyonu	0,25 ± 0,46	2,3 ± 0,51^{a,c}	0,37 ± 0,51	1,25 ± 0,46^{a,b,c}
Korpus Luteum Etrafında Hemoraji	0,75 ± 0,46	1,25 ± 0,35	1,12 ± 0,35	1,25 ± 0,46
Germinal Epitel Dejenerasyonu	0,87 ± 0,35	1,12 ± 0,35	0,87 ± 0,35	1,12 ± 0,35
Teka Tabakasında İnceleme	0,62 ± 0,51	1,12 ± 0,35	0,62 ± 0,51	1,25 ± 0,46

Veriler, ortalama ± standart sapma (Ort.± SD) olarak verilmiştir. K: Kontrol grubu, CP: Siklofosfamid grubu, GA: Gallik asit, CP+GA: Siklofosfamid + Gallik asit

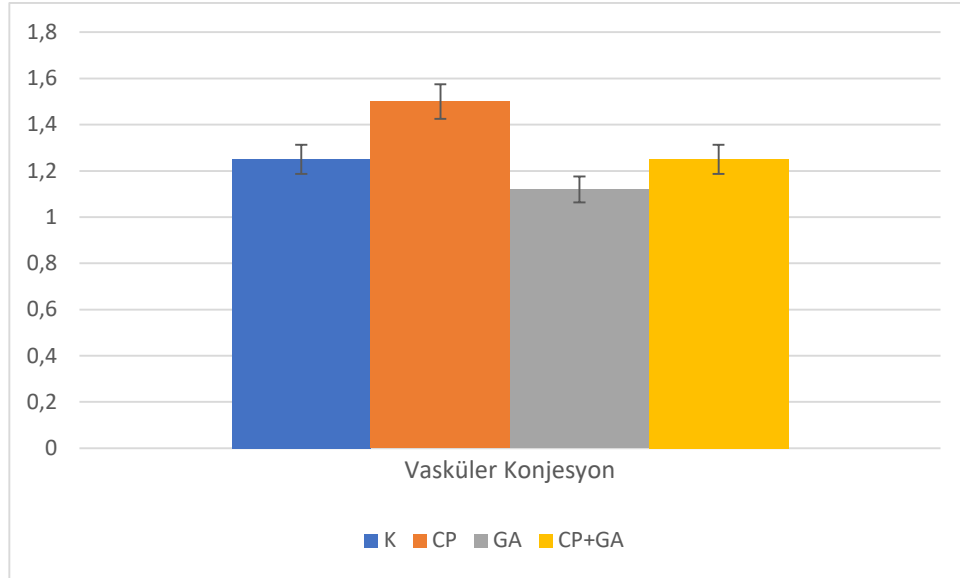
^aK grubuna göre anlamlı (p<0,05)

^bCP grubuna göre anlamlı (p<0,05)

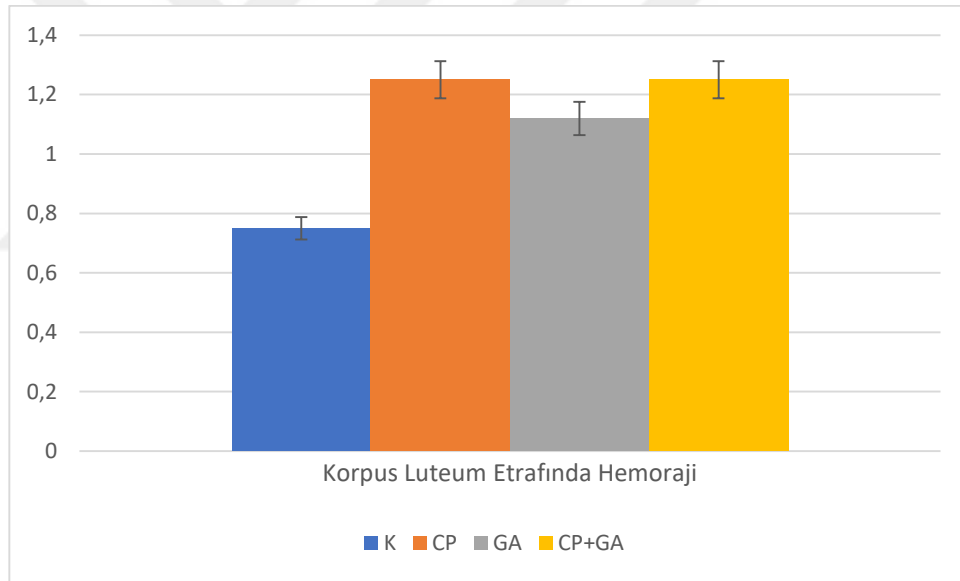
^cGA grubuna göre anlamlı (p<0,05)



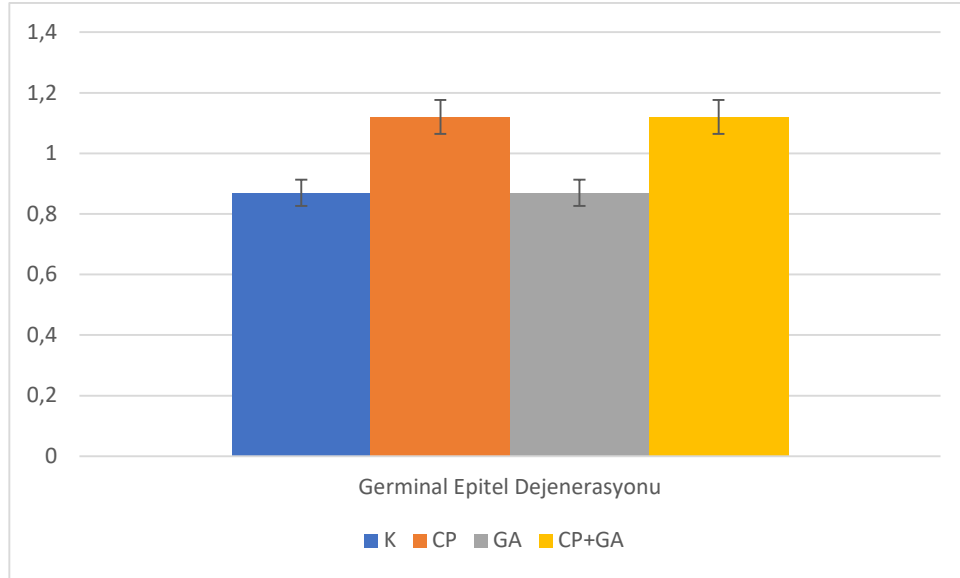
Şekil 12. Gruplara Ait Ovaryum Foliküler Hücre Dejenerasyonu İstatistiksel Grafiği



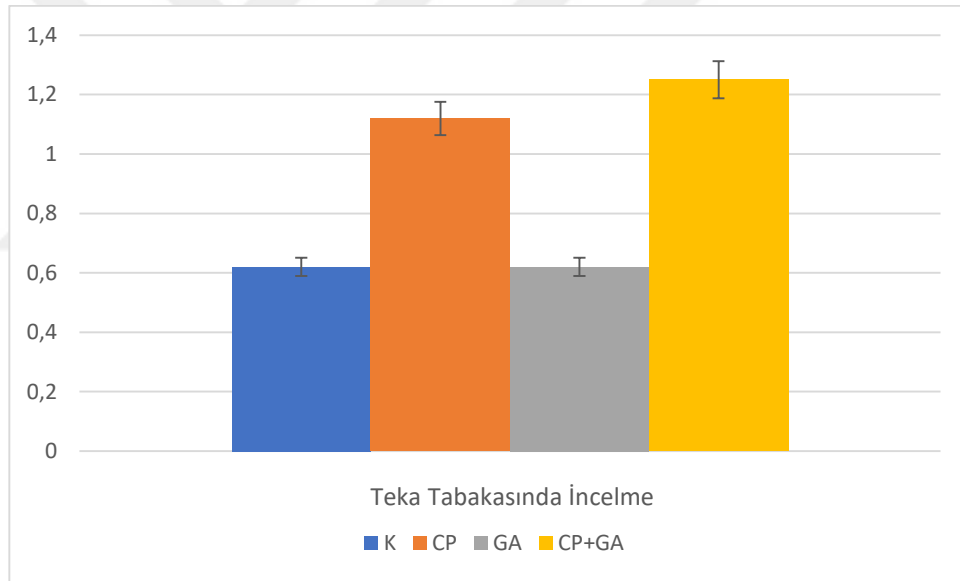
Şekil 13. Gruplara Ait Vasküler Konjesyon İstatistiksel Grafiği



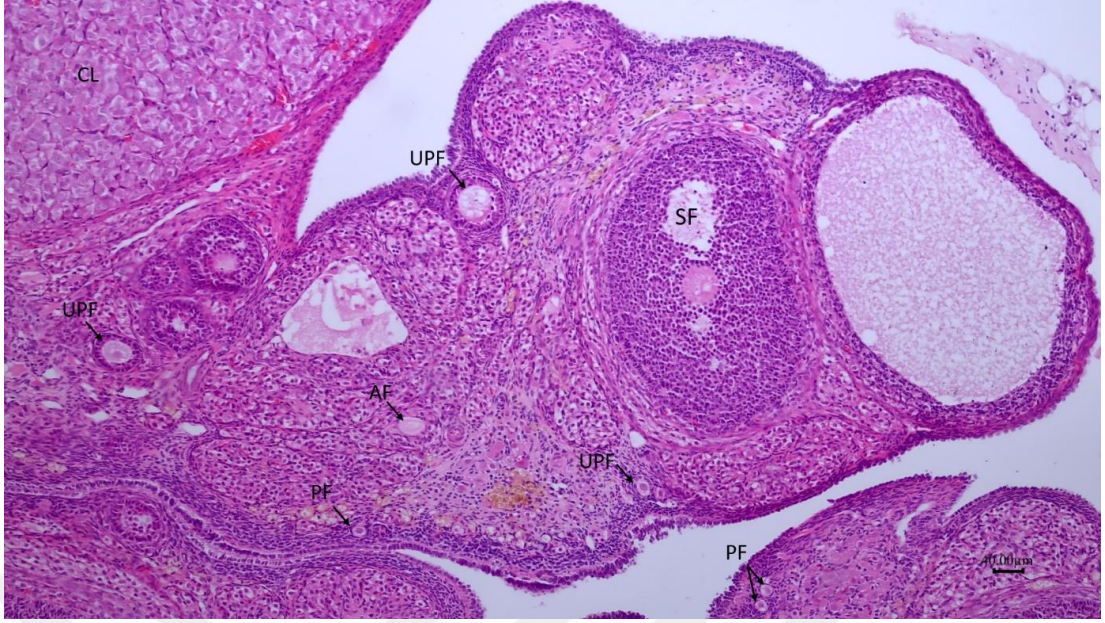
Şekil 14. Gruplara Ait Korpus Luteum Etrafında Hemoraji İstatistiksel Grafiği



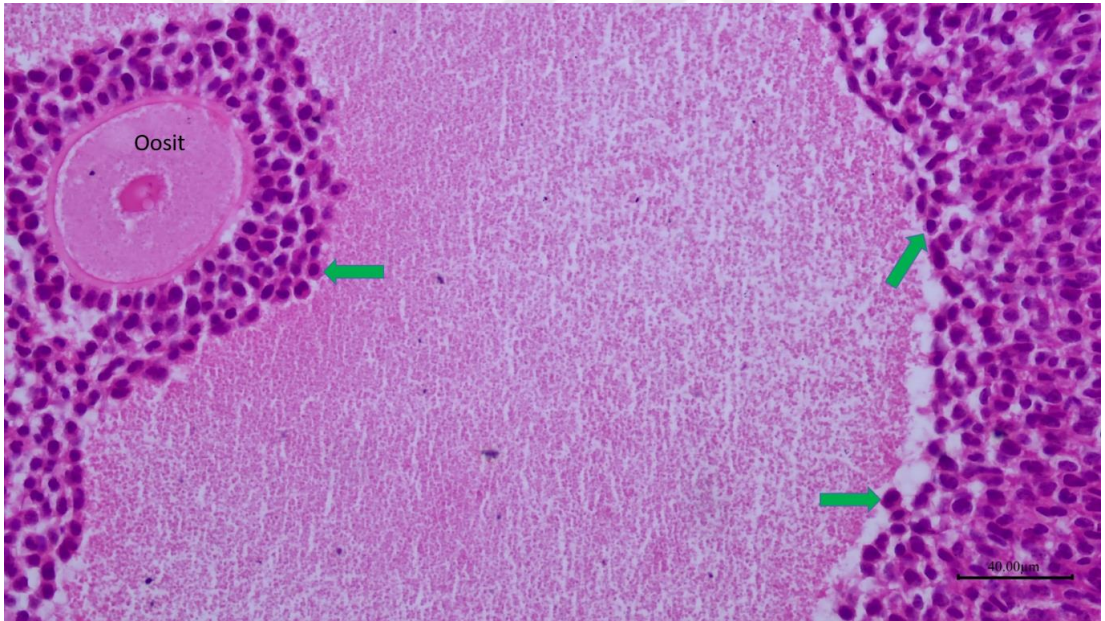
Şekil 15. Gruplara Ait Germinal Epitel Dejenerasyonu İstatistiksel Grafiği



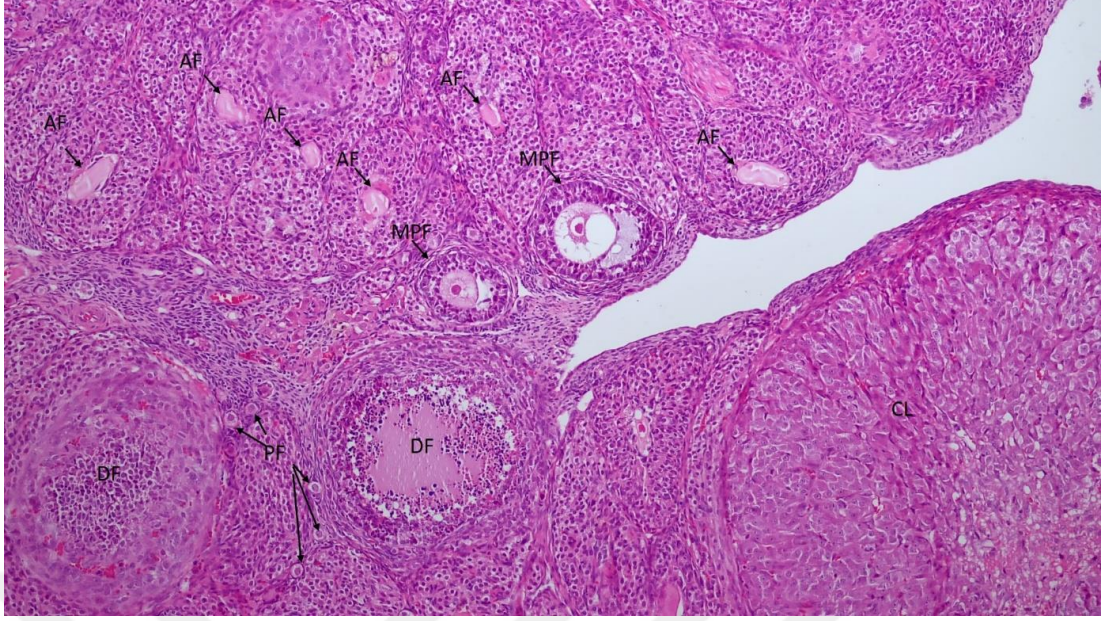
Şekil 16. Gruplara Ait Teka Tabakasında İncelme İstatistiksel Grafiği



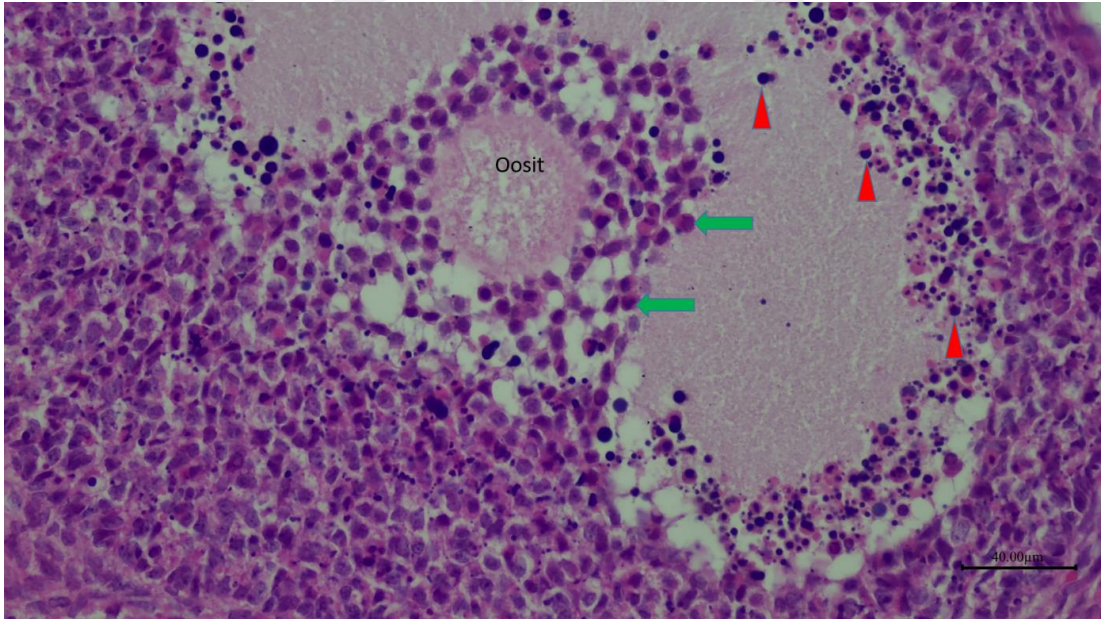
Resim 10. Kontrol Grubu (H&E, X100), Primordiyal folikül (PF), Unilaminar primer folikül (UPF), Sekonder folikül (sf), atretik folikül (AF), Korpus luteum (CL)



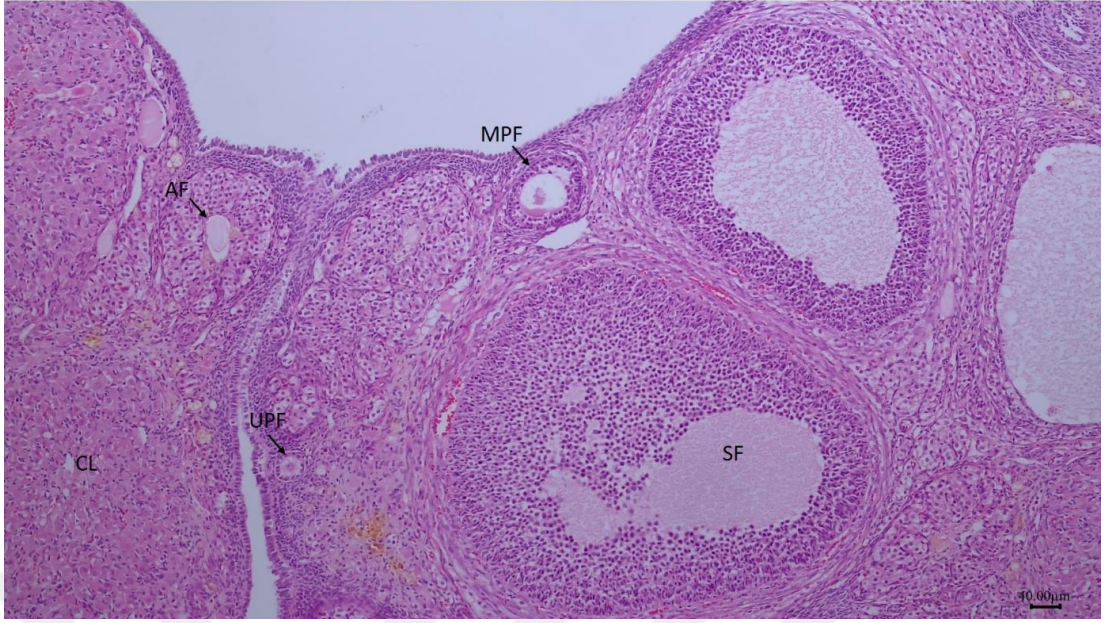
Resim 11. Kontrol Grubu (H&E, X400), Yeşil Ok: Granüloza hücresi



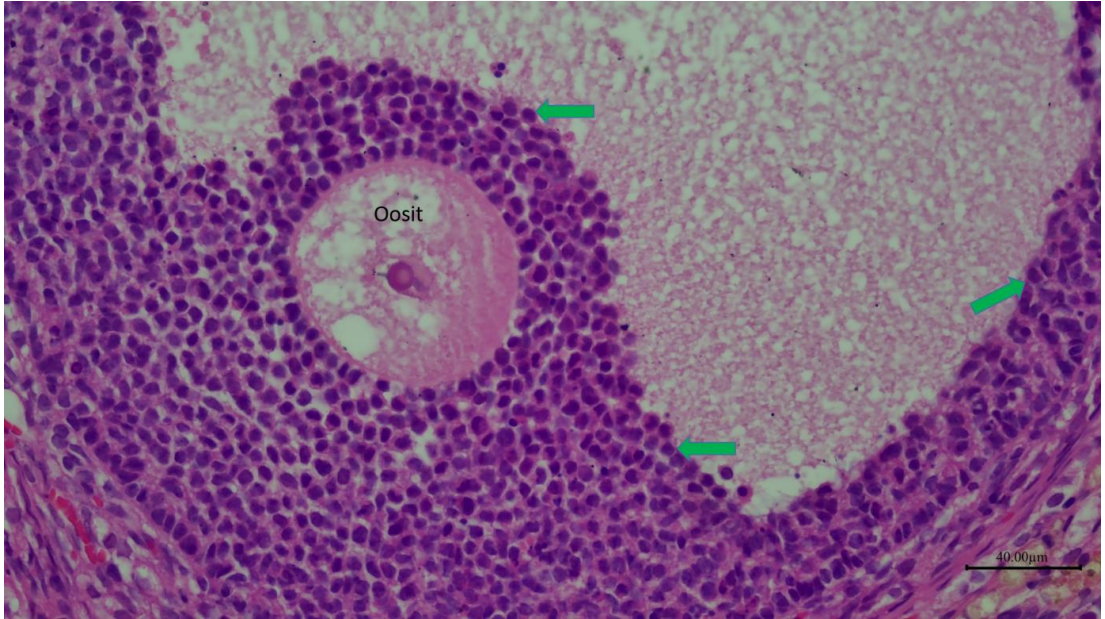
Resim 12. CP Grubu (H&E, X100), Primordiyal folikül (PF), Multilaminar primer folikül (MPF), Atretik folikül (af), dejeneratif folikül (DF), Korpus luteum (CL)



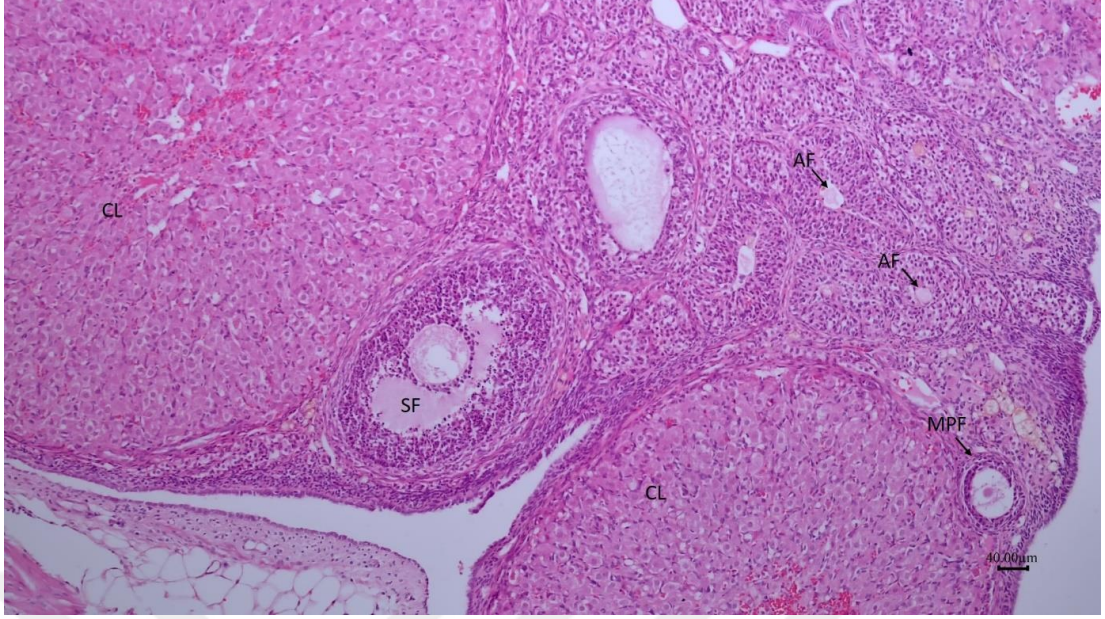
Resim 13. CP Grubu (H&E, X400), Kırmızı ok başı: Dejenere Hücre, yeşil ok: granüloza hücresi



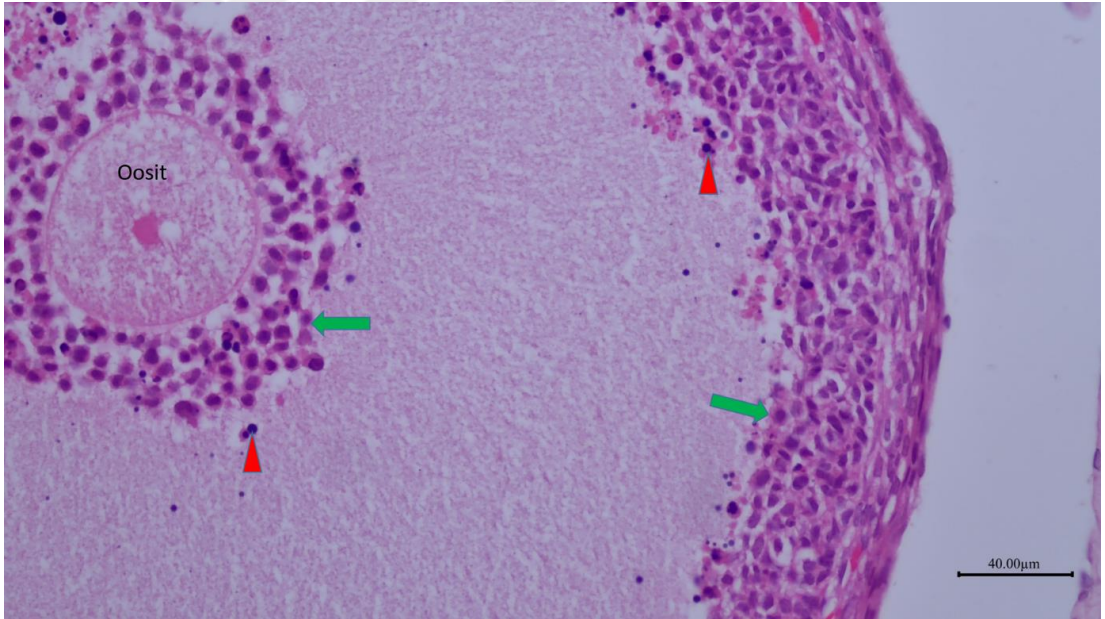
Resim 14. GA Grubu (H&E, X100), Unilaminar primer folikül (UPF), Multilaminar primer folikül (MPF), Sekonder folikül (SF), Atretik folikül (AF), Korpus luteum (CL).



Resim 15. GA Grubu (H&E, X400), Yeşil ok: Granüloza hücresi



Resim 16. CP+GA Grubu (H&E, X100), Multilaminar primer folikül (MPF), Sekonder folikül (SF), Atretik folikül (AF), Korpus luteum (CL)

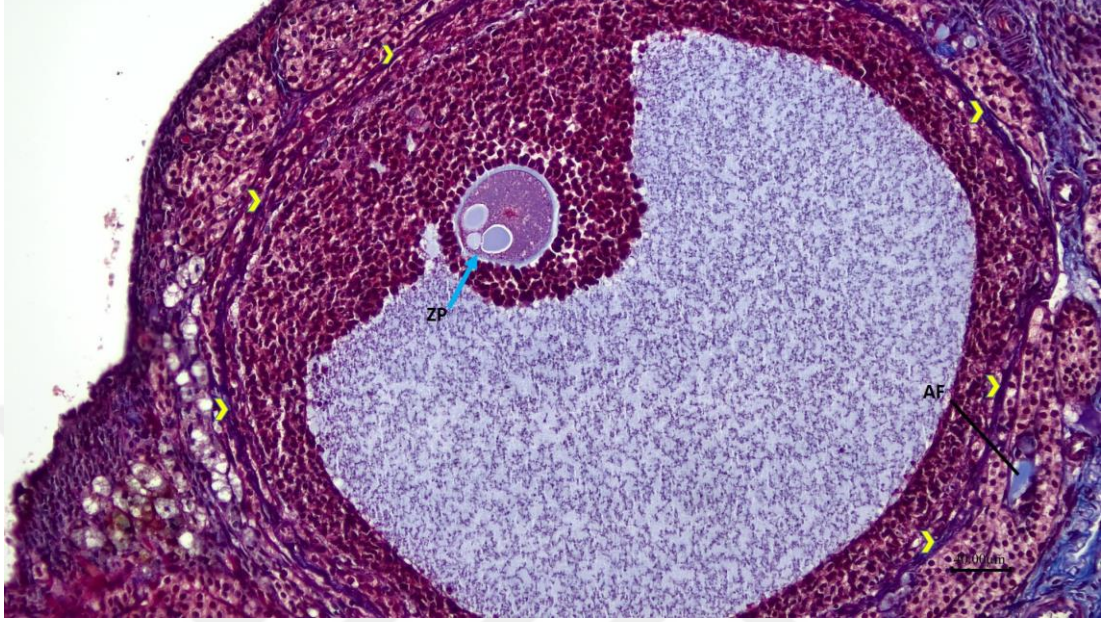


Resim 17. CP+GA Grubu (H&E, X400), Kırmızı ok başı: Dejenere hücre, Yeşil ok: Granüloza hücresi

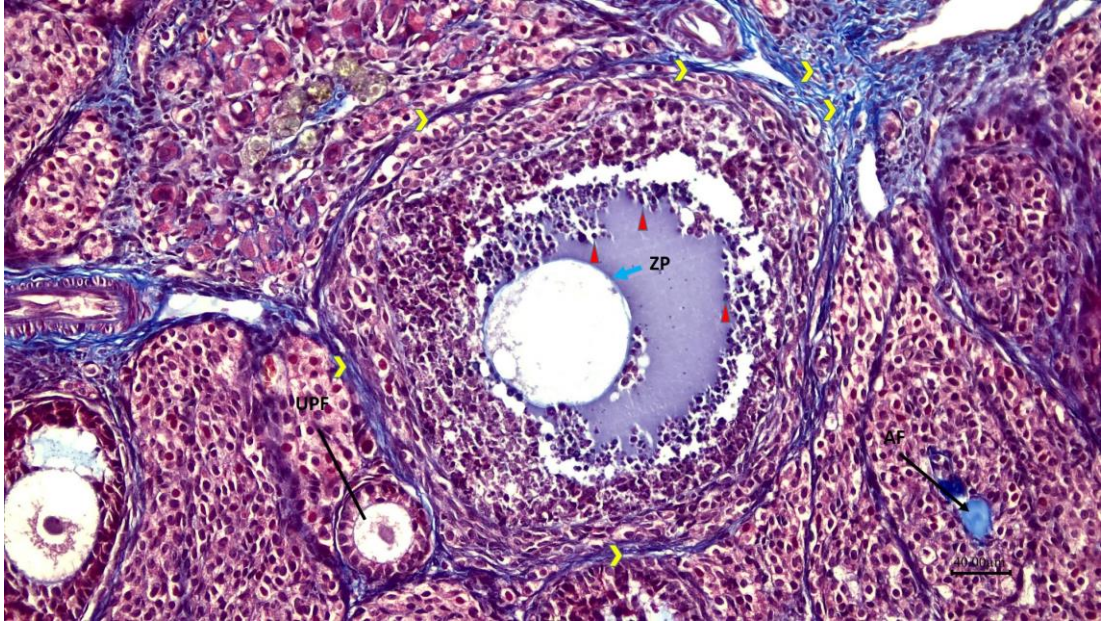
Masson Trikrom Boyalı Kesitlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi

Masson trikrom boyası ile boyanan ovaryum kesitlerinin ışık mikroskop altında yapılan değerlendirmesinde bağ dokusu yapısı ve kollajen yoğunluğu tüm gruplarda benzer özellikteydi. Fibrozis açısından yapılan değerlendirmelerde de gruplar arasında

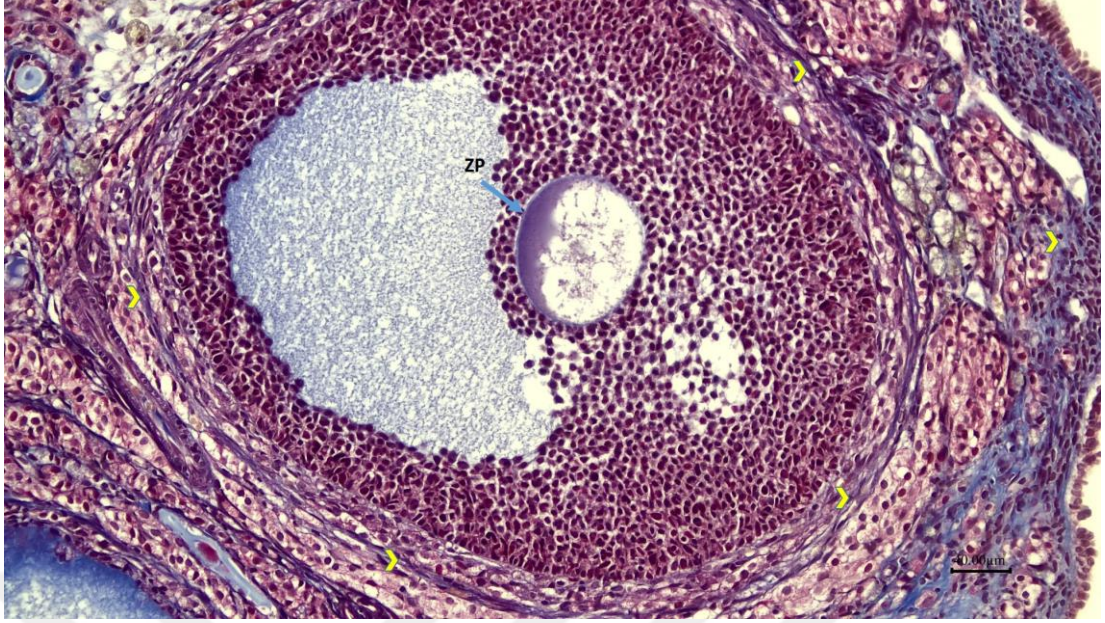
fark izlenmedi (Resim 18-21). CP grubunda foliküller içinde dejenere hücreler görüldü.



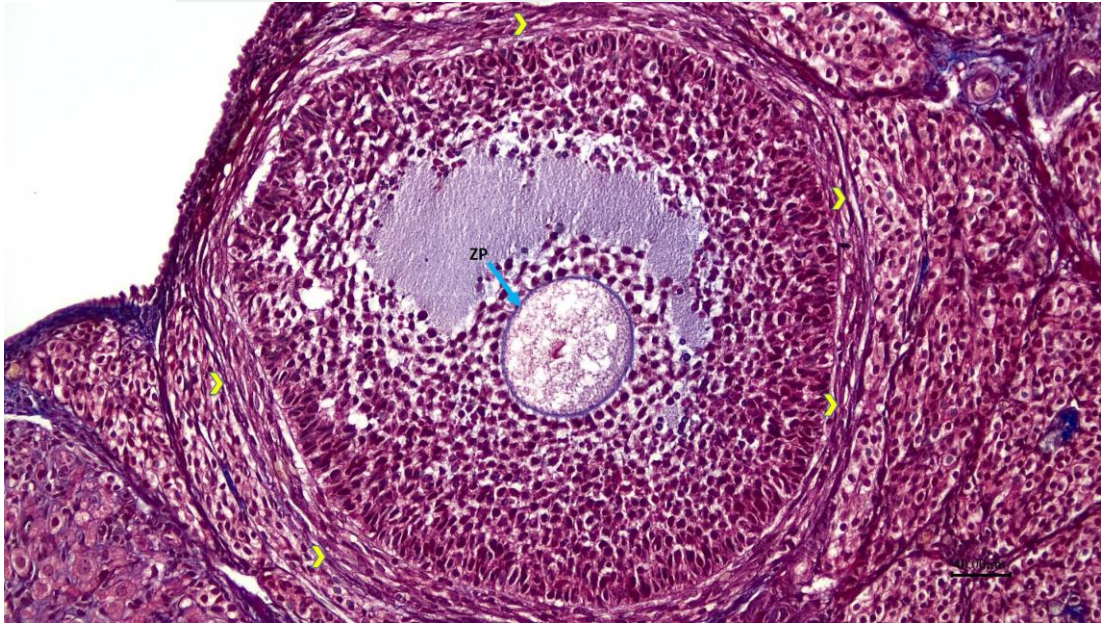
Resim 18. Kontrol Grubu (Masson Trikrom, X 200). Sarı çentikli ok başı: Bağ dokusu, Mavi ok: (ZP) Zona pellusida



Resim 19. CP Grubu (Masson Trikrom, X 200). Kırmızı ok başı: Dejenere hücre, Sarı çentikli ok başı: Bağ dokusu, UPF: Unilaminar primer folikül, Mavi ok: (ZP) Zona pellusida



Resim 20. GA grubu (Masson Trikrom, X200). Sarı çentikli ok başı: Bağ dokusu, Mavi ok: (ZP) Zona pellusida

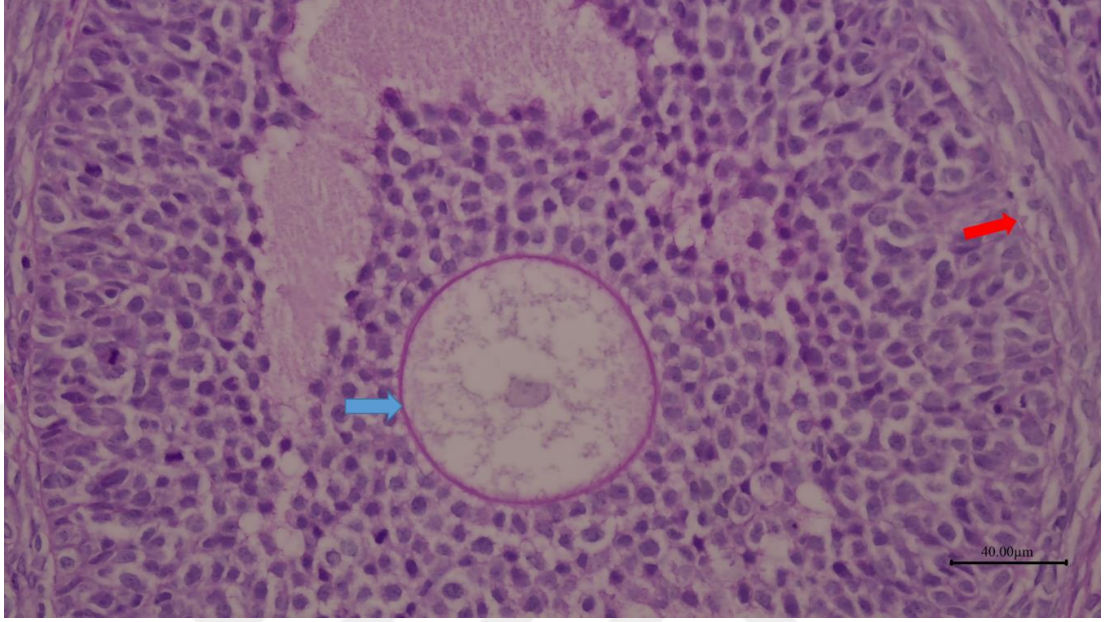


Resim 21. CP+GA Grubu (Masson Trikrom, X 200). Sarı çentikli ok başı: Bağ dokusu, Mavi ok: (ZP) Zona pellusida

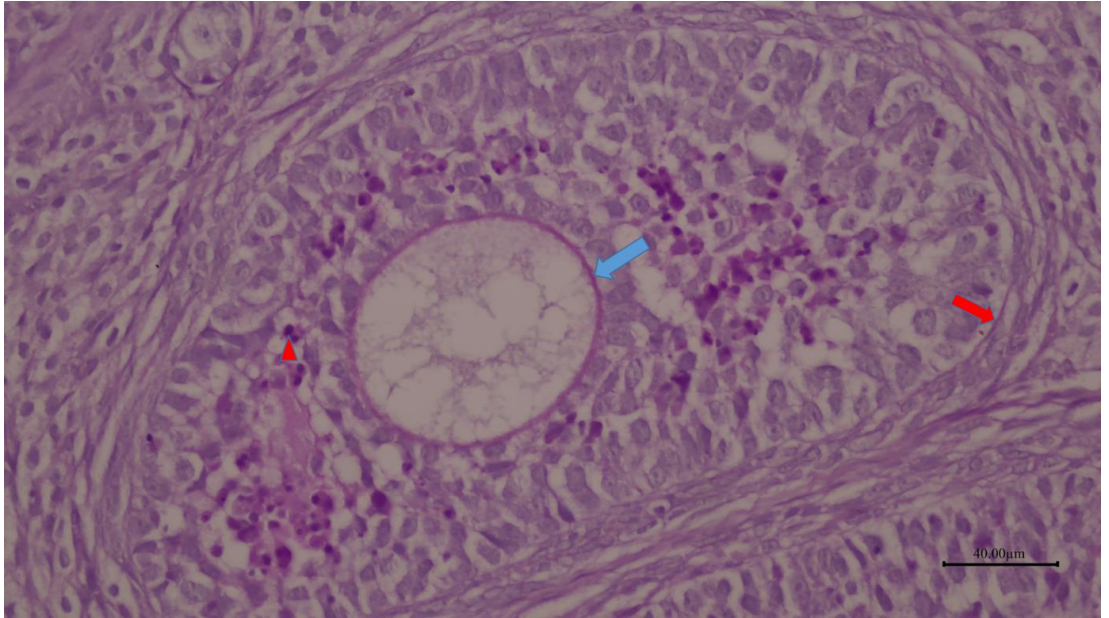
Periyodik Asit-Schiff Boyalı Kesitlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi

Periyodik Asit-Schiff boyası ile boyanan kesitlerde gruplarda bazal membran ve zona pellusida değerlendirildi. Bütün gruplarda zona pellusida yapısı normaldi.

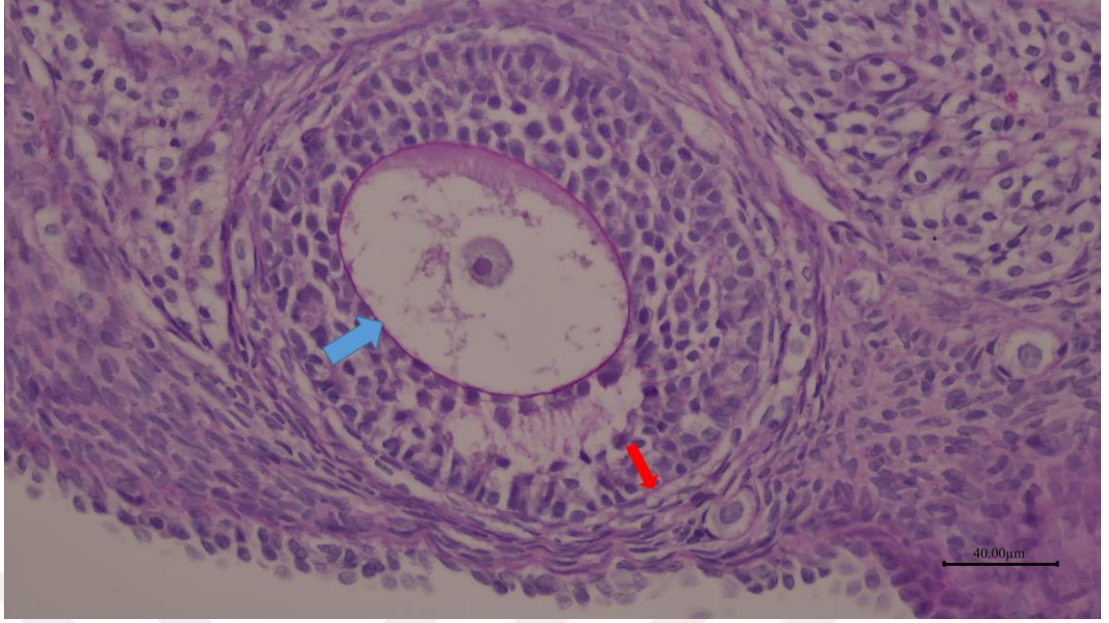
Folikülleri çevreleyen bazal membranın PAS (+)'liği tüm gruplarda aynı yoğunlukta izlendi. Gruplar arasında farklılık izlenmedi (Resim 22-25).



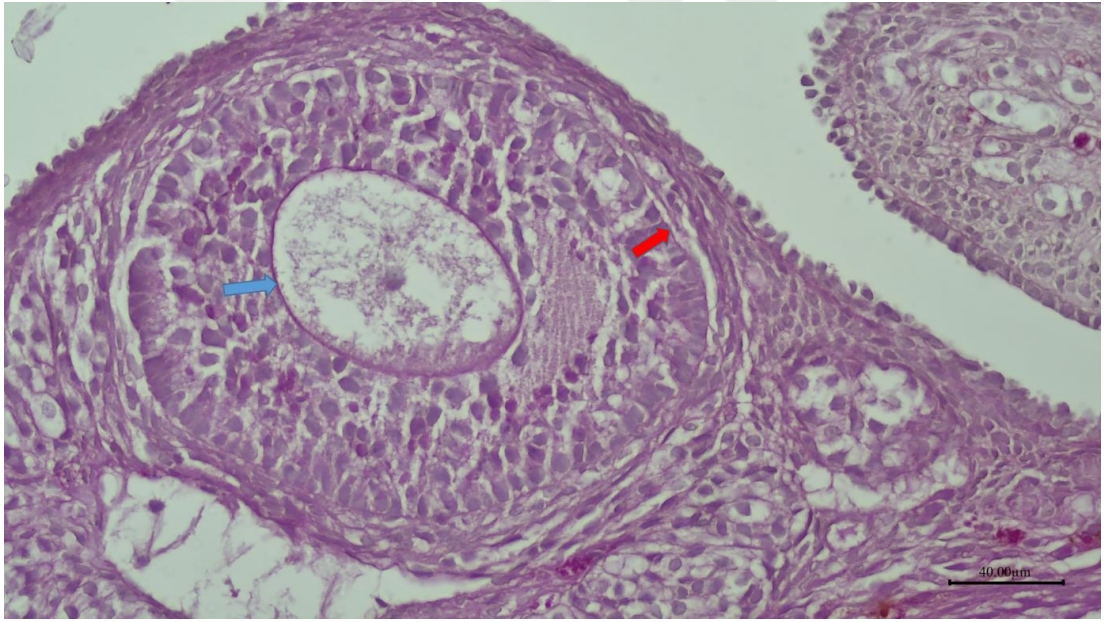
Resim 22. Kontrol Grubu (PAS, X400), Mavi ok: Zona pellusida intakt, Kırmızı ok: Bazal membran



Resim 23. CP Grubu (PAS, X400), Mavi ok: Zona pellusida intakt, Kırmızı ok başı: Dejenere hücre, Kırmızı ok: Bazal membran



Resim 24. GA Grubu (PAS, X400), Mavi ok: Zona pellusida intakt, Kırmızı ok: Bazal membran



Resim 25. CP+GA Grubu (PAS, X400), Mavi ok: Zona pellusida intakt, Kırmızı ok: Bazal membran

4.2.3. Apoptotik İndeks

TUNEL boyalı preparatlarda Aİ hesaplandı. CP grubunda Aİ'nin kontrol grubuna göre anlamlı arttığı görüldü ($p=0,032$). CP+GA grubunda CP grubuna göre

Aİ'de anlamlı azalma görüldü ($p=0,032$), (Şekil 17), (Tablo 13). Kontrol, CP, GA ve GA+CP gruplarına ait apoptotik ve normal hücreler gösterildi (Resim 26-29).

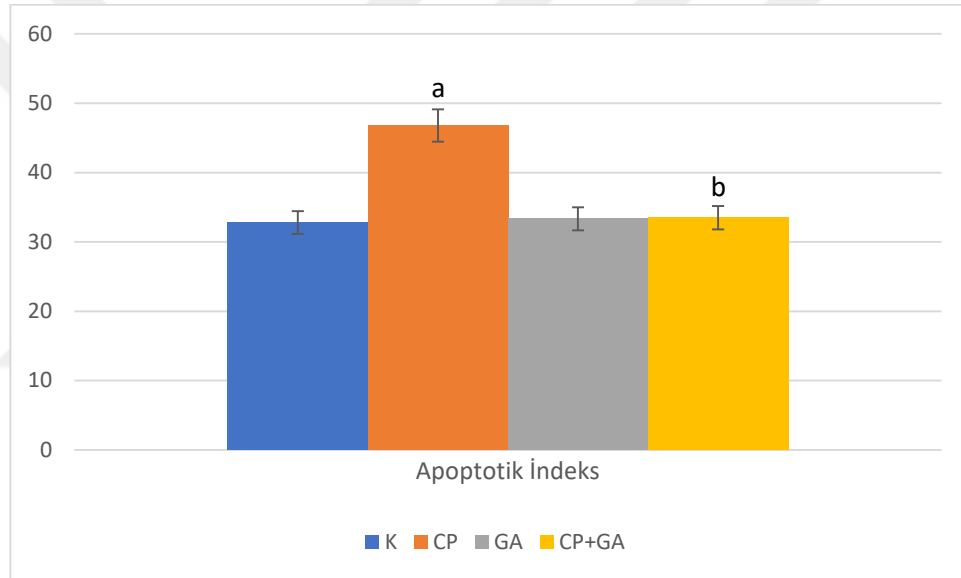
Tablo 13. Grupların Apoptotik Hücre Oranları (%)

	K Ort± SD	CP Ort± SD	GA Ort± SD	CP+GA Ort± SD
APOPTOTİK İNDEKS (%)	32,78 ± 3,57	46,8 ± 8,66^a	33,34 ± 9,03	33,48 ± 6,79^b

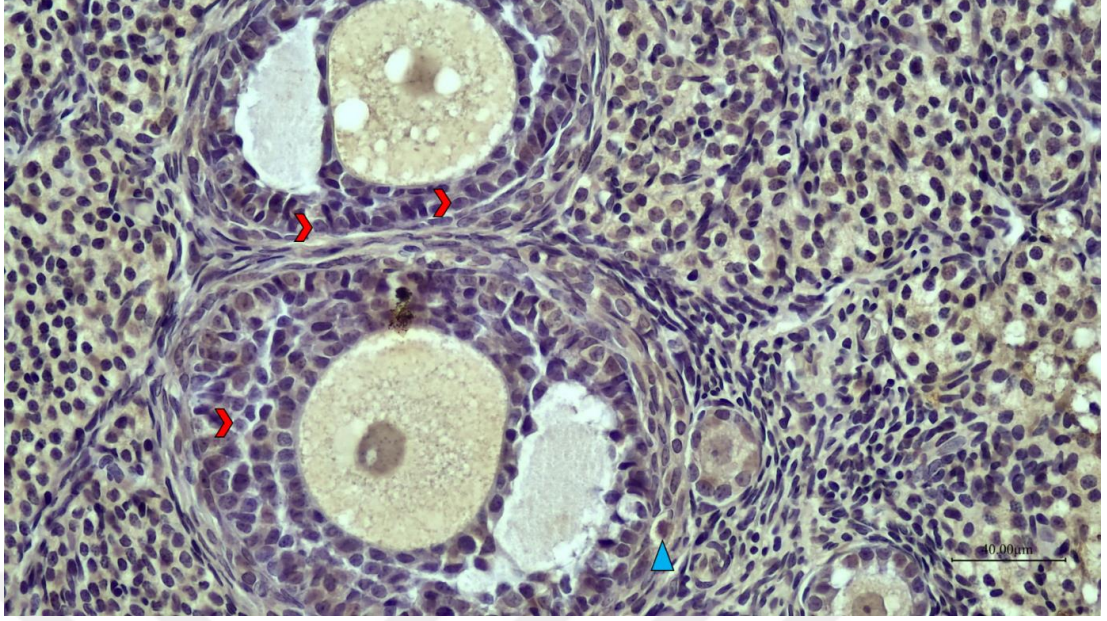
Veriler, ortalama ± standart sapma (Ort.± SD) olarak verilmiştir. K: Kontrol grubu, CP: Siklofosfamid grubu, GA: Gallik asit, CP+GA: Siklofosfamid + Gallik asit

^aK grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)

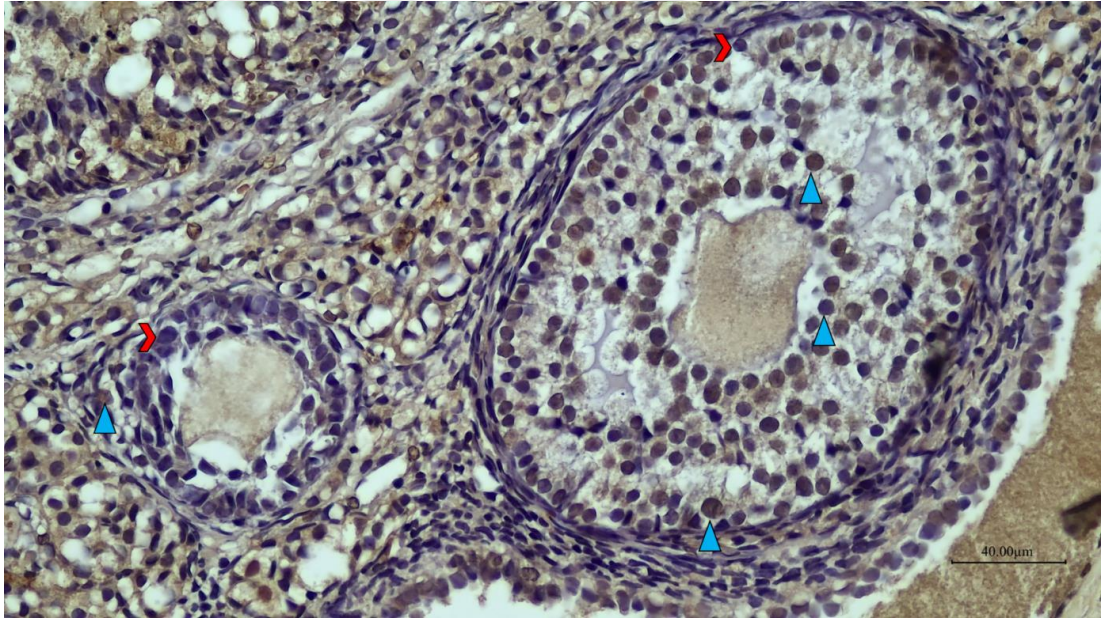
^bCP grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)



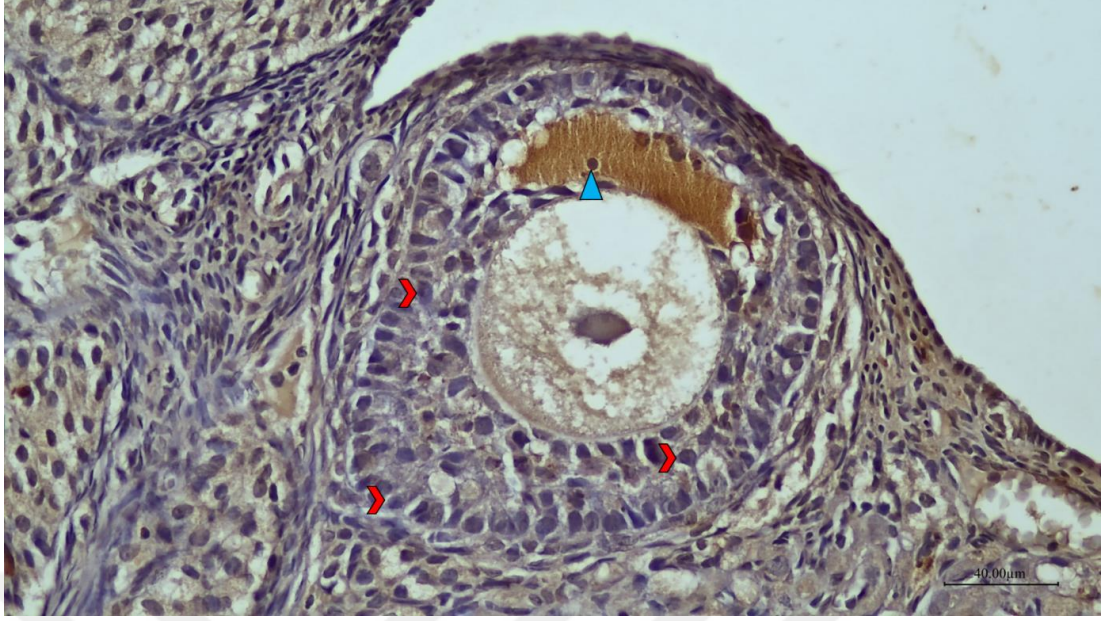
Şekil 17. Grupların Apoptotik İndeks Seviyeleri



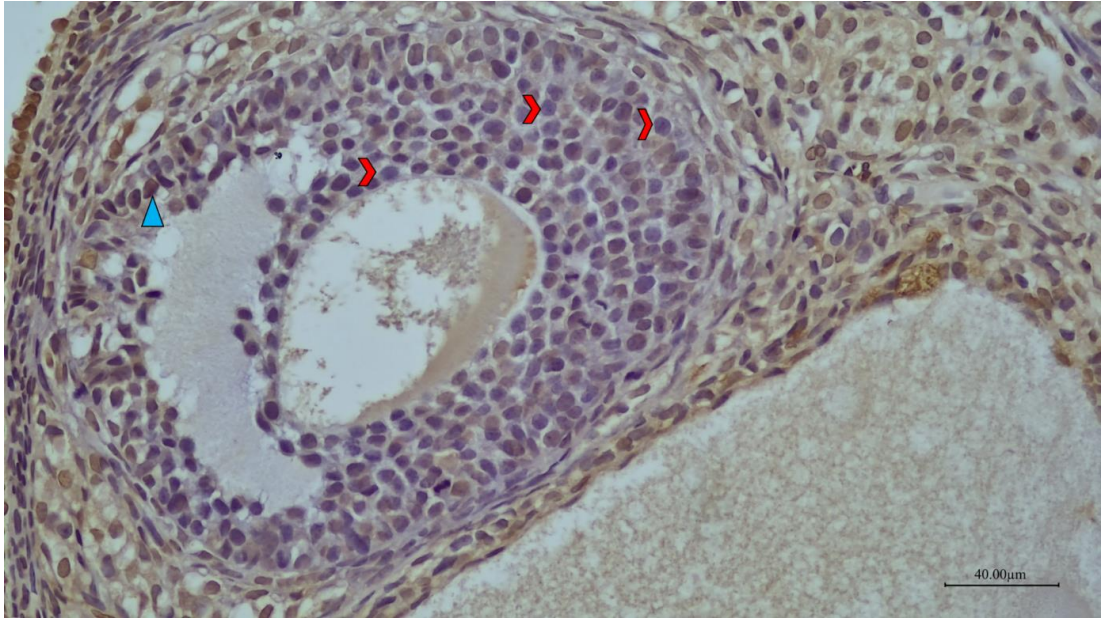
Resim 26. Kontrol Grubu (TUNEL, X400), Kırmızı çentikli ok başı: Normal hücre, Mavi ok başı: Apoptotik hücre



Resim 27. CP Grubu (TUNEL, X400), Kırmızı çentikli ok başı: Normal hücre, Mavi ok başı: Apoptotik hücre



Resim 28. GA Grubu (TUNEL, X400), Kırmızı çentikli ok başı: Normal hücre, Mavi ok başı: Apoptotik hücre



Resim 29. CP+GA Grubu (TUNEL, X400), Kırmızı çentikli ok başı: Normal hücre, Mavi ok başı: Apoptotik hücre

4.3. Biyokimyasal Parametrelere Ait Bulgular

4.3.1. Doku Biyokimyası

Deney gruplarından alınan ovaryum doku örneklerinde MDA, SOD, GPX, CAT, AMH çalışılmış ve sonuçlara ilişkin bilgiler Tablo 14’te verilmiştir. Yapılan biyokimyasal incelemeler sonucunda CP grubunda MDA’nın kontrol ve GA gruplarına göre arttığı görüldü (sırasıyla $p=0,003$, $p=0,001$). CP+GA grubunda MDA seviyesi CP grubuna göre azalmıştı ($p=0,002$), (Şekil 18). Doku SOD aktivitesi; CP grubunda kontrol ve GA gruplarına göre anlamlı olarak azaldı ($p=0,003$). CP+GA grubunda ise SOD aktivitesi CP grubuna göre anlamlı artmış olup kontrol grubuyla benzer seviyedeydi ($p=0,006$), (Şekil 19). Doku GPX değerlerinde gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı (Şekil 20). Doku CAT aktivitesi, CP grubunda kontrol grubuna göre anlamlı azalış gösterdi ($p=0,038$). CP+GA grubunda CAT aktivitesi K ve CP grubuna göre anlamlı artmıştı ($p<0,001$). GA grubunda CAT aktivitesi K ve CP grubuna göre anlamlı artmıştı ($p=0,001$), (Şekil 21). Doku AMH değerleri CP grubunda K grubuna göre anlamlı olarak azaldı ($p=0,015$), (Şekil 22).

Tablo 14. Doku Biyokimya Verileri

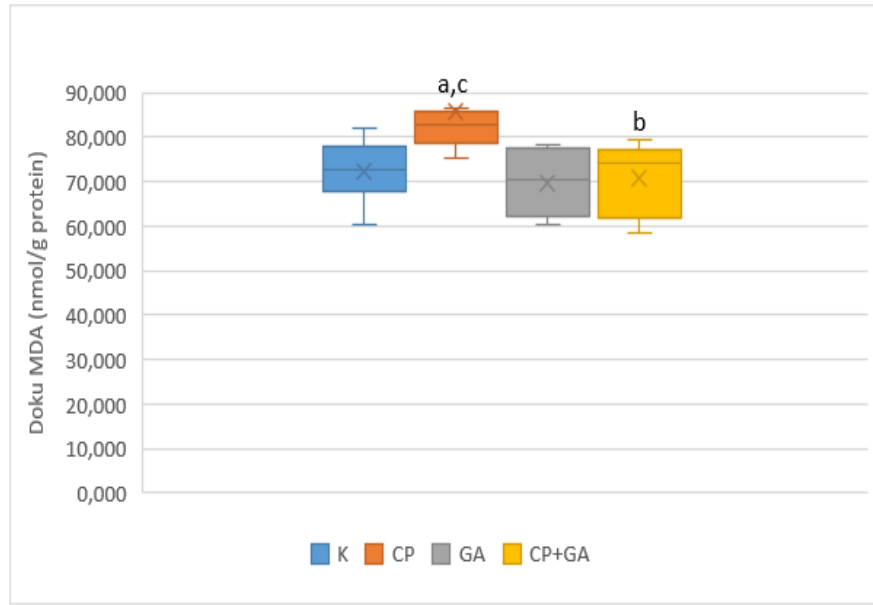
	K Ort± SD	CP Ort± SD	GA Ort± SD	CP+GA Ort± SD
Doku MDA (nmol/g protein)	72,33 ± 7,26	85,65 ± 12,9 ^{a,c}	69,7 ± 7,24	70,6 ± 8,1 ^b
Doku SOD (U/mg protein)	10,1 ± 1,8	8,4 ± 0,8 ^{a,c}	10,9 ± 1,6	10 ± 0,5 ^b
Doku GPX (ng/mg protein)	7,2 ± 1,3	7 ± 0,9	7,9 ± 1,4	6,9 ± 0,7
Doku CAT (k/g protein)	0,26 ± 0,03	0,2 ± 0,06 ^a	0,4 ± 0,07 ^{a,b}	0,4 ± 0,04 ^{a,b}
Doku AMH (ng/mg protein)	0,23 ± 0,06	0,15 ± 0,03 ^a	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,02

Veriler, ortalama ± standart sapma (Ort.± SD) olarak verilmiştir. K: Kontrol grubu, CP: Siklofosfamid grubu, GA: Gallik asit, CP+GA: Siklofosfamid+Gallik asit grubu

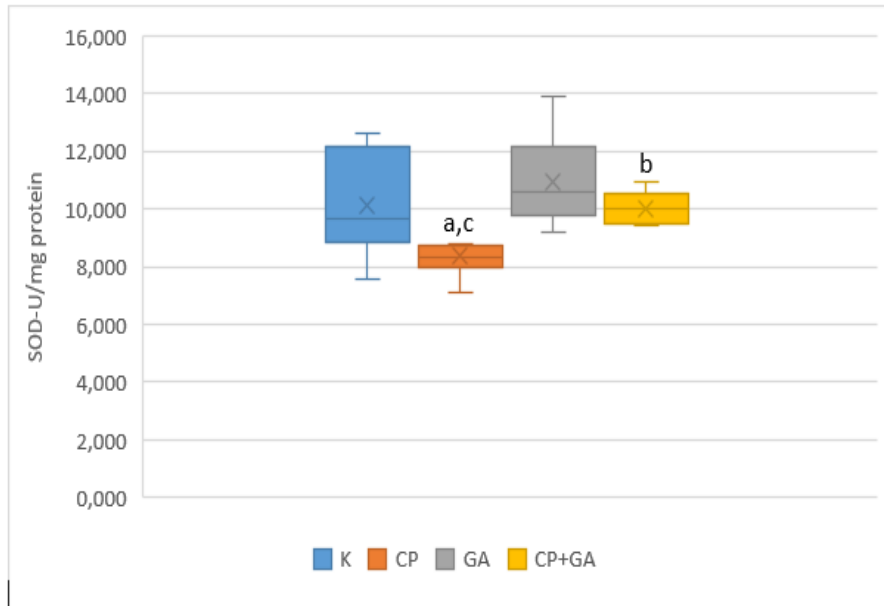
^aK grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)

^bCP grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)

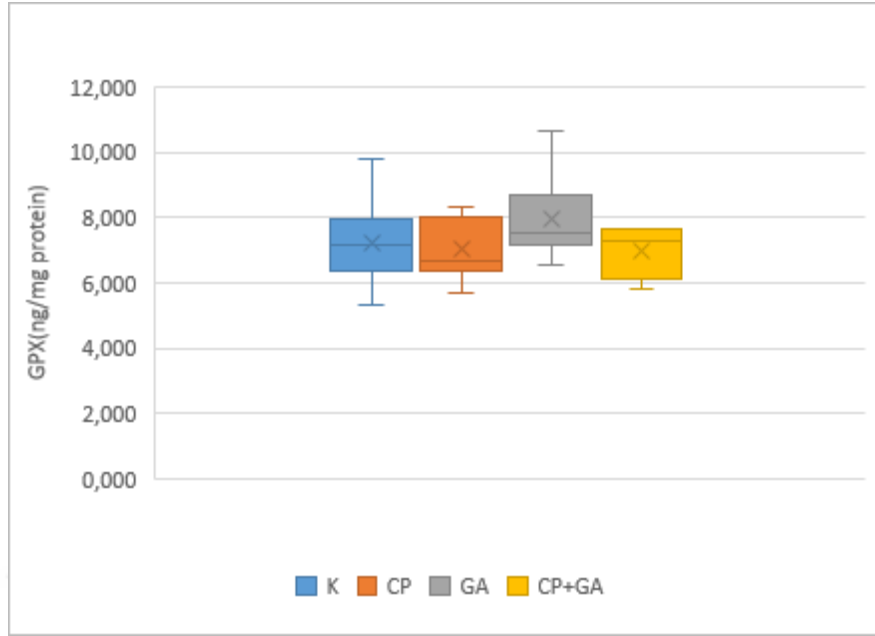
^cGA grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)



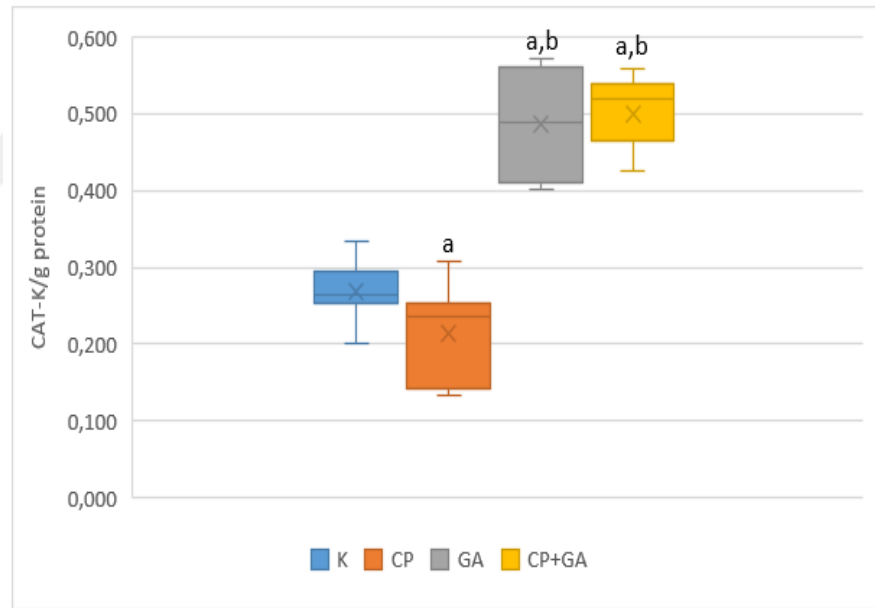
Şekil 18. Grupların Doku MDA Seviyeleri



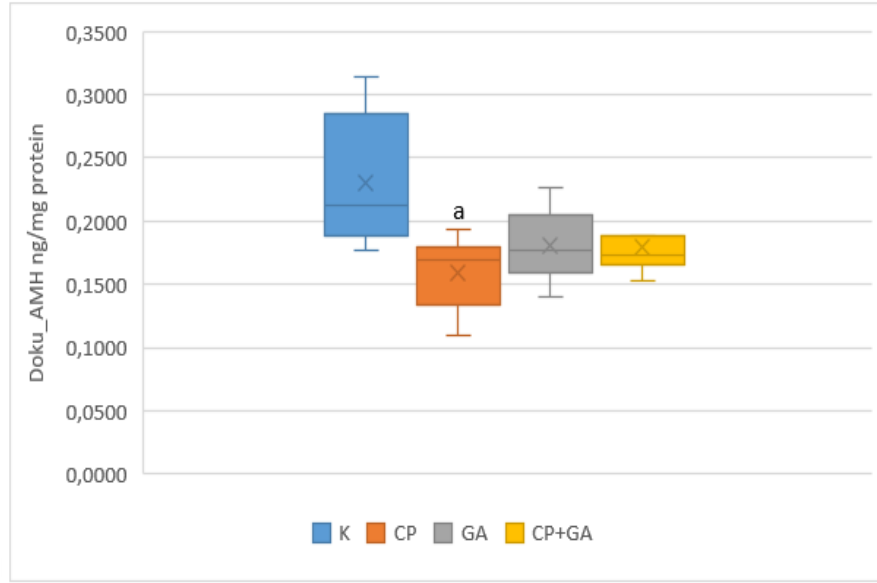
Şekil 19. Grupların Doku SOD Seviyeleri



Şekil 20. Grupların Doku GPX Seviyeleri



Şekil 21. Grupların Doku CAT Seviyeleri



Şekil 22. Grupların Doku AMH Seviyeleri

4.3.2. Serum Biyokimyası

Serum AMH değeri hesaplanan GA grubunda K, CP ve CP+GA gruplarına göre anlamlı artış bulundu ($p=0,003$, $p=0,003$, $p=0,022$), (Tablo 15, Şekil 23).

Tablo 15. Grupların Serum AMH Seviyeleri

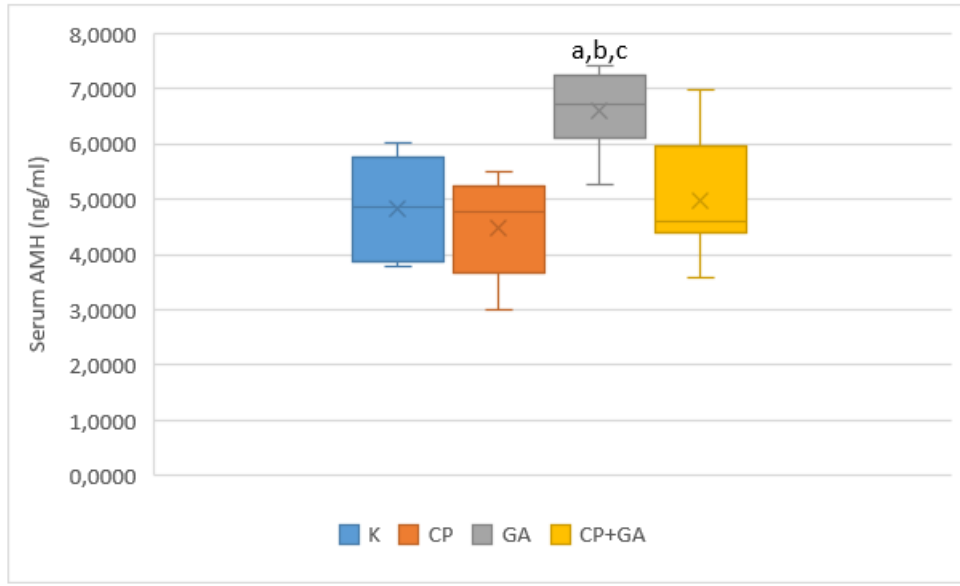
	K Ort±SD	CP Ort±SD	GA Ort±SD	CP+GA Ort±SD
Serum AMH (ng/ml)	4,8 ± 0,8	4,47 ± 0,89	6,6 ± 0,77^{a,b,c}	4,97 ± 1,12

Veriler, ortalama ± standart sapma (Ort.± SD) olarak verilmiştir. K: Kontrol grubu, CP: Siklofosfamid grubu, GA: Gallik asit, CP+GA: Siklofosfamid+Gallik asit grubu

^aK grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)

^bCP grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)

^cCP+GA grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)



Şekil 23. Grupların Serum AMH Seviyeleri

5. TARTIŞMA

En eski kanser ilaçlarından olan CP lenfoma ve lösemi gibi hematolojik malignitelerin yanı sıra meme, ovaryum ve küçük hücreli akciğer kanserleri gibi çeşitli epitelyal tümörlerin tedavisinde de kullanılmaktadır (6,122). CP'nin kendisi bir ön ilaçtır, karaciğerde sitokrom P-450 tarafından 4-hidroksisiklofosfamidi oluşturmak üzere metabolize edilir ve bu da daha sonra fosforamid mustard ve akroleine dönüştürülür. Fosforamid mustard, DNA'yı alkilleyerek DNA replikasyonunu önleyen birincil aktif metabolittir (123,124). Fosforamid mustard ayrıca mitokondriyi de etkileyerek transmembran potansiyelinde ve sitozolik sitokrom c birikiminde azalmaya yol açar (125). CP'nin etkileri hücre döngüsünden bağımsızdır. Bununla birlikte tüm alkilleyici ajanlarda olduğu gibi, hızla çoğalan hücreler CP'ye en duyarlı olanlardır (126).

Farmakolojik faydalarına rağmen CP, gonadotoksosite ile ilişkilendirilmiştir (127,128). Bugüne kadar CP'nin neden olduğu gonadal toksisitenin kesin nedeni açık değildir, ancak literatür CP'nin şiddetli oksidatif stres, nitratif stres, inflamasyon, apoptoz ve genomik değişikliklere neden olduğunu desteklemektedir (9). CP erkeklerde, testis hasarından sorumludur ve anormal sperm üretiminde artış ve sperm konsantrasyonu ve hareketliliğinde, testosteron düzeyinde, testis antioksidan kapasitesinde azalmayla ilişkilidir (128). Deneysel çalışmalarda CP'nin hem testis hem de vücut ağırlığında azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir (129,130). CP uygulaması ayrıca Sertoli hücrelerinde önemli hasara neden olur, birçok önemli enzimin gen ekspresyonunu değiştirir, hücre iskeleti hasarına neden olur ve spermatozoanın büyümesini, çoğalmasını ve farklılaşmasını olumsuz etkiler (131). CP kadınlarda, doza bağlı olarak ovaryumda belirgin hasara neden olur (132, 62). CP'nin indüklediği ovaryum hasarının, granüloza hücresi apoptozunun kolaylaştırılmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (17). Mevcut kanıtlar, CP'nin foliküller üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olduğunu ve CP 'ye maruz kalma sonrasında primordiyal foliküllerin tükenmesine yol açtığını göstermektedir (132). CP amenore, prematür ovaryan yetmezlik ve ovaryum fonksiyon bozukluğu ile ilişkilendirilen ilk kemoterapi ilacıdır (133-135). CP doğrudan DNA'ya zarar verir, foliküler apoptozu indükler ve ovaryum hücrelerine zararlı ROS üretir (136,137).

Literatürde, CP'nin neden olduğu gonadal hasarın iyileştirilmesi ya da önlenmesi için antioksidan özelliği olan spirulina, quercetin, rosmarinik asit ve çinko gibi farklı maddelerin kullanıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur (2,9,110,138). Ancak çay, meyveler, kırmızı üzümler, kabuklu yemişler ve şifalı bitkiler gibi birçok doğal kaynaktan bulunan GA'nın ovaryum hasarı için antioksidan olarak kullanıldığı az sayıda çalışmaya rastlanılmıştır (139,140). Çalışmamızda CP'yle hasar oluşturduğumuz rat ovaryumlarında GA'nın antioksidan etkilerini değerlendirdik.

CP'nin hücre bölünmeleri üzerinde baskılayıcı etkileri vardır, bu durum hızlı bölünen hücrelerde daha belirgindir. Bundan dolayı hem vücut ağırlığında hem de organlarda ağırlık kaybına sebep olabilir (141,142). Dişi fareler üzerinde yapılan deneyde 2 hafta boyunca 6 kez 100 mg/kg CP i.p. olarak uygulandığında, vücut ağırlığında azalma tespit edilmiştir (16,143). CP kaynaklı ovaryum hasarına resveratrolün koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmada CP grubundaki sıçanlara başlangıç dozu 50 mg/kg ve ardından 14 ardışık gün boyunca 8 mg/kg günlük dozda CP uygulamışlar, sonucunda CP grubunda vücut ağırlığında ve ovaryum ağırlığında anlamlı azalma tespit etmişlerdir (16). Çalışmamızda CP grubunda vücut ve ovaryum ağırlığında düşüş görüldü fakat bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bunun nedeninin çalışmalarda CP uygulanan gün sayısının bizim çalışmamızdan daha fazla olması ve doz farklılıklarından kaynaklanıyor olabileceğini düşündük.

Birçok çalışma oksidatif stresin çeşitli inflamatuvar ve apoptotik yolları aktive edebildiğini ortaya koymuştur. Kontrolsüz oksidatif stres kadın üreme sistemi için önemli bir tehdittir ve artan oksidatif stres, foliküllerin gelişimini oldukça olumsuz etkiler (142). Nair ve ark (2020) CP'nin toksisitesini, antioksidan savunma mekanizmasını bozarak oksidatif hasar yoluyla gösterdiğini ve bunun da proinflamatuvar süreci tetikleyerek apoptozu desteklediğini belirtmişlerdir. Bu durumun da ovaryum foliküllerinde dejeneratif hasara neden olduğunu rapor etmişlerdir (144). Ayrıca CP'nin ovaryumda korpus luteum ve foliküllerde mikrovaskülerizasyonda bozulmaya, DNA hasarıyla hücre apoptozuna neden olarak folikül dejenerasyonuna ve oosit kaybına doğrudan sebep olabileceği belirtilmiştir (142,145). Bizim çalışmamızda CP ovaryum dokusunda foliküler hücre dejenerasyonunu yüksek oranda artırmıştır.

Mazloom ve ark. GA'nın antioksidan enzimlerin aktivitesini artıran, proinflatuar sitokinlerin ovaryum konsantrasyonunu, DNA'nın oksidatif hasarını ve estradiol valerat kaynaklı polikistik over fenotip sıçan modelinde lipid peroksidasyonunu azaltan güçlü bir antioksidan, antiinflatuar ve doğal polifenol olduğunu ileri sürmüşlerdir. GA'nın oksidatif stres kaynaklı inflamatuvar bozuklukları azaltmada önemli bir rol oynayabileceğini belirtmişlerdir (146). Ayazoglu ve ark. çalışmalarında sisplatine maruz kalan sıçan ovaryumlarında GA uygulamasının folikül dejenerasyonunu azalttığını, primordiyal, primer ve sekonder folikül sayısını artırdığını, atretik folikül sayısını azalttığını gösterdiler (147). Bizim çalışmamızda GA uygulamasının CP kaynaklı folikül dejenerasyonunu azalttığı görülmüş olup, bu bulgumuz literatürü desteklemektedir.

Pu ve ark. (2023) siklofosamid ve busulfan verilerek prematür ovaryan yetmezliği modelini oluşturdukları deneyde, prematür ovaryan yetmezliği grubunda primordiyal, primer, sekonder ve preovulatuvar folikül sayılarının azaldığını atretik folikül sayısının ise arttığını tespit etmişlerdir (10). Çalışmamızda literatürle benzer olarak; CP grubunda primordiyal, unilaminar primer folikül sayısında azalma, atretik folikül sayısında artış bulundu. CP+GA grubunda primordiyal folikül sayısı CP grubuna göre anlamlı arttı. Bunun nedeni gallik asitin apoptozu engellemesi olabilir. CP+GA grubunda CP grubuna kıyasla unilaminar primer folikül sayısında artma, atretik folikül sayısında azalma görülsede istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Literatüre baktığımızda Dos ve ark.'nın (2023) doksorubisinin ovaryum üzerine toksik etkilerine karşı GA'nın koruyuculuğunu çalıştığı çalışmada, doksorubisin grubunda primordiyal, primer, sekonder ve antral foliküllerin azaldığını, gallik asit verilen grupta bu foliküler kaybın azaldığını tespit etmişlerdir (11). Bu bulgular da çalışmamızı desteklemektedir.

CP toksisitesinin yaygın olarak kabul edilen bir nedeni DNA hasarıdır (142). Liu ve ark. (2019) yaptığı çalışmada CP'nin ovaryum dokusu üzerindeki apoptotik etkisini göstermişlerdir. Yine aynı çalışmada CP'nin, granüloza hücre apoptozunu ve ardından oosit ölümünü indüklediğini belirtmişlerdir (142). Biz de çalışmamızda literatürle uyumlu olarak CP grubunda Aİ'de artışı tespit ettik. Bu artışın; CP'nin indüklediği oksidatif stresin yanında CP'nin DNA üzerine yaptığı hasara sekonder oluşmuş olabileceğini düşündük. Dos ve ark. doksorubisin over üzerindeki toksik

etkisine karşı GA'nın koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmada; ovaryum dokusunda gallik asitin apoptozu azalttığını gösterdiler (11). Literatürle benzer olarak çalışmamızda tedavi grubunda Aİ, CP grubuna kıyasla anlamlı azalmıştı.

Literatürde CP ile ilgili biyokimyasal bulgularımızı destekleyen kanıtlar bulunmaktadır (144,148,149). CP ile oluşturulan prematür ovaryen yetmezlik çalışmasında CP grubunda antioksidan parametreler olan GPx, CAT ve SOD'un azaldığı, lipid oksidasyon belirteci olan MDA'nın ise arttığı tespit edilmiştir (14). Hamzeh ve ark. CP'nin neden olduğu ovaryum hasarının, artan ROS üretimi ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (13). Çalışmamızda CP grubunda doku MDA'sı artmış olup dokuda SOD ve CAT aktivitesi azalmıştı. Bulgularımız CP'nin ROS üretimini arttırarak ovaryum hasarına yol açabileceğini destekler niteliktedir.

Ayazoğlu ve ark.'nın (2023) sisplatinle indüklenen ovaryum hasarında, GA uygulanmasının MDA ve oksidatif stres indeksi düzeylerinde azalmaya, total antioksidan durum ve CAT düzeylerinde ise artmaya neden olduğunu bildirmişlerdir (147). Bir başka çalışmada ise letrozol kaynaklı PCOS modelinde koruyucu olarak verilen GA'nın; SOD ve CAT düzeylerini arttırdığı MDA düzeyini ise azalttığı bulunmuştur (150). Bizim çalışmamızda CP grubunda doku MDA'sı artmış olup tedavi grubunda ise MDA seviyesi hasar grubuna göre azalmıştır. Tedavi grubunda SOD düzeyi hasar grubuna göre anlamlı artmış olup kontrol grubuyla benzer düzeydeydi. Yine doku CAT düzeyi CP+GA ve GA gruplarında hem CP grubuna hem de kontrol grubuna göre anlamlı artmıştı. Bu bize GA'nın SOD ve CAT gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak siklofosfamidin neden olduğu ovaryum hasarını azaltabileceğini gösterdi. GA uygulanan gruplarda da CAT aktivitesinin diğer gruplara göre belirgin olarak yüksek olması bize GA'nın özellikle CAT aktivitesini arttırmada güçlü etkinliğe sahip olabileceğini düşündürdü.

AMH, esas olarak sekonder ve antral foliküllerdeki granüloza hücreleri tarafından üretilir (15). AMH, primordial folikülün primer foliküle dönüşümünün önemli bir negatif düzenleyicisidir. Primordiyal foliküllerin aktivasyonunu inhibe eder ve antral foliküllerin FSH duyarlılığını azaltır, böylece ovaryumda belirli sayıda primordial folikül ve gelişen folikül sayısı sabitlenir (15). Feng ve ark. CP verdikleri deneklerde serum AMH'yı kontrol grubuna göre azalmış olarak bulmuşlar, bu düşüşü granüloza hücrelerinde artan apoptoza bağlamışlardır (15). Başka bir çalışmada,

Zheng ve ark. (2021) CP verilen sıçanlarda serum AMH değerinin düştüğünü göstermişlerdir (14). Çalışmamızda CP, serum AMH düzeyini bir miktar düşürse de istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bununla birlikte CP doku AMH'sında anlamlı düşüşe neden oldu. Bunun CP'nin folikül hücrelerine yaptığı dejenerasyona bağlı olabileceğini düşündük.

Literatürde GA'nın AMH üzerine etkisini gösteren bir çalışmaya rastlamadık. Xu X ve ark. (2024) 4-vinilsikloheksen diepoksit ile oluşturdukları prematür ovaryan yetmezlikli sıçanlarda FSH ve LH düzeylerinde artış, serum östradiol ve AMH düzeylerinde baskılanma gördüler. GA'nın da yer aldığı 6 kimyasal bileşeni içeren bu Shen-Ning-Xin decoction (BSNXD) uygulamasıyla da hasar gurubunda oluşan bu bulguların belirgin şekilde tersine çevrildiğini gözlemlediler. BSNXD uygulamasından sonra, hem düzensiz hormonların hem de ovaryum morfolojisinin iyileştiğini belirttiler (151). Yine Chen ve Tan (2020), çalışmalarında BSNXD uygulamasından sonra östradiol ve AMH seviyelerinin, ovaryum hacminin ve antral folikül sayısının önemli ölçüde yükseldiğini bildirdiler (152). Çalışmamızda, GA grubunda serum AMH miktarında diğer gruplara göre artış gördük. Bu bize GA'nın over rezervine faydalı olabileceğini düşündürdü.

Gruplardaki denek sayıları benzer çalışmalar örnek alınarak ve 3R kuralına uygun şekilde belirlenmiş olmasına rağmen, denek sayısı çalışmamızın sınırlılıklarından biridir. Histopatolojik olarak gözlemlenen antiapoptotik etkilerin biyokimyasal belirteçler (örneğin, caspaz-3) kullanılarak doğrulanmamış olması, çalışmamızın sınırlılıkları arasında yer almaktadır. Bu nedenle, gelecekteki çalışmalarda istatistiksel anlamlılığı artırmak için denek sayısının artırılması ve antiapoptotik ile antiinflamatuvar etkilerin değerlendirilmesinde biyokimyasal belirteçlerin eklenmesi uygun olacaktır.

Sonuç olarak CP, ovaryum doku biyokimyasında ve histolojisinde bozulmalara yol açabilir. GA ise ovaryumdaki CP ile indüklenen oksidatif hasarı azaltabilir. Ancak farklı doz ve uygulama süreleri ile yeni çalışmalar planlanmasının iyileştirici etkinin daha iyi değerlendirilebileceği kanısındayız.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

GA'nın, erişkin dişi sıçan ovaryumunda CP ile indüklenen hasarı önleme ve/veya iyileştirmesindeki rolünü deneysel olarak araştırdığımız çalışmamızda:

CP;

1. Primordiyal ve unilaminar folikül sayısını azaltmış, atretik folikül sayısını artırmıştır.
2. Ovaryumun histopatolojik incelemesinde foliküler hücre dejenerasyonuna sebep olmuştur.
3. Aİ'yi artırmıştır.
4. Biyokimyasal olarak doku MDA'yı artırmış, doku SOD ve CAT değerlerini azaltmıştır.
5. Doku AMH'yı kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaltmıştır.

GA;

1. CP'nin neden olduğu primordiyal folikül sayısındaki azalmayı engellemiştir.
2. CP'den kaynaklı foliküler dejenerasyonu engellemiştir.
3. Aİ'yi düşürmüştür.
4. CP'nin artırdığı doku MDA'yı azaltmıştır. CP'nin azalttığı doku SOD ve doku CAT değerlerini artırmıştır.
5. Saf GA verilen grupta Serum AMH değerini artırmıştır.

Çalışmamızın ileride tasarlanacak olan deneysel ve klinik çalışmalara yön vereceğini umuyoruz. Çalışmamız CP'ye bağlı gelişen ovaryum toksisitesine karşı GA'nın etkilerinin araştırıldığı ilk çalışmadır. GA'nın ovaryum üzerine etkilerinin araştırıldığı nadir çalışmalardandır. Bu konuda ileri araştırmalar yapacak çalışmacılar;

1. GA'nın farklı doz ve sürelerde kullanılarak iyileştirici etkisine daha iyi değerlendirilebilir.
2. Dokularda bakılan oksidan, antioksidan parametreleri artırılabilir.
3. GA'nın profilaktik ve/veya iyileştirici etkisinin altında yatan mekanizmaların değerlendirilebilmesi için farklı moleküler teknikler de kullanılabilir.

4. Çalışmayı daha zengin verilerle destekleyebilmek için konfokal mikroskopi, elektron mikroskopi, flow sitometri, hücre kültürü vb ileri teknikler kullanılabilir.



7. KAYNAKLAR

1. Sonigo, C., Beau, I., Binart, N., & Grynberg, M. (2019). The impact of chemotherapy on the ovaries: molecular aspects and the prevention of ovarian damage. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 5342.
2. European Societyfor Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Guideline Group on POI; Webber L, Davies M, Anderson R, Bartlett J, Braat D, Cartwright B, Cifkova R, de MuinckKeizer-Schrama S, Hogervorst E, Janse F, Liao L, Vlaisavljevic V, Zillikens C, Vermeulen N. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian in sufficiency. *Hum Reprod*. 2016 May;31(5):926-37. doi: 10.1093/humrep/dew027.
3. Mills, K. A., Chess-Williams, R., & McDermott, C. (2019). Novel insights into the mechanism of cyclophosphamide-induced bladder toxicity: chloroacetaldehyde's contribution to urothelial dysfunction in vitro. *Archives of Toxicology*, 93, 3291-3303.
4. Ogino MH, Tadi P. Cyclophosphamide. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2023. PMID: 31971727.
5. Colvin, O. M. (1999). An overview of cyclophosphamide development and clinical applications. *Current Pharmaceutical Design*, 5, 555-560.
6. Emadi, A., Jones, R. J., & Brodsky, R. A. (2009). Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 6(11), 638-647
7. Şengül, E., Gelen, V., Gedikli, S., Özkanlar, S., Gür, C., Çelebi, F., & Çınar, A. (2017). The protective effect of quercetin on cyclophosphamide-induced lung toxicity in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 92, 303-307.
8. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins Temel Patoloji. In: Tuzlalı S, Güllüoğlu M, Çevikbaş U, editör. Dokuzuncu basım. İstanbul : Nobel Tip Kitabevleri; 2013. 14-15.
9. Maremanda, K. P., Khan, S., & Jena, G. (2014). Zinc protects cyclophosphamide-induced testicular damage in rat: Involvement of metallothionein, tesmin and Nrf2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 445(3), 591-596.
10. Pu, X., Zhang, L., Zhang, P., Xu, Y., Wang, J., Zhao, X., ... & Fan, A. (2023). Human UC-MSC-derived exosomes facilitate ovarian renovation in rats with chemotherapy-induced premature ovarian insufficiency. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1205901.

11. Dos Santos Silva, R. L., Lins, T. L. B. G., do Monte, A. P. O., de Andrade, K. O., de Sousa Barberino, R., da Silva, G. A. L., ... & de Matos, M. H. T. (2023). Protective effect of gallic acid on doxorubicin-induced ovarian toxicity in mouse. *Reproductive Toxicology*, 115, 147-156.
12. Liu, H. Z., Tao, Y. X., Luo, P., Deng, C. M., Gu, Y. P., Yang, L., & Zhong, J. P. (2016). Preventive effects of a novel polysaccharide from *Sepia esculenta* ink on ovarian failure and its action mechanisms in cyclophosphamide-treated mice. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 64(28), 5759-5766.
13. Hamzeh, M., Hosseini-mehr, S. J., Mohammadi, H. R., Beklar, S. Y., Dashti, A., & Amiri, F. T. (2018). Atorvastatin attenuates the ovarian damage induced by cyclophosphamide in rat: An experimental study. *International Journal of Reproductive Biomedicine*, 16(5), 323.
14. Zheng, S., Ma, M., Chen, Y., & Li, M. (2022). Effects of quercetin on ovarian function and regulation of the ovarian PI3K/Akt/FoxO3a signalling pathway and oxidative stress in a rat model of cyclophosphamide-induced premature ovarian failure. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 130(2), 240-253.
15. Feng, J., Ma, W. W., Li, H. X., Pei, X. Y., Deng, S. L., Jia, H., & Ma, W. Z. (2022). Melatonin prevents cyclophosphamide-induced primordial follicle loss by inhibiting ovarian granulosa cell apoptosis and maintaining AMH expression. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 895095.
16. Nie, Z., Zhang, L., Chen, W., Zhang, Y., Wang, W., Hua, R., ... & Wu, H. (2021). The protective effects of resveratrol pretreatment in cyclophosphamide-induced rat ovarian injury: An vivo study. *Gynecological Endocrinology*, 37(10), 914-919.
17. Yuksel, A., Bildik, G., Senbabaoglu, F., Akin, N., Arvas, M., Unal, F., ... & Oktem, O. (2015). The magnitude of gonadotoxicity of chemotherapy drugs on ovarian follicles and granulosa cells varies depending upon the category of the drugs and the type of granulosa cells. *Human Reproduction*, 30(12), 2926-2935.
18. Abogresha, N. M., Mohammed, S. S., Hosny, M. M., Abdallah, H. Y., Gadallah, A. M., & Greish, S. M. (2021). Diosmin mitigates cyclophosphamide induced premature ovarian insufficiency in rat model. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3044.
19. Agarwal, A., Saleh, R. A., & Bedaiwy, M. A. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility*, 79(4), 829-843.

20. Ma, H., Wang, Y., Liu, G., Hu, Q., Zhu, J., & Dai, Y. (2023). Ovarian scaffolds promoted mouse ovary recovery from cyclophosphamide damage. *Journal of Reproductive Immunology*, 157, 103950.
21. Saeki, K., Yuo, A., Isemura, M., ABE, I., SEKI, T., & NOGUCHI, H. (2000). Apoptosis-inducing activity of lipid derivatives of gallic acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 23(11), 1391-1394.
22. Khorsandi, K., Kianmehr, Z., & Hosseinzadeh, R. (2020). Anti-cancer effect of gallic acid in presence of low level laser irradiation: ROS production and induction of apoptosis and ferroptosis. *Cancer Cell International*, 20(1), 1-14.
23. Subramanian, A. P., John, A. A., Vellayappan, M. V., Balaji, A., Jaganathan, S. K., Supriyanto, E., & Yusof, M. (2015). Gallic acid: prospects and molecular mechanisms of its anticancer activity. *Rsc Advances*, 5(45), 35608-35621.
24. Rajamanickam, K., Yang, J., & Sakharkar, M. K. (2019). Gallic acid potentiates the antimicrobial activity of tulathromycin against two key bovine respiratory disease (BRD) causing-pathogens. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1486.
25. Kratz, J. M., Andrighetti-Fröhner, C. R., Kolling, D. J., Leal, P. C., Cirne-Santos, C. C., Yunes, R. A., ... & Simões, C. M. O. (2008). Anti-HSV-1 and anti-HIV-1 activity of gallic acid and pentyl gallate. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103, 437-442.
26. Liu, K. Y., Hu, S., Chan, B. C., Wat, E. C., Lau, C. B., Hon, K. L., ... & Wong, C. K. (2013). Anti-inflammatory and anti-allergic activities of Pentaherb formula, Moutan Cortex (Danpi) and gallic acid. *Molecules*, 18(3), 2483-2500.
27. Variya, B. C., Bakrania, A. K., & Patel, S. S. (2020). Antidiabetic potential of gallic acid from *Emblica officinalis*: Improved glucose transporters and insulin sensitivity through PPAR- γ and Akt signaling. *Phytomedicine*, 73, 152906.
28. Jin, L. I., Piao, Z. H., Sun, S., Liu, B., Kim, G. R., Seok, Y. M., ... & Jeong, M. H. (2017). Gallic acid reduces blood pressure and attenuates oxidative stress and cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Scientific Reports*, 7(1), 15607.
29. Jayamani, J., & Shanmugam, G. (2014). Gallic acid, one of the components in many plant tissues, is a potential inhibitor for insulin amyloid fibril formation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 85, 352-358.
30. Chaikul, P., Khat-Udomkiri, N., Iangthanarat, K., Manosroi, J., & Manosroi, A. (2019). Characteristics and in vitro anti-skin aging activity of gallic acid loaded

in cationic CTAB niosome. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 131, 39-49.

31. Badhani, B., Sharma, N., & Kakkar, R. (2015). Gallic acid: A versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. Rsc Advances, 5(35), 27540-27557.
32. Nayeem, N., Asdaq, S. M. B., Salem, H., & AHEI-Alfgy, S. (2016). Gallic acid: a promising lead molecule for drug development. Journal of Applied Pharmacy, 8(2), 1-4.
33. Alavi Rafiee, S., Farhoosh, R., & Sharif, A. (2018). Antioxidant activity of gallic acid as affected by an extra carboxyl group than pyrogallol in various oxidative environments. European Journal of Lipid Science and Technology, 120(11), 1800319
34. Moore KL, Persaud TVN. The Developing Human. Clinically oriented embryology. 10th Ed., Saunders. Elsevier, Philadelphia; 2016.
35. Sadler TW. Langman Medikal Embriyoloji, Çev. Başaklar C., Ankara: Palme Yayıncılık; 2005.
36. Arıncı K, Elhan A. İnsan Vücudunun Yapısı. Ankara: Türk Tarih Kurumu Basımevi;2015. 23
37. Spence, Alexander P. Basic Human Anatomy California: Publishing Company, Inc. 1982. 600-603
38. Roach, M. K., & Andreotti, R. F. (2017). The normal female pelvis. Clinical Obstetrics and Gynecology, 60(1), 3-10.
39. Cohen, H. L., Tice, H. M., & Mandel, F. S. (1990). Ovarian volumes measured by US: bigger than we think. Radiology, 177(1), 189-192.
40. Arifoğlu Y. Her Yönüyle Anatomi İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi; 2016.414
41. Ross MH, Pawlina W. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. In: Demir R, çeviri editör. 6. baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2017.
42. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. 3. Baskı. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevleri; 2021.
43. Kinnear, H. M., Tomaszewski, C. E., Chang, A. L., Moravek, M. B., Xu, M., Padmanabhan, V., & Shikanov, A. (2020). The ovarian stroma as a new frontier. *Reproduction (Cambridge, England)*, 160(3), R25–R39.

44. Mescher Anthony L. (2016). Junqueira's Basic Histology, text and atlas. Junqueira Temel Histoloji Atlas Kitap. 13 th ed. Çeviren: Solakoğlu S, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Sti., İstanbul, Sayfa: 449-478.
45. Young B, Woodford P and O' Dowd G. Wheater's Functional Histology. A Text and Colour Atlas. 6. edition. Churchill Livingstone Elsevier: Philadelphia; 2014. 292-317
46. Acosta, T. J., & Miyamoto, A. (2004). Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Animal Reproduction Science*, 82, 127-140.
47. Guyton AC, Hall J E: Tıbbi Fizyoloji. Çavuşoğlu H (Çev) 10. basım. İstanbul: Nobel Tıp Kitap Evleri; 2001.
48. Kierszenbaum A.L. Histoloji ve Hücre Biyoloji Patolojiye Giriş. Edited by Ramazan DEMİR. Ankara: Palme Yayıncılık; 2006.
49. Shrikhande, L., Shrikhande, B., & Shrikhande, A. (2020). AMH and its clinical implications. *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India*, 70(5), 337-341.
50. Durlinger, A. L., Gruijters, M. J., Kramer, P., Karels, B., Ingraham, H. A., Nachtigal, M. W., ... & Themmen, A. P. (2002). Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*, 143(3), 1076-1084.
51. Vigier, B., PICARD, J. Y., TRAN, D., LEGEAI, L., & JOSSO, N. (1984). Production of anti-Müllerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. *Endocrinology*, 114(4), 1315-1320.
52. Gruijters, M. J., Visser, J. A., Durlinger, A. L., & Themmen, A. P. (2003). Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 211(1-2), 85-90.
53. Visser, J. A., de Jong, F. H., Laven, J. S., & Themmen, A. P. (2006). Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction*, 131(1), 1-9.
54. Garg, D., & Tal, R. (2016). The role of AMH in the pathophysiology of polycystic ovarian syndrome. *Reproductive Biomedicine Online*, 33(1), 15-28.
55. Laven, J. S., Mulders, A. G., Visser, J. A., Themmen, A. P., De Jong, F. H., & Fauser, B. C. (2004). Anti-Müllerian hormone serum concentrations in normoovulatory and anovulatory women of reproductive age. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(1), 318-323.

56. Pigny, P., Merlen, E., Robert, Y., Cortet-Rudelli, C., Decanter, C., Jonard, S., & Dewailly, D. (2003). Elevated serum level of anti-mullerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(12), 5957-5962.
57. Franks, S., Mason, H., & Willis, D. (2000). Follicular dynamics in the polycystic ovary syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 163(1-2), 49-52.
58. Franks, S., McCarthy, M. I., & Hardy, K. (2006). Development of polycystic ovary syndrome: involvement of genetic and environmental factors. *International Journal of Andrology*, 29(1), 278-285.
59. Hughesdon, P. E. (1982). Morphology and morphogenesis of the Stein-Leventhal ovary and of so-called "hyperthecosis". *Obstetrical & Gynecological Survey*, 37(2), 59-77.
60. Pellatt, L., Hanna, L., Brincat, M., Galea, R., Brain, H., Whitehead, S., & Mason, H. (2007). Granulosa cell production of anti-Mullerian hormone is increased in polycystic ovaries. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(1), 240-245.
61. Scanlon VC, Sanders T. Essentials of Anatomy And Physiology. 5. Edition.
62. De Jonge, M. E., Huitema, A. D., Rodenhuis, S., & Beijnen, J. H. (2005). Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Clinical Pharmacokinetics*, 44(11), 1135-1164.
63. Smith, D. R. (2005). Cyclophosphamide therapy for multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis: Etiology, Diagnosis, and New Treatment Strategies*, 171-191.
64. Cooperating Clinics Committee of the American Rheumatism Association. (1970). A controlled trial of cyclophosphamide in rheumatoid arthritis. *The New England Journal of Medicine*, 283(17), 883-889.
65. Ogino MH, Tadi P. Cyclophosphamide. [Updated 2023 Jul 3]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553087/>
66. Cerny, T., Graf, A., Rohner, P., Zeugin, T., Brunner, K. W., & Küpfer, A. (1991). Subcutaneous continuous infusion of ifosfamide and cyclophosphamide in ambulatory cancer patients: bioavailability and feasibility. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 117, S129-S134.

67. Wagner, T., & Fenneberg, K. (1984). Pharmacokinetics and bioavailability of cyclophosphamide from oral formulations. *Arzneimittel-Forschung*, 34(3), 313-316.
68. Sladek, N. E. (1988). Metabolism of oxazaphosphorines. *Pharmacology & Therapeutics*, 37(3), 301-355.
69. COHEN, J. T., & Jao, J. Y. (1970). Enzymatic basis of cyclophosphamide activation by hepatic microsomes of the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 174(2), 206-210.
70. Ren, S., Yang, J. S., Kalhorn, T. F., & Slattery, J. T. (1997). Oxidation of cyclophosphamide to 4-hydroxycyclophosphamide and deschloroethylcyclophosphamide in human liver microsomes. *Cancer Research*, 57(19), 4229-4235.
71. Bagley Jr, C. M., Bostick, F. W., & DeVita Jr, V. T. (1973). Clinical pharmacology of cyclophosphamide. *Cancer Research*, 33(2), 226-233.
72. Shulman-Roskes, E. M., Noe, D. A., Gamcsik, M. P., Marlow, A. L., Hilton, J., Hausheer, F. H., ... & Ludeman, S. M. (1998). The partitioning of phosphoramidate mustard and its aziridinium ions among alkylation and P–N bond hydrolysis reactions. *Journal of Medicinal Chemistry*, 41(4), 515-529.
73. Flowers, J. L., Ludeman, S. M., Gamcsik, M. P., Colvin, O. M., Shao, K. L., Boal, J. H., ... & Adams, D. J. (2000). Evidence for a role of chloroethylaziridine in the cytotoxicity of cyclophosphamide. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 45(4), 335-344.
74. O'Connor, P. M., Wassermann, K., Sarang, M., Magrath, I., Bohr, V. A., & Kohn, K. W. (1991). Relationship between DNA cross-links, cell cycle, and apoptosis in Burkitt's lymphoma cell lines differing in sensitivity to nitrogen mustard. *Cancer Research*, 51(24), 6550-6557.
75. Ritter, J. M., Flower, R. J., Henderson, G., Rang, H. P., Loke, Y. K., & MacEwan, D. (2020). Rang Y Dale. *Farmacología*. Elsevier.
76. Kayaalp SO. Akılcıl Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 12. baskı. Ankara: Pelikan Yayıncılık; 2009. 315-343
77. Bertram G. Basic Clinical Pharmacology. 12th Edition. 2012. 1345-1386
78. Pass, G. J., Carrie, D., Boylan, M., Lorimore, S., Wright, E., Houston, B., ... & Wolf, C. R. (2005). Role of hepatic cytochrome p450s in the pharmacokinetics and toxicity of cyclophosphamide: studies with the hepatic cytochrome p450 reductase null mouse. *Cancer Research*, 65(10), 4211-4217.

79. Thatcher, N., Smith, D. B., Lind, M. J., Anderson, H., Barclay, J., Chopra, M. P., & Fitzgerald, M. D. (1988). Double alkylating agent therapy with ifosfamide and cyclophosphamide for advanced non-small cell lung cancer. From the Manchester Lung Tumour Group. *Cancer*, 61(1), 14-18.
80. Fox, L. P., & Pandya, A. G. (2000). Pulse intravenous cyclophosphamide therapy for dermatologic disorders. *Dermatologic Clinics*, 18(3), 459-473.
81. Stillwell, T. J., & Benson Jr, R. C. (1988). Cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis: a review of 100 patients. *Cancer*, 61(3), 451-457.
82. Lawson, M., Vasilaras, A., De Vries, A., MacTaggart, P., & Nicol, D. (2008). Urological implications of cyclophosphamide and ifosfamide. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 42(4), 309-317.
83. Wolverton, S. E., & Wu, J. J. (2019). *Comprehensive Dermatologic Drug Therapy*. Elsevier Health Sciences.
84. Bronner, A. K., & Hood, A. F. (1983). Cutaneous complications of chemotherapeutic agents. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 9(5), 645-663.
85. Martin, F., Lauwerys, B., Lefebvre, C., Devogelaer, J. P., & Houssiau, F. A. (1997). Side-effects of intravenous cyclophosphamide pulse therapy. *Lupus*, 6(3), 254-257.
86. Cavallasca, J. A., Costa, C. A., del Rosario Maliandi, M., Contini, L. E., de Carrera, E. F., & Musuruana, J. L. (2015). Severe infections in patients with autoimmune diseases treated with cyclophosphamide. *Reumatología Clínica (English Edition)*, 11(4), 221-223.
87. Heijl, C., Harper, L., Flossmann, O., Stücker, I., Scott, D. G. I., Watts, R. A., ... & European Vasculitis Study Group. (2011). Incidence of malignancy in patients treated for antineutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis: follow-up data from European Vasculitis Study Group clinical trials. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70(8), 1415-1421.
88. Monach, P. A., Arnold, L. M., & Merkel, P. A. (2010). Erratum: Incidence and prevention of bladder toxicity from cyclophosphamide in the treatment of rheumatic diseases: A data-driven review. *Arthritis & Rheumatism*, 62(8), 2555-2555.
89. Werth, V. P. (1997). Pulse intravenous cyclophosphamide for treatment of autoimmune blistering disease: Is there an advantage over oral routes?. *Archives of Dermatology*, 133(2), 229-230.

90. Shabani, S., Rabiei, Z., & Amini-Khoei, H. (2020). Exploring the multifaceted neuroprotective actions of gallic acid: A review. *International Journal of Food Properties*, 23(1), 736-752.
91. Fernandes, F. H. A., & Salgado, H. R. N. (2016). Gallic acid: review of the methods of determination and quantification. *Critical reviews in analytical chemistry*, 46(3), 257-265.
92. Aruoma, O. I., Murcia, A., Butler, J., & Halliwell, B. (1993). Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(11), 1880-1885.
93. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747.
94. Moo-Huchin, V. M., Moo-Huchin, M. I., Estrada-León, R. J., Cuevas-Glory, L., Estrada-Mota, I. A., Ortiz-Vázquez, E., ... & Sauri-Duch, E. (2015). Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*, 166, 17-22.
95. Strlic, M., Radovič, T., Kolar, J., & Pihlar, B. (2002). Anti-and prooxidative properties of gallic acid in fenton-type systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6313-6317.
96. Nikolic, K. M. (2006). Theoretical study of phenolic antioxidants properties in reaction with oxygen-centered radicals. *Journal of Molecular Structure: Theochem*, 774(1-3), 95-105.
97. Asha, K. K., Mathew, S., & Lakshmanan, P. T. (2012). Flavonoids and phenolic compounds in two mangrove species and Their Antioxidant Property
98. Wang, K., Zhu, X., Zhang, K., Zhu, L., & Zhou, F. (2014). Investigation of gallic acid induced anticancer effect in human breast carcinoma MCF-7 cells. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 28(9), 387-393.
99. Gutteridge, J. M. (1994). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-Biological Interactions*, 91(2-3), 133-140.
100. Poljsak, B., Šuput, D., & Milisav, I. (2013). Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013.
101. Riley, P. A. (1994). Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 65(1), 27-33.

102. Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74.
103. Devasagayam TP, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Japi*. 2004 Oct;52(794804):4.
104. Cross, C. E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now. *J Lab Clin Med*, 119, 598-620.
105. Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Invited review: oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic pathology*, 30(6), 620-650.
106. Sies, H. (1985). Oxidative stress: introductory remarks.[In] Sies H.(ed.) *Oxidative Stress*.
107. López-Alarcóna, C. (2013). Ana Denicola (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-Based Assays.
108. Maulik, N., McFadden, D., Otani, H., Thirunavukkarasu, M., & Parinandi, N. L. (2013). Antioxidants in longevity and medicine. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013.
109. Toda, S. (2011). Polyphenol content and antioxidant effects in herb teas. *Chinese Medicine*, 2(1), 29.
110. Yener, N. A., Sinanoglu, O., Ilter, E., Celik, A., Sezgin, G., Midi, A., ... & Aksungar, F. (2013). Effects of spirulina on cyclophosphamide-induced ovarian toxicity in rats: biochemical and histomorphometric evaluation of the ovary. *Biochemistry Research International*, 2013.
111. Olayinka, E. T., Ore, A., Ola, O. S., & Adeyemo, O. A. (2015). Ameliorative effect of gallic acid on cyclophosphamide-induced oxidative injury and hepatic dysfunction in rats. *Medical Sciences*, 3(3), 78-92.
112. Picut CA, Dixon D, Simons ML, Stump DG, Parker GA, Remick AK. Postnatal Ovary Development in The Rat: Morphologic Study and Correlation of Morphology to Neuroendocrine Parameter *Toxicol Pathol*. 2015; 43(3): 343–353
113. Roshangar L, Hamdi BA, Khaki AA, Rad JS, Soleimani-Rad S. Effect of Low-Frequency Electromagnetic Field Exposure on Oocyte Differentiation and Follicular Development. *Advanced Biomedical Research*. 2014, 3:76
114. Standring S. *Gray's Anatomy*, Churchill Livingstone Elsevier. 40th Edition. 2008

115. Guven S, Muci E, Unsal MA, Yulug E, Alver A, Duman MK, Mentese A: The effects of carbon dioxide pneumoperitoneum on ovarian blood flow, oxidative stress markers, and morphology during laparoscopy: a rabbit model. *Fertil Steril* 2010;93:1327–1332.
116. Bage R, Bosu WT, Rodriguez-Martinez H.. Ovarian Follicle Apoptosis at the Onset of Standing Estrus in Virgin and Repeat-Breeder Dairy Heifers. *Theriogenology*. 2001; 56:699–712.
117. Odacı E, Özyılmaz C. Exposure to a 900 MHz Electromagnetic Field for 1 Hour a Day over 30 Days does Change the Histopathology and Biochemistry of the Rat Testis. *Int J Radiat Biol*. 2015 Jul;91(7):547-54.
118. Sun, Y. I., Oberley, L. W., & Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, 34(3), 497-500.
119. Aebi H, (1987). *Methods of Enzymatics Analysis*. 3: 273-285.
120. Mihara M, Uchiyama M (1978). Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86: 271.
121. Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
122. Brock, N., & Wilmanns, H. (1958). Effect of a cyclic nitrogen mustard-phosphamidester on experimentally induced tumors in rats; chemotherapeutic effect and pharmacological properties of B 518 ASTA. *Deutsche Medizinische Wochenschrift (1946)*, 83(12), 453-458.
123. Plowchalk, D. R., & Mattison, D. R. (1991). Phosphoramidate mustard is responsible for the ovarian toxicity of cyclophosphamide. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 107(3), 472-481.
124. Madden, J. A., & Keating, A. F. (2014). Ovarian xenobiotic biotransformation enzymes are altered during phosphoramidate mustard-induced ovotoxicity. *Toxicological Sciences*, 141(2), 441-452.
125. Hahn, K. M., Johnson, P. H., Gordon, N., Kuerer, H., Middleton, L., Ramirez, M., ... & Theriault, R. L. (2006). Treatment of pregnant breast cancer patients and outcomes of children exposed to chemotherapy in utero. *Cancer*, 107(6), 1219-1226.
126. Van Putten, L. M., Lelieveld, P., & Kram-Idsenga, L. K. (1972). Cell-cycle specificity and therapeutic effectiveness of cytostatic agents. *Cancer Chemotherapy Reports*, 56(6), 691-700.

127. Potnuri, A. G., Allakonda, L., & Lahkar, M. (2018). Crocin attenuates cyclophosphamide induced testicular toxicity by preserving glutathione redox system. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 101, 174-180.
128. Ghobadi, E., Moloudizargari, M., Asghari, M. H., & Abdollahi, M. (2017). The mechanisms of cyclophosphamide-induced testicular toxicity and the protective agents. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 13(5), 525-536.
129. Abd El Tawab, A. M., Shahin, N. N., & AbdelMohsen, M. M. (2014). Protective effect of *Satureja montana* extract on cyclophosphamide-induced testicular injury in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 196-205.
130. Ahmed, L. A., El-Maraghy, S. A., & Rizk, S. M. (2015). Role of the KATP channel in the protective effect of nicorandil on cyclophosphamide-induced lung and testicular toxicity in rats. *Scientific Reports*, 5(1), 14043.
131. Novin, M. G., Golmohammadi, M. G., Sagha, M., Ziai, S. A., Abdollahifar, M. A., & Nazarian, H. (2020). Protective effect of gallic acid on testicular tissue, sperm parameters, and DNA fragmentation against toxicity induced by cyclophosphamide in adult NMRI mice. *Urology Journal*, 17(1), 78-85.
132. Overbeek, A., van den Berg, M. H., van Leeuwen, F. E., Kaspers, G. J., Lambalk, C. B., & van Dulmen-den Broeder, E. (2017). Chemotherapy-related late adverse effects on ovarian function in female survivors of childhood and young adult cancer: a systematic review. *Cancer Treatment Reviews*, 53, 10-24.
133. Miller III, J. J., Williams, G. F., & Leissring, J. C. (1971). Multiple late complications of therapy with cyclophosphamide, including ovarian destruction. *The American Journal of Medicine*, 50(4), 530-535.
134. Fries, J. F., Sharp, G. C., Mcdevitt, H. O., & Holman, H. R. (1973). Cyclophosphamide therapy in systemic lupus erythematosus and polymyositis. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 16(2), 154-162.
135. Koyama, H., Wada, T., Nishizawa, Y., Iwanaga, T., Aoki, Y., Terasawa, T., ... & Wada, A. (1977). Cyclophosphamide-induced ovarian failure and its therapeutic significance in patients with breast cancer. *Cancer*, 39(4), 1403-1409.
136. Van Deng, J., Zhong, Y. F., Wu, Y. P., Luo, Z., Sun, Y. M., Wang, G. E., ... & He, R. R. (2018). Carnosine attenuates cyclophosphamide-induced bone marrow suppression by reducing oxidative DNA damage. *Redox biology*, 14, 1-6.

137. Morgan, S., Anderson, R. A., Gourley, C., Wallace, W. H., & Spears, N. (2012). How do chemotherapeutic agents damage the ovary?. *Human Reproduction Update*, 18(5), 525-535.
138. Gui, H., Jin, Y., Lin, A., Wang, P., Wang, Y., & Zhu, H. (2021). Rosmarinic acid relieves cisplatin-induced ovary toxicity in female mice via suppression of oxidative stress and inflammation. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 35(9), e22839.
139. Biskup, I., Golonka, I., Sroka, Z., & Gamian, A. (2013). Antioxidant activity of selected phenols estimated by ABTS and FRAP methods. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine*, 67, 958-963.
140. Alavi Rafiee, S., Farhoosh, R., & Sharif, A. (2018). Antioxidant activity of gallic acid as affected by an extra carboxyl group than pyrogallol in various oxidative environments. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120(11), 1800319.
141. Curtis JJ. Cyclophosphamide. In: Kaplan B, Burkhart GJ, Lakkis FG, editors. *Immunotherapy in Transplantation: Principles and Practice* [Internet]. 1st ed. John Wiley & Sons, Inc.; 2012 [cited 2020 Feb 28]. p. 290–5.
142. Liu, H., Zhang, Y., Li, M., & Luo, P. (2019). Beneficial effect of *Sepia esculenta* ink polysaccharide on cyclophosphamide-induced immunosuppression and ovarian failure in mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 140, 1098-1105.
143. Kim, J., & You, S. (2021). Extended adverse effects of cyclophosphamide on mouse ovarian function. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 22, 1-10.
144. Nair, D. V., Rani, M. U., Reddy, A. G., Kumar, B. K., Reddy, M. A., Lakshman, M., & Rajkumar, U. (2020). Protective effect of alpha-lipoic acid and omega-3 fatty acids against cyclophosphamide-induced ovarian toxicity in rats. *Veterinary World*, 13(1), 188.
145. Ezoe, K., Murata, N., Yabuuchi, A., Okuno, T., Kobayashi, T., Kato, O., & Kato, K. (2014). Long-term adverse effects of cyclophosphamide on follicular growth and angiogenesis in mouse ovaries. *Reproductive Biology*, 14(3), 238-242.
146. Mazloom, B. F., Edalatmanesh, M. A., & Hosseini, S. E. (2019). Gallic acid reduces inflammatory cytokines and markers of oxidative damage in a rat model of estradiol-induced polycystic ovary. *Comparative Clinical Pathology*, 28, 1281-1286.

147. Ayazoglu Demir, E., Mentese, A., Livaoglu, A., Turkmen Alemdar, N., & Demir, S. (2023). Ameliorative effect of gallic acid on cisplatin-induced ovarian toxicity in rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 46(1), 97-103.
148. Torino, F., Barnabei, A., De Vecchis, L., Sini, V., Schittulli, F., Marchetti, P., & Corsello, S. M. (2014). Chemotherapy-induced ovarian toxicity in patients affected by endocrine-responsive early breast cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 89(1), 27-42.
149. Khedr, N. F. (2015). Protective effect of mirtazapine and hesperidin on cyclophosphamide-induced oxidative damage and infertility in rat ovaries. *Experimental Biology and Medicine*, 240(12), 1682-1689.
150. ul haq Shah, M. Z., Soni, M., kumar Shrivastava, V., Mir, M. A., & Muzamil, S. (2022). Gallic acid reverses ovarian disturbances in mice with letrozole-induced PCOS via modulating Adipo R1 expression. *Toxicology Reports*, 9, 1938-1949.
151. Xu, X., Wang, J., Jin, X., Ma, Q., Li, H., Zhou, Q., & Chen, W. (2024). Bu-Shen-Ning-Xin decoction ameliorates premature ovarian insufficiency by suppressing oxidative stress through rno_circRNA_012284/rno_miR-760-3p/HBEGF pathway. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 133, 155920. Advance online publication.
152. W. Chen, Y. Tan. Clinical study on Bushen Ningxin Prescription for early-onset ovarian insufficiency of non-interaction between heart and kidney type. *J. N. Chinese Med.*, 52 (2020), pp. 76-79.