

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**DOXORUBİCİN İLE OLUŞTURULAN OVARYUM
TOKSİSİTESİ ÜZERİNE FARKLI DOZ SELENYUMUN
ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Hazırlayan
Özge CENGİZ**

**Danışman
Doç. Dr. Arzu YAY**

Yüksek Lisans Tezi

**Temmuz 2019
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**DOXORUBİCİN İLE OLUŞTURULAN OVARYUM
TOKSİSİTESİ ÜZERİNE FARKLI DOZ SELENYUMUN
ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Hazırlayan
Özge CENGİZ**

**Danışman
Doç. Dr. Arzu YAY**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından TYL-2018-8365 nolu proje kodu ile projelendirilmiştir.**

**Temmuz 2019
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Özge CENGİZ

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

''Doxorubicin İle Oluşturulan Ovaryum Toksisitesi Üzerine Farklı Doz Selenyumun Etkilerinin Değerlendirilmesi'' adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi 'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Özge CENGİZ

Danışman

Doç. Dr. Arzu YAY

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Birkan YAKAN

Doç. Dr. Arzu YAY danışmanlığında **Özge CENGİZ** tarafından hazırlanan **“Doxorubicin İle Oluşturulan Ovaryum Toksisitesi Üzerine Farklı Doz Selenyumun Etkilerinin Değerlendirilmesi”** konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

...../...../.....

JÜRİ

Danışman : Doç. Dr. Arzu YAY

Erciyes Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Birkan YAKAN

Erciyes Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Tülay MORTAŞ

Kırıkkale Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

.....

.....

.....

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca benden hiçbir konuda desteğini esirgemeyen, bilgisini ve deneyimlerini her zaman paylaşan, çalışmalarımda benimle birebir ilgilenen, yalnızca bir danışman olarak değil hayatın her anlamında bana destek olan, asla pes etmemeyi öğreten çok değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Arzu YAY'a sonsuz teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimimde desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız saygıdeğer hocam Prof. Dr. Birkan YAKAN'a, bilgisini ve güler yüzünü eksik etmeyen Uzm. Dr. Esra BALCIOĞLU'na, biyokimya çalışmalarımda içtenliğiyle bana yol gösteren Öğr. Gör. Dr. Didem BARLAK KETİ'ye, deney çalışmalarım boyunca birlikte mesailer yaptığımız tez yoldaşım Araş. Gör. Betül YALÇIN'a, uzakta da olsa bir telefonla bana her zaman yardımcı olan sevgili arkadaşım Öğr. Gör. Ayşe CEYHAN'a, çalışmaktan ve bir arada olmaktan keyif aldığım tüm ekip arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her anımda yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, sonsuz sevgi ve emekleriyle beni bugünlere getiren, bana verdikleri desteğin gücünü omzumda güçlü ellerini hissettiğim annem Öznur CENGİZ, babam Nebi CENGİZ'e, her gün yaparsın sen diyerek beni yüreklendiren kardeşlerim Esra, Berna ve Aylin'e, cesaretimi canlı tutan kuzenim Seda'ya sonsuz teşekkürler.

Özge CENGİZ

Kayseri, Temmuz 2019

DOXORUBİCİN İLE OLUŞTURULAN OVARYUM TOKSİSİTESİ ÜZERİNE FARKLI DOZ SELENYUMUN ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Özge CENGİZ

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 2019
Danışman: Doç. Dr. Arzu YAY

ÖZET

Doxorubicin, meme kanseri, mesane kanseri ve lenfoma da dahil olmak üzere çeşitli malignitelerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan antrasiklin türevi bir ilaçtır. Selenyum ise temel biyolojik fonksiyonlara sahip bir oligoelement olup, en yaygın olarak incelenen kimyasal önleyici bileşiklerden biridir. Bu çalışmada doxorubicinin ovaryumda oluşturacağı toksisiteye karşı antioksidan özellikte olan selenyumun farklı dozlarının olası koruyucu etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada 64 adet dişi sıçan her grupta 8 adet olacak şekilde; kontrol, DOX (5 mg/kg ip), SEL-1 (0.5 mg/kg ip), SEL-2 (1 mg/kg ip), SEL-3 (2 mg/kg ip), DOX + SEL-1 (5 mg /kg dox ip + 0.5 mg/kg sel ip), DOX + SEL-2 (5 mg/kg dox ip + 1 mg/kg sel ip) ve DOX + SEL-3 (5 mg/kg dox ip + 2 mg/kg sel ip) gruplarına ayrıldı. Deney sonunda, ovaryum dokuları eksize edildi ve %10'luk formaldehit içinde fikse edilerek rutin histolojik doku takibi basamaklarından geçirilerek parafin bloklar hazırlandı. Dokulardan 5µm kalınlığında seri kesitler alınarak histopatolojik değerlendirme için Hematoksilen&Eozin ve Masson trikrom ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Ovaryum dokularında AMH, IL1-β ve TNF-α immünreaktiviteyi immunohistokimyasal metod ile belirlendi. Caspase-3 primer antikoru ile apoptotik hücreler sayıldı. MDA, CAT, SOD ve GSH-Px düzeyleri ise ELISA yöntemi ile belirlendi.

Histopatolojik bulgular DOX'un oluşturduğu ovaryum hasarı üzerine farklı doz selenyum uygulanan gruplardan DOX+SEL-2'nin hem histopatolojik hem de folikül rezervi üzerine daha koruyucu özellik sergilediğini gösterdi. Ayrıca DOX, gelişmekte olan foliküllerde AMH immünreaktivitesinde düşüşe sebep olurken, IL1-β ve TNF-α immünreaktivitelerinde ve Caspase-3 pozitif apoptotik hücre sayısında ise artışa neden olarak ovaryumda hasara yol açtığı görüldü. DOX ve selenyumun birlikte uygulandığı gruplarda DOX+SEL-2 grubunda IL1-β ve TNF-α immünreaktivite yoğunlukları kontrole yakın olarak gözlenirken, Caspase-3 pozitif apoptotik hücre sayısındaki en belirgin azalış DOX+SEL-1 grubu olarak belirlendi. Biyokimyasal bulgularımız DOX verdiğimiz sıçanlarda oksidatif stres faktörlerinin artmasına bağlı olarak CAT, SOD ve GSH-Px gibi antioksidan olan enzimlerinin sentezinin azaldığı, buna rağmen MDA düzeyinin ise arttığını gösterdi.

Çalışmamızdan elde edilen histolojik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal sonuçlara göre, kemoterapi tedavisi sırasında antioksidan olarak selenyum alımının oluşabilecek serbest radikalleri en az düzeye indirerek, ovaryum histolojisinin korunmasında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca yüksek doz selenyum uygulamasının ovaryumda toksik etkiye yol açtığı gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Doxorubicin, Selenyum, Ovaryum, Sıçan

EVALUATION OF THE EFFECTS OF DIFFERENT DOSE SELENIUM ON DOXORUBICIN-INDUCED OVARIAN TOXICITY

Özge CENGİZ

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences
Department of Histology and Embryology
Masters's Thesis, July 2019
Advisor: Assoc. Prof. Dr. Arzu YAY

ABSTRACT

Doxorubicin is one of the commonly used anthracycline for the treatment of various malignancies, including breast cancer, bladder cancer and lymphoma. Selenium is an oligoelement with basic biological functions and is one of the most widely studied chemical inhibitor compounds. The aim of this study was to determine the possible protective effect of antioxidant different doses of selenium against toxicity which Doxorubicin will produce in the ovary.

In this study, 64 female rats were 8 in each group; control, doxorubicin (5 mg/kg ip), selenium-1 (0.5 mg/kg ip), selenium-2 (1 mg/kg ip), selenium-3 (2 mg/kg ip), doxorubicin+selenium-1 (5 mg/kg dox ip+0.5 mg/kg sel ip), doxorubicin+selenium-2 (5 mg/kg dox ip+1 mg/kg sel ip) and doxorubicin+selenium-3 (5 mg/kg dox ip+2 mg/kg sel ip) divided into groups. The tissues were excised and fixed in 10% formaldehyde and embedded in paraffin blocks through routine histological follow-up steps. Sections of 5 µm thickness were stained with Hematoxylen&Eosin and Masson trichrome for histopathological evaluation and there were examined by light microscope. AMH, IL1-β and TNF-α immunoreactivities were determined by immunohistochemical methodology.

Histopathological findings revealed DOX-induced ovarian damage and groups of DOX + SEL-2 with different saturation and this study was showed both histopathological and follicular reserve and more protective properties. In addition, DOX, AMH immunoreactivity is occurring, TNF-α and IL1-β immunoreactivity and caspase3 apoptotic positive cells caused by the increase in number of, they saw ovarian damage caused. In groups where DOX and selenium are applied together, IL1-β ve TNF-α immunoreactivity concentrations were close to the control in the DOX+SEL-2 groups and most significant decrease in Caspase-3 positive apoptotic cells was determined as DOX+SEL-1 group. Biochemical findings indicated which DOX was given, the synthesis of antioxidant enzymes such as CAT, SOD and GSH-Px decreased although increased of oxidative stress factors in rats, and MDA levels increased.

According to the histological, immunohistochemical and biochemical results obtained from in this study, chemotherapy treatment expressed the use of everyone in the preservation of ovarian histology by minimising the free radicals that can provide antioxidant and selenium intake. In addition, high dose selenium administration has been shown to cause toxic effects in ovarian.

Key words: Doxorubicin, Selenium, Ovary, Rat

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. OVARYUMUN ANATOMİK YAPISI.....	4
2.2. OVARYUMUN EMBRİYONİK GELİŞİMİ	5
2.3. OVARYUM HİSTOLOJİSİ.....	7
2.3.1. Ovaryum Korteksi	7
2.3.2. Ovaryum Medullası	8
2.3.3. Folikülogenez.....	8
2.4.DOXORUBİCİN	15
2.4.1. DOX'un Genel Özellikleri.....	15
2.4.2. DOX'un Biyokimyasal Yapısı	16
2.4.3. DOX'un Etki Mekanizması	16
2.4.4. DOX'un Yan Etkileri.....	17
2.5. ANTİOKSİDANLAR	17
2.6. SELENYUM	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Deney Hayvanları	20
3.2. Deney Grupları	20
3.3. Çalışma Planı.....	21
3.4. Histolojik Analizler.....	23
3.5. İmmunohistokimya	25
3.6. ELİSA	26

3.6.1. Ovaryum Doku Homojenatlarının Hazırlanması	26
3.6.2. Protein Tayini.....	27
3.6.3. Malondialdehit Tayini (MDA).....	27
3.6.4. Katalaz Aktivite Tayini (CAT)	27
3.6.5. Süperoksit Dismütaz Tayini (SOD).....	27
3.6.6. Glutathione Peroxidase Tayini (GSH-Px)	28
3.7. İstatistiksel Analiz	30
4. BULGULAR	31
4.1. Işık Mikroskopik Bulgular	31
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular	37
4.2.1 AMH (Anti-Müllerian Hormon)	37
4.2.2. IL1- β ve TNF- α	38
4.2.3. Caspase-3	39
4.4. Biyokimyasal Bulgular	42
4.4.1. MDA Sonuçları	42
4.4.2. CAT Sonuçları.....	43
4.4.3. SOD Sonuçları.....	44
4.4.4. GSH-Px Sonuçları.....	45
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	47
KAYNAKLAR.....	54
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	
ETİK KURUL KARARI	

KISALTMALAR ve SİMGELER

- AF** : Atretik folikül
AMH : Anti müllerian hormon
CAT : Katalaz
DOX: Doxorubicin
FSH : Folikül stimüle edici hormon
GSH-Px: Glutathione Peroxidase
H₂O₂: Hidrojen Peroksit
H&E : Hemotoksilen Eozin
I/R: İskemi reperfüzyon
IL1-β: İnterlökin 1-Beta
i.p : İntraperitoneal
kg : Kilogram
LH : Luteinizan hormon
MDA : Malondialdehit
mg : Miligram
MT : Masson trikrom
PA : Preantral folikül
PBS : Phosphate Buffer Saline
PF : Primer folikül
PGH : Primordiyal Germ Hücreleri
SEL: Selenyum
SF : Sekonder folikül
SOD : Süperoksit dismutaz
TF : Tersiyer folikül
TNF-α: Tümör nekroz faktör
µl : Mikrolitre
µm : Mikrometre

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.1: Deney grupları.....	20
Tablo 3.2: Doku Hazırlama Tekniği.....	24
Tablo 3.3: Hematoksilen & Eozin Boya Metodu.....	24
Tablo 3.4: Masson Trikrom Boya Metodu	25
Tablo 4.1: Gruplardaki folikül sınıfları ve folikül sayılarının istatistiksel analizi.....	36
Tablo 4.2: Tüm deney gruplarına ait primer, preantral, sekonder foliküllerde AMH immünreaktivite yoğunluklarının istatistiksel analizi.....	38
Tablo 4.3: Tüm deney gruplarına ait IL1- β ve TNF- α immünreaktivite yoğunluklarının istatistiksel analizi.....	39
Tablo 4.4: Tüm deney gruplarına ait Caspase-3 pozitif apoptotik hücre sayısının istatistiksel analizi.....	40
Tablo 4.5: Tüm deney gruplarına ait MDA değerlerinin istatistiksel analizi	43
Tablo 4.6: Tüm deney gruplarına ait CAT değerlerinin istatistiksel analizi	44
Tablo 4.7: Tüm deney gruplarına ait SOD değerlerinin istatistiksel analizi	45
Tablo 4.8: Tüm deney gruplarına ait GSH-Px değerlerinin istatistiksel analizi.....	46

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Dişi genital sistem.....	4
Şekil 2: A.Yolk kesesi duvarında bulunan PGH B. PGH göç yolları	6
Şekil 3: Ovaryumun şematik çizimi	8
Şekil 4: Primordiyal Folikül.....	9
Şekil 5: Primer Folikül	10
Şekil 6: Unilaminer primer folikül ve multilaminer primer folikül	11
Şekil 7: Sekonder Folikül	12
Şekil 8: Tersiyer Folikül	13
Şekil 9: DOX'un kimyasal yapısı.....	16
Şekil 3.1: Hayvanlar uygun koşullarda barındırıldı	22
Şekil 3.2: Uygulama öncesi DOX hazırlandı.....	22
Şekil 3.3: Ovaryum dokuları çıkarıldı	23
Şekil 3.4: Stop solution eklendi	29
Şekil 3.5: Microplate okuyucu ile 450 nm'de okutuldu	29
Şekil 4.1. Deney gruplarına ait ovaryum örneklerinin ışık mikroskopik görünümü.....	34
Şekil 4.2. Deney gruplarına ait ovaryum kesitlerinde AMH, IL1- β ve TNF- α ekspresyonu, Caspase-3 immunohistokimyasal boyama görüntüleri, (X40)	41
Şekil 4.3. Malondialdehit (MDA) Standart Curve Eğrisi	42
Şekil 4.4. Katalaz (CAT) Standart Curve Eğrisi	43
Şekil 4.5. Süperoksit Dismütaz (SOD) Standart Curve Eğrisi.....	44
Şekil 4.6. Glutathione Peroxidase Tayini (GSH-Px) Standart Curve Eğrisi.....	45

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kadınlarda doğurganlık kaybının en yaygın nedenleri, ovaryum yaşlanması ve sitotoksik tedavilerdir. ABD’de yapılan son çalışmalara göre her yıl yaklaşık 700.000 kadına kanser teşhisi konmaktadır. %8’i 40 yaşın altında olan bu kadınlar yoğun sitotoksik tedavilere bağlı olarak infertilite riski altındadır. Çocukluk, ergenlik ve yetişkin çağlarda görülen birçok malignitelerin tanı ve tedavisinde kaydedilen ilerlemeler, tedavi etkinliğini ve sağ kalım oranlarını çarpıcı bir şekilde artırmıştır. Bu artışla birlikte özellikle genç kadınlarda radyoterapi ve kemoterapi öncesi doğurganlığı korumaya yönelik strateji ve yöntemlerin önemi giderek artmıştır (Salama ve ark., 2013). Kemoterapi, immünoterapi, radyoterapi ve cerrahi olmak üzere birçok yöntem kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Kanserli hücrelerin kemoterapi ile yok edilmesi hedeflenirken öte yandan normal hücreler ile kanser hücreleri arasında bulunan benzerlikten dolayı sağlıklı hücrelerin de zarar görmesi söz konusudur. Kanser tedavisinde uygulanan kemoterapötik ajanlar kansere bağlı ölümleri azaltsada, uzun dönem sağ kalımlarda kardiyovasküler problemler, büyüme-gelişme problemleri ve sekonder malign tümörlerin gelişmesine sebep olarak yaşam kalitesini etkilemektedirler (Cascatio ve Lowitz, 2007). Kemoterapötik ajanlar üreme organları üzerinde toksik etkilere sahiptir. Bu organlardan biri olan ovaryumlar, kemoterapötik ajanlara son derece duyarlıdır. Kemoterapi, oosit, teka ve granüloza hücre hasarına, foliküler havuzdaki primordiyal foliküllerin sayısında azalmaya ve erken ovarian yetmezliğe neden olur. Kemoterapik ajanlar ve radyoterapi gonadları tahrip ederek doğurganlık kaybına ve erken menopoza neden olabilir (Kim, 2006; Sönmezer ve Özkavukçu, 2009).

Kemoterapötik bir ajan olarak bilinen anti-neoplastik aktiviteye sahip doxorubicin (DOX), çeşitli solid malignitelerin tedavisinde etkili ve yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Etkinliği doza bağlı olarak böbrek, miyokard ve kemik iliği toksisiteleri ile sınırlıdır (Heeba ve Mahmoud, 2014). DOX ile yapılan tedavilerde amenore gelişme riski, kadının yaşına bağlı olarak %20 ile %80 arasında değişmektedir.

Bir antrasiklin ajanı olan DOX, oositlerde apoptozisi uyardığı gösterilmiş olmasına rağmen, antrasiklinlerin over yetmezliğini indüklemadaki rolü belirsizliğini sürdürmektedir (Ben-Aharon ve ark., 2010). DOX antitümör etkisine rağmen, oksidatif stres ve toksik reaktif oksijen türlerinin oluşması ilaç toksisitesinin ana nedenleridir. Dolayısıyla ilaç kullanımının güçlü antioksidan ajanlarla birlikteki kombinasyonu, DOX'un toksik yan etkilerini azaltmak için uygun bir yaklaşım olabilir (Lee ve ark., 2012).

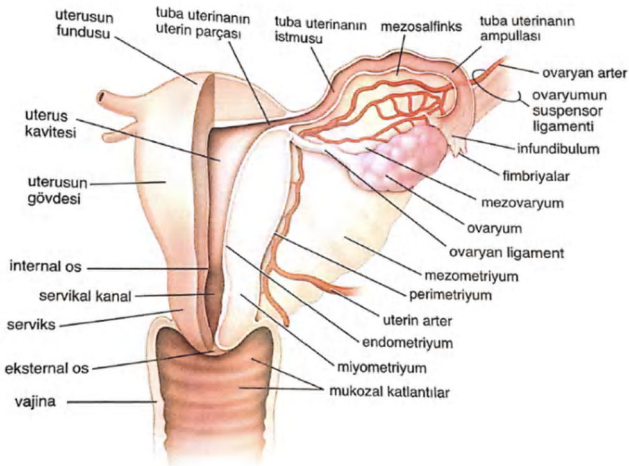
Selenyum, temel biyolojik fonksiyonlara sahip bir oligoelement olup, en yaygın olarak incelenen kimyasal önleyici bileşiklerden biridir. Gıdalar (tahıllar, sebzeler) selenyumun çeşitli miktar ve kimyasal formlarını içerir. Yeterli bir selenyum alımı günde 50 µg olarak tahmin edilmekte ve toksik düzeylerin 350-700 µg/gün civarında alımı ile oluştuğu tahmin edilmektedir. Selenyum birçok hücrel süreç için önemlidir, çünkü bazı kanser türlerinin önleyici fonksiyonu olan birkaç selenoproteinin bir bileşenidir. Düşük dozlarla selenyum takviyesi, sadece kanser önleme için yararlı görünmektedir, aynı zamanda iltihapları, kalp hastalıklarını azaltarak ve kan basıncını düzenleyerek bir organizmadaki diğer birçok fonksiyonu olumlu yönde etkileyebilir (Sanmartín ve ark., 2012). İnsanlarda biyolojik birçok işleve sahip olan selenyumun en önemli ve bilinen özelliği antioksidan etkisidir. Selenyumun reaktif oksijen radikallerini yıkarak oksidatif hasarı önlemesine dair pek çok çalışma mevcuttur (Simonoff ve ark., 1992). Selenyum ile ilgili çalışmalar, besinlerdeki ve çevredeki seviyelerine bağlı olarak insanlarda kullanılmasından dolayı artmıştır. Bu elementin kanser, diabet, siroz, kalp ve damar rahatsızlıklarını tedavi etmek veya önlemek için günlük alımının ne kadar olacağına dair çeşitli farklı görüşler vardır. Birçok hayvan çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre bazı dejeneratif hastalıklara karşı besinsel bir faktör olarak kullanılan selenyumun koruyucu etkisinin olabileceği gösterilmiştir (Gebre-Medhin ve ark., 1984).

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda; çeşitli malignitelerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan DOX'un ovaryumda oluşturacağı toksisiteye karşı antioksidan özellik gösteren selenyumun farklı dozlarının olası koruyucu etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. OVARYUMUN ANATOMİK YAPISI

Dişi üreme hücresi olan dişiye özgü seks hormonlarını (östrojen ve progesteron) ve ovumu üretmekle görevli ovaryumlar erkek üreme sistemindeki testislerin karşılığıdır. Pelvis minor içerisinde a.iliaca interna ve a.iliaca externa arasında bulunan çukurlukta (fossa ovarica) yerleşmişlerdir. Pembemsi gri renkli olan ovaryumların dış yüzeyi ergenlik çağından önce düzgün iken ergenlikten sonra ovulasyona bağlı olarak pürüzlü bir şekil alır. Badem büyüklüğündeki ovaryumlar 4 cm uzunluğunda, 1 cm kalınlığında, 2 cm genişliğinde ve yaklaşık olarak 5gr ağırlığındadır. Ovaryumun facies lateralis ve facies medialis olmak üzere iki yüzü, margo liber ve margo mesovaricus olmak üzere iki kenarı ve extremitas tubaria ve extremitas uterina olmak üzere iki ucu vardır. Ovaryumu besleyen damarların (a.v. ovarica) etrafını periton sardığı için bir ligament şeklini almıştır. Lig.ovari suspensorium denilen bu ligament ovaryumu asıncı bir rol üstlenmiştir. Ovaryumun uterusu bakan ucu (extremitas uterina) ile uterusun üst dış köşesi arasında uzanan bağa lig.ovari proprium denir. Bu bağ sayesinde hamile bir kadında uterus ile birlikte ovaryumun konumu da değişir (Unur E ve ark., 2016).



Şekil 1: Dişi genital sistem (Ross ve Pawlina, 2014)

2.2. OVARYUMUN EMBRİYONİK GELİŞİMİ

Embriyonun kromozomal ve genetik olarak cinsiyeti, sekonder oositi dölleyen sperm çeşidine bağlı olarak fertilizasyon esnasında belirlenir. Ancak gonadların erkek ve dişiliğe (testisler ve ovaryumlar) farklılaşmaları 7.haftada gerçekleşir ve gonadal cinsiyet XX, XY cins kromozom kompleksine bağlıdır. Bu nedenle genital gelişimin başlangıç evresi, farklılaşmamış dönem olarak adlandırılmaktadır (Şeftalioğlu, 2003).

Gonadlar (testis ve ovaryumlar) üç kaynaktan köken alarak gelişirler (Moore, 2009):

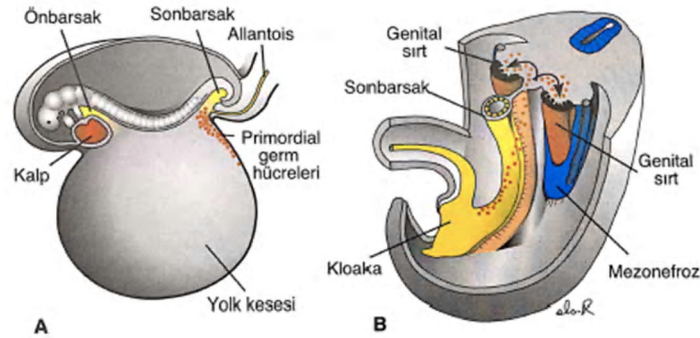
1. Karın arka duvarını örten sölom epiteli
2. Altta uzanan mezenşim (embriyonik bağ dokusu)
3. Primordiyal germ hücreleri (PGH)

Gonadal gelişim, ilk kez gelişimin 5.haftasında, mezonefrozun medialinde gerçekleşir. Sölom epitelinin proliferasyonu ve alttaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla, uzunluğuna iki adet gonadal ya da genital kabartı (sırt) meydana gelir (Şeftalioğlu, 2003).

Genital sırtlar içinde germ hücreleri, gelişimin 6.haftasına kadar görülmez. Primordiyal germ hücreleri (PGH) epiblast kökenlidir ve primitif çizgi boyunca göç ederek üçüncü haftada allantoise yakın yol kesesi endoderm hücreleri arasında görülmeye başlarlar. Gelişimin 4.haftasında ameboid hareketlerle son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerleyerek 5.haftanın başında ilkel gonadlara ulaşırlar. 6.haftada ise gonadal kabartıları işgal ederler. PGH'nin gonadlara ulaşmasından hemen önce ve ulaşması esnasında, genital kabartının sölom epiteli proliferer olur ve epitel hücrelerinin altındaki mezenşimin içine yayılırlar (Şekil.2). Bu yapılar primitif cinsiyet kordonları olarak adlandırılan düzensiz şekilli kordonları oluştururlar (Sadler, 2017). Erkek ve dişi embriyolarda bu kordonlar yüzey epiteliyle bağlantılıdır ve 7.haftadan önce, her iki cinsten de gonadlar benzerlik gösterir. Bu nedenle gonadlar farklılaşmamış gonad olarak adlandırılmaktadırlar (Şeftalioğlu, 2003).

Farklılaşmamış gonadlar, artık dışta bir korteks ile içte bir medulladan meydana gelmektedir. Embriyo XX cinsiyet kromozomuna sahipse, farklılaşmamış gonadın korteksi over yönünde değişim gösterir ve medulla geriler. Eğer embriyo XY cinsiyet kromozomuna sahipse, medulla testise farklılaşır ve korteks birtakım kalıntılar dışında geriler (Moore, 2009).

PGH'nin gonadlar üzerine indüktif etkileri vardır. Gonadal kabartılara ulaşamadıklarında ne testisler ne de ovaryumlar gelişemezler (Şeftalioğlu, 2003).



Şekil 2: A. Yolk kesesi duvarında bulunan PGH B. PGH göç yolları (Sadler, 2017)

PGH, büyük, oval veya yuvarlak şekilli, çapı 15-20 µm olan hücrelerdir. Nükleusları ekzantrik yerleşim gösterir ve kromatinleri belirgindir, nükleoplazma eşit miktarda yayılmıştır ve bir veya iki adet iri nükleolus içerir. PGH çok sayıda ribozomlara ve büyük mitokondrilere sahiptir. Golgi kompleksine ait veziküller ve ER sisternaları nadir olarak bulunur. Bunlarla birlikte insan PGH'nin sitoplazmalarında glikojen partikülleri ve lipit damlacıkları yaygın olarak bulunur. PGH'nin göçü esnasında lipit damlacıkları ve glikojen partikülleri enerji kaynağı olarak kullanılır (Motta ve ark., 1997; Drews ve ark., 2000; Pereda ve ark., 2006; Öktem Ö ve Oktay K., 2008a).

Gonadal gelişim dişilerde yavaş gerçekleşmektedir. Gelişimin 10.haftasına kadar ovaryumlar histolojik olarak ayırt edilemezler (Moore, 2009).

Y kromozomunun kısa kolu üzerinde bulunan SRY geninin etkisiyle fetusun cinsiyeti erkek yönünde gelişir. Y kromozomu yokluğunda XX cinsiyet kromozomuna sahip dişi embriyolarda, primitif cinsiyet kordonları düzensiz şekilli hücre kümelerine ayrılırlar. Primitif germ hücre grupları içeren bu kümeler, ovaryumun daha çok medullasında yerleşim gösterirler (Sadler, 2017). Medulla içine uzanan gonadal kordonlar rudimenter bir rete ovarii oluştururlar (Moore, 2009). Bu hücreler bir süre sonra, kaybolarak yerlerini damarlı bir stromaya (ovarian medulla) bırakırlar. Erkeklerdekinin aksine dişi gonadın yüzey epiteli çoğalmaya devam eder. Bu epitelten 7.haftada kortikal kordonlar denilen ikinci nesil kordonlar gelişir (Sadler, 2017). Fetal dönemde ikinci nesil

kordonlar, gonadın yüzeyindeki sölom epitelinden başlayarak altındaki mezenşim içine doğru girerler. Kortikal kordonlar sölom epitelinin proliferasyonu ile kalınlaşırken, PGH kordonların içerisine karışırlar (Şeftalioğlu, 2003). Bu kordonlar yaklaşık 16. haftada, tek tabaka foliküler hücre ile sarılmış bir oogonyum içeren, primordiyal folikül adı verilen izole hücre gruplarına ayrılırlar. Fötal yaşam boyunca, binlerce oogonyum aktif mitozla üretilir (Moore, 2009). Doğumdan önce oogonyumların bir kısmı dejenere olurken, büyük bir kısmı hacimce büyüyerek primer oositi yaparlar (Şeftalioğlu, 2003).

2.3. OVARYUM HİSTOLOJİSİ

Ovaryumlar, bir çift badem şeklinde, pembemsi beyaz renkli, 1,5 cm eninde, 3 cm boyunda ve 1 cm kalınlığındaki yapılardır. Ovaryum yüzeyi, tek katlı yassı epitelden kübiğe doğru değişen bir epitel ile döşelidir. Germinal epitel olarak bilinen bu tabaka mezovaryumu kaplayarak mezotelyum ile süreklilik sağlar (Ross ve Pawlina, 2014). Elektron mikroskopunda epitelin periton boşluğuna bakan yüzeyinde mikrovilluslar, az sayıda kinosilyumlar bulunur. Epitel sitoplazmalarında mitokondriyonlar ve pinositoz vezikülleri yaygın olarak bulunmaktadır. Bazal yüzü, bazal lamina ve altındaki sıkı bağ dokusundan yapılan tunika albuginea üzerine oturur (Tekelioğlu, 2002). Fibröz bağ dokusu yapısındaki tunika albuginea, tüm ovaryumu kapsül gibi sarar (Ovalle ve Nahirney, 2009).

Ovaryumlar iki kısımdan oluşur; dışta korteks, içte medulla. Histolojik olarak birbirlerinden farklı olan iki bölüm arasında net bir sınır bulunmaz (Eşrefoğlu, 2016). Korteks zengin bağ dokusu yapısındadır, matürasyonun ve dejenerasyonun farklı evrelerinde, oosit içeren farklı boyutlardaki ovaryum folikülleri bulunur. Sınırları belirgin olmayan medulla ise; çok sayıda kan damarları, lenfatikler ve sinirleri içeren gevşek bağ dokusu yapısındadır (Ovalle ve Nahirney, 2009).

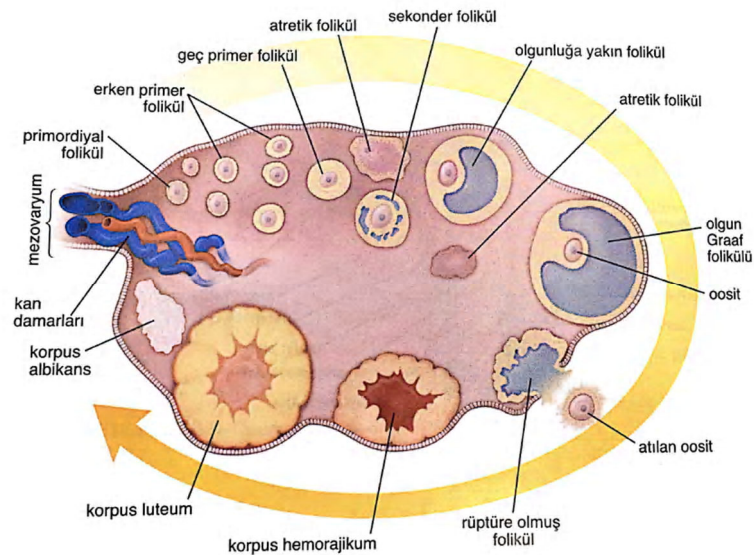
2.3.1. Ovaryum Korteksi

Ovaryumun periferik bölgesinde medullayı çevreleyecek şekilde korteks yer almaktadır. Korteks, selüler bağ dokusunda ovaryum foliküllerini içerir (Ross ve Pawlina, 2014). Korteks de puberteden önce sadece primordiyal foliküller gözlenirken, puberteden sonra primer, sekonder ve tersiyer olmak üzere gelişen foliküllere rastlanır. Seksüel olgunluk döneminde ise korteks de foliküllerden başka, korpus luteum, korpus albicans ve atretik

foliküllerde görülür (Eşrefoğlu, 2016). Korteks, kollajen lifler, retiküler lif ağları, damar duvarında bulunan elastin lameller ve ince-uzun mekik şeklindeki stroma hücrelerinden meydana gelir. Stroma hücreleri, fibroblastlardan farklı olarak hormon salgılayan teka interna hücrelerine dönüşebilen ayrıcalıklı hücrelerdir (Tekelioğlu, 2002).

2.3.2. Ovaryum Medullası

Ovaryumun merkezi bölgesidir ve gevşek bağ dokusu, kan damarları, lenf damarları ve sinirleri içerir (Ross ve Pawlina, 2014). Ovaryum medullasında foliküller bulunmaz (Eşrefoğlu, 2016). Ayrıca medullada oksidasyon enzimleri ve diğer enzimleri içeren hücreler bulunur. Bunların sayıları yaşla artar ve menopozda %80 oranında bulunurlar (Tekelioğlu, 2002).



Şekil 3: Ovaryumun şematik çizimi (Ross ve Pawlina, 2014)

2.3.3. Folikülogenez

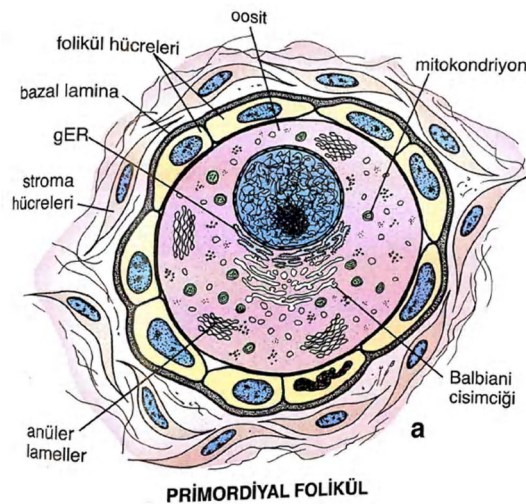
Histolojik olarak 3 tip folikül tanımlanmıştır;

1. Primordiyal folikül
2. Gelişmekte olan (primer, preantral ve sekonder) folikül
3. Olgun folikül (graaf, tersiyer folikülleri)

Folikülogenez ise, primordiyal folikülden başlayıp tersiyer folikül oluşumuna kadar gerçekleşen gelişim sürecidir. Bu süreçte folikül çapının artmasıyla birlikte hücresel özellikler de değişir. Folikül çevresini kuşatan bağ dokusunda da fonksiyonel ve histolojik değişiklikler gözlenir (Eşrefoğlu, 2016).

1. Primordiyal foliküller

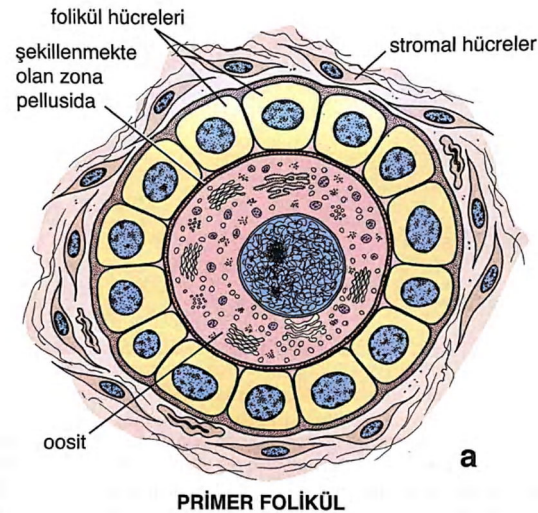
Folikül gelişiminin en erken evresi olan primordiyal foliküller fetal gelişimin 3. ayında ortaya çıkarlar. Primordiyal foliküller, olgun ovaryumda kortekste tunika albugenianın hemen altında yer alırlar. Tek tabaka halinde yassı foliküller oositi çevrelemektedir. Foliküllerin dış yüzeyi bazal lamina ile sınırlandırılmıştır (Ross ve Pawlina, 2014). Primordiyal folikülün içerisindeki oositin çapı yaklaşık 25 μm ' dir ve 1. mayozun profazındaki kromozomları içeren iri bir çekirdeği vardır. Çekirdek yakınında yoğunlaşan organeller, bol mitokondri, birkaç Golgi kompleksi ve yaygın GER içerir (Mescher, 2015). Golgi aygıtının veziküllerinin ve membranlarının, GER keselerinin, mitokondrilerin ve lizozomların yoğunlaştığı sitoplazma bölümleri ışık mikroskobik düzeyde Balbiani cisimleri olarak görülür (Eşrefoğlu, 2016). Ovaryumda tunika albuginea altında bulunan primordiyal foliküller hem embriyonda hem de doğumdan sonra atreziye uğrarlar. Erkeklerden farklı olarak sadece embriyonal hayatta kalırlar (Tekelioğlu, 2002).



Şekil 4: Primordiyal Folikül (Ross ve Pawlina, 2014)

2. Gelişmekte olan (primer, preantral ve sekonder) folikül

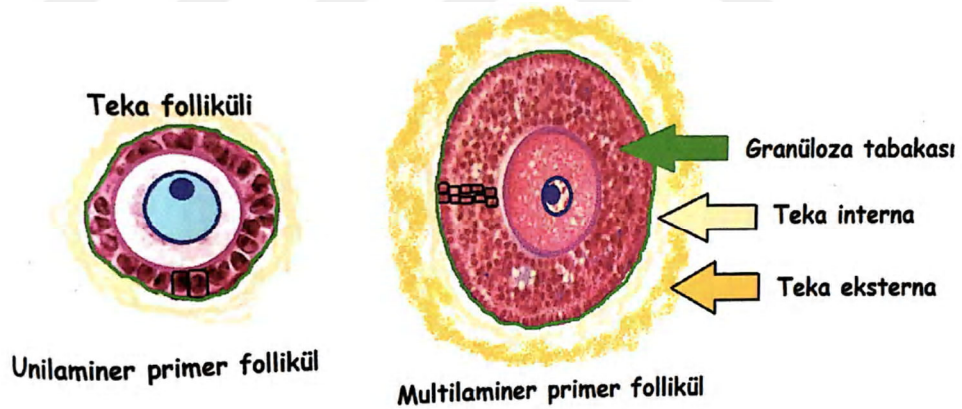
1. **Primer folikül:** Oosit büyümeye devam ederken çevresindeki yassı epitel hücreler önce kübik, sonra prizmatik hücrelere dönüşür ve tek katlı primer folikül olarak isimlendirilir (Tekelioğlu, 2002). İmmatür oosit büyürken çevresine glikozaminoglikanları ve glikoproteinleri salgılar. PAS ile pozitif boyanan bu bölgeye zona pellusida denir. Oosit yaklaşık 50-80 µm çapına ulaştığında zona pellusida görülmeye başlar. Foliküler hücreler de zona pellusida oluşumuna katkı sağlar (Eşrefoğlu, 2016). Zona pellusida elemanları olan ZP3 ve ZP4, sperm yüzeyindeki özgül proteinlere bağlanan ve akrozomal reaksiyonu uyaran sperm reseptörleridir (Mescher, 2015).



Şekil 5: Primer Folikül (Ross ve Pawlina, 2014)

2. **Preantral folikül:** Foliküler hücreler, granüloza denilen hücrelerin gap junctionlarla bağlantı kurduğu çok katlı foliküler epitelini oluşturmak için çoğalmaya devam ederler. Artık folikül hücrelerine granüloza hücreleri denir ve folikül bazal lamina ile çevrili olan çok tabakalı (multilaminar, preantral) primer folikül olarak adlandırılır (Mescher, 2015). Gap junction tipi bağlantılar granüloza hücreleri arasında yaygın olarak bulunmaktadır. FSH, granüloza hücrelerindeki reseptörlere bağlanarak az da olsa onları östrojen salgılamaları yönünde uyarır. Bu uyarı folikülün gelişmesinde önemli rol oynamaktadır.

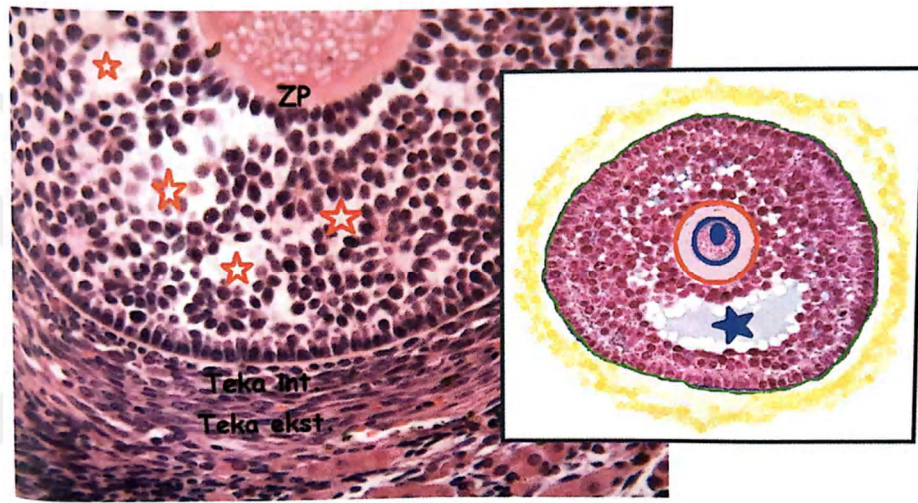
Folikülde değişiklikler olurken, bağ dokusunda da birtakım değişiklikler meydana gelir. Stroma, folikül çerçesinde teka folikülü olarak adlandırılan sıkı dokuyu oluşturur (Eşrefoğlu, 2016). Bu daha sonra folikül çevresinde teka interna ve teka eksterna olmak üzere iki farklı dokuya farklılaşır. İkisi arasında net bir sınır bulunmaz. Teka interna, granüloza hücrelerinden bazal lamina ile ayrılır ve bol kılcaklı damar içeren fibroblast benzeri iğ şeklindeki yapılardır (Tekelioğlu, 2002). Teka interna, androstenedion salgılayan steroid üreten hücreleri ile iyi damarlanmış bir dokudur (Mescher, 2015). Teka eksternayı ise; ovaryum stromasından ve teka internadan ayıran kesin bir sınır bulunmaz. Daha çok fibröz bağ dokusu yapısındadır; kollajen lif demetleri, düz kas hücreleri, steroidojenik özelliği olmayan iğ şeklindeki stromal hücreler ve oldukça büyük kan damarlarından yapılmıştır. Kollajen lif demetleri folikül yüzeyine paraleldir ve yavaş yavaş ovaryum stromasına girer (Tekelioğlu, 2002).



Şekil 6: Unilaminer primer folikül ve multilaminer primer folikül (Eşrefoğlu, 2016)

3. **Sekonder folikül:** Folikül büyümesi ve gelişmesi granüloza hücrelerinin ölçü ve sayısındaki artışla olur. Bu hücreler arasında folikül sıvısı birikmeye başlar ve sıvıyı içeren boşluklar birleşerek antrumu oluşturur. Bu özelliklerinden dolayı sekonder folikül olarak adlandırılır (Junquera ve ark., 1993). Antrum, hiyaluronik asitten zengin folikül sıvısı içerir. Hiyaluronik asit suyu tutarak folikül çapının artışını sağlar. Oositin çapı bu dönemde 250 µm' ye ulaşır

(Eşrefoğlu, 2016). Foliküler sıvı; büyüme faktörleri, GAG hiyaluronik asit, fibrinojen, plazminojen, bağlayıcı proteinler, proteoglikan ve yüksek yoğunlukta steroid (progesteron, östrojen ve androstenedion) içerir (Mescher, 2015). Birçok folikül bu aşamada atreziye uğrar, ancak bazılarının granüloza hücreleri dejenere olmaz ve androjen salgılayan küçük gruplar şeklinde kalırlar. Birkaç sekonder folikül ise ileri gelişmeye giderek olgun (graaf) folikülü yapar (Tekelioğlu, 2002).

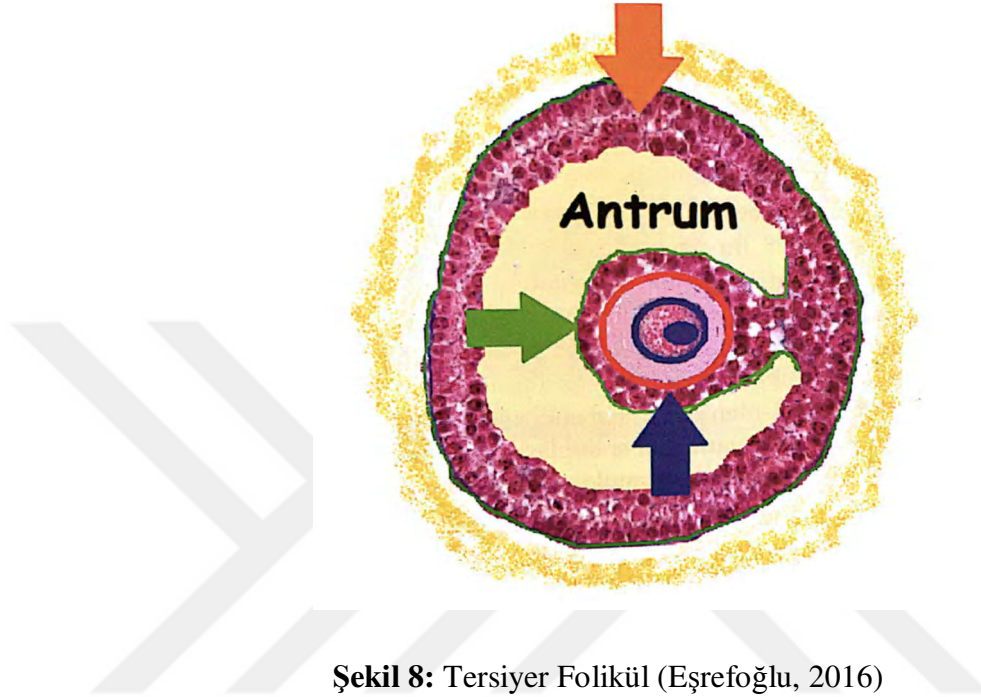


Şekil 7: Sekonder Folikül (Eşrefoğlu, 2016)

4. Olgun folikül (graaf, tersiyer folikülleri)

Antrumun büyümesiyle oosit, etrafındaki granüloza hücreleriyle birlikte bir kutba doğru itilir. Granüloza hücre sayıları arttıkça birbirinden uzaklaşır ve kısa sitoplazmik uzantılarla bağlanıp yıldız veya köşeli şeklinde görülürler. Oositin granüloza hücre katmanıyla bağlantısı gevşer. Oositin korona radyatayla sarılı olarak yapmış olduğu çıkıntıya kumulus ooforus denir (Tekelioğlu, 2002). Korona radyata ise oositi çevreleyen granüloza hücreleridir. Antrum boşluğunu saran ve granüloza hücrelerinden oluşan çok katlı hücre tabakasına membrana granüloza denir. Korona radyata ve oosit yüzeyindeki mikrovilluslar arasında gap junction tipi sıkı bağlantı kompleksleri bulunur (Eşrefoğlu, 2016). Korona radyata, ovumun ovaryumu terk ettiği anda ona eşlik eder. Corona radyata spermatozoon'un ovumu döllediği andan itibaren mevcuttur ve ovumun uterus tüpünü geçişi esnasında da bir

müddet kalır (Junquera ve ark., 1993). Olgun (tersiyer) folikül kalın teka tabakalarına sahiptir ve primordiyal folikülden yaklaşık 90 günlük bir zamanda gelişir (Mescher, 2015).



Şekil 8: Tersiyer Folikül (Eşrefoğlu, 2016)

Ovulasyon

Folikül gelişimine paralel olarak büyüyen oositin ovaryum yüzeyinden karın boşluğuna serbest bırakılmasıdır. Her menstrual siklus başlangıcında FSH ile 15-20 primer folikül uyarılır. Bunlardan sadece bir veya iki tanesi maturasyonunu tamamlar. Böylece her siklusta bir veya iki adet oosit olgunlaşarak karın boşluğuna bırakılır (Eşrefoğlu, 2016). Granüloza hücrelerinde, LH reseptörleri belirledikten sonra gonadotropinlere cevap gelişir. LH salınımından 24-36 saat sonra folikül sıvısı hızla artar. Ovulasyon öncesinde oositin çapı 120 μm , folikülün çapı ise 15-25 mm'ye ulaşır. LH'un etkisiyle mayoz-uyarıcı madde salınır ve graaf folikülü dönemine kadar profaz evresinde olan oosit, ovulasyondan 24-36 saat önce prometafaz ve metafaz evresine ulaşır. Ovulasyon esnasında oosit hızla telofaz ve anafaz evrelerini geçirek, birinci mayoz bölünmeyi tamamlar (Tekelioğlu, 2002). Olgun folikülde birinci mayotik bölünme tamamlandığında, primer oositin kardeş hücreleri eşit miktarda kromatin içerir. Fakat kardeş hücrelerden biri daha çok sitoplazma alır ve sekonder oosit oluşur. Sekonder oositin çapı yaklaşık 150 μm 'dir ve diğer kardeş hücre çok az miktarda sitoplazma alarak birinci polar cisim olur. Ovulasyondan önce folikül çıkıntısının üzerindeki

ovaryan yüzeyin küçük bir bölgesinde kan akımı durur. Germinal epitelin foliküler stigma ya da makula pellusida olarak adlandırılan bu bölümü yükselir ve sonra yırtılır. Kumulus ooforus ve korona radyata hücreleri tarafından kuşatılan oosit, reptüre olan (yırtılan) folikülden atılır. Sekonder oosit, ovulasyondan sonra yaklaşık 24 saat canlı kalır. Bu periyod da döllenme gerçekleşmezse sekonder oosit tuba uterinadan geçerken dejenere olur (Ross ve Pawlina, 2014).

Korpus Luteum

Ovulasyondan sonra teka eksternadaki düz kasların etkisiyle folikül duvarı büzüşür ve kıvrıntılı hale gelir. Teka interna ve granüloza arasındaki bazal lamina depolimerize olur ve teka internanın damarlarından sızan kanla ortadaki boşluk kanla dolar ve pıhtı oluşur. Bu yapı korpus luteum hemorajikum olarak adlandırılır (Tekelioğlu, 2002). Endokrin fonksiyon yapan korpus luteumda granüloza lutein hücreleri ve teka lutein hücreleri olmak üzere 2 tip hücre bulunur. Granüloza lutein hücreleri, geniş, veziküler nükleuslu ve soluk boyanan hücrelerdir. Bu hücrelerin sitoplazmaları ince lipid damlalarıyla doludur ve progesteron sentezlemeye başlarlar. Teka lutein hücreleri granüloza hücrelerinden daha küçüktür ve heterokromatik nükleuslu olan bu hücreler östrojen salgırlar. Korpus luteumda üretilen hormonlar, uterus duvarının muhtemel gebeliğe hazırlanmasında önemli rol oynarlar (Eşrefoğlu, 2016).

Korpus luteum, fertilizasyon ve implantasyon gerçekleşmezse sadece 14 gün aktif olur ve bu duruma menstruasyon korpus luteumu denir. İnsan koryonik gonadotropini (HCG) ve luteotropinlerin yokluğunda östrojenlerin ve progesteronların salgılanma hızı azalır ve ovulasyondan 10-12 gün sonra korpus luteum dejenere olmaya başlar. Korpus luteumun dejenere hücrelerinde intraselüler hiyalin birikmesiyle korpus albicans oluşur. Korpus albicans, ovaryum korteksinin derinliklerine doğru gömülerek birkaç ay içerisinde kaybolur (Ross ve Pawlina, 2014).

Atretik folikül

Yenidoğanlarda sayıları 400.000 kadar olan primordiyal foliküllerin olgunlaşmayan büyük bölümü postnatal dönemde ve puberteden sonra atrezi olurlar. Primordiyal foliküller de atrezi granüloza hücrelerinde gerçekleşen apoptoz ile karakterizedir (Eşrefoğlu, 2016). Atrezi, apoptoz, granüloza hücrelerinin ayrılması, zona pellusidanın

parçalanması ve oosit otolizini kapsamaktadır (Mescher, 2015). Ovaryumda foliküllerin çoğu, foliküler hücreler ve oosit ölümü halinde geriler ve makrofajlar tarafından ortadan kaldırılır (Junquera ve ark., 1993). Zona pellusida hücre içindeki otolitik değişikliklere dayanıklıdır ve folikülün boşluğunda yavaş yavaş katlanarak kollabe olur. Bağ dokusunda bulunan makrofajlar, dejenere hücrelerin ve zona pellusidanın kalıntılarını fagosite ederler. Folikül hücreleri ve teka interna arasındaki bazal membran kalınlaşarak camsı membran adını alan hiyalinize bir tabakayı oluşturur. Bu yapı atrezinin geç dönemdeki folikülleri için karakteristiktir (Ross ve Pawlina, 2014).

Foliküler atrezi, doğum öncesinden menapozun birkaç yıl sonrasına kadar devam etsede doğumdan sonra maternal hormonların zayıf olduğu dönemde ve kalitatif ve kantitatif hormonal değişimlerin olduğu puberta ve gebelik dönemlerinde çok baskındır (Mescher, 2015).

Ovaryum rezervi

Ovaryum rezervi terimi, kadın üreme potansiyelini, özellikle sahip olduğu oositlerin sayısını ve kalitesini tanımlamak için kullanılır. Bir kadın yaklaşık 2 milyon primordiyal folikül ile doğar, ancak menarşın başlangıcında doğal foliküler atreziden dolayı sadece 400.000 folikül kalır ve 30'lu yaşlarının ortasına ulaştığında, oosit tükenme hızı artmaya başlar. 30'lu yaşlarının sonuna ulaştığında, folikül sayısı düşüklüğünde belirgin bir artışla birlikte yaklaşık 25.000'e düşer (Tal ve Seifer, 2017). Oosit kaybı devamlılık gösteren bir süreçtir ve oositler primer, sekonder ve antral aşamalarda atreziye uğrar (Öktem ve Oktay, 2008b). Ovaryum rezervini belirlemede, ultrason (antral folikül sayısını ölçme, ovaryum hacmi), klinik (yaşa bağlı değerlendirme) ve biyokimyasal (FSH, AMH, İnhibin B, bazal östradiol miktarı) gibi yöntemler kullanılır (Faddy ve ark., 1992).

2.4.DOXORUBİCİN

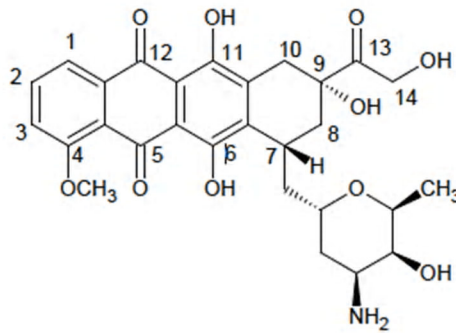
2.4.1. DOX'un Genel Özellikleri

Bugüne kadar geliştirilen en etkili antikanser ilaçlar arasında antrasiklinler yer almaktadır. Antrasiklinler ilk olarak 1960'ların başında, pigment üreten *Streptomyces peucetius*'tan izole edildi ve daunorubisin (DNR) ve doxorubicin (DOX) olarak adlandırıldı (Minotti ve ark., 2004). Bir antrasiklin antibiyotik olan DOX, yaygın olarak

lösemi, solid tümörler, yumuşak doku sarkomları ve meme kanseri gibi pek çok kanser tedavisi için etkili bir kemoterapötik ilaçtır. Bununla birlikte, DOX'un kardiyomyositler üzerindeki doza bağımlı toksik etkisi oldukça önemli bir konudur. DOX erişkinlerde 400–700 mg/m² ve çocuklarda 300 mg/m² kümülatif dozu aştığında kalp yetmezliğini başlatabilir (Songbo ve ark., 2019). Yaygın kullanımına rağmen, DOX'un sitotoksik etkileri çok fazladır ve kardiyotoksisite en bilinen yan etkisidir (Adwas ve ark., 2016).

2.4.2. DOX'un Biyokimyasal Yapısı

Tetrasiklik çekirdek, antrasiklin molekülü ve aminoşekerden (daunosamin) oluşmaktadır (Şekil 9). İlaça kırmızı rengini veren tetrasiklik çekirdektir. Grubun bütün üyelerinin tetrasiklik halkaya komşu hidrokinon ve kinon grupları bulunmaktadır (Aubel ve Londos, 1984). DOX, Daunorubisin molekülündeki 14. karbonun hidroksil grubu alması ile meydana gelmektedir (Mutlu, 2013). DOX'un kimyasal yapısı Şekil 9'da gösterilmiştir.



Şekil 9: DOX'un kimyasal yapısı (Amandeep ve ark., 2012)

2.4.3. DOX'un Etki Mekanizması

DOX'un birincil etki mekanizması, DNA baz çiftlerine bağlanarak DNA iplikçiklerinin kırılmasına ve hem DNA hem de RNA sentezinin inhibisyonuna neden olmasını içerir. DOX, topoizomeraz II enzimini inhibe ederek DNA hasarına ve apoptozun indüklenmesine sebep olur. Demir ile birleştirildiğinde, DOX ayrıca DNA sentezini daha da sınırlayan serbest radikal kaynaklı oksidatif hasara neden olur. Deksraksozan gibi demir şelatörler, DOX'un demir ile bağlanmasını sınırlandırarak serbest radikal oluşumunu önleyebilir (Johnson ve Dubey, 2017).

2.4.4. DOX'un Yan Etkileri

DOX'un kemoterapötik bir ajan olarak kullanımı, genellikle bulantı, kusma, alopesi, miyelosupresyon, stomatit ve gastrointestinal rahatsızlıklar dahil olmak üzere çeşitli yan etkilerle ilişkilidir (Carvalho ve ark., 2009). DOX uygulanan hastalarda en sık görülen yan etkiler ağız mukoza iltihabı, kemik iliği aktivitesinde azalma, saç dökülmesi ve sindirim bozukluğudur. Ağır trombosit ve lökosit kaybı söz konusu olduğundan dozu sınırlandırılmıştır (Türker ve Kayaalp, 2002). DOX'un klinik kullanımı genellikle geri dönüşümsüz dilate kardiyomiyopati ve kalp yetmezliğine yol açabilecek doza bağımlı kardiyotoksisite ile sınırlıdır (Xi ve ark., 2012). Kalp sadece DOX'un tek hedef organı değildir, çünkü literatürde böbrek, karaciğer, beyin, üreme organları ve benzerlerinde toksisitesi ele alınmıştır (Mohajeri ve Sahebkar, 2018). Oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoz, DOX'un üreme toksisitesinde etkili olan mekanizmalardır (Kabel, 2018).

2.5. ANTIOKSİDANLAR

Antioksidan, organizmadaki esansiyel maddelerin oksidasyonuna sebep olabilecek moleküllerin etkilerini önleyen ve geciktirebilen maddelere denilmektedir. Antioksidanlar ve oksidanlar arasındaki dengesizlik aşırı miktarda reaktif oksijen türlerinin çoğalmasına ve oksidatif hasara neden olur. Bu durum oksidatif stres olarak adlandırılır (Yeum ve ark., 2004). Oksidatif stres DNA hasarına, lipid peroksidasyonuna ve protein hasarına neden olabilir. Normal şartlar altında, vücutta iki tip antioksidan vardır: enzimatik olmayan antioksidanlar ve enzimatik antioksidanlar. Enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT) ve glutatyon redüktaz (GSR), H₂O₂ 'nin su ve alkole indirgenmesine sebep olurlar. Enzimatik olmayan antioksidanlar, C vitamini, E vitamini, β-karoten, selenyum, çinko, taurin, glutatyon ve benzeri de dahil olmak üzere sentetik antioksidanlar veya diyet takviyeleri olarak bilinir (Lu ve ark., 2018). Vücutta serbest radikaller açığa çıktığında organizmayı oksidatif stresten korumak amacıyla antioksidan sistem devreye girer (Willcox ve ark., 2004). Kadın üreme sisteminde, reaktif oksijen türleri ve antioksidanlar, ovaryumun fizyolojik metabolizmasında rol oynayan anahtar faktörler olarak kabul edilmiştir. Birçok çalışma, kadın üreme sisteminde antioksidanların ve transkriptlerinin varlığını araştırmıştır (Kato ve ark., 1997; Sugino, 2005; Agarwal ve ark., 2008). Önceki çalışmalar, reaktif oksijen türleri ve antioksidanlar arasındaki

denge, farklı luteal fazlardaki endometrial değişiklikler, folikülogenez, ovulasyon, fertilizasyon, plasental büyüme, embriyogenez ve implantasyon gibi dişi memeli hayvanlarında üreme aktivitelerini büyük ölçüde etkilediğini bildirmiştir (Al-Gubory ve ark., 2010). Bununla birlikte, oksidatif stres koşulları altında, bozulmuş ovaryum fonksiyonları, bozulmuş oosit miktarı, embriyonik gelişim bozuklukları, kadın hastalıkları ve kısırlık dahil olmak üzere, tehlikeli üreme ve doğurganlığa neden olabilir. Bu nedenle, antioksidanlar, normal yumurtalık fonksiyonunu desteklemek ve yumurtalıklardaki redoks dengesinin korunması için önemlidir (Wang ve ark., 2017).

2.6. SELENYUM

Selenyum, birçok biyolojik fonksiyonlarda görev alan temel bir elementtir. Antioksidan savunma, hem erkek hem de kadınlarda fertilitte, tiroid metabolizması, endokrin fonksiyon, immün fonksiyon, karsinogenez, kardiyovasküler hastalık ve kas gelişimi gibi çeşitli biyolojik işlemlerde anahtar rol oynamaktadır (Ahsan ve ark., 2014). Selenyum bir minareldir ve dokularda depo edilir. Böbrekte %15, kasta %30, plazmada %10, karaciğerde %30 ve kalan %15’de diğer organlarda depolanmaktadır. Serbest selenyum konsantrasyonları en yüksek hipofiz bezinde ve böbrek korteksindedir, onu takiben adrenal bez, tiroid, ovaryum, testis, karaciğer, dalak ve serebral korteks izler (Rayman, 2012). Selenyum, serbest radikallere karşı organizmayı savunmaya yardımcıdır ve tiroid hormonlarının metabolizmasına katılmaktadır. GSH-Px, fosfolipit hidrojen peroksit, hidrojen peroksit ve diğer serbest hidrojen peroksitlerin yıkılmasını katalizlemektedir. Uzun süreli selenyum eksikliğinde bütün vücut dokularında GSH-Px aktivitesi azalmaktadır. Selenyum, organik peroksitlerin (ROOH) ve hidrojenin, suya ve alkole indirgenmesini katalizleyen GSH-Px enziminin bir bileşenidir. Selenomethionin, selenyumun depo şekli olarak kabul edilir ve organizmada sentezlenemediğinden dolayı diyetle alınmalıdır (Kalaycıoğlu ve ark., 2010). Selenyumun; selenat ve selenit şeklinde inorganik bileşikleri, dimetilselenit ve selenometiyonin gibi diğer organik bileşikleri vardır. Selenyum gıdalarda genellikle selenometiyonin şeklinde bulunur. İnsanlarda diyetle alınan selenyumun büyük kısmını selenometiyonin oluşturur. Düşük selenyum alımıyla ilgili olabileceği tahmin edilen hastalıklar sebebiyle selenyumun birçok ülkede günlük belirli düzeyde alınması önerilmektedir. Öte yandan, fazla selenyum alımı durumunda yan etkiler oluşabilir (Tinggi, 2008). Selenyum canlılarda düşük dozlarda antioksidan role sahipken, yüksek dozlarda ise toksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir

(Tran ve ark., 2007). Bu yüzden selenyum günlük alınması gereken dozundan fazla alınmamalıdır. Selenyum ve bileşikleri genellikle düşük derişimlerde antioksidan özelliğini göstermektedir (McKenzie ve ark., 2002; Uğuz ve ark., 2009). Hayvanlarda selenyumun fizyolojik aktivitesi için tavsiye edilen alım 0.15-0.30 mg/kg'dır ve öldürücü doz yaklaşık 2.0-5.0 mg/kg arasında olabilir (Mueller, 2009; Bozkurt ve ark., 2012). Alınan selenyumun şekli ve miktarı, gıdanın yetiştirildiği toprağın jeokimyasına göre değişir. Sıçanlarda, orta öldürücü dozun (LD₅₀ intraperitoneal selenomethionine) (SeMeth) 4.25 mg/kg olarak belirlenmiştir (Reid ve ark., 2004). Bazı infertilite vakalarında etiyojisi bilinmeyen kadınlarda, selenyum konsantrasyonunun foliküler sıvıda azaldığını ve bazı düşüklerin selenyum yetmezliği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Paszowski ve ark., 1995). Dahası selenyumun ineklerde kısırlığı azalttığı bildirilmiştir (Harrison ve ark., 1984). Folikülogenezde granüloza hücrelerinin büyümesi, foliküllerin gelişim sürecinde önemli bir özellik olarak kabul edilir. Hayvan deneylerinde, selenyumun, yetişkin ovaryumlarında in vitro granüloza hücrelerinin ve 17 β -östradiol biyosentezinin büyümesini düzenleyebileceği gösterilmiştir. Son zamanlarda yapılan araştırmalar, selenyum ve selenoproteinlerin seviyelerinin, büyük sağlıklı foliküllerde arttığını ve daha sonraki büyüme ve foliküllerin çoğalması sırasında hayati bir antioksidan işlevi gerçekleştirebileceğini de açıklamıştır (Qazi ve ark., 2018).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu Başkanlığı 10/01/2018 tarih ve 18/002 no'lu onayı alınarak Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji- Embriyoloji Anabilim Dalı'nda çalışmamız gerçekleştirildi. Aynı zamanda TYL-2018-8365 no'lu proje kodu ile Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklendi.

3.1. Deney Hayvanları

Deney hayvanları, Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nden (DEKAM) temin edildi. Çalışmada 64 adet Wistar albino cinsi dişi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar deney süresince uygun kafeslerde en fazla 3-4 hayvan olacak şekilde, 21 ± 3 °C ve 12 saatlik aydınlık/karanlık ortamında, otomatik olarak klimatize edilen odalarda tutuldu (Şekil 3.1). Deney hayvanları standart pellet ve çeşme suyu ile beslendi.

3.2. Deney Grupları

Çalışmada kullanılacak hayvanlar ağırlıkları ölçüldükten sonra rastgele 8 gruba ayrıldı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Deney grupları

Grup 1 : 1 ml/kg (i.p.) serum fizyolojik enjeksiyonu yapılan grup (n=8),
Grup 2 : 5 mg/kg dozda (i.p.) DOX enjeksiyonu yapılan grup (n=8),
Grup 3 : 0.5 mg/kg dozda (i.p.) SEL-1 enjeksiyonu yapılan grup (n=8),
Grup 4 : 1 mg/kg dozda (i.p.) SEL-2 enjeksiyonu yapılan grup (n=8),
Grup 5 : 2 mg/kg dozda (i.p.) SEL-3 enjeksiyonu yapılan grup (n=8),

Grup 6 : 0.5 mg/kg dozda (i.p.) SEL-1 + yarım saat sonra 5mg/kg dozda (i.p.) DOX uygulanan grup (n=8),

Grup 7 : 1 mg/kg dozda (i.p.) SEL-2 + yarım saat sonra 5mg/kg dozda (i.p.) DOX uygulanan grup (n=8),

Grup 8 : 2 mg/kg dozda (i.p.) SEL-3 + yarım saat sonra 5mg/kg dozda (i.p.) DOX uygulanan grup (n=8).

3.3. Çalışma Planı

Çalışmamızda öncelikle deney hayvanlarının ağırlıkları belirlendi ve ilk gün bütün gruplara enjeksiyon uygulaması başlatıldı.

Birinci uygulamada kontrol grubundaki sıçanlara i.p. olarak 1 ml serum fizyolojik uygulandı. Selenyum gruplarına ait sıçanlarda selenyum, serum fizyolojikte çözdürülerek kullanıldı. SEL-1 grubuna, 0.5 mg/kg dozda i.p. selenyum, SEL-2 grubuna 1 mg/kg dozda i.p. selenyum ve SEL-3 grubuna 2 mg/kg dozda i.p. olarak selenyum uygulandı.

DOX uygulanacak gruplarda ise, Saba/Türkiye markasına ait liyofilize doksorubisin 25 ml enjeksiyonluk su ile sulandırılıp hazırlandı (Şekil 3.2) ve uygulandı.

DOX grubuna, 5 mg/kg dozda i.p.,

DOX+SEL-1 grubuna, DOX enjeksiyonundan yarım saat önce 0.5 mg/kg i.p. SEL-1 ve sonrasında 5 mg/kg dozda i.p. DOX,

DOX+SEL-2 grubuna, DOX enjeksiyonundan yarım saat önce 1 mg/kg i.p. SEL-2 ve sonrasında 5 mg/kg dozda i.p. DOX,

DOX+SEL-3 grubuna ise, DOX enjeksiyonundan yarım saat önce 2 mg/kg i.p. SEL-3 ve sonrasında 5 mg/kg dozda i.p. DOX uygulandı.

Uygulama toplamda 5 hafta sürdü. DOX haftada bir kez olmak üzere, 1., 7., 14., 21. ve 28. günlerde i.p. toplam 25 mg/kg (her dozda 5 mg/kg 5 kez) olarak verildi. Selenyum ise hergün 28 gün boyunca, gruplara uygun olarak 0.5 mg/kg, 1 mg/kg ve 2 mg/kg

uygulandı. Beşinci DOX uygulamasından 5 gün sonra (33. gün) hayvanların ağırlıkları ölçüldü, ketamine hydrochloride (50 mg/kg i.p) ve %2 xylazine hydrochloride (10 mg/kg i.p) ile anestezi sağlandıktan sonra, sıçanların karın ön duvarı orta hattan açılarak ovaryum dokuları eksize edildi (Şekil 3.3). Ovaryum dokularından sağ ovaryum %10'luk formaldehite alındı ve sol ovaryum biyokimyasal analizler için -80 °C'ye kaldırıldı.



Şekil 3.1: Hayvanlar uygun koşullarda barındırıldı



Şekil 3.2: Uygulama öncesi DOX hazırlandı



Şekil 3.3: Ovaryum dokuları çıkarıldı

3.4. Histolojik Analizler

Deney hayvanlarından alınan ovaryum dokuları, %10'luk formaldehit solüsyonunda tespit (fikse) edildi. Fikse edilen dokulara, rutin histolojik doku takibi metodu Tablo 3.2'de gösterildiği gibi uygulandı. Alkol serilerinden geçirilerek ksilende saydamlaştırıldı ve eriyik parafinde bir gece bekletildi. Daha sonra dokular parafin bloklara gömülerek bloklandı.

Tablo 3.2: Doku Hazırlama Tekniği

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Musluk suyu	1 saat	7	Absolü Alkol	1 saat
2	%50 Alkol	1 saat	8	Absolü Alkol	1 saat
3	%70 Alkol	1 saat	9	Ksilen	20 dakika
4	%80 Alkol	1 saat	10	Ksilen	20 dakika
5	%96 Alkol	1 saat	11	Ksilen	20 dakika
6	Absolü Alkol	1 saat	12	Eriyik parafın (60 °C)	1 gece

Işık mikroskopunda incelenmek üzere, mikrotom yardımıyla (Leica RM 2155) 5µ'luk kesitler alındı. Dokulardan 4 düz lam ve 1 polilizinli lam olmak üzere her gruptan doku bitene kadar seri kesitler alındı.

Ovaryum dokularının genel görünümünü ışık mikroskopunda histopatolojik olarak değerlendirebilmek için Hematoksilen & Eozin (H&E) ve Masson Trikrom boyamaları yapıldı (Tablo 3.3 ve Tablo 3.4). H&E ve MT ile boyanan kesitler OLYMPUS BX51 ışık mikroskobu kullanılarak görüntüledi.

Tablo 3.3: Hematoksilen & Eozin Boya Metodu

Sıra	Yapılan İşlem	Süre	Sıra	Yapılan İşlem	Süre
1	Etüv (60 °C)	2 saat	14	Eozin	3-5 dk
2	Ksilen I	10 dk	15	Akarsu	5 dk
3	Ksilen II	10 dk	16	%50 Alkol	1 dk
4	Ksilen III	10 dk	17	%70 Alkol	1 dk
5	Absolu Alkol I	5 dk	18	%80 Alkol	1 dk
6	Absolu Alkol II	5 dk	19	%96 Alkol	1 dk
7	%96 Alkol	5 dk	20	Absolu Alkol I	1 dk
8	%80 Alkol	5 dk	21	Absolu Alkol II	2 dk
9	%70 Alkol	5 dk	22	Absolu Alkol III	2 dk
10	%50 Alkol	5 dk	23	Ksilen I	20 dk
11	Akarsu	5 dk	24	Ksilen II	20 dk
12	Hematoksilen	5-8 dk	25	Ksilen III	20 dk
13	Akarsu	5 dk	26	Kapatma	

Folikül Sayımı

Her bir deney hayvanının sağ ovaryum dokusundan kesitler alınarak H&E boyama metodu uygulandı ve folikül rezervinin belirlenmesi için ışık mikroskopik olarak incelendi. Ovaryum korteksinde bulunan hem çekirdeği hem de çekirdekçiği belirgin olarak ayırt edilebilen primordiyal, primer, preantral, sekonder ve tersiyer foliküller her bir kesitte ayrı ayrı sayıldı. Foliküllerin morfolojik sınıflandırmasında; granüloza hücre şekli ve hücre katman sayısı göz önüne alındı. Buna göre; oositi çevreleyen yassı tek sıralı granüloza hücreleri içeren folikül *primordiyal folikül*, tek sıralı kübik granüloza hücreleri ile çevrili folikül *primer folikül*, iki ya da daha fazla sıralı kübik granüloza hücreli ve granüloza hücreleri arasında boşluk (antrum) şekillenmemiş foliküller *preantral folikül*, 4-5 sıra granüloza hücreleriyle çevrili ve bu hücreler arasında antral boşluklar belirmeye başlamış foliküller *sekonder folikül*, çapı en geniş olan ve antral boşluğun ileri derecede geliştiği ve kumulus ooforus tabakasının belirginleştiği folikül *graff folikül (tersiyer folikül)*, bozulmuş granüloza hücreleri ve oosit içeriyorsa *atretik folikül* olarak adlandırıldı ve foliküller sınıflandırmaya uygun olarak sayıldı. Bu kriterlere dayanarak, foliküller morfolojik olarak normal olarak sınıflandırıldı ve sadece normal foliküller nicelleştirildi. Folikül kalitesinin değerlendirilmesi, bazal membranın bütünlüğüne, hücre yoğunluğuna ve oosit bütünlüğüne dayanmaktadır. Sağlıklı olmayan foliküller, sağlıklı foliküllerden granüloza hücrelerinin kaybı ve piknotik nükleus ile ayırt edildi. Sayım işlemi tamamlandıktan sonra elde edilen veriler kaydedildi. Böylece herbir deneğin ovaryumunda bulunan toplam folikül sayıları belirlendi.

Tablo 3.4: Masson Trikrom Boya Metodu

Sıra	Yapılan İşlem	Süre	Sıra	Yapılan İşlem	Süre	Sıra	Yapılan İşlem	Süre
1	Etüv (60 °C)	2 saat	7	Akarsu	5 dk	13	Distile su	3 dk
2	Ksilen I/ II/ III	20 dk	8	Asit Fuksin	5 dk	14	Asetik asit	2 dk
3	Absolu Alkol I/ II	5 dk	9	Distile su	3 dk	15	% 96 Alkol	2 dk
4	%96/80/ 70/ 50 Alkol	5 dk	10	Fosfomolibdik asit	5 dk	16	Absolu Alkol	2 dk
5	Akarsu	2 dk	11	Kurutma	5 dk	17	Ksilen I/ II/ III	20 dk
6	Hematoksilen	5-8 dk	12	Anilin Blue	5 dk	18	Kapatma	

3.5. İmmunohistokimya

AMH, IL1- β , TNF- α ve Caspase-3 primer antikorlarının ovaryum dokularındaki lokalizasyonlarını ve ekspresyon seviyelerini göstermek amacıyla tüm deney gruplarına immunohistokimyasal boyama metodu uygulandı ve ışık mikroskopunda (Olympus BX51, Tokyo, Japan) incelendi. Her gruptaki 8 hayvana ait dokulardan alınan kesitlerden 10 farklı alan ölçüme dâhil edildi ve tüm gruplar için AMH, IL1- β , TNF- α ortalama immunoreaktivite yoğunlukları hesaplanırken, Caspase-3 antikoruyla boyanan bütün gruplarda apoptotik pozitif hücreler sayıldı ve X40'de Image J software programı kullanılarak değerlendirildi ve sonuçlar kaydedildi.

- 1) Ovaryum dokularına ait kesitlerin parafinleri 2-3 saat boyunca 60⁰C'lik etüvde bekletilerek giderildi.
- 2) Ksilende 3 defa 5'er dakika bekletilerek dokuların parafinleri iyice giderildi
- 3) Dereceli alkol serilerinden (%100, %96, %80, %70) 3'er dakika geçirilerek rehidrate edildi.
- 4) Alkolden kurtarmak için 2 kez 2'şer dakika distile sudan (dH₂O) geçirildi.
- 5) Endojen peroksidaz aktivitesini engellemek amacıyla %3'lük hidrojen peroksitte (H₂O₂) 12 dakika bekletildi.
- 6) Fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS)'de 2 kez 5 dakika kesitler yıkandı.
- 7) Formaldehitin kapattığı reseptör bölgelerinin açığa çıkarılması için mikrodalga fırında pH:6.00 sitrat tampon çözeltisi içerisinde mikrodalgada 360 Watt'ta 10 dakika kaynatıldı.
- 8) Kesitler kaynamadan sonra sitrat tampon içerisinde oda sıcaklığında 10 dakika soğutuldu.
- 9) PBS ile 2 kez 5'er dakika yıkandı.
- 10) Özgül olmayan antikor bağlanmalarını engellemek amacıyla 5 dakika Ultra V Block oda sıcaklığında uygulandı.

- 11) Yıkama yapmadan, kesitlere AMH (1:150) (Santa Cruz -ABD), IL1- β (1:100) (Novusbio-ABD) , TNF- α (1:200) (Novusbio-ABD) ve Caspase-3 (1:400) (Cell Signaling-ABD) antikoları damlatıldı ve negatif kontrol olarak primer antikor yerine PBS damlatıldı.
- 12) Kesitler 1 gece +4⁰C’de bekletildi.
- 13) Bir gecenin ardından kesitler oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.
- 14) PBS ile 2 kez 5 ‘er dakika yıkandı.
- 15) Biotinylated sekonder antikor ile 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyonu yapılarak primer antikora bağlanması sağlandı.
- 16) PBS ile 2 kez 5 ‘er dakika yıkandı.
- 17) Streptavidin peroksidaz ile 10 dakika inkübe edildi.
- 18) PBS ile 2 kez 5 ‘er dakika yıkandı.
- 19) İmmunreaktiviteyi görünür kılmak için DAB (DAB Plus substrate system) kromojen damlatıldı, 1-5 dakika inkübe edildi.
- 20) Distile su (dH₂O) ile 2-3 kere yıkandı.
- 21) Gill hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.
- 22) Distile su (dH₂O) ile 2-3 kere yıkandı.
- 23) Dehidratasyon amacıyla dokular dereceli alkol ve ksilen serilerinden 2’şer dakika geçirildi.
- 24) Entellan ile dokular kapatıldı.

3.6. ELİSA

3.6.1. Ovaryum Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Biyokimyasal analizler için alınan ovaryum örneklerinden doku homojenatı hazırlamak için yaş ağırlıklar tartıldı ve soğukluğu muhafaza edilerek ependorf tüplere aktarıldı. Dokulara fosfat tamponu (pH: 7,4) eklendi ve homojenizatörle 1000 rpm ‘de homojenize edildi. Doku homojenatları 15000 rpm’ de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) metodu kullanılarak Katalaz (CAT), Malondialdehit (MDA), Süperoksit dismütaz (SOD) ve Glutathione peroxidase (GSH-Px) analizleri için ayrıldı.

3.6.2. Protein Tayini

Doku örneklerindeki protein miktarını belirleyebilmek amacıyla Bradford Assay yöntemi ile protein tayini yapıldı.

3.6.3. Malondialdehit Tayini (MDA)

Sunred Biological Technology marka ticari kiti kullanılarak çalışıldı (Rat MDA ELISA Kit Catalog no: 201-11-0157). Kit içerisinde çıkan 96'lık plate içindeki her bir kuyucuğa 50 µl standart ve 40 µl örnekler yüklendi. Standartlar hariç bütün örneklerin üzerine 10 µl Biotin-(MDA) Ab eklendi. Daha sonra 50 µl HRP konjugete eklenerek 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plate alınarak otomatik washing cihazında yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı ve aspire edildi. Bütün örneklerin üzerine 50 µl Chromogen Solution A ve Chromogen Solution B eklendi. Tekrar 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Son olarak 50 µl stop solution eklenerek reaksiyon sonlandırıldı ve Thermo scientific (ABD) marka Microplate okuyucu ile 450 nm'de okutuldu.

3.6.4. Katalaz Aktivite Tayini (CAT)

Sunred Biological Technology marka ticari kiti kullanılarak çalışıldı (Rat CAT ELISA Kit Catalog no: 201-11-5106). Kit içerisinde çıkan 96'lık plate içindeki her bir kuyucuğa 50 µl standartlar ve 40 µl örnekler yüklendi. Standartlar hariç bütün örneklerin üzerine 10 µl Biotin-(CAT) Ab eklendi. Daha sonra 50 µl HRP konjugete eklenerek 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plate alınarak otomatik washing cihazında yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı ve aspire edildi. Bütün örneklerin üzerine 50 µl Chromogen Solution A ve Chromogen Solution B eklendi. Tekrar 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Son olarak 50 µl stop solution eklenerek reaksiyon sonlandırıldı ve Thermo scientific (ABD) marka Microplate okuyucu ile 450 nm'de okutuldu.

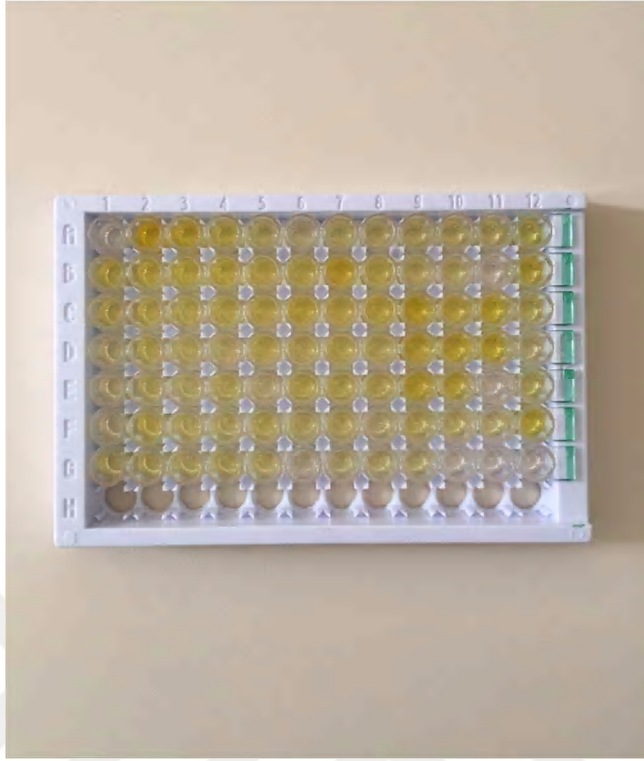
3.6.5. Süperoksit Dismütaz Tayini (SOD)

Sunred Biological Technology marka ticari kiti kullanılarak çalışıldı (Rat SOD ELISA Kit Catalog no: 201-11-0169). Kit içerisinde çıkan 96'lık plate içindeki her bir kuyucuğa 50 µl standart ve 40 µl örnekler yüklendi. Standartlar hariç bütün örneklerin

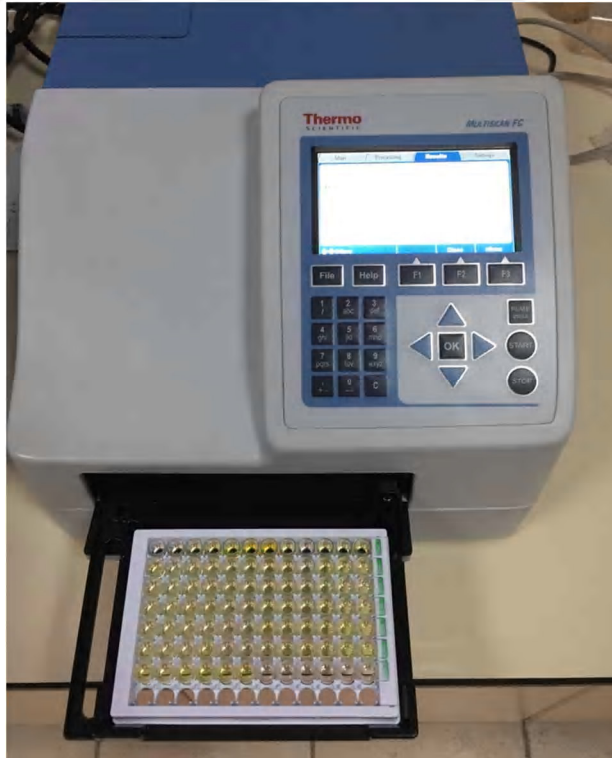
üzerine 10 µl Biotin-(SOD) Ab eklendi. Daha sonra 50 µl HRP konjugete eklenerek 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plate alınarak otomatik washing cihazında yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı ve aspire edildi. Bütün örneklerin üzerine 50 µl Chromogen Solution A ve Chromogen Solution B eklendi. Tekrar 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Son olarak 50 µl stop solution eklenerek reaksiyon sonlandırıldı ve Thermo scientific (ABD) marka Microplate okuyucu ile 450 nm'de okutuldu.

3.6.6. Glutathione Peroxidase Tayini (GSH-Px)

Sunred Biological Technology marka ticari kiti kullanılarak çalışıldı (Rat GSH-Px ELISA Kit Catalog no: 201-11-5104). Kit içerisinde çıkan 96'lık plate içindeki her bir kuyucuğa 50 µl standart ve 40 µl örnekler yüklendi. Standartlar hariç bütün örneklerin üzerine 10 µl Biotin-(GSH-Px) Ab eklendi. Daha sonra 50 µl HRP konjugete eklenerek 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plate alınarak otomatik washing cihazında yıkama solüsyonu ile üç kez yıkandı ve aspire edildi. Bütün örneklerin üzerine 50 µl Chromogen Solution A ve Chromogen Solution B eklendi. Tekrar 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Son olarak 50 µl stop solution eklenerek reaksiyon sonlandırıldı (Şekil 3.4) ve Thermo scientific (ABD) marka Microplate okuyucu ile 450 nm'de okutuldu (Şekil 3.5).



Şekil 3.4: Stop solution eklendi



Şekil 3.5: Microplate okuyucu ile 450 nm'de okutuldu

3.7. İstatistiksel Analiz

Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ve Q-Q, histogram grafikleri ile değerlendirilmiştir. Varyans homajenliği Levene testi ile değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalarda Tukey testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir. Verilerin analizi TURCOSA (Turcosa Analytics Ltd Co, Turkey, www.turcosa.com.tr) istatistik yazılımında gerçekleştirilmiştir.



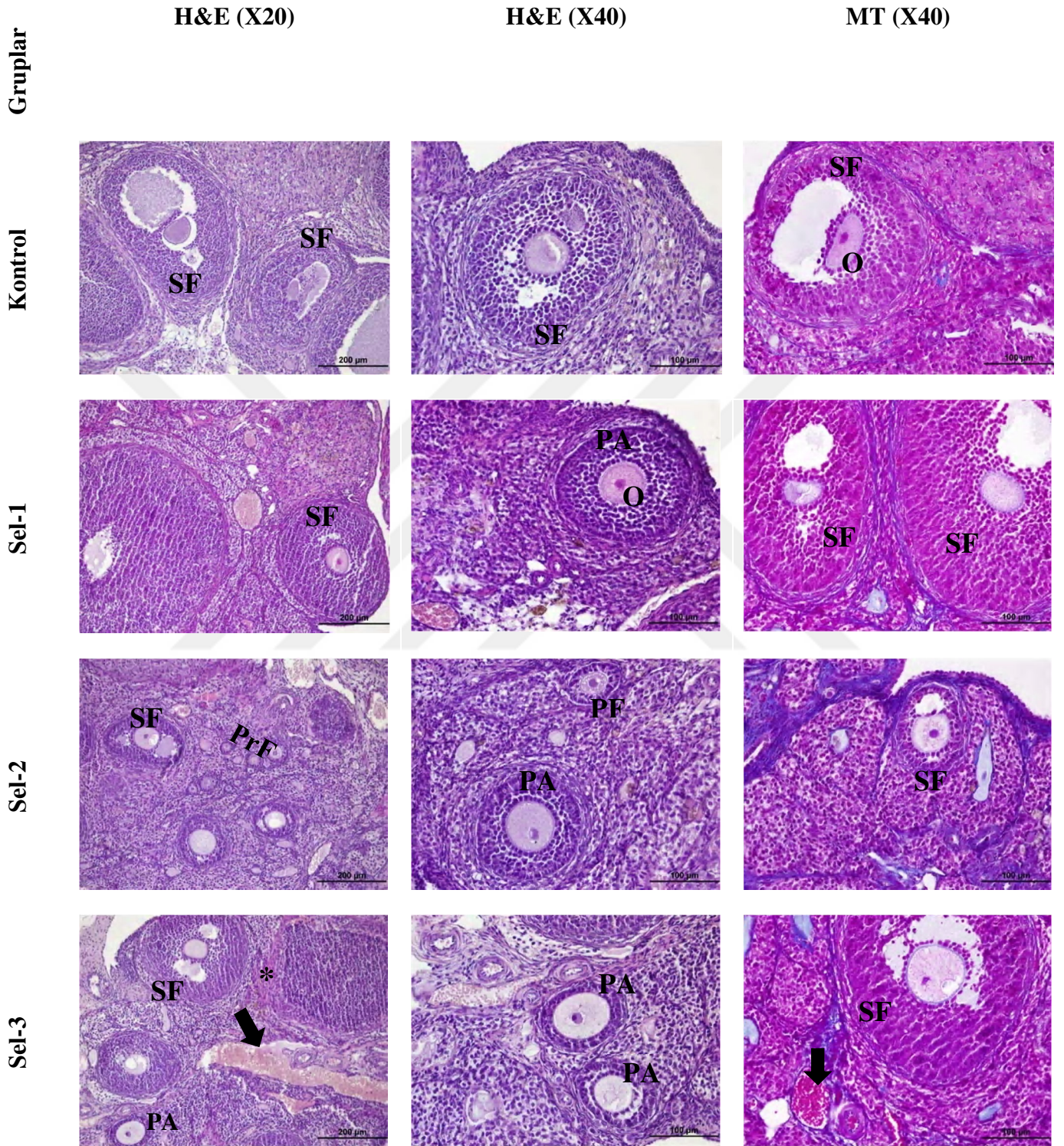
4. BULGULAR

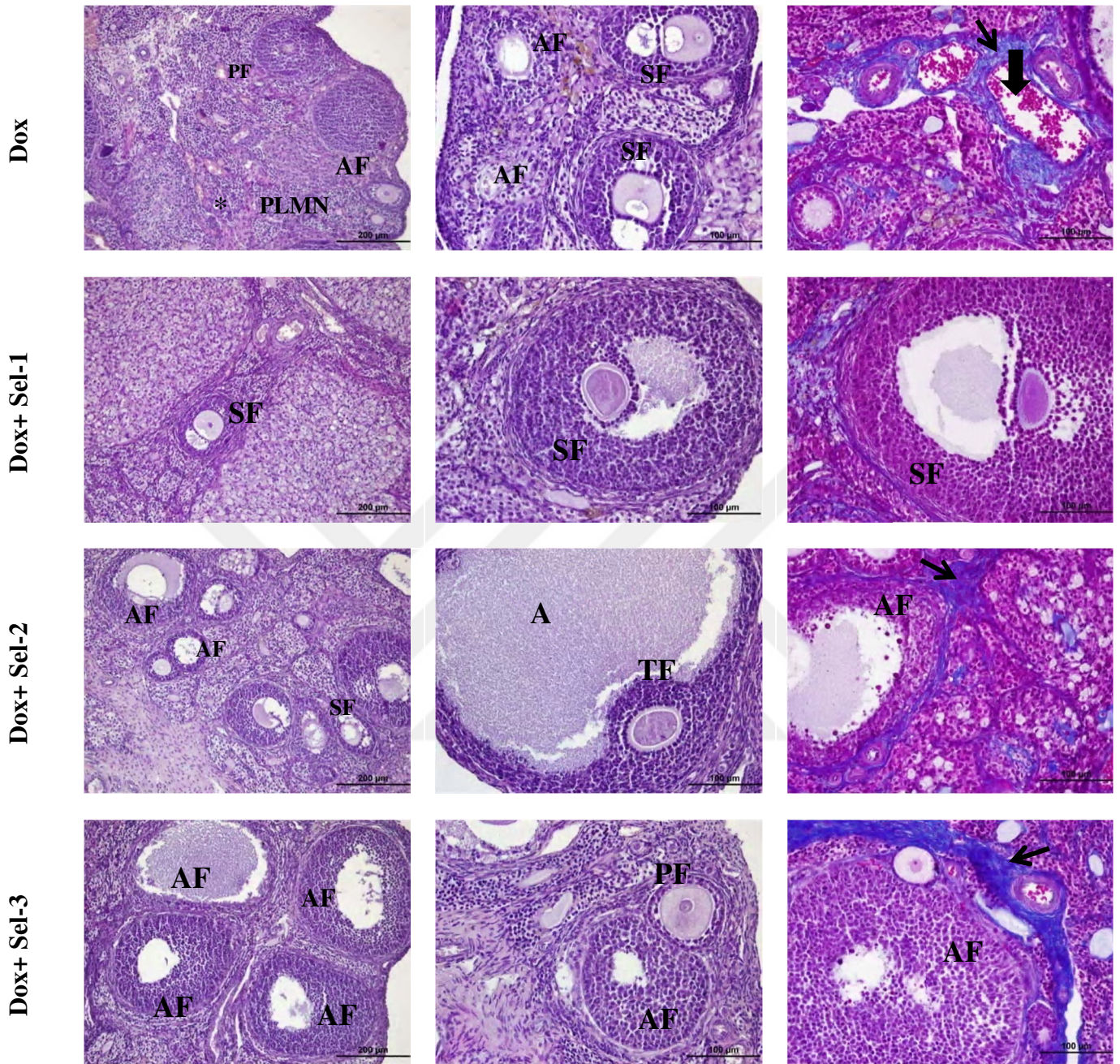
4.1. Işık Mikroskopik Bulgular

Ovaryum korteksinde bulunan foliküllerin genel morfolojik özelliklerini ve folikül sayılarını belirlemek için tüm deney gruplarına ait hematoksilen eozin (H&E) boyama metodu uygulanmış ovaryum kesitleri kullanıldı. Kontrol grubuna ait preparatlar incelendiğinde ovaryumların yüzeyi tek katlı yassı germinal epitelle sarılmaktaydı. Germinal epitelin altında, sıkı bağ dokusundan oluşan tunika albuginea belirgin bir şekilde ayırt edilirken, korteks tabakasında primordiyal, primer ve sekonder foliküller gibi gelişimin farklı aşamalarındaki birçok folikül yer almaktaydı. Buna göre, primordiyal foliküller oosit etrafında tek katlı yassı epitel hücreleri içermesi ile belirlendi. Daha büyük çapa sahip olan primer foliküllerde ise oositin etrafı tek sıra kübik epitel hücreleri ile sarılıydı. Farklı büyüklüklerde olduğu görülen preantral foliküllerde, merkezde bulunan primer oosit ve bunu çevreleyen çok katlı granüloza hücre tabakası mevcuttu. Çok katlı granüloza hücreleri arasında düzensiz antrumların oluştuğu sekonder foliküller kontrol grubunda oldukça belirgindi. Sekonder foliküllerde granüloza tabakasıyla birlikte teka tabakası da normal görünümdeydi. Folikülün bağ dokusuna komşu kısmında gevşek bağ dokusu yapısında, kan damarlarından zengin teka interna yapısı ve bunun dışında daha yoğun ve sıkı bir bağ dokusu yapısında teka eksterna yapısı gözlenmekteydi. Tersiyer foliküllerde ise kumulus ooforusun antruma doğru yaptığı çıkıntı içerisinde yer alan oosit ile zona pellusidayı saran granüloza hücrelerinin 'korona radiatayı' oluşturdukları görüldü. Ayrıca korteks bölümünde ovule olmuş foliküllerden kalan çok miktarda korpus luteum bulunmaktaydı. Ovaryumun foliküler havuzunda atrezi, fizyolojik bir süreç olarak gerçekleşir ve bu nedenle kontrol grubuna ait kesitlerde de atretik foliküller gözlenmiştir. Atretik foliküller, düzensiz şekilli ve zona pellusidası tam olarak belirgin olmayan oosit yapısı ile ayırt edilmekteydi. Ovulasyondan sonra gelişen korpus luteumda, steroid salgılayan hücre

özellikleri sergileyen granüloza lutein ve teka lutein hücreleri bulunmaktadır. Medulla kısmı, kortekse göre daha az sayıda hücre içermesi ve folikül yapılarını bulundurmaması ile dikkat çekmekteydi. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitlerinin medullası gevşek bağ dokusu yapısında, kollajen ve retiküler lifleri içeren, damar ve sinir dokudan zengin olup histolojik olarak normal bir görünümdeydi. Sadece selenyum uygulanan SEL-1, SEL-2 ve SEL-3 gruplarına ait sıçanlardan alınan ovaryum dokuları ışık mikroskopik olarak incelendiğinde genel olarak normal histolojik bulgular tespit edildi. SEL-1 ve SEL-2 grubuna ait ovaryum kesitlerinde, korteksin stromasında ve parankimasında herhangi bir patolojik duruma rastlanmamaktaydı ve genel morfolojik özellikler bakımından kontrol grubu ile benzerlik göstermekteydi. SEL-3 uygulanan grupta ise, selenyumun doz artışına bağlı olduğunu düşündüğümüz yer yer vasküler konjesyon alanları gözlemlendi. DOX uygulanan deney gruplarına ait ovaryum kesitleri, kontrol ve sadece selenyum uygulanan deney grupları ile karşılaştırıldığında, ovaryumun normal histolojik yapısının bozulduğu, foliküler dejenerasyon, vasküler konjesyon, hemoraji ve polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu (PMNL)'nin diğer deney gruplarına göre fazla olduğu görüldü. DOX ile selenyumun birlikte verildiği gruplara ait sıçan ovaryum örneklerinde ise, DOX+SEL-1 grubunda histolojik yapının DOX verilen deney gruplarına göre korunduğu, ödem, vasküler konjesyon ve PMNL infiltrasyonunun azaldığı, yeni gelişmekte olan foliküller olduğu gözlemlendi. Benzer şekilde, DOX+SEL-2'nin histopatolojik özellikleri azalttığı gözlemlendi. DOX+SEL-3 verilen grupta ise selenyumun doz artışına bağlı olarak toksik etki olabileceğini düşündüğümüz foliküler dejenerasyon ve vasküler konjesyon gibi histopatolojik bulgular gözlemlendi (Şekil 4.1).

Bağ dokusunun genel görünümünü ve kollajen lifleri belirlemek için masson trikrom boyama metodu kullanıldı. Masson trikrom boyama yapılmış kontrol grubuna ait ovaryum kesitlerinde germinal epitel altında bulunan tunika albuginea'da, korpus luteumları, folikülleri, stromal hücreleri ve kapiller damarları saran stromada mavi renkli boyanmış kollajen lifler belirgin olup normal dağılım göstermekteydi. Ovaryum stroması ve germinal epitel altında yer alan tunika albuginea yapılarındaki bağ dokusu bileşenleri normal görünüm sergiledi. Sadece DOX uygulanan deney gruplarına ait ovaryum örnekleri diğer tüm deney grupları ile karşılaştırıldığında stromada artmış kollajen lif dağılımı ve vasküler konjesyon alanları dikkati çekti. DOX ile selenyum birlikte uygulandığı gruplarda doz artışına paralel olarak stroma da fibrozis artışı mevcuttu (Şekil 4.1).





Şekil 4.1. Deney gruplarına ait ovaryum örneklerinin ışık mikroskopik görünümü.

PrF; Primordiyal Folikül, **PF:** Primer Folikül, **PA:** Preantral Folikül, **SF:** Sekonder Folikül, **TF:** Tersiyer Folikül, **AF:** Atretik Folikül, **O;** Primer oosit, **A:** Antrum, **İnce ok:** Fibrozis, **Kalın ok:** Vasküler Konjesyon, **PMNL:** Polimorfonükleer Lökosit infiltrasyonu *; Hemoraji

Folikül Sayımı

DOX'un folikül sayıları üzerine etkisini belirlemek için, deney sonrasında deneklerden elde edilen ovaryum dokularından alınan seri kesitler değerlendirildi. Böylece çekirdeği ve çekirdekçiği belirgin olarak ayırt edilebilen primordiyal, primer, preantral, sekonder ve tersiyer foliküller ile antral foliküller tek tek sayıldı. Gruplarda folikül sınıflarına göre sağlıklı folikül sayıları;

Primordiyal Folikül;

Primordiyal foliküllerin sayısı DOX verilen grupta kontrol grubuna kıyasla daha az ve morfolojik olarak bozulmuş görünümdeydi. Sadece selenyum uygulanan gruplar arasında primordiyal folikül sayısı bakımından kontrole en yakın olan grup SEL-2 olarak belirlendi. DOX ile selenyumun birlikte verildiği gruplarda DOX'a bağlı toksisitenin giderildiği ve primordiyal folikül sayısında artışın en iyi olduğu grup DOX+SEL-2 olarak belirlendi. Buna göre, primordiyal foliküllerin en iyi korunduğu grup DOX+SEL-2 grubuydu.

Primer Folikül;

Tüm deney grupları primer folikül sayısı açısından değerlendirildiğinde, SEL-3 grubunda primer folikül sayısı kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derece yüksek bulundu ($p<0.05$). DOX ile selenyumun birlikte verildiği gruplarda sadece DOX uygulanan gruba kıyasla primer folikül sayısının en iyi korunduğu grupların DOX+SEL-2 ve DOX+SEL-3 olduğu belirlendi.

Preantral Folikül;

Preantral folikül sayısı bakımından gruplar değerlendirildiğinde, kontrol grubu ile SEL-1, SEL-2 ve SEL-3 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). Yalnızca DOX uygulanan grup ile DOX+SEL (DOX+SEL-1; DOX+SEL-2; DOX+SEL-3) uygulanan gruplar arasında da preantral folikül sayısı açısından anlamlı bir farklılık yoktu ($p>0.05$).

Sekonder Folikül;

Kontrole göre en düşük sekonder folikül oranı DOX+SEL-3 grubunda gözlenirken SEL-2 grubunda en yüksek olduğu görüldü. DOX ile selenyumun birlikte uygulandığı gruplarda ise DOX'a göre en iyi sekonder folikül oranı DOX+SEL-2 olarak belirlendi.

Tersiyer Folikül;

Ovaryum havuzunda bulunan toplam tersiyer folikül sayısının en yüksek olduğu grup SEL-3 olarak belirlenirken, DOX+SEL-1'in en düşük grup olduğu görüldü. Diğer tüm gruplarda tersiyer folikül sayısı birbirlerine oldukça yakındı. Sadece selenyum uygulanan gruplarda ise kontrole göre yine SEL-3 grubunun tersiyer folikül sayısı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Atretik Folikül;

DOX uygulanan grupta atretik folikül oranı yine kontrol grubuna göre daha yoğun olarak görüldü. Sadece selenyum uygulanan gruplar arasında kontrole en yakın olan grup SEL-2 olarak belirlendi. DOX ile selenyumun birlikte uygulandığı gruplarda ise DOX'a bağlı toksisitenin giderildiği ve atretik folikül sayısının azaldığı en iyi grup DOX+SEL-2 idi.

Tablo 4.1: Gruplardaki folikül sınıfları ve folikül sayılarının istatistiksel analizi

Değişkenler	Gruplar								p
	Kontrol (n=8)	Sel-1 (n=8)	Sel-2 (n=8)	Sel-3 (n=8)	Dox (n=8)	Dox+Sel1 (n=8)	Dox+Sel2 (n=8)	Dox+Sel3 (n=8)	
Primordiyal	157.17± 32.80 ^a	121.84± 32.10 ^b	148.67± 25.05 ^a	114.67± 36.60 ^b	115.80± 37.28 ^b	141.75± 36.10 ^a	177.80± 13.48 ^c	144.75± 28.15 ^a	0.025
Primer	26.50± 9.70 ^a	29.17± 13.28 ^a	32.67± 8.27 ^a	60.34± 20.55 ^b	38.00± 11.23 ^{ab}	36.75± 17.27 ^{ac}	44.60± 15.52 ^{ac}	54.50± 9.8 ^{bc}	0.002
Preantral	27.84± 5.92	29.84± 9.24	36.50± 11.25	34.34± 15.74	35.80± 13.25	35.50± 12.24	41.60± 12.33	32.00± 5.48	0.603
Sekonder	23.50± 11.19 ^a	8.17± 2.14 ^b	38.00± 2.20 ^c	12.84± 6.45 ^b	8.80± 4.33 ^b	12.00± 7.44 ^b	20.80± 7.95 ^a	6.25± 5.31 ^b	<0.001
Tersiyer	5.50± 1.88 ^a	5.50± 1.38 ^a	6.84± 1.17 ^{ab}	9.67± 2.59 ^b	6.00± 1.00 ^a	5.25± 1.25 ^a	7.20± 1.79 ^{ab}	5.50± 1.74 ^a	0.002
Atretik	13.67± 5.54 ^a	16.34± 2.95 ^a	15.84± 3.77 ^a	23.50± 10.33 ^a	69.20± 12.94 ^{bc}	42.75± 14.64 ^b	24.60± 3.05 ^a	75.75± 13.50 ^c	<0.001

Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.2.1 AMH (Anti-Müllerian Hormon)

Ovaryum rezervini değerlendirmek için, AMH primer antikoru ile immünohistokimyasal boyama yöntemi kullanılarak hücreler boyandıktan sonra X40'lık büyütmede İmaje J software programı ile gelişmekte olan foliküllerde AMH immunreaktivite yoğunlukları hesaplandı. AMH primer antikoruyla boyanan kontrol gruplarına ait ovaryum kesitleri incelendiğinde, primer foliküllerin en yoğun AMH ekspresyonu gösterdiği görüldü. Fakat geç dönemdeki sekonder ve tersiyer foliküllerde AMH salınımında azalma mevcuttu. Primordiyal ve atretik foliküllerde ise AMH ekspresyonu gözlenmedi. AMH ekspresyonu ovaryum kesitlerinin stroma, korpus luteum, teka interna veya teka eksterna hücrelerinde de mevcut değildi. AMH immunreaktivitesi tüm deney gruplarında granüloza hücre sitoplazmasında pozitif ekspresyon gösterirken oositler negatif boyanma gösterdi. Deney gruplarına ait histolojik görüntüler Şekil 4.2' de verilmiştir.

Kontrol grubuna ait ovaryum örneklerinde, DOX grubuna ait ovaryum örnekleri ile karşılaştırıldığında foliküllerde yoğun AMH immunreaktivitesi mevcuttu. Primer foliküllerin AMH immunreaktivite yoğunlukları karşılaştırıldığında kontrol grubuna yakın olarak SEL-1 uygulanan grup gözlenirken, SEL-2, SEL-3, DOX, DOX+SEL-1, DOX+SEL-2, DOX+SEL-3 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüş olduğu görüldü ($p<0.05$) (Tablo 4.2). Preantral foliküllerin AMH immunreaktivitesi SEL-1 ve SEL-2 gruplarında kontrolden daha yoğun olduğu dikkat çekerken, DOX, DOX+SEL-1, DOX+SEL-2, DOX+SEL-3 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktü ($p<0.05$). Sekonder foliküllerde ise DOX, DOX+SEL-2 grupları kontrol, SEL-1, SEL-2, SEL-3, DOX+SEL-1, DOX+SEL-3 gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktü ($p<0.05$).

Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre DOX verilen gruplarda AMH immunreaktivitesinin zayıf olduğu, SEL-1 verilen grubun kontrole yakın olduğu gözlemlendi. SEL-3 verilen grubun AMH ekspresyonu kontrole göre oldukça düşüktü. DOX ve selenyumun birlikte uygulandığı gruplarda ise DOX+SEL-1'in AMH yoğunluğunu kontrole yakın şekilde arttırdığı ve diğer gruplara göre daha iyi koruduğu

gözlendi. Deney gruplarına ait AMH immunreaktivite yoğunlukları Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2: Tüm deney gruplarına ait primer, preantral, sekonder foliküllerde AMH immünreaktivite yoğunluklarının istatistiksel analizi

AMH ekspresyonu	Gruplar								p
	Kontrol (n=8)	Sel-1 (n=8)	Sel-2 (n=8)	Sel-3 (n=8)	Dox (n=8)	Dox+Sel1 (n=8)	Dox+Sel2 (n=8)	Dox+Sel3 (n=8)	
Primer	98.75± 16.90 ^a	93.05± 15.35 ^{ab}	84.45± 11.50 ^{ab}	78.78± 16.90 ^b	81.10± 13.85 ^{ab}	84.85± 19.85 ^{ab}	80.10± 11.90 ^{ab}	81.70± 18.40 ^{ab}	<0.001
Preantral	88.10± 14.30 ^a	91.85± 11.40 ^a	92.25± 10.25 ^a	82.25± 8.45 ^{ab}	79.20± 9.95 ^b	81.25± 9.45 ^{ab}	77.50± 11.70 ^b	71.40± 9.90 ^c	<0.001
Sekonder	89.65± 12.95 ^a	86.20± 10.48 ^a	81.10± 9.95 ^b	83.35± 15.27 ^{ab}	75.65± 10.25 ^c	88.25± 5.95 ^a	80.55± 11.75 ^b	83.55± 7.50 ^{ab}	<0.001

Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

4.2.2. IL1-β ve TNF-α

İnflamasyonun önemli belirteçleri olarak IL1-β ve TNF-α gibi sitokinlerin ovaryum stromasındaki aktivitelerini belirlemek amacıyla IL1-β; TNF-α immünohistokimyasal boyama yöntemi uyguladığımız preparatlar kullanıldı. IL1-β ve TNF-α primer antikolarıyla stromal hücreler boyandıktan sonra Imaje J programı ile immunreaktivite yoğunlukları hesaplandı. IL1-β primer antikoruyla boyanan ovaryum kesitlerinde, kontrol grubuna göre DOX uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir artış gözlendi (p<0.05). Selenyum verilen gruplarda ise SEL-2 grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlendi (p<0.05). Kontrol grubuna en yakın olarak DOX+SEL-2 ve DOX+SEL-3 görüldü. DOX ve selenyumun birlikte uygulandığı gruplarda DOX+SEL-2 ve DOX+SEL-3’ün immünreaktivite yoğunlukları birbirlerine oldukça yakındı (Şekil 4.2) (Tablo 4.3).

TNF-α primer antikoruna ile immünohistokimyasal olarak boyanan ovaryum kesitlerinde ise kontrol grubu TNF-α immünreaktivite yoğunluğunun en az olduğu grup iken, en yoğun TNF-α ekspresyon düzeyi gösteren grup DOX olarak belirlendi (Şekil 4.2). TNF-α immünreaktivite yoğunluğu bakımından kontrol grubuna en yakın ekspresyon gösteren grup DOX+SEL-1 grubu idi. Selenyum verilen gruplarda ise doz artışına bağlı

olarak SEL-1, SEL-2 ve SEL-3 gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış mevcuttu ($p<0.05$) (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: Tüm deney gruplarına ait IL1- β ve TNF- α immünreaktivite yoğunluklarının istatistiksel analizi

Değişkenler	Gruplar								<i>p</i>
	Kontrol (<i>n</i> =8)	Sel-1 (<i>n</i> =8)	Sel-2 (<i>n</i> =8)	Sel-3 (<i>n</i> =8)	Dox (<i>n</i> =8)	Dox+Sel1 (<i>n</i> =8)	Dox+Sel2 (<i>n</i> =8)	Dox+Sel3 (<i>n</i> =8)	
IL1-β	78.85 \pm	81.85 \pm	85.50 \pm	83.60 \pm	85.60 \pm	81.60 \pm	79.50 \pm	79.55 \pm	<0.001
	6.20 ^a	5.0 ^{ab}	5.65 ^b	7.40 ^{ab}	5.40 ^b	6.10 ^{ab}	6.85 ^a	7.20 ^a	
TNF-α	78.80 \pm	80.95 \pm	81.67 \pm	84.95 \pm	85.15 \pm	79.85 \pm	83.20 \pm	83.55 \pm	<0.001
	4.35 ^a	5.55 ^{ab}	5.85 ^{ab}	7.85 ^b	8.45 ^b	5.50 ^{ab}	5.75 ^b	10.20 ^b	

Veriler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

4.2.3. Caspase-3

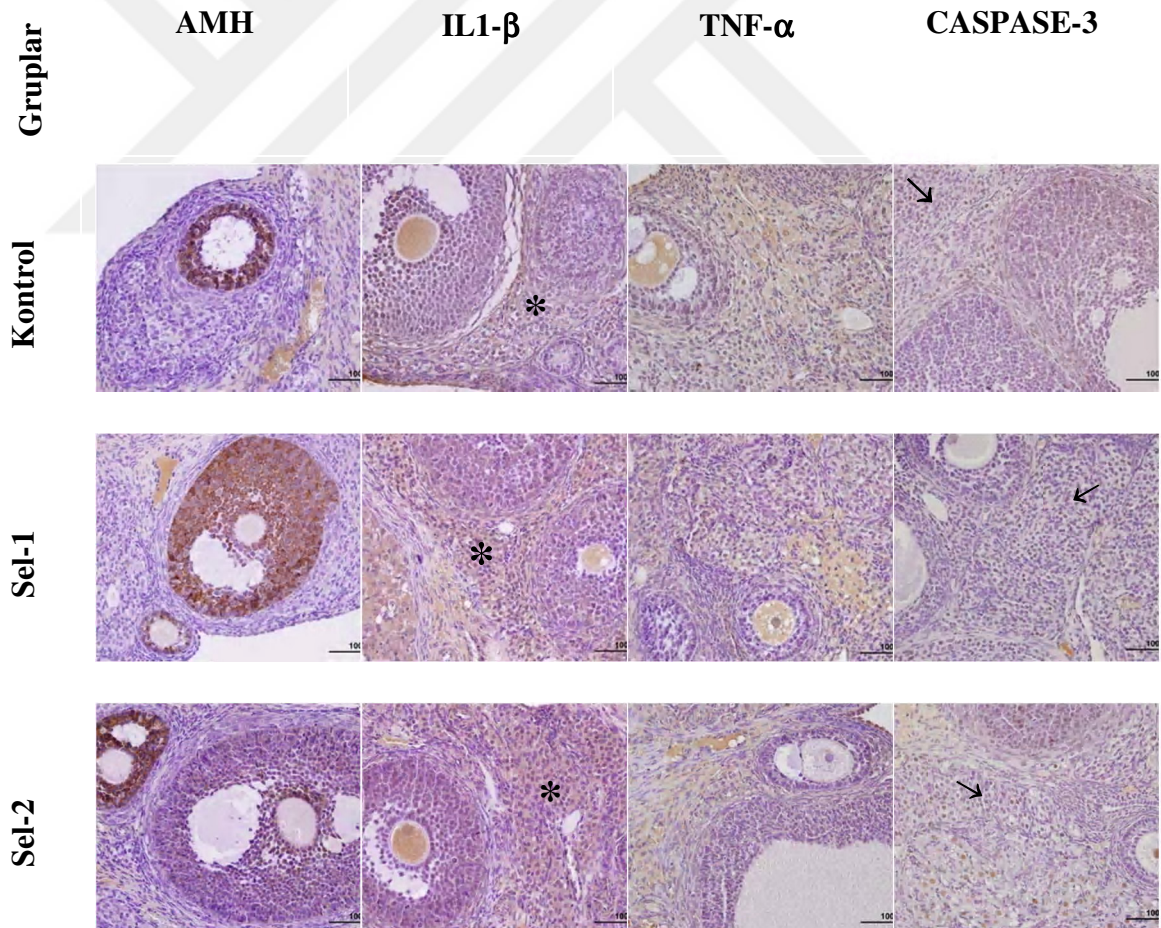
Ovaryum stromasında gerçekleşen apoptotik hücre ölümünün gösterilmesinde anahtar bir molekül olarak rol alan caspase-3 ile stromal hücrelerde apoptotik hücre sayısı değerlendirildi. Bu amaç için caspase-3 primer antikoru ile apoptotik hücreler boyandıktan sonra caspase-3 pozitif apoptotik hücreler sayıldı ve sonuçlar kaydedildi. Elde edilen verilere göre, kontrol grubu en düşük; DOX grubu ise en yüksek caspase-3 pozitif apoptotik hücre sayısına sahipti.

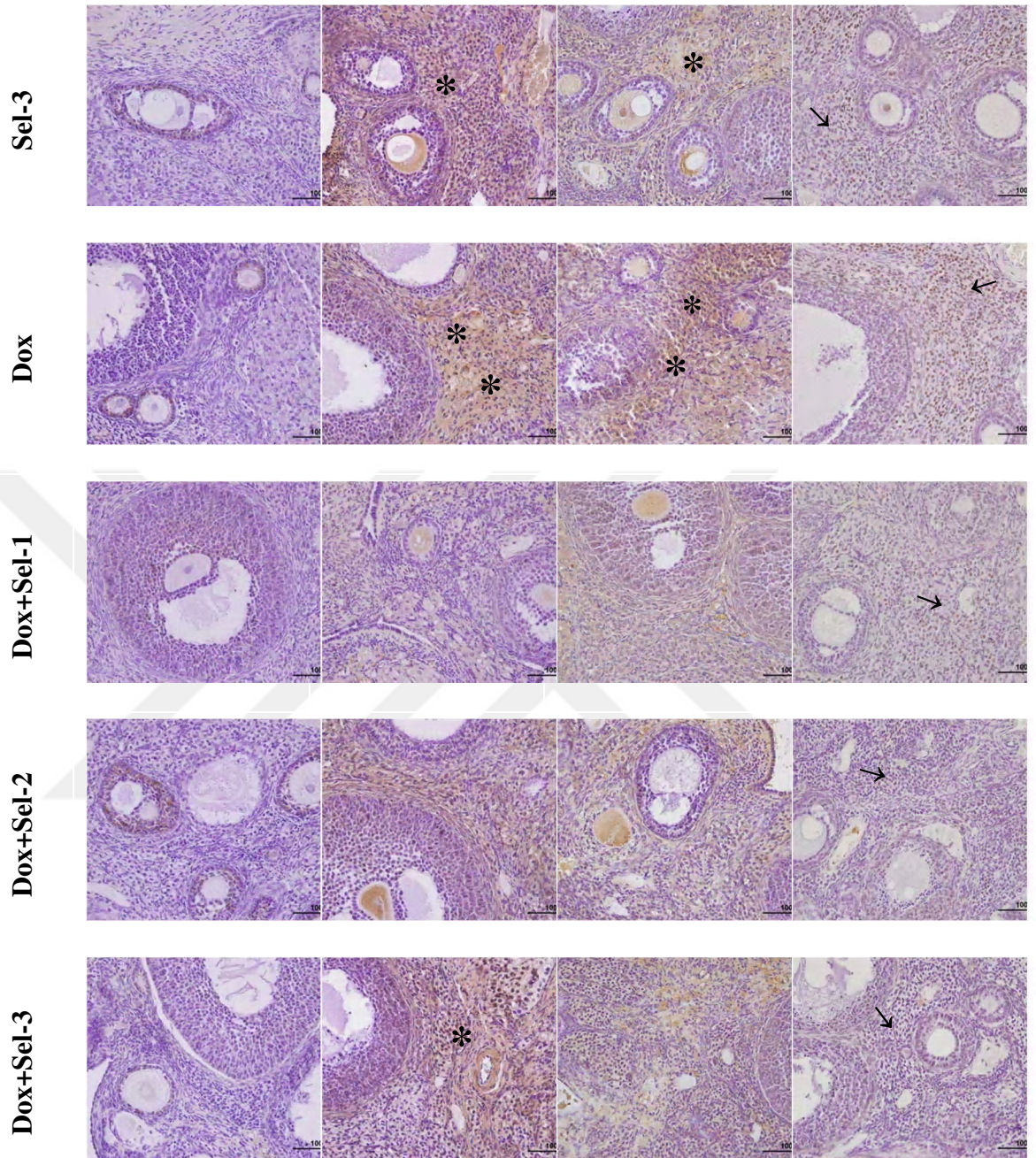
Kontrol grubuna en yakın caspase-3 pozitif hücre sayısı SEL-1 uygulanan grup olarak gözlenirken, selenyumun doz artışına bağlı olarak SEL-2 ve SEL-3 gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede bir artış gözlemlendi ($p<0.05$). Deney grupları içinde caspase-3 pozitif apoptotik hücre sayısının en fazla olduğu grup DOX grubu olarak belirlendi. DOX ve selenyumun birlikte uygulandığı gruplarda ise DOX+SEL-2 grubunda caspase-3 pozitif apoptotik hücre sayısında anlamlı bir azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2) (Tablo 4.4).

Tablo 4.4: Tüm deney gruplarına ait Caspase-3 pozitif apoptotik hücre sayısının istatistiksel analizi

Değişkenler	Gruplar								<i>p</i>
	Kontrol (<i>n</i> =8)	Sel-1 (<i>n</i> =8)	Sel-2 (<i>n</i> =8)	Sel-3 (<i>n</i> =8)	Dox (<i>n</i> =8)	Dox+Sel1 (<i>n</i> =8)	Dox+Sel2 (<i>n</i> =8)	Dox+Sel3 (<i>n</i> =8)	
Caspase-3	52.10± 17.95 ^a	75.90± 26.65 ^b	88.20± 31.85 ^{bc}	99.10± 22.15 ^c	124.70± 14.25 ^d	95.80± 30.30 ^c	75.95± 34.90 ^b	108.50± 38.40 ^{cd}	<0.001

Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.





Şekil 4.2. Deney gruplarına ait ovaryum kesitlerinde AMH, IL1- β ve TNF- α ekspresyonu, Caspase-3 immunohistokimyasal boyama görüntüleri, (X40)

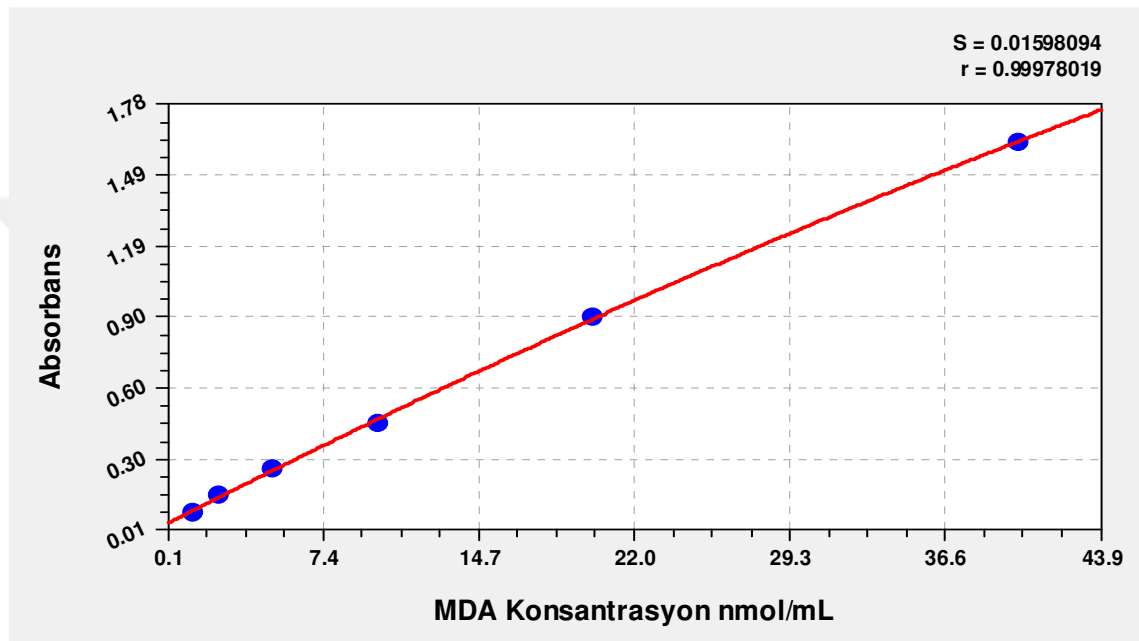
*; IL1- β ve TNF- α ekspresyonu

→ : Caspase-3 pozitif apoptotik hücreler

4.4. Biyokimyasal Bulgular

4.4.1. MDA Sonuçları

Deney hayvanlarından alınan sol ovaryum dokularında ELISA metodu kullanılarak MDA değerleri belirlendi ve örneklerin konsantrasyonları MDA standart eğrisi kullanılarak hesaplandı (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Malondialdehit (MDA) Standart Curve Eğrisi

Tüm deney grupları içinde Kontrol ve SEL-2 grupları en düşük MDA değerine sahip iken DOX ve DOX+SEL-3 grupları en yüksek MDA düzeyi gösterdi. Sadece DOX verilen grubun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği analiz edildi ($p < 0.05$). Özellikle kontrol grubuna göre DOX+SEL-3 verilen grupta MDA düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış göstermişti ($p < 0.05$). Bu durumda SEL-3 dozunun DOX'un artırdığı lipid peroksidasyonunu azaltmak yerine arttırdığını ve koruyucu özellik gösteremediğini düşünmekteyiz. Sadece selenyum uygulanan gruplarda ise kontrol grubuna en yakın olarak SEL-2 grubu gözlenirken SEL-1 ve SEL-3 gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p < 0.05$) (Tablo 4.5).

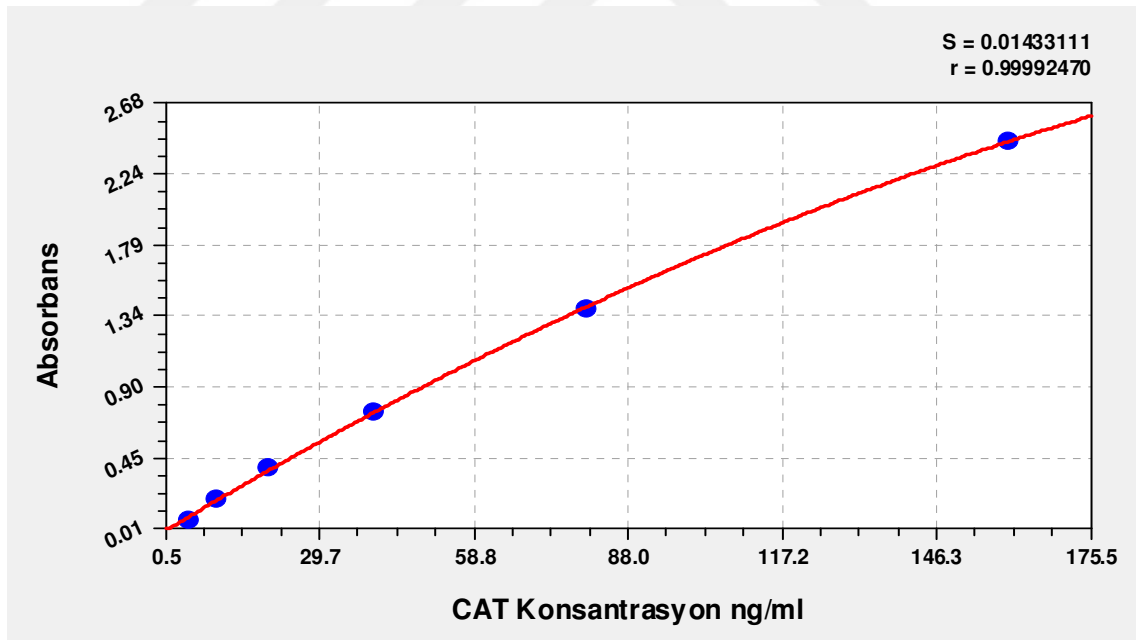
Tablo 4.5: Tüm deney gruplarına ait MDA değerlerinin istatistiksel analizi

MDA								p
Kontrol	Sel-1	Sel-2	Sel-3	Dox	Dox+Sel1	Dox+Sel2	Dox+Sel3	
(n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=8)	
2.60±0.90 ^a	6.80±2.60 ^{ab}	2.05±1.60 ^a	4.05±1.50 ^{ab}	9.05±4.15 ^c	3.80±1.40 ^a	3.95±2.27 ^{ab}	13.70±4.48 ^c	<0.001

Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

4.4.2. CAT Sonuçları

Deney hayvanlarından alınan sol ovaryum dokuları ELISA metodu için kullanıldı. Ovaryum dokularından alınan homojenatlarda CAT değerleri belirlendi ve örneklerin konsantrasyonları CAT standart eğrisi kullanılarak hesaplandı (Şekil 4.4).

**Şekil 4.4.** Katalaz (CAT) Standart Curve Eğrisi

Ovaryum CAT değerleri DOX+SEL-3 grubunda en yüksek iken SEL-2 grubunda en düşük olarak bulundu. DOX ile selenyumun birlikte verildiği gruplarda sadece DOX uygulanan gruba kıyasla DOX+SEL-2 grubunda kontrole yakın bir değere sahipti ancak sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$) (Tablo 4.6).

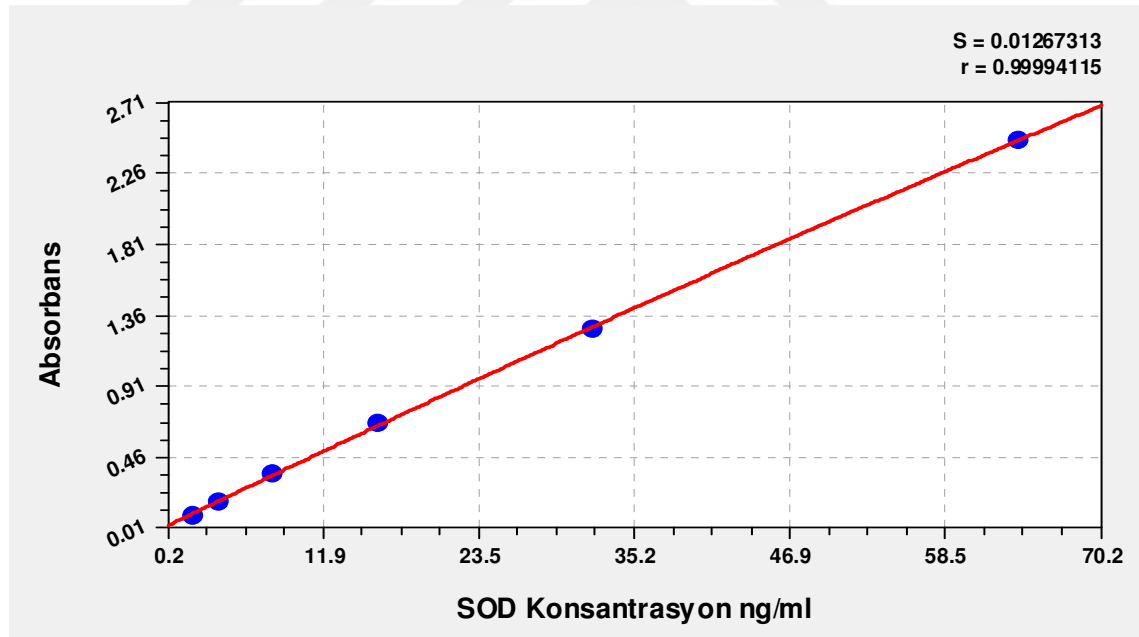
Tablo 4.6: Tüm deney gruplarına ait CAT değerlerinin istatistiksel analizi

CAT								
Kontrol (n=8)	Sel-1 (n=8)	Sel-2 (n=8)	Sel-3 (n=8)	Dox (n=8)	Dox+Sel1 (n=8)	Dox+Sel2 (n=8)	Dox+Sel3 (n=8)	p
5.57±1.85	5.36±1.00	4.40±0.70	5.83±2.20	4.49±2.30	6.48±0.70	4.80±1.90	7.62±1.17	0.061

Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

4.4.3. SOD Sonuçları

Deney hayvanlarından alınan sol ovaryum dokularında ELISA metodu kullanılarak SOD değerleri belirlendi ve örneklerin konsantrasyonları SOD standart eğrisi kullanılarak hesaplandı (Şekil 4.5).

**Şekil 4.5.** Süperoksit Dismütaz (SOD) Standart Curve Eğrisi

SOD düzeyleri değerlendirildiğinde, DOX verilen grubun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir azalma gösterdiği gözlemlendi ($p < 0.05$). Sadece selenyum uygulanan gruplarda doz artışına bağlı olarak kontrole göre SOD enzim değerlerinde bir azalma olduğu görüldü ancak gruplar arasında anlamlı bir farklılık

yoktu ($p>0.05$). Sadece DOX uygulanan deney gruplarında SOD değeri kontrol grubuna göre daha düşüktü ancak değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$). DOX ile selenyumun birlikte verildiği gruplarda ise sadece DOX uygulanan SOD düzeylerinde bir artış gözlenmiş ve özellikle de DOX+SEL-1 grubunda bu artışın sadece DOX uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$) (Tablo 4.7).

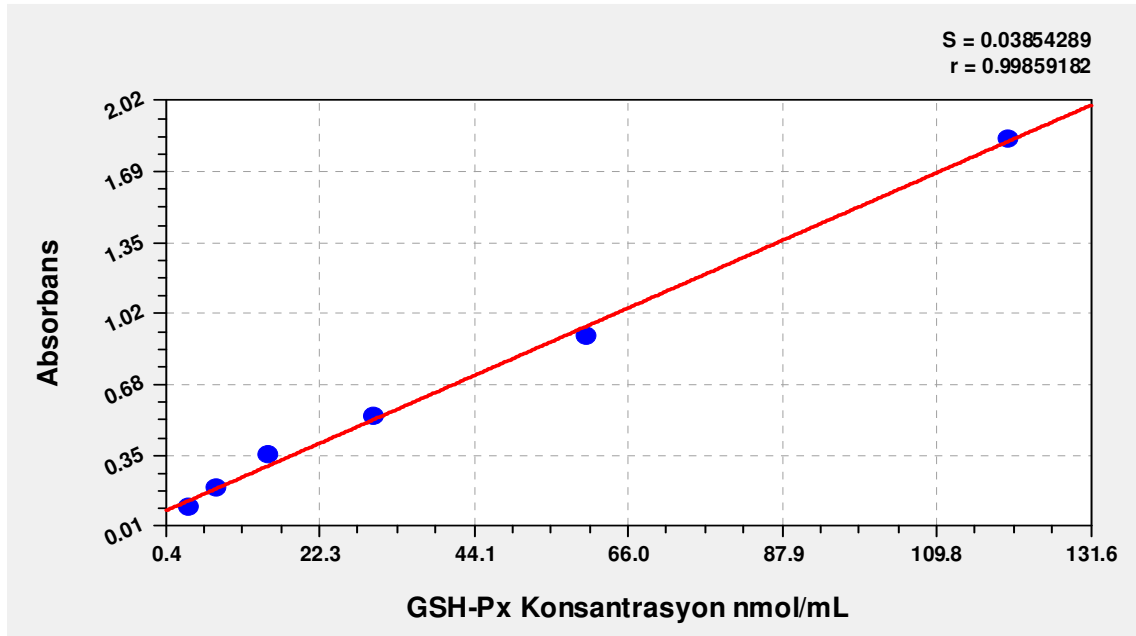
Tablo 4.7: Tüm deney gruplarına ait SOD değerlerinin istatistiksel analizi

SOD								p
Kontrol (n=8)	Sel-1 (n=8)	Sel-2 (n=8)	Sel-3 (n=8)	Dox (n=8)	Dox+Sel1 (n=8)	Dox+Sel2 (n=8)	Dox+Sel3 (n=8)	
3.10±0.55 ^{ab}	3.05±1.02 ^{ab}	2.58±0.65 ^b	2.35±0.50 ^b	1.90±1.03 ^b	3.45±0.93 ^a	2.15±0.52 ^b	3.22±0.55 ^{ab}	0.015

Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir

4.4.4. GSH-Px Sonuçları

Deney hayvanlarından alınan sol ovaryum dokularında ELISA metodu kullanılarak GSH-Px değerleri belirlendi ve örneklerin konsantrasyonları GSH-Px standart eğrisi kullanılarak hesaplandı (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Glutathione Peroxidase Tayini (GSH-Px) Standart Curve Eğrisi

Deney gruplarından alınan örnekler GSH-Px düzeyleri açısından değerlendirildiğinde, en düşük GSH-Px değeri sadece DOX uygulanan grupta gözlenirken, en yüksek GSH-Px değeri DOX+SEL-1 grubunda gözlemlendi. Selenyum verilen gruplarda doz artışına bağlı olarak GSH-Px değerinde kontrole göre bir düşüş olduğu ve bu azalmanın SEL-3 ile kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0.05$). DOX ile selenyumun birlikte verildiği gruplarda ise DOX+SEL-1'in kontrole göre daha iyi olduğu ve yine selenyum doz artışına bağlı olarak GSH-Px değerlerinde bir azalma meydana geldiği gözlemlenmiştir (Tablo 4.8).

Tablo 4.8: Tüm deney gruplarına ait GSH-Px değerlerinin istatistiksel analizi

GSH-Px								p
Kontrol (n=8)	Sel-1 (n=8)	Sel-2 (n=8)	Sel-3 (n=8)	Dox (n=8)	Dox+Sel1 (n=8)	Dox+Sel2 (n=8)	Dox+Sel3 (n=8)	
6.45±1.75 ^a	8.09±1.97 ^{ab}	7.50±2.89 ^{ab}	4.30±1.65 ^a	2.85±1.83 ^a	10.70±2.67 ^b	5.55±2.30 ^a	3.45±2.30 ^a	<0.001

Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Her yıl kansere yakalanan pek çok kadın hasta sitotoksik kemoterapi ve radyoterapilerle başarılı bir şekilde tedavi edilmektedir. Ancak hastaların birçoğu tedavi sonrasında tedavide kullanılan ajanların toksik etkilerine bağlı olarak gonadal yetmezlik ve kısırlık problemi yaşamaktadır. Son zamanlarda bu hastalar üreme yeteneklerini korumak amacıyla toksik tedaviler öncesinde yardımcı üreme yöntemlerine başvurmaktadır. Bu yöntemlerden farklı olarak başka ajanların kemoterapiyle birlikte uygulanması ile toksik etkilerin giderilmesi amaçlanmıştır (Oktay ve ark., 2007; Öktem ve Urman, 2010). Daha önce yapılan çalışmalarda DOX tedavisinin ovaryumda toksisiteye neden olduğunu ve bunun da ovaryum fonksiyonunda bir azalmaya yol açtığını göstermiştir (Roti ve Salih, 2012). Tümör hücrelerinde DOX, DNA hasarına neden olarak tümör hücresi proliferasyonunu inhibe ederken, normal hücrelerde ise DOX mitokondriyal fonksiyona müdahale ederek reaktif oksijen türleri üretimini ve birikimini aktive eder (Hortobagyi, 1997; Childs ve ark., 2002; Zhang ve ark., 2012; Carvalho ve ark., 2014). Morgan ve ark. (2013) yaptığı çalışmada, farelerden alınan ovaryumlar kültür ortamına aktarılmış ve DOX ile Cisplatin uygulaması gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda DOX'a maruz bırakılan ovaryumlarda morfolojik olarak sağlıklı foliküllere rastlamışlar ve primordiyal, primer, preantral folikül sayısında azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca ilaçların foliküllerin hangi hücre tipini spesifik olarak etkilediğini gösterebilmek için, oosit, granüloza, hem oosit hem granüloza şeklinde sınıflandırma yaparak DOX'a maruz bırakmışlar ve sonuçta en yüksek üç dozda (0.05, 0.1 ve 0.2 µg) görülen morfolojik olarak sağlıklı granüloza hücrelerine sahip foliküllerin yüzdesinde önemli artışlar olduğunu bildirmişlerdir. Her iki ilaç için, hem oosit hem de granüloza hücrelerinin sağlıklı olduğu foliküller, en yüksek iki doz (5 µg cisplatin, 0.2 µg doxorubicin) dışında nadiren görüldüğünü istatistiksel olarak vurgulamışlardır. Meioro ve ark. (2007) kemoterapiye maruz kalan hastaların doku örneklerinde, spesifik patolojik değişiklik saptamışlardır. Ovaryum korteksinde fibrozis, primordiyal foliküllerde kayıp, kan damarlarında daralma ve hyalinizasyon olarak bu değişiklikleri göstermişlerdir. Mevcut çalışmada, literatürdeki çalışmalara benzer şekilde, DOX'un neden olduğu foliküler dejenerasyona ilaveten, vasküler konjesyon, fibrozis, hemoraji

ve polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu'nun diğer deney gruplarına göre daha belirgin olduğu sonucunu gösterdik. Dahası, histopatolojik bulguların antioksidan olarak belirlediğimiz SEL'un uygulandığı DOX+SEL-2 grubunda tüm diğer SEL uygulanan gruplara göre daha koruyucu özellik gösterdiği belirlendi.

Roti ve ark. (2012) DOX'un ovaryumdaki dağılımının folikül sınıfına göre farklılık gösterdiğini, gelişen foliküllerde DOX birikiminin primordiyal ve primer foliküllere göre daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Soleimani ve ark. (2011) yaptığı çalışmada DOX'un insan primordiyal foliküllerinin hem oositlerinde hem de granüloza hücrelerinde büyük çift sarmallı DNA kopmalarına neden olduğunu bildirmişlerdir. Ben Aharon ve ark. (2010) yaptığı çalışmada ise 7.5 ve 10 mg/kg dozlarında uygulanan DOX'un sekonder foliküllerde ciddi bir azalışa sebep olduğunu, ayrıca DOX ile tedavi edilen farelerin ovaryum korteksinin, damar duvarının kalınlaşması ve hyalinizasyonu ile birlikte daha vasküler görüldüğünü bildirmişlerdir. Nishi ve ark. (2018) DOX'un 3 ve 6 mg/kg dozda uyguladığı her iki grupta da foliküler atrezide doza bağlı bir artış olduğunu bunun da primordiyal, primer ve tersiyer foliküllerde belirgin olduğunu göstermişlerdir. Niringiyumukiza ve ark. (2019) farelere 10 mg/kg DOX uyguladıkları çalışmada ovaryum morfolojisini ve folikül gelişimi üzerindeki toksik etkileri incelemişlerdir. DOX uygulamasının fare ovaryum yapısının kontrol grubuna göre değiştirdiğini bulmuşlardır. DOX ile tedavi edilen ovaryumlarda, kortikal fibrozis, hücrelerde lipid birikimi, gevşek ve heterojen bir stroma gibi değişiklikler saptamışlardır. Aynı zamanda DOX uygulanan farelerde primordiyal, primer, preantral folikül sayılarında bir azalma atretik folikül sayılarında ise bir artış gözlemlemişlerdir.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre; DOX grubunda primordiyal folikülün sayısında azalma ve kontrol grubuna göre atretik foliküllerde anlamlı bir artışın olduğunu, DOX+SEL-2 grubuna ait ovaryumlarda ise folikül sayılarının kontrol grubuna yakın olduğu belirlendi. Ovaryum folikül rezervi açısından deney grupları değerlendirildiğinde, DOX grubunda tüm folikül tipleri sayısında bir düşüş olduğunu gözledik. Farklı dozlarda selenyumun tek başına uygulandığı gruplarda ise, SEL-2 verilen grupta primordiyal, primer, preantral ve sekonder folikülleri açısından bir artış olduğunu gösterdik. Ayrıca, DOX+SEL-2 grubunda DOX grubuna göre hem folikül sayıları hem de ovaryum histolojisinin kontrol grubuna yakın özellikte olduğunu gözlemledik.

Anti-Müllerian hormon, dimerik glikoprotein yapıya sahiptir ve TGF- β ailesinin bir üyesidir. Gelişmekte olan foliküllerin granüloza hücrelerinden salgılanır (Cate ve ark., 1986; Massaue ve ark., 1990; Rajpert ve ark., 1999). Kadınlarda AMH ekspresyonu, prenatal dönemde ovaryumlarda kübik hale gelen primer foliküllerin tek katlı granüloza hücrelerinden salgılanmaya başlar ve menopoza kadar devam eder (Rajpert ve ark., 1999). AMH salınımı ilk olarak, erken dönemdeki primer foliküllerin kübik hücrelerinde görülür. Ekspresyonun en yüksek düzeye ulaştığı foliküller, preantral ve küçük çaptaki antral foliküllerdir. Preovulatuvar düzeydeki foliküllerin granüloza ve kumulus hücrelerinde ve atreziye uğrayan foliküllerde AMH salınımı görülmez (Hirobe ve ark., 1992; Durlinger ve ark., 2002; Salmon ve ark., 2004). Ovaryumdaki hasarın büyüklüğü kemoterapinin türüne ve dozuna, radyoterapi dozuna ve ışınlama alanına veya tedavi öncesi ovaryum rezervine bağlıdır. Yaş ile birlikte östradiol, inhibin B, FSH ve AMH gibi serum markerları ovaryum rezervinin önemli bir belirteçidir. AMH, kemoterapi sonrası özellikle ovaryum fonksiyonunun güçlü bir öngörücüsü olarak ortaya çıkmıştır (De Vos ve ark., 2014). Kemoterapi alan yetişkinlerde AMH hızlı bir düşüş göstermektedir. Çocukluk çağı kanseri tedavisinden sonra erişkinlerde ovaryum rezervini araştıran önceki çalışmalar, düşük AMH konsantrasyonları olduğunu göstermiştir (Brougham ve ark., 2012). İmmunohistokimyasal çalışmalarda AMH ekspresyonunun, primer foliküllerde en yüksek seviyede, antral foliküllerde yarı miktarda, 4mm'den sonrakilerde ise düzenli bir düşüş olduğu gösterilmiştir (Weenen ve ark., 2004). AMH, bütün kadınlarda ovaryum rezervini belirlemek için kullanılacak güvenilir bir markerdir (Uluğ ve Öner, 2014). Çalışmamızda, kontrol grubuna ait ovaryum dokularında AMH salınımının primer, preantral ve sekonder foliküllerinin granüloza hücrelerinden salgılandığı gözlenmiştir. Ayrıca AMH ekspresyonu, primordiyal folikül ve atretik foliküllerde gözlenmemiştir. Bu da AMH salınımının sadece gelişen folikül hücrelerinden salgılandığını desteklemektedir. DOX grubunda ise AMH ekspresyonunda azalma gözlenirken DOX+SEL-1'in AMH ekspresyonunu kontrole yakın şekilde arttırdığı ve diğer gruplara göre daha iyi koruduğu bulunmuştur.

Sitokinler, hücre-hücre iletişimine aracılık eden düşük moleküler ağırlıklı proteinlerdir. Ayrıca, proliferasyon, farklılaşma, hücre sağkalımı, immün hücre aktivasyonu, hücre göçü ve ölümü de düzenlerler (Landskron ve ark., 2014). İnflamasyon folikülogenez ve ovulasyonda önemli fizyolojik bir rol oynar. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda

anormal inflamasyonun, bozulmuş oosit kalitesini, normal ovaryum foliküler dinamiklerini değiştirebileceğini ve buna bağlı infertiliteye neden olabileceğini göstermektedir (Boots ve Jungheim, 2015). İnflamatuar sitokinler, ovaryum mikroçevresinde, ovaryum içindeki fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol oynayan en güçlü faktörlerden birini oluştururlar ve son araştırmalar, inflammatuar koşulların kadınlarda ovaryum rezervine etkilerini göstermiştir (Freour ve ark., 2012; Boots ve Jungheim, 2015). IL1- β ve TNF- α dahil olmak üzere artmış pro-inflamatuar faktör seviyelerinin, düşük oosit kalitesi ve IVF sonuçları üzerindeki olumsuz etkileri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Lee ve ark., 2000; Revelli ve ark., 2009; Winger ve ark., 2009). Çalışmamızda, inflamasyonun önemli belirteçleri olarak sıklıkla kullanılan IL1- β ve TNF- α ile boyanan ovaryum dokularının immunohistokimyasal bulgularında, DOX grubuna ait dokularda IL1- β ve TNF- α immunoreaktivite yoğunluğu bakımından kontrol grubuna göre artış gösterdiği gözlemlendi.

Apoptoz (programlı hücre ölümü), doku homeostazını koruyan, oksidatif hasar dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve patolojik uyarımlarla tetiklenen normal hücre ölüm sürecidir. Reaktif oksijen türleri ve ortaya çıkan oksidatif stres apoptoziste önemli rol oynamaktadır (Kim ve ark., 2014). Apoptoz, özellikle ovaryum gibi yüksek hücre proliferasyonu alanları olan organlarda önemli bir role sahiptir (Vital-Reyes ve ark., 2006). Ovaryumların temel görevi, sağlıklı nesillerin sürdürülebilmesi için foliküler büyüme ve olgun oositlerin üretilmesidir. Memelilerde ovaryum siklusu boyunca bir ya da az sayıda cins hücreleri ovulasyona uğrarken, çoğu folikül hücre apoptozisi ile atreziye uğrar. Foliküler gelişimin bütün aşamalarında apoptozis gerçekleşmesine rağmen, erken antral foliküller atretogenik sinyallerden oldukça fazla etkilenirler (Gougeon, 1996; McGee ve Hsueh, 2000). Buna rağmen, en az atrezi ya da granüloza hücre apoptozisi öncül antral ve en küçük antral foliküllerde gerçekleşir (Thomas ve ark., 2001; Oh ve ark., 2007). Foliküler atrezi, hem doğal hem de deneysel koşullarda omurgalı ovaryumlarında sık görülen bir olgudur. Stres, biyolojik ajanlar, sıcaklık ve yetersiz hormon seviyeleri gibi faktörler tarafından indüklenebilir. Foliküler atrezinin foliküler büyümenin ve gelişimin herhangi bir aşamasında meydana gelebileceği ve bu işlemin ovaryumun fizyolojik homeostazının korunmasına yardımcı olduğu bilinmektedir (Cassel ve ark., 2017). Kaygusuzoğlu ve ark. (2018) yaptığı çalışmada cisplatin ile indüklenen ovaryum toksisitesinde kontrol grubuna kıyasla cisplatin

grubunda çok fazla apoptotik pozitif hücre tespit edildiğini vurgulamışlardır. Hamzeh ve ark. (2018) cyclophosphamide ile oluşturdukları ovaryum hasarında cyclophosphamide uygulanan sıçanların ovaryum dokularında kontrol grubuna kıyasla artmış apoptozu caspase-3 immünreaktivitesinin artması ile göstermişlerdir. Aynı zamanda bu caspase-3 immünreaktivitesinin esas olarak granüloza, stromal hücreler ve korpus luteumda gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Said ve ark. (2012) yaptığı çalışmada radyasyona maruz bırakılan dişi sıçanların uterus ve ovaryumları incelenmiş kontrol grubuna oranla granüloza, teka interstisyel hücrelerinde ve uterus epitelyal hücrelerinde caspase-3 immünreaktivitesinin yoğun olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca sodyum selenit tedavisiyle uterus dejenerasyonunun önlendiğini çalışmalarında vurgulamışlardır. Biz de çalışmamızda benzer olarak DOX'un ovaryumda hem folikül hücrelerinde hem de stromal hücrelerde apoptozu indüklediğini gördük. DOX'a bağlı ovaryum hasarında caspase-3 pozitif apoptotik hücre sayısının kontrole göre arttığını ve DOX+SEL-2 verilen grupta bu sayının anlamlı düzeyde azaldığını gözlemledik.

Selenyum, birçok enzimin yapısında bulunması sebebiyle canlı organizmalar için gerekli temel bir elementtir (Aydoğdu ve ark., 2007). Selenyum, canlılarda düşük dozlarda antioksidan role sahipken, yüksek dozlarda ise toksik olduğu belirtilmiştir. Selenyum antioksidan mekanizmayla ilgili enzimlerde gerekli bir kofaktördür (Boğa, 2007). İnsanlarda birçok biyolojik fonksiyona sahip olan selenyumun en bilinen ve önemli fonksiyonu antioksidan etkisidir. Selenyum bağımlı enzimlerin serbest oksijen radikallerini yıkarak oksidatif hasarı önleyici etkiye sahip olduğuna dair çok sayıda çalışma vardır (Simonoff ve ark., 1992). Antioksidan uygulanarak yapılan çalışmalarda antioksidan ajan kullanımının ovaryumlardaki serbest oksijen radikali oluşumunu azalttığı ve kemoterapiye bağlı hasara karşı koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Niringiyumukiza ve ark. (2019) DOX ile yaptıkları çalışmada lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeyinin arttığı ve antioksidan bir enzim olan SOD konsantrasyonunun düştüğünü göstermişlerdir. Aynı zamanda kontrol grubuna kıyasla GSH-Px değerleri azalırken, CAT değerlerinin arttığını vurgulamışlardır. Gürgen ve ark (2013). Cyclophosphamide ile oluşturdukları ovaryum hasarında çeşitli antioksidanların koruyucu rollerini incelemişlerdir ve çalışma gruplarında GSH-Px düzeylerini değerlendirdiklerinde, cyclophosphamide uygulanan grupta GSH-Px düzeyinin kontrole göre azaldığını bulmuşlardır. Ayrıca, askorbik asit ve α -takoferol uygulanan gruplarda GSH-Px değerleri kontrol grubuna yakinken, selenyum uygulamasında diğer iki

antioksidan uygulanan gruba göre GSH-Px düzeyinin daha az artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Bozkurt ve ark. (2012) iskemi reperfüzyon hasarına karşı farklı doz selenyumun koruyucu etkisini incelemişlerdir. I/R gruplarda MDA seviyeleri oldukça yüksek iken, CAT, SOD ve GSH-Px aktivitelerini düşük bulmuşlardır. Selenyum ön tedavisiyle dokudaki MDA düzeylerini düşürmüşlerdir ve SOD, GSH-Px enzimlerinin aktivitelerini I/R gruplarına kıyasla arttırmışlardır. CAT aktivitelerinin Se1 verilen grupta I/R2 verilen gruba kıyasla arttığını ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığını göstermişlerdir. Se2 grubunda ise I/R2 grubundaki hasarı önemli derecede azalttıklarını bildirmişlerdir. Bizde çalışmamızda yaptığımız biyokimyasal analizler ve ortaya çıkan bulgular sonucunda DOX verdiğimiz sıçanlarda oksidatif stres faktörlerinin artmasına bağlı olarak CAT, SOD ve GSH-Px gibi antioksidan olan enzimlerinin sentezinin azaldığını, buna rağmen diğer çalışmalara benzer şekilde MDA düzeyinin ise arttığını gözlemledik. Bu artışın oluşan lipid peroksidatif hasarı normalize edebilmek için antioksidan enzimlerin sentezinin azaldığına bağlı olabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda, DOX'un oluşturduğu bu toksik etkiden dokuları korumak için selenyumun üç farklı dozunu uyguladık. Buna göre, özellikle SEL-2 ve SEL-3 verilen gruplar DOX'un oluşturduğu toksik etkileri korumaya yeterli olmazken, SEL-1 verdiğimiz sıçanlarda ise SOD ve GSH-Px enzim seviyelerinin daha yüksek olduğunu, MDA değerinin ise kontrole yakın olduğunu biyokimyasal analizler ile tespit ettik. Buradan yola çıkarak DOX'a bağlı ovaryum hasarında selenyumun 0.5 mg/kg dozunun (DOX+SEL-1 grubu) koruyucu etkisinin 1 mg/kg (DOX+SEL-2) ve 2 mg/kg (DOX+SEL-3) dozlarına göre biyokimyasal olarak daha fazla olduğunu ve özellikle DOX+SEL-3 grubunda ise uygulanan SEL-3 dozunun, 2 mg/kg toksik etkiye yol açtığını düşünmekteyiz.

Bu çalışmada antrasiklin türevi kemoterapötik bir ajan olan DOX'un sıçanlarda yol açtığı ovaryum hasarına karşı farklı doz selenyumun etkilerinin histolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle karşılaştırılması amaçlandı. Çalışmadan elde edilen histopatolojik verilere göre, DOX uygulanan grup kontrol grubuyla karşılaştırıldığında dejeneratif değişiklikler oldukça belirgindi. Ovaryumun genel histolojik görünümünü incelemek amacıyla yapılan ışık mikroskopik incelemelerde, dokularda DOX uygulanan grupta primordiyal foliküllerin sayısında azalma, gelişen foliküllerin sayısında düşüş, fibrozis ve hemoraji gibi patolojik bulgular

gözlendi. Güçlü bir antioksidan olarak bilinen selenyum uygulanan gruplarda ise selenyumda belirlenen doz artışına bağlı olarak histolojik yapılarda yer yer bozulmaların devam ettiği ve selenyumun artan dozunun koruyucu özelliğe sahip olmadığı görüldü. Ayrıca, DOX+SEL-3'de DOX'un neden olduğu dejeneratif değişiklikler üzerine de koruyucu herhangi bir etkiye sahip olmadığı belirlendi. Çalışmadan elde edilen histolojik sonuçlara bakıldığında, antioksidan olarak uygulanan farklı doz selenyum verilen gruplarda SEL-2'nin ovaryum histolojisini koruduğu ve kontrole göre daha iyi bir yapıya sahip olduğu sonucuna varıldı. Ayrıca ovaryum havuzunda bulunan foliküllerin sayısı hesaplandığında, DOX grubuna ait ovaryum dokularında atretik folikül sayısında belirgin bir artış vardı. Bu sonuçlar DOX'un toksik/gonadotoksik etkisini gösteren bulgulardan birisidir. Çalışmamızın sonuçları DOX'un toksik etkilerine karşı koruyucu olarak uygulanan farklı doz selenyumun DOX+SEL-2 verilen grupta DOX+SEL-1 ve DOX+SEL-3 gruplarına göre folikül rezervini koruma bakımından daha etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca DOX, gelişmekte olan foliküllerde AMH immünreaktivitesinde düşüşe sebep olurken, IL1- β ve TNF- α immünreaktivitelerinde ve Caspase-3 pozitif apoptotik hücre sayısında ise artışa neden olarak ovaryumda hasara yol açmıştır. Biyokimyasal sonuçlarımıza göre, DOX verilen grupta CAT, SOD ve GSH-Px gibi antioksidan olan enzim düzeylerinin azaldığı, MDA düzeyinin ise arttığı görülmüştür.

Çalışmamızdan elde edilen histolojik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal sonuçlara göre, kemoterapi tedavisi sırasında antioksidan olarak selenyum alımında oluşabilecek serbest radikalleri en az düzeye indirerek, normal ovaryum dokusunda ki gelişmekte olan folikülleri toksik etkiden koruyabilmesi için tercih edilen doz alımının önemli olduğu, fazla alınması durumunda DOX'un neden olduğu toksisiteyi korumadığı düşünülmektedir.

6.KAYNAKLAR

- Adwas AA, Elkhoely AA, Kabel AM, Abdel-Rahman MN, Eissa AA. Anti-cancer and cardioprotective effects of indol-3-carbinol in doxorubicin-treated mice. *J Infect Chemother*, 2016; 22: 36–43.
- Agarwal A, Gupta S, Sekhon L, Shah R. Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2008; 10: 1375–1403.
- Ahsan U, Kamran Z, Raza I, Ahmad S, Babar W, Riaz MH, Iqbal Z. Role of selenium in male reproduction-a review. *Anim Reprod Sci*, 2014; 146: 55–62.
- Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2010; 42: 1634–1650.
- Amandeep K, Manpreet K, Ramica S, Sunil K. Doxorubicin: a critical review on toxicity. *J Pharma Res*, 2012; 5: 2890-2894.
- Aubel-Sadron G, Londos-Gagliardi D. Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. *Biochimie*, 1984; 66: 333-52.
- Aydoğdu N, Erbaş H, Kaymak K. Taurin, Melatonin ve N-Asetilsisteinin Kadmiyuma Bağlı Akciğer Hasarındaki Antioksidan Etkileri.Trakya Univ Tıp Fak Derg, 2007; 24(1): 43-48.
- Ben-Aharon I, Bar-Joseph H, Tzarfaty G, Kuchinsky L, Rizel S, Stemmer SM. Doxorubicin-induced ovarian toxicity. *Reprod Biol Endocrinol*, 2010; 8: 20.
- Boğa A. Ağır Metallerin Özellikleri ve Etki Yolları. 2007; 16: 218.
- Boots CE, Jungheim ES. Inflammation and human ovarian follicular dynamics. *Semin Reprod Med*, 2015; 33: 270–275.

- Bozkurt O, Bayari SH, Severcan M, Krafft C, Popp J, Severcan F. Structural alterations in rat liver proteins due to streptozotocin-induced diabetes and the recovery effect of selenium: Fourier transform infrared microspectroscopy and neural network study. *J Biomed Opt*, 2012; 17(7): 076023.
- Bozkurt S, Arıkan DC, Kurutas EB, Sayar H, Okumus M, Coskun A, Bakan V. Selenium has a protective effect on ischemia/reperfusion injury in a rat ovary model: biochemical and histopathologic evaluation. *J Pediatr Surg*, 2012; 47: 1735–1741.
- Brougham MF, Crofton PM, Johnson EJ, Anderson RA, Wallace WH. Anti-Müllerian hormone is a marker of gonadotoxicity in pre- and postpubertal girls treated for cancer: A prospective study. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012; 97: 2059–2067.
- Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos MS, Moreira PI. Doxorubicin: The good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem*, 2009; 16(25): 3267- 3285.
- Carvalho FS, Burgeiro A, Garcia R, Moreno AJ, Carvalho RA, Oliveira PJ. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. *Med Res Rev*, 2014; 34(1): 106-135.
- Cascatio DA, Lowitz BB. *Klinik Onkoloji El Kitabı*, Manavoğlu O (Edt), Palme Yayıncılık, Ankara, 2007.
- Cassel M, Camargo MP, Jesus LWO, Borella MI. Involution processes of follicular atresia and post-ovulatory complex in a characid fish ovary: a study of apoptosis and autophagy pathways. *J Mol Histol*, 2017; 98: 243–257.
- Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, Ninfa EG, Frey AZ, Gash DJ, Chow EP. Isolation of the bovine and human genes for Mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell*, 1986; 45: 685–698.
- Childs AC, Phaneuf SL, Dirks AJ, Phillips T, Leeuwenburgh C. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis,

as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2: Bax ratio. *Cancer Res* 62, 2002: 4592–4598.

De Vos M, Smits J, Woodruff TK. Fertility preservation in women with cancer. *Lancet*, 2014; 384: 1302–1310.

Drews U. *Renkli Embriyoloji Atlası*, Solakoglu S (Edt), Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara, 2000: 384.

Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction*, 2002; 124: 601–609.

Eşrefoğlu M. *Özel Histoloji*, İstanbul Tıp Kitabevi, İstanbul, 2016: 293-307.

Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod*, 1992; 7: 1342-6.

Freour T, Miossec C, Bach-Ngohou K, Dejoie T, Flamant M, Maillard O, Denis MG, Barriere P, Bruley des Varannes S, Bourreille A, Masson D. Ovarian reserve in young women of reproductive age with Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis*, 2012; 18: 1515–1522.

Gebre-Medhin M, Ewald U, Platin L. Elevated Serum Selenium in Diabetic Children. *Acta Pediatr Scand*, 1984; 73: 109-114.

Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev*, 1996; 17: 121–155.

Gürgen SG, Erdoğan D, Elmas Ç, Kaplanoğlu GT, Özer C. Chemoprotective effect of ascorbic acid, α -tocopherol, and selenium on cyclophosphamide-induced toxicity in the rat ovary. *Nutrition*, 2013; 16: 1–8.

Hamzeh M, Hosseinimehr SC, Mohammadi HR, Beklar SY, Dashti A, Amiri FT. Atorvastatin attenuates the ovarian damage induced by cyclophosphamide in rat: An experimental study. *Int J Reprod Biomed*, 2018; 16(5): 323-334.

Harrison JH, Hancock DD, Conrad HR. Vitamin E and selenium for reproduction of the dairy cow. *J Dairy Sci*, 1984; 67: 123–32.

- Heeba GH, Mahmoud ME. Dual effects of quercetin in doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats and its modulation of the cytotoxic activity of doxorubicin on human carcinoma cells. *Environmental Toxicology*, 2014; 31: 624-636.
- Hirobe S, He WW, Lee MM, Donahoe PK. Müllerian inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in granulosa and Sertoli cells coincides with their mitotic activity. *Endocrinology*, 1992; 131(2): 854–862.
- Hortobagyi G. Anthracyclines in the treatment of cancer: an overview. *Drugs*, 1997; 54: 1–7.
- Johnson-Arbor K, Dubey R. Doxorubicin. Treasure Island (FL): StatPearls. 2017.
- Junquera LC, Carneiro J, Kelley RO. Temel Histoloji, Aytikin Y (Edt), Barış Kitabevi, İstanbul, 1993: 517-526.
- Kabel MA. Zinc/alogliptin combination attenuates testicular toxicity induced by doxorubicin in rats: role of oxidative stress, apoptosis and TGF- β 1/NF- κ B signaling. *Biomed Pharmacother*, 2018; 97: 439-449.
- Kalaycıoğlu L, Serpek B, Nizamlıoğlu M, Başpınar N, Tiftik A. *Biyokimya* (4. Baskı), Ankara, Nobel Yayınevi, 2010: 328-329.
- Kato H, Sugino N, Takiguchi S, Kashida S, Nakamura Y. Roles of reactive oxygen species in the regulation of luteal function. *Reviews of Reproduction*, 1997; 2: 81–83.
- Kaygusuzoğlu E, Çağlayan C, Kandemir FM, Yıldırım S, Küçükler S, Kılınca MA, Sağlam YS. Zingerone ameliorates cisplatin-induced ovarian and uterine toxicity via suppression of sex hormone imbalances, oxidative stress, inflammation and apoptosis in female Wistar rats. *Biomed Pharmacother*, 2018; 102: 517–530.
- Kim SH, Lee IC, Baek HS, Shin IS, Moon C, Bae CS, Kim HC. Mechanism for the protective effect of diallyl disulfide against cyclophosphamide acute urotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol*, 2014; 64: 110–118.

- Kim SS. Fertility preservation in female cancer patients: current developments and future directions. *Fertil Steril*, 2006; 85: 1-11.
- Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res*, 2014: 149185.
- Lee KM, Lee IC, Kim SH, Moon C, Park SH, Shin DH. Melatonin attenuates doxorubicin-induced testicular toxicity in rats. *Andrologia*, 2012; 44: 796-803.
- Lee KS, Joo BS, Na YJ, Yoon MS, Choi OH, Kim WW. Relationships between concentrations of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide in follicular fluid and oocyte quality. *J Assist Reprod Genet*, 2000; 17: 222-228.
- Lu J, Wang Z, Cao J, Chen Y, Dong Y. A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*, 2018; 16(1): 80.
- Massagué J, Cheifetz S, Boyd FT, Andres JL. TGF-beta receptors and TGF-beta binding proteoglycans: recent progress in identifying their functional properties. *Ann N Y Acad Sci*, 1990; 593: 59-72.
- McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrin Reviews*, 2000; 21:200-214.
- McKenzie RC, Arthur JR, Beckett GJ. Selenium and the regulation of cell signaling, growth, and survival: molecular and mechanistic aspects. *Antioxid Redox Signal*, 2002; 4(2): 339-51.
- Meirow D, Dor J, Kaufman B, Shrim A, Rabinovici J, Schiff E. Cortical fibrosis and blood-vessels damage in human ovaries exposed to chemotherapy. Potential mechanisms of ovarian injury. *Hum Reprod*, 2007; 22: 1626-1633.
- Mescher AL. *Temel Histoloji*, Solakoğlu S (Edt), Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2015: 449-458.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*, 2004; 56: 185-229.

- Mohajeri M, Sahebkar A. Protective effects of curcumin against doxorubicin-induced toxicity and resistance: A review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2018; 122: 30–51.
- Moore KL. Embriyoloji Ve Doğum Defektlerinin Temelleri, Müftüoğlu S, Atilla P, Kaymaz F (Eds), Güneş Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2009: 175-178.
- Morgan S, Lopes F, Gourley C, Anderson RA, Spears N. Cisplatin and doxorubicin induce distinct mechanisms of ovarian follicle loss; imatinib provides selective protection only against cisplatin. *PLoS ONE*, 2013; 8(7): e70117.
- Motta PM, Makabe S, Nottola SA. The ultrastructure of human and Mouse reproduction. The natural history of the female germ cell: origin, migration, and differentiation inside the developing ovary. *Human Reproduction Update*, 1997; 3: 281-297.
- Mueller AS. Selenium and diabetes: an enigma. *Free Radical Res*, 2009; 43(11): 1029–1059.
- Mutlu E. Erişkin Erkek Sıçanlarda Doksorubisin İle Oluşturulan Testis Hasarı Üzerine L-Karnitinin Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2013: 32.
- Niringiyumukiza JD, Cai H, Chen L, Li Y, Wang L, Zhang M, Xu X, Xiang W. Protective properties of glycogen synthase kinase-3 inhibition against doxorubicin-induced oxidative damage to mouse ovarian reserve. *Biomed Pharmacother*, 2019; 116: 108963.
- Nishi K, Gunasekaran VP, Arunachalam J, Ganeshan M. Doxorubicin-induced female reproductive toxicity: an assessment of ovarian follicular apoptosis, cyclicity and reproductive tissue histology in Wistar rats. *Drug Chem Toxicol*, 2018; 41(1): 72–81.
- Oh MS, Chang MS, Park W, Kim do R, Bae H, Huh Y, Park SK. Yukmijhwang-tang protects against cyclophosphamide-induced reproductive toxicity. *Reprod Toxicol*, 2007; 24: 365-370.
- Oktay K, Sönmezer M, Öktem O, Fox K, Emons G, Bang H. Absence of conclusive evidence for the safety and efficacy of gonadotropin-releasing hormone

- analogue treatment in protecting against chemotherapy-induced gonadal injury. *Oncologist*, 2007; 12(9): 1055-66.
- Ovalle WK, Nahirney PC. Netter's Essential Histology, Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P (Eds), Günes Tıp Kitabevleri, Ankara, 2009: 400-425.
- Öktem O, Oktay K. The ovary: anatomy and function throughout human life. *Ann N Y Acad*, 2008a; 1127: 1-9.
- Öktem O, Urman B. Options of fertility preservation in female cancer patients. *Obstet Gynecol Surv*, 2010; 65(8): 531-42.
- Öktem Ö, Oktay K. Stem cells: a perspective on oocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008b; 1127: 20-26.
- Paszkowski T, Traub AI, Robinson SY, McMaster D. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin Chem Acta*, 1995; 236: 173–80.
- Pereda J, Zorn T, Soto-Suazo M. Migration of human and Mouse primordial germ cells and colonization of the developing ovary: an ultrastructural and cytochemical study. *Microsc Res Tech*, 2006; 69: 386-395.
- Qazi I, Angel C, Yang H, Pan B, Zoidis E, Zeng CJ, Zhou GB. Selenium, selenoproteins, and female reproduction: A review. *Molecules*, 2018; 23(12): 3053.
- Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Graem N, Müller J, Cate RL, Skakkebeak NE. Expression of anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999; 84(10): 3836-3844.
- Rayman MP. Selenium and human health. *Lancet*, 2012; 379: 1256-1268.
- Reid ME, Stratton MS, Lillico AJ, Fakih M, Natarajan R, Clark LC, Marshall JR. A report of high-dose selenium supplementation: response and toxicities. *J Trace Elem Med Biol*, 2004; 18: 69–74.

- Revelli A, Delle Piane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol*, 2009; 7: 40.
- Ross HM, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas*. Lippincot Williams & Wilkins, Baykal B (Edt), Palme Yayıncılık, Ankara, 2014: 830- 875.
- Roti Roti EC, Leisman SK, Abbott DH, Salih SM. Acute doxorubicin insult in the mouse ovary is cell- and follicle type dependent. *PLoS One*, 2012; 7: e42293.
- Roti Roti EC, Salih SM. Dexrazoxane ameliorates doxorubicin-induced injury in mouse ovarian cells. *Biol Reprod*, 2012; 86: 1-11.
- Sadler TW. *Langman's Medikal Embriyolojisi*, Basaklar AC, Sönmez K (Eds), Palme Yayıncılık İstanbul, 2017: 261-266.
- Said RS, Nada AS, El-Demerdash E. Sodium selenite improves folliculogenesis in radiation-induced ovarian failure: a mechanistic approach. *PLoS One*, 2012; 7: e50928.
- Salama M, Winkler K, Murach KF, Seeber B, Ziehr SC, Wildt L. Female fertility loss and preservation: threats and opportunities. *Annals of Oncology*, 2013; 24: 598–608.
- Salmon NA, Handyside AH, Joyce IM. Oocyte regulation of anti-Müllerian hormone expression in granulosa cells during ovarian follicle development in mice. *Dev Biol*, 2004; 266(1): 201–208.
- Sanmartín C, Plano D, Sharma AK, Palop JA. Selenium Compounds, Apoptosis and Other Types of Cell Death: An Overview for Cancer Therapy. *Int J*, 2012; 8: 9649-9672.
- Simonoff M, Sergeant C, Garnier N, Moretto P, Llabrador Y, Simonoff G, Conri C. Antioxidant status (selenium, vitamins A and E) and aging. *EXS*, 1992; 62: 368–397.

- Soleimani R, Heytens E, Darzynkiewicz Z, Oktay K. Mechanisms of chemotherapy-induced human ovarian aging: double strand DNA breaks and microvascular compromise. *Aging* 3, 2011: 782–793.
- Songbo M, Lang H, Xinyong C, Bin X, Ping Z, Liang S. Oxidative stress injury in doxorubicin-induced Cardiotoxicity. *Toxicology Letters*, 2019; 307: 41-48.
- Sönmezer M, Özkavukçu S. Fertility preservation in females with malignant disease-1: causes, clinical needs and indications. *Turkish Journal of Hematol*, 2009; 26: 106-13.
- Sugino N. Reactive oxygen species in ovarian physiology. *Reproductive Medicine and Biology*, 2005; 4: 31–44.
- Şeftalioğlu A. Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi, Tıp&Teknik Yayıncılık, Ankara, 2003: 358-360.
- Tal R, Seifer DB. Ovarian reserve testing: a user's guide. *Am J Obstet Gynecol*, 2017; 217: 129-140.
- Tekelioğlu M. Özel Histoloji ince Yapı ve Geliştirme, Antip A.Ş Yayınları, Ankara, 2002: 216-229.
- Thomas FH, Leask R, Srsen V, Riley SC, Spears N, Telfer EE. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. *Reproduction*, 2001; 3: 487-495.
- Tinggi U. Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environ Health Prev Med*, 2008; 13(2): 102-108.
- Tran D, Moody AJ, Fisher AS, Foulkes ME, Jha AN. Protective Effects of Selenium on Mercury-Induced DNA Damage in Mussel Haemocytes. *Aquatic Toxicology*, 2007; 84: 11-18.
- Türker A, Kayaalp O. Kanser Kemoterapisinin Esasları ve Antineoplastik ilaçlar içinde: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Hacettepe-Tas, Ankara, 2002: 380-415.
- Uğuz AC, Naziroglu M, Espino J, Bejarano I, Gonzalez D, Rodriguez AB, Pariente JA. Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human

myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and caspase-3 and -9 activities. *J Membr Biol*, 2009; 232: 15–23.

Uluğ P, Öner G. Evaluation of the effects of single or multiple dose methotrexate administration, salpingectomy on ovarian reserve of rat with the measurement of anti-Müllerian hormone (AMH) levels and histological analysis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2014; 181: 205-209.

Unur E, Ülger H, Ekinçi N. *Anatomi, Bizim Büro Basımevi*, Ankara, 2016: 174.

Vital-Reyes V, Rodriguez-Burford C, Chhieng DC, Alvarado-Cabrero I, Reyes-Fuentes A, Grizzle WE. Ovarian expression of markers associated with proliferation or apoptosis in women with diminished ovarian reserve. *Fertil Steril*, 2006; 86: 176–185.

Wang S, He G, Chen M, Zuo T, Xu W, Liu X. The role of antioxidant enzymes in the ovaries. *Oxidative Med Cell Longev*, 2017; 2017: 4371714.

Weenen C, Laven JS, von Bergh AR, Cranfield M, Groom NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BC, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod*, 2004; 10: 77-83.

Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2004; 44: 275–295.

Winger EE, Reed JL, Ashoush S, Ahuja S, El-Toukhy T, Taranissi M. Treatment with adalimumab (Humira) and intravenous immunoglobulin improves pregnancy rates in women undergoing IVF. *Am J Reprod Immunol*, 2009; 61: 113–120.

Xi L, Zhu SG, Das A, Chen Q, Durrant D, Hobbs DC, Lesnefsky EJ, Kukreja RC. Dietary inorganic nitrate alleviates doxorubicin cardiotoxicity: mechanisms and implications. *Nitric Oxide*, 2012; 26: 274–284.

Yeum K-J, Russell MR, Krinsky IN, Adlini G. Biomarkers of antioxidant capacity in hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004; 430: 97-103.

Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, Lu LS, Lyu YL, Liu LF, Yeh ET. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med*, 2012; 18: 1639–42





T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(EÜHADYEK)



Tarih: 10.01.2018

Toplantı Sayısı: 01

Karar No:18/002

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 10.01.2018 tarihinde Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü	İmza
Fahri OĞUZKAYA	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi	
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Füsün Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Serpil SARIÖZKAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Ahmet ÖZTÜRK	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
Zühal HAMURCU	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
M. Betül AYCAN	Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Sezer DEMİRBUĞA	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
Nalan Hakime NOĞAY	Doç. Dr.	Sağlık Bilimleri Fakültesi	
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Yard.Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Burcu ÜNLÜ ENDİRLİK	Yard.Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Osman İBİŞ	Yard.Doç. Dr.	Ziraat Fakültesi	KATILMADI
Zeynep SOYER SARICA	Dr.	Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz.	
Serap ALTUNTAŞ EROĞLU	Avukat	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	KATILMADI
Asiye GÖKBELEN	Yardım Sevenler Derneği Başkanı	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi	KATILMADI

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji A.D.'dan Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR tarafından sunulan "Doxorubicin ile Oluşturulan Ovaryum Toksisitesi Üzerine Farklı Doz Selenyumun Etkilerinin Değerlendirilmesi" başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : 10.01.2018
Etik kurul Başkanı : Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA
İmza :

doxorubicin ile oluşturulan ovaryum toksisitesi üzerine farklı doz selenyumun etkilerinin değerlendirilmesi

ORJINALLIK RAPORU

% 6	% 5	% 4	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.ilmdergi.org İnternet Kaynağı	% 1
2	CANDAN, İbrahim Aydın, BAYRAM, Dilek, CALAPOĞLU, Nilüfer Şahin, GÜRBÜZ, Nilgün, CANKARA, Fatma Nihan, ÖZGÖÇMEN, Meltem and ARMAĞAN, İlkay. "Kadmiyum Verilen Dişi Sıçanlarda Üreme Sistemi Üzerine Melatonin ve Selenyumun Etkisi", Süleyman Demirel Üniversitesi, 2017. Yayın	% 1
3	www.fizyolojikongresi2014.org İnternet Kaynağı	% 1
4	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
5	halksagligiokulu.org İnternet Kaynağı	<% 1
6	www.slideshare.net İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı : Özge CENGİZ

Uyruğu : T.C.

Doğum Tarihi ve Yeri: 1993 / Kayseri –Türkiye

E-mail : ozgecngz3@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD	2019
Lisans	Bartın Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2012-2016

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2017- Halen	ERÜ Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji A.D	Biyolog

YABANCI DİL

İngilizce