

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

**CISPLATINİN OLUŞTURDUĞU SIÇAN OVARYUM  
HASARINDA EDARAVONUN KORUYUCU ETKİSİ**

**Hazırlayan  
Özlem KARA**

**Danışman  
Prof. Dr. Birkan YAKAN**

**Doktora Tezi**

**Nisan 2021  
KAYSERİ**

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

**CİSPLATİNİN OLUŞTURDUĞU SIÇAN OVARYUM  
HASARINDA EDARAVONUN KORUYUCU ETKİSİ  
(Doktora Tezi)**

**Hazırlayan  
Özlem KARA**

**Danışman  
Prof.Dr. Birkan YAKAN**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
tarafından TDK-2019-9118 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Nisan 2021  
KAYSERİ**

## **BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK**

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Özlem KARA

İmza:

## **YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI**

**“Cisplatinin oluşturduğu sıçan ovaryum hasarında edaravonun koruyucu etkisi ”**  
adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma  
Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

**Tezi Hazırlayan**

Özlem KARA

**Danışman**

Prof.Dr. Birkan YAKAN

**Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı**

Prof.Dr. Birkan YAKAN

**Prof. Dr. Birkan YAKAN** danışmanlığında **Özlem KARA** tarafından hazırlanan “**Cisplatinin oluşturduğu sıçan ovaryum hasarında edaravonun koruyucu etkisi**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Histoloji-Embriyoloji** Anabilim Dalı **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

09 /04/2021

**JÜRİ****İmza**

Danışman: Prof. Dr. Birkan YAKAN

Üye: Prof. Dr. Erdoğan Unur

Üye: Doç. Dr. Arzu Hanım Yay

Üye: Doç. Dr. Züleyha Doğanığit

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Halime Tozak Yıldız

**ONAY**

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

...../...../2021

**Enstitü Müdürü**

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının tüm aşamalarında ve yüksek lisans, doktora eğitimim süresince benden her konuda destek, yardım ve tecrübelerini esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Sayın Prof. Dr. Birkan YAKAN'a ve bana yol gösteren değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Arzu YAY, Doç. Dr. Derya Karabulut ve Dr. Öğr. Üyesi Esra BALCIOĞLU'na en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın deneysel bölümünde yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Emin, Tuğrul, Emel, Murat ve Nurhan'a, DEKAM'dan Sn. Fatma Hanım'a desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Hayatımın her anında karşılıksız sevgilerini, maddi-manevi desteklerini benden esirgemeyen, varlıklarıyla ve davranışlarıyla her zaman gurur duyduğum sevgili eşim Mustafa KARA, çocuklarım Elif ve Ali KARA'ya bana her zaman özel olduğumu hissettirdikleri için teşekkür ederim. Her an, her koşulda yanımda oldukları ve bana hayata pozitif bakmayı öğrettikleri için onlara sonsuz sevgi ve saygılarımı sunuyorum.

**Özlem KARA**

## **CİSPLATİNİN OLUŞTURDUĞU SIÇAN OVARYUM HASARINDA EDARAVONUN KORUYUCU ETKİSİ**

**Özlem KARA**

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**Doktora Tezi, Nisan 2021**

**Danışman: Prof. Dr. Birkan YAKAN**

### **ÖZET**

Cisplatin kanser tedavisinde 30 yıldan daha uzun süreden beri kullanılmaktadır. Bununla birlikte, üreme fonksiyonlarını bozabildiği gösterilmiştir. Bu çalışma cisplatinin neden olduğu ovaryum hasarı üzerinde edaravonun koruyucu etkisini değerlendirmeyi amaçlamaktadır.

Çalışmada toplam 40 adet Wistar albino cinsi dişi sıçan kullanılarak 4 grup oluşturuldu: Grup 1 (kontrol grubu) (n=10); herhangi bir işlem yapılmadı. Grup 2(cisplatin grubu) (n=10); 7,5 mg/kg tek doz cisplatin uygulandı ve herhangi bir işlem uygulanmadı. Grup 3 (edaravon grubu) (n=10); 1mg/kg edaravon tek doz uygulandı ve herhangi bir işlem uygulanmadı. Grup 4 (cisplatin+ edaravon grubu) (n=10); 7,5 mg/kg. tek doz cisplatin ile 1mg/kg edaravon uygulandı. 72 saat sonra, tüm gruplarda ovaryumlar cerrahi işlem uygulanarak çıkarıldı. Alınan kan örneklerinde serum malondialdehid (MDA) ve serum nitrik oksit (NO) düzeylerine bakıldı. Ovaryum doku örneklerinde TUNEL yöntemi kullanılarak DNA hasarı ve apoptozis değerlendirildi. Ovaryum doku hasarı Kaspaz-3 ve Kaspaz-8 ile immünohistokimyasal boyama yapılarak değerlendirildi. Çalışmadan elde edilen bulgulara göre, cisplatinin ovaryumda yapmış olduğu hasarda edaravon koruyucu özellik gösterdi. Serum MDA ve NO düzeyleri cisplatin grubunda diğer gruplardan daha yüksekti. Histopatolojik doku hasarı cisplatin grubunda diğer gruplara göre daha yüksekti. Benzer şekilde, DNA hasarı ve apoptozis cisplatin grubunda gruplardan daha yüksekti ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Kaspaz-3 ve Kaspaz-8 ile yapılan immünohistokimyasal boyamada ise cisplatin grubunda immün aktivite gösteren hücre yoğunluğu fazlayken cisplatin+ edaravon grubunda azalmıştı. Sonuç olarak, edaravon ovaryumda cisplatin hasarının önlenmesi ve kısa süreli tedavisinde etkili gibi görünmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Cisplatin, edaravon, apoptoz, ovaryum, sıçan

## PROTECTIVE EFFECT OF EDARAVONE ON CISPLATIN INJURY IN RAT OVARY

Özlem KARA

Erciyes University, Institute of Medical Sciences

Department of Histology and Embryology

PhD Thesis, April 2021

Supervisor: Prof. Dr. Birkan YAKAN

### ABSTRACT

Cisplatin has been utilized for cancer treatment for more than thirty years. However it has been shown that, it might deteriorate reproductive functions. This study was aimed to evaluate the protective effect of edaravone on cisplatin induced ovarian injury.

A total 40 female Wistar–Albino rats were utilized to form four groups: Group 1 (control group) (n=10), no procedure was performed. Group 2 (cisplatin group) (n=10), single dose 7,5 mg/kg cisplatin was administered and no procedure was performed. Group 3 (edaravone group) (n=10), single dose 1 mg/kg edaravone was administered and no procedure was performed. Group 4 (cisplatin+ edaravone group) (n=10), single dose 7.5 mg/kg cisplatin and 1 mg/kg edaravone were administered. 72 hours later, ovaries were surgically extirpated in all groups. Malondialdehyde (MDA) levels and nitric oxide (NO) levels were studied in blood samples. In ovarian tissue samples, DNA damage and apoptosis were assessed by using TUNEL method. Ovarian tissue damage was evaluated by immunohistochemical staining with caspase-3 and caspase-8.

According to the findings obtained from the study, edaravone showed protective properties on ovarian damage due to cisplatin. Blood MDA and NO levels were significantly higher in cisplatin group than other groups. Histopathological ovarian tissue damage in the cisplatin group was significantly higher than other groups. Similarly, DNA damage and apoptosis was higher in cisplatin group and this difference was found to be statistically significant. The immunohistochemical staining which was done by using caspase-3 and caspase-8 was revealed that immun reactive cells were statistically higher in cisplatin group than cisplatin+ edaravone group.

In conclusion, edaravone seems to be effective in prevention of ovarian damage and short-term treatment.

**Keywords:** Cisplatin, edaravone, apoptosis, ovarium, rat

## İÇİNDEKİLER

<b>BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....</b>	<b>ii</b>
<b>YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI .....</b>	<b>iii</b>
<b>ONAY .....</b>	<b>iv</b>
<b>TEŞEKKÜR .....</b>	<b>v</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>viii</b>
<b>İÇİNDEKİLER .....</b>	<b>x</b>
<b>KISALTMALAR .....</b>	<b>xii</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ.....</b>	<b>xiii</b>
<b>TABLolar LİSTESİ.....</b>	<b>xiv</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1. Ovaryum.....	3
2.1.1. Ovaryum Anatomisi .....	3
2.1.2. Ovaryum Embriyolojisi .....	4
2.1.3. Ovaryum Histolojisi .....	5
2.2. Cisplatin.....	6
2.2.1. Cisplatinin moleküler yapı ve özellikleri.....	6
2.2.2. Cisplatinin toksik etkisi .....	7
2.3. Serbest radikaller .....	8
2.3.1. Serbest oksijen radikalleri.....	9
2.3.1.1. Serbest oksijen radikallerinin hücre hasarındaki rolü .....	9
2.3.1.2. Lipid peroksidasyonu ve Malondialdehit .....	10
2.3.2. Nitrik Oksit .....	10
2.4. Antioksidanlar .....	11
2.4.1. Oksidatif stres ve antioksidanlar.....	11
2.5. Edaravon .....	12
2.5.1. Edaravonun antioksidan etkileri .....	13

<b>3. MATERYAL VE METOD.....</b>	<b>14</b>
3.1. Deneysel çalışma.....	14
3.2. Işık mikroskobu incelemeleri .....	16
3.2.1. Doku takibi .....	16
3.2.2. Hematoksilen & Eozin boyama.....	17
3.2.3. Histopatolojik analiz.....	18
3.3. TUNEL.....	18
3.4.Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 Tayini .....	18
3.5. Biyokimyasal analizler.....	19
3.5.1. Malondialdehit (MDA) düzey tayini .....	19
3.5.2. Nitrik Oksit (NO) aktivite tayini .....	19
3.6. İstatistiksel Analiz .....	19
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>290</b>
4.1. Histolojik bulgular.....	20
4.2.TUNEL Boyama değerlendirilmesi.....	27
4.3. İmmünohistokimyasal bulgular .....	27
4.4. Biyokimyasal bulgular .....	32
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>34</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>38</b>

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

**KISALTMALAR**

<b>4-HNE</b>	: 4-hidroksinonenal
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>DAPI</b>	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
<b>DEKAM</b>	: Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi
<b>EPO</b>	: Eritropoetin
<b>ETZ</b>	: Elektron Transport Zinciri
<b>H&amp;E</b>	: Hematoksilen Eozin
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>OH<sup>-</sup></b>	: Hidroksil
<b>OMİ</b>	: Oosit Maturasyon İnhibitörü
<b>RNS</b>	: Serbest Nitrojen Radikalleri
<b>ROS</b>	: Serbest Oksijen Radikalleri
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismütaz
<b>TUNEL</b>	: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Deoxyuridine Triphosphate DNA Nick-End Labelling

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2. 1. Dişi üreme sistemi.....	3
Şekil 2. 2. Dişi sıçanlarda üreme sistemi.....	4
Şekil 2. 3. Ovaryumun histolojik yapısı.....	5
Şekil 2. 4. Cisplatinin kimyasal yapısı.....	7
Şekil 2. 5. Cisplatinin DNA ile oluşturduğu bağlar.....	22
Şekil 2. 6. Cisplatin-DNA bağlanması.....	23
Şekil 2. 7. Serbest oksijen radikallerine bağlı oluşan lipit peroksidasyon ürünleri.....	24
Şekil 2. 8. Cisplatin-DNA kimyasal bağlanması.....	25
Şekil 2. 9. Antioksidanların sınıflandırılması.....	26
Şekil 2. 10. Edaravonun kimyasal formülü.....	27
Şekil 2. 11. Edaravonun tautomerik formları.....	28
Şekil 2. 12. Edaravonun antioksidan etki mekanizması.....	29
Şekil 2. 13. Edaravonun nöronal etki mekanizması.....	30
Şekil 2. 14. Edaravonun ROS, kaspaz 3 artışına ters etkisi.....	31
Şekil 4. 1. Hematoksilen & Eozin boyama tüm gruplar. H & E boyama x 20.....	32
Şekil 4. 2. Kontrol grubuna ait ovaryum dokusu. Hematoksilen & Eozin boyama.....	31
Şekil 4. 3. Edaravon grubuna ait ovaryum dokusu. H & E boyama x 20.....	31
Şekil 4. 4. Cisplatin uygulanan Grup 2’de hemoraji ve ödem. H & E boyama.....	31
Şekil 4. 5. Cisplatin + edaravon grubunda Hematoksilen & Eozin ile boyanmış kesitlerde hemoraji odakları x20.....	31
Şekil 4. 6. TUNEL boyama tüm gruplar.....	31
Şekil 4. 7. Deney gruplarına ait apoptotik hücre sayısı.....	31
Şekil 4. 8. Kontrol grubu TUNEL x20.....	31
Şekil 4. 9. Edaravon grubu TUNEL x20.....	31
Şekil 4. 10. Cisplatin + edaravon grubundaki apoptotik hücreler TUNEL x20.....	31
Şekil 4. 11. Kaspaz 3- Kaspaz 8 antikoru ile immünohistokimyasal boyama tüm gruplar.....	31
Şekil 4. 12. Cisplatin+ edaravon grubu ile Cisplatin grubuna ait ovaryum dokusu- kaspaz 3 x 20.....	31

## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3. 1. Deneş uygulaması ve gruplar .....	12
Tablo 3. 2. Doku Takip Yöntemi .....	16
Tablo 3. 3. Hematoksilen & Eozin Boyama yöntemi. ....	17
Tablo 3. 4. Ovaryumun Histolojik Hasarı için kullanılan skorlama tablosu.....	21
Tablo 3. 5. Kaspaz-3 ve Kaspaz-8 ile immünohistokimyasal boyama yöntemi .....	21
Tablo 4. 1. Histolojik Hasarın gruplara göre dağılımı .....	33
Tablo 4. 2. Kaspaz 3 antikoru ile immünohistokimyasal boyama sonuçları .....	33
Tablo 4. 3. Kaspaz 8 antikoru ile immünohistokimyasal boyama sonuçları .....	33
Tablo 4. 4. Grupların serum örneklerinde ortalama Nitrik Oksit (NO), Malondialdehit (MDA) ölçümleri.....	33
Tablo 4. 5. Grupların Nitrik Oksit (NO), Malondialdehit (MDA) ölçümlerinin grafiksel analizi .....	33

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, vücuttaki bir hücre grubunun farklılaşarak, anormal ve kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıdır. Uzak organlara kan ya da lenf yolu ile yayılabilen, insidansı yüksek bir hastalıktır (Brooks ve ark., 2009). Yapılan araştırmalara göre kanser, kalp ve damar hastalıklarından sonra ölüm sebeplerinde ikinci sırada yer almaktadır (Kutluk ve Kars, 1992). Akciğer kanseri, meme kanseri ve kalın bağırsak kanseri, kanser türleri arasında en yaygın görünen kanser türleridir (Ferlay ve ark., 2015). 2012 yılında yapılan veri analizlerinin sonuçlarına göre teşhis edilen 1.7 milyon meme kanseri vakasının 700 bini ölümle sonuçlanmıştır (Matthews ve Thompson, 2016). Sadece istatistiksel olarak kaydedilen ülkelerdeki verilere göre her yıl 225.500 kadına ovaryum kanseri tanısı konulmuştur ve tanı konulan hastaların 140.200'ü ölümle sonuçlanmıştır. Bu da jinekolojik kanserler arasında oldukça yüksek bir orandır. Spesifik olmayan semptomlar göstermesi ya da hiç semptom göstermemesi ile birlikte peritoneal sıvı vasıtası ile pasif metastaz sergilemesi yönünden kendine özgü genetik ve epigenetik özellikleri araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Yapılan araştırmalar erken tanının hastalık teşhisi konulmasından itibaren 5 yıl sonrası hayatta kalma oranlarını %20'den %90 oranına yükselttiğini göstermektedir (Torre ve ark., 2018a; Reid ve ark., 2017; Lengyel, 2010b). Bu durum kanserin erken tanı ve tedavisinin önemini göstermekle birlikte ovaryum kanserinde özellikle biyobelirteç olarak kullanılabilir hedefe yönelik tedavi geliştirilebilecek ajanları araştırmayı gerekli kılmaktadır (Kayaalp, 2002).

Cisplatin, platin türevi antineoplastik ajanlardan biridir. Cisplatin, immün-baskılayıcı, antimikrobiyal ve radyasyonun biyolojik etkilerine karşı duyarlı olması bakımından kanser tedavisinde tek başına ya da diğer antineoplastik ajanlarla birlikte kullanılmaktadır (Gerald, 2006). Cisplatin, ilerlemiş over kanseri, serviks, mesane, prostat, özofagus, testis tümörleri küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri, osteojenik sarkom gibi solid tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır (Kayaalp, 2005).

Cisplatinin kanser hücresi üzerindeki aktivitesinin artışı, doz artışıyla belirgin şekilde korelasyon göstermektedir (Chtourou ve ark., 2015). Fakat, cisplatinin bu yüksek dozlarda kullanımı kanserli hücreler dışında birçok doku ve organda da toksik etki oluşturmaktadır (Kim ve ark., 2010). Bu cisplatin kaynaklı toksik durum, doz azaltılmasına ya da kemoterapinin erken kesilmesine neden olmaktadır (Brouwers ve ark., 2009). Araştırmacılar kanser tedavisinde kullanılan ilaçların oluşturduğu toksik ve yan etkleri önlemeye yönelik değişik çalışmalar yapmışlardır. Oksidatif stresin bu toksik etkilerde rolü olduğunu düşünen araştırmacılar doğal ya da bitkisel kaynaklı farklı fitokimyasal içeren ürünler denemişlerdir (El Gharras, 2009).

Edaravon, lipid peroksidasyonunu inhibe ederek ve serbest radikalleri temizleyerek etkisini gösteren güçlü bir sentetiktir. Edaravon, hem C vitamini hem de E vitamini özelliklerine sahip olduğu ve kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçebildiği için diğer serbest radikal temizleyicilerinden farklıdır. Bunun yanı sıra yapılan çalışmalar sonucunda nöroprotektif, antiapoptotik ve anti-enflamatuvar etkileri bildirilmiştir (Masuda ve ark., 2017).

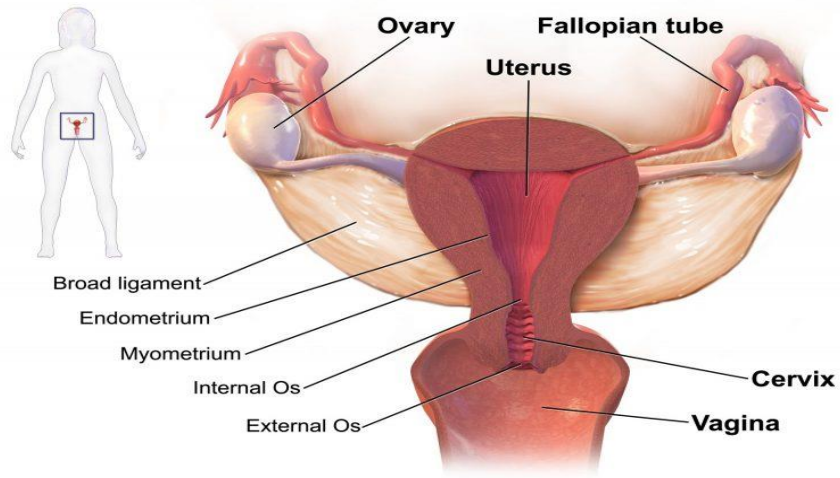
Günümüzde kanser tedavisinde neoplastik ajan olarak sık kullanılan cisplatinin böbrek, karaciğer, testis gibi birçok organ ve dokuda yapmış olduğu hasar üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Literatürde cisplatinin yapmış olduğu ovaryum hasarında edaravonun etkisi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızdaki amaç cisplatin ile indüklenen ovaryum hasarında edaravonun bu özelliklerinden yararlanarak koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırmaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Ovaryum

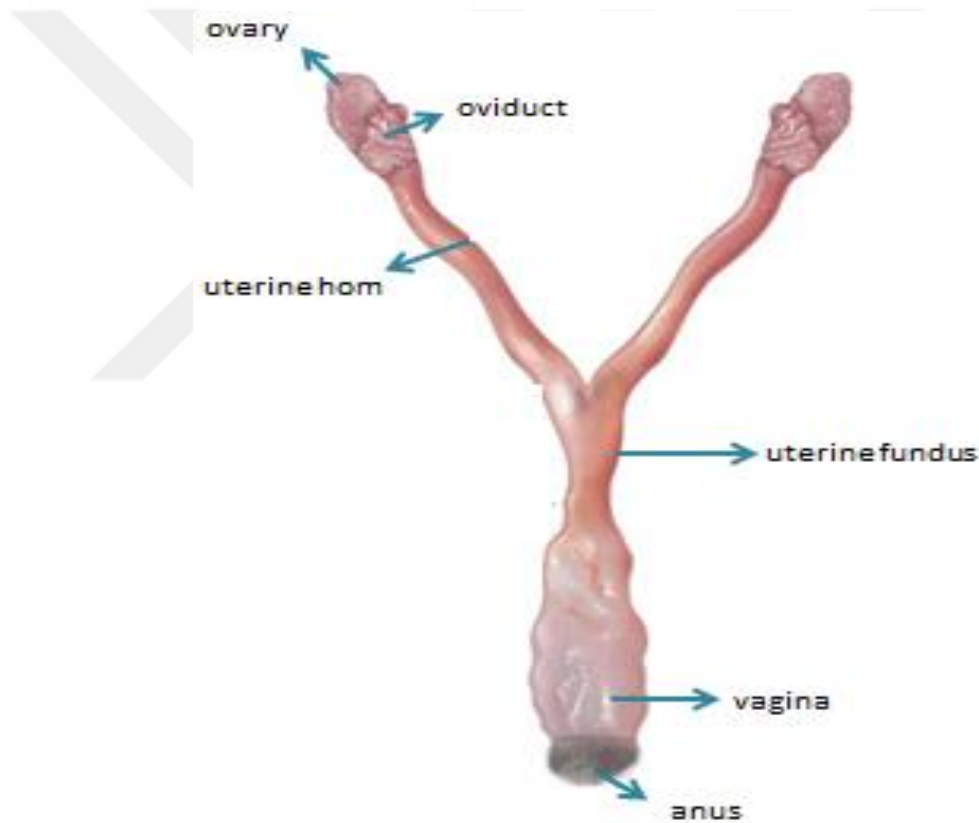
#### 2.1.1. Ovaryum anatomisi

Ovaryum, uterusun sağında ve solunda yerleşim gösteren grimsi beyaz renkteki bir çift genital organdır (Hibbard, 1985). Ovaryumun ağırlığı, kadının fizyolojik durumu ve yaşı ile ilişkili olup yaklaşık 5-8 gr kadardır. Lateral pelvik duvara yakın yerleşimde ve uterusun her iki yanında yer alırlar. Ovaryumlar, fossa ovarika (yumurtalık çukuru) adı verilen bölgede, arteriya iliyaka eksterna ile arteriya iliyaka interna arasındadır (Ovalle ve Nahirney, 2013). Mezovaryum, kan damarlarını ovaryumlara ileten bir periton kıvrımıdır ve her iki ovaryumu uterusun yan kenarlarından uzanarak broad ligamentine bağlar (Clement, 2002), (Şekil 2.1), (<https://vickihobbs.com/wp-content/uploads/2017/12/Broad-Ligament-e1512204912220.jpg>, Erişim Tarihi: 21 Aralık 2020).



Şekil 2. 1. Dişi üreme sistemi

Yetişkin sıçanlarda ovaryum, böbreklerin kranial kısmında yer alırlar ve böğürtlene benzeyen bol foliküllü bir yapıdadır. Mezovaryum ligamentleri ile dorsal vücut duvarına asılı olan ovaryumlar, ovidukt ile bikornual yapıdaki uterusu bağlanırlar. Ovaryumlar bir kapsül tarafından çevrelenerek abdominal kaviteden ayrılmıştır. Ovaryum medulla ve korteks olmak üzere iki tabakadan oluşmuştur. Ovulasyon öncesi yüzeyleri düzgün görünüme sahip ovaryumlar, ovulasyon sonrasında yumurtanın yerinde korpus luteumun oluşması ile bu düzgünlüklerini kaybederler ve kabartılı görünüme sahip olurlar (Dursun, 2008; Mülazımoğlu ve ark., 2011; Xu ve ark., 2018), (Şekil 2. 2).



Şekil 2. 2. Dişi sıçanlarda üreme sistemi (Boyd ve ark., 2018)

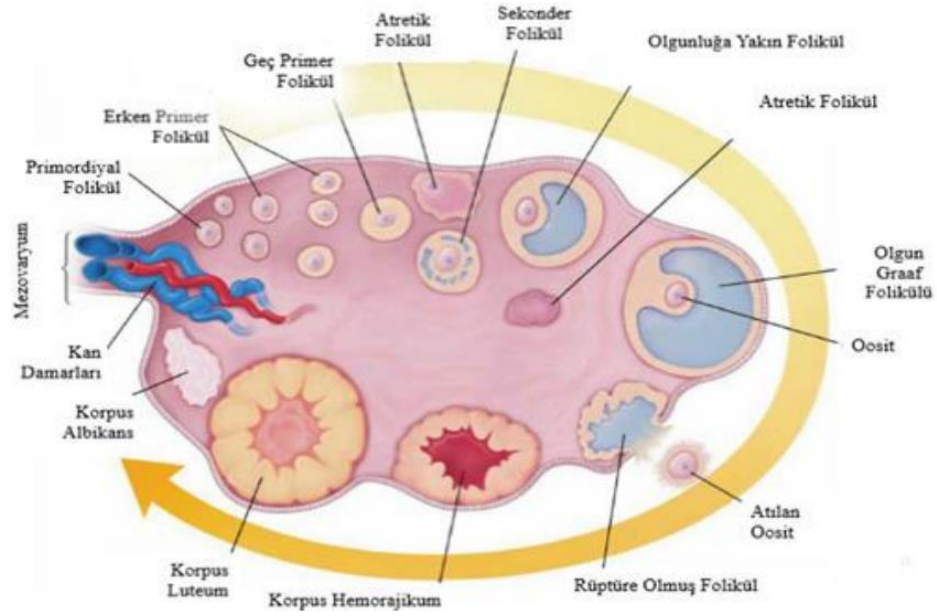
### 2.1.2. Ovaryum embriyolojisi

Primordiyal germ hücrelerinin (oogonium) olgun oositlere dönüşmesi için gerçekleşen olaylar dizisine oogenez denir. Bu süreç doğum öncesi dönemde başlar, pubertede tamamlanır ve menopoza kadar sürer (Sadler, 2010). Vitellus kesesi duvarından köken alan primordiyal germ hücreleri, fetal hayatın 4. haftasında çoğalarak gelişmekte olan gonadlara doğru son bağırsağın mezenteriy boyunca ameboid hareketlerle ilerler ve

beşinci haftanın başında primitif gonadlara ulaşırlar (Sadler, 2010). Altıncı haftada ise genital kabartılara yerleşirler. Gonadlara ulaşamayan primordiyal germ hücreleri ise dejenere olurlar (Ross ve ark., 2016). Oogoniumlar ovaryumlara ulaşarak mitoz bölünme ile çoğalır ve büyüyerek primer oositleri oluştururlar. Ovaryum stromasının hücreleriyle çevrili primer oositler, kortekste tek sıra epitel hücreleriyle çevrelenerek primordiyal folikülleri oluştururlar. Her iki ovaryumda yaklaşık 500 bin kadar primordiyal folikül bulunur. Folikül içindeki primer oosit, 1. mayoz bölünmenin profaz aşamasına girer ve diktiyat fazda bekler. Primer oositin çevresindeki foliküler hücrelerin, oosit maturasyon inhibitörü (OMİ) salgıladığı ve oositin mayoz bölünme evresini engellediği düşünülmektedir. Cinsel olgunluk döneminde foliküllerin bir kısmı atreziye ve apoptozise giderken bir kısmı da gelişimlerine devam ederler. Yenidoğan bir kız çocuğunun ovaryumlarında yaklaşık 2 milyon primer oosit vardır ( Karabulut ve Delilbaşı, 2007).

### **2.1.3. Ovaryum Histolojisi**

Ovaryumlar dıştan içe doğru korteks ve medulla olmak üzere iki bölümden oluşur. Korteks ile medulla bölgeleri arasında kesin bir sınır yoktur. Korteks, en dışta tek katlı yassıdan tek katlı kübik hücrelere kadar değişkenlik gösteren bir epitel (germinal epitel) ile sarılıdır. Germinal epitelin altında ince bir fibröz yapıdan oluşan Tunika albuginea, ovaryuma beyazımsı rengi verir (Kierszenbaum, 2006). Tunika albuginea, korteksi sıkı bir bağ dokusu tabakası olarak çevreler ve yaklaşık 100 µm kalınlığındadır. Tunika albuginea'nın altında yer alan korteksteeki bağ dokusu (stroma) içinde primordiyal folikül kümeleri bulunur. Bu stromada bulunan tipik iğ biçimindeki fibroblastlar, hormonal uyarılara karşı diğer organlardaki fibroblastlardan farklı yanıt verirler. Ovaryumun en iç kısmı ise gevşek bağ dokusu yapısındaki medulla bölümüdür. Medulla, büyük kan damarları (ovaryumun sarmal ve kıvrımlı arteri ile venler), lenf damarları ve sinirler ile damarca zengindir (Kierszenbaum, 2006) (Şekil 2. 3).



Şekil 2. 3. Ovaryumun histolojik yapısı (Ross ve Pawlina, 2013).

Sıçan ovariumu tek sıralı kübik ya da prizmatik epitel ile örtülüdür. Bu epitel hilusta bursa ovarica tek katlı yassı epiteline karışır. Sıçan ovarium folikülleri gelişimleri boyunca ortalama, primordiyal folikül evresinde 25-30  $\mu\text{m}$ , büyüme aşamalarında 30-400  $\mu\text{m}$ , graff folikül evresinde 650-700  $\mu\text{m}$ 'dir. Sıçan ovarium oositleri ise primordiyal folikülde 18-20  $\mu\text{m}$ , primordiyal folikülden graff foliküle kadar geçen büyüme aşamalarında 40-60  $\mu\text{m}$  iken graff folikülünde 80-90  $\mu\text{m}$ 'dir (Bayraktaroğlu, 2012).

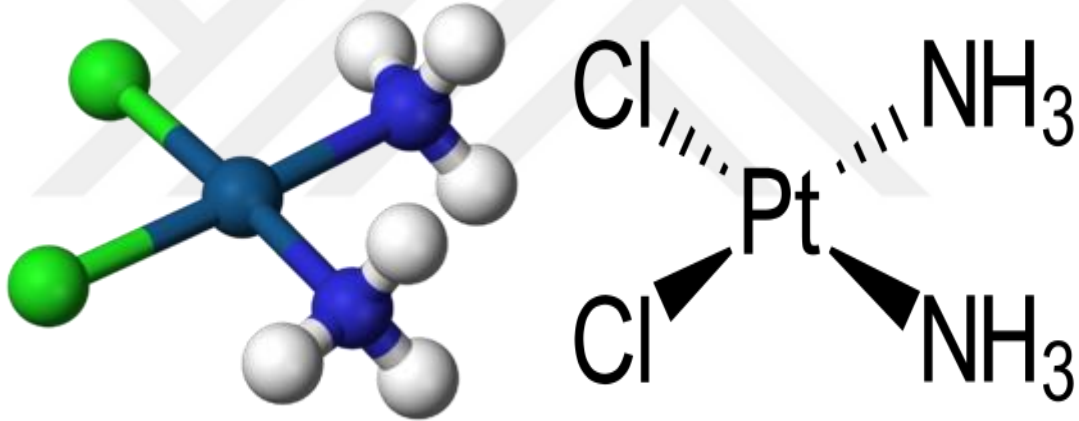
## 2.2. Cisplatin

Cisplatin biyofizikçi Barnett Rosenberg tarafından 1960' larda keşfedilen ilk jenerasyon platinyum bileşiğidir. Bakteri ve memeli hücrelerindeki bölünmeyi araştıran Rosenberg, yaptığı çalışmalarda elektromanyetik radyasyon uygulamasının *Escherichia coli*'nin hücre bölünmesini engellediğini fakat diğer büyüme yapılarını etkilemediğini gözlemledi. Bununla birlikte platin elektrotların bulunduğu büyüme alanında normalden yaklaşık 300 kat daha uzun filamanlı bakteriler olduğunu gösterdi. Buna sebep olan bileşenin aslında 1845'te Peyron tarafından sentezlenen önceleri Peyron kloridi daha sonra ise cisplatin olarak adlandırılan platinin nötral bir sis izomeri olduğu anlaşıldı ve 1965 yılında yayınlandı. 1968 yılında yapılan bir çalışmada intraperitoneal cisplatin uygulanan sarkomlu farede tümör boyutunda anlamlı bir gerileme olduğu gözlemlendi

ve cisplatin ilk defa 1971’de kanser hastalarına uygulanmaya başlandı. 1978 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu’ndan onay alan cisplatin günümüzde de birçok kanser tedavisinde kullanılmaktadır (Erdoğan ve Uzaslan, 2003; Mastanabad, 2009; Gültekin ve ark., 2008; Doğan, 2008).

### 2.2.1. Cisplatinin moleküler yapı ve özellikleri

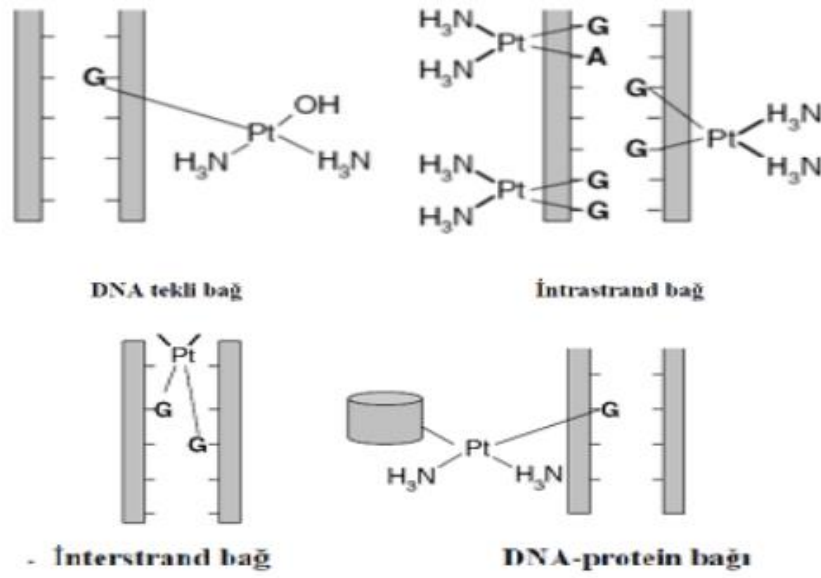
Cisplatin ( $\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}$ ), merkeze yerleşmiş +2 değerlikli Platin atomuna bağlanan iki amonyum ve iki klor dan oluşan bir bileşiktir (Şekil 2. 4). Cis ve trans olmak üzere iki izomeri vardır. Sitotoksik olan cis formu suda çözünebilir ve sitotoksik etkisini nükleer DNA’ya bağlanarak gösterir. DNA transkripsiyonunu ve replikasyonunu bozarak sinyal iletim yollarını aktive eder (Doğan, 2008).



**Şekil 2. 4.** Cisplatinin kimyasal yapısı (<https://www.wikiwand.com/en/Cisplatin>, Erişim Tarihi: 21 Aralık 2020).

Cisplatin hücrede mitokondriye zarar verir ve ATPaz aktivasyonunu engeller. Hücre döngüsünü duraklatarak hücresel taşıma sistemlerinin değişimini gerçekleştirir. Bu da apoptoz, inflamasyon, nekroz ve hücre ölümü gibi bir dizi olaylara sebep olur (Gültekin ve ark., 2008). Ortamdaki klor iyonunun konsantrasyonu cisplatinin ilaç etkinliğinde önemlidir. Klor iyonunun konsantrasyonunun kanda ve ekstraselüler sıvılarda yaklaşık 100 mM olduğu durumda cisplatinin etkinliği daha azdır. Hücre içi klor iyonu konsantrasyonunda meydana gelen ani düşmeler ilacın etkinliğini artırır (Revel ve Laufer, 2002). Tedavide kullanılan cisplatin, hücre içine Copper Transporter 1 (CTR1) (Bakır Transport Proteini) ile aktif olarak alınır (Kischkel ve ark.,1995; Koç ,2008). Cisplatin hücre içinde su ile tepkimeye girerek klor iyonlarının ikisini kaybederken iki su molekülü kazanır ve pozitif yüke sahip yeni bir molekül oluşur. Oluşan bu molekül

hücredeki RNA, proteinler ve özellikle DNA gibi nükleofilik moleküllerle tepkimeye girebilecek özelliktedir. Cisplatin DNA'da N7 pozisyonunda olan pürin bazları ile tepkimeye girerek tekli bağ oluştururken iki DNA zinciri arasında ve DNA zincirindeki bazlar arasında kovalent çarpaz bağlar oluşturur (Şekil 2.5), (Hikim ve ark., 2003 ; Van Loo ve ark.,2002).

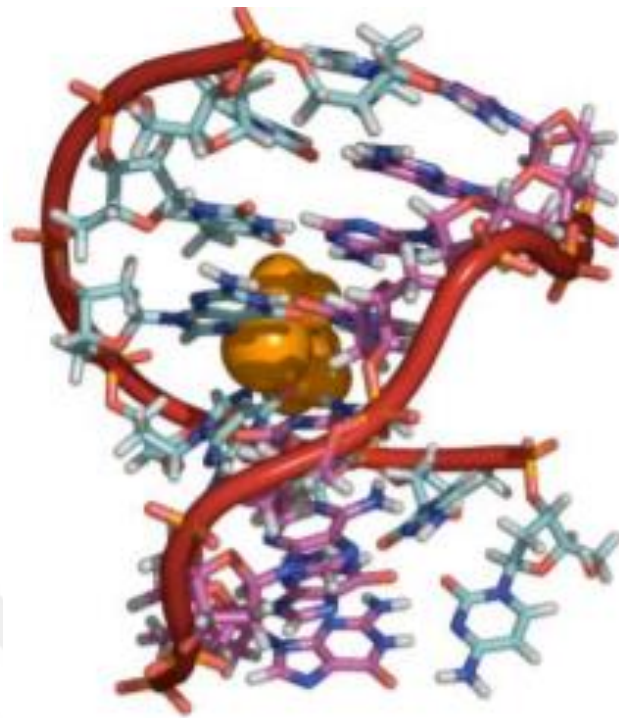


Şekil 2. 5. Cisplatinin DNA ile oluşturduğu bağlar (Hikim ve ark., 2003).

Kovalent bağların oluşumu sonucunda DNA'nın yapısı bozulur. DNA sarmalındaki bozuk yapılara hasarı tanıyan, kromozomal yüksek mobiliteye sahip grup 1 ve 2 (HMG-1 ve HMG-2) proteinleri, human RNA-polimeraz 1 transkripsiyon bağlanma proteini gibi histon olmayan proteinler bağlanır. Sarmal üzerindeki DNA hasarlı bölgelere bağlanan bu proteinler sinyal ileti yollarının birçoğunu aktive ederek hücre hasarı ve ölümüne yol açar (Doğan, 2008).

### 2.2.2. Cisplatinin toksik etkisi

Cisplatin en çok kullanılan kemoteropatik ajanlardan biri olmasına rağmen toksik etki mekanizması net olarak açıklanamamıştır ve birkaç farklı mekanizma ileri sürülmüştür. Bu mekanizmalardan biri, cisplatinin doğrudan sitotoksik Platin-DNA kompleksini oluşturduğudur (Şekil 2. 6).



**Şekil 2. 6.** Cisplatin-DNA bağlanması ( Sabuncuoğlu ve Özgüneş, 2010)

Pozitif yüke sahip Pt atomu hücrel DNA, RNA ve proteinleri bağlayabilmektedir ve özellikle Platin-DNA kompleksinin hücre bölünmesinde önemli toksik etkileri mevcuttur. Diğer mekanizma ise, cisplatinin aktif glutasyon (GSH) ile birleşmesi sonucu oluşan reaktif tiyollerle toksisite oluşturmaktadır. Gama glutamil transpeptidaz (GGT), hücre dışında glutasyonu glutamik asite ve sisteinil glisine ayırır. Sisteinil glisin, diaminopeptidazla glisin ve sisteine parçalanarak bir kısmı tekrar hücre içine alınır. Hücreye alınan aminoasitler ile GSH hücre içinde yeniden oluşturulur ve oluşan reaktif tiyoller toksik etki ile hücre ölümüne yol açabilir (Hanigan ve Devarajan, 2003). Cisplatin, teratojenik, mutajenik ve karsinojenik etkili bir ajandır (Florea ve Büsselberg, 2009; Kayaalp, 1998). Aynı zamanda cisplatin spermatotoksiktir ve cisplatine bağlı testiküler hasar direkt olarak spermatogenik hücrelerde ve Sertoli hücrelerinde görülürken Leydig hücrelerinde de fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır (Azu ve ark., 2010). Leydig hücrelerindeki etkisinden dolayı cisplatin kullanımı serum testosteron düzeylerinde ve intratestiküler P-450 seviyelerinde azalmaya sebep olmaktadır. Yüksek mitotik aktiviteye sahip olduğu için testis germinal epitel hücreleri, sitotoksik kemoterapötiklere karşı duyarlıdır. Tedavide hastanın yaşı, kümülatif doz ve kullanılan ajanlara bağlı olarak gonad fonksiyonlarındaki etki değişiklik gösterir.

Kemoterapötik ajanlar, germ hücrelerinde mutajenik değişikliklere ve gonadal hormon kaybına neden olabilirler. Fetus üzerinde de teratojenik etkiye sebep olabilirler. Cisplatin gonadları en çok suprese eden kemoterapötik ilaçlardan biridir (Dilek, 2010). Over kanseri tedavisinde cisplatin veya karboplatin uygulanan kadınlarda, lösemi gelişme riskinin dört kat fazla görüldüğü bildirilmiştir (Klaassen, 2001). Yapılan bir çalışmada cisplatin uygulanan sıçanlarda sperm üretimi ve seminifer tübül çapında azalma gözlenmiş ve seminifer tübülde TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Deoxyuridine Triphosphate DNA Nick-End Labelling) pozitif hücrelerde artış olduğu bildirilmiştir (Favareto ve ark., 2011). Cisplatin kullanılan hastaların çoğunda azospermi görülse de bu hastaların çoğunda spermatogenez 4 yıl içinde geri dönmektedir (Perk ve ark., 2005). Cisplatinin etkinliğinin daha fazla fakat toksik etkisinin daha az olduğu analogları araştırılmaktadır (Uehara ve ark., 2005).

Cisplatinin doz kısıtlayıcı toksik etkisinin olması, karboplatin gibi platin kökenli ve nefrotoksik olmayan türevleri geliştirse de cisplatin, platin içeren ajanlar içinde en sık tercih edilen kemoteropatik ajandır (Goyer ve ark., 2001). Oluşan yan etkileri önlemek için cisplatinin hızlı enjeksiyonundan kaçınılmış uygulamada uzun süreli infüzyon tercih edilmiştir. Böylece ilaç miktarı azaltılarak elimine edilmesi sağlanmış ve toksik etkisi en aza indirgenmiştir (Hu ve ark., 2007).

İlacın toksik etkisini önlemek için koruyucu olabilecek ilaçlar araştırılmış ve bu konuda çok sayıda araştırma deneyleri yapılmıştır. Bu deneylerde kullanılan vitamin C, vitamin E, melatonin, yaban mersini, likopen gibi pek çok antioksidan maddenin cisplatine bağlı toksisiteyi azalttığı kanıtlanmıştır (Pandir ve Kara, 2013; Cadabak, 2008; Pandir ve ark. 2014).

### **2.3. Serbest radikaller**

Vücuttaki hücreler enerji üretirken, moleküllerin oksidasyonu ve indirgenmesi gibi birtakım kimyasal reaksiyonlar oluşur. Bu kimyasal reaksiyonlar sonucunda da yüksek derecede reaktif moleküller meydana gelir. Bu moleküllerin elektrik yükleri pozitif, negatif ya da nötral yüklü olabilir. Serbest radikaller olarak bilinen bu moleküller vücutta normal oksijen kullanımına bağlı olarak sürekli olarak üretilirler (Kopani ve ark, 2006; Tiwari,2004). Son yörüngelerinde bir ya da birden fazla eşlenmemiş elektron

bulunduran serbest radikaller, kimyasal olarak aktif ve kısa ömürlüdürler. Son yörüngelerinde serbest elektron olması nedeniyle radikal olmayan maddelerle kolay etkileşime girerek onları da radikal yaparlar ve bir dizi zincir reaksiyonu başlatabilirler. Yapılan çalışmalarda serbest radikallerin herhangi bir patolojik durumda aerobik hücrelerde yan ürün olarak oluşabildiği ve hücrelerde molekül değişimlerine ve gen mutasyonlarına yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca serbest radikallerin yaşlanma ve doku yıkımında da rol aldığı ile ilgili çalışmalar vardır (Gutteridge, 1995; Fernandez ve Simitzu, 1991).

Serbest radikaller, organizmada lipitlerin ve proteinlerin parçalanması, inflamatuvar süreçler, enerji üretimi gibi hücrel tepkimelerin yan ürünü olarak sürekli oluşmaktadır. Oluşan bu serbest radikaller, antioksidan savunma gücünün harekete geçmesi ile birlikte homeostaz gerçekleştiğinde organizma için yararlı olmaktadır. Radyasyon, infeksiyon, oksijen toksisitesi, ilaç toksisitesi gibi nedenlerle bu denge bozulduğunda ise serbest radikaller zararlı olmaktadır. Serbest radikaller oksijen ya da nitrojen kaynaklı oluşuna göre serbest oksijen radikalleri (ROS) ve serbest nitrojen radikalleri (RNS) olarak isimlendirilir (Valko ve ark., 2006; Uysal, 1998; Halliwell, 1996). Süperoksit, alkoksil, peroksil, hidroksil (OH) ve lipit peroksil reaktif oksijen radikallerinden, nitrik oksit ve nitrojen dioksit ise reaktif nitrojen radikallerindedir (Karabulut ve Gülay, 2016).

### **2.3.1. Serbest oksijen radikalleri**

Serbest radikallerden en önemli olanlar özellikle serbest oksijen içeren radikallerdir. Bunlardan doğal oksijen molekülünden bir elektron alarak oluşan Süperoksit Radikalinin ( $O^{\cdot -}$ ) en önemli kaynağı elektron transport zinciri (ETZ) dir (Erden,1992) . Metal iyonlarını redükleyici etkiye ve oksitleyici özelliğe sahip Süperoksit radikali hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) kaynağıdır. Mitokondride enerji reaksiyonları sırasında kullanılan oksijenin yaklaşık % 1-5'i süperoksit yapımı ile sonlanmaktadır (Fernandez ve Simitzu,1991).  $H_2O_2$ , moleküler oksijenin etrafındaki moleküllerden iki elektron almasıyla oluşan peroksitin iki proton ( $H^+$ ) ile birleşmesi sonucu oluşur. Süperoksidin etrafındaki moleküllerden bir elektron alması ile meydana gelen peroksitin iki proton ( $H^+$ ) ile birleşmesi sonucu yine  $H_2O_2$  meydana gelir (Uysal, 1998).

Genellikle oksidanlar olarak adlandırılan  $H_2O_2$ , bir serbest radikal değildir fakat serbest radikal biyokimyasında önemli yeri vardır.  $H_2O_2$  gibi oksidan türleri bazı fizyolojik ve ya patolojik durumlarda canlılar tarafından üretilerek organizmada serbest radikal reaksiyonlarına yol açabilirler (Pham-Huy ve ark., 2008; Karabulut ve Gülay, 2016).

### **2.3.1.1. Serbest oksijen radikallerinin hücre hasarındaki rolü**

Hücrelerdeki metabolik reaksiyonların gerçekleşmesi için kullanılan oksijenin %90'ı oksidatif fosforilasyon sırasında mitokondride kullanılır ve bu oksijenin %1-3 kadarı yine mitokondrilerde ROS'a dönüştürülür (Cankurtaran, 2005; Muller ve ark., 2004). Normal koşullarda serbest radikaller metabolik reaksiyonlar sonucunda mitokondrilerde sürekli üretilmektedir. Serbest radikal düzeyleri yüksek olduğunda, serbest radikaller DNA, protein, karbonhidratlar, lipidler gibi hücre bileşenleriyle etkileşerek hücrelerde yapı ve fonksiyon bozukluklarına yol açar (Seitz ve Stickel, 2006).

Serbest oksijen ve nitrojen radikalleri, DNA ile etkileşime girerek şeker grubundan hidrojen atomlarının kaybına ya da ilavesine sebep olurlar ve oksidatif hasara yol açarlar. Özellikle, hidroksil radikali, pirimidinin C4-C5 çift bağı üzerinde oldukça etkilidir. Bu etkileşimler sonucunda timin glikol, urasil glikol gibi oksidatif pirimidin hasar ürünleri oluşur. Serbest radikallerin DNA ile etkileşimi poli sentetaz enzimini (ADP-riboz) aktive eder. Bu aktivasyon programlanmış hücre ölümüne ve DNA'nın parçalanmasına neden olur. Böylece, ETZ fonksiyonları bozular ve  $NAD^+$  seviyeleri hücresel düzeyde tüketilir (Sarma ve ark., 2010; Karabulut ve Gülay, 2016). Hücre dışında oluşan serbest oksijen radikalleri hücre içine hücre zarından girerken hücre zarında toksik etki yaratır ve hücrelerin oksidan savunma kapasitelerinin üzerinde oluştuğunda ise hücre ve organlarda hasar oluştururlar (Cheeseman ve Slater, 1993).

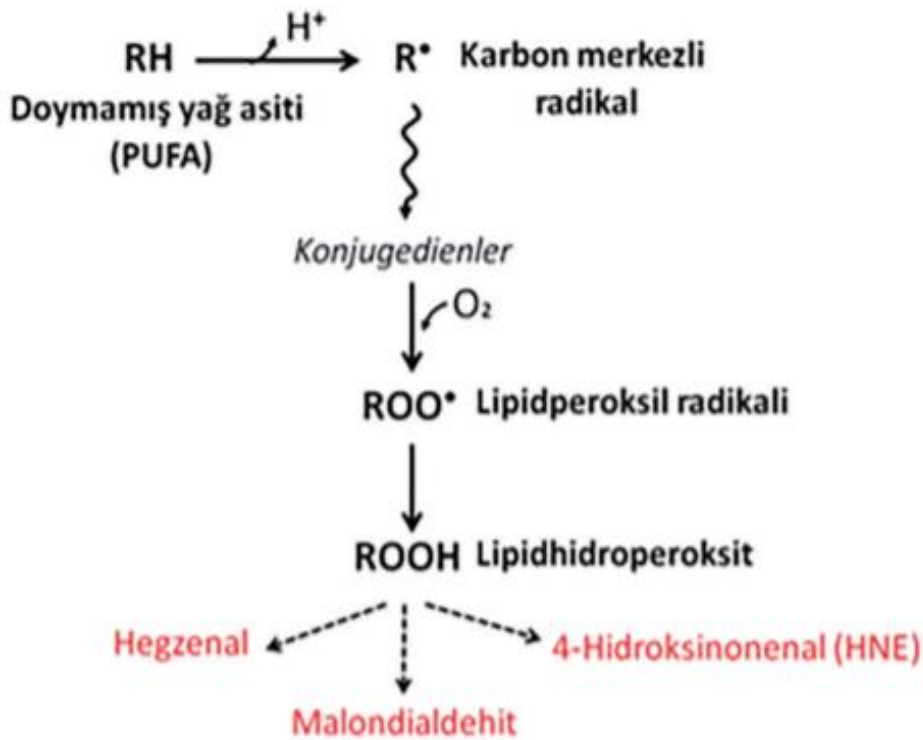
Serbest radikallerin lipitler ile reaksiyona girmesi ile oluşan lipit peroksidasyonu, yüksek miktarda toksik yan ürünlerin üretilmesine sebep olur ve oluşan yan ürünler ikinci haberciler gibi hareket ederek üretildiği bölgeden daha uzak bölgelerde etkilerini gösterirler ve oldukça zararlıdırlar (Devasagayam ve ark., 2003).

Serbest radikaller, gözlerde katarakt, maküler dejenerasyon oluşumu, retinopatide; sinir sistemi hastalıklarında; böbreklerde renal yetmezlik ve glomerulonefritte; solunum

sisteminde astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, amfizem, respiratuvar distress sendromu gibi yüze yakın hastalıkta doku hasarına neden olmaktadır (Collard ve Gelman, 2001).

### **2.3.1.2. Lipid peroksidasyonu ve Malondialdehit**

Serbest oksijen radikalleri hücre membranındaki fosfolipid, glikolipid gibi yağ asitleri üzerine etki ederek aldehid, hidroksi yağ asitleri, peroksit, alkol gibi zararlı ürünlere dönüşürler ve lipid peroksidasyonunu başlatırlar (Valko ve ark., 2006). Lipid peroksidasyonu; birçok organizmaya hasar veren, başlangıç, zincir gelişimi ve sonlanma olmak üzere üç aşamada gerçekleşen reaksiyonlar sürecidir. Bu aşama ilk olarak organizmada meydana gelen serbest oksijen radikalinin membran yapısındaki  $\alpha$ -metilen grubundan hidrojen atomunu uzaklaştırmasıyla başlar. Lipid hidroperoksitlerinin, aldehid ve karbonil bileşiklerine dönüşmesi ile son bulur. Lipid peroksidasyonunda son ürün olarak oluşan malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (4-HNE) en önemli olan ürünlerdendir (Gutteridge, 1995; Baydas ve ark., 2003), (Şekil 2.7). Yüksek reaktivite gösteren MDA, membran fonksiyonlarına ve yapısına zarar verecek yıkımlara sebep olabilmekte ve oksidatif gösterge olarak yaygın kullanılmaktadır (Draper ve Hadley, 1990). Hücre membranında çapraz bağlanma ve polimerizasyona neden olan MDA, membran reseptörlerini ve bağlı enzimleri inaktive ederek esneklik kaybına ve geri dönüşümü olmayan hasarlara yol açarken hücre DNA'sında mutajenik etkiye sebep olur (Goulart ve ark., 2005; Ayala ve ark., 2014).

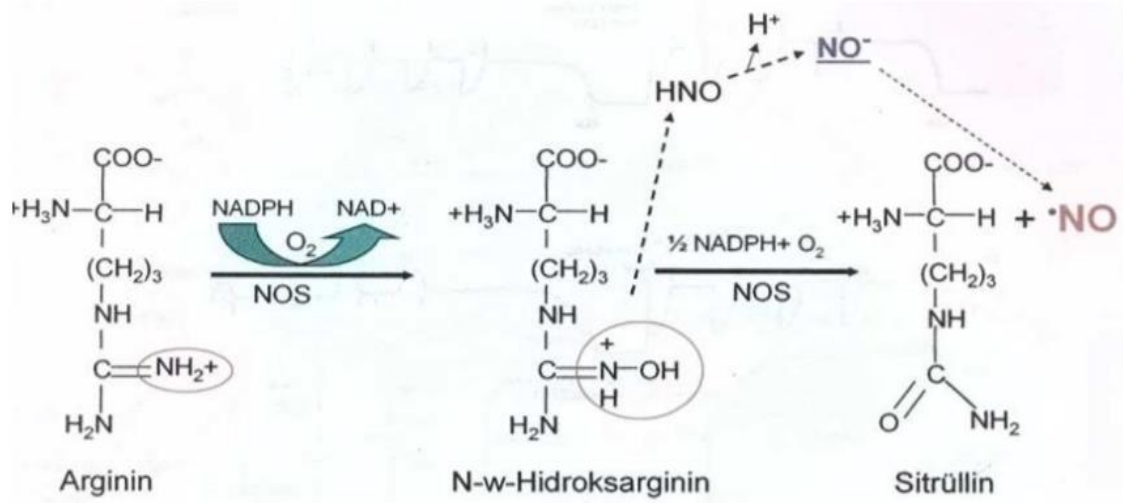


Şekil 2. 7. Serbest oksijen radikallerine bağlı oluşan lipid peroksidasyon ürünleri (Özcan ve ark., 2015)

### 2.3.2. Nitrik Oksit

Serbest azot radikalleri en az serbest oksijen radikalleri kadar önemli bir radikal gruptur ve nitrik oksit de bu grupta yer alır. Nitrik oksit, oluşan süperoksit radikallerini nötralize eden ve endotel hücrelerinde kalsiyum kalmodulin bağımlı nitrik oksit sentaz enzimi ile üretilen haberci bir moleküldür. Nitrik oksit sentaz enzimi, sinir sistemi başta olmak üzere, trombositlerde, damar endotellerinde ve birçok dokuda trombosit agregasyonunu inhibe edici ve damar gevşetici etkiye sahiptir (Strand-Amundsen ve ark., 2018; Eltzschig ve Eckle, 2011).

Arjinin, NADPH-bağımlı olan nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından katalize edilerek sitrülline dönüştürülür ve bu reaksiyon sırasında nitrik oksit üretilir (Şekil 2.8.), (Ogun ve ark. 2016; Büyükafşar, 2005).



**Şekil 2. 8.** Cisplatin-DNA kimyasal bağlanması ( Büyükafşar, 2005)

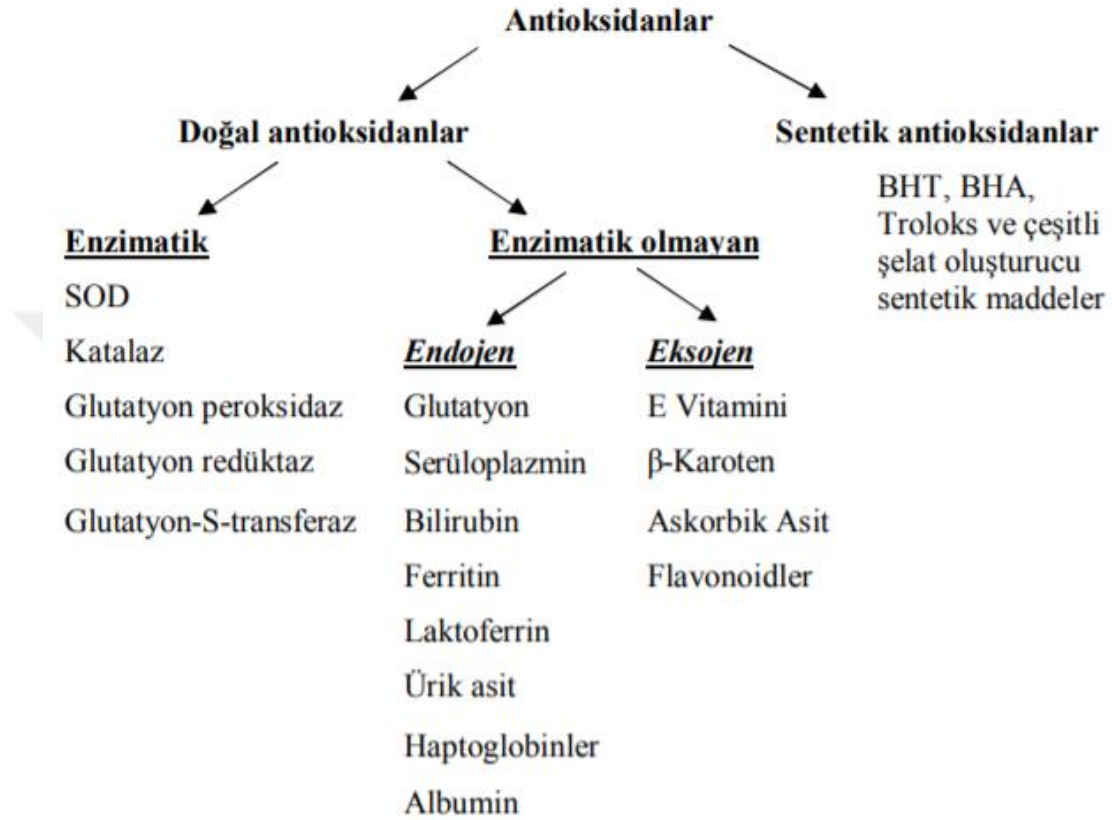
NOS enziminin farklı hücre komponentlerinde endotelial (eNOS), indüklenebilir (iNOS) ve nöronal (nNOS) enzimi şeklinde üç tip izoformu bulunur (Forstermann ve Sessa 2012). Bu da nitrik oksitin özellikle patoloji durumlarda oksidan etki sağlayarak nörotransmitter ve kan basıncı düzenleyicisi olarak işlev yapmasında rol oynar (Salman ve Ashraf 2013).

Araştırmacılar nitrik oksitin sitokrom C oksidaz enzimini inhibe edebildiğini ve mitokondride nitrik oksitin, serbest oksijen ve nitrojen türlerinin üretimini arttırdığını ileri sürmüşlerdir (Bolisetty ve Jaimes 2013).

## 2.4. Antioksidanlar

Antioksidanlar, serbest oksijen radikallerinin oksidasyonunu engelleyen, ortadan kaldıran ya da oksidasyon reaksiyonunun gecikmesine sebep olan maddelerdir (Yılmaz ve ark., 2015). Antioksidanlar, reaksiyonları yavaşlatarak ya da sonlandırarak serbest oksijen radikallerinin etkisiz hale gelmesini ve olumsuz etkilerinin azalmasını sağlarlar (Gutteridge, 1995). Antioksidan savunma, deoksidasyon işlemlerinin gerçekleştiği maddelere göre enzimatik ya da nonenzimatik savunma olarak adlandırılır. SOD, CAT, GST ve GPx rol alıyorsa enzimatik antioksidan savunma olarak isimlendirilirken, A, E, C vitamini, glutatyon, ürik asit gibi maddeler rol alıyorsa nonenzimatik antioksidan savunma olarak isimlendirilir (Perk ve ark., 2005). Nonenzimatik antioksidan ise

endojen ve ekzojen olmak üzere iki grupta sınıflandırmışlardır (Gupta ve ark., 2014), (Şekil 2.9). Bu maddelerin oluşturduğu antioksidan savunma sayesinde serbest radikallerin zararlı etkisi engellenerek hücreler korunmuş olur (Dilek, 2010).



Şekil 2. 9. Antioksidanların sınıflandırılması (Gupta ve ark., 2014).

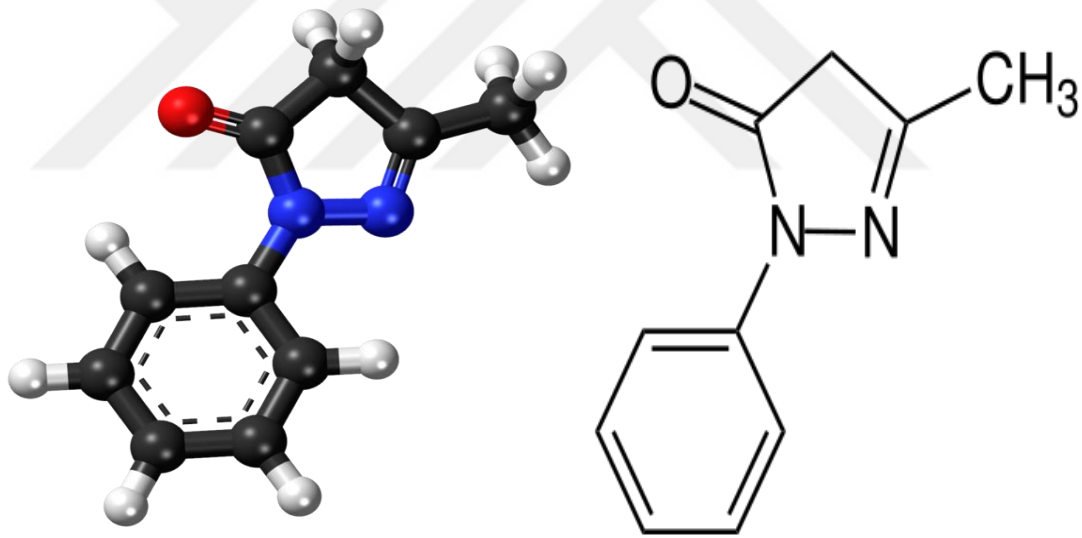
#### 2.4.1.Oksidatif stres ve antioksidanlar

Canlıda metabolik olaylar gerçekleşirken oluşan süperoksit, hidroksil ve  $H_2O_2$  gibi serbest oksijen radikallerinin artışı ile bunların detoksifikasyonundaki antioksidanların yetersizliği oksidatif dengenin bozulmasına yol açar. Bu da oksidatif stres olarak tanımlanır (Özcan ve ark., 2015). Oksidatif streste süperoksit ve nitrik oksit üretimi, mitokondriyal elektron taşınımını, bazı nörotransmitterlerin (norepinefrin, dopamin vb.) oksidasyonu ile gerçekleşen oksidan oluşumunu ve doku hasarını tetiklemektedir (Warner ve Sheng, 2004). Serbest radikallerin etkisi ile protein, lipit ve DNA gibi makromoleküllerin oksidatif hasara uğraması sonucu açığa çıkan malondialdehit (MDA), 8-hidroksiguanin (8-OHG), protein karbonil (PCO) gibi ürünlerin

biyokimyasal ve histokimyasal analizleri ile ölçülmesi oksidatif hasar varlığını belirler. Organizmada sentezlenen antioksidanların yanısıra dışarıdan alınan antioksidanların, hücreleri oksidatif hasara karşı koruyuculuğu ile ilgili çalışmalar son yıllarda giderek artmaktadır ve daha çok antioksidan aktivitesi yüksek olan fakat organizmaya zararı olmayan sentetik bileşikler tercih edilmektedir (Özcan ve ark., 2015)

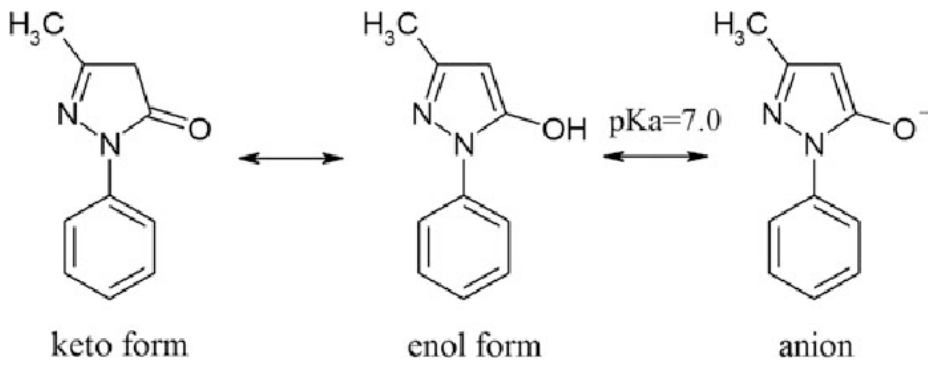
## 2.5. Edaravon

MCI-186 olarak da isimlendirilen edaravonun kimyasal formülü  $C_{10}H_{10}N_2O$  'dur ve hidrazin ve 3-oksopropiyonik asit ester türevleri ile sentezlenir (Şekil 2.10). 174, 2 g düşük molekül ağırlığında ve pKa değeri 7,0'dır. Yağda ve suda çözünebildiği için hücre membranından hatta kan beyin bariyerinden geçebilir ve nöroprotektif etkilidir (Zhang ve ark., 2005; Qin ve ark., 2016 ; Masuda ve ark., 2017 ).



**Şekil 2. 10.** Edaravonun kimyasal formülü (<https://www.wikiwand.com/en/Edaravone> Erişim Tarihi: 21 Aralık 2020)

Edaravon, amin, keto ve enol olmak üzere üç farklı tautomerik forma sahiptir (Şekil 2. 11). Vitamin C ve vitamin E özelliklerini taşıyan edaravonun yaklaşık %50'si anyonik formda bulunur ve serbest oksijen radikalleri ile kuvvetli reaksiyona girebilir (Yamamoto ve ark., 1996; Masuda ve ark., 2017).

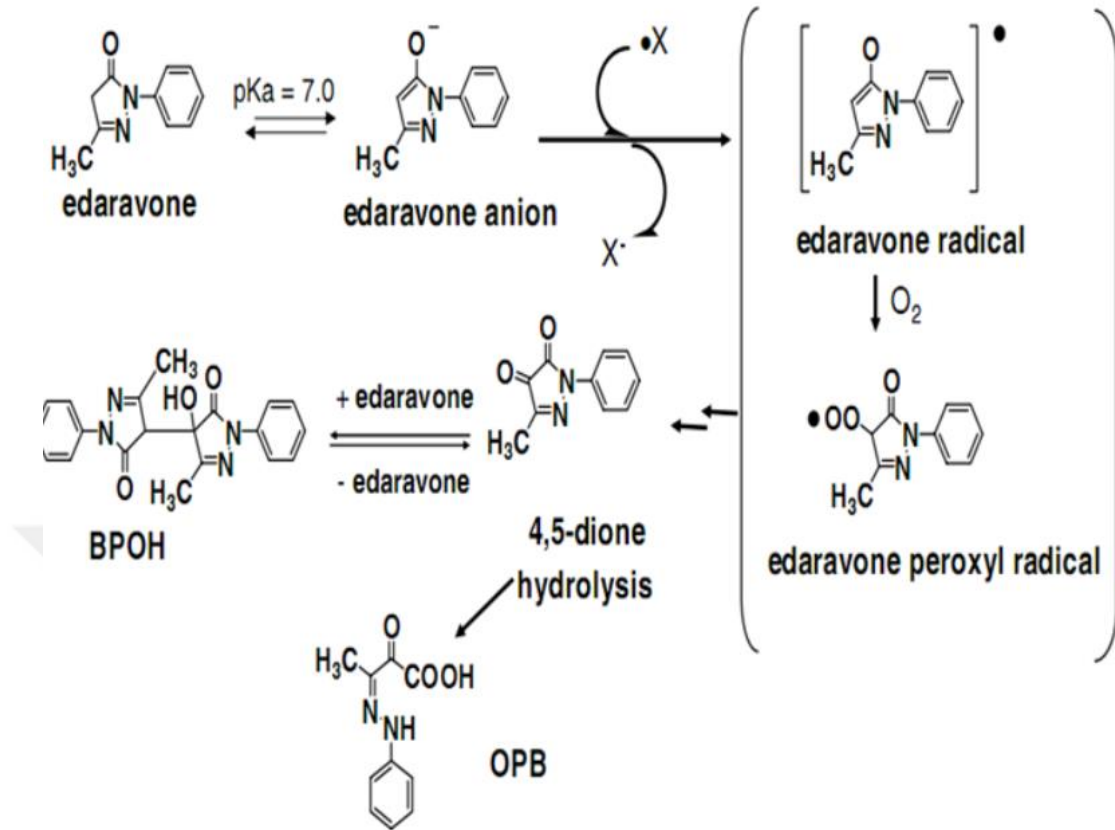


**Şekil 2. 11.** Edaravonun tautomerik formları (Hata ve ark., 2014)

Yarı ömrü 5,4 dakika olan edaravonun antioksidan özelliğinin yanısıra antiapoptotik, nöroprotektif, anti-enflamatuvar özellikleri de vardır. Aynı zamanda oksijen ve hidroksil radikallerini temizleyici, lipid peroksidasyonunu inhibe edici etkiye sahiptir (Kokura ve ark., 2005; Masuda ve ark., 2017).

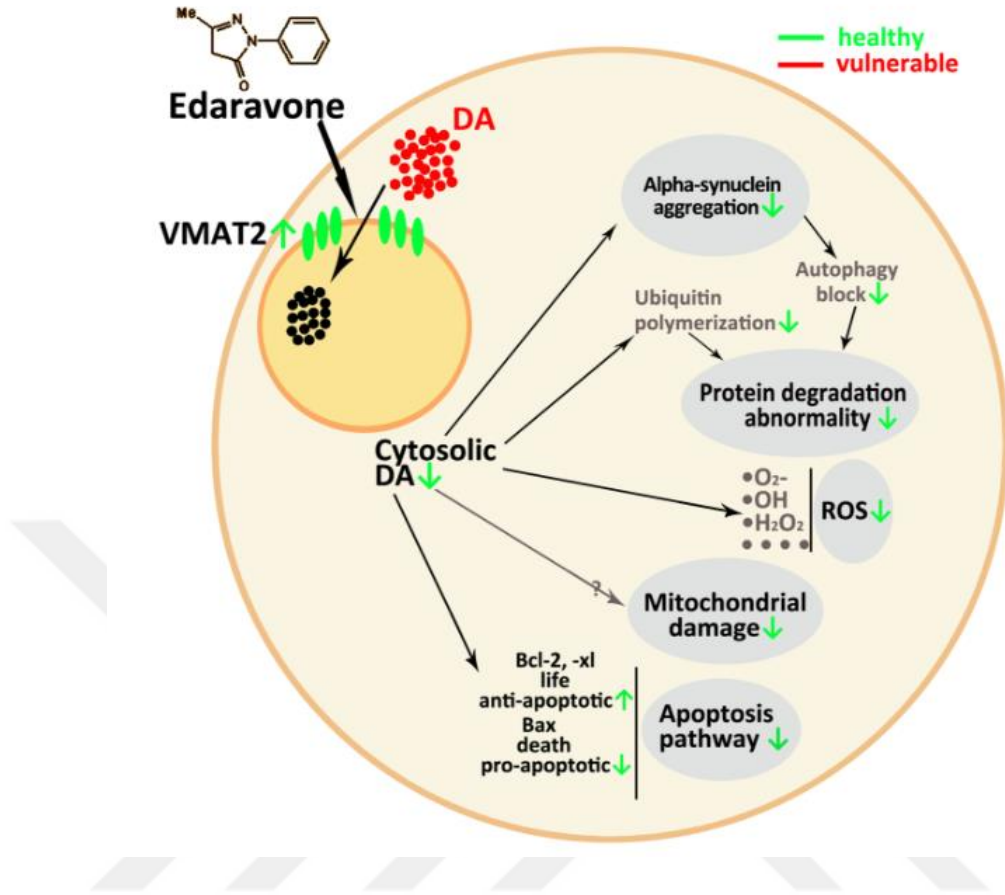
### 2.5.1. Edaravonun antioksidan etkileri

Edaravon hidroksi radikallerinin kuvvetli toplayıcısıdır ve proinflatuar sitokin üretimini inhibe ederek lipid peroksidasyon hasarını azaltmaktadır (Kano ve ark., 2007). Edaravon anyonundan peroksil radikaline bir elektronun transfer olması ile edaravon radikali ve peroksil anyonu oluşur. Bu reaksiyon sonucu lipid oksidasyonundaki zincirin kırılması ile edaravon peroksil radikali bir hidrojen atomu ve bir elektron vererek 4, 5-dion'a dönüşür. 4,5 dionun hidrolizi sonucu 2-okso-3-(fenilhidrazon)- butonoik asite (OBP) dönüşür ve oluşan OBP antioksidan özellik gösterir (Higashi ve ark., 2006; Zhang ve ark., 2005), (Şekil 2.12).



**Şekil 2. 12.** Edaravonun antioksidan etki mekanizması (Patel ve ark., 2014).

Edaravon, iskemik inme, parkinson ve amyotrofik lateral skleroz gibi dejeneratif nörolojik ya da serebral vasküler bozukluklardan kaynaklanan nöronal ve mitokondriyal hasarı, apoptoz riskini, serbest hidroksil radikallerini ve peroksinitrit radikallerini temizleyerek azaltır (Qin ve ark., 2016), (Şekil 2.13). Serbest radikal oluşumu ve oksidatif strese karşı edaravon, lipid peroksidasyonunun etkisini sınırlandırarak hastalığın ilerlemesini engeller (Inokuchi ve ark., 2009). İskemik inmede ise bölgesel kan akımını ve serebral ödemi tersine çevirdiği bildirilmiştir (Hironaka ve ark., 2011). Edaravon antioksidan etkisini prostasiklin üretimini artırarak ve araşidonik asit tepkimesindeki lipooksijenaz inhibisyonu ile gösterir. Hidroksi radikallerini yakalayıp alloksana bağlı lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Reaktif oksijen radikallerinin oluşturduğu hüresel hasarı önleyerek etkisini gösterir (Schwab ve Bartholdi, 1996; Masuda ve ark., 2017).



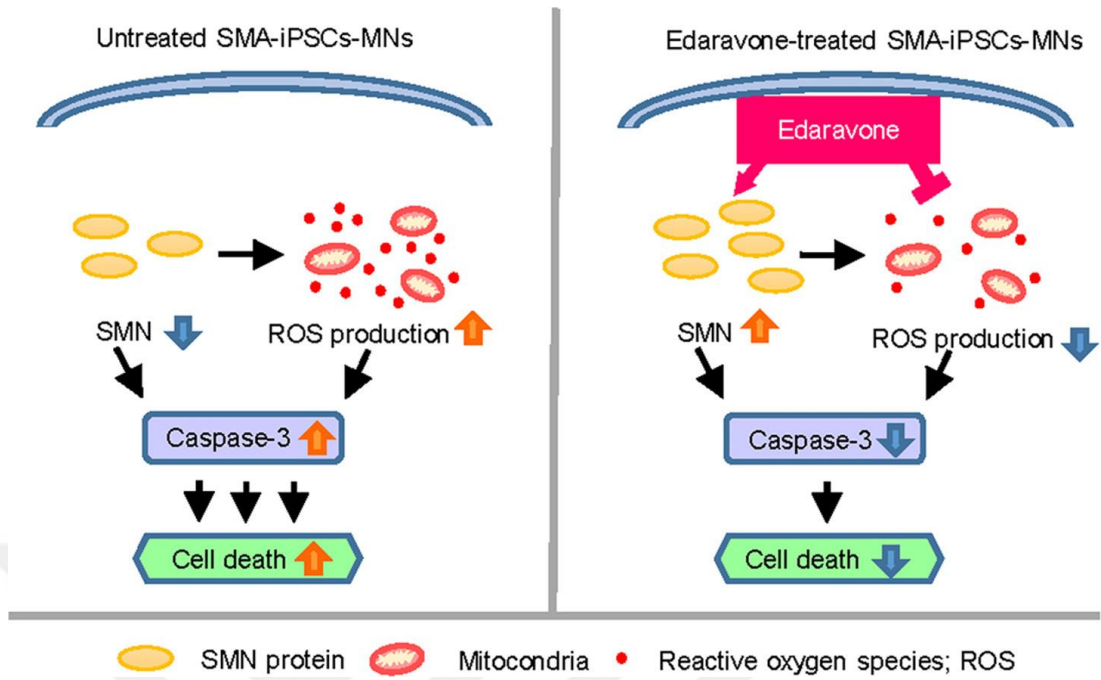
Şekil 2. 13. Edaravonun nöronal etki mekanizması

(<https://journals.plos.org/plosone/article/figure?id=10.1371/journal.pone.0020677.g008>)

Erişim Tarihi: 21 Aralık 2020)

Edaravon'un hidroksil radikalini kurtarıp, lipoksijenaz aktivitesini inhibe etmesi nedeniyle kardiyak iskemi reperfüzyon hasarını önlediği ve edaravon ile yapılmış birçok çalışmada beyin ve karaciğer hasarında iskemi başlatıldığı sırada verilmesinde bile koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir (Amemiya ve ark., 2005).

SMA hastasından indüklenmiş pluripotent kök hücreleri (iPSC) kullanılarak yapılan bir çalışmada serbest radikal temizleyicisi olan edaravonun terapötik potansiyeli değerlendirilmiş ve edaravonun, iPSC'lerden türetilen spinal motor nöronlarda artan reaktif oksijen radikallerinin ve mitokondriyal reaktif oksijen radikallerinin oluşumunu inhibe ettiği ve oksidatif stresin neden olduğu apoptozu tersine çevirdiği gözlenmiştir. Bu çalışmada, oksidatif stres ile artan kaspaz 3 ve hücre ölümü edaravon ile azalmıştır (Ando ve ark.,2017) (Şekil 2.14).



**Şekil 2. 14.** Edaravonun ROS, kaspaz 3 artışına ters etkisi (Ando ve ark., 2017)

Edaravonun antioksidan etkinliğinin araştırıldığı iskemi reperfüzyon çalışmaları da mevcuttur. Beyin iskemi reperfüzyon hasarında Bax- Bcl2 bağımlı antiapoptotik reaksiyonla nöroprotektif etki göstermiştir (Amemiya ve ark., 2005). Ovaryum iskemi reperfüzyon hasarında ise hemoraji, ödem oluşumu gibi doku hasarları derecelendirilmiş ve edaravonun antioksidan etkisi ile hasarın azaldığı gözlemlenmiştir (Kara ve ark., 2012).

### 3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışmanın planlanması ve yürütülmesi Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleşmiştir ve çalışma için Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (ERÜ-HADYEK) 18.01.2019 tarih ve 19/001 nolu kararı ile onay alınmıştır. Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-2019-9118 proje kodu ile desteklenen proje için Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nde (DEKAM) yetiştirilen 8-10 haftalık Wistar albino tipi sıçanlar, veteriner hekim kontrolünde Uluslararası Hayvan Hakları Evrensel Beyannamesine uygun olarak kullanılmıştır. 18-22 °C oda sıcaklığında 12 saat aydınlık/12 saat karanlık fotoperiyodu uygulanmış ve standart laboratuvar diyeti ve su ihtiyaçları sağlanmıştır. Uygulamadan 10 gün önce sıçanlar karantina altına alınmıştır. Çalışmamızda 8-10 haftalık Wistar albino tipi 150-220 gr ağırlığında 40 adet dişi sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar tartılarak ağırlıkları birbirine yakın olacak biçimde 8 kafese, 5'erli olarak yerleştirilmiştir ve 4 gruba ayrılmıştır.

#### 3.1. Deneysel çalışma

8-10 haftalık 40 adet Wistar albino tipi dişi sıçanlar her grupta 10'ar tane olacak şekilde 4 gruba ayrıldı:

**Grup 1:** Kontrol (n=10)

**Grup 2:** Cisplatin grubu ( 7,5 mg/kg tek doz cisplatin), (n=10)

**Grup 3:** Edaravon grup ( 1mg/kg edaravon tek doz), (n=10)

**Grup 4:** Cisplatin+ edaravon grubu (7,5 mg/kg tek doz cisplatin+ 1mg/kg edaravon tek doz), (n=10), (Tablo 3. 1).

**Tablo 3. 1.** Deney uygulaması ve gruplar

Grup	Grup adı	N	Uygulama	Miktar	Doz
1	Kontrol	10	Yok	Yok	Yok
2	Cisplatin grubu	10	Cisplatin	7,5 mg /kg	Tek doz
3	Edaravon grubu	10	Edaravon	1 mg /kg	Tek doz/gün
4	Cisplatin+edaravon grubu	10	Cisplatin+edaravon	7,5 mg /kg +1 mg /kg	Tek doz/gün

Grup 1 kontrol grubuydu, herhangi bir işlem yapılmadı. Deney sonlandırılacağı zaman ketamin (45 mg/kg)+ xylazin (5 mg/kg) kombinasyonu ile anestezi uygulandı. Biyokimyasal analizleri için steril tüplere kalplerinden kan alınarak hedef organ olan ovaryumlar çıkarıldı. Grup 2'ye (cisplatin grubu) 7,5 mg/kg cisplatin tek doz verildi ve herhangi bir işlem yapılmadı. İlaç uygulamasından 72 saat sonra deney sonlandırıldığında ketamin (45 mg/kg) + xylazin (5 mg/kg) kombinasyonu i.p. olarak uygulandı. Biyokimyasal analizleri için kalplerinden steril tüplere kan alındı ve ovaryumlar çıkarıldı.

Grup 3'e (edaravon grubu) 1mg/kg edaravon tek doz i.p. verildi. Deneyin son aşamasında ketamin (45 mg/kg)+ xylazin (5 mg/kg) i.p. anestezi uygulanarak biyokimyasal değerlendirme için steril tüplere kalplerinden kan alındı ve hedef organ ovaryum çıkarıldı.

Grup 4'e ( cisplatin+ edaravon grubu) 7,5 mg/kg i.p. tek doz cisplatin ile 1mg/kg edaravon i.p. tek doz uygulandı. İlaç uygulamasından 72 saat sonra ovaryumlar cerrahi olarak çıkarılarak % 10'luk Formaldehit solüsyonunda histolojik inceleme yapılana kadar fikse edildi.

Kaspaz 3, kaspaz 8, TUNEL ve hematoksilin-eosin ile immünohistokimyasal ve histopatolojik değerlendirme yapmak için ovaryum dokuları parafine gömüldü. İntrakardiyak alınan kan örnekleri malondialdehid (MDA) ve nitrik oksit (NO) düzeylerinin belirlenmesi için ependorf tüplerde daha sonra çalışılmak üzere -80°C'de saklandı.

### 3.2. Işık mikroskobu incelemeleri

#### 3.2.1. Doku takibi

%10'luk formaldehit solüsyonundaki ovaryum doku örnekleri ışık mikroskobik inceleme ve immünohistokimyasal boyama için 72 saat süreyle tespit edildikten sonra dehidratasyon işlemi için artan alkol serilerinden geçirildi. Ksilen ile şeffaflandırılma işleminin ardından doku örnekleri 60°C'de eriyik parafinde bir gece etüvde bekletilip bloklandı (Tablo 3. 2).

**Tablo 3. 2.** Doku Takip Yöntemi

Sıra	Kimyasal Madde	Süre
1	%10 Formaldehid	72 saat
2	Musluk suyu	1 gece
3	%50 Alkol	1 saat
4	%70 Alkol	1 saat
5	%80 Alkol	1 saat
6	%96 Alkol	1 saat
7	Absolü Alkol	1 saat
8	Absolü Alkol	1 saat
9	Absolü Alkol	1 saat
10	Ksilen	20 dakika
11	Ksilen	20 dakika
12	Ksilen	20 dakika
13	Eriyik parafin (60°C)	1 gece
14	Bloklama	20 dakika

#### 3.2.2. Hematoksilen & Eozin ile boyama

Parafin bloklara gömülen ovaryum dokularından rodajlı lamlara 5 µm kalınlığında kesitler alındı ve ışık mikroskobunda yapılacak histolojik değerlendirme için Hematoksilen & Eozin ile boyandı (Tablo3.3).

**Tablo 3. 3.** Hematoksilen & Eozin Boyama yöntemi

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

### 3.2.3. Histopatolojik analiz

Hematoksilen & Eozin ile boyanan kesitlerin ışık mikroskobu (Olympus® Inc. Tokyo, Japan) altında değerlendirildi. Doku hasarı olup olmadığını, varsa şiddetini belirlemek için mikroskopik alanlar tarandı ve histopatolojik değişiklikler hemoraji, ödem, konjesyon, lökosit infiltrasyonu ve folikül dejenerasyonu açısından tanımlandı. Her gruptan 50 alan taranarak hasar şiddeti 0 – 3 arasında skorlanarak gösterildi.

Histopatolojik skorumla en yüksek alana göre belirlenerek yapıldı. Semikantitatif analiz yapılarak patolojik bulgu yok ise 0, patolojik bulgular sırasıyla incelenen alanda <%33, %33-66 ve >%66 şeklinde ise 1, 2, 3 olarak belirlendi. Her parametre için belirlenen skorlar toplanarak toplam skor hesaplandı (Tablo 3. 4), ( Kart ve ark.,2011; Geyikoğlu ve ark., 2019; Kara ve ark., 2012; Pandır ve ark.,2014)

**Tablo 3. 4.** Ovaryumun Histolojik Hasarı için kullanılan skorumla tablosu

Grade	Hemoraji	Ödem	Vasküler Konjesyon	Lökosit infiltrasyonu	Folikül dejenerasyonu
<b>Grade 0</b>	patolojik bulgu yok	patolojik bulgu yok	patolojik bulgu yok	patolojik bulgu yok	patolojik bulgu yok
<b>Grade 1</b>	<%33	<%33	<%33	<%33	<%33
<b>Grade 2</b>	%33-66	%33-66	%33-66	%33-66	%33-66
<b>Grade 3</b>	>%66	>%66	>%66	>%66	>%66

Grade 0; patolojik bulgu yok, Grade 1, 2, 3 ise patolojik bulguların sırasıyla incelenen alanın <%33, %33-66 ve >%66 olması şeklinde belirlenmiştir (Kara ve ark., 2012; Pandır ve ark.,2014)

### 3.3. TUNEL

TUNEL için parafin bloklardaki ovaryum doku örneklerinden poly-L-Lysine kaplı lamalar üzerine alınan kesitler 2 saat 60°C'lik etüvde bekletilerek parafini giderildi. 5'er dakika Ksilen I, Ksilen II, Ksilen III serisinde bekletilen ve parafini arındırılan doku örnekleri azalan alkol serilerinden (%100, %96, %80, %70) 5'er dakika geçirilip suya indirildi. Suarge Biyotek San ve Tic. Ltd. Şti.'nden temin edilen Roche firmasının ticari kiti kullanılarak çalışıldı (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein). Fosfat tamponu ile iki kez 5'er dakika yıkanan örnekler antijen geri kazanımı için 0.01 M %5' lik sodyum sitrat tamponuna alınarak 350 W'de 5 dakika mikrodalga fırında bekletildi. Daha sonra soğuması için 10 dakika oda ısısında bırakıldı. 5'er dakika PBS ile 2 kez yıkanan doku örnekleri nem kamara içerisinde TUNEL reaksiyon karışımı ile 37°C etüvde 60 dakika inkübe edildi. 5'er dakika PBS ile 2 defa yıkanan doku örneklerine 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ile zıt boyama yapıldı. Distile su ile yıkanan örneklere kapatma solüsyonu (UltraCruz<sup>TM</sup> Mounting Medium) uygulanıp lamel ile kapatıldı. Olympus<sup>®</sup> BX51 Floresan mikroskobu ile 450-500 nm dalga boyunda

incelenerek görüntü alındı. 40X objektifte, apoptotik indeks için her kesitten on farklı alan taranarak apoptotik hücreler sayıldı.

#### **3.4. Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 tayini**

Aktif Diagnostik'ten temin edilen Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 antikoru kullanılarak çalışıldı. Ovaryumdan alınan kesitlerin Kaspaz-3 ve Kaspaz-8 ile immünohistokimyasal boyamaları yapıldı. Her iki antikor için de aynı metod uygulandı. Dokular 1 saat etüvde bekletildikten sonra Ksilen I, ksilen II ve ksilen III'de 5 dk bekletildi. Azalan alkol serilerinden (%100, 96, 80, 70). 3'er dk geçirildi ( Tablo.3. 5). 3 kere distile su ile 3 kere PBS ile 5 dakika yıkanan kesitler 12 dakika endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'te bekletildi. PBS ile 3 kere 5 dakika daha yıkandı. Antijenik alan dışındaki bölgeleri kapatmak için 5 dakika normal serum uygulandı. Primer antikor damlatıldı. Daha sonra negatif kontrol için ise fosfat tamponu damlatılarak örnekler tank içerisine yerleştirilip bir gece +4°C'de bekletildi. 30 dakika oda ısısında inkübe edilip PBS ile yıkandı. Oda sıcaklığında 10 dakika biotin sekonder antikorla inkübe edildi. Tekrar PBS ile yıkanıp oda sıcaklığında 10 dakika streptavidin peroksidaz ile bekletildi. Yıkama sonrası immünreaktivitenin görünür hale gelmesi için diaminobenzidin (DAB) kromojen ile 5 dakika muamele edildi. 3 dakika 2 kere distile su ile yıkandı. Hematoksilen ile 1 dakika zıt boyama yapılarak su ile yıkandı. Artan alkol serileri ile sudan arındırılan örnekler ksilenden geçirilerek entellan ile kapatıldı. Ksilenle kapatılan örnekler ışık mikroskobu ile incelendi. Her gruptan örneklerde on farklı alan taranarak immünoreaktivitesinin yoğunluğuna bakılarak skorlama yapıldı. İmmünoreaktif yaygınlık ve yoğunluk şiddetine göre hafif, orta, yoğun dağılım olarak değerlendirildi. Grup içi ve gruplar arası olarak skorlanarak istatistiksel değerlendirmesi yapıldı.

**Tablo 3. 5.** Kaspaz-3 ve Kaspaz-8 ile immünohistokimyasal boyama yöntemi

Sıra	Yapılan İşlem	Süre
1	Etüv (60 °C)	1 saat
2	Ksilen I	5 dakika
3	Ksilen II	5 dakika
4	Ksilen III	5 dakika
5	Absolu Alkol I	5 dakika
6	%96 Alkol	5 dakika
7	%80 Alkol	5 dakika
8	%70 Alkol	5 dakika
9	Distile su	3 kere
10	% 5 sitrat buffer	5 dakika
11	PBS	3x5 dakika
12	% 3H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	12 dakika
13	PBS	3x5 dakika
14	Normal serum	5 dakika
15	Primer antikor	Bir gece +4°C
16	PBS	3x5 dakika
17	Sekonder Antikor	10 dakika
18	PBS	3x5 dakika
19	Streptavidin horse Radish Peroksidaz	10 dakika
20	PBS	3x5 dakika
21	DAB Kromojen	5 dakika
22	Distile Su	2x3 dakika
23	Hemotoksilen	1 dakika
24	Çeşme suyu	1 dakika
25	%70 Alkol	5 dakika
26	%80 Alkol	5 dakika
27	%96 Alkol	5 dakika
28	Absolu Alkol I	5 dakika
29	Absolu Alkol II	5 dakika
30	Ksilen I	5 dakika
31	Ksilen II	5 dakika
32	Kapatma(entellan)	

### **3.5. Biyokimyasal analizler**

#### **3.5.1. Malondialdehit (MDA) düzey tayini**

Deneklerden alınan kan örnekleri daha sonra çalışılmak üzere santrifüj edilerek ependorf tüpünde -80 °C'ye kaldırıldı. ELISA yöntemi ile Atlas Biyoteknoloji Lab.'tan temin edilen MDA (Cat. No: E0156Ra, Bioassay Technology Laboratory) kitine uygun olarak çalışıldı ve ELISA reader' da 450 nm' de ng/ml olarak miktarları tayin edildi.

#### **3.5.2. Nitrik Oksit (NO) aktivite tayini**

Atlas Biyoteknoloji Lab.'tan temin edilen NO (Cat. No: E0703Ra, Bioassay Technology Laboratory) kiti kullanılarak çalışıldı. 450 nm' de ELISA reader' da serum örneklerinin miktarları µmol/ L olarak olarak tayin edildi.

### **3.6. İstatistiksel Analiz**

Verilerin değerlendirilmesi ve işlenmesi SPSS 18. 0 (Statistical Package for the Social Sciences) programında uygulandı. Grupların ortalama ± standart sapma yönünden farklılığı One-Way ANOVA (Tek Yönlü Varyans Analizi) ile yapıldı. Histopatolojik değerlendirmede semikantitatif yöntem ile bulunan verileri ortanca değerler yönünden ve gruplar arası varyasyonu analiz etmek için Kruskal Wallis testi kullanıldı. Kaspazların gruplar arası değerlendirmesi ise Fisher's Exact Test ile p değeri olarak hesaplandı. Biyokimyasal analizlerde post hoc Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi kullanıldı ve gruplar arası farklar tespit edildi. İstatistiksel bakımdan anlamlılık sınırı  $p < 0.05$  olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

Çalışmamızda, 4 gruba ayrılan dişi sıçanlar kullanıldı. Cisplatinin verilmesinden 72 saat sonra ovaryumlar cerrahi olarak çıkarılarak histolojik ve biyokimyasal takip işlemleri yapıldı. Gruplardaki histolojik değişiklikler ışık mikroskopunda incelenmek için Hematoksilen & Eozin (H&E) boyaması ile boyandı. DNA fragmentasyonunu belirlemek amacı ile de TUNEL yöntemi kullanılarak floresan mikroskobu ile incelendi. Ovaryum doku örnekleri immünohistokimyasal boyama yapılarak Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 ile boyanarak apoptotik bölgeler ışık mikroskobu ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Kan serum örneklerinde NO miktarı ve MDA düzeyleri ölçüldü. Tüm sonuçlar kendi içinde her bir grup için ayrı ayrı değerlendirildi.

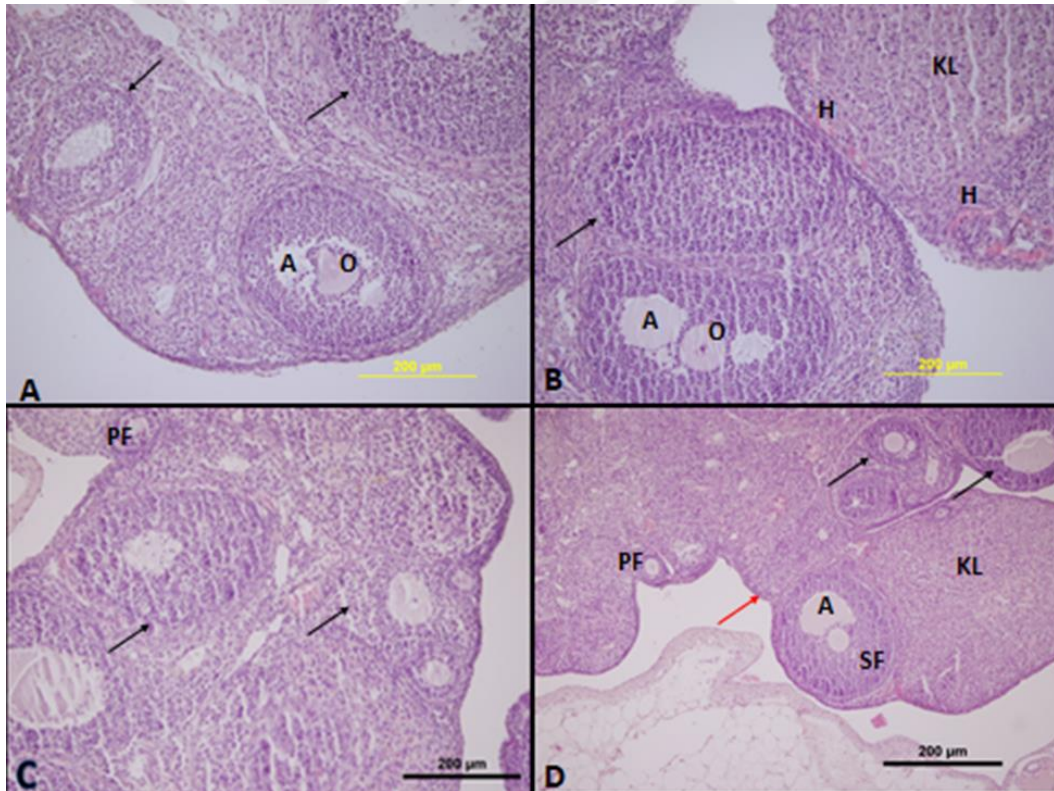
### 4.1. Histolojik Bulgular

Deney grupları makroskopik olarak değerlendirilmiş, kontrol grubu ve edaravon grubu dışındaki ovaryumların nekrotik görünümü ve kanamalı olduğu gözlenmiştir. Doku hasarı varlığının ve şiddetinin belirlenmesi için mikroskopik alanlar ışık mikroskobu ile taranarak histopatolojik değişiklikler incelenmiş hemoraji, ödem, konjesyon, lökosit infiltrasyonu ve folikül dejenerasyonu şeklinde tanımlanmıştır. Hasarın şiddetine göre 0 – 3 arasında skorlama yapılmıştır. Taranan alanlarda hasarın olmaması 0, %33 den az hasar 1, %33- %66 arasındaki hasar 2 ve % 66'dan fazla hasar 3 olarak skorlanmıştır (Tablo 4. 1).

**Tablo 4. 1.** Histolojik Hasarın gruplara göre dağılımı

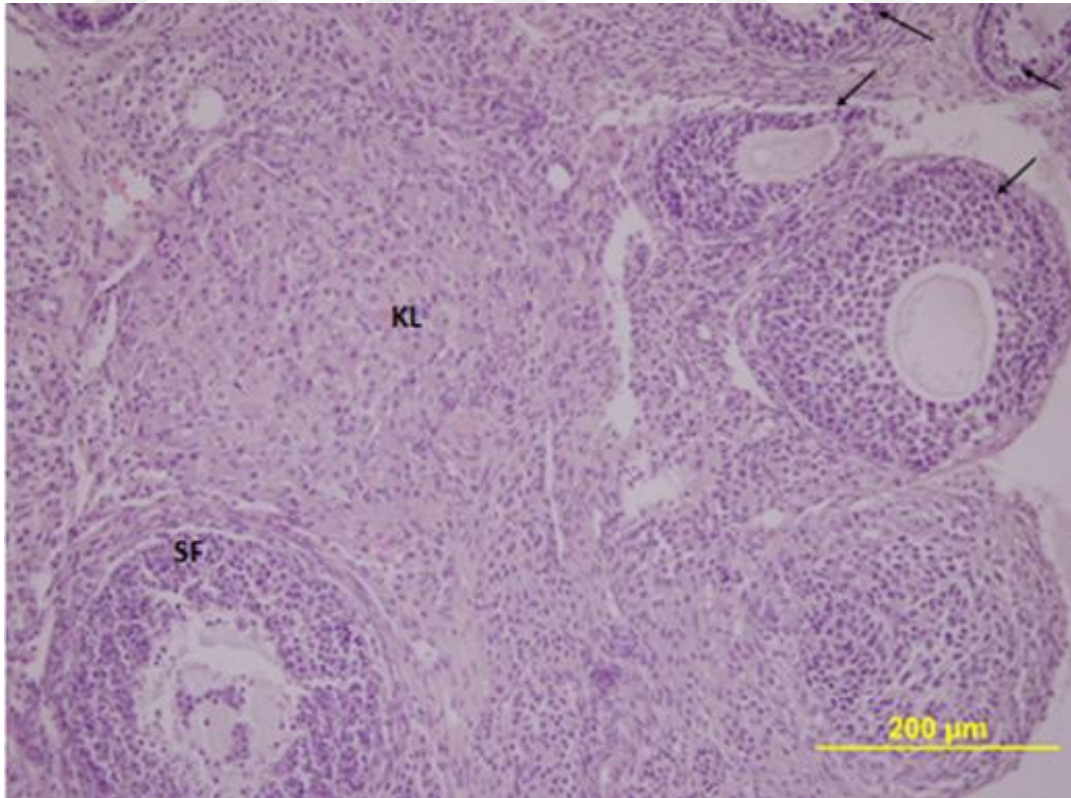
	Grup 1 (n=10)	Grup 2 (n=10)	Grup 3 (n=10)	Grup 4 (n=10)
<b>Hemoraji</b>	0.00	3.00*	0.00	2.20±0,6*
<b>Ödem</b>	0.00	3.00*	0.00	1.60±0,6*
<b>Vasküler Konjesyon</b>	0.00	3.00*	0.00	2.30±0,7*
<b>Lökosit infiltrasyonu</b>	0.00	3.00*	0.00	1.50±0,5*
<b>Folikül dejenerasyonu</b>	0.60±0,5	3.00*	0.60±0,6	1.25±0,5*

\*Kruskal Wallis testi, Cisplatin grubu ile Cisplatin+edaravon grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,001$ ) bulundu.



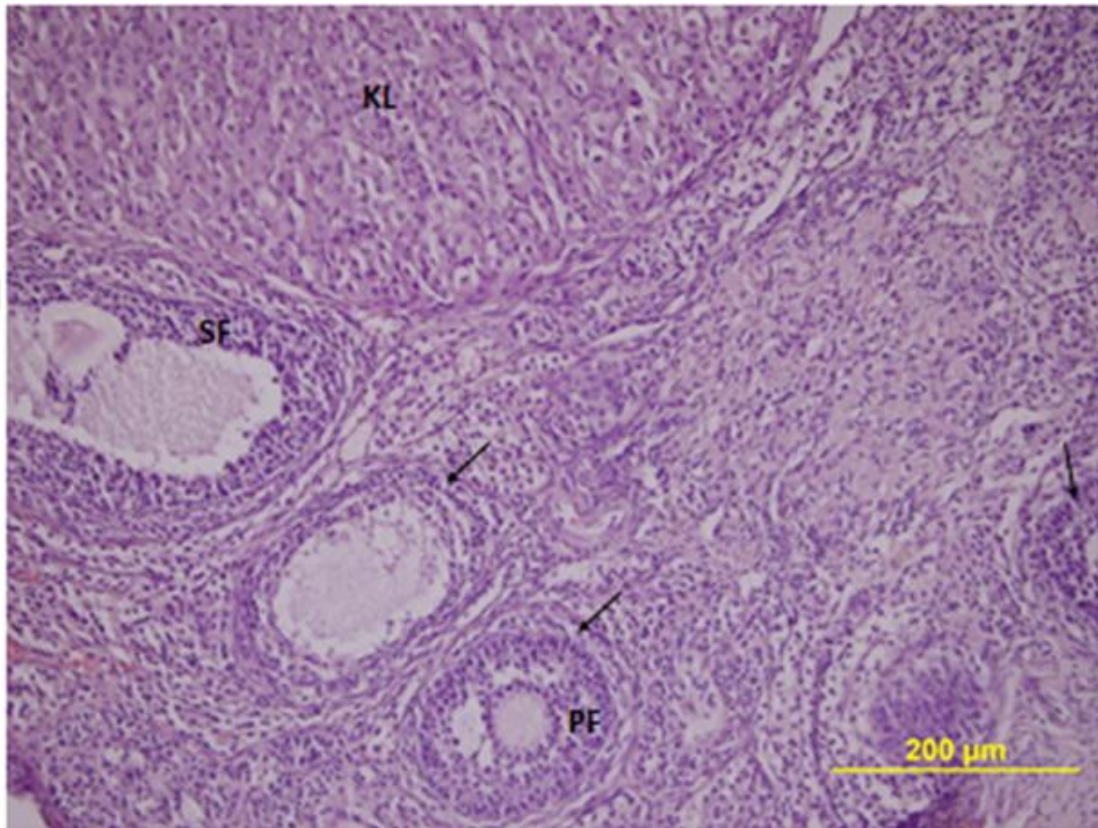
**Şekil 4. 1.** Hematoksilen & Eozin boyama tüm gruplar. A.Kontrol grubuna, B. Cisplatin grubuna, C. Edaravon grubuna, D. Cisplatin+ edaravon grubuna ait ovaryum dokusu. Korpus luteum (KL), sekonder folikül (SF), foliküller (siyah ok),antrum (A),oosit (O), hemoraji (H), germinal epitel( kırmızı ok).

H&E boyama ile boyanan kesitlerin ışık mikroskobu ile incelenmesinde, kontrol grubuna ait ovaryum dokusunda foliküller sağlıklı bir görünümde olup korteks ve folikül yapıları da net bir şekilde izlenmekteydi. Germinal epitel tek katlı kübik epitel ve devamında prizmatik epitel görünümündeydi. Germinal epitelin altında, fibröz bağ dokusu lif ve hücrelerinden oluşmuş Tunika albuginea yer almaktaydı. Ovaryum korteksinde gelişimi başlangıç aşamasındaki sekonder folikül ve sekonder folikül yer almaktaydı. Histolojik hasarın gruplara göre dağılımına bakıldığında cisplatin grubunda diğer gruplara göre hemoraji, ödem, folikül dejenerasyonu daha yoğundu. Edaravon grubunda bu hasarlara rastlanmazken kontrol grubuna benzer bir yapı görüldü 7,5 mg/kg i.p. tek doz cisplatin + 1mg/kg edaravon tek doz uygulanan grupta da hemoraji, ödem gibi hasarların olduğu fakat cisplatin grubuna göre hasarların daha az olduğu görüldü Cisplatin+ edaravon grubunda edaravonun cisplatinle kombine kullanılması konjesyonu orta, hücre dejenerasyonu ve nötrofil infiltrasyonunu zayıf düzeyde iyileştirdiği, hemoraji ve hücre hasarını ise yüksek düzeyde ortadan kaldırdığı gözlemlendi (Şekil 4. 1), (Tablo 4. 1.)



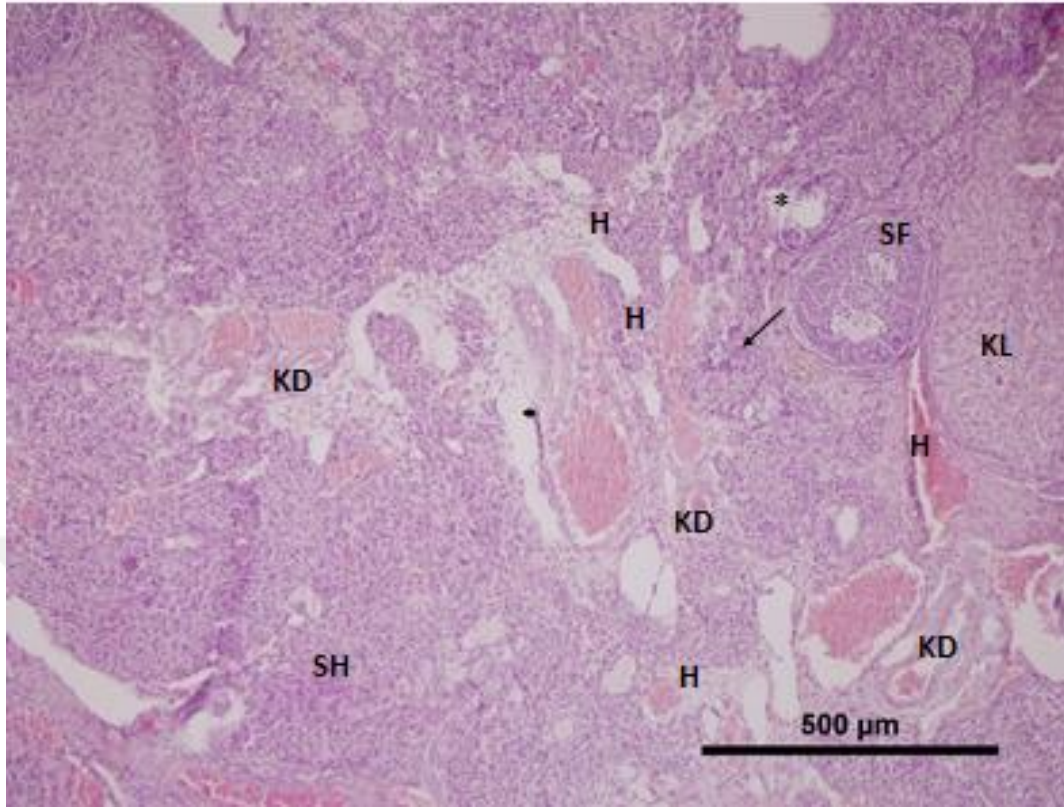
**Şekil 4. 2.** Kontrol grubuna ait ovaryum dokusu. Hematoksilen & Eozin boyama x 20  
Korpus luteum (KL), sekonder folikül (SF), foliküller (siyah ok)

H&E boyama ile boyanan kesitlerin ışık mikroskobu ile incelenmesinde, kontrol grubuna ait ovaryum dokusunda foliküller sağlıklı bir görünümdeydi. Korpus luteum ve sekonder foliküllerin arasında bulunan bağ dokusu alanları ve hücreleri arasındaki bağlantılar bozulmamış normal bir yapıda görünmekteydi (Şekil 4. 2).



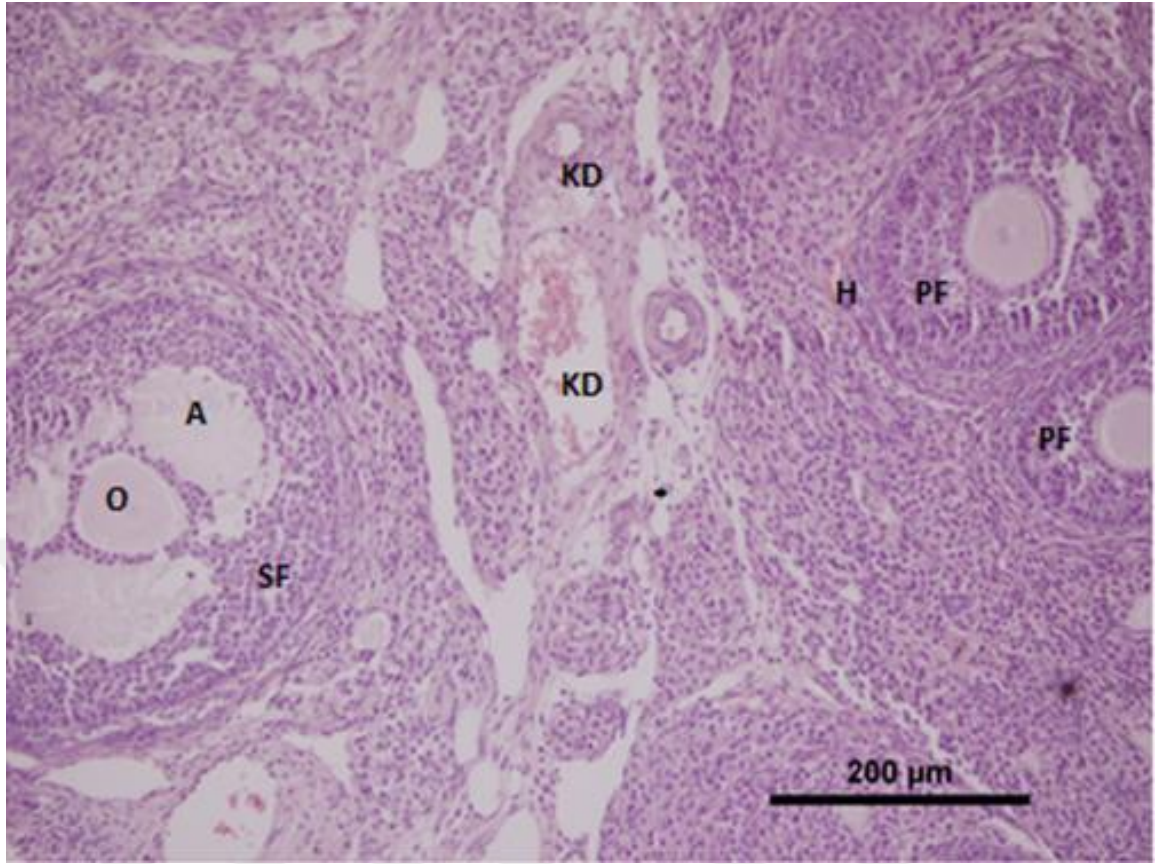
**Şekil 4. 3.** Edaravon grubuna ait ovaryum dokusu. H & E boyama x 20 Korpus luteum (KL), sekonder folikül (SF), foliküller (siyah ok)

Edaravon grubuna ait ovaryum dokusunun medullası sağlıklı bir şekilde izlenirken hilus hücreleri ve damarlar dikkati çekiyordu. Kortekste sekonder folikül ve primer foliküller görülmekteydi. Farklı boylarda gelişmekte olan sekonder foliküller belirgin görünümdeydi. Korpus luteum ve bağ dokusu alanları normal görünümdeydi. Edaravon grubunda Hematoksilen & Eozin ile boyanmış dokularda kortekste başlangıç aşamasında sekonder folikül izlenirken korpus luteumun hemen altındaydı. Kortikal bağ dokusunda histolojik olarak herhangi bir dejenerasyon gösteren yapıya rastlanmadı (Şekil 4. 3).



**Şekil 4. 4.** Cisplatin uygulanan grupta hemoraji ve ödem. H&E boyama x 10 ; Kan damarları (KD), korpus luteum (KL), sekonder folikül (SF), stromal hücreler (SH), hemoraji (H), infiltrasyon (siyah ok), ödem(\*)

7,5 mg/kg tek doz cisplatin uygulanan grupta Hematoksilen & Eozin ile boyanmış kesitlerde hemoraji ve ödem görüldü. Organ bütünü ile kanama odakları içerisindeydi. Damar bütünlüğü ve bağ dokusu hücrelerindeki normal yapı bozulmuştu. Sekonder folikül çevresinde ve stromada hemoraji ve ödem gözlemlendi. Korpus luteum ile primer folikül arasında hemoraji odakları gözlenirken sekonder foliküle yakın alanda infiltrasyon görüldü (Şekil 4. 4 ).



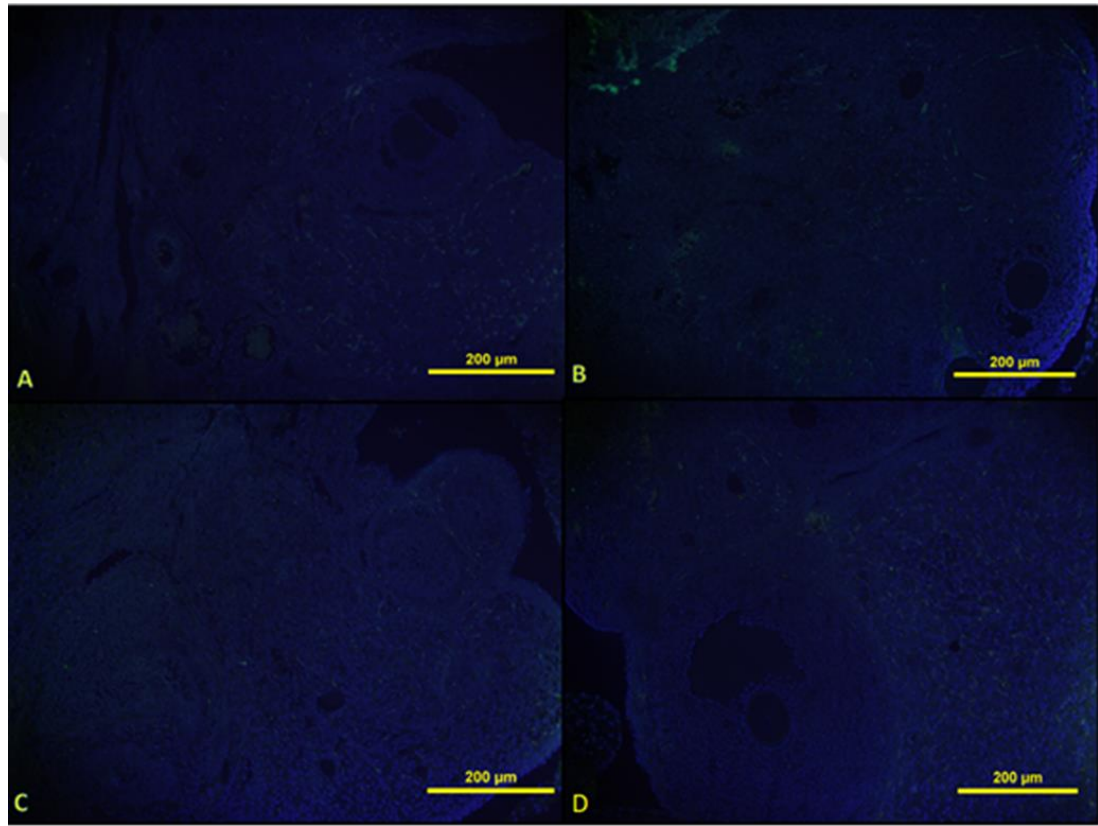
**Şekil 4. 5.** Cisplatin+edaravon grubunda H&E ile boyanmış kesitlerde hemoraji odakları x20. Kan damarları (KD), sekonder folikül (SF), oosit (O), antrum (A), hemoraji (H), ödem (\*)

Hematoksilen & Eozin ile boyanmış Cisplatin+ edaravon grubuna ait kesitlerde izlenen hasarın cisplatin grubuna göre anlamlı bir şekilde azaldığı dikkat çekiyordu. Foliküllerde çok belirgin bir hasar gözlenmezken primer folikül çevresinde küçük hemoroji odağı izleniyordu. Sekonder folikül ve diğer foliküllerde sağlıklı görünümdeydi (Şekil 4. 5. ).

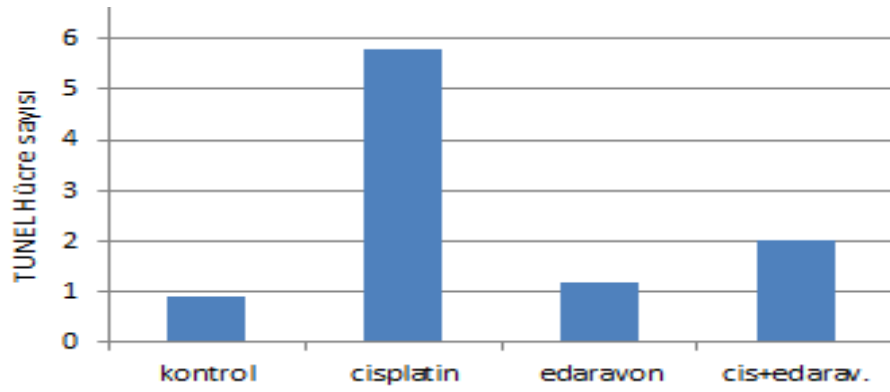
#### **4.2. TUNEL Boyama değerlendirilmesi**

Poly-L-Lysine kaplı lamalar üzerine parafin bloklardan alınan kesitlerin parafininin giderilmesi için 2 saat 60°C'lik etüvde bekletildi ve TUNEL boyama değerlendirilmesi için 450-500 nm dalga boyunda floresan mikroskopu ile değerlendirildi. Dört grup, apoptotik hücre sayısı bakımından değerlendirildiğinde kontrol grubu ve edaravon grubu birbirine yakın iken, Cisplatin grubunda apoptotik hücre sayısı oldukça fazlaydı.

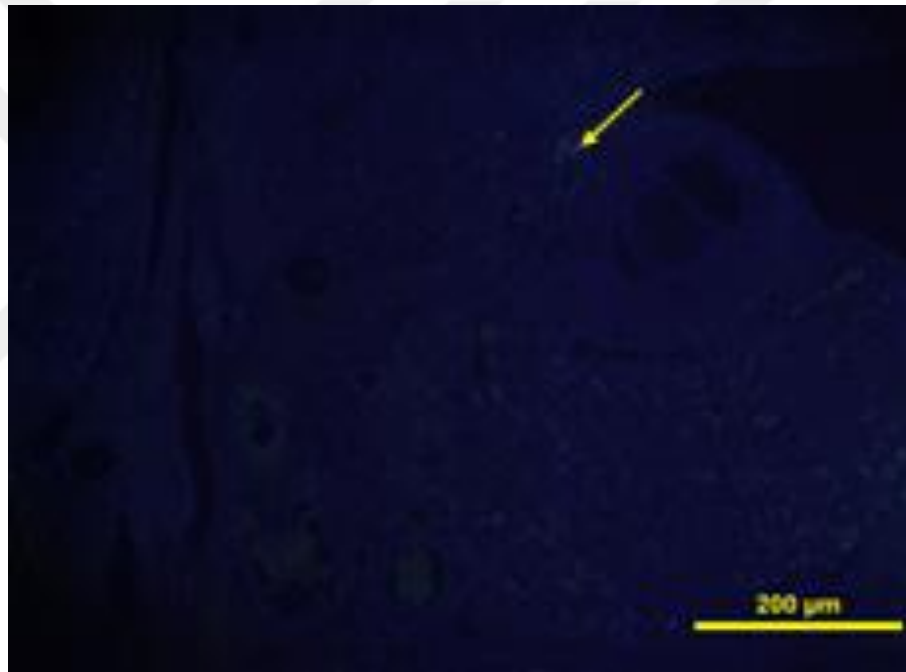
Cisplatin ve Cisplatin+ edaravon grubu karşılaştırıldığında ise Cisplatin+ edaravon grubundaki apoptotik hücre sayısının cisplatin grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı görüldü. TUNEL boyamanın uygulandığı tüm gruplara ait örneklerde ovariumun korteksinde ve medullasında apoptoz gözlemlendi. Apoptoz yalnızca foliküllerde olmayıp korpus luteum, atretik foliküllerde, stromada ve germinal epitelde de gözlemlendi. Cisplatin grubunda tüm gruplara göre daha fazla TUNEL pozitif hücreler gözlemlendi ve istatistiksel olarak anlamlıydı (p 0.05). (Şekil 4. 6) (Şekil4.7).



**Şekil 4. 6.** TUNEL boyama tüm gruplar. A.Kontrol grubuna, B. Cisplatin grubuna, C. Edaravon grubuna, D. Cisplatin+ edaravon grubuna ait ovarium dokusu. TUNEL x 20

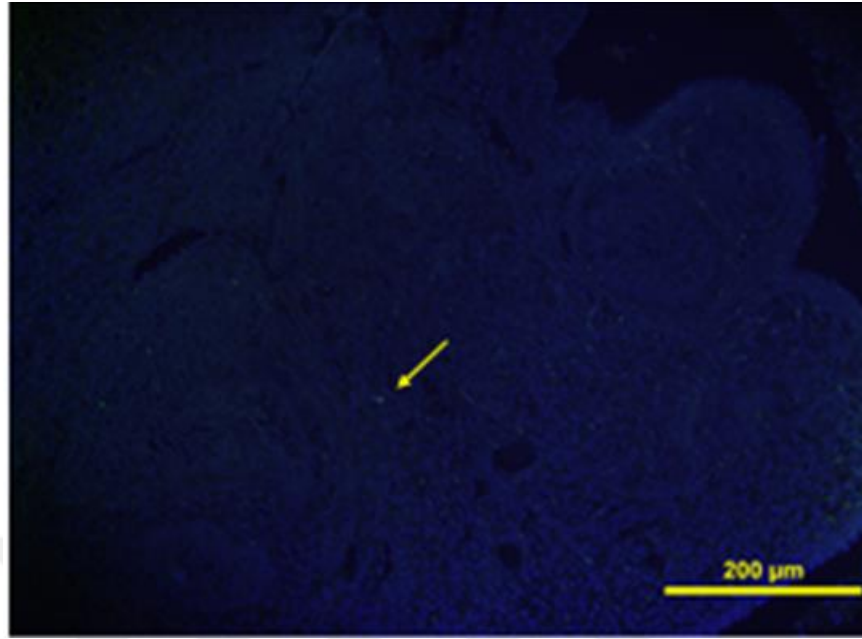


Şekil 4. 7. Deney gruplarına ait apoptotik hücre sayısı



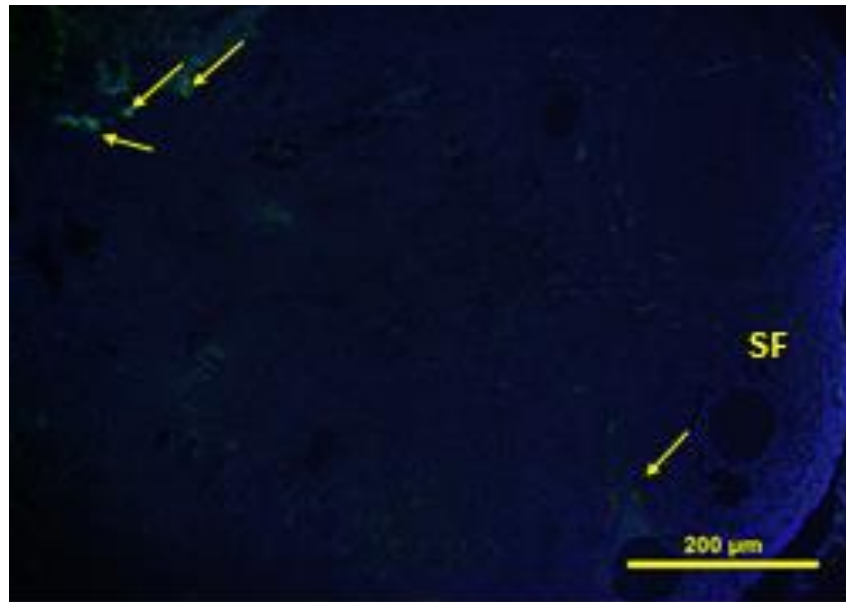
Şekil 4. 8. Kontrol grubu TUNEL x20

Kontrol grubuna ait görüntüde sekonder folikül yapısında apoptotik hücreye rastlandı. Fakat bu folikülde oosit görülmediğinden bunun doğal atreziye giden foliküllerden olabileceği düşünüldü (Şekil 4. 8).



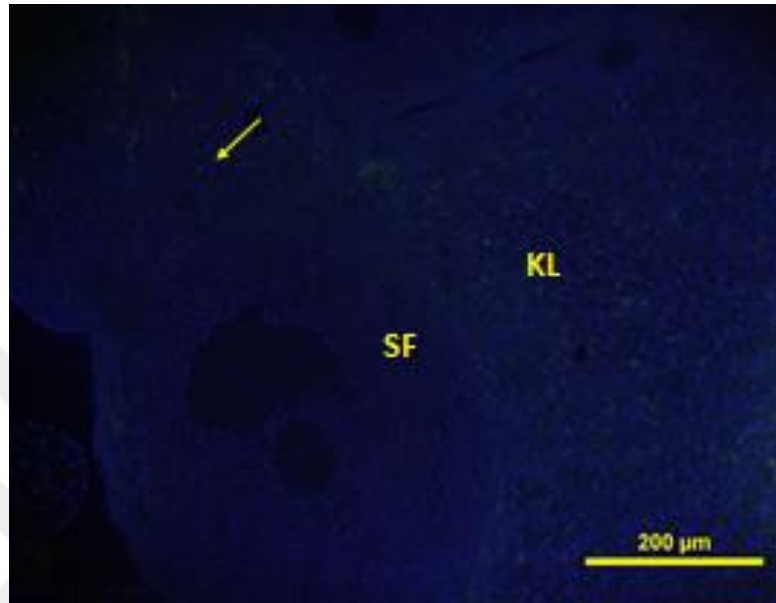
**Şekil 4. 9.** Edaravon grubu TUNEL x20

Edaravon grubunda TUNEL boyama ile 450-500 nm dalga boyunda floresan mikroskobu ile değerlendirilen kesitlerde primer foliküller ve korpus luteum görünürken kontrol grubuna istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yakın bir görünüm gözlemlendi. Folikülde apoptotik hücre gözlemlendi. ( $p < 0.05$ ). (Şekil 4. 9).



**Şekil 4. 9.** Cisplatin grubundaki apoptotik hücreler TUNEL x20.

7,5 mg/kg i.p. tek doz cisplatin + 1mg/kg edaravon tek doz uygulanan grupta TUNEL yöntemi ile değerlendirilen kesitlerde sekonder folikülde ve korpus luteuma yakın bağ dokusu alanlarında oldukça az sayıda apoptotik hücre gözlemlendi (Şekil 4. 10.) .



**Şekil 4. 10.** Cisplatin + edaravon grubundaki apoptotik hücreler TUNEL x20

7,5 mg/kg tek doz cisplatin uygulanan grupta TUNEL yöntemi ile floresan mikroskopunda 450-500 nm dalga boyunda değerlendirilen kesitlerde iki sekonder folikül arasındaki alanlarda apoptotik hücelere rastlandı. Üst bölgedeki korpus luteum ve sekonder folikülden başlayarak komşu bağ dokusu alanlarda apoptotik hücreler gözlemlendi. (Şekil 4. 10).

### 4.3. İmmünohistokimyasal bulgular

Kaspaz-3 ve Kaspaz-8'in immünoaktivitesine bakılan ovaryum kesitleri ışık mikroskobu altında değerlendirildi. Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 pozitif hücreler her grup için ayrı ayrı değerlendirilip gruplar arası karşılaştırmaları yapıldı (Şekil 4.11).Sıçan ovaryum kontrol ve edaravon kontrol grubunda Kaspaz 3 immünoaktivitesinin olmadığı ve cisplatin etkisiyle cisplatin grubunda ovaryum folikül hücrelerinde Kaspaz 3 boyamasının yaygınlık ve yoğunluk derecesinin şiddetli olduğu görüldü. 7,5 mg/kg cisplatin + 1mg/kg edaravon uygulanan grupta Kaspaz 3 immünoaktivitesinin hafif derecede olduğu saptandı (Tablo 4. 2).

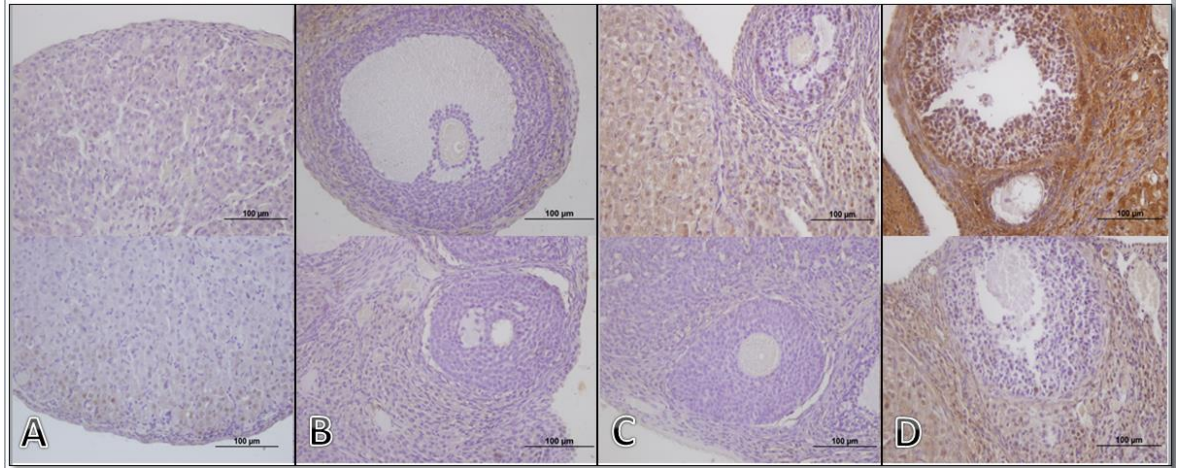
**Tablo 4. 2.** Kaspaz 3 antikoruna ile immünohistokimyasal boyama sonuçları.

Grup	Karşılaştırma	-	+	++	+++	
<b>Grup 1</b> <b>Kontrol</b>	<b>Grup içi</b> <b>Gruplar</b> <b>arası</b>	100 35.71	0 0	0 0	0 0	P değeri
<b>Grup 2</b> <b>Cisplatin</b>	<b>Grup içi</b> <b>Gruplar</b> <b>arası</b>	0 0	10 50	10 50	80 100	<0.0001 *
<b>Grup 3</b> <b>Edaravon kontrol</b>	<b>Grup içi</b> <b>Gruplar</b> <b>arası</b>	100 35.71	0 0	0 0	0 0	
<b>Grup 4</b> <b>Edaravon+cisplatin</b>	<b>Grup içi</b> <b>Gruplar</b> <b>arası</b>	80 28.58	10 50	10 50	0 0	
<b>Skorlama</b>	- : yok, + : hafif dağılım, ++ : orta dağılım ve +++ : yoğun dağılım *: Fisher's Exact Test					

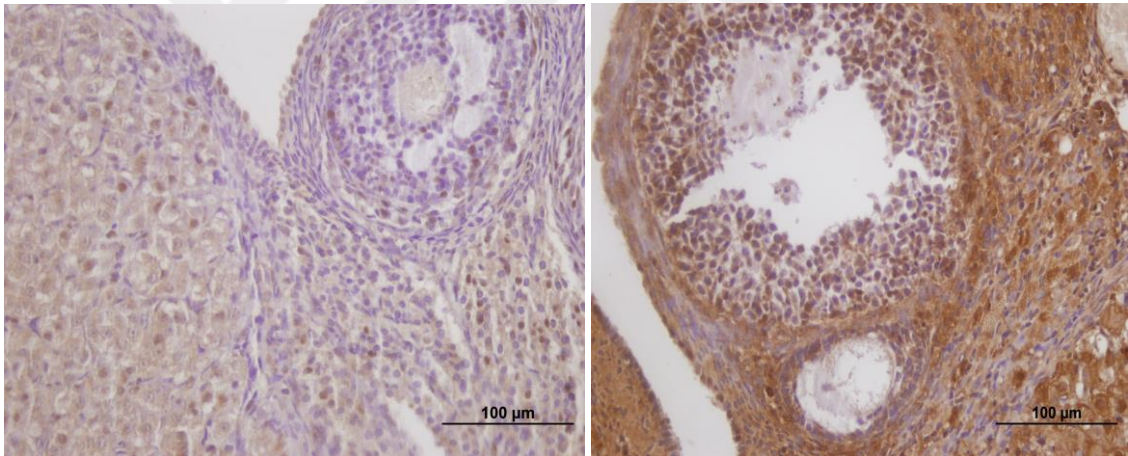
Benzer şekilde kontrol ve edaravon grubuna ait ovaryum dokularında Kaspaz 8 immünoaktivitesinin olmadığı görüldü. Cisplatin grubuna ait ovaryumlarda yoğun dağılım, cisplatin ve edaravonun birlikte verildiği grupta ise hafif dağılım olduğu gözlemlendi ( Tablo 4. 3).

**Tablo 4. 3.** Kaspaz 8 antikoruna ile immünohistokimyasal boyama sonuçları.

Grup	Karşılaştırma	-	+	++	+++	
<b>Grup 1</b> <b>Kontrol</b>	<b>Grup içi</b> <b>Gruplar</b> <b>arası</b>	100 34.48	0 0	0 0	0 0	P değeri
<b>Grup 2</b> <b>Cisplatin</b>	<b>Grup içi</b> <b>Gruplar</b> <b>arası</b>	0 0	10 50	20 100	70 100	<0.0001 *
<b>Grup 3</b> <b>Edaravon kontrol</b>	<b>Grup içi</b> <b>Gruplar</b> <b>arası</b>	100 34.48	0 0	0 0	0 0	
<b>Grup 4</b> <b>Edaravon+cisplatin</b>	<b>Grup içi</b> <b>Gruplar</b> <b>arası</b>	90 31.04	10 50	0 0	0 0	
<b>Skorlama</b>	- : yok, + : hafif dağılım, ++ : orta dağılım ve +++ : yoğun dağılım *: Fisher's Exact Test					



**Şekil 4. 11.** Kaspaz 3- Kaspaz 8 antikoru ile immünohistokimyasal boyama tüm gruplar. A.Kontrol grubuna, B. Edaravon grubuna C. Cisplatin+edaravon grubuna D. Cisplatin grubuna ait ovaryum dokusu ( Üst resim –kaspaz 3, alt resim kaspaz 8 x 20 ).



**Şekil 4. 12.** Cisplatin+edaravon grubu ile Cisplatin grubuna ait ovaryum dokusu- kaspaz 3 x 20.

Cisplatin grubuna ait ovaryumlarda yoğun Kaspaz 3 immünoreaktivitesi gözlenirken cisplatin ve edaravonun birlikte verildiği grupta hafif yoğunlukta Kaspaz 3 immünoreaktivitesinin olduğu gözlemlendi. Özellikle cisplatin uygulanan grupta germinal epitel hücrelerinde, sekonder folikülün granuloza hücrelerinde ve bağ dokusu alanında yoğun boyanma gözlemlendi. Edaravonun cisplatinle kombine verildiği grupta immünoreaktif hücre yoğunluğu daha azdı ( şekil 4.12).

#### 4.4. Biyokimyasal bulgular

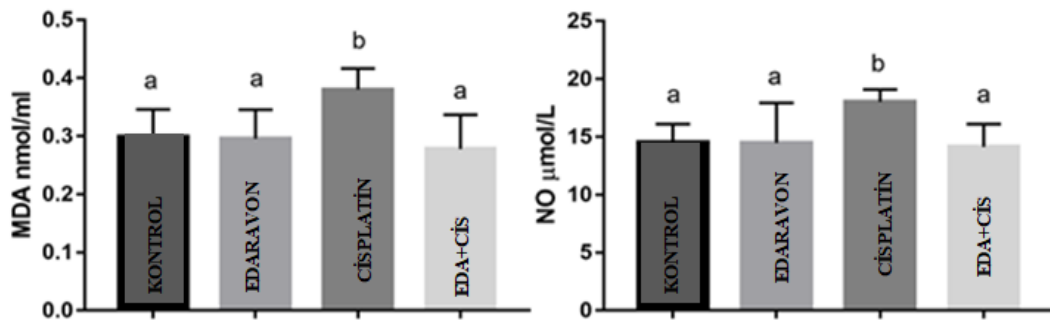
Gruplar arası değerlendirme MDA serum düzeyleri ve NO miktarları için kanda serum örneklerinde tayin edilmiştir. MDA için yapılan analizde cisplatin grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek ( $p<0.0012$ ), cisplatin+ edaravon grubu ile cisplatin grubu karşılaştırıldığında ise anlamlı olarak düşük bulundu ( $p<0.0012$ ). NO için yapılan analizde, cisplatin grubu diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksek, cisplatin+ edaravon grubu ise cisplatin grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ( $p<0.05$ ). Biyokimyasal verilerin değerlendirilmesi, gruplara göre serum biyokimyasal sonuçları Tablo 4. 4.'te gösterilmiştir.

**Tablo 4. 4.** Grupların serum örneklerinde ortalama Nitrik Oksit (NO), Malondialdehit (MDA) ölçümleri

	Nitrik Oksit (NO)	Malondialdehit (MDA)
<b>Grup 1 (n=10)</b>	14.53±1.57 <sup>a</sup>	0,29±0.04 <sup>a</sup>
<b>Grup 2 (n=10)</b>	18.03±1.06 <sup>b</sup>	0.38±0.03 <sup>b</sup>
<b>Grup 3 (n=10)</b>	14.47±3.48 <sup>a</sup>	0.29±0.05 <sup>a</sup>
<b>Grup 4 (n=10)</b>	14.13±1.98 <sup>a</sup>	0.27±0.05 <sup>a</sup>
<b>p değeri *</b>	0.019	0.0012

Veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı harfi (a,b ve c) içeren gruplar arasında anlamlı farklılık yoktur.  $P<0.05$  anlamlı kabul edilmiştir. \*Kruskal Wallis testi, Grup 2 ile Grup 4 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ) bulundu.

**Tablo 4. 5.** Grupların Nitrik Oksit (NO), Malondialdehit (MDA) ölçümlerinin grafiksel analizi



## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser, ölüme sebebiyet veren hastalıkların başında gelmektedir. Cisplatin birçok kanser türünde sıkça kullanılan platin bazlı neoplastik bir ajandır. Cisplatin, DNA ile etkileşime girerek DNA replikasyonunu engeller. DNA hasarı sonucunda kendini yenileyebilen hücreler hücre döngüsüne devam ederken kendini yenileyemeyen hücrelerde hücre ölümü gerçekleşir. Cisplatin, DNA hasarına neden olduğu için apoptozu indükleyerek hücrede sinyal ileti yolağını aktive eder. Cisplatin kanser oluşturan hücrelerin çoğalmasını önlerken yapı benzerliği gösteren diğer sağlıklı hücrelerin de hasar görmesine sebep olur (Kelland, 2007; Basu ve Krishnamurthy, 2010).

Ototoksisite, nefrotoksisite, nörotoksisite gibi görülen bu ciddi yan etkiler nedeniyle cisplatinin klinik kullanımı kısıtlanabilmekte ya da sonlandırılabilir (Schrier, 2002). Araştırmacılar bu toksisiteyi azaltabilecek kombine ilaç arayışına girmiş ve bu konuda özellikle serbest radikal temizleyici ajanları tercih etmişlerdir. Serbest radikal temizleyiciler klinik ve deneysel çalışmalarda oldukça yaygın kullanılmış, doğal ya da sentetik antioksidanların etkinliğinin çalışmalarda olumlu sonuçlar verdiği gösterilmiştir. Bu çalışmalar arasında yaban mersininin yüksek antioksidan etkiye sahip olduğu, diğer çalışmada nar meyvesindeki punicalagin'in biyoaktif etkilerden sorumlu olduğu ve nar suyundaki antioksidan etkinin punicalaginden kaynaklandığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Bell ve Hawthorne, 2008; Pandir ve ark., 2014; Chtourou ve ark., 2015 ).

Cisplatin apoptoza neden olan sitokrom c ve kaspazların salınımına neden olurken özellikle kaspaz 3 aktive olarak hücrede değişikliklere, bozulmaya ve nükleer ölüme sebep olmaktadır (Khan ve ark., 2012). Cisplatinin intrinsik kaspazlarla apoptozisi

indüklediği ve mitokondriyal disfonksiyona sebep olduğu gösterilmiştir (Canta ve ark., 2015).

Ural ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 32 adet Wistar albino dişi sıçan dört gruba ayrılmıştır. Gruplardan birine sadece radyasyon verilmiş, diğer iki gruba ise edaravon ve radyasyon farklı dozlarda verilmiştir. 45 mg / kg edaravon ve 30mg/kg edaravon radyoterapiden 30 dakika önce verilen ve radyasyon uygulanan grup ile sadece radyasyon verilen grupta ovaryum dokusunun ışık mikroskobu altında histolojik değişiklikleri ve anti-kaspaz-3 için karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmuştur (Ural ve ark., 2020).

Bizim çalışmamızda da Ural ve arkadaşlarının çalışmasına benzer sonuçlar görülmüştür. Ural ve arkadaşları yaptığı çalışmada gruplar arasında folikül sayısı, damar tıkanıklığı, ödem, sitoplazmik vakuolizasyon, kanama ve interstisyel hücre dejenerasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı farklar bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda da bunlara benzerlik gösteren histopatolojik bulgular saptanmıştır. Çalışmamızda ovaryum dokuları ışık mikroskobu altında değerlendirildiğinde cisplatin grubunda edaravon ve cisplatinin birlikte verildiği gruba göre anlamlı bir fark gözlenmiştir ( $p < 0.001$ ).

Biz çalışmamızda edaravon'un cisplatinle oluşturulmuş hasar modelinde hücre ölümüne etkisini biyokimyasal, histolojik ve DNA fragmentasyonu açısından araştırdığımızda tüm parametreler, gruplar arasında birbirini destekler nitelikte bulunmuştur. Sonuçlarımız Ural ve arkadaşlarının çalışmasını da bu yönden desteklemektedir. Fakat Ural ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada edaravonun biyokimyasal değerleri ve Kaspaz 3(+) hücre sayısını azalttığı saptansa da edaravon yüksek dozda verilmiş, verildiği iki farklı doz arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bu yönden değerlendirildiğinde diğer yapılan edaravon çalışmalarındaki dozlar da dikkate alındığında edaravon dozunun 45 mg / kg edaravon ve 30mg/kg edaravon şeklinde yüksek verilmesi etkinliği artırmamaktadır. Çalışmamız edaravonun doz ayarlamasında da bir gösterge niteliğinde olabilir. Bu yüzden doz ve uygulama yöntemi açısından ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Edaravon, C vitamini ve E vitamini özelliğine sahip olduğundan lipid peroksidasyonunu inhibe ederek oksitativ strese karşı serbest radikalleri temizler. Aynı zamanda kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçebilen, apoptozu inhibe eden bir antioksidandır (Masuda ve ark., 2017).

Cisplatine bağı ya da oksidatif strese bağı hasarlarda C ve E vitamini ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Ourique ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada sıçanlara valproik asit verilerek sıçan testisinde oksidatif strese bağı hasarda testis LPO değerinin arttığını E vitamini verilmesi ile ise bu hasarın azaldığını göstermişlerdir (Ourique ve ark., 2016.) Çalışmamızda edaravonun etkisinin E vitaminin yaptığı etkiye benzer bir şekilde serum MDA değeri cisplatin+ edaravon uygulanan grupta sadece cisplatin verilen gruba göre anlamlı bir şekilde azalmıştır ( $p < 0.063$ ) NO için değerlendirildiğinde ise cisplatin grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunurken edaravonun cisplatin ile birlikte verildiği grupta ise cisplatin grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ( $p < 0.05$ ).

Fetal dönemde foliküllerin, oogonyumların oluşumunda ve atrezi gibi olaylarda apoptozisin rolü bilinmektedir. Foliküler hücrelerdeki apoptotik ve yaşamsal moleküller arasında denge bulunmaktadır ve bu denge hücrenin sonunu belirlemektedir. Amin ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada cisplatinin neden olduğu hasar ve apoptozda bitki özlerinin etkisi araştırılmış ve cisplatinin TUNEL (+) boyanan germ hücrelerinde oldukça fazla artışa sebep olduğu bildirilmiştir (Amin ve ark., 2008). Çalışmamızda gruplar TUNEL (+) hücreler yönünden değerlendirildiğinde Amin ve arkadaşlarının çalışmasındaki gibi özellikle cisplatin grubundaki ovaryum folikül hücrelerinde yoğun artış gözlenmiştir.

Cisplatine bağı ovaryum hasarında ovaryumu korumak ve hasarı tedavi etmek için melatonin, yaban mersini, kurkumin gibi doğal antioksidanların yanı sıra dimetilsülfoksit ve 2-aminoetoksifenil borat gibi kimyasal antioksidan türleri kullanılmıştır. Çalışmalarda bu maddelerin E vitamini, C vitamini, antioksidan, antienflamatuvar gibi özelliklerinden yararlanılmıştır ve literatüre göre ovaryum hasarını azaltabilecek özellikler göstermişlerdir (Ergun ve ark., 2010; Pandir ve Kara, 2014 ; Sak ve ark., 2013; Esteban-Zubero ve ark., 2016; Taşkın ve ark., 2014).

Yaptığımız çalışmada cisplatinin ovaryum dokusunda oluşturduğu hasarda serbest oksijen radikallerinin rolü ve antioksidan özellikteki edaravonun bu hasarı gidermedeki etkileri araştırılmıştır. Çalışmamızda NO ve MDA düzeyleri ölçülmüş ve gruplar karşılaştırıldığında anlamlı farklar bulunmuştur. Grup 2 diğer gruplarla karşılaştırıldığında serum NO ve MDA düzeyleri anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Sonuçlar değerlendirildiğinde, edaravonun cisplatin ile kombine

uygulanmasının serbest oksijen radikallerinin oluşmasını etkilediğini gösteren çalışmaları desteklemektedir (Pandır ve ark.,2014; Azu ve ark.,2010).

Diğer yapılan çalışmalar ve bizim çalışmamızın sonuçları cisplatinin toksik etkisinin oluşmasında oksidatif stresin önemini ortaya koymaktadır. Çalışmaların birçoğunda antioksidanlar kullanılmış ve cisplatin dışında kullanılan kemoterapötik ajanların toksik etkisinde de serbest oksijen radikallerinin önemli olduğu ileri sürülmüştür (Almutairi ve ark., 2017; Chtourou ve ark., 2015 ).

Bu araştırma ile ovaryumdaki cisplatin hasarının oksidatif stres, apoptotik süreç ve inflamasyona bağlı mekanizmalarla tetiklendiği ve bunların oluşumunun en aza indirgenmesi ya da engellenmesi için edaravonun kombine kullanımı teklif edilmiştir. Sonuçlar edaravon kullanımının apoptotik hücrelerin sayısını önemli ölçüde azalttığını ve bu konuda etkili olabileceğini göstermektedir.

Çalışmada kullanılan edaravonun güçlü antioksidan ve güçlü anti-inflamatuar etkinliği ile ovaryum dokusunda olduğu gibi diğer dokularda da cisplatin benzeri toksik etki gösterebilen ajanlarla kombine kullanılması halinde farmakolojik tedavilerde alternatif ve etkili bir kaynak olabileceği yönündedir.

Cisplatin'in hasarını azaltmak ya da önlemek için birçok antioksidan denenmiş ve çeşitli farmakolojik ajanlarla farklı çalışmalar yapılmıştır. Edaravon ile de farklı doku ve organlarda reperfüzyon hasarı, antioksidan etkinliği yönünden göz, beyin gibi dokularda deneysel araştırmalar yapılmıştır (Pandır ve Kara, 2014; Masuda ve ark, 2017). Fakat günümüze kadar sıçan ovaryumunda cisplatinin neden olduğu ovaryum hasarında edaravon kullanımına ait bir çalışma bildirilmemiştir. Ayrıca cisplatin çalışmalarında antitoksik etki için kullanılan moleküller tek bir özellik gösterirken, edaravon güçlü antioksidan özelliğinin yanısıra antiapoptotik, kan beyin bariyerinden geçebilen nöroprotektif, anti-enflamatuvar özelliklerini de bir arada bulundurması ile dikkat çekicidir.

Sonuç olarak, tüm deney gruplarından elde edilen histopatolojik bulgulara göre, edaravonun cisplatinle oluşan ovaryum dokusundaki hasarı azaltmada yardımcı olabileceğini söyleyebiliriz. Yapılan histopatolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal analizlerin sonuçları birbiri ile tutarlı görünmüştür. Elde edilen sonuçlar edaravonun oksidatif streste etkili olduğunu, kaspaz 3 ve kaspaz 8 artışını azalttığını, ovaryum dokusunda oluşan apoptozun inhibisyonu ile ovaryum dokusunu koruduğunu

göstermiştir. Edaravonun cisplatinin ovaryumda oluşturduğu hasarı önlemede ve cisplatin ile yapılan tedavilerde koruyucu etkisinin olduğu söylenebilir.



## 6. KAYNAKLAR

- Almutairi MM, Alanazi WA, Alshammari MA, Alotaibi MR, Alhoshani AR, Al-Rejaie SS, Hafez MM, Al-Shabanah OA. Neuroprotective effect of rutin against Cisplatin-induced neurotoxic rat model. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2017; 17(1), 472.
- Amemiya S, Kamiya T, Nito C, Inaba T, Kato K, Ueda M, Katayama Y. Antiapoptotic and neuroprotective effects of edaravone following transient focal ischemia in rats, *European Journal of Pharmacology*, 2005; 516, 125-130.
- Amin A, Hamza AA, Kambal A, Daoud S. Herbal Extracts Counteract Cisplatin-mediated Cell Death in Rat Testis. *Asian J. Androl*, 2008; 10(2):291-297.
- Ando S, Funato M, Ohuchi K, Kameyama T, Inagaki S, Seki J, Kawase C, Tsuruma K, Shimazawa M, Kaneko H, Hara H. Edaravone is a candidate agent for spinal muscular atrophy: *In vitro* analysis using a human induced pluripotent stem cells-derived disease model. *European Journal of Pharmacology*, 2017; 814: 161-168
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, 2014.
- Azu OO, Duru FLO, Osinubi AA, Oremusu AA, Noronha CC, Elesha SOAT, Okanlawon AO. Histomorphometric Effects of *Kigelia Africana* (Bignoniaceae) Fruit Extract on the Testis Following Short-Term Treatment With Cisplatin In Male Sprague-Dawley Rats, *Middle East Fertility Society Journal*, Department of Anatomy, Nigeria, 2010; 200-208 p.

- Basu A, Krishnamurthy S. Cellular Responses to Cisplatin-Induced DNA Damage. *Journal of Nucleic Acids*, 2010; Article ID 201267. 133.
- Baydas G, Reiter RJ, Nedzvetskii VS. Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis. *Toxicol Lett*, 2003; 137: 169 – 174
- Bayraktaroğlu AG. Deneklerin histolojik özellikleri bunların deneysel çalışmalarda sınırlayıcı yönleri. *J Clin Anal Med*, 2012; 33-38.
- Bell C, Hawthorne S. Ellagic acid, pomegranate and prostate cancer a mini review. *J Pharm Pharmacol*, 2008; 60(2), 139-144.
- Bolisetty S, Jaimes EA. Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology. *Int J Mol Sci*, 2013; 14: 6306-44.
- Boyd K, Atis M, Mara H, Rendi RL, Garcia K, Gibson C. *Comparative Anatomy and Histology (Second Edition) A Mouse, Rat, and Human Atlas*, 2018; 303-334
- Brooks SA, Hannah LB, Kinch C, Nash G, Kıeda C. Altered Cell Surface Glycosylation Function in Mechanisms of Cancer Cell Metastasis. *Anadolu University Journal of Science and Technology*, 2009; 10, 1: 91-101 p.
- Brouwers EE, Huitema AD; Boogerd W, Beijnen JH, Schellens JH. Persistent neuropathy after treatment with cisplatin and oxaliplatin. *Acta Oncologica*, 2009; 48(6), 832-841
- Büyükafşar K. Nitrik oksitin farmakolojisi. Türk Farmakoloji Derneđi, Farmakoloji eğitim sempozyumları programı. Seminer özetleri, Mersin. Mayıs 2005.
- Cabadak H. Hücre Siklusu ve Kanser. *ADÜ Tıp Fak Der*, 2008; 9 (3):51-61.
- Cankurtaran M. Yaşlılık, yaşlanma mekizmaları, antiaging ve yaşam tarzı değişiklikleri. 7. Ulusal iç hastalıkları kongresi, kongre kitapçığı, 2005; 1-5.
- Canta A, Pozzi E, Carozzi V. Mitochondrial dysfunction in chemotherapy induced peripheral neuropathy (CIPN). *Toxics*, 2015; 3(2), 198-223.
- Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*, 1993; 49: 481-93

- Chtourou Y, Aouey B, Kebieche M, Fetoui H. Protective role of naringin against cisplatin induced oxidative stress, inflammatory response and apoptosis in rat striatum via suppressing ROS-mediated NF- $\kappa$ B and P53 signaling pathways. *Chemico-biological Interactions*, 2015; 239, 76-86.
- Clement PB. Anatomy and Histology of the Ovary. In Kurman R (ed): *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*, 5th ed. New York, Springer-Verlag, 2002; 649-650.
- Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations and preventations of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiol*, 2001; 94: 1133-8
- Devasagayam TPA, Boloor KK, Ramsarma T. Methods for estimating lipid peroxidation: Analysis of merits and demerits (minireview). *Indian J. Biochem. Biophys*, 2003; 40(5), 300-308.
- Dilek İ. Kemoterapide Toksikite Değerlendirilmesi, TCSB Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, XXXVI. Ulusal Hematoloji Kongresi, Ankara, 2010.
- Doğan İ. Seminal plazma reaktif oksijen türlerinin (ros) sperm DNA fragmentasyonu ve apoptozu sürecinde infertiliteye olan etkisinin değerlendirilmesi. Yüksek lisans tezi. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi; 2008
- Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *Oxygen Radicals in Biological Systems Part B: Oxygen Radicals and Antioxidants*, 1990; 421-31.
- Dursun N. Veteriner Anatomi II. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı. Medisan Yayınevi. Ankara, 2008; ISBN 975-7774-09-X.
- El Gharras H. Polyphenols: food sources, properties and applications—a review. *Int J Food Sci Technol*, 2009; 44(12), 2512-2518.
- Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nature Medicine*, 2011; 17 (11), 1391
- Erden M. Serbest Radikaller. *Turk Klin. Tıp Bil Derg*, 1992; 12: 201-7.
- Erdoğan BB, Uzaslan EK. Apoptozis Mekanizmaları, Tümör Gelişiminde Fas-FasL Bağımlı Apoptozis, *Akciğer Arşivi*, 2003; 4, 165-174.

- Ergun Y, Koc A, Dolapcioglu K, Akaydin Y, Dogruer G, Kontas T, Aslan E. The protective effect of erythropoietin and dimethylsulfoxide on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2010; 152 (2), 186-190.
- Esteban-Zubero E, García-Gil FA, López-Pingarrón L, Alatorre-Jiménez MA, Iñigo-Gil P, Tan DX, Reiter RJ. Potential benefits of melatonin in organ transplantation: a review. *Journal of Endocrinology*, 2016; 229 (3), R129-R146.
- Favareto AP, Fernandez CD, Silva DA., Anselmo Franci JA, Kempinas WDEG. Persistent impairment of testicular histology and sperm motility in adult rats treated with cisplatin at peri-puberty. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2011; 109(2): 85-96.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in Globocan 2012. *International Journal of Cancer*, 2015; 136: 359-386.
- Fernandez V, Simitzu K. Effects of hyperthyroidism on rat liver Glutathione Metabolism, 1991; 129: 85-91.
- Florea AM, Büsselberg D. Anti-cancer drugs interfere with intracellular calcium signaling. *NeuroToxicology*, 2009; 30: 803–810.
- Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*, 2012; 33: 829-837.
- Gerald KMCE, Pharm D. *AHFS DRUG INFORMATION*, 2006; 979- 984.
- Geyikoglu F, Koc K, Erol HS, Çolak S, Ayer H, Jama S, Eser G, Dortbudak MB, Saglam YS. The propolis and boric acid can be highly suitable, alone/or as a combinatory approach on ovary ischemia-reperfusion injury, *Arch Gynecol Obstet*, 2019; 300:1405–1412.
- Goyer RA, Clarkson TW. *Carasett and Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons*, 6.baskı, Mc Graw-Hill Companies Inc. Medical Publishing Division USA, 2001.

Goulart M, Batoreu MC, Rodrigues AS, Laires A, Rueff J. Lipoperoxidation products and thiol antioxidants in chromium exposed workers. *Mutagenesis*, 2005; 20(5), 311-315.

Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*, 1995; 41: 1819-1828

Gültekin N, Karaoğlu K, Küçükateş E. Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri. *Türk Kardiyol Dern Arş.* 2008; 36 (2): 120-130

Halliwell B. Oksidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radical Res*, 1996; 25: 57-74.

Hanigan MH, Devarajan P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Ther* 2003; 1: 47-61.

Hata K, Urushibara A, Yamashita S, Lin M, Muroya Y, Shikazono N, Yokoya A, Fu H, Katsumura Y. Chemical repair activity of free radical scavenger edaravone: reduction reactions with dGMP hydroxyl radical adducts and suppression of base lesions and AP sites on irradiated plasmid DNA. *Journal of Radiation Research*, 2014; 1–8

Hibbard L. Adnexal torsion. *Am J Obstet Gynecol*, 1985; 152:456–61.

Higashi Y, Jitsuiki D, Chayama K. Edaravone(3-Methyl-1-Phenyl-2- Pyrazolin-5-One), A Novel free radical scavenger, for treatment of cardiovascular diseases. *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery*, 2006; 1: 85-93.

Hikim A, Lue Y, Romero M, Yen P, Wang C, Swerdloff R. Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis. *Journal of steroid Biochemistry&Molecular Biology*, 2003; 85, 175-182

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687990861351>

<https://vickihobbs.com/wp-content/uploads/2017/12/Broad-Ligament-e1512204912220.jpg>, Erişim Tarihi: 21 Aralık 2020

<https://www.wikiwand.com/en/Edaravone> Erişim Tarihi: 21 Aralık 2020

- Hu QY, Liu P, Fu ZF. Concurrent chemoradiotherapy followed by adjuvant chemotherapy for stage III - IVa nasopharyngeal carcinoma. *Ai Zheng*, 2007; 26(4):394-7.
- Inokuchi Y, Imai S, Nakajima Y, Shimazawa M, Aihara M, Araie M, Hara H. Edaravone, a free radical scavenger, protects against retinal damage in vitro and in vivo, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2009; 329, 687-698.
- Kano T, Harada T, Hirayama T, Katayama Y. Combination Therapy Using tPA and Edaravone Improves the Neurotoxic Effect of tPA. *Interv Neuroradiol*, 2007 Mar 15; 13: 106-8.
- Kara M, Daglioglu YK, Kuyucu Y, Tuli A, Tap O. The effect of edaravone on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2012; 162:197-202.
- Karabulut H, Gülay MŞ. Serbest Radikaller, Free Radicals, , *MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg*, 2016; 4(1): 50-59
- Karabulut O, Delilbaşı L. Oogenezis, Oosit Toplama Prosedürü, Oosit Morfolojisi in vitro Maturasyon, In: Delilbaşı L.(Ed). *IVF laboratuvar Yöntemleri*. 2007; 85-86
- Kart C, Aran T, Guven S, Karahan SC, Yulug E. Acute increase in plasma D-dimer level in ovarian torsion: an experimental study. *Human Reproduction*, 2011; 26(3), 564-568.
- Kayaalp O. *Tıbbi Farmakoloji*. 10. Basım, 404-405, Hacettepe Taş, Ankara, 2002.
- Kayaalp O. *Türkiye İlaç Kılavuzu TİK-4 2005 Formülleri* Turgut Yayıncılık, Ankara, 2005.
- Kayaalp SO. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, 8. Baskı, Cilt 1-2, Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd şirketi, Ankara, 1998.
- Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*, 2007; 7: 573-584. 132.
- Khan R, Khan AQ, Qamar W, Lateef A, Tahir M, Rehman MU, Ali F, Sultana S. Chrysin protects against cisplatin-induced colon. toxicity via amelioration of

- oxidative stress and apoptosis: probable role of p38MAPK and p53. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012; 258(3), 315-329.
- Kierszenbaum AL (Ed). *Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Folikül gelişimi ve Menstrual Döngü* Çev. R. Demir. Palme Yayıncılık, Ankara, 2006; 566-572
- Kim JH, Jeong SJ, Kwon HY, Park SY, Lee HJ. Decursin prevents cisplatin-induced apoptosis via the enhancement of antioxidant enzymes in human renal epithelial cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2010; 33(8), 1279-1284.
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Kramer PH, Peter ME. Cytotoxicity dependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J*, 1995; 14: 5579–88.
- Klaassen CD, Goodman and Gilman"s *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10. Baskı, McGraw-Hill Companies Inc. Medical Publishing Division, USA, 2001.
- Koç A. Antioksidanların Cep telefonu ile oluşturulmuş testiküler apoptozis ve oksidatif stres üzerine etkileri. Uzmanlık tezi. Ankara. Fatih Üniversitesi, 2008.
- Kokura S, Yoshida N, Sakamoto N, Ishikawa T, Takagi T, Higashihara H, Nakabe N, Handa O, Naito Y, Yoshikawa T. The radical scavenger edaravone enhances the anti-tumor effects of CPT-11 in murine colon cancer by increasing apoptosis via inhibition of NF-Kb. *Cancer Letters*, 2005; 229, 223-233.
- Kopani M, Celec P, Danisovic L, Michalka P, Biro C. Oxidative stress and electron spin resonance. *Clinica Chimica Acta*, 2006; 364: 61-66.
- Kutluk T, Kars A. *Kanser Konusunda Genel Bilgiler*. Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları, 1992.
- Lengyel E. (2010b). Ovarian cancer development and metastasis. *American Journal of Pathology*. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100105>
- Mastanabad MF. Caspase promotör Bölge Polimorfizmleri ve Ovaryum Kanseri arasındaki ilişki. Yüksek lisans tezi. İstanbul. İstanbul Üniversitesi, 2009.
- Masuda T, Shimazawa M, Hara H. Retinal diseases associated with oxidative stress and the effects of a free radical scavenger (Edaravone). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017; 1-14.

- Matthews SB, Thompson J. The obesity-breast cancer conundrum: An analysis of the issues. *International Journal of Molecular Sciences*,2016; 17: 989.
- Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem*, 2004; 279(47), 49064-49073.
- Mülazımoğlu S, İde T, Aslan S. Ratlarda Üreme. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*. Ankara Üniversitesi. Veteriner Fakültesi, 2011; DOI: 10.4328/JCAM.585
- Ogun M, Ozcan A, Karaman M, Merhan O, Ozen H, Kukurt A, Karapehlivan M. Oleuropein ameliorates arsenic induced oxidative stress in mice. *J Trace Elem Med Biol*,2016; 36: 1-6.
- Ovalle WK, Nahirney PC. Female reproductive system. *Netter's essential histology*. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2013; 403-29.
- Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA. *JCEI*, 2015; 6 (3): 331-336 *Journal of Clinical and Experimental Investigations* doi: 10.5799/ahinjs.01.2015.03.0545
- Pandır D, Kara Ö. Cisplatin-induced kidney damage and the protective effect of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.): an experimental study. *Turk J Med Sci*, 2013; 43(6):951-6.
- Pandır D, Kara Ö, Kara M. Protective effect of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) on cisplatin induced ovarian damage in rats. *Cytotechnology*, 2014; 66(4):677-85.
- Patel DA, Raj H, Patel R. Edaravone: A Review on Analytical Method and its Determination in Biological Matrix and Synthetic Mixture. *Pharma Tutor Magazine*, 2014; 2,10.
- Perk H, Soyupek S, Oksay T. Erkek infertilitesine neden olan fiziksel ajanlar, ilaçlar ve toksinler. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji ABD., İnfertilite Dergisi*, 2005; 23, 305-310.
- Pham-Huy LA, He H, Pham-Huyc C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci*,2008; 4(2), 89-96.

- Reid BM, Permuth JB, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med*, 2017 Feb;14(1):9-32.
- Revel A, Laufer N. Protecting female fertility from cancer therapy. *Mol. And Cell. Endocr*, 2002; 187: 83-91
- Roh MI, Murakami Y, Thanos A, Vavvas DG, Miller JW. Edaravone, an ROS scavenger, ameliorates photoreceptor cell death after experimental retinal detachment, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2011; 52, 3825-3831.
- Ross MH, Pawlina W, *Histology: A text and atlas 6/E*, 2013; 832-23.2.
- Ross MH, Pawlina W, Barnash TA. *Atlas de Histologia Descritiva*, 2016; Artmed Editora.
- Sabuncuoglu S, Özgüneş H, Cisplatin toxicity: Importance of oxidative stress and effect of antioxidants. *İst Tıp Fak Derg*, 2010; 73: 3
- Sadler TW. *Langman's medical embryology*. Palme Yayıncılık İstanbul, 2010; 11-th ed 1-20
- Sak ME, Soydinc HE, Sak S, Evsen MS, Alabalik U, Akdemir F, Gul T. The protective effect of curcumin on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *International Journal of Surgery*, 2013; 11 (9), 967-970.
- Salman KA, Ashraf S. Reactive oxygen species: A link between chronic inflammation and cancer. *AsPac J Mol Biol Biotechnol*, 2013, 21: 42-49.
- Sarma AD, Mallick AR, Ghosh AK. Free radicals and their role in different clinical conditions: an overview. *Int J Pharm Sci Res*, 2010; 1(3), 185-192.
- Schwab ME, Bartholdi D. Degeneration and regeneration of axons in lesioned spinal cord. *Physiol. Rev*, 1996; 76, 319-370.
- Seitz HK, Stickel F. Risk factors and mechanisms of hepatocarcinogenesis with special emphasis on alcohol and oxidative stress. *Biol Chem*, 2006; 387: 349-360.

- Strand-Amundsen RJ, Tronstad C, Kalvoy H, Ruud TE, Hogetveit JO, Martinsen ÖG, Tonnessen TI. Small intestinal ischemia and reperfusion-bioimpedance measurements. *Physiological Measurement*, 2018; 39 (2), 025001.
- Tiwari AK. Antioxidants: New generation therapeutic base for treatment of polygenic disorders. *Current Science*, 2004; 86(8): 1092-1102.
- Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, Runowicz CD, Siegel RL. Ovarian cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2018a; <https://doi.org/10.3322/caac.21456>
- Tsuruma K, Yamauchi M, Inokuchi Y, Sugitani S, Shimazawa M, Hara H. Role of oxidative stress in retinal photoreceptor cell death in N-methyl-N-nitrosourea-treated mice. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2012; 118, 351-362.
- Uehara T, Watanabe IT, Itoh F, Inovne S, Koshgda H, Nakamura M, Yamate J, Maruyama T. Nephrotoxin of a novel anti neoplastic platinum complex, Nedaplatin: a comparative study with cisplatin in rats. *Arch toxicol*, 2005; 79: 451-460
- Ural ÜM, Gürlek B, Alver A. Protective effect of edaravone against radiation-induced ovarian injury: a histopathological and immunohistochemical evaluation in an experimental rat model. *Arch Gynecol Obstet*, 2020; doi: 10.1007 /s00404-020-05888-6.
- Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidan antioksidan dengelyi etkileyen koşullar. *Klin Gel*, 1998; 11: 336-41.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 2006; 160: 1-40.
- Van Loo G, Van Gurp M, Depuydt B, Srinivasula SM, Rodriguez I, Alnemri ES, Gevaert K, Vandekerckhove J, Declercq W, Vandenneele P. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ*, 2002 Jan; 9(1):20-6.
- Warner DS, Sheng H, Batinić-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol*, 2004; 207: 3221 -3231

- Xu J, Zheng T, Hong W, Ye H, Hu C, Zheng Y. Mechanism for the decision of ovarian surface epithelial stem cells to undergo neo-oogenesis or ovarian tumorigenesis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018; 50 (1), 214-232
- Qin T, Lei LY, Li N, Shi FR, Chen MH, Xie L. Edaravone improves survival and neurological outcomes after CPR in a ventricular fibrillation model of rats, *The American Journal of Emergency Medicine*, 2016; 34, 1944-1949.
- Yamamoto Y, Kuwahara T, Watanabe K, Watanabe K. Antioxidant activity of 3methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one, *Redox Report: Communications in Free Radical Research*, 1996; 5, 333–338.
- Yilmaz B, Kilic S, Aksakal O. Melatonin causes regression of endometriotic implants in rats by modulating angiogenesis, tissue levels of antioxidants and matrix metalloproteinases. *Arch Gynecol Obstet*, 2015; 292: 209-216
- Yuan Y, Zha H, Rangarajan P, Ling EA, Wu C. Anti-inflammatory effects of edaravone and scutellarin in activated microglia in experimentally induced ischemia injury in rats and in BV-2 microglia, *Biomedcentral Neuroscience*, 2014; 15, 125-127.
- Zhang N, Komine-Kobayashi M, Tanaka R, Liu M, Mizuno Y, Urabe T. Edaravone reduces early accumulation of oxidative products and sequential inflammatory responses after transient focal ischemia in mice brain. *Stroke*, 2005; 36: 2220-2225

## EK 1. ETİK KURUL KARARI



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



Tarih: 18.01.2019

Toplantı Sayısı: 01

Karar No:19/001

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 18.01.2019 tarihinde Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA 'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü
Fahri OĞUZKAYA	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Fusun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Serpil SARIÖZKAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Yusuf KONCA	Prof. Dr.	Ziraat Fakültesi
Ahmet ÖZTÜRK	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
M. Betül AYCAN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Zühal HAMURCU	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi
Sezer DEMİRBUĞA	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi
Zeynep CAFEROĞLU	Dr.Öğr.Üyesi	Sağlık Bilimleri Fakültesi
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Dr.Öğr.Üyesi	Veteriner Fakültesi
Burcu ÜNLÜ ENDİRLİK	Dr.Öğr.Üyesi	Eczacılık Fakültesi
Zeynep SOYER SARICA	Dr.	Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz.
Özge AL	Arş. Görevlisi	Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK)
Ali KOÇ	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	Sivil Üye
Mehmet TAV	Dernek Üyesi (Avukat)	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji A.D.'dan Prof. Dr. Birkan YAKAN tarafından sunulan "Cisplatinin Oluşturduğu Sıçan Ovaryum Hasarında Edaravonun Koruyucu Etkisi" başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

# CİSPLATİNİN OLUŞTURDUĞU SIÇAN OVARYUM HASARINDA EDARAVONUN KORUYUCU ETKİSİ

## ORIJINALLIK RAPORU

%6	%4	%3	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

## BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	<a href="http://readgur.com">readgur.com</a> İnternet Kaynağı	%2
2	KARAMAN, Esra, Gümüřçü, ÖZESMİ, Çiğdem, SÜER, Cem, GÖLGELİ, Asuman and DOLU, Nazan. "Hipergliseminin uyarılma potansiyelleri üzerine etkisinin streptozotosin ile diabet oluşturulmuş sıçanlarda incelenmesi", Fırat Üniversitesi, 2005. Yayın	%1
3	<a href="http://acikerisim.deu.edu.tr">acikerisim.deu.edu.tr</a> İnternet Kaynağı	<%1
4	ÇETİN, Mehmet Mustafa, YILMAZ, Zeki, ARTIŞ, Tarık, DENİZ, Kemal and SARAYMEN, Recep. "The effect of edaravone on liver damage in controlled experimental non-heart-beating donor model", Erciyes Üniversitesi, 2012. Yayın	<%1
5	KILIÇ, Avni, UYANIKOĞLU, Hacer and	<%1

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Ad-soyad **Özlem KARA**  
Uyruğu T.C.

### EĞİTİM BİLGİLERİ

2015-2016 Yüksek lisans, Erciyes Üniversitesi, Kayseri Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı  
2014-2015 Yüksek lisans, Bozok Üniversitesi, Yozgat Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Anabilim Dalı  
2013-2014 Lisans, Bozok Üniversitesi, Yozgat Fen- Edebiyat Fakültesi Biyoloji  
2013-2014 Ön Lisans, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Kurumları İşletmeciliği  
1993-1995 Ön Lisans, Marmara Üniversitesi, Tıbbi Laboratuvar Bölümü

### İŞ DENEYİMİ

2010-Halen Öğrenci  
2003-2010 Özlem Eczanesi  
1995-2003 ARİS İLAÇ İstanbul- Bölge Yöneticiliği

### EĞİTİM VE SERTİFİKA BİLGİLERİ

Temmuz 2019 – Mart 2020: Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Merkezi  
IVF Sertifikasyon eğitimi

08-16 Nisan 2013 : Deneysel Hayvanları Kullanım Sertifikası  
2001 : Özel Marmara Çağdaş Bilimler Vakfı Öğretim Kurumları  
Bilgisayar İşletmenliği Ofis Programları uzmanlığı sertifikası

### A. ULUSLARARASI HAKEMLİ DERGİLERDE YAYIMLANAN

#### MAKALELER

- A1.** Bas H, Kara Ö, Kara M, Pandir D. Protective effect of vardenafil on ischemiareperfusion injury in rat ovary. Turk J Med Sci 2013;43(5):684-9.
- A2.** Pandir D, Kara Ö. Cisplatin-induced kidney damage and the protective effect of bilberry (Vaccinium myrtillus L.): an experimental study. Turk J Med Sci 2013;43(6):951-6.
- A3.** Pandir D, Kara Ö, Kara M. Protective effect of bilberry (Vaccinium myrtillus L.) on cisplatin induced ovarian damage in rats. Cytotechnology 2014;66(4):677-85.

- A4.** Pandır D, Kara Ö. 2014. Chemopreventive effect of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) against cisplatin-induced oxidative stress and DNA damage as shown by the comet assay in peripheral blood of rats. *Biologia* 2014;69(6):811-6.
- A5.** Kara Ö, Baş H, Pandır D. Furan toxicity on testes and protective role of lycopene in diabetic rats. *J Turk Ger Gynecol Assoc* 2016;17:191-6.
- A6.** Kara Ö, Yakan B, Kara M, Kaymak E. Protective Effect of *vaccinium myrtillus* on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *Taiwanese J Obstet Gynecol* 2018;57(6):836-41.
- A7.** Kara M, Sabah-Ozcan S, Aran T, Kara O, Yilmaz N. Decreased expression of LIF mRNA in patients with myoma uteri. *J Cellular Biochem* 2019;120(3):3423-7.
- A8.** Kara M, Sabah-Ozcan S, Aran T, Kara O, Yilmaz N. Evaluation of Endometrial Receptivity by Measuring HOXA-10, HOXA-11, and LIF Expression in Patients with Polycystic Ovary Syndrome. *Gynecol Minim Invasive Ther* 2019;8(3):118-22.

## **B. ULUSLARARASI KONGRELERDE YAYINLANAN SÖZLÜ VE POSTER BİLDİRİLERİ**

- B1.** Bas H, Kara Ö, Kara M, Pandır D, 15th World Congress on Human Reproduction konferansı dahilinde "15th World Congress on Human Reproduction – Venice 2013" bildiri kitapçığındaki " Protective effect of vardenafil on ischemia-reperfusion injury in rat ovary ", ...pp., Venice, Italy, March, 2013.
- B2.** Pandır D, Kara Ö, Kara M. 2013. Protective effect of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) on cisplatin induced ovarian damage in rat. 11. Ulusal Jinekoloji ve Obstetrik Kongresi & 5. Akdeniz Ülkeleri Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu Kongresi, ", 428 pp, 15-19 Mayıs 2013, Antalya.
- B3.** Kara M, Seckin L, Aran T, Sabah S, Kara Ö, Yilmaz N, Sari N, Engin-Ustun Y, 11th Turkish German Gynecology Congress - Antalya 2016 konferansı dahilinde " J Turk Ger Gynecol Assoc 2016" dergisindeki " Evaluation of endometrial receptivity by measuring HOXA-10, HOXA-11, and LIF expression in patients with myoma uteri", 11 pp., Antalya, Turkey, May 2016.
- B4.** Kara M, Aran T, Sabah S, Kara Ö, Yilmaz N, Caglayan EK, 11th Turkish German Gynecology Congress - Antalya 2016 konferansı dahilinde " J Turk Ger Gynecol Assoc 2016" dergisindeki " Evaluation of endometrial receptivity by measuring HOXA-10, HOXA-11, and LIF expression in patients with polycystic ovary syndrome ", 87 pp., Antalya, Turkey, May 2016.

## **C. ULUSAL KONGRELERDE YAYINLANAN SÖZLÜ VE POSTER BİLDİRİLERİ**

**C1.** Pandır D, Kara O, Kara M., 11. Ulusal Jinekoloji ve Obstetrik Kongresi (TJOD 2013) konferansı dahilinde "11. Ulusal Jinekoloji ve Obstetrik Kongresi" bildiri kitapçığındaki "Protective effect of bilberry on cisplatin induced ovarian damage in rats", 428 pp., Antalya, Türkiye, Mayıs 2013.

## **D. KONGRE KATILIM**

**5 - 8 Mayıs 2016** III. Uluslararası Katılımlı Deneysel Hematoloji Kongresi,  
Kayseri

**16 - 19 Nisan 2015** II. Uluslararası Katılımlı Deneysel Hematoloji Kongresi,  
Kayseri