

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GEBE SIÇANLARA UYGULANAN PROSTAGLANDİN SENTEZ İNHİBİTÖRÜ
DİKLOFENAK SODYUMUN POSTNATAL OVARYUM MORFOMETRİSİNE
ETKİLERİNİN STEREOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Ebe Esra KAPTAN PARILTI
TIBBİ HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Murat Çetin RAĞBETLİ

VAN – 2011

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GEBE SIÇANLARA UYGULANAN PROSTAGLANDİN SENTEZ İNHİBİTÖRÜ
DİKLOFENAK SODYUMUN POSTNATAL OVARYUM MORFOMETRİSİNE
ETKİLERİNİN STEREOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Ebe Esra KAPTAN PARILTI
TIBBİ HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Murat Çetin RAĞBETLİ

VAN - 2011

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GEBE SIÇANLARA UYGULANAN PROSTAGLANDİN SENTEZ İNHİBİTÖRÜ
DİKLOFENAK SODYUMUN POSTNATAL OVARYUM MORFOMETRİSİNE
ETKİLERİNİN STEREOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Esra KAPTAN PARILTI
TIBBİ HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Murat Çetin RAĞBETLİ

Üye

Doç. Dr. Nureddin CENGİZ

Üye

Yrd. Doç. Dr. Necat KOYUN

TEZ KABUL TARİHİ

01/06/2011

TEŞEKKÜR

Histoloji ve Embriyoloji eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi, yardım ve desteğini esirgemeyen Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Murat Çetin RAĞBETLİ'ye, Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Nureddin CENGİZ'e, İstatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Sıddık KESKİN'e, Anatomi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Necat KOYUN'a, Araş. Gör. Sayın Dr. Mikail KARA'ya ayrıca laboratuvar çalışmalarında yardımda bulunan, patoloji laboratuvarının tüm çalışanlarına, Veysel Akyol'a, tezime emeği geçenlere ve özellikle sabrı ve desteği için sevgili eşime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR	VI
ŞEKİLLER.....	VII
TABLolar	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Ovaryum	5
2.1.1. Ovaryum embriyolojisi	5
2.1.2. Ovaryum anatomisi.....	7
2.1.3. Ovaryum histolojisi.....	9
2.1.4. Ovaryumların fizyolojisi.....	12
2.2. Diklofenak Sodyum	13
2.2.1. Diklofenak sodyumun formülü	13
2.2.2. Diklofenak sodyumun farmakolojisi	13
2.2.3. Diklofenak sodyumun gebelikte kullanımı.....	14
2.3. Stereoloji Nedir?	14
2.3.1. Stereolojik metotlar.....	14
2.3.2. Disektör.....	19
2.3.3. Cavalieri metodu.....	19
2.3.3.a. Hacim hesaplaması için kesit yüzey alanlarının hesaplanması.....	20
2.3.3.b. Toplam hacmin hesaplanması	22
2.3.3.c. Bileşen hacmi ve hacim oranlarının hesaplanması	23
2.3.3.d. Hacim oranından bileşenin toplam hacminin bulunması.....	23
2.3.3.e. Nokta sayım yöntemi ile alan ve hata miktarının hesaplanması.....	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Gereç	27
3.2. Yöntem.....	28
3.2.1. Ovaryumların kesit işlemleri	28
3.2.2. Ovaryumların boyama işlemleri	30

3.3. İstatistiksel Analiz.....	31
4. BULGULAR.....	32
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	48
ÖZET	51
SUMMARY	52
KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

CE	: Coefficient Error
CV	: Coefficient of Variation
DA	: Ductus Arterious
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
HK	: Hata Katsayısı
İM	: İntra müsküler
İM	: Işık Mikroskobu
NSAİİ	: Nonsterodial Antiinflamatuvar İlaç
PG	: Prostoglandin
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
SRÖ	: Sistematik Rastgele Örnekleme
OBJ	: Objektif
PGH	: Primordiyal Germ Hücreleri

ŞEKİLLER

Şekil 1. Üç haftalık embriyodaki primordiyal germ hücresi	6
Şekil 2. Ovaryumların anatomisi	8
Şekil 3. Ovaryumdaki çeşitli büyüme evrelerindeki foliküller.....	11
Şekil 4. Kesitlerde boyut azalması	16
Şekil 5. Kesit yöneliminin iz düşüm sayısına etkisi	17
Şekil 6. Tanecik yöneliminin kesitlerdeki izdüşüm sayısına etkisi	17
Şekil 7. Doku içerisinde bulunan farklı büyüklükteki tanecikler ve iki boyutlu düzlemlerdeki izdüşümleri.....	18
Şekil 8. Noktalı alan ölçüm cetveli.....	20
Şekil 9. Cavalieri yöntemi ile hacim hesaplaması yapılırken, kesitlerin hep aynı yöne bakan yüzeylerinin ölçüm için kullanılmasının önemi.	22
Şekil 10. Bileşik noktalı alan ölçüm cetveli.	24
Şekil 11. Ovaryum cetvelle ölçümü.....	28
Şekil 12. Kesit alınan mikrotom	29
Şekil 13. Sayımda kullanılan fotoğraf ataşmanı ilave edilmiş mikroskop	29
Şekil 14. Denek (diklofenak sodyum), sham (serum fizyolojik) ve kontrol gruplarına ait total hacim oranları.	32
Şekil 15. Gruplara ait total nokta sayıları	33
Şekil 16. Gruplara ait total primordiyal folikül sayısı	33
Şekil 17. Ovaryum denek grubu görüntüsü (Masson Trikrom x100 Obj.).....	45
Şekil 18. Ovaryum kontrol grubu görüntüsü (Masson Trikrom x100 Obj.).....	46
Şekil 19. Ovaryum denek grubu görüntüsü (Masson Trikrom x 4 Obj.).....	46
Şekil 20. Ovaryum kontrol grubu görüntüsü (Masson Trikrom x 4 Obj.).....	47
Şekil 21. Ovaryum sham grubu görüntüsü (Masson Trikrom x 4 Obj.).....	47

TABLÖLAR

Tablo 1. Sistematik rastgele örnekleme planının hata katsayısını (CE) hesaplamak için kullanılan tablo örneği.	26
Tablo 2. Denek 1. sıçan primordiyal folikül sayısı.	34
Tablo 3. Denek 2. sıçan primordiyal folikül sayısı.	34
Tablo 4. Denek 3. sıçan primordiyal folikül sayısı.	34
Tablo 5. Denek 4. sıçan primordiyal folikül sayısı.	35
Tablo 6. Denek 5. sıçan primordiyal folikül sayısı.	35
Tablo 7. Denek 6. sıçan primordiyal folikül sayısı.	36
Tablo 8. Sham 1. sıçan primordiyal folikül sayısı.	36
Tablo 9. Sham 2. sıçan primordiyal folikül sayısı.	37
Tablo 10. Sham 3. sıçan primordiyal folikül sayısı.	37
Tablo 11. Sham 4. sıçan primordiyal folikül sayısı.	38
Tablo 12. Sham 5. sıçan primordiyal folikül sayısı.	38
Tablo 13. Sham 6. sıçan primordiyal folikül sayısı.	39
Tablo 14. Kontrol 1. sıçan primordiyal folikül sayısı.	39
Tablo 15. Kontrol 2. sıçan primordiyal folikül sayısı.	40
Tablo 16. Kontrol 3. sıçan primordiyal folikül sayısı.	40
Tablo 17. Kontrol 4. sıçan primordiyal folikül sayısı.	41
Tablo 18. Kontrol 5. sıçan primordiyal folikül sayısı.	41
Tablo 19. Kontrol 6. sıçan primordiyal folikül sayısı.	42
Tablo 20. Ovaryum denek grubuna ait volüm nokta sayıları (nokta alanı) ve ovaryum total hacimleri.	42

Tablo 21. Ovaryum Sham grubuna ait volüm nokta sayıları ve total volümleri.	43
Tablo 22. Ovaryum kontrol grubuna ait volüm nokta sayıları ve ovaryum total volümleri.	43
Tablo 23. Gruplara ait ovaryum total primordiyal folikül sayısı.	44
Tablo 24. Denek, Kontrol ve Sham gruplarına ait CV ve CE değerleri.	44
Tablo 25. Gruplara ait tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları.	45

1. GİRİŞ

Son yıllarda gelişen teknoloji ve serbest ticaret anlayışı, her alanda olduğu gibi sağlık alanında da tüketici bir toplum ortaya çıkarmıştır. Bunun bir sonucu olarak da, ilaç tüketimi kontrolsüz bir şekilde artmıştır. Ülkemizde ise en çok tüketilen ilaçlar; antibiyotikler, ağrı kesiciler ve antiromatizmal ilaçlardır. Nonsterodial antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) bağımlılık yapmadığı için birçok romatizmal hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Antiinflamatuvar özelliklerinden dolayı kas iskelet rahatsızlıklarında ve eklem hastalıklarında tercih edilmektedirler. Bunun yanında NSAİİ'lar grubundan olan Diklofenak Sodyum'da kadın hastalıkları ve doğum uzmanlarınca sıklıkla kullanılır olmuştur. Erken doğum, semptomatik polihidroamnios, primer dismenore, rahim içi araçlardan doğan dismenore ve menoraji tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir (Odacı ve ark., 2001).

1991 yılında yapılan bir araştırma, ABD'de bu grubun bir ilacı olan aspirinin yılda 6000 ton kullanıldığını göstermektedir (Waissmann, 1991). NSAI ilaçlar grubundan olan diklofenak sodyum ise ülkemizde değişik firmalar tarafından değişik isimler adı altında son yirmi yıl içerisinde piyasaya sürülmüştür. Voltaren (ampul, göz damlası), miyadren (ampul, tablet), dikloron (tablet, ampul), diclomec (jel, ampul) sadece bir kaç örnektir (Ommaty, 1988). Yaygın kullanıma sahip olan diklofenak sodyumun bazı çalışmalarda, birçok organ ve dokunun yapısını bozduğu ve birçok sistemde de yan etkileri olduğu gösterilmiştir. Bu yan etkilerden en çok bilinenleri midede; ülser, kanama, hazımsızlık, stomatit, böbreklerde; akut renal yetmezlik, hipertansiyon, ciltte; eritema multiforme, büllöz erüpsiyonlar, ilaç erüpsiyonları, püstüler psöriazis, karaciğerde; hepatit, Reye sendromu, merkezi sinir sisteminde; baş ağrısı, baş dönmesi, bulantı, aseptik menenjit, kanda; aplastik anemi, trombositopeni, nötropeni, hemolitik anemi, akciğerlerde; pulmoner ödem, pulmoner alveolitis, astım ve anafilaktik reaksiyonlardır (Brooks, 1988; Odacı ve ark., 2001).

Hamilelikte antiromatizmal ilaçların kullanımı üzerine bilgiler sınırlıdır. NSAİİ'lerinden olan aspirin ve indometazin'in romatoid artrit tedavisindeki etkisi incelenmiştir. Hamileliğin son trimesterinde artrit veya tokolitik tedavi amacıyla uygulamada kullanılan NSAİİ'de çok dikkatli olunmalıdır. NSAİİ'nin gebelik süresince kullanımının annede ve fetusda yan etkilere yol açtığı bildirilmiştir. Hamilelikte verilen diklofenak sodyum'un gebelik ve doğum süresini uzattığı gözlenmiştir. Postnatal dönemde duktus arteriosusta (DA) kasılma, hidrops fetalis, oligohidroamnios, ileal perforasyon, beyinde kistik lezyonlar, özellikle karaciğerde parankimal dejenerasyona yol açtığı görülmüştür (Gökçimen ve ark., 2003). Bu tür ilaçların prostoglandinlerin biyosentezini inhibe ederek plasental engeli geçip, fetal dolaşıma girerek, toksik etkilerini çeşitli organ ve dokularda gösterdiği bilinmektedir. Fötal yaşamda uygulanan 1mg/kg NSAİİ'nin postnatal dönemde sıçan akciğer kapilleri sayısında, denek grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalma olduğu tespit edilmiştir (Kaplan ve ark., 1994).

Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada gebeliklerinde diklofenak sodyum kullanılmış, yüksek doz (125 mg/kg) ile orantılı olarak teratojen etkili olduğu gösterilmiştir (Chan ve ark., 2001). Carp ve arkadaşları (1988) ise, 3 mg/kg dozda diklofenak sodyum uygulanan sıçan embriyolarında blastosit implantasyonunun büyük oranda engellendiğini tespit etmişlerdir. Sıçan embriyolarında uygulanan 4 mg/kg diklofenak sodyumun, fetüs kaburgalarında defektlere neden olduğu bildirilmiştir (Brooks ve Needs, 1985). Bununla birlikte 10 mg/kg diklofenak sodyum uygulanan tavşanlarda herhangi bir teratojen etki görülmediği de bildirilmektedir (Russel, 1986). Gebeliğin farklı zamanlarında uygulanan diklofenak sodyumun fetüste farklı etkiler yapabileceği belirtilmiştir (Odacı ve ark., 2001).

Klinik uygulamada, kırık sonrası yaygın kullanımı olan antienflamatuar ilaç diklofenak sodyumun, insanlara uygulanan doz aralığında ve kırık sonrası on günlük kullanımda sıçan tibia kırıklarında kallus gelişimi ve kırık iyileşmesini olumsuz yönde etkilemediği sonucuna varılmıştır (Akman ve ark, 2001).

Diklofenak sodyum ve benzeri ilaçların, fetüste ve yenidoğanda toksik etkiler meydana getirdiği, gebelerde ise gebelik ve doğum süresini uzattığı bilinmektedir.

Yapılan çalışmalarda sıçanların normal gebelik süresinin NSAİİ'lar ile 21-23 günden 28-29 güne kadar uzadığı ve aynı durumun NSAİİ kullanan gebelerde de olduğu gözlenmiştir (Gökçimen ve Malas, 2003). Ayrıca prostaglandinlerin doğum eyleminin başlama mekanizmasındaki rolü bilinmekte ve prostaglandin sentetaz inhibitörleri preterm doğum eylemini durdurabilmektedir (Boehm ve ark., 1978; Niebly ve ark., 1980).

Carp ve ark., (1998) yaptıkları bir çalışmada, diklofenak sodyum uygulanan sıçanlarda blastosit implantasyonun % 34 oranında geciktiğini bildirmişlerdir. Russel (1986) tarafından yapılan bir çalışmada ise gebe tavşanlarda 10 mg/kg diklofenak'ın herhangi bir teratojenik etki göstermediği rapor edilmiştir.

Başka bir çalışmada; gebe sıçanlara 5 g/kg diklofenak sodyum uygulanmasıyla fetusların kaburgalarında deformiteler olduğu bildirilmiştir (Brooks ve ark.,1985). Rağbetli ve ark., (1996) yaptıkları çalışmada, intrauterinal yaşamlarında 1 mlg/kg günlük diklofenak sodyuma maruz kalan postnatal 20 haftalık erkek sıçanların dorsal hipokampus tabaka kalınlıklarının değişmediğini rapor etmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada gebelikte ve normal dozda kullanılan diklofenak sodyumun doğan yavruların karaciğerine etkisi araştırılmıştır. 20 haftalıkta yapılan bu çalışmada istatistiki olarak bir fark bulunmamıştır (Rağbetli ve ark., 2009a). Rağbetli ve ark., (2009b)'lerinin yaptığı başka bir çalışmada ise gebelikte kullanılan diklofenak sodyumun 20 haftalık yavruda akciğer dokusu üzerine patolojik etkisi olmadığı tespit edilmiştir.

Cotran ve ark., (1999) yaptıkları bir çalışmada, hamilelikte kullanılan NSAİİ'ların ductus arteriosus'da kasılmaya sebep olduğunu ve sonuçta sağ ventrikül yetmezliği ve pulmoner hipertansiyon geliştiğini ortaya çıkarmış, yeni doğanda ise karaciğere oksijenden fakir kanın gittiği ve karaciğer parankiminde vakuoler ve granüler dejenerasyonlar görüldüğünü rapor etmişlerdir.

Yapılan kaynak taramalarında çok nadir olarak görülen konjenital anomalilerin son on yıl içinde ülkemizde de görüldüğünün bildirilmiş olması NSAİ ilaçların yaygın

bir şekilde ülkemizde de kullanıldığını desteklemektedir. Bu yüzden diklofenak sodyum gibi NSAİ ilaçların gebelikte hekimler tarafından dikkatli kullanılması gerekmektedir (Gökçimen ve Malas, 2003).

Kaynak taramalarımızda her ne kadar diklofenak sodyumun gebe ve fetus üzerine etkisi araştırılmış olsa da 20 haftalık dişi fetusün üreme organının bir parçası olan ovaryumlar üzerine etkisini gösteren stereolojik bir çalışmaya rastlamadık. Bu nedenle planladığımız çalışma ve sonuçları bu alanda yeni bilgiler verdiğinden orijinal bir araştırmadır.

Bu çalışmanın amacı; prostaglandin sentez inhibitörü olan diklofenak sodyumun gebelikteki kullanımına bağlı olarak, dişi fetus üreme sisteminin bir parçası olan ovaryumların morfolojik volümü ve primordiyal folikül sayısına olan etkilerini stereolojik metotlarla araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

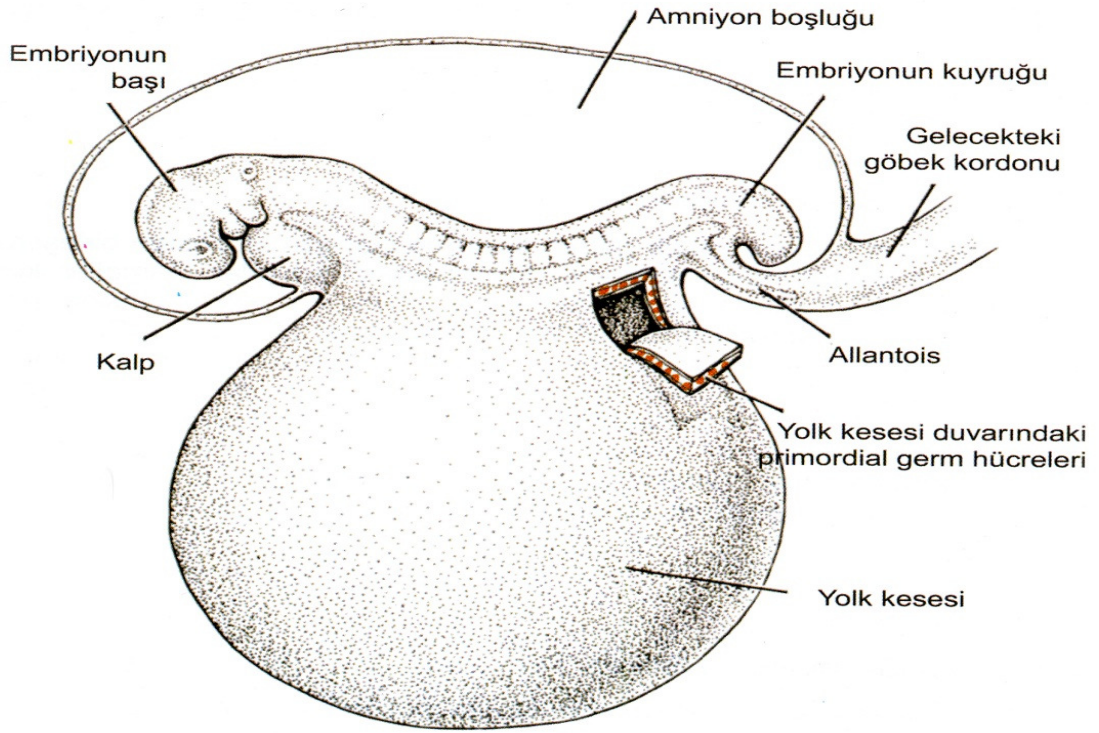
2.1. Ovaryum

2.1.1. Ovaryum embriyolojisi

İnsanoğlunun gelişimi, erkek gamet spermle dişi gamet oositin birleşerek zigot oluşturması anlamına gelen döllenme (fertilizasyon) ile başlar. Gametler iki hafta boyunca epiblastın içinde oluşan ve daha sonra da yolk kesesine göç eden primordiyal germ hücrelerinden (PGH) köken alırlar. Primordial germ hücreleri dördüncü haftadan itibaren, yolk kesesinden, gelişmekte olan gonadlara doğru yerleşmeye başlar ve hedeflerine beşinci haftada ulaşırlar. Göç sırasında başlayan mitotik bölünmelerle sayıca kalabalıklaşan hücreler bu durumu gonada ulaştıktan sonra da devam ettirirler. Fertilizasyona hazırlık amacıyla germ hücreleri gametogenez sürecine girerler. Gametogenez sırasında mayozla kromozom sayısı azaltılır. Daha sonra da sitodiferansiyasyonla olgunlaşırlar (Sadler, 2005).

Embriyonal hayatta ovaryumlar, karın arka duvarında böbreklerin yanında bulunurlar. Sonra da yavaş yavaş pelvise inerler. Ovaryumlar erişkinlerde periton ile örtülü olmadığı için yüzeyleri parlak değildir. Tunika albuginea korteks'deki bağ dokunun kalınlaşması ile oluşur (Moore, 1985).

Embriyonik yaşamın yaklaşık birinci ayında, primordiyal germ hücrelerinden oluşan küçük bir hücre topluluğu vitellüs kesesinden gonad taslağına göç eder. Gonadlarda bu hücreler bölünerek oogonyumlara dönüşür. Bölünmeler o kadar yoğundur ki uterus içi yaşamın ikinci ayında yaklaşık 600.000, beşinci ayı dolaylarında 7 milyonun üzerinde oogonyum vardır. Üçüncü aydan başlayarak oogonyumlar birinci mayoz bölünmenin profaz evresine girmeye başlar ancak bölünme diploten evresinde durarak mayoz bölünmenin diğer evrelerine ilerlemez ve puberteye girilene kadar birinci mayotik bölünmelerini tamamlamazlar (Sadler, 2005).



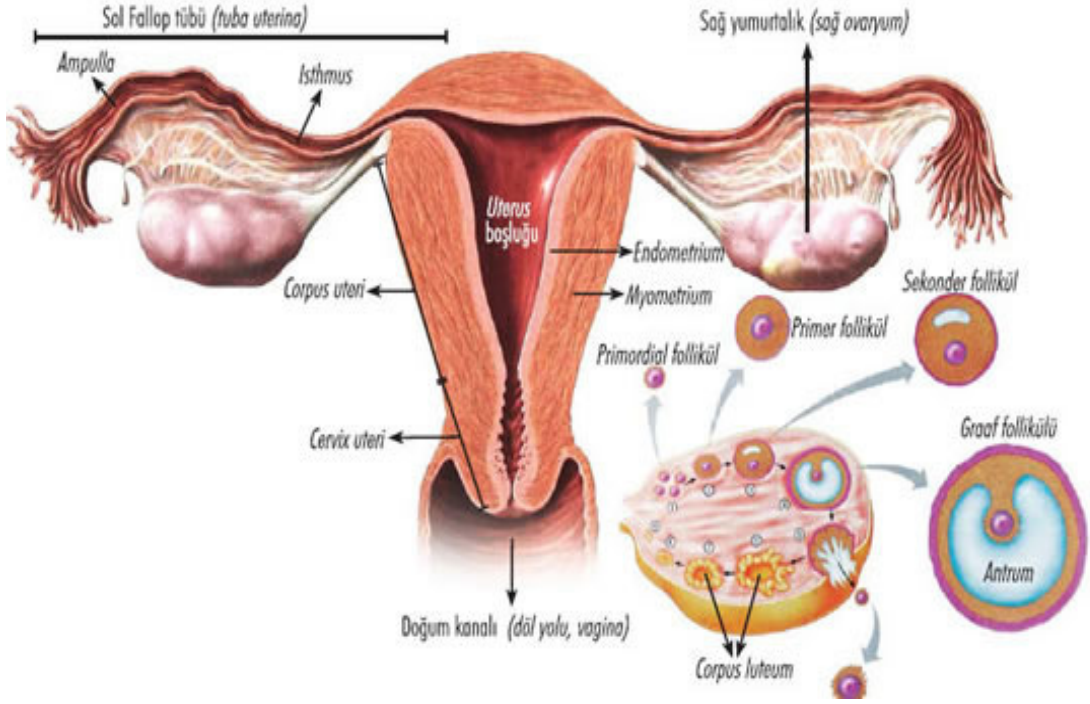
Şekil 1. Üç haftalık embriyoda, primordiyal germ hücrelerinin yolk kesesi duvarında daha sonra umbilikal kord haline gelecek olan yapının yakınında bulundukları görülmektedir. Bu hücreler daha sonra gelişmekte olan gonadlara göç edeceklerdir (Sadler, 2005).

Bu hücreler primer (birinci) oositlerdir ve foliküler hücreler olarak adlandırılan yassı hücrelerle çevrilidir. Gebeliğin yedinci ayına ulaşıldığında, oogonyumların çoğu primer oositlere dönüşmüştür. Ancak, primer oositlerin çoğu atrezi olarak adlandırılan bir yıkımla (dejeneratif süreçle) yok olur. Sonuç olarak puberte (ergenlik) dolaylarında ovaryumlar yaklaşık 300.000 oosit içerir. Atrezi, kadının üreme çağı boyunca sürer ve 40- 45 yaşlarında yaklaşık 8000 oosit kalır. Her aybaşı döngüsünde (ortalama süre 28 gün) genellikle tek bir oosit serbest bırakıldığından ve kadının doğurganlık çağı 30-40 yıl sürdüğünden, yalnızca 450 kadar oosit salınmış olur. Tüm diğer oositler atrezi yoluyla ortadan kaldırılır (Junqueira ve Carneiro, 2006). Puberteye ulaşıldığında dişi gonad artık primordiyal foliküllerden beslenen bir folikül havuzuna sahip olmuş durumdadır. Her ovarial siklusa bu havuzdan seçilen 5 ila 15 arasında değişen sayıda primordiyal folikül olgunlaşarak; primer, sekonder, tersiyer ve graff folikül ismini alır (Sadler, 2005).

İstirahat halinde olan primer oosit büyümeğe başladığında, oositi çevreleyen yassı epitel hücreleri önce kübikleşir, sonra çoğalarak çok sıralı bir epitel tabakası oluşturur. Çoğalan bu hücrelere granüloza hücreleri denir. Bu biçimiyle folikül artık primer folikül olarak adlandırılır. Granüloza hücreleri kendilerini çevrelerindeki, teka folikülü olarak bilinen stromal hücrelerden ayıran bir bazal membran üzerinde otururlar. Granüloza hücreleri ve oosit tarafından salgılanan glikoprotein yapısındaki bir madde oositin çevresinde zona pellusida adıyla bilinen bir tabaka oluşturur. Folikül büyümeğe devam ederken teka folikülünün hücreleri salgı yapan hücrelerden oluşan teka interna ve fibröz bir kapsül olan teka eksterna adlı iki belirgin tabaka şeklinde farklılırlar. (Sadler, 2005).

2.1.2. Ovaryum anatomisi

Ovaryum badem şeklinde bir çift üreme organıdır. Dişi üreme hücresini (ovum) yapar. Steroid yapısında dişi üreme sistemini düzenleyen hormonları oluşturur ve salgılar. Ovaryum, pelvis minörün dış duvarında ve fossa ovarii denilen çukurun içinde yerleşmiştir. Fossa ovarii, önde oblitere olmuş arteria umbilicalis, arkada üreter ve a. iliaka interna ile sınırlanmıştır. Ovaryum; grimsi pembe renkte, 3cm uzunluğunda, 1.5cm genişliğinde ve 1cm kalınlığında, 4-6 gr ağırlığındadır (Disaia PJ, 1994), (Ferner H ve Staubcsant J, 1982).



Şekil 2. Ovaryumların anatomisi. <http://www.goktepeliler.com/forums/insan>.

Ovaryumun dış yüzü ovulasyon başlamadan önce düzdür. Ovulasyon ile graff folikülünün oluşması yüzeyde çıkıntılara neden olur. Ovulasyondan sonra ise oluşan korpus luteumun dejenerasyonunu gösteren skar dokusu ile büzülmeler görülebilir. Ovaryumun konumu doğum yapan kadınlarda değişiklik gösterir. İlk doğumla birlikte yeri değişen ovaryum bir daha normal yerine dönemez. (Ferner ve Staubcsant, 1978).

Mesoovaryum'dan bazı düz kas lifleri hilum ovarii'yi geçerek ovaryum medullasına girebilir. Ovaryumların hareketlerinde bu düz kas liflerinin etkisi olabilir (Moore, 1985).

Üreme ovaryumlardaki ovumun gelişmesiyle başlar. Her seksüel siklusun ortasında tek bir yumurta, bir ovaryum folikülünden abdominal boşluğa atılır. Bu yumurta daha sonra fallop tüplerinden uterusu geçer. Eğer bir sperm tarafından döllenirse, uterusu implante olarak, bir fetus ve bir plasentayla fetal membranlar gelişir. Fetal yaşamda ovaryumun dış yüzeyi, embriyolojik olarak germinal plak epitelinden kaynaklanan germinal epitelle örtülüdür. Fetus gelişirken, germinal epitelde primordiyal ovumlar farklılaşarak ovaryum korteksindeki maddeye doğru göçerler. Ovum etrafında, ovaryum stromasının iç hücrelerinden ibaret bir tabaka oluşturarak onlara epiteloid

karakter kazandırır. Bu hücreler granüloza hücreleridir. Granüloza hücrelerinin oluşturduğu tek katlı bir tabaka ile çevrili ovuma primordiyal folikül denir (Guyton, 1986).

2.1.3. Ovaryum histolojisi

Ovaryumların yüzeyleri basit ya da kübik epitelle kaplıdır; bu epitel germinal epitel olarak adlandırılır. Germinal epitelin altında, ovaryumun beyazımsı rengini veren ve tunika albuginea olarak adlandırılan tıkHz bir bağ dokusu katmanı bulunur. Tunika albuginea'nın altında oositleri içeren ovaryum foliküllerinin bol miktarda bulunduğu (kortikal bölge) yer alır. Foliküller, kortikal bölgenin bağ dokusu (stroma) içinde gömülüdür. Bu stroma tipik iğ biçiminde fibroblast içerir ve bu fibroblastlar, hormonal uyarılara diğler organların fibroblastlarından farklı yanıt verir. Ovaryumun en iç kısmı gevşek bağ dokusu içinde zengin bir damar yatağı içeren medüller bölgedir. Korteks ile medulla bölgeleri arasında kesin bir sınır yoktur (Junqueira ve Carneiro, 2006). Ovaryumlar germinal hücreler, çeşitli evrelerdeki foliküller, teka hücreleri, granüloza hücreleri ve çeşitli evrelerdeki korpus luteum hücreleri içeren korteks bölümü ile bağ dokusu kan damarları ve sinirler içeren medulla bölümünden oluşur (Ackermann, 2006).

Ovaryumların birbiri ile ilişkili iki işlevi vardır. Dişi cinsiyet hücrelerini üretirler (oogenesis) ve steroid hormonlarını salgırlarlar (steroidogenesis). Histolojik kesitlerde ovaryumlar, içte medulla ve dışta korteks olmak üzere 2 bölgeye ayrılır. Medulla daha açık renk ile boyanan dar bir bölgedir. Zengin kan ve lenf damarları, sinirleri, az miktarda elastik lifler ve düz kas hücrelerini içeren gevşek bağ dokusu yapısındadır. Korteks, ovaryum foliküllerini içeren, medullayı dıştan saran ince kollagen liflerden ve iğ biçimli fibroblast benzeri hücrelerden zengin sıkı bağ dokusudur. Follikül etrafında düz kas hücreleri de bulunur. Medulla ile korteks arasında belirgin bir sınır yoktur. Hilusta korteks kesintiye uğrar ve mesoover medullaya doğru devam eder. Küçük düzensiz kanal kalıntıları olan reteoveriler bu bölgede bulunabilirler. Diğler büyük epiteloid hücre türü hilus hücreleridir. Ovaryum hilusunda ve mezooverde küçük gruplar halinde bulunurlar. Kolesterol esterlerinden zengin çok sayıda lipid damlaları ve lipofuksin pigmenti içerirler (So Disaia, 1994 ve Cormack, 1987), (Ackermann, 2006).

Eskiden germinal epitelin ilkel cinsiyet hücrelerinin kaynağı olduğu sanılıyordu. Bugün artık ilkel cinsiyet hücrelerinin gonad dışı bölgeden vitellus kesesinden köken alıp, gonadlara göç ettikleri belirlenmiştir. Sıkı bağ dokusu yapısındaki ince tunika albuginea, germinal epitel altında yer alır (Ross ve ark., 1989 ve Cormack, 1987).

Ovaryum folikülleri: Korteks ovarii'nin parankimatöz tabakası içerisinde gelişim ve dejenerasyonun çeşitli aşamalarındaki foliküller bulunmaktadır. Bu foliküller primordiyal foliküller, primer, sekonder ve tersiyer (graaf folikülü) folikül olmak üzere dört aşamada bulunurlar. Bir ovaryum folikülü, bir ya da daha fazla folikül hücresi ya da granüloza hücresi katmanıyla çevrili bir oosit içerir. Fetal yaşam sırasında oluşan foliküller (primordiyal foliküller) ise tek sıralı yassı folikül hücreleri ile çevrili bir primer oosit içerir. Bu foliküller kortikal bölgenin en üst katmanında yer alır. Primordiyal folikülün içindeki oosit yaklaşık 25 µm çapında, küre biçimindedir. Büyük bir nükleusu ve nükleolusu vardır. Oositler kalın amorf bir örtü olan zona pellusida ile çevrilidir ve bu katman en az üç farklı glikoprotein içerir (Junqueira ve Carneiro, 2006).

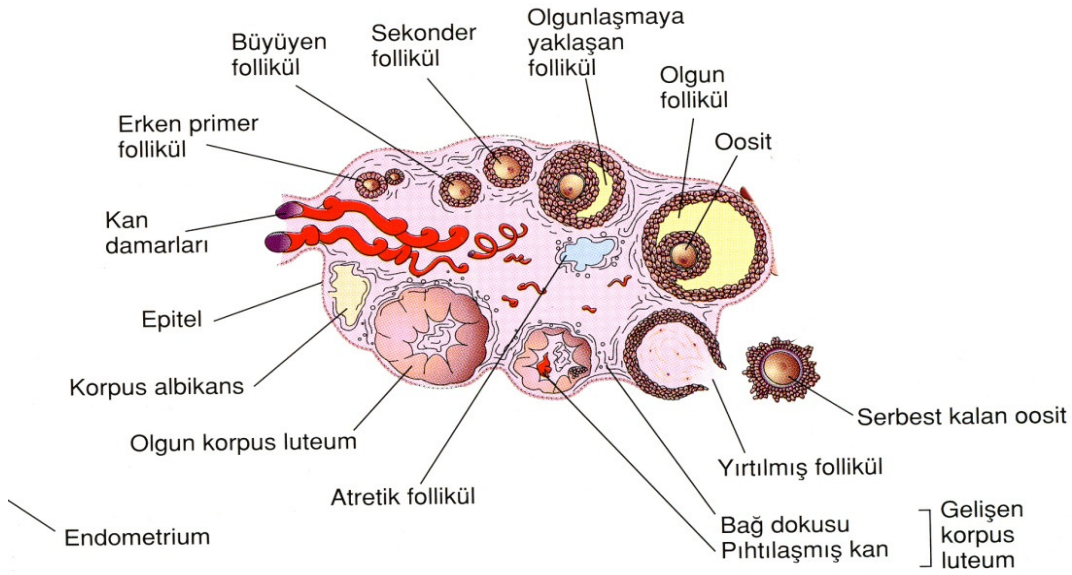
Foliküller granüloza hücrelerinin boyut ve sayıca artmasıyla büyüdükçe kortikal bölgenin daha alt bölgelerine göç eder. Folikül hücreleri arasında sıvı (likör folikülü) toplanmaya başlar. Sıvıyı içeren ufak boşluklar birleşerek daha büyük bir boşluk olan antrumu oluşturur. Bu foliküller sekonder folikül olarak adlandırılır. (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Granüloza hücrelerinin antrumu oluşturmak üzere yeniden düzenlenmesi sırasında, bu katmanda yer alan bazı hücreler, folikül duvarında bir yerde yoğunlaşır ve küçük bir tepecik oluştururlar. Antrumun iç kısmına kadar uzantı yapan ve oositi de içeren bu yapıya kümülüs ooforus ismi verilir (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Her aybaşı döneminde bir folikül daha fazla büyür ve baskın hale gelir. Baskın olan bu folikül yaklaşık 2.5 cm boyutuna ulaşır ve ovulasyonu gerçekleştirir. Bu olgun foliküle graaf folikül adı verilir (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Doğumda bir ovaryumda 100.000-400.000 adet primordiyal folikül bulunur.

Erginliğe kadar bunların büyük bir bölümü dejenere olduğundan bu dönemde ancak 10.000-20.000 adet primer folikül mevcuttur. Kadının ovulasyon periyodunda bunlardan ancak 400 tanesi ovum oluşturacak düzeye ulaşır (www.belgeler.com insan üreme sistemi).



Şekil 3. Ovaryum korteksi çeşitli büyüme evrelerindeki ve atrezik foliküllerin bulunduğu bir yerdir. Ayrıca korpus luteum içerir. Korpus luteum oositin atılmasından sonra graff folikülünden gelişir. Korpus albicans korpus luteumun dejenerasyonundan sonra oluşan skar dokusudur (Moore ve Persaud, 2002).

Korpus luteum: Oositini atan folikülün son evresidir. LH reseptörleri içerir. Uyarılması korpus luteumun ana steroidi olan progesteronun sentezini artırır. Gebelik gerçekleştiğinde korpus luteum devam eder ve ovulasyonu baskılamak ve endometriumun implantasyona hazırlamak üzere östrojen ve progesteronun yüksek düzeyde kalmasını sağlar. Gebelik olmadığında korpus luteum geriler ve menstrual döngünün son 4 gününde dejenere olur. Skar dokusu olan korpus albicans halini alır (Ackermann, 2006). Ovulasyondan sonra granüloza hücreleri bölünmemesine rağmen boyutlarında büyük bir artış gözlenir. Bu hücreler korpus luteumun %80 ini oluştururlar. Bu hücreler steroid salgılayan hücrelerin özelliklerine sahiptir. Teka internanın hücreleri de teka lutein hücrelerini oluşturarak korpus luteumun oluşumuna katkıda bulunurlar (Junqueira ve Carneiro, 2006).

2.1.4. Ovaryumların fizyolojisi

Ovaryum germinal hücreler, çeşitli evrelerdeki foliküller, teka hücreleri, granüloza hücreleri ve çeşitli evrelerdeki korpus luteumları içeren korteks ve bağ dokusu kan damarları ve sinirler içeren medulla bölümünden oluşur (Ackermann, 2006).

Ovaryumların Endokrin Fonksiyonları: Ovaryumların endokrin fonksiyonları foliküldeki teka ve granüloza hücreleri tarafından yerine getirilir. Bunlar LH ve FSH tarafından kontrol edilirler. Başlıca ovaryum hormonları; progesteron ve östrojenlerden östradiol ve östrondur. Hepsi de kolesterolden teka ve granüloza hücrelerinin iş birliği ile oluşur. Teka hücreleri asetattan kolesterol sentezleme yeteneğine sahip olmakla birlikte, kolesterolün ana kaynağı LDL'dir. Steroid yapımı menstural döngünün farklı evrelerinde büyük farklılıklar gösterir (Ackermann, 2006).

Progesteron sentezi ve sekresyonu: Progesteronun ana kaynakları korpus luteum ve plasentadır. Foliküllerin katkısı kısmen daha azdır ancak foliküler fazda kadında progesteronun düzeyinin erkektekine kıyasla üç kat daha fazla olduğu bilinmektedir. Kanda % 80 bağlı bulunurken, % 20'si serbest olarak bulunur (Ackermann, 2006).

Östrojenlerin sentezi ve sekresyonu: Östrojenler esas olarak foliküllerin granüloza hücrelerinden, korpus luteum ve plasentadan salgılanır. Teka hücreleri FSH reseptör içermedikleri ve yeterli miktarda aromataz aktivitesine sahip olmadıklarından östrojen açısından katkıları oldukça düşüktür. Dolaşımdaki östrojenlerin sadece % 2'si serbesttir. Büyük kısmı albümine (% 60) ve gonadal steroid bağlayan globuline (% 38) bağlıdır (Ackermann, 2006).

Korpus luteum: Korpus luteum'dan çok fazla miktarda östrojen ve progesteron sentezlenir. Normal bir kadında korpus luteum ovulasyondan 7-8 gün sonra gelişerek çapı 1.5 cm'ye kadar ulaşır. Eğer dışarı atılan ovum döllenmemişse korpus luteum giderek küçülür ve sekresyonları azalır. Ovulasyondan yaklaşık 12 gün sonra korpus albicans'a dönüşür ve bir süre sonra yerini bağ dokusuna bırakır. Yeni bir cinsel siklusu başlatan esas olay korpus luteum'un fonksiyon kaybıdır. Korpus luteum'dan salgılanan

progesteron ve östrojen ön hipofiz üzerine feedback etki yaparak FSH ve LH ‘ın düşük dozda salgılanmasını sağlar. Luteal hücreleri inhibin hormonunu da salgırlar (Ackermann, 2006).

2.2. Diklofenak Sodyum

2.2.1. Diklofenak sodyumun formülü

Beher üç ml’lik steril ampul; 75 mg Diklofenak sodyum; 30 mg Mannitol; üç mg Asetilsistein; 105 mg Benzil alkol; 600 mg Propilen glikol; 0.7 mg Sodyum hidroksit ve kafi miktarda enjeksiyonluk su içerir (Novartis ilaç sektörü İstanbul Türkiye; www.novartis.com.tr – Novartis).

2.2.2. Diklofenak sodyumun farmakolojisi

Aneljezik Antiinflamatuvar ve Antipiretik etkili bir Fenilasetik asit türevidir. Romatoit artrite karşı aspirin ve indometazin kadar ve osteoartrite karşıda indometazin derecesinde etkili olmuştur. Bu gruptaki diğer ilaçlar gibi, mide ve duodenum mukozasını bozucu etkisi diğer NSAİİ’lerin çoğuna göre daha zayıftır. Plazma proteinlerine fazla bağlanır. diklofenak sodyumun aspirin ile birlikte verilirse plazma düzeyinde belirgin şekilde azalma olur. Böbreklerden ve kısmen karaciğerden itrah edilir. Bir prostaglandin sentetaz inhibitörü olan diklofenak sodyum; antiinflamatuvar, analjezik ve antipiretik etkiye sahiptir. Özellikle romatizmal olgularda, ateş, sabahları görülen katılık ve eklem enflamasyonlarında yarar sağlarken fonksiyonları da düzeltir. İntramüsküler yoldan 75 mg olarak uygulanır. Plazma konsantrasyonu, verilen dozla doğru orantılıdır. Önerilen doz ve sürelerde kullanıldığında plazmada birikim yapmaz. Diklofenak sodyum’un % 99’undan fazlası, geri dönüşümlü olarak plazma albuminine bağlanır. Maksimum plazma düzeyine 1,5-2 saatte erişir. En yüksek plazma düzeyine ulaşıldıktan 2-4 saat sonra sinoviyal sıvıda da doruk düzeylere erişilir ve konsantrasyonda, plazmadakinden daha yüksek olarak kalır. Çoğunluğu hidroksilasyonla oluşan metabolitleri ve % 1’den az miktarı değişmeyen molekül biçiminde idrarla atılır. Geri kalan kısmının atılması ise feçesledir. Böbrek ve karaciğer fonksiyon bozukluklarında, ilacın farmakokinetiği değişmemektedir. Aynı şekilde, değişik yaşlardaki hastalarda; absorpsiyon, metabolizma ve eliminasyonda farklılık

gözlenmemiştir. Karaciğerde hidrokisillenme ve konjugasyon suretiyle inaktif edilir (Kayaalp, 2009). Epidemiyolojik çalışmalarda NSAİİ kullananlarda meme kanseri görülme insidansında azalma olduğu gösterilmiştir. NSAİ ilaçlar siklooksijenaz enzim sistemi üzerinden, COX-1 ve COX-2 enzimleri aracılığı ile etkisini gösterir. COX-2 birçok kanser dokusunda gösterilmiştir. Yapılan çalışmada COX-2 ile diğer parametreler arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (Dişel, 2005). Düzenli olarak aspirin ya da NSAİİ kullanan insanlarda kolorektal kanser gibi bazı kanser tiplerinin sıklığında azalma gösterilmiştir (Morgan, 1996). Bu etkinin COX'ın aracılık ettiği prostaglandin biyosentezinin baskılanması yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir (Chen ve ark., 2004). NSAİİ'lar, ailesel adenomatoz polipozis'li hastalarda premalign kolorektal poliplerde gerilemeye ve bazı kemirgen deneylerinde karsinogenezde inhibisyona neden olurlar (Hashimoto ve ark., 2004).

2.2.3. Diklofenak sodyumun gebelikte kullanımı

Hamilelikte ilaç kullanımı konusunda bilgilerimiz ilaçların etkilerine yönelik prospektif klinik çalışma yapmak etik olmadığından sınırlıdır. Amerika Birleşik Devletleri gıda ve ilaç dairesi (FDA) varolan klinik deneyimlere göre ilaçları 5 kategoride sınıflamıştır. A kategorisi: İlk trimestirde fetüs üzerinde zararını göstermemiştir. B kategorisi: Teratojenik etki göstermemiştir ama hamilede klinik deney yetersiz veya deney hayvanında yapılan çalışmalar fötotoksik etki yok ancak hamilelerde yapılan kontrollü çalışmada klinik fötotoksik etkisini göstermiştir. Gerekli ise gebede kullanılabilir. C Kategori: Embriyosit ve teratojenik etkileri gösterilmiştir, ya da deney hayvanı veya hamilelerde ilaç incelenmemiştir. D Kategori: İnsanda fetüs üzerinde zararlı etkisi kanıtlanmıştır. X Kategori: Bu kategorideki ilaçların deney hayvanı ve hamilede fetusa zararlı etkisi gösterilmiştir (Süzer, 2005). FDA Diklofenak Sodyumu kategori C olarak kabul etmektedir. (Ommaty, 2009).

2.3. Stereoloji Nedir?

2.3.1. Stereolojik metotlar

Stereolojik uygulamalar, biyolojik yapıların geometrik özelliklerini (hacim, yüzey alanı, sayı v.b.) hesaplama yolu ile belirlememizi sağlar. Bu sayede ince yapıdan

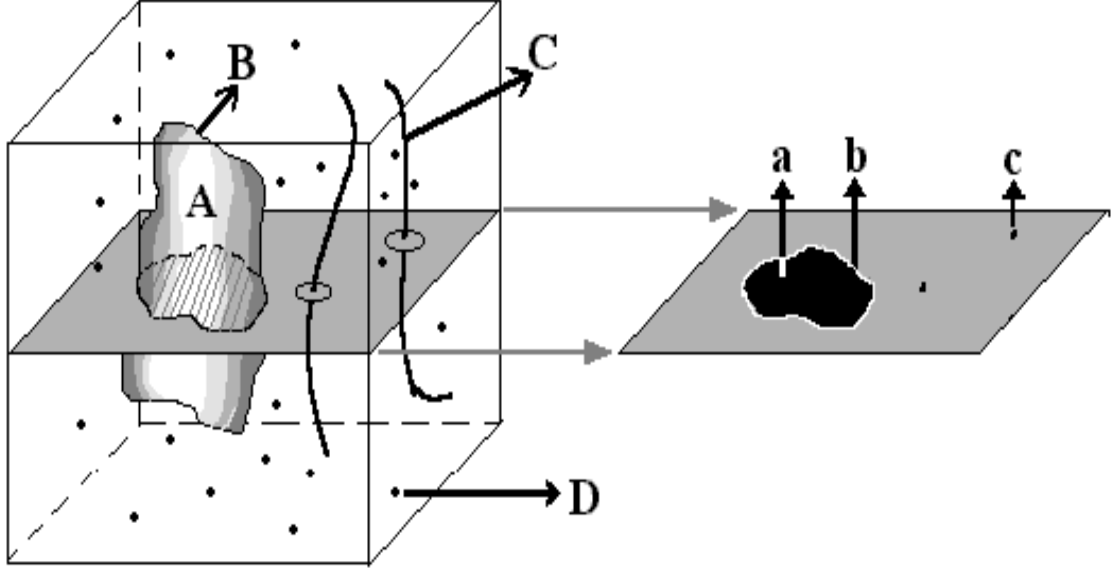
sistemik düzeye kadar yer alan oldukça farklı büyüklükteki elemanlarda yapısal değişiklikleri belirleyebiliriz. Stereolojik uygulamalar ile sağlanan bu bilgi, biyolojik yapıların kesitlerdeki (mikroskopi; radyolojide kullanılanlar gibi) görüntülerinden elde edilir (Ünal ve ark., 2002).

Stereolojik metotlar, organizmanın makroskobik ve mikroskobik yapılarının morfolojisi ile ilgilenen tüm bilim dallarındaki araştırmacıların bilmesi gereken konulardan biridir. Bunun sebebi ise, canlıdaki olayların üç boyutlu olan yapılarda gerçekleşmesine rağmen, bu yapılardan alınan iki boyutlu kesitlerin, ilgili yapı-organ hakkında genellikle doğru bilgi sağlayamamasıdır. Organ ve yapılarda bulunan objelerin sayısı, uzunluğu, yüzey alanı, hacmi ve hacim bileşenleri gibi geometrik özellikler ile ilgili gerçekçi bilgiler ancak stereolojik yöntemler kullanılarak elde edilebilir (Ünal ve ark., 2002).

Yapılan mikroskobik çalışmaların başlangıcından günümüze kadar, ilgili biyolojik yapı içerisindeki taneciklerin sayısını bulmak için birçok yöntem kullanılmıştır. Metotların çok sayıda olmasının sebebi her metodun kendi içerisinde bazı hata kaynaklarına sahip olmasıdır. Bu metotların hatalarını düzeltmek içinde yeni metotlar icat edilmiştir. Güvenirliği açısından en çok ilgi çeken ve sıklıkla kullanılan yöntem stereolojik metotlardır (Ünal ve ark., 2002).

Stereolojik metotların çok geniş olması sebebiyle çalışmamızda, yalnızca cavalier metodunu kullanmış bulunuyoruz. Doku içindeki hücre veya hücre içi elemanlarının sayısı bulunmak istendiğinde, yapı kesitler haline getirilerek mikroskop altında incelenir. Mikroskop altında incelenen yapıların tümü, gerçekte üç boyutlu yani uzunluk, genişlik ve yüksekliğe sahip öğelerdir. Oysa bunların mikroskobik incelemelerinde kullanılan kesit görüntüleri, yapıların iki boyutu (x ve y eksenleri) hakkında fikir verirken, derinlik (z eksen) ile ilgili olarak araştırmacıya doğrudan bilgi sağlamazlar. Mikroskobik çalışmaların başlangıcından yeni stereolojik metotların ortaya çıkışına kadar olan süre boyunca kullanılan yöntemlerde derinlik boyutu görmezden gelinmiş veya bir takım yetersiz düzeltme faktörleriyle, bu verinin yokluğu doldurulmaya çalışılmıştır. Kesit alma işlemini ve sonuçta elde edilen kesit kavramını yakından irdelemek, boyut azalması olayının önemini ortaya koyar. Herhangi bir

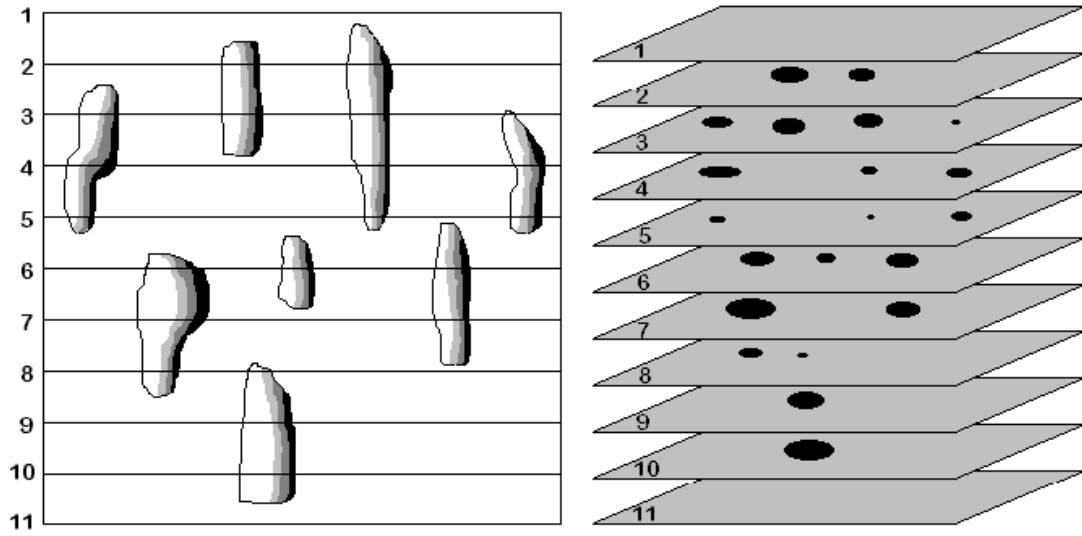
yapının iki boyutlu bir kesit düzlemi ile ortaya çıkan izdüşümü, esas yapının sahip olduğu boyut sayısından bir eksik boyuta sahip olacaktır (Ünal ve ark., 2002).



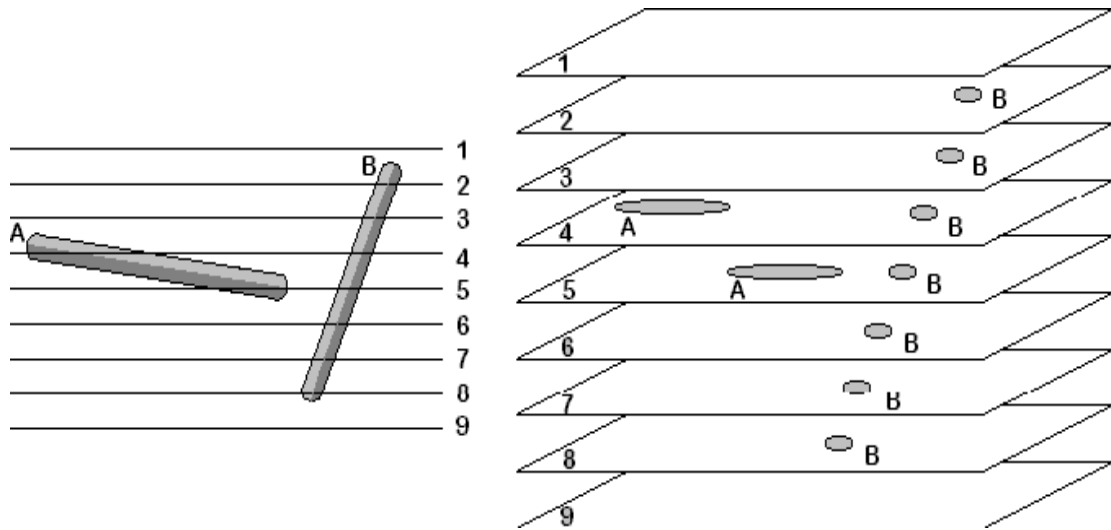
Şekil 4. Kesitlerde boyut azalması (Ünal ve ark., 2002).

Şekildeki üç boyutlu bir hacim içerisinde alınan iki boyutlu bir kesitte; üç boyutlu katı bir eleman olan (A) taneciği, iki boyutlu bir düzlemde kesildiğinde, ortaya iki boyutlu bir izdüşüm çıkmaktadır (a). Benzer şekilde, iki boyutlu bir yüzey (B), iki boyutlu bir kesit düzleminde tek boyutlu bir çizgi olarak (b). Tek boyutlu bir çizgi (C), sıfır boyutlu bir nokta olarak (c) görülürken, sıfır boyutlu bir nokta (D) ise iki boyutlu kesitte görülmeyecektir (Şekil 13).

Eski metotlarda kullanılan temel mantık, taraflı bir ön çalışma yapılarak, izdüşüm sayısının parçacık sayısına eşit olduğu kabul edilmektedir. Oysa kesitlerde ortaya çıkan parçacık sayısı, sadece parçacık izdüşüm sayısına değil, aynı zamanda kesit yönü, parçacık büyüklüğü ve parçacık yönelimi gibi parametrelere de bağlıdır (Ünal ve ark., 2002).



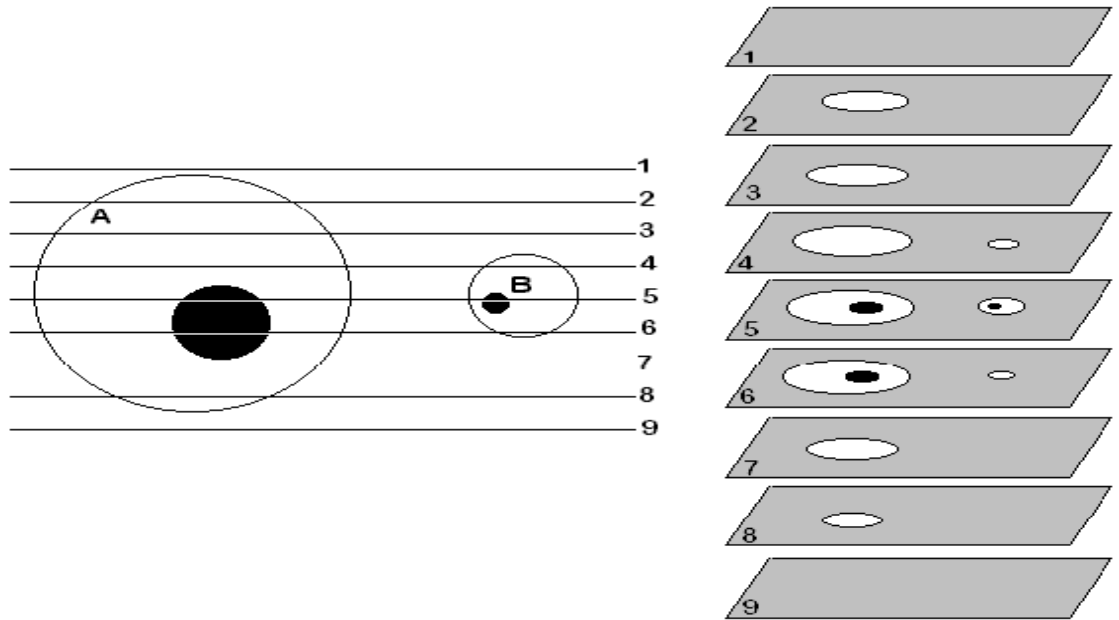
Şekil 5. Kesit yöneliminin iz düşüm sayısına etkisi (Ünal ve ark., 2002).



Şekil 6. Tanecik yöneliminin kesitlerdeki iz düşüm sayısına etkisi. Doku içerisinde bulunan farklı yönelimdeki tanecikler (solda) ve iki boyutlu düzlemlerdeki (sağda) iz düşümleri. Kesit düzlemine dik duran (B) taneciği A taneciğine göre daha çok sayıdaki kesitte iz düşüm vermiştir (Ünal ve ark., 2002).

Kesit düzlemine dik duran partiküller yatık olan partiküllere göre daha çok kesitte iz düşüm vermektedir. Doku içinde yatık duran A partikülü ve dik duran B partikülünün aynı yönde alınan kesitlerdeki iz düşümlerinde A partikülün 2, B partikülünden ise 7 kesit düzleminde olduğu görülür (Şekil 6). Doku içindeki partikül yerleşim ve yönelim farklılıkları, alınan kesit düzlemlerinde gözlenen iz düşümlerin sayısına etki etmektedir. Bir büyük ve bir küçük hücre ile bunların çekirdeklerinin

kesitlerde ortaya çıkan izdüşümleri ele alındığında büyük hücre 5, çekirdeği 2, küçük hücre 3, çekirdeği ise 1 kesitte ortaya çıkmıştır (Şekil 6). Partikül büyüklüğü göz önüne alınmadığı takdirde, doğrudan izdüşüm sayısından partikül sayısına ulaşmanın olmadığı görülmektedir. Son yıllarda, ‘sistemik rastgele örnekleme’ (SRÖ) modeli olarak tarif edilen tarafsız ve etkin bir örnekleme modeli geliştirilmiştir. Çünkü yapılan çalışmalarda hataları düzeltme (çeşitli düzeltme formülleri ile) faktörleri yeterli bulunmamıştır. Dolayısıyla bu model temelde bileşenlerine ayrılarak incelenmesi gereken yapılarda bir örnekleme yapılacağı zaman, tüm bileşenlerine yapıyı temsil edebilme açısından eşit olasılıklı şans verilmesi temeline dayanmaktadır (Ünal ve ark., 2002).



Şekil 7. Doku içerisinde bulunan farklı büyüklükteki tanecikler ve iki boyutlu düzlemlerdeki izdüşümleri. Büyük ebatlı tanecik (A), küçük ebatlı (B) taneciğe göre daha çok sayıda izdüşüm verir (Ünal ve ark., 2002).

Çalışmalarda doğru sonuca ulaşmanın ilk şartı, işlemlerin her aşamasında sistemik rastgele örnekleme koşuluna bağlı kalmaktır. Burada ‘sistemik’ kelimesi ile ilgilenilen bölgede yapılan bir ön çalışma sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda örnekleminin tekrar edilen periyodu, ‘rastgele’ kelimesiyle ise belirlenen periyodun ilk elemanın tarafsız bir biçimde seçilmesi anlatılmaktadır. İstatiksel olarak, etkin bir örnekleme, ne kadar çok örnek üzerinde uygulanırsa yapının her noktasına eşit

örnekleme şansı tanıdığı için homojen ve verimli bir örnekleme elde etme şansıda o kadar artar (Ünal ve ark., 2002).

Stereolojik metotlarda kullanılan yöntem ve prensiplerin büyük bir kısmı, SRÖ mantığının çeşitlemeleri olarak düşünülebilir. Partikül sayımı, alan hesaplamaları, alan ve hacim oranları gibi hesaplamalarda ilk şart çalışılan yapının her aşamada (parçaların seçimi, kesitlerin örneklenmesi, sayım alanlarının ve alan örneklerinin belirlenmesi vb.) sistematik ve rastgele tarzda örneklenmesidir (Ünal ve ark., 2002).

2.3.2. Disektör

Disektör ilk kez 1984 yılında Sterio tarafından tarif edilmiştir. Bu yöntemle; ilgilenilen objenin büyüklüğü, biçimi, doku ya da organ içerisindeki partikül sayısı, kesitlerin alınma yönü, sayılacak olan partikül büyüklüğü, doku içindeki yönelimi ve dokunun histolojik işlemler sırasında büzüşme ve genişlemesi gibi hesaplama hatalarına sebep olabilen tüm hata kaynaklarından bağımsız olarak ‘tarafsız’ bir biçimde hesaplanabilmektedir (Ünal ve ark., 2002).

2.3.3. Cavalieri metodu

Cavalieri metodu; ilk kez İtalyan matematikçi Bonaventura Cavalieri tarafından XVII. yüzyılda ortaya konmuştur ve stereolojik yöntemlerde en sık kullanılan hacim hesaplama yoludur (Canan ve ark., 2002).

Cavalieri metodunu uygulamak için, hacmi hesaplanmak istenen yapı eşit aralıklı birbirine paralel kesitlerle başından sonuna kadar dilimlere ayrılır. Daha sonra her bir dilimin aynı yöne bakan yüzeylerinin alanları uygun bir yöntemle hesaplanır. Tüm dilimlerden elde edilen toplam yüzey alanı değeri, dilimlerken kullandığımız ortalama dilim kalınlığı ile çarpılırsa, yapının toplam hacminin tarafsız bir hesaplaması elde edilir. Bunu matematiksel olarak şu şekilde formülleştirebiliriz:

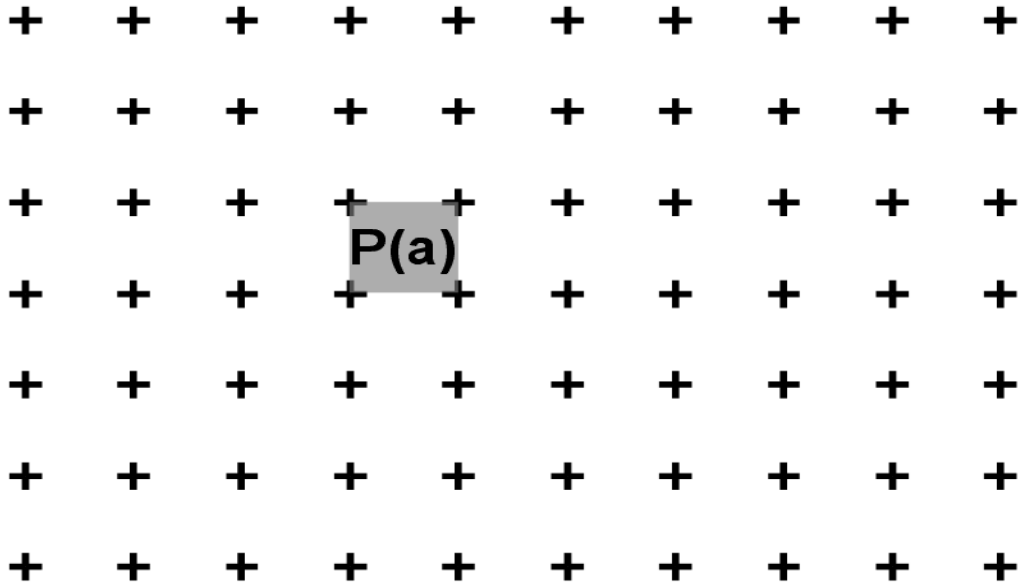
$$V_{ref} = \sum a_i \cdot t \quad (\text{Eşitlik1})$$

Formülde V_{ref} ilgilendiğimiz yapının toplam veya diğer bir ifade ile referans

hacmini; a_i , i numaralı kesitteki yapı izdüşümünün (veya izdüşümlerinin toplam) yüzey alanını; t ise ortalama kesit veya dilim kalınlığını belirtir. Bu yöntemle, gerek mikroskopik, gerekse makroskopik ölçekte, etrafındaki yapılarla ilişkilerine bakılmaksızın, sınırları yeterli kesinlikte belirlenebilen her türlü yapının hacmi hesaplanabilir (Canan ve ark., 2002).

2.3.3.a. Hacim hesaplaması için kesit yüzey alanlarının hesaplanması

Cavalieri hacim hesaplama yöntemi için ilk aşama, ilgilendiğimiz bölgenin izdüşümlerinin (kesitlerdeki görüntülerinin) alanlarını hesaplamaktır. Bu yöntem ise, bilgisayar destekli görüntü analiz cihazları aracılığıyla, planimetrik olarak izdüşüm alanlarını doğrudan ölçmektir. Bu yolla uygun biçimde ayarlaması (kalibrasyonu) yapılmış, mikroskop görüntülerini işlemek üzere tasarlanmış bir bilgisayar yazılımı ile sınırlandırılan herhangi bir bölgenin yüzey alanı ölçülebilir. Bu yöntem oldukça hızlı ve güvenilir olmasına rağmen, birçok durumda, özellikle bu cihazların yüksek maliyetlerine bağlı olarak, böyle bir sistem bulunamayabilir (Canan ve ark., 2002). Stereolojide en sık kullanılan izdüşüm alanı hesaplama yolu, ‘noktalı alan ölçüm cetvelleri’nden faydalanmaktır.



Şekil 8. Noktalı alan ölçüm cetveli.

Noktalı alan ölçüm cetvelleri (Şekil 8) birbirinden eşit aralıklarla ayrılmış noktalardan (şekilde artıların kollarının birleşim yeri) oluşan sistematik nokta dizgeleridir. Böyle bir dizgide, her bir artı işaretinin orta noktası, cetveldeki bir noktayı temsil ederken, bu noktalardan her biri ise, dört adet noktanın arasında kalan bir birim cetvel alanını temsil eder ($P(a)$). Aralarındaki sabit mesafesi bilinen böyle bir noktalı alan ölçüm cetveli, alanı hesaplanmak istenen herhangi bir kesit görüntüsü üzerine rastgele biçimde atılırsa, yapının kesitteki izdüşümü üzerine isabet edecek noktaların sayısı, bu izdüşümün kesitte temsil ettiği alan miktarıyla doğru orantılı olacaktır (Canan ve ark., 2002).

Kısaca, izdüşüm ne kadar büyükse içine o kadar fazla sayıda nokta isabet edecektir. Bu noktalardan her biri belli bir birim alanı ($P(a)$) temsil ettiğinden, ilgilendiğimiz izdüşümün sınırları içine düşen toplam nokta sayısının (ΣP_i) bu birim alan değeriyle çarpımı, bize o kesitteki izdüşümün toplam alanının (A_i) tarafsız bir hesaplamasını verecektir (Canan ve ark., 2002).

$$A_i = \Sigma P_i \cdot P(a) \quad (\text{Eşitlik 2})$$

Böyle bir formül ile hesaplanan bir alan ölçümü, hem uygulamada oldukça basit, hem de istatistiksel olarak daha doğru sonuçlar verecektir. Noktalı alan ölçüm cetvelleri ile yapılan alan hesaplamalarının, uygun sıklıkta noktalar içeren cetveller kullanıldığında, diğer görüntülü analiz sistemleriyle yapılan hesaplamalar kadar doğru sonuçlar vermektedir (Gundersen ve Jensen, 1987). Genellikle, şeffaf bir asetata çizilmiş noktalar dizgesi yeterli olmakta ve büyütme derecesi doğru bir biçimde saptandıktan sonra, mikroskopta gözlenen, monitöre veya bir başka görüntü ortamına yansıtılan veya fotoğraflanmış her türlü görüntü üzerinde rahatça uygulanabilmektedir. Tek bilinmesi gereken, cetveldeki noktalar arasındaki uzaklığın, büyütme derecesine göre doku düzeyindeki gerçek uzunluğudur. Büyütme derecesini bulmanın en güvenilir yolu, bir mikrometrik disk kullanmaktır (Canan ve ark., 2002).

Bir diğer önemli hususta, kullandığımız noktalı alan cetvelinin nokta sıklığıdır. Genellikle, sınırları karmaşık bir yapılanma gösteren iç içe izdüşümler için daha sık yerleşimli noktalar kullanmak gerekirken, düzgün sınırlara sahip yumuşak hatlı yapılar

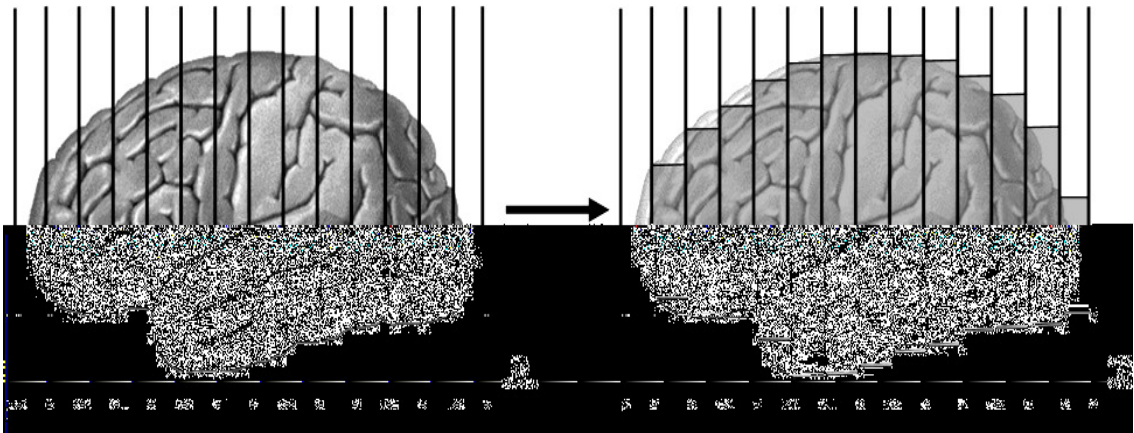
için daha seyrek noktalar yeterli olmaktadır. Nokta sıklığını artırmak, hesaplamaların daha doğru olmasını sağlasa da, belli bir hata payı dâhilinde, mümkün olan en seyrek nokta dizgesini kullanarak bu ölçümleri gerçekleştirmek daha doğru olacaktır.

Gundersen ve Jensen (1987) tarafından önerilen tarzda bir nomogram, çalışacağımız yapıya uygun noktalı alan ölçüm cetveli seçiminde yardımcı olabilir.

2.3.3.b. Toplam hacmin hesaplanması

Toplam hacmi elde etmek için, ilk önce kesitlerde ilgilendiğimiz bölgenin izdüşümlerinin toplam alanını hesaplamak sonrada bu toplam alan değerini, dilimleri veya kesitleri elde ederken kullandığımız ortalama kesit kalınlığı değeriyle çarpmamız yeterli olacaktır. Bu şekilde yapının toplam hacminin tarafsız bir hesaplamasını elde etmekteyiz. Kesitlerin alınması sırasında, toplam kesit sayısının çok fazla olmasından dolayı belli bir örnekleme yapılyorsa, hacim hesaplamasında bu husus dikkate alınarak hesaplanmalıdır (Canan ve ark., 2002).

Alan hesaplaması yapılan kesit yüzeylerinde ise dilimlerimiz ister makroskobik ister mikroskobik olsun, belli ve sonlu bir kalınlığa sahiptir ve iki kesme düzlemi ile oluşturulduklarında ‘alt’ ve ‘üst’ olarak iki yüzden oluşurlar. Cavalieri metodu ile hacim hesaplaması için, yüzey alanı ölçümleri, bir yapıdan alınmış tüm kesitlerin hep aynı yöne bakan yüzeylerinde gerçekleştirilmelidir (Şekil 9) (Canan ve ark.,2002).



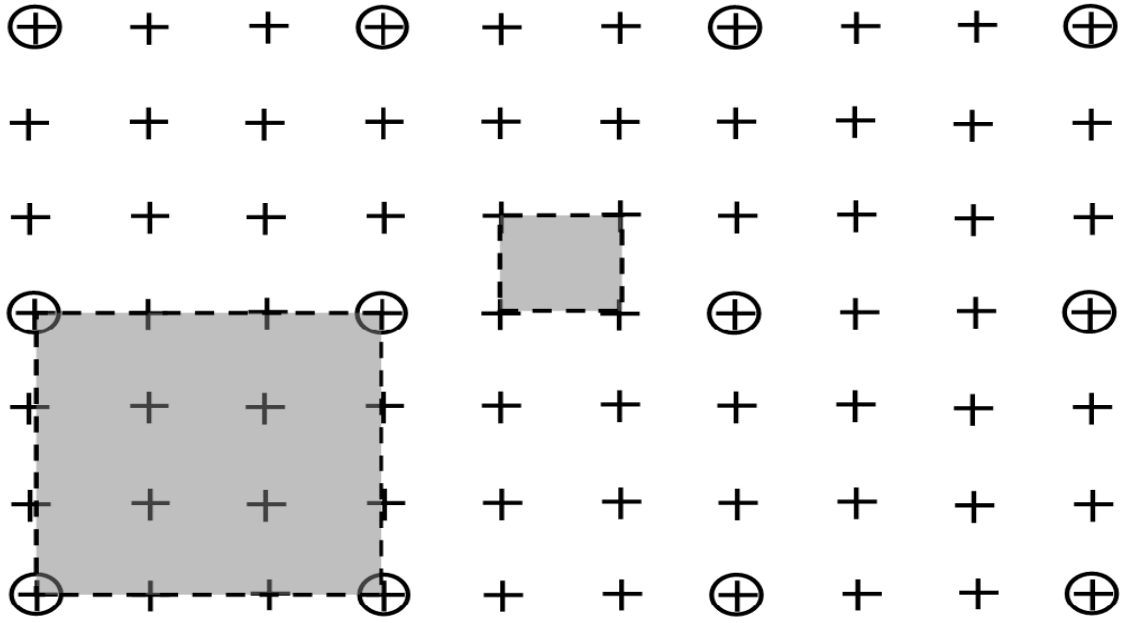
Şekil 9. Cavalieri yöntemi ile hacim hesaplaması yapılırken, kesitlerin hep aynı yöne bakan yüzeylerinin ölçüm için kullanılmasının önemi.

2.3.3.c. Bileşen hacmi ve hacim oranlarının hesaplanması

Herhangi bir yapı içerisindeki bir bileşenin kesit görüntüleri üzerindeki izdüşümlerine isabet edecek rastgele noktaların sayısı, o yapının hacmiyle ve dolayısıyla kesitlerde ortaya çıkan izdüşümlerinin alanlarıyla doğru orantılıdır. Bilinen sıklıkta noktalar içeren bir alan ölçüm cetvelinin, kesit görüntüleri üzerine rastgele atılması sonucu, ilgilenilen bileşenin izdüşümleri üzerine düşen toplam nokta sayısının hesaplanması ve bu değer ortalama kesit kalınlığı ile çarpılması, bileşen hacminin tarafsız olarak hesaplanmasını sağlar (Canan ve ark., 2002).

2.3.3.d. Hacim oranından bileşenin toplam hacminin bulunması

Hacmi veya hacim oranı hesaplanmak istenen bileşen, yapının tamamına göre oldukça küçük bir hacim kaplayabilir ve buna bağlı olarak kesitlerde ortaya çıkan izdüşümleri, yapının tamamına göre oldukça küçük yüzey alanlarına sahip olabilirler. Böyle bir durumda nokta sıklığı bileşen için seyrek kalacağından referans hacmine çok fazla sayıda nokta düşecek ve gereksiz yere çok fazla nokta sayılmış olacaktır. Böyle bir durumda bileşik noktalı alan ölçüm cetveli kullanılabilir (Şekil 10). Bu tip bir cetvelde, sık ve seyrek olmak üzere iki tip nokta dizgesi bir arada bulunur. Şekil 10'da etrafı dairelerle çevrili noktalar seyrek noktaları, diğerleri ise (daire ile çevrilmemiş noktalarla beraber) sık nokta dizgesini temsil ederler dolayısıyla daire ile çevrilmemiş noktalar A ile gösterilen büyük bir birim alanı ve sık noktalar ise 'a' ile gösterilen küçük birim alanları temsil eder. Böyle bir cetvel, uygun bir şekilde ayarlanıp bileşenler içeren bir yapının kesit görüntüleri üzerine atılırsa, yapının toplam hacmi için daire ile çevrelenmiş noktalar sayılırken, bileşen izdüşümleri için sık nokta dizgesindeki noktalar dikkate alınır. Böylece referans hacim için çok fazla nokta saymaya gerek kalmadan, etkin bir şekilde hacim oranı hesaplamaları gerçekleştirilir (Canan ve ark., 2002).



Şekil 10. Bileşik noktali alan ölçüm cetveli. Her bir büyük kare küçük karenin 9 katı büyüklükte bir alanı tanımlamaktadır.

Hacim oranı hesaplamasında Şekil 10'deki noktali alan ölçüm cetvelini dikkate alırsak, aşağıdaki formül yazılabilir (Canan ve ark., 2002).

$$\hat{V}_v(Y, ref) \frac{P(Y)}{9.P(ref)} \quad (\text{Eşitlik 3})$$

Burada, $V_v(Y, ref)$, Y bileşeninin referans hacim içindeki hacim oranını; $P(Y)$, Y bileşeninin kesitlerde ortaya çıkan izdüşümleri üzerine isabet eden –küçük- noktaların toplam sayısını; $P(ref)$ ise referans hacim içine isabet eden toplam –büyük- nokta sayısını ifade etmektedir. Paydadaki $P(ref)$ değerinin dokuz katının alınması, nokta takımları arasındaki ilişkiden kaynaklanmaktadır. Alan hacim hesaplamalarında hesaplamamanın doğruluğunu artırmanın bir yolu ise, her bir görüntü için noktali cetveli birden fazla (genellikle üç kez) rastgele olarak uygulamak ve elde edilen nokta sayısı değerlerinin ortalamalarını almaktır. Böylelikle tüm kesitler için oldukça kesin bir alan ve sonuçta hacim hesaplaması değeri elde edilmektedir (Canan ve ark., 2002).

2.3.3.e. Nokta sayım yöntemi ile alan ve hata miktarının hesaplanması

Genellikle nokta sayım yöntemiyle hacim veya hacim oranı hesaplamalarında, uygulanan yöntemin toplam değişkenlik hata katsayısı (HK) miktarı bir formülle hesaplanır.

Burada VarSRÖ uygulanan sistematik rastgele örnekleme yönteminin değişkenlik miktarının bir hesaplamasıdır. NOİSE değeri ise, nokta sayım tekniğiyle yapılan alan ölçümleri için hesaplanabilir.

$$\% \text{ NOİSE} = 100 * \text{NOİSE} / \text{HK} \quad (\text{Eşitlik 4})$$

Yapılan çalışma sonrasında hesaplanan HK değeri % 5 ve altında ise örnekleme yönteminin uygun olduğuna karar verilir. Hata katsayısının % 5'den büyük olduğu durumlarda % NOİSE değerine bakılır. Bu değer % 25 ve altında ise kullanılan noktalı alan ölçüm cetvelinin nokta sıklığı uygun ancak her bir birey için kullanılan kesit sayısının yetersiz olduğu düşünülür. Bu durumda kesit sayısı artırılarak hata katsayısı istenen düzeye çekilir. % NOİSE değeri 25 üzerinde ise kullanılan noktalı alan ölçüm cetvelinin nokta sıklığının yetersiz olduğu düşünülür. Böyle bir durumda nokta artırılarak uygun değerdeki HK elde edilir (Canan ve ark., 2002).

Toplam partikül sayısı N 'in bulunması için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$N = \bar{Q} \times \sum p_k \times \frac{a}{p}$$

N : Toplam partikül sayısı

$\sum p$: Nokta sayısı

$\bar{Q}$: Partikül ortalaması (Her hayvan için ayrı hesaplanır).

k : Kesit adımı

a : Çerçeve alanı

$\frac{a}{p}$: Nokta alanı

Tablo 1. Sistematik rastgele örnekleme planının hata katsayısını (CE) hesaplamak için kullanılan tablo örneği.

Kesit no(i)	Pi	Pi.Pi	Pi.Pi+1	Pi.Pi+2
1	3	3	24	30
2	8	36	80	96
3	10	35	120	160
4	12	30	192	204
5	16	32	272	208
6	17	30	221	204
7	13	37	156	130
8	12	40	120	96
9	10	22	80	30
10	8	31	24	0
11	3	15	0	0
12		3	0	0
Toplam	$\Sigma P (112)$	A	B	C

$$NOISE = 0,0724.(b/\sqrt{a})$$

Formüldeki n değeri, incelenen kesit sayısını, ΣP değeri tüm kesitlerde ilgili alan üzerine isabet edip sayılan toplam nokta sayısını gösterir. $b/\sqrt{a}$ değeri ise ilgilenilen yapının kesitlerde ortaya çıkan izdüşüm karmaşıklığını gösterir. Sistematik rastgele örnekleme varyansının hesaplanmasına ilişkin formüldeki A, B, C değerleri ise, kesitler arasında, ilgili alanlara isabet eden nokta sayılarının değişkenliğini belirleyen bir tablo yardımıyla (Tablo 1) hesaplanabilir. Bu tabloda i, kesit numarasını simgelemektedir. P_i olarak belirtilen sütuna, her bir kesitte sayılan noktaların sayılarının kareleri yazılır. Bir sonraki $P_i.P_{i+1}$ başlıklı sütun ise, herhangi bir kesitteki nokta sayısının, bir sonraki kesitteki nokta sayısı ile çarpımı yazılır. $P_i.P_{i+2}$ başlıklı kolon da bir kesitteki nokta sayısı ile ondan iki sonraki kesitteki noktaların sayılarının çarpımı içindir. Bu kolonlardaki verilerin toplanması sonucu sırasıyla A, B, C değerleri elde edilir. Bu değerler daha sonra 4 numaralı eşitlikte yerlerine yerleştirilerek, sistematik rastgele örnekleminin değişim katsayısı hesaplanır. Bu değer 0.05 civarında veya ondan küçük olduğu durumda çalışmada kullanılan örnekleme planı kesinlikte yeterli kabul edilir (Canan ve ark., 2002).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

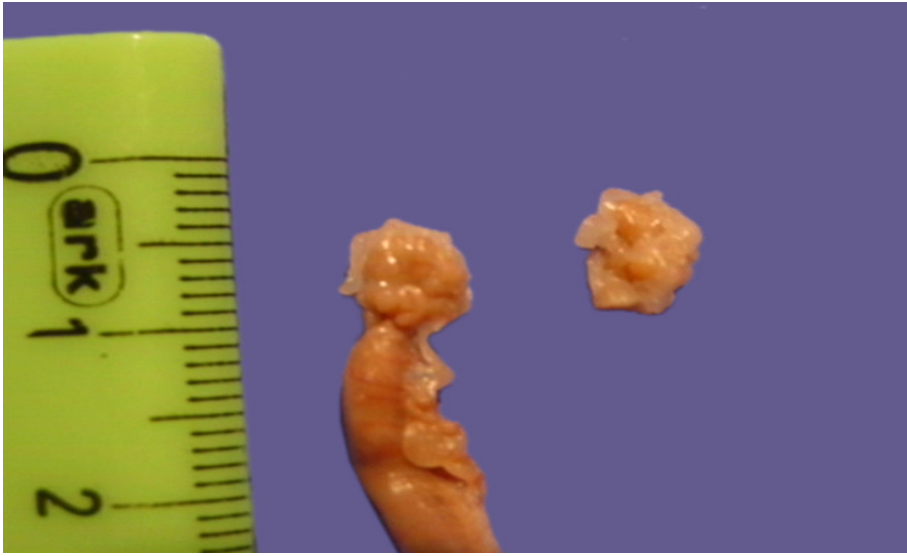
3.1. Gereç

Çalışmamızda Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen, ağırlıkları 150-200 g. arasında olan daha önce hiç çiftleşmemiş 12 adet erişkin Albino cinsi (9dişi+3erkek) sıçan kullanıldı. Ayrıca çalışma öncesi YYÜ Tıp Fakültesi Etik kurulundan (26.03.2009; karar no: 04) izin alındı.

Çiftleşme için 24 saat aynı kafeste tutulan üç dişi ve bir erkek sıçan daha sonra ayrı kafeslere alındılar. Ertesi gün dişi sıçanlarda vaginal plak gözlenenler gebeliğin sıfıncı '0.' günü kabul edildi. Gebe kaldığı tespit edilen sıçanlar rastgele denek grubu, sham grubu ve kontrol grubu yavru sıçanlar elde etmek amacıyla ayrı ayrı kafeslere konulup gebelikleri boyunca takip edildiler. Her gün tartılan ve kayıtları alınan sıçanların ağırlıklarındaki artış gebeliklerinin göstergesi olarak kabul edildi. Sıçanlar normal ışık ve karanlık siklusu ile 21 ± 2 °C oda sıcaklığında adlibitum olarak beslenmeye tabi tutuldular. Çiftleşme olayından beş gün sonra denek grubu olarak ayrılan sıçanlara gebeliklerinin 5. gününden itibaren 15 gün süreyle günde bir kez 1 mg/kg diklofenak sodyum i.m. (İntramüsküler) yolla enjekte edildi. Sham grubu gebe sıçanlara, aynı miktarda serum fizyolojik i.m. enjekte edildi. Kontrol grubu sıçanlara ise herhangi bir deneysel madde verilmedi.

Doğuma yakın her sıçan ayrı kafese alındı ve doğum günü postnatal '0.' sıfıncı gün kabul edildi. Postnatal 3-4 hafta arası yavruların perine mesafelerine bakılarak erkek ve dişi ayrımı yapıldı ve daha sonra farklı kafeslere alındılar. (Erkek ve dişi ayrımı ise şöyle yapıldı; erkek sıçanda perine dişiye oranla daha geniş). Sonuçta; Hepsi 20 haftalık olmak üzere, 6 adet denek grubu, 6 adet sham ve 6 adet kontrol grubu elde edildi. Yavru dişi sıçanlar postnatal 20 haftanın sonunda ketalar anestezisi (50 mg/kg) ile derin anestezide alınarak transkardiak bir kanül vasıtasıyla sol ventriküle girilerek perfüze edildi. Sonuç olarak 6 adet denek grubu, 6 adet sham grubu ve 6 adet kontrol grubu olmak üzere toplam 18 adet dişi sıçan çalışmaya dahil edildi. Kalbin sağ atrium kesisi yapılarak açıldı ve berrak sıvı akıncaya kadar kanın boşalması beklendi.

Akabinde serum fizyolojik ve 0,5 ml'lik heparin verildi, ardından % 10 nötral formaldehit tespit maddesi ile perfüze edildi. İlgili bölgeler beyazlaşınca kadar işleme devam edildi. Perfüzyon ve tespit işlemini takiben 20 haftalık yavru sıçanların ilk olarak, karın ön duvarı diseksiyonla açılarak sağ ovaryumun abdomen boşluğundaki yeri belirlendi. Sonrasında alınan ovaryumlar tuba uterinallardan ayrılarak, cetvelle boyu ölçüldü. (Şekil 11). Işık mikroskobunda gözlemlemek için % 10 formalinde 48 saat tespit edildi.



Şekil 11. Ovaryumun cetvelle ölçümü.

3.2. Yöntem

3.2.1. Ovaryumların kesit işlemleri

Sağ ovaryumlar rutin histolojik doku takip işlemlerinden geçirilerek parafine gömüldü ve bloklar hazırlandı. Bir havyandan ortalama 10 kesit alacak kadar (ilk kesit arasında rastgele bir tenesinden başlanarak ve onun ardından gelen her 40. kesit çifti alınarak sistemik ve rastgele bir şekilde 1/40 oranında örnekleme yapıldı). Kesitler deparafinize edildikten sonra Masson Trikrom boyama işlemine tabi tutuldu. Kesit aldığımız Rotary mikrotom Şekil 12’de görülmektedir. Stereolojik ölçümde ise, Cavalieri prensibinin modifiye metodu kullanıldı (Gundersen ve Jensen, 1987). Sonrasında total doku volüm oranları (bileşen hacim oranı), Shetereom 1.5 version paket programında verilmiş noktalı alan cetveliyle ölçüldü (Gundersen ve ark., 1988;

Howard ve Reed, 1998). Boyalı kesitlerin değerlendirilmesinde fotoğraf ataşmanlı Zeiss axioskop 40 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) ışık mikroskobunda follikül sayımı için x100 (N.A:1.25), volüm hesaplanması için x4 (NA:0.1) kullanıldı ve sonuçlar karşılaştırıldı (şekil 13). Görüntü elde etmek için AxioVision 3,1 Zeiss axioplan2 imaging Germany, Göttingen kullanıldı.



şekil 12. Kesit alınan mikrotom (Leica Model 2125RT Çin malı (Nussloch).



şekil 13. Sayımda kullanılan fotoğraf ataşmanı ilave edilmiş mikroskop (Zeiss Axioskop 4 Carl Zeiss Göttingen Germany).

3.2.2. Ovaryumların boyama işlemleri

Yaptığımız çalışmada ovaryum dokularının (bağ dokusu) ve primordiyal foliküllerin daha iyi görülmesi için Masson Trikrom boyama yöntemi kullanıldı.

Masson Trikrom boyama aşağıdaki prosedüre göre uygulandı:

1. Deparafinizasyon yapıldı.
2. Bouin solüsyonuyla (Pikrik asit 9 gr. %37-40'lık formaldehit 250 ml, distile su 100ml, acid solüsyonu 0,8 g) 80 °C etüvde 20 dk. bekletildi.
3. Akarsuda sarı renk gidinceye kadar yıkandı.
4. Weigert Demirli Hematoksilen solüsyonunda (A solüsyonu Hematoksilen 1g. % 96'lık etil alkol 100 ml, B Solüsyonu: Ferric chloride 29 g. distile su 100 ml) 5 dk. bekletildi.
5. Akarsuda 5 dk. yıkandı.
6. Biebrich skarlet- Asit fuksil solüsyonunda (Biebrich Scarlet 0,9 g. distile su 100 ml asit fuksin 0.1 g. glisial asetik asit 1ml.) 2 dk. tutuldu.
7. Distile suda 1 dk. bekletildi.
8. Phosphomolybdic – phosphotungstic asit solüsyonunda (Phosphomolybdic asit 2.5 g. phosphotungstic acid 2,5 ml distile su 100 ml) 10 dk. bekletildi.
9. Akarsudan geçirilerek yıkandı.
10. Anilin Blue solüsyonunda (Anilin blue 2,5 g. gliseal asetik asit 2,5 ml. distile su 100 ml) 5 dk. tutuldu.
11. Glasial asetik asit (% 1'lik) solüsyonunda 3 dk. bekletildi.
12. Distile suda 1 dk. çalkalandı.
13. % 96'lık 3 ayrı kaptaki alkol serilerinde 5'er dk. tutuldu.
14. Ksilol'de 10 dk. bekletildi.
15. Entellan damlatılarak lamelle kapatıldı (Bangroft ve Gamble, 2008).

3.3. İstatistiksel Analiz

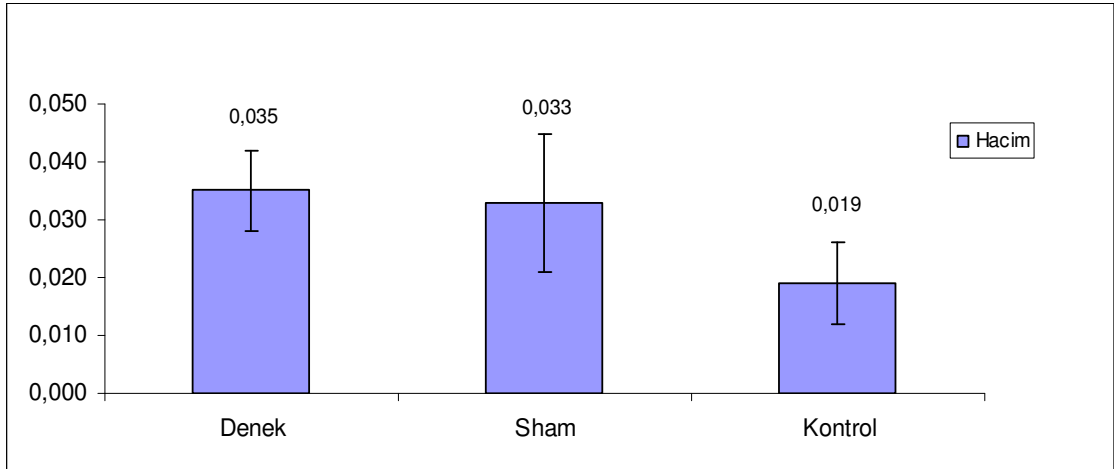
Gözlem güvenilirliğini sağlamak ve önyargıyı ortadan kaldırmak amacıyla dişi sıçanların denek, kontrol ve sham gruplarının kodlama usulü (kör çalışma) ile hacim hesaplaması yapıldı.

Primordial folükül hücre sayısı için tanımlayıcı istatistikler; Medyan, Ortalama, St. Sapma, Minimum ve Maksimum değer olarak ifade edilmiştir. Bu özellik bakımından grupları karşılaştırmada Kruskal - Wallis testi kullanılmıştır. Farklı grupları belirlemede ise Tukey testi kullanılmıştır. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi %5 olarak alınmış ve hesaplamalarda SPSS (ver:13) istatistik programı kullanılmıştır. Üzerinde durduğumuz özellikler bakımından, tanımlayıcı istatistikler; ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değer olarak ifade edilmiştir.

4. BULGULAR

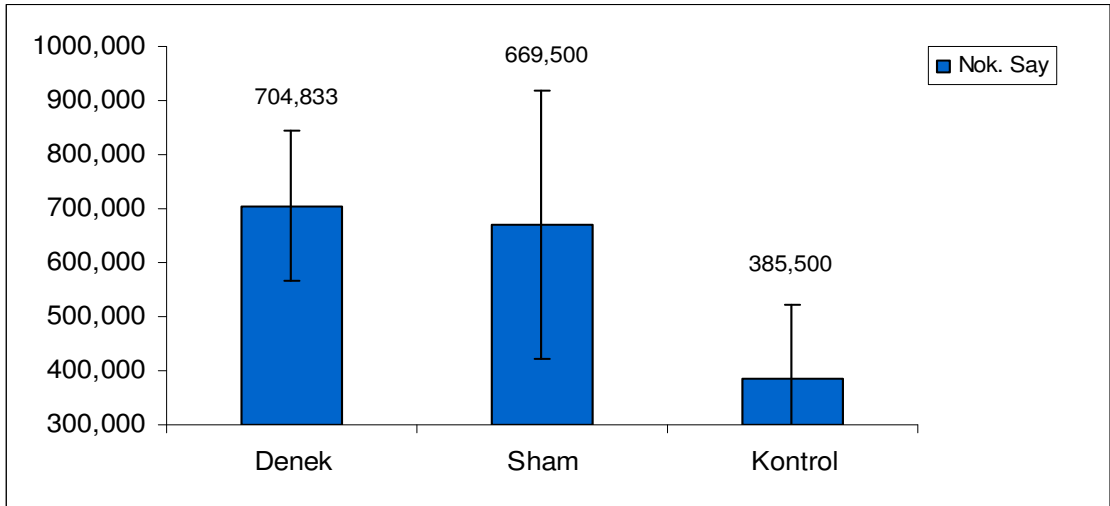
Işık mikroskobunda denek, kontrol ve sham grubundaki ovaryum total doku volümleri, volüm nokta sayıları ve primordiyal folikül sayısal yoğunlukları Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı. Gruplardaki varyasyon katsayı değerleri (CV), denek grubunda; 0.18, sham grubunda; 0.33, kontrol grubunda; 0.38 olarak hesaplandı (Tablo 6).

Ovaryumun denek, sham ve kontrol grubuna ait total hacim oranları (Şekil 14)'de belirtilmiştir. Denek grubu (0.0352 ± 0.007) ve sham grubu (0.032 ± 0.012) total hacim oranlarında, kontrol grubu (0.019 ± 0.007) hacim oranlarına göre istatistiki açıdan anlamlı dercede artış olduğu gözlenmiştir ($P < 0.05$), (Tablo 7).



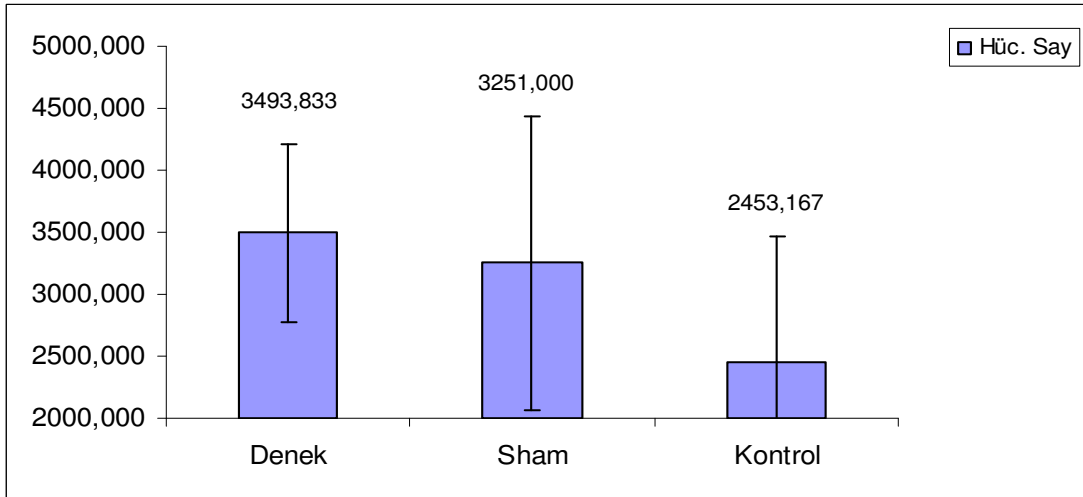
Şekil 14. Denek (diklofenak sodyum), sham (serum fizyolojik) ve kontrol gruplarına ait total hacim oranları.

Denek, sham ve kontrol grubu 18 sıçanın total ovaryum volüm nokta sayıları (nokta alanları) Şekil 15'te gösterilmiştir. Denek (704 ± 138) ve sham grubunun total volüm nokta sayılarının (638 ± 248), kontrol grubu volüm nokta sayılarına (359 ± 138) oranla arttığı gözlemlendi. Değerler istatistiki açıdan anlamlı bulundu ($P < 0.05$), (Tablo 2, 3, 4).



Şekil 15. Gruplara ait total volüm nokta sayıları (nokta alanları).

Ovaryum denek (3493 ± 718) ve sham (3251 ± 1186) grubunun total primordiyal folikül sayısının, kontrol (2453 ± 1021) grubu total primordiyal folikül sayısına göre değişmediği tespit edildi (Şekil 16, Tablo 5). Değerlerde istatistiki açıdan anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 7), ($P > 0,05$). Denek, sham ve kontrol gruplarına ait primordiyal folikül sayıları (Tablo 8-25)'de gösterilmiştir. Ovaryumdaki gruplara ait toplam (N) partikül sayıları (Tablo 5)'te gösterilmiştir.



Şekil 16. Gruplara ait total primordiyal folikül sayısı. Denek(diklofenak sodyum), sham (serum fizyolojik)

Tablo 2. Ovaryum denek grubuna ait volüm nokta sayıları (nokta alanı) ve ovaryum total hacimleri.

SIÇAN	Ovaryum volüm nokta sayısı (nokta alanı)	Ovaryum total Hacim (cm ³)
Denek 1	838	0.0414
Denek 2	861	0.0430
Denek 3	601	0.0300
Denek 4	772	0.0386
Denek 5	659	0.0329
Denek 6	508	0.0254
Ort	706,5	0,03521

Tablo 3. Ovaryum sham grubuna ait volüm nokta sayıları (nokta alanı) ve ovaryum total hacimleri.

SIÇAN	Ovaryum volüm nokta sayısı (nokta alanı)	Ovaryum total Hacim (cm ³)
Sham1	1091	0.0545
Sham 2	575	0.02875
Sham 3	739	0.03695
Sham 4	701	0.03505
Sham 5	564	0.0282
Sham 6	347	0.0173
Ort	669,5	0.0334

Tablo 4. Ovaryum kontrol grubuna ait volüm nokta sayıları ve ovaryum total volümleri.

SIÇAN	Ovaryum volüm nokta sayısı (nokta alanı)	Ovaryum total Volüm (cm ³)
Kontrol 1	237	0.01185
Kontrol 2	398	0.0199
Kontrol 3	644	0.0322
Kontrol 4	368	0.0184
Kontrol 5	315	0.01575
Kontrol 6	351	0.01755
Ort	385,5	0.0192

Noktalı alan ölçüm cetveli ile doku alanları hesaplanmıştır. Bir noktanın temsil ettiği alan =2500 µm²'dir.

Tablo 5. Gruplara ait ovaryum total primordiyal folikül sayısı.

SIÇAN	Ovaryum total primordiyal hücre sayısı (N)	Ovaryum primordiyal hücre sayısı (Q-)
Denek 1	4080	112
Denek 2	4508	119
Denek 3	2697	102
Denek 4	3566	105
Denek 5	3363	116
Denek 6	2749	123
Sham 1	5139	106
Sham 2	2530	100
Sham 3	3411	105
Sham 4	3917	127
Sham 5	2754	111
Sham 6	1755	115
Kontrol 1	1251	120
Kontrol 2	2381	136
Kontrol 3	4335	153
Kontrol 4	2364	146
Kontrol 5	1995	144
Kontrol 6	2393	155

Tablo 6. Denek, Kontrol ve Sham gruplarına ait CV ve CE değerleri.

SIÇAN	Coefficient Error (CE)
Denek 1	0.04060
Denek 2	0.03971
Denek 3	0.04218
Denek 4	0.04259
Denek 5	0.04366
Denek 6	0.05243
Coefficient of Variation (CV)	0.18
Sham 1	0.06695
Sham 2	0.05568
Sham 3	0.04133
Sham 4	0.06005
Sham 5	0.06139
Sham 6	0.05880
Coefficient of Variation (CV)	0.33
Kontrol 1	0.03810
Kontrol 2	0.05773
Kontrol 3	0.04198
Kontrol 4	0.04099
Kontrol 5	0.05492
Kontrol 6	0.06086
Coefficient of Variation (CV)	0.38

Denek, kontrol ve sham grubuna ait noktalı alan ölçüm cetveliyle yapılan sayım sonucu ortaya çıkan hata katsayısı (CE) ve varyasyon katsayısı (CV) verileri Tablo 6’da görülmektedir.

Tablo 7. Gruplara ait tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları.

	Grup	Medyan	Ort.	St. Sap.	Mak.	Min.	P
Volüm Nokta Sayısı	Denek	715,500	704,833 a	138,344	861,000	508,000	0.01
	Sham	638,000	669,500 a	248,013	1091,000	347,000	
	Kontrol	359,500	385,500 b	138,201	644,000	237,000	
Primordiyal F. Sayısı	Denek	3464,500	3493,833 a	718,912	4508,000	2697,000	0.20
	Sham	3082,500	3251,000 a	1186,471	5139,000	1755,000	
	Kontrol	2372,500	2453,167 a	1021,097	4335,000	1251,000	
Hacim	Denek	0,036	0,035 a	0,007	0,043	0,025	0.01
	Sham	0,032	0,033 a	0,012	0,055	0,017	
	Kontrol	0,018	0,019 b	0,007	0,032	0,012	

Farklı harfi alan grup ortalamaları arasındaki fark anlamlıdır.

Tablo 8. Denek 1. sıçan primordiyal folikül sayısı.

Kesit	Q	Qi.Qi	Qi.Qi+1	Qi.Qi+2
1	3	3	24	30
2	8	36	80	96
3	10	35	120	160
4	12	30	192	204
5	16	32	272	208
6	17	30	221	204
7	13	37	156	130
8	12	40	120	96
9	10	22	80	30
10	8	31	24	0
11	3	15	0	0
12		3	0	0
TOPLAM:	112			
		C	314	
		D	1289	
		E	1158	
		NOISE:	112	
		VAR(srs):	-14,1333	
		Toplam Var:	97,86667	
		CE:	0,088328	
		% NOISE:	114,4414	

Tablo 9. Denek 2. sıçan primordiyal folikül sayısı.

Kesit	Q	Qi.Qi	Qi.Qi+1	Qi.Qi+2
1	6	3	60	78
2	10	36	130	150
3	13	35	195	234
4	15	30	270	225
5	18	32	270	216
6	15	30	180	165
7	12	37	132	120
8	11	40	110	99
9	10	22	90	0
10	9	31	0	0
11	0	15	0	0
12		3	0	0
TOPLAM:	119			
		C	314	
		D	1437	
		E	1287	
		NOISE:	119	
		VAR(srs):	-16,15	
		Toplam Var:	102,85	
		CE:	0,085223	
		% NOISE:	115,7025	

Tablo 10. Denek 3. sıçan primordiyal folikül sayısı.

Kesit	Q	Qi.Qi	Qi.Qi+1	Qi.Qi+2
1	3	3	18	24
2	6	36	48	66
3	8	35	88	96
4	11	30	132	187
5	12	32	204	192
6	17	30	272	255
7	16	37	240	80
8	15	40	75	75
9	5	22	25	20
10	5	31	20	0
11	4	15	0	0
12		3	0	0
TOPLAM:	102			
		C	314	
		D	1122	
		E	995	
		NOISE:	102	
		VAR(srs):	-11,9042	
		Toplam Var:	90,09583	
		CE:	0,093058	
		% NOISE:	113,2128	

Tablo 11. Denek 4. sıçan primordiyal folikül sayısı.

Kesit	Q	Qi.Qi	Qi.Qi+1	Qi.Qi+2
1	5	3	20	30
2	4	36	24	44
3	6	35	66	90
4	11	30	165	187
5	15	32	255	240
6	17	30	272	255
7	16	37	240	160
8	15	40	150	90
9	10	22	60	0
10	6	31	0	0
11		15	0	0
12		3	0	0
TOPLAM:	105			
		C	314	
		D	1252	
		E	1096	
		NOISE:	105	
		VAR(srs):	-13,6875	
		Toplam Var:	91,3125	
		CE:	0,091007	
		% NOISE:	114,9897	

Tablo 12. Denek 5. sıçan primordiyal folikül sayısı.

Kesit	Q	Qi.Qi	Qi.Qi+1	Qi.Qi+2
1	4	3	28	32
2	7	36	56	77
3	8	35	88	128
4	11	30	176	198
5	16	32	288	304
6	18	30	342	288
7	19	37	304	114
8	16	40	96	112
9	6	22	42	24
10	7	31	28	0
11	4	15	0	0
12		3	0	0
TOPLAM:	116			
		C	314	
		D	1448	
		E	1277	
		NOISE:	116	
		VAR(srs):	-16,3375	
		Toplam Var:	99,6625	
		CE:	0,086061	
		% NOISE:	116,3928	

Tablo 13. Denek 6. sıçan primordiyal folikül sayısı.

Kesit	Q	Qi.Qi	Qi.Qi+1	Qi.Qi+2
1	6	3	48	48
2	8	36	64	80
3	8	35	80	136
4	10	30	170	190
5	17	32	323	289
6	19	30	323	209
7	17	37	187	170
8	11	40	110	99
9	10	22	90	50
10	9	31	45	27
11	5	15	15	0
12	3	3	0	0
TOPLAM:	123			
		C	314	
		D	1455	
		E	1298	
		NOISE:	123	
		VAR(srs):	-16,4542	
		Toplam Var:	106,5458	
		CE:	0,08392	
		% NOISE:	115,4433	

Tablo 14. Sham 1. sıçan primordiyal folikül sayısı.

Kesit	Q	Qi.Qi	Qi.Qi+1	Qi.Qi+2
1	5	3	45	55
2	9	36	99	117
3	11	35	143	165
4	13	30	195	182
5	15	32	210	165
6	14	30	154	140
7	11	37	110	99
8	10	40	90	60
9	9	22	54	27
10	6	31	18	0
11	3	15	0	0
12		3	0	0
TOPLAM:	106			
		C	314	
		D	1118	
		E	1010	
		NOISE:	106	
		VAR(srs):	-11,825	
		Toplam Var:	94,175	
		CE:	0,091551	
		% NOISE:	112,5564	

Tablo 15. Sham 2. sıçan primordiyal folikül sayısı.

Kesit	Q	Qi.Qi	Qi.Qi+1	Qi.Qi+2
1	3	3	24	33
2	8	36	88	128
3	11	35	176	187
4	16	30	272	240
5	17	32	255	204
6	15	30	180	120
7	12	37	96	60
8	8	40	40	24
9	5	22	15	10
10	3	31	6	0
11	2	15	0	0
12		3	0	0
TOPLAM:	100			
		C	314	
		D	1152	
		E	1006	
		NOISE:	100	
		VAR(srs):	-12,3333	
		Toplam Var:	87,66667	
		CE:	0,09363	
		% NOISE:	114,0684	

Tablo 16. Sham 3. sıçan primordiyal folikül sayısı.

Kesit	Q	Qi.Qi	Qi.Qi+1	Qi.Qi+2
1	6	3	60	60
2	10	36	100	120
3	10	35	120	160
4	12	30	192	168
5	16	32	224	192
6	14	30	168	140
7	12	37	120	96
8	10	40	80	40
9	8	22	32	24
10	4	31	12	0
11	3	15	0	0
12		3	0	0
TOPLAM:	105			
		C	314	
		D	1108	
		E	1000	
		NOISE:	105	
		VAR(srs):	-11,6875	
		Toplam Var:	93,3125	
		CE:	0,091998	
		% NOISE:	112,5251	

Tablo 17. Sham 4. sıçan primordiyal folikül sayısı.

Kesit	Q	Qi.Qi	Qi.Qi+1	Qi.Qi+2
1	8	3	88	128
2	11	36	176	187
3	16	35	272	288
4	17	30	306	221
5	18	32	234	216
6	13	30	156	156
7	12	37	144	108
8	12	40	108	96
9	9	22	72	27
10	8	31	24	0
11	3	15	0	0
12		3	0	0
TOPLAM:	127			
		C	314	
		D	1580	
		E	1427	
		NOISE:	127	
		VAR(srs):	-18,05	
		Toplam Var:	108,95	
		CE:	0,082188	
		% NOISE:	116,5672	

Tablo 18. Sham 5. sıçan primordiyal folikül sayısı

Kesit	Q	Qi.Qi	Qi.Qi+1	Qi.Qi+2
1	4	3	20	40
2	5	36	50	70
3	10	35	140	180
4	14	30	252	224
5	18	32	288	180
6	16	30	160	176
7	10	37	110	90
8	11	40	99	66
9	9	22	54	45
10	6	31	30	18
11	5	15	15	0
12	3	3	0	0
TOPLAM:	111			
		C	314	
		D	1218	
		E	1089	
		NOISE:	111	
		VAR(srs):	-13,225	
		Toplam Var:	97,775	
		CE:	0,089082	
		% NOISE:	113,526	

Tablo 19. Sham 6. sıçan primordiyal folikül sayısı

Kesit	Q	Qi.Qi	Qi.Qi+1	Qi.Qi+2
1	6	3	48	60
2	8	36	80	128
3	10	35	160	190
4	16	30	304	224
5	19	32	266	228
6	14	30	168	140
7	12	37	120	96
8	10	40	80	50
9	8	22	40	32
10	5	31	20	15
11	4	15	12	0
12	3	3	0	0
TOPLAM:	115			
		C	314	
		D	1298	
		E	1163	
		NOISE:	115	
		VAR(srs):	-14,3	
		Toplam Var:	100,7	
		CE:	0,08726	
		% NOISE:	114,2006	

Tablo 20. Kontrol 1. sıçan primordiyal folikül sayısı.

Kesit	Q	Qi.Qi	Qi.Qi+1	Qi.Qi+2
1	5	3	45	50
2	9	36	90	99
3	10	35	110	170
4	11	30	187	176
5	17	32	272	255
6	16	30	240	208
7	15	37	195	180
8	13	40	156	117
9	12	22	108	36
10	9	31	27	0
11	3	15	0	0
12		3	0	0
TOPLAM:	120			
		C	314	
		D	1430	
		E	1291	
		NOISE:	120	
		VAR(srs):	-16,0292	
		Toplam Var:	103,9708	
		CE:	0,084972	
		% NOISE:	115,417	

Tablo 21. Kontrol 2. sıçan primordiyal folikül sayısı.

Kesit	Q	Qi.Qi	Qi.Qi+1	Qi.Qi+2
1	4	3	24	40
2	6	36	60	102
3	10	35	170	180
4	17	30	306	391
5	18	32	414	342
6	23	30	437	299
7	19	37	247	171
8	13	40	117	91
9	9	22	63	54
10	7	31	42	28
11	6	15	24	0
12	4	3	0	0
TOPLAM:	136			
		C	314	
		D	1904	
		E	1698	
		NOISE:	136	
		VAR(srs):	-22,4333	
		Toplam Var:	113,5667	
		CE:	0,078359	
		% NOISE:	119,7534	

Tablo 22. Kontrol 3. sıçan primordiyal folikül sayısı.

Kesit	Q	Qi.Qi	Qi.Qi+1	Qi.Qi+2
1	8	3	80	88
2	10	36	110	150
3	11	35	165	198
4	15	30	270	330
5	18	32	396	468
6	22	30	572	396
7	26	37	468	416
8	18	40	288	90
9	16	22	80	64
10	5	31	20	0
11	4	15	0	0
12		3	0	0
TOPLAM:	153			
		C	314	
		D	2449	
		E	2200	
		NOISE:	153	
		VAR(srs):	-29,6375	
		Toplam Var:	123,3625	
		CE:	0,072594	
		% NOISE:	124,0247	

Tablo 23. Kontrol 4. sıçan primordiyal folikül sayısı.

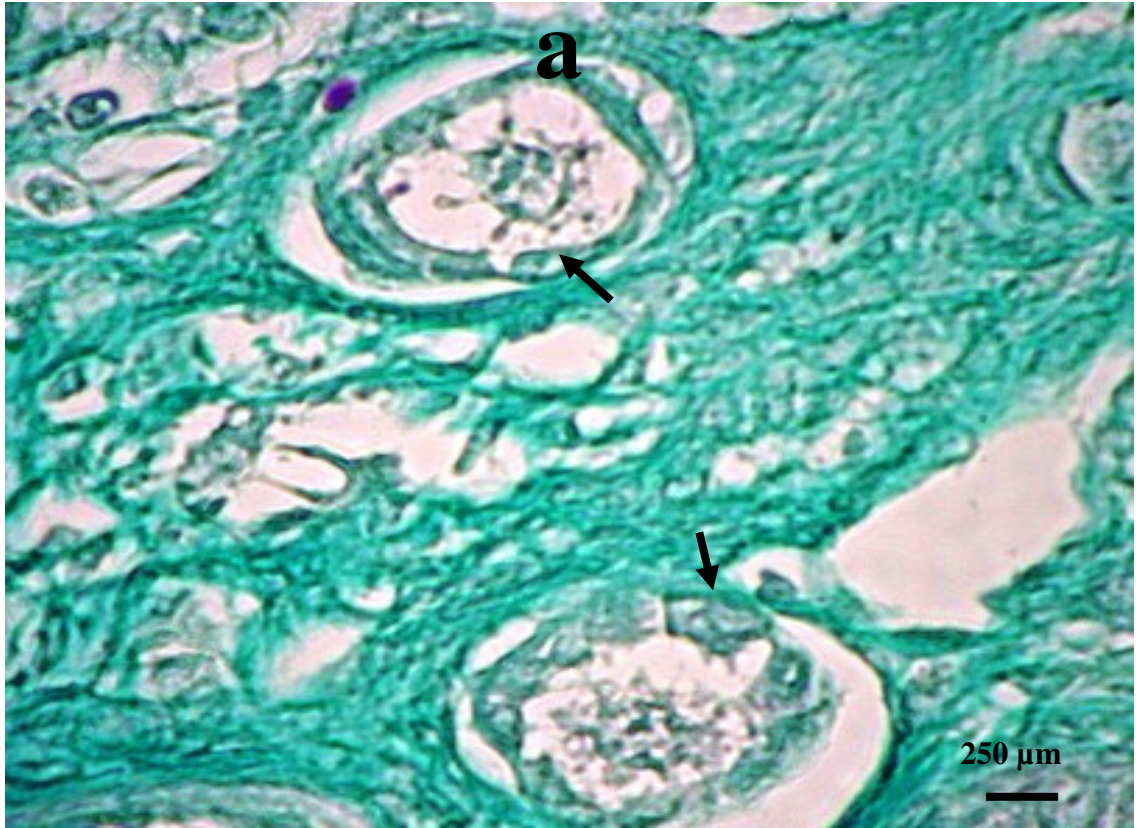
Kesit	Q	Qi.Qi	Qi.Qi+1	Qi.Qi+2
1	6	3	48	66
2	8	36	88	96
3	11	35	132	176
4	12	30	192	276
5	16	32	368	304
6	23	30	437	437
7	19	37	361	285
8	19	40	285	228
9	15	22	180	75
10	12	31	60	0
11	5	15	0	0
12		3	0	0
TOPLAM:	146			
		C	314	
		D	2151	
		E	1943	
		NOISE:	146	
		VAR(srs):	-25,6542	
		Toplam Var:	120,3458	
		CE:	0,075139	
		% NOISE:	121,317	

Tablo 24. Kontrol 5. sıçan primordiyal folikül sayısı.

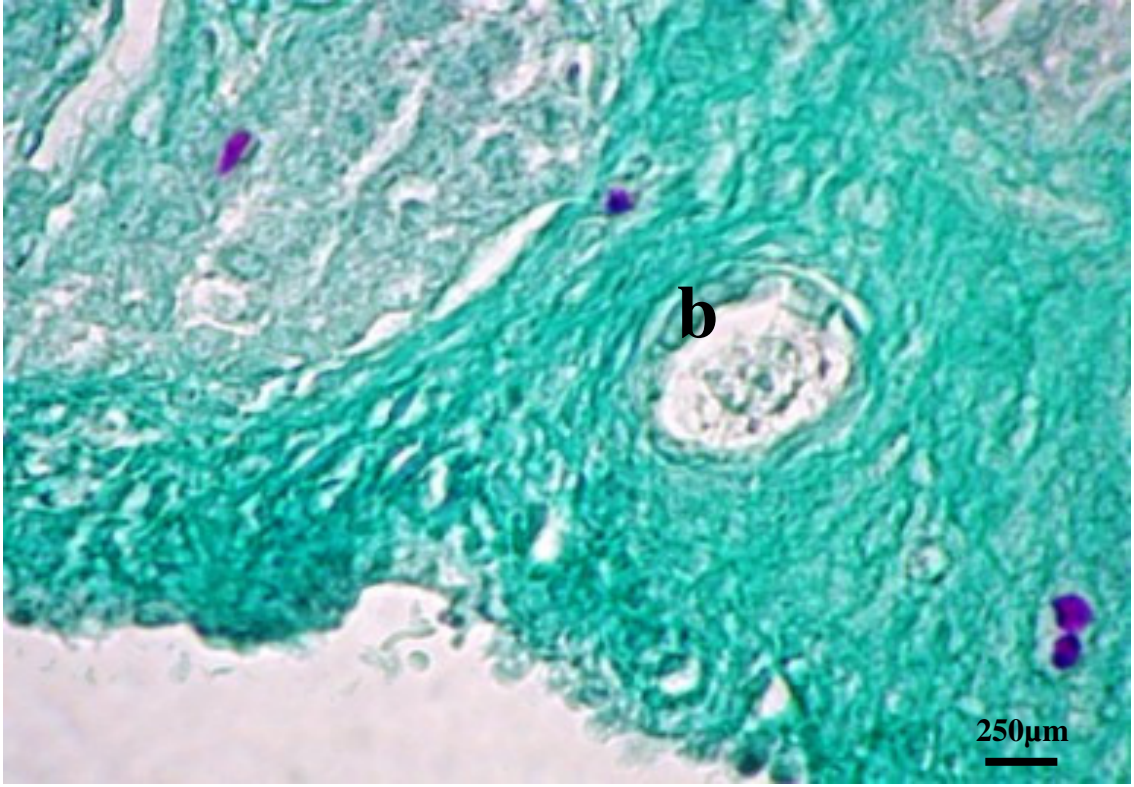
Kesit	Q	Qi.Qi	Qi.Qi+1	Qi.Qi+2
1	6	3	72	90
2	12	36	180	192
3	15	35	240	285
4	16	30	304	352
5	19	32	418	342
6	22	30	396	352
7	18	37	288	234
8	16	40	208	112
9	13	22	91	0
10	7	31	0	0
11		15	0	0
12		3	0	0
TOPLAM:	144			
		C	314	
		D	2197	
		E	1959	
		NOISE:	144	
		VAR(srs):	-26,3292	
		Toplam Var:	117,6708	
		CE:	0,075331	
		% NOISE:	122,3753	

Tablo 25. Kontrol 6. sıçan primordiyal folikül sayısı.

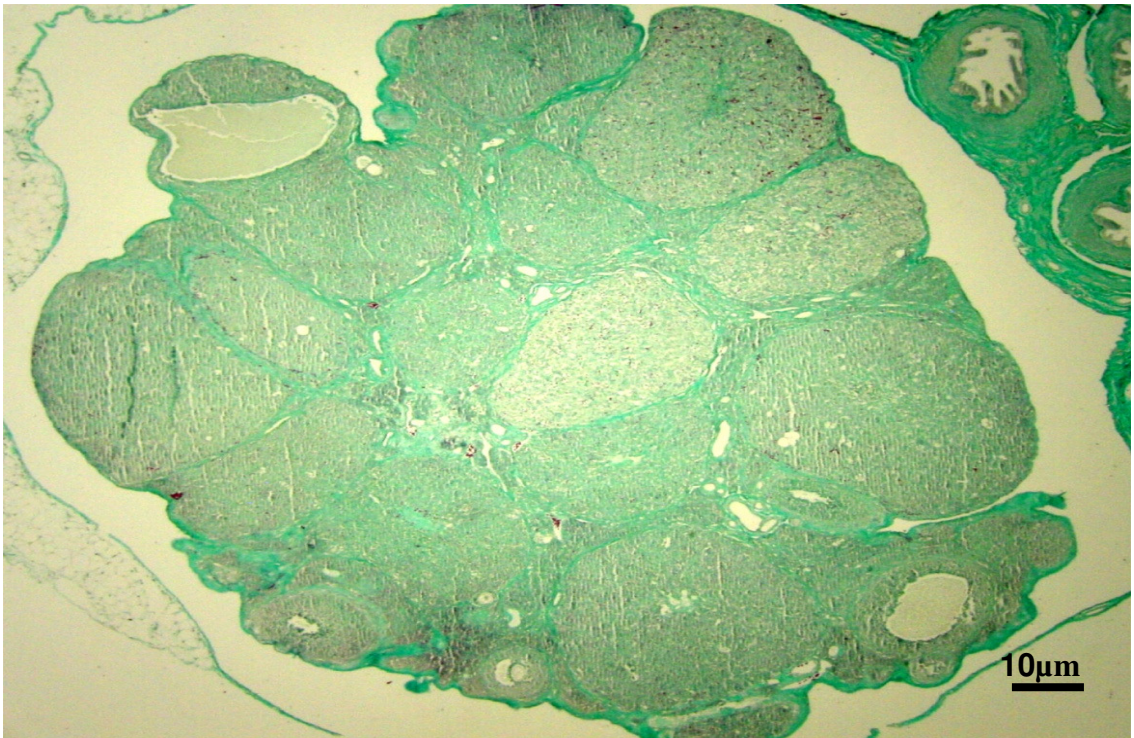
Kesit	Q	Qi.Qi	Qi.Qi+1	Qi.Qi+2
1	2	3	16	24
2	8	36	96	112
3	12	35	168	204
4	14	30	238	252
5	17	32	306	425
6	18	30	450	342
7	25	37	475	450
8	19	40	342	247
9	18	22	234	162
10	13	31	117	0
11	9	15	0	0
12		3	0	0
TOPLAM:	155			
		C	314	
		D	2442	
		E	2218	
		NOISE:	155	
		VAR(srs):	-29,4708	
		Toplam Var:	125,5292	
		CE:	0,072284	
		% NOISE:	123,4773	



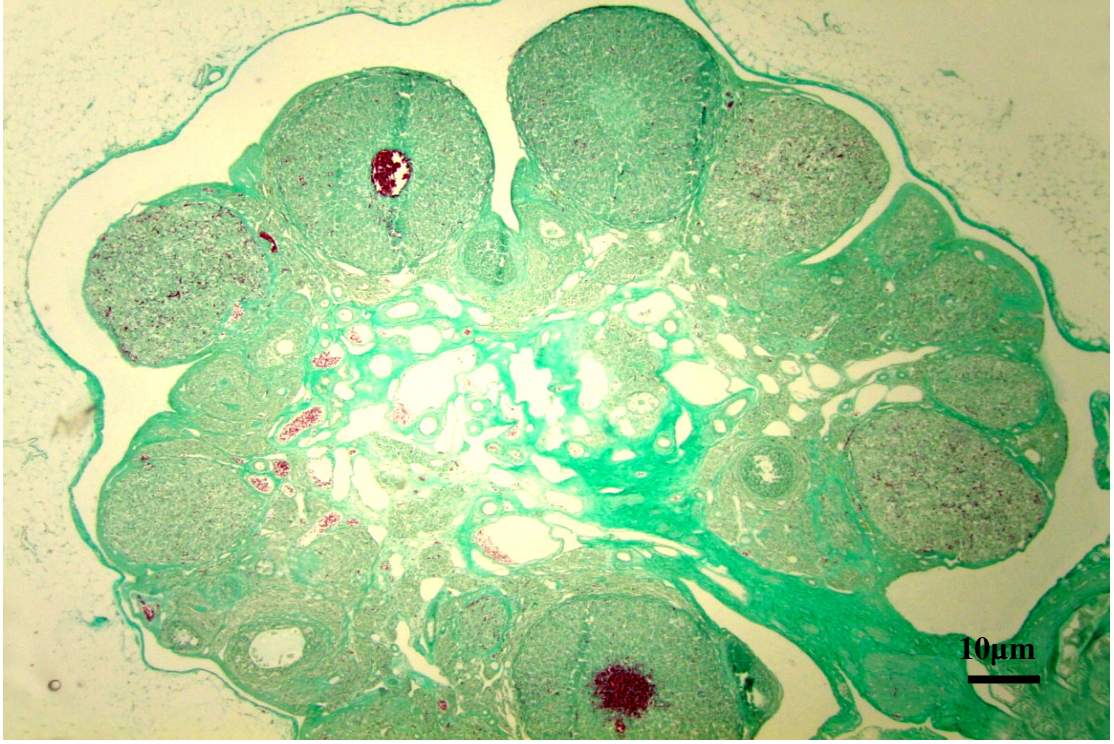
Şekil 17. Ovaryum denek grubu görüntüsü (Masson Trikrom x100 Obj. a: primordiyal folikül.Üstteki ok: Yassı folikül hücresi. Alttaki ok: Primer foliküldeki kübik foliklül hücresi.



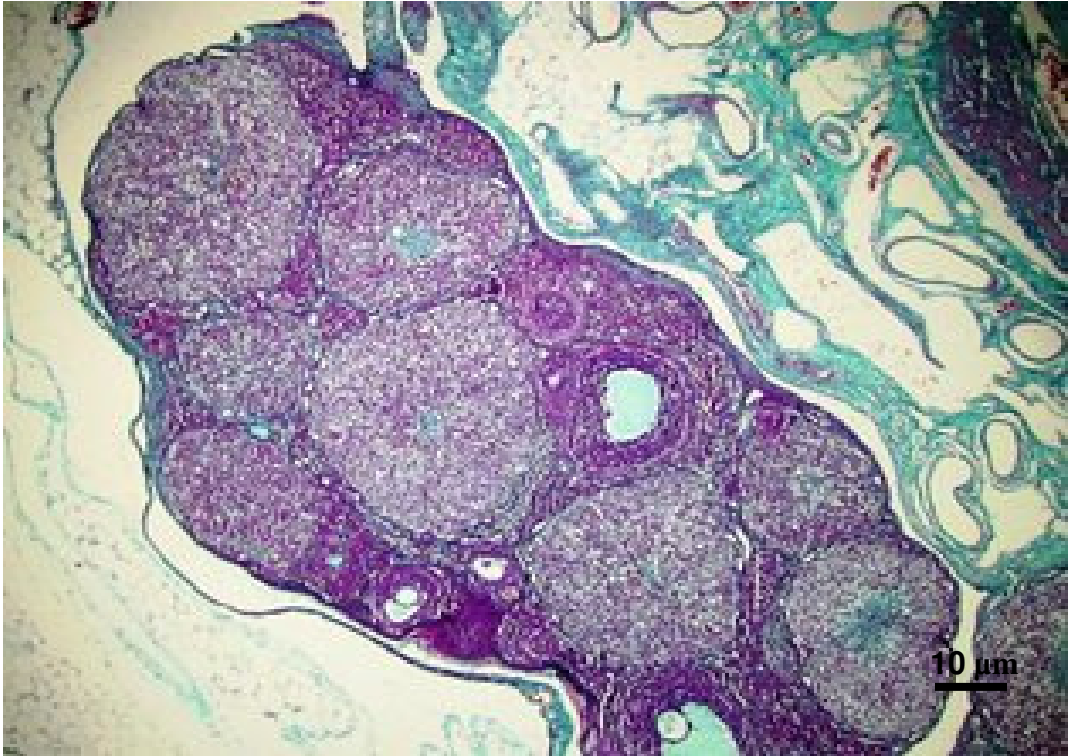
Şekil 18. Ovaryum kontrol grubu görüntüsü (Masson Trikrom x100 Obj.) b:primordiyal folikül.



Şekil 19. Ovaryum denek grubu görüntüsü (Masson Trikrom x 4 Obj.).



Şekil 20. Ovaryum kontrol grubu görüntüsü (Masson Trikrom x 4 Obj.).



Şekil 21. Ovaryum sham grubu görüntüsü (Masson Trikrom x 4 Obj.).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gebelikteki aktif romatizmal hastalıkların tedavi edilmesi, anne sağlığı ve fetüsün gelişimi için önemlidir. Hamilelikte antiromatizmal ilaçların kullanımı üzerine bilgiler sınırlıdır. NSAİİ'lerin romatoid artirit tedavisindeki etkisi aspirin ve indometazinde incelenmiştir. Bunun yanında, ibuprofen, sulindak, ketoprofen ve diklofenak'ın gebelikte kullanımı hakkında bilgiler sınırlıdır. NSAİİ'lerin gebelik süresince kullanımının annede ve fetusda yan etkilere yol açtığı bildirilmiştir. Hamilelikte verilen diklofenak sodyum'un gebelik ve doğum süresini 21-23 günden 28-29 güne kadar uzattığı gözlenmiştir (Gökçimen ve Malas 2003; Ostenson ve ark., 1998). Postnatal dönemde duktus arteriosus'ta (DA) kasılma, hidrops fetalis, oligohidroamnios, ileal perforasyon, beyinde kistik lezyonlar, özellikle karaciğerde parankimal harabiyete yol açtığı görülmüştür Carp ve ark.,1988; Kökçü ve ark.,1992).

Diklofenak sodyum (0.2 mg/kg) uygulanan denek grubu sıçanların, ovaryumları histopatolojik olarak incelendiğinde, denek grubundaki sekonder folikül sayısının azaldığını tespit etmişlerdir. Değerlerdeki azalmanın istatistiki açıdan anlamlı olduğu, tersiyer folikül sayısında ise farklılık olmadığı gözlenmiştir. Prostoglandinlerin follikül gelişimi üzerindeki etkileri bilinmemektedir. Merkezi sinir sisteminde hücre içi cAMP konsantrasyonlarını ve vasküler permeabilityi değiştirerek hipotalamik releasing hormonların hipofiz bezi üzerindeki etkilerini değiştirebilecekleri ve bu şekilde follikül gelişimini etkileyebilecekleri düşünülmektedir (Clark K., Wallac E. Ve Zacur H). Nonsteroidal anti-inflamatuar ilaçlar cyclo-oxygenase enzimini bloke ederek prostoglandin sentezini inhibe etmektedir. (Üstün ve ark., 1992). Bu çalışmanın sekonder folikül sayısı sonuçları çalışmamızdaki primordiyal folikül sayısı sonuçlarıyla örtüşmektedir. Dokular aynı olup, farklı doz aralıkları ve sayım için çalışmamızdan farklı teknikler kullanılmıştır.

Kaplan ve ark., (1994b)'larının yaptığı bir başka çalışmada 5 mg/kg i.m. uygulanan diklofenak sodyumun fetal plasental ağırlıkta anlamlı derecede artışa neden olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda ise denek ve sham grubunun total hacim oranları kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak artış göstermiştir. Kullanılan dokular farklı

olup, morfometrik olması yönünden çalışmamızla benzeşmektedir.

Başka bir çalışmada ise gebeliğin 4. gününden 17. gününe kadar 14 gün süreyle denek grubundaki 12 erişkin gebe sıçana 0,2 mg/kg diklofenak sodyum verilmiş, sıçanlardan doğan fetüs sayısının daha az olduğu ve denek grubunun gebelik süresinin önemli derecede daha uzun olduğu gözlenmiştir. Sonuçta; diklofenak sodyumun desidual defekte neden olabileceği sonucu düşünülmüştür (Kökçü ve ark., 1992). Çalışmamızda fetüs sayısına bakılmadı ancak, 1mg/kg diklofenak sodyumun, ovaryum primordiyal folikül sayısına etkisine bakılmış ve primordiyal folikül sayısının değişmediği gözlenmiştir. Çalışmamızdan farkı hem fetüs sayısı hem de stereolojik yöntemlerin kullanılmadığı söylenebilir.

Başka bir çalışmada ise; primordiyal ve primer foliküller optik ve fiziki disektör metodları ile bağımsız olarak sayılmıştır. Primordiyal foliküller 1930 ± 286 ve 2227 ± 101 iken, primer foliküller ise 137 ± 125 ve 265 ± 32 olup, 70 ve 100 günlük yaşlarda her ovaryuma düşen hesaplamalardan seri kesitlerin tam hesaplanması ile sekonder ve daha sonraki foliküllerin sayımı 100 günlüklerde her ovaryuma 135 adet düştüğü hesaplanmıştır. Bizim çalışmamızda ise; primordiyal folikül sayıları denek grubunda; 3493 ± 718 , sham grubunda; 3251 ± 1186 , ve kontrol grubunda; 2453 ± 1021 bulunmuştur. Çalışmamızdan farkı sadece sıçanların yaşları ve ilaç kullanılmamış olmasıdır (Myers 2003-2004).

Prenatal diklofenak sodyum uygulamasının ovaryumlar üzerine morfometrik etkilerini araştıran bir çalışmaya tarafımızdan rastlanılmadı. Dolayısıyla ovaryum dokusunun total hacmi ve primordiyal folikül sayımı ile ilgili olarak çalışmamızın dünya bilgileri için yeni olduğu söylenebilir. Çalışmamızda doğruluğu tartışmasız kabul gördüğünden, stereolojik metodlar kullanıldı. Stereolojik metotlar, doku ve yapıların geometrik analizini ifade eden ve iki boyutlu kesitlerden yapıların yoğunluk, sayı, hacim vb. gibi nicelikleri tarafsız bulmayı sağlayan metotlardır (Kaplan ve ark., 1994).

Özetle Sonuçlar;

Prenatal dönemde sıçanlara uygulanan (1mg/kg) diklofenak sodyumun, postnatal 20 haftalık sıçan ovaryumlarının, total doku hacmi ve primordiyal folikül sayıları üzerine etkileri stereolojik yöntemlerle araştırıldı. Denek, sham ve kontrol gruplarının, total doku hacimleri, Cavalieri prensibi ile hesaplandı ve sonuçlar karşılaştırıldı. Denek ve sham grubunun total hacim oranlarının, kontrol grubu total hacim oranlarına oranla artış gösterdiği tespit edildi. Değerler istatistikî yönden anlamlı bulundu ($P<0,05$). Ayrıca postnatal 20 haftalık yavru sıçanların, gruplara ait total primordiyal folikül sayıları stereolojik yöntemler kullanılarak sayıldı ve karşılaştırıldı. Sonuçlarda minimal farklılıklar tespit edilmesine rağmen istatistiki yönden anlamlı bir fark bulunmadı ($P>0,05$). Bunun sebebinin düşük doz (1mg/kg) kullanılmasından kaynaklı olabileceğini düşünmekteyiz. İleri çalışmalar için daha yüksek dozların kullanılmasının yanı sıra elektron mikroskopik follikül mitokondrionları volümünün stereolojik olarak araştırılmasını önerebiliriz.

ÖZET

Kaptan Parıltı E, Gebe sıçanlara uygulanan prostaglandin sentez inhibitörü diklofenak sodyumun postnatal ovaryum morфометrisine etkilerinin stereolojik yöntemlerle araştırılması. Y.Y.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Van, 2011. Diklofenak sodyum, analjezik, antiinflatuar ve antipiretik etkili bir ilaçtır. Gebelikte kullanılması halinde plasental bariyeri aşarak fötüsü etkilemekte ve gebelik süresinin uzamasına neden olmaktadır. Ovaryumlar dişi üreme hücresini (ovum) ve dişi üreme sistemi hormonlarını salgılayan organdır. Çalışmamızın amacı gebe sıçanlara uygulanan diklofenak sodyumun doğum sonrası 20 haftalık yavruların ovaryum morфометrisi üzerine etkilerinin stereolojik yöntemlerle araştırılmasıdır. İlk olarak, bir gece boyunca sıçanlar çiftleşmeye bırakıldı. Çiftleşmenin ertesi günü vaginal plak gözlenen dişi sıçanlar, gebeliğin sıfırıncı günü olarak kabul edildi. Hayvanlar normal ışık ve karanlık siklusu ile 21 ± 2 °C normal diyetle takibe alındı. Denek ve kontrol grubuna enjeksiyon gebeliğin beşinci gününde başlandı, 15gün süreyle hergün 1mg/kg diklofenak sodyum ve serum fizyolojik olmak üzere uygulandı. Postnatal 28. günde (3-4 hafta arası) yavruların erkek ve dişileri ayrılarak farklı kafese alındı. Çalışmamızda denek, sham ve kontrol gruplarında 6' şar adet Wistar albino cinsi olmak üzere toplam 18 adet sıçan kullanılmıştır. Gruplar 20 haftalık olunca derin anestezi altında perfüzyona alınarak sağ ovaryumları çıkarıldı ve rutin histolojik takip metodlarından sonra parafine gömüldü. Dokulardan belirli aralıklarla 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. İlk kesit rastgele seçildi, her 40. kesit çifti alındı. Kesitler, Masson trikrom ile boyandı ve Cavalieri prensibinin modifiye metodu kullanıldı. Total doku hacimleri noktalı alan ölçüm cetveli ile ölçüldü. Stereolojik inceleme sonucu, gebelikte uygulanan diklofenak sodyumun postnatal 20 haftalık denek ve sham grubu ile karşılaştırıldığında, kontrol grubu total doku hacimlerinin arttığı gözlemlendi. Değerler istatistiki açıdan anlamlı bulundu ($P<0,05$). Grupların total primordiyal folikül sayısının değişmediği tespit edildi. Değerler istatistiki açıdan anlamlı bulunmadı ($P>0,05$).

Anahtar kelimeler: Diklofenak sodyum, gebelik, sıçan, stereoloji, ovaryum, primordiyal folikül.

SUMMARY

Kaptan Parıltı E, Inhibitor of prostaglandin synthesis in pregnant rats administered diclofenac sodium stereological methods to investigate the effects of postnatal ovarian morphometry. Yuzuncu Yıl University, Institute of Health Sciences, Master Thesis in Department of Medical Histology and Embryology, Van, 2011. The diclofenac sodium is analgesic, antiinflammatory and antiparetic a drug. During pregnancy, diclofenac sodium extends the pregnancy and the birth and since it can cross the placenta barrier it affects the fetus ovaries secrete the female reproductive cell(ovum) and the hormones of female reproductive system. The aim of our study was to investigate the effects of prenatally applied diclofenac sodium on the morphometry of the 20 week young ovaries by stereological methods. First, the rats were left overnight to mate. The next day when vaginal plaques were observed was considered as the day '0' of the pregnancy. Animals were kept in a room with normal light and dark cycles ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$) and fed with normal diet. The injections in the control (SF) and the experimental group (1cc; 1mg/kg) were started on the fifty day of pregnancy and applied for 15 days. On the postnatal 28th day (between 3-4 weeks) the male and female offspring were separated into different cages. In our study, 18 female Wistar albino rats were used in the experimental, sham and control groups each having 6 rats. When the animals are 20 weeks young they were perfused under deep anesthesia and the ovary in to and embedded in paraffin after routine histological procedures. Tissue sections of about 5 microns thick were taken at regular intervals. The first section was chosen at random and every 40th section pairs were taken. Sections were stained with masson trichrome. Modified method of Cavalieri's principle was used for stereological analysis. total tissue volumes were measured with pointed field scale. When the subjects exposed to diclofenac sodium during pregnancy were compared with control group at 20 weeks postpartum, there was significant differences regarding total tissue volume and there were no significant differences regarding number of primordial follicles with stereological analysis ($P>0.05$).

Key Words: Diclofenac sodium, pregnancy, rats, stereology, ovary, primordial follicles.

KAYNAKLAR

Ackermann U, Basc, Masc, PhD (2006). PDQ Fizyoloji, 1.Baskı (Çeviri) Yeğen B.Ç, Kurtel H, Alican İ, İstanbul Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı. 447-453, İstanbul Medikal Yayıncılık.

Akman Ş, Göğüş A, Şener N, Bilgiç B, Aksoy B (2001). Sıçan tibia kırıkları sonrası uygulanan diklofenak sodyumun kırık kaynaması üzerine etkisi. Hacettepe ortopedi dergisi 11,2, -55

Bancroft JD, Gamble M (2008). Theory and Practice of Histological Techniques, Churchill Livingstone Elsevier, China, 68-69.

Brooks PM, Needs C (1985). Antirheumatic medication in pregnancy (letter). Br J Rheumatol, 24 (4), 382.

Brooks PM. (1988). Side effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. Med J; 148: 248- 51.

Boehm FH., ve Acker D. (1978). Prevention and treatment of premature labor. In: Sciarra Gynecolgy and Obstetrics Vo 12 Chap 31. New York: Harper and Row Publishers, 1-12.

Canan S, Şahin B, Odacı E, Ünal B, Aslan H, Bilgiç S, Kaplan S (2002). Toplam hacim, hacim yoğunluğu ve hacim oranlarının hesaplanmasında kullanılan bir stereolojik yöntem, Cavalieri Prensibi. Türk Hekimler Birliği Vakfı Türkiye Klinikleri Tıp bilimleri Dergisi Özel Sayısı, Stereolojide Temel Kavram ve Yöntemler. Cilt: 22, Sayı: 1 (Ek) Sayfa 7-14.

Carp HJA, Fein A, Nebel L (1988). Effect of diclofenac on implantation and embryonic development in the rat. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 28, 273-7.

Chan LY, Chiu PY, Siu SSN, Lau TK (2001). A study of diclofenac-induced teratogenicity during organogenesis using a whole rat embryo culture model department of obstetric and gynaecology, prince of Wales Hospital, the Chinese University of Hong Kong Shatin, Hong Kong. To whom correspondence should be addressed at: Department of Obstetric Gynaecology, Prince of Wales Hospital, The Chinese University of Hong Kong, Shatin, Hong Kong. Human Reproduction Vol,16 No,11 pp, 2390-2393.

Chen Q., Shinohara N., Abe T., Watanabe T., Nonomura K., Koyanagi T. (2004). Significance of COX-2 expression in human renal cell carcinoma cell lines. Int J Cancer, 108:825-832.

Clark K. Prostaglandins and the reproductive cycle. In: Sciarra JJ, ed. Gynecology and Obstetrics. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1987: Vol. 5, Chap. 42:1-14.

Cotran RS., Kumar W., Robbins SL. (1999). Pathologic of Basis Disease. Philadelphia, W. B. Saunder Co. pp: 549-550.

Disaia PJ, Clinical Anatomy of the Female Genital Tract in 6th Ed, Danforth's Obstetrics and Gynecology, 7th Ed, St.Louis ,J.B.Lippincott Company, 1994,(1),1-9.

Dişel U, (2005). Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı Meme kanserinde siklooksijenaz-2 ve klinikopatolojik parametreler ile ilişkisi. Yan Dal Uzmanlık tezi, Adana, 2005.

Ferner H, Staubcsant J, Sobotta Atlas of Human Anatomy, Vol.2, Munchen, 1982.

Gökçimen A ve Malas MA (2003). Nonsteroidal anti-inflamatuvar ilaçların gebelikteki toksisite ile ilgili literatürlerin gözden geçirilmesi. Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 10-(3), 50 - 52.

Gundersen H.J, Bendtsen T.F, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengard J.R, Pakkenberg B, Sorensen F.B, Vesterby, A, West MJ (1988). Some new, simple, efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. Apmis, 96,379-394

Gundersen, H. J., Jensen, E.B. (1987). The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. J, Microscopy, 1147, 229-263.

Guyton AC, Hall JE (1986). Çeviri, Çavuşoğlu H, Yeğen B.Ç, Gökhan N, İTextbook of Medical Physiology Tıbbi Fizyoloji 7. Baskı Nobel Tıp Kitpevi, W.B, Saunders Company,(1401-1402).

Hashimoto Y, Kondo Y, Kimura G, Matsuzawa I, Sato S, Ishizaki M, Imura N, Akimoto M, Hara S (2004). Cyclooxygenase-2 expression and relationship to tumour progression in human renal cell carcinoma, Histopathology, 44: 353-359.

Howard, C.V., Reed, M.G. (1998). Unbiased Stereology, three-dimensional measurements in microscopy (pp. 39-68). Oxford: BIOS Scientific Publishers

Junqueira LC, Carneiro J (2006). (çeviri: Aytekin Y, Solakoğlu S.) Temel Histoloji Nobel Tıp Kitapevi Çeviri İstanbul, 450-456.

Kaplan S, Rağbetli M.Ç, Bilgiç S, Balat Ö, Çiftçi N, Kökçü A, (1994b). The Effects of Diclofenac Sodium on Umbilical Cord Length, Umbilical Cord Vessel Diameters, Placental Weight and Fetal Weight. Tr. J, of Medical Sciences, 20 (1994): 155-157

Kaplan S, Canan S, Şahin B, Ünal B, (1997). Stereolojik Metodlar ve Uygulamaları Kursu Notları. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Samsun.

Kaplan S., Rağbetli M.Ç., Bilgiç S., Balat Ö., Çiftçi N., Kökçü A. (1994b). The Effects of Diclofenac Sodium on Umbilical Cord Length, Umbilical Cord Vessel Diameters, Placental Weight and Fetal Weight. Tr. J. of Medical Sciences 20 (1994): 155-157

Kaplan S, Çiftçi N, Korkmaz A, Rağbetli M.Ç, Bilgiç S, Balat Ö, Erdiñ N (1994a). Fötal yaşamda uygulanan nonsteroidal antiinflamatuvar ilacın postnatal dönemde akciğer kapiller sayısına etkilerinin araştırılması O.M.Ü. Tıp Dergisi 11(2): 97-100.

Kayaalp O (2009). Oğuz Kayaalp Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji 32.yıl 12. Baskı 2. cilt sayfa 854.

Kennedy TG (1997). Evidence for role for prostaglandins the initiation of blastocist implantation in the rat Biol Reprod; 16: 286-91.

Kökçü A, Üstün C, Çokşenim Ş, Balat Ö (1992). Gebe sıçanlara uygulanan diklofenak sodyumun fetüs sayısı ve gebelik süresine etkisi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastalıkları ve Doğum ABD, Samsun T Klin Jineköl Obst, 2, 295-297.(1).

Moore L K ve Persaud TVN (2002). Systema Skeletale ve Ekstremiteler. The Developing Human Clinically Oriented Embryology. Çev. Editörü; Yıldırım M, Okar İ, Dalcı H. İstanbul Nobel Tıp Kitapevi. 6. Baskı: 329-30, 109-10

Moore K. Clinically Oriented Anatomy, 2nd Ed., Baltimore: Williams and Wilkins, 1985.

Morgan G. (1996). Non-steroidal anti-inflammatory drugs and the chemoprevention of colorectal and nonaspirin oesophageal cancers. Gut, 38: 646-648..

Myers M, Britt K L, Wreford N G M, Ebling F J P and Kerr J B (2003-2004), Correspondence should be adressed to J Kerr, Department of Anotomy and and Cell Biology, School of Biomedical Sciences, Bulding 13C Fakulty of Medicine, Monash University, VIC 3800, Australia.

Nieibly JR., Blake DA., White RD. (1980). The inhibition of human premature labour by indomethacin. Am J Obstet Gynecol 136:1014-9.

Odacı E, Korkmaz A, Ayas B, Rağbetli MÇ, Çiftçi N (2001). Prenatal Dönemde Uygulanan diklofenak sodyumun, postnatal dönemde sıçanın eklem kıkırdak dokusuna etkisi. Türkiye klinikleri tıp bilimleri dergisi, 21, 278-281.

Ostenson M., Ramsey -Goldman R. (1998). Treatment of inflammatory rheumatic disordersin pregnancy: what are the safest treatment options? Drug Saf 389-410

Ommaty R (1988). Vademecum 98 Modern İlaç Rehberi.: Feryal Matbaası. Sayfa 1084-5, Ankara.

Ommaty R. (2009). Vademecum Modern İlaç Rehberi 21. yıl Sayfa: 1440

Pakrasi PL, ve Dey SK, (1982). Blastocyst is the source of prostagladins in the implantation site in the rabbit. Prostaglandins: 24; 72-7.

Persaud TVN ve Moore KL (1974). Inhibitors of prostaglandin synthesis and fetal development.Lancet i:93.

Rağbetli MÇ., Kaplan S., Korkmaz A., Albayrak D., (1996). Fötal yaşamda uygulanan diklofenak sodyumun postnatal 20 haftalık erkek sıçan hipokampusunun tabaka kalınlığına etkisi. Tr. J. of Biology 21 (1997) 299-305.

Ragbetli Ç., Aydınlioglu A., Kara M., Ragbetli MÇ., İlhan F. (2009a). Effects of diclofenac sodium on the rat liver in postnatal period Journal of Animal and Veterinary Advances 8 (9): 1761-1764.

Rağbetli Ç, İlhan F, Aydınlioğlu A, Kara M, Rağbetli M Ç (2009b). A histological investigation concerning the effects of diclofenac sodium to the lung in 4- and 20-week-old rats treated prenatally. The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine Early Online, 1-5.

Ross MH, Reith E J, Romrell LJ. Histology a text and atlas. Philadelphia: Williams and Wilkins, 1989:679-82.

Russel JG (1986). Antirheumatic medication in pregnancy (letter). Br J Rheumatol 25 (2), 229.

Sadler T W (1996). Langman Medical Embriyology Palme Yayıncılık (çeviri Başaklar CA).4-29. Ankara.

Süzer Ö. (2005). Süzer Farmakoloji 3 Baskı klinisyen Tıp Kitabevi Sayfa 515-516.

Ünal B., Aslan H., Canan S., Şahin B., Kaplan S. (2002). Biyolojik ortamlardaki objelerin sayımı yapılırken kullanılan eski (tarafı) metodların önemli hata kaynakları ve Çözüm önerileri. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi Cilt 22; 1-6 Sayı 1 Şubat

Üstün C., Kökçü A.,Çokşenim Ş., Kandemir B. (1992). Sıçanlarda, Prostoglandin Sentez İnhibitörü Diklofenak Sodyum'un Ovarian Follikulogenezis Üzerine Etkisi

Ondokuzmayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD, Samsun.
T Klin Jineköl Obst 1993, 3: 70-72.(2).

Waissmann G (1991). Aspirin, Sci Am, 264, 84-90.

Wallach E, Zacur H. The endocrine physiology of reproduction (Adrenal, Thyroid, Prostaglandins, Pineal). In: Scott JR, ed. Danforth's Obstetrics and Gynecology. Philadelphia: JB Lippincott Company 1990: Vol. 5, Chap 39: 787-805.

www.novartis.com.tr - Novartis (03.02.2010)

<http://www.goktepeliler.com>.forum/insan.

(www.belgeler.com insan üreme sistemi).

ÖZGEÇMİŞ

Esra KAPTAN PARILTI 1982’de ADANA’da doğdu. İlköğretimi Kozan’da, lise öğrenimini ise Osmaniye’de tamamladı. 2006 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ebelik bölümünden mezun oldu. 2008 Şubat ayında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. Van da çeşitli hastanelerde ve sağlık ocaklarında çalıştı. Halen Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi’nde çalışmaktadır. Evlidir.