

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**( YÜKSEK LİSANS TEZİ )**

**ORAL KONTRASEPTİFLERİN OVARYUM MATRİKS  
METALLOPROTEİNAZLARI İLE ETKİLEŞİMLERİNİN  
MORFOLOJİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

**MİNE GÜLTOMRUK**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. SEYHUN SOLAKOĞLU**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI**

**İSTANBUL-2009**

## TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

07 / 07 / 2009

Prof.Dr.Emine Kökoğlu  
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
 Program Adı : Histoloji ve Embriyoloji Yüksek Lisans Programı  
 Programın seviyesi : Yüksek Lisans  Doktora   
 Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji AD  
 Tez Sahibi : Mine GÜLTOMRUK  
 Tez Başlığı : Oral Kontraseptiflerin Ovaryum Matriks Metalloproteinazları ile Etkileşimlerinin Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi.  
 Sınav Yeri : İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD  
 Sınav Tarihi : 07 / 07 / 2009

### Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

- 1.Prof.Dr.Seyhun SOLAKOĞLU-(Danışman) İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
- 2.Prof.Dr.Yurdağül CANBERK-İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
- 3.Prof.Dr.SUZAN DAĞLIOĞLU-İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
- 4.Prof.Dr.Leyla TAPUL-İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
- 5.Doç.Dr.Meral KOYUTÜRK-İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Mine GÜLTOMRUK



## İTHAF

*Herzaman minnetar olduğum ve çok sevdiğim aileme ithaf ediyorum.*

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim sürecinde; derslerimde, tez konumun belirlenmesi ve yürütülmesinde, her zaman her konuda değerli bilgileriyle bana yol gösteren, yardım, destek ve sabrını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Seyhun SOLAKOĞLU'na, derslerimiz ve tez çalışmalarımızla ilgili her konuda bizlere yardımcı olan ve destekleyen İstanbul Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Yurdagül CANBERK'e ve öğretim üyesi hocalarım Sayın Prof. Dr. Ayhan BİLİR, Prof. Dr. Leyla TAPUL ve Doç. Dr. Bülent AHİSHALI'ya, ihtiyaç duyduğum her anda yardımları ve manevi desteklerini esirgemeyen aynı yolu birlikte yürüdüğümüz sevgili arkadaşlarım Biy. Nilay ŞAHİNARSLAN, Araş. Gör. Tuğba KOTİL ve Biy. Türkan SARIOĞLU'na, çalışmamdaki teknik konularda bana her zaman yardımcı olan anabilim dalı personeli Sayın Selahattin ÜNAL'a, elektron mikroskopi çalışmalarımıdaki yardımlarından dolayı Sayın Biy. Ebru KARABULUT ve diğer anabilim dalı çalışanlarına, hayvan deneylerimi gerçekleştirirken teknik yardımlarından dolayı DETAE personeli Sayın Hasan YILDIZ ve diğer çalışanlara, eğitim hayatımda maddi, manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyip her zaman yanımda olan, sabır ve yardımlarını esirgemeyen sevgili annem Meliha GÜLTOMRUK, sevgili babam Osman GÜLTOMRUK ve sevgili ablam Meral GÜLTOMRUK'a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1742

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	<b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b>
BEYAN .....	İİ
İTHAF .....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLolar LİSTESİ .....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	Xİ
ÖZET.....	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Oral Kontraseptifler .....	3
2.1.1. Levonorgestrel ve Etinil Östradiol.....	6
2.2. Ovaryumlar.....	7
2.3. Ovulasyon .....	11
2.4. Matriks Metalloproteinazlar (MMP) .....	12
2.5. Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü (VEGF).....	16
2.6. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF).....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
3.1. Hayvan Deneyi Uygulaması.....	18
3.2. Işık Mikroskobu Takibi.....	19
3.2.1. Histokimyasal Boyalar .....	19
3.2.1.1. Hematoksilen & Eozin (H&E):.....	19
3.2.1.2. Masson Trikrom: .....	20
3.2.1.3. Periyodik Asit Schiff (PAS): .....	20
3.2.2. İmmünohistokimya Uygulaması.....	21
3.2.2.1. MMP-2, MMP-9, VEGF, FGF İşaretleme si.....	21
3.2.2.2. BrDU İşaretleme si.....	22
3.3. Elektron Mikroskobu Takibi .....	24

3.4. İstatistiksel Analiz .....	24
3.5. Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar .....	25
3.5.1. Kullanılan Malzemeler .....	25
3.5.2. Kullanılan Cihazlar .....	25
4. BULGULAR .....	26
4.1. Işık mikroskobu bulguları: .....	26
4.2. İmmünohistokimya bulguları: .....	31
4.2.1. FGF .....	31
4.2.2. MMP-2 .....	31
4.2.3. MMP-9 .....	32
4.2.4. VEGF .....	32
4.2.5. BrdU .....	33
4.3. Elektron Mikroskobu Bulguları:.....	45
5. TARTIŞMA .....	51
KAYNAKLAR .....	57
ETİK KURUL KARARI .....	62
ÖZGEÇMİŞ .....	63

**TABLULAR LİSTESİ**

Tablo 4-1: Deney ve kontrol grubunda histokimyasal boyama ile saptanan atretik folikül sayıları. ....	26
Tablo 4-2: FGF, MMP-2, MMP-9 ve VEGF immünohistokimya uygulamalarımız sonucu kontrol ve deney gruplarına ait bulgulara ait genel özellikler. ....	34
Tablo 4-3: Kontrol ve deney gruplarına ait Granüloza hücreleri BrdU sayım sonuçları. ....	34
Tablo 4-4: Kontrol ve deney gruplarına ait stroma hücreleri BrdU sayım sonuçları.....	34

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4-1: Kontrol (a) ve deney (b) grupları ovaryum morfolojisi genel görüntüsüne ait ışık mikroskopu fotoğrafı. Hematoksilen – eozin (x4).....	27
Şekil 4-2: Kontrol (a) ve deney (b) gruplarında ovaryumdaki bağ dokusu dağılımını gösteren ışık mikroskopu fotoğrafı. Masson trikrom (x10).....	28
Şekil 4-3: Kontrol (a) ve deney (b) grupları ovaryum dokusu genel görüntüsüne ait ışık mikroskopu fotoğrafı. PAS (x4).....	29
Şekil 4-4: Kontrol (a) ve deney (b) grupları ovaryum dokusu atretik foliküllerin görüntüsüne ait ışık mikroskopu fotoğrafı. PAS (x10) .....	30
Şekil 4-5: Kontrol (a) ve deney (b) grupları ovaryum dokusu FGF immünohistokimya boyamasının genel görüntüsünü gösteren ışık mikroskopu fotoğrafı. (x10) .....	35
Şekil 4-6: Kontrol (a) ve deney (b) grupları ovaryum dokusu interstisyel glandüler hücreler ve diğer bağ dokusu hücrelerinde FGF immünohistokimya boyamasını gösteren ışık mikroskopu fotoğrafı. (x40) .....	36
Şekil 4-7: Kontrol (a) ve deney (b) grupları ovaryum dokusu MMP-2 immünohistokimya boyamasının genel görüntüsünü gösteren ışık mikroskopu fotoğrafı. (x10) .....	37
Şekil 4-8: Kontrol (a) ve deney (b) grupları ovaryum dokusu interstisyel glandüler hücreler ve diğer bağ dokusu hücrelerinde MMP-2 immünohistokimya boyamasını gösteren ışık mikroskopu fotoğrafı. (x40) .....	38
Şekil 4-9: Kontrol (a) ve deney (b) grupları ovaryum dokusu MMP-9 immünohistokimya boyamasının genel görüntüsünü gösteren ışık mikroskopu fotoğrafı. (x10) .....	39
Şekil 4-10: Kontrol (a) ve deney (b) grupları ovaryum dokusu interstisyel glandüler hücreler ve diğer bağ dokusu hücrelerinde MMP-9 immünohistokimya boyamasını gösteren ışık mikroskopu fotoğrafı. (x40) .....	40
Şekil 4-11: Kontrol (a) ve deney (b) grupları ovaryum dokusu VEGF immünohistokimya boyamasının genel görüntüsünü gösteren ışık mikroskopu fotoğrafı. (x10) .....	41
Şekil 4-12: Kontrol (a) ve deney (b) grupları ovaryum dokusu interstisyel glandüler hücreler ve diğer bağ dokusu hücrelerinde VEGF immünohistokimya boyamasını gösteren ışık mikroskopu fotoğrafı. (x40) .....	42

Şekil 4-13: Kontrol (a) ve deney (b) grupları ovaryum dokusu granüloza hücrelerinde sentez fazındaki hücrelerin BrdU immünohistokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. (x100).....	43
Şekil 4-14: Kontrol (a) ve deney (b) grupları ovaryum dokusu interstisyel glandüler stroma ve diğer bağ dokusu hücrelerinde sentez fazındaki hücrelerin BrdU immünohistokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. (x100).....	44
Şekil 4-15: Kontrol grubunda ovaryum stromasında bulunan hücrelerin ince yapı özelliklerini gösteren elektron mikroskobu fotoğrafı. (a ve b) (x5000).....	46
Şekil 4-16: Deney grubunda stromada gözlenen apoptotik hücreler (a) ve organel düzeyinde ödem ve vakuolleşmeyi (b) gösteren elektron mikroskobu fotoğrafı. (a: x7500, b: x15000) .....	47
Şekil 4-17: Deney grubunda DER sisternalarında meydana gelen genişlemeye bağlı vakuolizasyon (a) ve mitokondri inklüzyonlarını (b) gösteren elektron mikroskobu fotoğrafı. (a: x6000, b: x12000) .....	48
Şekil 4-18: Deney grubunda stromal glandüler hücrelerin salgı granüllerinde meydana gelen değişiklikleri gösteren elektron mikroskobu fotoğrafı (a ve b). (a ve b : x5000).....	49
Şekil 4-19: Deney grubunda stromal glandüler hücrelerde dejenere salgı granülleri (a) ve fagositik hücreleri (b) gösteren elektron mikroskobu fotoğrafı. (a: x5000, b: x7500) .....	50

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

- bFGF: Bazik fibroblast büyüme faktörü  
BrdU: 5-Bromo-2'-deoksiuridin  
DER: Düz yüzlü endoplazma retikulumu  
ECM: Hücre dışı matriks  
FGF: Fibroblast büyüme faktörü  
FSH: Folikül stimulan hormon  
GnRH: gonadotropin salgılatıcı hormon  
LH: Luteinizan hormon  
MMP: Matriks metalloproteinaz  
PAS: Periyodik asit Schiff  
PBS: Fosfat tamponlu serum fizyolojik  
PDGF: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü  
TIMP: Matriks metalloproteinazların endojen doku inhibitörleri  
TNF-  $\alpha$ : Tümör nekroze edici faktör  $\alpha$   
VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktör

## ÖZET

Gültomruk M. Oral kontraseptiflerin ovaryum matriks metalloproteinazları ile etkileşimlerinin morfolojik olarak değerlendirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Programı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2009.

Güncel olarak kullanılmakta olan doğum kontrol preparatlarının bileşiminde bulunan progesteron ve östrojen kombinasyonunun ovaryum stromasında yer alan hücrelerde oluşturabilecekleri etkileri ağırlıklı olarak matriks metalloproteinazları (MMP) ve bazı büyüme faktörleri düzeyinde araştırmayı hedefledik.

Çalışmamızda, 20 adet balb/c cinsi dişi fare kullanılarak 2 grup oluşturuldu. Kontrol grubunda bulunan farelere hiçbir uygulama yapılmazken deney grubunu oluşturan 10 adet fareye 21 gün süreyle 20 µg östrojen (etinil östradiol) ve 90 µg progesteron (levonorgestrel) gavaj yoluya verildi. Deney sonunda, MMP-2, MMP-9, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve hücre proliferasyonuna yönelik immünohistokimyasal, histokimyasal ve ince yapı düzeyinde araştırma protokolleri uygulandı. Yapılan histolojik değerlendirmede deney grubunda atretik folikül sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu, bunun dışında hücrelerde morfolojik olarak bir değişiklik meydana gelmediği izlendi. İmmünohistokimya çalışmalarında ovaryum stroması ve folikül yapılarında MMP-2 ve bFGF işaretlenme derecelerinde bir fark olmadığı, MMP-9'da stromaya ait glandüler hücrelerde boyanma derecesinde artış, VEGF'de ise stromaya ait glandüler hücrelerde ve luteal dokuda boyanma derecesinde azalma olduğu gözlemlendi. Sentez fazındaki hücreleri belirlemek amacıyla yapılan 5-Bromo-2'-deoksiuridin (BrdU) işaretlemesi ile deney grubunda kontrol grubundan farklı olarak ovaryum stromasında boyanmanın olmadığı ve foliküle ait granüloza hücrelerinin proliferasyon indeksinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğu izlendi. Elektron mikroskopik inceleme sonucunda deney grubu stromasında bulunan glandüler hücrelerde salgı granül içeriğinde ve morfolojisinde bozukluklar meydana geldiği izlendi. Ayrıca stromal hücrelerde yer yer hidropik dejenerasyon, mitokondri inklüzyonları ve fagositik hücre sayısında da artış gibi çeşitli dejeneratif değişiklikler meydana geldiği belirlendi.

Çalışmamızda ovaryumda levonorgestrel ve etinil östradiol kombinasyonunun fizyolojik düzeyin ötesinde etkiler oluşturabileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Ovaryum stroması, oral kontraseptifler, matriks metalloproteinazlar, immünohistokimya, elektron mikroskopisi.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1742

## ABSTRACT

Gultomruk M. Morphological evaluation of oral contraceptives and ovarian tissue matrix metalloproteinase interactions. Istanbul University Institute of Health Science, Histology and Embriology Programme. Master Thesis. Istanbul. 2009.

We aimed to search the effect of progesterone and estrogen combination which is used in current birth control pills, on the cells of ovarian stroma, especially from the aspect of matrix metalloproteinases (MMP) and certain growth factors.

In our study 20 balb/c female mice in 2 groups were used. Any treatment were applied in the control group and 20 µg estrogen (ethinyl estradiol) and 90 µg progesterone (levonorgestrel) were applied for 21 days to ten mice in experiment group by gavage. At the end of the experiment period, immunohistochemical staining protocols for MMP-2, MMP-9, vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) and S-phase detection via 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) assay, histochemical protocols and ultrastructural evaluation performed. In histological assessment, no morphological differences in ovaries between two groups were detected, except significant increase in follicular atresia in experiment In immunohistochemical assays there was no difference in MMP-2 and bFGF staining in ovarian stroma and follicles in both groups and an increase in MMP-9 staining in glandular cells of stroma and decrease in VEGF staining in glandular cells of stroma and luteal tissue were observed. To determine the proliferation BrdU labelling was applied. In experiment group no labelling in ovarian stroma and decrease in numbers of proliferating granulosa cells was statistically different from control group. Electron microscopic examination revealed alterations in both quantity and quality of secretory granules in interstitial glandular cells. Furthermore degenerative changes such as autophagic vacuoles and swelling in membrane bound organelles, mitochondrial inclusions and phagocytic cells were more prevalent in experiment group.

We concluded that the effects of levonorgestrel and ethinyl estradiol combination may have results beyond physiological level.

**Key Words:** Ovarian stroma, oral contraceptives, matrix metalloproteinases, immunohistochemistry, electron microscopy.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 1742

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Oral kontraseptifler, östrojen ve progesteron kombinasyonu olarak 1950'lerde ovulasyonu ve implantasyonu bloke ettiklerinin bulunmasının ardından her geçen gün kullanım oranları artan doğum kontrol preparatlarıdır (2). Ülkemizde de rahim içi araçlardan sonra en çok kullanılan yöntem oral kontraseptiflerdir ve yaygın olarak kullanılan oral kontraseptif kombinasyonları içinde östrojen bileşeni olarak etinil östradiol, progesteron bileşeni olarak ise levonorgetrel bulunmaktadır (16). Oral kontraseptifler kontrasepsiyon için etkili bir yöntem olması dışında terapötik olarak pek çok yararlı etki de sunmaktadır (47).

Dişi üreme sistemi içinde her over ve menstrüasyon döngüsünde ovaryum ve uterusun hücre dışı matiks (ECM) ve stroma yapılarında çok kapsamlı değişiklikler meydana gelir (8). Ovaryumun işlevi olan hormonların sentezi ve oositlerin üretimi dokunun dinamik, kapsamlı ve döngüsel biçimde yeniden modellenmesini gerektirmektedir. Ovaryumda bu değişiklikler folikül gelişimi, folikül duvarının yıkılması ve oositin serbest kalması, korpus luteum oluşması ve gerilemesi süreçleridir (19). Ovaryum ECM yapısında meydana gelen bu değişiklikleri kontrol eden sistemler içinde matiks metalloproteinazlar (MMP) önemli bir grup oluşturmaktadırlar (8).

MMP'ler insanlarda 23 farklı üyeden oluşan bir gen ailesidir. Yapıları ve substrat özgüllüklerine göre kollajenazlar, jelatinazlar (MMP-2 ve MMP-9), stromelisinler, zar tip MMP'ler ve diğerleri olmak üzere beş alt grupta sınıflandırılırlar (41). Endotelial hücre invazyonu, anjiyogenez, tümör progresyonu, hücre göçü ve çoğalması, apoptoz gibi pek çok biyolojik ve patolojik süreçte önemli rolleri vardır (19).

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), özellikle endotel hücreleri için özgül etkilere sahip olan multifonksiyonel bir büyüme faktörü ailesidir ve vücutta ovaryum folikülleri, korpus luteum hücreleri ve Leydig hücreleri de dahil olmak üzere birçok farklı hücre tipi tarafından sentezlenir. Endotel hücreleri için önemli bir mitojen olan ve migrasyon etkisine sahip bu faktör, fizyolojik olarak ovulasyondan hemen önce ovaryum foliküllerinden salgılanarak yeni damarların oluşumunu artırır (50, 51).

Fibroblast büyüme faktörü (FGF) hücre çoğalması ve göçü, embriyogenez, morfogenez, implantasyon gibi pek çok süreçte rol oynayan, heparin bağlı, çok fonksiyonlu polipeptidlerdir (49). Ovaryumda folikül gelişimi ve dominant folikül seçiminde önemli olan anjiyogenez, VEGF ve FGF uyarısı ile gerçekleşir (46).

Dışarıdan verilen hormonların organ ve doku düzeyindeki klinik etkileri iyi bilinmekle birlikte dokuyu oluşturan yapısal bileşenler arasındaki etkileşimleri araştıran çalışmaların sayısı sınırlıdır. Çalışmamızda, güncel olarak kullanılmakta olan doğum kontrol preparatlarının bileşiminde bulunan progesteron ve östrojen kombinasyonunun ovaryum stromasında yer alan hücrelerde oluşturabilecekleri etkileri matriks metalloproteinazlar, çeşitli büyüme faktörleri ve hücre kinetiği düzeyinde araştırmayı hedefledik. Bu amaçla yaygın olarak kullanılan oral kontraseptif preparatlarında bulunan levonorgestrel ve etinil östradiol kombinasyonunun ovaryumun folikül dışı bileşenlerindeki olası düzenleyici işlevleri, bu işlevlerin folikül ile etkileşimleri ve hücre proliferasyonu düzeyindeki etkileri fare ovaryum stromasına odaklanılarak histolojik ve immünohistokimyasal boyama teknikleri ve ince yapı düzeyinde incelenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Oral Kontraseptifler

Kontrasepsiyon; koitus olmasına rağmen gebeliğin önlenmesidir. Kadınlarda etkili bir kontrasepsiyon sağlanabilmesi için üreme fizyolojisinde üç noktada müdahale söz konusudur.

1. Ovulasyonun baskılanması (hormonal kontrasepsiyon)
2. Oosit fertilizasyonunun farklı yöntemlerle önlenmesi (ritim ve bariyer metodları)
3. Oosit fertilize olmuş ise implantasyonun önlenmesi (rahim içi araç) (53).

1950'lerde progesteronun ovulasyonu engellediğinin bulunması ve takiben kombine oral kontraseptif ilaçların geliştirilmesi, insanda üreme kontrolünün kilometre taşları olarak kabul edilir. Hormonal kontraseptiflerin kullanımı, güvenli üreme kontrolü sağlamaları nedeniyle, çok kısa zamanda tüm dünyada yaygınlaşmıştır (20) ve bu oran her geçen gün daha da artmaktadır (16). Alındıkları sürece ve geri dönüşlü bir şekilde gebe kalmayı önleyen hormonal kontraseptiflerin intramüsküler, vajinal, subkutan implant gibi çeşitli uygulama şekilleri de vardır. Ancak en sık kullanılan şekli oral kontraseptiflerdir (20). Kontrasepsiyon amacıyla oral yoldan kullanılan östrojen ve progesteron bileşiklere oral kontraseptifler adı verilir ve yeterli dozlarda uygulanan östrojen ve progesteron, folikül stimulan hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH) salgılanmasını durdurarak ovulasyonu engellerler (14). Kombine oral kontraseptifler, çeşitli kontraseptif yöntemler içinde sterilizasyon hariç en etkili kontrasepsiyon araçlarıdır (20, 53). Bu ilaçlar bugün, özellikle batılı ülkelerde en popüler kontrasepsiyon aracı olarak kullanılmaktadır. Ülkemizde ise en son Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırması (TNSA) 2003 verilerine göre Rahim içi araçlardan sonra, en fazla kullanılan aile planlaması yöntemi oral kontraseptiflerdir (16).

Kombine oral kontraseptifler, sentetik bir östrojen (genellikle etinil östradiol veya menstranol) ile progesteron (progestin) aktiviteye sahip bir C-19 steroid (noretisteron asetat, levonorgestrel, norgestrel gibi) olmak üzere iki bileşenden oluşurlar.

Kullanılış şekillerine göre oral kontraseptifler 4 çeşittir.

Monofazik oral kontraseptifler: Östrojen ve progesteron dozu sabittir ve 21 gün süreyle kullanılırlar. İkinci uygulama 7 günlük bir ilaçsız dönemden sonra başlar.

Bifazik oral kontraseptifler: Östrojen dozu sabittir, progestin dozu ilk 10 gün düşük, son 11 gün yüksektir.

Trifazik oral kontraseptifler: Östrojen ve progestin menstrüasyon döngüsündeki hormonal değişikliklere benzer olarak değişken dozlarda kullanılmaktadır.

Minihaplar: Yalnızca progestin içerirler ve kesintisiz olarak kullanılırlar (20).

Oral kontraseptiflerin etki ettiği düşünülen basamaklar:

1. İlacın progestin bileşeninin servikal mukus bileşimini değiştirdiği bilinmektedir. Bu değişiklik de sperm penetrasyonunun engellenmesi için yeterli olabilir.
2. İlaç tarafından indüklenen endometriyal değişiklikler normal implantasyonu engelleyebilir.
3. İlaç Fallop tüpü sekresyonu ve motilitesine etki ederek fertilize olmuş oositin uterus boşluğuna erken ulaşmasını sağlayabilir ve bu sayede de implantasyon hataları gerçekleşebilir.
4. İlaç ovaryumun endojen gonadotropinlere yanıtını engelleyerek ovulasyonu inhibe edebilir. Endojen gonadotropik düzenlenmeye karşı ovaryum yanıtının baskılanması oral kontraseptiflerin etki mekanizmasının temelini oluşturmaktadır (13). Ovulasyonun gerçekleşmesi hipotalamo-hipofizer sistemin kontrolü altındadır. Gonadotropinlerin salgılanması, hipotalamustan salgılanan gonadotropin salgılatıcı hormonun (GnRH) kontrolü altında gerçekleşir. FSH etkisiyle, gelişen folikülde, LH doruğuna bağlı olarak çatlama (ovulasyon) meydana gelmektedir. Oral kontraseptiflerin etkisi muhtemelen, hipotalamo-hipofizer seviyede GnRH'nin ve dolayısıyla gonadotropinlerin yeterli düzeyde salgılanmasını ve bunların hedef organ üzerindeki etkilerini, yani folikül gelişimini ve ovulasyonu baskılamak şeklindedir (53). Oral kontraseptifler, negatif geri bildirim mekanizması ile hipofizden FSH ve LH sekresyonunu inhibe eder. Düşük seviyedeki FSH ve LH baskın folikül gelişimini önler ve sonuç olarak östrojen seviyesi artmaz, LH doruğu oluşmaz ve ovulasyon tetiklenmemiş olur. Böylece fertilizasyon için uygun bir folikül bulunmaz. Ovulasyon meydana gelse dahi servikal mukus ve uterusda meydana gelen değişiklikler fertilizasyon ve implantasyonu engeller (48).
5. İlaç gonadotropinlerin salgılanmasını engelleyerek ovulasyonu inhibe edebilir (13).

Oral kontraseptifler, kontrasepsiyon için etkili bir yöntem olması dışında pek çok yararlı etki de sunmaktadır. Kadınlarda üreme sistemindeki düzensiz kanama, ağrılı

ve uzun menstrüasyon periyotları gibi semptomların iyileştirilmesi için, akne, hirsutizm, menoraji, endometriyoz ve hormon replasman tedavisinde (47), pelvik inflamasyon tedavisinde ve dış gebeliklerin önlenmesinde kullanılmaktadır. Demir eksikliği anemisi, primer dismenore, fonksiyonel over kistleri ve iyi huylu meme tümörleri gibi hastalıkların görülme sıklığını azalttıklarına ilişkin kanıtlar vardır (20).

Ayrıca tam olarak kanıtlanmamış olmakla birlikte osteoporoz, toksik şok sendromu, fibroid ve romatoid artrite karşı koruyucu oldukları ileri sürülmektedir. Oral kontraseptiflerin meme kanserine karşı koruyucu etkileri bulunmamaktadır. Öte yandan çok sayıda epidemiyolojik araştırmada oral kontraseptiflerin meme kanseri riskinde artış ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Özellikle üreme çağıının ortalarındaki (25-39 yaş) kullanımının güvenli olduğu, ancak erken ve ileri yaşlarda, kullanım süresi ile ilişkili olarak riskin arttığı görüşü ağırlık kazanmaktadır. Diğer taraftan serviks kanseri riskini artırdıklarına ilişkin verilerin bulunmasına karşın, nedensel bir ilişki henüz kanıtlanmamıştır. Oral kontraseptiflerle ilgili en önemli kaygılardan biri de kardiyovasküler hastalık riskini artırmaları olasılığıdır. İlk epidemiyolojik çalışmaların riskin arttığı yönünde sonuçlar ortaya koymasına karşın, özellikle düşük dozlu oral kontraseptiflerin kullanıldığı dönemlere ilişkin yeni veriler, başka risk faktörleri taşımayan sağlıklı kadınlarda güvenli olduklarını göstermektedir. Ancak olası risklerin önlenmesi için özellikle tromboembolik hastalık öyküsü olanlarla, 35 yaşın üzerinde olup sigara içen kadınlarda oral kontraseptif kullanımından kaçınılması önerilmektedir (20). Ancak oral kontraseptif kullananlarda kullanmayanlara kıyasla, hipertansiyon, kolestaz ve kolelitiazis gibi safra kesesi hastalıkları, üriner enfeksiyonlar, vajinal moniliazis sıklığı belirgin bir artış göstermektedir. Tüm bu komplikasyonlar, oral kontraseptif alım süresi ile de ilişkili bir durumdur (53).

Fare, sıçan, köpek gibi deney hayvanlarında tek veya kombine şekilde östrojen ve progestinlerle yapılan çalışmalar IARC (The International Agency for Research on Cancer) tarafından ayrıntılı olarak değerlendirilmiş, sonuçlar östrojenlerin ve progestinlerin kanserojenik etkilerinin hormonal ortama ve verilen doza kritik ölçüde bağımlı olduğunu göstermiştir.

Araştırmaların çoğu, oral kontraseptiflerin sağlıklı kadınlardaki kontrasepsiyon dışı yararlarının, olası risklerinden çok daha baskın olduğu konusunda birleşmektedir (20).

### 2.1.1. Levonorgestrel ve Etilin Östradiol

Günümüzde geçerli olan ve ülkemizde yaygın olarak kullanılan oral kontraseptiflerin içinde östrojen bileşeni olarak etinil östradiol ve progesteron bileşeni olarak levonorgestrel bulunmaktadır (16). Kombine oral kontraseptifler içinde kullanılan progestojenler çok sayıdadır ve bunların hepsi 19-nortestosteron'un 17- $\alpha$ -etinil türevleridir. Biyokimyasal ve metabolik etkileri doza, etkisine ve selektivitesine bağlıdır. Etki çeşitleri kullanılan uygulama tipine göre değişmektedir. Selektivite progesteronun progesteron reseptörüne afinite oranına karşılık androjen reseptörüne afinite oranı olarak tanımlanmaktadır. Progestojenler içinde norgestrel'in D ve L olmak üzere 2 stereoizomeri vardır ve levonorgestrel biyolojik olarak aktif olandır.

Levonorgestrel, progesteron, androjen, mineralokortikoid ve glukokortikoid reseptörlerine yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Fakat östrojen reseptörlerine bağlanmazlar. Ancak, servikal mukusa sperm penetrasyonunu azaltan güçlü bir antiöstrojenik etkileri vardır (25).

Etilin östradiol, doğum kontrol haplarında bulunan yarı sentetik östrojen bileşimidir ve oral yolla verildiğinde kimyasal yapısı nedeniyle aktivitesini kaybetmemektedir. Steroid molekülün C<sub>17</sub> konumundaki etinil grubu molekülü karaciğerdeki enzimatik bozulmadan korumaktadır ve bu durum oral uygulama ile aktivite kaybını önlemektedir. Etilin östradiol pek çok kombine oral kontraseptifin östrojen bileşenidir. Etilin östradiol östrojen reseptörlerini ve buna bağlı olarak östrojeni aktive ederek hormonal etki göstermektedirler (45). Etilin östradiol için temel metabolizma yolları sülfatlanma ve hidroksillenmedir. Birçok kontraseptif steroid plazmada albümine bağlanır. Oral kontraseptifler alındıktan sonra yaklaşık olarak 3 saat içinde jejunumun üst kısmında etkili bir biçimde absorbe olurlar. Bağırsak duvarı ve karaciğerde gerçekleşen bir sonraki basamak (hepatik ilk geçiş metabolizması) steroid plazma seviyesi ve farmakolojik etkilerini belirlemektedir. Etilin östradiolün % 40 kadarı karaciğerde konjuge olarak ince bağırsağa inaktif glukuronidler olarak geçerler. Bağırsağın bakteri florası tarafından aktif etinil östradiole dönüştürülür ve reabsorbe edilirler. Hepatik ilk geçiş metabolizması (first-pass) ve enterohepatik döngü steroid biyoyararlılık için önemli belirleyicilerdir (26). Karaciğer progesteronu çeşitli bileşiklere aktif olarak metabolize ettiği için progesteron oral yolla verildiğinde etkisizdir (31). Progestojenler içinde levonorgestrel karaciğer geçişi sırasında neredeyse

hiç etkilenmez (26) ve bundan ötürü de oral kontraseptiflerde yaygın olarak kullanılır (31).

## 2.2. Ovaryumlar

Dişi üreme sistemi, pelviste yerleşik iç genital organlar kapsamında değerlendirilen bir çift ovaryum ile genital kanallar olan fallop tüpleri (ovidukt veya tuba uterina), uterus, vajina ve labia major, labia minor ve klitoris olarak isimlendirilen dış genital organlar kapsamında incelenir (33). İşlevleri dişiye ait üreme hücreleri olan gametlerin (oositler) üretilmesi ve döllenmiş embriyo ve fetüs evrelerinden doğuma kadar taşımaktır. Ayrıca, üreme sisteminin organlarını kontrol eden ve vücudun diğer organları üzerinde etkileri olan cinsiyet hormonlarını da üretir. İlk menstrüasyon kanamalarının olduğu menarşta başlayarak üreme sistemi hormonların kontrolü altında yapı ve işlevsel etkenlik bakımından döngüsel değişiklikler geçirir (44). Ovaryumlar erişkinlerde boyu 3 cm eni 2 cm olan solid, badem biçimindeki bezler olup, kadın üreme sistemindeki döngüel değişikliklerin merkezi durumundadır ve menstrüel döngü olarak bilinen, düzenli aralıklarla tekrarlayan değişikliklere uğrarlar (33).

Gonad gelişiminin ilk evreleri embriyonik yaşamın 5. haftasında ortaya çıkar. Gelişimine başlayan ovaryumlar üç kaynaktan köken alırlar.

- Mezodermal epitel (söloom epiteli),
- Altındaki mezenşim (embriyonik bağ doku),
- Primordiyal germ hücreleri (32).

Gelişimin 5. haftasında primordiyal germ hücreleri vitellus kesesinin arka duvarından dorsal mezenter boyunca göç ederler ve 6. haftada gelecekteki gonadların oluşacağı 10. torasik seviye bölgesine ulaşırlar. Primordiyal germ hücrelerinin etkisiyle bu bölgedeki mezonefroz hücreleri ve söloom epiteli çoğalır ve genital kabartıları oluştururlar. Söloom epitelinin alttaki mezenşim dokusu içine çökmesi ve primordiyal germ hücrelerini kuşatması ile primer seks kordonları oluşur. Primer seks kordonları dejenere olur ve kortekste yerini sekonder seks kordonları oluşturur. Sekonder seks kordonlarının yapısında bulunan primordiyal germ hücresi ileride oositi, kordon hücreleri ise folikül hücrelerini oluşturacaktır (27). Medulla bölgesinde ise dejenere olan primitif seks kordonlarının yerini ovaryum medüllasını oluşturmak üzere dorsal aort ve kardinal venden köken alan damar ağı ve mezonefroz kökenli stroma almaktadır (5, 27).

Puberte öncesi ovaryum yüzeyi düz bir görüntüye sahiptir. Ancak zamanla ovaryum yüzeyi tekrarlayan ovulasyonlara bağlı olarak düzensiz bir şekil alır (39). Ovaryumların bir yanları mezovaryum denilen bir mezentere sahiptir. Bu yapı ovaryumun hilumundaki geniş bağa tutunur. Ovaryumlar, viseral peritondan farklılaşan bir örtü ile sarılıdır. Bu yapı germinal epitel adıyla bilinir, ancak ovaryum yüzey epiteli daha uygun bir terminolojidir (33). Ovaryum yüzey epitelinin hemen altında, ovaryumun beyazımsı rengini veren ve tunika albuginea olarak adlandırılan tıkız bir bağ dokusu katmanı bulunur (44) ve tüm ovaryumu kapsül gibi sarar. Bir ovaryumun dışta yer alan korteks ve içte yer alan medülla bölümleri vardır (33). Ovaryumda korteks ve medülla bölgeleri arasında kesin bir sınır bulunmamaktadır (44).

Medülla veya medüller bölge ovaryumun merkezinde yer alır (39). Sınırları belirgin olarak seçilemeyen medülla; çok sayıda kıvrımlı kan damarları, sinirler ve lenfatikler içeren gevşek bağ dokusu yapısındadır (33).

Ovaryum stromasında bulunan iç şeklindeki hücreler teka internanın hormon sentezleyen hücrelerine farklılaştıklarından fibroblastlardan farklı özelliktedirler. Kolajen liflerden oluşan bir ağ tarafından desteklenmektedirler. Ovaryum medüllasının stromasında fibroblastlar ve çok sayıda elastik lif içeren ve kolajenden zengin gevşek bağ dokusu bulunur. Çoğu memeli türünde ovaryum stromasında ayrıca östrojenleri sentezleyen epitelooid interstisyel hücre kümeleri ve kordonları bulunmaktadır. Epiteliyal görünümü ve salgı aktivitelerinden dolayı bu hücreler stroma içinde yaygın bir dağılım gösterirler ve interstisyel bezler (glandüler hücreler) olarak isimlendirilirler. Gerileyen foliküllerin teka tabakalarından yeni hücreler eklendikçe lutein hücrelere benzeyen sıkıca paketlenmiş ve giderek büyüyen hücre gruplarını oluştururlar. İleri yaşlardaki kemirgenlerde foliküller bu hücre kümeleri ile çevrelenmiştir. İnsan ovaryumunda interstisyel bez dokusu daha az yoğunluktadır. İnterstisyel hücre kümeleri erken yaşlarda daha fazla görülmekte ve yetişkinlerde stroma içerisine dağılmış olarak az sayıda gruplar şeklinde bulunmaktadırlar. Epitelooid hücrelerin bir diğer grubunda hilus hücreleridir. Hilus hücreleri mezovaryumda ve ovaryumun hilusunda küçük gruplar halinde bulunan hücrelerdir. Testisteki Leydig hücrelerine benzerlik gösterirler. Sitoplazmasında çok sayıda lipid damlacığı, kolesterol esterleri ve lipofuskin pigmenti ve Leydig hücrelerinde bulunan Reinke kristallerine eş yapıdaki kristaller bulunmaktadır. Bunun dışındaki yapısal özellikler steroid sentezi yapan hücrelerin tipik yapısını taşımaktadır (4).

Ovaryum korteksi veya kortikal bölge ovaryumun periferinde medüllayı çevreleyen bölgedir (39). Korteks helezon şeklinde düzenlenmiş hücreden zengin bağ dokusu yapısındadır. Farklı olgunlaşma ve dejenerasyon evrelerinde izlenen, oosit içeren, farklı boyutlardaki ovaryum folikülleri stroma içine gömülü olarak bulunur (33). Foliküllerin çevresindeki stroma dağınık bir şekilde düz kas hücreleri (39), heryöne dağılmış olan kolajen ve retiküler lifler (11) ve tipik iğ biçiminde fibroblastlar içerir ve bu fibroblastlar, hormonal uyarılara diğer organların fibroblastlarından farklı yanıt verir (44). Çocukluk çağındaki ovaryum korteksinde çok sayıda primordiyal folikül bulunur; cinsel olgunluğa erişmiş kadınlardaki ovaryum korteksinde ise çatlamış foliküllerin yerini alan korpus luteum'ların sayısı fazladır (33).

Ovaryumların: gametlerin üretimi (gametogenez) ve steroidlerin üretimi (steroidogenez) olmak üzere birbiriyle ilişkili iki temel görevi vardır.

Ovaryumlar tarafından salgılanan iki temel steroid hormon, östrojenler ve progesteronlardır:

Östrojenler, iç ve dış genital organların gelişmesi ve olgunlaşmasını teşvik ederler ve pubertede gelişen dişi eşey karakterlerinden sorumludurlar. Östrojenler ayrıca meme gelişiminin başlatılması için adipoz dokunun akümülyasyonu ve stromal ve duktal büyümenin düzenlenmesi ile meme bezleri üzerine etki etmektedirler (39). Östradiol en çok bulunan ve en etkin olan ovaryum östrojenidir; başlıca granüloza ve granüloza lutein hücreleri tarafından üretilir (12).

Progesteronlar ise, endometriyumda salgısal değişiklikleri düzenleyerek iç genital organları, özellikle de uterusu gebelik için hazırlar. Progesteronlar ayrıca lobüller proliferasyonun düzenlenmesi ile meme bezlerini laktasyon için hazırlar.

Her iki hormon da menstrüasyon döngüsünde döllenmiş ovumun implantasyonu için uterusun hazırlanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Eğer implantasyon gerçekleşmezse, uterus endometriyumu dejenere olur ve menstrüasyon devam eder.

Her biri bir oosit içeren çeşitli büyüklükteki ovaryum folikülleri korteks stroması içine dağılmış halde bulunmaktadırlar. Folikül büyüklüğü oositin gelişiminin hangi evresinde olduğunu göstermektedir (39). Fetal yaşam sırasında oluşan primordiyal foliküller tek sıralı yassı folikül hücreleriyle çevrili bir primer oosit içerir ve kortikal bölgenin en üst katmanında yer alır. Bu hücreler, mayoz bölünmenin birinci profaz evresindedirler. Puberteden başlayarak, küçük bir primordiyal folikül grubunda, foliküller büyüme olarak adlandırılan bir süreç başlar. Bu süreç oositler, granüloza

hücreleri ve bu folikülleri çevreleyen stromadaki fibroblast hücrelerindeki değişiklikleri kapsar (44). Folikül epiteli ve çevresindeki stroma, foliküllerin olgunlaşmasıyla ilişkili olarak hem hiperplaziye hem de hipertrofiye uğrar (33). Foliküllerin büyümesi, hipofizden salgılanan FSH tarafından uyarılır. Oosit, bu dönemde çok hızlı büyür. Folikül hücreleri mitoz bölünmeyle çoğalırlar ve tek katlı kübik hücre katmanını oluştururlar. Foliküller büyüdükçe kortikal bölgenin daha alt bölgelerine göç ederler. Folikül hücreleri arasında folikül sıvısı toplanmaya başlar ve sıvı içeren ufak boşluklar birleşerek antrumu oluştururlar.

Oositte ve granüloza tabakasında bu değişiklikler oluşurken, folikülün hemen bitişiğindeki stromada yer alan fibroblastlar teka foliküliyi oluşturmak üzere farklılaşırlar. Bu katman daha sonra teka interna ve teka eksterna olarak farklılaşır (44). Teka interna içte, kübik salgı yapıcı hücrelerin oluşturduğu damardan zengin bir tabakadır (39). Teka internanın hücreleri tamamen farklılaştığında steroid üreten hücreler ile benzer yapı gösterirler. Bu özellikler arasında bol miktarda düz endoplazma retikulumu (DER), tübüler kristal mitokondriyumlar ve çok sayıda lipid damlacıkları yer alır (44). Ayrıca teka interna hücreleri bol miktarda LH reseptörü içermektedirler. LH uyarısına yanıt olarak östrojen öncülleri olan ve granüloza tabakasına taşınan bir steroid hormon olan androstenedion sentezler ve salgırlar (39). Granüloza hücreleri, FSH etkisiyle androstenedionu östrojene dönüştüren aromataz enzimini salgırlar. Östrojen folikülü çevreleyen stromaya döner, kan damarları aracılığıyla kana geçer ve tüm vücuda yayılır (44). Teka interna tabakasında salgı yapan hücrelerin dışında fibroblastlar, kolajen demetleri ve zengin bir kılcal damar ağı bulunmaktadır (39). Endokrin işleve sahip tüm organlar gibi teka interna da damardan zengindir; küçük kan damarları teka internaya girer ve bu bölgenin salgı yapan hücrelerinin çevresinde zengin bir damar ağı oluşturur. Teka eksterna, başlıca, teka internayı çevreleyen düzenli fibroblast katmanları (44), düz kas hücreleri ve kolajen lifçiklerden oluşur (39). İki teka katmanı arasındaki sınır belirgin değildir. Teka interna ve granüloza hücre katmanları arasındaki sınır, hücrelerin morfolojik olarak farklı olmasından ve aralarında kalın bir bazal membran bulunmasından dolayı belirgindir.

Her aybaşı döneminde, genellikle bir folikül diğerlerinden daha fazla büyür ve baskın hale gelir. Diğer foliküller yıkıma uğrar. Olgun folikül ya da Graaf folikülü olarak adlandırılan ovulasyon öncesi folikül son derece büyüktür ve ovaryum yüzeyinden çıkıntı yapar. Granüloza hücrelerinde çoğalma olmadığından, granüloza

hücre tabakası daha ince bir hale gelir. Bu foliküller çok kalın bir teka katmanına sahiptirler (44).

Çok sayıda primer folikül olgunlaşma sürecine başlar; ancak, yalnızca bir ya da iki folikül gelişimini tamamlar, diğerleri atrezi denilen bir olayla bozunur (12). Foliküller gelişimlerinin herhangi bir aşamasında atreziye uğrayabilirler. Bu süreç granüloza hücrelerinde mitoz bölünmenin durması, granüloza hücrelerinin bazal laminadan ayrılması ve oositin ölümü ile özellik kazanmaktadır. Hücre ölümünden sonra foliküldeki kalıntılar makrofajlar tarafından ortadan kaldırılır. Bir sonraki evrede, fibroblastlar folikülün bulunduğu alanı kaplar ve kolajen içeren bir yara iyileşme dokusu (nedbe dokusu) oluşturur (44).

### 2.3. Ovulasyon

Ovulasyon, olgun folikül duvarının yırtılması ve oositin serbest kalmasıdır. Serbest kalan oosit oviduktun genişlemiş ucu tarafından yakalanır. Bu olay 28 günlük menstrüasyon döngüsünün yaklaşık 14. gününe denk gelir ve her siklusta ovaryumdan yalnızca bir oosit serbest bırakılır. Ovulasyon bazen gerçekleşmeyebilir ya da bir siklusta birden fazla oosit atılabilir (44). Hormonal değişiklikler, enzimatik etkiler ile birlikte oositin folikülden atılmasından sorumludur. Bu faktörler;

- Folikül sıvısının miktarında ve basıncında artış,
- Plazminojenlerin aktivasyonu ile folikül duvarının enzimatik proteolizi,
- Stratum granülozum ve oosit – kümülüs kompleksi arasında bulunan glikozaminoglikanların hormonlar aracılığıyla ortadan kaldırılması,
- Teka eksterna tabakasındaki düz kas liflerinin prostaglandinlerin etkisi ile kasılmasıdır (39).

Ovulasyon için uyarıyı oluşturan, büyüyen folikül tarafından üretilen dolaşımdaki yüksek östrojen düzeylerine yanıt olarak ön hipofizden salgılanan LH düzeyindeki ani yükselmedir. Kandaki LH düzeylerinin artmasının ardından birkaç dakika içinde ovaryumun kan akımında bir artış görülür ve plazma proteinleri kapiler ve postkapiler venüllerden sızarak ödeme yol açar. Lokal olarak prostaglandinler, histamin, vazopressin ve kolajenaz salıverilir. Granüloza hücreleri daha fazla hiyalüronik asit üretir ve aralarındaki bağlantılar gevşer. Folikül duvarının küçük bir kısmı, tunika albugineadaki kolajen yıkımı, iskemi ve bazı hücrelerin ölmesi nedeniyle zayıflar. Folikül sıvısı miktarındaki ve basıncındaki artış ve büyük olasılıkla düz kas hücrelerinin

kasılmasıyla birlikte bu zayıflama, folikül dış duvarının yırtılmasına ve ovulasyona yol açar. Ovulasyondan hemen önce folikül hücreleri, sahip oldukları FSH reseptörlerinin yanı sıra, LH reseptörleri de edinir. Bu olay, korpus luteumun luteinizasyonu ya da gelişmesi açısından büyük önem taşır. Ovulasyondan birkaç saat önce, folikül hücre tabakası ve teka interna korpus luteuma dönüşmeye başlar. Ovulasyonun ardından, geride kalan foliküler hücre tabakası büzülür ve hormon salgılayan majör bir bez olan korpus luteumun bir parçası olur (12). Folikül içeriye doğru çöker ve kıvrımlanmalar oluşurken, lümeni fibrin içeren sıvı ve kan ile dolar. Bu çökelti daha sonra pıhtıya dönüşür ve yerini fibröz yara iyileşme dokusu alır. Granüloza hücreleri ve teka hücreleri arasındaki bazal membran parçalanır ve önceden damarsız olan granüloza hücrelerinin arasına damarlar uzanır. Ön hipofizden salgılanan LH etkisiyle, granüloza hücreleri granüloza lutein, teka interna hücreleri ise teka lutein hücrelerine dönüşür. Her iki hücre tipi de steroid sentezleyen hücrelerle ortak özellikler gösterirler. Granüloza lutein hücreleri, progesteron hormonunu, teka lutein hücreleri, östrojen hormonunu sentezler ve salgırlar. Gebelik gerçekleşirse, korpus luteum ilk 8 hafta varlığını sürdürür, plasenta geliştikten sonra ise başlıca steroid hormon yapım işlevini üstlenir. Gebelik oluşmamışsa korpus luteum giderek geriler, progesteron yapımı durur ve korpus albicans veya beyaz cisim olarak adlandırılan beyaz renkli nedbe yapısına dönüşür (33). Korpus luteumun gerilemesi –luteoliz- sonucunda, korpus albicans oluşur. Bu süreçte, korpus luteumun bozulan luteal hücre kümelerinin yerini stromal bağ dokusu alır. Korpus albicans ovaryumlarda kalır; küçülür ama hiçbir zaman kaybolmaz (44).

#### **2.4. Matriks Metalloproteinazlar (MMP)**

Hücre dışı matriks hücreler arası boşluklarda özel bir ortam oluşturan dinamik, interaktif bir yapıdır. Dokulardaki hücrelerin bir arada tutulmasına yardımcı olur ve bunun yanı sıra hücre büyümesi ve farklılaşmasını kontrol eden pek çok hormon için depo görevi yapar. Bu yapı hücrelerin, özel fonksiyonları gerçekleştirmesi için kendilerini yönlendirecek hücre içi sinyal yolları ile doğrudan ya da dolaylı olarak etkileşmesini sağlar. Matriks ile hücreler arasında meydana gelen bu etkileşimler organizmanın normal gelişimi ve fonksiyonu için kritik bir rol oynar. Hücre-matriks etkileşimleri hücre dışı matriks bileşenlerinin hidrolizinden sorumlu olan proteolitik enzimler (ekstraselüler proteazlar) tarafından düzenlenir. Bu enzimler hücre dışı matriks yapısının bileşimini ve bütünlüğünü düzenleyerek matriks molekülleri tarafından

oluşturulan sinyallerin kontrolü, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve ölümünde de temel rol oynar. Bu enzimler içinde MMP'ler önemli bir grubu oluşturmaktadır (34, 37). MMP'ler ekstraselüler matriksin proteinaköz elemanlarını tamamen bozabilen ve sinyal proteinlerini parçalayabilen, çinko ve kalsiyuma bağımlı enzimlerdir (43). MMP'ler türlerine göre endotel hücreleri, makrofajlar, fibroblastlar, damar düz kas hücreleri, T lenfositler, trombositler, kondrositler, keratinositler, epitel hücreleri, mezenkim hücreleri, nötrofiller, trofoblastlar, osteoblastlar gibi oldukça farklı hücre tipleri tarafından ifade edilirler (34). İnsanlarda MMP ailesi yapısal ve işlevsel özelliklerine göre 5 alt gruba ayrılır: kolajenazlar, jelatinazlar, stromelisinler, zar tipi MMP'ler ve diğerleri (heterojen alt grup) (19).

MMP'lerin pek çoğu yapı ve işlevleri açısından çok sayıda benzerlik göstermektedirler. Bu ortak özellikler;

- 1- MMP'lerin preproenzim olarak sentezlenmesi ve inaktif proenzim şeklinde salgılanması,
- 2- Latent zimojenlerin hücre dışı alanda aktivasyonu,
- 3- Katalitik bölge tarafından ekstraselüler matriksin tanınması ve kırılması,
- 4- Hücre dışı ortamda MMP etkisinin serum ve doku kaynaklı metalloproteinaz inhibitörleri aracılığı ile inhibisyonudur (8).

MMP'ler yapılarındaki pek çok benzerliğe rağmen ECM bileşenlerini tanıma ve özgünlük açısından bazı farklılıklar göstermektedir. Örneğin, kolajenazlar (MMP-1 MMP-8 ve MMP-13) fibriler ve nonfibriler kolajeni parçalayabilme yeteneğine sahiptir. Jelatinazlar (MMP-2 ve MMP-9) katalitik bölgelerinde fibronektin benzeri bölge içerirler ve bu özellikleri ile jelatine bağlanabilir ve onu parçalayabilirler. Jelatinazlar ve stromelisinler, bazal membranın temel elemanlarından tip IV kolajen, laminin ve fibronektini bozabilir. Stromelisinler (MMP-3, MMP-7, MMP-10 ve MMP-11) sadece ECM sübstratları üzerine etki göstermeyip diğer MMP'ler, büyüme faktörleri ve insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinler ve tümör nekroze edici faktör  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) gibi sitokinler üzerinde de etki göstermektedir. Bu enzimler ile bağlayıcı proteinlerin ve büyüme faktörlerinin ekstraselüler bölgelerinin parçalanması, hücre büyümesinin modülasyonu, doğrudan hücre-matriks etkileşimi ya da dolaylı olarak büyüme faktörleri biyoyararlılığı düzenlenmektedir. Zar tipi MMP'ler karboksi-terminal bölgelerinde plazma zarına tutunmalarını sağlayan transmembran birim ve hücrenin dış

yüzeyinde bulunan ekstraselüler bir bölge içermektedir ve temel görevleri MMP-2 aktivasyonunun düzenlenmesidir (8).

Dokunun yeniden şekillenmesi, MMP aktivitesinin transkripsiyon, translasyon, sekresyon, latent enzim aktivasyonu ve MMP inhibisyonu basamaklarında MMP aktivitesinin modülasyonu ile düzenlenen karmaşık bir süreçtir. MMP aktivasyonunun kontrolünü sağlayan 2 önemli nokta latent enzimlerin (proMMP'ler) aktivasyonu ve MMP aktivitesinin matriks metalloproteinazların endojen doku inhibitörleri (TIMP) ve  $\alpha$  makroglobulin tarafından inhibisyonudur (43).

Ekstraselüler alanda pro-MMP'lerin aktivasyonu diğer MMP'ler ve plazminojen aktivatör / plazmin sistemi gibi proteinazlar ve reaktif oksijen türleri gibi proteolitik olmayan araçlar ile gerçekleşmektedir (8). Metalloproteinazların pek çoğu salımının ardından aktive olurken, stromelisin-3, MMP-23 ve bütün zar tipi MMP'ler bir serin proteaz olan furin ya da bilinmeyen farklı aktivatörler aracılığı ile hücre içinde aktive olurlar ve aktif formda salgılanırlar (43).

ECM bozucu enzim alt gruplarının ortak bir işlev bölgesi ve aktivasyon mekanizması vardır. Zar tip MMP'ler dışında hepsi proteolitik aktivite kazanılması için aktive edilmeleri gereken latent pro-form (zimojenler) olarak sentezlenir ve salgılanırlar. Aktif bölgelerinde  $Zn^{++}$  iyonu bulunmaktadır ve stabilitenin korunabilmesi için kalsiyuma ihtiyaçları vardır ve fonksiyonlarını nötral pH'da sürdürürler.

MMP sentezi temel olarak transkripsiyonel aşamada düzenlenir. MMP gen ekspresyonu çok yönlü sinyal yolları ile sürdürülen çok sayıda düzenleyici ve baskılayıcı faktörler aracılığı ile düzenlenir. Bu faktörler içinde forbol esterleri, integrin kökenli sinyaller, sitokinler ve interlökinler, interferonlar, epidermal büyüme faktörü (EGF), keratosit büyüme faktörü (KGF), sinir büyüme faktörü (NGF), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), TNF- $\alpha$  ve ekstraselüler matriks metalloproteinaz indükleyicileri (EMMPRIN) gibi büyüme faktörleri bulunmaktadır. Sitokinler, büyüme faktörleri ve hormonlar ayrıca mRNA transkripsiyon stabilesini post-transkripsiyonel olarak düzenlemektedirler.

MMP'ler gelişim sürecinde temel efektörlerdir. Endotelial hücre invazyonu, anjiyogenez ve tümör yayılmasında önemli rolleri bulunmaktadır. Hücre göçü, hücre proliferasyonu, apoptoz ve biyolojik olarak aktif moleküllerin işlevini düzenleyen doku morfogenezi süreçlerine katılmaktadır (19). Hücre dışı alanda MMP aktivitesi serum ya

da doku kaynaklı inhibitörler ile kontrol edilmektedir. Serum kaynaklı inhibitörler  $\alpha_2$  makroglobulin ve  $\alpha_1$ -inhibitör-3 gibi makroglobulinlerdir ve proteazların pek çoğunu inhibe edebilme özelliğindedirler. İnhibitörlerin diğer grubu lokal olarak üretilen ve özgün MMP'leri inhibe edebilen metalloproteinazların endojen doku inhibitörleridir (TIMP). TIMP'ler reproduktif dokularda baskın olarak bulunmakta ve ovaryum ve uterusu pek çok süreçte hormonal olarak kontrol edilip, lokal olarak üretilmektedir (8).

Organizmada fizyolojik olayların sürdürülmesinde MMP aktivitesi ile TIMP'ler arasında sürekli bir denge söz konusudur. MMP ekspresyonu, gen transkripsiyonunu etkileyen faktörlerin etkisi altındaki çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullarda gelişen yeniden modellenme sırasında artar. Bu sırada MMP'lerin üretimi TIMP'lerin üretimini aşabilir. Böylece MMP'ler ve TIMP'ler arasındaki denge bozulur. Dengenin MMP aktivitesi yönüne kayması matriksin kontrolsüz olarak yıkılmasına ve sonuçta fizyopatolojik olayların oluşumuna zemin hazırlar (37).

MMP'ler embriyonik gelişim, blastosist implantasyonu, organ morfogenez, sinir gelişmesi, ovulasyon, servikal dilatasyon, doğum sonrası uterus involüsyonu, endometriyal siklus, kemik yeniden modellenmesi, yara iyileşmesi, anjiyogenez, apoptoz gibi pek çok normal biyolojik süreç ve artrit, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nefrit, nörolojik hastalıklar, kan-beyin bariyerinin bozulması, deri, kornea ve gastrik ülser, karaciğer fibrozisi, anizem, fibrotik akciğer hastalıkları gibi patolojik süreçlere katılmaktadır (8).

Dişi üreme sisteminde MMP enzim sistemi ovaryum ve uterusun dinamik yapısal elemanlarında meydana gelen değişiklikleri düzenlemektedir. Çeşitli hormonlar, büyüme faktörleri ve sitokinler aracılığı ile doku yapısında meydana gelen bu değişiklikler ovaryumun luteal/foliküler, uterusun ise endometriyal fonksiyonu için önemlidir. Tek tabakalı granüloza hücreleri ile çevrelenmiş primordiyal folikülün preovulatuvar Graaf folikülüne farklılaşabilmesi için büyüyen ovaryum folikülünde hücre proliferasyonu ve hücre dışı matriksin yeniden modellenmesi gereklidir (8). MMP'ler ve TIMP'lerin folikül gelişimi ile ilgili olarak ECM yeniden modellenmesi sürecinde önemli rollerinin olduğu kabul edilmektedir (19).

## 2.5. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF), özellikle endotel hücreleri için özgül etkilere sahip olan multifonksiyonel bir büyüme faktörü ailesidir. Endotel hücrelerinin çoğalmasına, göç etmesine ve farklılaşmasına sebep olur. VEGF, hem gelişim sırasında, hem de yetişkinde vaskülogenez ve anjiyogenez için önemli ve gereklidir. Bu büyüme faktörü, özellikle damar oluşumunda kritik bir rol oynarken, endotel hücrelerinin yürüttüğü birçok işlevde de gerekli olduğu görülmüştür. Bu işlevler embriyogenez, yara iyileşmesi, tümör büyümesi, miyokard iskemisi, oküler neovasküler hastalıklar ve romatoid artrit gibi kronik inflamatuvar hastalıkları da kapsayan fizyolojik ve fizyopatolojik olaylarda ön plana çıkmaktadır.

Son yıllarda VEGF üzerine yapılan çalışmalar, bu ailenin PDGF süperailisinin önemli bir üyesi olduklarını ortaya koymuştur. Aynı zamanda VEGF ailesinin VEGF-A (Human-VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve Plasenta büyüme faktörü (PlGF) adı verilen altı üyeden meydana geldiğini göstermiştir (51). VEGF endotel hücresi yüzeyinde bulunan reseptörlerine bağlanıp bu hücreyi etkiler. Bu reseptörler VEGF reseptör-1, çözülebilir-VEGF reseptör-1, VEGF reseptör-2, çözülebilir-VEGF reseptör-2 ve VEGF reseptör-3'tür. VEGF sayesinde endotel hücreleri proliferasyon olmaktadır ve bu büyüme faktörüne doğru göç edip dizilerek yeni damarlar için öncü olan tüp biçimlenmesini sağlamaktadır (52). VEGF vücutta ovaryum folikülleri, korpus luteum, akciğer alveol hücreleri, böbrek glomerül viseral epitel hücreleri, böbrek proksimal tübül hücreleri, adrenal korteksin tüm hücreleri, Leydig hücreleri, aktive makrofajlar, arteriyoller çevreleyen fibroblastlar, bronşiyol ve koroid pleksus epitel hücreleri, hepatositler gibi birçok farklı hücre tarafından sentezlenir. Endotel hücreleri için önemli bir mitojen olan ve hücre göçü etkisine sahip bu faktör, fizyolojik olarak ovulasyondan hemen önce ovaryum foliküllerinden salgılanarak yeni damarların oluşumunu artırırken, ovulasyondan sonra bu salgılama görevini korpus luteum üstlenir.

VEGF mRNA'sının transkripsiyonu; trombosit kaynaklı büyüme faktörü-bb (PDG-BB), keratinosit büyüme faktörü (FGF-7), EGF, TNF- $\alpha$ , transforme edici büyüme faktörü- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) ve interlökin- $\beta$ 1 gibi çeşitli faktörler tarafından başlatılır. Böylece bu maddelerin mitojenik olmadığı, VEGF salgılanmasına yol açarak mitojeniteyi artırdıkları gösterilmiştir. Ayrıca protein büyüme faktörlerinin haricinde, forbol esterleri ve prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) gibi bazı küçük mediyatörlerin de VEGF ekspresyonunu düzenledikleri görülmüştür (51).

## 2.6. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)

Fibroblast büyüme faktörleri (FGF) hücre çoğalması ve göçü, embriyogenez, morfogenez, implantasyon ve tümörögenез gibi çeşitli biyolojik süreçlerde görev alan çok fonksiyonlu ve heparin bağlı polipeptidlerdir (49). Omurgalılarda FGF ailesi 22 üyeden oluşmaktadır. Omurgalı türleri içinde FGF'ler gen yapısını ve amino asit dizilimlerini yüksek ölçüde korumaktadırlar. Hücre yüzeyinde bulunan 4 FGF reseptörünün aktivasyonu için heparan sülfat gereklidir ve FGF'ler heparan sülfat proteoglikanlarına karşı yüksek afinite gösterirler. Embriyonik gelişim sırasında FGF'ler hücre çoğalması, hücre göçü ve hücre farklılaşması süreçlerinde çok çeşitli etkiler gösterirken erişkinlerde FGF'ler homeostatik faktörlerdir ve yara iyileşmesi sürecinde görev alırlar. FGF'ler anormal olarak sentezlendiklerinde kanser patogenezi de katkıda bulunurlar (36).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsünün (DETAE) 24.07.2007 tarih ve 33 numaralı Deney Hayvanları Etik Kurulu onayı ile İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Işık ve Elektron Mikroskobu laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

#### 3.1. Hayvan Deneyi Uygulaması

Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Anabilim Dalı laboratuvarlarında üretilmiş Balb/c soyu, erişkin,  $27\pm 4$  g ağırlığında 20 adet dişi fare kullanıldı. Deney hayvanları standart kafeslerde 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ve ısısı 22-24 °C olan fizyolojik ortamlarda tutulup, uygun koşullarda barındırıldı. Aynı biyolojik koşullar altında tuttuğumuz hayvanlar standart pellet yem ve musluk suyu ile serbest beslemeye tabi tutuldular. Deney uygulamaları 14/11/2008 – 4/12/2008 tarihleri arasında gerçekleştirildi.

20 adet Balb/c soyu fare kullanılarak her grupta 10'ar adet olmak üzere toplam 2 grup oluşturuldu. (1-Kontrol Grubu, 2-Deney Grubu)

**1.Grup (Kontrol Grubu):** Bu grupta bulunan 10 adet hayvana deney süresi boyunca hiçbir uygulama yapılmadı.

**2. Grup (Deney Grubu):** Bu grupta bulunan 10 adet hayvana 21 gün süreyle günlük doz olarak 90 µg levonorgestrel (Sigma N2260) ve 20 µg etinil östradiol (Sigma E4876) gavaj yoluyla verildi (25). Çalışmamızda kullanılan bu ilaçlar ülkemizde kullanılan oral kontraseptiflerin bileşiminde bulunan komponentlerdir (16). Farelere verilecek olan maddelerden levonorgestrel kloroform (Merck) içinde, etinil östradiol ise %96 etanol içinde çözülerek hazırlandı ve zeytinyağı ile seyreltilerek (18) hesaplanan dozları içinde bulunduran günlük 0,5 ml hacim içinde 21 gün süreyle gavaj yoluyla hayvanlara verildi.

Toplam 21 gün olan deney süresinin sonunda kontrol ve deneyli gruplara ait tüm hayvanlara 50 mg/kg dozda BrdU (Sigma B-5002) intraperitoneal olarak injekte edilerek in vivo BrdU işaretlemesi yapıldı. BrdU injeksiyonundan 2 saat sonra 50-200 mg/kg ketamin anestezisi altında hayvanların batınları açılarak sağ ve sol ovaryumları

ışık mikroskopik inceleme için %10'luk formaldehit ve elektron mikroskopik inceleme için %2,5'luk gluteraldehit solüsyonlarına alındı. Daha sonra hayvanlar sakrifiye edildi.

### **3.2. Işık Mikroskobu Takibi**

Deney hayvanlarından alınan ovaryumlar ışık mikroskopik inceleme için tamponlanmış %10'luk formaldehit solüsyonunda 48 saat süreyle tespit edildi. Dokular her birinde 24 saat bekletilmek suretiyle yükselen dereceli alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidrate edildikten sonra toluolde (Merck) 1 saat süreyle saydamlaştırma işlemi gerçekleştirildi. Dokuların kesite hazırlanması için sıvı parafin içerisinde 56°C'ye ayarlanmış etüvde (Heraeus) 1 saat bekletildi ve daha sonra dokular parafin bloklara gömüldü. Hazırlanan parafin bloklardan mikrotom (Leica RM 2255) ile 3,5 mikron kalınlığında kesitler alındı. İmmünohistokimya uygulamaları için seri parafin kesitler Histogrip (Zymed 00-8050) ile kaplanan lam üzerine alındı.

#### **3.2.1. Histokimyasal Boyalar**

##### **3.2.1.1. Hematoksilen & Eozin (H&E):**

Dokuların genel görünümünü belirlemek amacıyla H&E boyası uygulandı.

Boyamanın yapılışı;

- Parafin kesitler 30 dakika toluolde bekletilerek dokudan parafinin dokudan uzaklaşması sağlandı. Derecesi azalan alkol serilerinden (%100, 96, 90, 70) geçirilen kesitler daha sonra distile suya indirildi.
- Hematoksilende 30 dakika boyandı.
- Çeşme suyunda çalkalandı.
- Boyanın fazlası asit alkolde giderildi.
- Kesitler çeşme suyunda 1 saat bekletilerek mordanlama sonucu oluşan renk tonu ayarlandı.
- Eozinde 3 dakika boyandı.
- Distile suda yıkandı.
- Bu kez yükselen alkol serilerinden (%70, 90, 96, 100) geçirilerek toluole alındı ve daha sonra kesitler Kanada balzamu (AppliChem 8007-47-4) ile kapatıldı.

İşlem sonunda, hücre çekirdeği mavi-mor, sitoplazma ise pembe renge boyandı.

### 3.2.1.2. Masson Trikrom:

Bağ dokusunun genel görünümünü izlemek ve özellikle kolajen lifleri belirlemek amacıyla Masson trikrom boyası yapıldı.

Boyamanın yapılışı;

- Parafin kesitler 30 dakika toluolde bekletilerek dokudan parafinin uzaklaşması sağlandı. Derecesi inen alkol serilerinden (%100, 96, 90, 70) geçirilen kesitler daha sonra distile suya indirildi.

- Weigert hematoksilende 4 dakika boyandı.
- Çeşme suyunda 10 dakika tutuldu.
- Ponceau xylidin-asit fuksin solüsyonu ile 5 dakika boyandı.
- Hızlıca %1 asetik asitten geçirildi.
- Orange G ile 10 dakika boyandı.
- Hızlıca %1 asetik asitten geçirildi.
- Light Green ile 7 dakika boyandı.
- Hızlıca %1 asetik asitten geçirildi.
- 3 kez %100 etanolden geçirildi.
- Kesitler toluolden geçirilerek kanada balzamu ile kapatıldı.

İşlem sonunda, kolajen lifler yeşil, çekirdek mavi-siyah, sitoplazma, alyuvarlar ve kas dokusu kırmızı renge boyandı.

### 3.2.1.3. Periyodik Asit Schiff (PAS):

Karbonhidrattan zengin yapıların özellikle glikojen ve bazal membran boyanmalarını göstermek amacıyla PAS boyası yapıldı.

Boyamanın yapılışı;

- Parafin kesitler 30 dakika toluolde bekletilerek dokudan parafinin uzaklaşması sağlandı. Derecesi azalan alkol serilerinden (%100, 96, 90, 70) geçirilen kesitler daha sonra distile suya indirildi.

- Periyodik asitte 2 dakika boyandı.
- Distile suda 10 dakika bekletildi.
- Kesitler Schiff reaktantında 10 dakika boyandı.

- Akarsu altında 10 dakika bekletildi.
- Mayer hematoksilen ile 7 dakika boyandı.
- Akarsu altında 10 dakika bekletildi.
- İkişer kez %100 alkol ve toluolden geçirilerek kanada balzamu ile kapatıldı.  
İşlem sonunda glikojen, glikoprotein gibi karbonhidratlar mor-menekşe, çekirdek mavi renge boyandı (1).

### 3.2.2. İmmünohistokimya Uygulaması

#### 3.2.2.1. MMP-2, MMP-9, VEGF, FGF İşaretleme

Ovaryum dokusunda stromada incelenmesi hedeflenen MMP-2, MMP-9, VEGF ve bFGF hücre içi işaretleme için immünohistokimya çalışması yapıldı.

- Kesitler 1 gece 56°C etüvde tutularak lama tutunmaları sağlandı..
- Kesitler bu seriden geçirilerek saf suya indirildi.
  - Toluol ..... 2x10 dakika
  - Saf Alkol ..... 2x5 dakika
  - %96 Alkol ..... 2x 5 dakika
  - %90 Alkol ..... 2x 5 dakika
  - %70 Alkol ..... 2x 5 dakika
  - Saf Su ..... 1x 5 dakika
- Endojen peroksidazı maskelemek için kesitler %3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck 108597) – metanol (Riedel-de Haën 24229) bulunan şalede 10 dakika karanlıkta bekletildi.
  - 2 kez fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS) ile yıkandı.
  - Antijenin iyileşme işlemi için kesitler içinde 10 mM sitrat tamponu (pH=6) olan şaleye koyularak mikrodalga fırında 5 dakikalık periyotlarla 3 kez muamele edildi.
    - Mikrodalga fırından çıkarılan kesitler oda sıcaklığında 20 dakika soğumaya bırakıldı.
    - 2 defa PBS ile yıkandı.
    - Dokuların etrafı hidrofobik kalemle (Zymed 008899) sınırlandı.
    - İmmünohistokimya tepsisine konan kesitlere
      - MMP-2 ve VEGF boyaması için; 30 dakika Ultra V blok (Zymed 85-9043) uygulandı.
      - MMP-9 ve FGF boyaması için; 30 dakika tavşan serumu (Santa Cruz sc-2338) uygulandı.

- Primer antikor uygulaması her antikor için farklı dilüsyon oranlarında gerçekleştirildi.

- MMP-2 (Santa Cruz sc-13595) : 1/ 10
- MMP-9 (Santa Cruz sc-6840) : 1/ 50
- VEGF (Santa Cruz sc-53462) : 1/100
- bFGF (Santa Cruz sc-1884) : 1/ 50

- Kesitlere belirtilen oranlarda antikor dilüent (Zymed 00-3118) ile hazırlanan primer antikorlar uygulandı ve gece boyu +4°C de bekletildi.

- 2 defa PBS ile yıkandı.
- MMP-2 ve VEGF için Histostain Plus Broad Spectrum kit içinde bulunan Broad spectrum sekonder antikor (Zymed 85-9043) ile, MMP-9 ve FGF için rabbit anti-goat sekonder antikor (sc-2774) ile 30 dakika sekonder antikor uygulandı.

- 2 defa PBS ile yıkandı.
- 30 dakika HRP- Streptavidin (Zymed 85-9043) uygulandı.
- 2 defa PBS ile yıkandı.
- Karanlıkta 5 dakika kromojen (Zymed 002007) uygulandı.
- Distile su ile çalkalandı.
- 10 dakika Mayer Hematoksilen uygulandı.
- 7 dakika çeşme suyunda bekletildi.
- Preparatlar kurulanıp AEC ile uyumlu su bazlı kapatıcı (Zymed 008010) ile kapatıldı.

İmmünohistokimya ile boyanan preparatların boyanma yoğunlukları iki ayrı araştırmacı tarafından değerlendirilerek (-) Boyanma yok; (±) Soluk; (+) Orta; (++) Yoğun; (+++) Çok yoğun boyanma şeklinde derecelendirildi.

### 3.2.2.2. BrDU İşaretleme

Ovaryum dokusunda stroma bölgesinde ve granüloza hücrelerinde sentez fazındaki hücrelerin belirlenmesi amacıyla BrdU immünohistokimya çalışması yapıldı.

- Kesitler 1 gece 56°C etüvde tutuldu ve parafini giderildi.
- Kesitler bu seriden geçirilerek saf suya indirildi.
  - Toluol ..... 2x10 dakika
  - Saf Alkol ..... 2x5 dakika
  - %96 Alkol ..... 2x 5 dakika

- %90 Alkol ..... 2x 5 dakika
- %70 Alkol ..... 2x 5 dakika
- Saf Su ..... 1x 5 dakika
- Endojen peroksidazı maskelemek için kesitler %0,5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – metanolde 20 dakika süreyle karanlıkta bekletildi.
- 3 defa distile su ile yıkandı.
- 37 °C etüvde tripsin ile 30 dakika muamele edildi.
- 2 defa distile su ile yıkandı.
- 37 °C etüvde 4N HCl ile 30 dakika muamele edildi.
- Dokuların etrafı hidrofobik kalemle sınırlandı.
- İmmünohistokimya tepsisine konan kesitlere 30 dakika Ultra V blok (Zymed 85-9043) uygulandı.
- Primer antikor (Zymed 18-0103) 1/50 dilüsyon oranında antikor dilüent ile hazırlanarak kesitlere uygulandı ve gece boyu +4°C’de bekletildi.
- 2 defa PBS ile yıkandı.
- Sekonder antikor 30 dakika uygulandı.
- 2 defa PBS ile yıkandı.
- 30 dakika Streptavidin uygulandı.
- 2 defa PBS ile yıkandı.
- Karanlıkta 5 dakika kromojen uygulandı.
- Distile su ile çalkalandı.
- 7 dakika Mayer Hematoksilen uygulandı.
- Distile su ile 2 kez yıkandı.
- Preparatlar kurulanıp AEC ile uyumlu su bazlı kapatıcı ile kapatıldı.

BrDU ile boyanan preparatlarda stromada ve granüloza hücrelerine 1000’er hücre sayıldı ve çıkan değerler istatistiksel olarak değerlendirildi.

Histokimya ve immünohistokimyasal boyama yöntemleri ile hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu (Olympus CX21) ile incelendi ve incelenen bölümlerin fotoğrafı sayısal olarak kaydedildi. (Sony DSC-M2).

### 3.3. Elektron Mikroskobu Takibi

Deney hayvanlarından alınan ovaryum doku örneklerinden 1mm<sup>3</sup> büyüklüğündeki parçalar 0.1 M fosfat tamponu (pH 7.4) ile tamponlanmış olan %2,5'lik glutraldehit çözeltisi içinde 24 saat +4°C'de fikse edildi.

- 2 kez 10'ar dakika PBS ile muamele edildi.
- 1 saat Osmik asit (ikinci fiksatif) içinde bekletildi.
- PBS içinde 10 dakika bekletildi.
- %1'lik uranil asetat 1 saat uygulandı.
- PBS içinde 10 dakika bekletildi.
- Herbirinde 10'ar dakika olmak üzere yükselen aseton serilerinden (%30, %50, %70, %90, %96, %100, %100) (Merck) geçirildi
- 1 saat 1:1 Aseton : Epon karışımında bekletildi.
- 1 saat 1:3 Aseton : Epon karışımında bekletildi.
- 1 saat saf epon içinde bekletildi.
- Son olarak dokular 0,6 x 1 mm boyutlarındaki jelatin kapsüller içinde doldurulmuş gömme ortamına (Epon 812 – Merck) gömülüp 60°C'lik etüvde 18 saat bekletilerek eponun polimerizasyonu sağlandı.

Alınan yarı ince kesitler toluidin mavisiyle boyanıp, hedef bölümler tespit edildi ve ince kesit alınacak bölgeler belirlendi. Ultramikrotom (C. Reichert OM U3) ile 400 - 600 nanometre kalınlığında alınan ince kesitler, film ile kaplanmış 100 pencereci bakır kafesler üzerine alındı. Kontrastlama için 30 dakika uranil asetat ve 10 dakika kurşun nitrat (Reynold's) damlaları üzerinde bekletildikten sonra kesitler transmisyon elektron mikroskobu (TEM) (JEOL –JEM 1011) ile incelenerek incelenerek MegaView sayısal görüntüleme kamerası ve AnalySIS (Soft Imaging Software, GmbH) yazılımı ile fotoğraflandı. (23).

### 3.4. İstatistiksel Analiz

Yapılan çalışmadan elde edilen verilerin istatistiksel karşılaştırması SPSS 14.0 istatistik programı ile gerçekleştirildi. Deney ve kontrol gruplarına ait ovaryum dokularında atretik foliküllerin ve granüloza hücrelerinde ve stromada BrdU ile işaretlenmiş hücrelerin sayıları arasındaki farkın değerlendirilmesi Student t testi ile analiz edildi. Anlamlılık sınırı  $p < 0,05$  olarak kabul edildi.

### **3.5. Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar**

#### **3.5.1. Kullanılan Malzemeler**

Levonorgestrel (Sigma N2260), etinil östradiol (Sigma E4876), kloroform (Merck), BrdU (Sigma B-5002), toluol (Merck), Histogrip (Zymed 00-8050), Kanada balzamu (AppliChem 8007-47-4), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck 108597), metanol (Riedel-de Haën 24229), hidrofobik kalem (Zymed 008899), Ultra V blok (Zymed 85-9043), tavşan serumu (Santa Cruz sc-2338), MMP-2 (Santa Cruz sc-13595), MMP-9 (Santa Cruz sc-6840), VEGF (Santa Cruz sc-53462), bFGF (Santa Cruz sc-1884), antikor dilüent (Zymed 00-3118), sekonder antikor (sc-2774), sekonder antikor (Zymed 85-9043), HRP-Streptavidin (Zymed 85-9043), kromojen (Zymed 002007), AEC ile uyumlu su bazlı kapatıcı (Zymed 008010).

#### **3.5.2. Kullanılan Cihazlar**

Mikrotom (Leica RM 2255), etüv (Heraeus), ışık mikroskobu (Olympus CX21), fotoğraf makinesi (Sony DSC-M2), Ultramikrotom (C. Reichert OM U3), transmisyon elektron mikroskobu (TEM) (JEOL –JEM 1011), CCD kamera (Megaview GmbH)

## 4. BULGULAR

### 4.1. Işık mikroskobu bulguları:

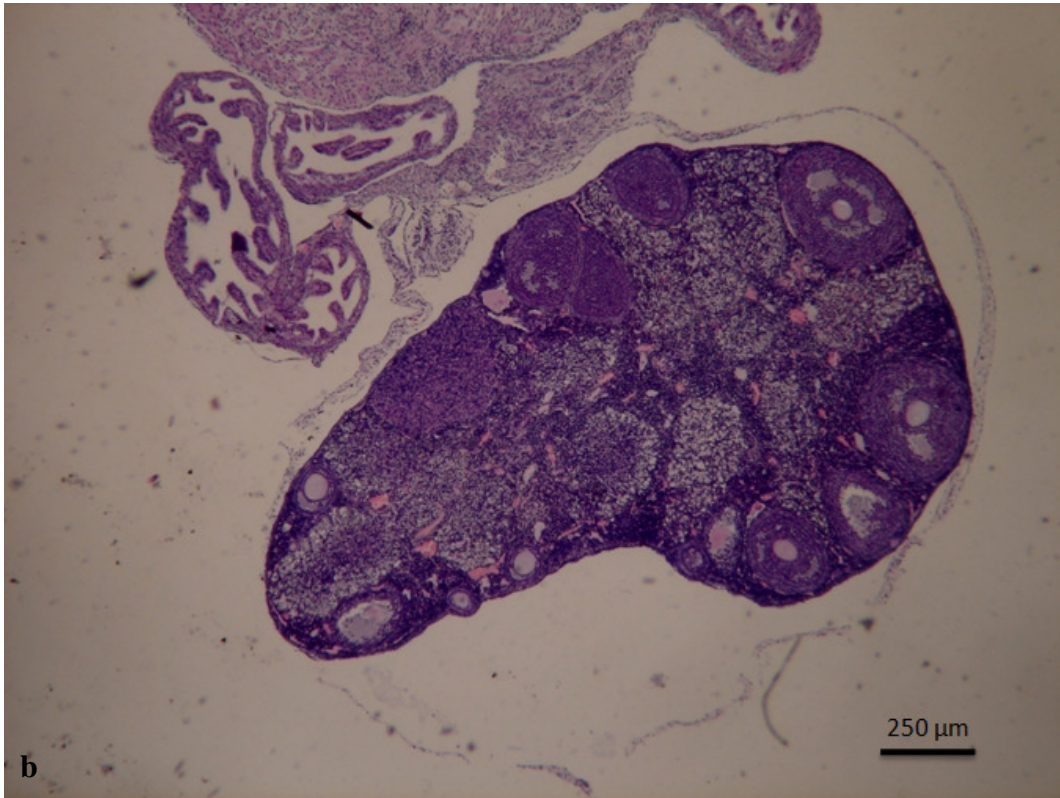
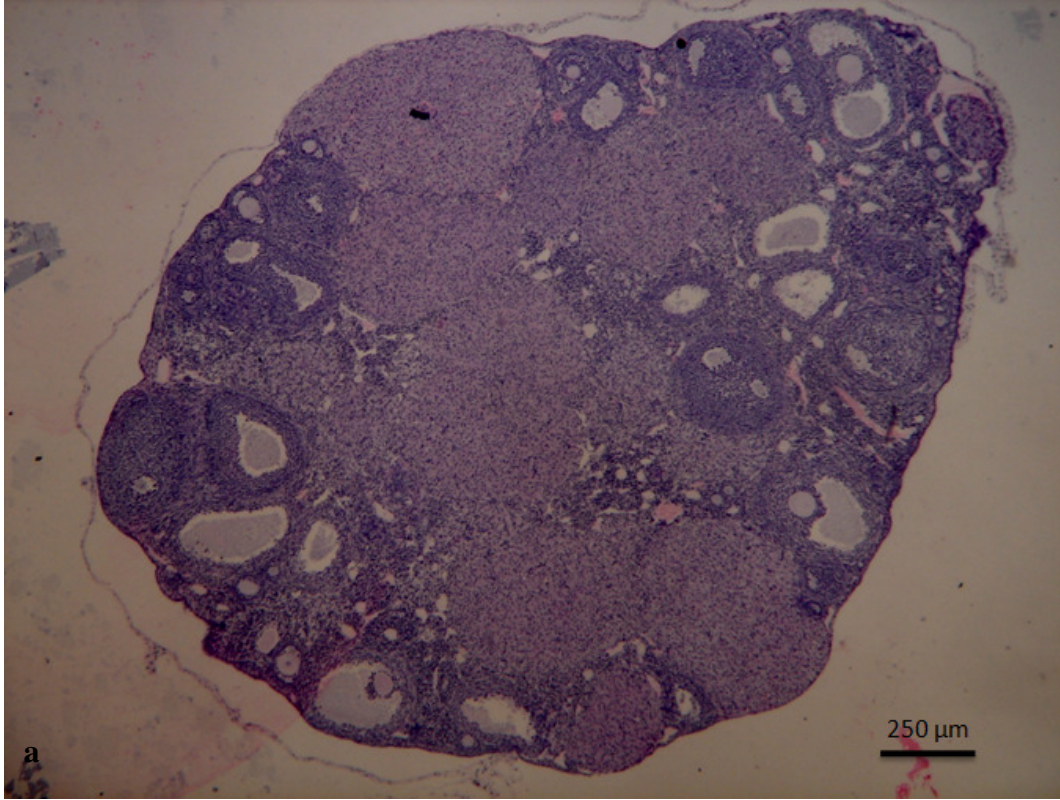
Çalışmamızda kontrol ve deney gruplarına ait ovaryum doku örneklerinin genel görünümünü belirlemek amacıyla H&E, karbonhidrattan zengin yapıların özellikle glikojen ve bazal membran boyanmalarını göstermek amacıyla PAS ve bağ dokusunun genel görünümünü izlemek ve özellikle kolajen lifleri belirlemek amacıyla Masson trikrom histokimyasal boyaları uygulandı. H&E ile boyama sonucunda deney grubunda ileri gelişim aşamalarındaki foliküllerin bulunmadığı gözlemlendi (Şekil 4-1b). Masson trikrom boyası ile kontrol ve deney gruplarına ait ovaryum dokularında stroma bölgeleri karşılaştırıldı ve iki grup arasında bağ dokusu miktarında ve kolajen lif dağılımında bir fark olmadığı izlendi. Uyguladığımız histokimyasal boyalar ile foliküllerin teka tabakaları karşılaştırmalı olarak incelendiğinde iki grup arasında tabakaların kalınlıkları bakımından fark olmadığı gözlemlendi (Şekil 4-2a, b). PAS ve Masson trikrom boyaları ile atretik foliküllerin değerlendirilmesinde deney grubunda kontrol grubuna kıyasla daha fazla sayıda ve daha büyük foliküllerin atreziye uğradığı gözlemlendi.(Şekil 4-2a, b; Şekil 4-3a, b; Şekil 4-4a, b). Deney grubunda atretik folikül sayısı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla bulundu ( $p<0,001$ ).

Histokimyasal boya uygulaması sonucunda değerlendirilen atretik folikül sayılarına göre yapılan istatistiksel analiz sonuçları tablo 4-1’de derlenmiş olarak sunulmaktadır.

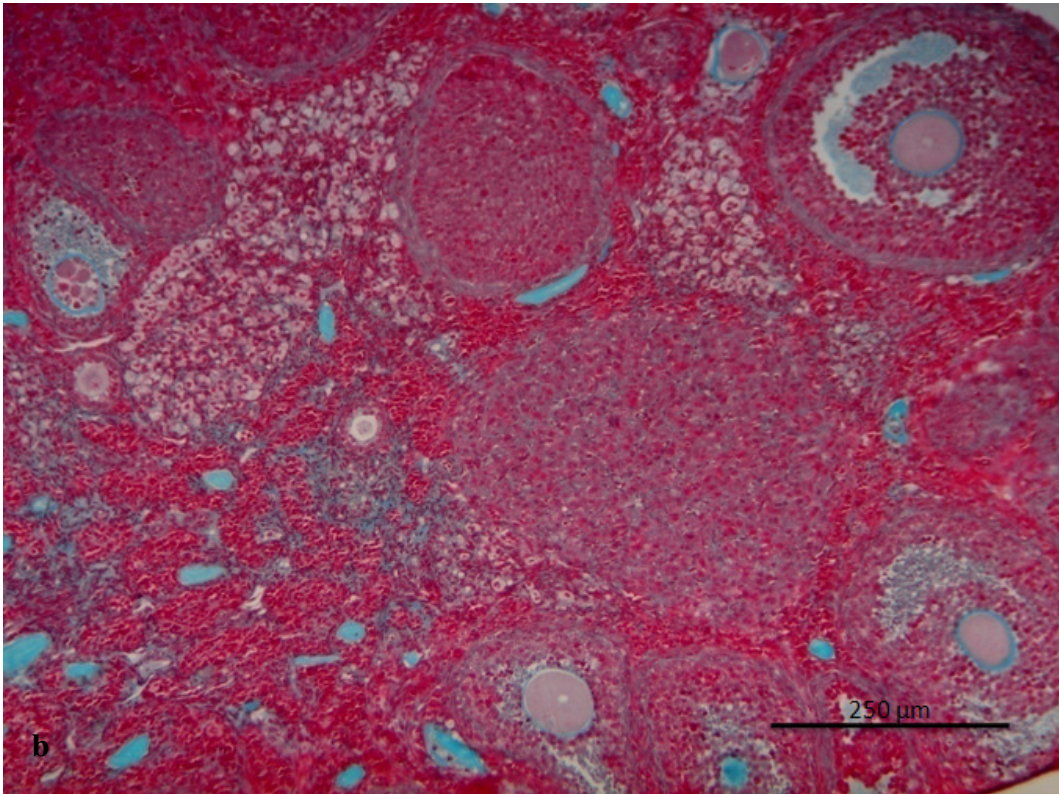
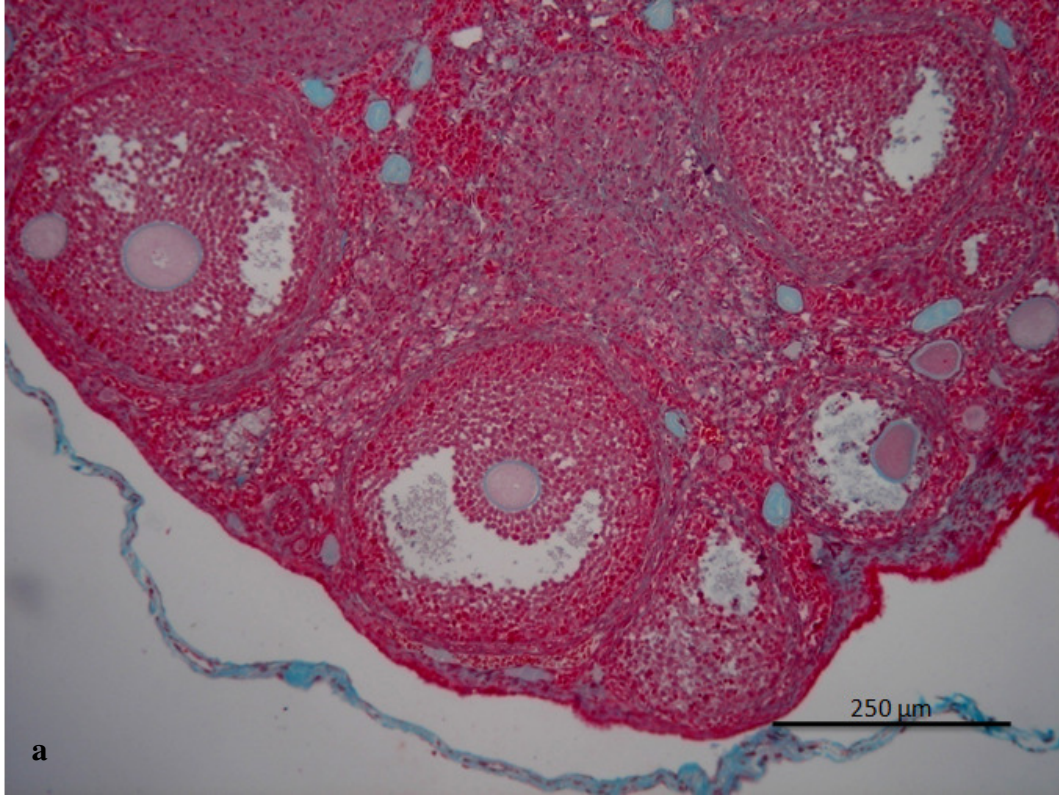
**Tablo 4-1: Deney ve kontrol grubunda histokimyasal boyama ile saptanan atretik folikül sayıları.**

	Kontrol Grubu (n:13)	Deney Grubu (n:18)
Ortalama Atretik Folikül Sayısı	3,07 ± 2,46	9,11 ± 4,29*

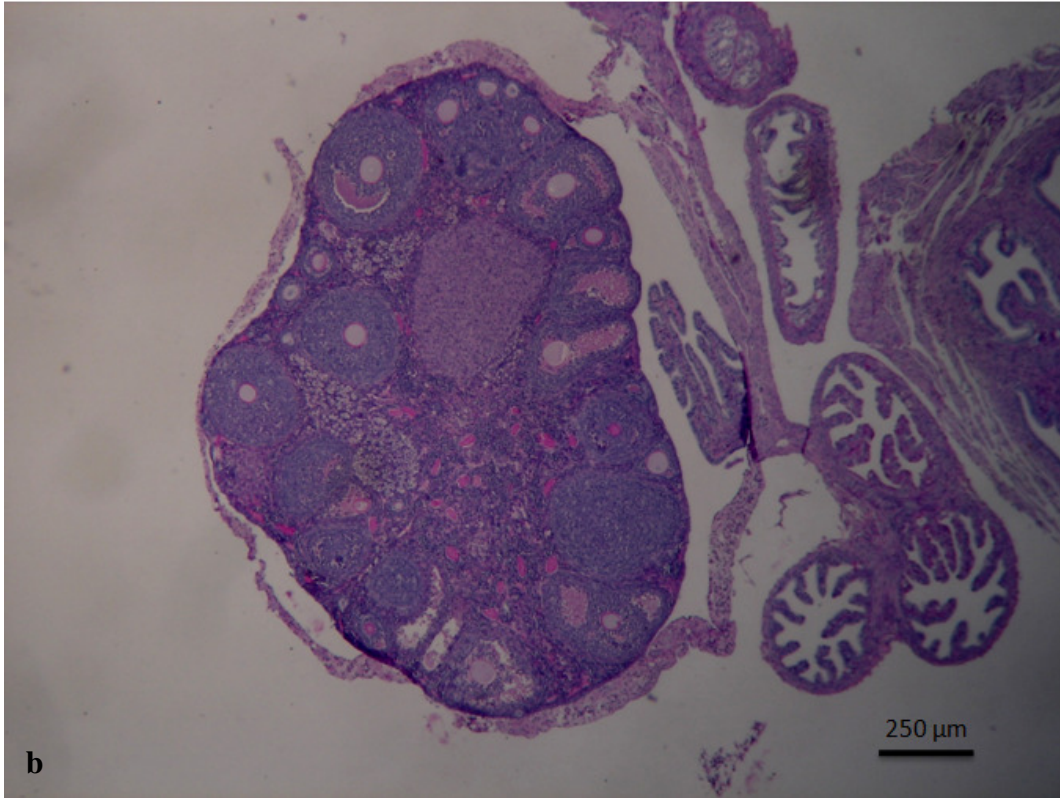
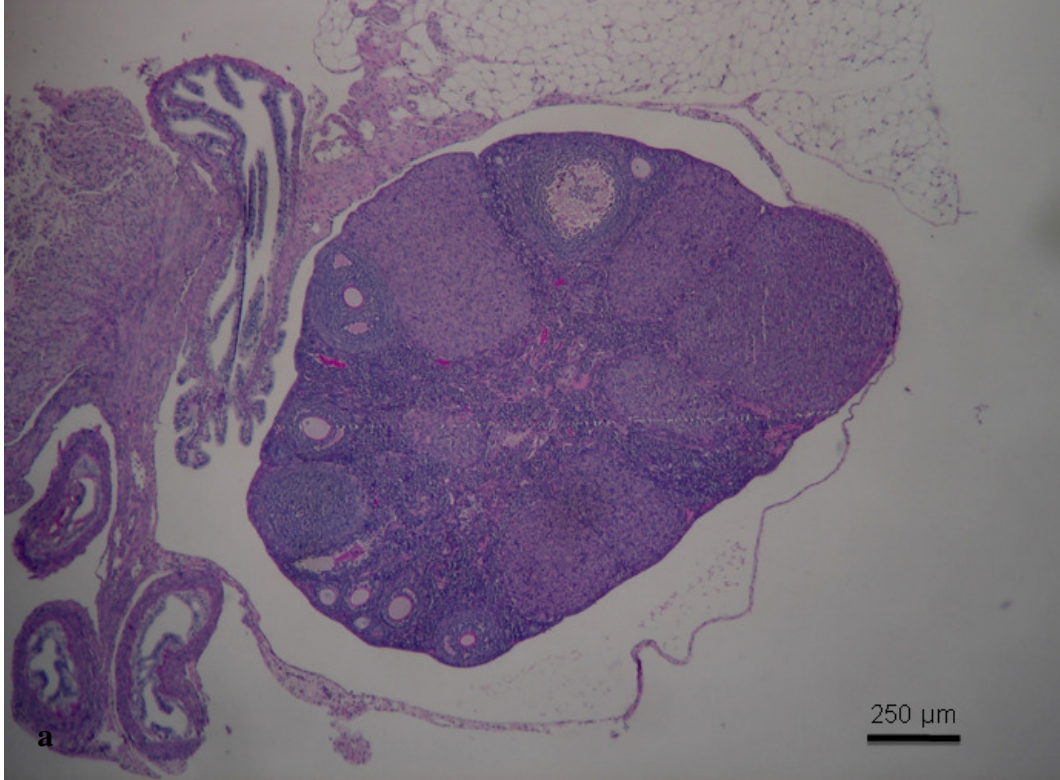
\* $p<0,001$



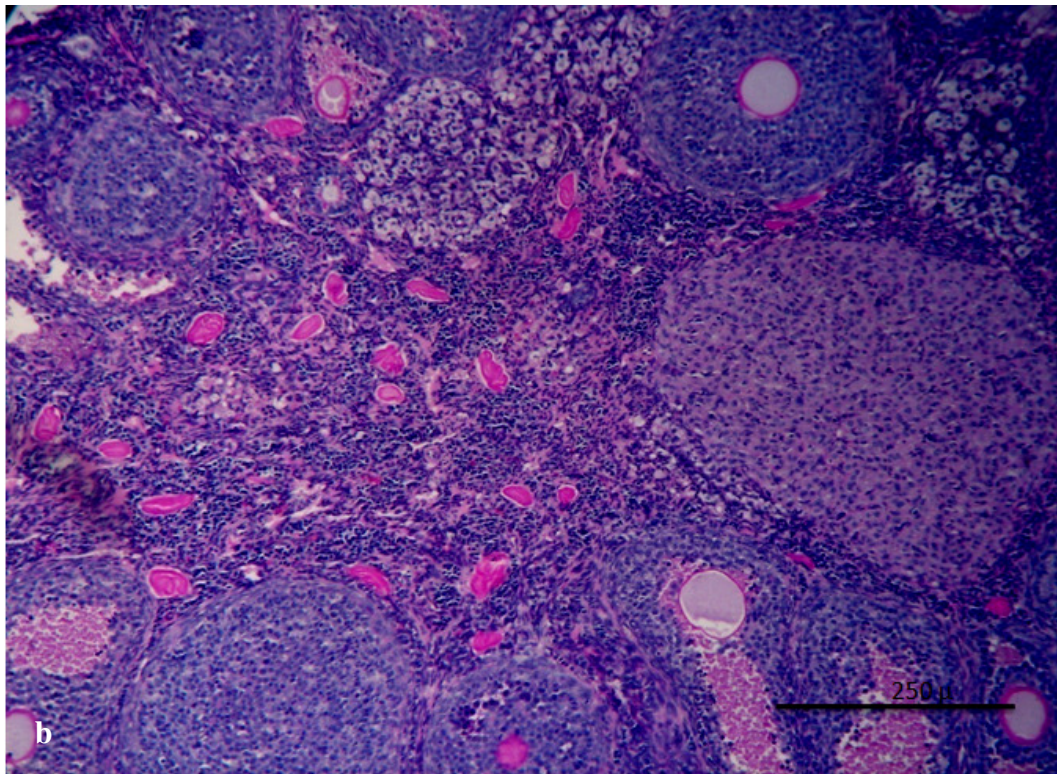
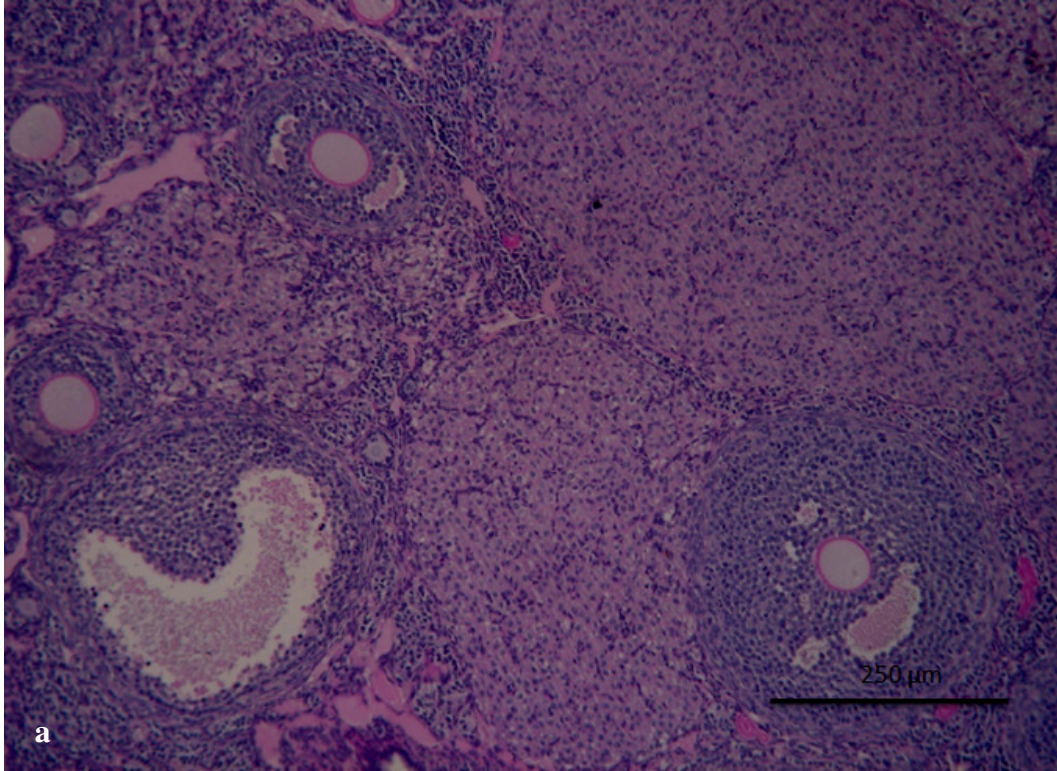
**Şekil 4-1: Kontrol (a) ve deney (b) grupları ovarium morfolojisi genel görüntüsüne ait ışık mikrokobu fotoğrafı. Hematoksilen – eozin (x4)**



**Şekil 4-2: Kontrol (a) ve deney (b) gruplarında ovaryumdaki bağ dokusu dağılımını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. Masson trikrom (x10)**



**Şekil 4-3: Kontrol (a) ve deney (b) grupları ovaryum dokusu genel görüntüsüne ait ışık mikroskobu fotoğrafı. PAS (x4)**



**Şekil 4-4: Kontrol (a) ve deney (b) grupları ovaryum dokusu atretik foliküllerin görüntüsüne ait ışık mikroskobu fotoğrafı. PAS (x10)**

## **4.2. İmmünohistokimya bulguları:**

### **4.2.1. FGF**

Kontrol grubuna ait ovaryum dokusunda bFGF'yi belirlemek amacıyla yapılan immünohistokimyasal boyamada ovaryum yüzey epitelinde ve ovaryumun stromasında glandüler hücrelerde yoğun boyanma meydana gelirken, diğer bağ dokusu hücrelerinde ve teka interna tabakasında boyanmanın olmadığı gözlenmedi. Granüloza hücreleri ve luteal dokuda boyanmanın orta derecede, teka eksterna hücrelerinde boyanmanın soluk olduğu izlendi (Şekil 4-5a; Şekil 4-6a).

Deney grubuna ait farelerin ovaryumlarında bFGF'ye yönelik olarak gerçekleştirilen immünohistokimyasal boyama sonucunda kontrol grubuna benzer sonuçlar elde edildi. Yapılan gözlemlerde ovaryum yüzey epitelinde ve ovaryumun stromasında glandüler hücrelerde yoğun boyanma meydana gelirken, diğer bağ dokusu hücrelerinde ve teka interna tabakasında boyanmanın olmadığı gözlenmedi. Granüloza hücreleri ve luteal dokuda boyanmanın orta derecede, teka eksterna hücrelerinde boyanmanın soluk olduğu izlendi (Şekil 4-5b; Şekil 4-6b).

### **4.2.2. MMP-2**

Kontrol grubuna ait ovaryum dokusunda MMP-2'yi belirlemek amacıyla yapılan immünohistokimyasal boyamada ovaryumun stromasında glandüler hücrelerde ve luteal dokuda boyanmanın yoğun olduğu ve teka interna hücrelerinde ise boyanmanın soluk olduğu izlendi. Teka eksterna hücrelerinde orta düzeyde boyanma gözlenirken, ovaryum yüzey epitelinde, diğer bağ dokusu hücrelerinde ve granüloza hücrelerinde boyanmanın olmadığı gözlemlendi (Şekil 4-7a; Şekil 4-8a).

Deney grubuna ait hayvanların ovaryumlarının MMP-2 için immünohistokimyasal olarak işaretlenmesi sonucunda kontrol grubuna benzer sonuçlar elde edildi. Ovaryumun stromasında glandüler hücrelerde ve luteal dokuda boyanmanın yoğun olduğu ve teka interna hücrelerinde ise boyanmanın soluk olduğu izlendi. Teka eksterna hücrelerinde orta düzeyde boyanma gözlenirken, ovaryum yüzey epitelinde, diğer bağ dokusu hücrelerinde ve granüloza hücrelerinde boyanmanın olmadığı gözlemlendi (Şekil 4-7b; Şekil 4-8b).

### 4.2.3. MMP-9

Kontrol grubuna ait ovaryum dokusunda MMP-9'u belirlemek amacıyla yapılan immünohistokimyasal boyamada ovaryum yüzey epitelinde, granüloza hücrelerinde ve teka interna hücreleri boyanmanın orta düzeyde olduğu izlendi. Ovaryumun stromasında glandüler hücrelerde ve luteal dokuda boyanmanın yoğun olduğu gözlemlendi. Teka eksterna hücrelerinde ve diğer bağ dokusu hücrelerinde ise boyanmanın olmadığı izlendi (Şekil 4-9a; Şekil 4-10a).

Deney grubuna ait hayvanların ovaryumlarının MMP-9 için immünohistokimyasal olarak işaretlenmesi sonucunda kontrol grubuna benzer şekilde ovaryum yüzey epitelinde, granüloza hücrelerinde ve teka interna hücreleri boyanmanın orta düzeyde olduğu izlendi. Luteal dokuda boyanmanın yoğun olduğu, Teka eksterna hücrelerinde ve diğer bağ dokusu hücrelerinde ise boyanmanın olmadığı izlendi Kontrol grubundan farklı olarak deney grubunda ovaryumun stromasında glandüler hücrelerde boyanma derecesinde artış olduğu belirlendi (Şekil 4-9b; Şekil 4-10b).

### 4.2.4. VEGF

Kontrol grubuna ait ovaryum dokusunda VEGF'yi belirlemek amacıyla yapılan immünohistokimyasal boyamada ovaryum yüzey epitelinde ve granüloza hücrelerinde boyanmanın orta düzeyde olduğu izlendi. Ovaryum stromasında glandüler hücrelerde ve luteal dokuda yoğun boyanma olduğu, diğer bağdokusu hücreleri, teka interna ve teka eksterna hücrelerinde ise boyanmanın olmadığı izlendi (Şekil 4-11a; Şekil 4-12a).

Deney grubuna ait hayvanların ovaryumlarının VEGF için immünohistokimyasal olarak işaretlenmesi sonucunda kontrol grubuna benzer şekilde ovaryum yüzey epitelinde ve granüloza hücrelerinde boyanmanın orta düzeyde olduğu, glandüler hücreler dışındaki diğer bağ dokusu hücrelerinde, teka interna ve teka eksterna hücrelerinde boyanmanın olmadığı izlendi. Kontrol grubundan farklı olarak stromada yer alan glandüler hücrelerde ve luteal dokuda boyanmanın orta düzeyde olduğu gözlemlendi (Şekil 4-11b; Şekil 4-12b).

FGF, MMP-2, MMP-9 ve VEGF immünohistokimya uygulamalarımız sonucu elde ettiğimiz bulgularımızın özeti olarak değerlendirilebilecek genel özellikler bir tablo şeklinde toplu olarak sunulmaktadır. (Tablo 4-2)

#### 4.2.5. BrdU

Kontrol grubuna ait ovaryum dokusunda sentez fazındaki hücreleri belirlemek amacıyla yapılan BrdU ile immünohistokimyasal boyama sonucunda foliküllere ait granüloza hücrelerinde (Şekil 4-13a) ve ovaryum stromasında (Şekil 4-14a) işaretlenmenin olduğu gözlemlendi.

Deney grubuna ait ovaryum dokusunda ise BrdU ile immünohistokimyasal boyama sonucunda kontrol grubuna benzer olarak granüloza hücrelerinde (Şekil 4-13b) boyanmanın meydana geldiği ancak hiçbir stroma bölgesinde (Şekil 4-14b) boyanmanın olmadığı görüldü. Elde ettiğimiz bu değerler istatistiksel olarak değerlendirildi. Deney grubunda granüloza hücrelerinde ve ovaryum stromasında ve foliküle ait granüloza hücrelerinde sentez fazındaki hücrelerin sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana geldiği izlendi ( $p < 0,001$ ).

BrdU sayımlarına göre yapılan istatistiksel analiz sonuçları granüloza hücreleri (Tablo 4-3) ve stroma hücreleri (Tablo 4-4) için tablo şeklinde toplu olarak sunulmaktadır.

**Tablo 4-2: FGF, MMP-2, MMP-9 ve VEGF immünohistokimya uygulamalarımız sonucu kontrol ve deney gruplarına ait bulgulara ait genel özellikler.**

	FGF		MMP-2		MMP-9		VEGF	
	Kontrol Grubu	Deney Grubu	Kontrol Grubu	Deney Grubu	Kontrol Grubu	Deney Grubu	Kontrol Grubu	Deney Grubu
<b>Ovaryum yüzey epiteli</b>	++	++	-	-	+	+	+	+
<b>Teka interna</b>	-	-	±	±	+	+	-	-
<b>Teka eksterna</b>	±	±	+	+	-	-	-	-
<b>Granüloza hücreleri</b>	+	+	-	-	+	+	+	+
<b>Luteal dokusu</b>	+	+	++	++	++	++	++	+
<b>İnterstisyel glandüler hücreler</b>	++	++	++	++	++	+++	++	+
<b>Diğer bağ dokusu hücreleri</b>	-	-	-	-	-	-	-	-

( -: Boyanma yok, ±: Soluk, +: Orta, ++: Yoğun, +++: Çok yoğun boyanmayı ifade etmektedir.)

**Tablo 4-3: Kontrol ve deney gruplarına ait Granüloza hücreleri BrdU sayım sonuçları.**

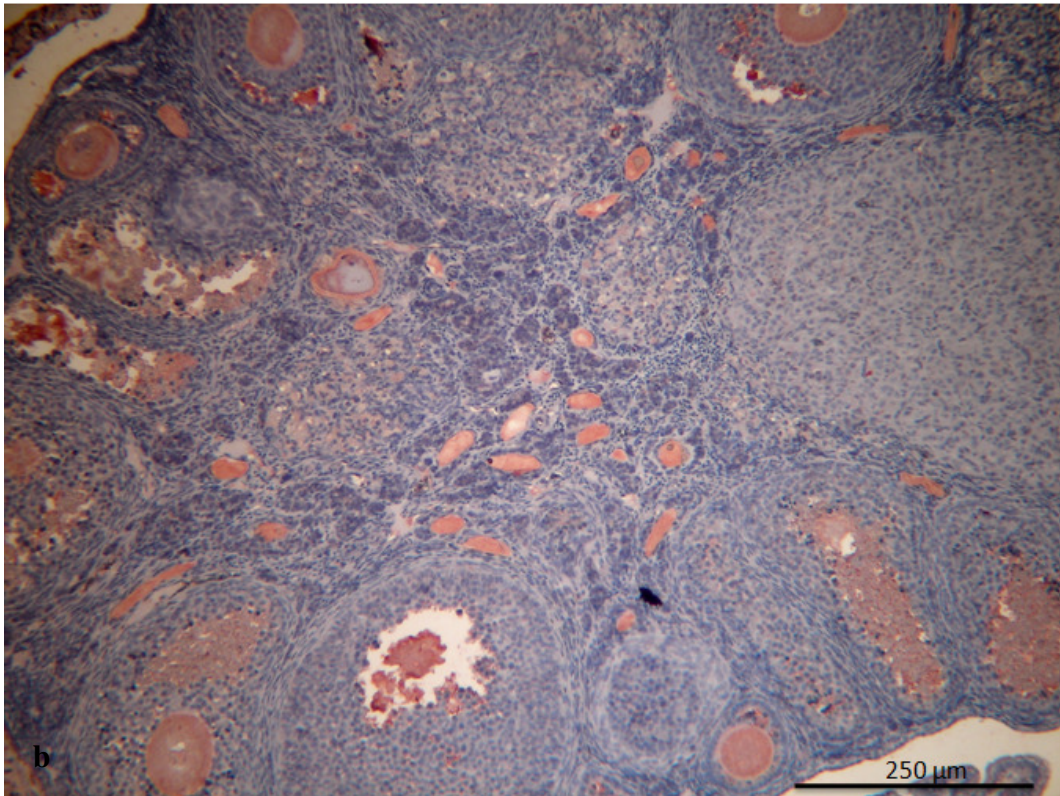
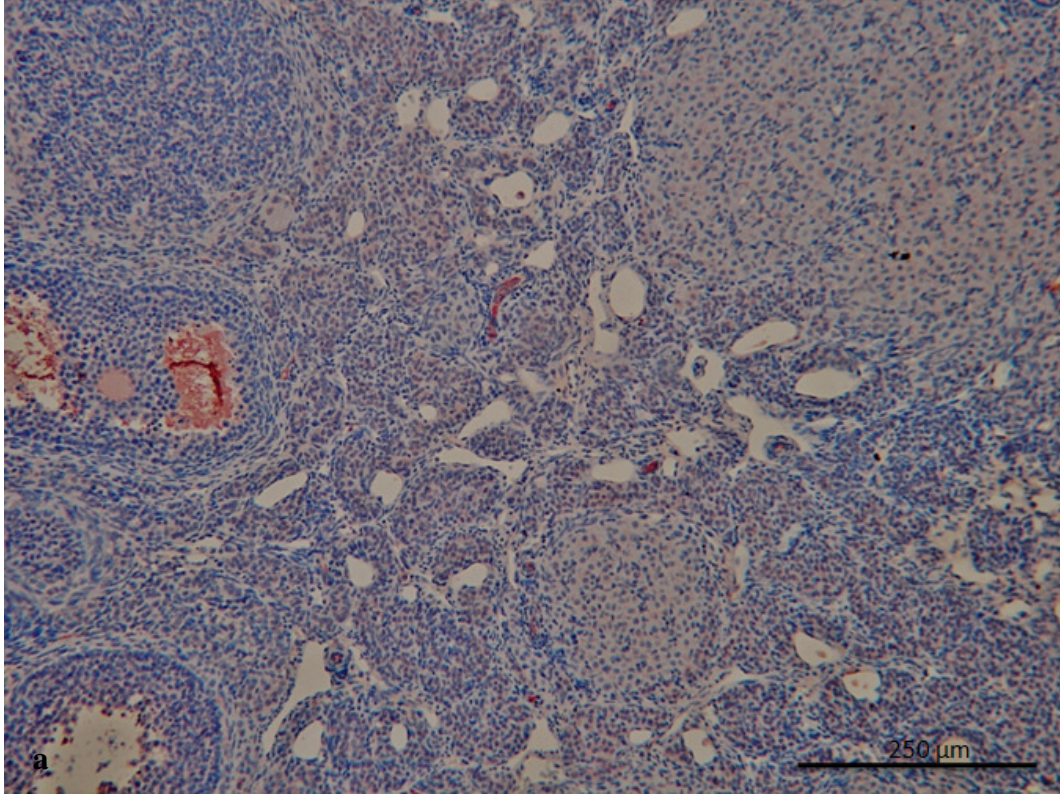
	Kontrol Grubu (n:16)	Deney Grubu (n:23)
<b>Ortalama Boyanan Granüloza Hücre Sayısı</b>	21,56 ± 7,13	18,74 ± 6,4*

\*p < 0,001

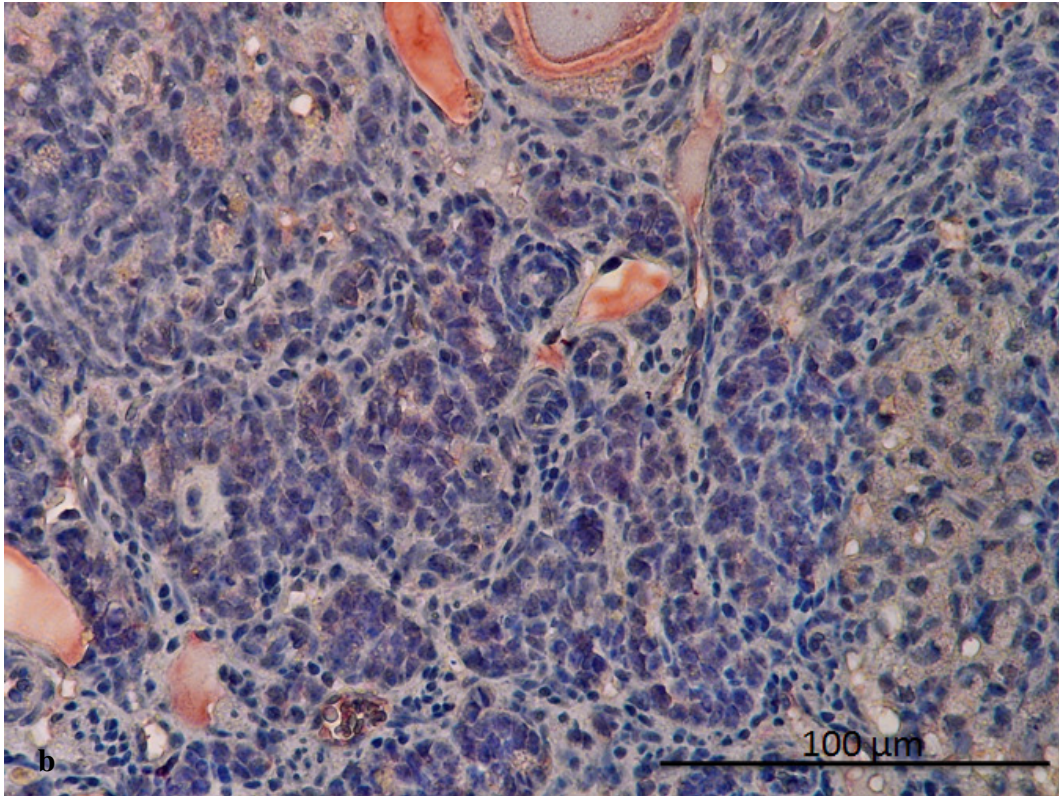
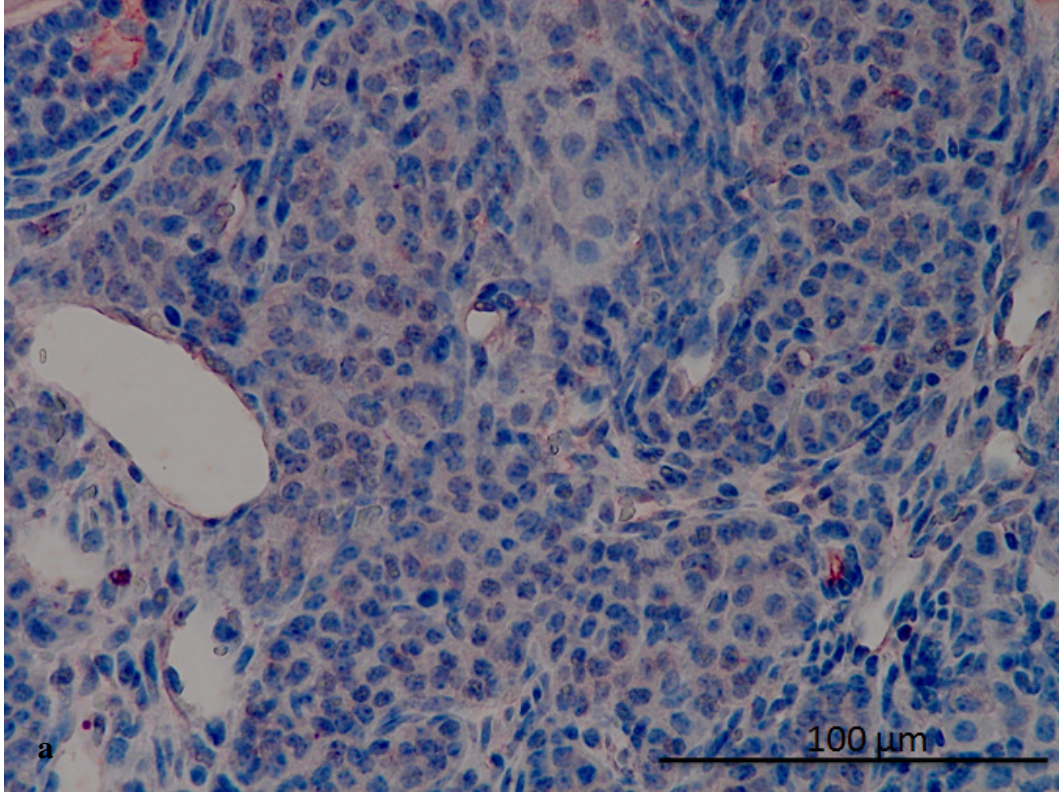
**Tablo 4-4: Kontrol ve deney gruplarına ait stroma hücreleri BrdU sayım sonuçları.**

	Kontrol Grubu (n:11)	Deney Grubu (n:11)
<b>Stromada Boyanan Ortalama Hücre Sayısı</b>	3,37 ± 1,1	0*

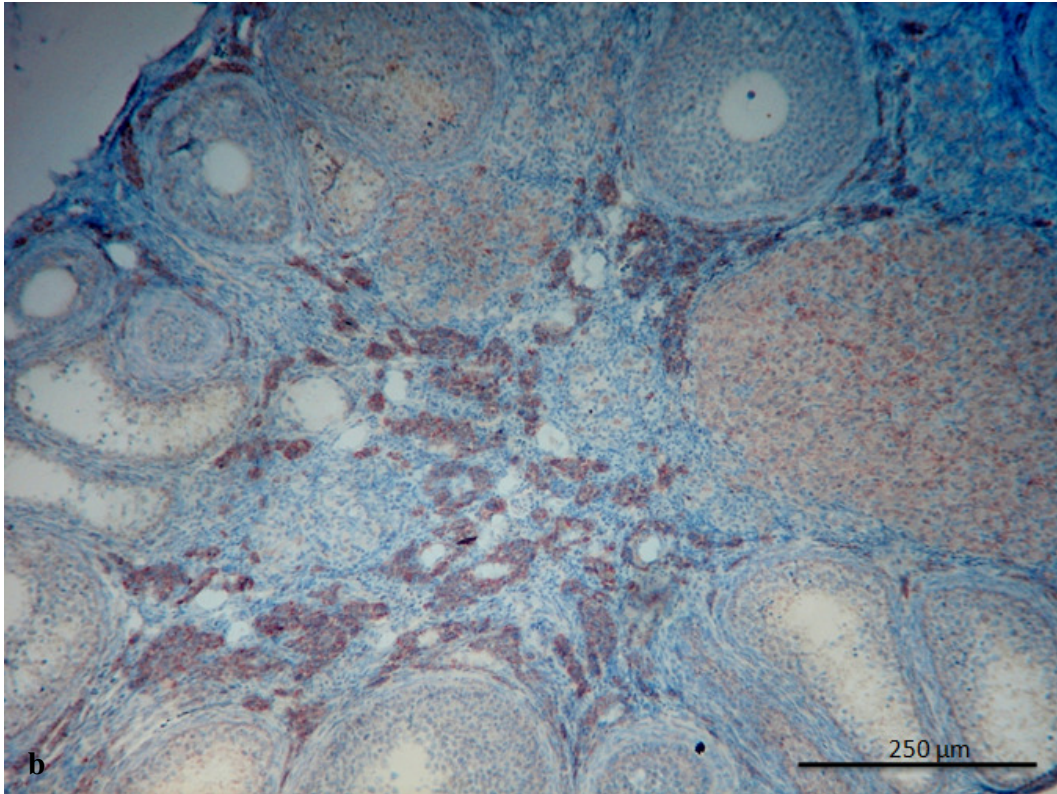
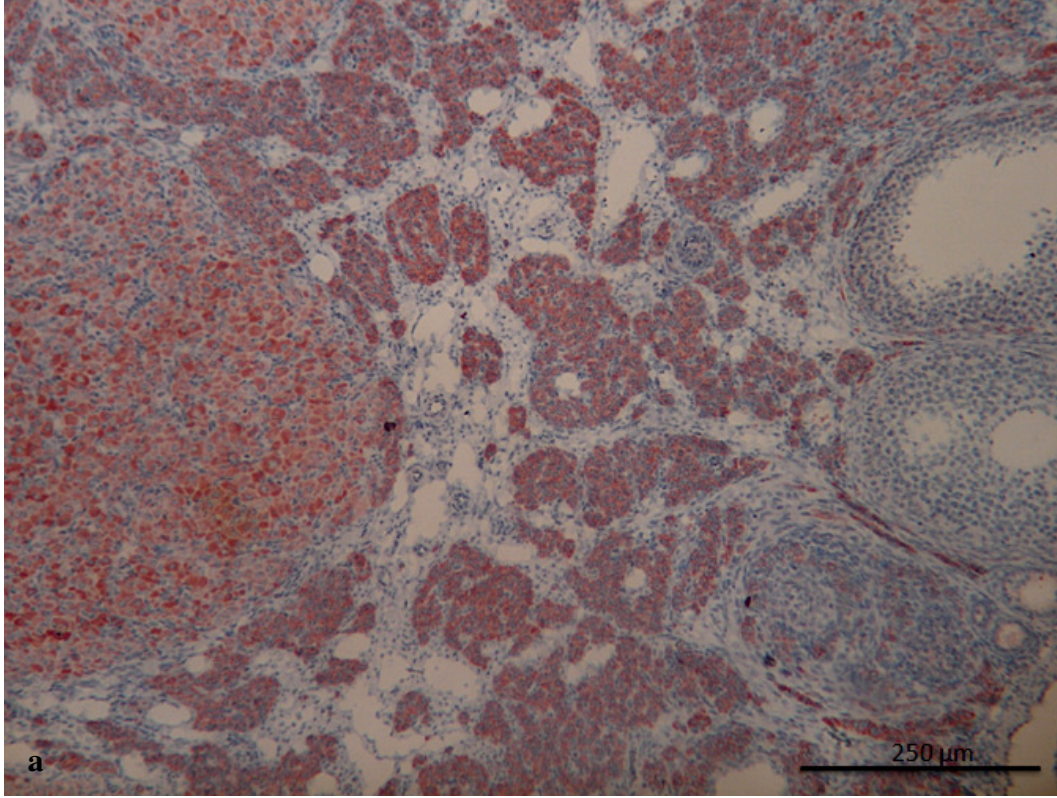
\*p < 0,001



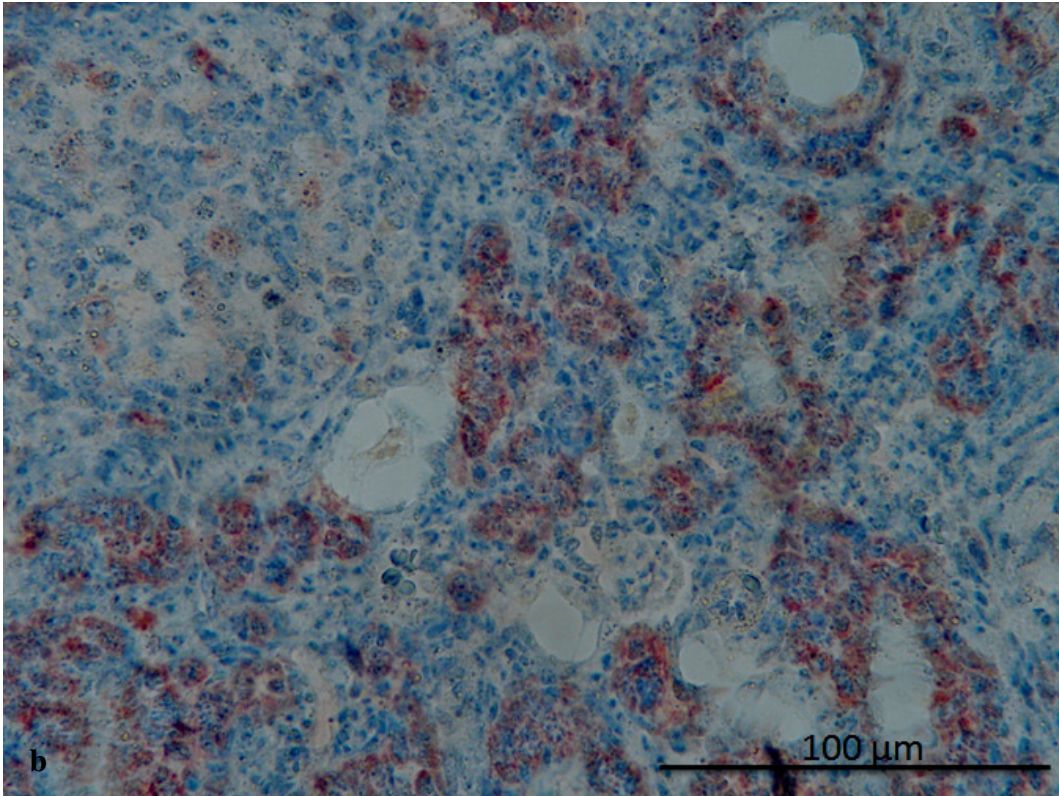
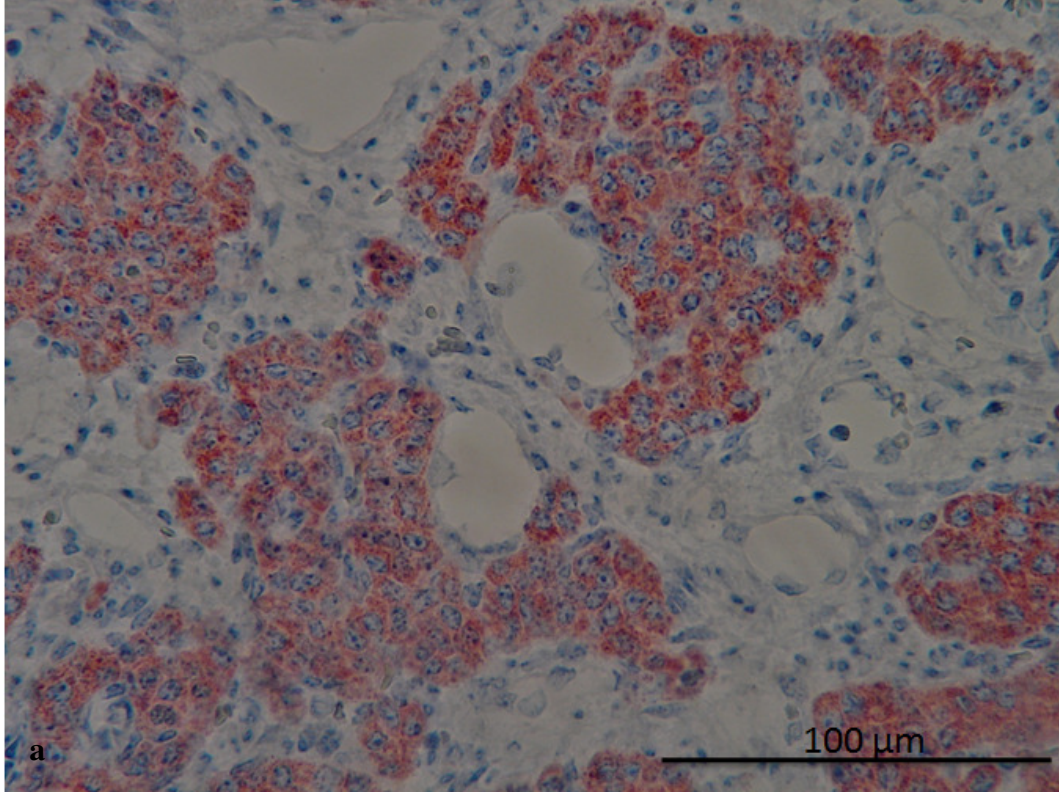
**Şekil 4-5: Kontrol (a) ve deney (b) grupları ovaryum dokusu FGF immünohistokimya boyamasının genel görüntüsünü gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. (x10)**



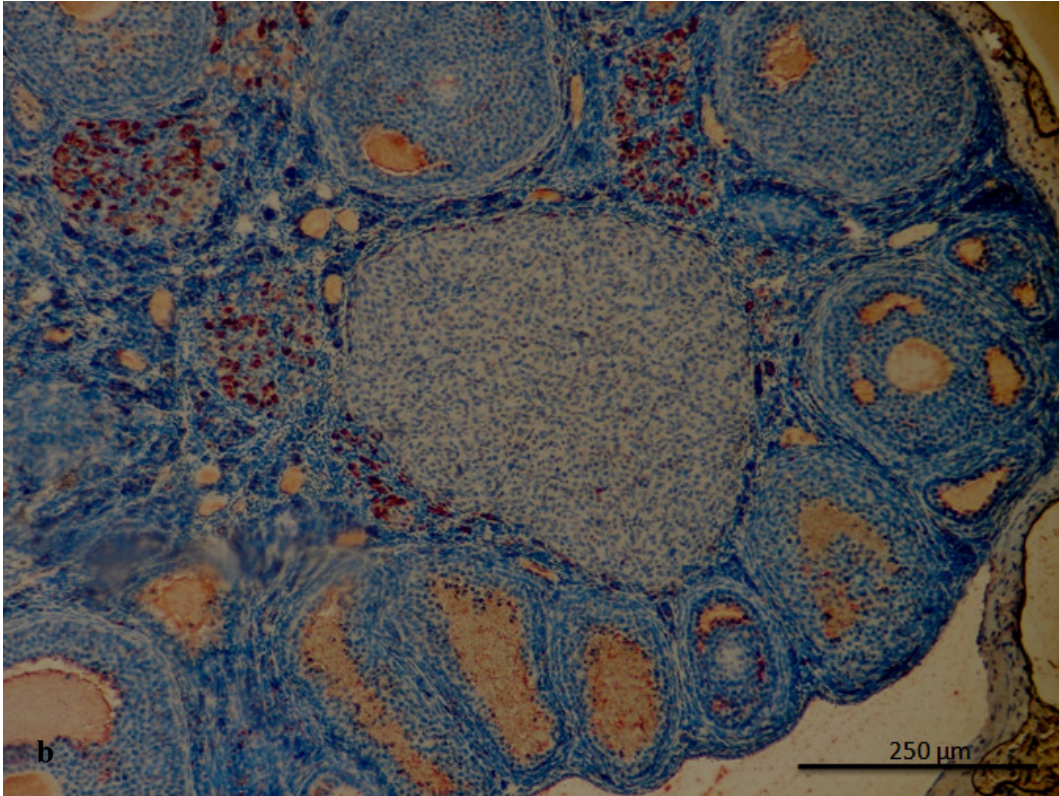
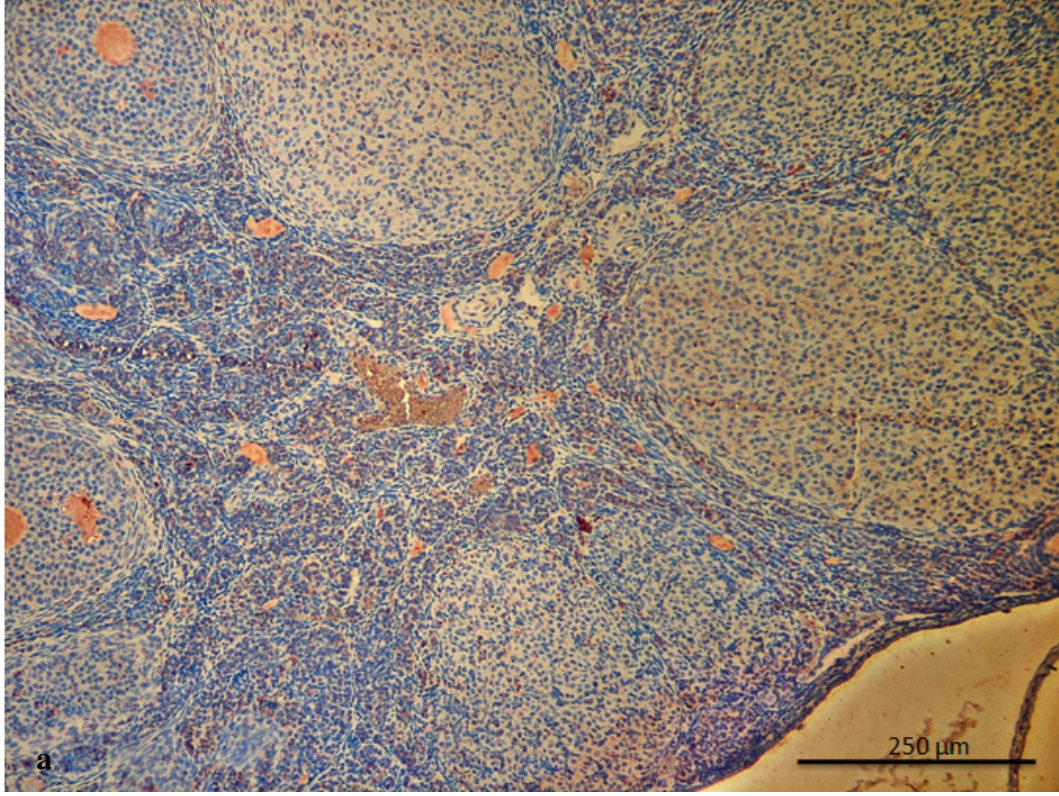
**Şekil 4-6: Kontrol (a) ve deney (b) grupları ovaryum dokusu interstisyel glandüler hücreler ve diğer bağ dokusu hücrelerinde FGF immünohistokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. (x40)**



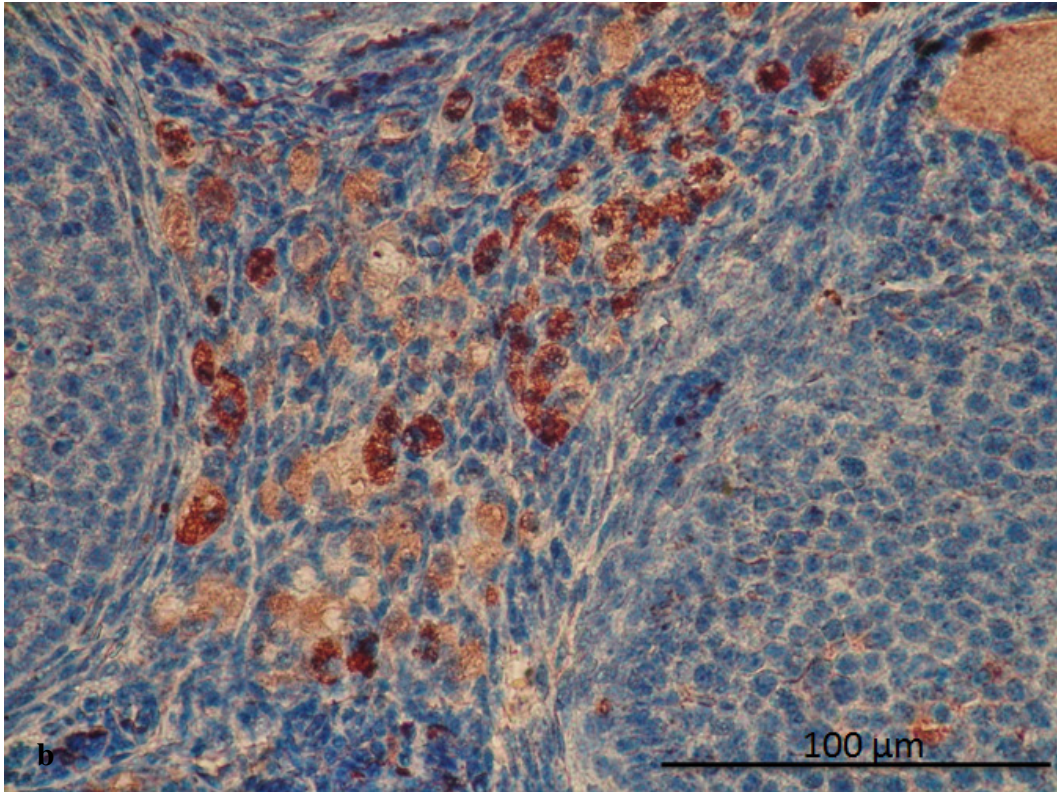
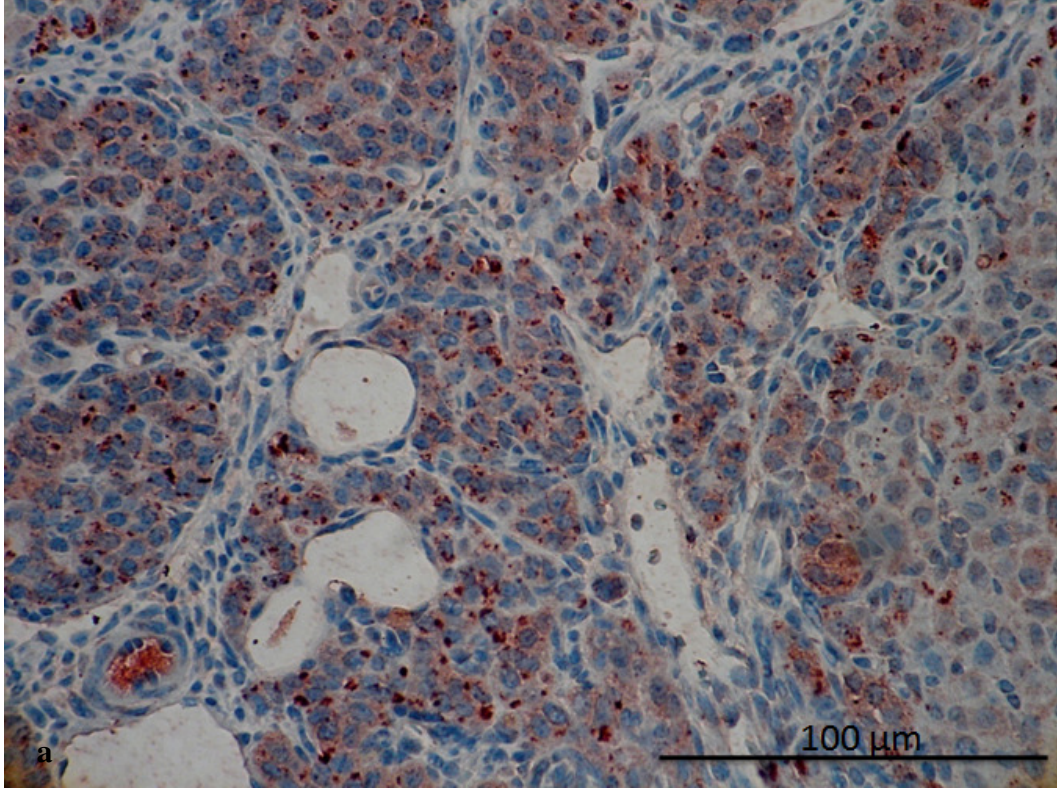
**Şekil 4-7: Kontrol (a) ve deney (b) grupları ovaryum dokusu MMP-2 immünohistokimya boyamasının genel görüntüsünü gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. (x10)**



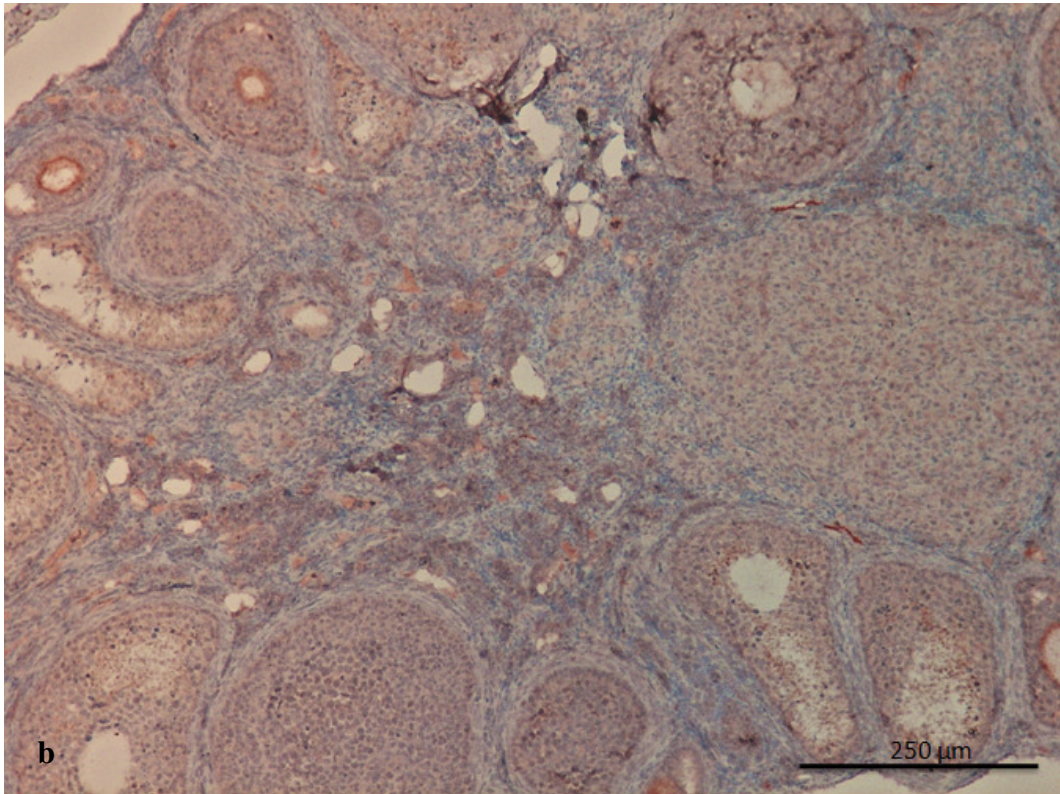
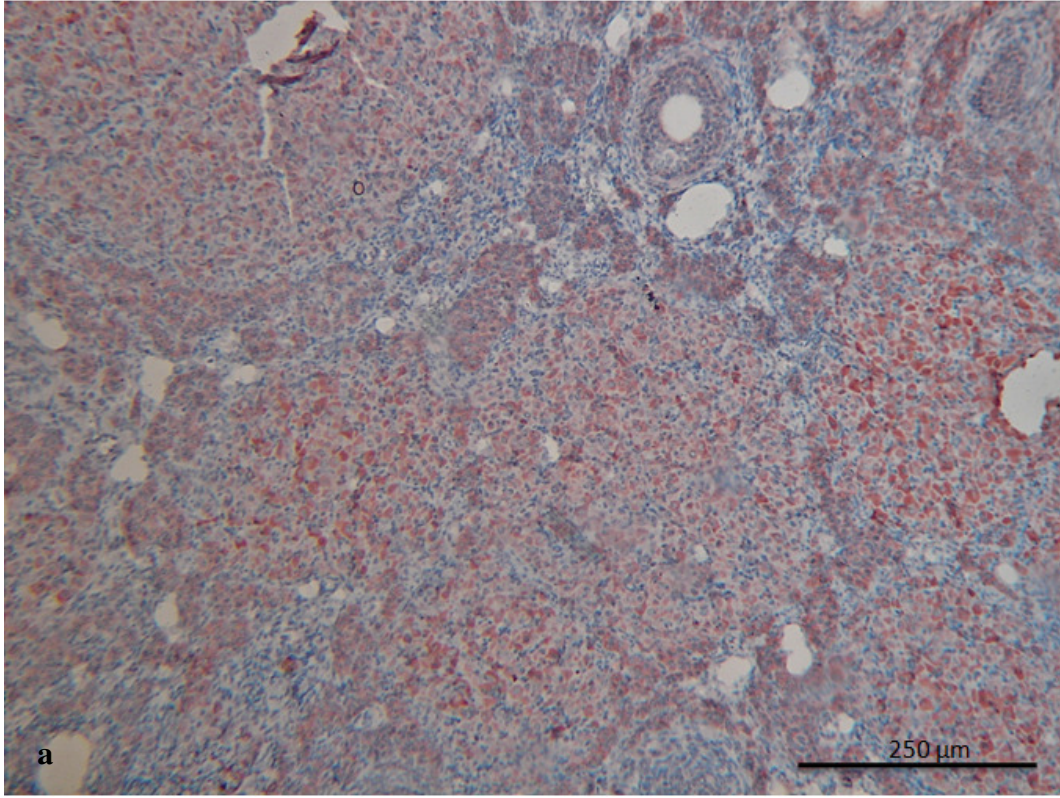
**Şekil 4-8: Kontrol (a) ve deney (b) grupları ovaryum dokusu interstisyel glandüler hücreler ve diğer bağ dokusu hücrelerinde MMP-2 immünohistokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. (x40)**



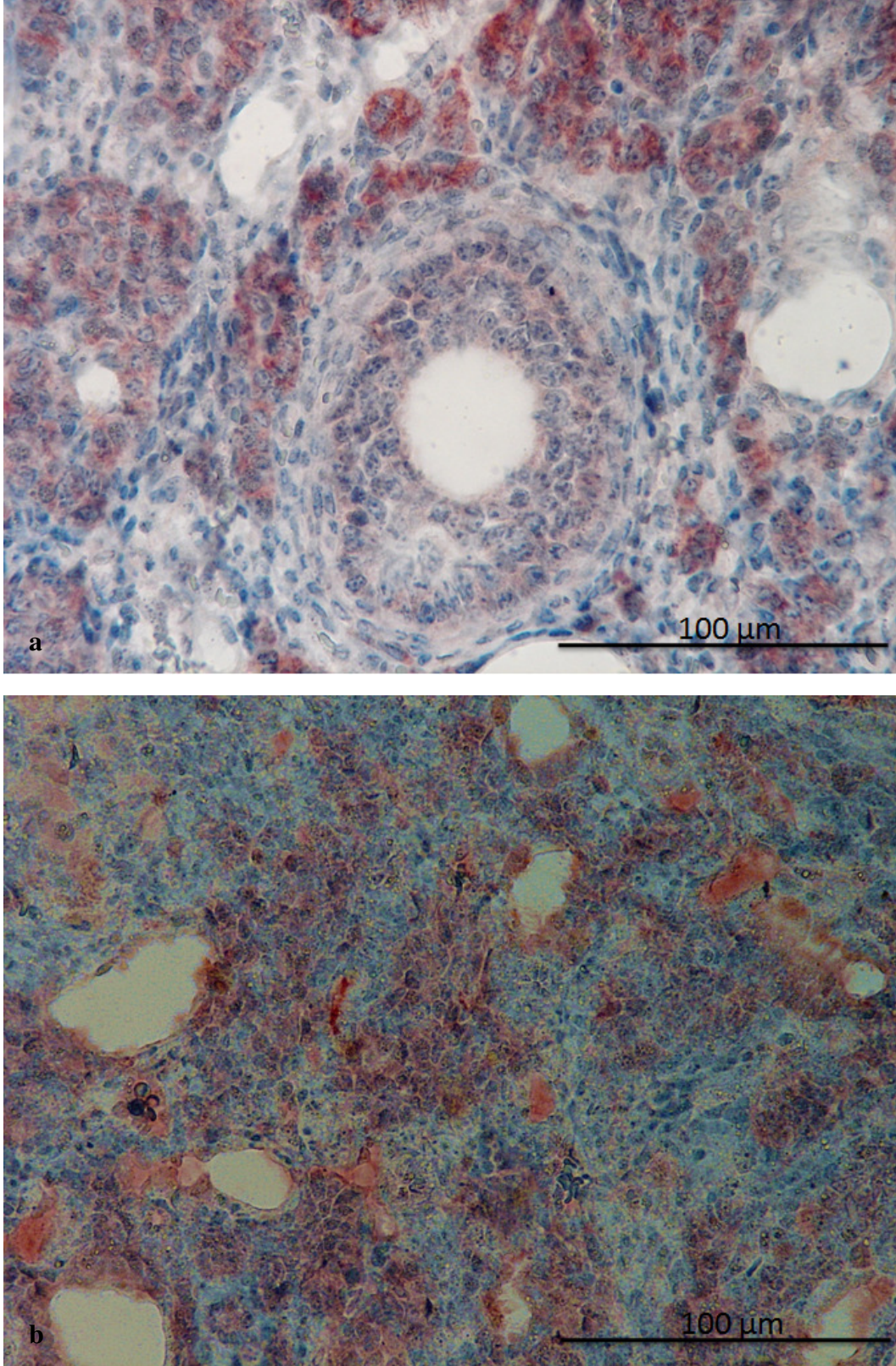
**Şekil 4-9: Kontrol (a) ve deney (b) grupları ovaryum dokusu MMP-9 immünohistokimya boyamasının genel görüntüsünü gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. (x10)**



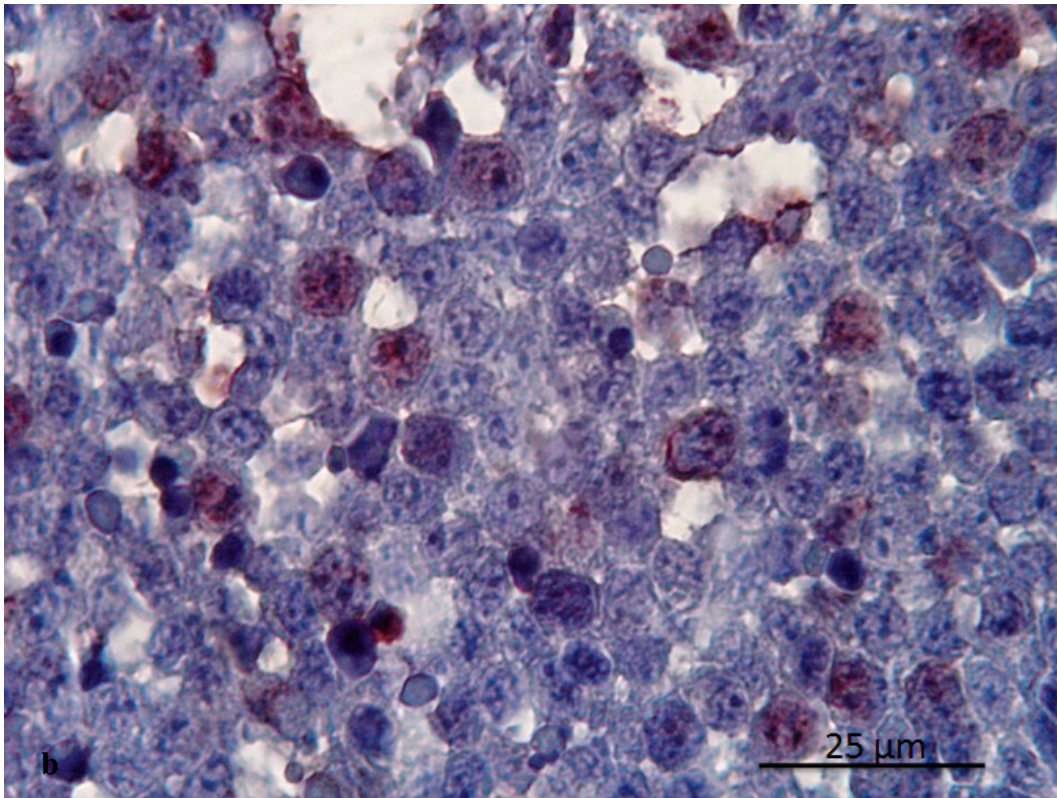
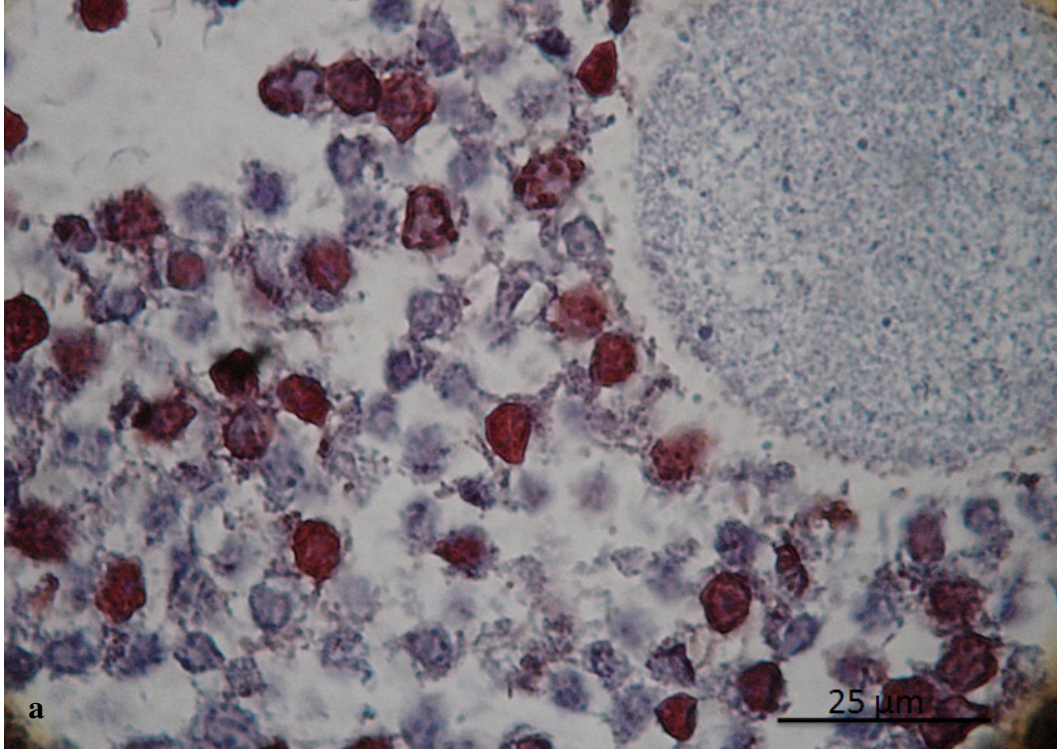
**Şekil 4-10: Kontrol (a) ve deney (b) grupları ovaryum dokusu interstisyel glandüler hücreler ve diğer bağ dokusu hücrelerinde MMP-9 immünohistokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. (x40)**



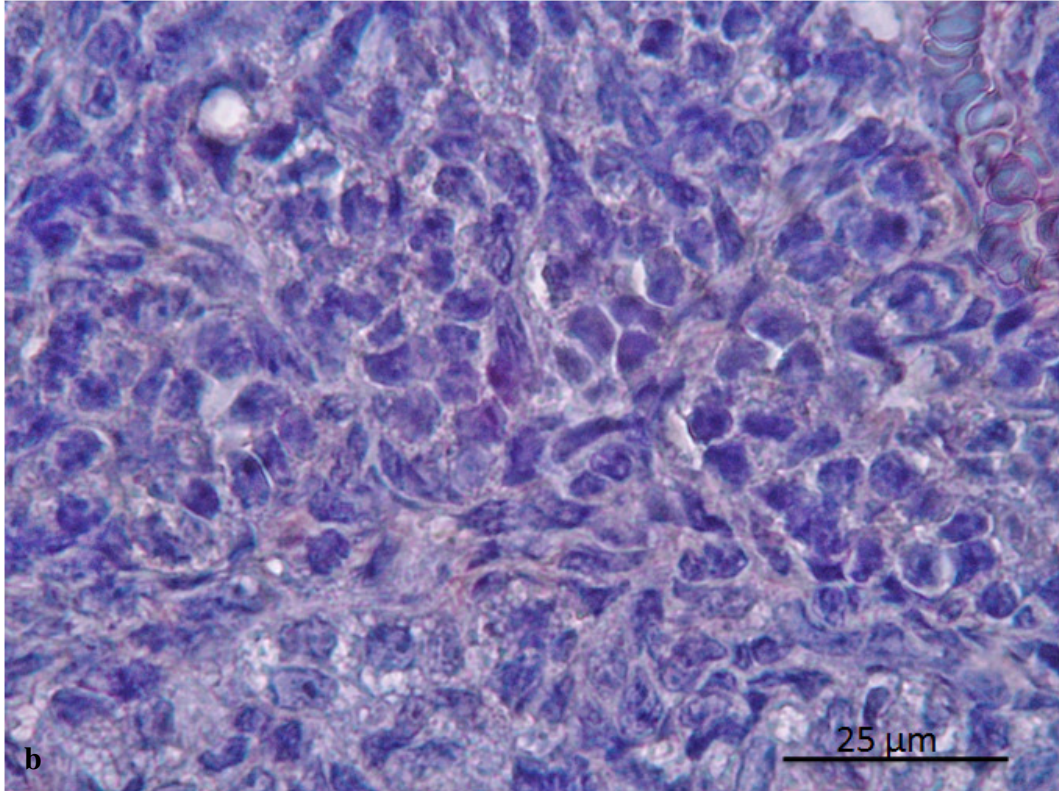
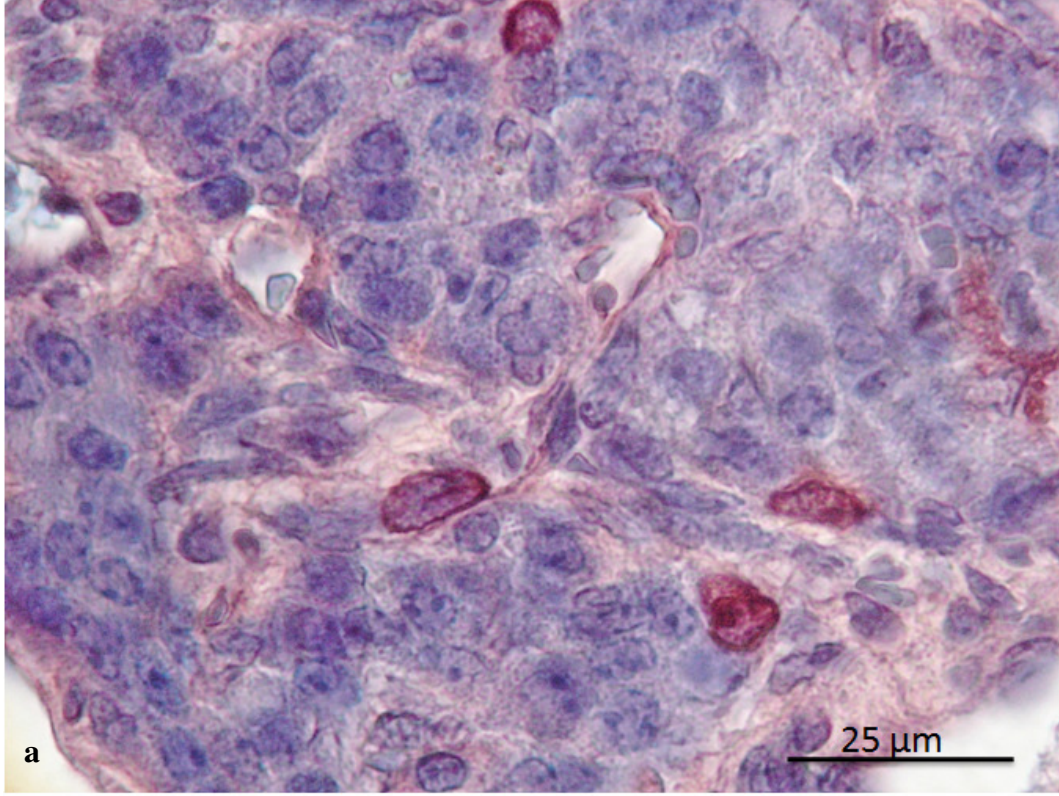
**Şekil 4-11: Kontrol (a) ve deney (b) grupları ovaryum dokusu VEGF immünohistokimya boyamasının genel görüntüsünü gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. (x10)**



**Şekil 4-12: Kontrol (a) ve deney (b) grupları ovaryum dokusu interstisyel glandüler hücreler ve diğer bağ dokusu hücrelerinde VEGF immünohistokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. (x40)**



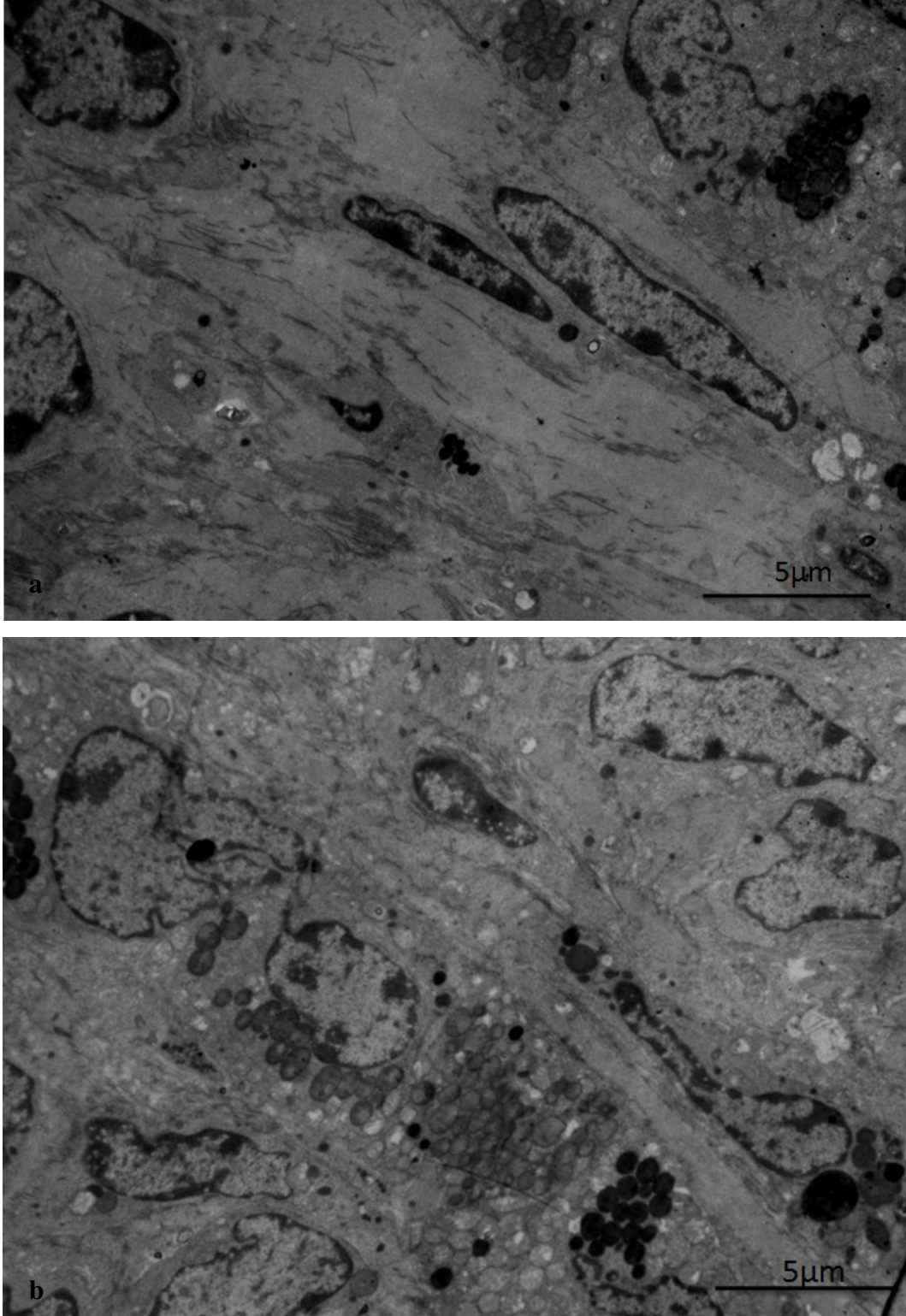
**Şekil 4-13: Kontrol (a) ve deney (b) grupları ovaryum dokusu granuloza hücrelerinde sentez fazındaki hücrelerin BrdU immünohistokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. (x100)**



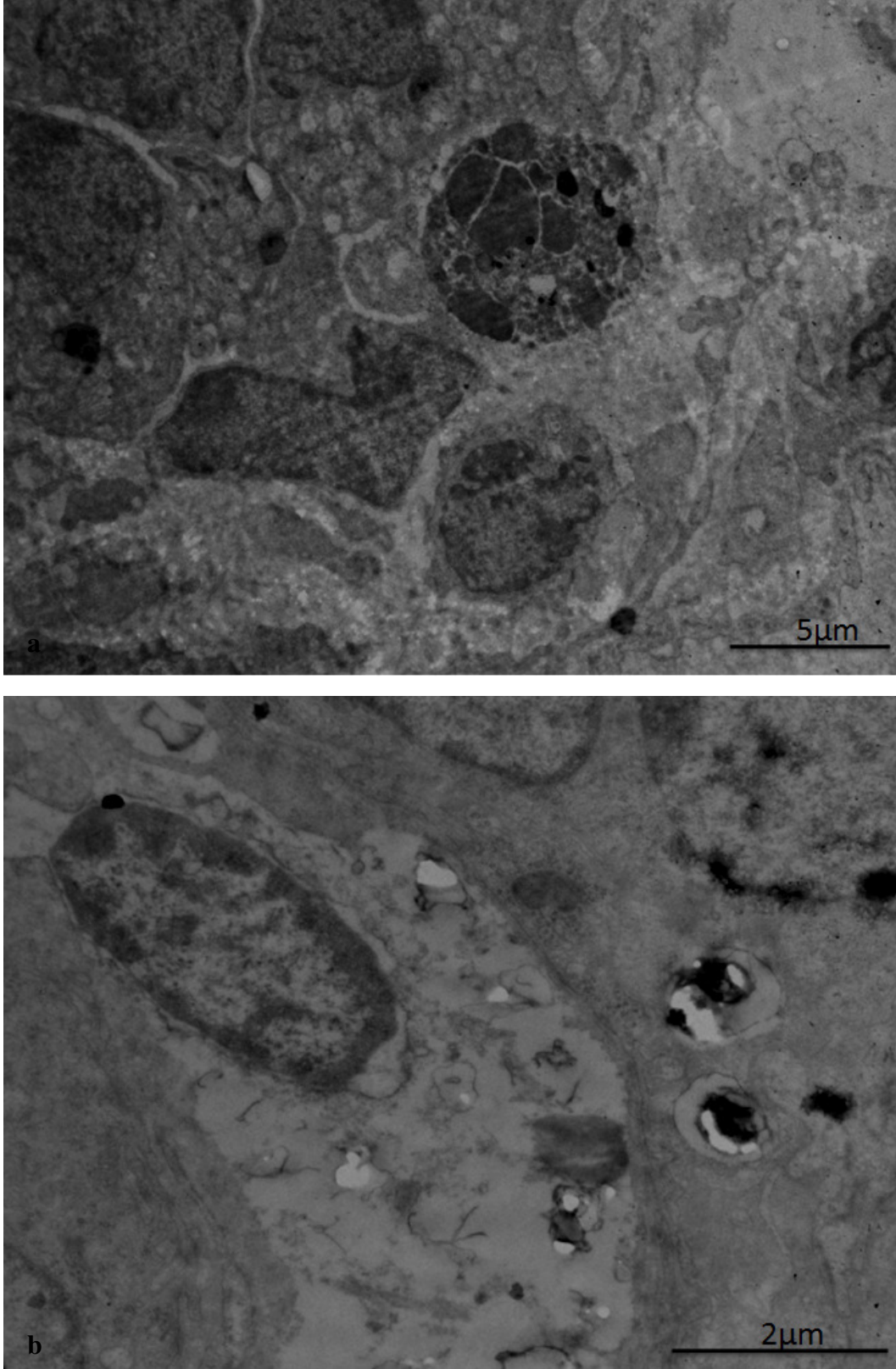
**Şekil 4-14: Kontrol (a) ve deney (b) grupları ovaryum dokusu interstisyel glandüler stroma ve diğer bağ dokusu hücrelerinde sentez fazındaki hücrelerin BrdU immünohistokimya boyamasını gösteren ışık mikroskobu fotoğrafı. (x100)**

### 4.3. Elektron Mikroskobu Bulguları:

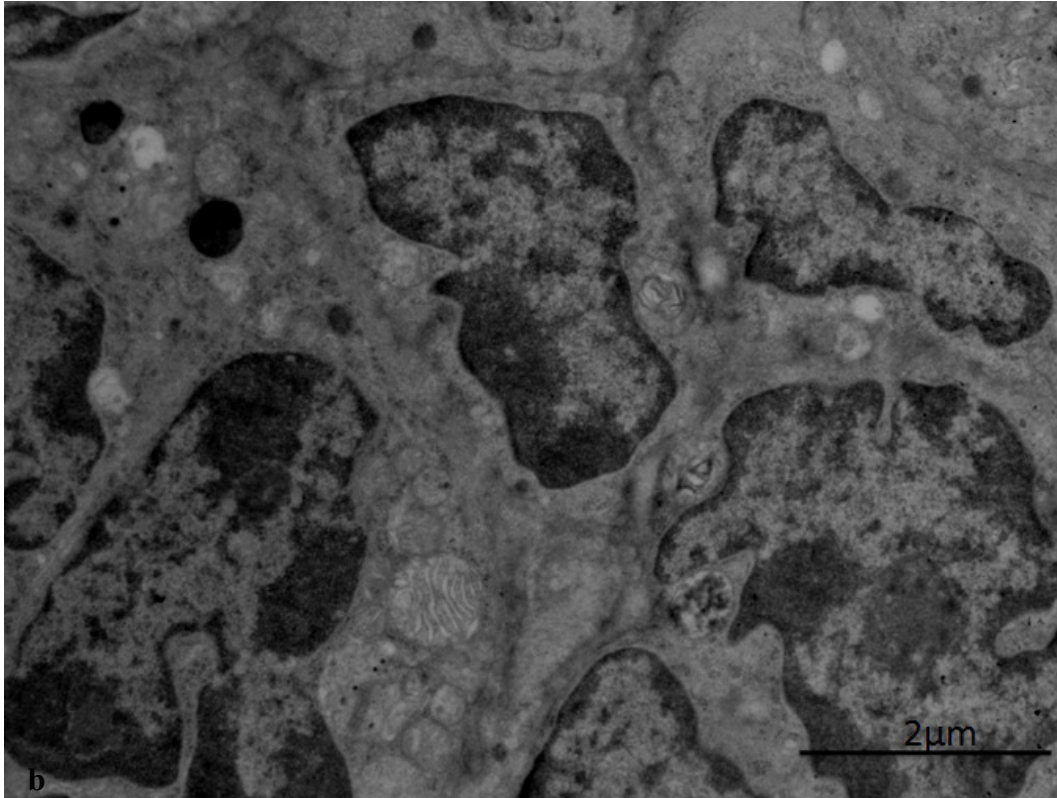
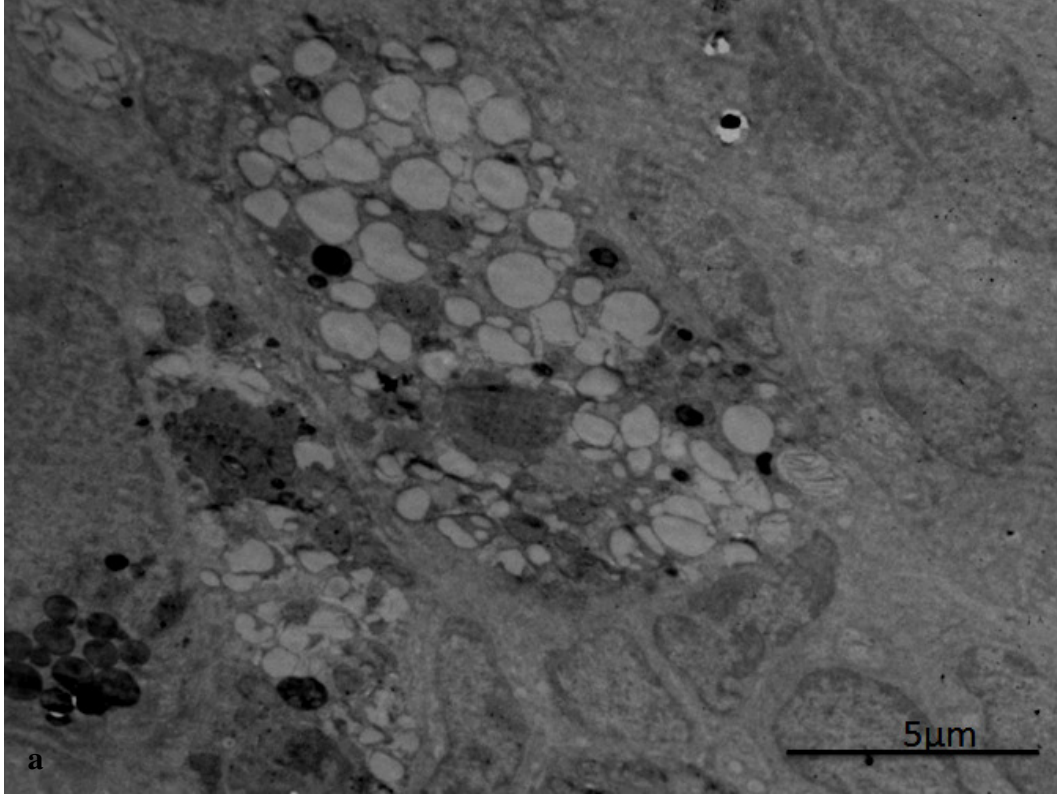
Kontrol ve deney grupları ovaryum doku örnekleri ağırlıklı olarak ovaryum stromasında bulunan interstisiyel glandüler hücreler ve diğer bağ dokusu hücreleri (fibroblast, makrofaj) karşılaştırılmalı olarak ince yapı düzeyinde değerlendirildi. Kontrol grubunda fibröz doku ağırlıklı stromada fibroblast, fibrosit, makrofaj hücreleri ve elastik ve kolajen liflerin varlığı izlendi. Ayrıca stromada bulunan intersitisiyel glandüler hücrelerin sentez aktivitelerine bağlı olarak sitoplazmalarında gelişmiş DER, çok sayıda, tübüler kristal mitokondriyumlar ve endokrin salgı granülleri bulunmaktaydı (Şekil 4-15a). Hücre sitoplazmasında bulunan salgı granüllerinin farklı büyüklüklerde, yuvarlak şekilli ve içeriğinde bulunan hormonun olgunluklarına bağlı olarak farklı yoğunluk derecelerinde olduğu izlendi. Sentez aktivitesine sahip hücre sitoplazmalarında yoğunluğu değişken (açık – koyu) ve salgı içeriğini boşaltmış granüller (degranülasyon) gözlemlendi. Glandüler hücrelerin, merkezde yer alan, heterokromatik ve çentikli bir çekirdeğe sahip oldukları izlendi (Şekil 4-15b). Doku içerisinde yer yer fagositik vakuoller içeren makrofajlara rastlandı. Deney ve kontrol grupları karşılaştırıldığında hücreler arasında kolajen ve elastik lif dağılımında bir fark olmadığı, ışık mikroskopik bulgularımıza benzer olarak stroma yapı ve yerleşiminde ince yapı düzeyinde belirgin bir değişiklik meydana gelmediği izlendi. Yapılan değerlendirmede kontrol grubundan farklı olarak stromada yer yer apoptotik hücrelere rastlandı (Şekil 4-16a) ve daha seyrek olarak bazı hücrelerde organel düzeyinde ödem ve vakuolleşme olduğu izlendi (Şekil 4-16b). Fagositik (makrofaj) hücrelerin sayısında da bir artış olduğu izlendi. Glandüler hücrelerin DER sisternalarında genişleme meydana geldiği (Şekil 4-17a), mitokondriyum kristallarında dejeneratif inklüzyonlarda da bir artış olduğu gözlemlendi (Şekil 4-17b). Hücrenin salgı granüllerinde bazı farklılıklar olduğu izlendi. Glandüler hücrelere ait salgı granüllerinin birleşmiş ve bu nedenle amorf bir görüntüye sahip oldukları, daha az sayıda ancak daha yoğun içerikli (koyu renkli) oldukları (Şekil 4-18a, b), bazı hücrelerde ise bozunmuş salgı granüllerinin varlığı dikkat çekmekteydi (Şekil 4-19a). Hücrelerde bulunan salgı granüllerinin kontrolden farklı olarak az sayıda ve sadece yoğun granüller şeklinde oldukları gözlemlendi (Şekil 4-18a, b). Deney grubu ovaryum dokusu stromasında kontrol grubuna kıyasla daha fazla sayıda bozunmuş hücreye rastlandı. Bazı hücrelerde fagositik vakuollerin bulunduğu izlendi. (Şekil 4-19b).



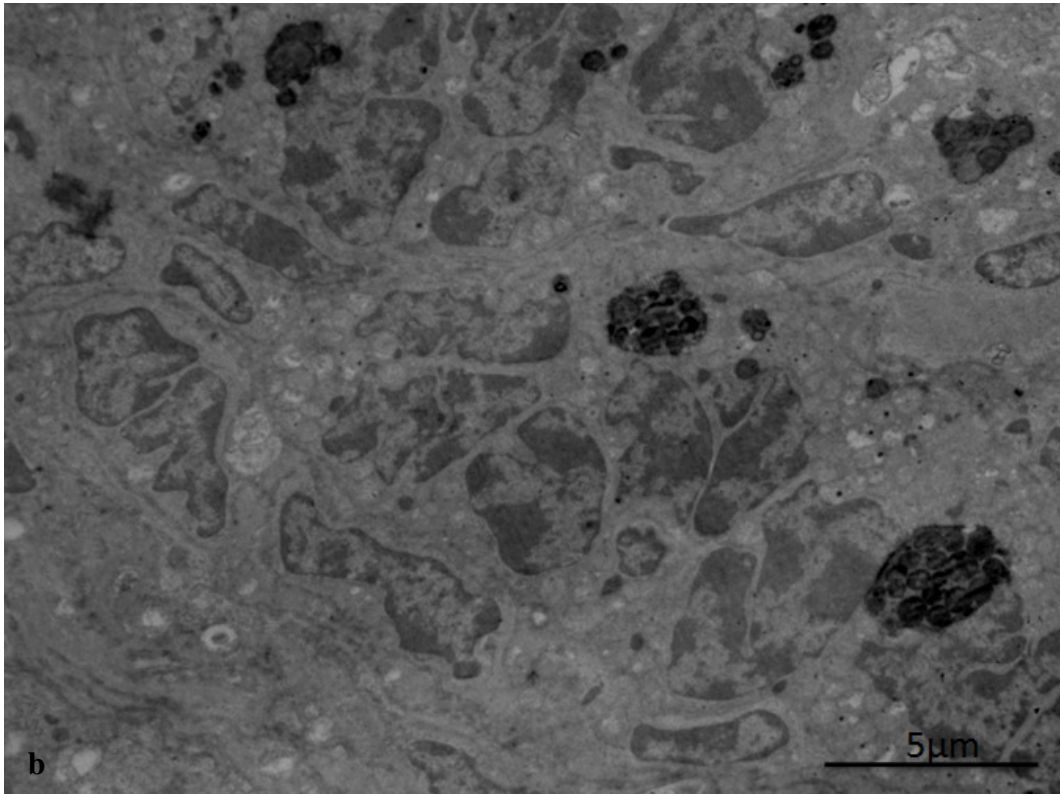
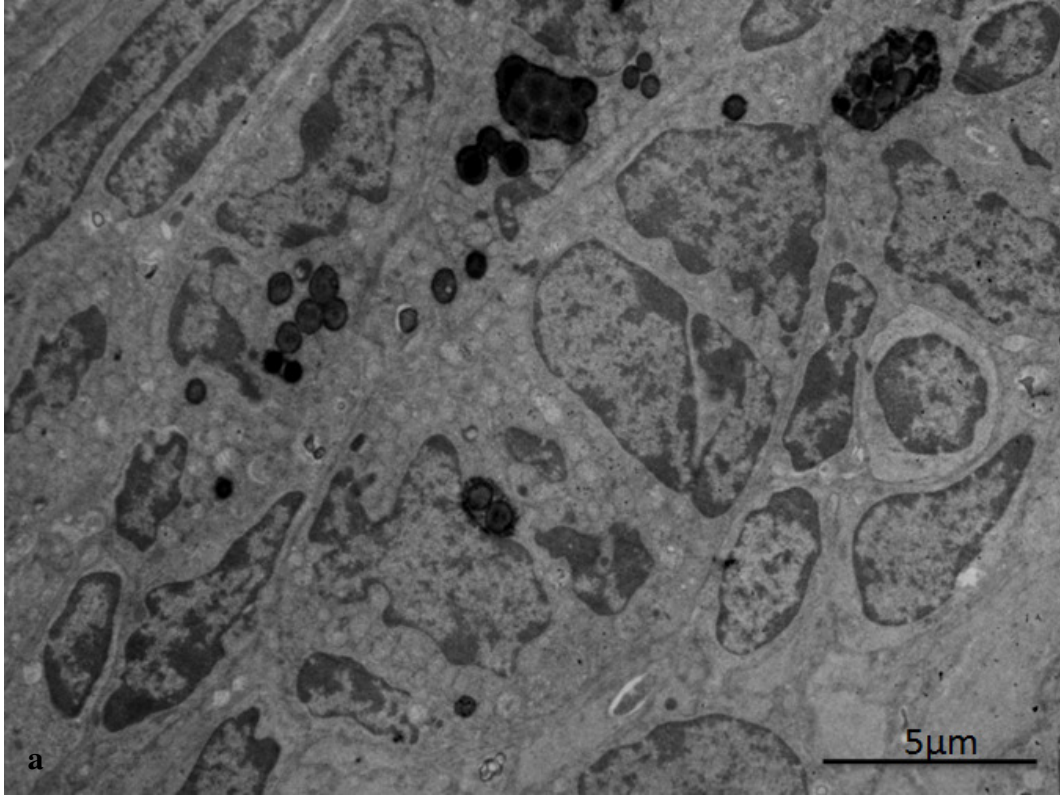
**Şekil 4-15: Kontrol grubunda ovaryum stromasında bulunan hücrelerin ince yapı özelliklerini gösteren elektron mikroskobu fotoğrafı. (a ve b) (x5000)**



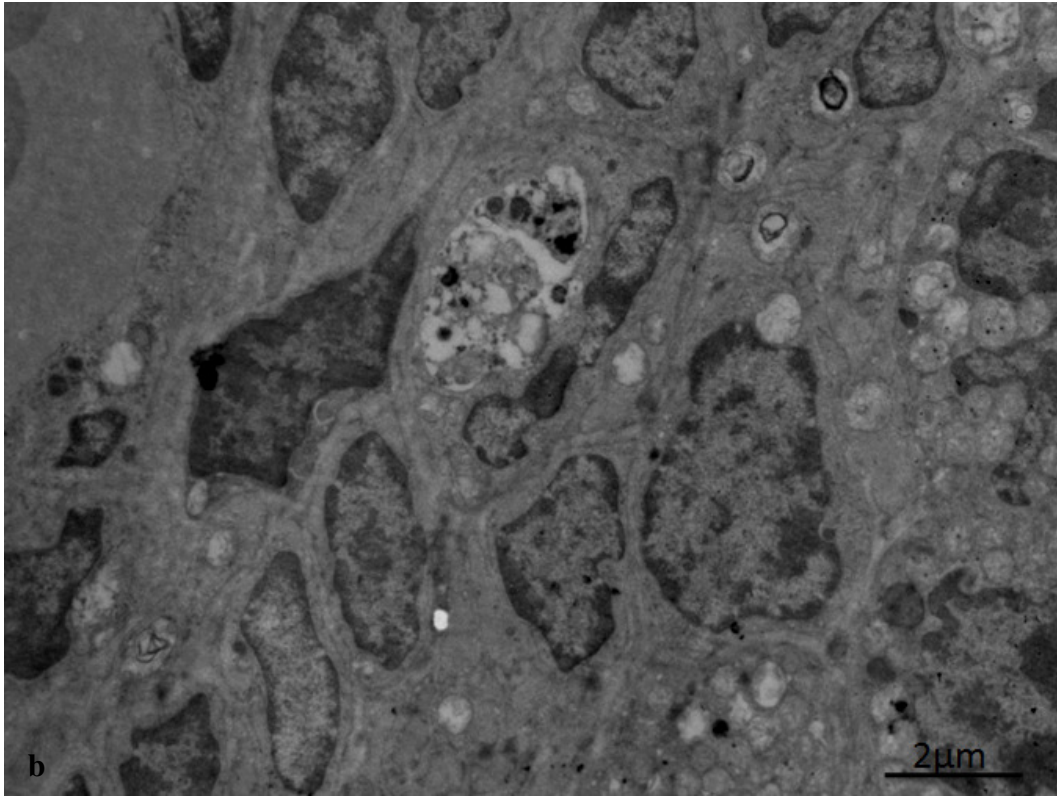
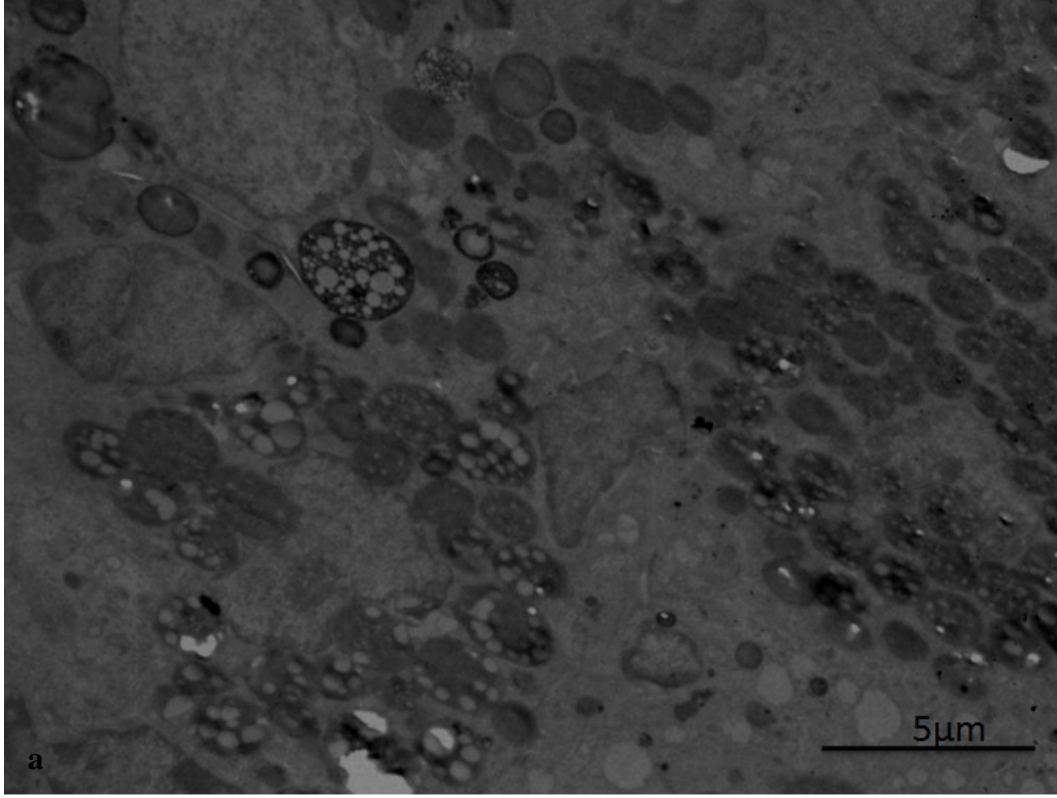
**Şekil 4-16: Deney grubunda stromada gözlenen apoptotik hücreler (a) ve organel düzeyinde ödem ve vakuolleşmeyi (b) gösteren elektron mikroskobu fotoğrafı. (a: x7500, b: x15000)**



**Şekil 4-17: Deney grubunda DER sisternalarında meydana gelen genişlemeye bağlı vakuolizasyon (a) ve mitokondri inklüzyonlarını (b) gösteren elektron mikroskobu fotoğrafı. (a: x6000, b: x12000)**



**Şekil 4-18: Deney grubunda stromal glandüler hücrelerin salgı granüllerinde meydana gelen değişiklikleri gösteren elektron mikroskobu fotoğrafı (a ve b).  
(a ve b : x5000)**



**Şekil 4-19: Deney grubunda stromal glandüler hücrelerde dejenere salgı granülleri (a) ve fagositik hücreleri (b) gösteren elektron mikroskobu fotoğrafı. (a: x5000, b: x7500)**

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, oral kontraseptiflerin bileşiminde bulunan levonorgestrel ve etinil östradiol kombinasyonu ile ovaryum dokusunda meydana gelebilecek değişiklikler histokimyasal, immunohistokimyasal ve ince yapı düzeyinde araştırılmıştır. Literatürde özellikle ovaryum dokusunu ilgilendiren çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde MMP'lerin durumunu ortaya koyan çok sayıda çalışma bulunmasına karşın (8), oral kontraseptiflerin etkilerini bizim kullandığımız parametrelerle araştıran çalışmalara ait sınırlı veri bulunmaktadır. Bu bağlamda çalışmamız, ovulasyonla sonuçlanmayan folikül gelişimi sürecinde stromal hücrelerin de katıldığı etkileşimlere yönelik veri sağlama açısından literatüre katkı sağlamaktadır.

Johnson ve ark. tarafından gerçekleştirilen klinik bir çalışmada, deneyimizde kullanılan ilaç kombinasyonunun, bizim kullandığımız dozları da içeren bir uygulama protokolü ile 1 yıl süreyle oral yoldan kullanılması sonucu endometriyum morfolojisinde patolojik değişiklikler meydana gelmediği ancak endometriyumun inaktif olduğu bulunmuştur (24). Öte yandan levonorgestrel salgılayıcı intrauterin araçların endometriyumda pseudo-desidualizasyon gibi morfolojik değişiklikler meydana getirdiği gösterilmiştir (42). Her iki çalışma da ışık mikroskopik düzeyde gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızın ışık mikroskobu ile gerçekleştirilen histokimyasal bölümünde atretik folikül sayısında artış olması ve erken antral evrenin ötesine taşınmış folikül bulunmaması dışında ovaryum dokusunda dikkat çekici morfolojik bir değişiklik meydana gelmediğini gözlemledik. Ancak elektron mikroskobu ile gerçekleştirilen incelemede deney grubunda gerek foliküler, gerekse stromal hücrelerde organel düzeyinde bozunma ve apoptoz görülmesi dört gün süren fare over döngüsünde (6) 6 sıklusa karşılık gelen süreçte ince yapı düzeyinde değişiklik oluşabildiğini ortaya koymaktadır. Bu bulgu levonorgestrel ve etinil östradiolün işlevsel düzeyin ötesinde oluşturduğu değişiklikleri işaret eden çalışmalarla koşutluk göstermektedir (7, 24).

Kullandığımız levonorgestrel ve etinil östradiol kombinasyonunun folikülogenezi engellemesi yüzünden (13) deney grubumuzdaki ovaryum kesitlerinde gelişimini erken antral evrenin ötesine taşımış foliküllerin izlenmemesi beklenen bir sonuçtur.

Ovaryumda meydana gelen folikül gelişimi, ovulasyon, korpus luteum oluşumu ve gerilemesi ile folikül atrezisi süreçleri anjiyogenez ve somatik hücrelerin ve germ

hücrelerinin ölümü ile özellik kazanan dinamik olaylardır (19). Bu olayların birbiriyle eşgüdümlü olarak gerçekleşmesi işlevlerin aksamadan yürütülebilmesi açısından önemlidir (22). Bu süreçte hücre dışı matriksin yeniden şekillenmesinde MMP'lerin önemli bir rol oynadığını gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (8, 19, 43). Kesitlerin immünohistokimyasal değerlendirmesi çerçevesinde kontrol ve deney gruplarının nitel olarak analiz edilen MMP 2 boyanma örüntüleri arasında boyanma bölgeleri ve düzeyleri bakımından belirgin fark olmadığını ancak deney grubundaki interstisyel hücrelerde MMP-9'un kontrol grubundakine denk yoğun boyanmanın yanı sıra bazı hücre kümelerinde heterojen olarak çok yoğun boyandığını saptadık. Bulgularımızda gruplar arasında MMP 2'nin bulunduğu bölgeler ve boyanma yoğunluğu bakımından fark olmamasına karşılık, MMP 9 boyanmasının intersisyel glandüler hücrelerde kontrol grubuna kıyasla daha yoğun olması folikülogenezde bu iki proteazın aktivasyon mekanizmalarının farklı olması ile açıklanabilir (8).

Öte yandan atretik folikül sayısının deney grubunda daha fazla olması, bu grupta fagositik faaliyete bağlı olarak MMP yoğunluğunun daha fazla olabileceğini düşündürse de, MMP aktivitesinin daha çok inflamasyonla bağlantılı fagositik sürece eşlik etmesi (45) deney grubumuzdaki atretik foliküllerdeki fagositik faaliyetin inflamasyon ya da doku yeniden modellenmesi sürecindeki kadar kapsamlı olmadığını göstermektedir. Bu bulgu, atretik foliküllerin eliminasyonunda apoptoz ve otofajinin rolünü ortaya koyan çalışmaların sonuçlarıyla uyumludur (17).

Oral kontraseptiflerin bileşiminde bulunan ve deneyimizde kullandığımız etinil östradiolün farklı dokularda MMP ekspresyonunu düzenleyici etki gösterdiğini belirten çalışmalar bulunmaktadır (29, 45). MMP'lerin folikül atrezisindeki rolleri ile ilişkili olarak koyunlarda hipofizektomi ile meydana gelen folikül atrezisinde MMP-2 ve MMP-9 seviyelerinde anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir (19). Levonorgestrel salgılayan intrauterin araçlar ile endometriyum stromasında MMP-9 miktarında anlamlı bir artış meydana geldiği progesteronun MMP-9 ekspresyonunu arttırdığını düşündürmüştür. Yapılan çalışmalarda progesteron artışına bağlı olarak artan MMP-9 miktarının progesteron düzeyinde meydana gelen azalmaya rağmen korunduğunu göstermiştir (42). Çalışmamızda ovaryum dokusunda MMP-9 aktivitesinin de baskın olarak interstisyel glandüler hücreler ve luteal dokuda gözlenmesi yukarıda sözü edilen çalışmaların ışığında MMP-9 boyanmasındaki farklılığın folikülün hormonal etkileşimlere açık olan interstisyel hücrelerde görülmesine açıklık getirmektedir.

bFGF pek çok hücre tipinde ve süreçte etkili olan bir büyüme faktörüdür. bFGF, hücre büyümesi, farklılaşma, anjiyogenez, doku transformasyonu ve yara iyileşmesi gibi biyolojik süreçlerde rol oynayan başlıca faktörlerden biridir ve çok sayıda hücre ve doku tipinde işlev görür. Olgun foliküllerin vasküler hücrelerinde bFGF'nin varlığı gösterilmiş ve bu faktörün ovulasyona gidecek folikül seçimi ve baskın hale gelmesinde önemli bir rolü olduğu öne sürülmüştür (3). Levonorgestrelin endometriyum dokusunda oluşturduğu etkilerin araştırıldığı çalışmalarda endometriyum stromasında ve epitelial hücrelerde asidik FGF ve bazik FGF ekspresyon düzeyleri açısından kontrol grubuna göre anlamlı bir fark olmadığı belirtilmiştir. Bu çalışmalarda intrauterin levonorgestrel uygulaması ile endometriyumdaki stromal hücrelerde ve glandüler epitelial hücrelerde kuvvetli boyanmanın olduğu belirlenmiştir (21). Bu bulgular, bizim çalışmamızda elde ettiğimiz, epitel kökenli interstisyel glandüler hücrelerdeki boyanma örüntüsüyle aynı yöndedir. Ancak bizim çalışmamızda stromadaki bağ dokusu hücrelerinde boyanma gözlenmemiştir. Bu durum ovaryumdaki endokrin ve parakrin etkileşimlerin düzenleyicisi ve/veya hedefinin mezenkimal interstisyel hücre popülasyonu olduğunu, buna karşılık bağ dokusunun nispeten geri planda kaldığını göstermektedir. Öte yandan kontrol ve deney grupları arasında FGF sentez bölgeleri ve düzeyleri bakımından bir fark olmaması kullanılan ilaç kombinasyonunun kullandığımız doz ve süreye bağlı olarak ovaryum dokusunda FGF ile ilintili parakrin etkileşimleri ve hücre dinamiklerini değiştirmedini düşündürmektedir.

Folikül aktivasyonu VEGF üretimi ve kan damarlarının gelişimi ile ilişkili bir süreçtir. Folikülogenezde VEGF'in rolü genelde antral folikül evresinden itibaren öne çıkmaktadır (22).

Sıçan ovaryumunda eksojen östrojen uygulamasının VEGF ekspresyonu aracılığıyla erken folikül gelişimini arttırdığı, diğer taraftan eksojen VEGF uygulamasının da erken folikül gelişimini indüklediğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır (9). Kullandığımız kombinasyondaki etinil östradiolün etkisiyle primordiyal folikül havuzundan daha fazla sayıda primer folikülün gelişmeye başladığını ancak kullanılan kombinasyonun ovulasyon sürecini bloke etmesine bağlı olarak seçilen bu foliküllerin atrezi sürecine girdiklerini düşündürmektedir. Işık mikroskopik değerlendirme sonucunda deney grubunda atretik folikül sayısında gözlenen anlamlı artış bu durum üzerinden açıklanabilir. VEGF'yi belirlemek amacıyla yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda levonorgestrel ve etinil östradiol

uyguladığımız deney grubumuzda kontrol grubundan farklı olarak stromada yer alan glandüler hücrelerde ve luteal dokuda boyanma düzeyinde azalma olduğu gözlemlendi. Çalışmada kullandığımız kombinasyonda etinil östradiolün bulunduğu göz önüne alındığında deney grubunda VEGF'nin daha yoğun boyanması beklenebilir. Ancak literatürde progestajenlerin ve östrojenlerin farklı dokularda VEGF ekspresyonuna yönelik etkilerine ilişkin farklı sonuçlar bildiren ve VEGF ekspresyonu ile proliferasyon arasında her zaman için doğrusal ilişkinin gösterilemediğini belirten çalışmalar bulunmaktadır (21, 28). Levonorgestrelin endometriyum stromasında, endotelial hücrelerde proliferasyon indeksinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma oluşturduğu belirtilmiştir (21). Ayrıca başka çalışmalarda, östrojenin endometriyal bezlerde proliferasyonu indüklediği, progestinin ise östrojenin indüklediği proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (38).

Öte yandan MMP'lerin anjiyogenez üzerinde iki yönlü etki gösterdiği ve gerek dokuya, gerekse endokrin ve parakrin etkileşimlere bağımlı olarak VEGF sentezinde artış ya da azalma oluşturduğu bilinmektedir (35). Çalışmamızda deney grubunda stromal glandüler hücreler ve luteal dokudaki VEGF boyanma yoğunluğunun kontrol grubuna kıyasla daha düşük bulunması, aynı grupta yoğun izlenen MMP-9 aktivitesiyle ilişkilendirilebilir. Bu durum da proliferasyon indeksinin deney grubunda granüloza hücrelerinde anlamlı azalma ve stromada hücrelerinde proliferasyon indeksinin sıfır olarak saptanması ile birbirini destekler niteliktedir. Ancak söz konusu etkileşimin, sınırlı sayıda parametre ile gerçekleştirdiğimiz bu çalışmanın kısıtlılıkları göz önüne alındığında dikkatle yorumlanması ve karmaşık bir ilişkiyi irdelemeye dönük ölçütlerle desteklenmesi gerekir.

Overektomi uygulanan canlılarda eksojen progesteron ve östrojen uygulamasında östrojenin apoptoz üzerine tek başına etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Progestin aracılı apoptotik etkilerin ise endometriyumda östrojen varlığında gerçekleştiği, stromada ise apoptotik etkiler için östrojenin gerekli olmadığı bildirilmiştir (38). Levonorgestrel ve etinil östradiol kombinasyonunun ovaryum epitelinde apoptozu önemli ölçüde indüklediği ve düşük dozlarda ovaryum kanseri riskinde anlamlı bir azalma sağladığı gösterilmiştir (30). Çalışmamızda apoptoz tayini yapılmamış olmasına rağmen elektron mikroskopik incelememiz sırasında deney grubunun stromasında kontrol grubuna göre daha sık olarak apoptotik hücelere rastladık. Ancak elektron mikroskopik inceleme nitel bir değerlendirme olduğundan

apoptotik hücre sayısındaki artışın yinelenabilir bulgu olarak değerlendirilmesinin doğru olmayacağını düşünmekteyiz.

Folikül gelişim sürecini baskılayıcı bir müdahalenin folikül içinde granüloza hücrelerinin proliferasyonunda anlamlı bir azalma şeklinde yansımaları oral kontraseptiflerin FSH bloğu oluşturarak meydana getirdiği etki mekanizması açısından beklenen bir bulgudur. Öte yandan stromada sentez fazında hiç hücre bulunmaması kullanılan ilaç kombinasyonu etkileşiminin ovaryum stromasında daha baskın olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak proliferasyonun kontrol grubuna kıyasla granüloza hücrelerinde anlamlı derecede düşük, stromada ise hiç görülmemesi hücreyi metabolik açıdan stres altına sokan durumun varlığını ve olumsuz mikroçevre (parakrin etkileşim) etkilerini işaret eden bulgular olarak yorumlanabilir.

İnce yapı düzeyindeki bulgularımızda ovaryumda gerek steroid tabiatlı granül içeren glandüler hücre sayısında gerekse hücre içi granül sayısında azalmanın meydana gelmesi kullandığımız etinil östradiol ve levonorgestrel kombinasyonunun negatif geribildirim mekanizması doğrultusunda steroid hormon sentezinin baskılanmasıyla ve deney grubunda sadece yoğun (koyu) içerikli salgı granülüne rastlanması ve varolan granüllerin dejenerasyonu sekresyon aktivitesinin azalmasıyla bağlantılı bir durum olarak değerlendirilebilir. Folikülogenezin gerçekleşebilmesi için sürekli hormon desteği gereklidir ve folikülogenezini bloke ettiğimiz için salgılamasının azalması beklenen bir sonuçtur. Kontrol grubunda elektron mikroskopik incelemede folikülogenez süreci devam ettiğinden degranülasyonun olduğu izlendi. Deney grubunda granül morfolojisinde meydana gelen değişiklikler, salgılama aktivitesindeki azalma ile koşut olarak hücre içinde koyu ve amorf salgı granülleri şeklinde izlenmekteydi. Bu durum aktivitesi azalmış bir hücrede mevcut salgının hücre dışına atılma işlemlerinde aksama meydana geldiğini düşündürmektedir. Kontrol grubunda çekirdeğin çentikli bir yapıya sahip olması glandüler hücrelerin metabolik olarak aktif hücreler olduklarını işaret eden bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. Deney grubundaki glandüler hücrelerde çekirdek ve DER yapısında meydana gelen değişiklikler ise işlevsel baskılanmayı düşündürmektedir.

İnce yapı düzeyindeki bulgular, ovaryum dokusundaki hücrelerde ölüm sürecinin otofaji ve apoptoz ile işlediğini düşündürdü. Elektron mikroskopik incelemede deney grubundaki hücrelerde mitokondriyum inklüzyonlarının yoğun olarak görülmesi de yine deney grubunda sık gözlemlendiğimiz apoptoza gidişi öngördürebilecek bir

bulgu olarak yorumlanabilir. Ayrıca levonorgestrel ve etinil östradiol uygulanan grupta bazı stromal hücrelerde kontrol grubundan farklı olarak vakuolizasyon ve ödemin de görülmesi bozunma sürecinde baskın etkinin apoptoz yolağı olmakla birlikte levonorgestrel ve etinil östradiolün etkilerinin işlevsel düzeyin ötesine geçebildiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda MMP-2, MMP-9, FGF ve VEGF için immünohistokimyasal değerlendirme nitel gözlem düzeyinde gerçekleştirildi. Spektrofotometri, jelatin zimografi gibi nicel analiz yöntemleri ile yapılan ölçümlerle yapılacak olan çalışmalarda gruplar arasında irdelenen parametrelerin miktarındaki değişikliklerin nicel sonuçlar olarak elde edilmesi bu tür çalışmaların yorum gücünü artırabilir.

Ovaryumda doku yeniden modellenmesi süreci apoptoz ve proliferasyon ile birlikte yürüyen biyolojik bir süreçtir. Normal fizyolojik koşullarda apoptoz ve proliferasyon arasında bir denge söz konusudur. Ancak çalışmamızda stromada apoptotik hücre sayısında artış ve proliferasyonda azalma meydana gelmesi kullandığımız levonorgestrel ve etinil östradiol kombinasyonunun fizyolojik sürecin ötesine geçen etkileri olabileceğini ortaya koymaktadır. Bu bağlamda bu kombinasyonun etkilerine dönük gelecekte yapılacak çalışmalarda elde ettiğimiz bu bulgularımızı moleküler, biyokimyasal vb. mekanizma düzeyindeki yeni parametrelerle birleştirerek daha kapsamlı bilgilere ulaşmak mümkün olabilecektir.

## KAYNAKLAR

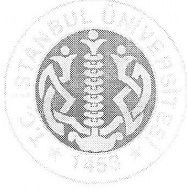
1. Bancroft J, Gamble M. *Theory and Practice of Histological Techniques*. U.S.A: Churchill Livingstone; 2002.
2. Benagiano G, Bastianelli C, Farris M. Contraception Today. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006; **1092**: 1-32.
3. Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W, Einspanier R. Expression and Localisation of Vascular Endothelial Growth Factor and Basic Fibroblast Groth Factor During the Final Growth of Bovine Ovarian Follicles. *Journal of Endocrinology* 2000; **167**: 371-382.
4. Bloom W, Fawcett DW. *A Textbook of Histology*. London: Chapman&Hall; 1994 (pp 816-831).
5. Carlson BM. *Human Embryology and Developmental Biology*. Mosby Elsevier; 2009 (pp 420-421)
6. Champlin AK, Dorr DL, Gates AH. Determining the Stage of the Estrous Cycle in the Mouse by the Appearance of the Vagina. *Biology of Reproduction* 1973; **8**: 491-494.
7. Charnock-Jones DS, Macpherson A, Archer DF, Leslie S, Makkink WK, Sharkey A ve ark. The Effect of Progestins on Vascular Endothelial Growth Factor, Oestrogen Receptor and Progesterone Receptor Immunoreactivity and Endothelial Cell Density in Human Endometrium. *Human Reproduction* 2000; **15**: 85-95.
8. Curry TE,Jr, Osteen KG. Cyclic Changes in the Matrix Metalloproteinase System in the Ovary and Uterus. *Biology of Reproduction* 2001; **64**: 1285-1296.
9. Danforth DR, Arbogast LK, Ghosh S, Dickerman A, Rofagha R, Friedman CI. Vascular Endotelial Growth Factor Stimulates Preantral Follicle Growth in the Rat Ovary. *Biology of Reproduction* 2003, **68**: 1736-1741. Erişim 11.09.2002, <http://www.biolreprod.org>.
10. Davidson B, Goldberg I, Gotlieb WH, Kopolovic J, Ben-Baruch G, Nesland JM ve ark. High Levels of MMP-2, MMP-9, MT1-MMP and TIMP-2 mRNA Correlate with Poor Survival in Ovarian Carcinoma. *Clinical & Experimental Metastasis* 1999; **17**: 799-808.

11. Demir R, Çeviri editörü. *Histoloji Atlası: Fonksiyonel İlişkileriyle*. Ankara: Palme Yayıncılık; 2001 (pp 301-320).
12. Demir R, Çeviri editörü. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Patolojiye Giriş*. Ankara: Palme Yayıncılık; 2006 (pp 565-585).
13. Diczfalusy E. Probable Mode of Action of Oral Contraceptives. *Brit. Med. J.* 1965; **2**: 1394-1399.
14. Dokmeci I. *Farmakoloji: Temel Kavramlar*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2000 (pp 474-488).
15. Ellerbrock SM, Fishman DA, Kearns AS, Bafetti LM, Stack MS. Ovarian Carcinoma Regulation of Matrix Metalloproteinase-2 and Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Through  $\beta$ 1 Integrin. *Cancer Research* 1999; **59**: 1635-1641.
16. Ergin AB, Komurcu N. *Oral Kontraseptifler ve Cinsellik*. Erişim Eylül 2006, Türk Androloji Derneği:  
<http://www.androloji.org.tr/images/File/26.Sayı/kadin2.pdf>.
17. Escobar ML, Echeverría OM, Ortíz R, Vázquez-Nin GH. Combined Apoptosis and Autophagy, the Process That Eliminates the Oocytes of Atretic Follicles in Immature Rats. *Apoptosis* 2008; **13**: 1253-1266.
18. Fintını D, Alba M, Salvatori R. Influence of Estrogen Administration on the Growth Response to Growth Hormone (GH) in GH-Deficient Mice. *Exp Biol Med* 2005; **230**: 715-720.
19. Goldman S, Shalev E. MMPS and TIMPS in Ovarian Physiology and Pathophysiology. *Frontiers in Bioscience* 2004; **9**: 2474-2483.
20. Gurbay A, Giray B, Hıncal F. Kombine Oral Kontraseptifler: Riskleri ve Yararları. *T Klin J Med Sci* 1997; **17**: 1-14. Erişim 29.03.1996.
21. Hague S, MacKenzie IZ, Bicknell R, Rees MCP. In-vivo Angiogenesis and Progesterone. *Human Reproduction* 2002; **Vol**: 786-793.
22. Hurka RVD, Zhaob J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicle. *Theriogenology* 2005; **63**: 1717-1751.
23. İ.Ü. *Uygulamalı Elektron Mikroskopik Teknikleri ve Hücre Kültürü Kursu* 1999. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı.

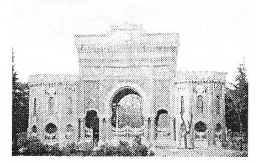
24. Johnson JV, Grubb GS, Constantine GD. Endometrial Histology Following 1 Year of a Continuous Daily Regimen of Levonorgestrel 90 µg/ethinyl Estradiol 20 µg. *Elsevier Contraception* 2007; **75**: 23-26.
25. Jordan A. Toxicology of Progestogens of Implantable Contraceptives for Women. *Elsevier Contraception* 2002; **65**: 3-8.
26. Kubba A, Guillebaud J. Combined Oral Contraceptives: Acceptability and Effective Use. *British Medical Bulletin* 1993; **49**: 140-157.
27. Larsen WJ. *Human Embryology*. U.S.A: Churchill Livingstone; 2001
28. Lau TM, Affandi B, Rogers PAW. The Effects of Levonorgestrel Implants on Vascular Endothelial Growth Factor Expression in the Endometrium. *Molecular Human Reproduction* 1998; **5**: 57-63.
29. Lee YJ, Lee EB, Kwon YE, Lee JJ, Cho WS, Kim HA ve ark. Effect of estrogen on the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3, and MMP-13 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in osteoarthritis chondrocytes. *Rheumatol Int* 2003; **23**: 282-288.
30. Lurie G, Thompson P, McDuffie KE, Carney ME, Terada KY, Goodman MT. Association of Estrogen and Progestin Potency of Oral Contraceptives with Ovarian Carcinoma Risk. *Obstet Gynecol* 2007; **109**: 597-607.
31. Menten G, Ersoz B, Çeviri editörleri. *Harper'ın Biyokimyası*. İstanbul: Barış Kitabevi; 1993 (pp 656-664).
32. Moore KL, Persaud TVN. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. Saunders; 2007 (chapter 12)
33. Muftuoglu S, Kaymaz F, Atilla P, Çeviri editörleri. *Netter Temel Histoloji*. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 2009 (pp 400-425).
34. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix Metalloproteinases. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; **274**: 21491-21494.
35. Nilsson UW, Dabrosin C. Estradiol and Tamoxifen Regulate Endostatin Generation via Matrix Metalloproteinase Activity in Breast Cancer *In vivo*. *Cancer Res* 2006; **66(9)**: 4789-4794.
36. Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biology* 2001; **2(3)**: reviews 3005.1-3005.12. Erişim 09.03.2001, <http://genomebiology.com/2001/2/3/reviews/3005>.

37. Reel B. Matriks Metalloproteinaz Enzimleri ve Ateroskleroz. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2006; **26**: 527-537.
38. Rodriguez GC, Rimel BJ, Watkin W, Turbov JM, Barry C, Du H ve ark. Progesterin Treatment Induces Apoptosis and Modulates Transforming Growth Factor- $\beta$  in the Uterine Endometrium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; **17(3)**: 578-584.
39. Ross MH, Reith EJ. *Histology A Text and Atlas*. Harper International Edition New York: Harper&Row;1985 (pp 727-735).
40. Sadler TW. *Langman's Medical Embryology*. U.S.A: Williams&Wilkins; 2006.
41. Shiomi T, Okada Y. MT1-MMP and MMP-7 in Invasion and Metastasis of Human Cancers. *Cancer and Metastasis Reviews* 2003; **22**: 145-152.
42. Skinner JL, Riley SC, Gebbie AE, Glasier AF, Critchley HOD. Regulation of Matrix Metalloproteinase-9 in Endometrium During the Menstrual Cycle and Following Administration of Intrauterine Levonorgestrel. *Human Reproduction* 1999; **14**: 793-799.
43. Smith MF, Ricke WA, Bakke LJ, Dow MPD, Smith GW. Ovarian Tissue Remodeling: Role of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2002; **191**: 45-56.
44. Solakoglu S, Aytekin Y, Çeviri editörleri. *Temel Histoloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2009 (pp 435-455).
45. Subramanian S, Matejuk A, Zamora A, Vanderbark AA, Offner H. Oral Feeding with Ethinyl Estradiol Suppresses and Treats Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in SJL Mice and Inhibits the Recruitment of Inflammatory Cells into the Central Nervous System. *The Journal of Immunology* 2003; **170**: 1548-1555.
46. Tamanini C, Ambrogi M. Angiogenesis in Developing Follicle and Corpus Luteum. *Reprod Dom Anim* 2004; **39**: 206-216.
47. The ESHRE Capri Workshop Group. Noncontraceptive Health Benefits of Combined Oral Contraception. *Human Reproduction Update* 2005; **11**: 513-525.
48. Tortora GJ. *Principles of Human Anatomy*. U.S.A: John Wiley & Sons, Inc.; 2004 (pp 869-871).

49. Tsai SJ, Wu MH, Chen HM, Chuang PC, Wing LY. Fibroblast Growth Factors-9 Is an Endometrial Stromal Growth Factor. *Endocrinology* 2002; **143**: 2715-2721.
50. Ueda M, Hung YC, Terai Y, Kanda K, Kanemura M, Futakuchi H ve ark. Vascular Endothelial Growth Factor-C Expression and Invasive Phenotype in Ovarian Carcinomas. *Clin Cancer Res* 2005; **11(9)**: 3225-3232.
51. Yazır Y, Gonca S, Filiz S, Dalcık H. Endotel Hücreleri İçin Önemli Bir Protein Ailesi; Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (Vegf), Ailenin Üyeleri, Yapısı ve Sentezi. *Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp Dergisi* 2004; **26(4)**: 181-184.
52. Yazır Y. Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (Vegf): Reseptörleri ve Fonksiyonları. *Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp Dergisi* 2007; **29(3)**: 128-136.
53. Yıldız A, Guner H. Oral Kontraseptifler. *Türkiye Klinikleri Aralık* 1988; **Cilt 8, Sayı 6**: 443-446.

**ETİK KURUL KARARI**

**T.C**  
**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ**  
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**



Sayı: 33


24.07.2007

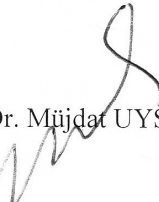
Sn. Doç. Dr. Seyhun Solakoğlu, İ. Ü. İstanbul Tıp Fak. Histoloji ve Embriyoloji AB. Dalı

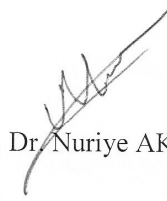
Karar No: 05


Başvuru Tarihi: 23.07.2007

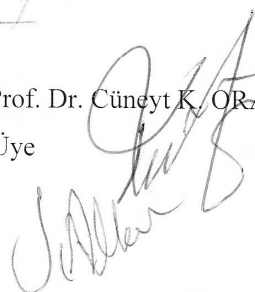
Sorumluluğunu üstlendiğiniz, Mine Gültomruk'a ait "Oral kontraseptiflerin ovaryum matriks metalloproteinazları ile in vivo ve in vitro etkileşimlerinin morfolojik olarak değerlendirilmesi" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul İlkelerine uygun bulunmuştur.


  
Prof. Dr. Mehmet KAYA  
İ. Ü. HADYEK Başkanı


  
Prof. Dr. Müjdat UYSAL  
Üye


  
Prof. Dr. Nuriye AKEV  
Üye

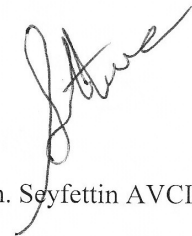
  
Prof. Dr. Gülderen ŞAHİN  
Üye

  
Prof. Dr. Cüneyt K. ORAL  
Üye

  
Doç. Dr. Alper YILMAZ  
Üye

  
Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ  
Üye

  
Avukat Safiye ALTUN  
Üye

  
Mak. Müh. Seyfettin AVCI  
Üye

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	MİNE	<b>Soyadı</b>	GÜLTOMRUK
<b>Doğ.Yeri</b>	İSTANBUL	<b>Doğ.Tar.</b>	17.07.1984
<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>TC Kim No</b>	13415294100
<b>Email</b>	<a href="mailto:minegultomruk@gmail.com">minegultomruk@gmail.com</a>	<b>Tel</b>	0535-4801487

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>		
<b>Yük.Lis.</b>		
<b>Lisans</b>	İSTANBUL ÜNİV. FEN FAK. BİYOLOJİ	2006
<b>Lise</b>	ŞEHREMİNİ LİSESİ	2002

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	iyi	iyi	62.500	

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>ALES Puanı</b>	80.487	83.036	85.001
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Word, Powerpoint, Excell	Çok iyi

## Yayımları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

### Uluslararası Yayın:

- *Cysteinyl-leukotriene receptor antagonist montelukast decreases blood–brain barrier permeability but does not prevent oedema formation in traumatic brain injury* Necat Biber; Hale Z. Toklu; Seyhun Solakoglu; Mine Gultomruk; Tayfun Hakan; Zafer Berkman; F. Gul Dulger. *Brain Injury*, 1362-301X, Volume 23, Issue 6, 2009, Pages 577 – 584

### Poster:

- IX. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi: Gültomruk M., Tunalı G., Aktar F., Karabulut E., Solakoglu S., Canberk Y. Hiperbarik oksijen tedavisi uygulanan diyabetli sıçanların akciğer dokusu üzerindeki etkilerinin morfolojik olarak incelenmesi. 20-23 Mayıs 2008 Adana
- IX. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi: Sahinarslan N., Tunalı G., Abay N.F., Gültomruk M., Aktar F., Ahışhalı B., Canberk Y. Hiperbarik oksijenin diyabetik sıçanlarda kalp kası üzerindeki ultrastrüktürel etkileri. 20-23 Mayıs 2008 Adana
- XIII. International Congress Of Histochemistry And Cytochemistry: Gultomruk M., Kotil T., Aktar F., Karabulut E., Solakoglu S., Canberk Y. Evaluating the effects of intermittent hypoxia on collagen. 23-27 Ağustos 2008 Polonya
- 19. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi: Gültomruk M., Kotil T., Karabulut E., Solakoglu S., Canberk Y. Oral kontraseptiflerin böbreküstü bezi üzerine etkilerinin ultrastrüktürel olarak incelenmesi. 22-25 Haziran 2009 Trabzon

### Kitap Çevirisi:

- Muftuoglu S, Kaymaz F, Atilla P, Çeviri editörleri. *Netter Temel Histoloji*. İçinde *Erkek Üreme Sistemi*. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 2009. (pp 377-399).

### Katıldığı Kurslar:

- Deney Hayvanlarının Biyolojik Araştırmalarda Kullanılması Kursu, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı (Haziran 2007)

### **Özel İlgi Alanları (Hobileri):**

Sinema, kitap okumak, voleybol oynamak, spor yapmak.