

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**OKSİDATİF STRESİN OVARYUM FOLLİKÜLLERİ
ÜZERİNE ETKİSİ VE ANTİMÜLLERİAN HORMON
EKSPRESYONU**

Hazırlayan
Esra BALCIOĞLU

Danışman
Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

Doktora Tezi

Nisan 2014

KAYSERİ

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

OKSİDATİF STRESİN OVARYUM FOLLİKÜLLERİ
ÜZERİNE ETKİSİ VE ANTİMÜLLERİAN HORMON
EKSPRESYONU

Tezi Hazırlayan
Esra BALCIOĞLU

Danışman
Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

Doktora Tezi

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TSD-11-3449 nolu proje ile desteklenmiştir.

Nisan 2014

KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

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

Adı Soyadı: Esra BALCIOĞLU

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

‘Oksidatif Stresin Ovaryum Follikülleri Üzerine Etkisi ve Antimüllerian Hormon Ekspresyonu’ adlı **Doktora tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Esra BALCIOĞLU

Danışman
Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

KABUL VE ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR danışmanlığında **Esra BALCIOĞLU** tarafından hazırlanan ‘**Oksidatif Stresin Ovaryum Follikülleri Üzerine Etkisi ve Antimüllerian Hormon Ekspresyonu**’ adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalında Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

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

JÜRİ:

Danışman: Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR (Histoloji ve Embriyoloji AD)

Üye: Prof. Dr. Birkan YAKAN

Üye: Prof. Dr. Harun ÜLGER

Üye: Doç. Dr. Mehmet Fatih SÖNMEZ

Üye: Doç. Dr. Hülya ÇETİN SORKUN

ONAY

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

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

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, en iyi şekilde yetişmemiz için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, her konuda bizi destekleyen değerli hocam Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR'a, eğitimimiz süresince bizimle ilgilenen, yol gösteren, tüm bilgi ve deneyimlerini bizlere aktarmaya çalışan bölüm hocalarımız Prof. Dr. Birkan YAKAN, Doç. Dr. Mehmet Fatih SÖNMEZ ve özellikle Yrd. Doç. Dr. Arzu YAY'a

Eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan mutlu olduğum, arkadaşlıklarını ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim bölüm arkadaşlarım Derya AKKUŞ ile diğer yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma, tüm Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına, ELISA çalışmalarında yardımını esirgemeyen Parazitoloji AD Araş. Gör. Ülfet ÇETİNKAYA ve DEKAM çalışanlarına,

Hayatımın her aşamasında manevi olarak yanımda olan aileme, çalışmalarım süresince birçok fedakârlıklar gösterip beni destekleyen hayat arkadaşıma ve biricik oğluma teşekkürlerimi sunarım.

Esra BALCIOĞLU

Kayseri, Nisan 2014

OKSİDATİF STRESİN OVARYUM FOLLİKÜLLERİ ÜZERİNE ETKİSİ VE ANTİMÜLLERİAN HORMON EKSPRESYONU

Esra BALCIOĞLU

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı

Doktora Tezi, Nisan 2014

Danışman: Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

KISA ÖZET

Oosit üretimi ve follikül olgunlaşmasından sorumlu birincil fonksiyonel organ ovaryumdur. Anti-Müllerian hormon (AMH) hem primordial follikül gelişiminde hem de dominant follikül seçiminde önemli rol oynayan transforming growth faktör β ailesinin üyesi olan, dimerik bir glikoproteindir. Organik klorürlü bir pestisit olan metoksiklor (MXC) üreme sistemi için toksik olarak bilinir. Bu çalışmanın amacı erken ergenlikte MXC'ye maruz kalmanın ovaryum morfolojisi ve ağırlığı, follikül çapı ve hacmi, AMH ekspresyonu üzerine etkilerini incelemektir.

Araştırmanın amaçları doğrultusunda, 36 adet dişi Wistar albino türü sıçan 4 gruba ayrıldı ve deney grubuna 20 gün süreyle farklı dozlarda MXC (8 mg/kg, 16 mg/kg, 32 mg/kg) verildi. Ovaryumlar toplandıktan sonra bloklar hazırlandı ve 5 μ m kalınlığında kesitler alındı. Genel yapı ve özelliklerini belirlemek için Masson's trikrom, Hematoksilen-Eozin ve immünohistokimyasal boyama uygulandı.

Normal sıçan ovaryumları ile karşılaştırıldığında MXC uygulanan gruplar düşük ovaryum ağırlığına sahipti. Kontrol ve deney grupları arasında follikül çapları ve alanları açısından anlamlı bir fark yoktu. Fakat yüksek ve orta doz MXC verilen gruplarda epitel ve tunika albugineada kalınlaşma belirlendi.

Bu sonuçlar MXC'nin ovaryum gelişimini inhibe ettiğini ve sıçan ovaryumunda doğrudan AMH üretimini uyardığını gösterdi. İlaveten, MXC'nin granüloza hücrelerindeki AMH üretimini teşvik ettiği belirlendi.

Anahtar kelime: Metoksiklor, oksidatif stres, ovaryum, Anti-Müllerian hormon

THE EFFECT OF OXIDATIVE STRESS ON OVARIAN FOLLICLES AND ANTIMULLERIAN HORMONE EXPRESSION

Esra BALCIOĞLU

Erciyes University, Faculty of Medicine

Department of Histology and Embryology, Doctoral Program

Ph.D.Thesis, April 2014

Supervisor: Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

ABSTRACT

The ovary is the primary responsible functional organ for oocyte production and follicle maturation. Anti-Mullerian hormone (AMH) is a dimeric glycoprotein, a member of transforming growth factor β superfamily, which plays an important role on both ovarian primordial follicle recruitment and dominant follicle selection, the organochlorine pesticide methoxychlor (MXC) is known as a reproductive toxicant. The aim of this study is to examine the effects of juvenile MXC exposure on morphology, weight, follicle diameters and volumes of ovarian and AMH expression .

For the purposes of the study, thirty six female Wistar albino rats were divided into four groups and experimental groups were given MXC (8 mg/kg, 16 mg/kg, 32 mg/kg) at different doses for 20 days. After collecting ovaries, blocks were prepared and 5 μ m thick sections were cut. To determine the overall structure and properties, Masson's trichrome, hematoxylin-eosin and immunohistochemical staining were performed.

MXC treated groups had the reduced ovarian weights compared to the ovaries of normal rats. There was no significant difference between control and experimental groups in terms of follicle diameter and area measurements. But the thickening of the epithelium and tunica albuginea was determined in the groups given high dose and medium dose of MXC. These findings indicated that MXC inhibit ovarian development and induce AMH production directly. Moreover, it was shown that MXC stimulate AMH production in granulosa cells.

Key word: Mexhoxcychlor, oxidative stress, ovary, Anti-Mullerian hormone

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR.....	v
KISA ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
KISALTMALAR.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
TABLolar LİSTESİ.....	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Ovaryumun Anatomik Yapısı.....	4
2.2. Ovaryumun Embriyonik Gelişimi.....	5
2.2.1. Farklılaşmamış Gonadlar	5
2.2.2. Primordial Germ Hücrelerinin Göçü	6
2.2.3. Ovaryumların Farklılaşması.....	7
2.3. Ovaryumun Histolojisi	9
2.3.1. Granuloza Hücreleri	10
2.3.2. Teka Hücreleri.....	11
2.3.3. Ovaryum Stroması.....	12
2.3.4. Ovaryum Folliküllerinin Gelişimi	13
2.3.4. Ovulasyon	16

2.3.5. Korpus Luteum.....	18
2.3.6. Folliküler Atrezi.....	20
2.3.7. Rodentlerde Follikül Gelişiminin Kronolojisi	21
2.3.7.1. Östrus Siklusu	22
2.4. Ovaryum Fizyolojisi.....	23
2.4.1. Ovaryumda Bulunan Hormonlar ve Reseptörleri.....	23
2.5. Endokrin Bozucular.....	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1. Dokuların Elde Edilmesi	32
3.2. İmmunohistokimya	37
3.3 İstatistiksel Analiz.....	40
4. BULGULAR.....	41
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	79
6. KAYNAKLAR.....	86
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR

AMH:	Anti-Müllerian Hormon
AMHR 1:	Anti-Müllerian Hormon Reseptörü 1
AMHR 2:	Anti-Müllerian Hormon Reseptörü 2
Bcl-2:	B hücre/lenfoma ailesi 2
BMP4:	Bone Morphogenetic Factor 4
BMP7:	Bone Morphogenetic Factor 7
cAMP:	Siklik adenozin mono fosfat
DAB:	Diaminobenzidin
DAX-1:	Duplicated protein in Adrenal hypoplasia congenital on the X chromosome
DDT:	Diklorodifeniltri-kloro etan
EGF:	Epidermal Growth Factor
ELISA:	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER:	Östrojen Reseptörü
ER-α:	Östrojen Reseptörü- α
ER-β:	Östrojen Reseptörü- β
FGF:	Fibroblast growth factor
FGF7:	Fibroblast growth factor 7
FSH:	Folikül Uyaran Hormon
FSHR:	Folikül uyarıcı hormon reseptörü.
GBG:	Gonadal steroid-bağlayıcı globuline
GCT:	Granülosa hücreli tümörler
GDF-9:	Büyüme farklılaştırma faktörü 9
GER:	Granüllü Endoplazmik Retikulum
GnRH:	Gonadotropin releasing hormon

gr:	Gram
HCG:	İnsan Koryonik Gonadotropin Hormonu
H+E:	Hematoksilen-eozin
IGF-1:	İnsülin büyüme faktörü-1
IL-1β:	İnterlökin-1 β
IL-6:	İnterlökin-6
INF:	Interferon
IVF:	In vitro fertilizasyon
kDa:	Kilo dalton
LH:	Luteinize Hormon
LHR:	Luteinleştirici hormon reseptörü.
MIS:	Müllerian Inhibing Substance
ml:	Mililitre
MT:	Masson's trikrom
MXC:	Metoksiklor
NAIP:	Nötral apoptosis inhibitör protein
NGF:	Nerve Growth Factor
NOBOX:	Homebox kodlayan genler
OMI:	Oosit maturasyon inhibitörü
PBS:	Fosfat buffer saline
PCOS:	Polikistik over sendromu
pg:	pikogram
PGH:	Primordial Germ Hücreleri
PR-A:	Progesteron reseptörü-A
PR-B:	Progesteron reseptörü-B
SCF:	Stem cell factor

SF1:	Steroidogenaz Faktör 1
SPO11:	Spondation Protein Homolog 11
SRY:	Sex-determining region of the Y chromose
TDF:	Testis Belirleyici Faktör
TGF-β:	Transforming Growth Factor β
TNF:	Tümör nekroz faktör
TRAIL:	Tümör nekroz faktör ilişkili apoptoz indükleyici ligand
WNT-4:	Wingless-Related MMTV İntegration site 4
XIAP:	X-linked inhibitör of apoptosis
ZP:	Zona Pellusida

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2. 1: Ovaryumun Anatomisi	5
Şekil 2. 2: Ovaryumların embriyolojik gelişimi	7
Şekil 2. 3: Ovaryumun şematik yapısı	10
Şekil 2. 4: Ovaryum folliküllerinin gelişimi	13
Şekil 2. 5: Kemirici ve insanlarda prepuberta ve puberta aşamasında follikül gelişimi süreleri	22
Şekil 3. 1: Östrous siklusu; a) östrus, b) metöstrus, c) diöstrus d) proöstrus.....	33
Şekil 4. 1: Gruplar arasında deney başlangıç ve bitişindeki ortalama vücut ağırlık ölçümleri.	42
Şekil 4. 2: Kontrol ve deney grupları arasında ovaryum ağırlığının karşılaştırılması....	43
Şekil 4. 3: Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde genel görünüm	455
Şekil 4. 4: Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde primer ve primordial follikül....	46
Şekil 4. 5: Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde preantral follikül.....	46
Şekil 4. 6: Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde sekonder follikül.	47
Şekil 4. 7: Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde tersiyer follikül.....	47
Şekil 4. 8: Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde atretik follikül	48
Şekil 4. 9: Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde korpus luteum.....	48
Şekil 4. 10: Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde medulla bölgesi	49
Şekil 4. 11: Düşük doz MXC uygulanan grupta ovaryumun genel görünümü.....	50
Şekil 4. 12: Düşük doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde primer ve primordial follikül.....	51
Şekil 4. 13: Düşük doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde preantral follikül.	51
Şekil 4. 14: Düşük doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde sekonder follikül.....	52

Şekil 4. 15: Düşük doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde dejenere sekonder follikül.	52
Şekil 4. 16: Düşük doz MXC uygulanan gruba ait tersiyer follikül.	53
Şekil 4. 17: Düşük doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde atretik follikül. .	53
Şekil 4. 18: Düşük doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde atretik follikül. .	54
Şekil 4. 19: Düşük doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde medulla bölgesi.....	54
Şekil 4. 20: Orta doz MXC uygulanan grupta ovaryumun genel görünümü.	56
Şekil 4. 21: Orta doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde primer ve primordial follikül.....	56
Şekil 4. 22: Orta doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde preantral follikül..	57
Şekil 4. 23: Orta doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde sekonder follikül. .	57
Şekil 4. 24: Orta doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde sekonder follikül. .	58
Şekil 4. 25: Orta doz MXC uygulanan gruba ait tersiyer follikül.	58
Şekil 4. 26: Orta doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde atretik follikül.	59
Şekil 4. 27: Orta doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde atretik follikül.	59
Şekil 4. 28: Orta doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde medulla bölgesi ...	60
Şekil 4. 29: Yüksek doz MXC uygulanan grup ait genel görünüm.....	61
Şekil 4. 30: Yüksek doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde primer ve primordial follikül.	62
Şekil 4. 31: Yüksek doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde preantral follikül.	62
Şekil 4. 32: Yüksek doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde sekonder follikül	63
Şekil 4. 33: Yüksek doz MXC uygulanan gruba ait tersiyer follikül.	63
Şekil 4. 34: Yüksek doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde atretik follikül. .	64

Şekil 4. 35: Yüksek doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde atretik follikül.	64
Şekil 4. 36: Yüksek doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde medulla bölgesi.....	65
Şekil 4. 37: Grupların germinal epitel doku kalınlığı bakımından karşılaştırılması.	66
Şekil 4. 38: Grupların t.albuginea kalınlığı bakımından karşılaştırılması.	66
Şekil 4. 39: Kontrol ve deney gruplarındaki primordial ve primer follikül çaplarının karşılaştırılması	67
Şekil 4. 40: Primordial ve primer follikül alanlarının gruplar arasında dağılımı.....	69
Şekil 4. 41: Sekonder ve tersiyer follikül alanlarının gruplar arasında dağılımı.....	70
Şekil 4. 42: İnsan böbrek dokusunda AMH antikoru ile immunohistokimyasal boyama (pozitif kontrol)	71
Şekil 4. 43: İnsan böbrek dokusunda immunohistokimyasal boyama (negatif kontrol)	71
Şekil 4. 44: Kontrol grubuna ait immunohistokimyasal boyamada primordial ve preantral follikül	72
Şekil 4. 45: Kontrol grubuna ait immunohistokimyasal boyamada sekonder ve primer follikül	72
Şekil 4. 46: Kontrol grubuna ait immunohistokimyasal boyamada tersiyer follikül	73
Şekil 4. 47: Düşük doz grubuna ait immunohistokimyasal boyamada preantral follikül.....	73
Şekil 4. 48: Düşük doz grubuna ait immunohistokimyasal boyamada preantral ve sekonder follikül	74
Şekil 4. 49: Düşük doz grubuna ait immunohistokimyasal boyamada tersiyer follikül.	74
Şekil 4. 50: Orta doz grubuna ait immunohistokimyasal boyamada preantral follikül..	75
Şekil 4. 51: Orta doz grubuna ait immunohistokimyasal boyamada primer, preantral ve sekonder follikül	75
Şekil 4. 52: Orta doz grubuna ait immunohistokimyasal boyamada sekonder follikül..	76

Şekil 4. 53: Yüksek doz grubuna ait immunohistokimyasal boyamada primer

follikül, preantral follikül..... 76

Şekil 4. 54: Yüksek doz grubuna ait immunohistokimyasal boyamada sekonder

follikül..... 77

Şekil 4. 55: Yüksek doz grubuna ait immunohistokimyasal boyamada

tersiyer follikül. 77

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3. 1: Işık mikroskobu doku hazırlama tekniği	35
Tablo 3. 2: Hematoksilen-Eozin boyama tekniği	36
Tablo 3. 3: Masson's trikrom boyama tekniği.....	37
Tablo 3. 4: İmmünohistokimya boyama tekniği.....	39
Tablo 4. 1: Deney ve kontrol gruplarına ait serum AMH ve FSH değerlerinin karşılaştırılması.....	44
Tablo 4. 2: Kontrol ve deney gruplarındaki primordial, primer, preantral, sekonder ve tersiyer follikül çaplarının karşılaştırılması.	68
Tablo 4. 3: Kontrol ve deney gruplarına ait ovaryum kesitlerindeki primer, preantral, sekonder ve tersiyer folliküllerden eksprese edilen AMH değerlerinin karşılaştırılması	78

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ovaryum, dişi üreme sisteminde tekrarlayan döngülere göre önemli yapısal ve işlevsel değişiklikler gösteren karmaşık bir endokrin organdır. Ovaryumda follikül gelişimi, ovülasyon, lüteinizasyon, lüteoliz ve hormon salgılaması gibi çeşitli fizyolojik olaylar gerçekleşir (1).

Memeli ovaryumlarının başlıca görevi, bir bireyin neslinin devamı için gerekli olan döllenabilir özellikte bir yumurta hücresinin gelişimini sağlamak, follikülogenez ve ovulasyonu gerçekleştirmektir (2). Erken folliküler gelişim parakrin büyüme faktörleri tarafından kontrol edilir. Follikül gelişimi Kit ligand ve büyüme farklandırma faktör- 9 (GDF-9) gibi bazı faktörler tarafından uyarılır (3). Bunun tersine, Anti Müllerian hormon (AMH) dahil diğer büyüme faktörleri ise erken folliküler gelişimi engeller (4).

AMH ovaryumda primordial follikülden primer folliküle geçtikten sonra granuloza hücrelerinden sentezlenmeye başlar. Preantral ve küçük antral folliküllerde en yüksek düzeye ulaşır ve folliküller büyüdükçe sentezi azalır. AMH, ovaryum rezervinin değerlendirilmesinde, granuloza hücreli tümörlerin saptanması ve takibinde, gecikmiş pubertanın tanınmasında, kriptoorşit ve anorşit tanısında, polikistik over (PCOS) hastalarının tayin edilmesinde, In vitro fertilizasyon (IVF) tedavisinde ve her yaşta erkek gonad fonksiyonunun değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (5-7).

Çevresel endokrin bozucular sentetik veya doğal maddeler olup (8); endokrin sistemin gelişimi ve fonksiyonunu değiştiren, ekzojen madde veya madde karışımlarıdır. Bu maddeler, hormonların üretim, salınım, yıkım ve vücuttan atılımları üzerine etki etmektedirler. Doğal olarak bulunabildikleri gibi değişik sentetik ve endüstriyel ürünlerin içerisinde de yer almaktadırlar (9). Bu maddelerin çoğunun yağda eriyerek,

yağ dokusunda birikerek veya yıkılıp zararsız hale getirilmeleri işlemi zor olduğu için vücutta uzun süre kalıp zararlı etkilerde bulunabilirler (10, 11).

Hem üreme sistemi hem diğer organlar üzerinde etkisi olan endokrin bozucuların uterus ve ovaryum ağırlığında artış, meme kanseri, yaşayan yavru sayısında azalma, erken ve geç puberta, Leydig ve Sertoli hücrelerinde atrofi, testis ve prostat kanseri, iskelet kalsifikasyonu, ventriküllerde genişleme, fetal tiroid hormon bozukluğu, serum tiroksin seviyelerinde düşüklük, epifizlerin erken ya da geç kapanması, postnatal büyüme bozukluğu gibi sorunlara yol açtığı bildirilmiştir (12, 13).

Endüstriyel kimyasal yan ürünler ile kontaminasyonun olduğu bölgelerde balık, kuş ve kabuklu deniz hayvanlarında fertilizasyonun azalması, ürogenital ve somatik anomalilerin artması bilim adamlarının dikkatini çekmiştir. Örneğin östrojenik etkili dikofol, diklorodifeniltri-kloro etan (DDT) ve onların yıkım ürünleri ile temas eden genç timsahlarda ve sıçanlarda yumurta sayısının azaldığı, ovaryumda anomalilerin olduğu, erkek timsahlarda anormal testis ve feminize genital gelişime neden olduğu tespit edilmiştir (10, 11).

Endokrin bozucuların zararlı etkileri açısından, yaşamın hangi döneminde maruz kalındığı önem taşımaktadır. Bu dönemlerin başında intrauterin dönem yer alır (14, 15). Bu dönemde endokrin bozuculara maruz kalınması, üreme organlarında ciddi ve geri dönüşümü olmayan patofizyolojilere neden olabilir (9). Endokrin bozucuların oluşturacağı olumsuz etkide maruz kalınan doz ve etkilenme süresi de ortaya çıkacak etki için önemli faktörlerdendir. Etkilenme süresi uzadıkça veya doz arttıkça oluşabilecek olumsuz etki daha da şiddetli olabilmektedir (11). Yeni doğan dönemi, organizmanın endokrin bozuculara karşı en savunmasız olduğu dönemlerden biridir. Androjen etkili ilaç verilen yeni doğan sıçanlarda testis ağırlığının ve steroid üretiminin olumsuz etkilendiği tespit edilmiştir (16). Endokrin bozucuların insan sağlığı üzerine etkileri incelendiğinde özellikle üreme sisteminde değişik mekanizmalarla birçok patolojiye yol açtığı gösterilmiştir (17, 18). Ancak, endokrin bozucuların çok değişik mekanizmalar ile antioksidan enzimleri inhibe ettiği ve ortamda reaktif oksijen radikallerinin artmasıyla apoptotik hücre ölümüne neden oldukları düşünülmektedir (9, 13, 18, 19).

Metoksiklor (MXC) meyve, sebze ve bahçelerdeki böceklerle karşı yaygın olarak kullanılan organoklorür bir pestisittir (20). MXC canlıda östrojeniktir ve östrojen

reseptörü için az afiniteye sahiptir (8, 21). Cummings (8), MXC'nin hem dişi hem erkek üreme sistemi üzerine toksik etki gösterdiğini; üreme organları, aksesuar bezler, cinsel olgunlaşma ve üreme fonksiyonlarına etkili olan hormon düzeylerini bozduğunu, histopatolojik değişiklikler ve endokrin parametrelerde değişikliğe neden olduğunu bildirmektedir. Aynı zamanda MXC'nin erkek üreme sistemi üzerindeki istenmeyen etkileri tanımlanmıştır ki, keçilerin epididimal spermlerindeki antioksidanların azalması (22), koyun ve siçanlarda testis, prostat ağırlığı ve spermatogenezin azaldığı gözlenmiştir (23-25). MXC'nin ovaryum yapısı ve folliküller üzerine etkileri değişik çalışmalarda (25-35) incelenmiştir. Ancak, düşük doz MXC ile oluşturulan oksidatif stresin AMH ekspresyonu üzerine etkileri ile ilgili ayrıntılı ve geniş kapsamlı yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır.

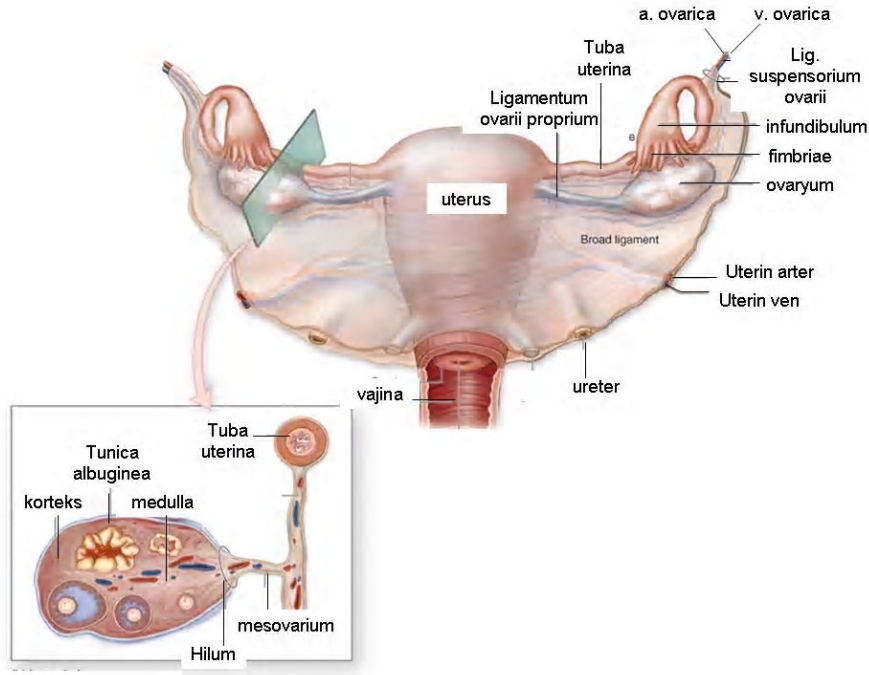
Bu araştırmanın amacı, MXC uygulaması ile oluşturulan oksidatif stresin ovaryum üzerinde meydana getirdiği değişiklikleri tespit etmektir. MXC'nin ovaryumun genel yapısı, germinal epitel ve tunika albuginea kalınlıkları üzerine etkisi, follikül çap ve hacimleri açısından kontrol ve deney grupları arasındaki ilişki, MXC'nin kandaki AMH ve Follikül Uyaran Hormon (FSH) değerleri ile AMH ekspresyonu açılarından kontrol ve deney grubu arasındaki ilişkiyi belirlemek hedeflenmiştir. Ayrıca, aynı sürede ve farklı dozlarda uygulanan MXC'nin iyi bir over rezerv belirteci olan AMH üzerine olan etkisini belirlemek de amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryumun Anatomik Yapısı

Pelvisin yan duvarlarında bulunan fossa ovarica adı verilen çukurcuklarda yer alan ovaryumlar yaklaşık olarak 3-8 gr ağırlığında, 3-5 cm uzunlukta, 1,5-3 cm genişlikte ve 1-1,5 cm kalınlıktadırlar (36-38). Ovaryum anatomik olarak facies lateralis ve medialis olmak üzere iki yüzü, margo liber ve margo mesoovaricus olarak iki kenarı ve extremitas tubaria ve extremitas uterina olarak iki ucu bulunur. Embriyonal yaşamın başlangıcında ovaryumlar, intraabdominal yerleşimli iken, gelişimin ikinci ayından başlayarak aşağıya pelvis boşluğuna doğru inmeye (descensus ovarii) başlarlar ve pelvis minorun duvarındaki fossa ovaricaya yerleşirler. Tuba uterinanın arka ve alt kısmında bulunan ovaryumlar, lig. latum uteri içinde bulunurlar. İlk gebelikte ovaryumlar, uterusla karın boşluğuna doğru çekilirler ve bir daha aynı yere dönemezler. Çoklu doğumlarda ovaryumlar biraz daha aşağıda bulunur (39).

Ovaryumların ön kısımlarında kan damarlarının ve sinirlerin girdiği hilus bulunur. Mezovaryum, kan damarlarını ovaryumlara ileten bir periton kıvrımı olup ovaryumu uterusun yan kenarlarından uzanan ligamentum latuma bağlar (Şekil 2.1). Ovaryumlar, ligamentum ovarii ile de tuba uterinanın tutunma yerine yakın bir şekilde uterusun yan duvarına bağlanırlar (36-38).



Şekil 2. 1: Ovaryumun Anatomisi (40)

2.2. Ovaryumun Embriyonik Gelişimi

Embriyoların genetik ve kromozomal cinsiyeti, ovumu dölleyen sperm çeşidi ile fertilizasyon sırasında belirlenir. Buna rağmen, erkek ve dişi gonadlara (testisler ve ovaryumlar) ait morfolojik özellikler embriyonik dönemin yedinci haftasına kadar seçilemez (41). Gonadlar posterior abdominal duvarını döşeyen sölom epiteli, altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu) ve primordial germ hücreleri (PGH) olmak üzere üç kaynaktan köken alır (42, 43).

Embriyolarda genital organların gelişimi 3 aşamada gerçekleşir (43):

Farklılaşmamış gonadlar

PGH'nin oluşumu ve göçü

Ovaryumların farklılaşması

2.2.1. Farklılaşmamış Gonadlar

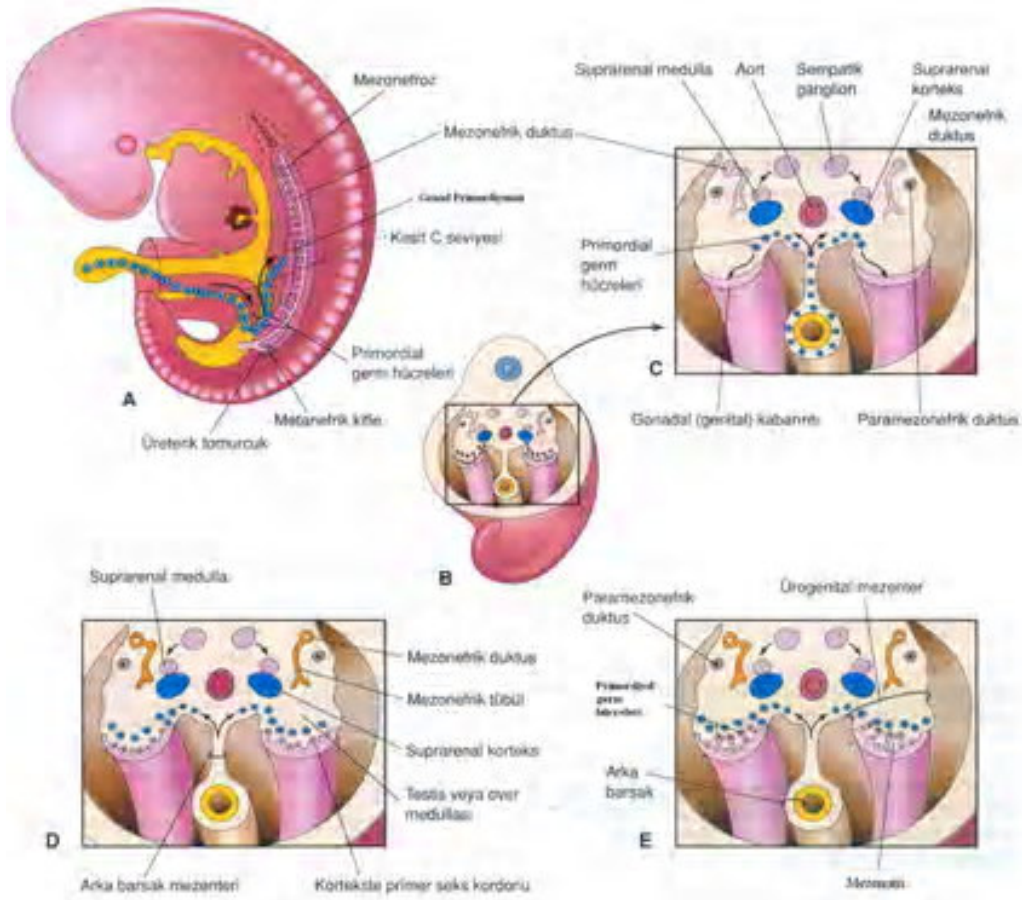
Gonadlar, gelişimin beşinci haftasında mezonefrozun mediyalinden gelişen yapılardır. Gonadların gelişimi sırasında, sağ ve soldaki sölom epitelinin çoğalması ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla iki adet gonadal veya genital kabartı oluşur. Kalınlaşmış

söloom epiteli PGH'ni bölgeye çeken Transforming Growth Factor β (TGF- β) ailesinden bir kemotaktik faktör salgılar ve aynı anda bu hücrelerin çoğalmasını uyarır. PGH'nin primitif gonadlara ulaşmasından hemen önce genital kabartının söloom epiteli çoğalır ve altındaki mezenşimin içine gömülür. Bu yapılar primer cinsiyet kordonları adı verilen düzensiz şekilli yapıları oluşturur.

Parmak şeklindeki epiteliyal kordonlar, altındaki mezenşimin içerisine doğru kısa sürede büyürler. Farklılaşmamış gonadların kesitlerinde dışta korteks, içte medulla bulunmaktadır. Embriyo XX cinsiyet kromozom çiftine sahip ise, farklılaşmamış gonadın korteksi farklılaşırken ve medullası geriler. Eğer embriyo XY cinsiyet kromozom çiftine sahip ise medulla testise farklılaşır ve korteksi, bazı kalıntıları dışında geriler. Gelişimin altıncı haftasına kadar bu yapılarda PGH bulunmaz. Erkek ve dişide yedinci haftadan önce gonadların görünümü birbirlerine benzemektedir. Bu nedenle gonadlar farklılaşmamış gonad adını alır (42-44).

2.2.2. Primordial Germ Hücrelerinin Göçü

PGH, testis ve ovaryumlarda bulunan yetişkin gametlerin embriyonik öncülleridir. PGH büyük, yuvarlak veya oval şekilli, 15-20 μm çapında olan hücrelerdir. Nükleusları ekzantrik yerleşim gösterir ve kromatinleri belirgin haldedir, nükleoplazma eşit miktarda yayılmış ve bir veya iki adet büyük nükleolus içerir. PGH büyük mitokondrilere ve çok sayıda ribozomlara sahiptir. Golgi aygıtına ait veziküller ve endoplazmik retikulum sisternaları nadir olarak bulunur. Bunlarla birlikte glikojen partikülleri ve lipid damlacıkları insan PGH'nin sitoplazmalarında yaygın olarak bulunur. Glikojen partikülleri ve lipid damlacıkları PGH'nin göçü esnasında enerji kaynağı olarak kullanılır (44-47). Gelişimin dördüncü haftasında, büyük yuvarlak PGH allantois kesesinin başlangıç yerine yakın vitellüs kesesinin endodermal hücreleri arasında görülmeye başlarlar ve sayıları yaklaşık olarak 100 adettir. Embriyonun katlanması sırasında, vitellüs kesesinin dorsal parçası embriyo içerisine dâhil olur. Bu sırada, PGH bağırsağın dorsal mezenterisi boyunca ameboid hareketlerle gonadal kabartılara göç ederler (Şekil 2.2). PGH'nin köken aldıkları yerden gonadlara doğru göç ederken izledikleri yol hala tam olarak anlaşılamamıştır. Uzun zamandır gelişen gonadların germ hücrelerine karşı kemotaktik bir çekim gücü oluşturduğu tahmin edilir.



Şekil 2. 2: Ovaryumların embriyolojik gelişimi (43)

Alternatif bir hipotez olarak ise, germ hücrelerinin gonadlara doğru gitmesine bu hücreleri çevreleyen nonsellüler mikro çevrenin ve sellüler mikro çevrenin rehberlik ettiği öne sürülür. PGH göç esnasında bölünerek çoğalırlar ve ovaryuma ulaştıklarında sayıları yaklaşık olarak 1000'e ulaşır. Altıncı haftada PGH altındaki mezenşim içerisine girerek primer seks kordonlarına dâhil olurlar. Gonadların ovaryumlara ya da testislere farklılaşmasında PGH'nin indükleyici etkisi vardır. Eğer PGH genital kabartılara göç edemezse testislerin ya da ovaryumların gelişimi görülmez. Yanlış yönlendirilen PGH gonadların dışına yerleşebilir. Genelde bu koşullar altında hücreler ölür. Eğer ölmezler ise teratoma adı verilen yapılar oluşur (41-44, 46).

2.2.3. Ovaryumların Farklılaşması

Cinsiyetin dişi yönünde farklılaşabilmesi için önceleri sadece Y kromozomunun bulunmamasının yeterli olduğu kabul edilirdi. Y kromozomunun kısa kolu üzerinde testis belirleyici faktör (TDF) için gerekli olan *Sex-determining Region of the Y*

chromose (SRY) geni bulunur ve TDF etkisi altında primer cinsiyet kordonları seminifer tübüllere farklılaşır. Ancak son yıllardaki yapılan çalışmalarda primitif gonadların ovaryuma farklılaşabilmesi için bazı genlere ihtiyaç olduğu saptanmıştır. Örneğin nükleer hormon reseptör ailesinin bir üyesi olan ve X kromozomunun kısa kolunda yer alan *Duplicated protein in Adrenal hypoplasia congenital on the X chromosome (DAX-1)*, Leydig ve Sertoli hücrelerinin farklılaşmasında gerekli olan steroidogenaz faktör 1'in (SF1) aktivitesini düzenleyerek bu hücrelerin oluşumunu engeller. Ayrıca ovaryumun farklılaşabilmesi için *Wingless-related MMTV integration site 4 (WNT-4)* büyüme faktörünün de etkisi bulunur. Sertoli hücrelerinden salınan *Müllerien inhibe edici faktör/anti-Müllerien hormon (MIS/AMH)* eksikliğinde östrojenin etkisiyle parametonefrik kanallardan tuba uterina, uterus, serviks ve vajinanın üst kısımları oluşur.

Dişi X kromozomu, ovaryum gelişmesi için gerekli olan genleri taşır ve iki adet X kromozomuna ihtiyaç vardır. Bu iki X kromozomu oositlerin mayoz I'in profazında uzun süre kalması için gereklidir. OX kromozomları taşıyan bir bireyde de ovaryumlar gelişir. Ovaryumlar histolojik olarak 10. haftaya kadar ayırt edilemezler. Dişi embriyolarda primer cinsiyet kordonları erkeklerdeki kadar belirgin değildir. Ancak gonadın medullasına kadar uzanır ve rudimenter rete ovarii'yi oluştururlar. Normalde daha sonra rete ovarii ve primer cinsiyet kordonları dejenere olurlar (41-43). Dişi gonadların yüzey epiteli yedinci haftada alttaki mezenşimin içine gömülmesine rağmen yüzeye yakın kalmaya devam ederek kortikal kordon adı verilen ikinci nesil kordonları oluşturur. Onaltıncı haftada, bu kordonlar izole hücre kümelerine parçalanırlar. İzole hücre kümeleri primordial follikülleri oluşturur. Oluşan folliküllerin her biri, primordial germ hücrelerinden köken alan bir oogonium ve onu saran, yüzey epitelinden köken alan, tek sıralı yassılaştırmış folliküller hücreler içerir. Primitif germ hücrelerini içeren bu hücre kümeleri daha çok ovaryumun medulla bölgesine yerleşirler ve bir süre sonra kaybolarak yerlerini vasküler bir stromaya bırakırlar. Medulladaki germ kordonları hilusa doğru giderek küçülür ve kaybolurlar. Kortikomedüller bölgedeki oogonyumlar primer oosit oluşturmak için hacimce büyümeye başlarlar (41-44).

Primer oosit insanda bulunan en büyük hücredir, yuvarlak biçimlidirler ve çapı yaklaşık 120-200 µm kadardır. Oositin nükleusu hücre şekline uygun olarak yuvarlaktır ve merkezde bulunur. Kromatin ağı nükleusun her tarafına eşit miktarda dağılmıştır ve

gevşek bir yapı gösterdiğinden açık renkte boyanır. Oosit sitoplazmasına, aynı zamanda ooplazma adı da verilir. En önemli özelliği, paraplazma denilen besin maddelerinden zengin olmasıdır. Belli başlı besin maddeleri protein, lipid, yağ, karbonhidrat, mineraller ve vitaminlerdir (48, 49). Primer oosit ilk mayoz bölünmesine doğumdan önce başlar ancak profaz aşaması pubertaya kadar tamamlanamaz. Bu aşamada oogonyumlar germ kordonlarının epitelial hücrelerinden meydana gelen tek katlı follikül epiteli tarafından sarılır. Primer oositi çevreleyen follikül hücreleri I. mayozu profazda tutan bir faktör olan oosit maturasyon inhibitörü (OMI) adındaki bir maddeyi salgılayarak, oositin mayoz bölünme sürecini durdurduğu düşünülür (41, 43, 44).

Doğum sonrası (postnatal) dönemde yeni oogonium oluşmaz. Doğumdan önce büyük bir bölümü dejenere olsa da 2 milyon civarında hücre doğum öncesi primer oosit haline gelir (41-44).

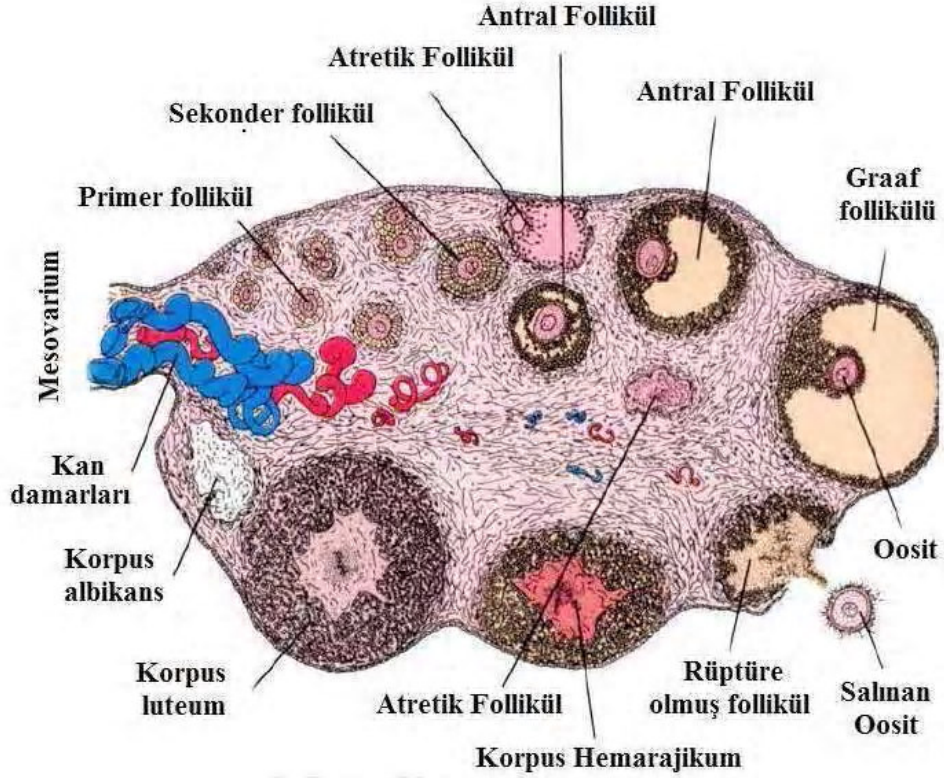
2.3. Ovaryumun Histolojisi

Ovaryum mezotelin devamı olan tek katlı kübik ve bazı bölümlerde yer yer yassı hücrelerden oluşan ve germinal epitel adı verilen yüzey epiteli ile örtülüdür. Yüzey epitelinin altında, ovaryuma beyazımsı rengini veren ve tunika albuginea olarak adlandırılan sıkı bağ dokusu tabakası bulunur. Tunika albugineanın altında, oosit içeren folliküllerin bulunduğu korteks bölümü ile iç kısımda gevşek bağ dokusu içinde zengin bir damar yatağı içeren medulla bulunur (50-52). Histolojik özellikleri birbirinden farklı olan bu iki bölüm arasında, keskin bir sınır bulunmaz. Genç bireylerin ovaryumlarında bu iki kısım kolayca ayrılabilirken daha ileriki yaşlarda pek fark edilemez (45, 51, 53-55).

Ovaryum korteksinde çeşitli gelişim aşamalarında olan folliküller bulunur. Puberteden önce kortekste sadece primordial folliküller bulunurken, puberteden sonra primordial, primer, sekonder ve antral folliküller bulunur. Seksüel olgunluk döneminde bu folliküllerden başka korpus luteum ve atretik folliküller de bulunur. Her bir menstrual döngüde folliküllerin sayısında azalma olur ve sonuçta folliküler havuzun tükenmesi ile de menapoz başlar (37, 38, 56).

Ovaryum medullası gevşek fibroelastik bağ dokusu yapısındadır. Medullada kollajen lif demetleri, elastik lif ağları, büyük kan damarları, lenf damarları, sinir demetleri ve çeşitli yönlere uzanan düz kas lifleri bulunur. Kortekse göre elastik ve kollajen liflerin

sayısı fazladır. Bu yapıların yanı sıra medullada interstisiyel ve hilus hücrelerine de rastlanır. Atreziye giden folliküllerin teka interna hücrelerinden, küçük lipid damlacıkları içeren interstisiyel hücrelerin olduğu düşünülür (Şekil 2.3).



Şekil 2. 3: Ovaryumun şematik yapısı (50)

İnsanda menstruasyon öncesi bazı interstisiyel hücreler östrojen salgılar. Bazı türlerde ise progesteron salgılar. İlk menstruasyon siklusu sırasında interstisiyel hücrelerin çoğunluğu involusyona uğrar ve fonksiyonları azalır (37, 51, 53, 55-57).

2.3.1. Granuloza Hücreleri

Granuloza hücreleri, olgunlaşmakta olan ve olgunlaşmış folliküllerde, 5-7 μ m çaplı polihedral hücrelerdir (58). Rete ovariden mi (59) yoksa yüzey epitelinin mi (60) geliştiği tartışmalıdır. Bazal membrana tutunan hücreler sıklıkla prizmatik şekillidir ve hücre sınırları belirsizdir. Küçük yuvarlak veya oval şekilli hiperkromatik nükleusları vardır. Granuloza hücreleri direkt kan akımına sahip değildir. Vaskularize teka katmanından bir bazal lamina ile ayrılmışlardır. Bazal lamina relatif bir follikül bariyeri oluşturarak lökosit ve büyük molekül ağırlıklı maddelerin folliküle girmesine engel

olur. Kan akımının olmaması komşu granuloza hücreleri arasında ve oositle granuloza hücreleri arası intersellüler iletişim varlığını gerekli kılar. Herhangi bir evredeki folliküllerin granuloza hücreleri arasında zonula adherensler ile neksus ve desmozomlar vardır. Granuloza hücrelerindeki mitotik figürler genellikle olgun folliküllerde çok sayıdadır. Bunların sayısı ovulasyondan önce azalır. Primordial folliküllerin büyümesi gonadotropin uyarımına bağlı değildir. Fakat gelişebilmesi üzerine Nerve Growth Factor (NGF) ve Spondation Protein Homolog 11 (SPO11) gibi faktörlerin etkisi bulunur (41, 61, 62). Ovulasyondan birkaç saat önce luteinizasyon başlayana kadar sitoplazmik lipidler yoktur. Primer, sekonder ve antral folliküllerin granuloza hücrelerinin sitoplazmaları, sitokeratin, vimentin ve desmoplakin için immunreaktifdir.

Olgunlaşmakta olan follikülde granuloza hücrelerinin sitoplazmalarındaki lamellar kristal mitokondriyonlar, granüllü endoplazmik retikulum (GER), serbest ribozomlar ve Golgi cisimleri yavaş yavaş çoğalırlar. Granuloza hücreleri bulundukları yere bağlı olarak, mural granuloza hücreleri, antral granuloza hücreleri ve kumulus granuloza hücreleri olmak üzere farklı fenotipler gösterirler. Mural granuloza hücreleri, antral follikülde yüksek 3- β hidroksisteroid dehidrogenaz ve aromataz aktivitesi göstererek en büyük steroidojenik aktiviteyi gösterirler ve preovulatuvar follikülde en fazla Luteinize Hormon (LH) reseptörüne sahiptirler. Antruma yaklaştıkça granuloza hücrelerinde steroidojenik aktivite azalırken mitotik aktivite artar. Ovulasyon esnasında oosit ile birlikte salınan kumulus hücreleri aromataz eksprese etmezler ve LH reseptör ve LH'ya cevap kapasiteleri mural kompartmanlara oranla daha düşüktür (63).

2.3.2. Teka Hücreleri

Teka hücreleri, fetal yaşamdan menopozun sonuna değin, gelişen folliküllerin periferinde ve stromal hücrelerden devamlı olarak farklılaşırlar. Teka ve interstisyel hücreler, stromal kompartmanın mezenşimal hücrelerinden gelişirler. Primer interstisyel hücreler gebeliğin 12. haftasında fetal ovaryumun medulla bölümünde ortaya çıkar ve 20. gebelik haftasında kaybolurlar. Gonadotropinlere cevap veremezler. Kolesterol yan zincir klivaj aktiviteleri olmadığı için de novo steroidogenez yapamazlar. Fakat sirküle steroidojenik öncülleri kullanarak androjen üretebilirler. Teka tabakası, steroid hormon salgılamaya uygun endokrin bir yapı gibi zengin şekilde damarlanma gösteren teka interna ve büyük çoğunluğu fibröz bağ dokudan oluşan teka eksternadan oluşur (64).

Teka internayı oluşturan hücrelerin zarlarında LH reseptörleri bulunur ve bu hücreler de steroid üreten hücrelerin ultrastruktürel özellikleri gözlenir. Poligonal şekilli olup oval nükleuslara, sitoplâzmalarında çok sayıda lipid damlalarına ve gelişmiş düz endoplazmik retikuluma sahiptirler. Mitokondriyonların kristalları tubuler tiptedir. Bu hücreler bağ dokusundan geliştiği halde epiteloïd karakterdedirler. Teka interna hücreleri, granuloza hücrelerindeki erkek seks hormonu olan androstenedionu üretmektedir. Teka hücrelerinde üretilen androstenedion, aromataz enzimi yardımıyla granuloza hücrelerinde östrojene çevrilir. Teka interna hücreleri granuloza hücrelerinden farklı fakat stromal hücrelerle benzer olarak vimentin için immunreaktiftir. Sitokeratin için ise immunreaktif değildir. Mitotik görünüm olgunlaşan folliküllerin teka hücrelerinde mevcuttur.

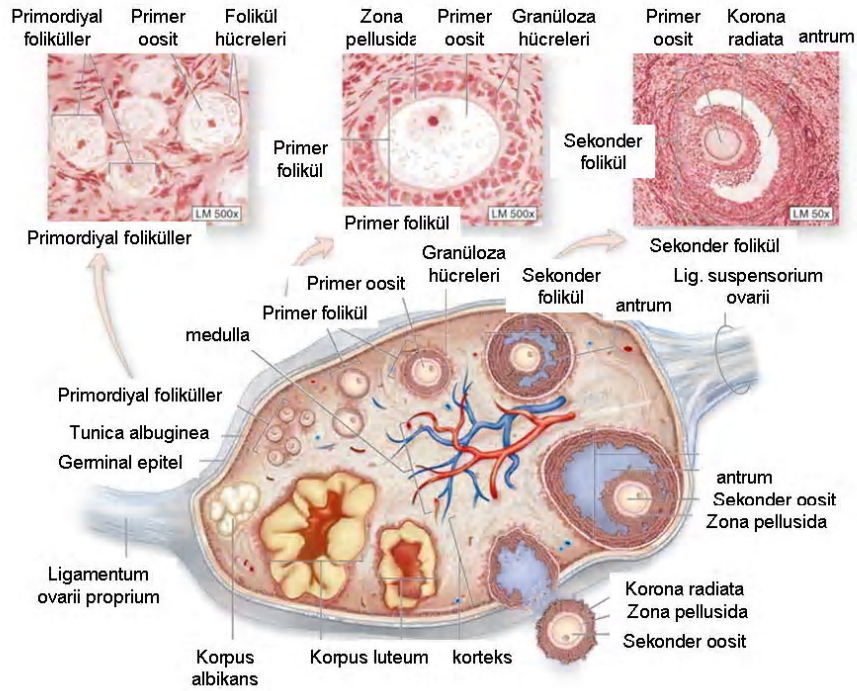
Teka eksterna tabakası, teka internanın etrafını sarar ve çevre stroma ile sınırları belirsizdir. Teka eksternada az sayıda konsantrik yerleşimli fuziform bağ dokusu hücreleri, yoğun kalın kollajen lifler ve düz kas demetleri bulunur. Her iki teka tabakası arasında kesin bir sınır yoktur (60).

2.3.3. Ovaryum Stroması

Kortikal ve medullar stroma benzer görünümündedirler ve sınırları belirsizdir. İğ biçimli stromal hücreler dar sitoplâzmalıdır. Berrak sitoplazmik lipid damlacıkları özellikle geç reproduktif ve postmenopozal dönemde özel boyalarla gösterilebilir. İmmunohistokimyasal boyalarla sitoplâzmada ayrıca vimentin, aktin ve desmin görüntülenebilir. Luteinize stromal hücreler ise folliküllerden uzakta yerleşiktir. Tek başlarına sıklıkla medullada, küçük bir yuva içinde bulunurlar. Polihedral şekilli, eozinofilik-açık, çeşitli miktarda lipid damlacığı içeren sitoplâzmaları vardır. Sentral yerleşimli yuvarlak nükleusa ve belirgin nükleolusa sahiptirler. Bu hücrelerde testosteron için sitoplazmik immunreaktivite bulunur. Ovaryum stroması ayrıca belirgin steroidojenik aktivitesi olmayan fibroblastlardan oluşur. Bu hücreler androjen reseptörü eksprese ederler ve androjenlerin etkisi ile proliferer olurlar. Ovaryum kaynaklı hiperandrojeneminin karakteristiği stromal yoğunlukta artış olarak görülür. Stromal hücreler ovaryumlarda çevre yapılardan follikül ve korpus luteumu ayırırlar. Büyüme faktörleri ve bağlayıcı proteinleri üretirler (57).

2.3.4. Ovaryum Folliküllerinin Gelişimi

Folliküllerin primordial follikül popülasyonundan ayrılıp gelişme ve differensiyasyonuna follikülogenez denir. Follikülogenez somatik hücrelerin proliferasyonu, steroidojenik kapasite elde etmesi, oositin büyümesi ve mayoz bölünme ile karakterizedir. Follikülogenezin amacı olgun, kumulus kompleksi ile çevrili, üreme yolunda spermle döllenebilen bir oosit ile endometriumun gebeliğe hazır olmasını sağlayacak hormonları salgılayan korpus luteum elde etmektir. Bu folliküller ardışık büyüme ve differensiyasyon sürecine girmeden önceki dönemde sessizdirler (Şekil 2.4). Bütün folliküller ovulatuvar döneme ulaşmazlar, bir kısım folliküler atrezi denilen bir süreçle kaybedilirler. Mc Gee et al. (65) göre folikülogenezde iki dönem vardır. Bunlardan birincisi ilk “recruitment”dir. Bu dönemde primordial folliküller erken antral döneme doğru yavaş büyüme içerisindeyler. Bu dönemde atreziden kurtulan erken antral folliküller hızlı bir büyüme içerisine girerler. Folliküller gelişim sürecine girdikten sonra biri ya da bazıları daha ileriye büyüme ve ovulasyon için seçilirler buna dominant follikül adı verilir. Diğer folliküller atreziye uğrarlar.



Şekil 2. 4: Ovaryum folliküllerinin gelişimi (40)

Folikülün gelişimi, granuloza, teka, interstisyel hücreler ile oositlerden salınan büyüme faktörlerinin otokrin ve parakrin sinyallerine bağlıdır. Bu faktörler, Bone morphogenik factor - 4 (BMP-4), B hücre / lenfoma ailesi 2 (Bcl 2), Fibroblast growth factor (FGF), Homebox kodlayan genler (NOBOX), survivin, X linked inhibitör of apoptosis (XIAP), GDF- 9, Nötral apoptosis inhibitör protein (NAIP), Stem cell factor (SCF), integrin, gonadotropin, Tümör nekroz faktör ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) olmak üzere çeşitli moleküllerdir (66). Ovaryumlarda farklı gelişim evrelerine göre başlıca 4 tip follikül bulunmaktadır (41, 43).

1. Primordial folliküller
2. Primer folliküller
3. Sekonder follikül
4. Tersiyer follikül

2.3.4.1. Primordial folliküller

Dişi bireylerde PGH gelişimin 25. haftasında mitozla çoğalarak yaklaşık 7 milyon oogonyum meydana getirir. Bu aşamada yassı epitel hücreleri oogonyumların çevresini tek tabaka halinde sararak primordial follikülleri oluşturur. Mayoz bölünmeye girmiş primer oositlerin büyük çoğunluğu primer follikül oluşturamayıp atreziye uğrar ve yok olurlar (67). Fetal hayatın beşinci ayında başlayan atrezi folliküllerin sayısını logaritmik olarak azaltır. Atrezi başlamadan önce beş milyon civarında olan oosit sayısı doğumda 1 milyondan aza iner (50). Pubertede ise bu rakam 200.000'e kadar inmiştir (68). Puberteden itibaren her menstural döngüde bir kaç adet follikül gelişirken yalnızca bir tanesi baskın follikül olup son aşamaya kadar gelişir, diğerleri ise atreziye uğrayarak yavaş yavaş yok olurlar. Bir kadının üretken dönemi süresince yaklaşık 400 oosit bu aşamaya kadar gelip ovulasyonla atılır. Menopozdan sonra geri kalan oositler birkaç yıl içinde tamamen yok olur (50). Bununla beraber, son yıllarda bazı araştırmalarda fare türlerinde germ hattı kök hücrelerinden, yaşamın erken yıllarında yeniden eşey hücresi oluşturulmuştur. Bazı kurbağa türlerinde (*Xenopus laevis*) kök hücrelerinden, yaşam süresinin çoğu boyunca eşey hücresi üretildiği yönündeki kanıtlar oldukça kuvvetlidir (43, 69).

Primordial folliküllerin gelişebilmesi için NGF ve SPO11 gibi faktörlerin etkisi bulunur (44, 46, 70-72). Bunun dışında birçok büyüme faktörü burada rol alır. Kök hücre

faktörü, lösemi inhibitor faktör, insulin gibi faktörler primordial follikülün gelişimi için önemlidir. Bone Morphogenetic Factor 4 (BMP-4) primordial follikül yaşamını attırmakta ve primordial-primer follikül geçişinde rol almaktadır (73). GDP-9 yokluğu, follikülogenezi, primer follikül sürecinde bloke eder (3).

2.3.4.2. Primer folliküller

Puberteden itibaren çeşitli unsurların etkisiyle bazı folliküller büyüme evresine girerler. Büyümenin ilk işareti, yassı follikül epitel hücrelerinin kübik hücrelere dönüşmesidir. Bu aşamada follikül primer follikül adını alır (74). Primer folliküller, primordial folliküldeki primer oosit, follikül hücreleri ve bunları çevreleyen stromal dokudaki değişikliklerin sonucu olarak gelişir. Primer oositin çapı büyür. Follikül hücreleri oosit gelişmesine bağlı olarak değişikliğe uğrarlar, yassıdan kübik şekle dönüşürler ve granuloza hücreleri adını alırlar. Primer follikülde, oositin çevresinde tek katlı kübik epitel ve bazal lamina bulunur. Primer follikülün çapı 50-80 µm kadar büyür. Ayrıca, primer folliküllerde oositin çevresinde zona pellusida (ZP) oluşmaya başlar. Primordial folliküllerden primer folliküllerin gelişebilmesi için BMP4, Bone morphogenetic factor 7 (BMP7) ve Fibroblast growth factor 7 (FGF7) gibi bazı faktörlerin etkileri vardır (51, 53, 73, 75).

2.3.4.3. Sekonder folliküller

Follikül epiteli ve çevresindeki stroma, folliküllerin olgunlaşması ile ilişkili olarak hem hiperplaziye hem de hipertrofiye uğrar. Bu komponentler solid, multilaminar özellikteki sekonder follikülü oluştururlar. Follikülde granuloza hücreleri mitoz ile çok katlı duruma gelirler. Hücrelerin sıkıca paketleniği çok katlı konsantrik bir düzen kazanırlar. Granuloza hücrelerin oluşturdukları bu çok katlı epitele stratum granulosum adı verilir. Ayrıca bu tip folliküllere multilaminar primer follikül de denir (51, 57, 76). Follikül büyürken primer oositin de çapı artar ve homojen, eozinofilik ekstrasellüler bir tabaka olan ZP, hücrenin plazma membranını çevreler (52).

Proteoglikanlardan zengin olan ZP, hem oosit hem de granuloza hücreleri tarafından sentezlenir. ZP, follikül içindeki üreme hücrelerini, tubada ovulasyona uğramış oositi ve klivaj aşamasındaki embriyoyu korur. Ayrıca sperm ile iletişim kuran bölge olmakla birlikte polispermiden koruyucu basamağı da oluşturur. Işık mikroskopunda parlak, homojen bir şekilde ve asidofilik olarak gözlenir. Ayrıca glikoprotein içeriğinden dolayı PAS pozitifdir. Yalnızca üç glikoproteinden oluşur: 200 kDa ağırlığında ve dimerik

yapıda olan ZP1; 120 kDa 16 ağırlığında olan ZP2 ve 83 kDa ağırlığında olan ZP3. ZP2 ve ZP3 düzenli aralıklarla ZP1 dimerleri tarafından birbirlerine bağlanarak uzun filamen kompleksini oluştururlar. Sperm bağlanması sırasında, ZP3'e bağlı olan oligosakkaritler sperm reseptörleriyle ilişkiye girerler (57). ZP1 olmayan fare yapısal olarak anormal zona oluşturur ve fekunditesinde azalma görülür. ZP2 olmayan farede preovulatuvar follikülü barındıramayan ince bir zona oluşur, antral follikül sayısı azalır ve daha az yumurta ovulasyona uğrar. ZP3 eksik fare zona pellusida oluşturamaz ve dişiler sterildir (77).

2.3.4.4. Tersiyer follikül

Antrumun ileri büyümesi ile oosit, çevresindeki granuloza hücreleriyle beraber bir kutba doğru itilir. Granuloza hücreleri çoğaldıkça birbirlerinden uzaklaşır, kısa sitoplazmik uzantılarla birbirine bağlanıp köşeli veya yıldız şeklinde görünürler. Oositin granuloza hücre tabakalarıyla bağlantısı gevşer. Oositin korona radyatayla sarılı olarak follikül boşluğuna yapmış olduğu çıkıntıya kumulus oovorus denir. Bu dönemde granuloza hücreleri oosite komşu olan kumulus hücreleri ve komşu olmayan murak granuloza hücreleri olarak isimlendirilir. Oosit mural hücrelerin farkanmasını baskılatıp kumulus hücrelerinin farkanmasını ilerleterek kendi mikro çevresini kontrol eder. Ovulasyondan hemen önce izlenen bu folliküle preovulatuvar follikül de denir (78).

2.3.4. Ovulasyon

Granuloza hücrelerinde LH reseptörleri belirdikten sonra gonadotropinlere yanıt gelişir. LH salınımından 24–36 saat sonra hızla follikül sıvısı artar. Ovulasyon öncesinde oositin çapı 120 µm, follikülün çapıysa 15–25 mm'ye ulaşır. LH'un etkisiyle lokal bir faktör olan mayoz-uyarıcı maddenin salınımıyla Graaf follikülü evresine kadar profazda olan oosit, ovulasyondan 24–36 saat önce prometafaz ve metafaz aşamalarına ulaşır. Ovulasyon anında oosit hızla telofaz ve anafaz aşamalarını geçirerek, birinci mayoz bölünmeyi tamamlar ve birinci kutup hücresi previtellin aralıkta izlenir. Bu bölünmede sitoplazma dağılımı dengesizdir; kutup hücresi az sitoplazmalı, çok küçük bir hücredir. Ovulasyonla tuba uterinaya atılan hücre sekonder oositir; ikinci mayoz bölünmenin metafazında döllenmeyi bekler. Graaf follikülünde sürekli olarak granuloza hücreleri tarafından yapımı süren proteoglikanlar ve hyaluronik asit su tutarlar. Bu da hem follikülün büyümesine hem de olgun granuloza hücrelerinin birbirleriyle olan bağlantılarını yitirmelerine neden olur. Ovulasyondan hemen önce ovaryum yüzeyinde

Graaf follikülünün bulunduğu yerde soluk, kansız, ince duvarlı bir kabarıklık görülür, buraya stigma (stigma folliculare) denir. Duvarın incelmesinde hücresel yer değiştirme ve teka ile tunika albugineadaki kollajen lif demetlerinin yıkılması söz konusudur. Folliküllerde ovulasyondan hemen önce kollajenaz yüksek bulunmuştur. Follikül sıvısı plazminojen içermektedir. Ovulasyon öncesi LH'un etkisiyle granuloza hücreleri plazminojen aktivatörü sentezler. Bu da plazminojenin aktif plazmine dönüşmesine ve prokollajenazın aktive olarak bazal membran, teka ve tunika albugineadaki kollajenin yıkılmasına yardımcı olur. Dejenerasyonla stigma bölgesinde açılan delikten sekonder oosit (oosit II) ve çevresindeki bir miktar granuloza hücresi, follikül sıvısıyla birlikte periton boşluğuna atılır. Bu olaya ovulasyon (yumurtlama) denir. Bu, 28 günlük menstriyal döngünün yaklaşık 14. gününde gerçekleşir. Atılan oosit II tuba uterinanın fimbriya ovarikaları ile tutularak tuba uterina içerisine alınır. Oositin tuba uterinadaki yolculuğu yaklaşık dört gün sürer, bu sürede bir spermiyum tarafından döllenirse ikinci olgunluk bölünmesi tamamlanır. Ovum ve ikinci kutup cisimciği oluşur. Döllenme olmadığında sekonder oosit 24 saat içinde dejenere olur (78).

Primordial follikül evresinden daha ileriye gelişim, oositin boyutunda bir artış, granuloza hücrelerinin birçok tabakaya proliferasyonu ve oositin iç tarafındaki granuloza hücrelerinden ZP denilen kalın bir materyal tabakasıyla ayrılmasıyla karakterizedir. Granuloza hücreleri östrojen, ovülasyondan hemen önce az miktarda progesteron ve peptid hormon inhibin salgılar. ZP'nın varlığına rağmen, granuloza hücrelerinin iç tabakası, ZP' yı geçen ve oositle yarıklı bağlantılar (gap junction) oluşturan sitoplazmik uzantılar yoluyla, oositle çok yakından ilişkili kalır. Bu yarıklı bağlantılar sayesinde, besinler ve kimyasal haberciler oosite geçer. Örneğin, granuloza hücreleri, oositte mayotik bölünmeyi durdurmayı sağlamakta etkili olan siklik adenosin mono fosfat (cAMP) gibi bir ya da daha çok faktör sağlar; gelişmekte olan oositin hücre içi pH'ını düzenler (79). Granuloza hücreleri birbirleriyle de yarıklı bağlantıları vardır, böylece tüm yapı bir sinsisyum olarak çalışır. Follikül granuloza hücrelerinin mitozuyla geliştikçe, granuloza hücrelerini çevreleyen bağ dokusu hücreleri farklılaşır ve granuloza hücrelerinden östrojen salınmasında önemli bir rol oynayan teka tabakalarını oluşturarak sekonder follikül halini alır. Bundan kısa süre sonra, follikül içindeki primer oosit tam boyutuna ulaşır (80-100 µm) ve granuloza hücrelerinin ortasında, salgıladıkları sıvının sonucu olarak sıvı ile dolu bir aralık olan antrum oluşmaya başlar (erken antral follikül). Bazı primordial folliküllerden önce primer, ardından sekonder

follikül oluşumu sürekli olarak meydana gelir ve daima sabit sayıda sekonder folliküller bulunur. Her menstrüel siklusun başlangıcında, bu preantral folliküllerin 10-25'i antral folliküllere gelişmeye başlar. Siklusta ilk hafta bir seçim işlemi ortaya çıkar: sadece bir follikül, baskın follikül gelişmeye devam eder ve genişlemeye başlamış olan diğerleri atreziye uğrar. Bu folliküllerdeki oositler de ölür. Atrezi antral folliküllerle sınırlı değildir, gelişimin tüm evrelerinde folliküller atreziye uğrayabilir. Doğumda 2-4 milyon olan follikül ve oosit sayısı, fetusta daha önce bulunanların sadece küçük bir kısmıdır. Atrezi daha sonra tüm prepubertal yaşam boyunca devam eder, böylece aktif üreme yaşamı başladığında sadece 200.000 follikül vardır.

Baskın follikül antrumunun genişlemesi sonucu olarak, oositi çevreleyen granuloza hücre tabakaları, antrum içine uzanan bir tümsek oluşturlar ve buna kumulus ooforus denir. Oositin hemen çevresindeki kumulus hücrelerine korona radiata denir. Bu tür folliküle de tersiyer follikül (Graaf follikülü) adı verilir. Ovülasyon yaklaştıkça, primer oosit sekonder oosite dönüşmek üzere birinci mayotik bölünmesini tamamlar. Olgun follikül (Graaf follikülü) o kadar genişler ki (çapı yaklaşık 1,5 cm) over yüzeyinden dışarı doğru şişlik yapar. Follikül ve overin birleştikleri yerde ince duvar yırtıldığında ovülasyon gerçekleşir. Sıkıca yapışmış ZP ve granuloza hücreleriyle çevrilmiş olan sekonder oosit tuba uterinanın fimbriaları tarafından yakalanır. Olgun follikül antrum sıvısını ve yumurtasını boşalttıktan sonra, overdeki kalıntısı antrum çevresinde kollabe olur ve hızlı bir değişime uğrar. Granuloza hücreleri büyük ölçüde genişler, yeni oluşan kapillerler içeriye ilerler. Gland benzeri, östrojen, progesteron ve inhibin salgılayan tüm bu yapıya korpus luteum denir. Korpus luteum yaklaşık 10 gün içinde maksimum gelişimine ulaşır. Bu arada, tuba uterinaya alınmış olan oosit döllenenmezse hızla dejenere olur. Menstrüasyona ve yeni bir menstrüel siklusun başlamasına, korpus luteum fonksiyonunun kaybı yol açar (79).

2.3.5. Korpus Luteum

Ovulasyondan sonra, follikülün granuloza ve teka interna hücreleri, korpus luteum (sarı cisim) denilen geçici bir iç salgı bezini oluşturmak üzere yeniden düzenlenirler. Korpus luteum ovaryumun korteks bölgesinde görülür. Follikül sıvısının boşalması ile follikül duvarı kıvrımlı bir hal alır. Follikül boşluğuna bir miktar kanama olur; bu kan pıhtılaşır (koagülasyon) ve daha sonra yerini bağ dokusu alır. Bu bağ dokusu ile birlikte giderek ortadan kaldırılan kan pıhtısı artıkları korpus luteumun en iç kısmını oluşturur.

Ovulasyondan sonra granuloza hücrelerinin boyutlarında bölünmelerine karşın büyük bir artış olur (20–35 µm çapında). Bunlar korpus luteum parankima hücrelerinin (luteocytus) yaklaşık %80'ini oluştururlar ve granuloza lutein hücreleri olarak adlandırılırlar. Bu hücreler, steroid salgılayan hücrelerin genel yapısal niteliklerine sahiptirler. Teka internanın hücreleri de teka lutein hücrelerini oluşturarak korpus luteumun oluşumuna katkıda bulunurlar. Bu hücreler granuloza lutein hücrelerine benzer yapıda, ancak daha küçüktürler (yaklaşık 15 µm çapında) ve daha koyu boyanırlar. Bu hücreler korpus luteum duvarının kıvrımlarında yerleşirler. Teka internanın kapiller ve lenfatik damarları korpus luteumun iç kısmına doğru gelişirler ve bu yapının zengin damar ağını oluştururlar (80).

Oosit II atıldıktan sonra follikül hücrelerinin yeniden düzenlenmesi ve korpus luteumun oluşması, ovulasyon öncesinde salgılanan LH'nin uyarısı sonucu gerçekleşir. LH uyarımıyla korpus luteum hücrelerinin enzimlerinde de değişiklik olur ve korpus luteum progesteron ve östrojenleri salgılamaya başlar.

Korpus luteumun durumu gebeliğin oluşup oluşmamasına bağlıdır. LH uyarımının ardından, korpus luteum 10–12 gün süreyle hormon salgılamak üzere programlanmıştır. Gebelik oluşmadığında, korpus luteum hücreleri apoptozis ile dejenere olur. Progesteron salgısındaki azalmanın sonuçlarından biri menstruasyondur. Menstruasyonda uterus mukozasının bir kısmı dökülür. Östrojen, hipofizden FSH salgılanmasını baskılar. Korpus luteum dejenerasyonundan sonra, steroid hormonların kandaki yoğunlukları azalır ve follikül uyarıcı hormon salgılanır. FSH diğer folliküllerin büyümesini uyarır ve bir sonraki menstrüel döngü başlar. Yalnızca menstrüel siklusun bir kısmı süresince kalan korpus luteum, menstruasyon korpus luteumu olarak adlandırılır ve hücresel kalıntıları makrofajlar tarafından ortadan kaldırılır. Korpus luteumun bulunduğu yer fibroblastlar tarafından doldurulur ve burada sıkı bağ dokusundan oluşan bir cisim gelişir. Bu cisme korpus albicans (corpus albicans) denir.

Gebelik oluşursa endometriyum dökülmez. Embriyonun trofoblastik hücrelerince sentezlenen bir hormon olan insan karyonik gonadotropin hormonu (HCG) korpus luteumun devamlılığının sürdürülmesini sağlayan sinyaller gönderir. HCG'nin etkisi LH'a eşdeğerdir, böylece korpus luteumun dejenerasyonu engellenir. Korpus luteum daha da büyür ve progesteron hormonu salgılar. Progesteron bu işlevlerinin yanı sıra uterus bezlerinin salgı yapısını da uyarır. Bu bezlerin salgıları, plasenta işleve

başlayıncaaya değin embriyonun beslenmesi açısından önemli görölmektedir. Gebelikteki korpus luteuma gebelik korpus luteumu (corpus luteum graviditatis) denir. Gebelik korpus luteumu 4–5 aya değin aktiftir. Daha sonra geriler. Yerinde oluşan korpus albicans menstruasyon korpus albicansından daha büyüktür ve kalıcıdır (51).

2.3.6. Folliküler Atrezi

Ovaryumda doğum sırasında sayıları milyonlarla ifade edilen folliküller bulunur. Her menstrual siklusta birden çok follikül gelişir. Ancak olgun bir follikül, parçalandığında ve oosit-kumulus-korona kompleksi atıldığında geride kalan olgunlaşmakta olan folliküller atrezi ismi verilen bir süreç ile ortadan kaybolurlar. Atrezi granuloza hücrelerindeki apoptoz aracılığıyla meydana gelir. Fetal gelişim, erken postnatal yaşam ve pubertede çok sayıda follikül atreziye uğrar. Folliküller atreziye uğrarken ilk başta oositler daha sonra da follikül hücreleri dejenere olurlar. Atreziye uğrayan primordial folliküllerin yerini stroma alır. Gelişen folliküllerin atrezisi ise daha kompleks bir olaydır. Bu olayları sıralarsak; Oosit dejenere olur, mitoz durur ve granuloza hücreleri arasında endonükleazlar ve hidrolitik enzimlerin ekspresyonu görülür. Nötrofil ve makrofajların granuloza tabakasına invazyonu gerçekleşir. Follikül antrumuna granuloza hücreleri dökülür ve vaskülarize bağ dokusu dizisi ile granuloza tabakasının invazyonu gerçekleşir. Otolitik değişikliklere dayanıklı olan ZP ise makrofajlar tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılır. Teka interna hücrelerinde hipertrofi gözlenir. Follikül kollapsı olur (43, 51, 53, 57).

Folliküllerdeki atrezi sürecini birkaç gen düzenler. Bunlardan bir tanesi gonodotropinlerin induklediği NAIP'dir. Bu granuloza hücrelerindeki apoptoz yönündeki değişiklikleri inhibe eder. NAIP gen ekspresyonu büyüyen folliküllerin tüm evrelerinde mevcuttur. Fakat atreziye uğramış follikülde yoktur. Gonodotropinlerin yüksek düzeyde olması ovaryumlarda NAIP'in ekspresyonunu artırır. Bu şekilde apoptozis inhibe edilir.

Oositlerde dejenerasyon ve otoliz gerçekleşir. ZP ilişkili olduğu hücrelerdeki otolitik değişikliklere karşı dirençlidir. Antrum içinde yavaşça bozular ve katlanıp kolloba olur. Bağ dokusundaki makrofajlar, dejenere hücrelerin artıklarını ve ZP'yı fagosite ederler. Follikül hücreleri ile teka interna arasındaki bazal membran follikül hücrelerinden ayrılabilir ve kalınlığı artar. Camsı membran adı verilen dalgalı hyalin bir tabaka oluşturur (57).

Teka interna hücrelerinin büyümesi bazı atretik folliküllerde meydana gelir. Bu hücreler teka lutein hücrelerine benzerler ve bağ dokusuyla ayrılmış diziler şeklinde radial olarak düzenlenirler. Bağ dokusunda zengin kapiller ağ gelişir. Bu atretik folliküller, korpus luteuma benzemektedirler ve korpus lutea atretika ismini alırlar (50).

Menstrual siklus başında artan FSH konsantrasyonları ile bir follikül midsiklusa artan miktarda östrojen üretimini sağlar ve maturasyona ulaşır. Feedback mekanizma ile FSH sekresyonu düşer, dolayısıyla folliküllerde apoptoz gözlenir ve atrezi gerçekleşir (81).

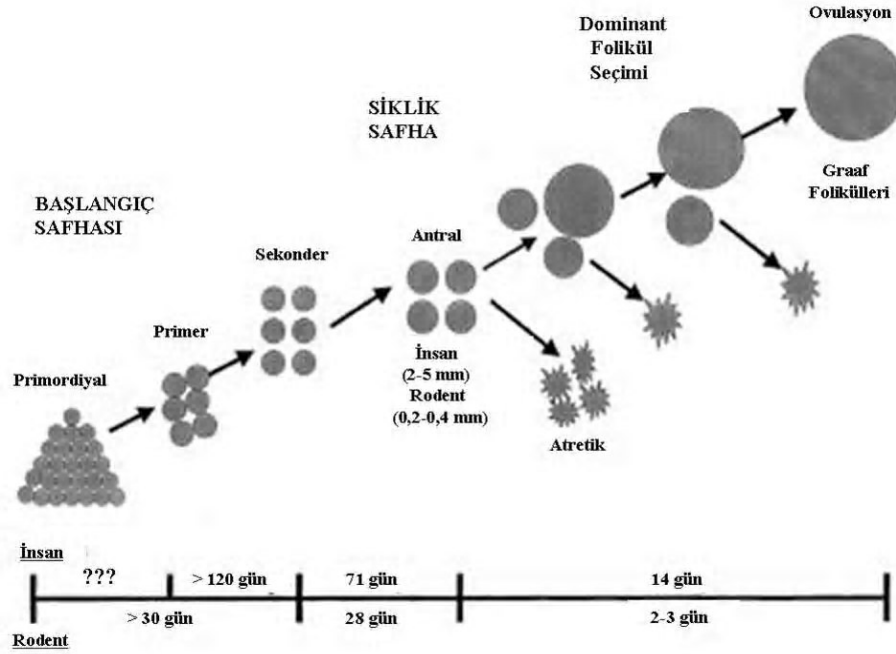
Granuloza hücrelerinde apoptoza neden olan mekanizmalar tam olarak bilinmemekle beraber;

1. Kaspazlar, inhibitör, interferon (INF), endotelin gibi birçok molekülü ilgilendirir.
2. Gonadotropin, İnsülin büyüme faktörü-1 (IGF-1), İnterlökin-1 β (IL-1 β), Epidermal growth factor (EGF), Bcl-2 gibi survival faktörleri ve TGF- β , İnterlökin-6 (IL-6), androjen, bax, reaktif oksijen türleri, Tümör nekroz faktör (TNF) ve kaspazlar gibi atretojenik faktörleri görev alır (82). Bu moleküller arasında denge ile ölüm ve yaşam sınırı çizilir (81).

2.3.7. Rodentlerde Follikül Gelişiminin Kronolojisi

Rodentlerdeki ovaryan gelişim insanlardakine benzer ancak zamanlama farklıdır. Primordial germ hücreleri ileri embriyonik gelişimde oogonya oluşturmak üzere gonadlara göç eder. Doğumda, sıçan ovaryumu kordonlardan ve oogonyumlardan oluşur. Primordial folliküller doğumdan sonra, üçüncü günün sonunda oluşurlar (61). İlk follikül dalgasının antral folliküle kadar gelişimi üç haftayı bulur (65). İyi gelişmiş sekonder folliküller yedinci günde gözlenir. Minimal ovaryan hücre apoptozisi ancak 18. günde oluşur (61, 83). Bu dönemde erken antral folliküller de gözlenir. Puberta ya da ilk östrus 34. gün civarında meydana gelir. Düzenli östrus siklusu, 10-12. aylarda görülen düzensiz siklusların oluşumuna kadar devam eder. 12-15. ayların sonunda hayvanlar persistent siklusa girerler ve bunu persistent diöstrus ve ardından anöstrus takip eder. Follikül gelişimi 25 μ m'den (primordial follikül) 500-800 μ m (preovulatuvar follikül) çapa kadar, 60 günden fazla bir sürede ulaşır (yaklaşık 15 östrus siklusu). Primordial follikülün sekonder folliküle gelişim aşaması 30 günden uzun olabilir. Sekonder aşamadan ovulasyona kadar olan gelişim süresi $28 \pm 2-3$ gün olabilir (65). Bu

durumda erken follikül gelişimi, insanlardakine benzer şekilde rodentlerde de oldukça uzundur (Şekil 2.5).



Şekil 2. 5: Kemirici ve insanlarda prepuberta ve puberta aşamasında follikül gelişimi süreleri (65)

2.3.7.1. Östrus Siklusu

Farelerde genital siklus (östrus siklusu) postnatal 28-42. günlerde (84) vajinal açıklığın gözlenmesiyle, vajinal smear yöntemi kullanılarak takip edilmektedir. Östrus siklusu yaklaşık 4-5 gün sürer (85). Fare ve sıçanlarda, insanlardakine benzer olarak, genital siklus çeşitli hormonlar ile kontrol edilmektedir. Östrus siklusu, proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus olmak üzere başlıca dört fazdan oluşur. Proöstrus fazı 12 saat, östrus fazı 12-24 saat, metöstrus fazı 6-8 saat, diöstrus fazı ise 52-60 saat sürmektedir (86).

Östrus siklusu boyunca cinsiyet hormonlarındaki değişim vajinal epitelin histolojik görünümünde belirgin değişiklikler meydana getirir. İlk defa 1917 yılında Stockard ve Papanicolou tarafından, guinea domuzlarda başlayan östrus siklusu çalışmalarından bugüne kadar, farklı memeli türlerinde östrus aşamalarını belirlemek için kabul edilen yöntem 'vajinal smear'dir (87). Bu yöntem, vajinal duvardan sürüntü alınması ya da vajinal yıkama sonucu elde edilen preparatlar üzerinde, her bir faz ile ilintili hücre tiplerinin (epitelial hücre, kornifiye hücre, lökositler) histolojik olarak tanınması

esasına dayanır. Bu yöntem tekrarlayan sıkluslara ait gözlemler için güvenilir bir kayıt sağlamaktadır.

2.4. Ovaryum Fizyolojisi

Kadın hormonal sistemi, üç ayrı hormon grubundan oluşur:

1. Hipotalamik-serbestleştirici hormon ya da Gonadotropin-Serbestleştirici Hormon (GnRH).
2. Hipofiz ön lobu hormonları olan FSH ve LH. Bu hormonların her ikisi de hipotalamusta sentezlenen GnRH-serbestleştirici hormon etkisiyle salgılanırlar.
3. Ovaryum hormonları östrojen ve progesteron. Bu hormonlar hipofiz ön lobundan salınan FSH ve LH' ye yanıt olarak ovaryumlarda salgılanırlar.

Kadında aylık menstrüal döngü sürecinde, bu hormonların salınımları değişkenlik gösterir. Döngünün farklı evrelerinde salgılanma hızları farklıdır (88).

2.4.1. Ovaryumda Bulunan Hormonlar ve Reseptörleri

Ovaryumda östrojen ve progesteron olmak üzere iki ana grup hormon salgılanır.

2.4.1.1. Östrojen

17 β -östradiol, östron ve östrodiol doğal östrojenlerdir. Bunlar 18 karbonlu hormonlardır. Ovaryum folliküllerinin teka interna ve granuloza hücrelerinden, korpus luteum ve plasentadan salgılanır. Biyosentetik yolla androjenlerden oluşurlar. Dolaşımdaki androstenedionun aromatisasyonu ile de sentezlenirler. Aromataz, androstenedionun östrona, testosteronun ise östradiole dönüşümünü katalizleyen enzimdir. Dolaşımdaki östradiolün % 2'si serbest, % 60'ı albümine, % 38'i testosteronu da bağlayan gonadal steroid-bağlayıcı globuline (GBG) bağlıdır. Karaciğerde östrojenler okside edilir veya glukuronid ve sülfat bileşiklerine dönüştürülür. Bu bileşiklerin tümü diğer metabolitlerle birlikte idrarla atılır. Önemli miktarlarda safrayla salgılanır ve bağırsaklardan dolaşıma geri emilir.

Sıçanlarda östrojenin; östrojen reseptörü- α (ER- α) ve östrojen reseptörü- β (ER- β) olmak üzere iki alt tipi tanımlanmıştır (89, 90). Türler arasında yüksek benzerlik göstermekte olan ER- β , aynı zamanda farelerde ve insanlarda klonlanmıştır (91). Estradiolün ER- α 'ya bağlanma afinitesinin ER- β 'ya göre daha yüksek olduğu ve ER- α 'nın transkripsiyonal aktivasyonunu artırdığı belirtilmiştir (92, 93). Transkripsiyonel

aktivitedeki bu farklılığın yanı sıra ER- α ve ER- β aktive edici protein-1 bölgesinde tamamen zıt transkripsiyonel etkiye sahiptir (94). Ayrıca fare uterusunda ER- β 'nın; ER- α 'nın negatif düzenleyicisi olarak görev üstlendiği bildirilmiştir (95). Çeşitli sıçan dokularında değişik bağlanmaların ürünü olarak; ER- β mRNA'sının ER- β 1, ER- β 2, ER- β 1- δ 3, ER- β 2- δ 3, ER- β 1- δ 4 olmak üzere beş izoformu tanımlanmıştır. Yalnızca ER- β 1 ve ER- β 2 hem hormona hem de östrojen cevap elementine bağlanma yeteneğine sahiptir. Bunun yanında ER- β 2, ER- β 1 ile karşılaştırıldığında estradiyole bağlanma afinitesi daha düşüktür (96). ER- α , orta ve yüksek düzeylerde, uterus, testis, hipofiz, böbrek, epididim ve adrenalde; ER- β ise, yüksek düzeylerde ovaryum, prostat, akciğer, mesane, kemik ve beyinde eksprese olur (97).

2.4.1.2. Progesteron

Progesteron, korpus luteum, plasenta ve az miktarlarda follikülden salınan 21 karbonlu bir hormondur. Az miktarlardaki progesteron testis ve böbreküstü bezinin korteksinden de dolaşıma katılır. Dolaşımdaki progesteronun yaklaşık % 2'si serbest, %80'i albümine, % 18'i ise kortikosteroid bağlayıcı globuline bağlıdır. Yarı ömrü kısa olan progesteron, karaciğerde, pregnanediol'e dönüştürüldükten sonra glukuronik asitle birleştirilip idrarla atılır. İki ayrı promotor bölgesinde transkripsiyonla tek bir genden iki progesteron reseptörü izoformu üretilir. Bir genden iki protein izoformunun eksprese edilmesi fare, sıçan, insan gibi birçok türde görülür (98). İnsandaki Progesteron reseptörü-A (PR-A) izoformu Progesteron reseptörü-B'den (PR-B) N terminal uçtaki 164 amino asidin yokluğuyla ayrılır. PR-A 94, PR-B 114 kilodaltondur (99). PR-A etkinleştğinde PR-B'nin bazı etkilerini inhibe edebilir. Öte yandan, iki izoformun varlığının fizyolojik anlamı bilinmemektedir (97). İzoformların oranı gelişim boyunca üreme sistemi dokusuna ve östrus döngüsüne bağlı olarak değişir (100, 101). Diğer yandan, baskın olmayan folliküllerin granuloza hücrelerinde östrojen reseptörü belirlenmiş fakat progesteron reseptörü bulunmamıştır. Ovulasyondan sonra erken gebelik sırasında progesteron reseptörü, lüteinleşmiş granuloza hücrelerinde ve korpus luteum içinde kalmayı sürdürür. Menstrasyon döngüsü süresinde teka interna ve onu çevreleyen doku hücreleri östrojen reseptörü negatif, progesteron reseptörü ise pozitifdir (96). Östrojen reseptörünün iki alt tipi bulunur. Bunlar ER- β ve ER- α 'dır. Bunların imminohistokimyasal olarak yerleşimi, yeni doğan, erken doğum sonrası evrede, immatur ve yetişkin sıçanlarda belirlenmiştir ve farklı bölgelerde yerleşmiş oldukları

gözlenmiştir. ER- β , primer, sekonder ve olgun folliküllerin, granuloza hücrelerinin çekirdeklerinde gözlenmiştir. Atretik folliküllerde ise zayıf boyanma ya da hiç boyanmama gözlenmiştir. Tekal hücrelerde, luteal hücrelerde, germinal epitelde ve oositlerde çekirdekte özgün bir ER- β tutulumu belirlenmemiştir. Yeni doğan sıçan ovaryumunda ER- β ekspresyonu gözlenmemiştir. 5–10 günlük sıçan ovaryumlarında, primer ve sekonder folliküllerin granuloza hücrelerinde zayıf ER- β immünoaktivitesi gözlenirken, primordial folliküllerde saptanmamıştır. ER- α ise granuloza hücrelerinde hiç gözlenmezken germinal epitelde, interstitial hücrelerde ve tekal hücrelerde gözlenmiştir (102).

2.4.1.3. Follikül Stimülan Hormon

FSH hem erkekte hem de kadınlarda salgılanan, hipofiz kaynaklı, glikoprotein yapısında bir hormondur. FSH iki alt birimden oluşmuştur. α ve β alt birimleri bir miktar etkinlik gösterirlerse de tam fizyolojik etkinlik için iki alt birimin birlikte bulunması gerekir. İnsan FSH'sının yarı ömrü yaklaşık 170 dakikadır (97). Follikül uyarıcı hormon reseptörü (FSHR) ve luteinleştirici hormon reseptörü (LHR) karşılıklı etkileşimle çalışır ve üreme fizyolojisinde önemli rol oynar. FSHR temelde germ hücrelerinde bulunan hücre yüzey reseptörüdür ve G proteinleriyle etkileşim yoluyla etkisini gösterir. Bu reseptör, hücre zarını sarmal şeklindeki etki bölgesiyle yedi kez kesen bir proteindir. Hücre dışında amino terminal, hücre içinde ise karboksi terminal uca sahiptir (103). FSHR'nin ovaryumda granuloza hücrelerinde, testiste Sertoli hücrelerinde eksprese edildiği bildirilmiştir. Ovaryumdan salınan cinsiyet hormonlarının etkisiyle döngüsel değişiklikler gösteren tuba uterinaların, gonadotropinler için doğrudan hedef organ olduğu düşünülmemiştir. Ancak yapılan bir çalışmada; insan tuba uterinasında hem LHR'nin hem de reseptöre bağlanacak olan hormona ait genin eksprese edildiği bildirilmiştir. Bu durum gonadotropinler ve reseptörlerinin tuba uterinaların fizyolojik işlevine katılma olasılığını akla getirmiştir (104). Follikulogenezin primer evresi kadar erken bir dönemde FSHR sadece granuloza hücrelerinin üzerinde bulunurlar. Atrofiye ya da luteinize olana değin FSHR'ler sağlıklı folliküllerin granuloza hücreleri üzerinde ve her hücre başına reseptör sayısında çok az değişime uğrayarak kalırlar.

FSH, over folliküllerinin gelişimini uyaran gonadotropik bir hormondur. Over rezervinin azalması sonucu folliküler gelişim bozulur ve buna yanıt olarak kan FSH

düzeyi yükselir. İlk kez 21 yıl önce fertilitenin değerlendirilmesinde kullanılmış, daha sonra da IVF sikluslarında yaştan daha önemli bir belirleyici olduğu ortaya çıkmıştır (105).

Toner et al. (106) 1478 IVF siklusunda yaptıkları çalışmada gebelik ve siklus iptal oranlarını belirlemede bazal FSH değerlerinin yaştan daha değerli bir prediktör olduğunu bulmuşlardır. Siklusun 2 veya 3. günü bakılan FSH değeri 12 mIU/ ml ve üzerinde ise overin ovulasyon indüksiyonu veya kontrollü ovaryan hiperstimülasyona cevabı zayıf olacaktır. Bu üst sınır merkezlere göre değişebilmekle beraber en yüksek değer 25 mIU/ml kabul edilebilir. FSH değeri sikluslar arasında dalgalanmaktadır, bununla beraber en az bir kez yüksek bulunması zayıf over rezervi yönünden anlamlıdır ve sikluslar arası farklarla over cevabında değişiklik olmamaktadır (107). Tedavi öncesi değerlendirmede 3. gün FSH düzeyi 15 IU/I den az olanlarda %13,6, 25 IU/I veya daha yüksek olduğunda %10'dur. Son grupta devam eden gebelik oranı sadece %3,6'dır (108).

2.4.1.4. Anti-Müllerian Hormon

Transforming growth faktör- β ailesinden 140kDa büyüklüğünde dimerik glikoprotein yapıdadır (109). AMH salgılanmasından sorumlu olan gen 19p13.3 üzerinde bulunur (110). Erkeklerde testiküler gelişimin başlangıcından puberteye kadar Sertoli hücrelerinden, daha az miktarda dişilerde granuloza hücrelerinden doğumdan menapoza kadar sentezlenmektedir (5, 111). MIS olarak da bilinmektedir.

AMH'nun tek etkisinin reproduktif organlara olduğu düşünülmektedir. En önemli ve belirgin etkisi Müller kanalının regresyonunu sağlamaktır. Yokluğunda Müller kanalından Fallop tüpleri, uterus ve vajinanın üst 1/3'ü gelişmektedir (112).

AMH ovaryen granuloza hücrelerinden preantral ve küçük antral folliküllerden, pitüiter FSH'nın etkisiyle dominant follikül için seçilebilecek büyüklüğe ve farklılaşmaya ulaşılıncaya kadar sentezlenmektedir. İnsanlarda bu olay follikül 4-6 mm büyüklüğe ulaşılıncaya kadar gerçekleşmektedir. AMH teka ve atretik folliküllerden sentezlenmemektedir (113).

Son çalışmalarda preantral, geç preantral ve preovulatuvar folliküllerde AMH mRNA seviyelerinin oositin gelişim evreleriyle paralel olarak düzenlendiği, AMH'nun intra ve interfolliküler koordinasyonda önemli görevleri olduğu gösterilmiştir (114). AMH

sentezini düzenleyen mekanizmalar tam olarak bilinmekle beraber granuloza hücreleri üzerinde AMH reseptörlerinin tespit edilmesi ovaryen fizyolojide rolü olduğunu düşündürmektedir (115).

AMH'nun serine theronine kinaz reseptörlerini kullanan iki farklı reseptörü bulunmaktadır. Anti-müllerian hormon reseptörü 2 (AMHR-2) Müller kanalı mezenşiminde bulunmaktadır. Bu reseptörün fonksiyon bozukluğu tıpkı AMH yokluğunda olduğu gibi, kalıcı Müller kanalı sendromuna yol açabilmektedir. Sıçanlarda AMHR-2 granuloza ve teka hücrelerinde de gözlenmiştir (116). Anti-müllerian hormon reseptörü 1'in (AMHR-1) özellikleri ve işlevi günümüze kadar tam olarak tespit edilememiştir. Primordial folliküllerin gelişmesi negatif ve pozitif faktörlerin etkisi altındadır. AMH erken folliküler gelişim üzerine negatif etkileri olan bir faktördür. Homozigot AMH knockout dişi sıçanlarda daha fazla sayıda büyüyen preantral ve küçük antral follikül saptanmış ancak bu sıçanlarda primordial follikül stoklarının daha erken yaşta tükendiği gözlenmiştir.

AMH etkilerinin direk primordial hücreler üzerinden olup olmadığını göstermek için yapılan bir çalışmada; AMH bulunmayan sıçan overini AMH bulunan yapay ortama bıraktıktan sonra yapılan incelemede büyüyen follikül sayısının %50 azaldığı, AMH'nun primordial oositleri direk olarak etkilediği gözlenmiş ve AMH'nun primordial follikül gelişiminin aktivasyonunu, preantral folliküllerin büyümesini azalttığı sonucu çıkarılmıştır (117).

In vivo ve in vitro çalışmalarda AMH eksikliğinde folliküllerin FSH'ya daha duyarlı olduğunu göstermektedir. AMH'dan yoksun farelerde düşük ve yüksek FSH konsantrasyonları ile yapılan çalışmalarda AMH mevcut farelerle karşılaştırıldığında hem sayısal hem de gelişimsel olarak daha iyi yanıt alınmış olduğu gözlenmiştir (118). Clemente ve ark. (119) eksojen AMH'nun kültür ortamında granuloza hücrelerinde aromataz aktivitesini ve LH reseptör sayısını azalttığını göstermişlerdir.

AMH insan granuloza-luteal hücrelerin proliferasyonunu bloke etmekte ve folliküler sıvıda konsantrasyonu granuloza hücrelerindeki mitoz indeksi ile ters orantılı bulunmaktadır (120). Hayat boyunca kadınlardaki AMH düzeyi erkeklerden daha düşük düzeydedir. Yeni doğanda AMH seviyeleri tespit edilemeyecek kadar düşüktür, 2-4 yaşlarında hafif yükselme olur sonrasında ergenliğe kadar stabil seyretmektedir. Yaş

ilerledikçe folliküler rezervin azalmasına bağılı olarak serum düzeyi düşer, menapozda çok düşük veya tespit edilemeyecek düzeye geriler (121).

Serum AMH menstural siklus sırasında değişim göstermemektedir. Bu özelliği diğer over rezerve testlerinden farklı olarak siklusun herhangi bir gününde değerlendirilme yapma avantajı sağlamaktadır (122). Minimal fluktuasyonlar siklik olmayan küçük follikül büyümesinden dolayı oluşabilmektedir. Ovaryen follikül havuzunun azalması ve oosit kalitesinin düşmesi nedeniyle yaşla beraber üreme fonksiyonları azalmaktadır. AMH son zamanlarda over rezervini göstermekte kullanılmaya başlanmıştır. Spontan menapoz sonrasında veya ooferektomi sonrasında AMH düzeylerinin tespit edilemeyecek düzeylere düşmesi AMH'un tamamen over kaynaklı olduğunu göstermektedir (121, 122).

Siklusun üçüncü gününde saptanan AMH seviyeleri yaşla beraber düşmektedir. La Marca et al. (123) yaptığı çalışmada 1-7 yıl boyunca takip edilen olgularda AMH seviyelerinin ortalama %38 düştüğünü buna karşın aynı sürede antral follikül sayısı, bazal FSH düzeyi ve İnhibin B düzeylerinde değişiklik olmadığını saptamışlardır. Over rezervini gösteren diğer belirteçlere oranla yaşa bağılı oosit/follikül rezervini daha iyi gösterdiği düşünülmektedir ve yaş arttıkça diğer parametrelerde değişiklik olmadan ilk olarak AMH düzeyleri azalmaktadır (124).

AMH düzeyleri kontrollü ovaryen stimülasyon sırasında azalmaktadır (122). Bunun nedeninin FSH'nun AMH sekresyonuna negatif etkisi olduğu düşünülmektedir. Baarends ve ark. (113) çalışmasında, sıçanlarda FSH'nın AMH ve AMHR-2 ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. Alternatif olarak suprafizyolojik estradiol seviyelerinin overde AMH ve AMHR-2 mRNA sentezini azaltmasının da AMH seviyelerinin azalmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Yine başka bir çalışmada kontrollü ovaryen hiperstimülasyon sırasında AMH seviyeleri küçük antral follikül sayısı ile korelasyon göstermekte ve multiple folliküler maturasyon sonrası küçük antral follikül sayısında azalmaya bağılı olarak ve daha büyük folliküllerden oldukça az salgılanması nedeniyle azalmakta olduğu sonucuna ulaşılmıştır (125). Folliküller antral follikül gelişinceye kadar gonadotropinlerden bağımsız olarak gelişmektedir (126). Hipofizektomize, hipopituitarizm olan olgularda antral follikül basamağına kadar gelişim olmaktadır. AMH sekonder amenore tanısında hipogonadotropik hipogonadizm ile hipergonadotropik hipogonadizm ayrımında yardımcı olabilmektedir. Gebelikte

gonadotropin düzeylerinin oldukça düşük olmasına rağmen AMH düzeylerinde değişiklik olmadığı görülmektedir. AMH plasentadan sentezlenmemekte, gebelik boyunca düzeyleri değişmemektedir (127).

Deney grubunda bulunan PCOS'lu hastalardaki AMH düzeyleri, kontrol grubundaki hastaların AMH düzeylerine göre artmış bulunmaktadır. PCOS tanımlanmasında sensitivitesi %92, spesifitesi %67 olarak bulunmuştur (7). Literatürde tanısal kriter olarak follikül sayısının yerine kullanılabileceğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır (128). Amenoreik ve oligomenoreik PCOS hastaları karşılaştırıldığında, amenoreik grupta AMH seviyelerinin oligomenoreik gruptan anlamlı şekilde yüksek olduğu tespit edilmekte ve AMH'nın anovulasyon etiopatogenezinde rolü olduğu düşünülmektedir (122).

AMH sadece granuloza hücrelerinden sentezlenmektedir, bu nedenle granuloza hücreli tümörlerde (GCT) marker olarak kullanılabilir. GCT saptanan olguların %76-93'ünde yüksek bulunmuştur (129). AMH, GCT takibinde estradiol ve inhibine göre daha iyi bir markerdir, özellikle rekürrenslerin 10-20 yıllık zaman dilimlerinde ortaya çıktığı GCT'lerde rekürrenslerin erken tesbitinin sağ kalım süresini arttırdığı düşünülmektedir (130).

2.5. Endokrin Bozucular

Endokrin sistemin gelişimi ve fonksiyonunu değiştiren, ekzojen madde veya madde karışımlarıdır. Bu maddeler hormonların üretim, salınım, bağlanma, taşınma, aktivite, yıkım ve vücuttan atılımları üzerine etki etmektedirler. Bu maddelerin çoğu yağda eriyerek yağ dokusunda birikerek veya yıkılıp zararsız hale getirilmeleri işlemi zor olduğu için vücutta uzun süre kalıp zararlı etkilerde bulunabilirler (11). Endokrin bozucuların insan sağlığı üzerine etkileri incelendiğinde, özellikle üreme sistemi ve tiroidin görevlerini etkilemekle birlikte diğer birçok etkilerinin de olduğu tespit edilmiştir (12). Endokrin bozucuların zararlı etkileri açısından, yaşamın hangi döneminde maruz kalındığı önem taşımaktadır (14). İntrauterin yaşamda endokrin bozuculara maruz kalınması, üreme organlarında ciddi ve geri dönüşümü olmayan patolojilere neden olabilir. Yeni doğan dönemi, organizmanın endokrin bozuculara karşı en savunmasız olduğu dönemlerden biridir. Androjen etkili ilaç verilen yeni doğan sıçanlarda testis ağırlığının ve steroid üretiminin olumsuz etkilendiği tespit edilmiştir

(16). Endokrin bozucuların oluşturacağı olumsuz etkide maruz kalınan doz ve etkilenme süresi de ortaya çıkacak etki için önemli faktörlerdendir. Etkilenme süresi uzadıkça veya doz arttıkça oluşabilecek olumsuz etki daha da şiddetli olabilmektedir (11). Endokrin bozucuların çoğu, östrojenik etkili olmakla birlikte antiöstrojenik ve antiandrojenik etkili olan bozucular da bulunmaktadır. Ayrıca gonadotropin düzeylerini değiştirerek ya da sıklıkla reseptörlerini uyararak veya engelleyerek etki etmektedirler (11, 12).

Pestisitler tarımda zararlılara karşı yoğun kullanılan ilaçlardır. Bu ilaçlar aynı zamanda insan sağlığını da etkilemektedir. Genel olarak hiçbir pestisit güvenli olarak kabul edilmez. MXC meyve, sebze ve bahçelerdeki böceklerle karşı yaygın olarak kullanılan organoklorür bir pestisittir (20). MXC canlıda östrojeniktir ve östrojen reseptörü için az afiniteye sahiptir (8, 21). Cummings (8), MXC'nin hem dişi hem de erkek üreme sistemi üzerine toksik etki gösterdiğini; üreme organları, aksesuar bezler, cinsel olgunlaşma ve üreme fonksiyonlarına etkili olan hormon düzeylerini bozduğunu, histopatolojik değişiklikler ve endokrin parametrelerde değişikliğe neden olduğunu bildirmektedir. Aynı zamanda metoksiklorun erkek üreme sistemi üzerindeki istenmeyen etkileri tanımlanmıştır ki bunlar, keçilerin epididimal spermelerindeki antioksidanların azalması (22), koyun ve sığanlarda testis, prostat ağırlığı ve spermatogenez azalması gözlenmiştir (23-25).

Sentetik endokrin bozuculardan bazılarının organlarda apoptotik etki yaptığı gösterilmiştir. Özellikle gonadlarda oluşan apoptotik hücre ölümünün en önemli nedenlerinden birinin oksidatif stres olduğu ileri sürülmektedir. Normal şartlarda antioksidan enzimler, organizmada oluşan reaktif oksijen radikallerini zararsız hale getirmektedir. Ancak, endokrin bozucuların çok değişik mekanizmalar ile antioksidan enzimleri inhibe ettiği ve ortamda reaktif oksijen radikallerinin artmasıyla apoptotik hücre ölümüne neden oldukları düşünülmektedir. Nguyen et al. (131) nitrik oksidin DNA'da pürin ve pirimidinin deaminasyonuna neden olarak DNA zincirinde kırılma ve mutasyonlarda artışa neden olabildiğini saptamışlardır. Nitrik oksidin tetiklediği DNA hasarından sonra apoptozis sürecinin başladığı ileri sürülmektedir (132). Ayrıca nitrik oksit, oksidatif DNA hasarını uyarmakla birlikte DNA tamir mekanizmalarını inhibe ederek apoptozise neden olmaktadır (133). Apoptotik hücre ölümünde kalsiyum-kalmodulin bağımlı protein kinaz-fosfataz sistemi, kalsiyum bağımlı endonükleaz veya

membran lipit peroksidasyonunun uyarılmasının da DNA kırılması ve hücre ölümüne neden olan mekanizmalar olabileceği ileri sürülmektedir (132). Organoklorin pestisid olan metoksiklor ile yapılan bir çalışmada, reaktif oksijen radikallerinin arttığı ve overlerde antral folliküllerin büyümesinde yavaşlama ve atrezinin nedeninin oksidatif stres olduğu ileri sürülmüştür (25).

Yapılan bir çalışmada (134), endokrin bozucuya maruz kalınan yaşa göre çocuklarda; erken veya geç ergenlik, vajina kanseri, kanser sıklığında artış, sperm sayısında azalma, testosteron düzeyinde azalma, üreme sistemi gelişim sorunları, obezite, tiroid bozuklukları, merkezi sinir sisteminin gelişim bozuklukları, düşük doğum ağırlığı, öğrenme problemleri, zekâ düzeyinde azalma görülebildiğini, erişkinlerde ise meme kanseri, endometriyozis, embriyo ve fetal ölümler, malformasyonlu çocuklar, testis kanseri, prostat kanseri, sperm sayısında azalma, sperm kalitesinde ve testosteron düzeyinde azalma, tiroid hormon düzeylerinde değişiklikler görülebildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca zehirli maddeler primordial folliküllerin yok olması ve follikül havuzunun yenilenmemesi gibi nedenlerle kalıcı kısırlığa neden olabilir. Kısa süreli toksik madde uygulanması primordial folliküllerden çok primer ve preantral follikülleri etkiler ve geçici kısırlığa yol açar (135).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Dokuların Elde Edilmesi

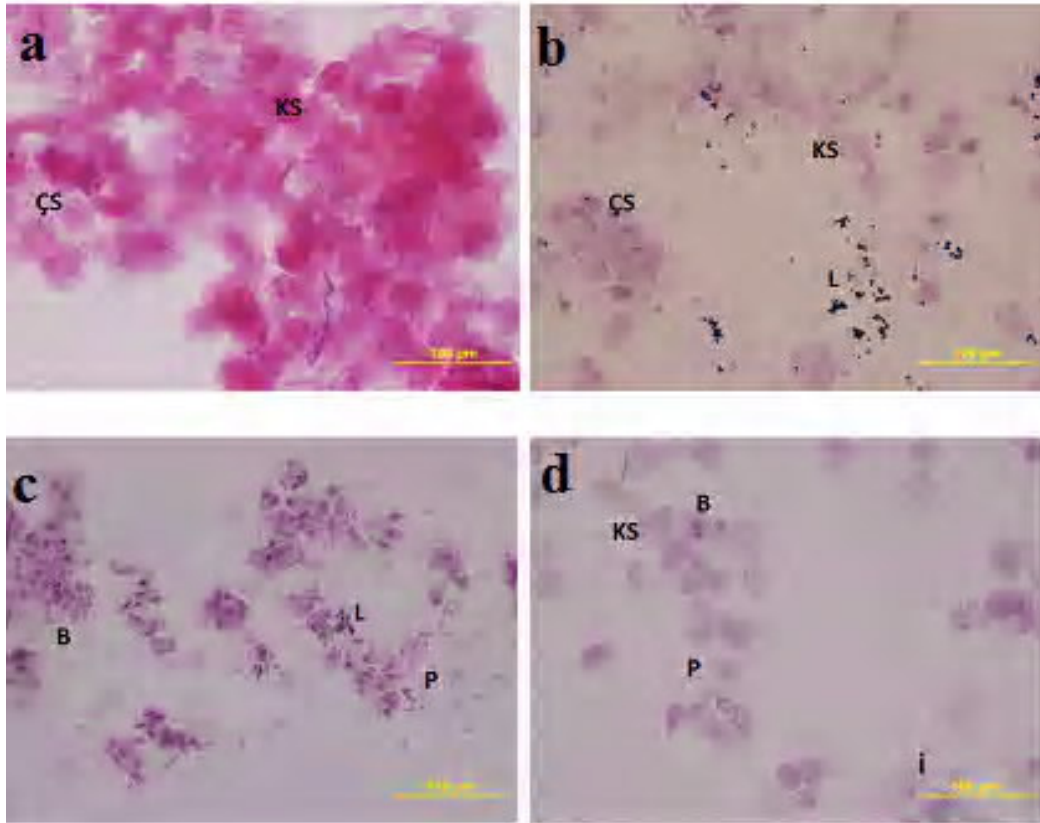
Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı 13/ 10/ 2010 tarih ve 10/85 nolu Etik Kurul onayı doğrultusunda Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji- Embriyoloji Anabilim Dalı'nda planlandı ve uygulandı. Çalışmanın deney aşaması Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde (DEKAM) gerçekleştirildi. Bu çalışma, T.C. Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklendi (Proje no: TSD. 11.3449). Tüm prosedürler etik kurallara uygun bir şekilde yapıldı.

Çalışmada DEKAM'da yetiştirilen 35 günlük 90-150 gr ağırlığında Wistar albino türü 36 adet dişi sıçan kullanıldı. Kafesler içinde tutulan sıçanlara günün normal düzeninde 21 ± 3 °C ve 12 saatlik aydınlık/karanlık ortamında su ve besin ihtiyaçları sağlandı. Çalışmada kullanılan denekler rastgele 4 gruba ayrıldı.

Deneye başlamadan önce sıçanların ağırlıkları ve östrus döngüleri belirlendi. Östrous döngüsünü belirlemek için sıçanlar 25 günlük iken vaginal smear ile kontrol edilmeye başlandı. Östrus, metaöstrus, diöstrus ve proöstrus olan 4 devre 2 tam siklus boyunca takip edildi. Östrous döngüsü daha önce Cooper et al. (136) belirlediği ölçütlere göre değerlendirildi. Bu işlem için, plastik pipet ile vajina içine serum fizyolojik verilerek yıkandı, vaginal hücreler ışık mikroskobu ile standart morfolojik ölçütlere göre analiz edildi.

Östrus süresi yaklaşık 10-14 saat sürmekteydi ve dişi sıçanlar diğer dönemlere göre bu dönemde daha hareketli ve hırçın davranışlar göstermekteydi. Vajinal duvar diğer siklusa göre daha kuru olarak gözlemlendi. Mikroskopik olarak hücreler incelendiğinde

%80-90'nını oluşturan kornifiye süperfisiyal hücreler epitelyal yığınlar şeklinde yerleşim gösteriyordu, hücrelerin yaklaşık %10-20'sini çekirdekli süperfisiyal hücreler oluşturunuyordu. Genel görünüm %90 oranında asidofil özellikte idi ve hiç lökosit gözlenmedi (Şekil 3.1a). Metöstrus dönemi oldukça uzundu ve yaklaşık bir gün sürdü. Çekirdekli ve kornifiye hücrelerin yanı sıra bol miktarda lökosit gözlemlendi. Preparat genel itibari ile bazofil özellik gösteriyordu (Şekil 3.1b). En uzun dönem diöstrus olarak gözlemlendi ve diöstrus dönemi yaklaşık 3 gün olarak belirlendi. Bol miktarda lökosit gözlemlendi. Parabazal ve bazal hücreler yaklaşık hücrelerin %90 'ını oluşturunuyordu ve bu hücrelerin arasında az miktarda intermediyer hücreler yer alıyordu (Şekil 3.1c). Proöstrus dönemi yaklaşık olarak 10-12 saat sürdü ve mikroskopik olarak hücrelerin %40-50 çekirdekli süperfisiyal hücreler, %30-40 inter mediyer hücreler ve %15-20 bazal hücrelerden meydana gelmişti. Genel anlamda yapı asidofilikti ve çok az sayıda lökosit gözlenmekteydi (Şekil 3.1d).



Şekil 3. 1: Östrous siklusu; a) östrus, b) metöstrus, c) diöstrus d) proöstrus. Kornifiye süperfisiyal hücre (KS), çekirdekli süperfisiyal hücre (ÇS), parabazal (P), bazal hücreler (B), lökosit (L), inter mediyer hücreler (İ) (X40,HE)

Östrous döngüsünün düzenli olduğu belirlenen hayvanlara, gruplara göre 20 gün boyunca belirlenen dozlarda MXC (Sigma[®] 36161) intraperitoneal uygulaması yapıldı. Birinci deney grubuna 10 ml susam yağı içinde 8 mg/kg dozda MXC (düşük doz), ikinci deney grubuna 16 mg/kg dozda MXC (orta doz) ve üçüncü deney grubuna 32 mg/kg dozda MXC (yüksek doz) verildi (28). Kontrol grubuna da aynı ölçüde serum fizyolojik enjeksiyonu intraperitoneal olarak yapıldı. Çalışmada MXC uygulamasının 10. gününden itibaren yeniden östrus döngüsü kontrolü yapıldı. 20 günün sonunda sıçanların vücut ağırlığı tekrar ölçüldü, karın kesisi yapılarak vena cava inferiordan kan örnekleri toplandı ve sonra sakrifiye işlemi gerçekleştirildi.

İlk olarak inferior vena cavadan gelen kanlar toplandı ve 4000 devirde 15 dk santrifuj edilip serumları ayrıldı. Elde edilen serumlardan Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemi kullanılarak AMH (Cusabio Biotech Co., LTD. MIS/AMH ELISA Kit) ve FSH (Endocrine Technologies ING.USA Rodent FSH) değerlerine bakıldı.

MIS/AMH ELISA CUSABIO CSB-E11162r adlı ticari kit kullanılarak AMH düzeyi ölçüldü. Bu yöntem, enzimatik immunassay esasına dayanmaktadır. Anti-MIS/AMH antikorlarıyla kaplı kuyucuklarda standartlar, kontroller ve serum örnekleri inkube edildi. Yıkama aşamasının ardından, kuyucuklar ikinci bir biotinle işaretli anti-MIS/AMH dedeksiyon antikoru ile muamele edildi. İkinci bir inkubasyon ve yıkama aşamasından sonra kuyucuklar streptavidin-horseradish peroksidaz (HRP) ile inkube edildi. Üçüncü yıkama aşamasının ardından kuyucuklara substrat (tetrametilbenzidin) eklendi. Asidik stop solusyonunun ilavesiyle reaksiyon durduruldu ve absorbans 450 nm’de mikropate okuyucu (TECAN, sunrise) ile ölçüldü.

Aynı şekilde ELISA yöntemiyle, ENDOCRINE TECHNOLOGIES, INC. USA Rodent FSH ELISA ticari kiti kullanılarak, serumlarda ölçüm yapıldı. Bu test immunassay prensibine dayanmaktadır. FSH konsantrasyonu bilinmeyen serum örnekleri (işaretli olmayan antijen) ve konjuge FSH (işaretli antijen) kuyucuklara eklendi. Yıkama aşaması ile bağlı olmayan serbest antijenler uzaklaştırıldı. Elde edilen sonuçlar 450 nm’de plate okuyucu (TECAN, sunrise) ile ölçüldü. AMH ve FSH için elde edilen ELISA değerleri curve exert programı ile hesaplanarak istatistik değerlendirmesi yapıldı.

Rutin histolojik takip için her iki ovaryum çıkarılarak, ağırlıkları tartılıp, serum fizyolojik ile yıkandı. Hayatlarına son verilen sıçanlardan alınan ovaryumlar %4'lük formaldehit solüsyonlarında tespit edildi. Tespit solüsyonlarında 24 saat bekleyen ovaryumlar uygun doku hazırlama metodu ile takip edildi (Tablo 3.1).

Tablo 3. 1: Işık mikroskobu doku hazırlama tekniği

Sıra	Yapılan işlem	Süre
1.	Musluk suyu	1 gece
2.	%50 Alkol	1 saat
3.	%70 Alkol	1 saat
4.	%80 Alkol	1 saat
5.	%96 Alkol	1 saat
6.	Absolü Alkol	1 saat
7.	Absolü Alkol	1 saat
8.	Absolü Alkol	1 saat
9.	%50 Ksilen- Alkol	10 dakika
10.	%70 Ksilen-Alkol	10 dakika
11.	Ksilen	20 dakika
12.	Ksilen	20 dakika
13.	Ksilen	20 dakika
14.	Eriyik parafin	1 gece
15.	Bloklama	

Bir gece akan musluk suyunda bırakılan ovaryumlar artan alkol serilerinden geçirilerek sudan kurtarıldı, ksilol ile şeffaflandırıldıktan sonra parafine gömülerek bloklandı. Hazırlanan parafin bloklarından 5 µm kalınlığında toplam 200 µm seri kesitler alındı. Standart histolojik yöntemler kullanılarak ksilol ile kesitlerin parafini uzaklaştırıldı ve azalan dereceli alkol serilerinden geçirilip sulandırıldı. Genel histolojik yapıyı görmek amacıyla kesitler Hematoksilen-eozin (H+E) ve Masson's trikrom ile boyandı (Tablo 3.2 ve 3.3).

Tablo 3. 2: Hematoksilen-Eozin boyama tekniği

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

Tablo 3. 3: Masson' s trikrom boyama tekniği

Sıra	Yapılan İşlem	Süre
1.	Etüv (60 °C)	1 saat
2.	Ksilen I	20 dakika
3.	Ksilen II	20 dakika
4.	Ksilen III	20 dakika
5.	Absolu Alkol I	20 dakika
6.	Absolu Alkol II	20 dakika
7.	%96 Alkol	20 dakika
8.	%80 Alkol	20 dakika
9.	%70 Alkol	20 dakika
10.	%50 Alkol	20 dakika
11.	Akarsu	5 dakika
12.	Hematoksilen	8 dakika
13.	Akarsu	5 dakika
14.	%1 'lik asit alkol	1-2 saniye
15.	Akarsu	5 dakika
16.	Asit fuksin	5 dakika
17.	Distile su	2-3 dakika
18.	Fosfomolibdik asit	5 dakika
19.	Kurutma	
20.	Anilin blue	2-5 dakika
21.	Distile su	2-3 dakika
22.	%1 'lik asetik asit	2 dakika
23.	%50 Alkol	10 dakika
24.	%70 Alkol	10 dakika
25.	%80 Alkol	10 dakika
26.	%96 Alkol	10 dakika
27.	Absolu Alkol I/II	10 dakika
28.	Ksilen I/II	20 dakika
29.	Kapatma	20 dakika

3.2. İmmunohistokimya

Deneydeki ovaryum dokularında MXC'nin AMH üzerine etkisini belirlemek için avidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile immunohistokimya uygulandı. Bir gece 60°C'de tutulan, önce ksilen sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edilen kesitler daha sonra fosfat buffer saline (PBS) (amresco code: E404-100TABS) ile 3 defa 5'er

dakika yıkandı. Daha sonra antijen geri kazanımı için %10'lık EDTA ile mikrodalga fırında 600W'de 3X5 defa kaynatılan kesitler 20 dakika oda ısısında aynı tampon solüsyon içinde bekletildi. PBS ile tekrar yıkanan kesitler Goat ImmunoCruz™ Staining System boyama kiti (Santa Cruz: 2053) prosedürüne göre gerçekleştirildi. Tekrar PBS ile yıkanan kesitlere antijenik alanların dışında kalan bölgelerin kapatılmasını sağlamak için oda sıcaklığında 20 dakika Blok serum uygulandı. Hemen ardından kesitler fare dokularına özgüllük gösteren keçi poliklonal birincil antikor AMH (Santa Cruz Biotechnology MIS (C-20): sc-6886) ile 1 gece +4°C'de bekledikten sonra 20 dakika inkübe edildi. Negatif kontrol olarak, birincil antikor yerine Negatif Kontrol kullanıldı. Yıkama işleminden sonra kesitler fare dokularına bağlanabilen biotin-sekonder antikor ile 30 dakika inkübe edildi ve ardından yıkama işlemi tekrarlandı. Daha sonra HRP-Streptavidin enzim ayracı ile 30 dakika muamele edilen kesitler yıkanarak immunreaktiviteyi görünür hale getirmek için diaminobenzidin (DAB) özelliği gösteren kitteki peroksidaz substrat ile 1-10 dakika muamele edildikten sonra 5 dakika deiyoinze H₂O ile yıkandı. Gill hematoksilin ile karşıt boyanan kesitler birkaç kez deiyoinze H₂O ile yıkandı. Son olarak artan alkol serileri ile suyu uzaklaştırılarak ksilenden geçirilen kesitler kapatma ortamı (Entellan®, Merck) ile kapatılarak ışık mikroskopunda incelendi. Boyama metodu Tablo 3.4 'te ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 3. 4: İmmünohistokimya boyama tekniği

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Etüv (60 °C)	1 saat	18	PBS	3x5 dk
2	Ksilen I	5 dk	19	HRP-Streptavidin	10 dk
3	Ksilen II	5 dakika	20	PBS	3x5 dk
4	Ksilen III	5 dakika	21	DAB kromojen	3-5 dk
5	Absolü Alkol	10 dk	22	Distile su	Yıka
6	%96 Alkol	10 dk	23	Hematoksilen	3-4 dk
7	%80 Alkol	10 dk	24	Musluk suyu	5 dk
8	%70 Alkol	10 dk	25	Distile su	Yıka
9	Distile Su	3 kez yıka	26	%70 Alkol	5 dk
10	%10 EDTA	10-20 dk	27	%80 Alkol	5 dk
11	PBS	2x5 dk	28	%96 Alkol	5 dk
12	Peroxidase Block	5 dk	29	Absolü Alkol	5 dk
13	PBS	3x5 dk	30	Ksilen I	5 dk
14	Normal Serum	20 dk	31	Ksilen II	5 dk
15	Primer Antikor	1 gece +4° C	32	Ksilen III	5 dk
16	PBS	3x5 dk	33	Kapatma	
17	Sekonder Antikor	30 dk			

Boyama sonucunda hem çekirdeği hem de çekirdekçiği görülen primordial, primer, preantral, sekonder ve tersiyer folliküllerin çap ve alan ölçümleri anaySIS LS Research-5 programı kullanılarak yapıldı. Ayrıca epitel ve t. albuginea kalınlık ölçümü anaySIS LS Research-5 programı kullanılarak Masson's trikrom ile boyanmış kesitlerde yapıldı.

Folliküller şu ölçütlere göre değerlendirildi; tek sıra yassı granuloza hücresi ve oosit içeriyorsa primordial follikül, bir sıra kübik granuloza hücresi içeriyorsa primer follikül, granuloza hücre tabakası birden fazla ve antral boşluk bulunmuyorsa preantral follikül

ve 4–5 sıra granuloza hücre tabakası bulunan ve içinde antrum bölgeleri yer alan folliküllerde antral follikül olarak adlandırıldı. Ayrıca bazı durumlarda follikül hiç antral alan içermese de granuloza hücre katmanı ≥ 5 , bozulmuş granuloza hücreleri ve oosit içeriyorsa atretik follikül kabul edildi (137). Belirlenen ölçütlere göre değerlendirilen folliküller, OLYMPUS BX51 mikroskobu kullanılarak görüntülendi. Germinal epitel ve t. albuginea kalınlığının ölçümü ve primordial, primer, preantral ve sekonder folliküllerin çap ve alan ölçümleri X40 büyütme de, tersiyer folliküllerin çap ve hacim ölçümleri ise X20 büyütmede elde edilen görüntülerde yapıldı. Epitel ve t. albuginea kalınlık ölçümleri 100 farklı alanda, çap ölçümleri 50 farklı follikül üzerinde ve alan ölçümleri 6 farklı follikül üzerinde gerçekleştirildi. Granuloza hücrelerinden salgılanan AMH'nun immun reaktivitesini belirlemek için 20 farklı follikülde Image J programı kullanılarak yapıldı.

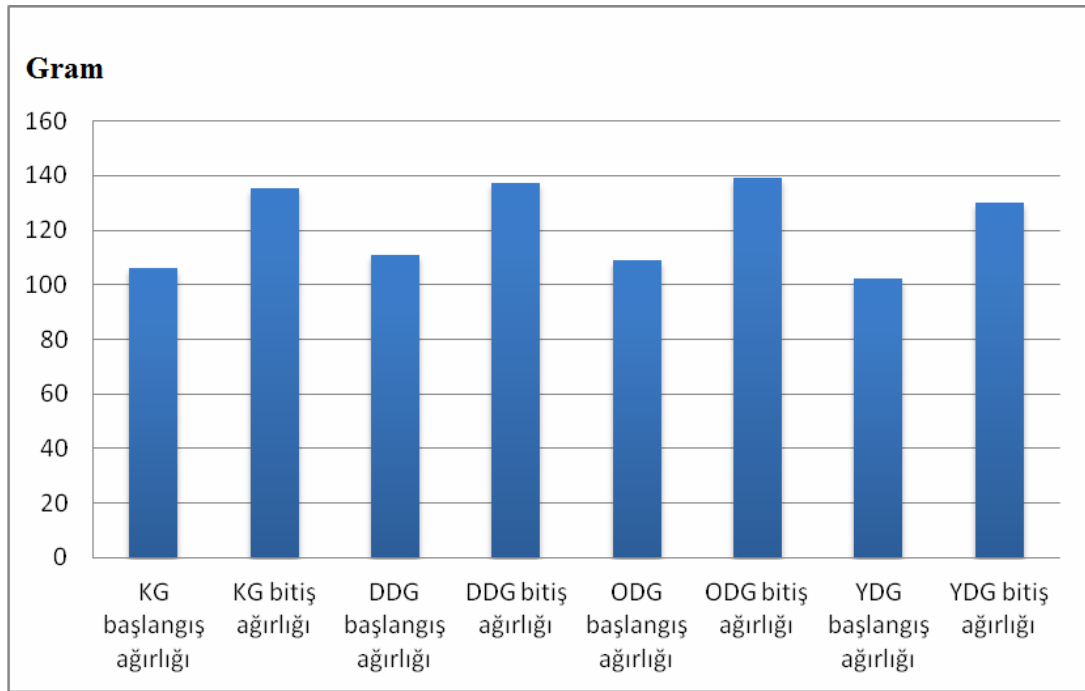
3.3 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel çözümler için SPSS 20.0 istatistik programının kullanıldığı bu çalışmada; deneyde kullanılan sıçanların deney başlangıç ve bitimindeki vücut ve ovaryum ağırlıkları, ovaryum dokularında folliküllerin çapları, yüzey epiteli ve tunika albugineanın kalınlığının karşılaştırılması, ovaryumdaki folliküllerin alan hesaplaması, kandaki AMH ve FSH düzeyleri ve Image J programı kullanılarak elde edilen AMH ekspresyonuna ait verilerin karşılaştırılması, fark (anlamlılık) testlerinin yapılması ve değerlendirilmesi amacıyla Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

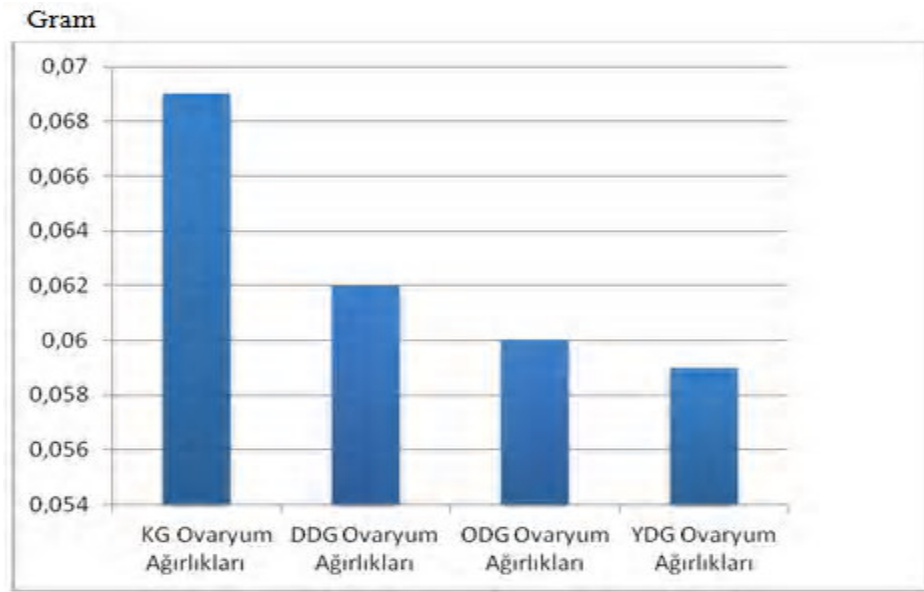
Çalışmada kullanılan deney hayvanlarının davranışları çalışma boyunca takip edildi. Deneysel çalışmada uygulanan yöntem ve enjeksiyonların davranışları üzerine etkilerinin olup olmadığı değerlendirildi. Gözlemler sonucunda, yöntemlerin ve MXC uygulamasının deneyde kullanılan sıçanlar üzerinde herhangi bir davranışsal değişime yol açmadığı saptandı. Yalnızca susam yağı içinde çözündürülerek enjekte edilen MXC'ye maruz kalan deri bölgelerinde yanık alanları gözlemlendi. Kontrol ve deney grubundaki sıçanların günlük su ve besin ihtiyaçlarını benzer şekilde tükettiği belirlendi.

Deneyin başladığı ilk gün sıçanlar rastgele 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki sıçanların başlangıçtaki ortalama vücut ağırlığı $106,3 \pm 4,9$ gr, MXC'nin düşük dozda verildiği grubun başlangıçtaki ortalama vücut ağırlığı $110,8 \pm 9,1$ gr, orta dozda verilen grubun başlangıç ortalama ağırlığı $109,2 \pm 8,5$ gr ve yüksek dozda verilen grubun başlangıçtaki ortalama vücut ağırlığı $102,2 \pm 7,49$ gr olarak ölçüldü. Yirmi gün MXC uygulamasının sonunda ortalama vücut ağırlıkları kontrol grubunda $135,1 \pm 7,3$ gr, düşük doz grubunda $137,3 \pm 7,7$ gr, orta doz grubunda $139,2 \pm 5,3$ gr ve yüksek doz grubunda $130,2 \pm 14,9$ gr olarak ölçüldü (Şekil 4.1). İstatistiksel olarak vücut artış oranları karşılaştırıldığında, kontrol grubu ve deney grupları arasında ($p < 0,05$) anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü.



Şekil 4. 1: Gruplar arasında deney başlangıç ve bitişindeki ortalama vücut ağırlık ölçümleri. Kontrol grubu (KG), düşük doz MXC verilen grup (DDG), orta doz MXC verilen grup (ODG), yüksek doz MXC verilen grup (YDG)

MXC uygulandıktan sonra günün ilk yarısında sıçanlar sakrifiye edildi ve ovaryum ağırlıkları ölçüldü. Kontrol grubundaki hayvanların ortalama ovaryum ağırlığı $0,070 \pm 0,005$ gr, 8 mg/kg dozda MXC verilen deney grubunun ortalama ovaryum ağırlığı $0,063 \pm 0,005$ gr, 16 mg/kg dozda MXC verilen orta doz grubunun ortalama ovaryum ağırlığı $0,061 \pm 0,005$ gr ve 32 mg/kg dozda MXC verilen deney grubunun ortalama ovaryum ağırlığı $0,060 \pm 0,005$ gr olarak belirlendi. Kontrol grubu ile düşük, orta ve yüksek doz gruplarının ortalama ovaryum ağırlıkları karşılaştırıldığında, MXC (Şekil 4.2) uygulaması sonucunda ortalama ovaryum ağırlıklarının düştüğü ve istatistiksel olarak anlamlı farkın ortaya çıktığı görüldü ($p < 0,05$).



Şekil 4. 2: Kontrol ve deney grupları arasında ovaryum ağırlığının karşılaştırılması. Kontrol grubu (KG), düşük doz MXC verilen grup (DDG), orta doz MXC verilen grup (ODG), yüksek doz MXC verilen grup (YDG)

Sıçanlara MXC verilmeden önce düzenli bir östrosiklusuna sahip olup olmadıkları belirlendi ve düzenli sıklusa sahip olmayanlar deney dışı bırakıldı. Sıçanlarda MXC uygulamasından önce östrosiklus yaklaşık 4-5 gün olarak belirlendi. MXC'nin uygulanmaya başlanmasından sonraki 10. günde de siklus takibi yeniden yapılmaya başlandı ve 10 gün devam etti. Bu takip esnasında östrus, metöstrus, diöstrus ve proöstrus sürelerinde düzensizlikler gözlemlendi. Fakat hücre yapılarında herhangi bir değişiklik mevcut değildi.

ELISA yöntemi ile çalışmada kullanılan hayvanların kan serumlarındaki AMH ve FSH değerlerine bakıldı. Kontrol grubunun ortalama AMH seviyesi $82,92 \pm 4,317$ pg/ml, düşük doz MXC'ye maruz kalan grubun ortalama AMH seviyesi $108,67 \pm 5,13$ pg/ml, orta doz MXC uygulanan grubun ortalama AMH seviyesi $114,79 \pm 10,41$ pg/ml ve yüksek doz MXC verilen grubun ortalama AMH seviyesi $110,66 \pm 3,97$ pg/ml olarak belirlendi. Bu sonuçlar doğrultusunda deney gruplarında ortalama AMH seviyesinde artış gözlemlendi ve bu artış istatistiksel olarak ($p < 0,05$) anlamlı bulundu. Kontrol grubunun FSH değeri $0,32 \pm 0,08$ pg/ml, düşük doz MXC'ye maruz kalan grubun FSH değeri $0,17 \pm 0,03$ pg/ml, orta doz grubunda FSH değeri $0,20 \pm 0,06$ pg/ml ve yüksek doz MXC uygulanan grubun FSH değeri ise $0,27 \pm 0,04$ pg/ml olarak ölçüldü. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda kontrol ve deney gruplarının serum FSH değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p > 0,05$) (Tablo 4.1).

Tablo 4. 1: Deney ve kontrol gruplarına ait serum AMH ve FSH değerlerinin karşılaştırılması

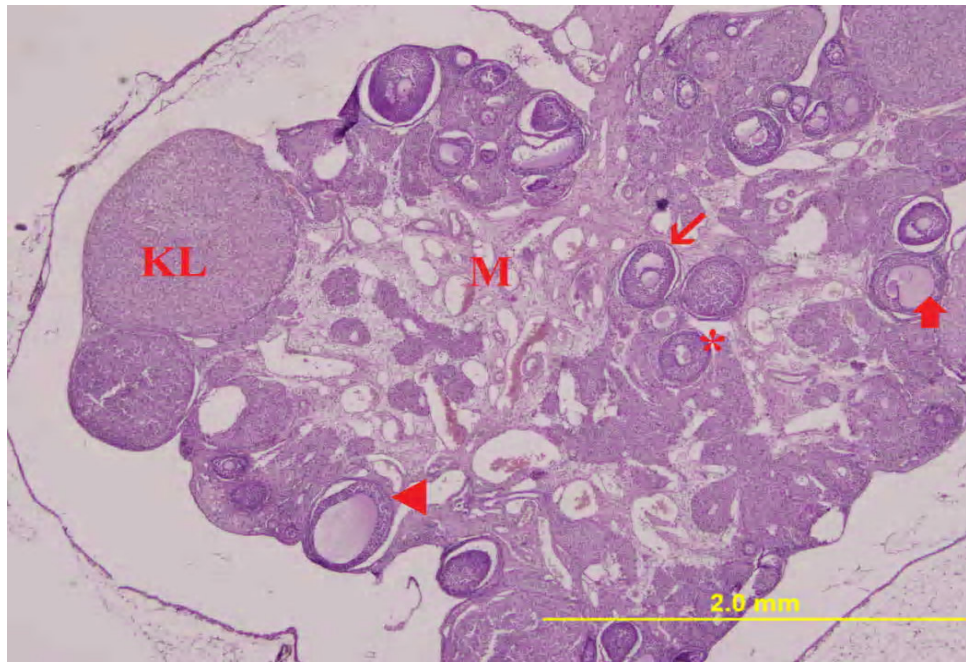
n=10	AMH	FSH
	ortalama±standart sapma (pg/ml)	ortalama±standart sapma (pg/ml)
KG	82,92 ± 4,317	0,32 ± 0,08
DDG	108,67 ± 5,13	0,17 ± 0,03
ODG	114,79 ± 10,41	0,20 ± 0,06
YDG	110,66 ± 3,97	0,27 ± 0,04

p<0,05 KG: Kontrol grubu, DDG: Düşük doz grubu, ODG: Orta doz Grubu, YDG: Yüksek doz grubu

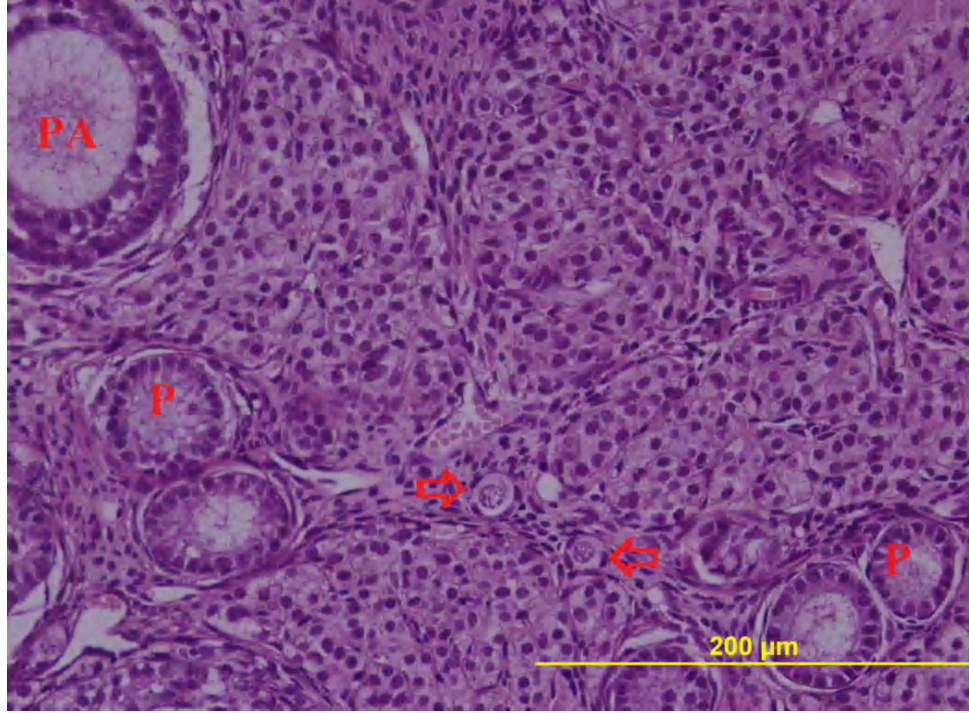
Bütün gruplarda H+E ve MT ile boyanan kesitlerde genel histolojik değerlendirme yapıldı. Dört grupta da ovaryumun dış görünümünde kayda değer bir farklılık mevcut değildi. Kontrol grubuna ait ovaryumların yüzeyi girintili çıkıntılı şekilde görüldü. Germinal epitel kontrol grubunda çoğunlukla basit kübik ya da prizmatik tipte gözlemlendi. Sadece korpus luteumun bulunduğu bölgelerde germinal epitel alçak kübik veya tek katlı yassı tipteydi. Germinal epitelin altında, fibröz bağ dokusu lifleri ve hücrelerden oluşan tunika albuginea gözlemlendi. Tunika albugineanın altında, daha periferik kısımda olan ve çeşitli sayı ve tipte folliküllerin bulunduğu korteks bölümü ile iç kısımda gevşek bağ dokusu yapısında olan ve zengin bir damar yatağı içeren medulla bulunuyordu. Follikülleri çevreleyen stromada yer alan hücreler oval şekilli, iri nükleuslu ve sitoplazmaları bazofilik olup gruplar halinde yerleşim göstermekteydi (Şekil 4.3).

Kontrol grubunda merkezi yerleşim gösteren oosit ve tek sıra yassı granüloza hücreleri ile çevrili primordial folliküller, kübik ya da prizmatik granüloza hücreleri ile çevrili primer folliküller gözlemlendi. Oosit büyük ve ökromatik bir nükleusa sahipti. Primer folliküllerin çapı primordial folliküllerden biraz daha büyüktü (Şekil 4.4). Kontrol grubuna ait ovaryum kesitlerinde farklı büyüklüklerde preantral folliküller gözlemlendi. Preantral folliküllerde; oosit çok katlı granüloza hücre tabakası ile çevrelenmişti ve granüloza hücreleri arasında herhangi bir antrum mevcut değildi (Şekil 4.5). Oosit ile granüloza hücreleri arasında, hem oosit hem de granüloza hücreleri tarafından yapılan zona pellusida belirgindi ve stroma hücrelerinden farklı olan belirgin bir teka tabakası mevcuttu. Folliküller etrafında yer yer düz kas demetleri ve bağ dokusu lifleri ve az miktarda kan damarlarına rastlandı. Çapı genişlemiş ve çok katlı granüloza hücreleri arasında düzensiz antrumların oluştuğu sekonder folliküller korteks bölgesine yerleşmiş

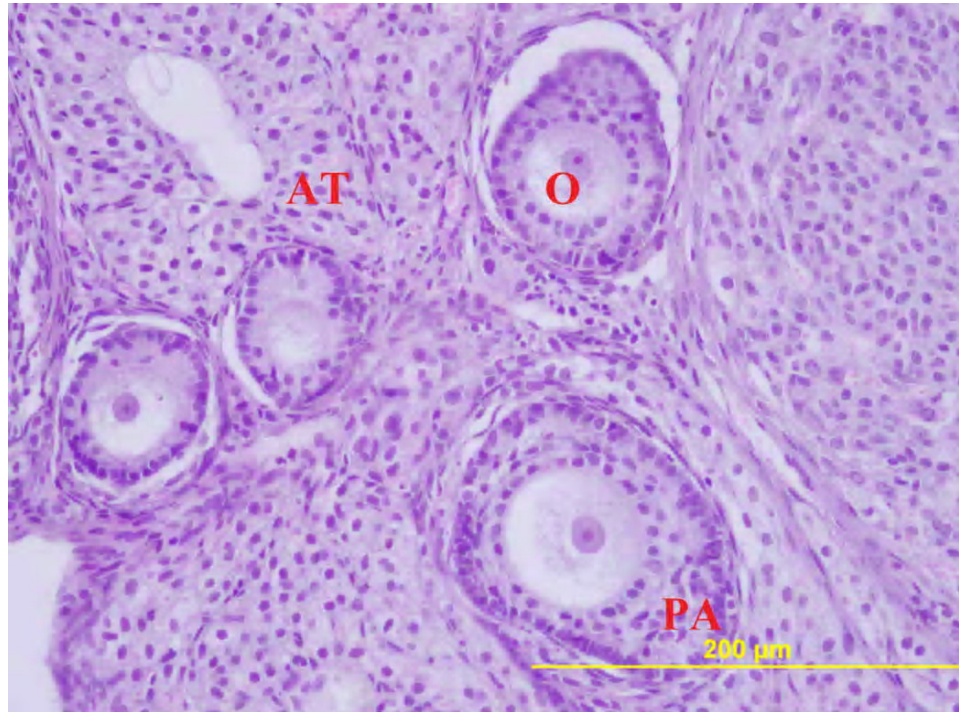
olarak gözlemlendi. Küçük kas demetleri, fibroblast ve kan damarları içeren teka tabakası sekonder follikülde belirgindi. (Şekil 4.6). Tersiyer follikülde; kumulus ooforusun antruma doğru yaptığı çıkıntı içerisinde bulunan oosit ve zona pellusida çevresindeki granüloza hücrelerinin ‘korona radiatayı’ oluşturdukları gözlemlendi. Follikülleri çevreleyen granüloza hücreleri koyu boyanmış heterokromatik nükleusa sahiptiler (Şekil 4.7). Kontrol grubuna ait kesitlerde atretik folliküllerin yapısına bakıldığında ise; düzensiz şekilli ve zona pellusidası tam olarak belirgin olmayan oosit yapısı gözlenmektedir. Ayrıca yoğunlaşmış şekilde gözlenen granüloza hücreleri arasında düzensiz ve az sayıda piknotik nükleuslu granüloza hücreleri mevcuttu (Şekil 4.8). Ovulasyondan sonra gelişen korpus luteumda granüloza lutein hücreleri, teka lutein hücrelerinden daha iri veziküler nükleuslu ve daha soluk boyanmış sitoplazmalı hücreler olarak dikkati çekti. Hücre sitoplazmaları köpüğümsü bir görünüme sahip olup steroid salgılayan hücre özelliğini yansıtmaktaydı. Korpus luteumun dış kısmındaki teka tabakası bütün gruplarda belirgin şekilde gözlemlendi (Şekil 4.9). Ovaryumun medullasında kortekse göre az sayıda hücre bulunmasına karşın damarlanmanın fazla olduğu görüldü. Medullada yer alan hücreler bazofilik boyanmış olup, çekirdekleri merkezi olarak gözlemlendi. Medulla bölgesinde follikül yapıları bulunmadığı için bağ dokusu lifleri ve kas demetleri daha net ayırt ediliyordu (Şekil 4.10).



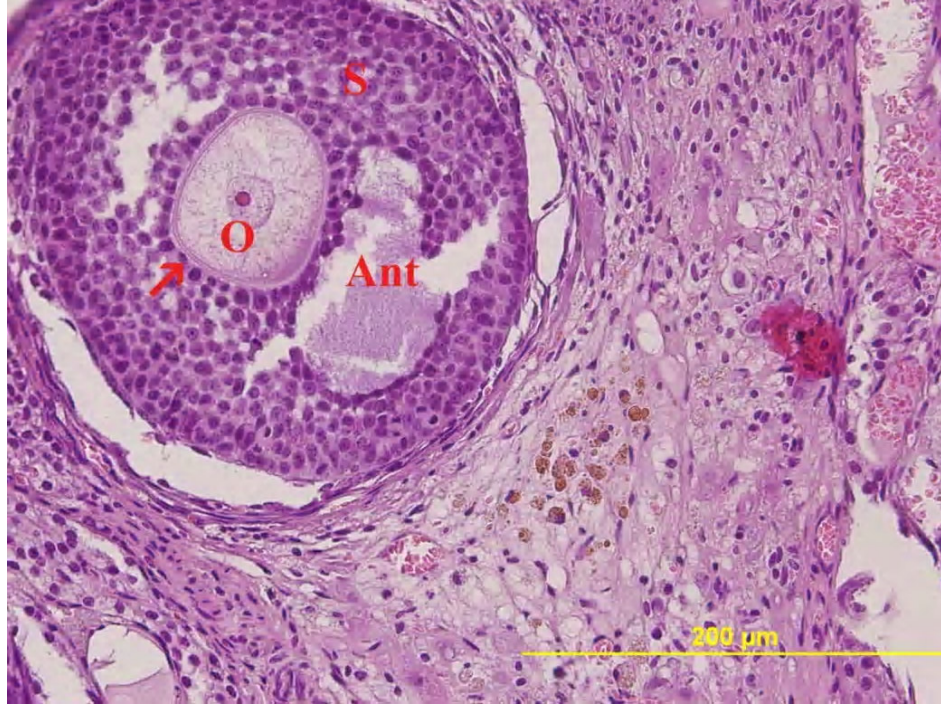
Şekil 4. 3: Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde genel görünüm. Korpus luteum (KL), medulla (M), atretik follikül (◄), preantral follikül (*), sekonder follikül (◄), tersiyer follikül (►) (X4, H+E)



Şekil 4. 4: Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde primer ve primordial follikül. Preantral follikül (PA), primer follikül (P), primordial follikül (⇔) (X40,H+E)



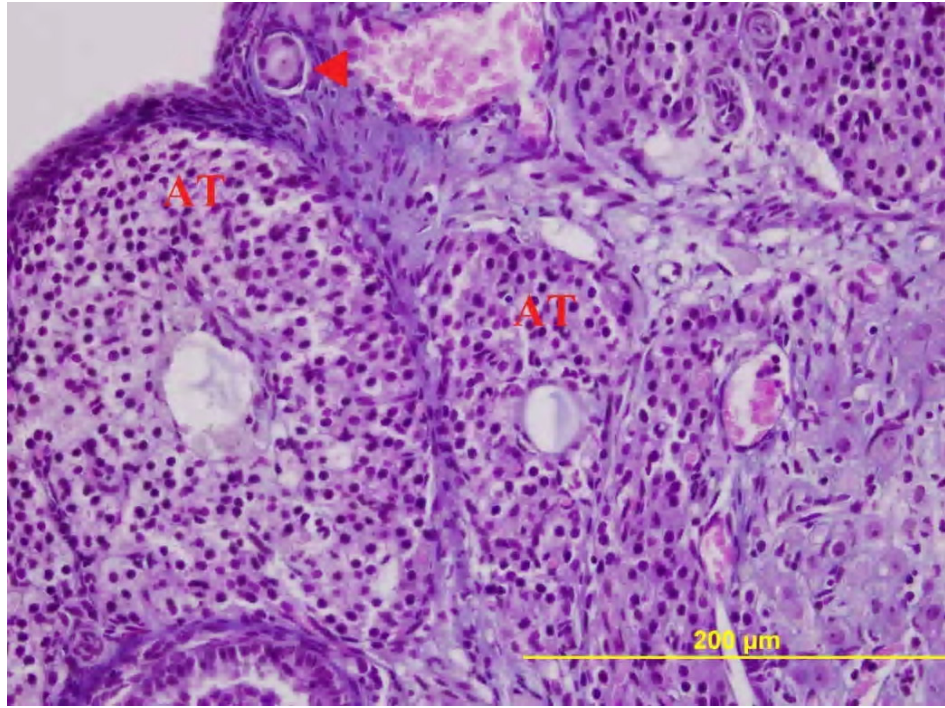
Şekil 4. 5: Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde preantral follikül. Preantral follikül (PA), oosit (O), atretik follikül (AT) (X40,H+E)



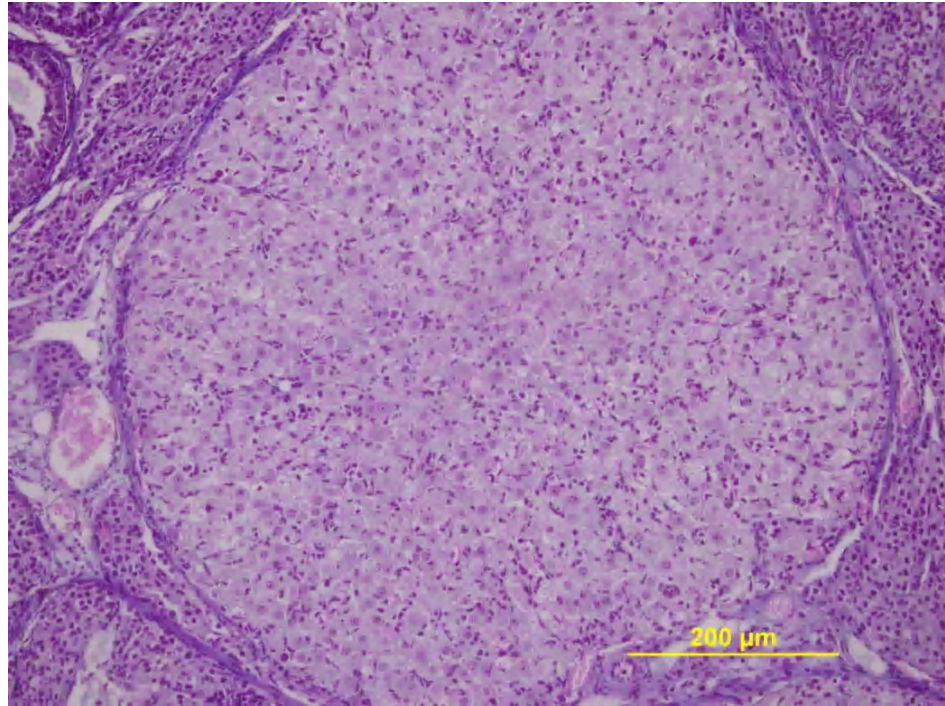
Şekil 4. 6: Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde sekonder follikül. Sekonder follikül (S), antrum (Ant), zona pellusida (↗), oosit (O) (X40, H+E)



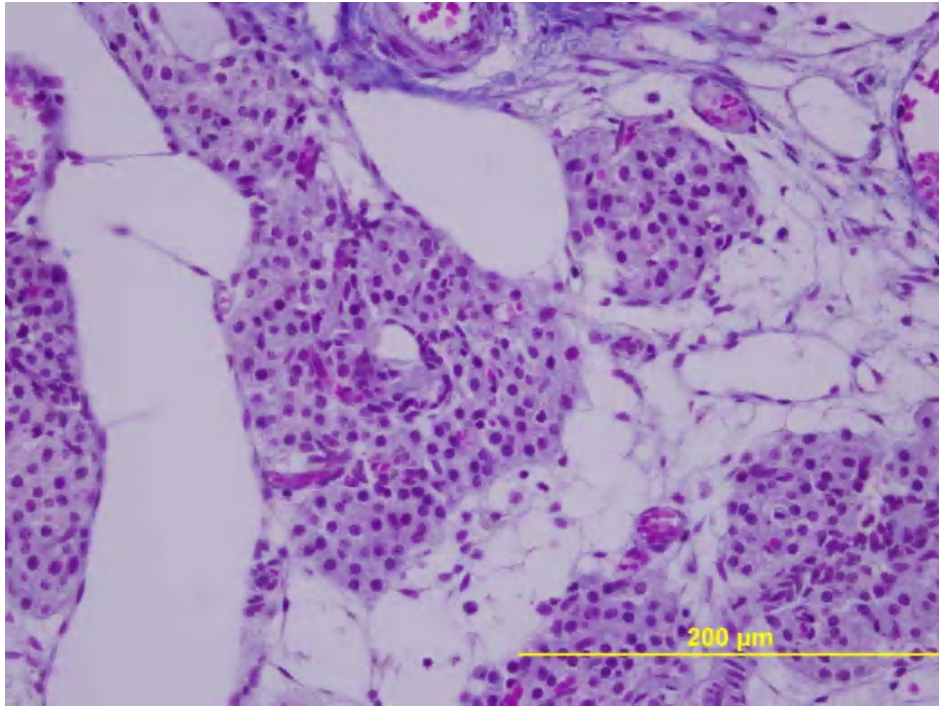
Şekil 4. 7: Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde tersiyer follikül. Tersiyer follikül (T), antrum (Ant), zona pellusida (↖) (X40, MT)



Şekil 4. 8: Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde atretik follikül . Atretik follikül (AT), primer oosit (◄) (X40,MT)



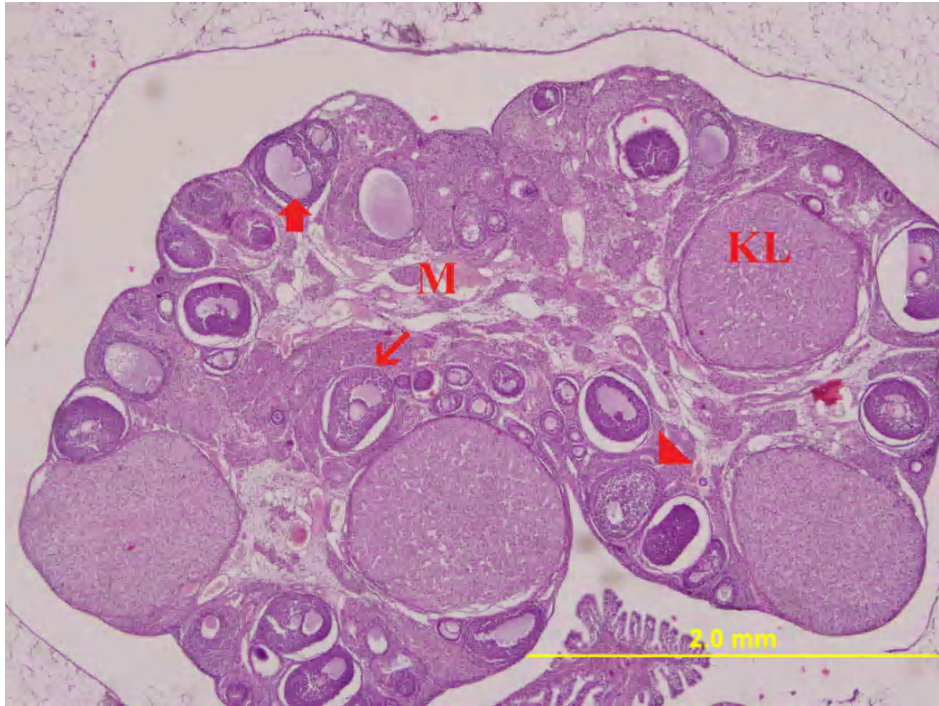
Şekil 4. 9: Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde korpus luteum (X20,MT)



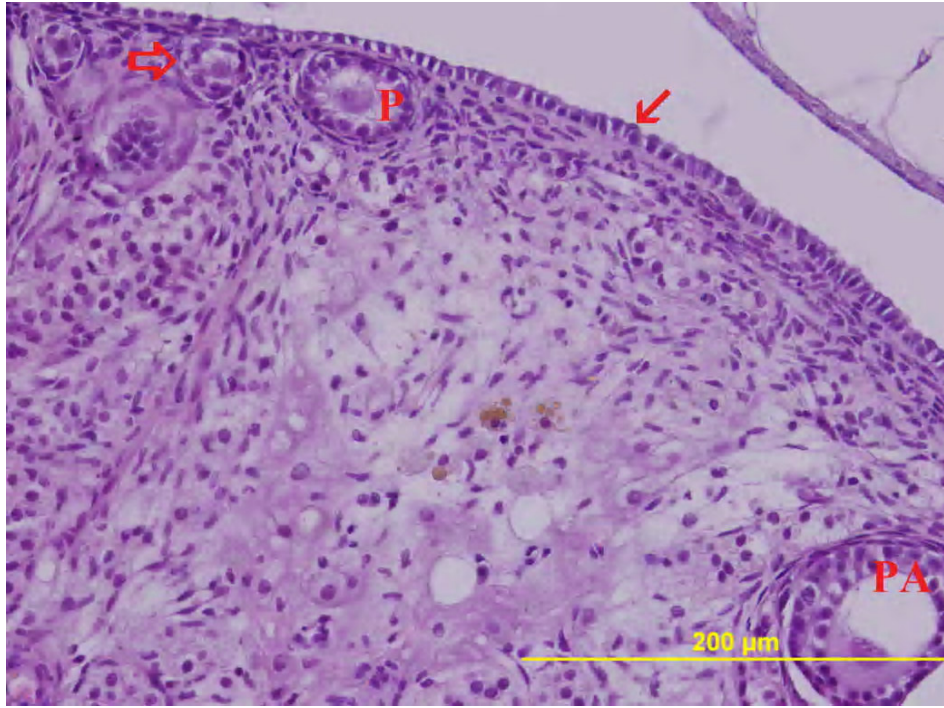
Şekil 4. 10: Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde medulla bölgesi (X40 MT)

Düşük doz grubuna ait histolojik değerlendirme sonucunda; ovaryum yüzeyinin girintili çıkıntılı bir yapıda olduğu gözlemlendi. Germinal epitel basit kübik ya da prizmatik tipteydi ve korpus luteumun bulunduğu bölgelerde epitelde yassılaşma belirlendi. Epitel dokusunun altında fibröz bağ dokusu kontrol grubu ile benzer özellikler gösterdi. Farklı gelişim aşamasındaki folliküller korteks bölgesine yerleşmişti ve merkezde gevşek bağ dokusu özelliğinde medulla yer alıyordu. Medulla bölgesinde folliküllerin yer almamasından dolayı kan damarları kolaylıkla ayırt ediliyordu. Folliküllerin etrafında iri nükleuslu ve bazofilik sitoplazmalı hücreler gözlemlendi (Şekil 4.11). Korteks tabakasında merkezi yerleşim gösteren oosit ve tek sıra granüloza hücreleri ile çevrili primordial folliküller, çapı genişlemiş ve kübik granüloza hücreleri ile çevrili primer folliküller mevcuttu (Şekil 4.12). Kontrol grubun da olduğu gibi, düşük doz MXC'ye maruz kalan grupta da çok sıralı granüloza hücreleri ile çevrelenmiş, antrum içermeyen ve zona pellusida tabakası belirgin olan preantral folliküller gözlemlendi. Preantral follikül etrafında teka tabakasında da herhangi bir değişiklik mevcut değildi. Folliküller etrafında yer yer düz kas demetleri, bağ dokusu lifleri ve az miktarda kan damarları mevcuttu (Şekil 4.13). Granüloza hücreleri arasında düzensiz antrumların oluştuğu sekonder folliküller kas demetleri ve fibroblastlar arasında gözlemlendi. Fakat kontrol

grubundan farklı olarak oositi çevreleyen granüloza hücreleri arasında piknotik hücrelere rastlandı. Ayrıca granüloza hücreleri arasında bağlantının bozulduğu bölgeler gözlemlendi (Şekil 4.14 ve 15). Düşük doz MXC uygulanan gruptaki tersiyer follikülün genel yapısı kontrol grubu ile benzer özellik gösteriyordu. Fakat korona radiata ile çevrili olan oositlerin bazılarının yapısında dejenerasyon gözlemlendi. İlâveten oositi sistematik olarak çevreleyen granüloza hücrelerinde dejenerasyon bölgeleri ve antrumunu çevreleyenlerde yassılaşımlar gözlemlendi (Şekil 4.16). Kontrol gruplarından farklı olarak düşük doz MXC uygulanan grupta atretik folliküllerin sayısında artış belirlendi. Atretik folliküllerin yoğunlaşmış granüloza hücreleri arasında dejenere hücrelere rastlandı. Dejenere olmuş oosit yapısı kontrol grubuna göre daha düzensizdi ve zona pellusida yapısında bozulmalar mevcuttu (Şekil 4.17 ve 18). Medulla bölgesinde damarlanma daha yoğundu, bağ dokusu ve kas demetleri arasında gözlenen hücrelerin çekirdekleri merkezi yerleşimli idi (Şekil 4.19).



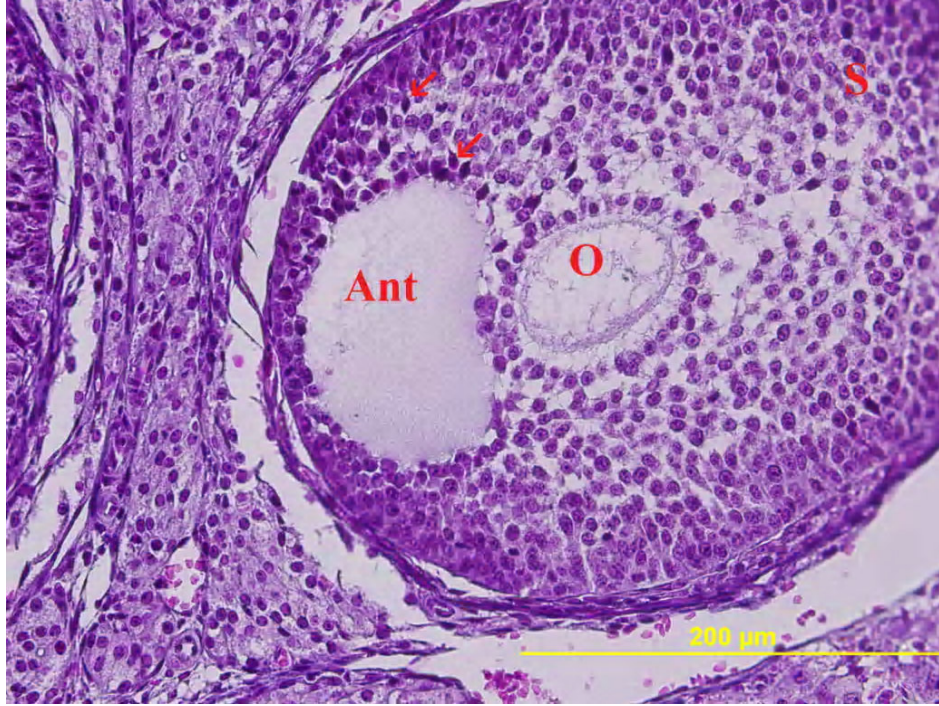
Şekil 4. 11: Düşük doz MXC uygulanan grupta ovaryumun genel görünümü. Korpus luteum (KL), medulla (M), atretik follikül (◄), sekonder follikül (↘), tersiyer follikül (↗) (X4,H+E)



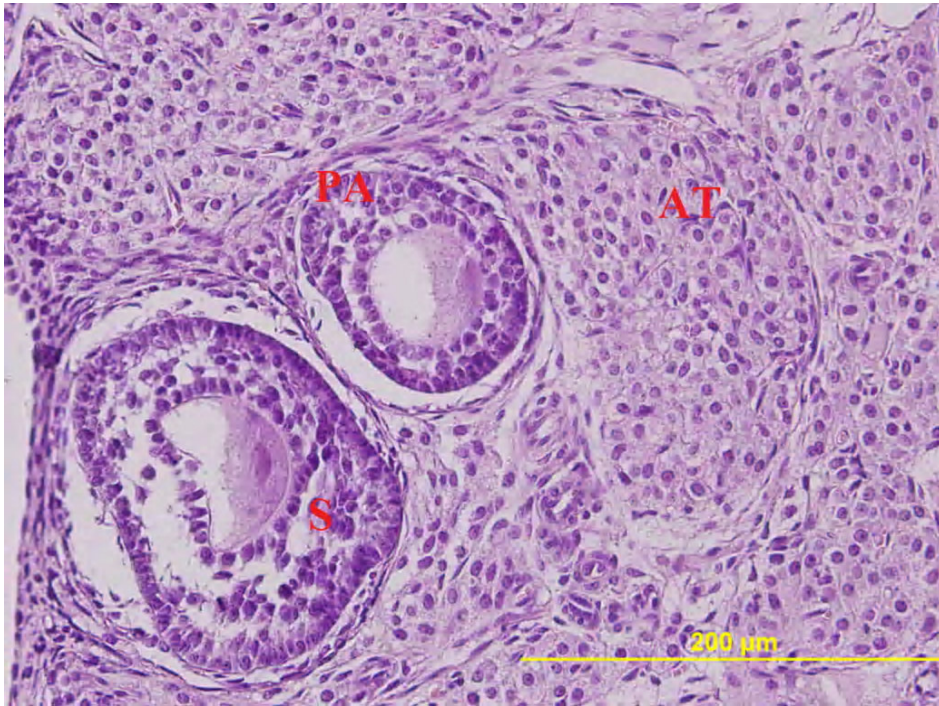
Şekil 4. 12: Düşük doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde primer ve primordial follikül. Preantral follikül (PA), primer follikül (P), primordial follikül (⇨), germinal epitel (↙) (X40,H+E)



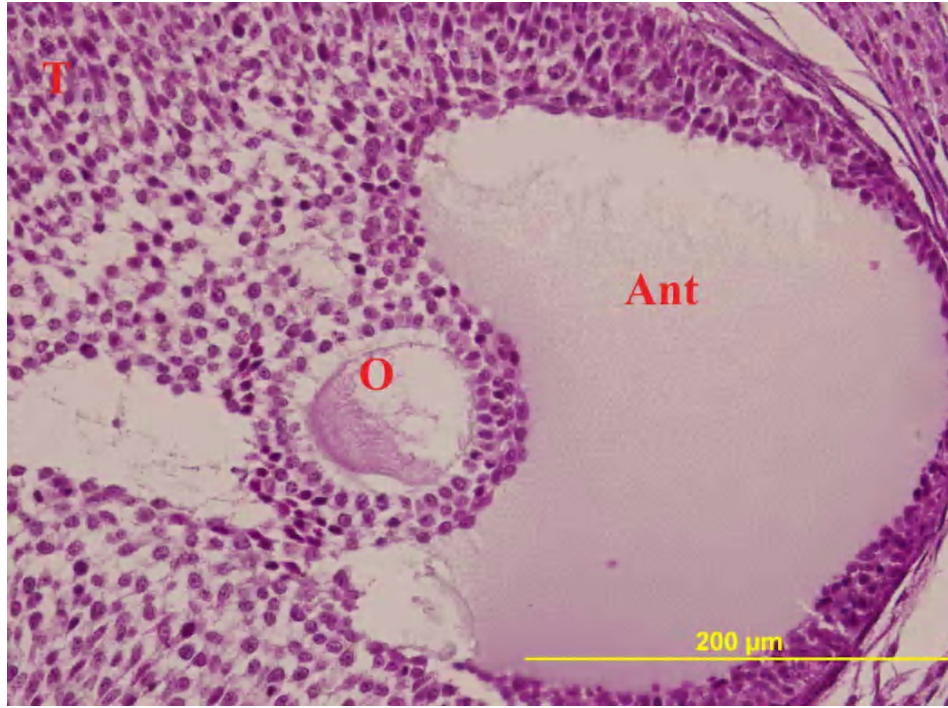
Şekil 4. 13: Düşük doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde preantral follikül. Preantral follikül (PA), oosit (O), zona pellusida (↗) (X40,H+E)



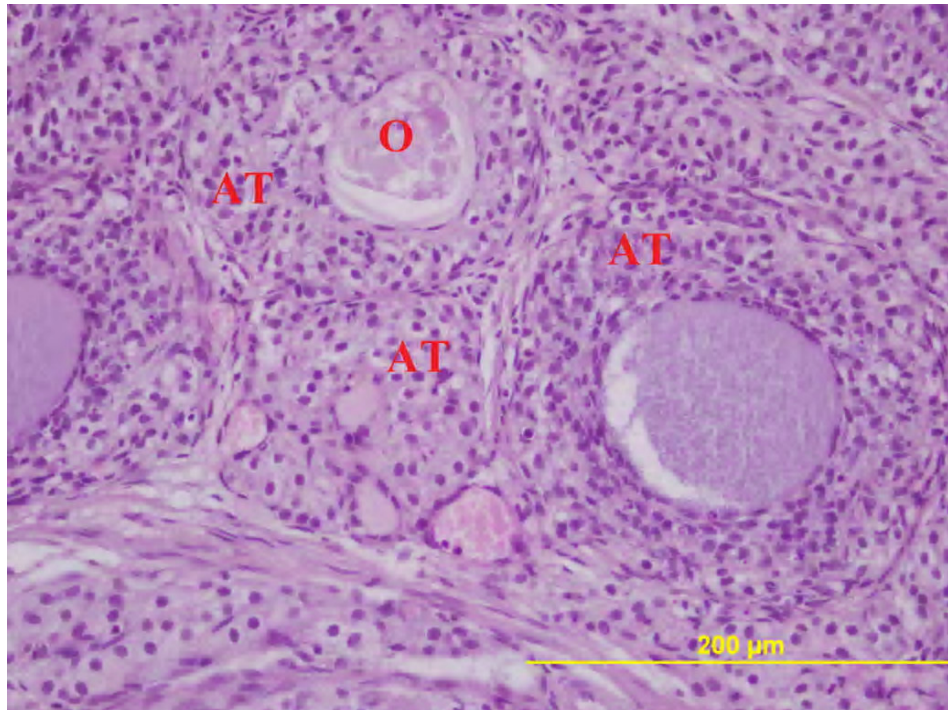
Şekil 4. 14: Düşük doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde sekonder follikül. Sekonder follikül (S), antrum (Ant), oosit (O), dejenere hücre (↘) (X40, MT)



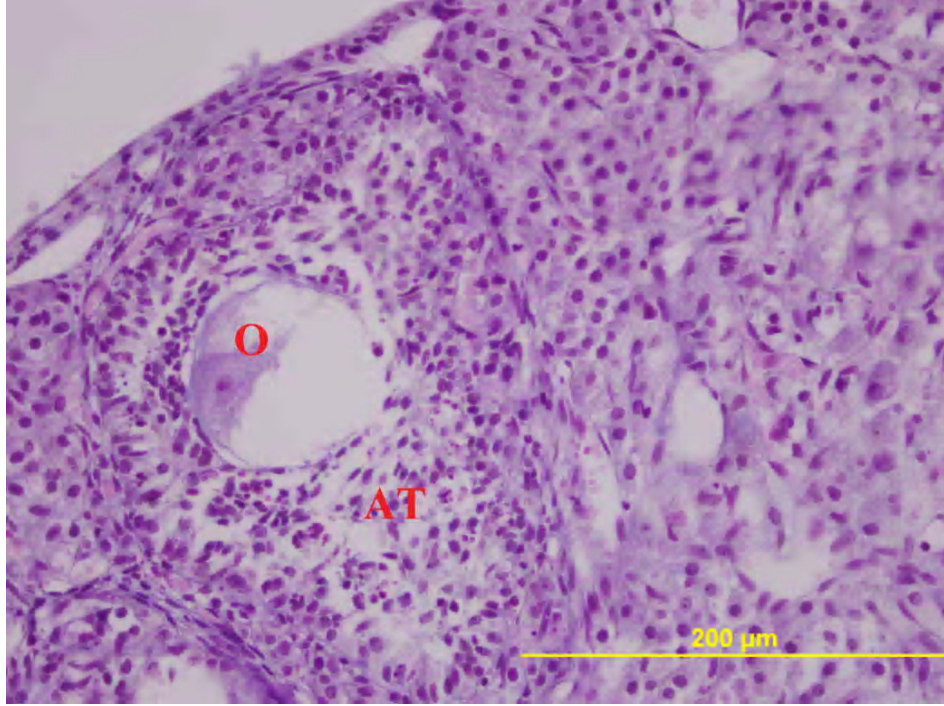
Şekil 4. 15: Düşük doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde dejenere sekonder follikül. Sekonder follikül (S), preantral follikül (PA), atretik follikül (AT) (X40,H+E)



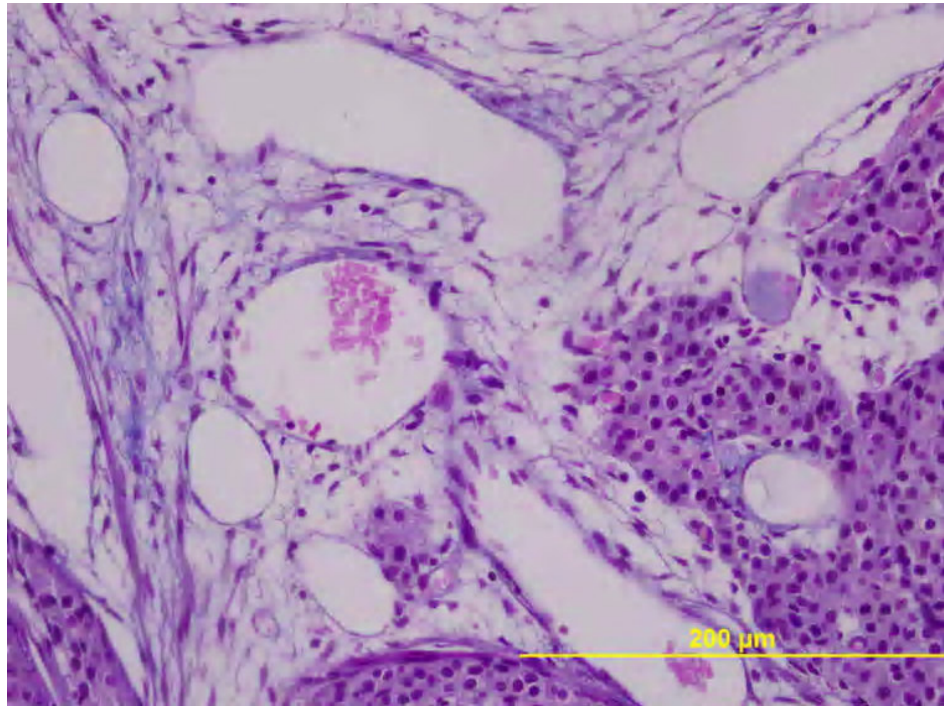
Şekil 4. 16: Düşük doz MXC uygulanan gruba ait tersiyer follikül. Tersiyer follikül (T), antrum (Ant), oosit (O) (X40, H+E)



Şekil 4. 17: Düşük doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde atretik follikül. Atretik follikül (AT), oosit (O) (X40, H+E)

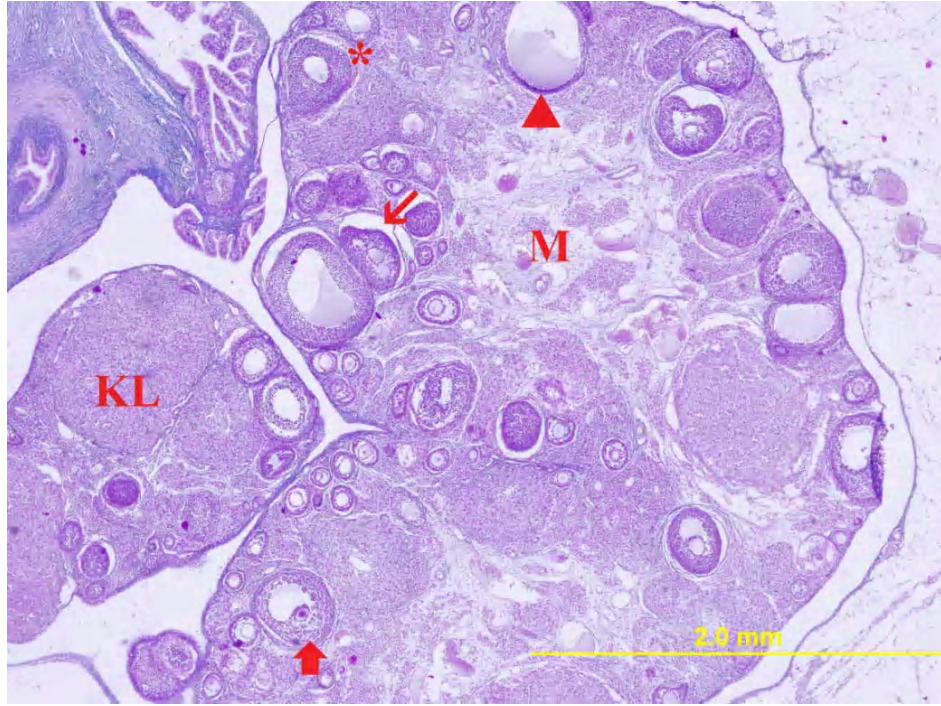


Şekil 4. 18: Düşük doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde atretik follikül. Atretik follikül (AT), oosit (O) (X40,MT)

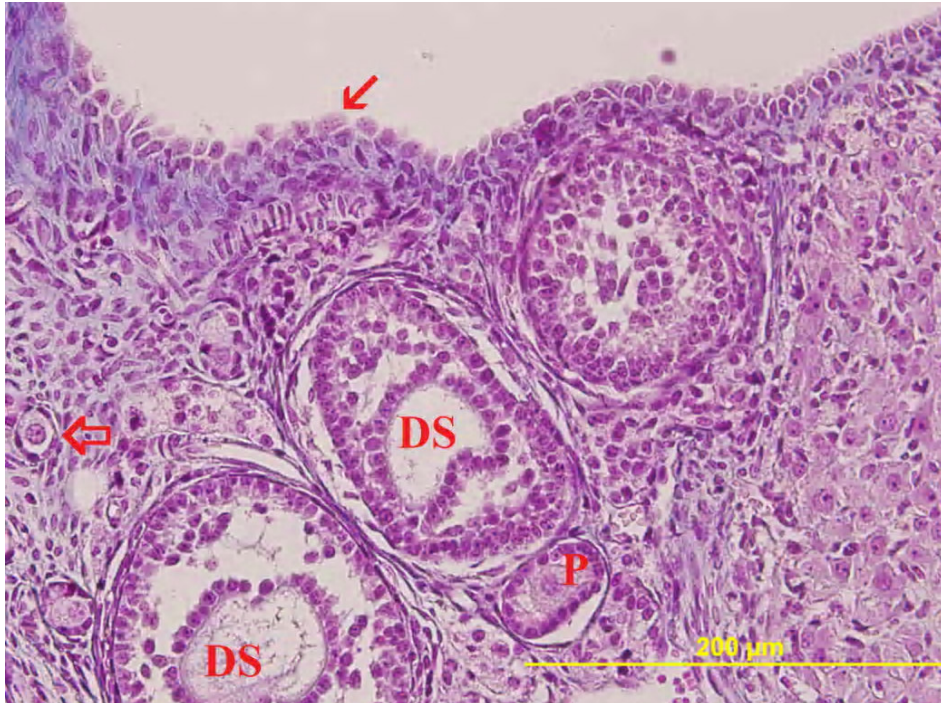


Şekil 4. 19: Düşük doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde medulla bölgesi (X40, MT)

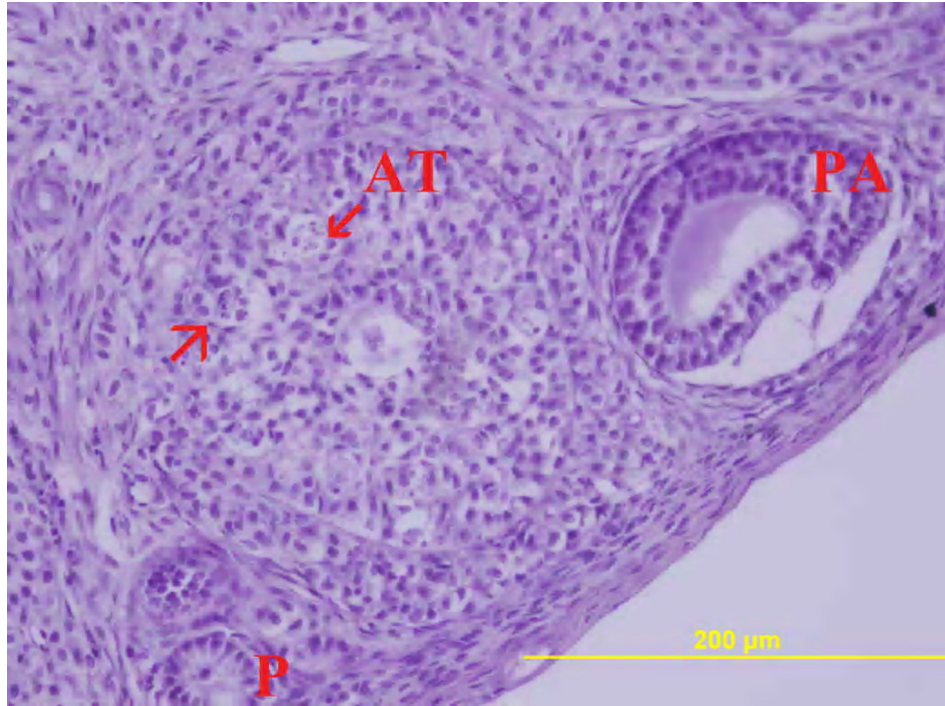
Kontrol ve düşük doz grubundan farklı olarak, orta doz MXC'ye maruz kalan grupta germinal epitelde yer yer dökülmeler mevcuttu. Tek katlı kübik epitelin altında yer alan tunika albugineanın yapısında bir değişiklik gözlenmedi. Korteks ise folliküllerin yer alması sayesinde medulladan kolaylıkla ayırt edilebiliyordu (Şekil 4.20). Folliküllerin genel yapısında ve yerleşiminde herhangi bir farklılık mevcut değildi. Oosit etrafında tek sıra yerleşmiş granüloza hücrelerinden oluşan primordial folliküller ve tek katlı kübik epitelden oluşan primer folliküller korteks bölgesine yerleşmiş olarak gözlendi. Primer ve primordial follikülleri çevreleyen granüloza hücreleri arasında dejenerasyon bölgeleri mevcuttu. Oosit yapısında da yer yer bozulmalar dikkati çekti. Follikülleri çevreleyen stroma içerisinde dejenere olmuş primordial ve primer folliküllere rastlandı (Şekil 4.21). Orta doz MXC uygulanan grupta dejenere olmuş preantral folliküllere rastlandı. Folliküllerin oosit yapısında düzensizlikler ve granüloza hücreleri arasında dejenerasyon ve ayrılma alanlarına rastlandı (Şekil 4.22). Kontrol grubundaki sekonder folliküllerden farklı olarak 16 mg/kg/gün MXC'ye maruz kalan deney gruplarında; granüloza hücrelerinde piknotik çekirdek ve dejenere olmuş oosit yapılarına rastlandı. Oosit ve granüloza hücreleri arasındaki bağlantının bozulduğu belirlenmedi (Şekil 4.23 ve 24). Orta doz MXC'ye maruz kalan deney grubunda at nalı şeklindeki antrum boşluğu, tersiyer folliküllerin gelişiminde yavaşlama ve genel yapısında düzensizlikler belirlendi. Antrumu çevreleyen ilk sıra granüloza hücrelerinde yassılaşma ile oositi sistematik olarak çevreleyen granüloza hücreleri arasında apoptozis gözlendi. Korona radiata ile çevrili olan oositin yapısında dejenerasyon mevcuttu (Şekil 4.25). Atretik folliküllerin yapısı düzensizdi ve granüloza hücreleri arasında dejenere olmuş alanlara ve dejenere hücrelere rastlandı (Şekil 4.26 ve 27). Orta doz MXC'ye maruz kalan grubun medulla bölgesinde kontrol grubundakine benzer hücresel elemanlar mevcuttu (Şekil 4.28).



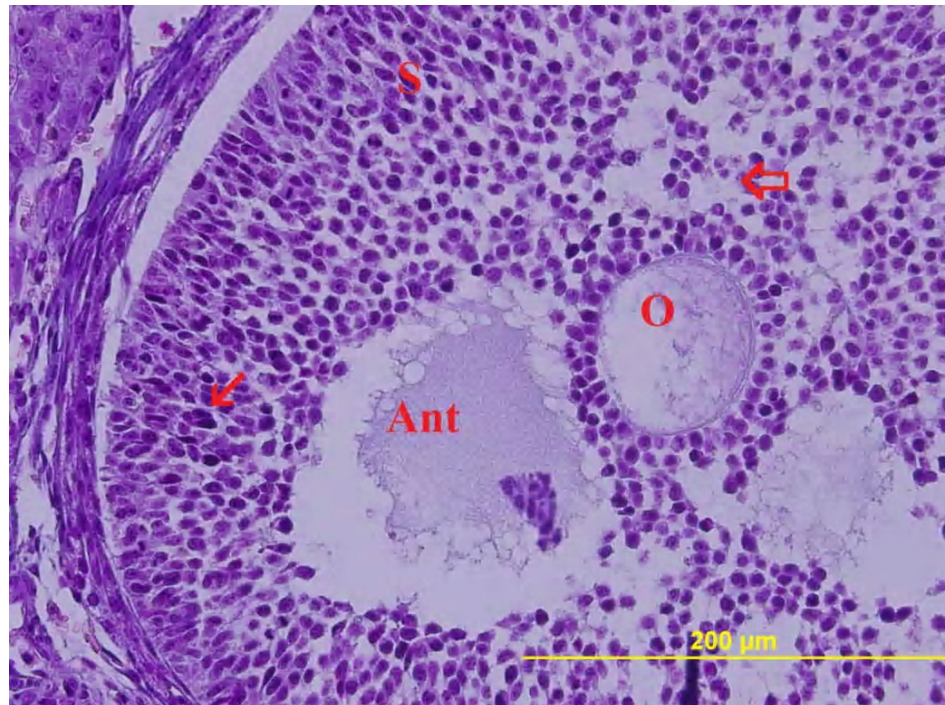
Şekil 4. 20: Orta doz MXC uygulanan grupta ovaryumun genel görünümü. Korpus luteum (KL), medulla (M), atretik follikül (◄), sekonder follikül (↖), tersiyer follikül (➡), preantral follikül (*) (X4,MT)



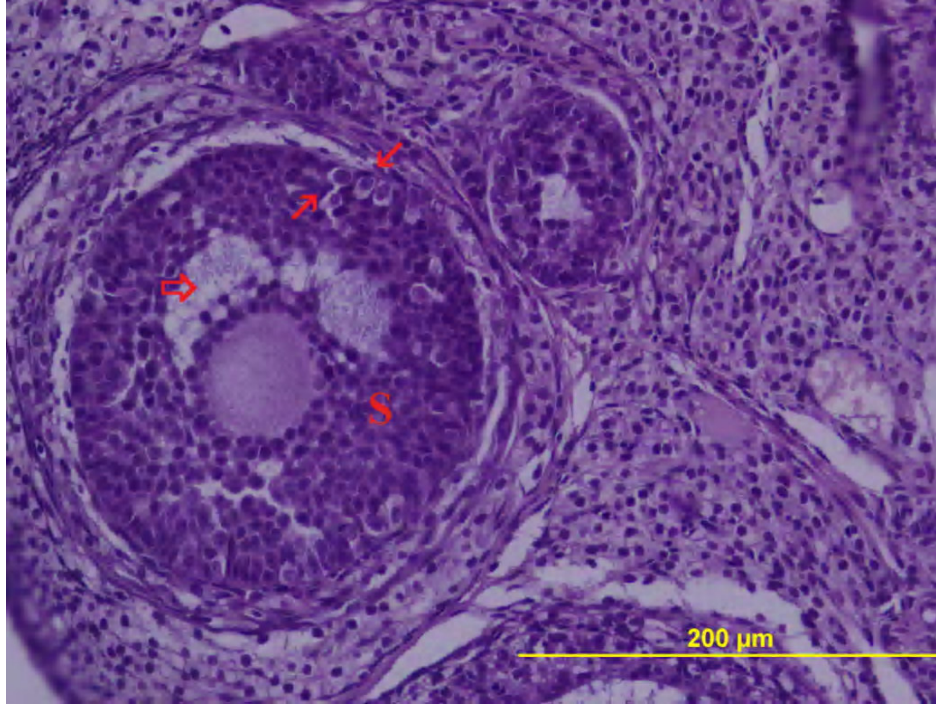
Şekil 4. 21: Orta doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde primer ve primordial follikül. Primer follikül (P), primordial follikül (⇔), dejenere sekonder follikül (DS), germinal epitel (↖) (X40,MT)



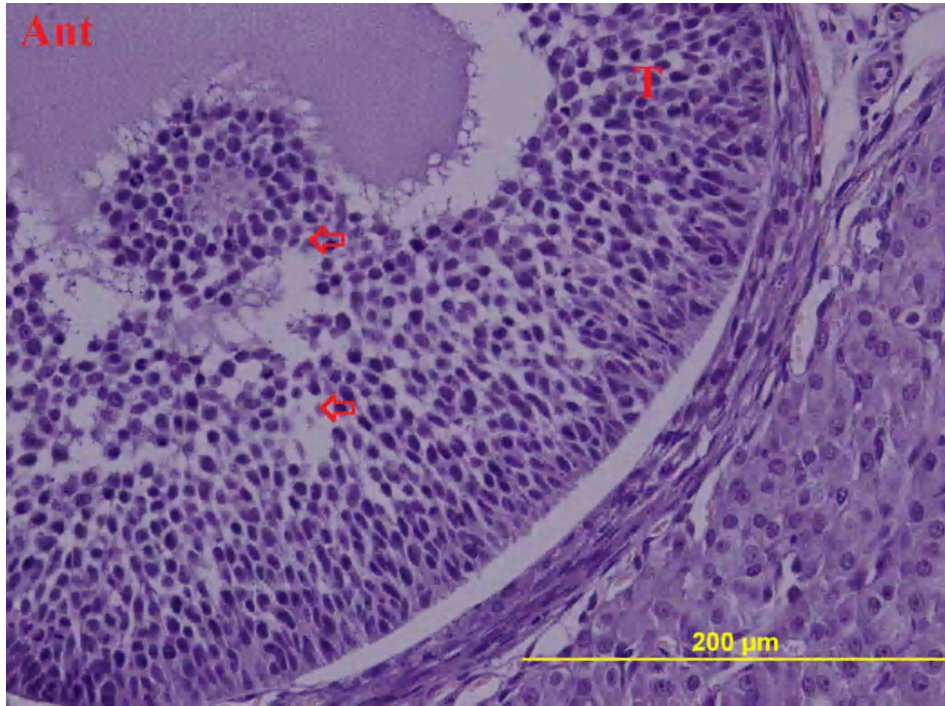
Şekil 4. 22: Orta doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde preantral follikül. Preantral follikül (PA), primer follikül (P) , atretik follikül (AT), dejenere hücre (↗) (X40,H+E)



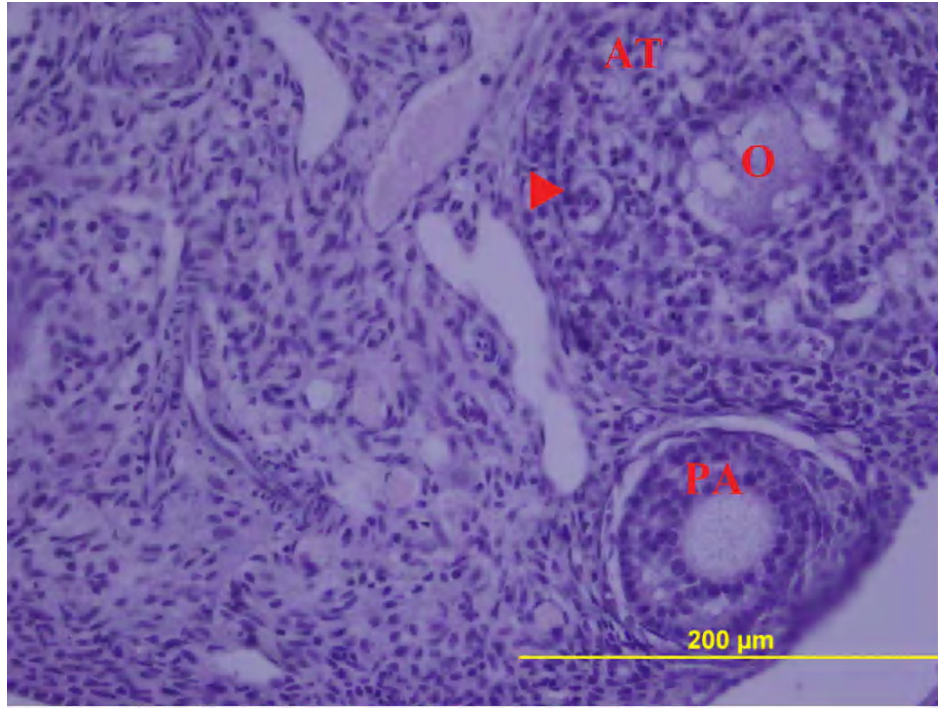
Şekil 4. 23: Orta doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde sekonder follikül. Sekonder follikül (S), antrum (Ant), oosit (O), dejenere hücre (↘), granüloza hücrelerinde dejenerasyon (⇔) (X40,MT)



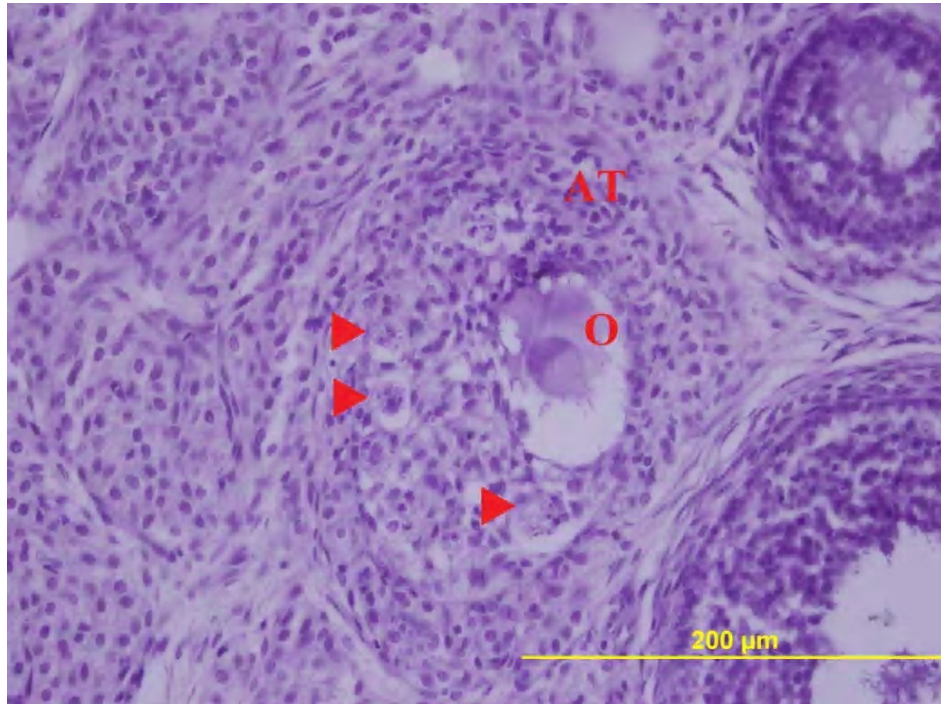
Şekil 4. 24: Orta doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde sekonder follikül. Sekonder follikül (S), dejenere hücre (↗), atretik bölge (⇒) (X40,H+E)



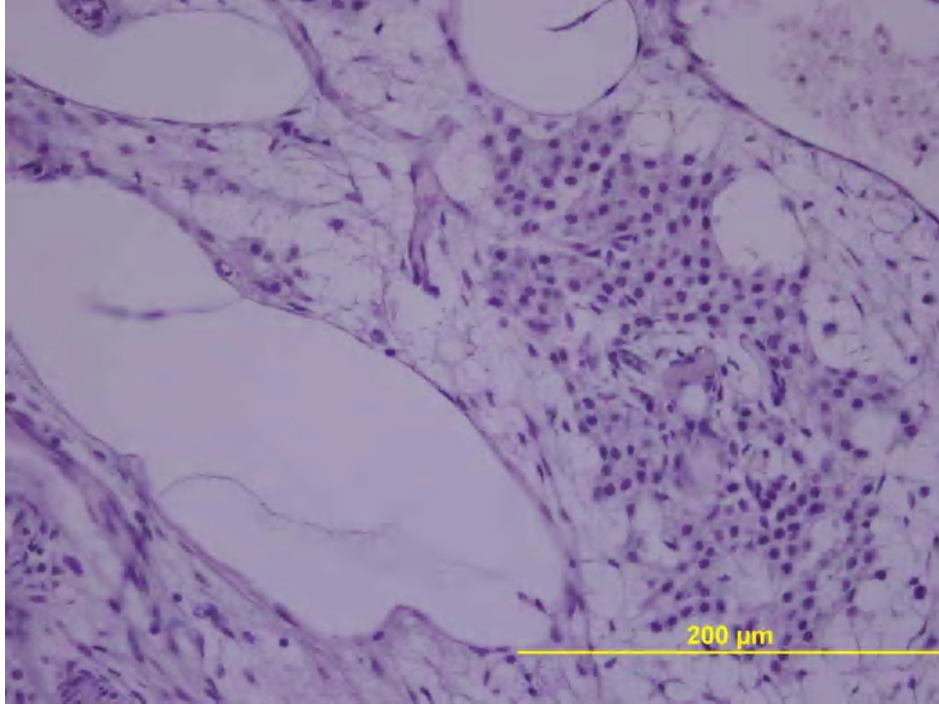
Şekil 4. 25: Orta doz MXC uygulanan gruba ait tersiyer follikül. Tersiyer follikül (T), antrum (Ant), dejenereasyon bölgesi (⇒) (X40, H+E)



Şekil 4. 26: Orta doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde atretik follikül. Preantral follikül (PA), oosit (O), dejenere hücre (►) (X40,H+E)



Şekil 4. 27: Orta doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde atretik follikül. Atretik follikül (AT), oosit (O), dejenere hücre (►) (X40,HE)

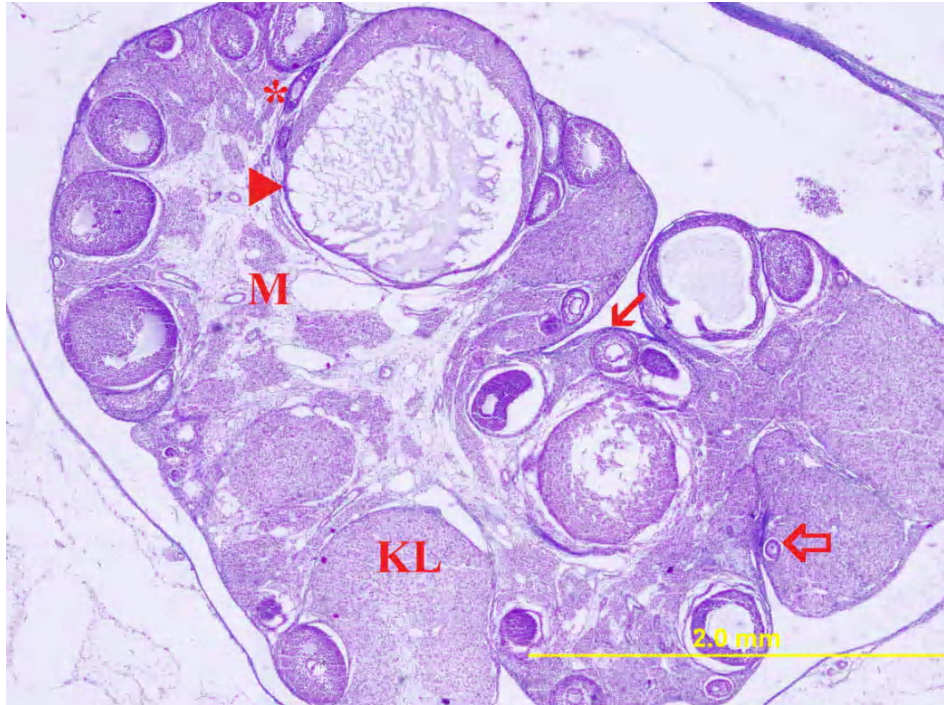


Şekil 4. 28: Orta doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde medulla bölgesi (X40, H+E)

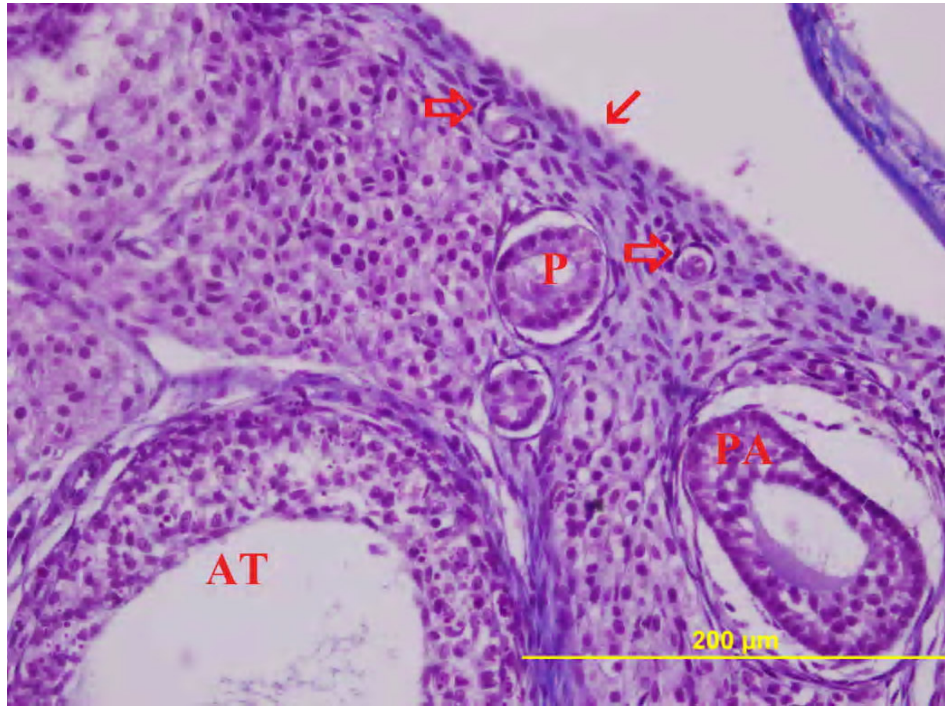
Yirmi gün süreyle yüksek dozda MXC'ye maruz kalan deney grubundan elde edilen sonuçlar orta doz grubu ile benzerlik gösteriyordu. Dıştan girintili çıkıntılı bir yüzeye sahip olan ovaryum, tek katlı kübik epitelle çevriliydi. Fibröz bağ dokusu özelliğindeki tunika albuginea herhangi bir değişiklik gözlenmedi. Folliküller korteks bölgesine yerleşmiş durumdaydı ve bol miktarda atretik follikül gözlemlendi (Şekil 4.29). Yüksek doz MXC uygulanan grupta düzenli yapıdaki primordial ve primer folliküller arasında ayrıca dejenere olmuş follikül yapılarına rastlandı. Primordial ve primer folliküllerin hem granüloza hücrelerinde hem de oosit yapısında düzensizlikler gözlemlendi. Fakat follikülü çevreleyen bağ dokusu liflerinde ve stromada yer alan hücrelerde farklılık mevcut değildi (Şekil 4.30).

Yüksek doz MXC'ye maruz kalan sıçanlarda preantral folliküllerin yapısında dejenerasyonlar gözlemlendi. Oositi çevreleyen granüloza hücrelerinde ayrılma alanlarına ve piknotik hücrelere rastlandı (Şeki 4.31). Sekonder folliküllerde dejenere olmuş oosit ve granüloza hücreleri arasındaki bağlantıda düzensizlikler gözlemlendi. Fakat zona pellusida yapısında herhangi bir farklılık belirlenmedi (Şekil 4.32). Kontrol grubundakine benzer yapıdaki tersiyer folliküller yüksek doz MXC'ye maruz kalan ovaryum kesitlerinde de gözlemlendi. Fakat deney grubunda at nalı şeklindeki antrum

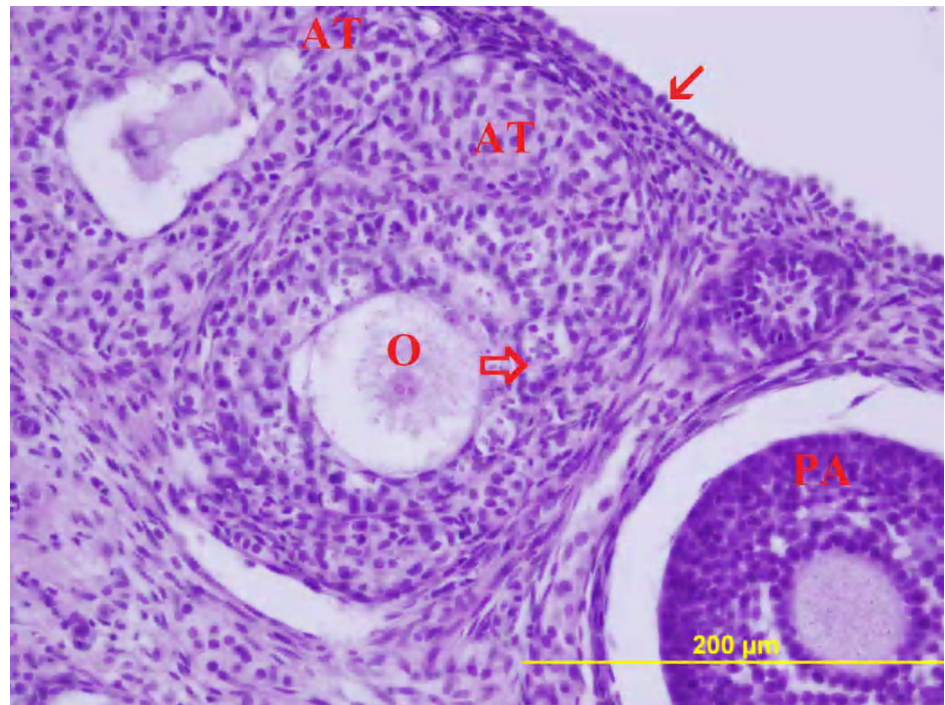
boşluğunu çevreleyen granüloza hücrelerinde yassılaşımlar mevcuttu. Korona radiata ile çevrili olan oositin yapısında dejenerasyon gözlemlendi. İlave ten oositi sistemati k olarak çevreleyen granüloza hücrelerinde apoptoz belirlendi (Şekil 4.33). Yüksek dozda MXC'ye maruz kalan grupta atretik follikül sayısının arttığı ve bu follikül yapıları arasında dejenere hücrelerin yer aldığı belirlendi (Şekil 4.34 ve 35). At nalı şeklindeki antrum yapısında vakuolizasyon gözlemlendi. Yüksek doz grubundaki medulla bölgesi kontrol grubu ile benzer bağ dokusu ve damar yapılarına sahipti, fakat hücreler arasında yağ damlacıkları gözlemlendi (Şekil 4.36).



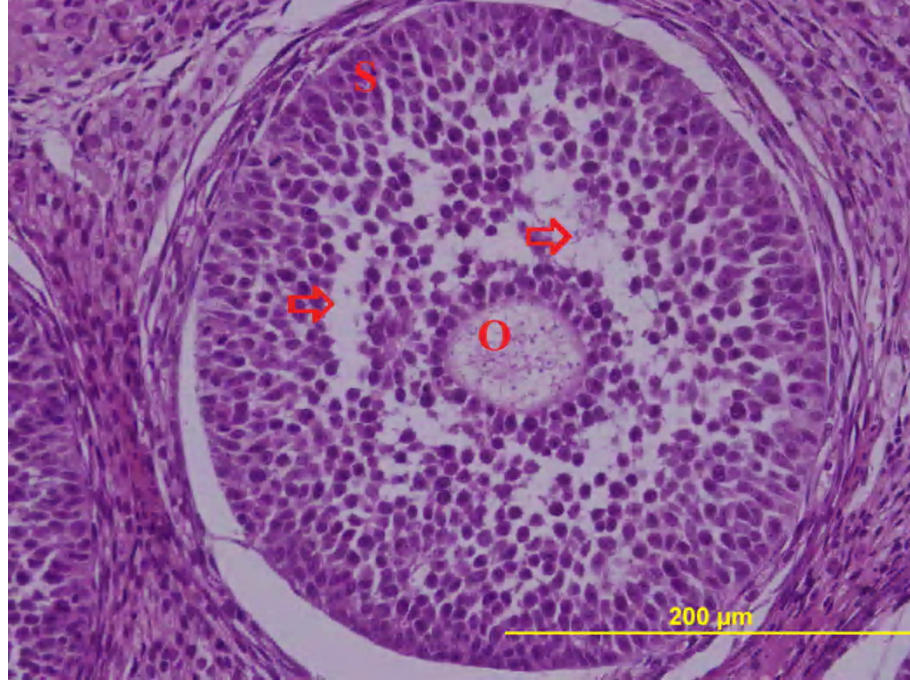
Şekil 4. 29: Yüksek doz MXC uygulanan grup ait genel görünüm. Korpus luteum (KL), Medulla (M), atretik follikül (◄), sekonder follikül (↙), preantral follikül (*), primer follikül (↖) (X4,MT)



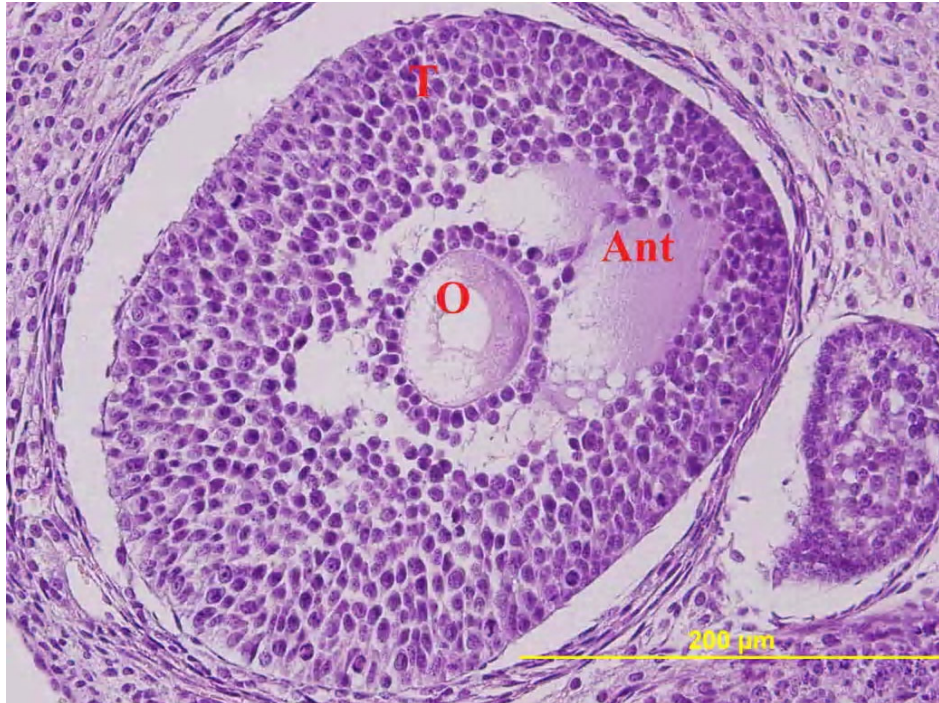
Şekil 4. 30: Yüksek doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde primer ve primordial follikül. Preantral follikül (PA), primer follikül (P), primordial follikül (⇒), atretik follikül (AT), germinal epitel (↙) (X40,MT)



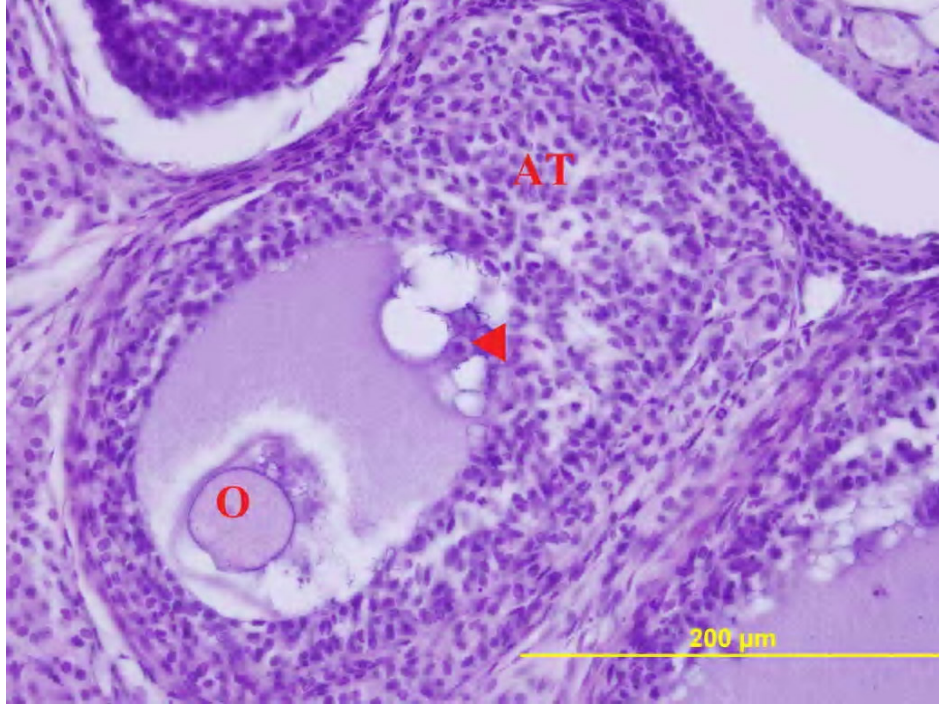
Şekil 4. 31: Yüksek doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde preantral follikül. Preantral follikül (PA), oosit (O), atretik follikül (AT), dejenere hücre (⇒), germinal epitel (↓) (X40,H+E)



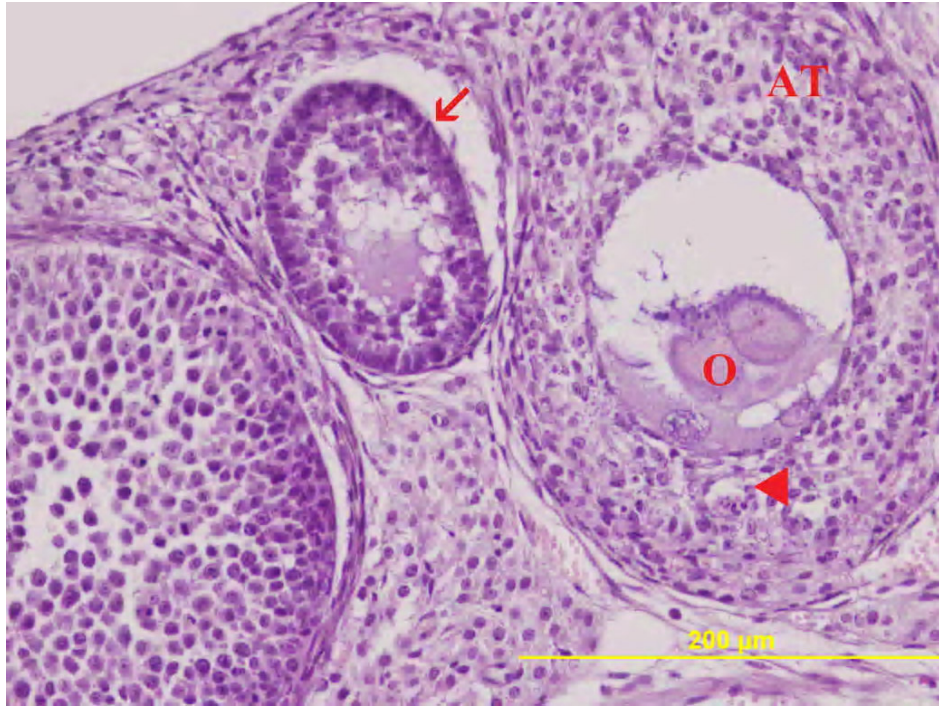
Şekil 4. 32: Yüksek doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde sekonder follikül. Sekonder follikül (S), oosit (O), granüloza hücrelerinde dejenerasyon (⇒) (X40,H+E)



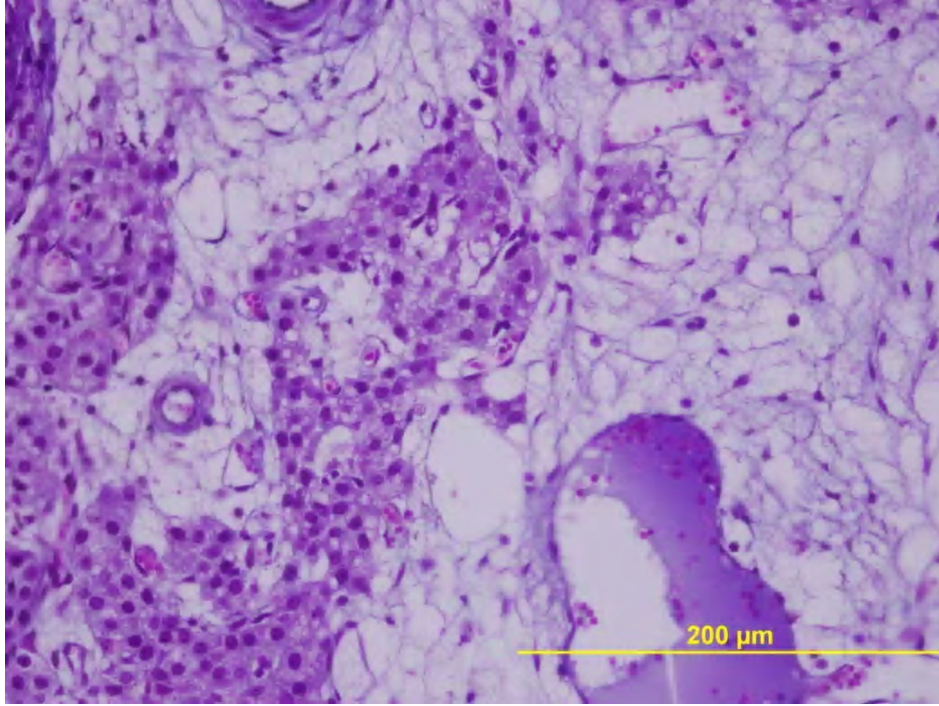
Şekil 4. 33: Yüksek doz MXC uygulanan gruba ait tersiyer follikül. Tersiyer follikül (T), antrum (Ant), oosit (O) (X40, H+E)



Şekil 4. 34: Yüksek doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde atretik follikül. Atretik follikül (AT), oosit (O), dejenere hücre (◄) (X40,H+E)

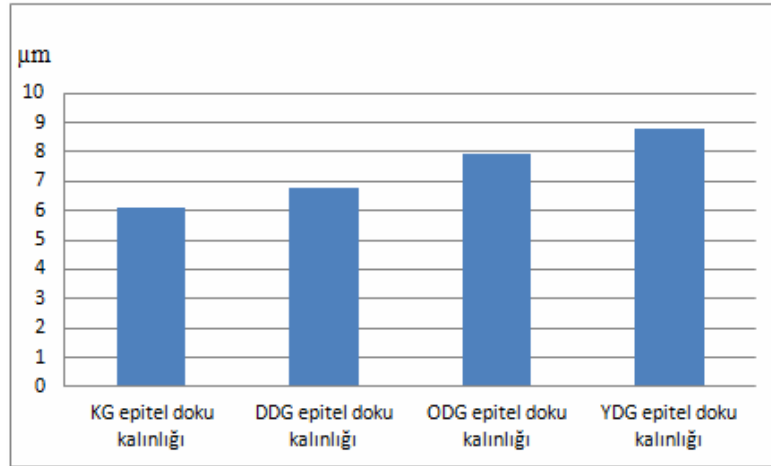


Şekil 4. 35: Yüksek doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde atretik follikül. Atretik follikül (AT), oosit (O), dejenere hücre (◄), dejenere preantral follikül (◄) (X40,H+E)



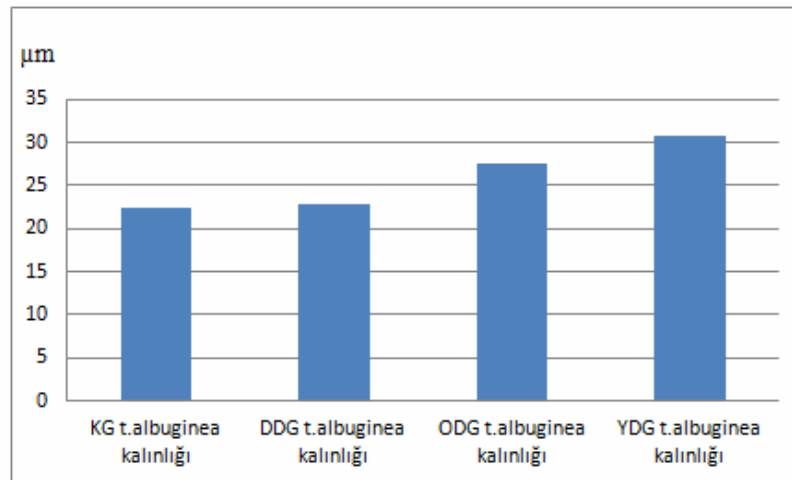
Şekil 4. 36: Yüksek doz MXC uygulanan gruba ait ovaryum kesitinde medulla bölgesi (X40, MT)

AnalySIS LS Research-5 programı kullanılarak doku kesitleri üzerinde yapılan ölçümlerde germinal epitel kalınlığı, kontrol grubunda $6,10 \pm 1,18 \mu\text{m}$, düşük doz MXC verilen grupta ortalama germinal epitel kalınlığı $6,76 \pm 1,16 \mu\text{m}$ olarak hesaplanmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda düşük doz MXC verilen grubun germinal epitel kalınlığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p < 0,05$). Orta dozda MXC verilen grupta germinal epitel kalınlığı $7,94 \pm 1,03 \mu\text{m}$ ve yüksek dozda MXC verilen grupta ise $8,76 \pm 0,87 \mu\text{m}$ olarak belirlendi. Bu bulgular sonucunda hem orta hem de yüksek doz MXC verilen grupta germinal epitel dokusundaki kalınlaşma kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ($p < 0,05$) anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.37).



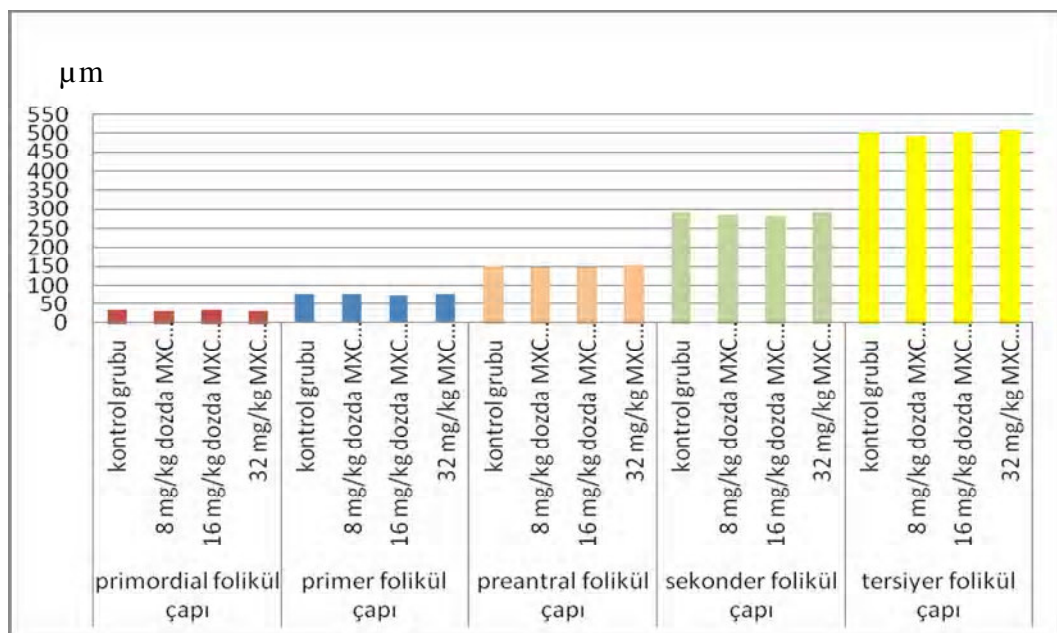
Şekil 4. 37: Grupların germinal epitel doku kalınlığı bakımından karşılaştırılması. Kontrol grubu (KG), düşük doz MXC verilen grup (DDG), orta doz MXC verilen grup (ODG), yüksek doz MXC verilen grup (YDG)

MT ile boyanan kesitlerde analySIS LS Research-5 programı kullanılarak yapılan ölçümlerin sonuçlarına göre; kontrol grubuna ait germinal epitelin altında yerleşim gösteren tunika albugineanın ortalama kalınlığı $22,39 \pm 3,29 \mu\text{m}$, düşük dozda MXC verilen grupta ortalama kalınlık $22,86 \pm 2,78 \mu\text{m}$ olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, düşük doz MXC verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu ($p > 0,05$). Fakat hem orta ($27,63 \pm 5,7 \mu\text{m}$) hem de yüksek doz ($30,70 \pm 5,9 \mu\text{m}$) MXC uygulanan gruplar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tunika albugineadaki artışın istatistiksel olarak ($p < 0,05$) anlamlı olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.38).



Şekil 4. 38: Grupların t.albuginea kalınlığı bakımından karşılaştırılması. Kontrol grubu (KG), düşük doz MXC verilen grup (DDG), orta doz MXC verilen grup (ODG), yüksek doz MXC verilen grup (YDG)

Kontrol ve deney gruplarına ait ovaryumlardaki çap ölçüm sonucuna göre; kontrol grubundaki primordial folliküllerin ortalama çapı $33,25 \pm 6,5 \mu\text{m}$, düşük doz MXC alan grupta ortalama çap $30,11 \pm 6,5 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü. Kontrol grubu ve düşük doz deney grubundan elde edilen veriler değerlendirildiğinde düşük doz verilen grupta follikül çapında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlenmiştir ($p < 0,05$). Bu durumun aksine orta ve yüksek doz verilen gruplarda primordial follikül çaplarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir. Primer folliküllerin ortalama çapları; kontrol grubunda $76,81 \pm 16,12 \mu\text{m}$, 8 mg/kg dozda MXC uygulanan grupta $75,80 \pm 15,74 \mu\text{m}$, orta dozda MXC verilen grupta $73,45 \pm 13,03 \mu\text{m}$ ve yüksek doz MXC maruz kalan grupta $76,18 \pm 14,81 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü. Preantral follikül ölçüm sonuçları kontrol grubunda $150,63 \pm 23,07 \mu\text{m}$, düşük doz alan grupta $146,72 \pm 27,39 \mu\text{m}$, orta doza maruz kalanlarda $147,63 \pm 24,81 \mu\text{m}$ ve yüksek doz uygulanan grupta $152,25 \pm 27,38 \mu\text{m}$ olarak hesaplandı. Sekonder folliküllerin çapları kontrol grubunda $292,20 \pm 82,28 \mu\text{m}$, düşük doz grubunda $286,72 \pm 88,12 \mu\text{m}$, orta dozda $281,72 \pm 61,50 \mu\text{m}$ ve yüksek doz grubunda ise $290,63 \pm 91,01 \mu\text{m}$ olarak bulundu. Tersiyer follikül ölçümlerine göre kontrol grubunun ortalama çapı $504,29 \pm 98,68 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü. Düşük doz grubunda ortalama tersiyer follikül çapı $493,92 \pm 94,92 \mu\text{m}$, orta doz grubunda $501,55 \pm 82,57 \mu\text{m}$ ve yüksek doz grubunda $509,05 \pm 70,36 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü (Tablo 4.2). Follikül çaplarının ölçümünden elde edilen değerler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilemedi ($p > 0,05$) (Şekil 4.39).



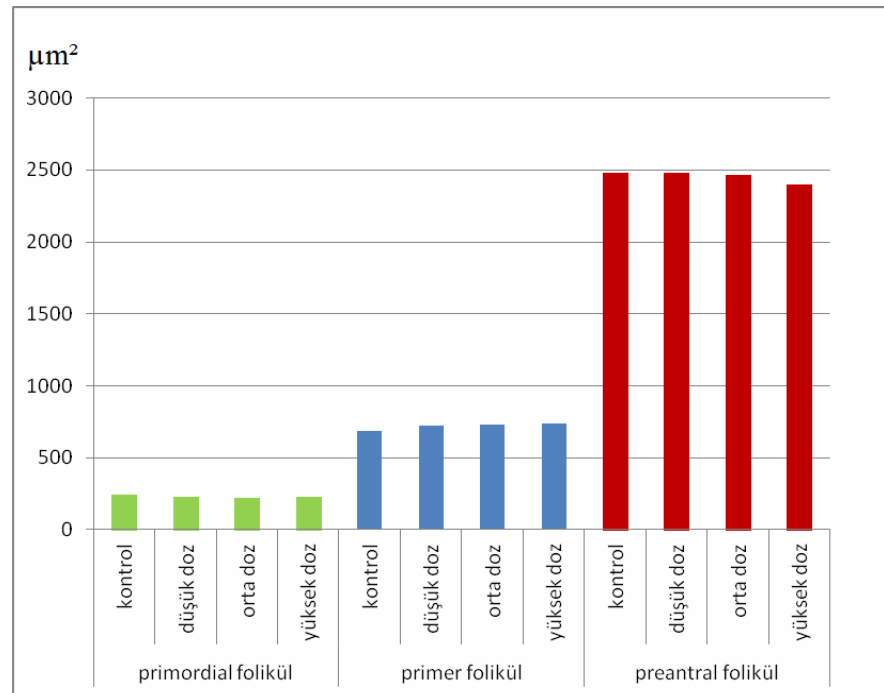
Şekil 4. 39: Kontrol ve deney gruplarındaki primordial ve primer follikül çaplarının karşılaştırılması

Tablo 4. 2: Kontrol ve deney gruplarındaki primordial, primer, preantral, sekonder ve tersiyer follikül çaplarının karşılaştırılması. Kontrol grubu (KG), Düşük doz grubu (DDG), Orta doz Grubu (ODG), Yüksek doz grubu(YDG)

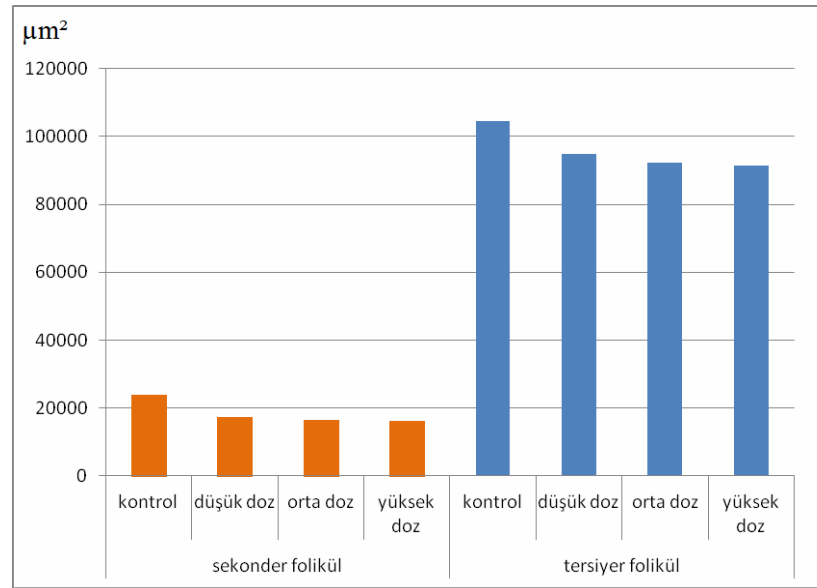
Follikül tipi	Ortalama follikül çapı (µm)	p
KG primordial follikül	33,2587±6,56	
DDG primordial follikül	30,1120±6,55	0,018*
ODG primordial follikül	33,3956±6,99	0,920
YDG primordial follikül	31,8734±7,73	0,337
KG primer follikül	76,8136±16,12	
DDG primer follikül	75,8099±15,74	0,753
ODG primer follikül	73,4528±13,03	0,255
YDG primer follikül	76,1888±14,81	0,841
KG preantral follikül	150,6313±23,07	
DDG preantral follikül	146,7249±27,39	0,442
ODG preantral follikül	147,6389±24,81	0,534
YDG preantral follikül	152,2592±27,38	0,749
KG sekonder follikül	292,2044±82,28	
DDG sekonder follikül	286,7242±88,12	0,749
ODG sekonder follikül	281,72±61,50	0,473
YDG sekonder follikül	290,6323±91,01	0,928
KG tersiyer follikül	504,2997±98,68	
DDG tersiyer follikül	493,9236±94,69	0,679
ODG tersiyer follikül	501,5577±82,57	0,907
YDG tersiyer follikül	509,0504±70,36	0,831

* p<0,05

Foliküllerin alan ölçüm sonuçlarına göre; kontrol grubundaki primordial folliküllerin ortalama alanı $240,15 \pm 83,42 \mu\text{m}^2$, düşük doz MXC alan grubun ortalama primordial follikül alanı $231,06 \pm 69,50 \mu\text{m}^2$, orta doz grubunun alan ölçüm sonuçları $224,20 \pm 78,10 \mu\text{m}^2$ ve yüksek doz grubunun follikül alanı $230,55 \pm 144,23 \mu\text{m}^2$ olarak ölçüldü. Aynı alan ölçümleri diğer folliküller için de yapıldı. Kontrol grubunda primer follikülün ortalama alanı $686,60 \pm 184,12 \mu\text{m}^2$, preantral follikülün ortalama alanı $2483,91 \pm 426,88 \mu\text{m}^2$, sekonder follikülün alanı $24019,33 \pm 3561,33 \mu\text{m}^2$ ve tersiyer follikülde ise $104688,4 \pm 51923,1 \mu\text{m}^2$ olarak bulundu. Düşük doz MXC grubunda primer follikül $724,16 \pm 197,88 \mu\text{m}^2$, preantral folliküller $2476,80 \pm 664,43 \mu\text{m}^2$, sekonder folliküller $17191,81 \pm 7619,12 \mu\text{m}^2$ ve tersiyer folliküller $94750,15 \pm 13038,67 \mu\text{m}^2$ ortalama follikül alanına sahipti. Orta doz grubunda; primer follikül $731,54 \pm 142,97 \mu\text{m}^2$, preantral follikül $2464,17 \pm 707,18 \mu\text{m}^2$, sekonder follikül $16406,74 \pm 5183,97 \mu\text{m}^2$ ve tersiyer follikül $92159,97 \pm 11442,37 \mu\text{m}^2$ ortalama alan ölçümleri elde edildi. Yüksek doz grubunda; primer folliküller $739,90 \pm 286,21 \mu\text{m}^2$, preantral folliküllerinin ortalama alanı $2398,88 \pm 591,77 \mu\text{m}^2$, sekonder folliküllerinin alanı $16256,15 \pm 4701,66 \mu\text{m}^2$ ve tersiyer follikülün ortalama alan ölçümü $91403,97 \pm 17726,22 \mu\text{m}^2$ olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir sonuç bulunamamıştır (Şekil 4.40 ve 41).

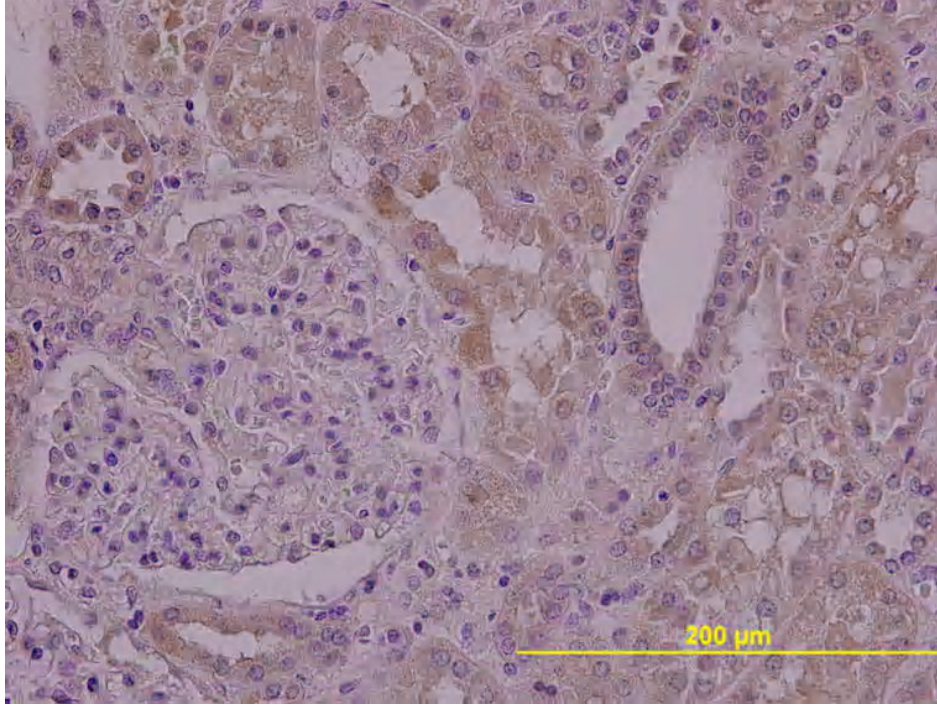


Şekil 4. 40: Primordial ve primer follikül alanlarının gruplar arasında dağılımı

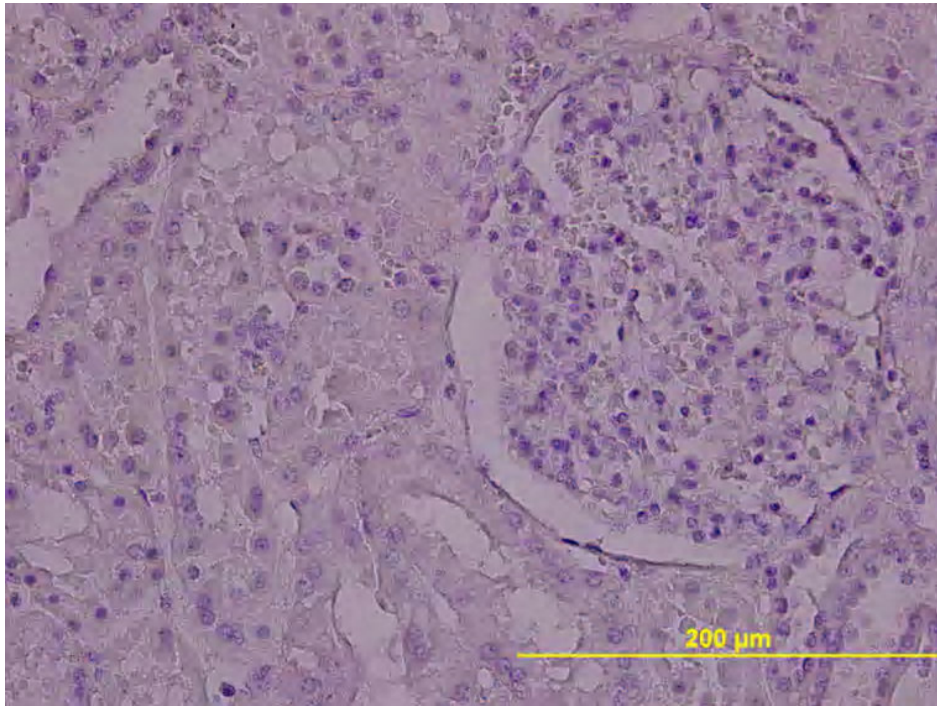


Şekil 4. 41: Sekonder ve tersiyer follikül alanlarının gruplar arasında dağılımı

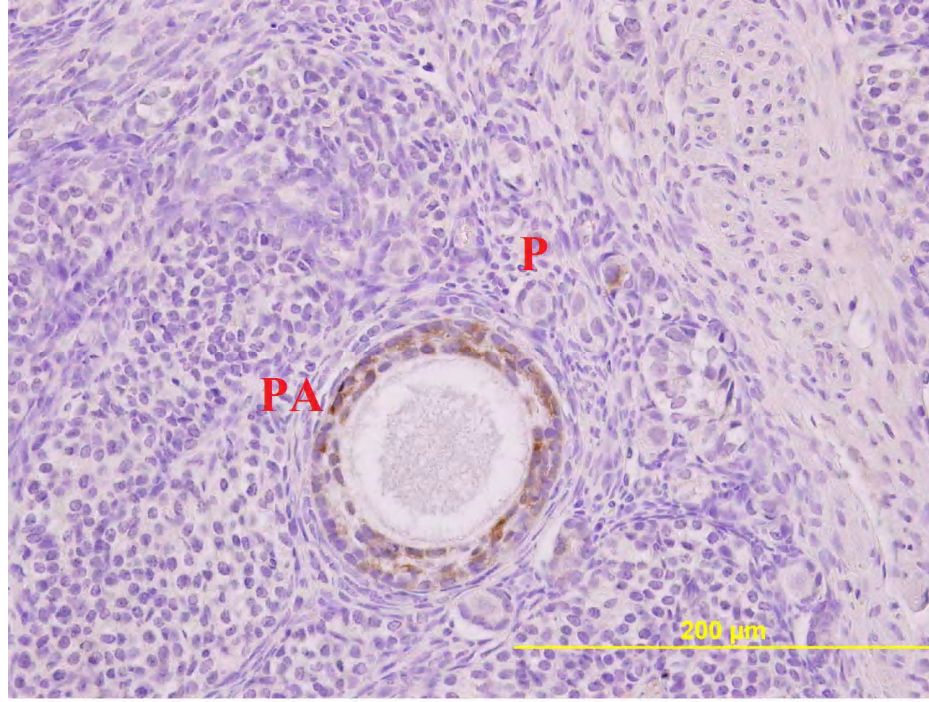
Kontrol grubuna ait kesitlerde immunohistokimyasal boyama yöntemi ile AMH ekspresyonu primer ve preantral folliküllerin granüloza hücrelerinde belirlendi. Fakat orta ve geniş çaplı antruma sahip olan folliküllerde AMH ekspresyonunda azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 4.44 ve 45). Sekonder folliküllerde yalnızca oositi çevreleyen granüloza hücrelerinde AMH ekspresyonu gözlenirken, tersiyer folliküllerde kumulus ooforus bölgesinde AMH ekspresyonu mevcuttu (Şekil 4.46). Bütün gruplarda granüloza hücrelerindeki immunohistokimyasal boyama sitoplazmada belirginken, granüloza hücrelerinin çekirdekleri AMH antikoru için negatif boyanma gösterdi. MXC uygulanan ovaryumlar; kontrol grubu ovaryumlar ile karşılaştırıldığında daha güçlü AMH ekspresyonu olduğu belirlendi. Düşük doz grubunda MXC uygulamasına bağlı olarak primer, preantral ve küçük antral folliküllerde immunohistokimyasal boyama kontrol grubuna göre daha yoğun olarak gözlemlendi (Şekil 4.47). Ayrıca sekonder ve tersiyer folliküllerde oositi çevreleyen birkaç sıra granüloza hücre tabakasında AMH ekspresyonunda, kontrol grubuna göre artış olduğu belirlendi (Şekil 4.48 ve 49). Orta ve yüksek doz MXC uygulanan gruplarda primer, preantral ve küçük antral folliküllerde AMH ekspresyonu daha yoğun olarak gözlenirken, sekonder ve tersiyer folliküllerdeki granüloza hücrelerinin tamamında immunohistokimyasal boyanma belirlendi (Şekil 4.50,51,52,53,54 ve 55). Hem kontrol hem de deney grubundaki oosit yapısında, primordial ve atretik folliküllerde AMH ekspresyonuna rastlanmadı. Negatif kontrol ovaryumlarda hiçbir şekilde pozitif immünereaktivite belirlenmedi.



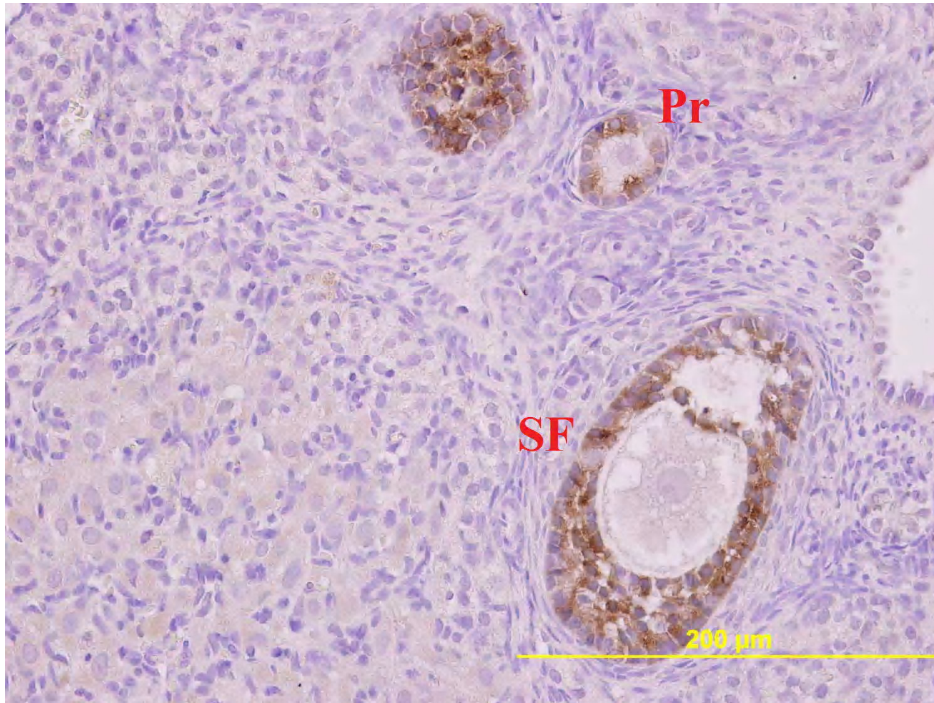
Şekil 4. 42: İnsan böbrek dokusunda AMH antikoruna ile immunohistokimyasal boyama (pozitif kontrol) (X40)



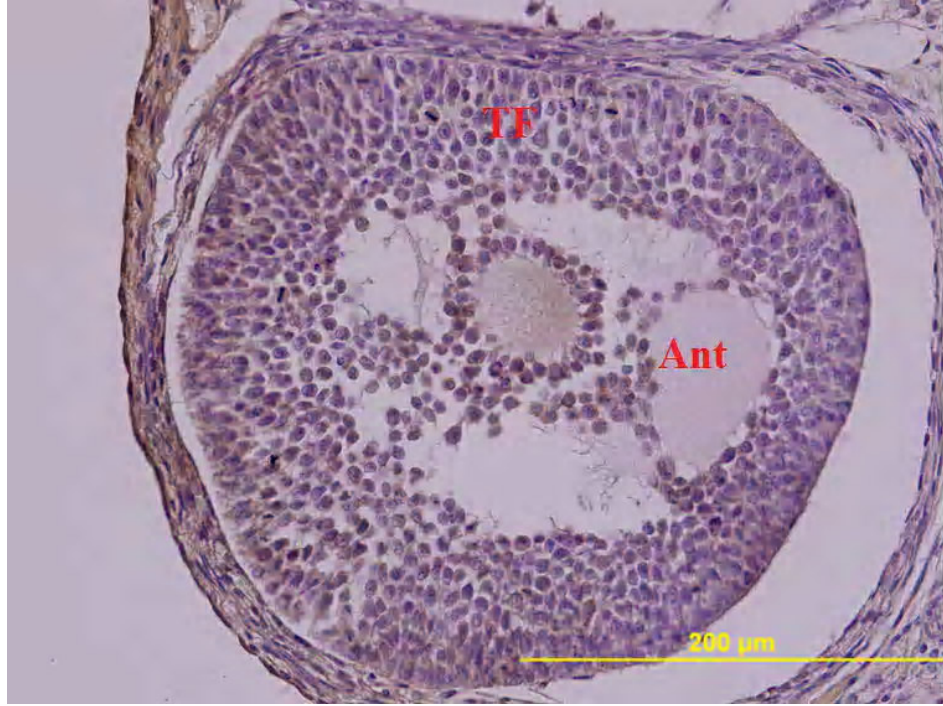
Şekil 4. 43: İnsan böbrek dokusunda immunohistokimyasal boyama (negatif kontrol) (X40)



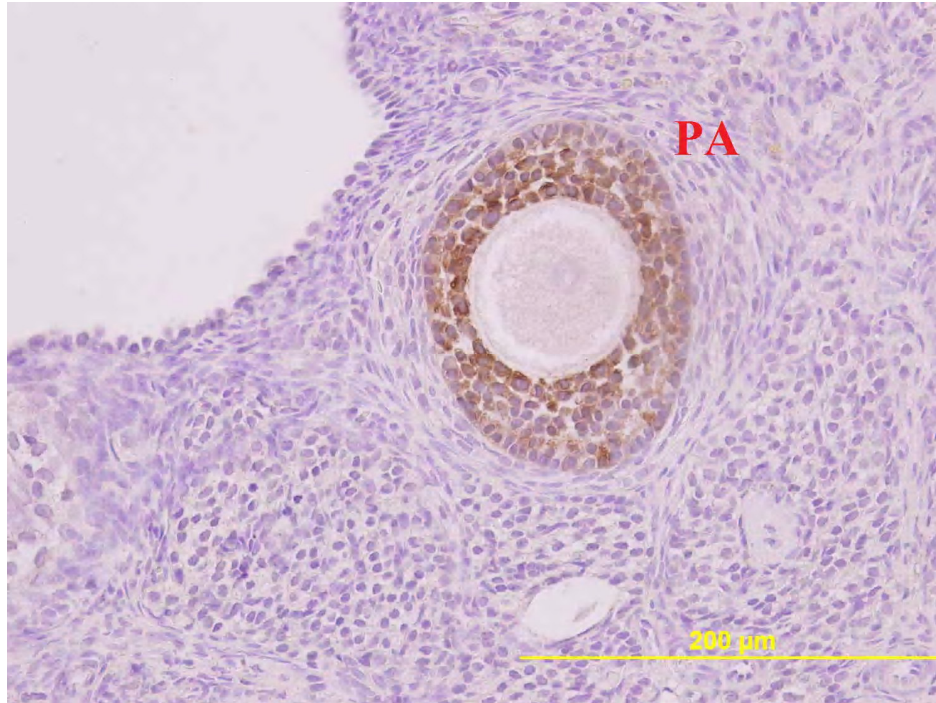
Şekil 4. 44: Kontrol grubuna ait immunohistokimyasal boyamada primordial (P) ve preantral follikül (PA) (X40)



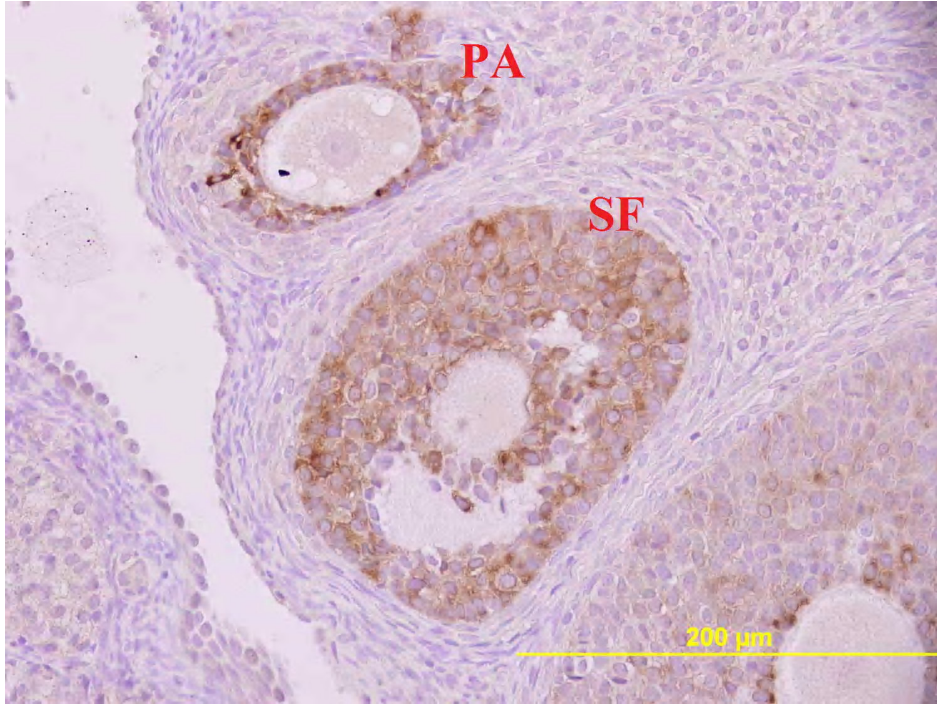
Şekil 4. 45: Kontrol grubuna ait immunohistokimyasal boyamada sekonder (SF) ve primer follikül (Pr) (X40)



Şekil 4. 46: Kontrol grubuna ait immunohistokimyasal boyamada tersiyer follikül (TF) ve antrum (Ant) (X20)



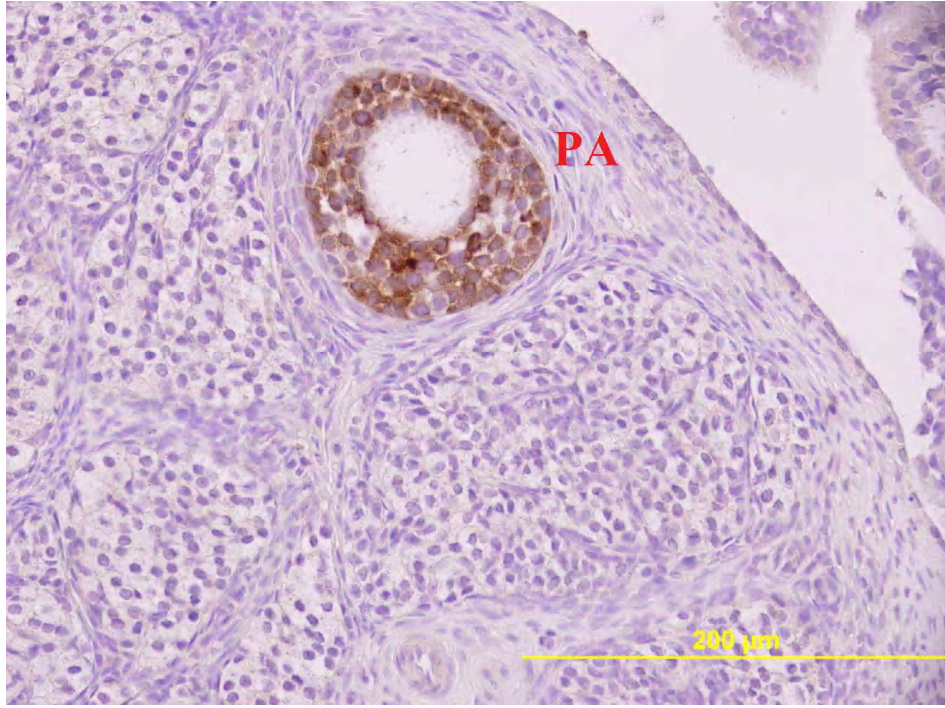
Şekil 4. 47: Düşük doz grubuna ait immunohistokimyasal boyamada preantral (PA) follikül (X40)



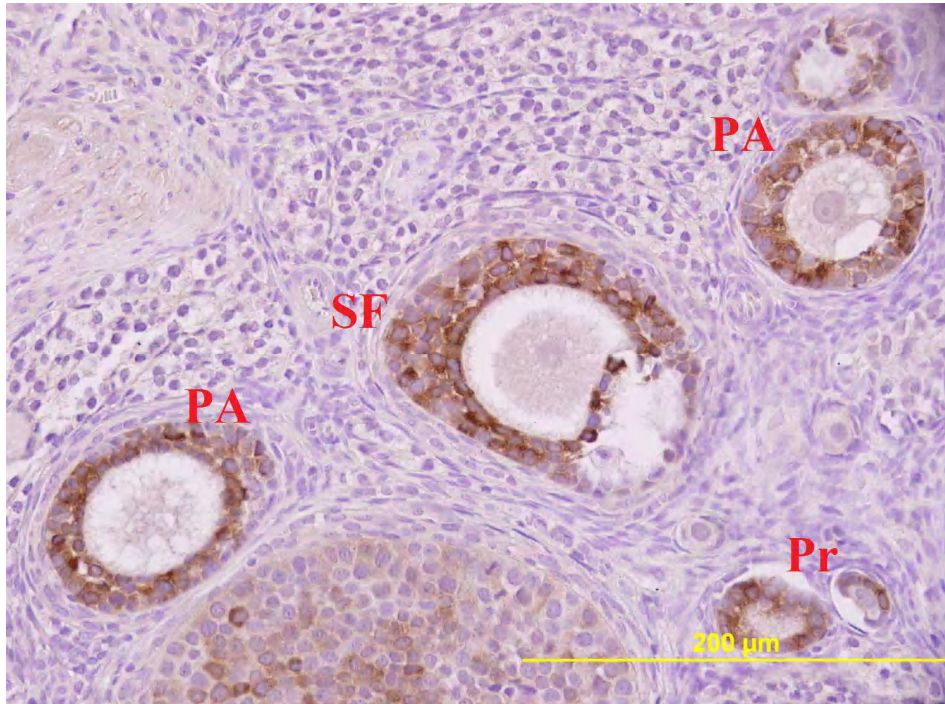
Şekil 4. 48: Düşük doz grubuna ait immunohistokimyasal boyamada preantral (PA) ve sekonder follikül (SF) (X40)



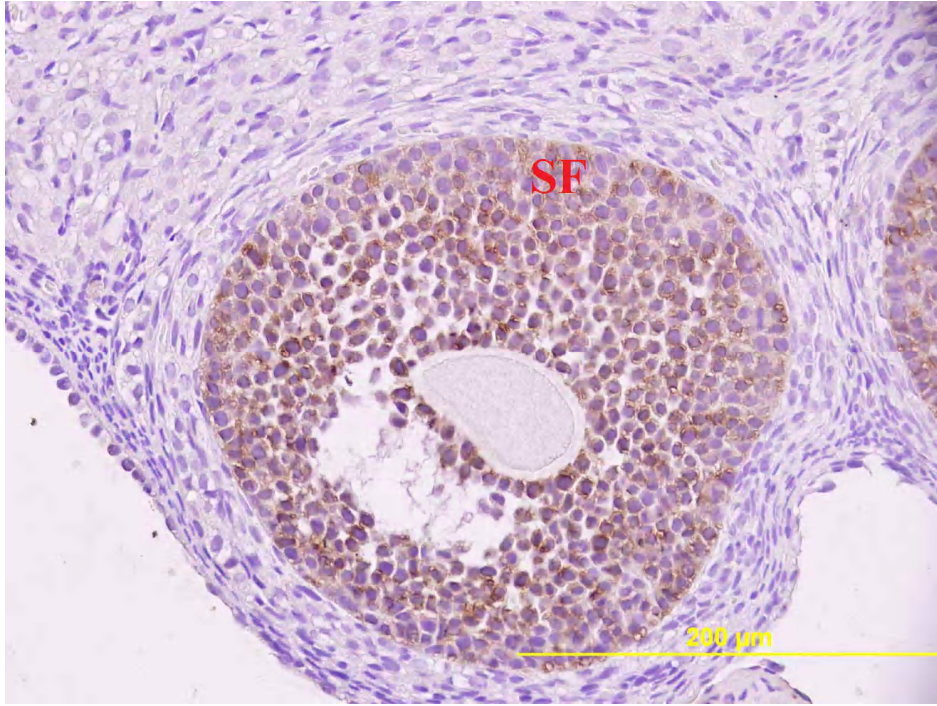
Şekil 4. 49: Düşük doz grubuna ait immunohistokimyasal boyamada tersiyer follikül (TF) (X40)



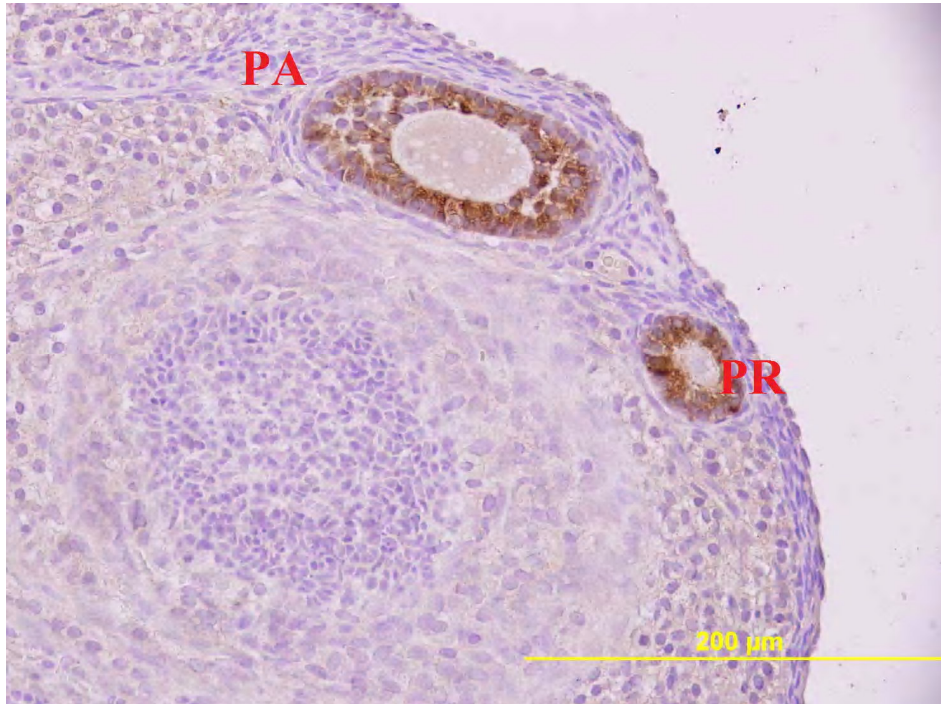
Şekil 4. 50: Orta doz grubuna ait immunohistokimyasal boyamada preantral follikül (PA) (X40)



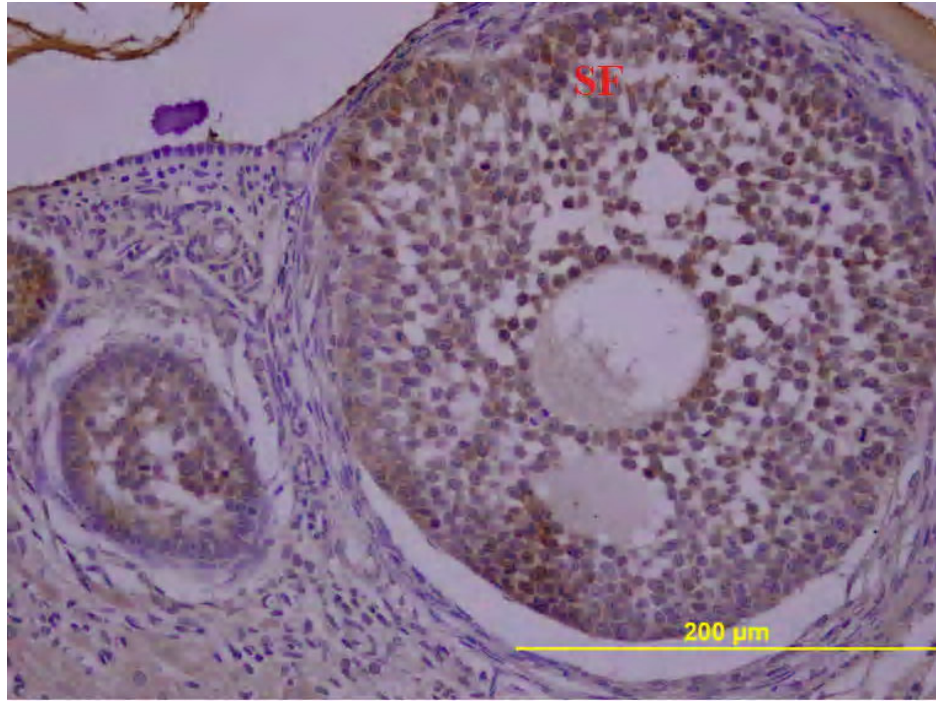
Şekil 4. 51: Orta doz grubuna ait immunohistokimyasal boyamada primer (Pr), preantral (PA) ve sekonder follikül (SF) (X40)



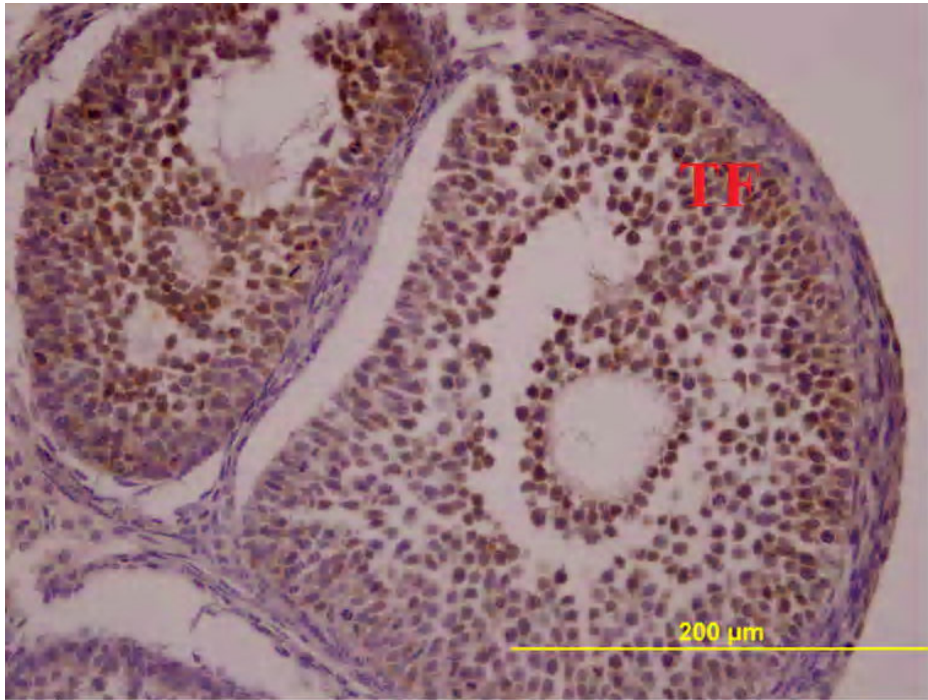
Şekil 4. 52: Orta doz grubuna ait immunohistokimyasal boyamada sekonder follikül (SF) (X40)



Şekil 4. 53: Yüksek doz grubuna ait immunohistokimyasal boyamada primer follikül (PR), preantral follikül (PA) (X40)



Şekil 4. 54: Yüksek doz grubuna ait immunohistokimyasal boyamada sekonder follikül (SF)(X40)



Şekil 4. 55: Yüksek doz grubuna ait immunohistokimyasal boyamada tersiyer follikül (TF) (X40)

5. TARTIşMA VE SONUÇLAR

AMH, inhibin ve aktivin gibi glikoproteinlerinin dâhil olduğu TGF- β ailesinin bir üyesidir (5). Bu ailenin üyeleri mezankimal epitelyal etkileşimlerde, hücre büyümesinde, ekstrasellüler matriks üretiminde ve dokunun yeniden yapılanmasında önemli rol oynamaktadır. AMH primordiyal folliküllerin pregranuloza hücrelerinde salgılanmamaktadır. Primordiyal folliküller, büyüme havuzuna alındığında granüloza hücreleri AMH üretmeye başlamaktadır. En fazla AMH ekspresyonu büyük preantral ve küçük antral folliküllerin granüloza hücrelerinde gözlenmektedir (6, 138, 139). Serum AMH düzeyi menstruel siklus (139) ve gebelik boyunca (123) önemli derecede değişmediği için klinik çalışmalarda, ovaryum rezervinin değerlendirilmesinde, granüloza hücreli tümörlerin saptanması ve takibinde, puberta prekoks ve gecikmiş pubertanın tanınmasında, kriptoorşit ve anorşit tanısında, her yaşta erkek gonad fonksiyonunun değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (5, 6).

Çevresel endokrin bozucular endokrin sistemin fonksiyonlarını etkileyen sentetik ve doğal maddelere verilen ortak addır (8). Endokrin bozucuların etkileri; endokrin bozucu ile karşılaşma yaşına, süresine, miktarına, tek veya karışım şeklinde bulunma durumuna göre değişebilmektedir. Bu maddelerin değişik mekanizmalar ile antioksidan enzimleri inhibe ettiği ve ortamda reaktif oksijen radikallerinin artmasıyla apoptotik hücre ölümüne neden oldukları düşünölmektedir (132). Apoptotik hücre ölümlerinin temel yollarından birisi oksidatif strestir (135). Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerin etkilerini ortadan kaldırabilmektedirler. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme, bu dengenin bozulmasına

neden olur. ‘Oksidatif stres’ olarak adlandırılan bu durum serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte ve sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (140, 141). Bazı endokrin bozucuların ise hormonal aksı etkilemeden üreme organlarında apoptozise neden olarak gonad fonksiyonlarını bozdukları tespit edilmiştir. Endokrin bozucuların insan sağlığı üzerine etkileri incelendiğinde özellikle üreme sisteminde değişik mekanizmalarla birçok patolojiye yol açtığı görülmüştür (17).

MXC endokrin bozucu olduğu bilinen bir pestisittir (8) ve canlıda östrojen reseptörü için düşük afiniteye sahiptir (21). Dişi kemirgenlerde MXC, ovaryum atrofisine (27), ovaryum hücrelerinin sentez yeteneğinde düşüğe (142-144) ve follikülogeneze etki ettiği belirlenmiştir (21). Dişilerde meydana getirdiği etkilerin yanında, MXC erkek sıçanlarda üreme davranış ve fonksiyonlarını bozan bir maddedir (145). MXC’nin erkek üreme sistemi üzerinde oksidatif strese neden olduğu ve testis, epididimis ve spermin antioksidan özelliklerini değiştirdiği ifade edilmiştir (146-148). Ayrıca, erkek koyun ve sıçanlarda yapılan çalışmalarda testis, prostat ve seminifer tübüllerin ağırlığında azalma, düzensiz spermatogeneze (23, 24) ve seksüel uyarımda azalmaya (149) neden olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada, tarımda yoğun olarak kullanılan MXC’nin önemli bir oksidatif stres kaynağı olduğu göz önüne alınarak, farklı dozlarda MXC uygulaması sonucu granüloza hücrelerinden salgılanan AMH ekspresyonu üzerine etkisini belirlemek ve germinal epitel kalınlığı ile folliküllerin büyüklüğü üzerine etkisini tespit etmek amaçlanmıştır.

Oksidatif stres oluşturduğu bilinen MXC’nin ovaryum yapısı ve fonksiyonları üzerine etkisini inceleyen çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda farklı dozlarda ve farklı sürelerde MXC uygulamaları yapılmıştır.

Doğum öncesi bir hafta ve doğum sonrası 6 hafta boyunca oral yolla MXC’ye (5-150 mg/kg/gün) maruz kalmanın dişi sıçanlarda ovaryum fonksiyonlarını ve fertilitiyi etkilediği gösterilmiştir. Yapılan bu çalışmalarda bütün dozların vajinal açılma yaşını azalttığı (34, 35) ve yüksek doz MXC uygulanan gruplarda östrus siklusunda düzensizlikler meydana getirdiği, hamilelik oranını ve yaşayan yavru sayısını azalttığı ifade edilmiştir (34, 141). Armenti et al. (33) yaptığı çalışmada, kısa dönem (12 gün) ve yüksek dozda MXC’ye (20-100 µg/kg/gün) maruz kalan sıçanlarda puberta yaşının hızlandığı, östrus siklusunda düzensizlikler meydana geldiği ve gebelik oranının

düştüğü görülmüş, fakat düşük doz MXC'ye maruz kalan sıçanlarda hiçbir değişiklik olmadığı ortaya çıkmıştır. Kısa dönem (14 gün) ve düşük dozda (0,05-1,0 mg/kg/gün) MXC'ye maruz kalma sonucunda neonatal dönemdeki dişi kemirgenlerde ovaryum atrofisine ilaveten, erken vajinal açılma ve düzensiz östrus siklusuna yol açtığını ifade edilmiştir (27). Emzirme dönemi boyunca MXC (50 mg/kg/gün) verilen hayvanların yavrularında vajinal açılmanın hızlandığı, doğurganlığın azaldığı ve kontrol grubu sıçanlar ile karşılaştırıldığında üremeye karşı duyarsızlığın geliştiği gözlenmiştir (21). Yapılan çalışmalara benzer olarak yapılan bu çalışmada da, deneye başlamadan önce düzenli östrus siklusuna sahip olanlar belirlenmiş, 10 günlük (8-32 mg/kg/gün) MXC uygulamasının ardından vajinal smear yönteminde gözlenen hücrelerin yapısında bir değişiklik olmamasına rağmen, östrus siklusunda düzensizlikler görülmüştür. Bu durum, düşük dozda dahi olsa MXC'nin sıçanlarda östrus siklusunda düzensizlikler oluşturduğunu göstermektedir.

Bazı araştırmalarda dişi sıçanlarda doğum öncesi bir hafta ve doğum sonrası 6 hafta boyunca oral yolla MXC'ye (5-150 mg/kg/gün) maruz kalmanın ovaryum ve uterus ağırlığını düşürdüğü, korpus luteum sayısında azalmaya neden olduğu ortaya çıkmıştır (34, 35). Kısa dönem (14 gün) ve düşük dozda MXC'nin (0,05-1,0 mg/kg/gün) verildiği başka bir çalışmada (27), neonatal dönemdeki dişi kemirgenlerde ovaryum ağırlığında düşüş, korpus luteum sayısında ve süperovulasyon kapasitesinde azalma olduğu görülmüştür. Uzumcu ve ark. (29) in vivo olarak yeni doğan sıçanlarda yaptığı çalışmada, 8 gün boyunca farklı dozlarda MXC (1, 10, 50, 100 ve 500 mg/kg/gün) uygulaması yapılmıştır. Değişik dozda MXC uygulamasının canlı ağırlığında bir farklılık oluşturmadığı belirtilmiştir. Özellikle 50, 100, 500 mg/kg/gün MXC uygulanan gruplarda ovaryum ağırlığında ve boyutunda ise azalma gözlenmiştir.

Bizim çalışmamızda diğer çalışmaların sonuçlarına benzer olarak, düşük dozda ve kısa süreli MXC uygulaması sonucunda deney ve kontrol grubu sıçanların vücut ağırlıkları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü. Ancak kontrol grubuna oranla deney grubunda ovaryum ağırlığında düşüş olduğu belirlendi. Bu bulgular doğrultusunda toksikanta maruziyetin, ovaryum ağırlığında azalmaya yol açtığı ve bunun atretik folliküllerin sayısındaki artıştan kaynaklanmış olabileceği düşünülebilir.

Ovaryumda hem ER β hem de ER α eksprese edilir (150). ER α 'nın ekspresyonu postnatal günlerde başlar ve yaş ile yoğunlaşarak devam eder (151). ER α ekspresyonu

ovaryumun germinal epitelinde gözlenirken (152), ER β 'nin ekspresyonu büyüyen folliküllerin granüloza hücrelerinde gerçekleşmektedir (153, 154). Shanle et al. yaptıkları çalışmada, MXC'nin östrojenik aktivite gösterdiği, bu etkinin de hem ER β hem de ER α 'dan doğrudan etkilendiği sonucu ortaya çıktığı belirtilmiştir (155). Bu farklı alanlardaki 2 östrojen reseptör alt tipinin farklı ekspresyonu, MXC'nin niçin hem folliküllerde atreziye neden olduğunu hem de yüzey epitelinde kalınlaşma meydana getirdiğini açıklar. Bai et al. (153) ile Choi et al. (154) yaptıkları çalışmalarda, MXC'nin etkisinin doğrudan antral folliküllerde atreziye ve germinal epitel üzerine etkisi ile ya da endojen hormonlarının üzerine dolaylı etkisi ile ortaya çıktığını belirtmişlerdir.

In vivo olarak 20 gün boyunca 8-16-32 mg/kg/gün MXC'ye maruz kalan farelerde ER'nin etkilenmesi sonucunda ovaryum yüzey epitelinin kalınlığında artış olduğu ifade edilmiştir (28). Tavşanlar üzerinde yapılan in vitro bir çalışmada ise, MXC'nin endojen hormonların indirek yolla ovaryum epitelinin proliferasyonuna yol açtığı ve östrojenin ovaryum yüzey epitelinin proliferasyonuna neden olduğu belirtilmiştir (153). Başka bir çalışmada (156) da, MXC'nin ovaryum epitelinin boyunda artışa sebep olduğu bildirilmiş ve bunun östrojen tarafından meydana gelebileceği öne sürülmüştür. Diğer çalışmalardan farklı olarak bu çalışmada tunika albugineanın kalınlığı da ölçülmüş ve deney grubuna ait bütün dozlarda bağ dokusu yapısında kalınlaşma meydana geldiği gözlenmiştir. Tunika albugineadaki kalınlaşmanın ovulasyonun gerçekleşmesini zorlaştırabileceği göz önünde tutulmalıdır. Toksikant olan MXC'nin hormon seviyesini etkileyerek germinal epitelde kalınlaşma meydana getirmiş olması, ilerleyen dönemlerde ovaryum kanser riskini düşündürebilir.

Yapılan çalışmalarda MXC uygulamasının superovulator yanıtı azalttığı, progesteron seviyesinde azalma ve serum LH seviyesinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (33, 141). Armenti et al. (33) yaptıkları çalışmada, yüksek dozda MXC uygulamasının serum LH seviyesini artırdığı ve follikül kompozisyonu ile korpus luteum sayısını azalttığı ifade edilmiştir. Diğer çalışmalara benzer olarak Borgeest et al. (157) da 20 gün süreyle MXC'ye (8-64 mg/kg/gün) maruziyetin progesteron seviyesini azalttığını, fakat serum FSH değerinde ve overdeki FSH seviyesinde değişikliğe neden olmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmaların aksine in vitro ortamda 10 μ M, 0,1-1,0 μ g/ml MXC'ye 48 saat maruz kalan domuzların granüloza hücrelerinde bazal FSH ve östrojen

seviyesinde azalma olduğu ifade edilmiştir (143, 158). Benzer bir çalışmada da FSH'nın erken antral follikül gelişiminde önemli olduğu ve MXC uygulamasının FSH seviyesini değiştirdiği bildirilmiştir (159).

Uzumcu ve ark. yaptıkları çalışmada ise, 8 gün boyunca farklı dozlarda MXC (1, 10, 50, 100 ve 500 mg/kg/gün) uygulaması sonucunda, Western blot çözümleme verilerine göre AMH seviyesinde artış olduğu belirlenmiştir (29). Bizim çalışmamızda da, MXC'nin bütün dozlarında serum AMH seviyesinde artışa neden olduğu belirlendi. Elde edilen ortalama FSH (kontrol grubu 0.32 ± 0.08 , düşük doz grubu 0.17 ± 0.03 , orta doz grubu 0.20 ± 0.06 , yüksek doz grubu 0.27 ± 0.04) değerlerinde düşüş gözlenmesine rağmen, sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda MXC'nin doğrudan granüloza hücreleri üzerine etkisi olduğunu, fakat doğrudan hipofizi etkilemediği düşünülebilir.

Organoklorin pestisid olan metoksiklorun reaktif oksijen radikallerini artırdığı ve buna bağlı olarak da overlerde antral folliküllerin büyümesinde yavaşlama ile atretik folliküllerdeki artışın oksidatif strese bağlı olduğu ileri sürülmüştür (25). Ovaryumların toksikantlara maruz kalması sonucunda primer veya preantral folliküllerin tahrip olduğu ve follikül havuzunun yenilenememesinden dolayı da kalıcı infertilite meydana geldiği bildirilmiştir (160).

Bu bilgiler ışığında, MXC'nin ovaryum follikülleri üzerindeki etkisini belirlemek için hem in vivo hem de in vitro çalışmalar yapılmıştır. Çiftleşmeden 14 gün önce yüksek dozda MXC'ye (200 mg/kg/gün) maruz kalma sonucunda infertilite meydana geldiği ifade edilmiştir. Aynı çalışmada endometrial stromada desidualizasyon, folliküllerde atrezi ve düzensiz korpus luteum yapıları meydana geldiği gözlenmiştir (8). Toksikantın etkisine bağlı olarak yapılan çalışmalarda, gebelik sayısında azalma (161) ve ölü fetus sayısında artış olduğu ileri sürülmüştür (162). MXC'nin piknotik granüloza hücrelerinde artış (144, 161) meydana getirdiği, ayrıca da yüksek dozda MXC (200 mg/kg/gün) uygulamasının teka ve interstitial hücrelerde lipid birikimine neden olduğu ifade edilmiştir (144, 163).

In vivo yapılan çalışmada da, sıçanlara 8 gün boyunca farklı dozlarda MXC (1, 10, 50, 100 ve 500 mg/kg/gün) uygulaması sonucunda antral follikül sayısında azalma meydana geldiği, fakat diğer folliküllerde bir değişikliğin olmadığı görülmüştür. Aynı çalışmada MXC'nin follikülleri çevreleyen granüloza hücrelerini doğrudan etkilediği ve AMH

ekspresyonunda artış olduğunu ifade edilmiştir. Sadece düşük doz MXC uygulanan grupta AMH ekspresyonunda artışın oluşmadığı gözlenmiştir (29). Ikeda et al. (26) yaptıkları çalışmada ise, MXC uygulaması, ovaryum boyutunda ve ağırlığında azalmaya neden olurken, preantral folliküllerin sayısında da artış meydana getirdiği, ancak antral follikül sayısında azalma olduğu gözlenmiştir. Kısa dönem (14 gün) ve düşük dozda (0,05-1,0 mg/kg/gün) MXC'ye maruz kalan neonatal dönemdeki dişi kemirgenlerde, ovaryum atrofisinin yanı sıra, korpus luteum sayısında ve süperovulasyon kapasitesinde azalma, atretik folliküllerde artış ve folliküler kistler meydana geldiği gözlenmiştir (27).

Farelerde yapılan in vivo bir çalışmada da, MXC (8-64 mg/kg/gün) uygulanmasının ovarum yüzeyindeki ER β ekspresyonunda azalmaya ve granüloza hücrelerinde ölüme neden olduğu ifade edilmiştir. Yapılan çalışmalarda MXC'nin erken ovaryum gelişimi, folikülogenezis ve ovaryum fonksiyonuna etki ettiği (157), antral follikül atrezisinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (33). In vivo olarak yapılan başka bir çalışmada da, 20 gün boyunca farklı dozlarda MXC'nin farelerde ovaryum atrezisine ve atretik follikül sayısında artışa neden olduğu, fakat primordial, primer ve preantral follikül sayısında da bir değişikliğe yol açmadığı ifade edilmiştir (28).

Farelerin antral follikülleri üzerinde yapılan in vitro çalışmada ise, 24-96 saat MXC (1-100 μ g/ml) verilen farelerde antral follikül atrezisinde artış olduğu ve bunun Bcl-2 ve Bax (164), oksidatif stres (25) ve östrojen (165, 166) mekanizmaları ile gösterilebileceği belirtilmiştir. Tavşanlar üzerinde in vitro yapılan diğer bir çalışmada da MXC'nin atretik antral follikül sayısını artırdığı kanısına varılmıştır (153). Ovaryum atrezisinin düzenlenmesinde iki önemli aile Bcl-2 (anti-apoptotik faktör) ve Bax (pro-apoptotik faktör) etkili olduğu (167, 168) ve MXC'nin Bcl-2 ailesinde meydana getirdiği değişikliklerin tam olarak bilinmediği, sadece ER aracılığı ile Bcl-2'nin regülasyonunu etkilediği ifade edilmiştir (169).

Bu çalışmada da, özellikle orta ve yüksek dozda MXC verilen gruplarda atretik antral follikül sayısında artışla birlikte, hem oosit yapısında bozulma, hem de folliküllerde piknotik granüloza hücreleri gözlemlendi. Düşük doz MXC verilen grupta, oksidatif stres sonucunda ovaryumda çok ciddi değişimlerin oluşmamasının serbest radikallerin oluşum hızı ve bunların antioksidanlar tarafından nötralize edilme hızı arasındaki dengeden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Orta ve yüksek doz MXC verilen gruplarda ise, dengenin serbest radikaller lehine bozulduğu ve oksidatif stresin daha

yavaş nötralize edildiği, hücrelerde serbest radikallerin artışına bağlı olarak oksidatif hasar meydana geldiği söylenebilir. Ovaryumdaki folliküllerin çap ve hacim ölçülerine bakıldığında; deney ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılık ortaya çıkmamış, diğer bir ifade ile MXC'nin follikül çaplarına ve hacmine bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. Benzer diğer çalışmalarda, MXC'nin verilen gruplarda hem teka hem de interstitial hücrelerde lipid birikiminin olduğu (163, 144) bildirilirken, bu çalışmada sadece interstitial hücrelerde lipid birikiminin olduğu gözlenmiştir. AMH ekspresyonunu belirlemek için yapılan immünohistokimyasal boyama sonucunda; MXC uygulamasının granüloza hücrelerini etkilediği ve buna bağlı olarak sekonder ve tersiyer folliküllerde AMH ekspresyonunda artış olduğu belirlenmiştir.

Çalışmanın temelini oluştururken AMH'nun atretik folliküllerden sentezlenmediğini, primer folliküllerde başladığı ve preantral folliküllerde maksimum düzeye ulaştığı belirlenmiştir. MXC uygulaması sonucu diğer çalışmalara paralel olarak atretik folliküllerin sayısında artış olduğu belirlendi. Bunun yanında yapılan çalışmada hem ELISA sonuçları hem de immünohistokimya sonuçlarında AMH seviyesinde artış gözlemlendi. Bu artışın granüloza hücrelerinin sayısına bağlı olmadığı belirlendi. Granuloza hücrelerinde mitoz ile hücre artışının hızlanıp hızlanmadığını belirlemek için özellikle follikül çapı ve hacim ölçümleri yapıldı. Sonuçta deney ve kontrol grupları arasında çap ve alan ölçümleri bakımından anlamlı bir değişiklik olmadığı belirlendi. Bu da bizi oksidatif strese AMH artışının sebebinin doğrudan ER β 'nın etkilenmesine bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Bu artışın, yalnızca primer ya da preantral folliküllerde değil aynı zamanda sekonder ve tersiyer folliküllerdeki granüloza hücrelerinde de AMH ekspresyonunun varlığı ile ilişkili olduğu kabul edilebilir.

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen bulgular tarımda kullanılan MXC'nin, ovaryum gelişimi üzerine bir gelişim bozukluğuna neden olabildiğini göstermektedir. Her ne kadar uzun zamandır pestisitlerin üreme organları üzerindeki etkisi konusunda farklı çalışmalar yapılmış olsa da, ovaryumda meydana gelen pek çok karmaşık işlemin daha iyi anlaşılması için, elde edilen bulgulara ek olarak; fiziksel stereoloji ve immunofluoresan çalışmalardan elde edilecek verilerle birlikte ele alınmasının literatür bilgilerine daha çok katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Zackrisson U, Mikuni M, Wallin A, et al. Ovary and ovulation: Cell-specific localization of nitric oxide synthases (NOS) in the rat ovary during follicular development, ovulation and luteal formation. *Hum Reprod* 1996; 11: 2667-2673.
2. Pepling ME, Spradling AC. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Developmental Biology* 2001; 234: 339–351.
3. Dong J, Albertini DF, Nishimori K, et al. Growth differentiation factor–9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996; 383: 531–535.
4. Durlinger AL, Kramer P, Karels B, et al. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 1999; 140: 5789–5796.
5. Teixeira J, Maheswaran S, Donahoe PK. Mullerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr Rev.* 2001; 22: 657-674.
6. Gruijters MJ, Visser JA, Durlinger Al, et al. Antimüllerian hormone and its role in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 211: 85-90.
7. Mulders AG, Laven JS, Eijkemans MJ, et al. Changes in anti-Müllerian hormone serum concentrations over time suggest delayed ovarian ageing in normogonadotrophic anovulatory infertility. *Human Reproduction* 2004; 19: 2036–2042.

8. Cummings AM. Methoxychlor as a model for environmental estrogens. *Crit Rev Toxicol* 1997; 27: 367–379.
9. Bigsby R, Chapin RE, Daston GP et al. Evaluating the effects of endocrine disruptors on endocrine function during development. *Environ Health Perspect* 1999; 107: 613-618.
10. Solomon GM, Schettler T. Environment and health. 6. Endocrine disruption and potential human health implications. *Canadian Medical Association Journal* 2000; 1116: 1467-1474.
11. Lee MM. Endocrine Disruptors. A Current Review of Pediatric Endocrinology 2007; 109–118.
12. Kelce WR, Wilson EM. Antiandrogenic Effects of Environmental Endocrine Disruptors. In: Metzler M (ed). *The Handbook of Environmental Chemistry, Endocrine Disruptors Part 1*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2001: 39–61.
13. Metzler M, Pfeiffer E. Chemistry of Natural and Anthropogenic Endocrine Active Compounds. In: Metzler M (ed). *The Handbook of Environmental Chemistry, Endocrine Disruptors Part 1*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2001: 63-80.
14. Gray LE Jr, Wilson VS, Stoker T et al. Adverse effects of environmental antiandrogens and androgens on reproductive development in mammals. *Int J Androl* 2006; 29: 96–104.
15. Weuve J, Sanchez BN, Calafat AM et al. Exposure to phthalates in neonatal intensive care unit infants: urinary concentrations of monoesters and oxidative metabolites. *Environ Health Perspect* 2006; 114: 1424-31.
16. Kuwada M, Kawashima R, Nakamura K, et al. Study of neonatal exposure to androgenic endocrine disruptors, testosterone and dihydrotestosterone by normal-phase. HPLC *Biomed Chromatogr* 2006; 20:1237–1241.
17. Massart F, Parrino R, Seppia P, et al. How do environmental estrogen disruptors induce precocious puberty? *Minerva Pediatr* 2006; 58: 247-54.
18. McLachlan JA, Simpson E, Martin M. Endocrine disruptors and female reproductive health. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006; 20: 63-75.
19. Ward WE, Thompson LU. Dietary Estrogens of Plant and Fungal Origin: Occurrence and Exposure. In: Metzler M (ed). *The Handbook of Environmental*

- Chemistry, Endocrine Disruptors Part 1. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2001: 101-128.
20. Wauchope, RD, Butler TN, Hornsby AG, et al. The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision-making. *Rev Environ Contam Toxicol* 1992; 123: 1–155.
 21. Hall DL, Payne LA, Putnam JM, et al. Effect of methoxychlor on implantation and embryo development in the mouse. *Reprod Toxicol* 1997; 11: 703–708.
 22. Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, et al. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit* 2004; 10: 141-147.
 23. Bal HS. Effect of methoxychlor on reproductive systems of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1984; 176: 187–196.
 24. Jackson CJr, Lindahl IL, Reynolds P, et al. Effects of methoxychlor and malathion on semen characteristics of rams. *J Anim Sci* 1975; 40: 514–517.
 25. Gupta R, Schuh R, Fiskum G et al. Methoxychlor causes mitochondrial dysfunction and oxidative damage in the mouse ovary. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006b; 216: 436–445.
 26. Ikeda Y, Nagai A, Ikeda MA, et al. Neonatal estrogen exposure inhibits steroidogenesis in the developing rat ovary. *Developmental Dynamics* 2001; 221: 443–453.
 27. Eroschenko VP, Abuel-Atta AA, Grober MS. Neonatal exposures to technical methoxychlor alters ovaries in adult mice. *Reprod Toxicol* 1995; 9: 379–387.
 28. Borgeest C, Symonds D, Mayer LP, et al. Methoxychlor may cause ovarian follicular atresia and proliferation of the ovarian epithelium in the mouse. *Toxicol Sci* 2002; 68: 473–478.
 29. Uzumcu M, Kuhn JE, Armenti AE, et al. Early postnatal methoxychlor exposure inhibits folliculogenesis and stimulates anti-Mullerian hormone production in the rat ovary. *J Endocrinol* 2006; 191: 549–558.
 30. Cummings AM, Laskey J. Effect of methoxychlor on ovarian steroidogenesis: role in early pregnancy loss. *Reprod Toxicol* 1993; 7: 17–23.
 31. Suzuki M, Lee HC, Chiba S et al. Effects of methoxychlor exposure during perinatal period on reproductive function after maturation in rats. *J Reprod Dev* 2004; 50: 455–461.

32. Walters LM, Rourke AW, Eroschenko VP. Purified methoxychlor stimulates the reproductive tract in immature female mice. *Reprod Toxicol* 1993; 7: 599–606.
33. Armenti AE, Zama MA, Passantino L, et al. Developmental methoxychlor exposure affects multiple reproductive parameters and ovarian folliculogenesis and gene expression in adult rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 233: 286–296.
34. Gray Jr. LE, Ostby J, Ferrell J, et al. A dose–response analysis of methoxychlor-induced alterations of reproductive development and function in the rat. *Fundam Appl Toxicol* 1989; 12: 92–108.
35. Chapin RE, Harris MW, Davis BJ, et al. The effects of perinatal/juvenile methoxychlor exposure on adult rat nervous, immune, and reproductive system function. *Fundam Appl Toxicol* 1997; 40: 138–157.
36. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi*, 4. Baskı, Güneş Kitapevi, İstanbul, 2006: 196-225.
37. Eşrefoğlu M, Genel ve Özel Histoloji, Pelikan Tıp ve Teknik Kitapçılık, Ankara, 2004: 356.
38. Solomon EP. *İnsan Anatomisi ve Fizyolojisine Giriş*, Süzen LB. (Edt), Birol Basın Yayın Dağıtım, İstanbul, 2000: 274.
39. Gövsa F. *Sistematik Anatomi*, Güven Kitabevi, İzmir, 2003: 67-73.
40. http://www.academic.kellogg.cc.mi.us/herbrandsonc/bio201_McKinley/Reproductive%20%20System.htm Feb 7, 2008
41. Sadler TW. *Langman's Medikal Embriyolojisi*, (Çev. Başaklar AC, Sönmez K), 7. Basım, Palme Yayıncılık İstanbul, 2007: 1-20.
42. Şeftalioğlu A. *Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi*, Tıp&Teknik Yayıncılık, Ankara, 1998: 650.
43. Moore KL. *Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi*, (Çev. Yıldırım V, Okar İ, Dalçık H), Nobel Matbaacılık, İstanbul, 2002: 560.
44. Drews U. *Renkli Embriyoloji Atlası*, (Çev. Solakoğlu S), Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara, 2000: 384.
45. Motta PM, Makabe S, Nottola SA. The ultrastructure of human and mouse reproduction. The natural history of the female germ cell: origin, migration, and differentiation inside the developing ovary, *Human Reproduction Update* 1997; 3: 281-297.
46. Öktem Ö, Oktay K. Stem cells: a perspective on oocytes, *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008; 1127: 20-26.

47. Pereda J, Zorn T, Soto-Suazo M. Migration of human and Mouse primordial germ cells and colonization of the developing ovary: an ultrastructural and cytochemical study. *Microsc Res Tech* 2006; 69: 386-395.
48. Erbenli T. Temel Histoloji, Güneş Kitabevi, Ankara, 1990: 191-228.
49. Bloom W, Fawcett DW. A Text of Histology, Chapman and Hall, London, 1994: 964.
50. Ross MH. Histology a Text and Atlas of Histology, Philadelphia: (Edt. Williams and Wilkins), 2003: 773-788.
51. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji, (Çev. Aytekin A, Solakoğlu S), Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara, 2003: 512.
52. Ovalle WK, Nahirney PC. Netter's Essential Histology, (Çev. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P). Güneş Tıp Kitapevleri, Ankara, 2009: 400-425.
53. Erkoçak A. Özel Histoloji, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Basım Evi, Ankara, 1982: 83-94.
54. Gartner LP, Hiatt LJ. Color Text Book of Histology, 2. Edition, WB Saunders Co, London, 2001: 458-482.
55. Fawcett DW. Bloom and Fawcett: Concise Histology, Chapman And Hall, U.S.A.1997; 964
56. Kalaycı S. Histoloji, Uludağ Üniversitesi Yayıncılık, Bursa, 1986: 565.
57. Sternberg SS. Histology for Pathologist, Lippincott-Raven, New York, 1997: 297-305.
58. Abraham LK, Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojisi Giriş, (Çev. Demir R), Ankara: Palme Yayıncılık 2006: 564-584.
59. McNatty KP, Fidler AE, Juengel JL, et al. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 163: 11–20.
60. Gondos B, Zamboni L. Ovarian development: the functional importance of germ cell interconnections. *Fertil Steril* 1969; 20: 176–189.
61. Hurk R, Bevers MM, Beckers JF. In vivo and in vitro development of preantral follicles. *Theriogenology* 1997; 47: 73-82.
62. Mazaud S, Guigon CJ, Lozach A, et al. Establishment of the reproductive function and transient fertility of female rats lacking primordial follicle stock after fetal gamma-irradiation. *Endocrinology* 2002; 143: 4775-87.

63. Colonna R, Cecconi S, Tatone C, et al. Somatic cell-oocyte interactions in Mouse oogenesis: stage-specific regulation of mouse oocyte protein phosphorylation by granulosa cells. *Dev Biol* 1989; 133: 305-308.
64. Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, et al. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 854-866.
65. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000; 21: 200-214.
66. Gougeon A, Nilsson EE, Skinner MK, Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biol Reprod* 2003; 69: 1265–1272.
67. Gandolfi F, Brevini TAL, Cillo F, Antonini S. Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency *Rev Sci Tech Int Epiz* 2005; 24: 413-423.
68. Demeestere I, Centner J, Gervy C, et al. Impact Of Various Endocrine And Paracrine Factors On In Vitro Culture Of Preantral Follicles In Rodents. *Reproduction* 2005; 130: 147–156.
69. Jamnongjit M, Hammes SR. Oocyte maturation: the coming of age of a germ cell. *Semin Reprod Med* 2005; 23: 234-41.
70. Demir R. İnsanın Gelişimi ve İmplantasyon Biyolojisi, Palme yayıncılık, Ankara, 1995: 92-115.
71. Dissen GA, Romero C, Hirshfield AN, et al. Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. *Endocrinology* 2001; 142: 2078-2086.
72. Giacomo MD, Barchi M, Baudat F, et al. Distinct DNA damage dependent and independent responses drive the loss of oocytes in recombination defective Mouse mutants. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102: 737-742.
73. Nilsson EE, Skinner MK. Bone morphogenetic protein 4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development, *Biol Reprod* 2003; 69: 1265-1272.
74. Miyano T. In Vitro Growth Of Mammalian Oocytes. *J Reprod Dev* 2005; 51: 169-176.

75. Lee WS, Otsuka F, Moore RK, et al. Effect of bone morphogenetic protein 7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biology of Reproduction* 2001 ;65, 994-999.
76. Fraschini F, Demartini G, Esposti D. Pharmacology of Silymarin. *Clin Drug Invest* 2002; 22: 51-65.
77. Liang L, Soyal SM, Dean J. FIG alfa a germ cell specific transcription factor involved in the coordinate expression of the zona pellucida genes. *Development* 1997; 124: 4939-4947.
78. Tekelioğlu M. Özel Histoloji İnce Yapı ve Gelişime, Antıp AŞ Yayınları, Ankara, 2002:251-229.
79. Widmaier EP, Raff H, Strang KT. *Female Reproductive Physiology. Human Physiology* 9th edition, New York; Mc Graw - Hill company, 2004: 659-669.
80. <http://www.colorado.edu/kines/iphy4480tsai/ovary.jpg> 10.06.2007.
81. Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms, *Human Reproduction Update*, 2005; 11: 162–178.
82. Hsu SY and Hsueh AJ. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm. *Physiol Rev* 2000; 80: 593–614.
83. Gaytan F, Morales C, Bellido C, et al. Ovarian Follicle Macrophages: Is Follicular Atresia in the Immature Rat a Macrophage-Mediated Event? *Biol Reprod* 1998; 58: 52-59.
84. Allen E. The oestrous cycle in the Mouse. *Amer J Anat* 1922; 30: 297-371.
85. Safranski TJ, Lamberson WR, Keisler DH. Correlations among three measures of puberty in mice and relationships with estradiol concentration and ovulation. *Biol Reprod* 1993; 48: 669-673.
86. Petroianu A, Vasconcellos LS, Alberti LR, et al. The influence of venous drainage on autologous ovarian transplantation. *J Surg Res* 2005; 124:175-9.
87. Rao RP, Kaliwal BB. Monocrotophos induced dysfunction on estrous cycle and follicular development in mice. *Ind Health* 2002; 40: 237-244.
88. Noyan A. Yaşamda ve Hekimlikte fizyoloji. 13. basım. Ankara: Meteksan Anonim Şirketi, 2003.
89. Koike S, Sakai M, Muramatsu M. Molecular cloning and characterization of rat estrogen receptor cDNA. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 2499–2513.

90. Kuiper G, Enmark E, Peltouhikko M, et al. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 5925–5930.
91. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 1996; 392: 49–53.
92. Peterson CM. Estrogen and progesterone receptors: an overview from the year 2000. *J Soc Gynecol Investig* 2000; 1: 3–7.
93. Paech K, Webb P, Kuiper GG, et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 1997; 277: 1508–1510.
94. Weihua Z, Saji S, Makinen S, et al. Estrogen receptor (ER) β , a modulator of ER α in the uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 5936–5941.
95. Price RH Jr, Lorenzon N, Handa RJ. Differential expression of estrogen receptor beta splice variants in rat brain: identification and characterization of a novel variant missing exon 4. *Brain Res Mol Brain Res* 2000; 80: 260–8.
96. Kraus WL, Katzenellenbogen BS. Regulation of Progesterone Receptor Gene Expression and Growth in the Rat Uterus: Modulation of Estrogen Actions by Progesterone and Sex Steroid Hormone Antagonists. *Endocrinology* 1993; 132: 2371–2379.
97. Ganong WF. Tıbbi Fizyoloji (20 baskı). Türk Fizyoloji Bilimler Derneği, Nobel Tıp Kitabevi, Ankara, 2002.
98. Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, et al. Human Progesterone Receptor A Form Is a Cell and Promoter Specific Repressor of Human Progesterone Receptor B Function. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 1244–1255.
99. Shyamala G, Schneider W, Schott D. Developmental regulation of murine mammary progesterone receptor gene expression. *Endocrinology* 1990; 126: 2882–2889.
100. Mangal RK, Wiehle RD, Poindexter AND 3rd, Weigel NL. Differential expression of uterine progesterone receptor forms A and B during the menstrual cycle. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997; 63: 195–202.
101. Zheng W, Magid MS, Kramer EE, et al. Follicle-Stimulating Hormone Receptor Is Expressed in Human Ovarian Surface Epithelium and Fallopian Tube. *Am J Pathol* 1996; 148: 47–53.

102. Rose MP, Gaines Das RE, Balen AH. Definition and measurement of follicle stimulating hormone. *Endocr Rev* 2000; 21: 5-22.
103. Lei ZM, Toth P, Rao CV, et al. Novel expression of human chorionic gonadotropin/human luteinizing hormone receptors and ligand hCG in human fallopian tubes. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 863– 872.
104. Camp TA, Rahal JO, Mayo KE. Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 1405–1417.
105. Tanbo T, Dale PO, Lunde O, et al. Prediction of response to controlled ovarian hyperstimulation: a comparison of basal and clomiphene citrate-stimulated folliclestimulating hormone levels. *Fertil Steril* 1992; 57: 819- 824.
106. Toner JP, Philput CB, Jones GS, et al. Basal FSH level is a better predictor of in vitro fertilization performance than age. *Fertil Steril* 1991; 55: 784-791.
107. Scott RT, Hofmann GE, Oehninger S, et al. Intercycle variability of day 3 FSH levels and its effect on stimulation quality in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1990; 54: 297-302.
108. Speroff L, Glass NH, Kase RG. *Clinical Gynaecologic Endocrinology and Infertility* (6 edn) 1999: 84,171, 213, 236, 1013, 1075, 1097, 1133.
109. Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C et al. Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* 1986; 45: 685–698.
110. Haguenauer CO, Peard JY, Mattei MG, et al. Mapping of the gene for Antimüllerian Hormone to short arm of human chromosome 19. *Cytogenet Cell Genet* 1987; 44: 2-6.
111. Rey R, Lukas-Croisier C, Lasala C. et al. AMH/ MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. *Mol Cell Endocrinol* 2003;15: 21–31.
112. Knebelmann B, Boussin L, Guerrier D, et al. Anti-Müllerian hormone Bruxelles: a nonsense mutation associated with the persistent Müllerian duct syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991; 88: 3767–71
113. Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P, Hoogerbrugge et al. Anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic

- acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotrophin-induced follicle growth. *Endocrinology* 1995; 136: 4951-4962.
114. Salmon NA, Handyside AH, Joyce IM. Oocyte regulation of anti-Müllerian hormone expression in granulosa cells during ovarian follicle development in mice. *Developmental Biology* 2004; 266: 201–208.
 115. Josso N, di Clemente N, Gouedard L. Anti-Müllerian hormone and its receptors. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 179: 25–32.
 116. Ingraham HA, Hirokawa Y, Roberts LM, et al. Autocrine and paracrine Müllerian inhibiting substance hormone signalling in reproduction. *Recent Prog Horm Res* 2000; 55: 53-67.
 117. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, et al. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 2002; 143: 1076–1084.
 118. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, et al. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 2001; 142: 4891–99.
 119. di Clemente N, Goxe B, Re´my JJ, et al. Inhibitory effect of AMH upon the expression of aromatase activity and LH receptors by cultured granulosa cells of rat and porcine immature ovaries. *Endocrine* 1994; 2: 553–558.
 120. Seifer DB, MacLaughlin DT, Penzias AS, et al. Gonadotrophin releasing hormone agonist induced differences in granulosa cell cycle kinetics are associated with alterations in follicular fluid mullerian inhibiting substance and androgen content. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 73: 711-714.
 121. Lee MM, Donahoe PK, Hasegawa T, et al. Müllerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 571–576.
 122. La Marca A, Malmusi S, Giulini S, et al. Anti-Müllerian hormone plasma levels in spontaneous menstrual cycle and during treatment with FSH to induce ovulation. *Human Reproduction* 2004; 19: 2738–2741.
 123. La Marca A, De Leo V, Giulini S, et al. Anti-Müllerian hormone in premenopausal women and after spontaneous or surgically induced

- menopause. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 2005a; 12: 245–248.
124. Van Rooij IA, Tonkelaar I, Broekmans FJ, et al. Anti-Müllerian hormone is a promising predictor for the occurrence of the menopausal transition. *Menopause* 2004; 11: 601–606.
 125. Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, et al. Serum anti-Müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum Inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Human Reproduction* 2003b;18: 323–327.
 126. Johnson J, Canning J, Kaneko T, et al. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mamalian ovary. *Nature* 2004; 428: 145-150.
 127. Richardson SJ, Nelson JF. Follicular depletion during the menopausal transition. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1990; 592, 13–20.
 128. Pigny P, Jonard S, Robert Y, et al. Serum anti-Müllerian hormone as a surrogate for antral follicle count for definition of the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 941–945.
 129. Rey RA, Belville C, Nihoul-Fekete C, et al. Evaluation of gonadal function in 107 intersex patients by means of serum antimüllerian hormone measurement. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999; 84: 627–631.
 130. Scott RT, Opsahl MS, Leonardi MR, et al. Life table analysis of pregnancy rates in a general infertility population relative to ovarian reserve and patient age. *Hum Reprod* 1995; 10: 1706–1710.
 131. Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, et al. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3030–4.
 132. El-Gohary M, Awara WM, Nasser S, et al. Deltamethrin Induced testicular apoptosis in rats: the protective effect of nitric oxide synthase inhibitor. *Toxicology* 1999; 132: 1-8.
 133. Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection -how, why, when, and where? *Nitric Oxide* 1997; 1: 107-120.
 134. Vos JG, Dybing E, Greim HA, et al. Health effects of endocrine disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Crit Rev Toxicol* 2000; 30: 71-133.

135. Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 1991; 124: 43–101.
136. Cooper RL, Goldman JM, and Vanderbergh JG. Monitoring the estrous cycle in the laboratory rodent by vaginal lavage. In *Methods in Toxicology* (Eds. Chapin RE and Heindel J), Academic Press, Orlando, FL. 1993: 45–46.
137. Oktay K, Schenken RS, Nelson JF. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. *Biology of Reproduction* 1995; 53: 295–301.
138. Hazout A, Bouchard P, Seifer DB, et al. Serum antimüllerian hormone/müllerian inhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of assisted reproductive technology outcome than follicle-stimulating hormone, inhibin B, or estradiol. *Fertil Steril* 2004; 82: 1323-9.
139. La Marca A, Volpe A. Anti-müllerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool? *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64: 603-610.
140. Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool? *Redox Report* 2004; 9: 145-152.
141. Akaydin S, Sepici A, Özkan Y, et al. Evaluation of allontoin levels as a new marker of oxidative stress in Behçet's disease. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 2006; 35: 61-64.
142. Zachow R, Uzumcu M. The methoxychlor metabolite, 2,2-bis (p-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane, inhibits steroidogenesis in rat ovarian granulosa cells in vitro. *Reprod Toxicol* 2006; 22: 659-665.
143. Chedrese, PJ and Feyles F. The diverse mechanism of action of dichlorodiphenyl-dichloroethylene (DDE) and methoxychlor in ovarian cells in vitro. *Reprod Toxicol* 2001; 15: 693–698.
144. Martinez EM, Swartz WJ. Effects of methoxychlor on the reproductive systems of the adult female mouse: 2. Ultrastructural observations. *Reprod Toxicol* 1992; 6: 93–98.
145. Gray LE Jr, Ostby J, Cooper RL, et al. The estrogenic and antiandrogenic pesticide methoxychlor alters the reproductive tract and behavior without

- affecting pituitary size or LH and prolactin secretion in male rats. *Toxicol Ind Health* 1999; 15: 37-47.
146. Gangadharan B, Murugan MA and Mathur PP. Effect of methoxychlor on antioxidant system of goat epididymal sperm in vitro. *Asian J Androl* 2001; 3: 285–288.
 147. Latchoumycandane C and Mathur PP. Effect of methoxychlor on the antioxidant system in mitochondrial and microsome-rich fractions of rat testis. *Toxicology* 2002a; 176: 67–75.
 148. Latchoumycandane C, Chitra KC and Mathur PP. The effect of methoxychlor on the epididymal antioxidant system of adult rats. *Reprod Toxicol* 2002; 16: 161–172.
 149. Eroshenko VP, Amstislavsky SY, et al. Altered behaviors in male mice, male quail and salamander larvae following early exposures to the estrogenic pesticide methoxychlor. *Neurotoxicology and Teratology* 2002; 24: 29-36.
 150. Woodruff TK, Mayo KE. To beta or not to beta: estrogen receptors and ovarian function. *Endocrinology* 2005; 146: 3244–3246.
 151. Sar M, Welsch F. Differential expression of estrogen receptor-beta and estrogen receptor-alpha in the rat ovary. *Endocrinology* 1999; 140: 963–971.
 152. Pelletier G, Labrie C and Labrie F. Localization of oestrogen receptor alpha oestrogen receptor beta and receptors in the rat reproductive organs. *J Endocrinol* 2000; 165: 359-370.
 153. Bai W, Oliveros-Saunders B, Wang Q, et al. Estrogen stimulation of ovarian surface epithelial cell proliferation. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2000; 36: 657-666.
 154. Choi KC, Kang SK, Tai CJ, et al. Estradiol up regulates antiapoptotic Bcl-2 messenger ribonucleic acid and protein in tumorigenic ovarian surface epithelium cells. *Endocrinology* 2001; 142: 2351-2360.
 155. Shanle EK, Xu W. Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: Identification and mechanisms of action. *Chem Res Toxicol* 2011; 24: 6-19.
 156. Billig H, Furuta I, Aaron JW. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 1993; 133: 2204-2212.

157. Borgeest C, Miller KP, Gupta R, et al. Methoxychlor-induced atresia in the mouse involves Bcl-2 family members, but not gonadotropins or estradiol. *Biol Reprod* 2004; 70: 1828–1835.
158. Crellin NK, Kang HG, Swan CL, et al. Inhibition of basal and stimulated progesterone synthesis by dichlorodiphenyldichloroethylene and methoxychlor in a stable pig granulosa cell line. *The Journal of the Society for Reproduction and Fertility* 2001; 121: 485- 492.
159. Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S, Billing H, Perlas E and Hsueh AJ. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: Follicle stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology* 1996; 137: 1447-1456.
160. Hirshfield AN. Overview of ovarian follicular development: Considerations for the toxicologist *Environ. Mol Mutagen* 1997; 29: 10-15.
161. Swartz WJ and Eroschenko VP. Neonatal exposure to technical methoxychlor alters pregnancy outcome in female mice. *Reprod Toxicol* 1998; 12: 565-573.
162. Swartz WJ and Corkern M. Effects of methoxychlor treatment of pregnant mice on female offspring of the treated and subsequent pregnancies. *Reprod Toxicol* 1992; 6: 431–437.
163. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, et al. Ovarian surface epithelium: Biology, endocrinology and pathology. *Endocr Rev* 2001; 22: 255-288.
164. Miller KP, Gupta RK, Greenfeld CR, et al. Methoxychlor directly affects ovarian antral follicle growth and atresia through Bcl-2- and Bax mediated pathways. *Toxicol Sci* 2005; 88: 213–221.
165. Miller KP, Gupta RK, Flaws JA. Methoxychlor metabolites may cause ovarian toxicity through estrogen-regulated pathways. *Toxicol Sci* 2006; 93: 180–188.
166. Tomic D, Freech MS, Babus JK, et al. Methoxychlor induces atresia of antral follicles in ER (alpha) overexpressing mice. *Toxicol Sci* 2006; 93: 196-204.
167. Choi D, Hwang S, Lee E, et al. Expression of mitochondria-dependent apoptosis genes (p53, Bax, and Bcl-2) in rat granulosa cells during follicular development. *J Soc Gynecol Investig* 2004; 11: 311–317.
168. Flaws JA, Hirshfield AN, Hewitt JA, et al. Effect of bcl-2 on the primordial follicle endowment in the Mouse ovary. *Biol Reprod* 2001; 64: 1153–1159.

169. Dubal DB, Shughrue PJ, Wilson ME, et al. Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: A potential role for estrogen receptors. *J Neurosci* 1999; 19: 6385–6393.

**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
KAYSERİ-TÜRKİYE**

ETİK KURULUN ADI : Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

ETİK KURULUN ADRESİ : Erciyes Üniversitesi

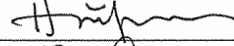
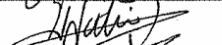
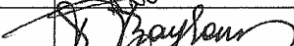
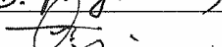
Tarih: 13/10/2010

Toplantı Sayısı: 9

Karar No: 10/85

Etik kurul toplantısı 13/09/2010 tarihinde Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel

Etik Kurul Prof.Dr: Harun ÜLGER Başkanlığı'nda başkanlığında gerçekleştirilmiş

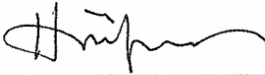
Üye Adı/Soyadı	Akademik Ünvanı	Fakültesi	
Zübeyde Gündüz	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Harun Ülger	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Özlem Canöz	Prof.Dr.	Tıp Fakültesi	
Hatice Özbilge	Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Servet Kesim	Yrd. Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
Davut Bayram	Öğrt.Gör.Dr.	Veteriner Fakültesi	
Coşkun Tez	Doç. Dr.	Fen Fakültesi	
M. Betül Aycan	Yrd. Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi(Farmakoloji)	
Ahmet Öztürk	Öğrt.Gör.Dr		
Serap Altuntaş Eroğlu	Avukat		
Ali Tekiner	Eczacı		

Yürütücülüğünü Üniversitemizin Tıp Fakültesi Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR tarafından yapılan "Oksidatif Stresin Ovaryum Follikülleri Üzerine Etkisi ve Antimüllerian Hormon Ekspersyonu " adlı araştırması incelenerek çalışmasının yapılmasının uygun olacağına ve rektörlük makamına sunulmasına oy birliğiyle karar verildi.

ASLININ AYNI DİR

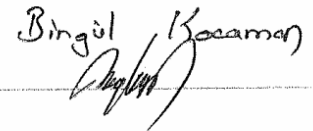
Tarih : 13/10/2010

Etik Kurul Başkanı İmzası



Etik Kurul Başkanı Y : Prof.Dr: Harun ÜLGER

Okam Sekreteri



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Esra BALCIOĞLU

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 1 Ocak 1980, Kayseri

Tel: +90 352 233 50 57

Cep: 0538 558 84 98

email: esrabalcioğlu79@hotmail.com

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı 38039 Talas/ KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek lisans	Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2005
Lisans	Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji	2001
Lise	Melikgazi Lisesi, Kayseri	1997

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2008- 2013	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Araş.Gör.
2003-2005	Atılım Dershanesi	Öğretmen
2000-2003	Dilbem Dershanesi	Öğretmen

YABANCI DİL

İngilizce