

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

**GEBELİKTE OLAYLANAN DENEYSEL HİPOKSİDE GİNKGO BİLOBA’NIN
OVARYUM DOKUSUNA ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Demet UZUN

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Celal ILGAZ

ANKARA
Ocak 2010

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

**GEBELİKTE OLAYLANAN DENEYSEL HİPOKSİDE GİNKGO BİLOBA'NIN
OVARYUM DOKUSUNA ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Demet UZUN

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Celal ILGAZ

Bu tez çalışması kısmen Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri 01-2007-42 kod numaralı proje ile desteklenmiştir.

ANKARA
Ocak 2010

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 18/01/2010



Prof.Dr.Deniz ERDOĞAN
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof.Dr.Celal ILGAZ
Gazi Üniversitesi



Doç.Dr.Meltem BAHÇELİOĞLU
Gazi Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Resimler	iv
Kısaltmalar ve Simgeler	viii
Teşekkür	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Ovaryum'un Gelişimi	6
2.2. Ovaryum Anatomisi	8
2.2.1.Ovaryum'un Yapısı	8
2.2.2.Ovaryum'un Damarları	9
2.2.3.Ovaryum'un Sinirleri	10
2.3. Ovaryum Histolojisi	10
2.3.1.Ovaryum Korteksi	11
2.3.2.Ovaryum Medullası	11
2.3.3.Ovaryum Follikülleri	12
2.3.2.1 Primordiyal Follikül	12
2.3.2.2 Primer Follikül	12
2.3.2.3 Sekonder Follikül	13
2.3.2.4 Graaf Follikülü	14
2.4 Ovaryum Fizyolojisi	15
2.4.1 Hipofiz Ön Lobu Hormonları ve Ovaryum'lar Üzerine Etkileri	15
2.4.1.1 Ovulasyonda LH'un önemi ve yükselişi	17
2.5. Hipoksi	18
2.5.1.Hipoksinin Çeşitleri	19
2.5.2.Hipoksi'nin Etkileri	19
2.5.3.Hipoksik Hipoksi	20

2.6. Ginkgo Biloba	23
2.7. Dönüştürücü Büyüme Faktörü (TGF- β)	24
2.8. Büyüme Farklılaşma Faktörü-9 (GDF-9)	25
3.GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1.Deney Hayvanları ve Gruplandırma	26
3.2. İmmunohistokimyasal Yöntem	27
3.3.Elektron Mikroskopik Yöntem	29
4.BULGULAR	33
4.1. İmmünohistokimyasal Bulgular	33
<u>4.1.1.TGF- β Bulguları</u>	33
<u>4.1.2.GDF-9 Bulguları</u>	44
4.2. Yarı-İnce Kesit Bulguları	55
4.3. Elektron Mikroskopik Bulgular	63
5.TARTIŞMA	76
6.SONUÇ	88
7.ÖZET	90
8.SUMMARY	92
9.KAYNAKLAR	94
10.EKLER	104
11.ÖZGEÇMİŞ	105

RESİMLER

- Resim 1:** Gelişimin 7. günü kontrol grubuna ait ovaryum'da TGF- β primer antikor tutulumu
(İmmünperoksidaz-Hematoksilen x100, x400, x1000). 35
- Resim 2:** Gelişimin 7. günü hipoksi uygulanan gruba ait ovaryum'da TGF- β primer antikor tutulumu
(İmmünperoksidaz-Hematoksilen x100, x1000) 36
- Resim 3:** Gelişimin 7. gün Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan gruba ait ovaryum'da TGF- β primer antikor tutulumu
(İmmünperoksidaz&Hematoksilen x100, x1000). 37
- Resim 4:** Gelişimin 14. günü kontrol grubuna ait ovaryum'da TGF- β primer antikor tutulumu
(İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400, x1000). 38
- Resim 5:** Gelişimin 14. günü hipoksi uygulanan gruba ait ovaryum'da TGF- β primer antikor tutulumu
(İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400, x1000). 39
- Resim 6:** Gelişimin 14. gün Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan gruba ait ovaryum'da TGF- β primer antikor tutulumu
(İmmünperoksidaz&Hematoksilen x100, x400, x1000). 40
- Resim 7:** Gelişimin 21. gün kontrol grubuna ait ovaryum'da TGF- β primer antikor tutulumu
(İmmünperoksidaz&Hematoksilen x100, x400). 41
- Resim 8:** Gelişimin 21. günü hipoksi uygulanan gruba ait ovaryum'da TGF- β primer antikor tutulumu
(İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400, x1000). 42
- Resim 9:** Gelişimin 21. gün Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan gruba ait ovaryum'da TGF- β primer antikor tutulumu
(İmmünperoksidaz&Hematoksilen x100, x400, x1000). 43

Resim 10: Gelişimin 7. günü kontrol grubuna ait ovaryum'da GDF-9 primer antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400, x1000).	46
Resim11: Gelişimin 7. günü hipoksi uygulanan gruba ait ovaryum'da GDF-9 primer antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400, x1000).	47
Resim 12: Gelişimin 7. gün Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan gruba ait ovaryum'da GDF-9 primer antikor tutulumu (İmmünperoksidaz&Hematoksilen x400, x1000).	48
Resim 13: Gelişimin 14. günü kontrol grubuna ait ovaryum'da GDF-9 primer antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x1000).	49
Resim 14: Gelişimin 14. günü hipoksi uygulanan gruba ait ovaryum'da GDF-9 primer antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400, x1000).	50
Resim 15: Gelişimin 14. gün Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan gruba ait ovaryum'da GDF-9 primer antikor tutulumu (İmmünperoksidaz&Hematoksilen x400, x1000).	51
Resim 16: Gelişimin 21. gün kontrol grubuna ait ovaryum'da GDF-9 primer antikor tutulumu (İmmünperoksidaz&Hematoksilen x400).	52
Resim 17: Gelişimin 21. günü hipoksi uygulanan gruba ait ovaryum'da GDF-9 primer antikor tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400, x1000).	53
Resim 18: Gelişimin 21. gün Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan gruba ait ovaryum'da GDF-9 primer antikor tutulumu (İmmünperoksidaz&Hematoksilen x400, x1000).	54
Resim 19: Gelişimin 14. günü kontrol grubna ait yarı-ince kesit görünümü (Toluidin Mavisi x100, x400).	57
Resim 20: Gelişimin 14. günü hipoksi uygulanan gruba ait yarı-ince kesit görünümü	

(Toluidin Mavisi x100, x400).	58
Resim 21: Gelişimin 14. günü Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan gruba ait yarı-ince kesit görünümü	
(Toluidin Mavisi x400).	59
Resim 22: Gelişimin 21. günü kontrol grubna ait yarı-ince kesit görünümü	
(Toluidin Mavisi x400).	60
Resim 23: Gelişimin 21. günü hipoksi uygulanan gruba ait yarı-ince kesit görünümü	
(Toluidin Mavisi x400).	61
Resim 24: Gelişimin 21. günü Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan gruba ait yarı-ince kesit görünümü	
(Toluidin Mavisi x100, x400).	62
Resim 25: Gelişimin 14. günü kontrol grubuna ait elektron mikroskopik görünüm	
(Uranil asetat-Kurşun sitrat x3680, x5210).	65
Resim 26: Gelişimin 14. günü kontrol grubuna ait elektron mikroskopik görünüm	
(Uranil asetat-Kurşun sitrat x15800).	66
Resim 27: Gelişimin 14. günü hipoksi uygulanan gruba ait elektron mikroskopik görünüm	
(Uranil asetat-Kurşun sitrat x6230).	67
Resim 28: Gelişimin 14. günü hipoksi uygulanan gruba ait elektron mikroskopik görünüm	
(Uranil asetat-Kurşun sitrat x8100, x24570).	68
Resim 29: Gelişimin 14. günü Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan gruba ait elektron mikroskopik görünüm	
(Uranil asetat-Kurşun sitrat x3830, x4850).	69
Resim 30: Gelişimin 14. günü Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan gruba ait elektron mikroskopik görünüm	
(Uranil asetat-Kurşun sitrat x13720).	70

Resim 31: Gelişimin 21. günü kontrol grubuna ait elektron mikroskopik görünüm (Uranil asetat-Kurşun sitrat x4330).	71
Resim 32: Gelişimin 21. günü kontrol grubuna ait elektron mikroskopik görünüm (Uranil asetat-Kurşun sitrat x4090, x12760).	72
Resim 33: Gelişimin 21. günü hipoksi uygulanan gruba ait elektron mikroskopik görünüm (Uranil asetat-Kurşun sitrat x3610, x4040).	73
Resim 34: Gelişimin 21. günü hipoksi uygulanan gruba ait elektron mikroskopik görünüm (Uranil asetat-Kurşun sitrat x12590, x3980).	74
Resim 35: Gelişimin 21. günü Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan gruba ait elektron mikroskopik görünüm (Uranil asetat-Kurşun sitrat x7059, x8190, x7880).	75

KISALTMALAR VE SİMGELER

IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörünü

HELLP : Hamileliğin uyardığı tansiyonun en ileri şekli

KL : Kit ligand

LIF : Lökemi inhibitör faktör

bFGF : Temel fibroblast büyüme faktörü

KGF : Keratinosit büyüme faktörü

TGF- β : Dönüştürücü büyüme faktörü β

BMP : Kemik morfogenetik faktörü

GDF : Büyüme farklılaşma faktörü

bFGF : Temel fibroblast büyüme faktörü

ATP : Adenozintrifosfat

SOR : Serbest oksijen radikalleri

DNA : Deoksiribonükleik asit

SRY : Y kromozomu üzerindeki cinsiyet belirleyici bölge

OMI : Oosit olgunlaşmasını baskılayan madde

a. : Arteria

lig. : Ligamentum

v. : Vena

n. : Nervus

μ : Mikron

PAS : Periyodik asit-Schiff

FSH : Follikül uyarıcı hormon

LH : Luteinize edici hormon

GnRH: Gonadotropin-Serbestleştirici Hormon

FSH: Follikül Uyarıcı Hormon

cAMP : Siklik AMP

hCG: Koryonik gonadotropin

PaO₂ : Kısmi oksijen basıncı

m : Metre

PAF : Platellet aktive edici faktör

kDa : Kilo dalton

β : Beta

VEGF : Vasküler endotelyal büyüme faktörü

IL : İnterlökin

HIF : Hypoxia inducible factor

GER : Granüllü endoplazmik retikulum

AMH : Anti Mülleryan Hormon

GDNF : Glial Hücreden üretilen Nörotrofik Faktör

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, tezimin hazırlanması, düzenlenmesi ve deneylerim süresince değerli bilgilerini paylaşan Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Deniz Erdoğan başta olmak üzere, anlayışlı yaklaşımları ile beni yönlendiren tez danışmanın Sayın Prof. Dr. Celal İlğaz'a ve eğitimimde katkıları olan Sayın Prof. Dr. M. Tahir Hatipoğlu'na, Prof.Dr. Candan Özoğul'a Sayın Prof. Dr. Suna Ömeroğul'na, yardım ve desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Çiğdem Elmas ve Doç. Dr. Gülnur Take'ye;

Tezimin deney aşamasını birlikte yürüttüğüm ve büyük emekleri geçen Arş. Gör. Fatma Helvacioğul'na, yardımlarından ötürü Arş. Gör. Güleser Göktaş'a ve tüm dönem arkadaşlarıma;

Sonsuz sevgi ve özveriyle beni bugünlere getiren, eğitimim için her türlü fedakarlığı göstererek desteklerini hiç esirgemeyen canım annem Tülay Maknik'e, sevgili babam İsmail Maknik'e, sıkıldığımda yüzümü güldüren kardeşim Serhan Maknik'e ve attığım her adımda beni cesaretlendiren, tez çalışmalarımın her aşamasında yanımda olarak anlayış ve sabrını esirgemedi beni destekleyen sevgili eşim Berk Uzun'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Demet UZUN

Ocak 2010-ANKARA

1. GİRİŞ

Hücreyel metabolizmanın sürekliliğinin sağlanabilmesi ortamdaki oksijen varlığıyla doğru orantılıdır. Oksijen eksikliğinin yaşandığı koşullarda doku hasarları oluşur. Hipoksik koşullar (dokuda oksijen azlığı), günlük yaşamda yüksek irtifalara çıkmakla, perinatal evrede fötusun ya da doğum sırasında bebeğın oksijensiz kalması ile gerçekleşebilmektedir. Son yıllarda bu konuyla ilgili araştırmalar oldukça artmıştır. Araştırmalarda deneysel olarak hipoksik koşullar yaratılmakta ve dokular ya da deney hayvanları bu koşullara etkin bırakılmaktadır.

18.yy'da uçan balonların kullanılmasıyla birlikte 9000 metre yüksekliğe değın çıkan insanların beyin ve vücutlarında uyuşmalar olduğu, tehlikeye karşı tepkisiz oldukları ve hareket edemedikleri; hatta bazılarının bu yolculuklar sırasında öldüğü bildirilmiştir. Yüksek irtifa ile oluşan oksijen yetmezliğinin akut etkileri halsizlik, başağrısı, alınganlık, baş dönmesi, mide bulantısı, uykusuzluk iken; kronik etkileri daha ciddi seyretmektedir. Beyin kan akışının azalması sonucu oluşan serebral hipoksi, kafa karışıklığına ve ardından bilinç kaybına neden olmakta; daha ileri aşamalarda ise ölüme varan sonuçlar ortaya çıkmaktadır.¹

Hipoksi, fötal yaşamın olağan bir parçasıdır. Gelişimini normal olarak sürdüren embriyonlar hipoksi işaretleyicisi ile işaretlendiğinde nöral tüpte, kalpte ve organogenezisin erken evrelerinde intrasomatik mezenşimde hipoksi saptanmıştır.² Gelişimin ilerleyen evrelerinde ise hipoksinin damar ile kan yapımı ve kıkırdak gelişiminin düzenlenmesinde rol aldığı belirtilmiştir.³ Ayrıca hipoksinin insülin benzeri büyüme faktörünü (IGF) uyardığı da bilinmektedir.⁴

Hipoksik koşulların ağırlaşması ya da kronik hipoksi koşullarında anormal gelişim ve doğum sonrası defektler görülmektedir. Günümüzde fetal ölümlerin ilk 10 nedeni arasında fetal hipoksinin oluşturduğu komplikasyonlar bulunmaktadır.³

Hipertansiyon, preeklampsi ve HELLP sendromu gibi hipertensif bozukluklar, yükseklerde yaşama, anemi, pulmoner hastalıklar, plasenta previa gibi kanamalı hastalıklar, oligohidroamniyoz olarak adlandırılan amniyon sıvısının azlığı, bazı ilaçlar ve sigara kullanımı gibi maternal kökenli faktörler fetal hipoksinin oluşmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda intrauterin büyüme gerilikleri, düşük kilolu ve prematüre doğum veya ölü doğumlar gerçekleşir.³ Bunun yanında hipoksiye etkin kalan fetusların, doğumdan sonra artan yaşla birlikte kardiyopulmoner yetersizliklere ve aterosklerozise yatkın oldukları belirtilmektedir.⁵

Kronik fetal hipoksi gelişimi geriletği gibi birçok organda fizyolojik değişikliklere neden olmaktadır. Hipoksi, fetal kalp atım hızını azaltır. Böylece organlara giden kan akımı azalmakta ve bu da doku harabiyetine neden olmaktadır. En büyük hasar ise beyin üzerindedir. Normal koşullarda serebral kan basıncı oto-regülasyon ile 30-50 mmHg civarında tutulmaktadır. Hipoksik koşullarda ise kendi kendisini düzenleme mekanizması ortadan kalkmakta ve serebral kan akışı azalmaktadır. Böylece merkezi sinir sistemi hareketleri kısıtlanmaktadır.⁷ Kronik fetal hipoksinin üreme sistemi organlarında da hasara neden olabilmektedir. Hipoksinin dişi üreme sisteminin önemli organlarından olan ovaryumdaki folliküllerin gelişimlerini olumsuz etkilediği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

Ovaryum, dişi üreme sisteminde üreme döngüsü boyunca önemli yapısal ve işlevsel değişiklikler gösteren karmaşık bir endokrin

organdır. Follikül gelişimiyle birlikte başlayan ve puberteye gelindiğinde ovulasyon, luteinizasyon ve luteoliz gibi çeşitli fizyolojik olaylarla süren döngü sayesinde ovaryumlar dışı üreme sisteminin en önemli organlarıdır.

Ovaryumların en önemli işlevsel birimleri ise ovaryum follikülleridir. Ovaryum follikülleri, embriyonal gelişim sürecinde ilkel üreme hücrelerinden köken alan oogonyumların çoğalmasi ile birlikte oluşan oosit ve çevresini saran follikül (granüloza) hücrelerinden oluşmaktadır. Ovaryum folliküllerinde, teka hücreleri ve granüloza hücreleri olarak iki tür somatik hücre vardır. Bu hücreler follikül gelişimi sırasında birçok hormonun senteziyle yükümlüdürler. Ayrıca bu hücrelerin proliferasyonunun, antral follikülün gelişiminde de rol oynadığı belirtilmiştir.⁸

Embriyonal gelişim, primer oosit ve onu çevreleyen folliküler hücrelerden oluşan bir primordiyal follikülün gelişimiyle sonlanır. Doğumda ovaryum, primordiyal follikül havuzu şeklindedir. Puberteye gelindiğinde ise follikül gelişimi primordiyal follikülden primer folliküle farklanma ile sürer. Primordiyal folliküllerin gelişiminde, parakrin ve otokrin yolla sentezlenen büyüme faktörlerinin rolü olduğu bilinmektedir. Bu büyüme faktörleri arasında kit ligand (KL), lökemi inhibitör faktör (LIF), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), keratinosit büyüme faktörü (KGF), dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF- β) ailesinden olan BMP-4 ile BMP-7 ve yine bu ailenin üyesi olan büyüme farklılaşma faktörü 9 (GDF-9) bulunmaktadır. Oositlerin çevresini saran yassı follikül hücrelerinden salgılanan bFGF ve KL'lar bu hücrelerin kendisinde, oositte ve stromal hücrelerde büyümeyi tetikler. Böylece stromal hücreler ve teka hücrelerinden follikülün etkinliğini sağlayan ve yaşamını güçlendiren BMP-4 ve BMP-7 salgılanır. Bu sinyallerin etkisiyle primordiyal follikül gelişerek primer follikül haline gelir.^{8,9}

Primer follikülün farklanması ise oosit'in GDF-9 ve BMP-15'i salgılamasıyla olur. Bu iki sinyal molekülü oosit'in çevresini saran granüloza hücrelerinin etkinliği ve çoğalmasını sağlar.⁹ Primer follikülün proliferasyonu ile birlikte sekonder follikül oluşur. Bu aşamada follikülde içinde sıvı bulunan ve antrum olarak adlandırılan bazı boşluklar oluşur. Bu boşlukların birleşmesi ve tek, geniş bir boşluğun şekillenmesiyle birlikte Graaf follikülü yapar. Ovulasyonla birlikte atılan olgun follikül Graaf follikülü'dür. Ovulasyondan sonra follikülün oosit dışında kalan kısımları korpus luteumu oluşturur. Döllenme gerçekleşmezse korpus luteum, kan akımının azalmasıyla birlikte geriler ve döngü böylece sürer.

Föetal gelişim sırasında normal bir olay olarak rol oynayan hipoksi, ovaryal döngünün bir parçası olan ve lutealiz olarak adlandırılan korpus luteumun gerilemesi aşamasında da rol oynamaktadır. Aşırı hipoksik koşulların, farklı gelişim evrelerindeki oositleri olumsuz etkilediği, metafazda kromozom dizilişlerinde düzensizliklere ve sitoplazma içeriğinde eksikliklere neden olduğu belirtilmiştir. Yarıklanma aşamasındaki embriyonlarda da çok çekirdekli blastomerlerin, aşırı hipoksik koşullara etkin kalan oositlerden köken aldığı gösterilmiştir.¹⁰

Yeterince oksijenlenemeyen dokularda aşırı ATP yıkımı sonucu serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşmaktadır. Serbest oksijen radikalleri ortaklanmamış elektronlar nedeniyle oldukça reaktiftir ve hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi önemli biyolojik yapıları ile tepkimeye girerler. Bu nedenle hipoksi sonucunda oluşan serbest oksijen radikallerinin, dokudaki hasarlanmaların ana kaynağı olduğu düşünülmektedir.

Serbest oksijen radikalleri, oosit ile spermiumun kalitelerini düşürerek dişi ve erkek üreme sistemleri üzerinde olumsuz etkiler göstermektedirler. Bu etkilerin sonucunda ise infertilite oranları yükselmektedir. Serbest radikaller ya da reaktif oksijen türleri dişi üreme sistemlerinde ,proinflamatuvar sitokinler üzerinden etki göstererek, endometriyozis, ovaryum kanseri, polikistik ovaryum sendromu gibi daha birçok patolojik duruma neden olmaktadır.

Oksidatif metabolizma sonucu oluşan serbest oksijen radikalleri normalde süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz gibi enzimlerle ya da vitamin E, vitamin C , beta-karoten gibi vücuttaki antioksidan mekanizmalar veya dışarıdan verilen antioksidan maddeler ile yok edilir.¹³

Ginkgo biloba, serebral ve periferik kan akışı bozukluklarında yararı kanıtlanmış bir Uzak Doğu bitkisidir. İçeriğindeki flavanoidler sayesinde kuvvetli serbest radikal tutucu özelliğe sahip olan Ginkgo biloba ekstreleri, hipoksi sonucu azalan kan akımı ve oluşan serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu hasarların düzeltilmesinde kullanılabilecek geçici bir antioksidandır.

Fötal hipoksinin ovaryum follikülleri üzerinde olumsuz etkiler yarattığı bilinmektedir. Bu çalışmada da , gebelikte olaylanan hipoksinin ovaryum dokusu üzerine olan etkilerinin belirlenmesi ile antioksidan bir madde olan Ginkgo biloba ekstresinin, hipoksinin oluşturduğu bu etkiler üzerindeki olası iyileştirici rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Bulgular kaynak verileriyle karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.OVARYUMUN GELİŞİMİ

Genital sistem erken embriyonik dönemde dişi ve erkek yapısal özelliğe sahip değildir. Gelişimin 7. haftasına değin farklanmamış olan gonadlar, bu evrede testis ya da ovaryumlara farklanırlar. Farklanmada birçok gen işlevsel role sahiptir.¹⁴

XY kromozomuna sahip farklanmamış gonadlar, gelişimin 7. haftasında Y kromozomu üzerinde bulunan ve testis belirleyici faktörü kodlayan SRY geninin etkisiyle, **testis**'e farklanırlar. XX kromozoma sahip olanlar ise X kromozomu üzerinde bulunan bir dizi genin etkisiyle **ovaryum**'a dönüşürler.

Gonadlar gelişimin 5. haftasında kölom epitelinin çoğalması ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşan, bir çift genital ya da gonadal kabartılar şeklinde belirirler.¹⁴

Gelişimin 5. haftasından başlayarak gonadal kabartılara ilkel (primordiyal) üreme hücreleri göç eder ve burada düzensiz şekilli kordonları oluştururlar.¹⁵

İlkel üreme hücreleri, gelişimin 2. haftasında embriyonik primer ektodermden (epiblast) köken alırlar. Daha sonra epiblasttan ayrılarak ameboid hareketlerle vitellus kesesinin ekstraembriyonik yapılarına göç ederler. 4. haftada son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerleyerek 5. haftanın başında ilkel gonadlara ulaşırlar. 6. haftada ise genital kabartıları işgal ederler.⁹

İlkel üreme hücrelerinin ilkel gonadlara ulaşmasından hemen önce ve ulaşması sırasında, genital kabartının epiteli çoğalır ve epitel hücrelerinin altındaki mezenşimin içine gömülürler. Burada ilkel cinsiyet kordonları olarak adlandırılan düzensiz şekilli kordonları oluştururlar. Erkek ve dişi embriyonlarda bu kordonlar yüzey epiteline bağlıdır ve bu evrede erkek ya da dişi gonadların birbirinden ayırt edilebilmesi olanaksızdır. Bu nedenle bu evreye faklanmamış dönem, bu gonad'a ise faklanmamış gonad denir.^{9,14}

Faklanmamış gonad, ilkel cinsiyet kordonlarının oluşumuyla birlikte 2 bölgeye ayrılır. Dışta yer alan bölge **korteks** , içte yer alan bölge ise **medulla** olarak adlandırılmaktadır. X cinsiyet kromozomuna sahip embriyonlarda faklanmamış gonadın korteksi ovaryuma faklanır.¹⁵

7. haftada dişi gonad'ın yüzey epitelinden köken alan hücre kordonları alttaki mezenşimin içine gömülür. Bunlar yüzeye yakın yeleşirler ve ikincil kordonlar olarak adlandırılırlar. 16. haftada, bu kordonlar izole hücre kümelerine parçalanır. Bu hücre kümeleri bir ya da daha çok sayıda ilkel üreme hücrelerini çevrelemektedir. Bu üreme hücreleri zamanla oogonyum'lara dönüşür. Oogonyum'ların çevreleri ise kordonların oluşturduğu hücre kümelerinden köken alan folliküler hücreler ile sarılır.¹⁵

Doğum öncesi evrede ilkel üreme hücrelerinden köken alan oogonyum'ların çoğunluğu hızla mitoz bölünme geçirirken, bir kısmı bölünmesini 1.mayoz bölünmenin profaz aşamasında durdurarak **primer oosit**'lere faklanır. Bu evrede primer oosit'ler DNA kapsamlarını iki katına çıkararak birinci mayoz bölünmeye başlarlar. Gelişimin 20. haftasında, fetal ovaryumlardaki üreme hücre sayısı yaklaşık 7 milyona ulaşır. Gelişimin 28.-30. haftalarında ovaryum yüzeyine yakın bulunan az sayıdaki oogonyum dışındaki tüm oogonyum'lar yok olur. Varlıklarını sürdürenler,

1.mayoza başlayan primer oosit'lerdir. Primer oosit'ler çevrelerini saran yassı folliküler hücreler ile birlikte **primordiyal follikül** adını alır.^{14,15,16}

Doğumda ovaryum'larda sayısı 700.000-2.000.000 arasında değişen primer oosit bulunduğu sanılmaktadır. Bu sayı puberteye değin 400.000'e düşer. Bu evreye değin primer oosit'ler 1.mayoz bölünmelerini tamamlamadan beklerler. Oosit'lerin olgunlaşması folliküler hücrelerce salgılanan oosit olgunlaşmasını baskılayan madde (OMI, oosit maturation inhibitor) tarafından engellenir.^{14,15}

Puberteye gelindiğinde, primordiyal follikül büyüyen follikül aşamasına geçer. Böylece follikül hücrelerinde, oositte ve bunlara eşlik eden stromada değişiklikler oluşur. Başlangıç olarak oosit büyür ve bunu saran follikül hücreleri kübik bir şekil alırlar. Daha sonra follikül hücreleri çoğalarak çok sıralı bir epitel tabakası oluştururlar. Çoğalan bu hücrelere **granüloza hücreleri** denir. Bu hale gelen follikül ise '**Primer Follikül**' olarak adlandırılır. Gelişme sürdükçe granüloza hücreleri arasında içi sıvıyla dolu boşluklar belirir. Boşlukların birbirleriyle birleşmesi sonucu bir antrum oluşur ve follikül '**Sekonder Follikül**' adını alır. Follikül ovulasyona yakın daha da büyür ve '**Graaf Follikül**' olarak adlandırılır.⁹

2.2. OVARYUM ANATOMİSİ

2.2.1.Ovaryum'un Yapısı

Ovaryumlar kadında esas üreme organı olan, oval biçimli , bademe benzeyen bir çift organlardır. Her bir ovaryum pembemsi-beyaz renkte, solid nodüler yüzeyle, 3-3,5 cm uzunluğunda, 2-3 cm genişliğinde 1-1,5 cm kalınlığında ve 3-5 gr ağırlığındadır.²⁷

Ovaryumlar pelvis boşluğunda **fossa ovarica** denilen çukurlarda yerleşmişlerdir. Fossa ovarica, arteria iliaca externa, arteria iliaca interna ve ligamentum latum uteri arasında bulunur. Bu alanı aşağıda önden ligamentum latum uteri, yukarıda önden vasa iliaca externa; arkadan vasa iliaca interna ve ureter; önde ise oblitere umbilikal arter sınırlar. ^{27,28}

Facies lateralis ve facies medialis olarak iki yüzü; ön (margo mesovaricus) ve arka (margo liber) olarak iki kenarı; üst (extremitas tubaria) ve alt (extremitas uterina) olarak iki ucu bulunur. Ovaryumun üst ucu lig. suspensorium ovarii ile pelvis'in lateral duvarına; alt ucu olan lig. proprium ile de uterus'a tutunur. Ovaryum'un ön kenarı ise, kısa bir peritoneal plika olan mesovarium ile lig.latum uteri'ye bağlanır. Ovaryum'u tutan bir diğer yapı ise fimbria ovarica'dır. Bu yapı, tuba uterina'nın infundibulum tubae uterinae parçasında bulunan saçaklardan birinin ovaryum'un üst ucuna yapışan kısmıdır. Bu bağın içerisinde düz kas lifleri bulunur. ^{26,27,29}

2.2.2.Ovaryum'un Damarları

Ovaryum'un arterleri, abdominal aortadan çıkan **a.ovaricalar**'dır. Bu arterler, lig. suspensorium ovarii içinde pelvis'e iner. Hilum ovarii'den ovaryum'a girer ve follüküller çevresinde kılcal ağlar oluşturur. Arteria uterina'nın bir yan dalı olan ramus ovaricus'tan da ovaryum'a dallar gelir. Bunun sonucu olarak mesovarium içinde arteria ovarica ile arteria uterina arasında bir anostomoz oluşur. ^{26,30}

Ovaryum'u direne eden venler ovaryum ve tuba uterina yakınlarında venöz bir ağ olan plexus pampiniformis'i oluşturur. Bu pleksustaki venler birbirleri ile birleşerek tek bir ven olan vena ovarica'yı oluşturur. V. ovarica, a.ovarica ile birlikte seyrederek ve hilum ovarii'den çıkar. Sağ taraftaki yükselerek vena cava inferior'a, sol taraftaki ise vena renalis sinistra'ya açılır.³⁰

Lenf damarları kan damarları ile birlikte uzanır. Yukarı çıkarak nodi lumbales'e açılan bu damarlara tuba uterina'lardan ve fundus uteri'den gelen lenf damarları da katılır.³⁰

2.2.3.Ovaryum'un Sinirleri

Ovarium'un sinirleri, plexus hypogastricus inferior ve a.ovarica'nın çevresindeki plexus ovaricus'dan gelir. Parasempatikleri n.vagus'tan, sempatikleri ise n.splanchnicus minor ve bir kısmı torakal medulla spinalis segmentlerinden gelir. Bunların ovaryum içindeki dağılımı ve görevleri tam olarak bilinmemektedir.^{9,26}

2.3. OVARYUM'UM HİSTOLOJİSİ

Ovaryum'un yüzeyi tek katlı yassı ya da kübik bir epitel ile kaplıdır. Periton'un mezotelyumundan farklı olan bu epitele **germinal epitel** (epithelium germinativum) adı verilir. Epitelin elektron mikroskopik görüntülerinde hücrelerin üst yüzeylerinde çok sayıda mikrovillus ve sitoplazmada çekirdek çevresinde yerleşik iyi gelişmiş organeller içerdiği izlenir. Hücrelerin yan yüzlerinde ise desmozomlar bulunur.^{17,18,19,20}

Germinal epitelin altında, ovaryum'un beyazımsı rengini veren ve **tunika albuginea** olarak adlandırılan sıkı bağ dokusu katmanı bulunur. Bu iki katman birbirinden bazal membran ile ayrılır. Damardan yoksun olan tunika albuginea katmanında ovaryum'un yüzeyine koşut olarak yerleşmiş kollajen fibriller yer alır.

Tunika albuginea'nın altında, ovaryum folliküllerini içeren **korteks katmanı** ile en içte yer alan ve damardan zengin gevşek bağ dokusu olan **medulla katmanı** yer alır. Bu iki katman arasında kesin bir sınır bulunmaz.^{17,18,19,20}

2.3.1.Ovaryum Korteksi

Korteks ovaryumun işlevsel bölümüdür. Stroma ile stromaya gömülü olan ve çeşitli gelişim evrelerindeki ovaryum folliküllerinden oluşur. Stroma ise kollajen, elastik ve retiküler lif ağları ile iç biçimli bağ dokusu hücreleri olan fibroblastları kapsar. Fibroblastlar hormonal uyarılara diğer organlardaki fibroblastlardan daha duyarlıdır. Korteksin interstisyel bağ dokusu germinal epitel altında sıkışarak tunika albuginea'yı oluşturur.^{17,21}

2.3.2.Ovaryum Medullası

Kan ve lenf damarları ile sınırlardan zengin olan bu bölge kollajen lif demetlerinden ve elastik liflerden oluşan gevşek bağ dokusudur.²²

2.3.3.Ovaryum Follikülleri

Ovaryumda farklı gelişim evreleride 4 tip follikül görülür:

2.3.3.1.Primordiyal Follikül

Olgunlaşmış ovaryumda primordiyal folliküller tunika albuginea'nın hemen altında korteks stroması içinde bulunur. Primordiyal folliküller, bir primer oosit ve onu çevreleyen tek katlı yassı follikül hücrelerinden oluşur. follikül hücreleri birbirlerine desmozomlar ile tutunmuştur ve etraflarını saran bazal lamina ile stromadan ayrılırlar. Bu aşamada follikül içindeki oosit yaklaşık 25 µm çapındadır. Çekirdek hücrenin kenarına yakın yerleşiktir ve oldukça belirgin bir ya da daha fazla çekirdekçik içerir. Çekirdek plazması açılmış kromozomlar nedeniyle veziküler olarak görülür. Oosit sitoplazmasında, **Balbani cisimciği** olarak adlandırılan; Golgi kompleksi membranları ve vezikülleri, endoplazmik retikulum, birçok mitokondriyon ve lizozomların birikmesiyle oluşmuş bir yapı bulunur.^{18,23}

2.3.3.2.Primer Follikül

Ergenlik dönemine gelindiğinde her ovariyal döngüde 5-15 arası primordiyal follikül, folliküler büyüme evresine girerek primer folliküllere farklanır. Primer oosit 100-150 µm çapına ulaşırken çevresini saran yassı folliküler hücreler kübikleşir. Bu hale gelen folliküle **tek sıralı (unilaminar) primer follikül** denir. Daha sonra mitotik erke sahip olan folliküler hücreler çoğalır ve çok katlı hale gelerek **çok katlı (multilaminar) primer follikül** adını alır. Bu aşamada follikülü çevreleyen folliküler hücrelere **granüloza hücreleri**; oluşturdukları katmana ise **granüloza**

katmanı denir. Primer oosit tarafından salgılanan aktivin sinyal molekülü, granüloza hücrelerinin çoğalmasını sağlar. ^{18,19,24,25}

Bu evrede, oosit ile oositi çevreleyen follikül hücrelerinden **zona pellusida** olarak adlandırılan bir katman oluşturulur. Zona pellusida, glikoprotein ve glikozaminoglikandan zengin, eozinofilik, homojen ve PAS (+) bir katmandır . Oositi çevresindeki folliküler hücrelerden ayırır. Granüloza hücrelerinin uzantıları ve oositlerin mikrovillusları, zona pellucida içine uzanırlar ve oluklu bağlantılar aracılığıyla birbirleriyle iletişim kurarlar. ^{19,20,26}

Granüloza hücrelerinin çoğalmasıyla, follikülü çevreleyen stromada yer alan fibroblastlar **teka folliküli** denilen bağ dokusu katmanını oluşturmaya başlarlar. Bu katman daha sonra farklanarak içte aşırı damarlı ve hücreli bir tabaka olan **teka internayı**; dışta ise daha çok fibröz bağ dokudan oluşan **teka eksternayı** oluşturur. ^{19,26}

2.3.3.3.Sekonder (Antral) Follikül

Çok sıralı primer follikülün granüloza katmanı, hipofiz bezi ön lobu bazofilik hücrelerinden salgılanan FSH (follikül uyarıcı hormon) etkisiyle çoğalmayı sürdürür ve 8-12 katlı bir granüloza tabakası oluşur. Çapı 200 µm'ye ulaşan follikülün granüloza hücre katmanında boşluklar oluşmaya başlar. Boşluklar **folliküler sıvı** (liquor folliculi) olarak adlandırılan bir sıvı ile dolar. Oluşan follikül sıvısı plazma bileşenlerini ve follikül hücreleri tarafından salgılanan ürünleri içerir. Sıvıda glikozaminoglikanlar, steroid-bağlayıcı proteinler ile diğer bazı proteinler ve yüksek yoğunlukta steroidler (progesteron, androjenler ve östrojenler) bulunur. Sıvı dolu bu boşluklar birleşerek **antrum** denilen daha büyük bir boşlukluğu oluşturur.

Antrum şekillenirken oosit ve çevresinde kalan bir grup granüloza hücresi antruma doğru uzar ve **kumulus ooforus**'u biçimlendirir. Oositin çevresinde kalan tek katlı granüloza hücrelerine **korona radiata** adı verilir. Bu aşamaya gelen folliküle de artık **sekonder** ya da **antral follikül** denir.
18,19,24

2.3.3.4. Graaf (Olgun) Follikül

Follikül gelişiminde son aşamadır. Oosit 150 µm çapa ulaşmıştır ve follikülün çapı da yaklaşık 250 µm kadardır. Antrum şekillenirken oosit ve çevresinde kalan bir grup granüloza hücresi antrum içine sarkarak **kumulus ooforus**'u oluşturur. Oositin çevresinde kalan tek sıralı granüloza hücreleri **korona radiata**'yı şekillendirirler. Ovaryal döngünün başlamasından 12-14 gün sonra olgunlaşan sekonder oosit, çevresindeki korona radiata katmanıyla birlikte Graaf follikülü'nden atılır. Bu olaya **ovulasyon** denir. Her ovaryal döngüde bir grup follikül gelişmeye başlarsa da, bunlardan yalnızca bir tanesi tam anlamıyla olgunlaşır. Diğerleri dejenere olarak atretik folliküller haline gelir.^{14,18,22,25}

Ovulasyondan hemen önce, primer oosit I. Mayoz bölünmeyi tamamlayarak büyüklükleri farklı, ancak her biri 23 çift yapı (2nDNA) kromozom içeren iki yavru hücre oluşturur. Bu hücrelerden biri sitoplazmanın büyük bölümünü içeren sekonder oosit, diğeri ise çok az sitoplazma kapsayan 1. kutup cisimidir. I. kutup cisimi, oosit'in hücre zarıyla zona pellusida arasındaki perivitellin aralıkta yer alır. I. Mayoz bölünmenin tamamlanmasından hemen sonra sekonder oosit II. Mayoz bölünmeye girer ve fertilizasyona değin bekler. Ovulasyondan hemen önce, döngünün 14. gününde, artan LH (luteinizan hormon) 'un mayotik bölünmeyi uyardığı düşünülmektedir. II. Mayoz bölünme ancak oosit II, bir spermiumla

döllendirse tamamlanır. Dölllenme olmazsa ovulasyondan 24 saat sonra oosit II dejenere olur.¹⁴

Ovulasyondan sonra, ovaryum dokusu içerisinde kalan granüloza ve teka interna hücreleri **korpus luteum** olarak adlandırılan ve ovaryumun korteks bölgesinde yer alan geçici bir içsalgı bezi oluştururlar. LH uyarımıyla korpus luteum, progesteron ve östrojen salgılar. Gebeliğin oluşmadığı durumlarda korpus luteum dejenere olur ve bulunduğu yer fibroblastlar tarafından kaplanarak sıkı bir bağ dokusu oluşur. Bu dokuya **korpus albicans** denir. Gebeliğin oluşması durumunda ise korpus luteum, ilk 8 hafta (plasenta oluşuncaya değin) boyunca varlığını sürdürür.^{19,25}

2.4. OVARYUM FİZYOLOJİSİ

2.4.1. Hipofiz Ön Lobu Hormonları ve Ovaryum'lar Üzerine Etkileri

Kadın genital hormon sistemi, üç ayrı hormon grubundan oluşur:

1. Hipotalamik-serbestleştirici bir hormon olan; **Gonadotropin-Serbestleştirici Hormon (GnRH)**

2. Hipofiz bezi ön lobu hormonlarından **Folikül Uyaran Hormon (FSH)** ve **Luteinize edici Hormon (LH)**. Bu hormonların her ikisi de hipotalamus'ta sentezlenen GnRH'a yanıt olarak salgılanır.

3. Ovaryum hormonları, **östrojen** ve **progesteron**dur. Bu hormonlar hipofiz ön lobundan salgılanan iki hormona (FSH, LH) yanıt olarak, ovaryum'larca salgılanır.

Kadında görülen aylık ovaryal döngü sürecinde, bu hormonların salgı miktarları değişkenlik gösterir. Döngünün farklı evrelerinde son derece farklı hızlarda salgılanırlar. Döngü sürecinde ovaryumdaki değişikliklerin tümü ön hipofiz bezinden salgılanan gonadotropik hormonlar olan FSH ve LH'a bağlıdır.³¹

FSH ve LH, molekül ağırlıkları yaklaşık 30000 dalton olan küçük glikoprotein yapısındaki hormonlardır. Bu iki hormon ovaryum'lardaki hedef hücrelerini, hücre zarlarında bulunan özgül reseptörlere bağlanarak uyarırlar. Aktive olan reseptörler, bu hücrelerin salgı, büyüme ve çoğalma hızını arttırmırlar. Bu uyarıcı etkilerin tümü hücre sitoplazmasındaki ikincil haberci siklik AMP (cAMP) sisteminin aktivasyonu sonucu gerçekleşir. cAMP, protein kinaz oluşumunu sağlar, daha sonra da çeşitli fosforilasyonlarda, anahtar enzim görevi yaparak pek çok hücre içi işlevi hızlandırır. **FSH**, çok katlı primer follikülün granüloza hücrelerindeki reseptörlere bağlanarak sekonder follikül gelişimini, gelişen folliküllerden östrojen salınımını ve LH reseptör yapımı için teka interna hücrelerini uyarır. **LH** ise, teka internadaki bu reseptörlere bağlanarak bu hücrelerde kolestroiden androjen yapımını uyarır. Bu androjen, bazal membranı geçerek granüloza hücrelerine gelir ve burada **östrojen hormonuna** dönüştürülür. Bunun dışında, sekonder follikülün granüloza hücrelerinden inhibin, folliostatin, aktivin gibi hormonlar da salgılanır. Gelişen follikülden salgılanan yüksek miktardaki östrojenle birlikte bu hormonlar, dolaylı olarak hipotalamus'a etki eder ya da doğrudan ön hipofiz bezinden fazla FSH salgılanmasını baskırlar. Aynı zamanda, ön hipofizin bazofil hücrelerinden LH salgılanmaya başlar.^{18,31}

2.4.1.1.Ovulasyonda LH'un önemi ve yükselişi

LH, follikül büyümesinin son aşamasında ve ovulasyon anında gerekli olan bir hormondur. Ovulasyondan hemen önce kandaki LH miktarı 6-10 kat artış gösterir. Bu ani artışla birlikte primer oosit 1.mayoz bölünmeyi tamamlar ve sekonder oosit oluşur. Daha sonra sekonder oosit 2.mayoz bölünmenin metafaz evresinde bekler. Artan LH'in etkisiyle ovulasyon başlar. Olgun follikül, ovaryum yüzeyinden dışarıya doğru **stigma** denilen bir çıkıntı yapar. LH düzeyinin artması sonucu uyarılan teka eksterna ve tunika albuginea içindeki proteolitik etkinlik, olgun Graaf follikülünün yırtılmasını kolaylaştırır. Dışarıya atılan oosit ovaryum'a çok yaklaşmış olan uterus tüplerinin fimbriyaları tarafından yakalanarak tuba uterina içine alınır. Ovulasyon puberteden menapoz'a değin 28 günde bir olaylanır. Ovulasyon iki kanama arasında, döngünün 14. gününde gerçekleşir ve genelde bir adet oosit atılır. Bazen aynı anda birkaç oosit atılabilir.^{18,31}

Oosit'in ovulasyonla dışarı atılmasını izleyen ilk birkaç saat içinde, geride kalan granüloza ve teka interna hücreleri yine LH'in etkisiyle **lutein hücrelerine** dönüşür. Bu luteinizasyon sürecinin sonunda **korpus luteum** oluşur. Gebelik gerçekleştiğinde plasentadan LH'la hemen hemen aynı özelliklere sahip diğer bir hormon olan **koryonik gonadotropin (hCG)** salgılanır. Bu hormon korpus luteum'a etki ederek yaşamını uzatır ve genelde gebeliğin ilk 2-4 aylık süresinde devamını sağlar.^{18,31,32}

Korpus luteum'daki granüloza hücreleri **progesteron** ve **östrojen** salgılar. Teka interna hücreleri ise **androstenedion** ve **testosteron** gibi androjenleri salgılar. Ancak, bunların da çoğu granüloza hücrelerine geçerek kadın hormonlarına dönüştürülür. Lutein hücreler

çoğalma, genişleme, salgı ve dejenerasyon sırasına göre programlanırlar. Yaklaşık 12 gün süren bu döngünün sonunda ,döllenme olmadığında, luteal hücrelerden salgılanan **inhibin** hormonu etkisiyle FSH ve LH düzeyi azalır. Sonuçta korpus luteum dejenere olarak fibrotik bir yapı olan **korpus albicans**'a dönüşür. Korpus luteumun dejenerasyonu ile azalan östrojen ve progesteron düzeyleri sonucunda menstrüasyon başlar.³¹

Granüloza hücrelerinden salgılanan östrojen ve progesteronun dişi üreme sistemi üzerinde önemli etkileri vardır. Östrojenin, ovaryum folliküllerinin büyümesini sağlaması ve FSH salınımını düzenlemesinin dışında dişi üreme organlarının şekillenmesinde, sekonder dişi cinsiyet özelliklerinin oluşmasında da görevi vardır. Dış genital organlar östrojen hormonu etkisiyle gelişir, tüm genital kanallardaki epitel örtüsü ve düz kaslar büyür, endometriyum kalınlaşır, protein anabolizması uyarılır, meme dokusunda büyüme olur, deri altı yağ dokusu artar, sıvı ve elektrolit dengesi korunur. Progesteron ise, uterus endometriyumunun salgısını artırır, tuba uterina'ları döşeyen mukozada sekresyon evresiyle ilgili değişimleri başlatır, meme dokusunun büyümesine neden olur.^{18,21,31}

2.5. HİPOKSI

Dokuların normal metabolik fonksiyonlarını sürdürmek için gerek duyduğu oksijenin yetersiz olduğu durumlarda **hipoksi** oluşmaktadır.³³

2.5.1.Hipoksinin Çeşitleri

1- Hipoksik (Hipobarik) Hipoksi : Arterlerdeki PaO₂'nin düşmesine (PaO₂ < 80 mm Hg) koşut olarak dokulara giden oksijen miktarının azalması sonucu ortaya çıkan hipoksidir.

2- Anemik Hipoksi : Oksijeni taşıyacak olan hemoglobin miktarının azalması ya da hemoglobinin oksijeni taşıyamaması nedeniyle oluşur.

3- Dolaşım (Stağnant, İskemik) Hipoksisi : Damarsal bir hastalık ya da arteryel venöz kısa yol oluşumuna bağlı olarak dokuya giden arterlerde kan akımının azalması ya da engellenmesi durumunda görülür.

4- Histotoksik Hipoksi : Bazı zehirli maddelerin (siyanid, CO, narkotikler) , mitokondriyal solunumdaki elektron taşıma sistemini durdurması sonucu hücrenin oksijen kullanımını önlenmesiyle oluşur.^{33,34}

2.5.2.Hipoksi'nin Etkileri

Hücresel boyutta hasar en çok hipoksi sırasında gözlenmektedir. Oksijen azlığından en çok etkilenen organel mitokondriyonlardır. Bunun sonucunda hücresel ATP düzeyi azalır, enerji üretimi ve kullanımı arasındaki denge bozulur.³⁵

Dokulardaki O₂ miktarı aerobik metabolizmayı sürdürmeye yetmediğinde anaerobik metabolizma uyarılır. Laktat ve hidrojen iyonlarının yapımı artar ve laktik asit oluşumuyla birlikte kan pH'sında anlamlı bir düşüş gözlenir.³³

Hipoksiden ilk olarak etkilenen organlar ise beyin, göz retinası, kalp ve akciğerlerdir. Zamanla tüm organlar etkilenir.

Hafif hipoksida (PaO₂ = 60-79 mm Hg) uyku hali,tembellik, zihin ve kas yorgunluğu, bazen baş ağrısı, kalp atışlarında hızlanma, ender olarak mide bulantısı, bazen öfori görülür. İlerlediği durumlarda (PaO₂ = 40-59 mm Hg) merkezi sinir sisteminde, kalpte ve böbreklerde fonksiyonel bozukluklar belirir. Ağır derecedeki hipoksida (PaO₂ < 40 mm Hg) hücre ölümleri gerçekleşir. Son aşamada ise ölüm görülür.^{31,36,37}

2.5.3.Hipoksik Hipoksi

En sık görülen hipoksi türü olan hipoksik hipoksi, normal kişilerin deniz düzeyinden 3600 metre ve daha üzeri yüksekliklere çıkmasıyla ya da pnömoni gibi sık rastlanan birçok hastalığın sonucu olarak izlenmektedir.^{31,34} Hipoksik hipoksinin diğer nedenleri ise şöyle sıralanabilir:

1- Atmosferdeki oksijen eksikliği ya da hipoventilasyon sonucu akciğerlerin yetersiz oksijenlenmesi,

2- Çeşitli pulmoner hastalıklar sonucu alveolar ventilasyon-perfüzyon oranının bozulması ve solunum membranlarında difüzyonun azalması,

3- Venöz-arteryal şantlar,

4- Anemi ya da anormal yapılı hemoglobin, genel ve lokal dolaşım yetmezliği ile doku ödemi sonucunda kan ile dokulara taşınan oksijenin yetersiz olması,

5- Dokulara gelen oksijeni dokuların kullanamaması. Bunun nedenleri ise; hücresel oksidasyon enzimlerinin zehirlenmesi ile oksijen kullanmadaki hücresel metabolik kapasitenin, toksisite, vitamin yetmezliği ya da diğer faktörler nedeniyle azalmasıdır.

Gebelik sırasında uzun süre etkin kalınan hipoksi sırasında kronik maternal ve fetal hipoksiler oluşmaktadır. Deneysel olarak, maternal arteriyel oksijen basıncı 40 mm Hg'ye indirilerek maternal hipoksi oluşturulur. Uzun süreli maternal hipoksi sonucunda fütüse giden oksijen azalmakta ve fütüsün arteriyel oksijen basıncı ise 10-12 mm Hg'ye düşmektedir. Bugüne değin koyun, domuz ve sıçanlarda deneysel olarak kronik fetal hipoksi çalışılmış ve bunun sonucunda fetal büyümenin geciktiği gözlenmiştir. Hipoksi sonucu büyüme geriliği gözlenen fütüslerde düşük arteriyel kan basıncı ve düşük nabız izlenmektedir. Kronik fetal oksijen yetmezliği dokularda hücre büyümesi ve dolaşım erkinin artması ile dengelenmeye çalışılmakta ancak buna karşın başta beyin olarak pek çok organda hasar oluşmaktadır.⁷

Yüksek irtifalara çıktıkça azalan oksijen basıncı nedeniyle oluşan hipoksi özellikle dağcılarda çok sık görülebilmektedir. Deniz düzeyinde 104 mm Hg olan alveoler oksijen basıncı , 6000 m yüksekliğe çıktığında 40 mm Hg'ye düşmektedir. Aklimatize olmuş, yani vücudunu yüksek irtifaya alıştırmış bir insanda ise bu değer 53 mm Hg'dir. Yüksek irtifalarda uzun süre yaşayan insanlarda aklimatizasyon sonucunda düşük oksijen vücutta daha az zararlı etkilere yol açar. Bu uyumu sağlayabilmek için; pulmoner ventilasyonda büyük bir artış, eritrositlerde çoğalma, akciğerlerin difüzyon erkinde artma, dokuların damarlanmasında artış, düşük oksijen basıncına karşı hücrelerin oksijeni kullanma yeteneklerinde artma görülür. Bu sayede kişi, hipoksinin etkisinde olmadan yaşamını sürdürebilir ya da daha yükseklere çıkabilir.³¹

Yeterince oksijenlenemeyen dokularda ise enerji metabolizması değişerek doku ATP (adenozin trifosfat) miktarında azalma görülmektedir. Hipoksik koşullarda aşırı adenosin yıkımı sonucu oluşan hipoksantin enzimatik yıkımı sırasında ksantin dehidrogenaz enzimi tarafından **serbest oksijen radikalleri (SOR)** üretildiği bildirilmektedir. Organizmada oksidatif mekanizmalar sonucu oluşan SOR, aşırı üretim veya vücuttaki oksidan/antioksidan dengenin bozulması durumunda, protein, lipid, karbonhidrat ve nükleotid gibi biyomolekülleri etkileyerek zararlı etki göstermeye başlamaktadır. Normal metabolizma sırasında yan ürün olarak üretilen bu radikaller vücuttaki antioksidan mekanizmalar ile ortamdan uzaklaştırılır. Bu mekanizmalar, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimler ile askorbat, E vitamini, Ginkgo biloba gibi serbest radikal tutucularından oluşmaktadır.^{13,35,38}

2.6. GİNKGO BİLOBA

Anavatanı Asya olan Ginkgo biloba, yüzyıllardır Çin’de sağlık koruyucu özelliği nedeniyle astımdan nezleye, vajinal candidiasis’ten üriner sistem hastalıklarına kadar birçok hastalığa karşı kullanılmaktadır. 1960’lı yıllarda Almanya’da yapılan bir çalışmada Ginkgo biloba ekstratının, serebral ve periferik kan akışı bozukluklarında yarar sağladığının kanıtlanması üzerine tıpta yerini almıştır. Bugün dünyada alternatif tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır.³⁹

Ginkgoaceae ailesine ait olan Ginkgo biloba, Türkçe’de ginkgo ya da Japon eriği olarak adlandırılır. Ginkgo biloba adını ise yapraklarının iki loblu şeklinden almıştır.⁴⁰

Ginkgo biloba yapraklarından elde edilen ekstrenin içerisinde %22-27 oranında flavon glikozitleri (kersetin, izoramnetin; biflavonlar-amentoflavon), %5-7 oranında terpenik laktonlar (gingkolit A-C, J,M ; bilobalit) yanında diğer bileşenler olan proantosiyaniidler, organik asitler (hidroksikinurenik asit, kinurenik asit, protokateşik ve vanilik asit), ozlar, ginkgolik asit, D-glukarik asit bulunur.⁴¹

Ginkgo biloba ekstresi, içeriğindeki flavanoidler nedeniyle serbest radikal tutucu özelliğe sahipken, ginkgolidler sayesinde ise kuvvetli platelet aktive edici faktör (PAF) karşıtı olarak etki gösterir. PAF vücutta, trombosit aktivasyonunu sağlar, nötrofil agregasyonu, süperoksit radikal üretimi, lizozomal enzimleri salınması ve lökotrien sentezini uyarır.³⁵

Bu etkileri nedeniyle Ginkgo biloba ekstratı, PAF ve serbest radikallerin rol oynadığı doku hasarı gibi patolojik durumların tedavisinde kullanılmaktadır.

2.7.Dönüştürücü Büyüme Faktörü (TGF- β)

Dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) ailesi, gelişimi çok yönlü denetleyen hücre dışı büyüme faktörlerinin büyük bir grubunu oluşturur. 112 amino asitlik aynı büyüklükte iki alt birim içeren ve 25 kDa ağırlığındaki peptidler olan TGF- β üyeleri, hücre proliferasyonu, farklılaşması, göçü, adezyonu ve ölümü gibi hücrenel süreçleri düzenleme yeteneğine sahiptir. ^{42,43}

TGF- β ve ilgili faktörler, organizmanın tüm dokularının gelişiminde, homeostazisinde ve onarımında çok önemli rol oynarlar. TGF- β ve benzer faktörler, 2 tip reseptör olan serin/treonin protein kinazları bir araya getirerek gen ekspresyonunu düzenlerler. Bu kinazlardan biri diğerini fosforlar, fosforlanan kinaz SMAD proteinlerine dönüşür. SMAD'lar, hücre çekirdeği içine sinyal taşıyan ve özel olarak DNA'ya bağlanma yeteneği ile transkripsiyonel kompleks oluşturan özgün bir protein ailesidir. Reseptör kompleksin ligand aktivasyonundan sonra tip I reseptör kinazlar özgün SMAD'ları fosforile ederler, bu fosforile olan SMAD'lar daha sonra Smad4 ile birleşerek hücre çekirdeğine taşınırlar. Bu kompleksler çekirdek içinde yalnız veya DNA-bağlanma altbirimi ile birleşik halde bulunabilir ve özgün promotor elemanlarına bağlanarak hedef genleri aktive ederler. ⁴³

TGF- β 'ların hücre içi düzenleyici proteinler olarak potansiyel rolleri vardır. Memeli ovaryumlarında, TGF- β 'nın bilinen 5 şeklienden üçünün (TGF- β 1, - β 2, - β 3) mRNA'ları saptanmıştır.⁴² TGF- β ovaryum

korpus luteum'unda ve oosit'lerde kuvvetli olarak salınırken, teka hücrelerinde ve atretik folliküllerde salınımı zayıftır. Küçük ve orta büyüklükteki folliküllerin granüloza hücrelerinde ise gözlenmez.⁹

2.8.Büyüme Farklılaşma Faktörü-9 (GDF-9)

Son yıllarda üzerinde en çok çalışılan büyüme faktörlerinden biri olan GDF-9, TGF- β ailesinin bir üyesidir. Farelerde ve insanlarda yapılan çalışmalarda, GDF- 9, ovaryal follikülogenez için gereksinim duyulan önemli faktörlerdendir. Oositten salgılanan GDF-9, folliküler gelişim evresinde özellikle primordiyal follikülden primer folliküle geçişte son derece önemli rol oynamaktadır.^{9,42}

Farelerde yapılan çalışmalarda tek sıralı granüloza hücre katmanı içeren primer folliküllerdeki oositten GDF-9 mRNA'sının sentezlendiği ve bu yolla follikülogenezisi uyardığı gösterilmiştir.^{42,44} Oositten salgılanan GDF-9 parakrin yolla etki ederek granüloza hücrelerindeki reseptörlerine bağlanır.⁴⁵

Bu çalışmaların sonucuna göre GDF-9 yetmezliğinin olduğu olgularda tek sıralı granüloza hücre katmanı içeren primer folliküler aşamadan sonraki ileri folliküler gelişim aşamasında belirgin bir engelin olduğu ve buna bağlı olarak üreme yetmezliğine neden olduğu saptanmıştır . Bu nedenle GDF-9 *in vivo* somatik hücre fonksiyonları için gereksinim duyulan ilk oosit kökenli faktör olarak gösterilmektedir.⁴²

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Deney Hayvanları ve Gruplandırma

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi' inden sağlanan Wistar albino cinsi gebe sıçanlar kullanıldı. Deneklerin bakım odasında ısı 21-23 °C ve ışık/zaman ayarı 14/10 saat olarak belirlendi.

Çalışmada; gelişimin 7. , 14. ve 21. Wistar albino sıçanlardan, her grupta 6 sıçan olacak şekilde 9 grup oluşturuldu;

1. Grup: Gelişimin 7.günü Kontrol grubu (n=6)
2. Grup: Gelişimin 7. günü Hipoksi grubu (n=6)
3. Grup: Gelişimin 7. günü Hipoksi + Ginkgo biloba uygulaması yapılan grup (n=6)
4. Grup: Gelişimin 14. günü Kontrol grubu (n=6)
5. Grup: Gelişimin 14. günü Hipoksi grubu (n=6)
6. Grup: Gelişimin 14. günü Hipoksi + Ginkgo biloba uygulaması yapılan grup (n=6)
7. Grup: Gelişimin 21. günü Kontrol grubu (n=6)
8. Grup: Gelişimin 21. günü Hipoksi (n=6)
9. Grup: Gelişimin 21. günü Hipoksi + Ginkgo biloba uygulaması yapılan grup (n=6)

Hipoksi, % 10'luk O₂, % 90'luk N₂ gaz karışımı kullanılarak, hipoksik kamarada oluşturuldu. Vajinal plak oluşumu görülen sıçanlar gebeliğinin 0. gününde kabul edildi. Sıçanlar gebeliğin 5. gününde % 10'

luk O₂ ve % 90'lık N₂ gaz karışımı verilen hipoksik kamaralara konuldu ve 10 gün süresince bu koşullara etkin bırakıldı

Kontrol grubu olarak belirlenen sıçanlar gebelikleri süresince normal atmosfer koşullarında yaşatıldı. Doğumun gerçekleşmesi ile birlikte, Ginkgo biloba uygulanan gruptaki yavrulara her gün aynı saatte 100 mg/kg Ginkgo biloba ekstresi oral yolla uygulandı ve tüm deneklerin deney süresi boyunca vücut ağırlıkları ölçüldü.

Belirlenen günlerde (7., 14. ve 21. günler) denekler intramuskular ketamin (45 mg/kg) ve ksilazin (5 mg/kg) enjeksiyonu ile uyutularak ötenazi gerçekleştirildi. Ötenazi sonrası deneklerin karın bölgeleri açılarak ovaryum dokuları alındı. Alınan dokular elektronmikroskopik inceleme için pH 7,4'de 1/15 µ fosfat tamponlu % 2,5'lük gluteraldehit tespit solüsyonu içine konuldular. Işık mikroskopik inceleme için 1 cm³ büyüklüğünce kesilen doku parçaları % 10'lük nötral formalinde 72 saat süreyle tespit edildiler. Daha sonra alışlagelmiş izleme yöntemlerden geçirilerek parafine gömüldüler. Bloklardan 5 µ kalınlığında kesitler alınarak polilizinli lamlara konuldu.

3.2. İmmunohistokimyasal Yöntem

Çalışmada ovaryumlardaki granüloza hücrelerinde yaşam sinyallerini belirleyebilmek için Santa Cruz GDF-9-keçi poliklonal primer antikor (Cat= sc-7407, Lot= E2206) ve Santa Cruz TGF-β-tavşan poliklonal primer antikor (Cat = sc-146, Lot = A1306), ile Ultra Vision Detection System Zymed Pouvaient sekonder antikor (Cat= 85-9043, Lot=1396691) ile HRP/AEC (Cat= 00-2007, Lot= 319293A) ve Ultra Vision Detection

System Anti-Polyvalent HRP (Cat= TP-125-HL, Lot= PBN70509) ile HRP/AEC (Cat= TA-007-HAC, Lot= 007HAC13565) kullanıldı.

Kesitler 37° C'deki etüvde bir gece tutuldular daha sonra deparafinizasyonu kolaylaştırmak için etüv ısı 57° C'ye çıkarılarak bu ısıda 1 saat bekletildiler.

Lamlar deparafinizasyonu tamamlamak amacıyla 2 kez 15'er dakika ksilol'e etkin bırakıldı. Daha sonra 10'ar dakika sırasıyla % 100, %96 ve %80'lik alkol serilerinden geçirildiler.

Dehidrate edilen dokular alkolden arındırılmak amacıyla iki kez 5'er dakika distile sudan geçirildikten sonra, doku içerisinde formaldehit'in kapattığı reseptör bölgelerinin açığa çıkarılmasını sağlamak amacıyla İM sitrat tamponu pH 6.0 (cat= AP-9003-500, Lab Vision, Fremont, USA) ile mikrodalga fırında retriye işlemi gerçekleştirildi. TGF-β₁ primer antikoru immün boyamasında retriye aşaması gerekmediğinden bu aşama uygulanmadı.

Daha sonra, 15 dakika %3'lük hidrojen peroksit ile etkin bırakılan dokulardan endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. İşlem sonrasında PBS (phosphate buffer şaline) (Zymed) (pH 7.4) ile camlar yıkandı.

Yıkanan lamlara 5 dakika UltraV block (85-9043 Zymed, USA) uygulanarak özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Bu işlemden sonra dokular yıkanmadan primer antikor aşamasına geçildi.

Bu amaçla kesitler TGF- β 1 primer antikoru (poliklonal anti-rabbit) (Santa Cruz, USA) ve GDF-9-goat primer antikoru (poliklonal anti-goat) (Santa Cruz, USA) ile 60 dakika oda ısısında bekletildi.

Daha sonra PBS ile yıkanan lamlara 20 dakika biyotinli sekonder antikoru (85-9043, Zymed, USA) uygulanarak primer antikora bağlanması sağlandı. PBS ile yıkanan camlar 20 dakika streptavidin peroksidaz enzim kompleksine (85-9043, Zymed, USA) etkin bırakıldı, böylece dokularda enzimin biyotin'e bağlanması sağlandı.

Son olarak ortama kromojen AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) (TA-015-HAS, Lab Vision, USA), (Cat=00-2007, Lot=50481594, Zymed, USA) eklenerek yaklaşık 10 dakika bekletildi ve gözle görülebilir immün tepkimenin ortaya çıkması sağlandı.

Zemin boyası olarak Mayer'in hematoksilin'i (OB24092, Merck) kullanıldı. Negatif boyama primer antikoru aşamasında yapıldı. Boyanan camlar ultramount ile lamelle kapatılıp, bilgisayar donanımlı fotoışık mikroskopta (DCM 4000, Leica, Germany) değerlendirildi.

3.3. Elektron Mikroskopik Yöntem

Tespit:

Sorenson' un fosfat solüsyonu:

Sol. A: Potasyum fosfat monobazik (KH_2PO_4)..... 0.908 g

Distile su.....100 ml

Sol. B: Sodyum fosfat dibazik ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)....1.188 g

Distile su.....100 ml
18.2 ml Sol. A + 81.8 ml Sol. B = 100 ml (pH: 7.4)

Gluteraldehit tespit solüsyonunun hazırlanması:

9.2 cc Sorenson fosfat tamponu+0.8 cc Gluteraldehit = 10 cc

Dokular, bu solüsyona 30 dakika etkin bırakılıp sertleşmeleri sağlandıktan sonra, bir çift bistüri yardımıyla 1 mm³ lük parçalara halinde ayrıldı. Bir saat daha gluteraldehit solüsyonunda bekletilerek ilk tespitleri sağlandı. Dokular daha sonra fosfat tamponunda yıkanarak 2. tespit solüsyonuna konuldular.

Osmiyum Tetroksit tespiti:

Osmiyum tetroksit (O_sO₄).....0.1 g
Distile su.....5 cc
1 kısım Sorenson fosfat tamponu + 1 kısım osmiyum tetroksit

Dokular bu şekilde hazırlanmış %1'lik osmiyum tetroksit solüsyonuna 1 saat etkin bırakıldı. Böylece tespitleri ve boyanmaları sağlanmış oldu.

Dehidratasyon ve blok oluşturulması:

Dokular osmiyumla ikinci kez tespit edildikten sonra, doku içindeki fazla suyun uzaklaştırılması için, artan derecelerdeki alkol serilerinden geçirildi.

% 50'lik alkol10 dakika
% 60'lık alkol10 dakika
% 70'lık alkol10 dakika
Uranil asetat30 dakika (1 g uranil asetat + 50 ml % 80' lik alkol karışımı hazırlandıktan sonra süzülerek 10 dakika bekletilip süzülerek uygulandı.)
% 80' lik alkol2 kez yıkandı ve 10 dakika bekletildi.
% 90'lık alkol10 dakika
% 96'lık alkol10 dakika
% 100'lük alkol15 dakika
Propilen oksit30 dakika
Propilen oksit + 1. gömme materyali.....30 dakika (gömme materyalinin doku içine geçişi sağlandı.)
1. Gömme materyali.....1 gece 40 °C' de bekletildi.
1. Gömme materyali:
Araldit CY 212.....10 cc
DDSA.....10 cc
1. Gömme materyali.....2 saat rotatorda oda ısısında
2. Gömme materyali..... 2 saat 40 °C 'de bekletildiler.
2. Gömme materyali:
Araldit CY 212.....10cc
DDSA.....10cc
BDMA.....0.4cc
Dibütil fitalat.....1cc

Daha sonra dokular, içinde aynı gömme materyali bulunan 00 numara jelatin kapsüle gömüldü. Blok içindeki havanın çıkması için 1 saat oda ısısında bekletilen dokular, polimerizasyon için 24 saat 45 °C' de,

48 saat 60 °C' de etüvde bekletildi. Süre sonunda etüv kapatılarak dokular etüv içinde kendi hallerinde soğumaya bırakıldı.

Hazırlanan bloklardan LKB Leica ultramikrotom (Dechert Supernova) ile 1 µ kalınlığında kesitler alındı ve toluidin mavisi ile boyandı. Bilgisayar donanımlı foto-ışık mikroskobu (DCM 4000, Leica, Germany) ile incelenen kalın kesitlerin resimleri çekildi ve bu bölgeler işaretlenerek formvar kaplı bakır gridler üzerine 0.2-0.5 µ'luk ince kesitleri alındı. Kontrast sağlamak ereğiyle, alınan kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyanarak Carl Zeiss EVO LS 10+ ED transmission elektron mikroskopta (TEM) değerlendirilerek fotoğraflandı.

4. BULGULAR

4.1. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.1.1.TGF- β Bulguları

Gelişimin 7. gününde olan deneklere ait kontrol grubunda, ovaryumda TGF- β antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal değerlendirmede, primordiyal follikülden başlayarak tüm gelişim aşamasındaki folliküllerde granüloza hücre sitoplazmasında, ayrıca oosit'te ve zona pellusida'da TGF- β tutulumu zayıftan ortaya değişiyordu. Yer yer bazı teka interna hücrelerinde de orta derecede tutulum ilgiyi çekti (Resim 1).

Gelişimin 7. günü Hipoksi uygulanan grupta ovaryumda TGF- β tutulumunun tüm kontrol grubu yapılarından daha yaygın immünreaktivite gösterdiği izleniyordu (Resim 2).

Gelişimin 7. günü Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan grupta ovaryum kesitinde TGF- β immün tepkimesinin kontrol grubuna eşdeğer görünüm sergilediği gözleniyordu (Resim3).

Gelişimin 14. günündeki deneklere ait kontrol grubunda TGF- β ile yapılan immünohistokimyasal değerlendirmede, küçük büyütmeli resimlerde özellikle primordiyal ve tek sıralı granüloza hücre katmanı içeren folliküllerde tutulum granüloza hücrelerinde zayıftan ortaya; buna karşın oositte ise yoğun olarak ayırt ediliyordu. Büyük büyütmeli resimlerde tutulum, çok sıralı granüloza hücre katmanı içeren primer ve antrum

oluşmuş sekonder folliküllerde zayıftan ortaya değişiyordu. Teka interna hücrelerinin de buna eşlik ettiği ilgiyi çekiyordu (Resim 4).

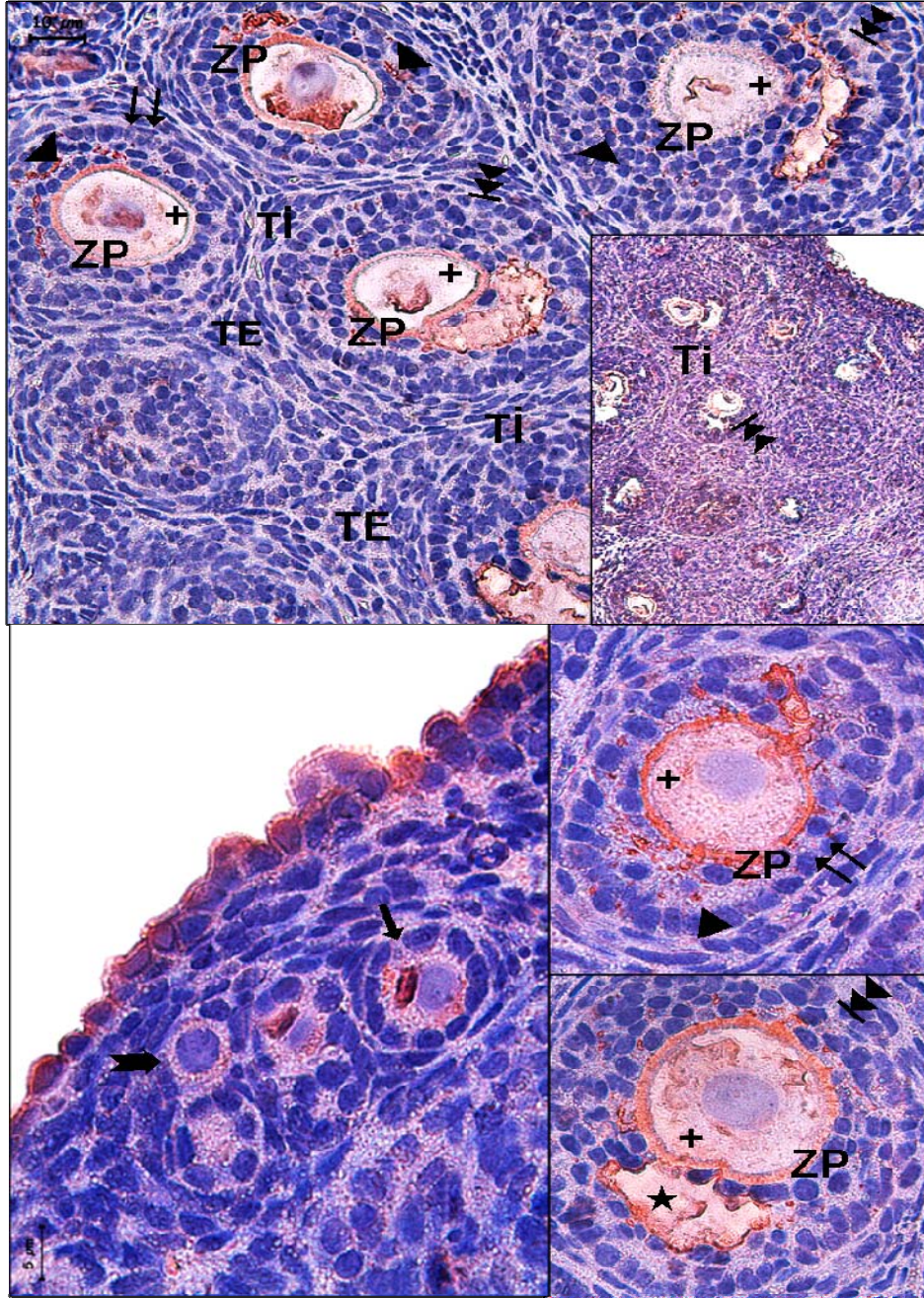
Gelişimin 14. günü Hipoksi grubunda ovaryumda TGF- β tutulumu oldukça yoğundu. Tüm gelişen folliküllerde, granüloza hücrelerinde ve daha yoğun olmak üzere oosit'te belirgin immünreaktivite izleniyordu (Resim 5).

Gelişimin 14. günü Hipoksi-Ginkgo biloba uygulanan grupta ovaryumda TGF- β immünreaktivitesinin kontrol grubuna eşdeş olduğu gözlemlendi (Resim 6).

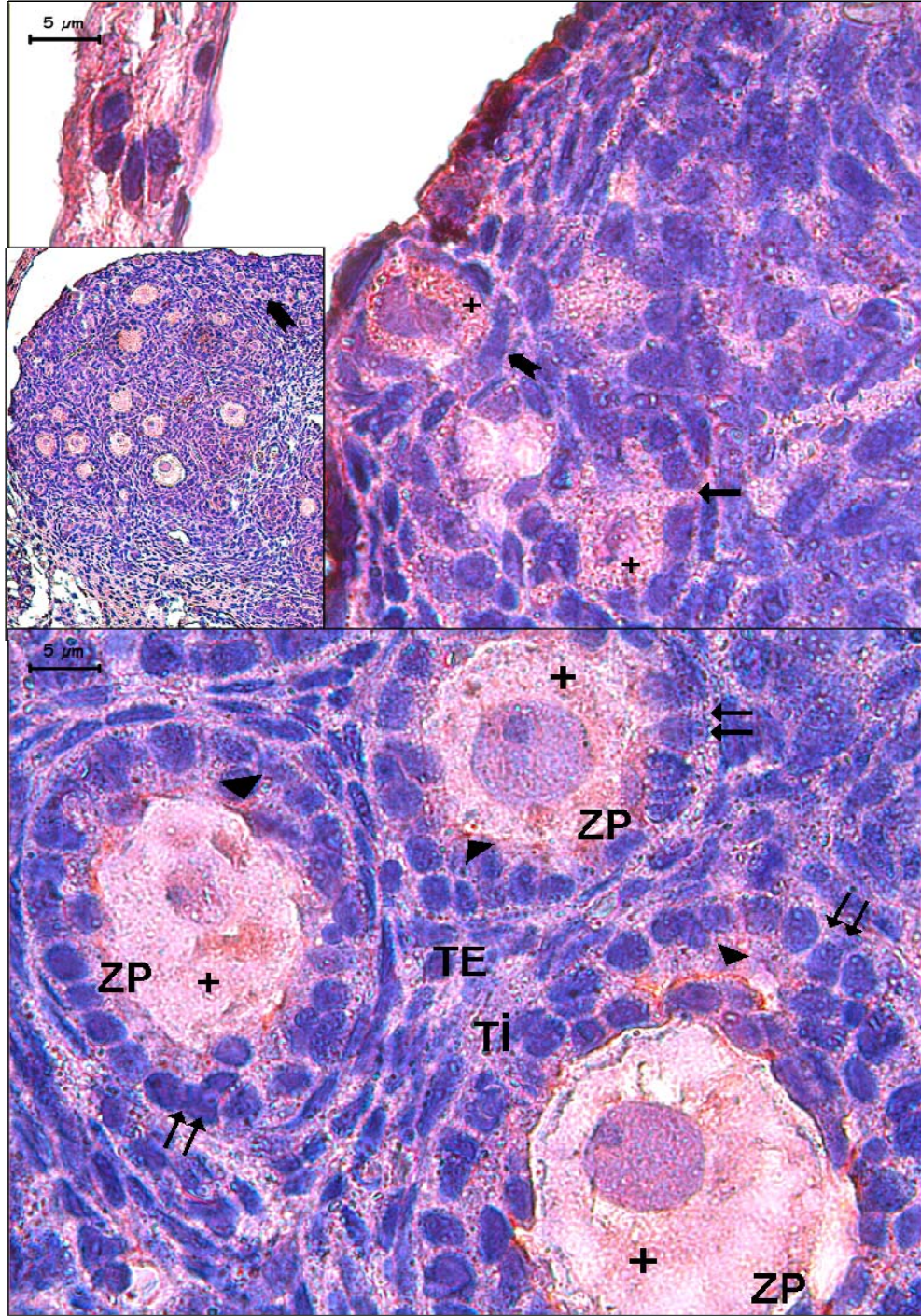
Gelişimin 21.günündeki deneklere ait kontrol grubunda ovaryumda tüm gelişen folliküllerde TGF- β tutulumunun diğer gruplara karşın daha orta derecede olduğu gözlenirken; oosit'te de tutulumun diğer yapılara karşın daha zayıf olduğu dikkati çekti (Resim 7).

Gelişimin 21. günü Hipoksi grubunda ovaryumda TGF- β tutulumunun granüloza hücre sitoplazmasında ve granüloza hücreleri arasında daha yoğun olduğu izlenirken zona pellusida ve oosit'teki immünreaktivitenin daha zayıf olduğu ayırt edildi (Resim 8).

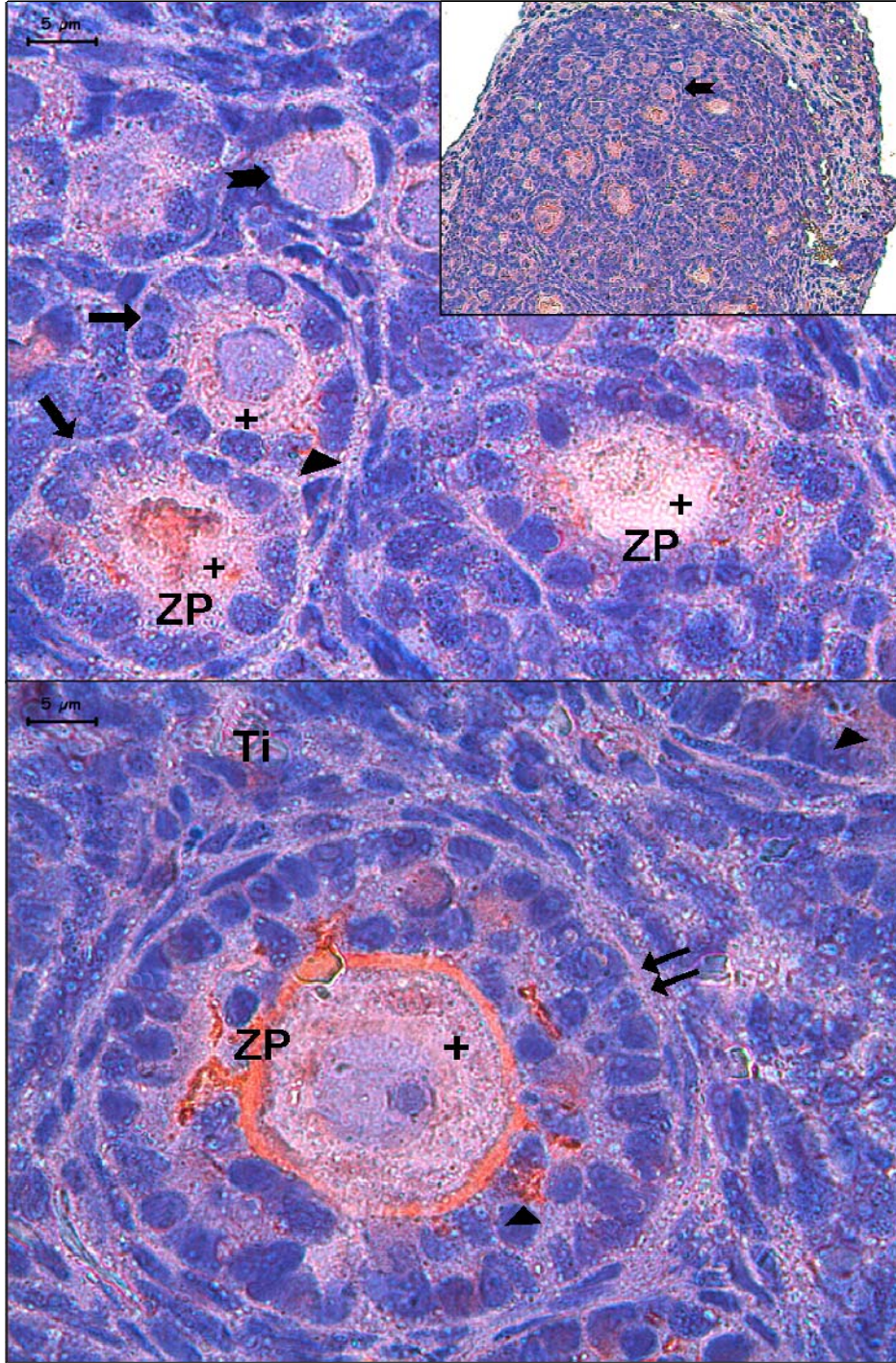
Gelişimin 21. günü Hipoksi+ Ginkgo biloba uygulanan grupta ovaryumda TGF- β ile yapılan değerlendirmede bulgular yine kontrol grubuna eşdeşti (Resim 9).



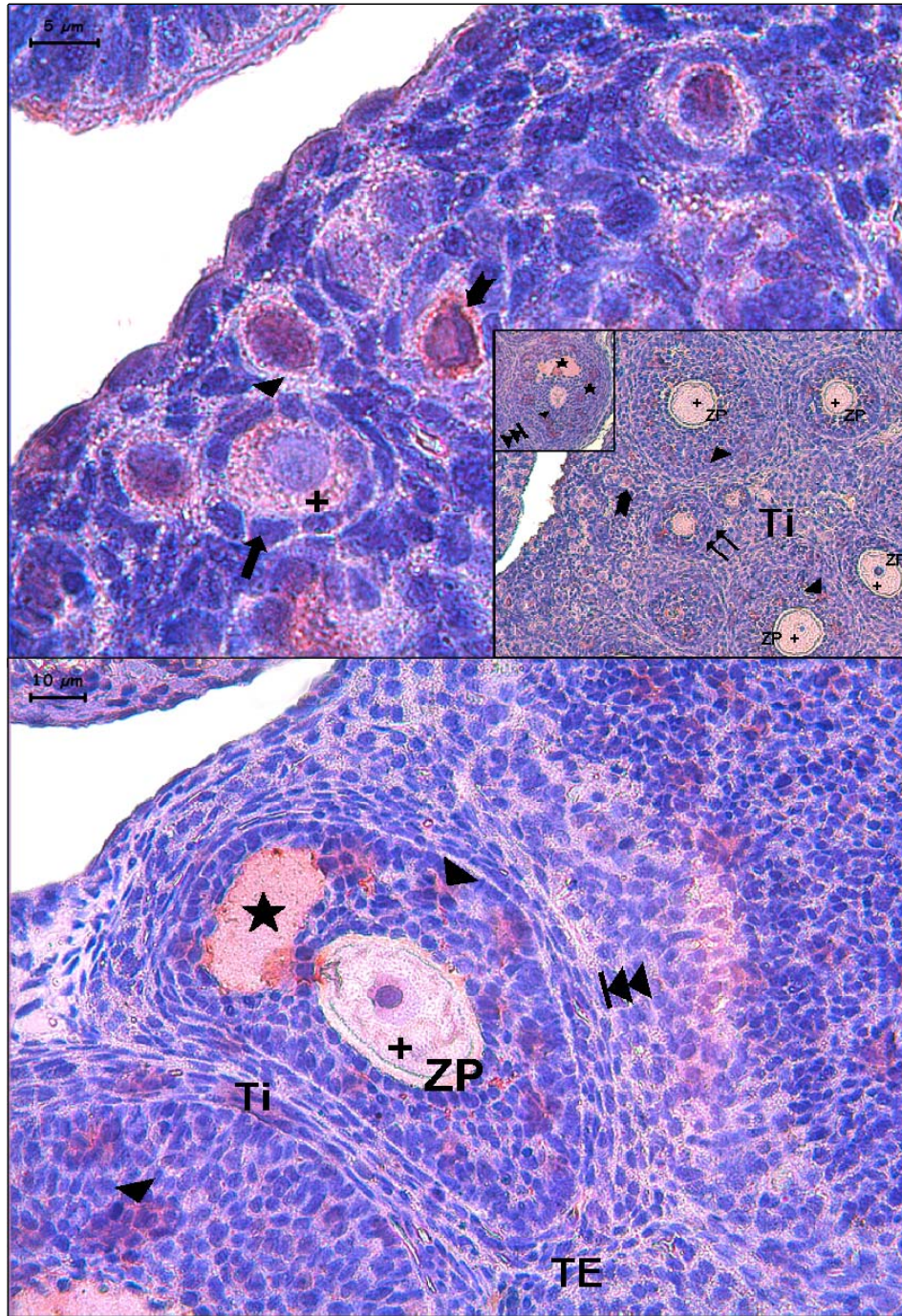
Resim 1: Gelişimin 7. gün kontrol grubunda TGF- β primer antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal boyamada primordiyal follikül (\Rightarrow), tek katlı (\rightarrow) ve çok katlı (\Rightarrow) primer follikül ve antral follikül'ün (\blacktriangleright) antrum'u (\star) ile granüloza hücrelerinde (\blacktriangleright), oosit sitoplazmasında (+), zona pellusida'da (ZP) ve teka interna hücrelerinde (TI) immünreaktivite izleniyor, (TE: teka eksterna) (İmmünperoksidaz&Hematoksilen x100, x400, x1000).



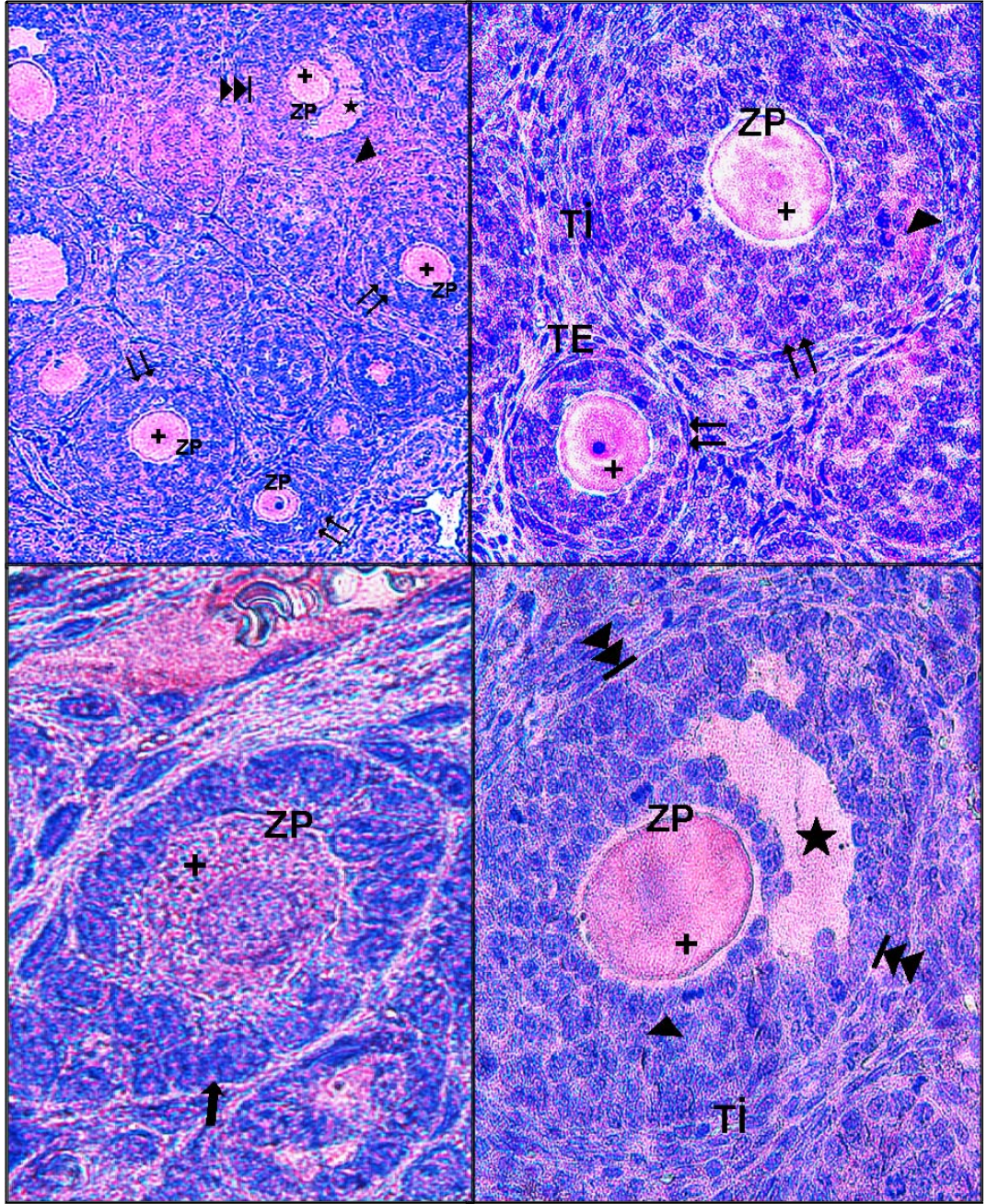
Resim 2: Gelişimin 7. gün Hipoksi uygulanan grubunda TGF- β primer antikorunu immün boyaması, primordiyal follikül (→), tek katlı (→) ve çok katlı (⇨) primer follikül'ün granüloza hücrelerinde (▸), oosit sitoplazması (+) ve zona pellusida (ZP) ile teka interna hücrelerinde (TI) daha yoğun olduğu görülüyor, (TE: teka eksterna) (İmmünoperoksidaz&Hematoksilen x100, x1000).



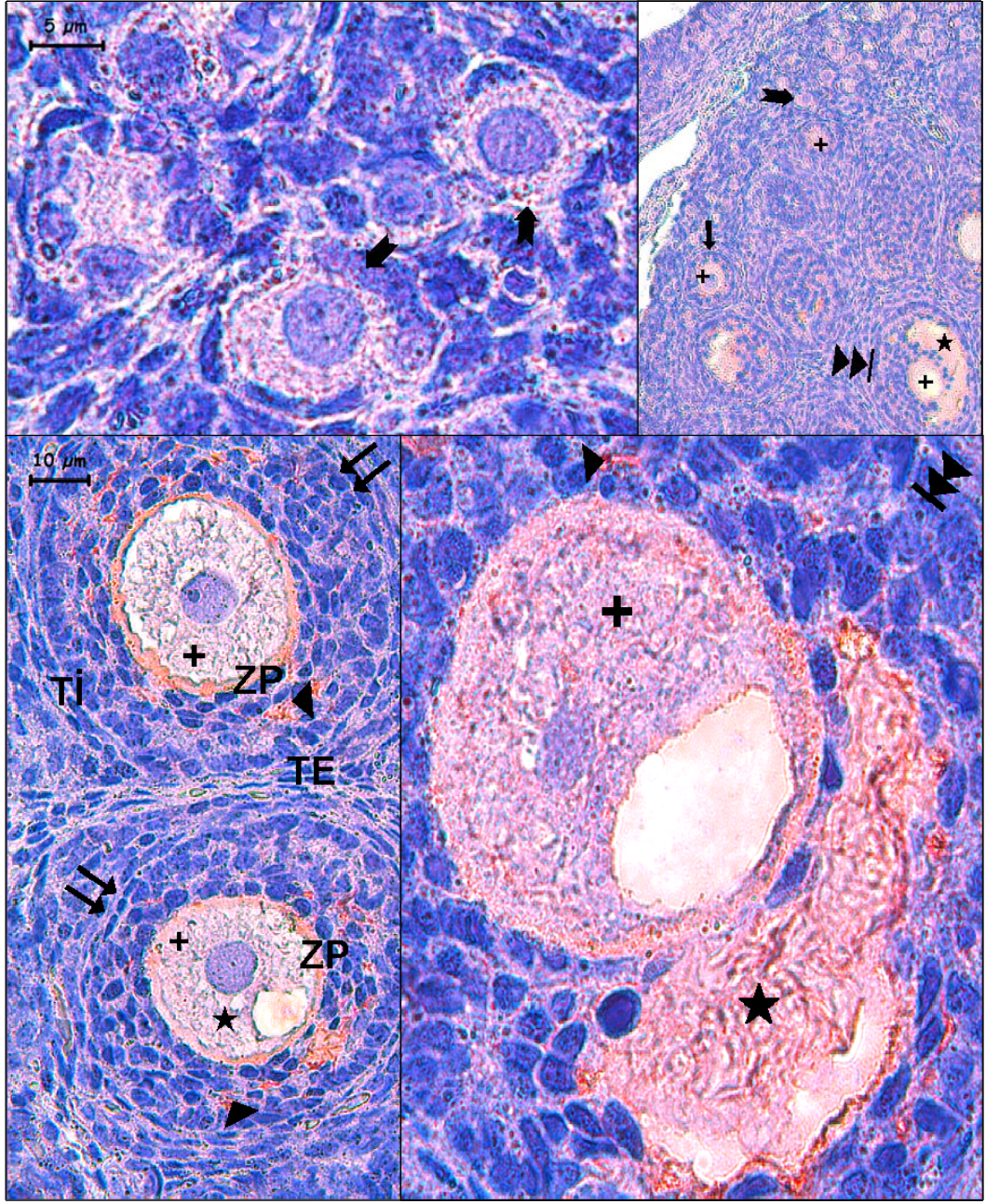
Resim 3: Gelişimin 7. gün Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan grupta primordiyal follikül (→), tek katlı (→) ve çok katlı (⇔) primer follikül'ün granuloza hücrelerinde (▴), oosit sitoplazması (+) ve zona pellusida (ZP) ile teka interna hücrelerinde (Ti) TGF-β primer antikor tutulumu izleniyor (İmmünperoksidaz&Hematoksilen x100, x1000).



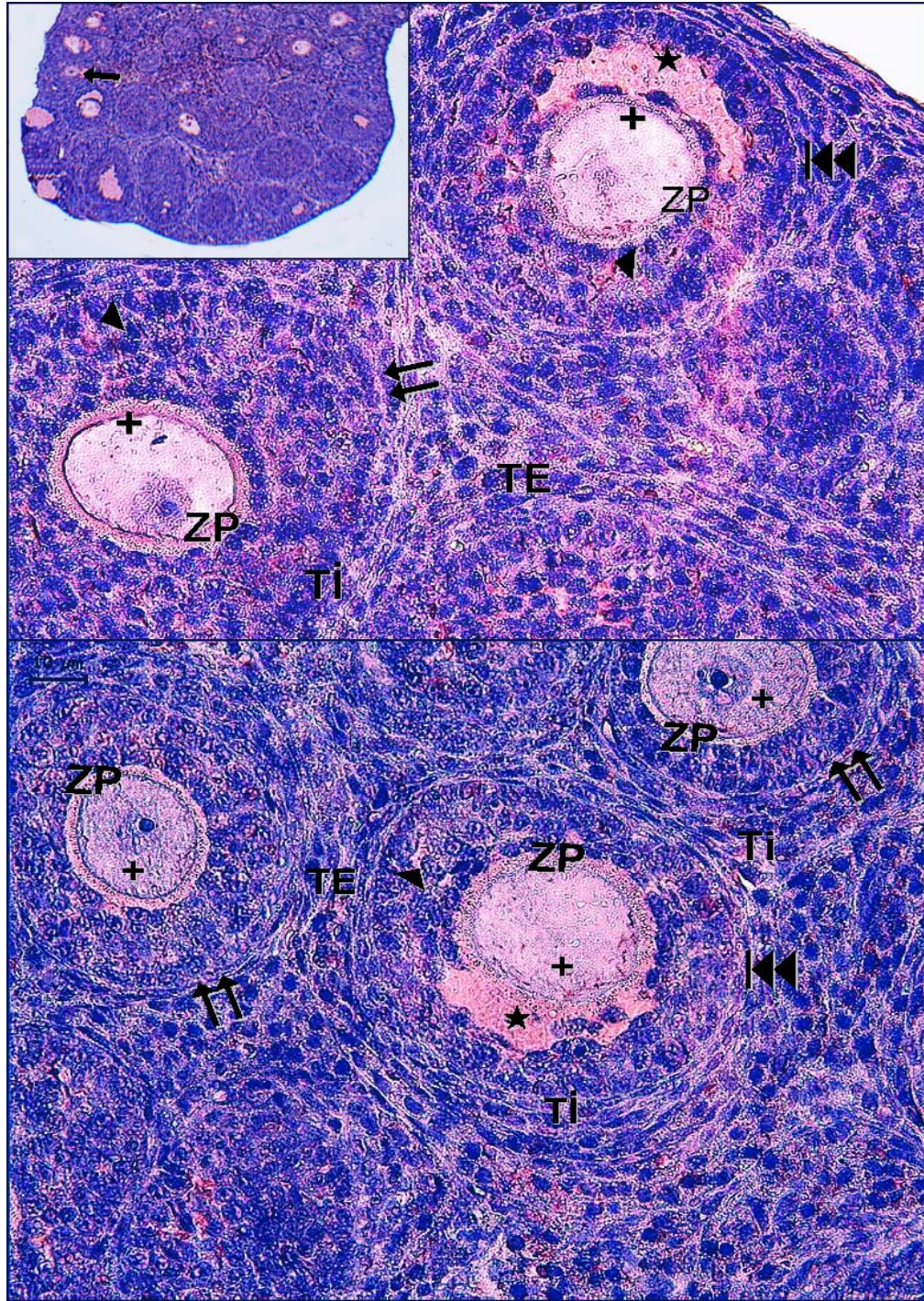
Resim 4: Gelişimin 14. gün kontrol grubu TGF- β ile yapılan immün boyamada; primordiyal follikül (\rightarrow), tek katlı (\leftarrow) ve çok katlı (\rightleftharpoons) primer follikül ve antral follikül (\rightleftharpoons) antrum'u (\star), granüloza hücreleri (\blacktriangleright), oosit sitoplazması (+), zona pellusida (ZP) ve teka interna hücreleri (Ti), immünreaktivitesi, (TE: teka eksterna) (İmmünperoksidaz&Hematoksilen x400, x1000).



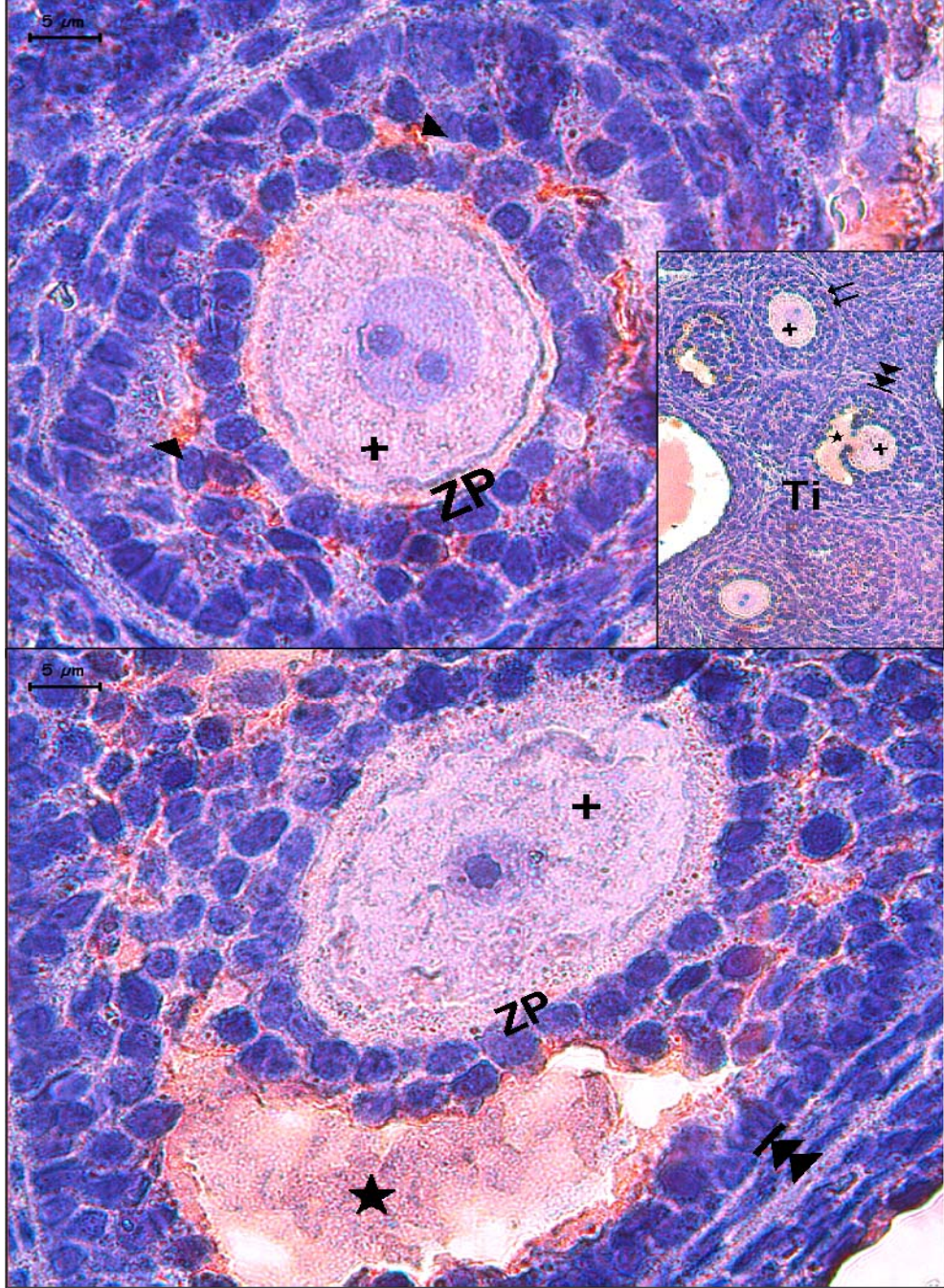
Resim 5: Gelişimin 14. gün Hipoksi uygulanan grubunda TGF- β primer antikoru ile yapılan immünohistokimyasal değerlendirmede, tek katlı (\rightarrow) ve çok katlı (\Rightarrow) primer follikül ve antral follikül (\blacktriangleright) antrum'u (\star), granüloza hücreleri (\blacktriangleright), oosit sitoplazmasında (+) yoğun immün reaktivite görülüyor, (Ti: Teka interna hücreleri , TE: Teka eksterna hücreleri) (İmmünperoksidaz&Hematoksilen x400, x1000).



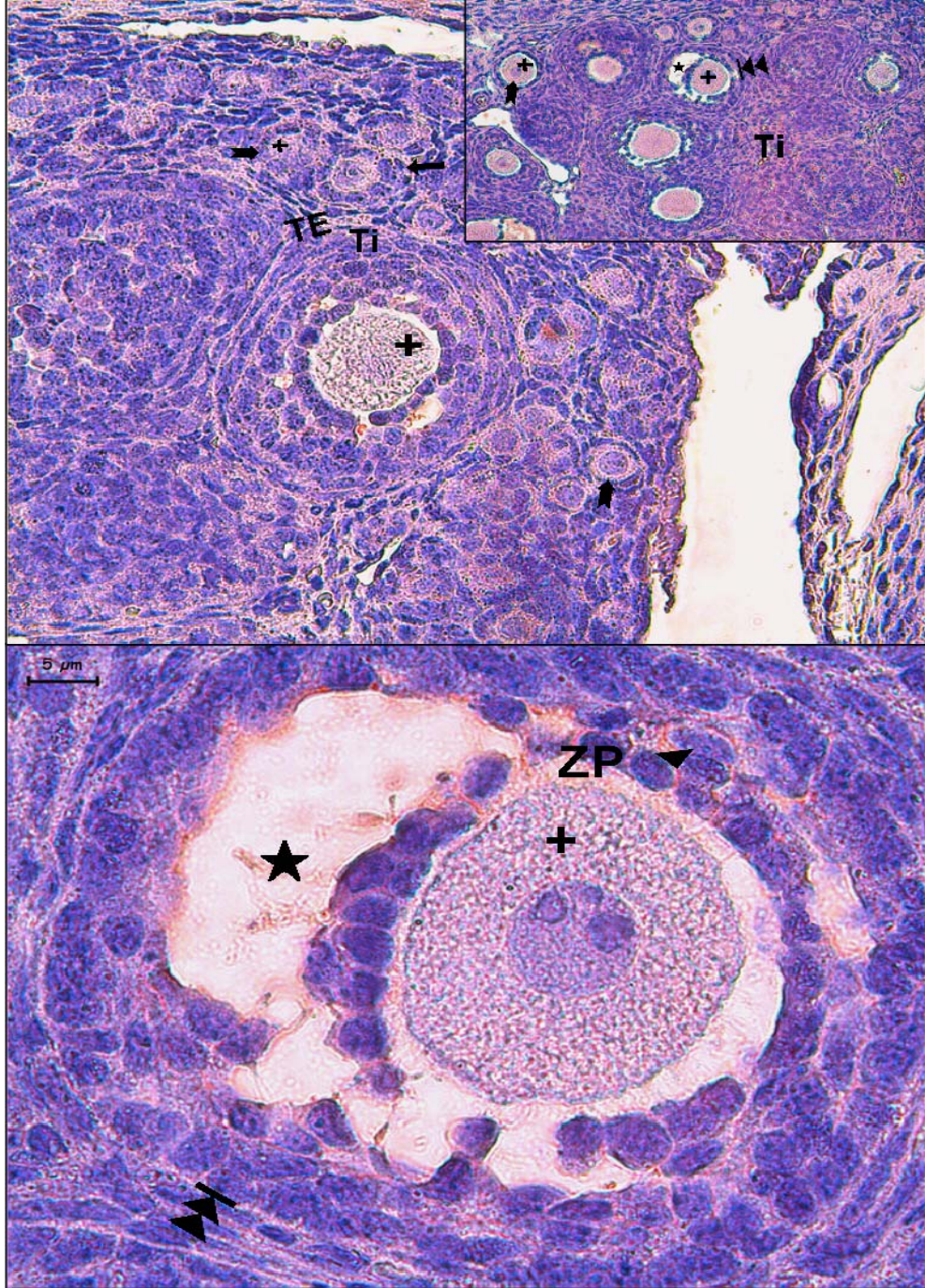
Resim 6: Gelişimin 14. gün Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan grubu TGF- β boyanma özelliklerinin kontrol grubuna eşdeğer olduğu dikkat çekiyor; primordiyal follikül (\Rightarrow), tek katlı (\rightarrow) ve çok katlı (\Rightarrow) primer follikül ve antral follikül (\Rightarrow) antrum'u (\star), granuloza hücreleri (\blacktriangleright), oosit sitoplazması (+), zona pellusida (ZP) ve teka interna hücreleri (Tİ) immünreaktivitesi, (TE: teka eksterna) (İmmünperoksidaz&Hematoksilen x100, x400, x1000).



Resim 7: Gelişimin 21. gün kontrol grubu TGF- β ile yapılan immün boyamada tutulum diğer gruplara göre orta derece; tek katlı (\rightarrow) ve çok katlı (\Rightarrow) primer follikül ve antral follikül (\blacktriangleright) antrum'u (\star), granüloza hücreleri (\blacktriangledown), oosit sitoplazması (+), zona pellusida (ZP) ve teka interna hücreleri (Ti) immünreaktivitesi, (TE: teka eksterna) (İmmünperoksidaz&Hematoksilen x100, x400).



Resim 8: Gelişimin 21. gün Hipoksi uygulanan grubunda TGF- β primer antikoru ile yapılan immünohistokimyasal incelemede immünreaktivitenin granüloza hücreleri (\blacktriangleright) ve aralarında yoğun, oosit sitoplazması (+) ve zona pellusida'da (ZP) ise zayıf olduğu izleniyor, [Tİ (teka interna), \Rightarrow (çok katlı primer follikül) , $\blacktriangleright\blacktriangleright$ (antral follikül), ★ (antrum)], (İmmünperoksidaz&Hematoksilen x400, x1000).



Resim 9: Gelişimin 21. gün Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan grubu TGF- β boyanma özelliklerinin kontrol grubuna eşdeğer olduğu izleniyor; tek katlı (\rightarrow) ve çok katlı (\Rightarrow) primer follikül ve antral follikül (\blacktriangleright) antrum'u (\star), granüloza hücreleri (\blacktriangleright), oosit sitoplazması (+), zona pellusida (ZP) ve teka interna hücrelerindeki (Ti) zayıf immünreaktivite, (TE: teka eksterna) (İmmünperoksidaz&Hematoksilen x100, x400, x1000).

4.1.2.GDF-9 Bulguları

Gelişimin 7. günündeki kontrol grubunda ovaryumda primordiyal follikül granüloza hücreleri ve oosit hücre sitoplazması düzeyinde GDF-9 tutulumunun ortadan kuvvetliye değiştiği ve yine tek sıralı primer follikülde de bu görünümün belirginliği ayırt edildi. Çok sıralı granüloza hücre katmanı içeren primer follikülde de tepkimenin teka interna granüloza hücre sitoplazması ve oosit düzeyinde oldukça yoğun olduğu dikkat çekti (Resim 10).

Gelişimin 7. günündeki hipoksi grubunda ovaryum kesitlerinde GDF-9 tutulumun kontrol grubuna karşın tüm hücrelerde daha orta dereceli olduğu izlendi. Oositte ise tutulum zayıftı (Resim 11).

Gelişimin 7. günündeki hipoksi-Ginkgo biloba uygulanan grupta ovaryum kesitlerinde GDF-9 immünreaktivitesinin daha belirgin olduğu ilgiyi çekti; granüloza hücrelerinde, ara dokuda ve oosit sitoplazmasında yoğun tutulum belirlendi (Resim 12).

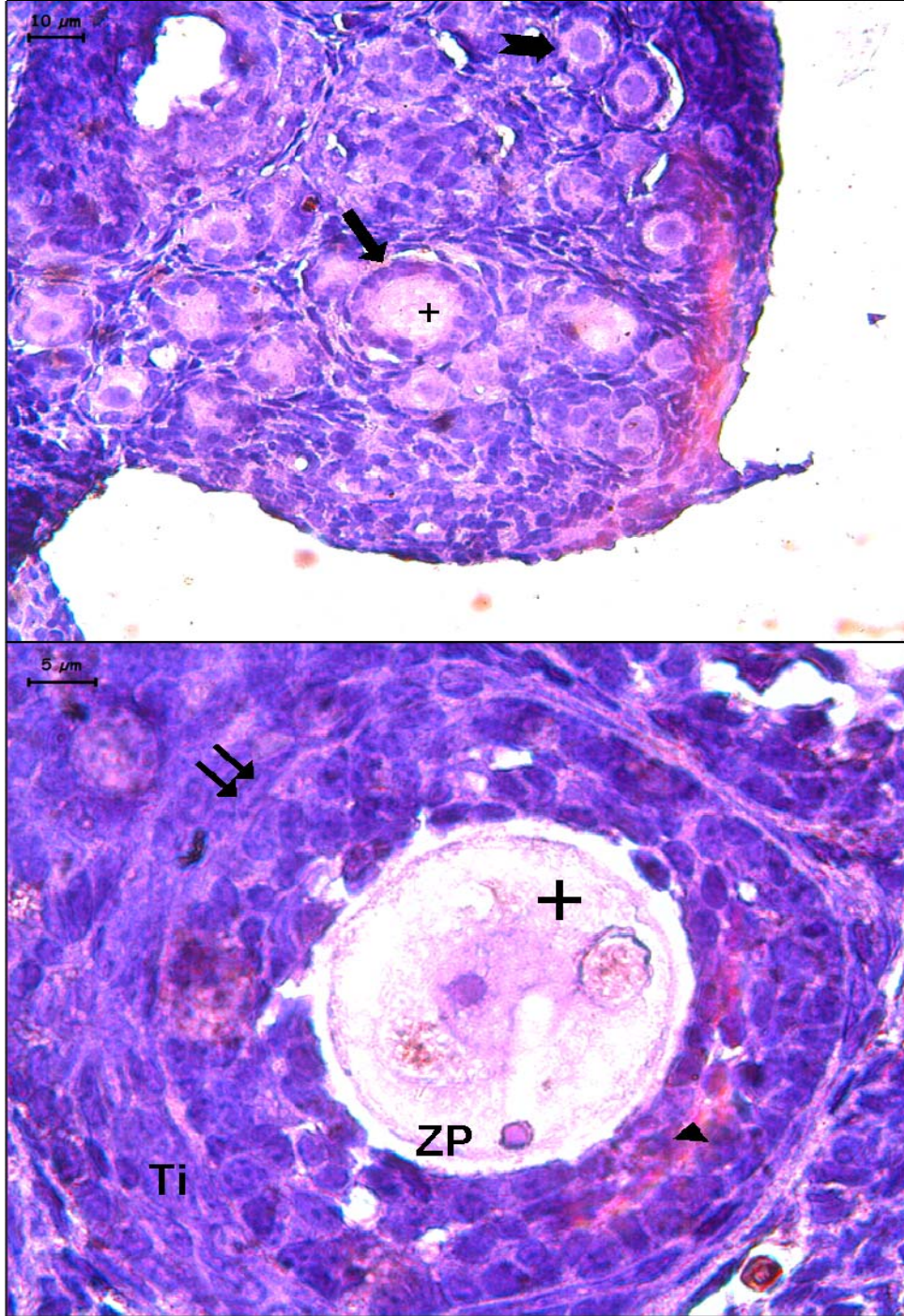
Gelişimin 14. günündeki kontrol grubunda ovaryum kesitinde GDF-9 ile yapılan immünohistokimyasal değerlendirmede primordiyal follikülde tutulumun daha zayıf olduğu gözlemlendi. Büyük büyültmelerde GDF-9 tutulumunun çok sayıda granüloza hücre sitoplazmasında ve hücreler arasında yoğun granüler şekilde olduğu gözlenirken oosit sitoplazmasında orta dereceli bir tutulum ilgiyi çekti (Resim 13).

Gelişimin 14. günü hipoksi grubunda GDF-9 tepkimesinin ovaryumdaki tüm yapılarda, follikül hücrelerinde ve oosit hücrelerinde sitoplazma düzeyinde zayıftan ortaya değiştiği ayırt edildi (Resim 14).

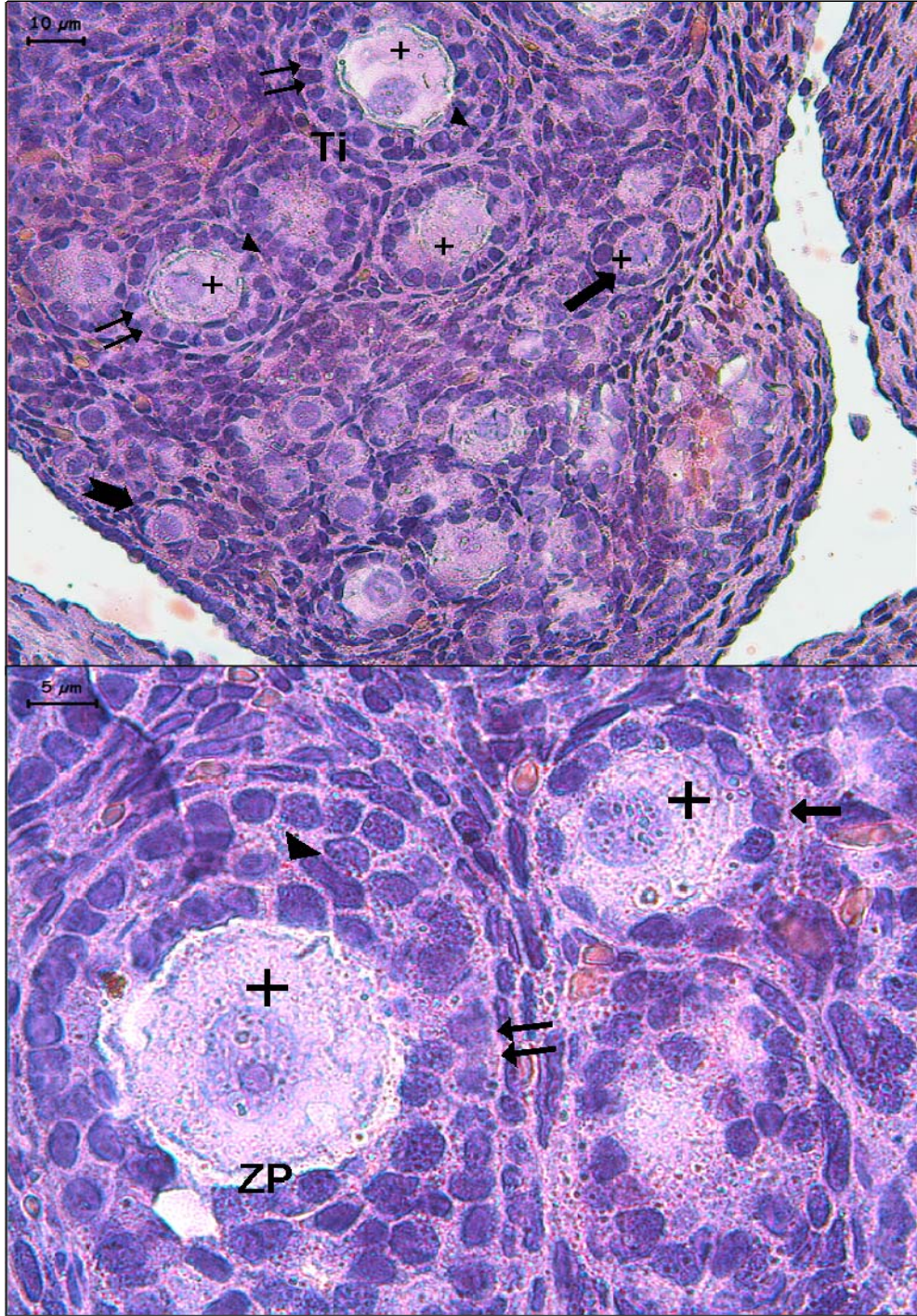
Gelişimin 14 günü hipoksi+ Ginkgo biloba grubunda GDF-9 primer antikoru ile yapılan değerlendirmede ovaryumda yine tüm yapılarda immünreaktivitenin kontrole eşdeş görünüm sergilediği izlendi (Resim 15).

Gelişimin 21. günündeki kontrol grubunda GDF-9 immün boyamasında reaksiyon tüm ovaryum folliküllerinde ve oosit sitoplazmasında tutulum orta dereceliydi (Resim 16).

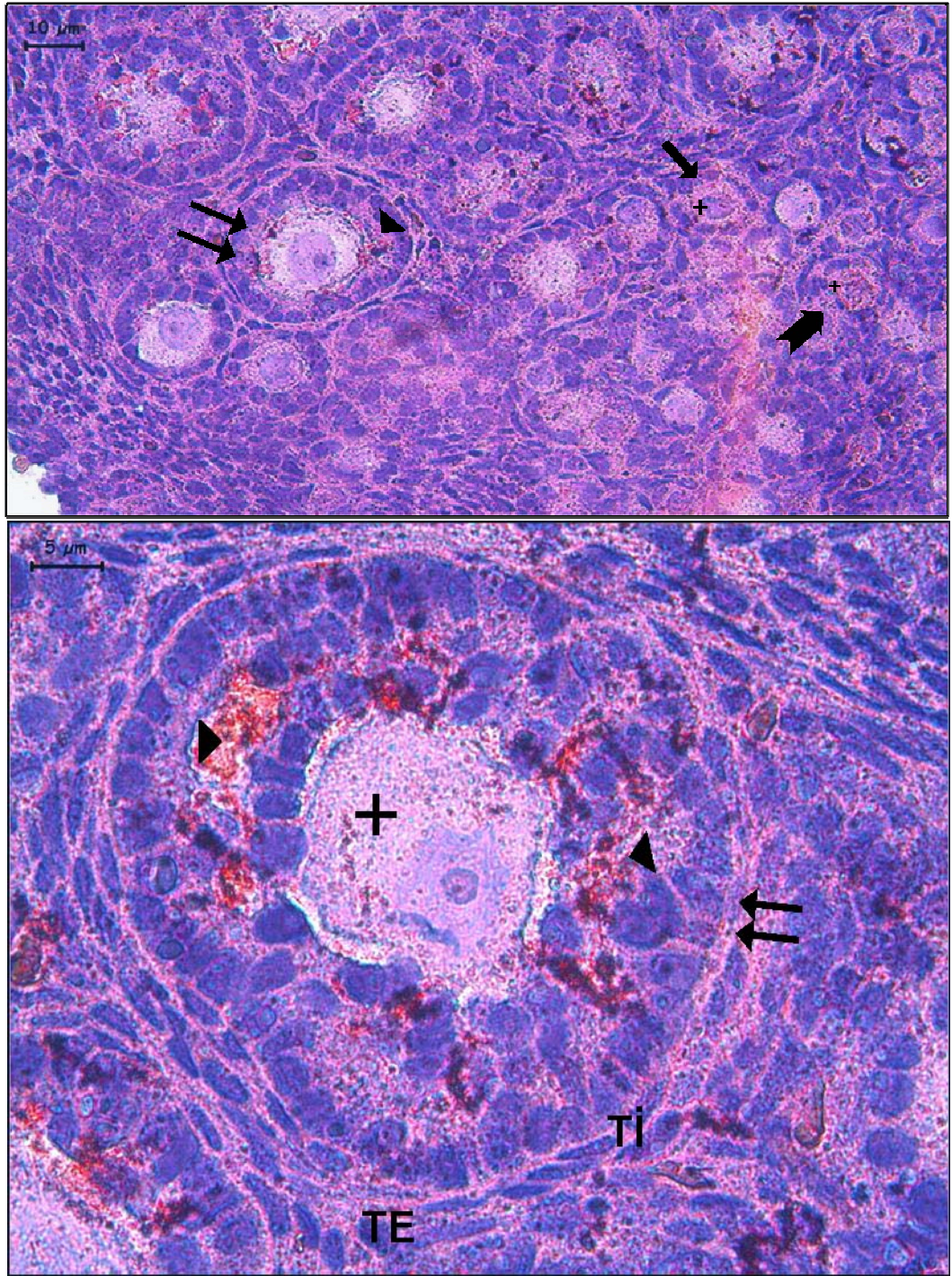
Gelişimin 21. gününe ait hipoksi grubunda ovaryumun GDF-9 antikoru ile immünohistokimyasal değerlendirmesinde tutulumun daha zayıf olduğu izlenirken (Resim 17), gelişimin 21 günü hipoksi-Ginkgo biloba uygulanan deney grubunda GDF-9 tutulumun yine kontrole eşdeş görünüm sergilediği ilgiyi çekti (Resim 18).



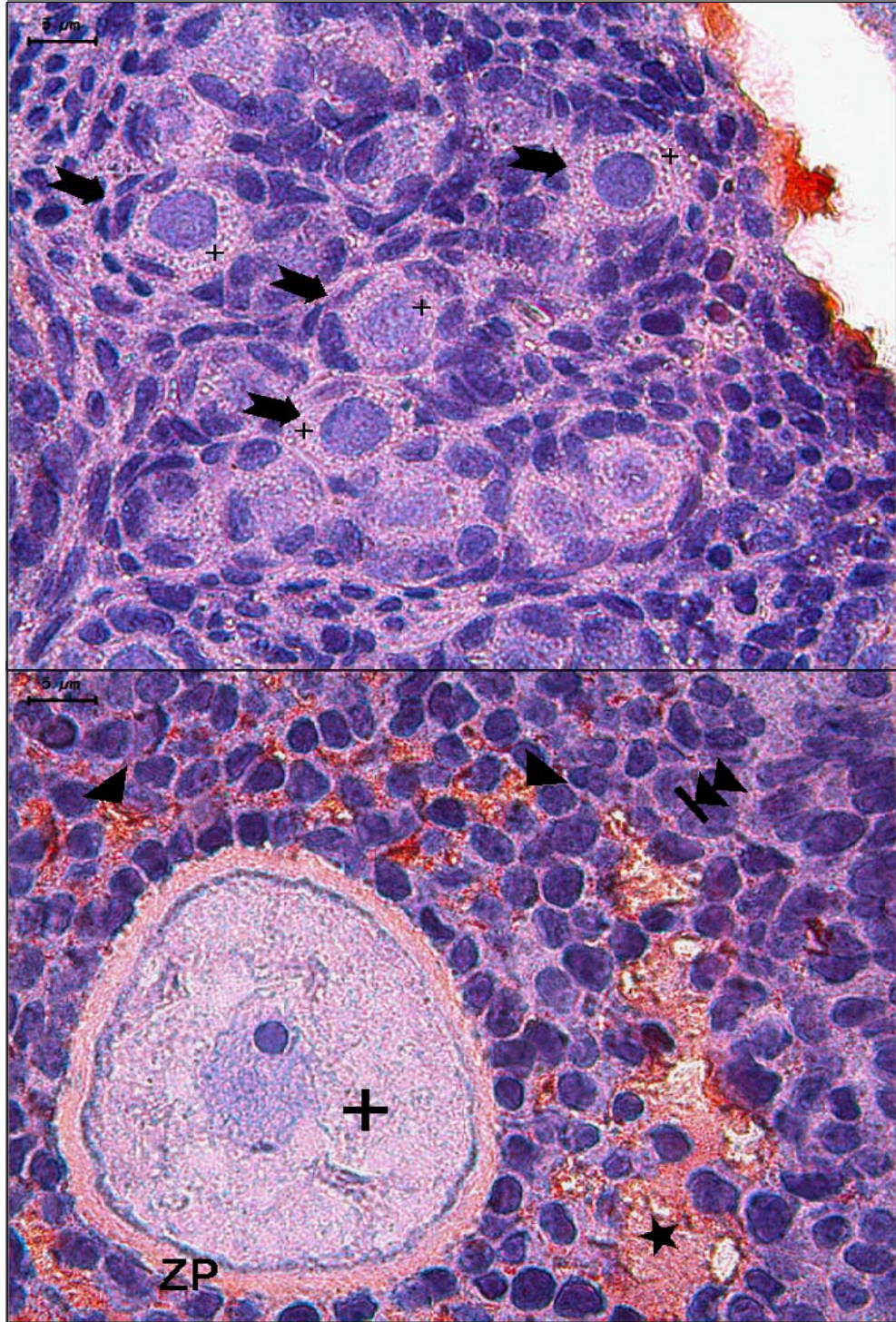
Resim 10: Gelişimin 7. günü kontrol grubu GDF-9 primer antikoruna ile yapılan immün boyamada; primordiyal follikül (→), tek katlı (←) ve çok katlı (⇔) primer follikül, granüloza hücreleri (▶), oosit sitoplazması (+), zona pellusida (ZP) ve teka internada (Ti) immünreaktivite izleniyor (İmmünperoksidaz&Hematoksilen x400, x1000).



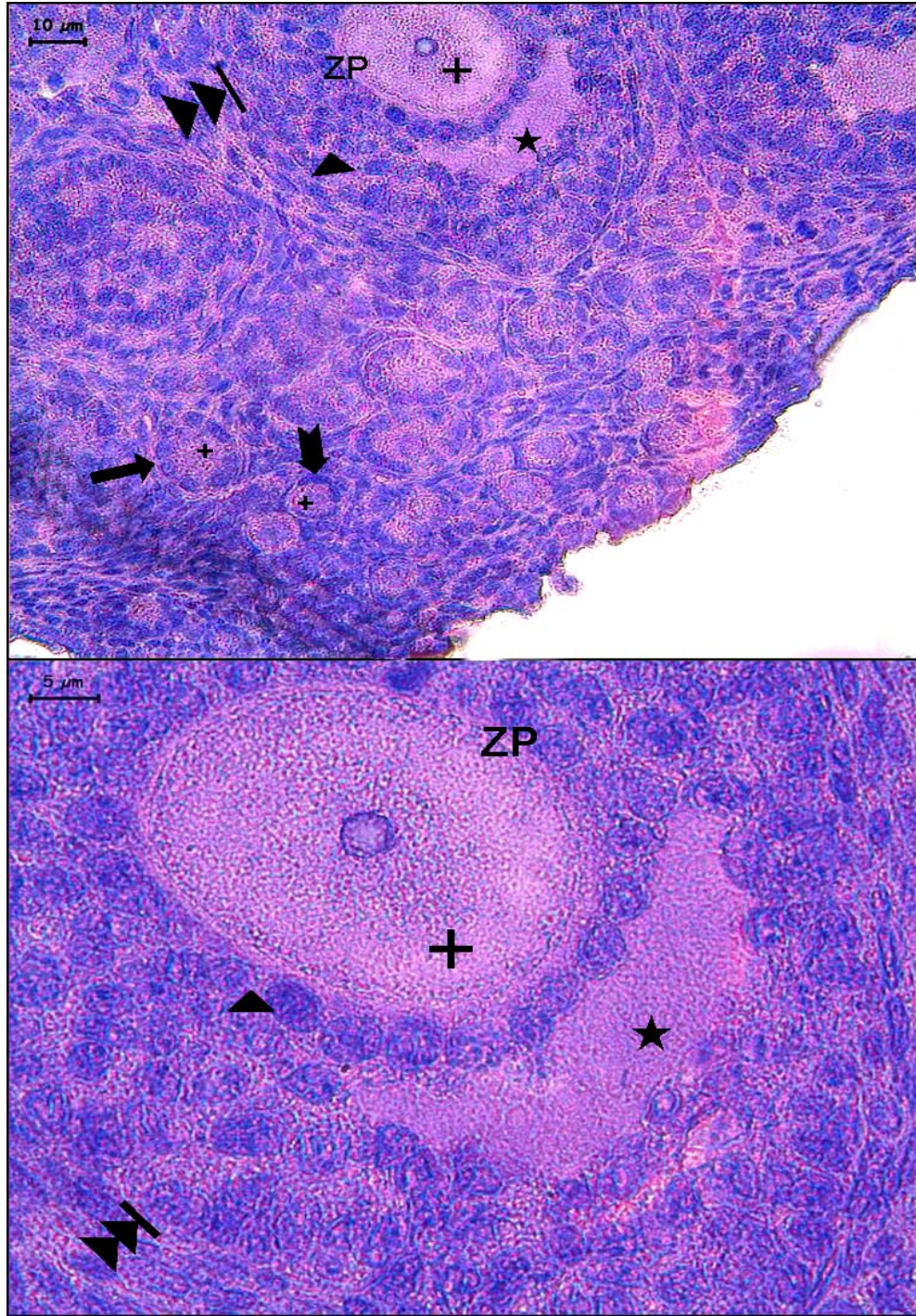
Resim 11: Gelişimin 7. günü hipoksi uygulanan grupta GDF-9 primer antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal incelemede; primordiyal follikül (➡), tek katlı (→) ve çok katlı (⇨) primer follikül, granüloza hücreleri (▶), oosit sitoplazması (+), zona pellusida (ZP) ve teka internada immünreaktivite izleniyor (İmmünperoksidaz&Hematoksilen x400, x1000).



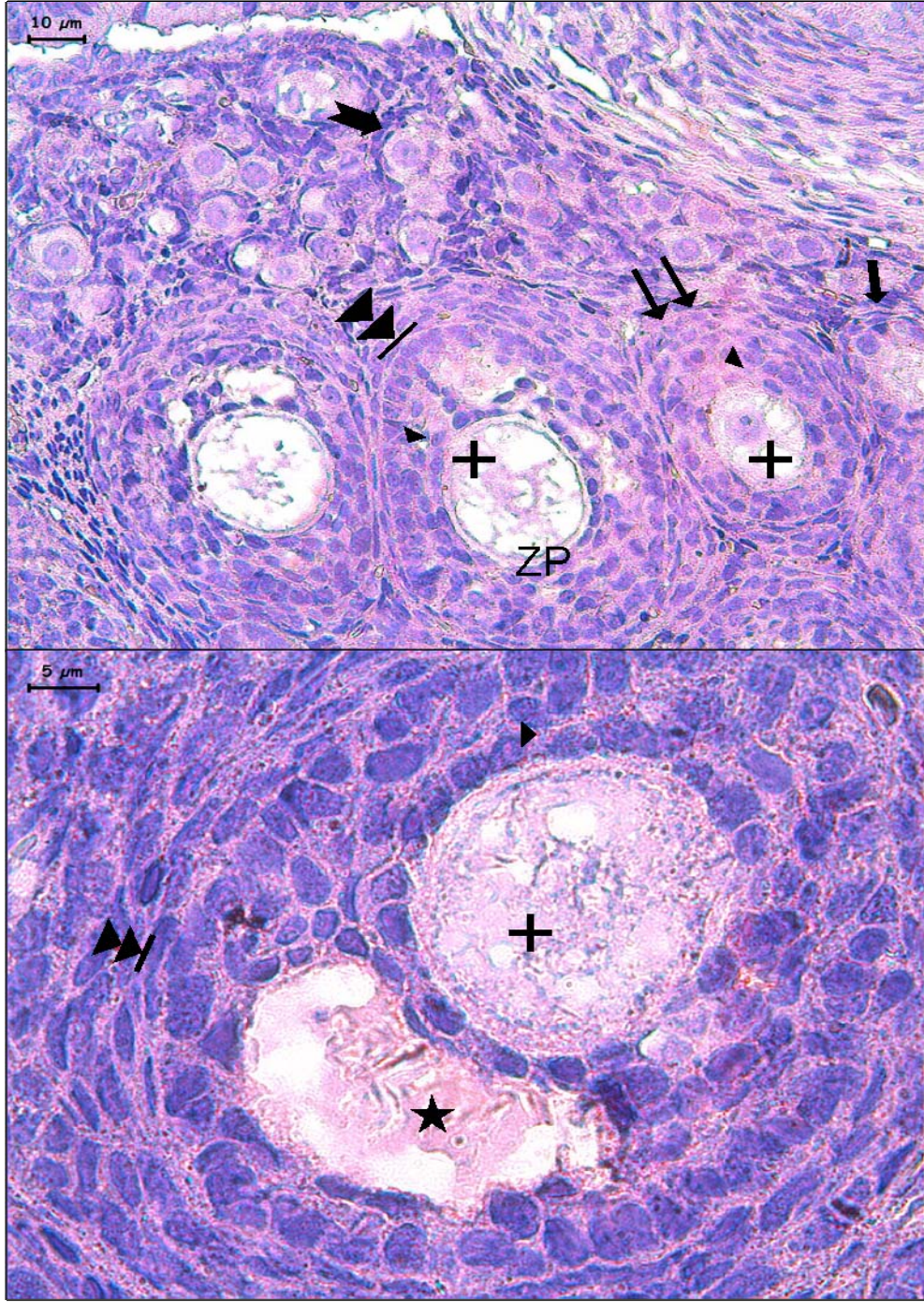
Resim 12: Gelişimin 7. günü Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan grupta; primordiyal follikül (→), tek katlı (→) ve çok katlı (⇒) primer follikül, granuloza hücreleri (▶), oosit sitoplazması (+), zona pellusida (ZP) ve teka internada GDF-9 immünreaktivitesi (TE: teka eksterna) (İmmünperoksidaz&Hematoksilen x400, x1000).



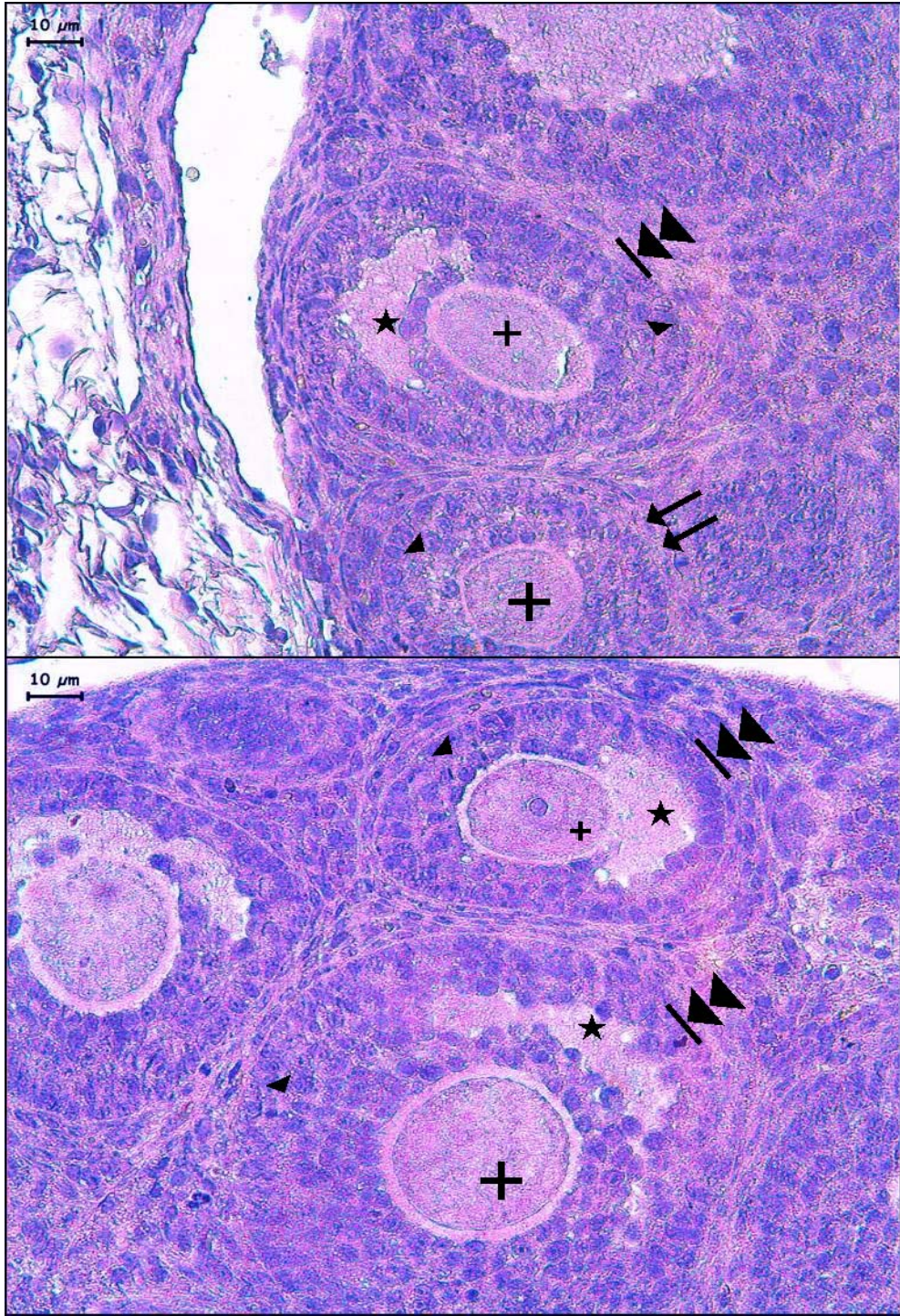
Resim 13: Gelişimin 14. günü kontrol grubunda; primordiyal follikül (➔), granuloza hücreleri (▶), oosit sitoplazması (+), zona pellusida (ZP) ve antral follikül (➤) antrum'u (★) GDF-9 immünreaktivitesi (İmmünperoksidaz&Hematoksilen x1000).



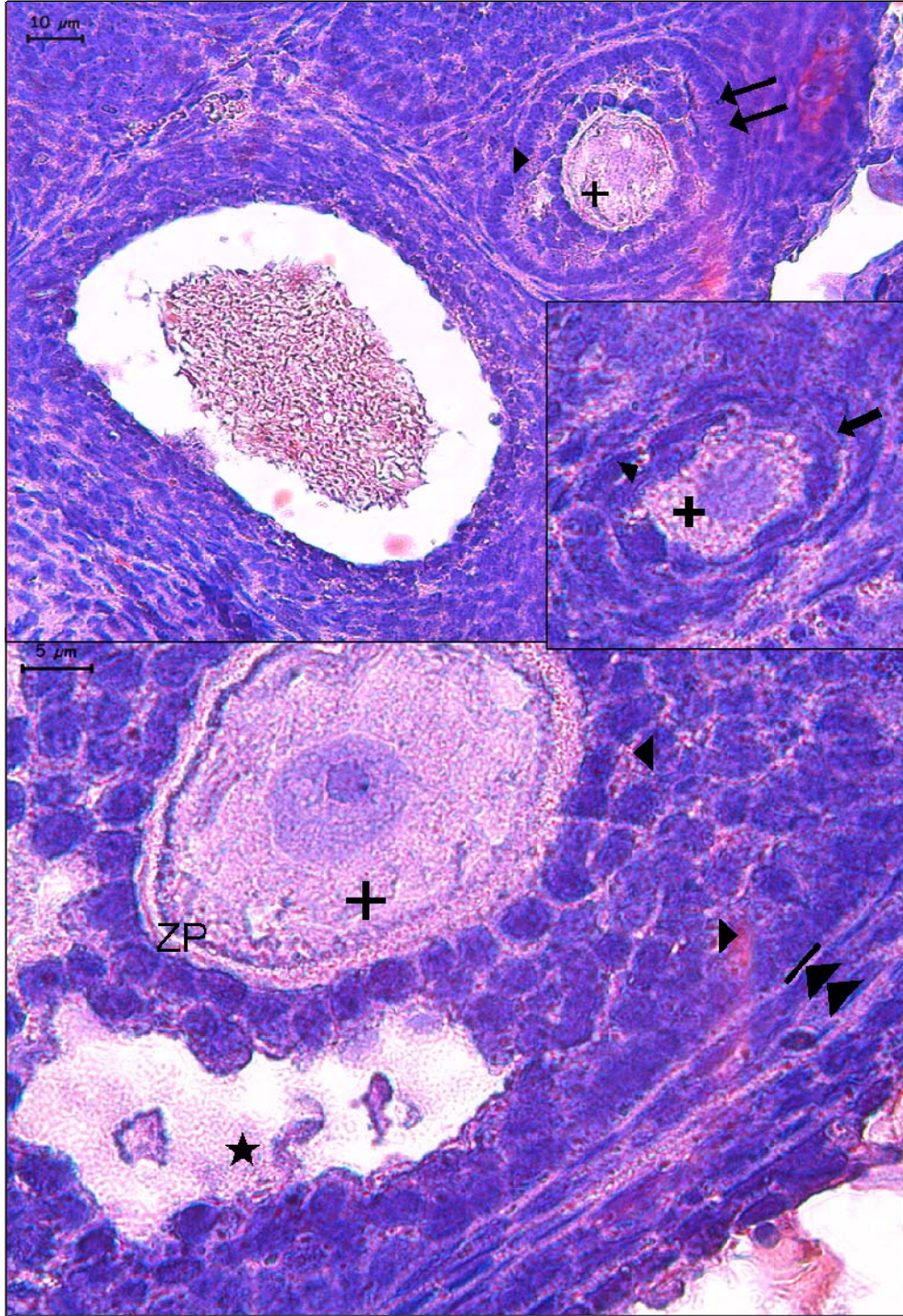
Resim 14: Gelişimin 14. günü hipoksi uygulanan grupta yapılan GDF-9 primer antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal incelemede; primordiyal follikül (➤), tek katlı primer follikül (➔), granüloza hücreleri (▶), oosit sitoplazması (+), zona pellusida (ZP) ve antral follikül (➤) antrum'u (★) immün boyaması izleniyor (İmmünperoksidaz&Hematoksilen x400, x1000).



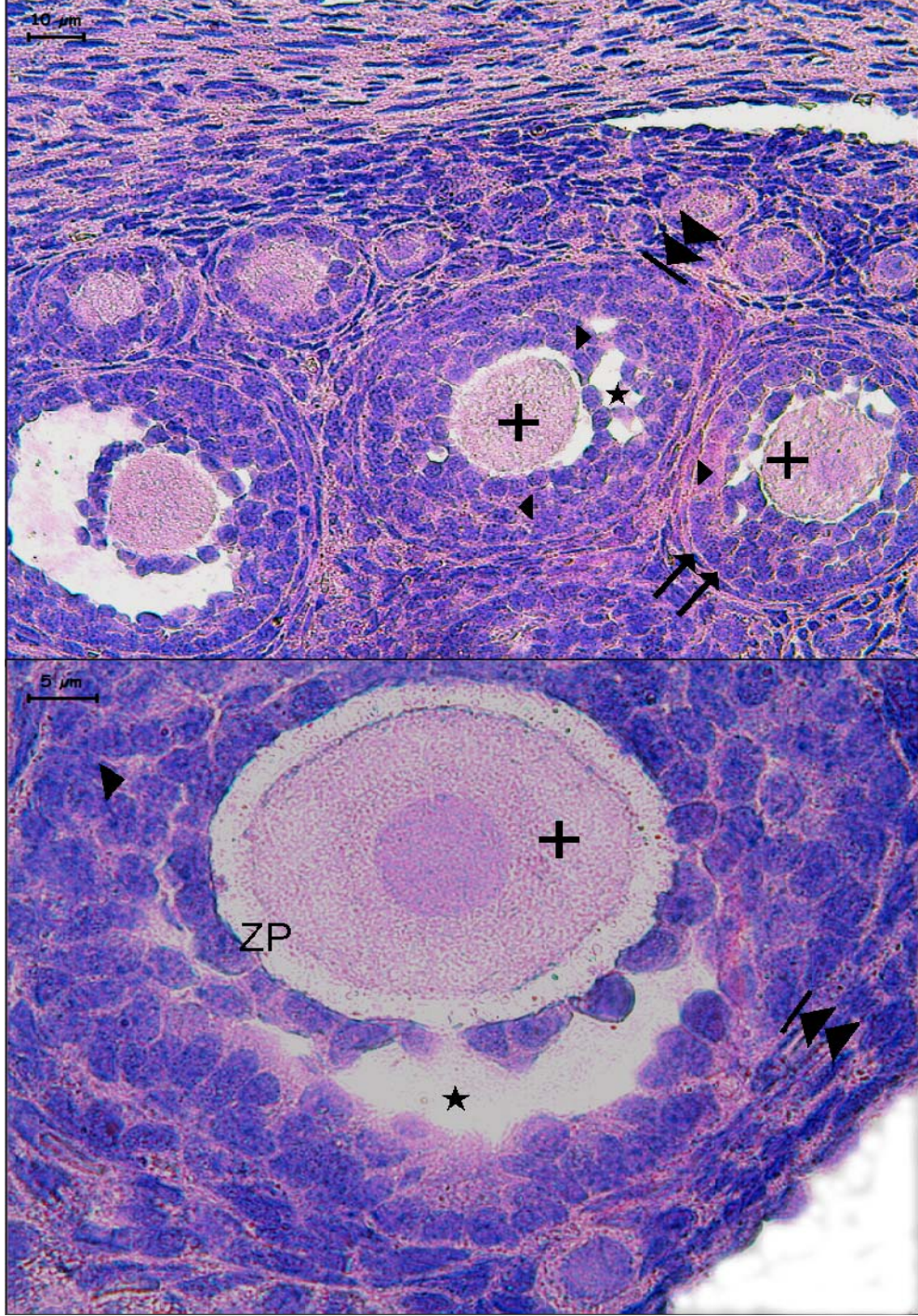
Resim 15: Gelişimin 14. günü Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan grupta yapılan GDF-9 primer antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal boyamada; primordiyal follikül (➡), tek katlı primer follikül (→), granuloza hücreleri (▶), oosit sitoplazması (+), zona pellusida (ZP) ve antral follikül (▶▶) antrum'unda (★) immün boyama izleniyor (İmmünperoksidaz&Hematoksilen x400, x1000).



Resim 16: Gelişimin 21. günü kontrol grubunda; çok katlı primer follikül (⇔), granüloza hücreleri (▶), oosit sitoplazması (+) ve antral follikül (⇨) antrum'u (★) GDF-9 tutulumu (İmmünperoksidaz&Hematoksilen x400).



Resim 17: Gelişimin 21. günü hipoksi uygulanan grupta; GDF-9 primer antikoru ile yapılan immünohistokimyasal değerlendirilmede; tek katlı (→) ve çok katlı (⇨) primer follikül, granüloza hücreleri (▴), oosit sitoplazması (+) ve antral follikül (⇨) antrum'u (★) GDF-9 tutulumu (İmmünperoksidaz&Hematoksilen x400, x1000).



Resim 18: Gelişimin 21. günü Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan grupta; GDF-9 primer antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal boyamada; çok katlı primer follikül (⇨), granüloza hücreleri (▶), oosit sitoplazması (+), zona pellusida (ZP) ve antral follikül (⇨⇨) antrum'u (★) GDF-9 tutulumu (İmmünperoksidaz&Hematoksilen x400, x1000).

4.2.Yarı-İnce Kesit Bulgular

Gelişimin 14. gününe ait kontrol grubunda yarı ince kesitlerin küçük büyültmeli resimde ovaryum korteksinin dış bölümlerinde yerleşik primordiyal folliküller yassı tek sıra granüloza hücre katmanı ve ortada yerleşik oosit ile gözlemlenirken çok sıralı hücre katmanı içeren folliküllerin oldukça gelişkin olduğu, zona pellusida'nın geliştiği ve granüloza hücrelerinden bazılarının oldukça yoğun boyandığı ayırt edildi. Bu hücrelerin gelişim sürecindeki olağan apoptotik hücreler olduğu düşünüldü. Teka interna katmanındaki salgı hücreleri normal yapısal özelliğiyle gözlemlenirken, teka eksterna daha fibröz bir yapı olarak ayırt ediliyordu. Sekonder folliküllerde antrumun gelişkinliği, kumulus ooforus bölümü ve ortada yer alan oosit belirgindi (Resim 19).

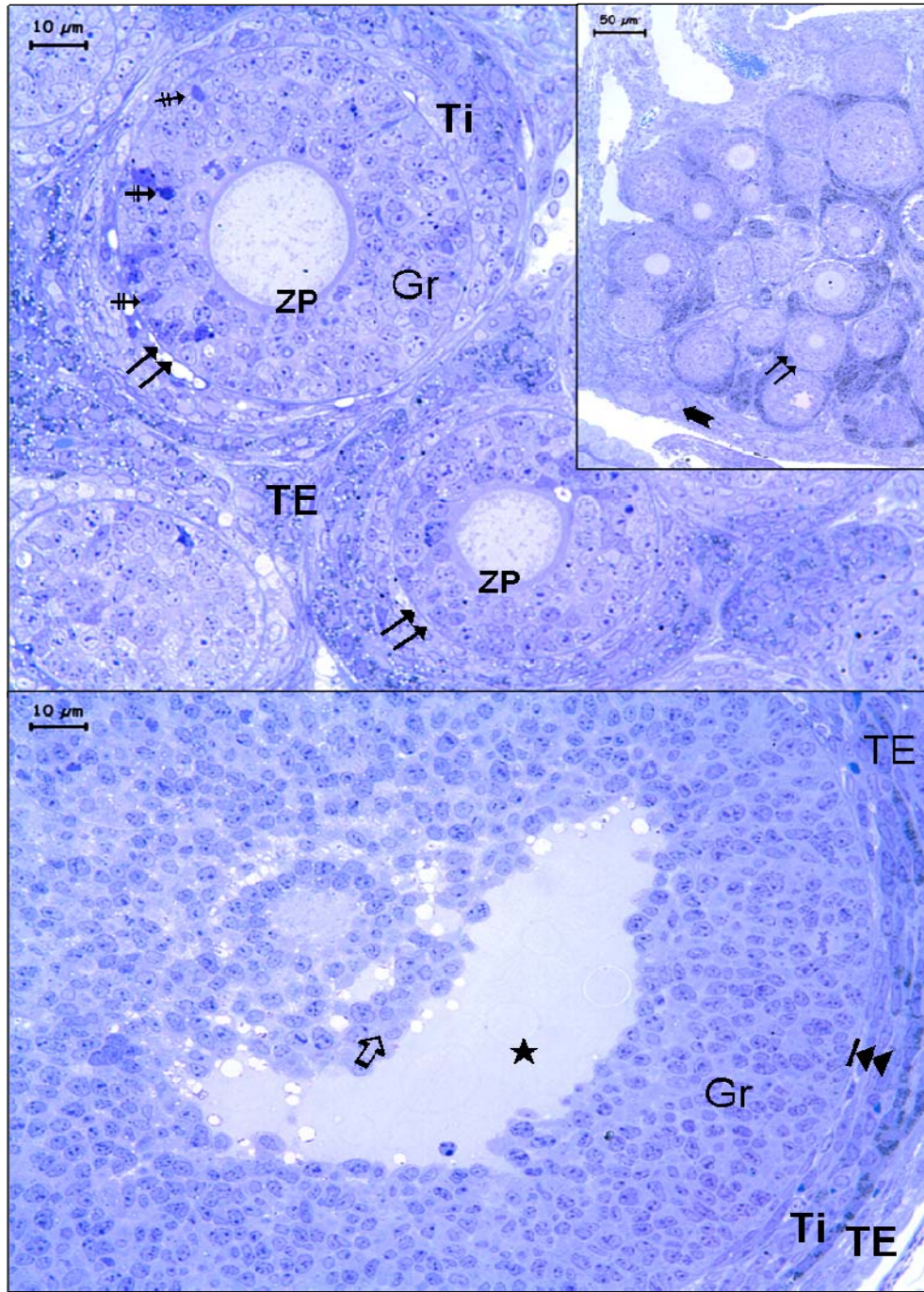
Gelişimin 14 günündeki hipoksi grubunda kortekste yerleşik primordiyal folliküller, tek sıra granüloza katmanı içeren ve çok sıralı hücre katmanı içeren folliküllerde oositin normal yapıda olduğu, granüloza hücrelerinin ise çok sıralı halde dizildiği, bazı folliküllerde de antrumun biçimlendiği ayırt ediliyordu. Bazı granüloza hücrelerinde mitoz bölünmeyi simgeleyen görünüm belirgindi. Teka interna ve eksterna normal yapıdaydı (Resim 20).

Gelişimin 14 günü Hipoksi+Ginkgo biloba uygulaması yapılan deney grubunda ovaryum yarı ince kesit değerlendirmesinde yapının oldukça normal olduğu görünüyordu (Resim 21).

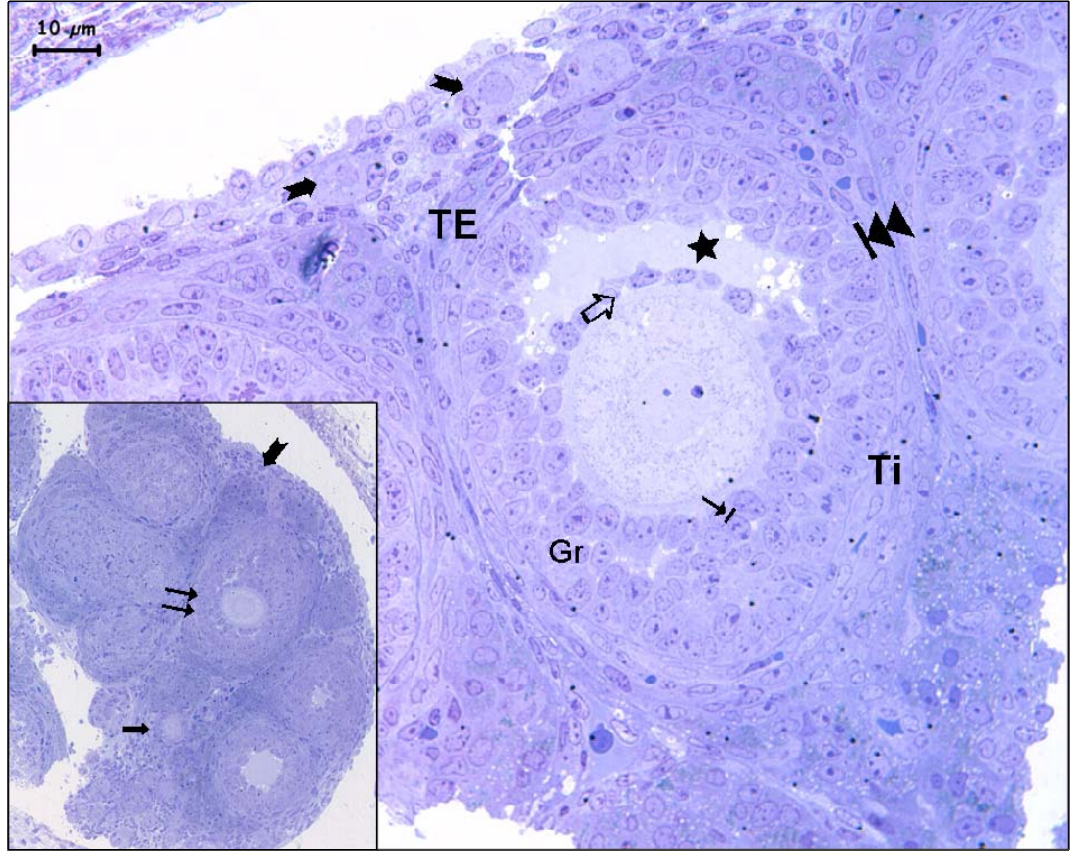
Gelişimin 21. günündeki kontrol grubunda ovaryum yarı ince kesitlerinde tüm gelişen folliküllerin yapısal olarak normal olduğu izlendi (Resim 22).

Gelişimin 21. günü Hipoksi uygulanan grubun ovaryum yarı ince kesitlerinde bazı folliküllerde çift oosit yapısı izlenirken, büyük grup granüloza hücrelerinin apoptozise gider görünümü ilgiyi çekiyordu. Apoptotik hücrelerde çekirdek kromatini oldukça yoğun ve sitoplazmada yaygın granüller ilgiyi çekiyordu. Yine bazı teka interna hücrelerinin de buna eşlik ettiği belirlendi (Resim 23).

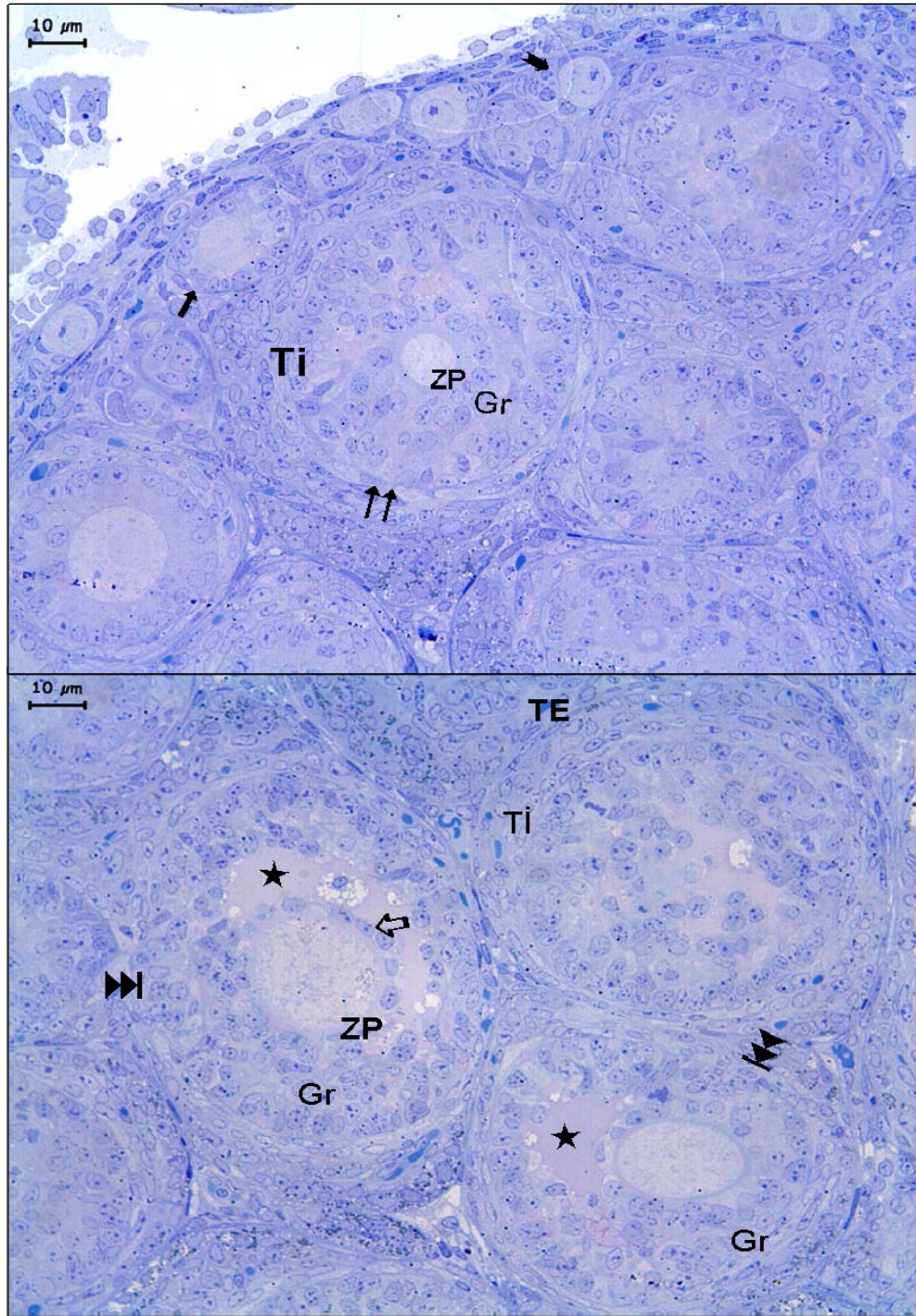
Gelişimin 21. günü Hipoksi +Ginkgo biloba uygulaması yapılan deney grubunda yarı ince kesit bulgularının kontrol grubuna eşdeğer olduğu izlendi (Resim 24).



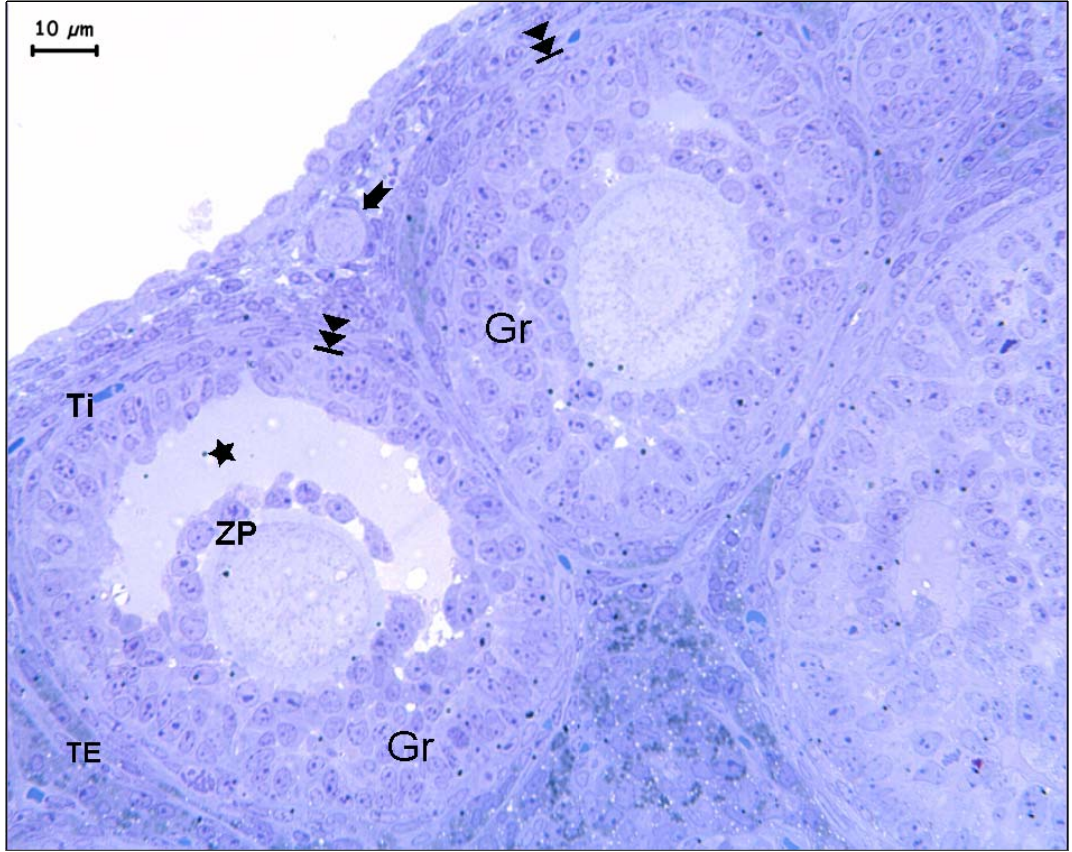
Resim 19: Gelişimin 14. günü kontrol grubunun yarı-ince kesit incelemelerinde; primordiyal follikül (→), çok katlı primer follikül (⇨), granüloza hücreleri (Gr), apoptotik hücreler (⊕), zona pellusida (ZP) ve antral follikül (⇨) antrum'u (★), kumulus ooforus hücreleri (⇨),teka interna (Tİ), teka eksterna (TE); (Toluidin Mavisi x100, x400).



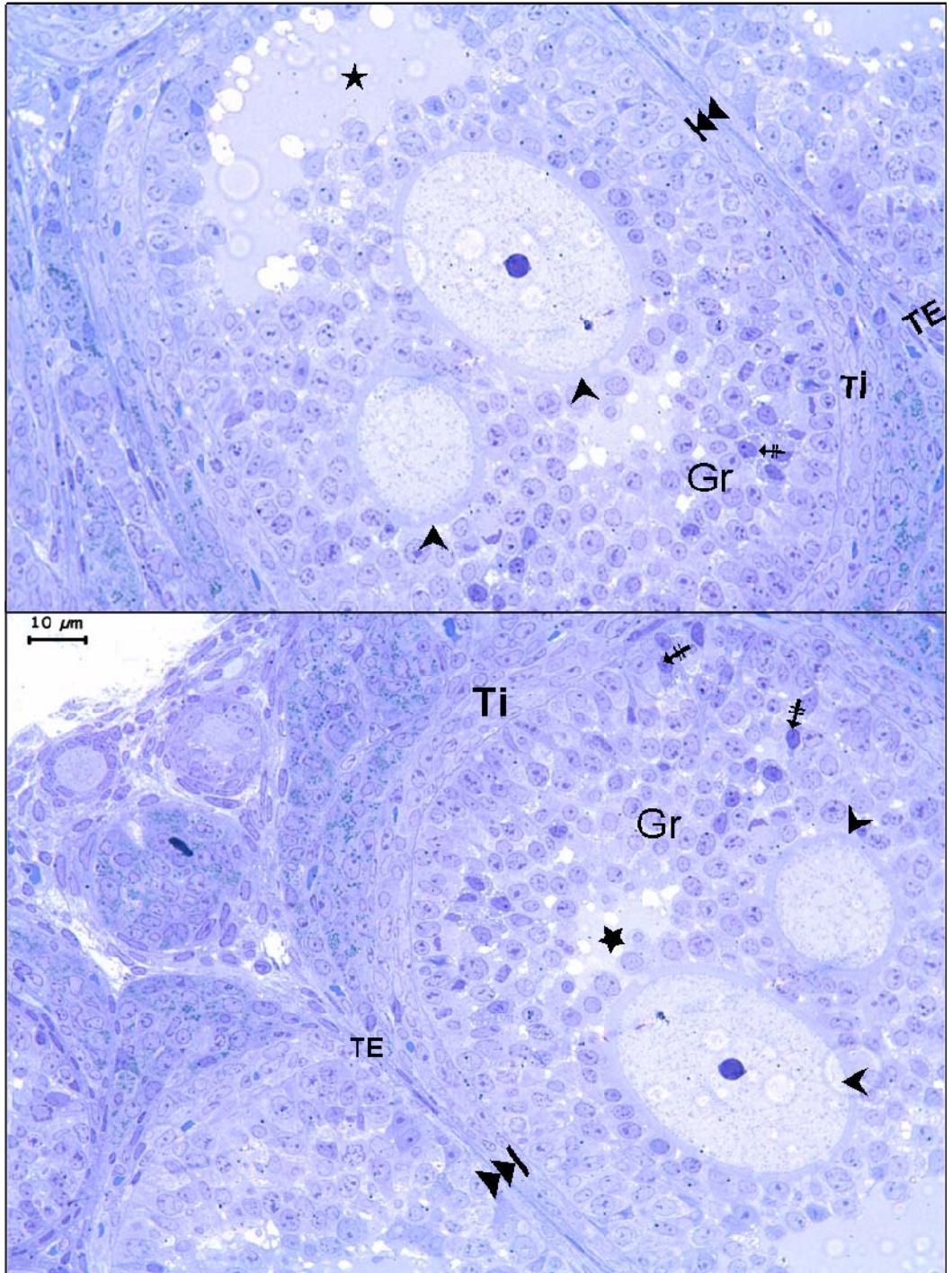
Resim 20: Gelişimin 14. günü hipoksi uygulanan grubunun yarı-ince kesit incelemelerinde; primordiyal follikül (➤), tek katlı (→) ve çok katlı primer follikül (⇨), granuloza hücreleri (Gr), mitotik hücreler (→') ve antral follikül (⇨) antrum'u (★), kumulus ooforus hücreleri (⇨), teka interna (Ti), teka eksterna (TE); (Toluidin mavisi x100, x400).



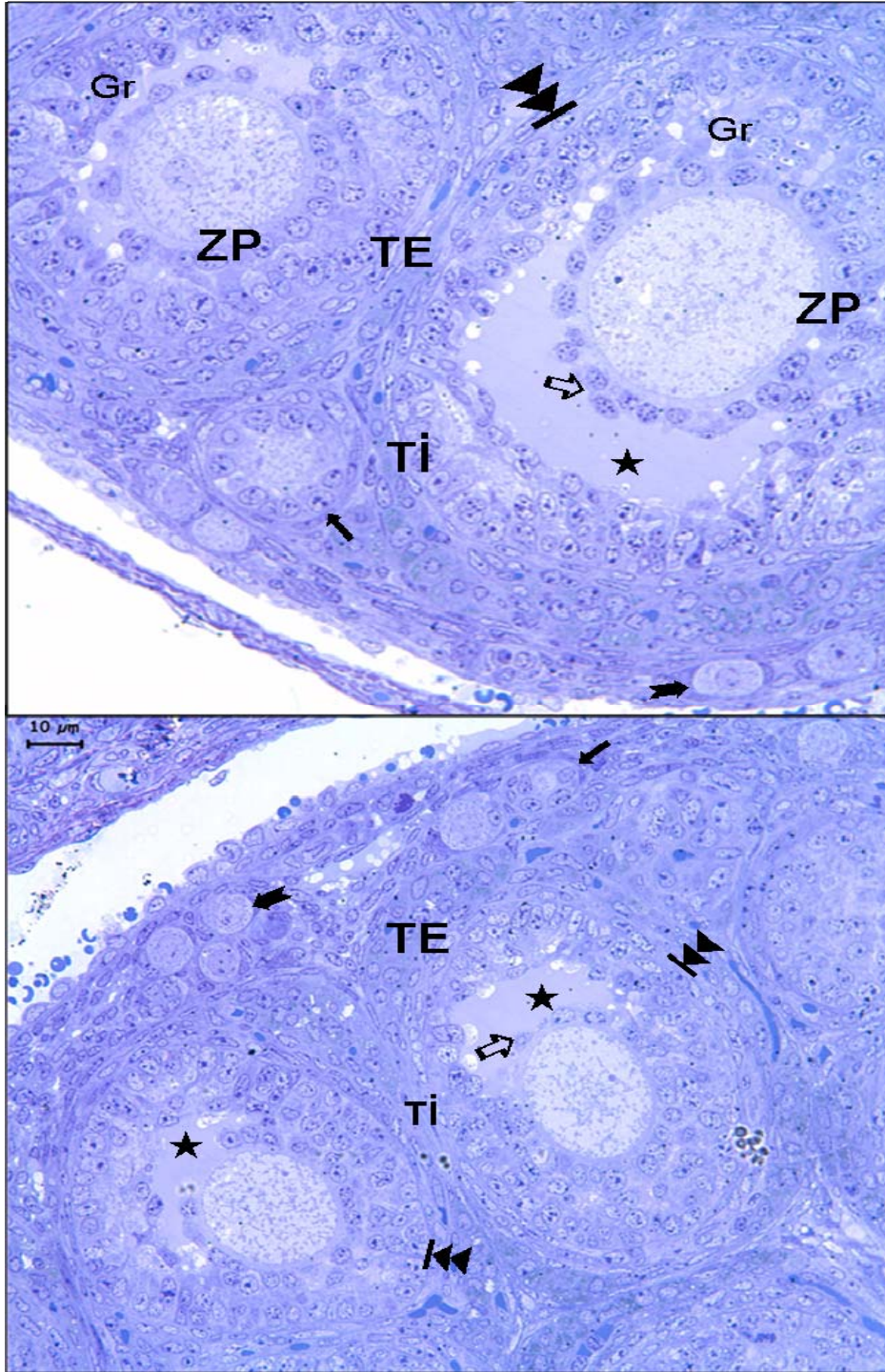
Resim 21: Gelişimin 14. günü Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan grubunun yarı-ince kesit incelemelerinde; primordiyal follikül (→), tek katlı (⇨) ve çok katlı primer follikül (⇨), granüloza hücreleri (Gr), zona pellusida (ZP) ve antral follikül (⇨) antrum'u (★), kumulus ooforus hücreleri (⇨), teka interna (Tİ), teka eksterna (TE); (Toluidin mavisi x400).



Resim 22: Gelişimin 21. günü kontrol grubunun yarı-ince kesit incelemelerinde; primordiyal follikül (→), granüloza hücreleri (Gr), zona pellusida (ZP) ve antral follikül (↯) antrum'u (★), teka interna (Tİ), teka eksterna (TE); (Toluidin mavisi x400).



Resim 23: Gelişimin 21. günü Hipoksi uygulanan grubunun yarı-ince kesit incelemelerinde; çift oosit yapısı (➤), granuloza hücreleri (Gr), apoptotik hücre (⌘), antral follikül (➤➤) antrum'u (★), teka interna (Tİ), teka eksterna (TE); (Toluidin mavisi x400).



Resim 24: Gelişimin 21. günü Hipoksi +Ginkgo biloba uygulanan grubunun yarı-ince kesit incelemelerinde; primordiyal follikül (➤), tek katlı primer follikül (➔), granüloza hücreleri (Gr), zona pellusida (ZP) ve antral follikül (➡) antrum'u (★), kumulus ooforus hücreleri (⇨), teka interna (Tİ), teka eksterna (TE); (Toluidin mavisi x100, x400).

4.3.İnce Kesit Bulgular

Gelişimin 14. günündeki kontrol grubunda ovaryumun ince yapı incelemelerinde oosit sitoplazmasının, zona pellusida'nın ve granüloza hücrelerinin normal yapı sergiledikleri ilgiyi çekti. Granüloza hücrelerinde irili ufaklı vakuollerin varlığı belirgindi. Teka interna hücrelerinde yer yer mitoz bölünmeyi simgeleyen görünüm ilgiyi çekti. Folliküller arası bağ dokuda damarlar yaygındı. Korpus luteum'a ait hücrelerin yağ damlacıkları içerdiği ayırt edildi. Büyük büyütmelede oosit sitoplazmasında tubüler yapılar, vakuoller, mitokondriyonlar ilgiyi çekti. Zona pellusida'da madde taşınmasını simgeleyen küçük veziküllerin varlığı izlendi . Granüloza hücrelerinde çekirdeklerin ökromatik yapıda olduğu gözlenirken sitoplazmada GER tubulusları ve mitokondriyonlar belirgindi (Resim 25-26).

Gelişimin 14.günü Hipoksi uygulanan grupta primordiyal ve tek sıralı granüloza hücre katmanı içeren primer folliküllerde, granüloza hücrelerinde vezikül ve vakuollerin varlığı ve yer yer GER tubuluslarının genişlemesi belirgindi. Oosit sitoplazmasının içerik yönünden oldukça normal yapıda olduğu izlendi. Korpus luteum'um gelişkinliği ve luteal hücrelerdeki lipid dağılımı da oldukça belirgindi. Çok sıralı granüloza hücre katmanı içeren primer follikülde oosit ve zona pellusida normal yapıda gözlenirken granüloza hücrelerinde mitokondriyonlarda kristolizis ve bazı granüloza hücreleri de apoptozise giden görünümle ilgiyi çekti (Resim 27-28).

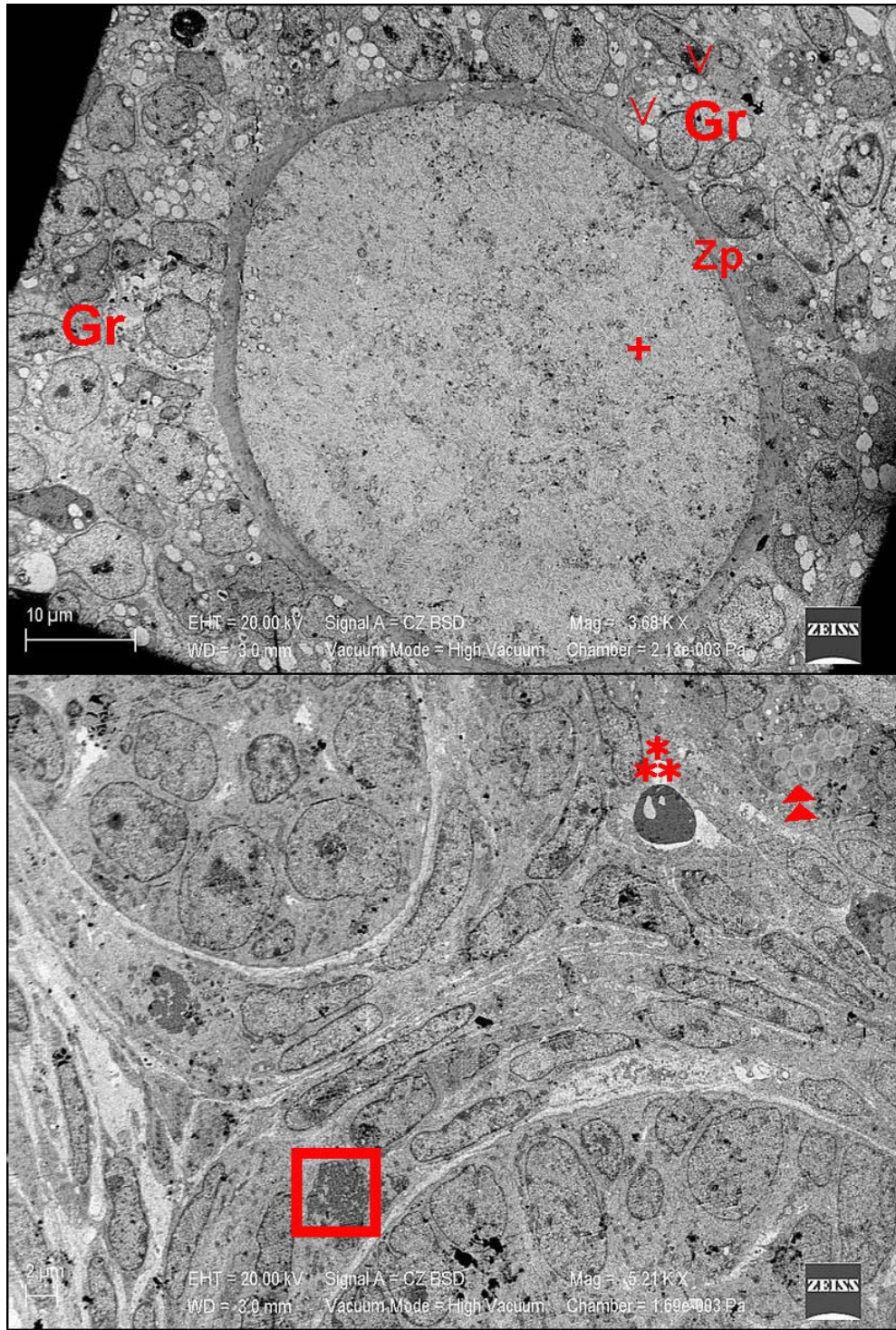
Gelişimin 14.günü Hipoksi-Ginkgo biloba uygulanan gruba ait bazı folliküllerde Hipoksi grubundaki değişimlerin belirginliği izlenirken bazı folliküllerin de normal yapıda olduğu dikkat çekti. Korpus luteumda luteal hücreler oldukça gelişkindi. Sitoplazmanın yağ damlacıkları ile dolu olduğu

gözlenirken bazı yağ damlacıklarının iriliği ayırt edildi. Büyük büyütmede oosit yapısı ve granüloza hücrelerinin genelde normal yapı sergilediği izlendi (Resim 29-30).

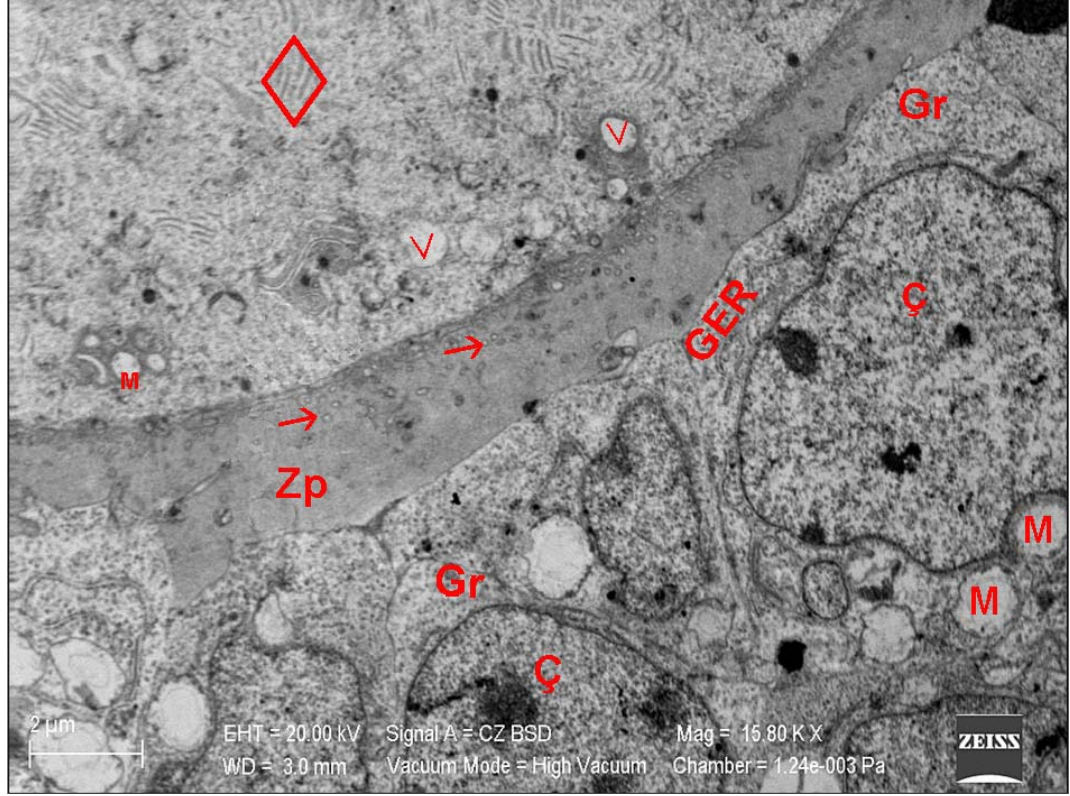
Gelişimin 21.günü kontrol grubunda oosit ve zona pellusida yapısı genelde normal olarak gözlemlendi. Granüloza hücreleri ve teka interna'nın normal yapıda olduğu gözlemlendi. Korpus luteum hücreleri yağ damlacıklarıyla belirgindi. Granüloza hücre sitoplazmasında bulunan mitokondriyonlarda yer yer kristolizis izlendi (Resim 31-32).

Gelişimin 21. günü Hipoksi grubunda tüm folliküllerde belirgin bir apoptozise gidiş ilgiyi çekti. Apoptotik hücrelerde çekirdek ve sitoplazma içeriğinin son derece yoğun boyandığı izlendi. Bu hücrelerde mitokondriyonlarda kistolizis de oldukça yaygındı. Oosit ve zona pellusida ise normal yapı sergilerken korpus luteum yapılarının oldukça fazla olduğu ilgiyi çekiyordu (Resim 33-34).

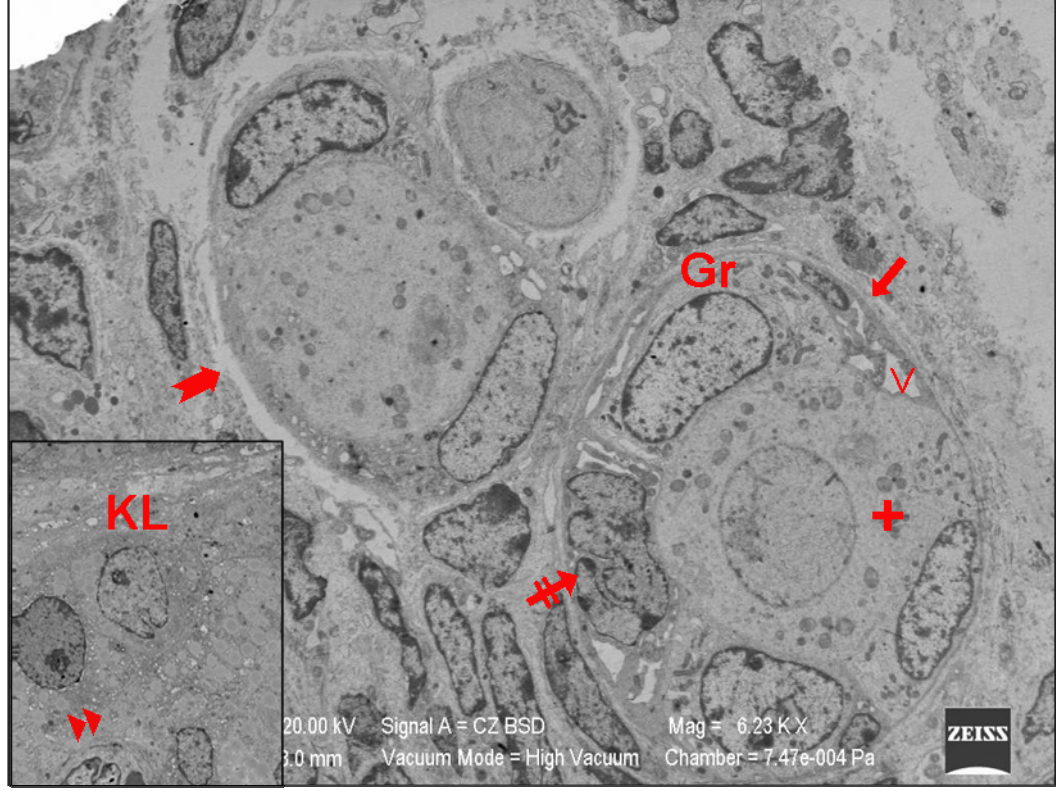
Gelişimin 21. günü Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan grubun, Hipoksi grubuna karşı daha kontrole benzer olduğu ayırt edildi (Resim 35).



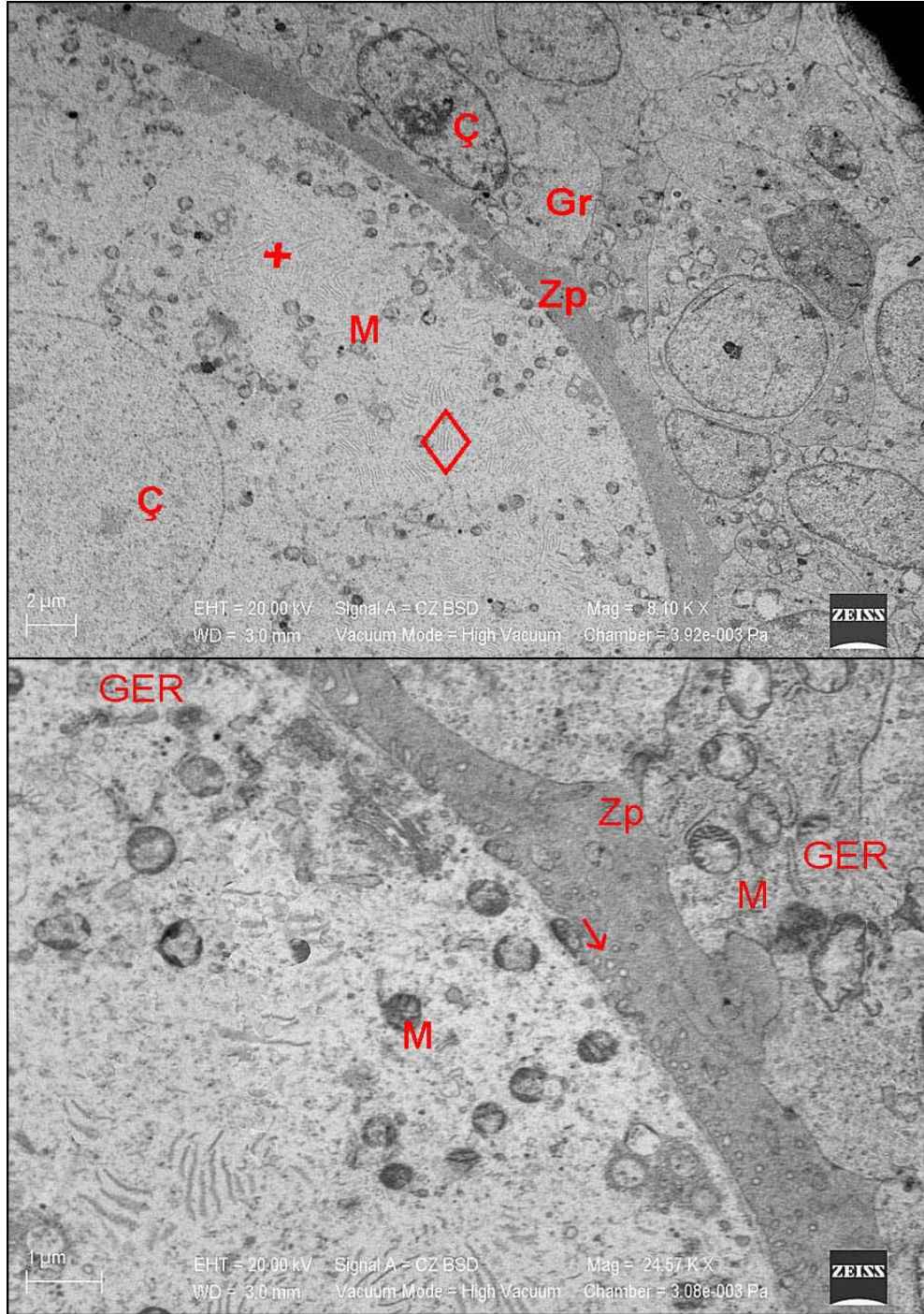
Resim 25: Gelişimin 14. günü kontrol grubuna ait elektron mikroskopik resimlerde; teka interna hücresinde mitoz bölünme (□); granuloza hücresi (Gr); oosit sitoplazması (+), zona pellusida (ZP), vakuol (V), damar (*) ve yağ damlacıkları (▶) (Uranil asetat-Kurşun sitrat x3680, x5210).



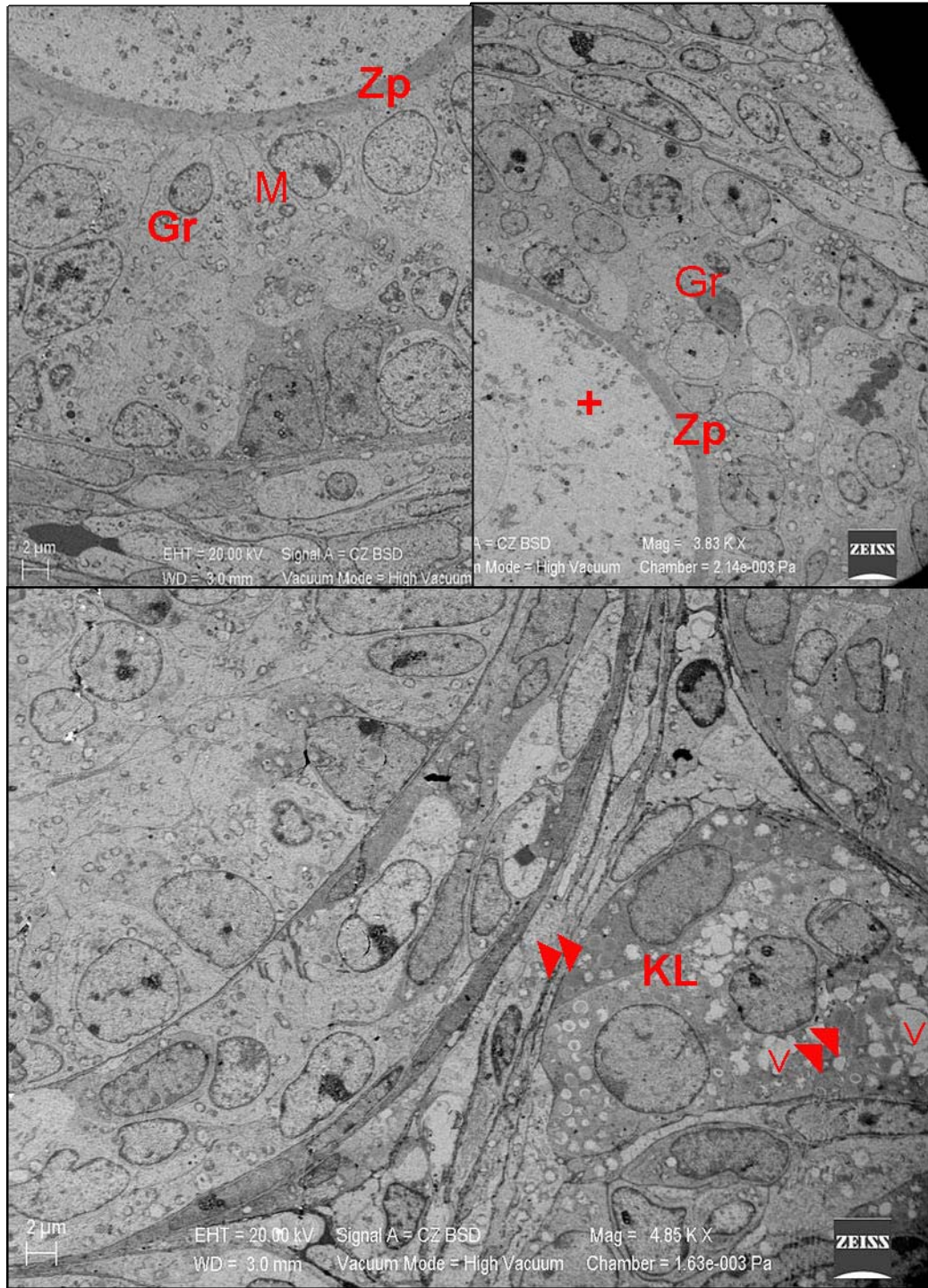
Resim 26: Gelişimin 14. günü kontrol grubuna ait elektron mikroskopik resimlerde; oosit sitoplazmasında tubüller (◇), granüloza hücresi (Gr), zona pellusida (ZP), vakuol (V), mitokondriyon (M), madde taşınmasında görevli veziküller (→), granüllü endoplazmik retikulum (GER) ve çekirdek (Ç) (Uranil asetat-Kurşun sitrat x15800).



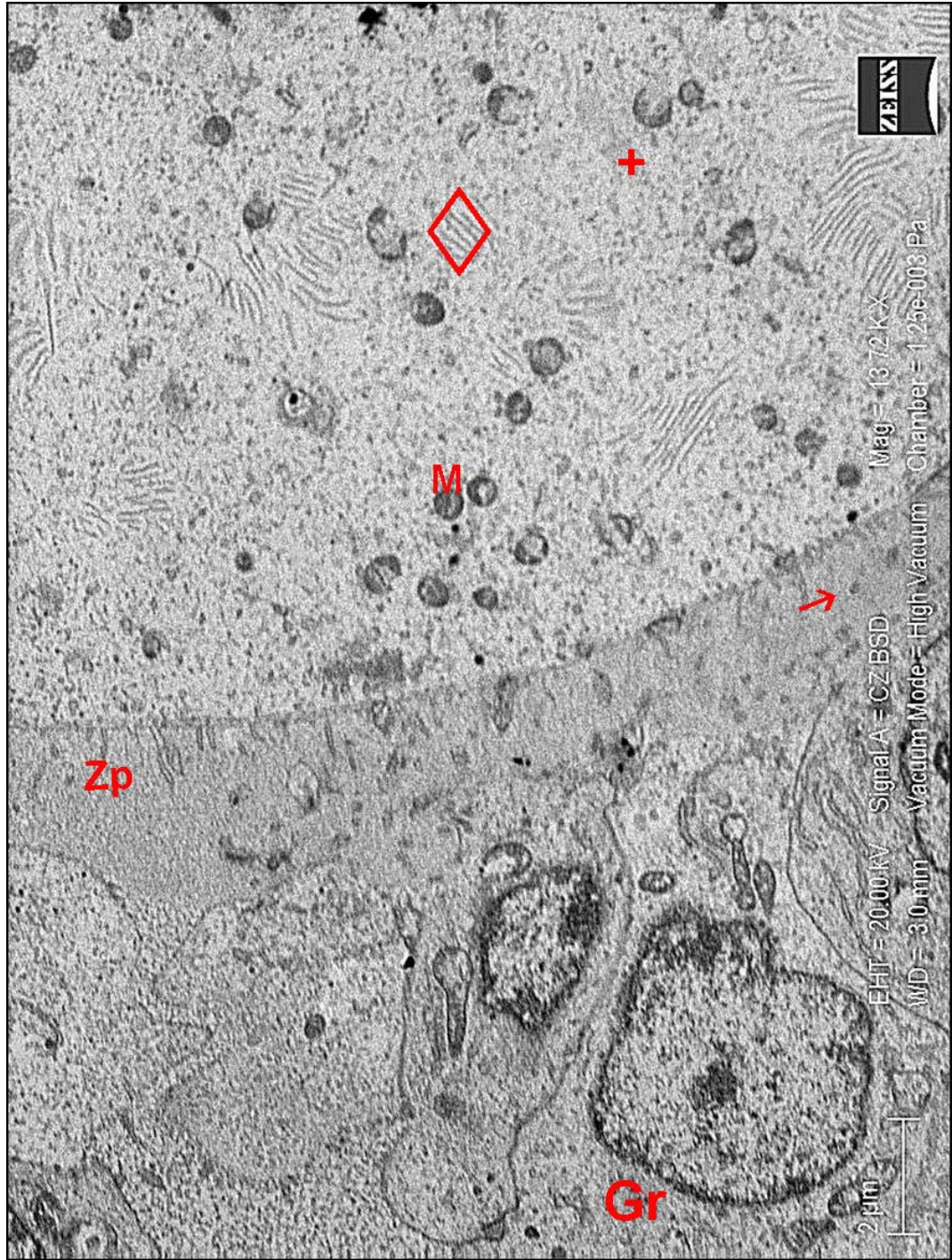
Resim 27: Gelişimin 14. günü hipoksi uygulanan grubuna ait elektron mikroskopik resimlerde; oosit sitoplazması (+), granüloza hücresi (Gr), vakuol (V), primordiyal follikül (→), tek katlı primer follikül (↔), apoptotik hücreler (⊕), korpus luteum (KL), yağ damlacıkları (⇨) (Uranil asetat-Kurşun sitrat x6230).



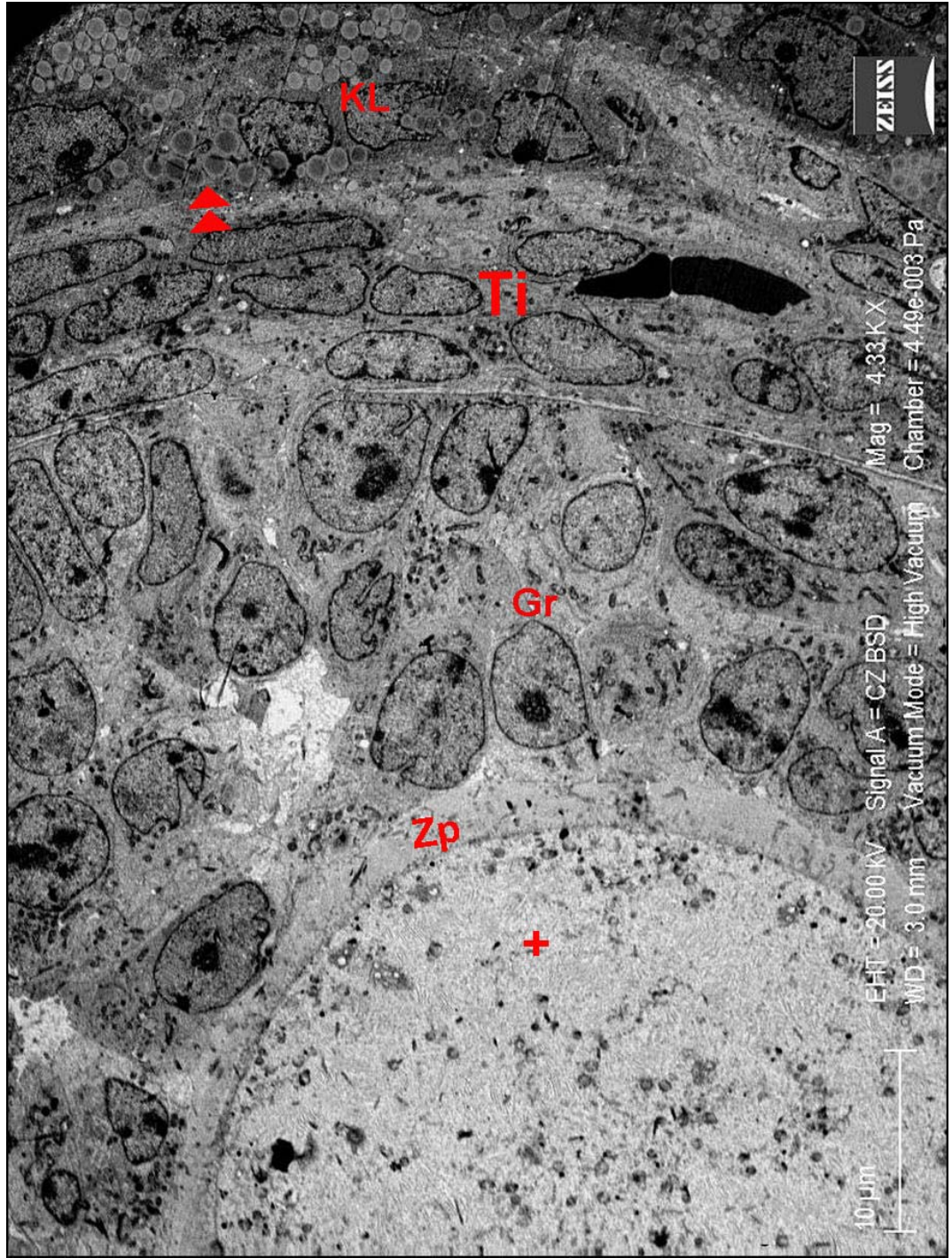
Resim 28: Gelişimin 14. günü hipoksi uygulanan grubuna ait elektron mikroskopik resimlerde; oosit sitoplazmasında tubüller (◇), granüloza hücresi (Gr), zona pellusida (ZP), mitokondriyon (M), madde taşınmasında görevli veziküller (→), granüllü endoplazmik retikulum (GER) ve çekirdek (Ç) (Uranil asetat-Kurşun sitrat x8100, x24570).



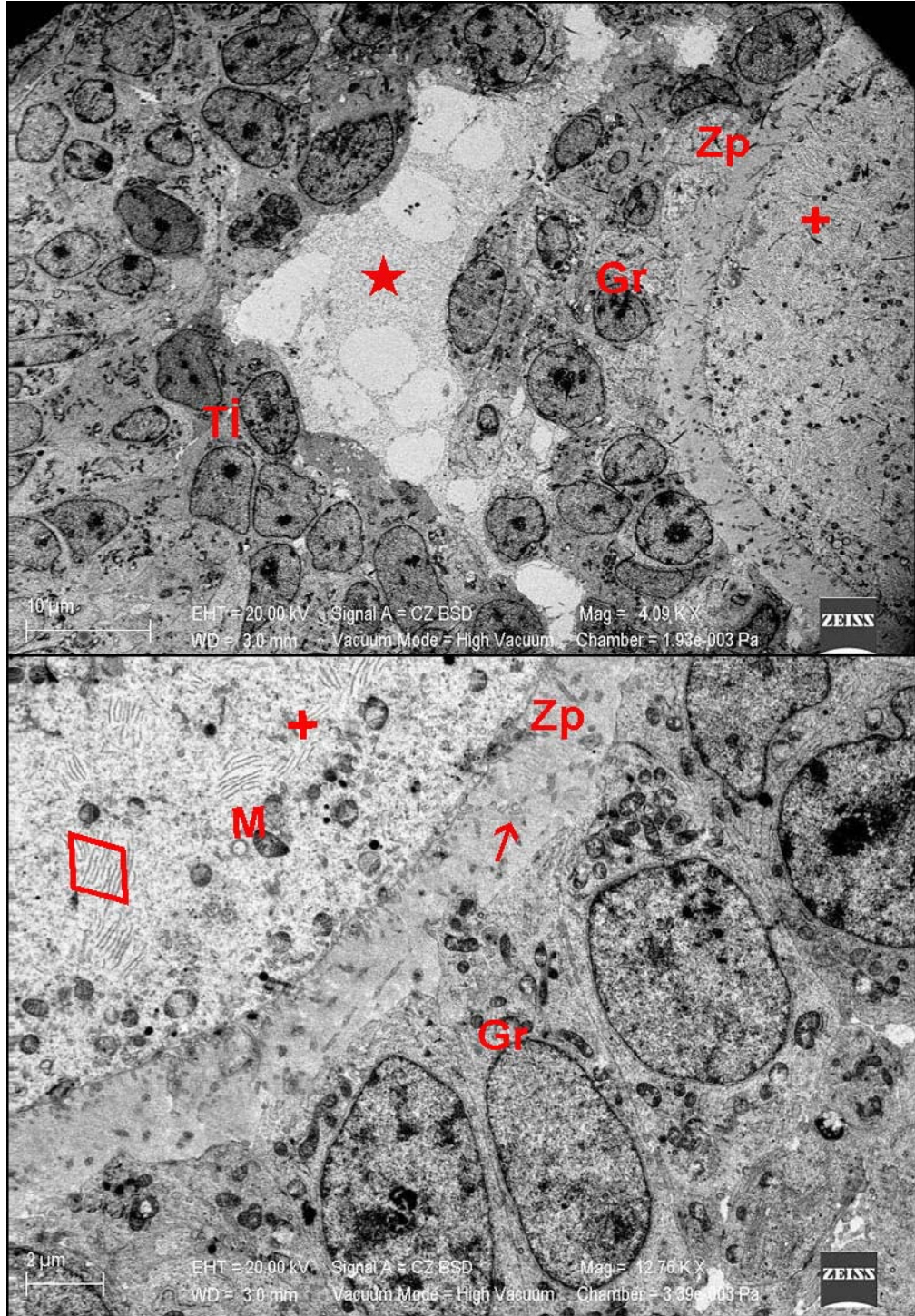
Resim 29: Gelişimin 14. günü Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan grubuna ait elektron mikroskobik resimlerde; oosit sitoplazması (+), zona pellusida (ZP), granüloza hücresi (Gr), vakuol (V), mitokondriyon (M), korpus luteum (KL), yağ damlacıkları (►►) (Uranil asetat-Kurşun sitrat x3830, x4850).



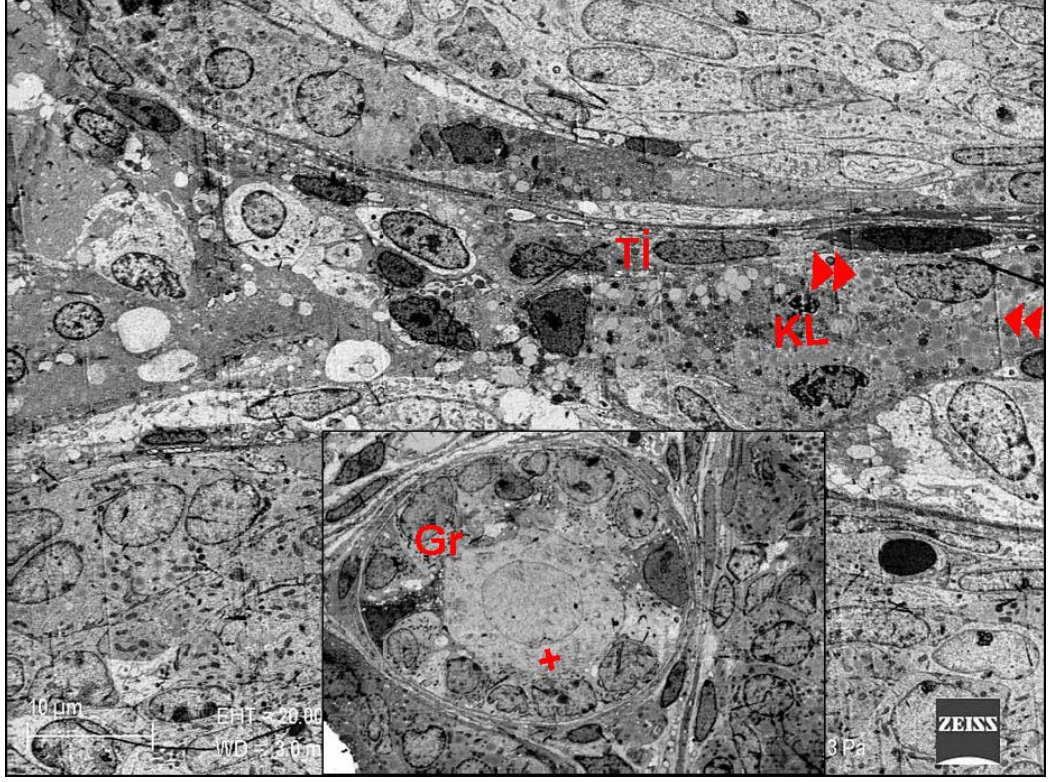
Resim 30: Gelişimin 14. günü Hipoksi+Ginkgo uygulanan grubuna ait elektron mikroskopik resimlerde; oosit sitoplazmasında (+) tubüller (◇) ve mitokondrion (M), granüloza hücresi (Gr), zona pellusida (ZP), madde taşınmasında görevli veziküller (→) (Uranil asetat-Kurşun sitrat x13720).



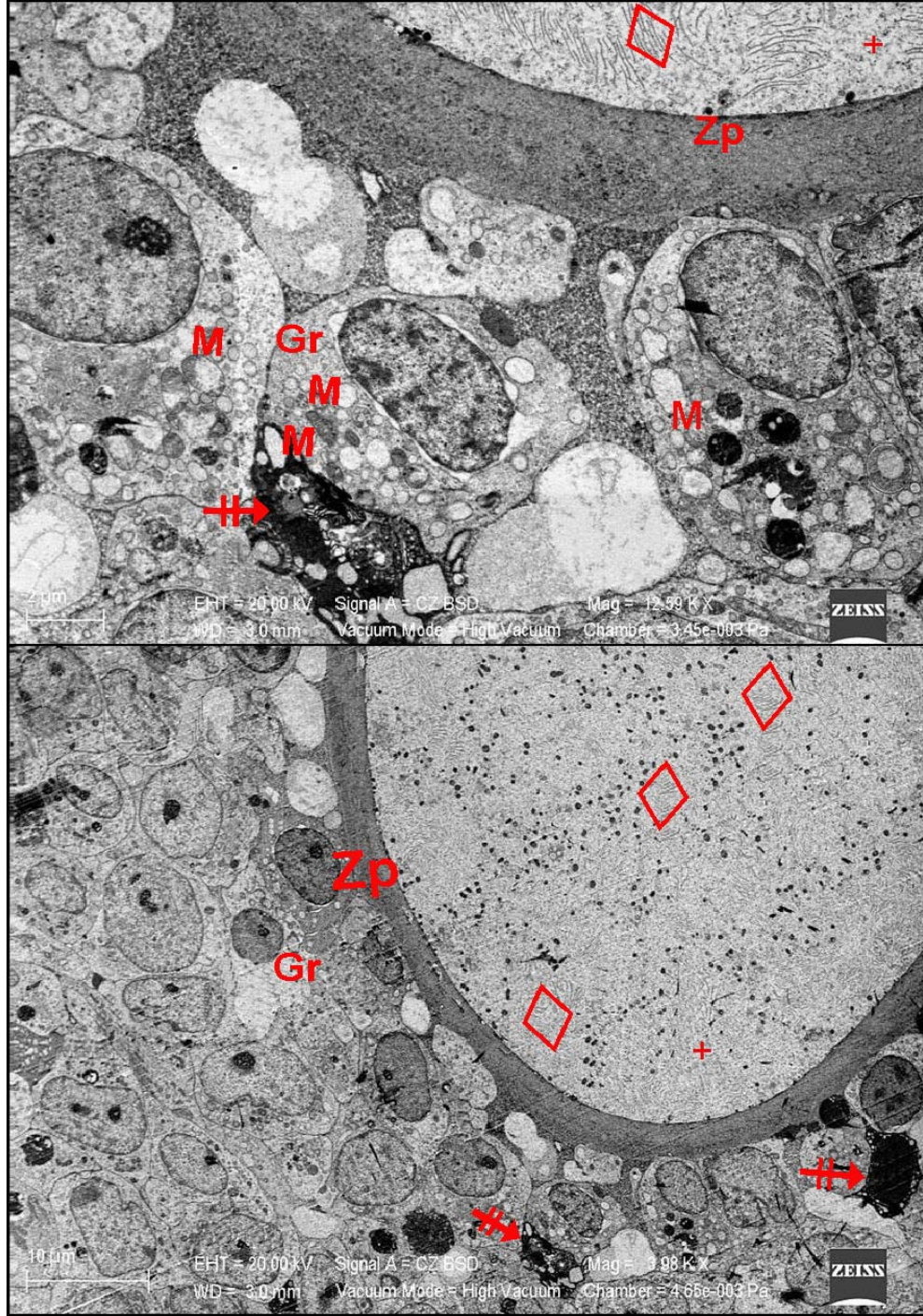
Resim 31: Gelişimin 21. günü kontrol grubuna ait elektron mikroskobik resimlerde; oosit sitoplazması (+), zona pellusida (ZP), teka interna (Tİ), korpus luteum (KL), yağ damlacıkları (▸) (Uranil asetat-Kurşun sitrat x4330).



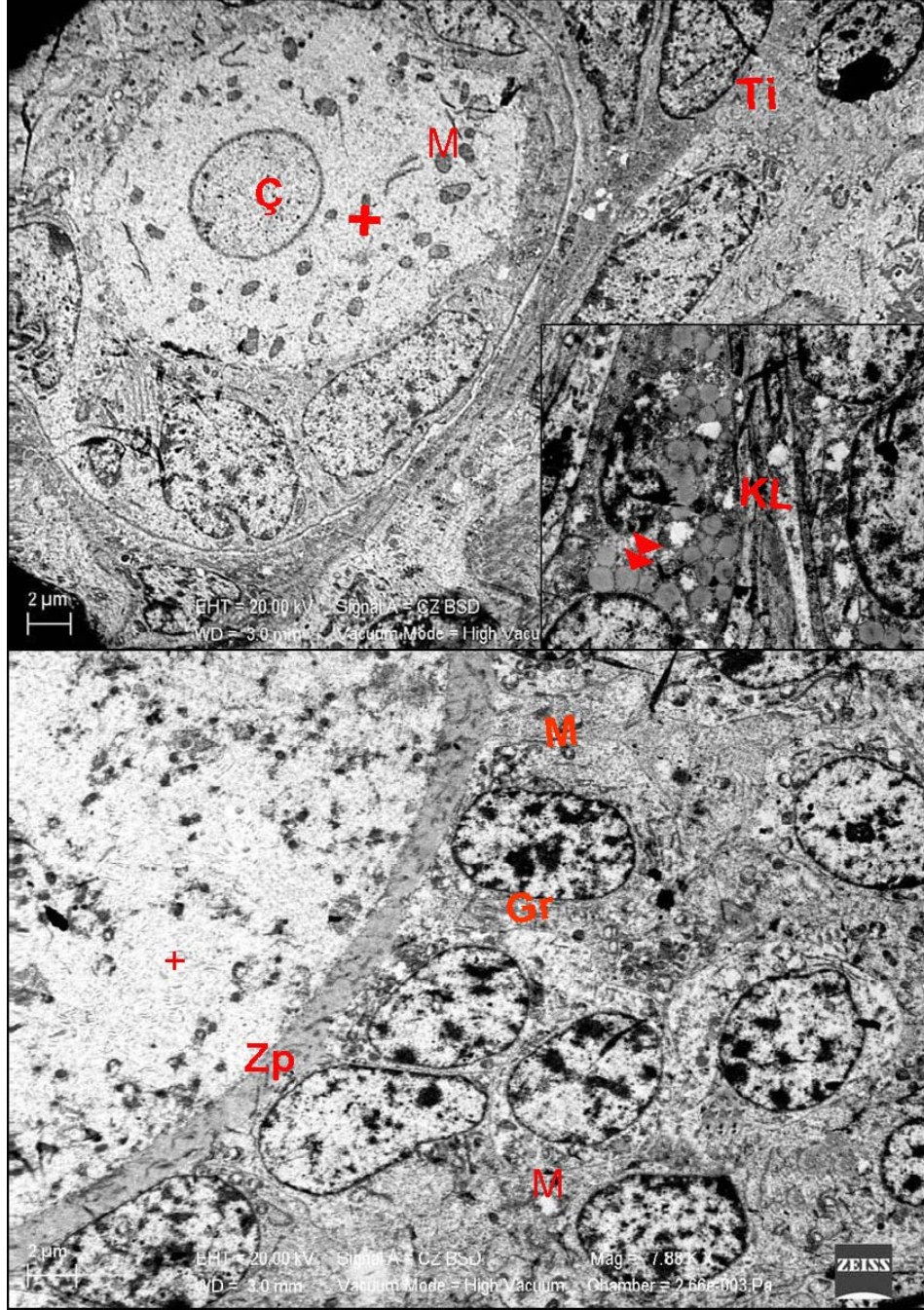
Resim 32: Gelişimin 21. günü kontrol grubuna ait elektron mikroskobik resimlerde; oosit sitoplazmasında (+) tubüller (◇) ve mitokondriyon (M), granuloza hücresi (Gr), zona pellusida (ZP), vezikül (→), antrum (★), teka interna (TI) (Uranil asetat-Kurşun sitrat x4090, x12760).



Resim 33: Gelişimin 21. günü hipoksi uygulanan grubuna ait elektron mikroskopik resimlerde; oosit sitoplazması (+), granuloza hücresi (Gr), korpus luteum (KL), yağ damlacıkları (»»), teka interna (Tİ), (Uranil asetat-Kurşun sitrat x3610, x4040).



Resim 34: Gelişimin 21. günü Hipoksi uygulanan grubuna ait elektron mikroskopik resimlerde; oosit sitoplazmasında (+) tubüller (◇), granüloza hücresi (Gr), zona pellusida (ZP), mitokondriyon (M), apoptotik hücreler (‡) (Uranil asetat-Kurşun sitrat x12590, x3980).



Resim 35: Gelişimin 21. günü Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan grubuna ait elektron mikroskopik resimlerde; oosit sitoplazması (+), çekirdek (Ç), teka interna (Ti), korpus luteum (KL), yağ damlacıkları (►►), zona pellusida (ZP), mitokondriyon (M) (Uranil asetat Kurşun sitrat x7059, x8190, x7880

5.TARTIŞMA

Solunum havasındaki oksijenin azlığı, dokuların gereksinim duyduğu oksijeni sağlamasına engel olur. Hipobarik (hipoksik) hipoksi olarak adlandırılan bu olgu günlük yaşamda yüksek irtifalara çıkmakla ya da çevresel oksijenin azalması durumlarında oluşur.

DeneySEL olarak hipobarik hipoksik koşullar yaratılarak yapılan çalışmalar, oksijen azlığından en çok etkilenen dokuların retina, miyokard ve merkez sinir sistemine ait dokular olduğunu göstermiştir.

1950'li yıllardan bu yana araştırılan hipoksi ve etkileri, günümüze gelişen yöntemler, moleküler ve histolojik incelemeler ile daha da anlaşılır hale gelmiştir.⁴⁶

Gün geçtikçe artan doğa turizmiyle birlikte yüksek rakımlı bölgelere ve hatta dağlara çıkan insanlarda akut hipoksinin belirtileri görülmektedir. Dağ hastalığı olarak adlandırılan bu patolojik olgunun hangi düzenekler sonucu oluştuğu bilinmemektedir. Bu, yüksek irtifa sonucu oluşan hipoksinin beyin damarlarında genişlemeye neden olduğu ve bunun baş ağrısını tetiklediği şeklinde açıklanmaya çalışılmaktadır. Baş ağrısının ise mide bulantısı ya da halsizlik gibi diğer belirtileri uyardığı düşünülmektedir. Çok hızlı bir şekilde yüksek irtifaya çıkıldığında ise beyin ve pulmoner ödemler oluşmakta ve bu da ölüme yol açabilmektedir.⁴⁷

Yüksek irtifa sonucu oluşan hipobarik hipoksiden en çok etkilenen organlardan birisi beyindir. 5000 metreden daha yükseğe çıkıldığında beyinde kalıcı nöron hasarların oluştuğu ve öğrenme ya da belleğin bundan etkilendiği bilinmektedir.⁴⁸

Normal metabolik dokuların fizyolojik düzenlemelerinde uyarıcı faktör olarak rol alan hipoksi, ftal gelişimin de normal bir parçasıdır. Hipoksinin, gelişmekte olan embriyonik dokularda vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) 'n uyararak dokuların damarlanmasını sağladığı kanıtlanmıştır. Ancak, aşırı hipoksik koşullar gelişim bozukluklarına ve postnatal defektlere neden olmaktadır. Margie Ream ve arkadaşları, maternal oksijeni azaltarak oluşturdukları ftal hipoksinin, VEGF, eritropoietin, glukoz taşıyıcı-1 , insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteini-1 gibi proteinlerin sentezini azaltarak fetusta gelişim geriliğine ve kilo kaybına yol açtığını; ayrıca şiddetli hipoksik koşulların kalp-damar sistem bozukluklarına, kanamalara ve ödeme neden olduğunu belirtmişlerdir.³

Fötal beyin hasarının en büyük nedeninin hipoksi olduğunu belirten Hava Golan ve Mahmoud Huleihel'in yaptıkları derlemede; 3 saatlik hipoksi uygulamasının ardından apoptotik moleküllerin salgılandığı, 3. günün sonunda hücre ölümlerinin başladığı ve 7. günde ise l hücre oranının arttığı belirtilmiştir. 14-20. günlerde ise beyinde hücre hasarının başlamakta olduğu bildirilmiştir. Doğum sonrası yaşamın ilk ayında duyuşal ve motor reflekslerin gelişiminde gerileme olduğu; yetişkinlikte ise motor fonksiyonlarda, öğrenmede ve bellekte sorunların olduğu kemirgenler üzerinde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.⁴⁶

Foliküler büyüme sırasında görülen damarlanma, azalan oksijenin tetiklediği fizyolojik bir olgudur. Giuseppina Basini ve arkadaşları, hipoksinin domuz granüloza hücreleri üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında oksijen stresinin follikül büyüklüğü üzerine bir etkisinin olmadığını, ancak hipoksinin hücre büyümesini engellemeden VEGF

üretimini artırdığını göstermişlerdir. Ayrıca kısmi hipoksinin (%5 oksijen) 17 β -estradiol ve progesteron düzeylerini etkilemezken, aşırı hipoksik (%1 oksijen) koşullarda bu düzeyin azaldığını belirtmişlerdir.⁴⁹

Yoshino ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise VEGF gibi anjiyogenik bir faktör olan interlökin-8 (IL-8) ' in hipoksik koşullarda, ovaryumdaki granüloza-lutein hücrelerinden salınımını 2 kat arttırdığı saptanmıştır. Bu bulgular doğrultusunda, ovaryum folliküllerinde oluşan hipoksinin proanjiyogenik ve kemotaktik sinyalleri uyararak ovaryum fonksiyonlarını bozduğu sonucuna varılmıştır.⁵⁰

Bu güne değin yapılan çalışmalar, oosit'in gelişim yeterliliğinin, follikül içi oksijen düzeyinden etkilendiğini göstermiştir. G.Redding ve arkadaşları gelişmekte olan insan folliküllerindeki folliküler sıvının içerdiği oksijen miktarlarını araştırmışlardır. Folliküllerin sahip oldukları şekillere göre içerdikleri oksijen miktarının değiştiğini öne süren araştırmacılar; erken antral follikül sıvısındaki oksijen miktarının giderek arttığını, ovulasyon öncesinde ise azalma gösterdiğini belirtmişlerdir.⁵¹

Ovaryumlarda damarlanma ovulasyon sonrası olaylanan korpus luteum'un oluşumunda önemli role sahiptir. Hipoksinin korpus luteum oluşumu üzerindeki etkilerini araştırmak ereğiyle yapılan çalışmada Ryo Nishimura ve arkadaşları, sığır korpus luteum'unda östrus döngüsü süresince HIF 1alfa proteininin alt birimi olan HIF1 A ve VEGF miktarlarını değerlendirmişlerdir. HIF 1 A (hypoxia inducible factor 1 A) hipoksi sonucunda sentezlenen bir gen ürünüdür. HIF 1 A'nın erken luteal evredeki korpus luteum'larda yüksek düzeylerinde sentezlendiği saptanan

çalışmada, yüksek miktardaki HIF 1A sentezinin VEGF'yi uyararak anjiyogenezi başlattığı ve bu sayede luteal oluşumun olaylandığı öne sürülmüştür.^{52,53,54}

Korpus luteum ve HIF 1A sentezi hakkında bilinenler sınırlıdır. Son yıllarda yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda, HIF 1A'nın maymun korpus luteum'unun çekirdeğinde tutulum gösterdiği belirtilmiştir. Korpus luteum'un oluşumunun erken evrelerinde tutulumun güçlü; ancak geç dönemlerinde ise zayıf olduğu Duncan ve arkadaşlarınca gösterilmiştir. Benzer sonuçlara varılan bir diğer çalışmada ise Boonyaprakob ve arkadaşları, domuz ovaryumunda HIF1A sentezinin korpus luteum'un olgunlaşması sırasında azaldığını göstermiştir. Yapılan bu çalışmalarla, hipoksi sonucu oluşan HIF1A proteininin birçok türün korpus luteum oluşumu için gerekli olduğu sonucuna varılmaktadır.^{52,53,54}

Çalışmamızda oluşturduğumuz hipobarik hipoksik koşulların da bu çalışmaları destekler nitelikte olduğu ve gelişimin 14.-21. günlerinde hipoksi uygulanan gruplarda gelişkin korpus luteum yapılarının varlığı belirlendi. Korpus luteum'u oluşturan hücrelerin hormon öncülü iri yağ damlacıkları ile karakterize oldukları görüldü. Bu bulgu, hipoksinin neden olduğu olumsuz etkilere karşı korunmak ereği ile ovaryumda hormon üretiminin artmış olabileceğini düşündürdü.

Ryo Nishimura ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmadan çıkan sonuç ise azalan oksijen miktarının korpus luteum'da progesteron düzeylerini düşürerek luteolizin başlamasını tetiklemesidir.⁵⁵

Progesteron hormonunun, insanlarda ve deney hayvanlarında ventilasyonu ve kemoreseptör yanıtını artırdığı bilinmektedir. Kronik dağ hastalığının belirgin etkilerinden olan eritrosit fazlalığının, yüksek irtifalarda (4300 m) yaşayan ve menapozla girmiş olan kadınlarda daha fazla olduğu görülmüştür. Leon Velarde ve arkadaşları yüksek irtifalarda yaşayan menapozlu kadınların fazla eritrosit üretiminin ovaryum hormonlarıyla ilgili olduğunu öne sürmüşlerdir. Menapoz öncesi ve sonrası kadınlarda oksijen düzeyleri, hemoglobin yoğunlukları ve östradiol ile progesteron düzeylerinin karşılaştırmalı değerlendirildiği çalışmada; menapoz sonrası kadınlarda düşük oksijen ve progesteron düzeyleri ile yüksek hemoglobin düzeyinin olduğu, östradiolün ise ilişkisinin bulunmadığı dikkat çekmiştir. Buna bağlı olarak, menapoz sonrası azalan progesteron düzeyiyle birlikte, yüksek irtifanın yarattığı kronik dağ hastalığının belirtilerinin görülme oranının arttığı bildirilmiştir.^{56,57}

I.Martin ve L.Costa; dişi fareleri, 5500 m yükseklikteki oksijen düzeylerine denk gelecek şekilde oluşturdukları, deneysel hipobarik hipoksiye etkin bırakmışlar ve ovaryumlar üzerindeki etkilerini gözlemlemişlerdir. 23 hafta süresince hipoksik kabinde tutulan dişi farelerin yüksek düzeyde östrojen sentezlediklerini ve üretkenliklerinin azaldığını belirten araştırmacılar, ışık mikroskop görüntülerinde ovaryumlarda kistlerin oluştuğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacıların J. Macrome önderliğinde yaptığı çalışmada da benzer bulguları ortaya koymuşlardır.

58,59

Van Blerkom, yaptığı çalışmada aşırı hipoksiye etkin kalan folliküllerin oositlerinde sitoplazmik ve kromozomal bozuklukların görüldüğünü bildirmiştir. Ayrıca bu folliküllerin ileride çok çekirdekli

blastomerlere sahip embriyonları oluşturduğu ve bunlarda çeşitli gelişim bozukluklarının görüldüğünü belirtmiştir.⁶⁰

Van Blerkom'un bulgularına kosut olarak, çalışmamızda ince yapı düzeyinde yaptığımız değerlendirmelerde tüm hipoksi oluşturulan gruplarımızda Granüloza hücrelerinde vezikül ve vakuollerin varlığı ve yer yer GER tubuluslarının genişlemesi belirgindi, ancak oosit sitoplazmasının içerik yönünden oldukça normal yapıda olduğu izlendi. Ovaryum yapısı yarı-ince kesit değerlendirmelerinde tüm gruplarda kümulus ooforus hücrelerinin normal yapı sergiledikleri görülürken özellikle 21. gün hipoksi uygulanan gruplarda bazı foliküllerin çift oosit yapısına sahip olduğu izlendi.

Tüm bu olumsuz koşullar birleştiğinde günümüzde giderek artan bir sorun haline gelen üreme bozukluklarını gündeme getirmektedir. Son zamanlarda, nedenleri tam olarak anlaşılamayan bu bozukluklara hipoksi sonucu oluşan reaktif oksijen radikallerinin neden olduğu düşünülmektedir. Vücutta oksidatif metabolizma sonucu serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşmaktadır. Sağlıklı bir vücutta antioksidanlar ile dengede olan SOR hipoksik koşullarda artarak dengeyi bozmakta ve sonucunda ise oksidatif stres oluşmaktadır. Serbest oksijen radikalleri vücuttaki birçok fizyolojik süreçte sinyal moleküller olarak görev alırlar. Dişi üremesinde follikülogenez, oosit olgunlaşması, ovaryal döngü, luteolizis, implantasyon, embriyogenezis ve gebelik gibi birçok fizyolojik olayda rol alır. Vücuttaki oksidan/antioksidan denge bozulduğunda artan miktarlardaki SOR, polikistik over ya da endometriozis gibi patolojik olgulara neden olmaktadır.^{61,62}

Martin-Romero ve arkadaşları, yardımcı üreme yöntem uygulamaları sırasında kullanılan kültür ortamlarının insan oositi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Folliküler sıvıda düşük oranda bulunan SOR, ticari olarak satılan ortamlarda değişik oranlarda bulunmaktadır. Bu ortamları kullanan araştırmacılar, kültür ortamında inkübe ettikleri kümulus ooforus hücrelerinde lipid peroksidasyonunun varlığını gözlemlemişlerdir. Değişik oranlarda SOR içeren bu ortamların oositin plazma membranına hasar verdiğini vurgulamışlardır.⁶³

Dişi üreme sisteminin fizyoloji ve patolojisinde rol alan SOR ve antioksidanların düzenekleri tam olarak bilinmemekte ve bu konuda yapılan her çalışma bir ipucu olmaktadır. Folliküler sıvı ve kümulus ooforus hücrelerinden salgılanan antioksidan enzimlerin, oositi oksidatif hasara karşı koruduğu bilinmektedir. Ayrıca artan SOR üretimi ovulasyon ya da döllemeyi etkilemektedir.⁶⁴

Kümulus ooforus hücre kültürü ile çalışan Maros ve arkadaşları, bu hücrelerde süperoksit dismutaz'ın (SOD) hücre içi formları olan CuZnSOD ve MnSOD ile boyama yaptıklarında bu hücrelerdeki tutulumlarını göstermişlerdir. Primordiyal ya da primer folliküllerde sentezlenmeyen bu enzimin, MnSOD formu antral folliküllerin granüloza ve teka interna hücrelerinde; CuZnSOD formunun ise olgun folliküllerin granüloza ve teka hücrelerinde sentezlendiği saptanmıştır. Ovulasyona yakın azalan oksijenin oluşturacağı hasarlara karşı artan bu enzimlerin koruyucu özelliklerinin olduğu vurgulanmıştır.⁶⁵

Antioksidan enzimlerin vücutta yetersiz olduğu koşullarda dışarıdan uygulanan multivitaminlerin üremeyi güçlendirebileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Rao ve arkadaşları, nikel ve krom elementlerinin ovaryumda oluşturduğu oksidatif strese karşı E vitaminin koruyucu etileri üzerine çalışmışlardır. Nikel ve krom, ovaryum dokusunda lipid peroksidaz enzim aktivitesini artırırken, protein, glutatyon, askorbik asit, katalaz ve süperoksit dismutaz düzeylerinde azalmaya neden olmaktadır. Nikel ve kroma ek olarak verilen E vitamini ise lipid peroksidasyonunu azaltmış ve antioksidan mekanizmasını güçlendirmiştir.⁶⁶

Çalışmamızda kullandığımız Ginkgo biloba ekstresi, kuvvetli serbest radikal tutucu özelliği kanıtlanmış bir antioksidandır. Adnane Louajrl ve arkadaşları Ginkgo biloba'nın bu özelliğini, 21 gün süresince hipoksiye etkin bırakılan fareler üzerinde incelenmiştir. Çalışmada 25 ve 50 mg/kg dozlarla Ginkgo biloba verilmiş ve SOR miktarı ölçülmüştür. 50mg/kg doz verilen grupta daha düşük olmakla birlikte her iki grupta da SOR miktarının azaldığı görülmüştür. Bu durum Ginkgo biloba'nın serbest radikal tutucu özelliğini kanıtlamaktadır.⁶⁷

Jiang ve arkadaşları çalışmalarında, Ginkgo biloba'nın spinal kord sinir hücrelerini oksidatif stres sonucu oluşacak olan apoptozisten koruduğunu göstermişlerdir. Benzer şekilde Shen ve arkadaşları da hipoksinin neden olduğu endotelial bozuklukların Ginkgo biloba ekstresi ile kısmen iyileştirilebileceğini, bu bozukluklara karşı ise tam bir koruma sağladığını belirtmişlerdir.⁶⁸

Wolfgang ve arkadaşları azalan uterus kan akımına ve azalan endometriyal yanıtı karşı Ginkgo biloba'nın uterus perfüzyonunu artırıp artıramayacağı üzerine araştırma yapmışlardır. Çalışmanın sonunda Ginkgo biloba uygulamasının endometriyal kalınlığı anlamlı bir şekilde artırdığı sonucuna varılmıştır.⁶⁹

Kontrollü olarak yapılan iki çalışmada ölüm gibi ciddi bir durumla sonuçlanabilecek yüksek irtifa hipoksisinden korunmak ereği ile Ginkgo biloba preparatları kullanılmıştır. Aşamalı olarak 5000 m yüksekliğe çıkarılan insanlarda, Ginkgo bilobanın koruyucu etkisi kanıtlanmıştır. Hızlı bir şekilde 4100 m yüksekliğe çıkarılan insanlarda ise bu preparatın, akut dağ hastalığına karşı %50 oranda koruyuculuğu olduğu gösterilmiştir.⁴⁷

Ginkgo biloba'nın ovaryum dokusu üzerine olan etkilerini gösteren çalışma sayısı yeterli değildir. Ovaryum ile ilgili yapılan çalışmalar genellikle Ginkgo biloba'nın ovaryum kanserinde koruyucu etki gösterdiği yönündedir. B. Ye ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, Ginkgo biloba ekstresi ile bileşenleri olan quersetin ve ginkgolid A ve B 'nin, seröz ovaryum hücre kanserinde %40 oranında proliferasyonu önleyici etki gösterdiğini, müköz hücre kanserinde ise daha az etkilerinin olduğunu kanıtlamışlardır. Ginkgolidlerin proliferasyon önleyici etkilerini, hücre döngüsü sırasında S evresine geçişi engelleyerek yaptığı vurgulanmıştır.⁷⁰

Ginkgo biloba ekstresinin ovaryum kanseri riskini azalttığıının gösterilmesiyle birlikte A. Koltermann ve arkadaşlarını bu ekstrenin ovaryum üzerindeki etkilerini araştırmaya yöneltmiştir. Ginkgo biloba'nın periferel damar bozukluklarındaki damarlanma oluşumundaki etkilerinin aksine bu çalışma sonucunda, ginkgolidlerin anjiyogenezi engellediği vurgulanmıştır.⁷¹

Ginkgo biloba ile benzer etkilere sahip olan diğerk bir antioksidan olan yeşil çay ile yapılan bir çalışmada, Bassini ve arkadaşları, yeşil çayın VEGF sentezini engelleyerek anjiyogenezi engellediğini göstermişlerdir. Kısmi ya da aşırı hipoksinin, VEGF sentezini uyardığına değinen araştırmacılar, yeşil çayın bu sentezi baskıladığını, bununla birlikte yüksek dozlarda verilen yeşil çayın sığır granüloza hücrelerinin çoğalmasını durdurduğunu savunmuşlardır.⁷²

Çalışmamızda kullanılan Ginkgo biloba'nın ovaryum dokusuna ya da folliküllerine karşı böyle bir etkisinin olup olmadığı henüz araştırılmamıştır. Ginkgo biloba'nın gebelikte olaylanan hipoksiye etkin kalan yenidoğan farelerin ovaryum dokusu üzerindeki etkilerini saptamak ereğiyle sağlıklı insan ve fare Graaf folliküllerinin granüloza hücrelerinden salındığı bilinmekte olan dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β) ile TGF- β ailesinin bir üyesi olan GDF-9'un ovaryumdaki tutulumlarına bakılmıştır.

TGF- β süperalesi, ovaryum gelişimi ve fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol alır ve 35 alt gruba sahiptir. Bu grubun içerisinde , Aktivin, İnhibin, Kemik Morfogenik Proteinleri (BMP-2,-4,-5,-6,-7), Büyüme Farklılaşma Faktörü 9 (GDF-9), Glial Hücreden üretilen Nörotrofik Faktör (GDNF), Nodal, Anti Mülleryan Hormon (AMH) bulunmaktadır.^{73,74}

TGF- β ailesi üyeleri hücre sel çoğalmayı, farklılaşmayı ve hücre dışı ortam ile etkileşimi denetleyen çok fonksiyonlu sitokinlerdir.^{9,75}

Ovaryum folliküllerinin oluşumu ve gelişimi sırasında önemli işlevlere sahip olan TGF- β 'nın preantral folliküllerin gelişimini uyardığı

Ann E. Drummond' un yapmış olduğu derlemede vurgulanmıştır. Ayrıca TGF- β 'nın, sağlıklı insan ve fare Graaf folliküllerinin granüloza ve teka hücrelerinde salındığı da belirtilmiştir. TGF- β 'in ovaryum korpus luteum'unda ve oosit'lerde kuvvetli olarak salınırken, teka hücrelerinde ve atretik folliküllerde salınımının zayıf olduğu, küçük ve orta büyüklükteki folliküllerin granüloza hücrelerinde gözlenmediği; buna karşın, TGF- β 2 , β 3 ve TGF- β tip II reseptörünün antral folliküllerin granüloza hücrelerinde ve oosit'lerde salındığı yapılan çalışma ile gösterilmiştir.^{9,73}

Çalışmamızda TGF- β primer antikoru ile yapılan immünohistokimyasal değerlendirmelerde, Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan gruplarda TGF- β immünreaktivitesinin kontrol gruplarıyla eşdeş olduğu belirlendi. Aşırı hipoksik koşulların follikül gelişimini hızlandırdığını saptadığımız çalışmamızda Ginkgo biloba ekstresinin bu olguyu kontrol grubu yönünde değiştirdiği görülmüştür.

TGF- β süper ailesinin üyelerinden biri olan büyüme ve farklılaşma faktörü 9 (GDF-9) ovaryum'da follikül gelişimi süresince granüloza hücrelerinin çoğalması ve farklılaşmasında görev alan bir moleküldür. GDF-9 folliküler gelişim evresinde özellikle primordiyal follikülden primer folliküle geçişte son derece önemli rol oynadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.^{9,76}

A. Julia ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, GDF-9 salınımı olmayan dişi farelerin, follikülogenezisin primer follikül aşamasında engellenmesi sonucu üreme sorunlarının görüldüğünü saptamışlardır.⁷⁷

Çalışmamızda kullandığımız GDF-9 primer antikoru ile yapılan immünohistokimyasal incelemelerde, kontrol grubunda görülen

tutulum normal olarak değerlendirilirken bu immünreaktivitenin hipobarik Hipoksi gruplarında azaldığı, Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan gruplarda GDF-9 immünreaktivitesinin kontrole yakın görünüm sergilediğı belirlendi.

6.SONUÇ

Çalışmamızda gelişimin 7., 14. ve 21. günlerindeki deneklere ait kontrol gruplarda TGF- β tutulumu tüm gelişen folliküllerde, granüloza hücrelerinde , oosit'te ve zona pellusida'da gözlenirken hipoksi uygulanan gruplarda TGF- β tutulumunun daha yaygın ve yoğun olduğu izlendi. Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan gruplarda bulguların kontrol grubu ile eşdeğer olduğu dikkat çekti.

GDF-9 primer antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyamada tutulumun, gelişimin 7. günündeki deneklere ait kontrol gruplarında kuvvetli olduğu, 14. ve 21. günlerindeki deneklere ait kontrol gruplarında ise daha orta dereceli olduğu izlendi. Hipoksi uygulanan gruplarda ise tutulumun kontrol gruplarına göre zayıf olduğu gözlemlendi. Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan gruplarda ise bulguların kontrol grubu yönünde değiştiği belirlendi.

Yarı-ince kesitler değerlendirildiğinde; gelişimin 14. gününe ait tüm gruplarda ovaryum yapıları normal izlendi. 21. güne ait gruplardan hipoksi uygulanan grupta bazı folliküllerde çift oosit yapısı gözlenirken, büyük grup granüloza hücrelerinin apoptozise gider görünüşleri dikkat çekti. Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan gruplar yine kontrol grubuyla eşdeğer özellikler sergiliyordu.

Elektron mikroskopik incelemelerde kontrol grupları normal yapıda izlenirken, gelişimin 14. günü hipoksi uygulanan grupta granüloza hücrelerinde vakuol ve veziküllerin varlığı ve GER tubuluslarının genişlemesi belirgindi. Korpus luteum'da luteal hücrelerin gelişkinliği dikkat çekiciydi. Gelişimin ilerleyen döneminde ise folliküllerde belirgin bir

apoptozise gidiş belirlendi. Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan grupta bulguların yine kontrol grubuyla koşut olduğu izlendi.

Sonuç olarak çalışmamızda hipobarik hipoksi uygulamasının dişi sıçanlarda hormonal mekanizmayı aktive ederek puberteyi hızlandırdığı ve follikülogenezisi uyardığı belirlenirken, olgun folliküllerin dejeneratif özellikler sergilediği dikkati çekti. Ginkgo biloba verilen gruplarda ise bu değişimlerin olmadığı saptandı.

7. ÖZET

Dokulardaki oksijen eksikliğine koşut gelişen ve bir fonksiyon bozukluğu olan hipoksi, günlük yaşamda etkilerini akut olarak gösterirken, uzun süreli oksijensizliğin oluşturduğu kronik hipoksik etkiler birçok dokuda hasara neden olmaktadır. Fötal dönemde oluşan kronik hipoksinin ise gelişim bozukluklarına neden olduğu bilinmektedir.

Bu çalışmada, gebelikte olaylanan hipoksinin ovaryum dokusu üzerine olan etkilerinin belirlenmesi ve bir antioksidan olan Ginkgo biloba ekstresinin hasarlı dokular üzerine olası iyileştirici etkisinin immünohistokimyasal ve elektron mikroskopik düzeyde incelenmesi amaçlandı.

Bu doğrultuda Wistar albino cinsi gebe sıçanlar gebeliğin 5. gününde % 10' luk O₂ ve % 90'lık N₂ gaz karışımı verilen hipoksik kamaralara konuldu ve 10 gün süresince bu koşullara etkin bırakıldı. Kontrol grubu olarak belirlenen sıçanlar gebelikleri süresince normal atmosfer koşullarında yaşatıldı. Doğumun gerçekleşmesi ile birlikte, hipoksi uygulanan gruptaki yavruların bir bölümüne her gün aynı saatte 100 mg/kg Ginkgo biloba ekstresi oral yolla uygulanarak deney grupları oluşturuldu.

Gelişimin 7., 14. ve 21. günlerinde alınan ovaryum dokularında follikül gelişimini izleyebilmek amacıyla TGF- β ve GDF-9 primer antikoru kullanıldı.

TGF- β primer antikoru ile boyanan, gelişimin 7., 14. ve 21. günleri hipoksi gruplarında tüm gelişim aşamasındaki folliküller, granüloza

hücreleri, oosit, zona pellusida ve teka interna hücreleri yoğun derecede tutulum gösterirken, kontrol ve Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan gruplarda tepkimenin zayıftan orta dereceye değişmekte olduğu belirlendi.

GDF-9 primer antikoru ile immünohistokimyasal boyama uygulanan, Hipoksi+Ginkgo biloba gruplarında gelişimin 7. gününde immünreaktivitenin kontrol ve hipoksi uygulanan gruplara karşın daha yoğun olduğu, 14. ve 21. günlerde ise 7. güne oranla bu boyanmanın orta derecede olduğu saptandı.

Yarı ince kesitler üzerinde yapılan incelemelerde; hipoksi uygulanan gruplarda gelişimin 14. ve 21. günlerinde gelişkin korpus luteum yapılarının varlığı gözlenirken, Hipoksi+Ginkgo biloba uygulanan gruplarda ovaryumun normal yapıda olduğu belirlendi.

Elektron mikroskop incelemelerinde ise hipoksi gruplarında granüloza hücrelerinde apoptozise gidiş izlenirken; hipoksinin etkisiyle çift oosit yapılarının geliştiği görüldü.

Bu bulgular doğrultusunda hipobarik hipoksi uygulamasının dişi sıçanlarda hormonal mekanizmayı aktive ederek puberteyi hızlandırdığı ve follikülogenezisi uyardığı belirlenirken, olgun folliküllerin dejeneratif özellikler sergilediği dikkati çekti. Ginkgo biloba verilen gruplarda ise bu değişimlerin olmadığı saptandı.

8. SUMMARY

While showing acute effects in daily life; hypoxia is a kind of functional disorder that develops due to the lack of oxygen in tissues, also causes damages in various tissues which are arised by the lack of oxygen for a long time period. It is known that chronic hypoxia developed in fetal period causes growth disorder.

In this study, it is aimed to investigate the effects of hypoxia which is developed during pregnancy over ovary tissues, and the therapeutic effect of the antioxidant material named Ginkgo biloba on damaged tissues at immunohytochemical and electron microscobic level.

In this manner, Wistar albino type pregnant mice are put into hypoxic cabins at the fifth day of their pregnancy and given a gas mixture with the percentage of % 10 of oxygen and % 90 of nitrogen and left in this conditions for ten days. Mice which are assessed as control group are lived in normal atmospheric conditions during their pregnancies. With the of birth, Experiment groups are formed by applying 100 mg/kg of Ginkgo biloba extract to some part of the new born mice that exposed to hypoxia by orally by the same time every day.

TGF- β and GDF-9 primary antibodies are used to follow the follicle development on the ovary tissues which are expelled at seventh, fourteenth and twentyfirst days of evolution.

It is stated that while groups that are exposed to hypoxia and are applied TGF- β primary antibody, at seventh, fourteenth and twentyfirst days of evolution, all of the developing stage follicles, granuloza cells,

oosit, zona pelluside and teka interna cells are stained in dense degree; at the control groups and groups that are exposed to hypoxia + Ginkgo biloba are stained with the changing degree from weak to medium.

It is appointed that at the seventh day of evolution, immunoreactivity is more dense at the hypoxia + Ginkgo biloba groups that GDF-9 primary antibody applied than the control group and hypoxia exposure group; at the fourteenth and twentyfirst days these immune staining is in a medium degree compared to the seventh day.

During the analysis carried out the half-thin sections it is experienced that while observing normal ovary structure at the hypoxia-Ginkgo biloba exposed group, developed corpus luteum structure is observed at hypoxia exposed group at the fourteenth and twentyfirst days of evolution.

During the analysis carried out by electron microscope, it is observed that, in hypoxia exposed groups a process of apoptosys in granulosa cells are seen, whereas double oosit structures are developed with the effect of hypoxia.

As a result, in our study, while stating that hypobaric hypoxia exposure over female mice accelerated puberty by activating hormonal mechanism and induced folliculogenesis, it took attention that mature follicles showed degenerative characteristics. It is observed that these variations did not occur at the groups that exposed to Ginkgo biloba.

9. KAYNAKLAR

- 1.** Randall D, Burggren W, French K. *Animal Physiology*. 5. Baskı. A.B.D: W.H. Freeman and Company; 2002. s.499-578.
- 2.** Lee YM, Jeong CH, Koo SY, Son MJ, Song HS, Bae SK, Raleigh JA, Chung HY, Yoo MA, Kim KW, et al. Determination of Hypoxic Region by Hypoxia Markerin Developing Mouse Embryos In Vivo: A PossibleSignal for Vessel Development. *Dev Dyn*. 2001 Feb;220(2):175-86.
- 3.** Ream M, Ray AM, Chandra R, Chikaraishi DM, et al. Early fetal hypoxia leads to growth restriction and myocardial thinning. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008 Aug;295(2):R583-95.
- 4.** Popovici RM, Lu M, Bhatia S, Faessen GH, Giaccia AJ, Giudice LC, et al. Hypoxia regulates insulin-like growth factor-binding protein 1 in human fetal hepatocytes in primary culture: suggestive molecular mechanisms for in utero fetal growth restriction caused by uteroplacental insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Jun;86(6):2653-9.
- 5.** Rueda – Clausen CF, Morton JS, Davidge ST, et al. Effects of hypoxia-induced intrauterine growth restriction on cardiopulmonary structure and function during adulthood. *Cardiovasc Res*. 2009 Mar 1;81(4):713-22.
- 6.** Wang Z, Huang Z, Lu G, Lin L, Ferrari M, et al. Hypoxia during pregnancy in rats leads to early morphological changes of atherosclerosis in adult offspring. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 May;296(5):H1321-8.

7. Greger R, Windhorst U. Comprehensive Human Physiology. 2. Baskı. A.B.D: Springer;1996. s.2307-2337.
8. Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. Hum Reprod Update. 2005 Sep-Oct;11(5):461-71
9. Gülgen S. Kemoterapi Uygulamasının Sıçan Ovaryum Follikülleri Üzerine Etkisi ve Çeşitli Antioksidanların Koruyucu Rollerinin Yapısal ve İmmünohistokimyasal Düzeyde Belirlenmesi. Doktora. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2009.
10. Blerkom VJ, Antczak M, Schrader R,et al. The developmental potential of the human oocyte isrelated to the dissolved oxygen content of follicularfluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. Human Reproduction vol.12 no.5 pp.1047–1055, 1997.
11. Agarwal A, Gupta S, Sikka S, et al. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. Curr Opin Obstet Gynecol. 2006 Jun;18(3):325-32.
12. Agarwal A, Gupta S, Sharma R,et al. Oxidative stress and its implications in female infertility - a clinician's perspective. Reprod Biomed Online. 2005 Nov;11(5):641-50.
13. Willmer P, Stone G, Johnston I. Environmental Physiology of Animals. 2. Baskı. UK: Blackwell Publishing; 2005. s.112-170.
14. Sadler T. W. Langman's Medikal Embriyoloji. Başaklar A. C (Çev), 9. Baskı. Ankara: Palme Yayınları; 2005.

- 15.** Moore L. K, Persaud T.V.N. Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi. Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H (Çev) 1. Baskı. İstanbul: Noel Tıp Kitapevleri; 2002.
- 16.** Gülle K. Fare Ovaryumunda Poli (Adp-Ribozil)Asyon Yolu. Doktora. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi; 2008.
- 17.** Erdoğan D, Hatipoğlu M. T, Görgün M, Ilgaz C. Özel Histoloji. 2. Baskı. Ankara: Hatipoğlu Yayınevi; 2007.
- 18.** Gartner P. L, Hiatt L. J. Color Textbook of Histology. 2. Baskı. A.B.D: W.B. Saunders Company; 2001.
- 19.** Junqueira C. L, Carneiro J. Temel Histoloji. Aytekin Y, Solakoğlu S (Çev), 10. Baskı, Brezilya, Noel Tıp Kitapevleri, 2003. s.449-459.
- 20.** Mills S. E. Histology for Pathologists. 3. Baskı. A.B.D.: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
- 21.** Aksoy A. Yaşlanmaya Koşut Sıçan Ovaryum'unda Folikül İnce Yapısı ve Folikül Uyarıcı Hormon Reseptörlerinin (Fshr), Östrojen Reseptörlerinin (Er), Progesteron Reseptörlerinin (Pr) İmmünohistokimyasal Olarak Belirlenmesi. Yüksek Lisans. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2008
- 22.** Öber A, İzzetoğlu G. T. Histoloji. 1. Baskı. Ankara: Nobel Yayın; 2006. s.239-245, s.274-275.
- 23.** Başar M. Süperovulasyonun Ovaryum Dokusu Yapısı Üzerine Etkilerinin Morfolojik Yönden Araştırılması. Yüksek Lisans. İstanbul: İstanbul Üniversitesi;2006.

- 24.** Fawcett D. W, Jensch R. P. Concise Histology. 2. Baskı. Londra: Chapman and Hall; 2002.
- 25.** Ovalle K. W, Nahirney C. P. Netter's Essential Histology. 1. Baskı. China: Saunders Elsevier; 2008. s.399-409.
- 26.** Akıncı A. Östrojenden Yoksun ve Zengin Diyet Uygulamasında Ovaryumun İnce Yapısı. Yüksek Lisans. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2004.
- 27.** Yıldırım M. İnsan Anatomisi 2. Noel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti; s.167-179.
- 28.** Ayaş B. B. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörleri ve Transformasyon Edici Büyüme Faktörü Alfa'nın İnsan Ovaryumu Gelişen Folliküllerindeki Dağılımın İmmünohistokimyasal Olarak Belirlenmesi. Yüksek Lisans. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2001.
- 29.** Hatipoğlu MT, Hatipoğlu HG. Yüksekokullar Anatomi Ders Kitabı. 1. Baskı. Ankara: Selvi Yayınevi; 2006. s.211-213.
- 30.** Moore L. K., Agur M. R. A. Temel Klinik Anatomi. Elhan A, Barut Ç, Ersoy M (Çev), 2. Baskı, Güneş Kitabevi. s.246-247
- 31.** Guyton C. A, Hall E. J. Tıbbi Fizyoloji. Çavuşoğlu H, Yeğen Ç. B (Çev), Onbirinci Baskı, ABD, Elsevier Saunders, 2006, s.1011-1025.
- 32.** Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. Demir R (Çev), 1.Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık;2006. s.565-575.
- 33.** Berne RM, Levy MN, Koepfen BM, Stanton BA. Fizyoloji. 5. Baskı. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 2008. s492-510.

- 34.** Bıyıkız PC. Hipoksik Yenidoğan Sıçanların Solunum Sistemi Morfolojisi Ve Nöroendokrin Hücrelerin Histokimyasal Olarak Işık Mikroskopik Düzeyde İncelenmesi. Yüksek Lisans. Kocaeli: Kocaeli Üniversitesi;2004.
- 35.** Odyakmaz B. Deneysel Hipoksidede Ginkgo Glikozitlerinin Sitoprotektif Etkisi. Yüksek Lisans. Ankara: Gazi Üniversitesi; 1994.
- 36.** Costanzo L. S. Fizyoloji. Özgüven T, Özgüven K. T (Çev) 3. Baskı, Ankara, Güneş Kitabevi, 2003. s.288-293.
- 37.** Karalezli A. Arter Kan Gazları. Turkish Medical Journal 2007, 1:44-50.
- 38.** Kurtuluş H, Eskiocak S, Tütüncüler F, Başaran ÜN, Gülen Ş. Deneysel Sistemik Hipoksi Geliştirilmiş Yenidoğan Ratlarda N–Asetilsistein Uygulamasının Etkileri. Türk Biyokimya Dergisi. 2003; 28 (2); 40-44.
- 39.** McKenna DJ, Jones K, Hughes K, Humphrey S. Botanical Medicines The Desk Reference for MAjor Herbal Supplements. 2. Baskı. A.B.D: Haworth Herbal Press; 2002. s.445-503.
- 40.** Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M. Farmasötik Botanik. Ankara Üniversitesi Basımevi: Ankara; 1998. s.121
- 41.** Demirözer Ö, editör. Tedavide Kullanılan Bitkiler “FFD Monografları”. 1. Baskı. Ankara: Noel Tıp Kitabevleri; 2007.
- 42.** Bulgurcuoğlu S, Özsait B, Attar E. Büyüme Faktölerinin Oosit ve Embriyo Gelişimi Üzerindeki Etkisi. Artemis, Ocak 2003; Vol 4(1) 18-26

- 43.** Soyöz M, Özçelik N. TGF- β (Transforming Growth Factor- β) ve Sinyal İletimi J Med Sci, 2007, 27. s.426
- 44.** Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppa L, Louhio H, Tuuri T. Human Growth Differentiation Factor 9 (GDF-9) and Its Novel Homolog GDF-9B Are Expressed in Oocytes during Early Folliculogenesis. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism Vol. 84, No. 8.
- 45.** Pangas SA. Growth Factors in Ovarian Development. Seminars In Reproductive Medicine. Volume 25, Number 4 2007.
- 46.** Golan H, Huleihel M, et al. The effect of prenatal hypoxia on brain development: short- and long-term consequences demonstrated in rodent models. Dev Sci. 2006 Jul;9(4):338-49.
- 47.** Hackett PH, Roach RC, et al. High-altitude illness. N Engl J Med. 2001 Jul 12;345(2):107-14.
- 48.** Maiti P, Singh SB, Muthuraju S, Veleri S, Ilavazhagan G, et al. Hypobaric hypoxia damages the hippocampal pyramidal neurons in the rat brain. Brain Res. 2007 Oct 17;1175:1-9.
- 49.** Basini G, Bianco F, Grasselli F, Tirelli M, Bussolati S, Tamanini C, et al. The effects of reduced oxygen tension on swine granulosa cell. Regul Pept. 2004 Aug 15;120(1-3):69-75.
- 50.** Yoshino O, Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Yano T, Tsutsumi O, Fujimoto A, Kugu K, Momoeda M, Fujiwara T, Taketani Y, et al. Upregulation of interleukin-8 by hypoxia in human ovaries. Am J Reprod Immunol. 2003 Oct;50(4):286-90.

- 51.** Redding GP, Bronlund JE, Hart AL, et al. Theoretical investigation into the dissolved oxygen levels in follicular fluid of the developing human follicle using mathematical modelling. *Reprod Fertil Dev.* 2008;20(3):408-17.
- 52.** Nishimura R, Okuda K, et al. Hypoxia is Important for Establishing Vascularization During Corpus Luteum Formation in Cattle. *J Reprod Dev.* 2009 Nov 2.
- 53.** Duncan WC, van den Driesche S, Fraser HM, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor in the primate ovary up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha in the follicle and corpus luteum. *Endocrinology.* 2008 Jul;149(7):3313-20.
- 54.** Boonyaparakob U, Gadsby JE, Hedgpeth V, Routh PA, Almond GW, et al. Expression and localization of hypoxia inducible factor-1alpha mRNA in the porcine ovary. *Can J Vet Res.* 2005 Jul;69(3):215-22.
- 55.** Nishimura R, Sakumoto R, Tatsukawa Y, Acosta TJ, Okuda K, et al. Oxygen concentration is an important factor for modulating progesterone synthesis in bovine corpus luteum. *Endocrinology.* 2006 Sep;147(9):4273-80.
- 56.** León-Velarde F, Rivera-Chira M, Tapia R, Huicho L, Monge-C C, et al. Relationship of ovarian hormones to hypoxemia in women residents of 4,300 m. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001 Feb;280(2):R488-93.
- 57.** León-Velarde F, Ramos MA, Hernández JA, De Idiáquez D, Muñoz LS, Gaffo A, Córdova S, Durand D, Monge C, et al. The role of

menopause in the development of chronic mountain sickness. *Am J Physiol.* 1997 Jan;272(1 Pt 2):R90-4.

58. Martin IH, Costa LE, et al. Reproductive function in female rats submitted to chronic hypobaric hypoxia. *Arch Int Physiol Biochim Biophys.* 1992 Sep-Oct;100(5):327-30.

59. Macome JC, Costa LE, Martin IH, Taquini AC, et al. Steroid biosynthesis by gonads of rats submitted to chronic hypobaric hypoxia. *Acta Physiol Lat Am.* 1977;27(5):249-57.

60. Van Blerkom J. Epigenetic influences on oocyte developmental competence: perifollicular vascularity and intrafollicular oxygen. *J Assist Reprod Genet.* 1998 May;15(5):226-34.

61. Agarwal A, Allamaneni SS, et al. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reprod Biomed Online.* 2004 Sep;9(3):338-47.

62. Agarwal A, Gupta S, Sekhon L, Shah R, et al. Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal.* 2008 Aug;10(8):1375-403.

63. Martín-Romero FJ, Miguel-Lasobras EM, Domínguez-Arroyo JA, González-Carrera E, Alvarez IS, et al. Contribution of culture media to oxidative stress and its effect on human oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2008 Nov;17(5):652-61.

64. Agarwal A, Allamaneni SSR, et al. Oxidants and antioxidants in human fertility. *Middle East Fertility Society Journal* Vol. 9, No. 3, 2004.

- 65.** Matos L, Stevenson D, Gomes F, Silva-Carvalho JL, Almeida H, et al. Superoxide dismutase expression in human cumulus oophorus cells. *Mol Hum Reprod.* 2009 Jul;15(7):411-9.
- 66.** Rao MV, Chawla SL, Sharma SR, et al. Protective role of vitamin E on nickel and/or chromium induced oxidative stress in the mouse ovary. *Food Chem Toxicol.* 2009 Jun;47(6):1368-71.
- 67.** Louajri A, Harraga S, Godot V, Toubin G, Kantelip JP, Magnin P, et al. The effect of ginkgo biloba extract on free radical production in hypoxic rats. *Biol Pharm Bull.* 2001 Jun;24(6):710-2.
- 68.** Jiang X, Nie B, Fu S, Hu J, Yin L, Lin L, Wang X, Lu P, Xu XM, et al. EGb761 protects hydrogen peroxide-induced death of spinal cord neurons through inhibition of intracellular ROS production and modulation of apoptotic regulating genes. *J Mol Neurosci.* 2009 Jun;38(2):103-13.
- 69.** Paulus WE, Zhang M, Strehler E, Reeka N, Sterzik K, et al. Application of ginkgo biloba in assisted reproduction therapy. Volume 78, Supplement 1, Page S124 (September 2002).
- 70.** Ye B, Aponte M, Dai Y, Li L, Ho MC, Vitonis A, Edwards D, Huang TN, Cramer DW, et al. Ginkgo biloba and ovarian cancer prevention: epidemiological and biological evidence. *Cancer Lett.* 2007 Jun 18;251(1):43-52.
- 71.** Koltermann A, Liebl J, Fürst R, Ammer H, Vollmar AM, Zahler S, et al. Ginkgo biloba extract EGb(R)761 exerts anti-angiogenic effects via activation of tyrosine phosphatases. *J Cell Mol Med.* 2008 Oct 23.

- 72.** Basini G, Bianco F, Grasselli F, et al. EGCG, a major component of green tea, inhibits VEGF production by swine granulosa cells. *Biofactors*. 2005;23(1):25-33.
- 73.** Drummond AE. TGFbeta signalling in the development of ovarian function. *Cell Tissue Res*. 2005 Oct;322(1):107-15.
- 74.** Knight PG, Glister C, et al. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* (2006) 132 191-206.
- 75.** Trombly DJ, Woodruff TK, Mayo KE, et al. Roles for Transforming Growth Factor Beta Superfamily Proteins in Early Folliculogenesis. *Seminars In Reproductive Medicine*/Volume 27, Number 1.
- 76.** Pangas SA. Growth Factors in Ovarian Development. *Seminars In Reproductive Medicine*/Volume 25, Number 4.
- 77.** Elvin JA, Yan C, Wang P, Nishimori K, Matzuk MM, et al. Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. *Mol Endocrinol*. 1999 Jun;13(6):1018-34.

10.EKLER

17/12/2007 14:32

9003122213202

GU GEN SEK BURO

PAGE 01/01



T.C.
GAZI ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı

21.12.2006

SAYI : B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/123-18366
KONU:


Sayın
Prof.Dr.Celal ILGAZ
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji
Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

G.Ü.ET-06.085 kod numaralı ve "Gebelikte olayların deneysel hipoksi sonrasında Ginkgo bilobanın postnatal beyin gelişimi üzerine olası etkisi: Western Blotting, elektron mikroskopik ve immunohistokimyasal değerlendirme." başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-06.085 and entitled "The Probable effects of Ginkgo biloba after the experimental hypoxia in pregnancy on postnatal brain development: Western blotting, Electron microscopic and Immunohistochemical evaluation." is in compliance with Gazi University Ethical Council regulations.


With my best regards.


Prof.Dr.Gökhan ALPAŞLAN
Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı
Chairman
Gazi University Experimental Animals Ethical Council

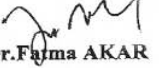

Prof.Dr.Engin ÇALGÜNER


Prof.Dr.Nedret KILIÇ


Prof.Dr.Sevil PEHLİVAN


Prof.Dr.Deniz ERDOĞAN


Prof.Dr.Deniz ERBAŞ


Prof.Dr.Fajma AKAR


Prof.Dr.Altan DOĞAN


Doç.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU


Uz.Vet.Hek.Şeyda DİKER

11. ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Lefkoşa'da doğdum. İlk öğrenimimi İzmir Yunus Emre İlköğretim Okulu'nda, orta öğrenimimi ise Ankara Milli Piyango Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 2002 yılında kazandığım Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden 2007 yılında mezun oldum. Aynı yıl Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım.