



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK
LİSANS
TEZİ

ADOLESAN DIŞI SIÇANLARDA İZOTRETİNOİNİN
OOSİT MATURASYONU ÜZERİNE ETKİSİ

PINAR KAÇAMAK

HİSTOLOJİ - EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEMMUZ 2018



**ADOLESAN DIŞI SIÇANLARDA İZOTRETİNOİNİN OOSİT
MATURASYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

Pınar KAÇAMAK

**YÜKSEK LİSANS
HİSTOLOJİ - EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2018

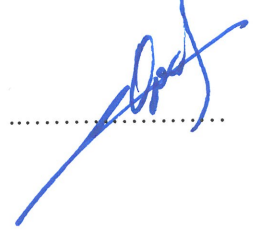
Pınar Kaçamak tarafından hazırlanan “ADOLESAN DİŞİ SIÇANLARDA İZOTRETİNOİNİN OOSİT MATURASYONU ÜZERİNE ETKİSİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Candan Özoğul

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı

Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

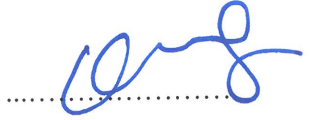


Başkan: Prof. Dr. Engin Çalgüner

Anatomi Anabilim Dalı

Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye: Doç. Dr. Cem Korkmaz

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı

Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Tez Savunma Tarihi: 26/07/2018

Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Pınar KAÇAMAK

26/07/2018

ADOLESAN DIŞI SIÇANLARDA İZOTRETİNOİNİN OOSİT MATURASYONU ÜZERİNE ETKİSİ

(Yüksek Lisans)

Pınar KAÇAMAK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2018

ÖZET

Ergenlik sivilcesi olarak bilinen ve kronik dermatozlardan biri olan Akne Vulgaris, pilosebace ünitenin iltihabi hastalığı olup tüm ırklarda ve iki cinsiyette eşit oranda görülmektedir. A vitamini türevi retinoidlerin sentetik üyelerinden olan izotretinoin, 20 yılı aşkın süredir orta ve şiddetli AV tedavisinde kullanılmaktadır. Literatürde iso'nun birçok yan etkisi olduğu bilinmekle birlikte, infertiliteye neden olduğunu iddia eden az sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak bu çalışmaların incelenen parametreleri klinikte yanıt bekleyen sorulara cevap verebilecek düzeyde değildir. Bu çalışmada iso uygulaması ve oosit maturasyonu arasındaki ilişki ile ilgili az sayıda bulunan literatür verilerine katkı sağlamayı hedefledik ve literatüre uygun olarak planlanan iso uygulamasının diőı sıçan gonadlarındaki oosit maturasyonu üzerine olası toksik etkilerini histokimyasal (periyodik asit-Schiff) ve immünohistokimyasal (GDF-9 ve BMP-15) olarak inceledik. 32 adet adolesan diőı sıçan her birinde 8 denek olacak şekilde 4 gruba ayrıldı: kontrol grubu, susam yağı (çözücü) grubu, düşük doz grubu ve yüksek doz grubu. Çalışmamızın sonunda izotretinoinin düşük doz uygulamasının primordiyal ve primer folliküllerde yer alan kumulus-oosit kompleksinde hasar belirtilerinin ilk sinyallerini oluşturduğu gözlenmiştir. Histolojik ve moleküler sonuçlarla ortaya konan bu bulgu, yüksek doz uygulamasında ise daha ileri olarak sergilenmiştir ve folliküllerin ileri farklanması multilaminar primer follikülde bloke edildiği, kumulus oosit komplekslerinin sekonder follikül aşamasından itibaren atretik follikülden çok dejeneratif bulgular sergilediği belirlenmiştir.

Bilim Kodu : 1033

Anahtar Kelimeler : Akne Vulgaris, İzotretinoin, Oosit maturasyonu, BMP-15, GDF-9

Sayfa Adedi : 125

Danışman : Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL

THE EFFECT OF ISOTRETINOIN ON OOCYTE MATURATION IN ADOLESCENT
FEMALE RATS

(M. Sc. Thesis)

Pınar KAÇAMAK

GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

July 2018

ABSTRACT

Acne Vulgaris, one of the chronic dermatoses known as adolescent acne, is an inflammatory disease of the pilosebaceous unit that is seen equally in all races and genders. Isotretinoin, a synthetic member of vitamin A-derived retinoids, is used in moderate and severe AV treatment for more than 20 years. Although there are many side effects of iso in the literature, there are few studies claiming that iso causes infertility. However, the examined parameters of these studies are not sufficient to respond to clinically relevant questions. In this study, we aimed to contribute to a small number of literature data on the relationship between iso administration and oocyte maturation and investigated the possible toxic effects of iso administration, which planned according to the literature, on oocyte maturation in female rat gonads by histochemical (periodic acid-Schiff) and immunohistochemical (GDF-9 and BMP -15). 32 adolescent female rats were divided into 4 groups as 8 subjects in each group: control group, sesame oil (solvent) group, low dose group and high dose group. At the end of our study, it was observed that low doses of isotretinoin constitute the first signals of damage signs in the cumulus-oocyte complex in primordial and primary follicles. This finding, revealed by histological and molecular results, was further demonstrated in high-dose administration and it has been determined that the advanced differentiation of the follicles is blocked in the multilaminar primer follicle and cumulus-oocyte complexes have been found to be degenerative rather than atretic follicular since the second follicle stage.

Science Code : 1033

Key Words : Acne Vulgaris, Isotretinoin, Oocyte maturation, GDF-9, BMP-15

Page Number : 125

Advisor : Prof. Dr. Candan Özoğul

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi birikimlerini benimle paylaşan; sabrı, hoşgörüsü ve desteği ile her zaman yanımda olan Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız ve saygı değer danışmanım Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL'a,

Anabilim dalımızda görev yapan ve yüksek lisans eğitimim süresince bilgi birikimlerinden faydalandığım saygı değer hocalarım Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU'na, Prof. Dr. Gülnur Take Kaplanoglu'na ve Prof. Dr. Çiğdem Elmas'a,

Bilgi birikimlerini benimle paylaşan ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan Prof. Dr. Hikmet ALTUNAY'a ve Arş. Gör. Dr. Nuh YILDIRIM'a,

Tez çalışmalarımnda yardım ve desteğini benden esirgemeyen başta Arş. Gör. Dr. Gülistan Sanem SARIBAŞ'a, Arş. Gör. Dr. Saadet Özen AKARCA DİZAKAR'a, Arş. Gör. Hüseyin Erdiñ BEŞİKÇİOĞLU'na ve Arş. Gör. Asiye Aslı EMNİYET SERT'e olmak üzere Teknisyen Recep ORHAN 'a, Uzm. Ecz. Zübeyir ELMAZOĞLU'na ve tüm çalışma arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca bana yol gösteren, destek olan ve sevgilerini benden hiçbir zaman esirgemeyen saygı değer annem Naime KAÇAMAK'a, saygı değer babam İsmail KAÇAMAK'a ve sevgili kardeşim Kemal KAÇAMAK'a,

Sonsuz sabrı, hoşgörüsü ve desteği ile daima yanımda olan sevgili Savaş ŞENGÜL'e teşekkür ediyorum.

Hayatım boyunca saygı ve sevgiyle hatırlayacağım, daima yanımda olduklarını hissettiğim anneannem Rabia YAPICIOĞLU'nu ve dedem Halil İbrahim YAPICIOĞLU'nu minnetle anıyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	x
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Ovaryumların Gelişimi	5
2.1.1. Oogenezis	6
2.2. Ovaryumların Anatomisi.....	8
2.2.1. Ovaryumların yapısı.....	9
2.3. Ovaryumların Histolojisi.....	10
2.3.1. Ovaryum medullası	10
2.3.2. Ovaryum korteksi.....	11
2.4. Ovaryumların Fizyolojisi.....	17
2.5. Follikülogenezis ve Oosit Maturasyonunda Etkili Moleküller.....	22
2.5.1. Büyüme farklılaşma faktörü 9 (GDF-9).....	26
2.5.2. Kemik morfogenetik protein 15 (BMP-15).....	27
2.6. Akne Vulgaris (AV).....	28
2.6.1. Tedavi.....	31

	Sayfa
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
3.1. Deney Hayvanları.....	37
3.2. Deneyde Kullanılan Kimyasal.....	37
3.3. Deney Protokolü / Gruplandırma.....	37
3.4. Deneklerde Ötenazi.....	38
3.5. Histokimyasal Takip Yöntemi.....	38
3.6. İmmünohistokimyasal Yöntem.....	40
3.7. İstatistiksel Yöntem.....	41
4. BULGULAR.....	43
4.1. Vücut Ağırlıklarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi.....	43
4.2. Morfometrik Bulgular ve Zona Pellusida Kalınlığının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi.....	46
4.3. GDF-9 Bulgularının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi.....	52
4.4. BMP-15 Bulgularının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi.....	67
5. TARTIŞMA.....	85
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	101
KAYNAKLAR	103
EKLER	121
EK-1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı.....	122
EK-2. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu Katılım Sertifikası	123
ÖZGEÇMİŞ	124

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. Sıçanların Deney Başlangıcı ve Deney Sonu Ağırlıklarının Gruplara Göre Standart Sapma Değerleri.....	43
Çizelge 4.2. Sıçanların Deney Başlangıcı ve Deney Sonu Ağırlıklarının İstatistiksel Farklılıkları	44
Çizelge 4.3. Multilaminar Primer Follikülerdeki Zona Pellusida Kalınlıklarının Gruplara Göre Standart Sapma Değerleri.....	47
Çizelge 4.4. Multilaminar Primer Follikülerdeki Zona Pellusida Kalınlıklarının Gruplar Arası Karşılaştırması.....	47
Çizelge 4.5. Primordiyal, Primer, Sekonder Folliküllerde Bulunan Primer Oositlerdeki GDF-9 Tutulumlarının Gruplara Göre Standart Sapma Değerleri.....	53
Çizelge 4.6. Primordiyal, Primer, Sekonder Folliküllerde Bulunan Primer Oositlerdeki GDF-9 Tutulumlarının Gruplar Arası Karşılaştırması.....	54
Çizelge 4.7. Primordiyal, Primer, Sekonder Folliküllerde Bulunan Primer Oositlerdeki BMP-15 Tutulumlarının Gruplara Göre Standart Sapma Değerleri.....	68
Çizelge 4.8. Primordiyal, Primer, Sekonder Folliküllerde Bulunan Primer Oositlerdeki BMP-15 Tutulumlarının Gruplar Arası Karşılaştırması.....	69

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1. Sıçanların Deney Başlangıcı ve Deney Sonu Ağırlıkları	43
Şekil 4.2. Multilaminar Primer Follikülerdeki Zona Pellusida Kalınlıklarının Gruplar Arası Karşılaştırması.....	46
Şekil 4.3. Primordiyal Follikülerde Bulunan GDF-9 Tutulumlu Primer Oositlerin Gruplar Arası Karşılaştırması.....	52
Şekil 4.4. Primer Follikülerde Bulunan GDF-9 Tutulumlu Primer Oositlerin Gruplar Arası Karşılaştırması.....	52
Şekil 4.5. Sekonder Follikülerde Bulunan GDF-9 Tutulumlu Primer Oositlerin Gruplar Arası Karşılaştırması.....	53
Şekil 4.6. Primordiyal Follikülerde Bulunan BMP-15 Tutulumlu Primer Oositlerin Gruplar Arası Karşılaştırması.....	67
Şekil 4.7. Primer Follikülerde Bulunan BMP-15 Tutulumlu Primer Oositlerin Gruplar Arası Karşılaştırması.....	67
Şekil 4.8. Sekonder Follikülerde Bulunan BMP-15 Tutulumlu Primer Oositlerin Gruplar Arası Karşılaştırması.....	68

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Kontrol Grubunda Multilaminar Primer Follikülde Gelişen Zona Pellusida PAS, X400.....	48
Resim 4.2. Susam Yağı (Çözücü) Grubunda Multilaminar Primer Folliküldeki Zona Pellusida Yapısı PAS, X400.....	49
Resim 4.3. Düşük Doz Grubunda Multilaminar Primer Folliküldeki Zona Pellusida Yapısı PAS, X400.....	50
Resim 4.4. Yüksek Doz Grubunda Multilaminar Primer Folliküldeki Zona Pellusida Yapısı PAS, X400.....	51
Resim 4.5. Kontrol Grubunda GDF-9 Tutulumu Olan Primordiyal ve Multilaminar Primer Folliküllerdeki Primer Oositler X200.....	58
Resim 4.6. Kontrol Grubunda GDF-9 Tutulumu Olan Unilaminar Primer ve Erken Antral Folliküllerdeki Primer Oositler X400, X40	59
Resim 4.7. Susam Yağı (Çözücü) Grubunda GDF-9 Tutulumu Olan Primordiyal, Unilaminar Primer ve Erken Antral Folliküllerdeki Primer Oositler X200	60
Resim 4.8. Susam Yağı (Çözücü) Grubunda GDF-9 Tutulumu Olan Multilaminar Primer ve Antral Folliküllerdeki Primer Oositler X100.....	61
Resim 4.9. Düşük Doz Grubunda GDF-9 Tutulumu Olmayan Primordiyal Folliküldeki Primer Oosit X400.....	62
Resim 4.10. Düşük Doz Grubunda GDF-9 Tutulumu Olmayan Unilaminar ve Multilaminar Primer Folliküllerdeki Primer Oositler X200.....	63
Resim 4.11. Düşük Doz Grubunda GDF-9 Tutulumu Olan Erken Antral Folliküldeki Primer Oosit ve GDF-9 Tutulumu Olmayan Atretik Görünümlü Erken Antral Folliküldeki Primer Oosit X200.....	64
Resim 4.12. Yüksek Doz Grubunda GDF-9 Tutulumu Olmayan Primordiyal ve Unilaminar Primer Folliküllerdeki Primer Oositler X400.....	65

Resim	Sayfa
Resim 4.13. Yüksek Doz Grubunda GDF-9 Tutulumu Olmayan Multilaminar Primer ve Erken Antral Folliküllerdeki Primer Oositler X200, X400.....	66
Resim 4.14. Kontrol Grubunda BMP-15 Tutulumu Olan Primordiyal Folliküldeki Primer Oosit X400.....	73
Resim 4.15. Kontrol Grubunda BMP-15 Tutulumu Olan Unilaminar Primer ve Antral Folliküllerdeki Primer Oositler X400, X40.....	74
Resim 4.16. Susam Yağı (Çözücü) Grubunda BMP-15 Tutulumu Olan Primordiyal Folliküllerdeki Primer Oositler X400.....	75
Resim 4.17. Susam Yağı (Çözücü) Grubunda BMP-15 Tutulumu Olan Unilaminar ve Multilaminar Folliküllerdeki Primer Oositler X200.....	76
Resim 4.18. Susam Yağı (Çözücü) Grubunda BMP-15 Tutulumu Olan Antral Folliküldeki Primer Oosit X400, X40.....	77
Resim 4.19. Düşük Doz Grubunda BMP-15 Tutulumu Olan Primordiyal Folliküldeki Primer Oosit X400.....	78
Resim 4.20. Düşük Doz Grubunda BMP-15 Tutulumu Olmayan Unilaminar Primer Folliküldeki Primer Oosit X400.....	79
Resim 4.21. Düşük Doz Grubunda BMP-15 Tutulumu Olmayan Multilaminar Primer Folliküldeki Primer Oosit X400.....	80
Resim 4.22. Yüksek Doz Grubunda BMP-15 Tutulumu Olmayan Primordiyal Folliküldeki Primer Oosit X400.....	81
Resim 4.23. Yüksek Doz Grubunda BMP-15 Tutulumu Olmayan Primordiyal Folliküldeki Primer Oosit X400.....	82
Resim 4.24. Yüksek Doz Grubunda BMP-15 Tutulumu Olmayan Geç Antral Folliküldeki Primer Oosit X200, X40.....	83

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
----------	-------------

μ	Mikron
μg	Mikrogram
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
im	İntra muskuler
kg	Kilogram
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
ng	Nanogram
sn	Saniye

Kısaltmalar	Açıklamalar
-------------	-------------

AC	Adenilat siklaz
ActR-1	Asit toleransı tepki regülatörü
ALT	Alanin aminotransferaz
AMH	Anti-müllerian hormon
APF	Anafaz uyarıcı faktör
AST	Aspartat aminotransferaz
ATRA	All-trans retinoik asit

Kısaltmalar**Açıklamalar**

AV	Akne vulgaris
bFGF	Bazık fibroblast büyüme faktörü
BMP	Kemik morfogenetik protein
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CASP	Kaspaz
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
c-Kit	Reseptör tirozin kinaz
CSF	Sitostatik faktör
DAB	Diaminobenzedin
EGF	Epitelyal büyüme faktörü
FDA	Food and drug administration
FSH	Folikül uyarıcı hormon
GDF	Büyüme farklılaşma faktörü
GnRH	Gonadotropin serbestleştirici hormon
GJ	Geçit bağlantıları
GV	Germinal vezikül
GVBD	Germinal vezikülün yıkılması
hCG	İnsan koryonik gonadotropin
HSD	3- β hidoksisteroid dehidrojenaz
ICSI	İntra sitoplazmik sperm enjeksiyonu
IGF1R	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü
IL	İnterlökin
IVF	<i>In vitro</i> fertilizasyon
İBH	İnflamatuar bağırsak hastalığı
İEH	İntestinal epitelyal hücre
İso	13-cis-retinoik asit / İzotretinoin
LH	Luteinize edici hormon
LT-B4	Lökotrien-b4
MAPK	Mitojen aktive edici protein kinaz
MPF	Olgunlaşmayı düzenleyici faktör

Kısaltmalar**Açıklamalar**

NAIP	Nöral apoptozis inhibitör protein
NGAL	Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin
OMI	Oosit olgunlaşmasını baskılayan madde
PAI	Plazminojen aktivatör inhibitörü
PAS	Periyodik asit-schiff
PDE	Fosfodiesteraz
PBS	Phosphate buffer saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
RAI-1	Retinoik asit indüklenbilir gen 1
RARα	Retinoik asit reseptör alfa
RT-PCR	Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
SRY	Y kromozomu üzerindeki seks belirleyici bölge
StAR	Steroidojenik akut düzenleyici protein
TBF	Testis belirleyici faktör
TG	Trigliserit
TGF	Transforme edici büyüme faktörü
TNF-α	Tümör nekroz faktör alfa
tPA	Plazminojen aktivatörü
TRAIL	TNF- α ilişkili apoptozis indükleyici ligand
VLDL	Çok düşük yoğunluklu lipoprotein
ZP	Zona Pellusida

1. GİRİŞ

Akne vulgaris (AV), ergenlik sivilcesi olarak bilinmekte olup tüm ırklarda ve iki cinsiyette eşit oranda görülmektedir [1-3]. Genel olarak ergenlik döneminde başlayan AV'in bitiş zamanı değişmektedir ve bazen daha geç yaşlarda da başlayabilmektedir [1-4]. Basit bir hastalık gibi görünen AV, iletişimin büyük önem kazandığı günümüz toplumunda görüntüsüyle dahi çok büyük sorun yaratabilmektedir. Beden algılamasının en üst düzeyde olduğu ve AV'in en sık görüldüğü ergenlik döneminde oluşan lezyonun şiddeti normalden çok daha fazla algılanır ve genç bireylerde depresyon gibi ciddi psikolojik rahatsızlıklara yol açabilir. Bununla birlikte deride kalıcı izlere yol açabilen AV'in tedavi edilmesi gerekmektedir [5]. Günümüzde AV hastalığında birçok topikal ve sistemik ilaçların kullanıldığı tedavi yöntemleri bulunmaktadır [6, 7]. Aknenin orta ve şiddetli formlarında izotretinoin (13-cis retinoik asit / iso), oral antibiyotikler ve hormonal ilaçlar gibi sistemik ajanların kullanımı tercih edilmektedir.

AV genellikle 12-18 yaşları arasındaki gençleri etkilemektedir ve bazıları iso ile tedavi edilmektedir. Bu ilacın birçok yan etkisi olduğu bilinmekle birlikte, özellikle üreme organları üzerindeki etkilerini açıklayan yalnızca birkaç çalışma bulunmaktadır [8-10]. Bununla birlikte; Çınar ve diğerleri (2017), iso ile yapılan sistemik tedavinin kadınlarda fertilite üzerinde uzun vadeli yan etkilerinin olmadığını bildirmişlerdir [11].

Genellikle infertilite (kısırlık), her iki cinsiyette eşit oranda görülmektedir. Kadınlarda; yumurtlama düzensizliği, tuba uterina tüplerinden kaynaklanan problemler, uterusu oluşturan miyom ve polipler, endometriozis ve yaşın ilerlemesi fertilite sorunlarına yol açabilmektedir. Erkeklerde; sperm sayısının ve sperm hareketinin azalması, sperm ve testis kaynaklı yapısal bozukluklar infertiliteye neden olabilmektedir. Bununla birlikte tiroid kaynaklı bozukluklar, diyabet ve epilepsi gibi hastalıklar, bazı ilaç ve kanser tedavileri, obezite, aşırı alkol ve sigara tüketimi gibi faktörler fertiliteyi olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Fertilite bazen birden fazla parametreye bağlı olarak azalırken bazen de infertilite nedeni bulunamamaktadır [12, 13]. Bunların araştırılması hala infertilite çalışmalarının çözüm arayan öncelikli konularındandır. Literatürde iso'nun infertiliteye neden olduğunu iddia eden az sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak bu çalışmaların incelenen parametreleri klinikte yanıt bekleyen sorulara cevap verebilecek düzeyde değildir.

Yapılan bir araştırmada, 6 ay boyunca toplam 120 mg/kg iso oral olarak alan akneli erkek hastalarda fertilitenin etkilenmediği rapor edilmiştir [14]. Şu anda, erkek fertilesinde izotretinoinin yan etkilerinin olmadığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, iso ile ilgili yapılan hayvan çalışmaları, bozulmuş spermatogenezis bulgularını göstermektedir [15]. Erkek sıçanlarda 21 gün boyunca 2 mg/ml/gün izotretinoin uygulamasının siklin D1 ve E₂F-pozitif hücrelerin sayısını azalttığı bildirilmiştir [8].

Son zamanlarda, iso'nun yumurtalık dokusu üzerindeki zararlı etkileri deneysel ve klinik çalışmalarda araştırılmıştır. Abali ve diğerleri (2013), 7,5 ve 15 mg/kg/gün iso uygulanan sıçan modelinde serum anti-Müllerian hormon (AMH) konsantrasyonlarında azalma ve ovaryen apoptotik etkinliklerde artma meydana geldiğini bildirmişlerdir [16]. Yapılan farklı bir çalışmada, iso'nun yumurtalıklar üzerindeki geri dönüşümlü etkisi incelenmiş ve uygulama grubunda serum AMH seviyelerinin azaldığı, uygulama ortadan kalktıktan sonra serum AMH değerlerinin az da olsa geri dönüşümlü olarak arttığı bildirilmiştir [17].

Retinoidler, hücresel büyüme, farklılaşma, hücre yüzeyi değişimi ve bağışıklık modülasyonunu modifiye ederek keratinositleri etkiler. Retinoidlerle ilişkili başlıca yan etkiler keilitis, cilt ve mukozanın kuruluğu, cildin kırılganlığının artması, hiperlipidemi, transaminazların yükselmesi, miyalji, artralji ve hiperostozdur [8]. A vitamini türevi retinoidlerin sentetik üyelerinden olan iso, 20 yılı aşkın süredir orta ve şiddetli AV tedavisinde kullanılmaktadır. İso akne vulgarisin tamamen ortadan kaldırılması için potansiyel olan tek ilaç gibi görülmektedir [18, 19] ve iso'nun nükleer reseptörlerin veya nükleer olmayan hedeflerin transaktivasyon aktivitesi yoluyla, sebo-baskılayıcı, komedolitik, anti-inflamatuvar ve muhtemelen immünolojik etkilere sahip olduğu belirtilmektedir [20, 21]. Ancak bu etkilerini hangi mekanizma ya da mekanizmalar üzerinden meydana getirdiği tam olarak bilinmemektedir [22-24]. Bununla birlikte iso gebelikte teratojenik etkiye sahiptir. Yüksek karaciğer enzimleri ve serum lipidleri ile eş zamanlı olarak oküler, gastrointestinal ve olası psikolojik yan etkilerin görülebileceği bildirilmiştir [25, 26].

İso, akne tedavisi için yaklaşık olarak 0,5-1 mg/kg/gün dozunda, 6 ay boyunca kullanılmaktadır. Kullanılan bu doz oranı kümülatif doz olarak 120-150 mg/kg'a tekabül

etmektedir. Bununla birlikte, çok daha düşük dozların (5 mg/gün gibi düşük) hemen hemen aynı tedavi etkisine sahip olduğu fakat önemli ölçüde daha az yan etkisinin olduğu rapor edilmiştir [27]. İso sadece şiddetli akne vulgaris için değil, aynı zamanda rosacea, follikülit, sarkoidoz, granüloma annulare, seboreik dermatit, miyelodisplastik sendromlar, cilt neoplazmalarının kemoprevizi, perioriferatif dermatit ve çeşitli keratinizasyon bozuklukları gibi diğer dermatolojik durumların tedavisinde de kullanılmaktadır [28, 29].

Follikül gelişiminde önemli roller üstlenen büyüme faktörlerinin bir grubunu oluşturan Transforme edici büyüme faktörü b (transforming growth factor b (TGFb)) ailesi; TGFb, inhibin, aktivin, büyüme ve gelişme faktörü 9, anti-Müllerian hormon (AMH) ve kemik morfogenetik proteinlerinden oluşur. Bunlar hücre büyümesi ve farklılaşması, apoptozis ve morfogenezis gibi biyolojik olayların gerçekleşebilmesi için gereklidirler. Büyüme farklılaşma faktörü 9 (differentiation factor 9 (GDF-9)) yokluğunda ovaryum follikülü primer fazına geçemez. GDF-9 uygulanan immatür ratlardaki primer ve küçük preantral folliküllerin, primordiyal folliküllere oranla daha fazla olduğu bildirilmiş olup GDF-9 tarafından uyarılan primordiyal folliküller matürasyon için aktifleşerek geliştikleri için sayılarının azalmış olabileceği düşünülmüştür. GDF-9 follikül gelişiminin diğer aşamalarını etkilemezken; FSH, preantral follikül sayılarını arttırdığı halde, primer ve primordiyal folliküllerin sayısını etkilemez. Bu durum FSH'ın özellikle daha olgun follikülleri etkilediğini düşündürür ve sonuç olarak follikül gelişiminde erken evrede oosit kökenli uyarıların, sonraki evrelerde ise FSH ve LH'nin baskın olduğu iki farklı aşamanın meydana geldiği düşünülür [30, 31].

Oosit tarafından üretilen parakrin faktörler, ovaryum follikülünün erken gelişim evresinde ve antral follikülün morfojenik gelişiminin tayin edilmesinde gereklidirler. GDF-9b olarak da bilinen BMP-15 (Kemik morfogenetik protein 15 / Bone morphogenetic protein 15) oositlerde bulunan X'e bağlı gen tarafından ifade edilirler ve sentezlenen protein GDF-9 ile yaklaşık olarak %52 oranında benzerlik gösterir. İlk kez primer follikülde bulunan primer oosit tarafından sentezlenen BMP-15 granüloza hücrelerinin çoğalmasını indükler ve selektif olarak FSH'nin etkisiyle uyarılmış olan progesteron sentezini engeller. BMP-15 yokluğu olan dişi farelerde ovulatuvar defektler sonucu azalmış fetus boyutları ve doğurganlık görülmektedir. BMP-15^{-/-}, GDF-9^{+/-} veya BMP-15^{-/-}, GDF-9^{-/-} çift mutasyon taşıyan farelerde BMP-15 ve GDF-9 proteinleri ovaryum fonksiyonlarında sinerjik etki

göstermektedirler. BMP-15 eksikliği olan fareler, follikülogenezis ve ovulasyonun geç evrelerinde açık defektler eşliğinde subfertilidir [32, 33].

Çalışmamızda literatüre uygun olarak planlanan iso uygulamasının dişi sıçan gonadlarındaki oosit maturasyonu üzerine olası toksik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda tüm çalışma gruplarındaki ovaryum dokularında, iso uygulamasının oosit maturasyonu üzerine olası toksik etkilerini histokimyasal olarak ortaya koymak için periyodik-asit-Schiff reaksiyonu gerçekleştirilirken immünohistokimyasal olarak ortaya koymak için BMP-15 ve GDF-9 işaretlemeleri yapılmıştır. Bu amaçla dokular alıılmış ışık mikroskopik takip yöntemlerine tabi tutulmuştur.

Yapılan bu çalışma ile iso uygulaması ve oosit maturasyonu arasındaki ilişki ile ilgili az sayıda bulunan literatür verilerine katkı sağlamak hedeflenmiştir. Ayrıca bu çalışma ile elde edilen sonuçların iso tedavisinin yan etkilerinin açıklanmasında ve bu konuyla ilgili çalışmaların yapılmasında ışık tutacağı düşünülmüştür. Bunlar dışında iso tedavisinin yan etkileri sonucunda ek tedavi nedenlerinin ortaya çıkabileceği göz önüne alınarak hem hasta sağlığı açısından hem de ekonomik açıdan iso tedavisinin yeniden değerlendirilmesine katkıda bulunulacağı amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Ovaryumların Gelişimi

Cinsiyet farklanması, çok sayıda genin rol aldığı kompleks bir süreçtir. Döllenme sırasında cinsiyet kromozomal açıdan belirlenmiş olsa da gelişimin 7. haftasına değin gonadlar dişiye ya da erkeğe ait morfolojik özellikler taşımamaktadırlar. Y kromozomunun kısa kolunda (Yp11) bulunan SRY geni (Y kromozomu üzerindeki seks belirleyici bölge) cinsiyetin belirleyicisidir. SRY geninin protein ürünü olan TBF (Testis Belirleyici Faktör), gelişmemiş durumdaki üreme organlarının cinsiyetini belirleyen genleri aktive eder. Bu faktörün varlığında fetusun cinsiyeti erkek, yokluğunda ise dişidir [34].

Gelişimin 5. haftası sırasında gonadlar kölomik epitelin proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla meydana gelmiş, bir çift uzunlamasına genital ya da gonadal kabartılar halinde oluşurlar. Gelişimin 6. haftasına kadar bu kabartılar içinde üreme hücreleri (germ hücreleri) yoktur [34, 35].

İnsan embriyosunda primordiyal germ hücreleri gelişimin 2. haftasında epiblasttan köken alırlar. Gelişimin 3. haftasında primordiyal germ hücreleri epiblasttan ayrılarak ameboid hareketlerle vitellus kesesinin ekstraembriyonik yapılarına göç ederler ve vitellus kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm hücrelerinin arasında belirirler. 4. haftada son bağırsak mezenterinin dorsali boyunca ilerlerler ve 5. hafta başında primitif gonadlara ulaşarak 6. haftada gonadal kabartıları işgal ederler. Primordiyal germ hücrelerinin izlediği bu yola **primitif germ çizgisi** adı verilir. Primordiyal germ hücreleri oval şekilli, açık renk sitoplazmaya sahip hücrelerdir ve alkalen fosfataz enzim işaretlemeyle belirlenebilirler. Primordiyal germ hücreleri gonadal kabartılara ulaşamazlarsa gonadlar gelişmez. Bu nedenle primordiyal germ hücrelerinin, gonadların testis veya ovaryuma farklılaşmalarında indükleyici etkileri bulunmaktadır [34, 35].

Primordiyal germ hücrelerinin primitif gonadlara ulaşmasından hemen önce ve ulaşması sırasında, gonadal kabarıklığın kölomik epiteli çoğalır ve epitel hücrelerinin altındaki mezenşimin içine gömülerek düzensiz şekilli olan primitif cinsiyet kordonları oluştururlar. Dişi ve erkek embriyolarda bu kordonlar yüzey epiteline bağlıdır. Bu yüzden bu evrede

dişi ya da erkek gonadların ayırt edilebilmesi olanaksızdır [34]. XX kromozomlara sahip dişi embriyolarda, primitif cinsiyet kordonları primordiyal germ hücresi grupları içeren düzensiz hücre kümelerine ayrılıp genellikle ovaryumun medullar bölgesinde yerleşmişlerdir. Daha sonra bu hücre kümeleri kaybolur ve yerlerini vasküler stromaya (ovarian medulla) bırakırlar [34, 35].

Erkeğinkinden farklı olarak dişi gonadının yüzey epiteli çoğalmaya devam eder. Gelişimin 7. haftasında ise yüzey epitelinden köken alan hücre kordonları, alttaki mezenşim içine gömülerek yüzeye yakın yerleşirler ve kortikal kordonlar adı verilen ikincil kordonlar meydana gelir. Gelişimin 4. ayında, bu kordonlar bir veya daha çok sayıda primordiyal germ hücresini çevreleyerek izole hücre toplulukları şeklinde ayrılırlar. Bu üreme hücreleri zamanla oogonyuma dönüşür. Yüzey epitelinden göç ederek üreme hücrelerini çevreleyen epitel hücrelerinden ise folliküler hücreler meydana gelir [34, 35].

2.1.1 Oogenezis

Primordiyal germ hücreleri, dişi gonada ulaştığında genetik olarak oogonyumlara farklılıklar ve oogonyumlar art arda mitoz bölünmeler geçirerek çoğalırlar. Gelişimin 3. ayının sonunda oogonyumlar kümeler halinde dizilerek yassı epitel hücreleriyle çevrenirler. Bir küme içinde bulunan oogonyumların tümünün tek bir primordiyal germ hücresinden geliştiği düşünülmektedir. Oogonyumların etrafında bulunan yassı epitel hücreleri, yüzey epitelinden köken alır. Bu hücreler follikül hücreleri olarak adlandırılırlar [34-36]. Oogonyumların büyük bir kısmı mitozla bölünmeye devam ederken, geri kalan kısmı bölünmesini I. mayoz bölünmenin profazında durdurur ve primer oositlere farklılıklar. Oogonyumların sayısı gelişimin 3. ayından başlayarak hızla artar ve 5. ayında ovaryumdaki üreme hücrelerinin sayısı ortalama olarak 7 milyona ulaşır. Bundan sonra hücre ölümü başlar, çok sayıda primer oosit ve oogonyum atretik hale gelir. Gelişimin 7. ayında çoğu oogonyum dejenerer olur, sadece yüzeye yakın yerleşmiş birkaç oogonyum hayatta kalır. Hayatta kalan primer oositlerin tümü, I. mayoz bölünmenin profaz evresine girmiştir. Her bir primer oositin etrafı tek sıra halinde yassı follikül hücreleriyle çevrenmiştir. Etrafında birbirine desmozomlarla tutunmuş tek sıra yassı epitel hücreleriyle sarılı primer oosite primordiyal follikül denir ve bu follikül çevre dokudan bazal laminayla ayrılmıştır [34-37].

Doğum sırasında bütün primer oositler I. mayoz bölünmenin profazının diploten evresindedir. Bu evrede primer oositin çekirdek kromatini seyrek ve düzensiz bir yapılanma gösterir. Puberteye kadar primer oositler profaz safhasında kalırlar ve bu süre boyunca, oosit olgunlaşması follikül hücreleri tarafından salgılanan oosit olgunlaşmasını baskılayan madde (OMI, oocyte maturation inhibitor) aracılığıyla baskılanır. Doğumda ovaryumlardaki primer oosit sayısı 700 bin ile 2 milyon arasında değişirken puberteye kadar bunların büyük bir kısmı atretik hale gelir ve puberte başlangıcında bu sayı 400,000'e düşer ancak 500'den daha azı bir kadının üreme döngüsü içinde ovulasyonla gonad dışına atılır. Diğerleri ise çeşitli gelişim evrelerinde dejenere olur. Geç olgunlaşan oositlerin bazıları 40 yıl boyunca I. mayozun profazında bekler [34-37].

Puberteyle birlikte her ovaryan döngüde 5 ile 15 arasında değişen sayıda primordiyal follikül, primer (preantral), sekonder (antral) ve Graaf (tersiyer, preovulatuvar) olarak adlandırılan 3 aşamadan geçerek olgunlaşmaya başlar. En uzun olan evre antral follikül evresidir. Preovulatuvar evre yaklaşık olarak 37 saat devam eder. I. mayozun profaz safhasında dinlenme aşamasında olan primer oosit büyümeye başlar ve oositin çevresindeki yassı epitel hücreleri kübikleşir. Bu follikül unilaminar primer follikül olarak adlandırılır. Kübik şekilli follikül hücreleri çoğalıp çok sıralı epitel katmanı olan granüloza katmanını (stratum granulosum) meydana getirirler. Bu follikül multilaminar primer follikül (preantral) olarak adlandırılır. Granüloza hücrelerinin çoğalmasını sağlayan ve primer oositler tarafından salgılanan sinyal molekülü aktivindir. Primer follikülün etrafında, stromal hücreler bazal laminanın hemen dışında teka follikülü denilen bir bağ dokusu kılıfı oluştururlar. Bu arada oosit büyüdükçe, granüloza hücreleri ve oosit tarafından glikoprotein yapıda bir madde salgılanarak oositin etrafında **zona pellusida** adı verilen bir katman oluşturulur. Follikül büyürken teka follikül hücreleri, içte teka interna ve dışta teka eksterna adı verilen iki belirgin katman şeklinde farklanır. Teka interna hücreleri vaskülarizedir ve kübik salgı hücrelerinden oluşur. Fibröz bir kapsül olan teka eksterna ise fibroblast benzeri hücrelerden oluşur. Oositin etrafında bulunan follikül hücrelerinin ufak sitoplazmik uzantıları oosit zarının mikrovilluslarıyla birleşmek için zona pellusidayı geçerler [34-37]. Gelişmenin ilerlemesiyle birlikte granüloza hücreleri arasında içi sıvı dolu boşluklar oluşur ve bu boşlukların birleşmesiyle antrum meydana gelir. Bu follikül sekonder (veziküler) follikül olarak adlandırılır. Oositi saran granüloza hücreleri bozulmadan kalır ve kümülüs ooforusu oluştururlar. Olgun bir sekonder follikül yaklaşık olarak 10 mm çapındadır. İçte steroid salgı yapan hücrelerden oluşan teka interna ve dışta

teka eksterna ile sarılıdır. Teka eksterna zamanla ovaryum stromasına karışır. Ovulasyon yaklaştıkça follikül daha fazla büyür ve Graaf (tersiyer, preovulatuvar) follikül olarak adlandırılır [34-37].

Her ovaryan döngüde bir grup follikül gelişir ancak bunlardan sadece biri tam olarak olgunlaşır. Diğer folliküller çeşitli gelişim aşamalarında atretik hale gelirler. Olgunlaşan sekonder follikül lüteinizan hormonun (LH) etkisiyle preovulatuvar evreye girer. Primer oosit I. mayoz bölünmeyi tamamlayıp her biri 23 çift kromozom içeren iki yavru hücre oluşturur. Oluşan bu hücrelerin büyüklükleri farklıdır çünkü bunlardan biri sitoplazmanın büyük bölümünü alan sekonder oosit, diğeri ise çok az sitoplazmaya sahip olan 1. polar cisimdir. Polar cisim, oositin hücre zarıyla zona pellusida arasındaki perivitellin aralıkta bulunur. Ovulasyondan hemen önce I. mayoz bölünme tamamlanır. Bundan hemen sonra ve sekonder oosit dinlenme evresine girmeden önce hücre II. mayoz bölünmeye geçer. Ovulasyondan yaklaşık 3 saat önce kromozomlar metafaz plağında dizilirler ve ovulasyon gerçekleşir. Daha sonra sekonder oosit dışarıya atılır. II. mayoz bölünme sekonder oosit bir spermiyumla döllenirse tamamlanır ancak döllenme olmazsa ovulasyondan 24 saat sonra sekonder oosit dejenere olur. Bu sırada 1. polar cisim de ikinci kez bölünebilir. Ovaryumlarda oögonyumlardan sekonder oosit oluşuncaya kadar meydana gelen olaylara oögenesis denir [34-37].

2.2 Ovaryumların Anatomisi

Küçük pelvisin yan duvarında fossa ovaricaya yerleşmiş bir çift organ olan ovaryum fossa ovarica, a. iliaca externa ile a. iliaca interna arasında yer alır. Ovaryum proksimalde a. iliaca externa, ventro-distal taraftan lig. latum uterinin tabanı ve dorsalde üreter ile sarılmıştır. A. ve v. obturatoria ile n. obturatorius peritoneumun altından geçer. Hamilelik sırasında ovariumlar uterusla birlikte karın boşluğuna çekilir ve tekrar aynı yerine dönmezler. Genellikle doğum yapan kadınlarda ovariumlar biraz daha aşağıda yer alır [38]. Ovaryumlar tuba uterinaların arka ve aşağı kısmında yerleşmiş olup lig. latum uteri içinde bulunurlar ve uzun eksenleri vertikal yönde seyretmektedir. Ovaryumların yüzü puberteye kadar pembemsi-gri renkli, düz ve parlak olup peritoneumla örtülüdür. Puberteden sonra ovariumlar matlaşır. Ovulasyon ve doğuma bağlı olarak da ovariumların üzeri pürüzlü hale gelir [38].

Her bir ovaryum yaklaşık olarak 4 cm uzunluğunda, 2 cm eninde, 0,8 cm kalınlığında olup her birinin ağırlığı 3-5 gramdır. Her bir ovaryum facies lateralis ve facies medialis olmak üzere iki yüze, extremitas tubaria ve extremitas uterina olmak üzere iki uca, margo liber ve margo mesovaricus olmak üzere iki kenara sahiptir. Fimbria ovarica ile lig. ovarii suspensorium, extremitas tubaria komşuluğunda birbirlerine tutunur. Lig. suspensorium ovarii, iliac damarların ön tarafında yukarı doğru uzanan bir periton plikasıdır. Bu yapının içinde a. ve v. ovarica yer alır. Extremitas uterina, lig. ovarii proprium ile uterusun cornu uterisine tutunur. Az miktarda düz kas lifleri içeren bu bağ gubernaculum artığının bir bölümüdür ve lig. latum uteri içinde bulunur [38]. Fossa ovaricayı pariyetal periton örter ve facies lateralis pariyetal peritona oturur. Dış yüze göre daha konveks olan facies medialis infundibulum tubae uterinae örter. Serbest olduğu için arka kenarı margo liber olarak adlandırılmaktadır. Ön kenara göre daha konveks olan bu kenar, üreterle komşuluk yapmaktadır. Mesovarium tutunduğu için ön kenarı margo mesovaricus olarak adlandırılmaktadır. Arka kenara göre daha ince olan ön kenarda, hilum ovarii bulunmaktadır ve bu kenara, lig. latum uterinin bir bölümü olan mesovarium tutunur. Hilum ovariiiden ovariuma giren ve çıkan damar ve sinirler, mesovariumun iki yaprağı arasında bulunur. Tuba uterina, margo mesovaricus üzerinden geçerek extremitas tubarianın üzerinde kıvrılıp önce margo liber'e daha sonra buradan da facies medialis gelir [38].

2.2.1 Ovaryumların yapısı

Ovaryumları en dıştan örten periton da diğer organları örten peritonlar gibi düz ve parlak olup yassı epitel ile döşeli zar yapısındadır ancak puberteden sonra yapısı değişerek germinal epitelyum (Waldayer katmanı) adı verilen yalnızca tek katlı kübik hücre katına dönüşür. Böylece rengi matlaşır. Puberteden sonra normal periton yapısı korunsaydı ovulasyon sırasında oosit peritonu delip dışarı atılamazdı. Epitelin altında, tunica albuginea adı verilen bir katman yer alır ve bu katman, yaşla birlikte kalınlaşır. Tunica albugineanın içinde ovaryumların esas yapısını oluşturan ayrıca cortex ovarii ve medulla ovarii denilen iki farklı bölümden meydana gelen stroma ovarii bulunur. Dış tarafta yer alan cortex ovarii ovaryumun her tarafını kabuk şeklinde sarar ve bu bölüm içindeki bağ dokuları arasında, çeşitli gelişim evrelerinde olan folliküller bulunmaktadır. İç tarafta yer alan medulla ovarii, cortex ovariiye göre daha gevşek bir yapıdadır. Medulla ovariiiden çıkan bağ dokusu uzantıları, hilum ovariiide damarların çevresinde bulunan bağ dokusu ile devam eder ve

hilum ovariden içeri giren damarların büyük bir kısmı cortex ovaride dağılmaktadır. Cortex ovaride gelişen folliküller çevrelerinde kapiller ağlar meydana getirirler [38, 39]. Abdominal aortadan çıkan a. ovaricalar ovariumun arterleridir. A. ovarica, lig. suspensorium ovarii içinde pelvise inerek hilum ovariden ovariuma girip folliküller etrafında kılcal ağlar meydana getirir [38, 39]. Plexus pampiniformis adı verilen venöz ağı oluşturan ovaryumun venleri, arterleri izleyerek hilum ovariden çıkar. Plexus pampiniformis denilen venöz ağı meydana getiren venler, yukarı doğru çıktıkça birbirleriyle birleşirler ve sonunda a. ovarica ile birlikte seyreden v. ovaricayı oluştururlar. Bunlar sağ tarafta v. cava inferiora, sol tarafta ise v. renalis'e açılır [38, 39]. Ovaryumların lenf damarları, nodi lymphatici preaortici ve nodi lymphatici aortici lateralislere açılırlar ve kan damarlarıyla birlikte uzanırlar [38, 39]. Plexus ovaricus, plexus hypogastricus inferior ve a. ovaricanın çevresinde yer alır ve ovaryumların sinirleri plexus ovaricusdan gelir. Ovaryumların parasempatik sinirleri n. vagustan gelirken sempatiklerinin bir kısmı n. splanchnicus minör, bir kısmı ise torakal medulla spinalis segmentlerinden gelirler [38, 39].

2.3 Ovaryumların Histolojisi

Ovaryumları en dıştan saran ve tek sıralı yassıdan kübiğe doğru değişen epitel (epithelium superficiale-germinativum), embriyoda primer ve sekonder cinsiyet kordonlarını yapan peritoneal mezotelyumdan geliştiği için germinal epitel (epitelyum germinale) olarak isimlendirilir. Peritona bakan epitel yüzünde mikrovilluslar ve az miktarda kinosilyalar bulunurken epitel hücrelerinin sitoplazmaları mitokondriyon ve pinositoz veziküllerinden zengindir. Tunika albuginea germinal epitelin altında yer alır ve damar bakımından fakir, sıkı kollajenöz bağ dokusu yapısındadır. Tunika albugineadaki kollajen lifler ovaryum yüzeyine paralel yerleşmişlerdir ve ovaryumun her bir kesitinde içte medulla dışta korteks olarak iki bölüm görülür. Medulla ve korteks arasında kesin bir sınır bulunmamaktadır [36, 37, 40-42].

2.3.1 Ovaryum medullası

Kollajen ve elastik lifler, fibroblastlar, sinir lifleri, büyük kan ve lenf damarları içeren bağ dokusundan meydana gelen medulla ovaryumların merkezinde bulunur. Granüloza hücreleri ile oositler folliküler atrezi sırasında dejenere olurken teka interna hücreleri

steroid salgı yapmaya devam ederler. Bu hücelere epiteloid hücreler veya interstisyel hücreler denir ve bunlar medullada yerleşik halde bulunurlar. Kümeler oluşturmak için bir araya gelen interstisyel hücreler, interstisyel bezleri meydana getirirler. İnterstisyel bezler işlevlerini puberteden itibaren menopoza kadar sürdürürler. Bu bezler östrojen salgırlarlar [36, 37]. Ovaryum medullasında bulunan diğler epiteloid hücreler hilus hücreleridir. Gebelik esnasında ve menopoz döneminde androjenleri salgıladığı düşünölen hilus hücreleri; testislerde bulunan, yapısal olarak Reinke kristaloidi içeren Leydig hücreleriyle eşdeğerdur ve benzer organel içeriğı ile sitoplazmik özelliğle sahiptirler [36, 37].

2.3.2 Ovaryum korteksi

Farklı gelişim evrelerindeki ovaryum folliköllerinin bulunduğı korteks; stroma, kollajen lifler, elastik lifler, retiköler lifler ve fibroblastlardan meydana gelmiştir. Tunika albuginea, korteksin interstisyel bağ dokusunun germinal epitel altında sıkılaşmasıyla oluşur [36, 37, 40-42]. Korteksin stroması içine yerleşmiş olan farklı gelişim evrelerindeki ovaryum folliköllerini, ortada büyük bir oosit (germ hücresi/üreme hücresi) ile oositi saran folliköl epitelinden meydana gelmişlerdir [36, 37, 40-42].

Ovaryum folliköllerini

Her bir ovaryum follikölü, merkezde bir oosit ve oositi saran bir ya da daha fazla folliköl veya granöloza hücre katmanıyla çevrilmiştir. Folliköllerin sayısı menopozdan sonra oldukça azalır. Aşağı yukarı ovaryumlardan her 28 günde, bir oosit atılır ve her bir kadın 30-40 yıl kadar üremeye devam eder. Bu zaman zarfında yaklaşık olarak 450 oosit atılır [36, 37, 40-42].

Histolojik olarak gelişim evresine göre 4 tip ovaryum follikölü tanımlanır:

Primordiyal folliköl

İlk kez fetal yaşamın 3. ayında ortaya çıkan primordiyal folliköller, etrafında tek sıra halinde yassı folliköl hücreleri bulunan primer oositlerden oluşurlar. Ovaryumların periferinde, kortekste bulunurlar ve sayıları artmaz, bireyin üreme yaşı süresince büyüyüp gelişirler ancak çoğı dejenerasyona uğrar [36, 37]. Primordial folliköllerde yer alan primer

oositler 25-30 µm çapında yuvarlak biçimli hücrelerdir ve geniş, periferik yerleşimli, bir adet çekirdekçiğe sahip çekirdekleri vardır. Primer oositler organel bakımından zengindirler ve çok sayıda mitokondriyon, gelişmiş Golgi kompleksi, granüllü endoplazmik retikulum ve birkaç tane ribozom içerirler.

Primer follikül

5-15 arası primordiyal follikül, puberteyle birlikte FSH etkisiyle her menstrüel döngüde olgunlaşmaya başlar. İlk olarak I. mayozun profaz evresinde olan primer oositler büyür ve oositleri çevreleyen yassı follikül hücreleri kübikleşir. Bu evrede folliküle, **tek katmanlı (unilaminar) primer follikül** denir. Primer oosit genişlemiş bir çekirdek, çok sayıda Golgi kompleksi, mitokondriyon, gelişmiş granüllü endoplazmik retikulum ve serbest ribozomlar içerir [36, 37]. Oolemma adı verilen oosit membranı altında **kortikal granülleri** denilen salgı vezikülleri bulunur ve bu granüllerde proteaz bulunur. Salgı vezikülleri, ovum spermle aktive edildiğinde içeriğini ekzositozla boşaltır. Bunlar periyodik asit-Schiff reaksiyonu ile boyanırlar ve elektron mikroskopta tanınmaları kolaydır. Follikül hücreleri ve primer oosit glikoprotein yapısında bir madde salgılar ve bu madde oositin çevresinde zona pellusida olarak adlandırılan bir katman oluşturur. Bu katman ilk kez unilaminar primer follikül evresinde görülür ve ZP1, ZP2 ve ZP3 olmak üzere 3 farklı glikoproteinden oluşur. Follikül hücrelerinin hücre zarları parmak biçiminde küçük sitoplazmik uzantılar içerir ve bu uzantılar zona pellusidayı geçerek, oosit yüzeyindeki mikrovilluslarla aralıklı bağlantılar (gap junction) aracılığıyla bağlanırlar. Böylece folliküler gelişim boyunca iletişim kurularak besin maddelerinin follikül hücrelerinden geçişi kolaylaştırılır. Etrafındaki stromal hücrelerden bir bazal membranla ayrılmış olan follikül hücreler çoğalarak çok sıralı hale gelirler ve **granüloza hücreleri** olarak isimlendirilirler. Bu evrede folliküle, **çok katmanlı (preantral, multilaminar) primer follikül** denir [36, 37]. Primer oosit tarafından üretilen aktivin granüloza hücrelerinin çoğalmasını sağlar. Aynı zamanda follikülün dış tarafında bulunan ve stromal hücrelerden oluşan teka follikülü de iki katmana ayrılır. Folliküle yakın olan iç tarafta salgı yapan hücrelerden meydana gelen ve kan damarları bakımından zengin **teka interna**, dış tarafta ise fibroblast benzeri hücrelerin bulunduğu bağ dokusu yapıları **teka eksterna** yer almaktadır. Teka internada bulunan hücrelerin, hücre zarları LH reseptörleri bakımından pozitif ve sitoplazmalarında çok sayıda yağ damlaları, granülsüz endoplazmik retikulumlar ve tubuler kristal mitokondriyonlar bulunur. Teka interna hücreleri tarafından salgılanan

androstenedion granüloza hücrelerine girerek aromataz enzimi aracılığıyla östradiole dönüşür. Teka interna tabakası ile granüloza hücreleri arasında kalın bir bazal lamina bulunmaktadır [36, 37].

Sekonder follikül

Folliküler gelişme ilerledikçe multilaminar primer follikülün çapı oldukça büyür ve granüloza hücrelerinin arasında içi sıvı dolu boşluklar meydana gelir. Daha sonra boşluklar birbirleriyle birleşerek antrumu oluştururlar. Antrum yarım ay şeklini alır. Bu evredeki folliküle, sekonder follikül denir. Hipofizin ön lobunda bulunan bazofil hücreleri tarafından üretilen FSH, sekonder follikülün granüloza hücrelerinin çoğalmasını ve hücrelerarası boşluğa follikül sıvısı birikmesini sağlar. Follikül sıvısı; glikozaminoglikan, proteoglikan, hormon bağlayıcı proteinler gibi yapıları, progesteron, inhibin, östradiol, folliostatin gibi hormonları ve FSH ile LH'nin salınmasını düzenleyen aktivini içerir. Daha sonra bir miktar granüloza hücresiyle birlikte primer oosit, antrum boşluğu içinde bir kenara toplanarak kumulus ooforus olarak adlandırılan yapıyı meydana getirirler. Zona pellusidanın etrafında gevşek bir şekilde yerleşmiş olan kübik veya alçak boylu prizmatik granüloza hücrelerinin sitoplazmik uzantıları hala oosit ile bağlantılarını devam ettirmektedir. Primer oositi saran bu tek katlı granüloza hücre katmanı **korona radiata** olarak isimlendirilir. Mitokondriyonlar, oosit sitoplazmasında çekirdek yakınında birikirler ayrıca sitoplazmada protein-lipit yapısında vitellus oluşur [36, 37]. Daha sonra stromal hücreler genişlemeye başlar ve teka internadaki zengin kapiller ağıyla beslenirler. Sekonder follikül evresindeki birçok follikül atreziye uğrar ancak atreziye uğramış olan follikülerin bazı granüloza hücreleri dejenere olmaz. Bunlar menopoza kadar düşük seviyelerde androjen salgılayan interstisyel bezlere dönüşürler [36, 37].

Graaf follikülü

Sekonder folliküllerden sadece birkaçı olgun follikül oluşturmak üzere gelişmeye devam eder ve Graaf (tersiyer, preovulatar) follikülü evresine geçer. Bu evrede granüloza hücreleri çoğalır, antrum genişleyerek follikül sıvısıyla dolmaya devam eder ve ovulasyondan hemen önce follikül çapı yaklaşık olarak 25 mm'dir. Membrana granüloza, follikül duvarında bulunan folliküler hücreler tarafından meydana getirilir. Graaf follikülünde primer oositin etrafında bulunan korona radiata ve kumulus ooforus oluşmaya

devam eder daha sonra bu üçlü yapı ovulasyona yakın tutunduğu yerden ayrılarak follikül sıvısının içinde serbest hale gelir. Kısa süre sonra maturasyonunu tamamlayan primer oosit I. mayozu tamamlar ve bölünerek kromozom sayısı bakımından eşit olan (23 kromozom) ancak sitoplazma miktarı bakımından eşit olmayan iki hücre oluşturur. Oluşan iki hücreden biri sekonder oositir ve sitoplazmanın hemen hemen tamamını alır. Diğeri 1. polar cismi oluşturur. Hemen sonrasında sekonder oosit hızlı bir şekilde II. mayoz bölünmeye başlar ve bu bölünme metafaz evresinde durur. Graaf follikülü en dıştan kalın, homojen ve saydam olan, **camsı zar (membrana vitrea)** adı verilen bazal membran ile çevrelenir [36, 37, 43].

i) Atretik follikül

Doğumdan önce başlayıp menopozdan birkaç yıl sonrasına değin ovaryumlarda atretik folliküller meydana gelir. Menstrüal döngü boyunca her ovulasyonda genellikle bir oosit atılır ve dişilerin yaşamı boyunca ovaryumlarında çok sayıda, farklı evrelerde aynı anda bulunan folliküllerden yalnızca %0,1'i olgunlaşarak ovulasyona uğramaktadır [36, 37, 40-42].

Folliküler büyüme hormonal etkinin yetersizliği nedeniyle geriler. Genellikle ilk olarak oosit parçalanıp dejenere olurken granüloza hücrelerinin ortadan kalkması daha geç olur. Granüloza hücreleri parçalanmış oositleri fagosite eder ve atretik follikül zamanla ovaryum stroması içinde kaybolur. Daha büyük folliküller gerilerken intersitisyel hücreler ortaya çıkar. Bu durum sekonder dejeneratif değişikliklerin olduğunu gösterir ve böylece teka interna hücreleri farklılaşarak interitisyel hücrelere dönüşürler. Folliküler atrezi bir programa göre düzenlenir. Antrum içinde granüloza hücrelerinin etkisi azalır ve granüloza hücrelerinde mitotik ve enzimatik aktiviteler dururken teka internada hipertrofi, follikülün kollaps hale geçmesi ve follikül içine bağ dokusunun invazyonu gibi değişiklikler meydana gelir. Makrofaj ve nötrofiller granüloza hücrelerini baskılar ve bağ dokusunda hakimiyet kurarlar. Granüloza hücrelerinde apoptotik değişiklikler nöral apoptozis inhibitör protein (NAIP) yüzünden meydana gelmez. Folliküllerin tüm evrelerinde gözlenirken atreziye giden follikülde tesiri görülmez ve yüksek seviyede gonadotropinlerin bulunması NAIP etkisinin baskın hale gelmesini, follikül hücrelerinin korunmasını sağlar. Oositte de birtakım değişiklikler meydana gelir ve zona pellusidada katlanma, büzülme ve kırılma atrezi göstergeleridir. Tüm bu değişikliklerin sonucunda ortaya çıkan kalıntılar makrofajlar

tarafından fagosit edilir [43].

Ovulasyon

Ovulasyon, sekonder oositin Graff follikülünden atılmasıdır ve bu follikülünün granüloza ve teka hücrelerinin östrojen üretimiyle birlikte menstrüal döngünün 14. gününde kandaki östrojen düzeyi artar. Artan östrojen uterus endometriyumunun folliküler (proliferatif) evreye girmesini, servikal mukusun spermiyumların girişini kolaylaştıracak şekilde artmasını ve hipofizin LH (luteinize edici hormon) salgılamasını indükler. LH seviyesinin döngünün tam ortasında birdenbire artmasıyla olgunlaşmaya sebep olan faktörlerin etkisi artar. Böylece I. mayozun profaz safhasında kalmış olan primer oosit I. mayozu tamamlar ve sekonder oosit ile 1. polar cisim oluşur. Hemen sonrasında II. mayoz başlar fakat sekonder oosit ovulasyondan yaklaşık olarak 3 saat öncesine kadar metafaz safhasında kalır. Gerçekleşen bu değişikliklerle birlikte ovaryumun yüzeyinde bir kabarıklık meydana gelir. Oluşan kabarıklığın tepesinde stigma adı verilen ve damarsız olan bir nokta oluşur. LH seviyesinin yüksek olması kollajenaz etkisinin artmasına, dolayısıyla follikülün etrafındaki kollajen liflerin sindirilmesine yol açar. Ayrıca LH seviyesinin birdenbire yükselmesi prostaglandin miktarını artırır. Artan prostaglandin miktarı teka eksternadaki düz kas hücrelerinin kasılmasına sebep olur. Bu kasılmalarla birlikte oosit etrafını saran korona radiatalı granüloza hücreleriyle birlikte bir miktar kumulus hücrelerini de peşine takarak kumulus ooforusun bulunduğu kısımdan dışarı atılır ve tuba uterinanın abdominal ostiumu içine nakledilir. Ovulasyon sırasında tuba uterinanın fimbriyaları oositin olduğu ovaryum yüzeyine doğru yönelmiş ve o tarafa doğru yaklaşmıştır. Böylece oositin tuba uterina içine çekilmesi kolaylaşır ve bu durum oositin peritoneal boşluk içine geçmesini engeller [36, 37, 40-43].

Puberteden menopoza kadar 28 günde bir ovulasyon meydana gelir ve döngünün tam ortasında yani 14. gününde gerçekleşir. Ovulasyonda nadiren aynı anda birkaç oosit atılabilir de genellikle bir oosit atılır [40-42]. Ovulasyondan sonra Graff follikülünde iç basınç düşmesi gerçekleşir ve kısa bir süre için teka katmanlarından kan sızmasıyla follikül içine kan toplanır. Bunun sonucunda oluşan yapı **korpus rubrum** (kırmızı cisim) olarak adlandırılır [40-42].

Korpus luteum (sarı cisim)

Ovulasyon sonrasında Graff follikülü yırtılır ve duvarında kalan granüloza hücreleri ile teka interna hücreleri çevrelerinde bulunan damarlar aracılığıyla yaşamaya devam ederler. LH'ın indüklemesiyle birlikte granüloza ve teka interna hücrelerinin sitoplazmalarında sarımsı bir pigment birikir. Sonrasında bu hücreler büyüyerek granüloza lutein hücreleri ve teka lutein hücrelerine dönüşürler. Granüloza lutein hücreleri ve teka lutein hücrelerinin oluşturduğu geçici endokrin bez yapısı korpus luteum (sarı cisim) olarak isimlendirilir. Progesteron ve östrojen korpus luteum tarafından üretilir. Östrojenik hormonların yardımıyla progesteron uterus endometriyumunun sekretuar (progestasyonel) evreye girmesine yol açar. Böylece uterus embriyonun implante olabilmesine uygun duruma gelir [36, 37, 40-42].

Döllenme gerçekleşmediği zaman, korpus luteum 14 gün boyunca aktif kalır ve menstrasyon korpus luteumu adını alır. İnsan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu ve diğer luteotropinlerin salgılanmaması nedeniyle progesteron ve östrojen üretimi azaldığı için korpus luteum ovulasyondan 10-12 gün sonra dejenere olur ve menstrüal kanama başlar [40-42]. Döllenme gerçekleştiği zaman, embriyonun sinsityotrofoblastları tarafından salgılanan insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu ile korpus luteumun dejenere olması önlenir ve korpus luteum büyümesini sürdürerek **gebelik korpus luteumuna (korpus luteum graviditatis)** dönüşür. Gebeliğin 3. ayının sonunda, gebelik korpus luteumu ovaryumun 1/3 ile 1/2'si büyüklüğüne ulaşır ve sarımtırak renkteki luteal hücreler 4. ayın sonuna kadar progesteron salgılamaya devam ederler. Daha sonra plasentanin trofoblastik kısmı tarafından üretilen progesteronun miktarı gebeliğin devam ettirilmesine yetecek seviyeye ulaştığı için, luteal hücreler yavaşça dejenerasyona uğrarlar. Gebelik korpus luteumu gebeliğin 4. ayından önce ortadan kalkarsa genellikle düşük meydana gelir [36, 37].

Menstruasyon ve gebelik korpus luteumlarının dejenere olmasıyla birlikte **korpus albicans** adı verilen beyaz renkli bir yapı meydana gelir. Korpus albicans kollajen liflerden zengin bağ dokusu yapısındadır ve ovaryum içinde zamanla absorbe edilip ortadan kaldırılır [40-42].

2.4 Ovaryumların Fizyolojisi

Ovaryumların fonksiyonları; hipotalamik-serbestleştirici bir hormon olan Gonadotropin Serbestleştirici Hormon (GnRH), hipofizin ön lobundan salgılanan gonadotropinler (FSH ve LH) ve ovaryumdan salgılanan östrojen ve progesteron olmak üzere üç farklı hormon grubunun kontrolü altındadır [44, 45].

Hipofizin ön lobundan salgılanan FSH ve LH, menstrüal döngü boyunca ovaryumlarda meydana gelen değişikliklerden sorumludur. Ovaryumlar FSH ve LH tarafından uyarılmazsa inaktif durumda kalırlar. Diğer bir gonadotropik hormon olan insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu, fetal yaşam boyunca plasenta tarafından salgılanır ve ovaryumları uyarıp onların işlev görmesini sağlar. Bu durum doğumdan kısa bir süre sonra kaybolur dolayısıyla ovaryumlar puberte öncesine kadar inaktif durumda beklerler. Küçük glikoprotein yapıda FSH ve LH, ovaryumlardaki hedef hücrelerinin hücre zarlarında bulunan son derece özgül reseptörlere bağlanarak etki gösterirler. Reseptör aktivasyonu hedef hücrelerin salgılama, büyüme ve çoğalma hızını artırır. Meydana gelen bu etkilerin hepsi hedef hücrelerin sitoplazmasında bulunan ikincil haberci siklik AMP (cAMP) sisteminin aktive edilmesi sonucunda oluşur. cAMP aktivasyonu fosforilasyonlara yol açar ve böylece hücre içi işlevi hızlanır [44, 45]. Ovulasyondan önce folliküllerden biri daha fazla büyür ve bol miktarda östrojen üretir. Östrojenin follikül üzerinde pozitif geribildirim etkisi vardır. FSH ve östrojenler birlikte granüloza hücrelerinin hücre zarlarında bulunan FSH ve LH reseptör sayısını artırır. Ancak östrojen teka hücreleri üzerinde daha az pozitif geribildirim etkiye sahiptir. Meydana gelen bu etkiler sayesinde, hızla gelişen follikülün sıvı ve hormon salgısı hızlı bir şekilde yükselir. Follikül tarafından üretilen büyük miktarlardaki östrojen, FSH üretimini engellemek için, hipotalamusu indükler. Bu geribildirim geride kalan az gelişmiş folliküllerin daha fazla gerilemesine neden olduğu sanılmaktadır [44, 45].

Follikül büyümesinin son aşaması ve ovulasyon sırasında gerekli olan LH'nin hipofizin ön lobundan salgılanması ovulasyondan yaklaşık olarak 48 saat önce belirgin olarak artmaya başlar ve ovulasyona kadar artmaya devam eder. Aynı zamanda FSH salgılanması da 2-3 kat artar. Böylece hem LH hem de FSH aynı anda etki ederek ovulasyondan birkaç gün öncesinden itibaren follikülün hızla büyümesine neden olurlar. Ayrıca LH'nin etkisiyle, granüloza ve teka hücreleri daha çok progesteron ve daha az östrojen salgılayan hücrelere

dönüşür ve ovulasyondan yaklaşık olarak 1 gün önce östrojen salgısı azalırken progesteron salgısı başlar [44, 45].

Ovulasyonu takip eden ilk birkaç saat içinde, luteinizasyon adı verilen bir süreçte geride kalan granüloza ve teka interna hücreleri hızlı bir şekilde lütein hücrelerine dönüşür ve korpus luteum yapısı meydana gelir. Korpus luteum LH'nin etkisiyle büyür ve salgısını arttırır. Döllenme olursa LH'a benzer özelliklere sahip olan insan koryonik gonadotropin (hCG) hormon plasentadan salgılanmaya başlar ve korpus luteumun yaşamını uzatarak genellikle gebeliğin ilk 2-4 aylık süresinde dejenere olmamasını sağlar [44, 45]. Korpus luteumdaki granüloza lütein hücreleri progesteron ve östrojen salgılamakta teka lütein hücreleri androstenedion ve testosteron gibi androjenleri üretirler. Granüloza hücrelerinde androjenlerin çoğu kadın hormonlarına dönüşür. LH, granüloza ve teka interna hücrelerinin lütein hücrelerine dönüşümünde rol oynayan başlıca faktördür ve böylece lütein hücreler çoğalma, genişleme, salgı ve dejenerasyon için programlanmış olurlar. Dolayısıyla LH salgılanmasa bile süreç bir süre daha devam eder ve 4 ile 8 gün sonra sonlanır. Granüloza hücrelerinin luteinizasyonu LH'nin yanı sıra oositin ovaryumdan atılmasıyla ilişkilidir. Ovulasyonun sonuna kadar luteinizasyonu kontrol eden bir diğer faktör follikül sıvısında yer alan luteinizasyonu baskılayıcı faktördür. Böylece ovulasyon gerçekleşene kadar korpus luteum oluşmaz [44, 45].

Luteal fazda, korpus luteum tarafından salgılanan büyük miktarda östrojen ve daha az miktarda progesteron, hipofizin ön lobu üzerinde geri bildirim etkisi yaratır ve LH ile FSH'nin düşük dozda salgılanmalarına neden olurlar. Diğer taraftan luteal hücreler küçük miktarda inhibin hormonu üretirler. İnhibinin görevi esas olarak FSH salgılanmasını baskılamaktır. Kanda LH ve FSH seviyesi düştüğünde ve sonrasında bu hormonlar kaybolduklarında korpus luteumun tamamı dejenerasyona uğrar ve bu durum korpus luteumun involusyonu olarak adlandırılır. Östrojen, progesteron ve inhibin korpus luteum tarafından salgılanmadığı zaman hipofizin ön lobu üzerindeki negatif geri bildirim ortadan kalkar ve sonrasında yine ilk olarak FSH ve birkaç gün sonra da LH salgılanmaya başlar. Böylece LH ve FSH yeni folliküllerin büyümesini başlatarak yeni bir menstrüal döngüye girilir. Fakat östrojen ve progesteron yokluğu uterusu menstruasyonu indüklediği için bu folliküller yeterince gelişmezler [44, 45].

Östrojenler, gebe olmayan sağlıklı kadınlarda ovaryumlardan yüksek miktarda

salgılanırken adrenal korteksten az miktarda salgılanırlar. Gebe olan sağlıklı kadınlardaysa östrojenler yüksek miktarda plasentadan salgılanırlar. Kadınların plazmasında 17β östradiol, östron ve östriyol olmak üzere 3 tip östrojen görülür. 17β östradiol ovaryumlar tarafından salgılanan en önemli östrojendir [44, 45]. Östrojenik kuvvet açısından 17β östradiol, östrona göre 12 kat, östriyole göre ise 80 kat daha kuvvetlidir. Bu nedenle 17β östradiol en önemli östrojendir [44, 45]. Genellikle adrenal korteks ve ovaryum teka hücreleri tarafından salgılanan androjenlerin periferik dokularda meydana gelen dönüşümlerinden östron oluşur. Dolaşımda östron, 17β östradiol ile dengede bulunur ve daha sonra östron östriyole dönüşür ve bu olayın büyük bir kısmının karaciğerde gerçekleştiği sanılmaktadır [44, 45]. Zayıf bir östrojen olan östriyol östradiol ve östronun oksidasyon ürünü olarak özellikle karaciğerde oluşur [44, 45]. Biyosentetik yolla androjenlerden oluşan östrojenler ovaryumlarda granüloza ile teka interna hücreleri ve korpus luteumlar tarafından salgılanırlar. Östrojenlerin sentezlenmesi dolaşımda bulunan androstenedionun aromatisasyonu şeklinde gerçekleşir. Androstenedionun östrona ve testosteronun östradiole dönüşümü aromataz enzimi tarafından katalizlenir. Çok sayıda LH reseptörü taşıyan teka interna hücrelerinde LH, cAMP üzerinden indüklemeye yaparak kolesterolün androstenediona dönüşümünün artmasına sebep olur ve androstenedionun bir kısmı östradiole dönüşürken diğer bir kısmı östradiol olarak dolaşıma katılır. Aynı zamanda teka interna hücreleri granüloza hücrelerine de androstenedion temin eder ve böylece granüloza hücreleri östradiol üretirler. Çok sayıda FSH reseptörü taşıyan granüloza hücrelerinde ise FSH, cAMP üzerinden indüklemeye yaparak aromataz etkisini arttırıp bu hücrelerin daha fazla östradiol salgılamasını sağlar [44, 45]. Olgunlaşmış granüloza hücrelerinde de LH reseptörleri vardır ve LH bu hücrelerde östradiol yapımını indükler. Her ne kadar ovaryumun stromal dokusu östrojen ve androjen sentezleyebilse de bu sentez üreme dönemindeki sağlıklı kadınlarda olur ve önemsiz miktarlarda meydana gelir [44, 45]. Karaciğerde yıkılan östrojenler burada glukuronid ve sülfatlar halinde bağlanır. Bu ürünlerin küçük bir kısmı safrayla atılırken geri kalan kısmı idrarla atılır. Karaciğer işlevlerinin zayıflamasıyla vücutta östrojen aktivitesinin artması ve bazen hiperöstrinizmin oluşması karaciğerin kuvvetli östrojenler olan östradiol ve östronu, zayıf östrojen olan östriyole dönüştürmesiyle ilgilidir [44, 45].

Çocuklukta çok az miktarda salgılanan östrojenlerin seviyesi, pubertede gonadotropik hormonların etkisiyle yaklaşık olarak 20 kat yükselir ve kadının genital organlarında birtakım değişiklikler meydana gelir. Puberteden birkaç yıl sonra uterusun hacmi artar.

Endometriyal stromadaki hücrelerin çoğalmasına ve endometriyal bezlerin büyümesine yol açan östrojenler sayesinde uterus olası implantasyon sonucu oluşan fötusun beslenmesi için hazırlanır. Östrojenler aynı zamanda Puberteden sonra vajina epitelinin kalınlaşmasını sağlayarak vajinayı travma ve enfeksiyonlara karşı daha dirençli kılar [44, 45]. Bununla birlikte östrojenler tuba uterinaların mukoza katmanlarındaki salgı oluşturan hücrelerin (peg hücreleri) ve silyalı epitel hücrelerinin çoğalmasını sağlar [44, 45]. Ayrıca östrojenler memede yağ birikimine, stromal doku ve kanal sistemlerinin gelişmesine neden olurlar. Fakat meme bezlerindeki bu değişiklikler sadece östrojenlerin etkisiyle meydana gelmez. Bunların gerçekleşmesi için progesteron ve prolaktin hormonlarına da ihtiyaç vardır [44, 45].

Osteoblastik aktiviteyi arttıran östrojenler üreme çağıının ilk birkaç yılında büyüme hızını son derece arttırırlar ancak uzun kemiklerin epifizlerinin erken kapanmasına neden olurlar. Erkeklerde testosteron benzer etkiye sahiptir ancak kadınlarda daha güçlüdür. Bu yüzden genellikle kadınlarda büyüme erkeklere göre daha erken yaşlarda durur [44, 45]. Toplam vücut proteinini az da olsa arttıran östrojenler uygulandıktan sonra nitrojen dengesini pozitif tarafa çeker. Ancak testosteron protein depolamasında östrojenlere göre daha fazla etkilidir [44, 45]. Vücutta metabolik hızı az miktarda arttıran östrojenler, bu açıdan testosteronla karşılaştırıldığında 1/3 oranda daha az etkilidir. Deri altı yağ dokusunu arttıran östrojenler göğüs ve kalçalarda yağ birikmesine neden olurlar [44, 45]. Puberteden sonra kadınlarda adrenal bezden fazla miktarda östrojen salgılanması pubis ve aksillar bölgede kıllanmaya neden olur. Derinin daha çok damarlanmasına neden olan östrojenler sayesinde deri yumuşak ve genellikle pürüzsüzdür. Adrenal androjen seviyelerinin puberteden sonra yükselmesi aksiller ter bezlerinin salgısını arttırır ve bu durum akneye neden olur [44, 45]. Tıpkı aldosteron gibi östrojenler de böbrek tübüllerinde su ve sodyumun geri emilmesine yol açar [44, 45]. Salgılandıktan sonra östrojenler birkaç dakika dolaşımda kaldıktan sonra hedef hücrelere ulaşırlar ve hücrelere girdikten 10-15 saniye sonra sitoplazmadaki bir reseptör proteinle birleşerek çekirdeğe girerler. Böylece DNA'nın özgül kısmıyla reaksiyona girerek transkripsiyon başlatır ve birkaç dakikada RNA üretimi gerçekleşir. RNA sitoplazmaya diffüze olup protein oluşumunu arttırarak hücre işleyişini etkiler [44, 45].

Progesteron en önemli progestindir ve 21 karbonludur. Diğer bir progestin olan 17 α -hidroksiprogesteron düşük düzeylerde bulunur. Aynı etkiye sahip olan her iki progestin

beraber salgılanır [44, 45]. Progesteron gebe olmayan sağlıklı bir kadında sadece menstrüal döngünün ikinci yarısında korpus luteumdan salgılanırken döngünün birinci yarısında kanda bulunan az miktardaki progesteron eşit şekilde adrenal korteks ve ovaryumlardan salgılanır. Progesteron gebe olan sağlıklı bir kadında ise esas olarak gebeliğin 4. ayından sonra plasentadan yüksek miktarda salgılanır. Steroid biyosentezinin önemli bir ara ürünü olan progesteron steroid sentezi yapan testis ve adrenal korteks gibi dokularda az miktarda sentezlendikten sonra dolaşıma girer. 17α -hidroksiprogesteron, östrojenlerle birlikte ovaryum follikülünden salgılanır. Bu hormon 17β -östradiol eşdeğidir. Dolaşımdaki bulunan progesteronun yaklaşık olarak %2'si serbestken bunun %18'i kortikosteroid-bağlayıcı globuline ve kalan %80'i albümine bağlıdır. Progesteronun yarılanma süresi kısadır ve karaciğerde pregnanediol dönüştürülüp glukuronik asitle birleştirildikten sonra idrarla atılır [44, 45]. Pregnenon, teka hücreleri tarafından granüloza hücrelerine gönderilir ve burada progesterona dönüştürülür. Progesteron salgısı folliküler fazın sonuna doğru artarken luteal evrede korpus luteumdan yüksek miktarda progesteron salgılanır ve böylece ovaryum kaynaklı progesteron salgısı yaklaşık olarak 20 kat artar. Adenilat siklazın aktive olmasıyla LH korpus luteumu indükleyerek progesteron salgılanmasını uyarır ve daha sonra protein sentezinin başlamasıyla progesteron salgılanır [44, 45].

Menstrüal döngüsünün ikinci yarısında progesteron, endometriyal salgılama ile ilgili değişiklikleri başlatarak uterusu implantasyona hazırlar ve uterusun kasılmalarını azaltarak implante olmuş blastosistin atılmasını önler [44, 45]. Ayrıca progesteron, uterusu olduğu gibi tuba uterina mukozasında da salgılama ile ilgili değişikliklerin başlamasına neden olur. Bu salgı, döllenme olduktan sonra uterus tüplerinde yüzen zigotun implante olmadan önce beslenebilmesi için önemlidir [44, 45]. Bununla birlikte progesteron memelerde bulunan alveol hücrelerinin çoğalmasını sağlayarak lobül ve alveollerin gelişimine ivme kazandırır. Sonuç olarak memeler büyür ve salgılayıcı bir yapı haline dönüşürler [44, 45]. Östrojenler, testosteron ve adrenokortikal hormonlar gibi progesteronun yüksek miktarları sodyum, klor ve suyun böbrek tübüllerinden geri Emilimini artırır. Progesteron aynı zamanda, su ve sodyum atılımını artırır. Aldosteronla arasında bir yakınlık olan progesteron, tübül epitel hücrelerinden sodyum iyonlarının taşınması için aldosteronla aynı reseptör proteinlere bağlanırlar ve progesteron reseptör proteinlere bağlandığı zaman aldosteron bağlanamaz. Ancak aldosterona oranla progesteron daha düşük miktarda sodyum taşınmasına neden olur ve bu yüzden böbrek tübüllerinden sodyum ve suyun geri Emilimini düşük seviyede etkiler. Progesteron aldosteronun etkisini baskılayarak vücutta

belirgin bir şekilde su ve sodyum kaybına neden olur [44, 45].

Hipotalamustan salgılanan serbestleştirici hormonlar, hipotalamik-hipofizier portal sistem yoluyla hipofizin ön lobuna taşınarak hipofizin ön lobundan salgılanan hormonların çoğunu denetlerler. Serbestleştirici hormon olan GnRH, gonadotropinlerin kontrol edilmesinde oldukça önemli bir yer tutar. Hipotalamus sürekli GnRH salgılamayarak her 1-3 saatte bir salgı yapar ve bu birkaç dakika sürerek tekrarlanır. Hipofiz ön lobu sürekli GnRH tarafından uyarıldığı zaman FSH ve LH salgısı kaybolduğu için GnRH'ın aralıklı salgılanması fonksiyonel açıdan önem taşır ancak bunun sebebi bilinmemektedir. GnRH'ın aralıklı salgılanmasına bağlı olarak LH ve FSH'ın salgılanması da aralıklı bir şekilde artar veya azalır [44, 45]. Hipotalamusta bulunan arkuat çekirdeklerin sinirsel uyarılması sonucunda GnRH salgılanır. Bu sebeple kadınlarda üreme fonksiyonlarının çoğu arkuat çekirdekler tarafından kontrol edilmektedir. Aynı zamanda hipotalamusun ön tarafında bulunan preoptik kısmındaki nöronlar da orta seviyede GnRH salgılar [44, 45].

2.5 Follikülogenezis ve Oosit Maturasyonunda Etkili Moleküller

Follikülogenezis ve oosit maturasyonu aynı zamanda gerçekleşir ve birbiriyle uyumludur [46].

Hipotalamus kaynaklı GnRH, hipofiz kaynaklı FSH ve LH ve ovaryumlar tarafından üretilen otokrin/parakrin etkiye sahip lokal büyüme faktörleri [büyüme farklılaşma faktörü 9 (GDF-9), kemik morfogenetik protein 6 (BMP-6), kemik morfogenetik protein 7 (BMP-7), kemik morfogenetik protein 15 (BMP-15), c-Kit, epitelyal büyüme faktörü (EGF), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), Anti-Müllerian hormon (AMH)] puberteden sonra follikülogeneziste rol alır. AMH dışında adı geçen büyüme faktörleri granüloza ve teka hücrelerinde üretilip salınabilir. Gelişen folliküllerin granüloza hücrelerinde üretilen ve parakrin etkiye sahip olan AMH, dominant follikülün seçilmesi ve kalan folliküllerin gelişmesini engellemesi açısından diğer büyüme faktörlerinden ayrılır [47-50]. Gonadotropinlerden (FSH ve LH) bağımsız olarak primordiyal follikülden primer follikül oluşur. Bu evrede oosit ve onu çevreleyen tek sıralı follikül hücrelerinden salgılanan bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve kit ligandın devreye giren ilk lokal büyüme faktörleri olduğu sanılmaktadır. Primer follikül oluşumundan sonraki follikül gelişiminde FSH, LH ve lokal büyüme faktörleri sorumludur. Bunlardan oosit kaynaklı olanlar; GDF-9, BMP-6,

BMP-15 ve c-Kit'ken granüloza hücreleri kaynaklı olanlar AMH, EGF, bFGF, inhibin, aktivin, BMP-2, BMP-5, BMP-6'dır. BMP-4, BMP-7, TGFb ise teka hücreleri tarafından salgılanır. Bütün bu lokal büyüme faktörleri, otokrin ve parakrin etki meydana getirerek uyum içinde fonksiyon gösterirler [47-50].

Granüloza hücreleri FSH'nin etkisiyle östrojen salgılar. Kanda seviyesi artan östrojen, önce pozitif geri bildirimle LH salgılanmasını indüklerken menstrüel döngünün sonunda negatif geri bildirimle LH salgılanmasını inhibe eder [46]. Ovulasyonun meydana gelmesi ve sonrasında progesteronun korpus luteumdan salgılanabilmesi önemli bir yere sahip olan LH sayesinde oosit maturasyonu başlar ve LH'nin kan seviyesi en üst noktaya vardıkdan 10-12 saat sonra ovulasyon meydana gelir. Proteolitik enzimler ve prostaglandinler LH ve progesteron tarafından aktive edilerek follikül duvarında bulunan kollajenler yıkılır ve kumulus hücrelerinin ekspansiyonu gerçekleşir. Sonrasında ovulasyon meydana gelir. LH, ilk olarak granüloza hücrelerinde bulunan G-protein aracılığıyla adenilat siklazı (AC) aktiveleştirir. Aktifleşen AC, cAMP'yi artırır. Protein kinaz A aracılığıyla artan cAMP, plazminojen aktivatörü (tPA) sentezine yol açar. Plazminojen tPA tarafından plazmine dönüştürülür ve plazmin follikül duvarında bulunan fibronektin, laminin, kollajen ve fibrinin yıkılmasını sağlayarak ovulasyonun kolaylaşmasına sebep olur. Bununla birlikte LH, benzer mekanizma ile teka hücrelerinin plazminojen aktivatör inhibitörünü (PAI) sentezlemelerinde yer alır. Böylece PAI ve tPA yolları plazminojenin plazmine dönüştürülmesinde tampon görevi görür [51, 52].

FSH ve LH, granüloza hücrelerinde bulunan G-protein bağlı reseptör proteinlere bağlanınca adenilat siklaz aktiveleşir ve cAMP artar. Artan cAMP kumulus hücrelerinde bulunan mitojen aktive edici protein kinazı (MAPK) aktiveleştirir ve mayozda ilerleme meydana gelir. Artan cAMP aynı zamanda granüloza hücrelerinde oosit maturasyonu için gerekli olan steroid üretimini artırır [53, 54]. Geçit bağlantıları (GJ) aracılığıyla cAMP oosit içine geçer [54, 55]. Menstrüel döngünün ortalarında salgılanan LH, oosit ve granüloza hücreleri arasında bulunan GJ'leri azaltır. Bu azalmayla cAMP'nin oositteki seviyesinin yükselmesi önlenmiş olur [55]. Fosfodiesterazlar (PDE) mayoz ilerlemesinin başlamasını önleyen cAMP'yi yıkarak mayoz ilerlemesinin başlamasına katkı sağlarlar. Bu sırada granüloza hücrelerinde immatür ovulasyonu önlemek amacıyla artan cGMP MAPK'ı inaktifleştirir [51, 52, 54].

Ovulasyon sırasında atılan oosit 2. metafaz safhasında kalan sekonder oositir. Döllenme gerçekleşirse Mayoz tekrar ilerlemeye başlar ve olgun ovum meydana gelir. Döllenme gerçekleşmezse sekonder oosit dejenerasyona uğrar [34, 56-58]. Mayoz, diploid sayıda kromozoma sahip olan dişi üreme hücresi oositin haploid sayıda kromozoma sahip yavru hücreleri oluşturmak üzere kromozom sayısını yarıya indirgeyen hücre bölünmesidir. İnsanlarda intrauterin dönemin 4. ayında oositlerin mayozla bölünmesi başlar fakat follikül hücreleri tarafından üretilen OMI, puberteye kadar oositlerin 1. profazın diploten evresinde kalmalarına sebep olur. LH başta olmak üzere gonadotropinler puberteden sonra mayozun tekrar ilerlemeye başlamasını sağlar ve ovulasyondan hemen önce mayoz I tamamlanıp ve mayoz II başlar. Ovulasyon mayoz II'nin metafaz safhasında meydana gelir. Mayozdaki bu ikinci bekleme döllenme gerçekleşene kadar sürer. Döllenme gerçekleşirse mayoz bölünme tamamlanır [55, 59].

Genel olarak oosit maturasyonu, mayoz anında oositin profaz I safhasından metafaz II safhasına kadar gerçekleşen olaylar zinciridir. Oositin olgunlaşması nükleer ve sitoplazmik maturasyon olarak ikiye ayrılır [55].

i) Nükleer maturasyon

LH, nükleer maturasyonun başlaması için indükleyici etkiye sahipken östrojenler başta olmak üzere steroidler nükleer maturasyonun devamı için gereklidir [53]. Oosit 1. profazın diploten evresindeyken çekirdek zarı yıkılmamıştır. Bu yüzden oositin hücre çekirdeğine germinal vezikül (GV) adı verilir. Germinal vezikülün yıkılması (Germinal Vesicle Break Down-GVBD) oosit maturasyonunda meydana gelen ilk olaydır. LH etkisiyle GVBD başlar ve daha sonra kromozom yoğunlaşır, iğ iplikçikleri oluşur ve ardından homolog kromozomlar metafaz plağı üzerine yerleşir. 1. metafazdan sonra 1. anafaz ve telofaz gerçekleşir ve sitoplazma miktarı açısından eşit olmayan sekonder oosit ve 1. polar cisim oluşur. II. mayoz interfaz safhasına girilmeden başlar. II. mayozun metafaz safhasında ikinci bir bekleme meydana gelir ve bu sırada ovulasyon oluşur [55, 59]. Döllenme gerçekleşirse II. mayoz tamamlanır ve bunun sonucunda oluşan, sitoplazma açısından zengin hücreye oosit adı verilir. Diğer hücre ise sitoplazma açısından fakir ancak ribozom, mitokondriyon ve kortikal granüllere sahip olan 2. polar cisimdir [59].

ii) Sitoplazmik maturasyon

1. polar cismin meydana gelmesiyle perivitellin boşluk genişler, mitokondriyonların sayısı artar ve Golgi kompleksleri tarafından kortikal granüllerin salgılanmasıyla ooplazma granüllü hale gelir. İlk başta merkezi yerleşimli olan mitokondriyonlar oositin gelişmesiyle periferik yerleşir. Sitoplazmik maturasyon sırasında önemli olan mitokondriyonlar, hücre içi metabolik olaylarda, hücre farklılaşması ve proliferasyonunda yer alırlar. Döllenmenin başarılı olabilmesi için; oosit maturasyonu ve follikülogenezisin, kromozom düzenlenmesinin ve ovulasyonun uyum içinde ve aynı anda gerçekleşmesi gerekir. Bu aşamada olgunlaşmayı düzenleyici faktörün (Maturation Promoting Factor; MPF) rolü büyüktür. MPF, p34cdc2 ve cyclin B olmak üzere iki alt bileşenden oluşan kompleks bir proteindir. İlk bileşen katalizör olarak görev alırken ikinci bileşen regülatör olarak işlev görür [60, 61]. Oosit maturasyonu MPF tarafından indüklenirken GVBD kromozom yoğunlaşması ve iğ iplikçiklerinin oluşumu gibi olayların sıralı ve başarılı bir şekilde meydana gelmesini sağlar. Siklin bağımlı protein kinazlar oosit maturasyonunda görev alır. Kinaz ve fosfatazların aracılığıyla fosforilasyon ve defosforilasyon olaylarının kontrolünde mayozun tekrar başlaması ve maturasyon süreci gelişir [60, 61]. I. mayozda LH'nın uyarılmasıyla primer oositin içinde MPF miktarı artmaya başlar ve I. mayozun tamamlanmasıyla birlikte azalır. MPF miktarı II. mayozda tekrar artar ve II. mayozun bitmesiyle tekrar azalır. Bu süreç zigot oluştuktan sonra her mitotik bölünmenin öncesinde ve sonrasında artıp azalır ve böylece siklik değişimler meydana gelir [60, 61].

Tamamlanan I. mayozun ardından oositin içinde bir grup faktörden meydana gelen ve genel olarak sitostatik faktörler (CSF) adı verilen faktörler birikmeye başlar. Bunlar II. mayozda artar ve 2. metafaz safhasında beklemeye sebep olurlar. Anafaz uyarıcı faktör (APF), mitotik bölünmelerde metafazdan anafaza geçişi sağlarken II. mayozda APF'nin bu etkisi progesteron uyarımıyla da artan CSF'ler nedeniyle inhibe edilir ve metafaz safhasında bekleme olur. Döllenme olursa CSF'lerin inhibisyonu ortadan kalkar ve II. mayoz devam etmeye başlar [62, 63].

MPF, büyüme faktörleri (EGF, TGF), cAMP, Gn ve GnRH, PDE1'er, steroidler ve PDE aktivasyonundan sorumlu Ca^{+2} oosit maturasyonunun düzenlenmesinde görev alır. Fosforile MPF inaktifken defosforile MPF ise aktiftir. Fosforilasyonda görev alan cAMP, MPF'yi inhibe eder ve oosit içinde miktarı arttığında maturasyonu engeller. Diğer taraftan

PDE'ler cAMP'yi yıkarak maturasyonun ilerlemesinde rol alır. Steroidler, MPF aktifleşmesinde cAMP miktarını azaltarak görev alır. LH, MAPK yolağı aracılığıyla MPF'yi aktifleştirir. MAPK yolağı, steroidlerin oosit maturasyonunda görev almasında ve PDE lerin aktive edilmesinde önemli bir yere sahiptir [63]. Bu yolak aynı zamanda FSH ve LH'nin etkisinde mayozun tekrar ilerlemeye başlamasında, mayotik iğ ipliklerinin regüle edilmesinde, CSF artışında, asimetrik sitokinezisin meydana gelmesinde ve 2. polar cismin atılmasında görev alır. MPF'nin aksine MAPK I. mayozda artmaya başlar ve I. mayoz sonlandığı zaman azalır daha sonra tekrar artmaz [63].

İnaktif olan fosforile MPF'nin aktivasyonu Cdc25 fosfatazların defosforilasyonu aracılığıyla gerçekleşir [46]. Döllenmeden sonra meydana gelen Ca^{+2} dalgalanmaları inaktif MPF'nin oluşmasına neden olur. Aktin ve miyozin sitoplazmik maturasyonda ve döllenmede oluşan olaylarda görev alır. Bu mikroflamanlar sitoplazmik maturasyonda; periferel kromozom migrasyonunda, iğlerin kortikal yerleşiminde, homolog kromozomların ayrılmasında, kortikal regülasyonda, 1. polar cismin ayrılmasında önemli yere sahiptirler. Ayrıca döllenme sırasında; sperm birleşmesinde, iğ rotasyonunda, kortikal granül ekzositozunda, 2. polar cismin atılmasında ve ayrılma halkasının meydana gelmesinde görev alırlar. Bununla birlikte bunlar GVBD ve mayotik iğ oluşumunda yer almazlar. MAPK yolağı, miyozin hafif zincir kinaz, miyozin ağır zincir kinaz, RhoA, Cdc42, Arp2/3 ve diğer sinyal molekülleri ve protein kinaz C; mikroflaman aktivasyonunda görev alır [64].

Döllenmeden sonra II. mayoz tamamlanır ve oosit içinde meydana gelen Ca^{+2} dalgalanmaları nedeniyle kortikal granüller yırtılır. Dişi ve erkek pronükleuslar oluşur ve zigot gelişip mitotik bölünmeler meydana gelir [64, 65].

2.5.1 Büyüme farklılaşma faktörü 9 (GDF-9)

TGFb ailesinin üyelerinden olan GDF-9, memeli oositleri tarafından follikülogenezis boyunca yüksek seviyede salgılanır ve yokluğu follikül gelişimini engeller. Yapılan araştırmalarda GDF-9'un granüloza hücrelerinin proliferasyonu, Graff follikülü gelişimini ve kumulus hücrelerinin yayılımını arttırdığı ancak FSH etkili cAMP sentezini ve steroidogenezi inhibe ettiği bulunmuştur [48]. Çeşitli *in vitro* çalışmalarda besiyerlerine GDF-9 eklenerek çok miktarda sağlıklı follikül elde edilmiş ve bu

çalışmalarda GDF-9'un follikül gelişimindeki önemi gösterilmiştir [48]. GDF-9 eksikliği olan folliküllerde bulunan teka hücre katmanındaki 17 α -hidroksilaz, LH reseptörü ve c-kit sinyal moleküllerinde düşüş tespit edilmiştir [66]. Bazı çalışmalarda kemirgen ve insana ait olan ovaryum dokularına *in vitro* şartlar altında GDF-9 uygulanmış ve primer follikül gelişiminin hız kazandığı görülmüştür [67].

Özellikle primordiyal follikülden primer folliküle geçiş aşamasında önemli olan GDF-9 follikül gelişimi için gereklidir. Primordiyal folliküllerdeki primer oositlerin etrafında bulunan tek katlı yassı follikül hücreleri bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve kit ligandları sentezlerler. Bunlar hem otokrin olarak yassı follikül hücrelerinin hem de parakrin olarak oosit ve stromal/intersitisyel hücrelerin büyümesini sağlar. Daha sonra stromal/intersitisyel hücreler ile bu hücreleri saran teka hücreleri BMP-4 ve BMP-7'yi sentezlerler. TGFB ailesi üyelerinden olan BMP-4 ve BMP-7 follikül gelişimini olumlu yönde etkileyen protein sinyalleridir. Bu sinyal akımıyla primordiyal follikülden primer folliküle geçiş meydana gelir. Daha sonra primer follikülde bulunan primer oosit GDF-9 ve BMP-15 sentezler. Bunlar primer oositin etrafında bulunan granüloza hücrelerinin çoğalmasına ve işlevlerinin artmasına neden olurlar. Gelişen granüloza hücreleri de Anti-Mülleryan hormon (AMH) sentezler. AMH, diğer primordiyal folliküllerin gelişmesine ve bunlarda bulunan primer oositlerin bFGF ile kit ligandları salgılamalarına neden olur [48].

2.5.2 Kemik morfogenetik protein 15 (BMP15)

BMP-15 aynı zamanda Gdf9b olarak bilinir ve ilk kez primer folliküllerin oositleri tarafından sentezlenerek granüloza hücrelerinin çoğalmasını indükler [68, 73]. Rekombinant insan BMP-15'in uygulandığı *in vitro* araştırmalarda, bu proteinin FSH'tan bağımsız olarak farklılaşmamış sıçan granüloza hücrelerinin çoğalmasını uyardığı bulunmuştur. Bununla birlikte BMP-15 granüloza hücrelerinin FSH reseptör proteinini sentezlemelerini baskılar ve FSH'ın işlevini sınırlayabilir [68-70]. Erken follikül gelişiminde türlere göre farklı etkiler gösteren BMP-15, kemirgenler gibi poli-ovulatuvar türlerde döllenme için çok önemli değilken, insan ve koyun gibi mono-ovulatuvar türlerde döllenme için çok önem arzeder [48, 69]. FSH etkisiyle granüloza hücrelerinde steroidojenik akut düzenleyici protein (StAR), 3 β -hidroksisteroid dehidrojenaz (HSD), Cyp11a1, inhibin/aktivin alt üniteleri ve LH reseptör proteinini sentezlenir ancak BMP-15 bunların sentezlenmesini baskılar [69, 70].

BMP-15, granüloza hücrelerinin kit ligand sentezlemesini sağlar. Daha sonra c-kit aracılığıyla negatif geri bildirim mekanizması oluşturularak oositin gereğinden fazla BMP-15 sentezlemesi önlenir. Kit ligand sentezinin artmasıyla birlikte BMP-15 sentezi azalır ve bu sayede FSH inhibisyonu azalarak etkin bir şekilde granüloza hücrelerinin çoğalması meydana gelir [69, 71]. Follistatin dominant folliküllerde fazla miktarda üretilir. BMP-15'e bağlanan follistatin onun aktivasyonunu engeller. FSH reseptör proteini sentezini inhibe eden BMP-15 aktivasyonunun follistatin aracılığıyla regüle edilmesi, FSH ile granüloza hücreleri arasındaki etkileşimde önemli bir rol oynamaktadır [69, 72].

BMP-15, kumulus hücrelerinin büyümesinde görev alır ve kumulus hücrelerinde apoptozisin regüle edilmesinde etkili olabileceği bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada sıgır ovaryum dokusundan elde edilen kumulus-oosit yapısından oosit çıkarılmış ve kumulus hücrelerinin apoptozise gittiği saptanmış ancak BMP-15 uygulamasından sonra kumulus hücrelerinde apoptozisin inhibe edildiği gösterilmiştir [69, 74, 75].

2.6 Akne Vulgaris (AV)

Pilosebace ünitenin kronik ve iltihabi bir hastalığı olan AV; komedon, püstül, kist, papül, nodül ve skatris biçiminde polimorfik lezyonlar gösterir. AV'nin genellikle kozmetik sorunlara neden olduğu sanılsa da AV görülen bireylerde çok ciddi psikolojik ve sosyal problemler oluşmaktadır. Bu yüzden AV, bir uzman tarafından tedavi edilmesi gereken önemli bir hastalıktır. Günümüzde AV hastalığında birçok topikal ve sistemik ilaçların kullanıldığı tedavi yöntemleri bulunsa da hala birçok zorluk yaşanmakta ve tedavide kullanılan topikal ve sistemik ilaçlar ciddi yan etkilere yol açmaktadır [6, 7].

ABD'de her yıl yaklaşık olarak 40-50 milyon bireye AV tanısı konmaktadır ve bunun sıklığı 12-24 yaş arası genç bireylerde yaklaşık olarak %85'ken tüm yaş gruplarında yaklaşık olarak %15'tir [76]. AV genellikle ergenlik döneminde görülmesine rağmen kadınların yaklaşık olarak %12'sinde, erkeklerinse yaklaşık olarak %3'ünde 40 yaşına kadar devam edebilir. AV hem kadınlarda hem de erkeklerde eşit olarak görülse de ciddi seyirli formları erkeklerde kadınlara oranla daha sık görülür. Bununla birlikte beyaz tenli insanlarda, siyah tenli olanlara oranla daha şiddetli seyreder [77].

Multifaktöriyel olduğu düşünülen AV'nin nedeni günümüzde tam olarak bilinmemektedir.

AV lezyonlarının gelişiminden sorumlu olduğu sanılan faktörler 4 grupta toplanır:

1. Sebace bezlerin hiperplazisi ve sebum üretiminde artış
2. Folliküler hiperkeratinizasyon
3. Bakteriyel proliferasyon
4. İnflamasyon ve immün cevap [6, 78]

1) Sebace bezlerin hiperplazisi ve sebum üretiminde artış

Bir kıl follikülü ve ona açılan sebace bezden oluşan pilosebace ünitesi, AV patogenezi için en önemli bölgedir. Yüzün orta bölgesi, göğüs ve sırtta yoğun bir şekilde bulunan sebace bezler, ayak tabanı ve avuç içi dışında kalan bütün vücutta bulunur [6, 79]. Sebum, sebace bezlerde bulunan sebositlerden salgılanır ve skualen, polar lipid, trigliseritler (TG), sterol esterleri ve kolesterolden meydana gelmiştir. Akne tanısı konulan bireylerde skualen, sterol esterleri ve bazı yağ asitlerinin yüksek seviyede bulunduğu görülürken, başka bir yağ asidi olan linoleik asitin düşük seviyede bulunduğu tespit edilmiştir [6]. Sebumda linoleik asit eksikliği epitelde bariyer yapısının bozulmasına yol açar. Bu durum fazla miktarda sebum salgılanmasına ve keratin tıkaçta yapışkan bir görünümün meydana gelmesine sebebiyet verir [6, 80]. Genellikle sebum salgısı ne kadar fazlaysa aknenin şiddeti o kadar yüksektir. Akne tanısı konulan bireylerde sebace bezlerdeki lobüllerin sayısı ve sebace follikülün genişliği artmıştır.

2) Folliküler hiperkeratinizasyon

Çok katlı yassı epitel ile döşeli olan infundibulum, pilosebace ünitenin deri yüzeyine açıldığı bölgedir. Follikülü oluşturan hücreler, tıpkı epidermisteki gibi yenilenerek sebumla beraber dışarı atılır. Follikül kanalının akroinfundubulum bölgesindeki keratinositlerde meydana gelen çoğalma ve adezyon artışı, akne oluşumunda gerçekleşen ilk olaydır [2, 6]. Keratinositler, sağlıklı bir follikülde lümene tek tek hücreler şeklinde dökülür ve ardından dışarı atılır. Yapılan bir çalışmada akneli bireylerden alınan doku örnekleri monoklonal antikor Ki67 ile işaretlenmiş ve bu antikoru follikül kanalında bulunan keratinositlerin hücre çekirdeklerine tutunmasıyla komedonal folliküllerde bulunan keratinositlerin daha hızlı çoğalma gösterdikleri tespit edilmiştir [81, 82]. Bununla birlikte akneli bireylerde keratinositler yüksek seviyede keratin 6 ve keratin 16 içermektedir [76].

Akneli bireylerde duktusta hiperkornifikasyon, follikül hücrelerinde hiperproliferasyon ve follikül hücrelerinin anormal derecede yapışıklığı sebebiyle hipodeskuamasyon görülmektedir [6, 78]. Follikül kanalının üst kısmı tıkanır ve bunun sonucu olarak sebum salgısı alt kısımda birikir. Böylece mikrokomedon adı verilen aknenin öncü lezyonları oluşur. Komedojenesis, korneositlerin sebase follikülünde anormal deskuamasyon sonucunda birikmesi ile meydana gelir ve follikül zaman geçtikçe yağ, hücre artıkları ve bakteri ile dolarak açık ve kapalı komedonlar şeklinde belirginleşir. Follikül kanalının geçirgenliği, bozulmuş keratinizasyonla artar ve bu durum *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) ve inflamatuvar mediyatörlerin geçişinin kolaylaşmasına neden olur. *P. acnes* kolonizasyonu ile birlikte inflamatuvar lezyonlar ortaya çıkar [6, 82].

3) Bakteriyel proliferasyon

Akneli hastaların deri floralarında *P. acnes*, *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) ve *Malassezia furfur* (*M. furfur*) gibi mikroorganizmalar bulunmasına rağmen akne enfeksiyöz bir hastalık değildir. Bu üç mikroorganizmanın haricinde *Propionibacterium granulosum*, *Propionibacterium avidum* ve *Pityrosporum orbicular* da akne tanısı almış bireylerin deri yüzeylerinde ve follikül kanallarında tespit edilmiştir [6, 81].

Daha çok follikülün yüzeye yakın kısımlarında *S. epidermidis* ve *M. furfur* bulunurlar ve bu mikroorganizmalar patolojik bir etkiye sahip değildirler. Follikülde en çok bulunan mikroorganizma ise hareketsiz ve anaerobik olan *P. acnes*'tir. *P. acnes* her ne kadar enfeksiyöz olmasa da hastalığın inflamatuvar sürecinin başlamasından sorumlu olan en önemli faktördür [82, 83].

4) İnflamasyon ve immün yanıt

Akne patolojik olayın başlamasına sebep olmayan immünolojik mekanizma genelde diğer etkenlerin yanında ikincil olgu olarak medana gelir. *P. acnes* tarafından sentezlenen lipazın uyarımı ile oluşan serbest yağ asitleri keratinizasyon bozukluğuna ve nötrofil kemotaksisine yol açar.

Komedonal follikül duvarında masif rüptür gelişimi, *P. acnes* ve nötrofiller tarafından salgılanan enzimler sebebiyle meydana gelir ve komedonal içerik dermise yayıldığı zaman

P. acnes'in hücre zarında bulunan karbonhidratlara karşı antikor oluşur ve kompleman yoluyla inflamasyon başlar [84]. Litik etkili kompleman ve elastaz, pilosebace follikülünün çevresinde bulunan bağ doku liflerini parçalarlar ve sonuç olarak papül, püstül ya da abseler meydana gelir. Nötrofiller tarafından başlatılan inflamasyon, follikül kanalında bulunan keratinositler tarafından salgılanan TNF- α , Lökotrien-b4 (LT-B4), IL-1 α , IL-6 ve IL-8 gibi sitokinlerle ve açığa çıkan serbest radikallerle devam eder. Sitokin IL-1 α , AV'de en önemli sitokindir [80] ancak akne'de esas olarak kompleman aracılı hücreyel immünitenin görev aldığı sanılmaktadır [78, 82, 85].

Diyet, stres, genetik geçmiş, sigara kullanımı, premenstrüel alevlenme, ultraviyole radyasyon, terleme, meslek, ilaç ve kozmetik ürün kullanımı; akne oluşumunda rol oynayan diğer faktörlerdir.

2.6.1 Tedavi

AV tedavisinde amaç, hastalığın şiddetini azaltarak bireyin bu hastalığı en kısa sürede, en az fiziksel ve psikolojik hasarla atlatmasını sağlamaktır [6]. Akne lezyonlarının tipi, şiddeti, tutulum yeri ve hastanın cevabına göre tedavi şekli seçilmeli ve seçilen tedavi uzun süre uygulanmalıdır. İyileştikten sonra da belirli aralıklarla tedaviye devam edilmelidir. Bu sebeple uzmanlar her hastaya için farklı tedavi yöntemi tercih eder. AV tedavisi, AV etyopatogenezinde rol alan dört faktörün azaltılmasına kaybolmasına yönelik olmalıdır ve bunlar arasında antibakteriyel, keratolitik, antiinflamatuvar ve sebum salgısını azaltan pekçok topikal ve sistemik ajan yer almaktadır [86, 87].

i) Topikal tedavi

Lokal retinoidler, benzoil peroksit, azelaik asit, lokal antibiyotikler, sodyum sülfasetamid gibi topikal ajanlar komedonal, orta ve hafif şiddetteki inflamatuvar akne'de kullanılırlar bununla birlikte bu ajanların hem etkileri hem de yan etkileri sistemik tedavilere oranla daha azdır [88]. En sık görülen yan etkileri lokal irritasyondur ve yüksek konsantrasyonda uzun süre kullanıldıklarında salisilat toksisitesi yapabilirler [86].

ii) Sistemik tedaviler

Aknenin papülopüstüler ve nodüler akne gibi orta ve şiddetli formlarında izotretinoin (13-cis retinoik asit/iso), oral antibiyotikler ve hormonal ilaçlar gibi sistemik ajanların kullanımı tercih edilmektedir. İso, ergenlik döneminde ve yetişkinlikte şiddetli akne tedavisinde en çok kullanılan sentetik bir retinoiddir. İzotretinoin mekanizması tam olarak bilinmese de izotretinoinin nükleer reseptörlerin veya nükleer olmayan hedeflerin transaktivasyon aktivitesi yoluyla, sebo-baskılayıcı, komedolitik, anti-inflamatuar ve muhtemelen immünolojik etkilere sahip olduğu belirtilmektedir [20, 21].

İzotretinoin (13-cis-retinoik asit/iso)

A vitamini türevi olan retinoidlerin üyelerinden iso, 20 yılı aşkın süredir orta ve şiddetli AV hastalarının tedavisinde kullanılır. İso, AV lezyonlarının gelişiminden sorumlu olduğu düşünülen major faktörlerin hepsine karşı etkili olabilen tek tedavi ajanıdır ve sebum salınımını, komedon oluşumunu, deride *P. acnes* kolonizasyonunu azaltması yanında özellikle antiinflamatuvar etkinlik gösterdiği bilinmektedir. Ancak bu etkilerini hangi mekanizma ya da mekanizmalar üzerinden meydana getirdiği tam olarak bilinmemektedir [22-24].

Peck ve diğerleri (1979) iso'nun, özellikle şiddetli aknede etkili olduğunu göstermişlerdir. İso, 1982 yılında şiddetli nodüler aknede tedavi ajanı olarak kullanılabileceği yönünde FDA tarafından onaylanmıştır [89] ve o tarihten beri başta AV olmak üzere birçok dermatolojik hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. İnflamatuar akne tedavisinde de en etkili ajan olan iso, topikal ajanlara ve oral antibiyotiklere karşı dirençli, yara izi bırakma riski fazla olan AV ve nodülökistik akneli olgularda oldukça başarılı gösterilen bir tedavi seçeneğidir [22, 89].

Farmakoloji

Oral olarak alınan iso'nun yaklaşık olarak %25'i gastrointestinal kanaldan emilerek karaciğere ulaşır. Daha sonra iso'nun karaciğerde retinol bağlayıcı proteinle birlikte oluşturduğu kompleks kanda prealbumine bağlanırken sebositlerde bağlayıcı proteinlere bağlanarak hücrede hızlı bir biçimde all-trans retinoik asite çevrilir. Aktif olan bu metabolit, nükleer retinoik asit reseptör proteinine bağlanıp sebositin gen ifadenmesini değiştirerek etki gösterir [90, 91]. İso, oral alımdan sonra 2-4 saat içinde serumda en

yüksek konsantrasyonuna ulaşırken etkili eşik konsantrasyonuna yaklaşık olarak 1 hafta içinde ulaşmaktadır. İsonun yarılanma ömrü 10-20 saatken metabolitlerinin yarılanma ömrü 11-50 saattir. İsonun başlıca metabolitleri 4-hidroksi ve 4-oxo-iso'dur ve bunlar karaciğerde glikolizasyon sonucu metabolize edilerek safra ve idrarla dışarı atılır [92].

Etki mekanizması

İso, şiddetli nodüler akne ile birlikte geleneksel tedavilere yanıt vermeyen inflamatuvar akne, topikal tedaviye karşı dirençli olup hem fiziksel hem de psikolojik hasar bırakan orta ve şiddetli akne, şiddetli sebore, tekrarlamaya yatkın kronik akne ve gram negatif follikülit tedavisinde de kullanılır [22, 90]. Sebosit çoğalmasını ve farklılaşmasını inhibe eden iso, sebase bezlerinin boyutlarını küçülterek sebum sentezinde %90 ve üzerinde azalma oluşturur ve böylece *P. acnes* çoğalmasını önler. Aynı zamanda folliküler keratinizasyonu normalleştiren, yeni komedon oluşumunu engelleyen ve antiinflamatuvar etki gösteren iso, akne patogenezindeki majör faktörler üzerinde etkili olan tek tedavi ajanıdır [22, 90, 91].

Doz ve kullanım

Akne tedavisindeki iso dozu 0,1-2,0 mg/kg/gün arasında değişmekle birlikte yan etkilerinin görülme sıklığı fazla olduğu için 1,0 mg/kg/gün üzerindeki dozları genellikle aşmamaktadır. Tedaviye ilk olarak, akne lezyonlarındaki alevlenmeyi önlemek amacıyla 0,5 mg/kg/gün dozuyla başlanıp ardından dozun 1 mg/kg/güne çıkarılması ve biyoyararlanımı artırmak için günlük dozun ikiye bölünüp yemekle birlikte alınması önerilir. Tedaviden sonra nükslerin meydana gelmemesi için kümülatif dozun 120-150 mg/kg/güne ulaşması gerekir [22, 89, 90]. İso tedavisi ile en erken düzelen inflamatuvar lezyonları püstüler lezyonlardır ve inflamatuvar akne lezyonlarında komedonlara oranla daha hızlı düzelme görülürken yüz ve kollardaki lezyonlar gövdeye göre daha hızlı iyileşme gösterir. Tedavinin ilk ayında aknelerde alevlenme görülebilirken ikinci ayında belirgin düzelme olmaktadır [22].

Aknelerde meydana gelen şiddetli alevlenme durumunda 4-6 hafta boyunca 0,5-1,0 mg/kg/gün dozunda oral yolla prednizolon alınması önerilir [22, 90]. Son yıllarda, standart iso tedavisinden sonra hızla nüks eden aknede sürdürülebilirlik elde etmek ve hafif ya da orta şiddette akneli bireylerde düşük doz iso tedavisi kullanılmaktadır ve bu tedavi

sürecinde iso, ayda 1 hafta olmak koşuluyla toplam 6 ay boyunca 0,1-0,5 mg/kg/gün doz aralığında verilmektedir. Bu tedavi protokolünde özellikle mukokutanöz yan etkilerle birlikte TG yüksekliği ve diğer yan etkiler daha düşük oranda izlenmektedir ancak bu uygulamanın en önemli dezavantajı tedaviden sonra yüksek nüks oranlarının görülmesidir [90]. İso tedavisinin ardından nüks etme oranları 3 yıl sonrasına oranla ilk yılda oldukça fazladır [90]. Polikistik over sendromu gibi endokrin bozukluğu olan ya da geç başlangıçlı aknesi olan kadın hastalarda ve gövdesinde akne lezyonu olan hastalarda nüks etme sıklığı daha fazladır [22, 90]. İso tedavisinden sonra idame tedavi amacıyla topikal retinoidlerin kullanılmasının mikrokomedon oluşumunu önleyerek nüksü azaltabileceği söylenmektedir [90].

Yan etkiler

A vitamini fazlalığında görülen yan etkiler iso için de geçerlidir. Teratojenik olan iso'nun kullanıldığı tedavide özellikle deri ve mukozalar olmak üzere kulak, göz, solunum sistemi, kardiyovasküler sistem, gastrointestinal sistem, hematolojik sistem, sinir sistemi, kas ve iskelet sistemi üzerinde yan etkiler oluşmaktadır. İsonun serum lipid profili üzerinde de yan etkisi vardır [93, 94].

İso kullanımında teratojenite haricinde meydana gelen olumsuz etkilerin görülme şiddeti ve sıklığı doza bağlıdır ve ilacın kesilmesiyle birlikte ortadan kalkarlar ve bu olumsuz etkilerin çoğu ilacın kesilmesini gerektirmez. Akne hastalarında doz düzenlemesi ve/veya ilave tedavi rejimleriyle meydana gelen yan etkiler tolere edilebilir. Akut toksisitelerde özellikle mukoz membranlar ve deri etkilenirken, kronik toksisitelerde esas olarak iskelet sistemi etkilenir [22, 90].

İso tedavisinde hastaların hemen hemen hepsinde görülen bulgu keilittir. Yapılan araştırmalarda keilit görülme sıklığı yaklaşık olarak %100 oranında tespit edilmiştir. Hastaların üçte ikisinde tedavi sırasında meydana gelen keilit durumunda burun mukozasında kuruluk ve burun kanaması oluşur [95]. Yapılan bir araştırmada iso'nun neden olduğu ağız kuruluğu ve susuzluk oranı %6 olarak tespit edilmiştir [95]. İso tedavisi alan akneli bireylerin yarısından azında belirli kserozis ve kserozise bağlı olarak kaşıntı oluşabilir. Ancak kserozis genellikle atopi geçmişi olan bireylerde ortaya çıkar [96]. İso, akneli bireylerin yaklaşık olarak üçte birinde konjunktivalarda kuruluğa yol açabilir ve

diğer sebasöz bezlerdeki gibi meibomian bez salgılamasında da azalmaya sebep olabilir ve bu durum gözlerin kurummasına neden olabilir. Kseroftalmi keratit, konjunktivit ve bazı bulgulara korneal ülserasyona sebep olabilir [97].

İso tedavisi alan hastaların yaklaşık olarak %5’inde güneş ışığına karşı artan hassasiyet durumu tespit edilmiştir. Maküler eriteme yol açan ışığa hassasiyet genelde fasiyal dermatit şeklinde ortaya çıkar [98]. İso tedavisi alan akneli bireylerin avuç içi ve ayak tabanlarında sık olmamakla birlikte soyulma olabilir [99] ve nadiren baş ağrısı, letarji ve yorgunluk oluşabilir. Kalıcı hale gelen baş ağrısı görmede bulanıklık, bulantı, kusma gibi şikayetlerle birlikteyse papil ödem ve psödötümör serebri açısından dikkatli olunmalı ve hemen tedaviye son verilmelidir [100]. İso kullanan hastaların yaklaşık olarak %1’inde myalji ve eklem ağrısı oluşur ve kas ağrısı genelde fiziksel olarak aktif olan ve spor yapan kişilerde görülür [99-101].

Yapılan çalışmalarda iso kullanımına bağlı çeşitli psikolojik bozukluklar (depresyon, psikoz, irritabilite, intihar düşüncesi), kardiyak bozuklukları, nonspesifik gastrointestinal sistem bozuklukları, enfeksiyonlar, duyma bozuklukları gibi sık görülmeyen yan etkilerin de ortaya çıktığı rapor edilmiştir [97, 100, 101]. Aynı zamanda iso kullanımına bağlı doz ve tedavi süresiyle ilgili olarak hiperosteoze ve kemik toksisitesi rapor edilmiş yan etkiler arasındadırlar. İso tedavisi alan hastaların bazılarında, hemorajik destrüktif deri lezyonlarıyla birlikte ortaya çıkan ateş, poliartralji, lökositoz, poliartralji ile karakterize edilen ve diğer bir akne çeşidi olan akne fulminans oluşabilir [102, 103].



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Deney Hayvanları

Çalışmada Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden (GÜDAM) temin edilmiş olan, ağırlıkları 220 ± 35 g arasında değişen 32 adet adolesan, dişi Wistar albino rat kullanıldı. Deneyler GÜDAM laboratuvarında gerçekleştirildi. Denekler ayrı kafeslerde 12 saat aydınlık-karanlık siklusunda, 24 ± 2 °C'lik ortamda, standart rat yemi ve musluk suyu ile serbest olarak beslendi.

3.2 Deneyde Kullanılan Kimyasal

20 mg iso içeren kapsüller (Roaccutane) açılıp A sınıfı hacim şişelerine aktarıldı ve istenen konsantrasyonda süspansiyon elde etmek için belirli hacimdeki susam yağında çözüldü [16].

3.3 Deney Protokolü / Gruplandırma

Grup 1: (n=8) Kontrol Grubu (KG)

Grup 2: (n=8) Susam Yağı (Çözücü) Grubu (SYG)

Grup 3: (n=8) Düşük Doz Grubu (DDG) (7,5 mg/kg/gün)

Grup 4: (n=7) Yüksek Doz Grubu (YDG) (15 mg/kg/gün)

Grup 1: (n=8) Kontrol Grubu

- Birinci günden itibaren 30 gün boyunca boş gavaj uygulaması (gavaj stresi) yapıldı.

Grup 2: (n=8) Susam Yağı (Çözücü) Grubu

- Birinci günden itibaren 30 gün boyunca 1,42 ml susam yağı gavaj uygulaması ile verildi.

Grup 3: (n=8) Düşük Doz Grubu

- Birinci günden itibaren 30 gün boyunca 1,42 ml süspansiyon hacmi içinde 7,5 mg/kg/gün iso gavaj uygulaması ile verildi.

Grup 4: (n=7) Yüksek Doz Grubu

- Birinci günden itibaren 30 gün boyunca 1,42 ml süspansiyon hacmi içinde 15

mg/kg/gün iso gavaj uygulaması ile verildi.

Deneyin 14. gününde yüksek doz grubundaki deneklerden biri, yüzünde oluşan şiddetli lezyonlardan ötürü deney dışı bırakıldı. Bu yüzden istatistiksel hesaplamalar kontrol grubundaki 8, susam yağı (çözücü) grubundaki 8, düşük doz grubundaki 8 ve yüksek doz grubundaki 7 denekten elde edilen veriler ile yapıldı.

3.4 Deneklerde Ötenazi

Deneklerin her birine ketamin (45 mg/kg i.m) ve xylazine (5 mg/kg i.m) ile derin anestezi uygulanarak sırtüstü pozisyonda yatırılan sıçanlar intrakardiyak kan alınması ile feda edildi.

3.5 Histokimyasal Takip Yöntemi

Diseksiyonu sonrasında çıkarılan ovaryum dokuları Bouin's fiksatifinde tespit edildi. Ardından doku örnekleri 6 saatte bir yenilenen lityum karbonatlı %70'lik alkolle 24 saat süresince yıkandı. Suyu uzaklaştırmak amacıyla doku örnekleri artan alkol serilerinden (%50, %70, %80, %96, %100) geçirildi. Bu işlem sonunda dokular parlatılmaları için ksilole alındı ve ardından erimiş parafine gömüldü.

Her bir deneğe ait örnekler için hazırlanan bloklardan 4 mikron (μ) kalınlığında kesitler alınarak histokimyasal inceleme için periyodik asit-schiff (PAS) reaksiyonu gerçekleştirildi.

PAS reaksiyonu için gerekli olan solüsyonların hazırlanması

Periyodik asit çözeltisi

1 g periyodik asit, 100 ml distile suyun içinde çözüldü.

Sodyum (potasyum) metabisülfid

1 g sodyum (potasyum) metabisülfid 120 ml distile suda çözüldü. Üzerine 0,85 ml HCl

(konsantre) eklendi ve daha sonra bunun üzerine de 100 ml distile su eklendi. 110 ml + 110 ml olacak şekilde 2 şale halinde kullanıldı.

1 N HCl

85,6 ml HCl + 914,4 ml distile su veya 8,56 ml HCl + 91,44 ml distile su ile hazırlandı.

Schiff Reaktifi

100 ml kaynamış su içinde 0,5 g bazik fuksin çözüldü ve 5 dakika karıştırıldı. Sonrasında çözelti bir süre daha ısıtılırken karıştırıldı. Çözelti 50 °C'ye soğuyana kadar karıştırıldı ve 1 N HCl (15 ml) eklendi. Sıcaklık 25 °C'ye düştüğünde çözeltiye 0,5 g sodyum (potasyum) metabisülfite eklendi ve çözelti tekrar karıştırıldı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında karanlık ortamda 24 saat bekletildi. 24 saat bekleyen çözeltiye 300 mg aktif kömür eklendi ve 10 dakika karıştırıldı. Çözelti daha sonra Whatman filtre kağıdından süzüldü.

PAS reaksiyonu genel protokolü

İmmünohistokimyasal işaretlemeler için 4 µm kalınlığındaki ovaryum dokuları polilizinli lamlara alınarak 62 °C'deki etüvde 1 saat bekletildi. Lamlar deparafinizasyonu tamamlamak için 2 kez 5'er dakika ksilende bekletildi. Daha sonra 3'er dakika (dk) sırasıyla %100, %96, %90, %80, %70 ve %50'lik alkol serilerinden geçirildi. Rehidrate edilen dokuları alkolden arındırmak için kesitler 2 kez 5'er saniye (sn) distile suda yıkandı. Ardından doku örnekleri 20 dk boyunca periyodik asit çözeltisinde bekletilip 10 dk akan musluk suyunda yıkama yapıldı. Doku kesitleri sonrasında karanlık ortam ve oda sıcaklığındaki Schiff reaktifi içerisinde 25 dk bekletilip 2 kez 5'er dk karanlık ortam ve 4 °C'<ç deki sodyum metabisülfitte yıkandı ve ardından doku örneklerine 15 dk boyunca akan musluk suyu ile yıkama yapıldı. Daha sonra 2-3 dk distile suda bekletilen kesitler tekrar 1-2 dk boyunca akan musluk suyunda yıkandı. Hematoksilen ile 1 dk çekirdek boyaması yapıldı. Sonrasında 10 dk akan musluk suyunda bekletilen kesitler tekrar 1 dk boyunca distile suyunda yıkandı. Yıkanan kesitler artan alkol serilerinden geçirildikten sonra ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı. Sonuç olarak nükleuslar mor, hücre sitoplazması pembe ve glikoprotein yapısındaki zone pellusida magenta rengine boyandı.

Doku kesitleri, Leica DM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sistemi ve Leica LAS V4.9 programı ile değerlendirilip fotoğraf çekildi. PAS reaksiyonuyla genel doku yapısı incelendi ve zona pellusida yapısı değerlendirildi. Her bir denek için zona pellusida kalınlığını ölçmek amacıyla 400X büyütmede multilaminar primer follikülerin fotoğrafları çekildi, 3 farklı ölçüm bölgesi seçildi ve kalınlık ölçümü yapıldı [104, 105].

3.6 İmmünohistokimyasal Yöntem

Tüm çalışma gruplarındaki ovaryum dokularından elde edilen 4 µ kalınlığındaki kesitlerde, iso uygulamasının oosit maturasyonu üzerine etkilerini immünohistokimyasal olarak ortaya koymak için BMP-15 (Kemik morfogenetik protein 15) ve GDF-9 (Büyüme ve farklılaşma faktörü 9) işaretlemeleri yapıldı [106].

BMP-15 ve GDF-9 immün işaretlemeleri

İmmünohistokimyasal işaretlemeler için 4 µm kalınlığındaki ovaryum dokuları polilizinli lamlara alınarak 62 °C'deki etüvde 1 saat bekletildi. Lamlar deparafinizasyonu tamamlamak için 2 kez 15'er dakika ksilende bekletildi. Daha sonra 5'er dakika sırasıyla %100, %96, %90, %80 ve %70'lik alkol serilerinden geçirildi. Rehidrate edilen dokuları alkolden arındırmak için kesitler 2 kez 5'er dakika distile sudan geçirildi. Daha sonra doku içerisinde reseptör bölgelerinin açığa çıkarılmasını sağlamak amacıyla, dokulara sitrat tamponu (pH 6,0) ile mikrodalga fırında retrieval işlemi uygulandı. Mikrodalgadan çıkan sitrat tamponundaki dokular 20 dakika dışarıda soğumaya bırakıldı. Daha sonra dokular sitrattan arındırılmak için 2 kez 5'er dakika distile sudan geçirildi. Dokuların etrafı PAP-Pen ile çevrilerek nemli ortam olan immünohistokimya barına dizildi. Dokular 3 kez 3'er dakika PBS (Phosphate Buffer Saline) (pH 7,4) ile yıkandı. Daha sonra, 15 dakika %3'lük hidrojen peroksit ile etkin bırakılan dokulardan endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. İşlem sonrasında PBS ile camlar 3 kez 3'er dakika yıkandı. Yıkanan camlara 5 dakika UltraV block (Cat: TP-125-HL, Lot: PHL170627, UltraVision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent/HRP (RTU), Thermo Fisher Scientific, USA) uygulanarak, özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Bu işlemten sonra dokular yıkanmadan primer antikor aşamasına geçildi. Bloklama aşamasının ardından kesitler yıkanmadan, sırasıyla 1/200 ve 1/100 oranında hazırlanan GDF-9 (Cat: bs-4720R, Lot: AG03318110, Bioss Inc., Woburn, MA, USA) ve BMP-15 (Cat: bs-6612R, Lot: AG11087339, Bioss

Inc., Woburn, MA, USA) primer antikorlarıyla 4 °C'de 1 gece inkübe edildi. Primer antikordan sonra camlar 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. Daha sonra 10 dakika biotinli sekonder antikör (Cat: TP-125-HL, Lot: PHL170627, UltraVision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent/HRP (RTU), Thermo Fisher Scientific, USA) uygulanarak sekonder antikörün primer antikora bağlanması sağlandı. İşlem sonunda dokular yine 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. Sonra 10 dakika streptavidin uygulandı ve işlem sonunda dokular 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. Son olarak dokulara diaminobenzedin (DAB) substratı içeren DAB kromojeni (Cat: TA-125-HD, Lot: HD31722, UltraVision Detection System Large Volume DAB Substrate System (RTU), Thermo Fisher Scientific, USA) damlatılarak gözle görülebilir immün tepkimenin ortaya çıkması sağlandı. 2 kez 5'er dakika distile su ile yıkanan dokularda zemin boyası olarak Mayer's Hematoksilen'i kullanılarak distile su ile tekrar yıkama yapıldı. DAB ile boyanan lamalar azalan alkol serilerinden geçirildi. Sonrasında 20 dakika ksilende bekletilen lamlara entellan damlatılıp lamel ile kapatıldı.

Doku kesitleri, Leica DM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sistemi ve Leica LAS V4.9 programı ile değerlendirilip fotoğraf çekildi. GDF-9 ve BMP-15 ile immünohistokimyasal olarak işaretlenen her bir doku kesitindeki pozitif tutulum gözlenen oositler sayıldı. Her bir kesit için immünohistokimyasal tutulum gözlenen oosit sayısı toplam oosit sayısına göre oranlanarak yüzdesi alındı.

3.7 İstatistiksel Yöntem

Parametrik değişkenlerin karşılaştırması bağımlı örneklem t-testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren değişkenlerin tanımlanmasında ortalama ve standart sapma değerleri kullanıldı. Nonparametrik değişkenlerin karşılaştırması Wilcoxon işaret sırası testi ile değerlendirildi. Normal dağılım göstermeyen değişkenlerin tanımlanmasında çeyreklikler arası genişlik olan ortanca değeri kullanıldı.

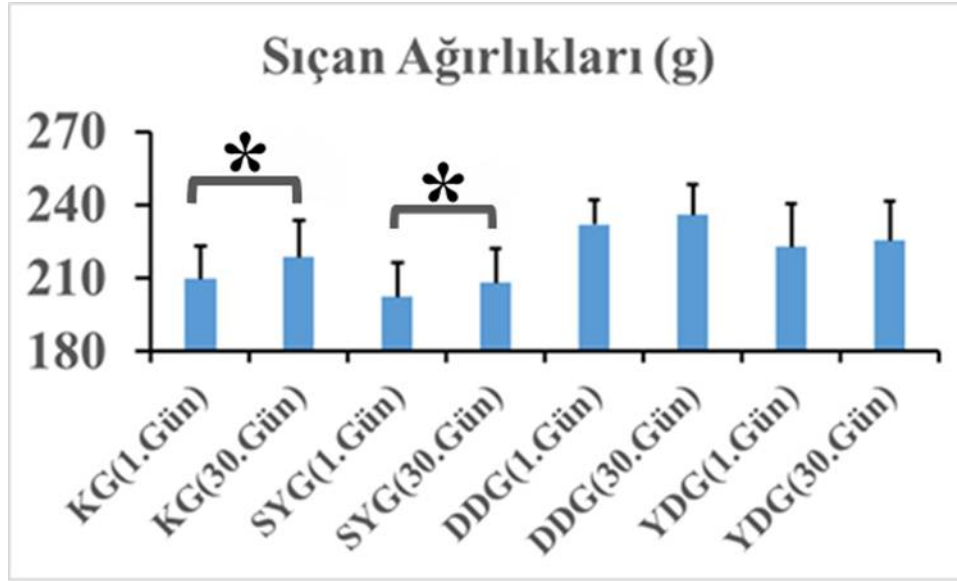
Parametrik test varsayımları gösteren değişkenlerin karşılaştırılması için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. ANOVA ile fark bulunduğu takdirde farkın kaynağı Holm-Sidak yöntemi ile değerlendirildi. İstatistiksel analiz ve hesaplamalar SigmaStat 3.5 (Systat Software, Inc., USA) ile yapıldı. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ değeri kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1 Vücut Ağırlıklarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Sıçanların deney öncesi ve deney sonrası vücut ağırlıkları ölçüldü.



Şekil 4.1. Sıçanların deney başlangıcı ve deney sonu ağırlıkları

Çizelge 4.1. Sıçanların deney başlangıcı ve deney sonu ağırlıklarının gruplara göre standart sapma değerleri

	N	Standart Sapma
		Sıçan Ağırlıkları (g)
Kontrol Grubu (1. Gün)	8	13,606
Susam Yağı (Çözücü) Grubu (1. Gün)	8	13,928
Düşük Doz Grubu (1. Gün)	8	10,029
Yüksek Doz Grubu (1. Gün)	7	17,604
Kontrol Grubu (30. Gün)	8	14,937
Susam Yağı (Çözücü) Grubu (30. Gün)	8	13,688
Düşük Doz Grubu (30. Gün)	8	12,479
Yüksek Doz Grubu (30. Gün)	7	16,040

Deney başlangıcı ve deney sonu ağırlıklarının istatistiksel farklılıkları bağımlı örneklem t-testi ve Wilcoxon işaret sırası testi ile değerlendirildi. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi. Parametrik test varsayımları gösteren değişkenlerin karşılaştırılması için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. ANOVA ile fark bulunduğu takdirde farkın kaynağı Holm-Sidak yöntemi ile değerlendirildi (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Sıçanların deney başlangıcı ve deney sonu ağırlıklarının istatistiksel farklılıkları (İstatistiksel olarak $P < 0,05$ değeri anlamlı kabul edilmiş olup koyu karakterlerle vurgulanmıştır) α : Bağımlı örneklem t-testi, β : Wilcoxon işaret sırası testi

	P Değeri		P Değeri
KG (1. Gün) / KG (30. Gün)	0,006^a	SYG (1. Gün) / YDG (1. Gün)	0,134 ^a
KG (1. Gün) / SYG (1. Gün)	0,195 ^{β}	DDG (1. Gün) / YDG (1. Gün)	0,299 ^a
KG (1. Gün) / DDG (1. Gün)	0,011^a	SYG (1. Gün) / SYG (30. Gün)	0,024^a
KG (1. Gün) / YDG (1. Gün)	0,255 ^a	DDG (1. Gün) / DDG (30. Gün)	0,322 ^a
KG (30. Gün) / SYG (30. Gün)	0,180 ^a	YDG (1. Gün) / YDG (30. Gün)	0,330 ^a
KG (30. Gün) / DDG (30. Gün)	0,047^a	SYG (30. Gün) / DDG (30. Gün)	<0,001^a
KG (30. Gün) / YDG (30. Gün)	0,402 ^a	SYG (30. Gün) / YDG (30. Gün)	0,140 ^a
SYG (1. Gün) / DDG (1. Gün)	<0,001^a	DDG (30. Gün) / YDG (30. Gün)	0,186 ^a

Sıçanların deney başlangıcı ağırlıkları incelendiğinde grupların ağırlık ortalamaları ve standart sapma değerleri kontrol grubunda 207 ± 18 g ve 13,606; susam yağı (çözücü) grubunda 205 ± 20 g ve 13,928; düşük doz grubunda $234,5 \pm 15,5$ g ve 10,029; yüksek doz grubunda $218,5 \pm 27,5$ g ve 17,604 olarak saptandı (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1).

Sıçanların deney sonu ağırlıkları incelendiğinde grupların ağırlık ortalamaları ve standart sapma değerleri kontrol grubunda $214,5 \pm 18,5$ g ve 14,937; susam yağı (çözücü) grubunda 212 ± 18 g ve 13,688; düşük doz grubunda 235 ± 20 g ve 12,479; yüksek doz grubunda 221 ± 22 g ve 16,040 olarak saptandı (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1).

İstatistiksel olarak kontrol grubundaki deneklerin başlangıç ve deney sonu ağırlıkları karşılaştırıldığında anlamlı fark bulundu ($p = 0,006$) (Çizelge 4.2).

Susam yağı (çözücü) grubundaki deneklerin başlangıç ve deney sonu ağırlıkları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p=0,024$) (Çizelge 4.2).

Düşük doz grubundaki deneklerin başlangıç ve deney sonu ağırlıkları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,322$) (Çizelge 4.2).

Yüksek doz grubundaki deneklerin başlangıç ve deney sonu ağırlıkları karşılaştırıldığında ise yine istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,330$) (Çizelge 4.2).

Buna göre; istatistiksel olarak kontrol grubu deney sonu ağırlık ortalamaları ile susam yağı grubu deney sonu ortalamaları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,180$) (Çizelge 4.2).

Kontrol grubu ile düşük doz grubundaki deneklerin deney sonu vücut ağırlıkları ortalamaları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ve düşük doz grubundaki deneklerin ağırlık ortalamaları daha fazlaydı ($p=0,047$) (Çizelge 4.2).

Kontrol grubu ile yüksek doz grubu deneklerin 30. günde vücut ağırlık ortalamaları karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,402$) (Çizelge 4.2).

Susam yağı grubuyla düşük doz grubunun deney sonu ağırlık ortalamaları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ve düşük doz grubundaki deneklerin ağırlık ortalamaları daha fazlaydı ($p<0,001$) (Çizelge 4.2).

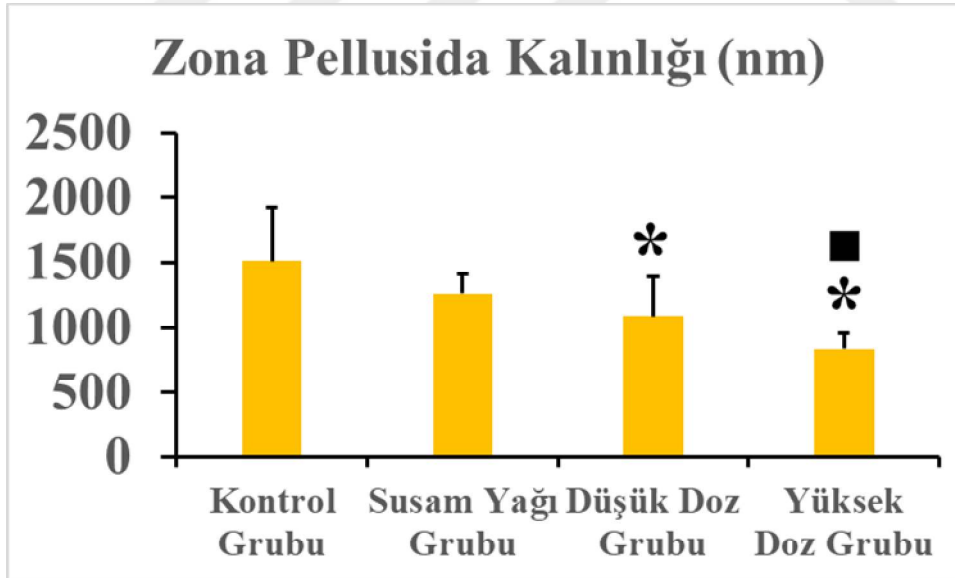
Susam yağı grubuyla yüksek doz grubunun deney sonu ağırlık ortalamaları karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,140$) (Çizelge 4.2).

Düşük doz grubu deneklerin deney sonu ağırlık ortalamaları yüksek doz grubu deneklerin ağırlık ortalamaları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p=0,186$) (Çizelge 4.2)

İstatistiksel olarak anlamlı farklılık 30. gün kontrol grubu ile düşük doz grubu arasında ve susam yağı ile düşük doz arasında tespit edilmiştir. Deneklerin gruplara göre dağılımı randomize olarak yapılmasına rağmen 30. günün sonunda düşük doz grubundaki deneklerin vücut ağırlıklarının kontrol ve susam yağı gruplarındaki deneklerin vücut ağırlıklarından fazla olması düşük doz grubundaki deneklerin başlangıç ağırlıklarının zaten yüksek değerde ölçülmüş olması ile açıklanabilir kanısındayız.

4.2 Morfometrik Bulgular ve Zona Pellusida Kalınlığının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Bu çalışmada zona pellusida kalınlıklarının ölçülebilmesi için ovaryum kesitlerinde PAS reaksiyonu uygulaması yapılmış ve multilaminar primer folliküllerdeki zona pellusida kalınlıkları ölçülerek istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla her bir denekten elde edilen kesitler incelenerek multilaminar primer folliküler 400X büyütmede fotoğraflanmıştır. Literatüre uygun olarak her multilaminar primer folliküllerdeki zona pellusidalar üzerinde 3 farklı ölçüm bölgesi seçilerek kalınlık ölçümü yapıldı.



Şekil 4.2. Kontrol, susam yağı (çözücü), düşük doz ve yüksek doz grubunda bulunan multilaminar primer folliküllerdeki zona pellusida kalınlıklarının karşılaştırması (* işareti kontrol grubu ile susam yağı (çözücü), düşük doz ve yüksek doz grupları arasındaki istatistiksel karşılaştırmayı göstermek için kullanılmıştır. ■ işareti ise susam yağı (çözücü) grubu ile kontrol, düşük doz ve yüksek doz grupları arasındaki istatistiksel karşılaştırmayı göstermek için kullanılmıştır)

Çizelge 4.3. Multilaminar primer folliküllerdeki zona pellusida kalınlıklarının gruplara göre standart sapma değerleri

	N	Standart Sapma
		Zona Pellusida Kalınlığı (µm)
Kontrol Grubu	8	413,382
Susam Yağı (Çözücü) Grubu	8	155,450
Düşük Doz Grubu	8	309,425
Yüksek Doz Grubu	7	124,025

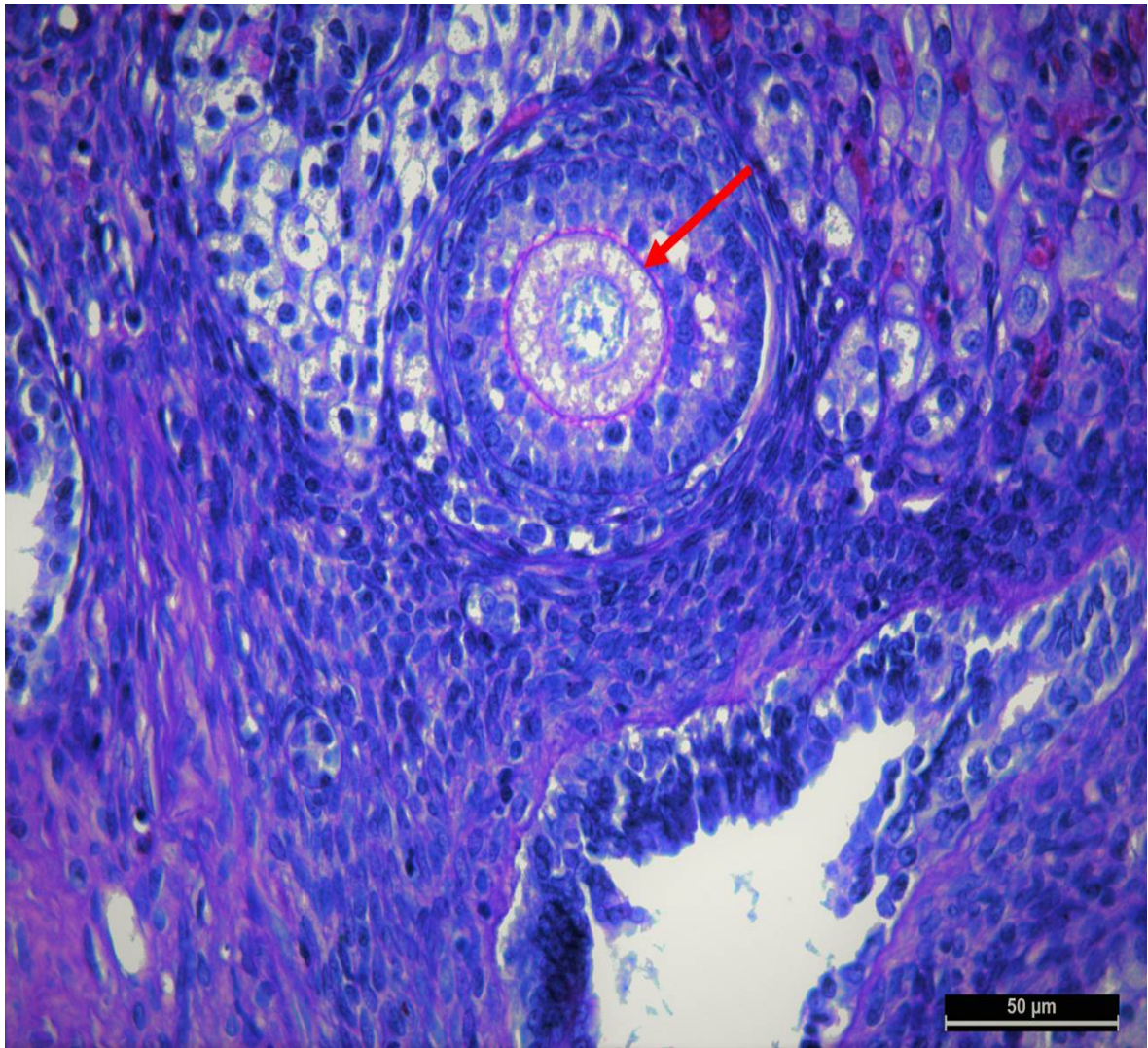
Zona pellusida kalınlığına ait değerlerin istatistiksel farklılıkları bağımlı örneklem t-testi ile değerlendirildi. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi. Parametrik test varsayımları gösteren değişkenlerin karşılaştırılması için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. ANOVA ile fark bulunduğu takdirde farkın kaynağı Holm-Sidak yöntemi ile değerlendirildi (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Multilaminar primer folliküllerdeki zona pellusida kalınlıklarının gruplar arası karşılaştırması (İstatistiksel olarak $P < 0,05$ değeri anlamlı kabul edilmiş olup koyu karakterlerle vurgulanmıştır) α : Bağımlı örneklem t-testi

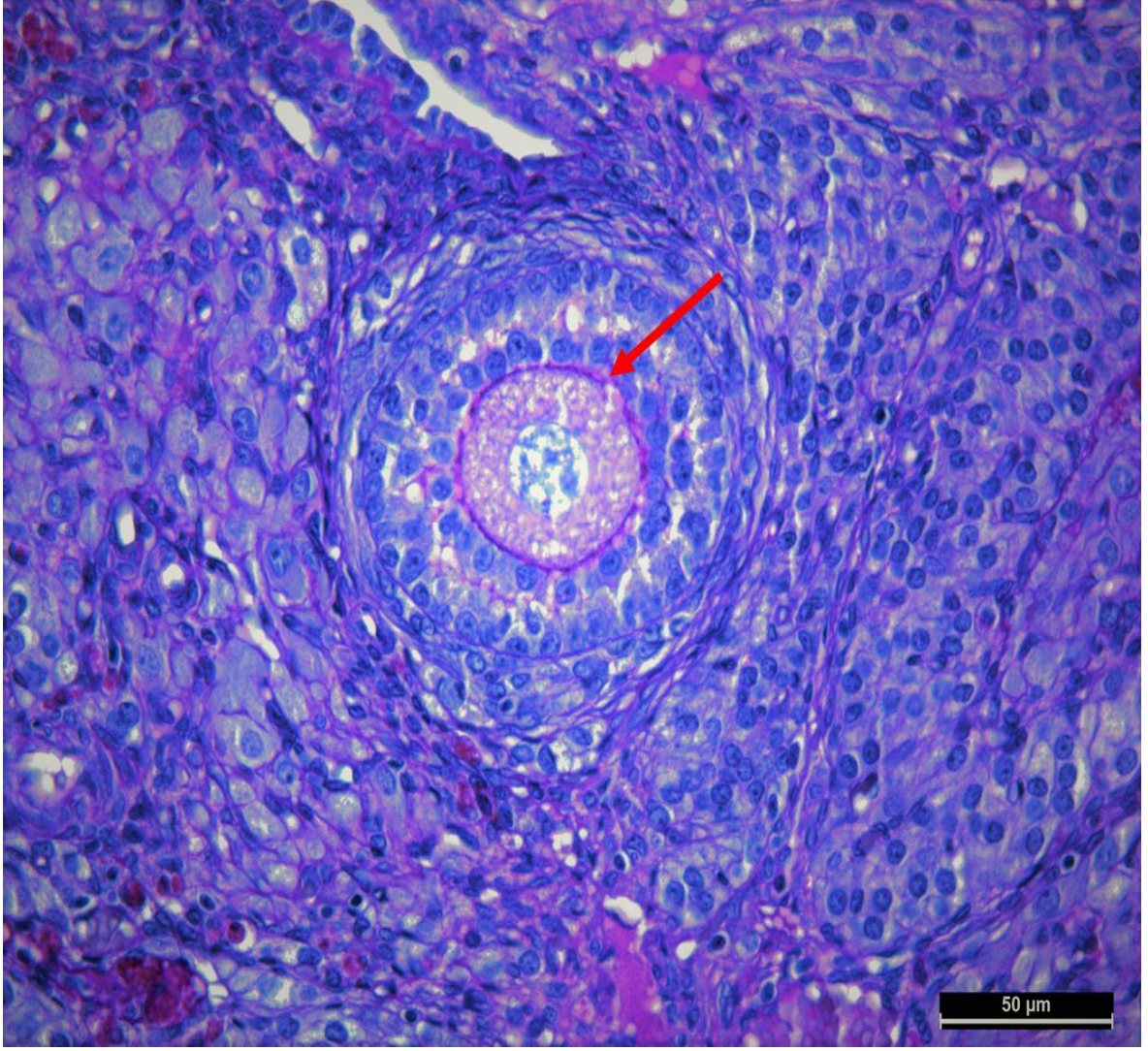
	Zona Pellusida Kalınlığı (µm) (P Değeri)
Kontrol Grubu / Susam Yağı (Çözücü) Grubu	0,126 ^a
Kontrol Grubu / Düşük Doz Grubu	0,046^a
Kontrol Grubu / Yüksek Doz Grubu	0,002^a
Susam Yağı (Çözücü) Grubu / Düşük Doz Grubu	0,246 ^a
Susam Yağı (Çözücü) Grubu / Yüksek Doz Grubu	<0,001^a
Düşük Doz Grubu / Yüksek Doz Grubu	0,095 ^a

Deney gruplarına göre zona pellusida kalınlığına ait sırasıyla kalınlık ortalamaları ve standart sapma değerleri kontrol grubunda $1546,1645 \pm 694,329$ ve 413,382; susam yağı (çözücü) grubunda 1327 ± 258 ve 155,450; düşük doz grubunda $1211,5 \pm 364,5$ ve 309,425; yüksek doz grubunda $833,5 \pm 186,5$ ve 124,025 olarak saptandı (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.2).

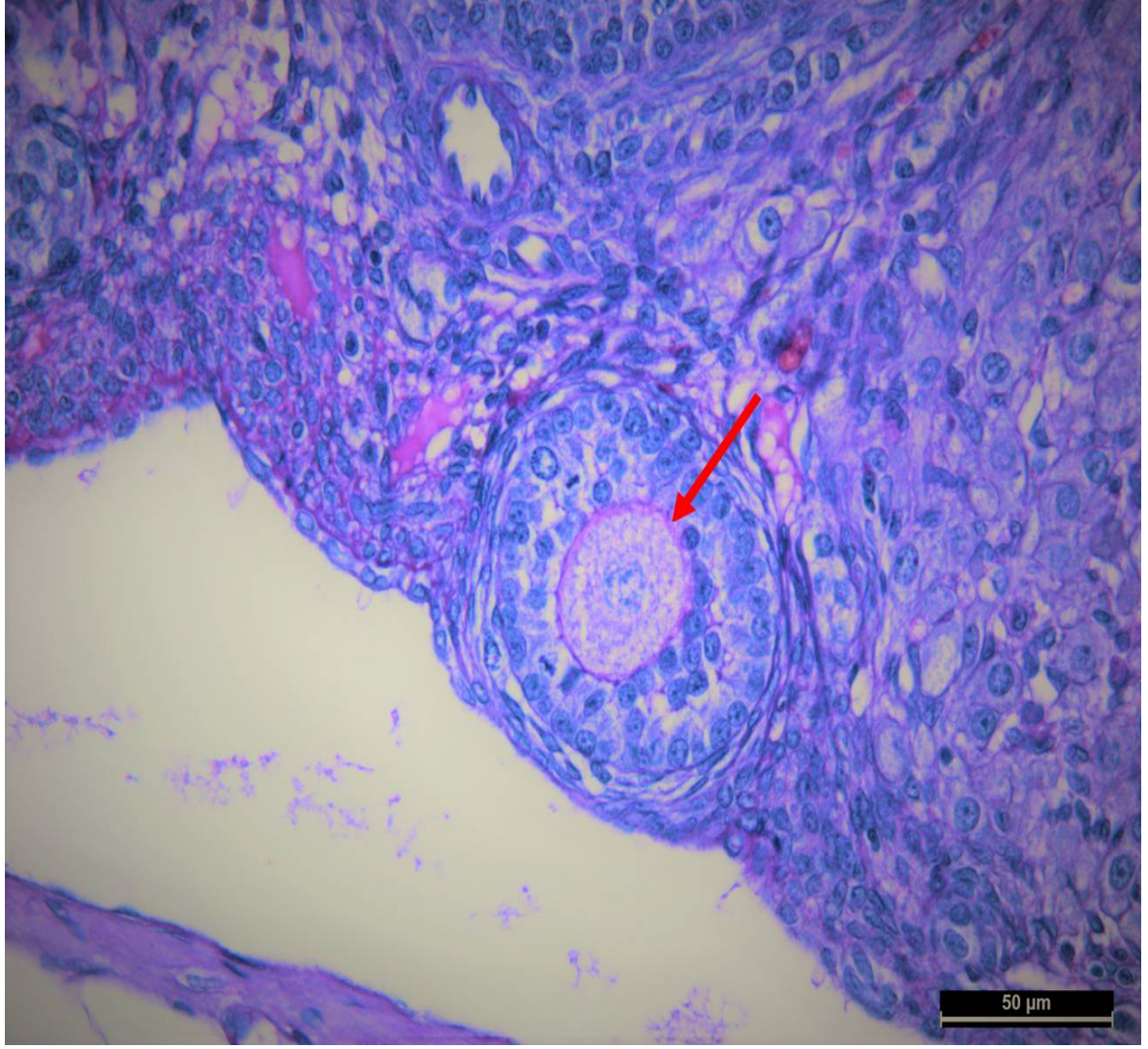
Kontrol grubu ile susam yağı (çözücü) grubu zona pellusida kalınlığı açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,126$). Kontrol grubu ile düşük doz grubu karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p=0,046$). Kontrol grubu, yüksek doz grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p=0,002$). Düşük doz grubu ile yüksek doz grubu karşılaştırıldığında zona pellusida kalınlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamakla ($p=0,095$) birlikte yüksek doz grubu istatistiksel olarak fazla anlamlı farklılık göstererek düşük doz grubuna göre daha inceydi (Çizelge 4.4).



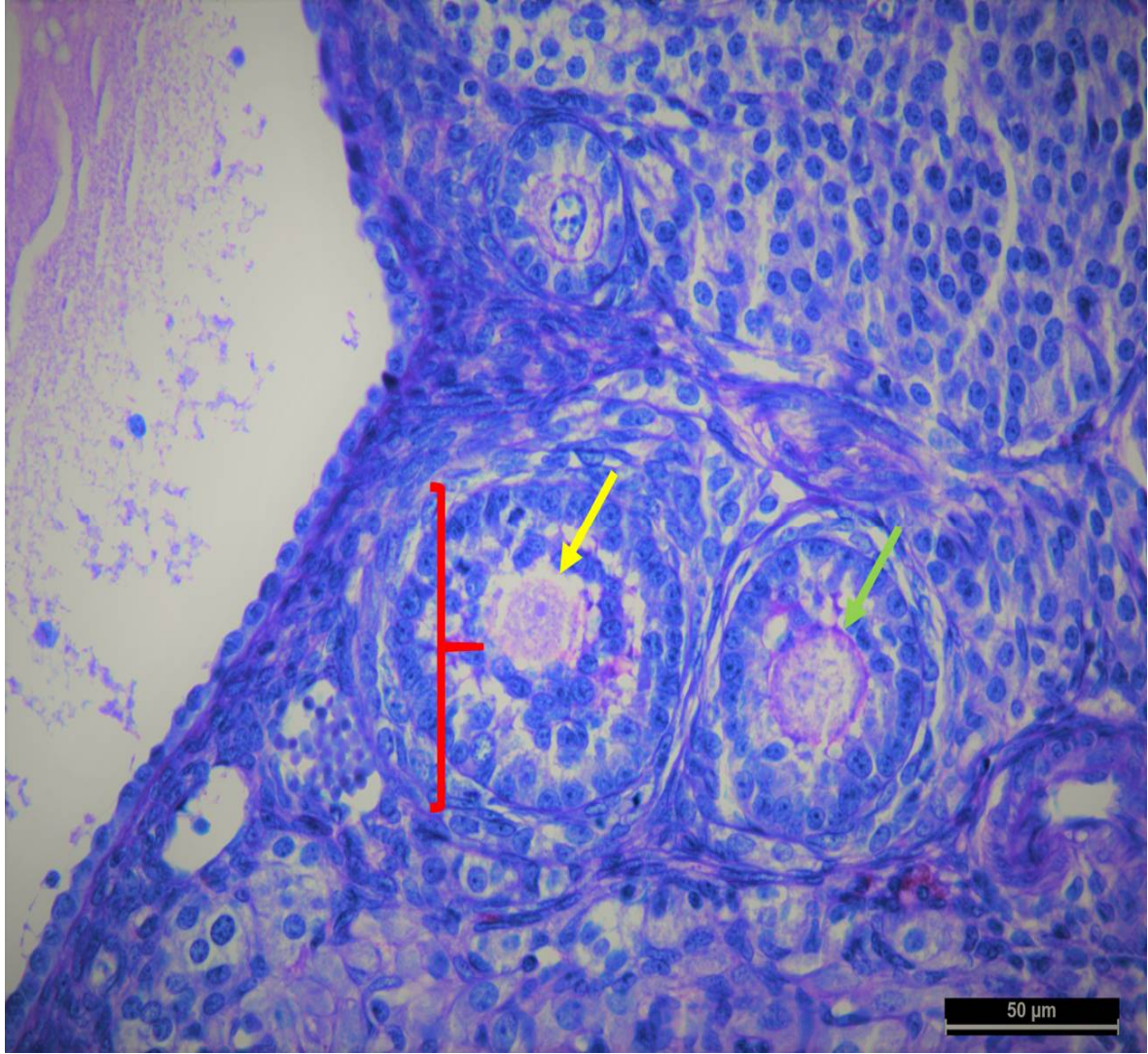
Resim 4.1. Kontrol grubunda multilaminar primer follikülde gelişen zona pellusida (kırmızı ok) PAS X400



Resim 4.2. Susam yağı grubunda multilaminar primer follikülde gelişen zona pellusida (kırmızı ok) PAS X400



Resim 4.3. Düşük doz grubunda multilaminar primer follikülde gelişen zona pellusida (kırmızı ok) PAS X400

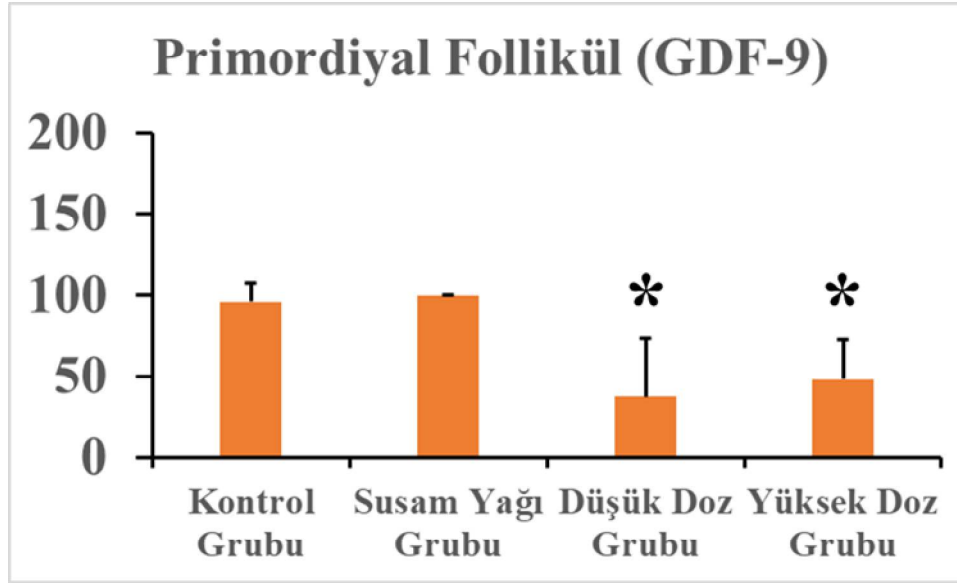


Resim 4.4. Yüksek doz grubunda zona pellusidası gelişmeyen bir multilaminar primer follikülde (sarı ok) aynı zamanda folliküler hücrelerinin organizasyonunda düzensizlik (kırmızı parantez), zona pellusidası gelişen ancak kalınlığında belirgin düzensizlikler gösteren bir diğer multilaminar primer follikül (yeşil ok) (PAS) X400

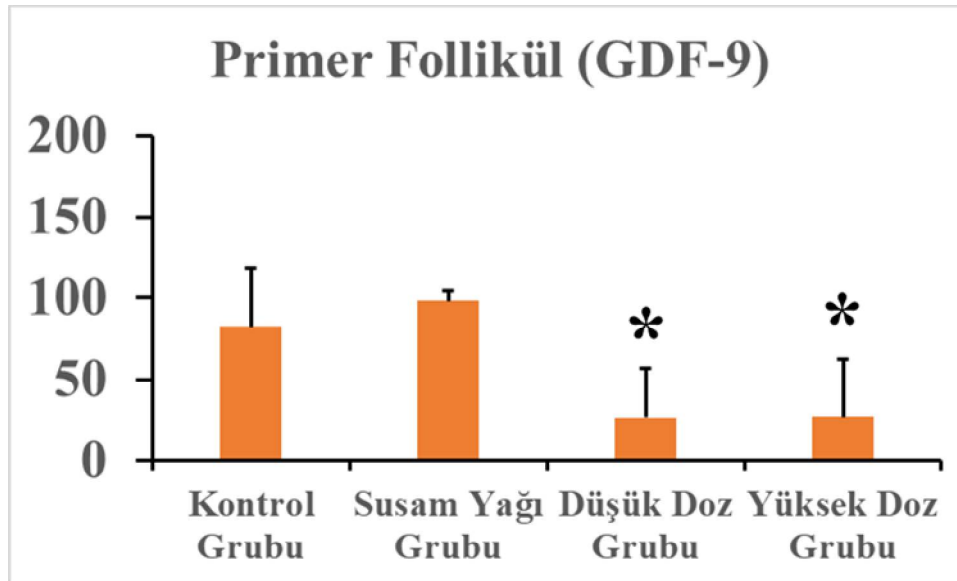
PAS reaksiyonu uygulanan kesitlerde değerlendirilen multilaminar primer folliküller incelendiğinde kontrol grubu ve susam yağı grubundaki folliküllerin tüm yapısal elemanlarının normal histomorfolojik yapıda olduğu gözlenirken, düşük doz grubundaki zona pellusidanın kompakt yapısını kısmen kaybettiği (Resim 4.3) gözlemlendi. Yüksek doz grubunda ise bazı multilaminar primer folliküllerde zona pellusida ya hiç gelişmemiş ya da düzenli morfolojik yapısını tamamen kaybetmişti. Bu grupta ayrıca multilaminar primer folliküllerde yer alan follikül hücreleri arasındaki bağlantı birimlerinin muhtemel dejenerasyonu sonucu hücreler arası açılmalar ve intrasellüler vakuolizasyonlar saptandı (Resim 4.4)

4.3 GDF-9 Bulguları ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

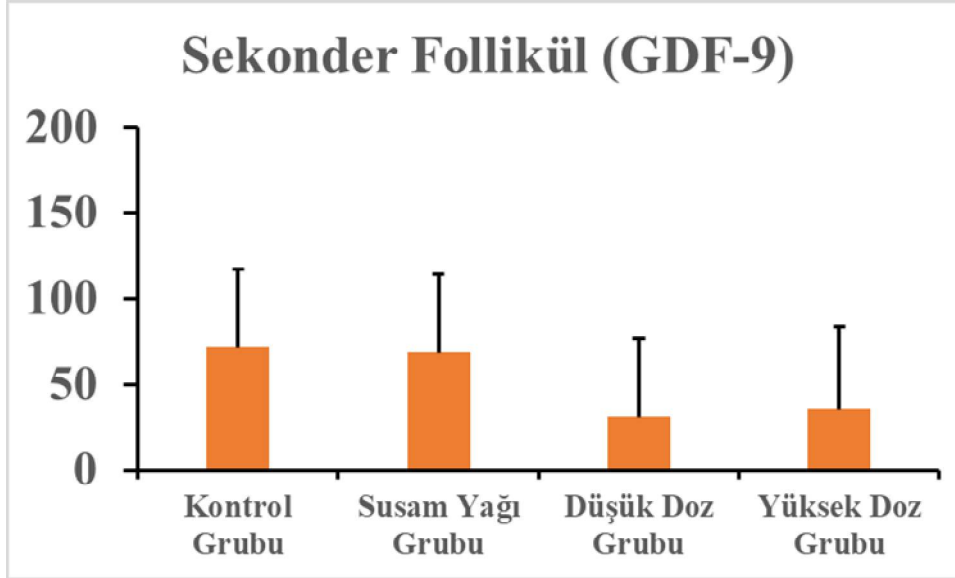
GDF-9 ile immünohistokimyasal olarak işaretlenen her bir doku kesitindeki pozitif tutulum gözlenen oositler sayıldı. Her bir kesit için immünohistokimyasal tutulum gözlenen oosit sayısı toplam oosit sayısına göre oranlanarak yüzdesi alındı.



Şekil 4.3. Kontrol, susam yağı (çözücü), düşük doz ve yüksek doz grubundaki primordiyal folliküllerde bulunan GDF-9 tutulumlu primer oositlerin karşılaştırması



Şekil 4.4. Kontrol, susam yağı (çözücü), düşük doz ve yüksek doz grubundaki primer folliküllerde bulunan GDF-9 tutulumlu primer oositlerin karşılaştırması



Şekil 4.5. Kontrol, susam yağı (çözücü), düşük doz ve yüksek doz grubundaki sekonder folliküllerde bulunan GDF-9 tutulumlu primer oositlerin karşılaştırması

Çizelge 4.5. Primordiyal, primer ve sekonder folliküllerde bulunan primer oositlerdeki GDF-9 tutulumlarının gruplara göre standart sapma değerleri

	N	Standart Sapma		
		Primordiyal Follikül	Primer Follikül	Sekonder Follikül
Kontrol Grubu	8	11,785	36,422	45,180
Susam Yağı (Çözücü) Grubu	8	0,000	5,893	45,806
Düşük Doz Grubu	8	36,092	30,584	45,806
Yüksek Doz Grubu	7	24,439	35,064	47,559

GDF-9 immüntutulumuna ait değerlerin istatistiksel farklılıkları bağımlı örneklem t-testi ve Wilcoxon işaret sırası testi ile değerlendirildi. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi. Parametrik test varsayımları gösteren değişkenlerin karşılaştırılması için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. ANOVA ile fark bulunduğu takdirde farkın kaynağı Holm-Sidak yöntemi ile değerlendirildi (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Primordiyal, primer ve sekonder folliküllerde bulunan primer oositlerdeki GDF-9 tutulumlarının gruplar arası karşılaştırması (İstatistiksel olarak $P<0,05$ değeri anlamlı kabul edilmiş olup koyu karakterlerle vurgulanmıştır)
 α : Bağımlı örneklem t-testi, β : Wilcoxon işaret sırası testi

	GDF-9 (P Değeri)		
	Primordiyal Follikül	Primer Follikül	Sekonder Follikül
Kontrol Grubu / Susam Yağı (Çözücü) Grubu	1,0 ^{β}	0,5 ^{β}	0,917 ^{α}
Kontrol Grubu / Düşük Doz Grubu	0,002^{α}	0,01^{α}	0,071 ^{α}
Kontrol Grubu / Yüksek Doz Grubu	0,002^{α}	0,01^{α}	0,25 ^{β}
Susam Yağı (Çözücü) Grubu / Düşük Doz Grubu	0,002^{α}	<0,001^{α}	0,156 ^{β}
Susam Yağı (Çözücü) Grubu / Yüksek Doz Grubu	0,031^{β}	0,001^{α}	0,253 ^{α}
Düşük Doz Grubu / Yüksek Doz Grubu	0,539 ^{α}	0,813 ^{β}	0,631 ^{α}

Deney gruplarına göre primordiyal folliküllerde yer alan primer oositlerdeki GDF-9 immüntutulumuna ait sırasıyla ortalama ve standart sapma değerleri kontrol grubunda 95,833 ve 11,785; susam yağı (çözücü) grubunda 100,000 ve 0,000; düşük doz grubunda 37,351 ve 36,092; yüksek doz grubunda 47,891 ve 24,439 olarak saptandı (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.3).

Kontrol grubu ile susam yağı (çözücü) grubu karşılaştırıldığında primordial follikülerde yer alan primer oositlerdeki sitoplazmik GDF-9 tutulumu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=1,0$) (Çizelge 4.6).

Kontrol grubu ile düşük doz grubu karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı (**$p=0,002$**) (Çizelge 4.6),

Kontrol grubu ile yüksek doz grupları karşılaştırıldığında primordial folliküllerde yer alan primer oositlerdeki sitoplazmik GDF-9 tutulumu açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p=0,002$) (Çizelge 4.6).

Susam yağı (çözücü) grubunda yer alan primordiyal folliküllerdeki oositlerin immüntutulum değerleri düşük doz grubundaki oosit verileri ile karşılaştırıldığında aynı kontrol grubuyla yapılan karşılaştırmalarda olduğu gibi istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermekteydi ($p=0,002$) (Çizelge 4.6).

Susam yağı (çözücü) grubunda yer alan primordiyal folliküllerdeki oositlerin immüntutulum değerleri yüksek doz grubundaki oosit verileri primordiyal folliküllerde yer alan oositler açısından karşılaştırıldığında ise yine aynı istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermekteydi ($p=0,031$) (Çizelge 4.6).

Düşük doz grubu verileri ve yüksek doz grubu verileri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,539$) (Çizelge 4.6).

Bu sonuçlar doğrultusunda deney grupları olan düşük doz ve yüksek doz gruplarındaki primordiyal folliküllerde yer alan oositlerde GDF-9 immüntutulmaları kontrol grubu ve çözücü gruplarındaki oositlerdeki immün yanıtı göre azalmış olarak tespit edildi. Bu azalma düşük doz ve yüksek doz grubunda benzerdi.

Deney gruplarına göre primer folliküllerde yer alan primer oositlerdeki GDF-9 immüntutulmasına ait sırasıyla ortalama ve standart sapma değerleri kontrol grubunda 82,143 ve 36,422; susam yağı (çözücü) grubunda 97,917 ve 5,893; düşük doz grubunda 26,488 ve 30,584; yüksek doz grubunda 26,840 ve 35,064 olarak saptandı (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.4).

Primer folliküllerde yer alan primer oositlerdeki sitoplazmik GDF-9 tutulumları değerlendirildiğinde ise; kontrol grubu ile susam yağı (çözücü) grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,5$) (Çizelge 4.6).

Kontrol grubu ile düşük doz grupları karşılaştırıldığında primer folliküllerde yer alan primer oositlerdeki sitoplazmik GDF-9 tutulumu açısından istatistiksel olarak anlamlı

farklılık vardı ($p=0,01$) (Çizelge 4.6).

Kontrol grubu ile yüksek doz grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak yine anlamlı farklılık vardı ($p=0,01$) (Çizelge 4.6).

Susam yağı (çözücü) grubunda yer alan primer folliküllerdeki oositlerin immüntutulum değerleri düşük doz grubundaki oosit verileri ile karşılaştırıldığında yine anlamlı farklılık belirlendi ($p<0,001$) (Çizelge 4.6).

Susam yağı (çözücü) grubunda yer alan primer folliküllerdeki oositlerin immüntutulum değerleri yüksek doz grubu ile karşılaştırıldığında ise yine aynı istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermekteydi ($p=0,001$) (Çizelge 4.6).

Primer folliküllerdeki oositlerin GDF-9 immüntutulumları için düşük doz grubu verileri yüksek doz grubu verileri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,813$) (Çizelge 4.6).

Bu sonuçlar doğrultusunda deney grupları olan düşük doz ve yüksek doz gruplarındaki primer folliküllerde yer alan oositlerde GDF-9 immüntutulumları kontrol grubu ve çözücü gruplarındaki oositlerdeki immün yanıtı göre azalmış olarak tespit edildi. Bu azalma düşük doz ve yüksek doz grubunda eşdeğerdi.

Deney gruplarına göre sekonder folliküllerde yer alan primer oositlerdeki GDF-9 immüntutulumuna ait sırasıyla ortalama ve standart sapma değerleri kontrol grubunda 71,667 ve 45,180; susam yağı (çözücü) grubunda 68,750 ve 45,806; düşük doz grubunda 31,250 ve 45,806; yüksek doz grubunda 35,714 ve 47,559 olarak saptandı (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.5).

Sekonder follikülerde yer alan primer oositlerdeki sitoplazmik GDF-9 tutulumları değerlendirildiğinde ise; kontrol grubu ile susam yağı (çözücü) grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,917$) (Çizelge 4.6).

Kontrol grubu ile düşük doz grupları karşılaştırıldığında sekonder follikülerde yer alan primer oositlerdeki sitoplazmik GDF-9 tutulumu açısından istatistiksel olarak anlamlı

farklılık yoktu ($p=0,071$) (Çizelge 4.6).

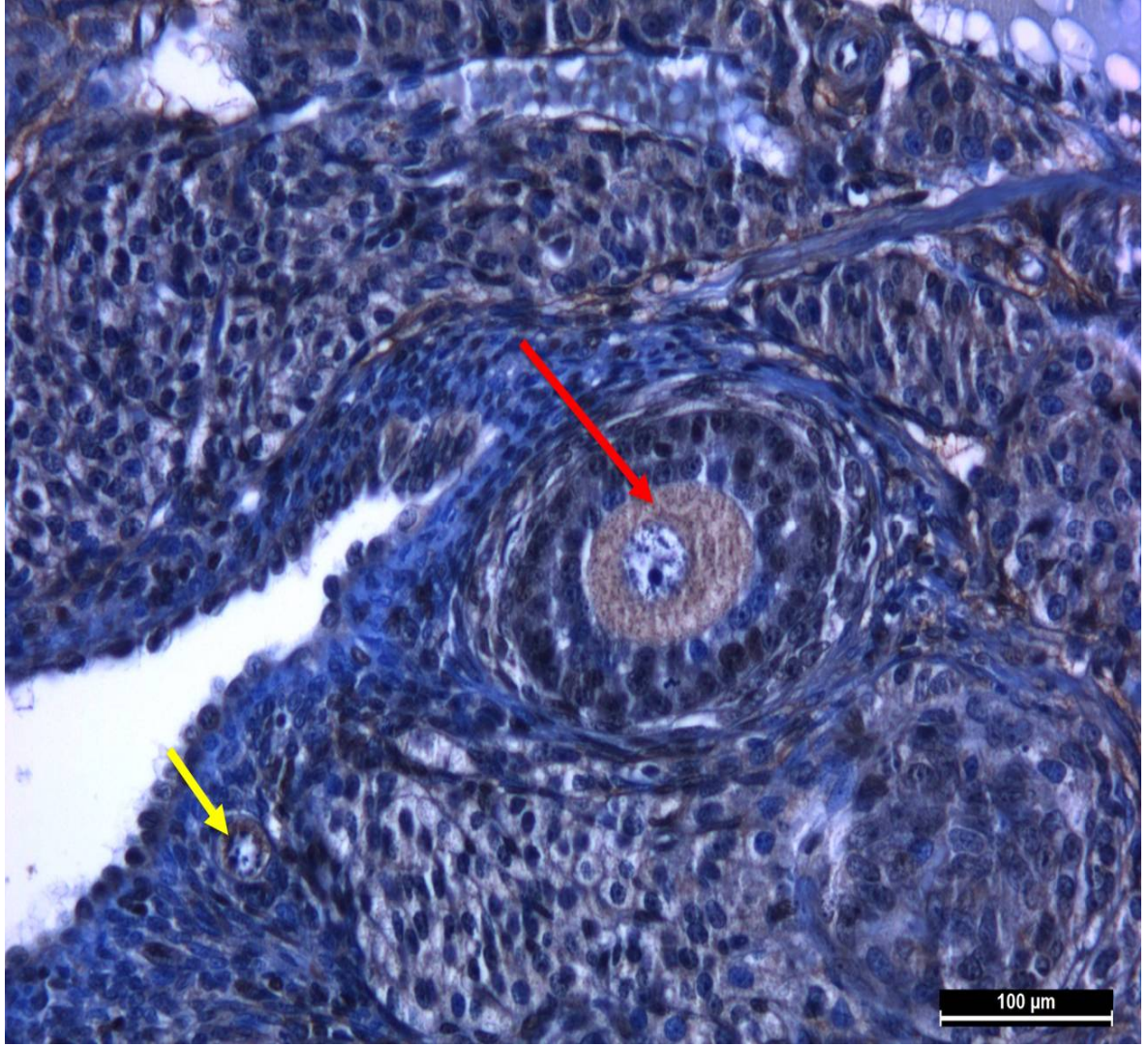
Kontrol grubu ile yüksek doz grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p=0,250$) (Çizelge 4.6).

Susam yağı (çözücü) grubunda yer alan sekonder folliküllerdeki oositlerin immüntutulum değerleri düşük doz grubundaki oosit verileri ile karşılaştırıldığında yine anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,156$) (Çizelge 4.6).

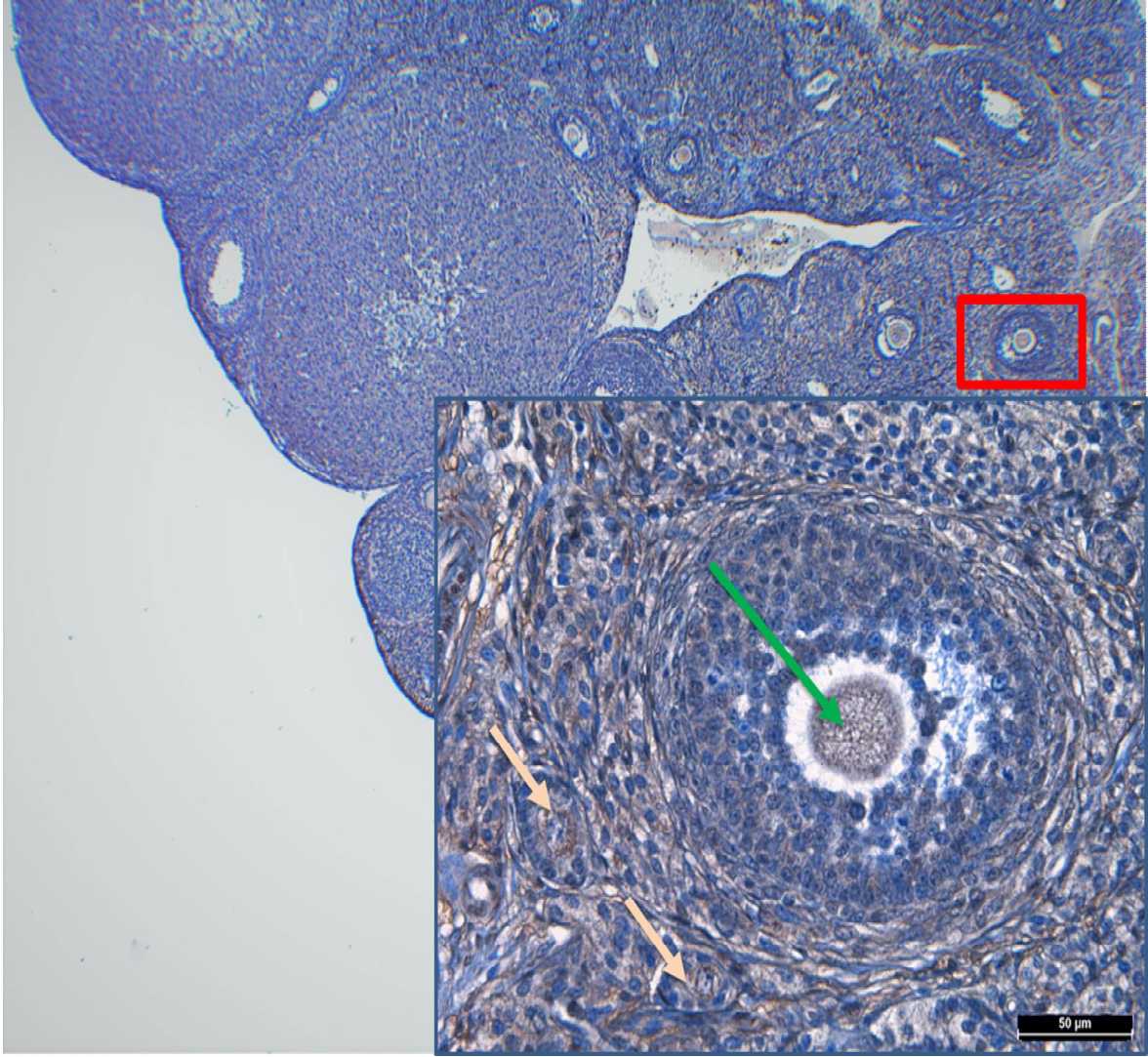
Susam yağı (çözücü) grubunda yer alan sekonder folliküllerdeki oositlerin immüntutulum değerleri yüksek doz grubu ile karşılaştırıldığında yine istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p=0,253$) (Çizelge 4.6).

Sekonder folliküllerdeki oositlerin GDF-9 immüntutulumlarının düşük doz grubu verileri yüksek doz grubu verileri karşılaştırıldığında yine istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,631$) (Çizelge 4.6).

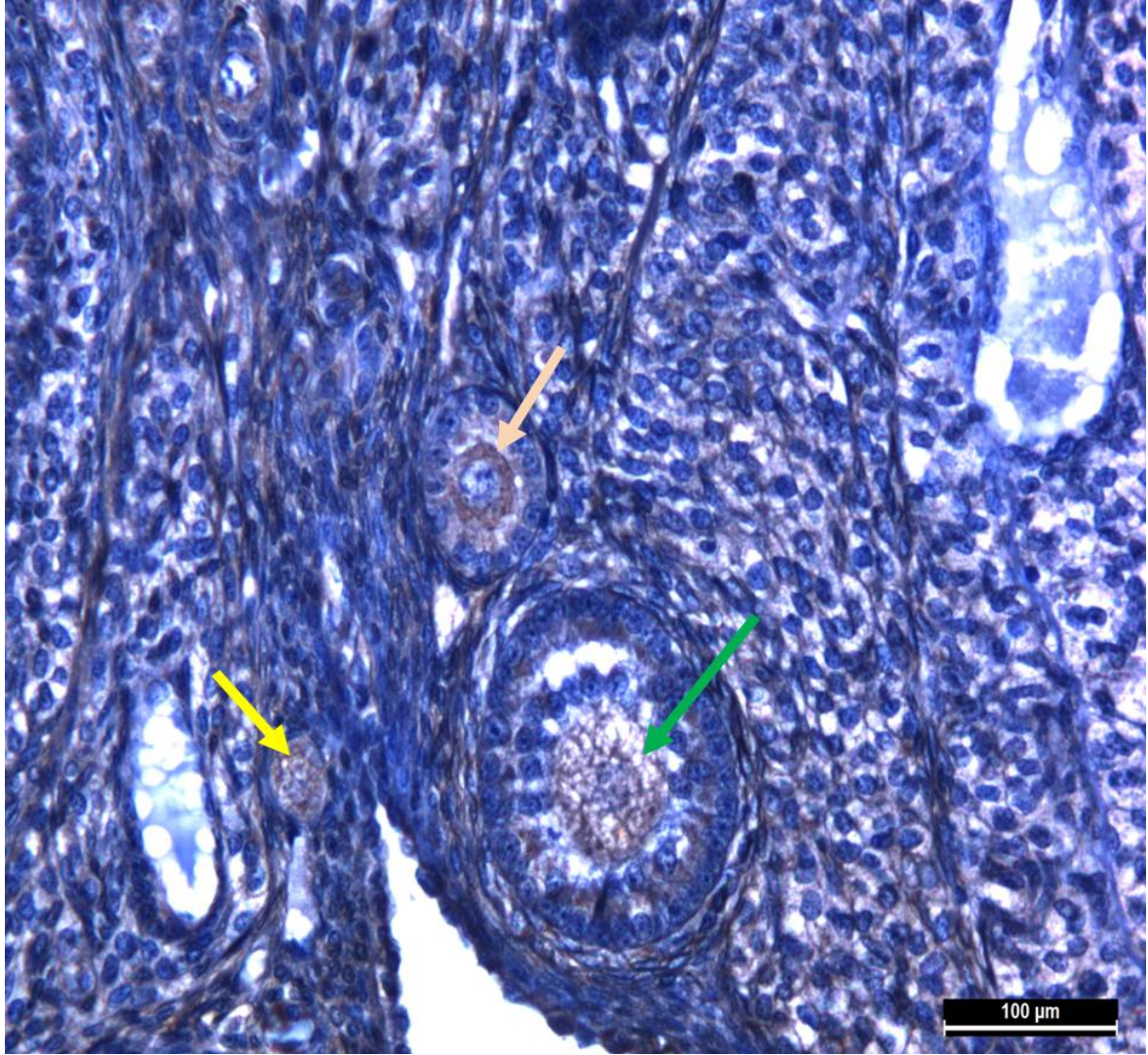
Bu sonuçlar doğrultusunda kontrol grubu, çözücü grubu ve deney gruplarından elde edilen kesitlerde değerlendirilen sekonder folliküllerdeki oositlerde GDF-9 immüntutulumları karşılaştırıldığında tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı.



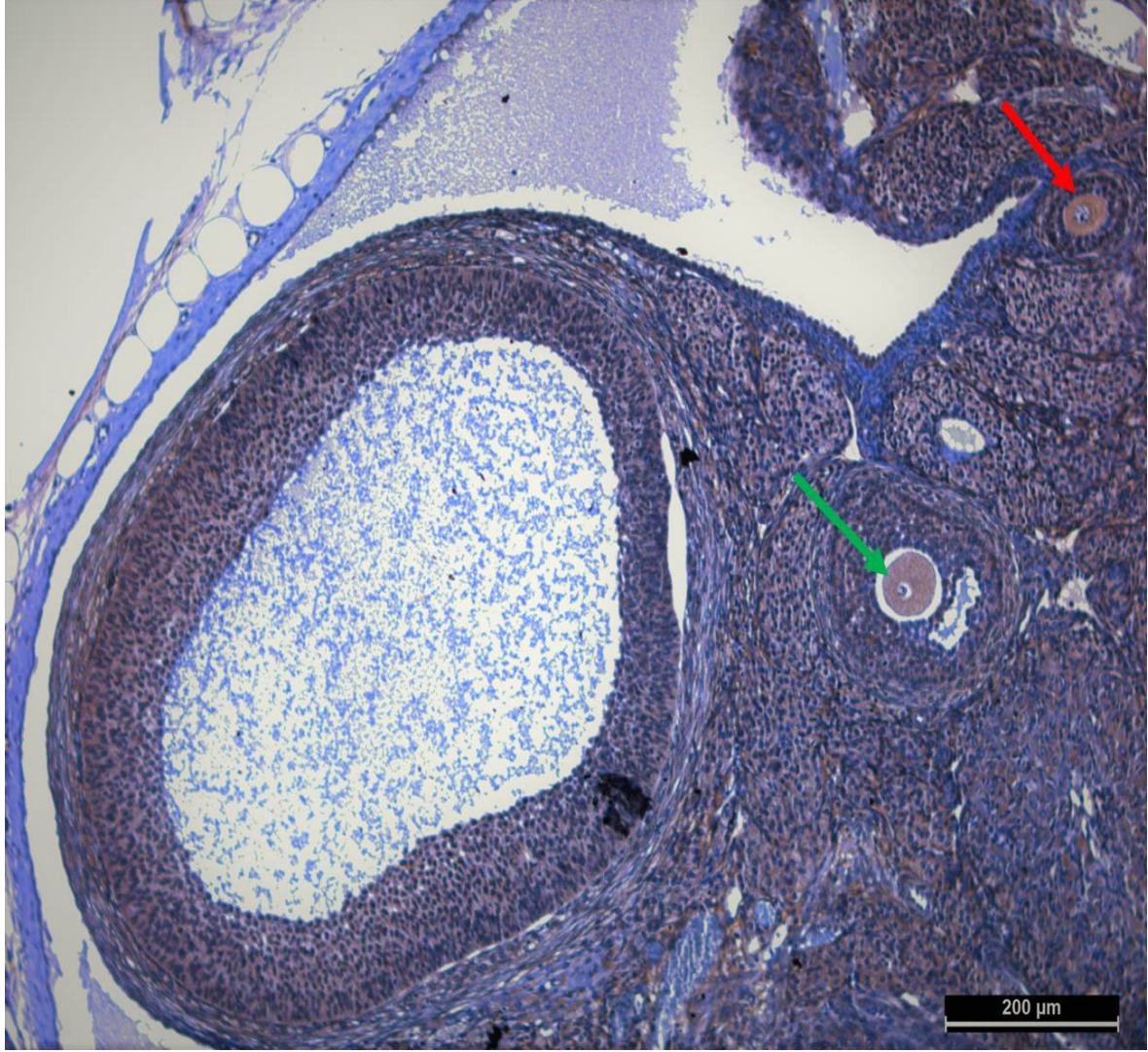
Resim 4.5. Kontrol grubunda GDF-9 sitoplazmik immünpozitif olan primordial follikülde (sarı ok) ve multilaminar primer follikülde yer alan primer oositler (kırmızı ok) X200



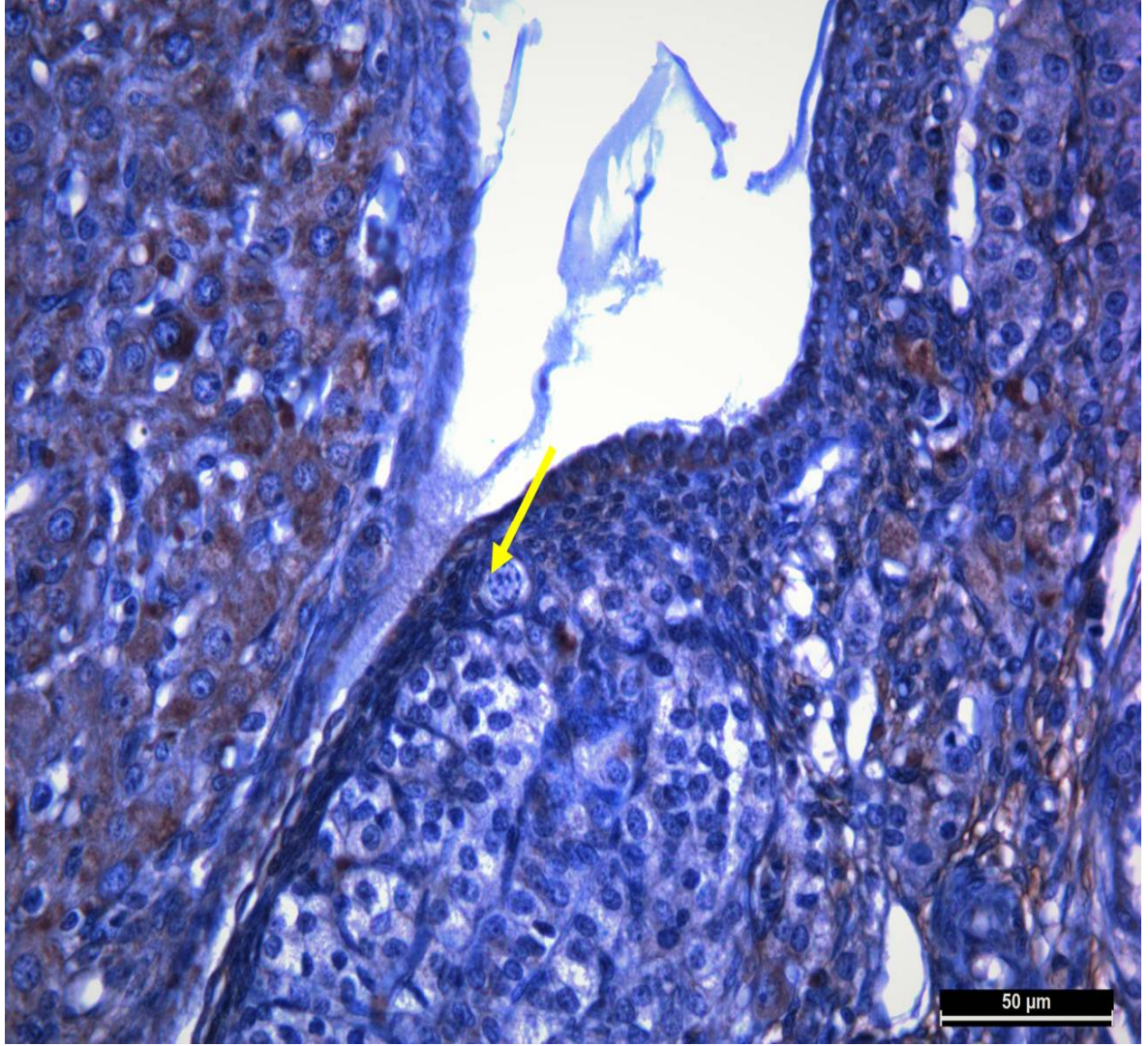
Resim 4.6. Kontrol grubunda unilaminar primer (turuncu oklar) ve erken antral (yeşil ok) folliküllerde GDF-9 sitoplazmik tutulumu gösteren primer oositler (küçük resim) X400; büyük resim X40



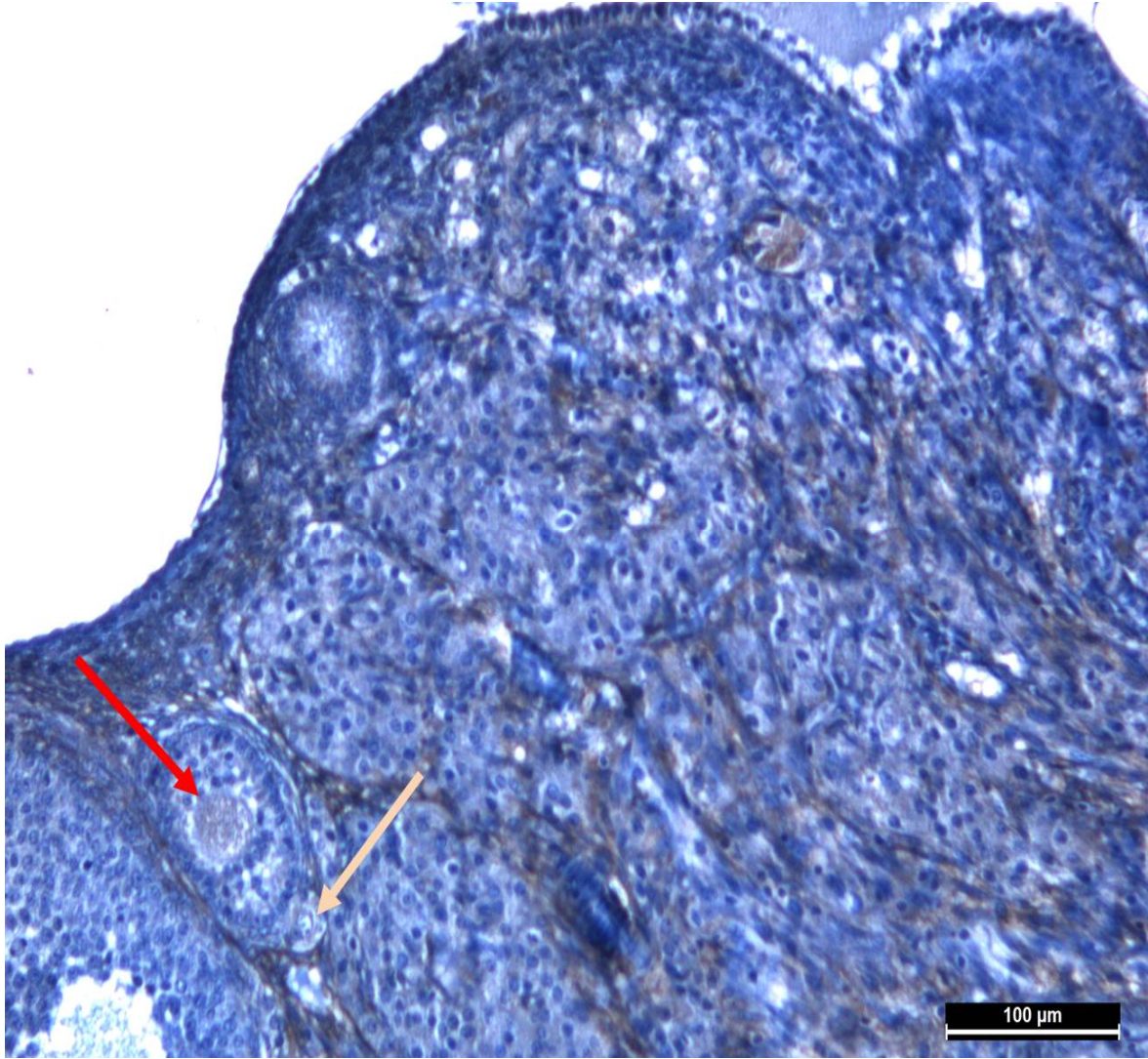
Resim 4.7. Susam yağı grubunda primordial (sarı ok), unilaminar primer (turuncu ok) ve erken antral (yeşil ok) follikülerde sitoplazmik GDF-9 tutulumu gösteren primer oositler X200



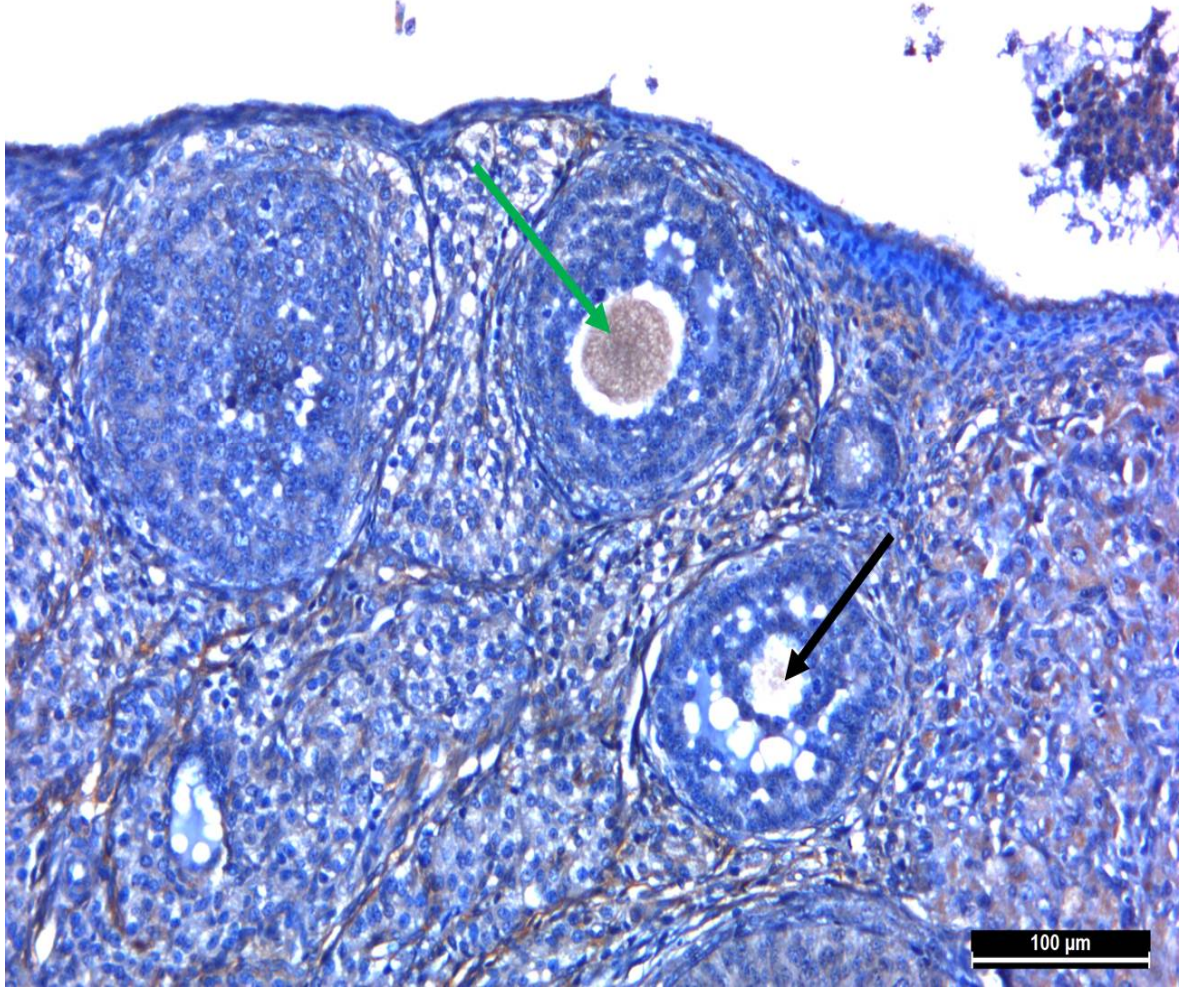
Resim 4.8. Susam yağı grubunda multilaminar primer (kırmızı ok) ve antral (yeşil ok) folliküllerde GDF-9 sitoplazmik tutulumu gösteren primer oositler X100



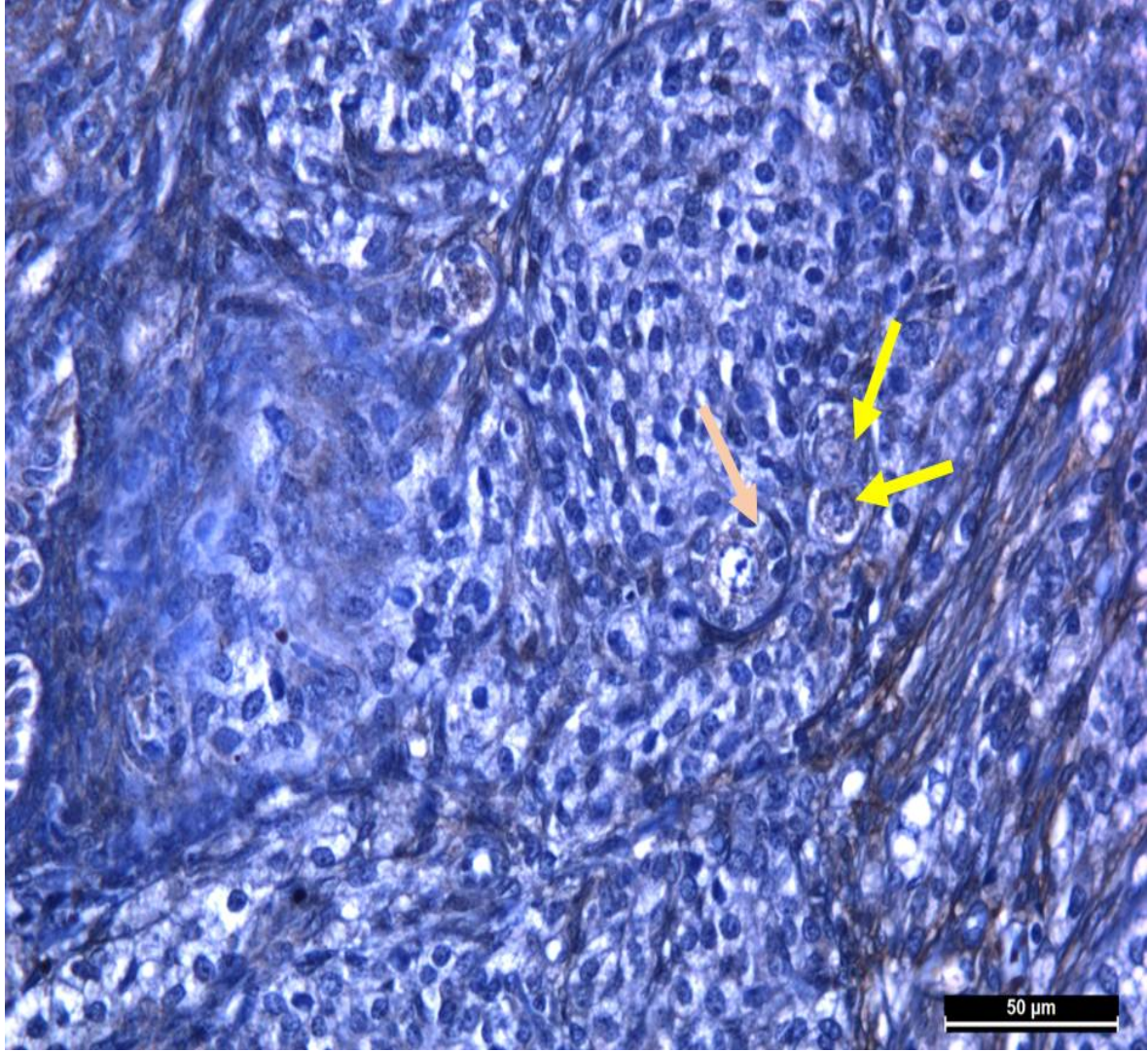
Resim 4.9. Düşük doz grubunda negatif GDF-9 sitoplazmik immünotutulumu gösteren primordiyal folliküldeki primer oosit (sarı ok) X400



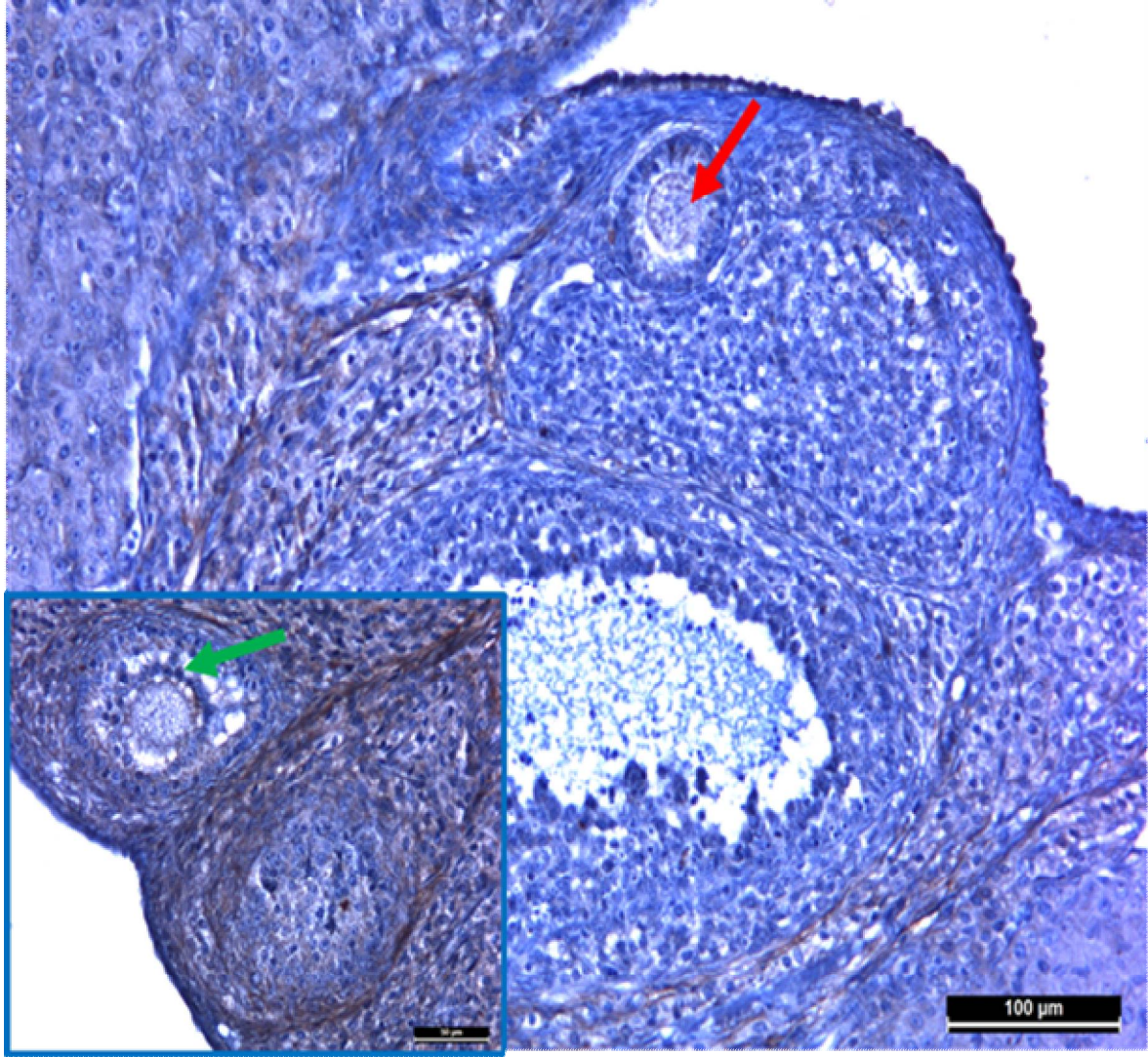
Resim 4.10. Düşük doz grubunda sitoplazmik olarak negatif GDF-9 immünotutulumu gösteren unilaminar (turuncu ok) ve multilaminar (kırmızı ok) primer folliküllerdeki primer oositler X200



Resim 4.11. Düşük doz grubunda GDF-9 sitoplazmik immüntutulum gösteren erken antral folliküldeki primer oosit (yeşil ok) ve GDF-9 negatif tutulum gösteren atretik görünümde erken antral folliküldeki primer oosit (siyah ok) X200



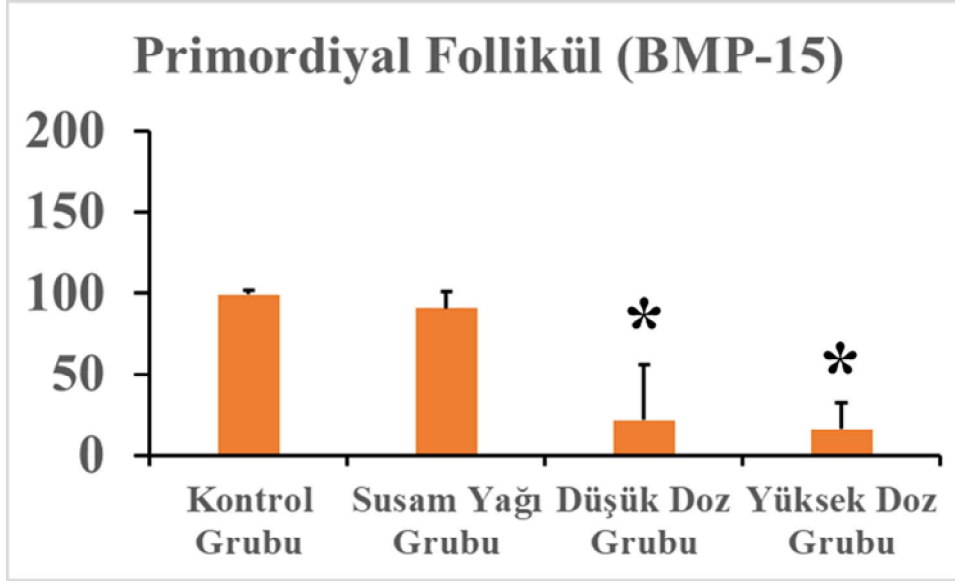
Resim 4.12. Yüksek doz grubunda GDF-9 immünnegatif olan primordial (sarı oklar) ve unilaminar primer (turuncu ok) folliküllerdeki primer oositler X400



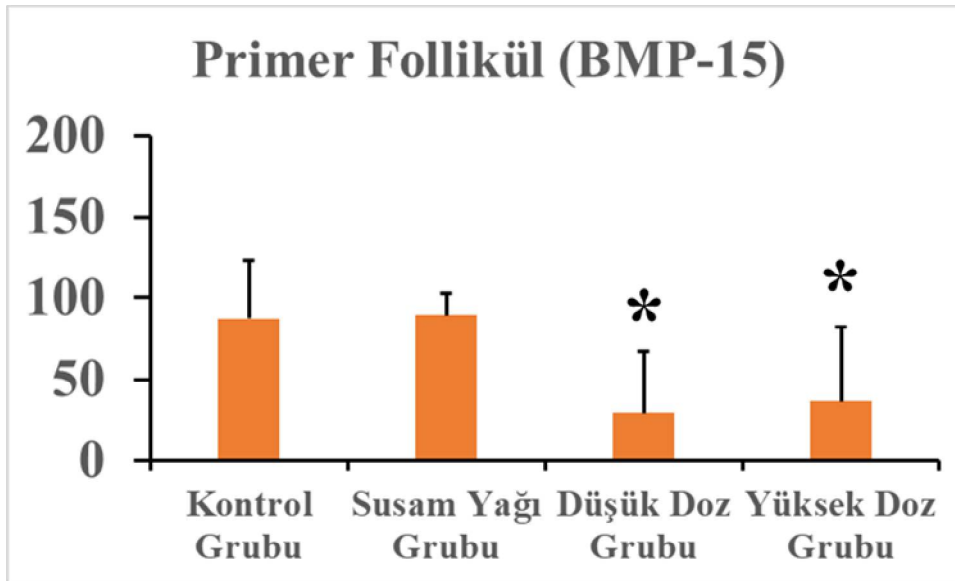
Resim 4.13. Yüksek doz grubunda GDF-9 immünnegatif sitoplazmik tutulum gösteren multilaminar primer folliküldeki primer oosit (kırmızı ok) (büyük resim X200) ve erken antral (yeşil ok) folliküldeki primer oosit (küçük resim X400)

4.4. BMP-15 Bulguları ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

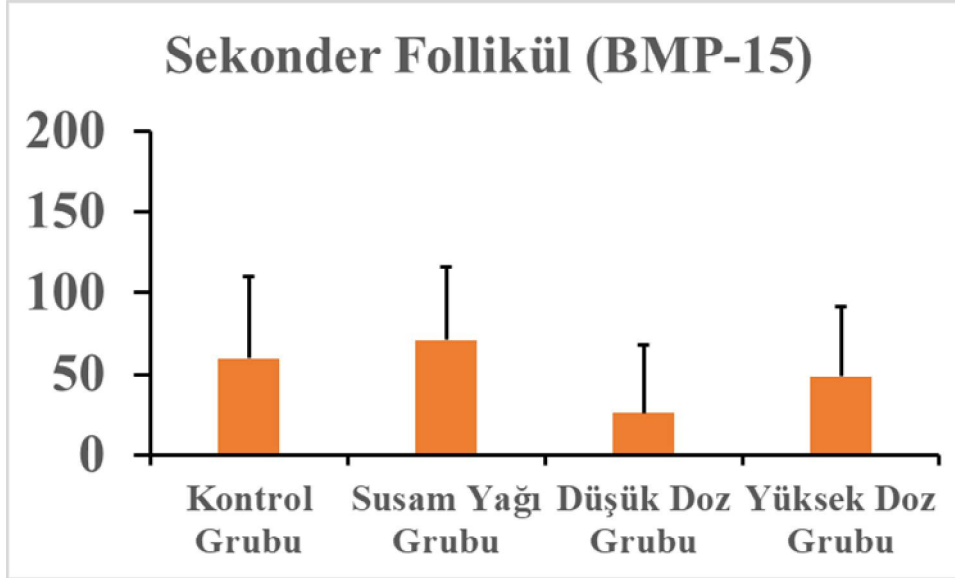
BMP-15 ile immünohistokimyasal olarak işaretlenen her bir doku kesitindeki pozitif tutulum gözlenen oositler sayıldı. Her bir kesit için immünohistokimyasal gözlenen oosit sayısı toplam oosit sayısına göre oranlanarak yüzdesi alındı.



Şekil 4.6. Kontrol, susam yağı (çözücü), düşük doz ve yüksek doz grubundaki primordiyal folliküllerde bulunan BMP-15 tutulumlu primer oositlerin karşılaştırması



Şekil 4. 7. Kontrol, susam yağı (çözücü), düşük doz ve yüksek doz grubundaki primer folliküllerde bulunan BMP-15 tutulumlu primer oositlerin karşılaştırması



Şekil 4.8. Kontrol, susam yağı (çözücü), düşük doz ve yüksek doz grubundaki sekonder folliküllerde bulunan BMP-15 tutulumlu primer oositlerin karşılaştırması

Çizelge 4.7. Primordiyal, primer ve sekonder folliküllerde bulunan primer oositlerdeki BMP-15 tutulumlarının gruplara göre standart sapma değerleri

	N	Standart Sapma		
		Primordiyal Follikül	Primer Follikül	Sekonder Follikül
Kontrol Grubu	8	2,720	35,355	50,022
Susam Yağı (Çözücü) Grubu	8	10,396	13,789	45,207
Düşük Doz Grubu	8	34,453	37,458	41,652
Yüksek Doz Grubu	7	16,323	45,231	42,608

BMP-15 immüntutulumuna ait değerlerin istatistiksel farklılıkları bağımlı örneklem t-testi ve Wilcoxon işaret sırası testi ile değerlendirildi. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi. Parametrik test varsayımları gösteren değişkenlerin karşılaştırılması için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. ANOVA ile fark bulunduğu takdirde farkın kaynağı Holm-Sidak yöntemi ile değerlendirildi (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Primordiyal, primer ve sekonder folliküllerde bulunan primer oositlerdeki BMP-15 tutulumlarının gruplar arası karşılaştırılması (İstatistiksel olarak $P < 0,05$ değeri anlamlı kabul edilmiş olup koyu karakterlerle vurgulanmıştır)
 α : Bağımlı örneklem t-testi, β : Wilcoxon işaret sırası testi

	BMP-15 (P Değeri)		
	Primordiyal Follikül	Primer Follikül	Sekonder Follikül
Kontrol Grubu / Susam Yağı (Çözücü) Grubu	0,125 ^{β}	0,625 ^{β}	0,710 ^{α}
Kontrol Grubu / Düşük Doz Grubu	<0,001^{α}	0,047^{α}	0,250 ^{β}
Kontrol Grubu / Yüksek Doz Grubu	<0,001^{α}	0,034^{α}	0,738 ^{α}
Susam Yağı (Çözücü) Grubu / Düşük Doz Grubu	<0,001^{α}	0,004^{α}	0,120 ^{α}
Susam Yağı (Çözücü) Grubu / Yüksek Doz Grubu	0,016^{β}	0,012^{α}	0,080 ^{α}
Düşük Doz Grubu / Yüksek Doz Grubu	0,645 ^{α}	0,663 ^{α}	0,187 ^{α}

Deney gruplarına göre primordiyal folliküllerde yer alan primer oositlerdeki BMP-15 immüntutulumuna ait sırasıyla ortalama ve standart sapma değerleri kontrol grubunda 99,038 ve 2,720; susam yağı (çözücü) grubunda 90,804 ve 10,396; düşük doz grubunda 21,627 ve 34,453; yüksek doz grubunda 16,224 ve 16,323 olarak saptandı (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.6).

Kontrol grubu ile susam yağı (çözücü) grubu karşılaştırıldığında primordial follikülerde yer alan primer oositlerdeki sitoplazmik BMP-15 tutulumu arasında fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,125$) (Çizelge 4.8).

Kontrol grubu ile düşük doz grubu karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p<0,001$) (Çizelge 4.8),

Kontrol grubu ile yüksek doz grupları karşılaştırıldığında primordial folliküllerde yer alan primer oositlerdeki sitoplazmik BMP-15 tutulumu açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p<0,001$) (Çizelge 4.8).

Susam yağı (çözücü) grubunda yer alan primordial folliküllerdeki oositlerin immüntutulum değerleri düşük doz grubundaki oosit verileri ile karşılaştırıldığında aynı kontrol grubuyla yapılan karşılaştırmalarda olduğu gibi istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermekteydi ($p<0,001$) (Çizelge 4.8).

Susam yağı (çözücü) grubunda yer alan primordial folliküllerdeki oositlerin immüntutulum değerleri yüksek doz grubundaki oosit verileri primordial folliküllerde yer alan oositler açısından karşılaştırıldığında ise yine aynı istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermekteydi ($p=0,016$) (Çizelge 4.8).

Düşük doz grubu verileri ve yüksek doz grubu verileri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,645$) (Çizelge 4.8).

Bu sonuçlar doğrultusunda deney grupları olan düşük doz ve yüksek doz gruplarındaki primordial folliküllerde yer alan oositlerde BMP-15 immüntutulumları kontrol grubu ve çözücü gruplarındaki oositlerdeki immün yanıtı göre azalmış olarak tespit edildi. Bu azalma düşük doz ve yüksek doz grubunda benzerdi.

Deney gruplarına göre primer folliküllerde yer alan primer oositlerdeki BMP-15 immüntutulumuna ait sırasıyla ortalama ve standart sapma değerleri kontrol grubunda 87,500 ve 35,355; susam yağı (çözücü) grubunda 89,136 ve 13,789; düşük doz grubunda 29,375 ve 37,458; yüksek doz grubunda 36,508 ve 45,231 olarak saptandı (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.7).

Primer folliküllerde yer alan primer oositlerdeki sitoplazmik BMP-15 tutulumları değerlendirildiğinde ise; kontrol grubu ile susam yağı (çözücü) grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,625$) (Çizelge 4.8).

Kontrol grubu ile düşük doz grupları karşılaştırıldığında primer follikülerde yer alan primer oositlerdeki sitoplazmik BMP-15 tutulumu açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p=0,047$) (Çizelge 4.8).

Kontrol grubu ile yüksek doz grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak yine anlamlı farklılık vardı ($p=0,034$) (Çizelge 4.8).

Susam yağı (çözücü) grubunda yer alan primer folliküllerdeki oositlerin immüntutulum değerleri düşük doz grubundaki oosit verileri ile karşılaştırıldığında yine anlamlı farklılık belirlendi ($p=0,004$) (Çizelge 4.8).

Susam yağı (çözücü) grubunda yer alan primer folliküllerdeki oositlerin immüntutulum değerleri yüksek doz grubu ile karşılaştırıldığında ise yine aynı istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermekteydi ($p=0,012$) (Çizelge 4.8).

Primer folliküllerdeki oositlerin BMP-15 immüntutulumları için düşük doz grubu verileri yüksek doz grubu verileri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,663$) (Çizelge 4.8).

Bu sonuçlar doğrultusunda deney grupları olan düşük doz ve yüksek doz gruplarındaki primer folliküllerde yer alan oositlerde BMP-15 immüntutulumları kontrol grubu ve çözücü gruplarındaki oositlerdeki immün yanıtı göre azalmış olarak tespit edildi. Bu azalma düşük doz ve yüksek doz grubunda benzerdi.

Deney gruplarına göre sekonder folliküllerde yer alan primer oositlerdeki BMP-15 immüntutulumuna ait sırasıyla ortalama ve standart sapma değerleri kontrol grubunda 59,722 ve 50,022; susam yağı (çözücü) grubunda 70,833 ve 45,207; düşük doz grubunda 26,042 ve 41,652; yüksek doz grubunda 48,809 ve 42,608 olarak saptandı (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.8).

Sekonder follikülerde yer alan primer oositlerdeki sitoplazmik BMP-15 tutulumları değerlendirildiğinde ise; kontrol grubu ile susam yağı (çözücü) grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,710$) (Çizelge 4.8).

Kontrol grubu ile düşük doz grupları karşılaştırıldığında sekonder folliküllerde yer alan primer oositlerdeki sitoplazmik BMP-15 tutulumu açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p=0,250$) (Çizelge 4.8).

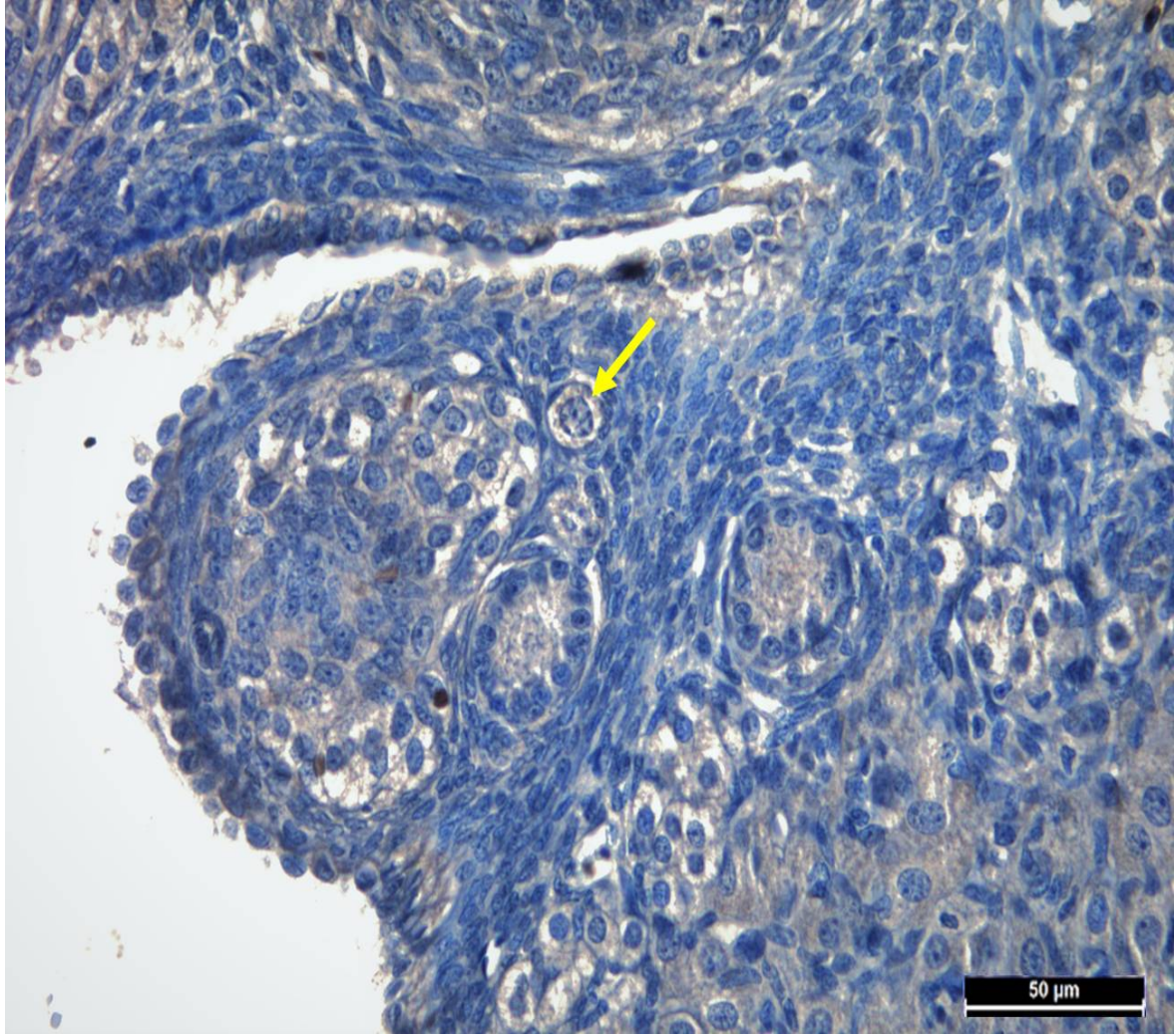
Kontrol grubu ile yüksek doz grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p=0,738$) (Çizelge 4.8).

Susam yağı (çözücü) grubunda yer alan sekonder folliküllerdeki oositlerin immüntutulum değerleri düşük doz grubundaki oosit verileri ile karşılaştırıldığında yine anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,120$) (Çizelge 4.8).

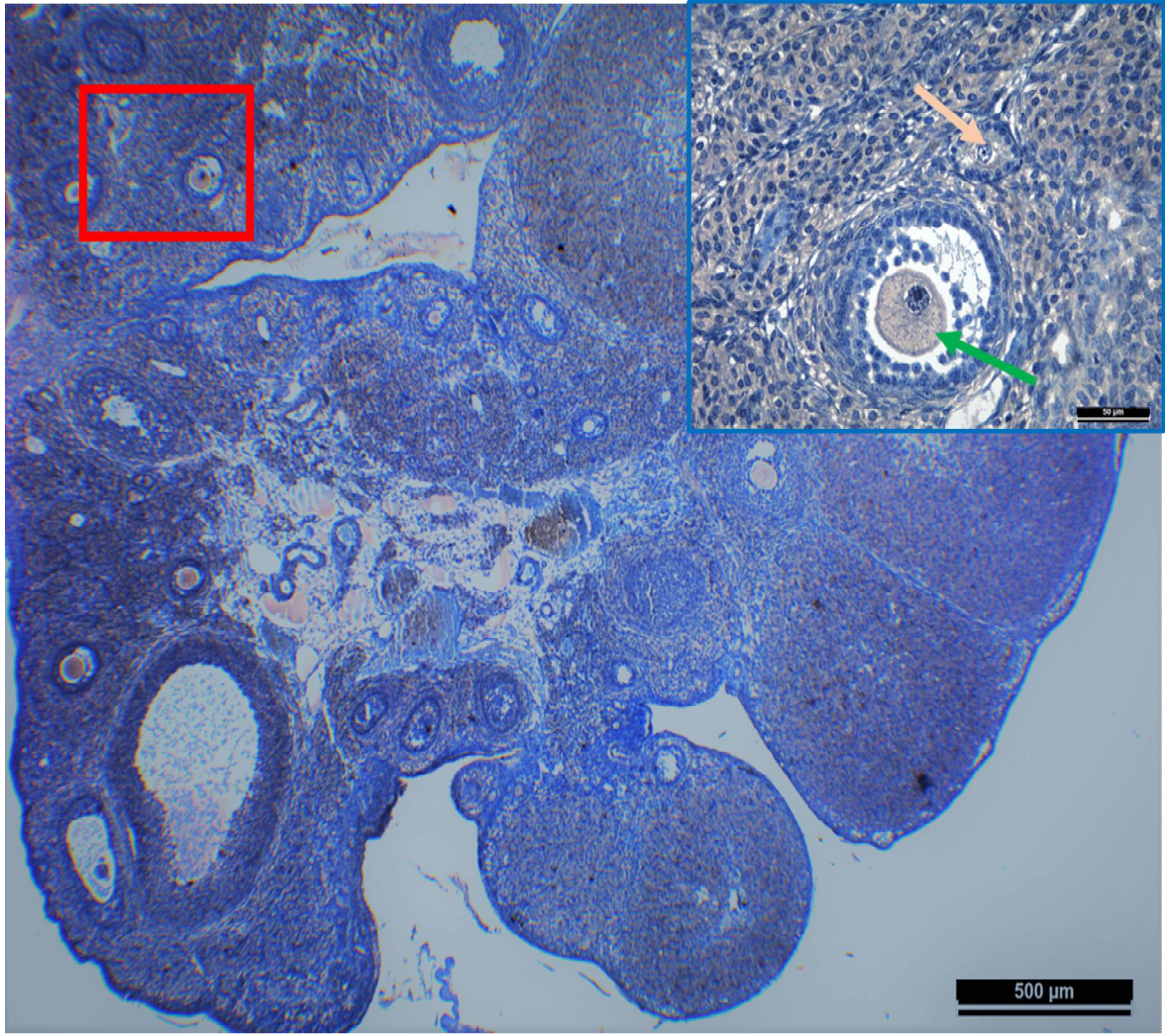
Susam yağı (çözücü) grubunda yer alan sekonder folliküllerdeki oositlerin immüntutulum değerleri yüksek doz grubu ile karşılaştırıldığında yine istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p=0,080$) (Çizelge 4.8).

Sekonder folliküllerdeki oositlerin BMP-15 immüntutulumlarının düşük doz grubu verileri yüksek doz grubu verileri karşılaştırıldığında yine istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,187$) (Çizelge 4.8).

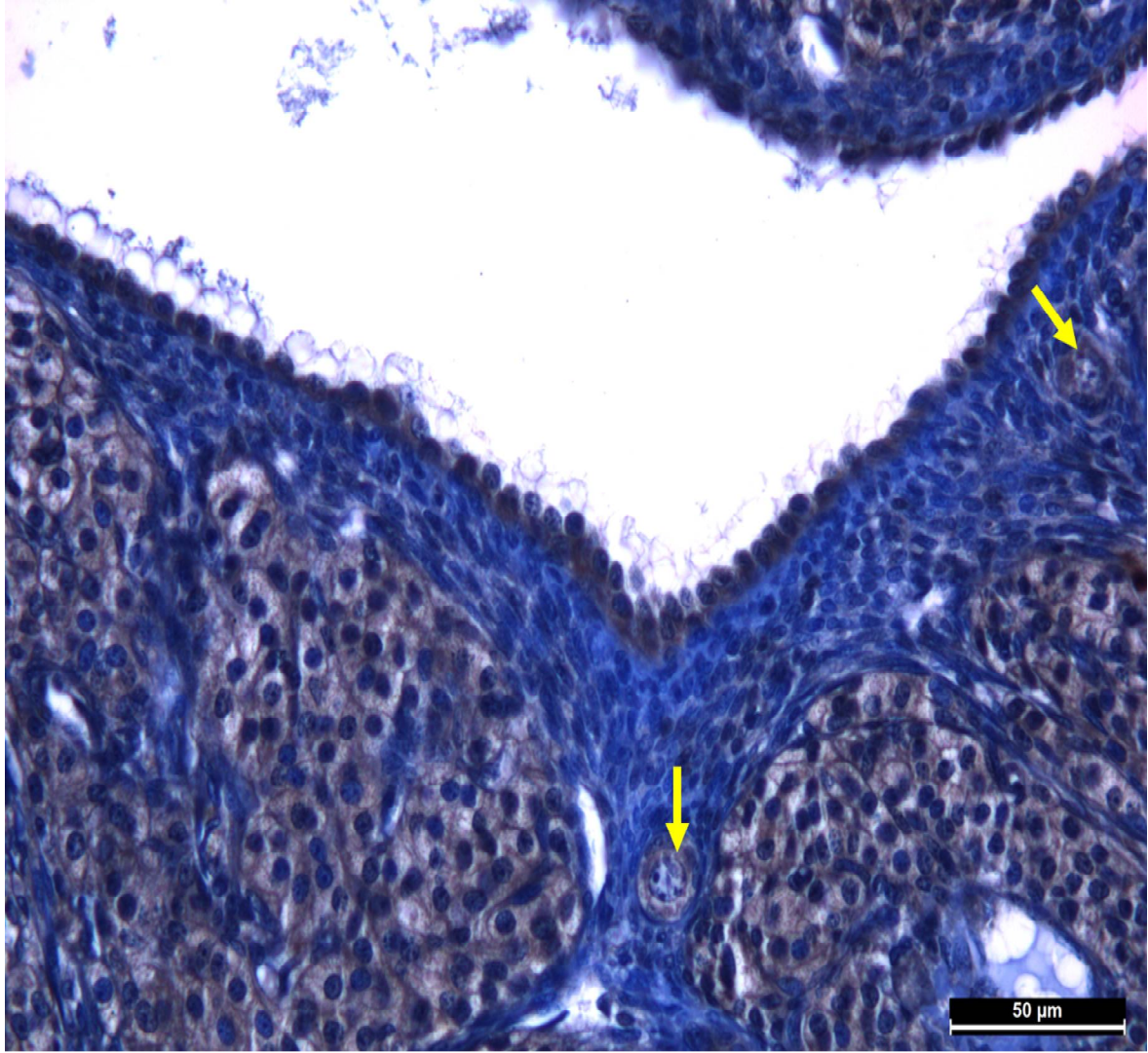
Bu sonuçlar doğrultusunda sekonder folliküllerde yer alan primer oositlerin BMP-15 immüntutulumları değerlendirildiğinde kontrol grubu, susam yağı (çözücü) grubu ve deney grupları arasındaki ikili karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.



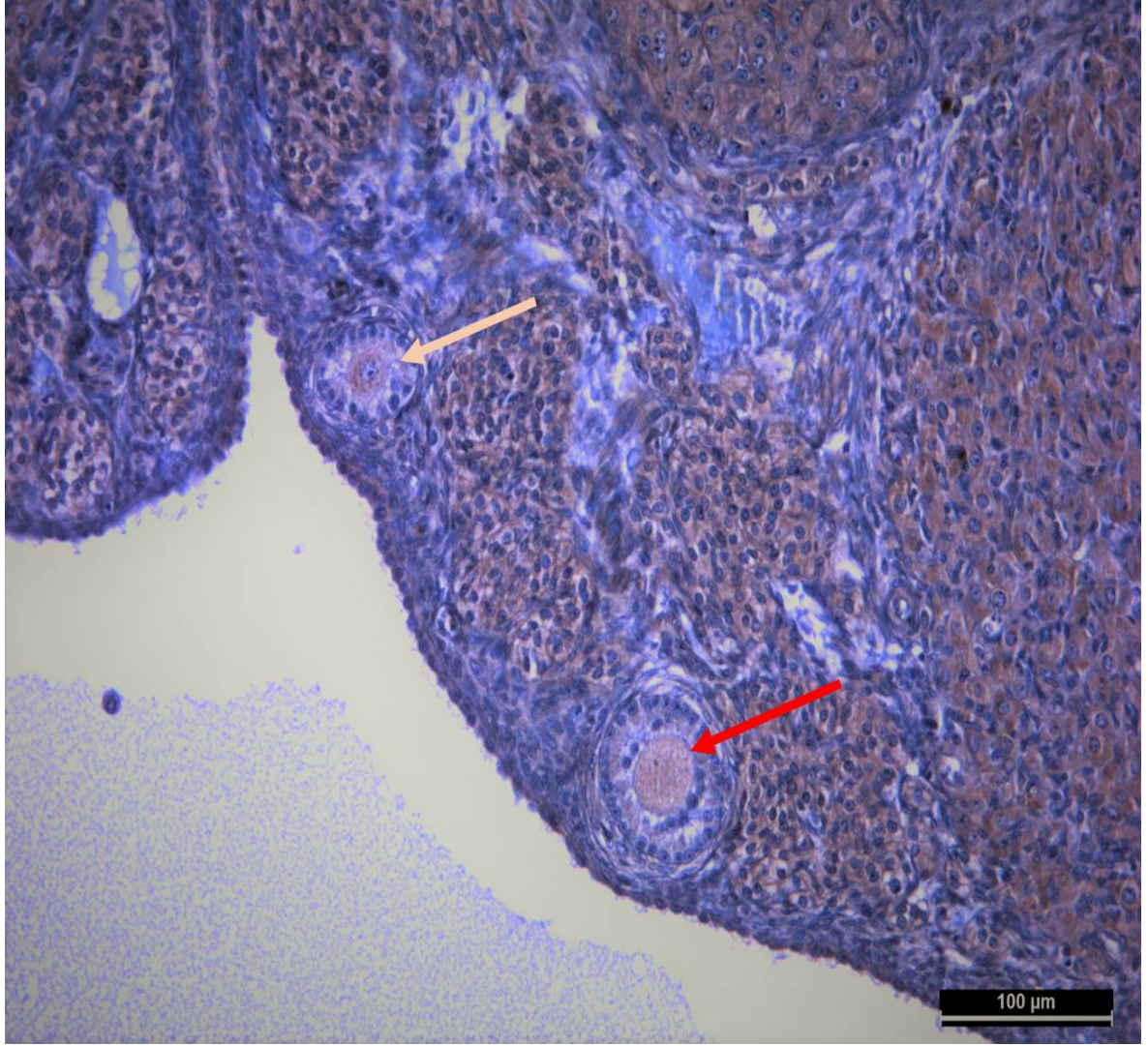
Resim 4.14. Kontrol grubunda primordial follikülde (sarı ok) BMP-15 sitoplazmik tutulumu gösteren primer oosit X400



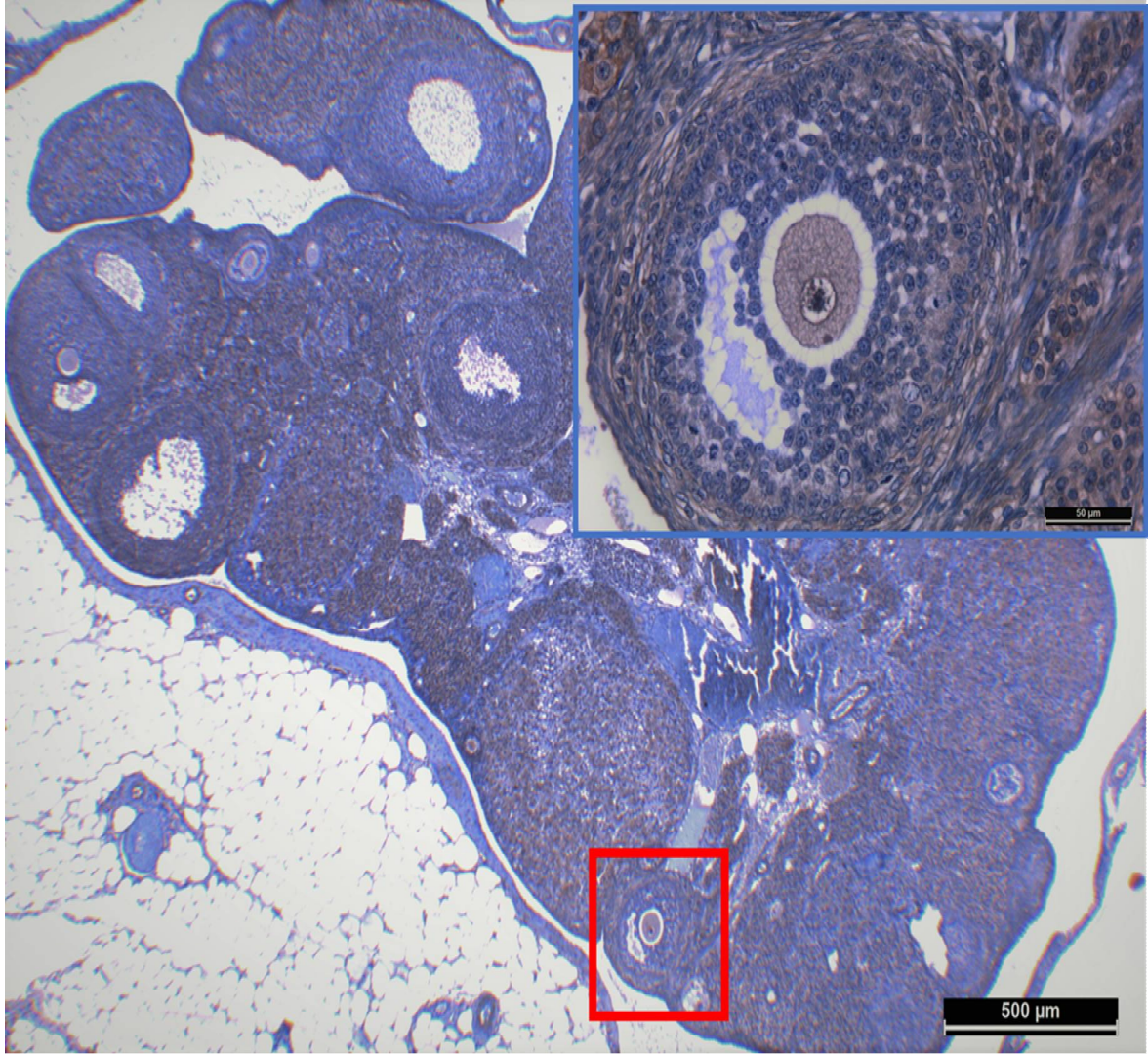
Resim 4.15. Kontrol grubunda unilaminar primer (turuncu ok) ve antral (yeşil ok) folliküllerde BMP-15 sitoplazmik tutulumu gösteren primer oositler (küçük resim) X400; büyük resim X40



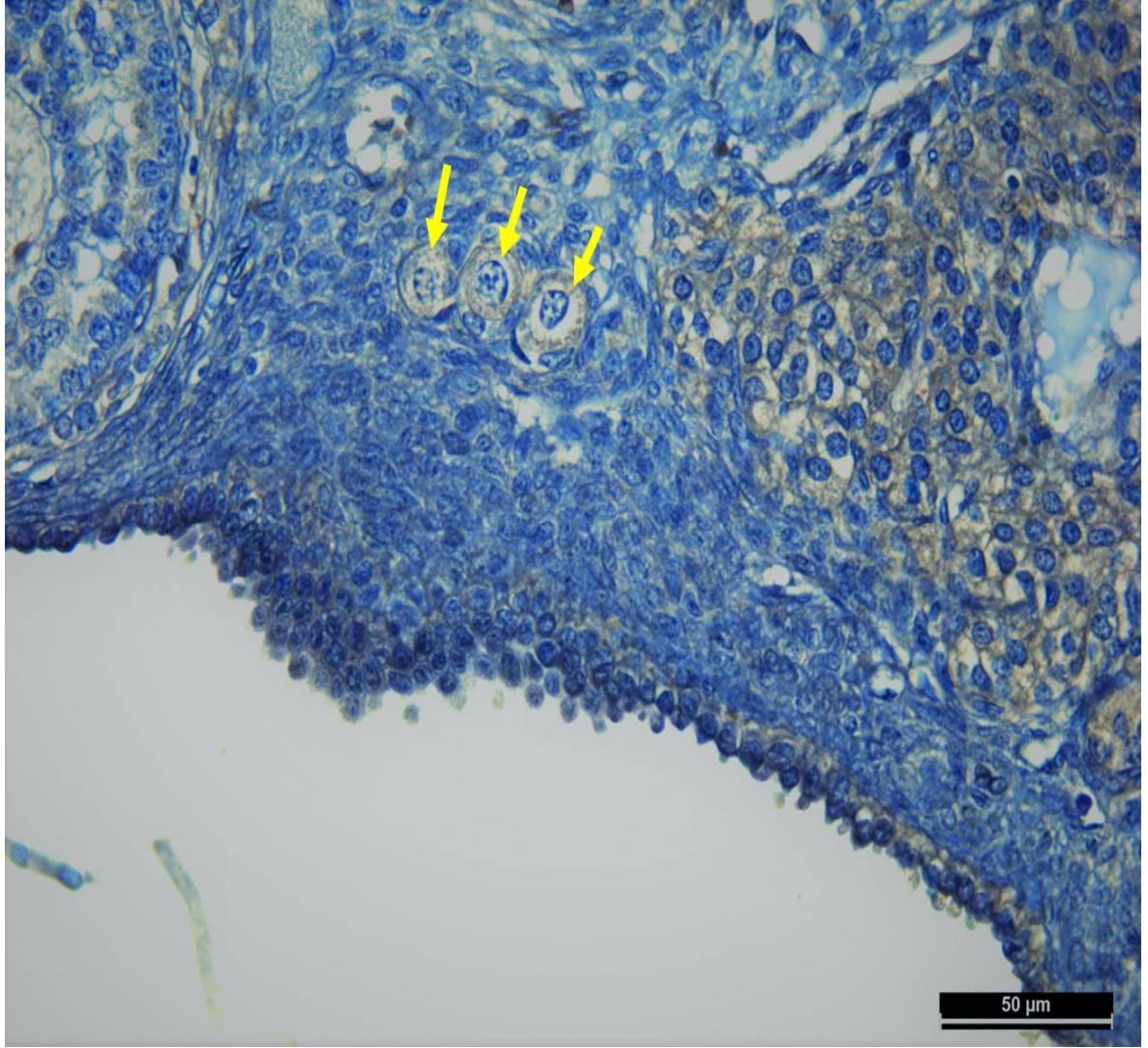
Resim 4.16. Susam yağı grubunda primordial folliküllerde BMP-15 pozitif sitoplazmik immüntutulumu gösteren primer oositler (sarı oklar) X400



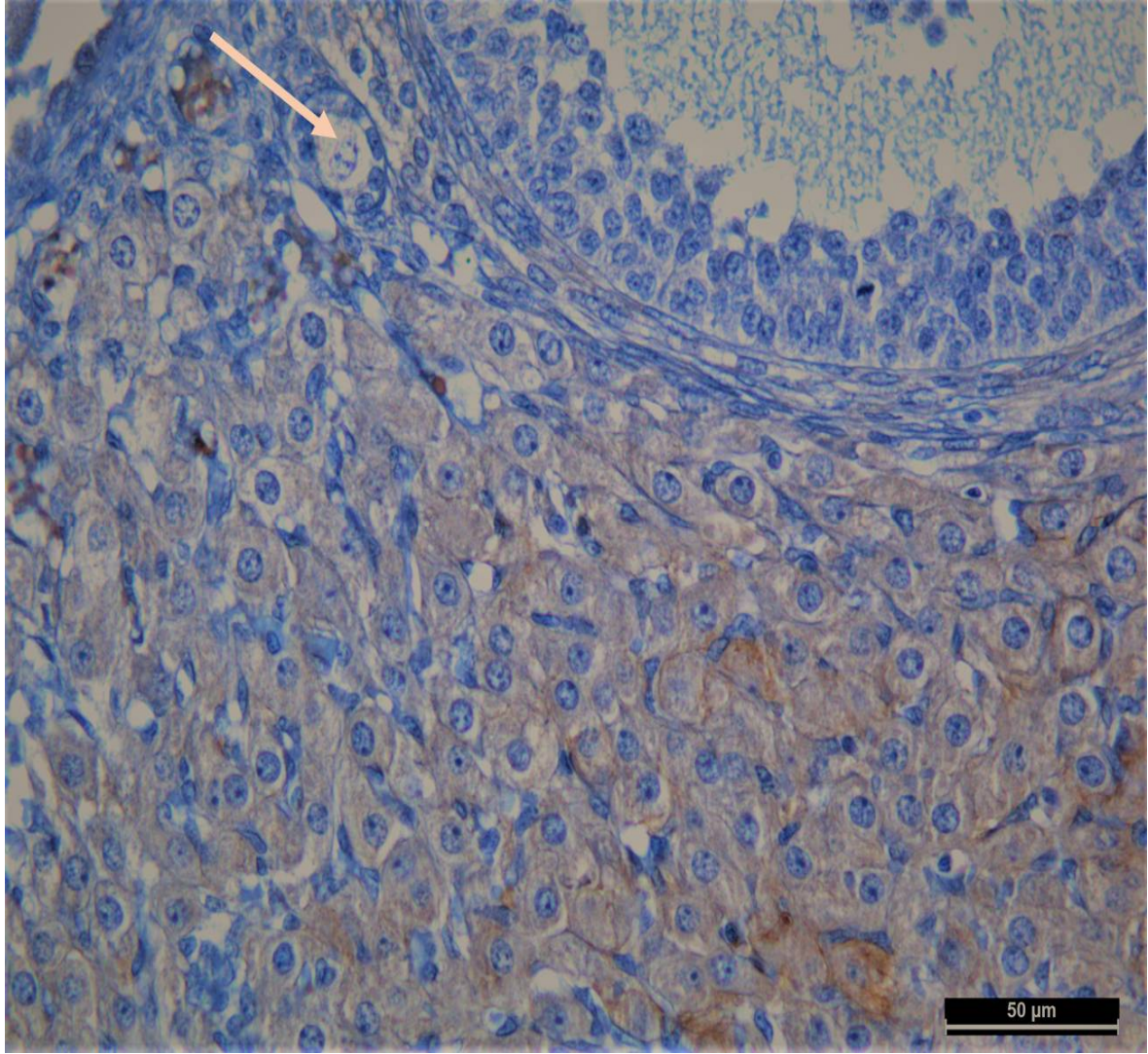
Resim 4.17. Susam yağı grubunda unilaminar (turuncu ok) ve multilaminar (kırmızı ok) primer folliküllerde BMP-15 pozitif sitoplazmik immünotutulumu olan primer oositler X200



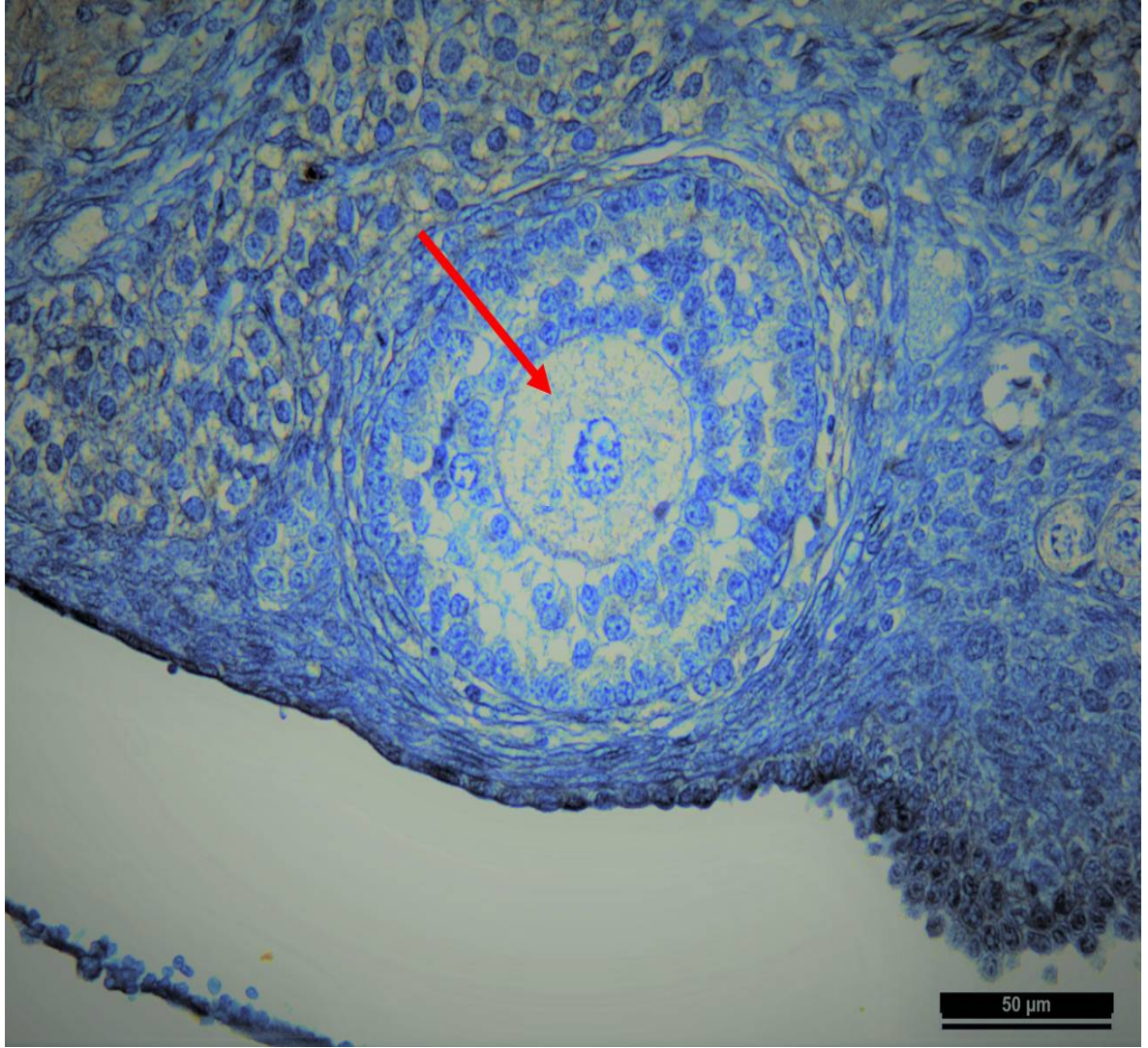
Resim 4.18. Susam yağı grubunda antral follikülde yer alan primer oositte sitoplazmik BMP-15 pozitif immünotutulumu (küçük resim) X400; büyük resim X40



Resim 4.19. Düşük doz grubunda primordiyal folliküllerde (sarı oklar) yer alan primer oositlerde sitoplazmik BMP-15 pozitif immünotutulumu X400



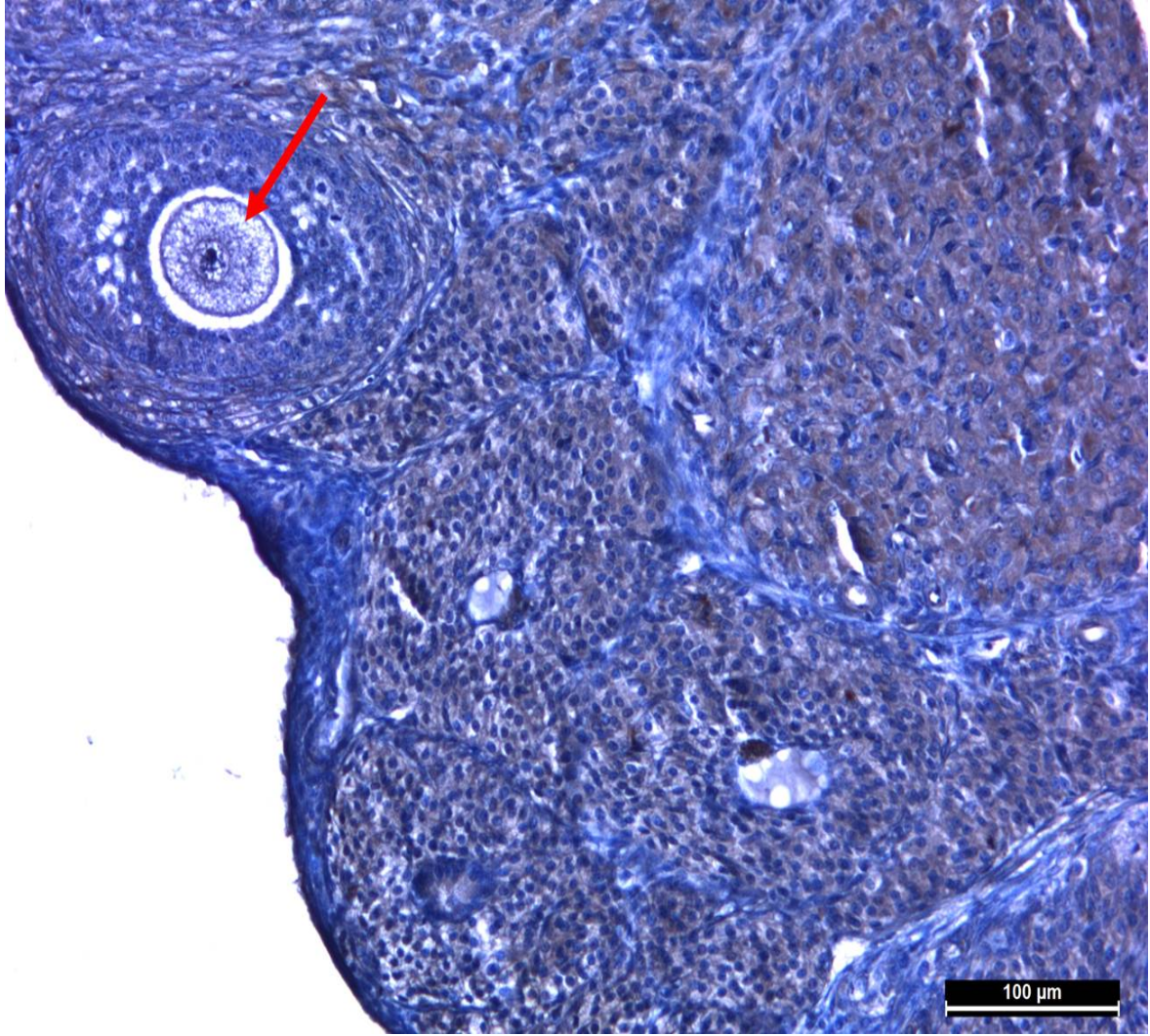
Resim 4.20. Düşük doz grubunda unilaminar primer follikülde (turuncu ok) BMP-15 negatif immünotutulumu gösteren primer oosit X400



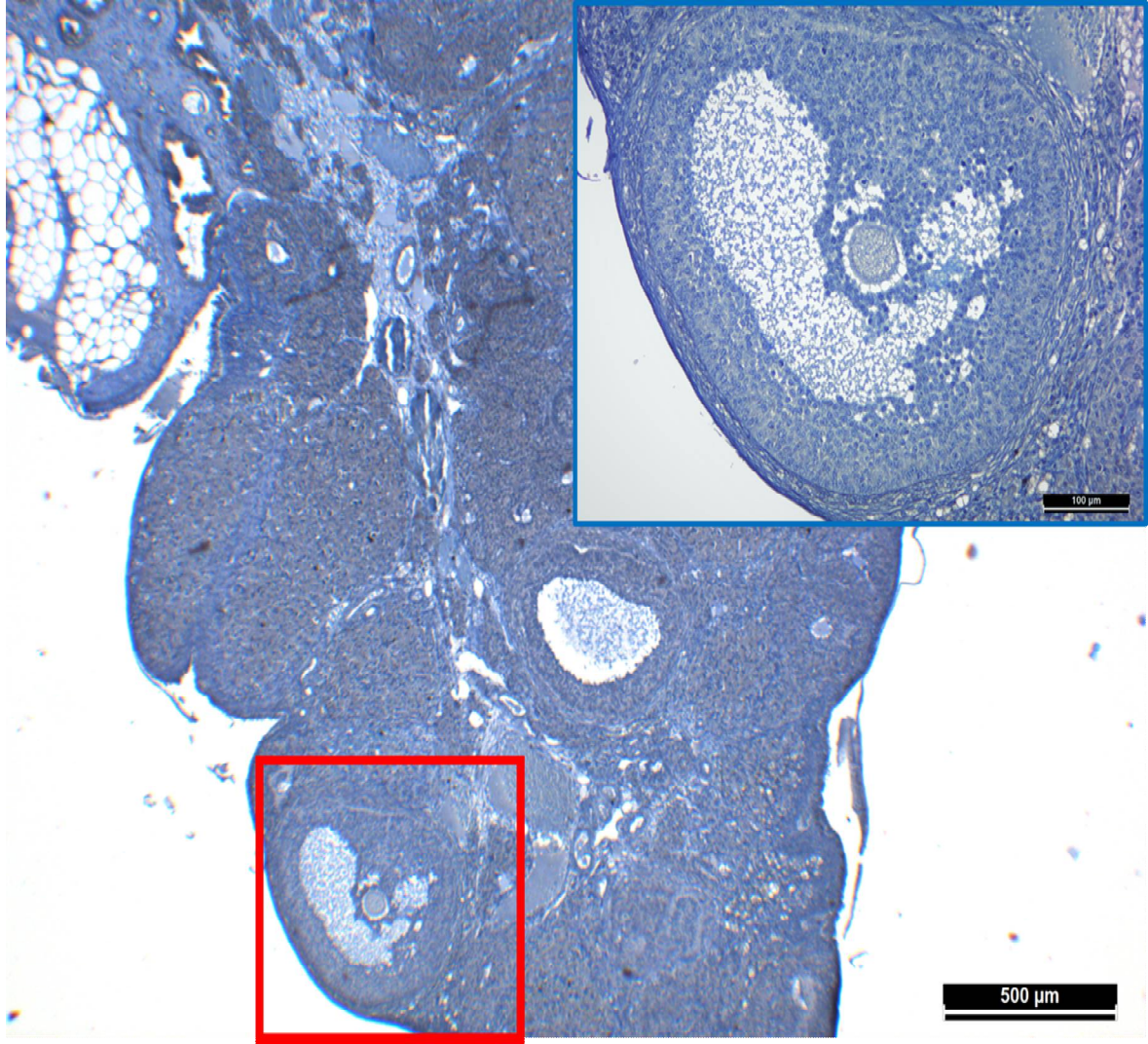
Resim 4.21. Düşük doz grubunda multilaminar primer (kırmızı ok) follikülde BMP-15 negatif immuntutulumu gösteren primer oositler X400



Resim 4.22. Yüksek doz grubunda primordial follikülde BMP-15 negatif immünotutulumu gösteren primer oosit (sarı ok) X400



Resim 4.23. Yüksek doz grubunda multilaminar primer follikülde BMP-15 negatif immünotutulumu gösteren primer oosit (kırmızı ok) X200



Resim 4.24. Yüksek doz grubunda geç antral follikülde BMP-15 negatif immünotutulumu gösteren primer oosit (küçük resim) X200; büyük resim X40



5. TARTIŞMA

Kronik dermatozlardan biri olan AV ergenlik sivilcesi olarak bilinmektedir ve pilosebace ünitenin iltihabi hastalığıdır. Tüm ırklarda ve iki cinsiyette eşit oranda görülmektedir [1-3]. Genel olarak ergenlik döneminde başlayan AV'in bitiş zamanı değişken olup daha geç yaşlarda da başladığı görülebilmektedir [1-4]. Hayati tehlikesi olmadığı ve genel sağlığı etkilemediği için basit bir hastalık gibi görünen AV, iletişimin büyük önem kazandığı günümüz toplumunda görüntüsüyle dahi çok büyük sorun yaratabilmektedir çünkü yüz derisi iletişimde yer alan en önemli görünen organdır ve beden algılanmasında elzemdir. AV'in en sık görüldüğü ergenlik dönemi beden algılamasının en üst düzeyde olduğu bir dönemdir. Bu dönemde oluşan lezyonun şiddeti normalden çok daha fazla algılanır ve genç bireylerde depresyon gibi ciddi psikolojik rahatsızlıklara yol açabilir [5].

Kişinin iyi olma halinde ve kendine verdiği değerde azalma, bozulan beden algısı, utanç duyma, sosyal içe kapanıklık, reddedilme korkusu, öfkeli olma, yaşam tarzında kısıtlama yapma, aile ilişkilerinde problemler, depresyon ve anksiyete AV ile ilgili olarak bildirilen psikiyatrik sorunlardandır [107-110].

Yapılan çalışmalarda AV hastası olan ergenlik dönemindeki öğrencilerin arkadaş toplantılarına davet almadıklarını, insanların arasında olmaktan hoşlanmadıklarını ve insanların kendilerine baktıklarını belirttikleri bildirilmiştir [111]. Gövdede lezyon olan AV hastalarıyla yapılan çalışmada ise ek olarak fiziksel temastan korkma, yüzme gibi spor aktivitelerinden kaçınma, uyku problemi gibi sorunların ortaya çıktığı rapor edilmiştir [110]. Bununla birlikte AV hastalarında ortaya çıkan psikolojik belirtilerin klinik açıdan önemsiz olduğunu rapor eden çalışmalar mevcuttur [112].

AV'in kimlik gelişiminin yaşandığı, sosyal ve fiziksel değişimlerin en fazla olduğu ergenlik döneminde ortaya çıkması, AV'i insanların endişelerinin odak noktası yapmaktadır ve bu nedenle hastanın diğer kişilerle iletişimde, kendisini değerlendirmesinde ve yaşam kalitesinde etkili olmaktadır [108, 110, 113].

Genel olarak AV 12-18 yaşları arasındaki gençleri etkilemektedir ve bazıları iso ile tedavi edilmektedir. A vitamini türevi retinoidlerin sentetik üyelerinden olan iso, 20 yılı aşkın

süredir orta ve şiddetli AV tedavisinde kullanılmaktadır. Retinoidler, hücreyel büyüme, farklılaşma, hücre yüzeyi değişimi ve bağışıklık modülasyonunu modifiye ederek keratinositleri etkiler [8]. Retinoidler keratinosit farklılaşmasını değiştirir ve bu nedenle akne dahil olmak üzere çeşitli keratinizasyon bozukluklarının tedavisinde kullanılır [15]. Primer epidermal keratinositlerde, all-trans retinoik asitin (ATRA) hücre döngüsü kontrolü ve programlanmış hücre ölümü ile ilişkili birçok geni düzenlediği gösterilmiştir [114]. Epidermal keratinositlerin terminal farklılaşmasının sonucunda keratinosit apoptozunun özel bir süreci olarak kabul edilen kornifikasyonla tamamlandığı belirtilmektedir [115, 116]. Retinoidlerle ilişkili başlıca yan etkiler keilitis, cilt ve mukozanın kuruluğu, cildin kırılganlığının artması, hiperlipidemi, transaminazların yükselmesi, miyalji, artralji ve hiperostozdur [8].

İso akne vulgarisin tamamen ortadan kaldırılması için potansiyel olan tek ilaç gibi görülmektedir [18, 19] ve isonun nükleer reseptörlerin veya nükleer olmayan hedeflerin transaktivasyon aktivitesi yoluyla, sebo-baskılayıcı, komedolitik, anti-inflamatuvar ve muhtemelen immünolojik etkilere sahip olduğu belirtilmektedir [20, 21]. Ancak bu etkilerini hangi mekanizma ya da mekanizmalar üzerinden meydana getirdiği tam olarak bilinmemektedir [22-24].

Şiddetli aknenin tedavisinde kullanılan iso'nun başlıca farmakolojik etkisi sebum baskılamasıdır [117]. Aşırı sebum üretimi ve sebum bileşimindeki kalitatif proinflatuvar değişikliklerin aknenin patogenezinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir [118-120]. Bilinen tüm anti-akne ilaçları arasında iso'nun en güçlü sebum baskılayıcı etkiyi sergilediği bildirilmiştir [121]. Bu sebomsupresif aktivite esas olarak sebosit apoptozisine dayanmaktadır [15]. Nelson, Gilliland, Cong ve Thiboutot (2006), iso'nun insan SEB-1 sebositlerinde apoptoz ve hücre döngüsü inhibisyonunu indüklediğini göstermiştir [122]. Diğer çalışmalarında Nelson, Cong, Gilliland ve Thiboutot (2011), apoptotik protein tümör nekrozis faktörüne bağlı apoptoz indükleyici ligandın (TRAIL) [123] ve nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalinin (NGAL) insan sebace bezi hücrelerinde iso'nun apoptotik etkisine katkıda bulunduğunu göstermiştir [124]. Kelhălâ ve diğerleri (2016) [125], yaptıkları çalışmayla iso tedavisi sırasında akne hastalarının cildinde TRAIL ve NGAL ekspresyonunun arttığını doğrulamıştır. Birçok tümör hücre hattında apoptozu uyaran TRAIL (Apo-2L) normal hücreler için nispeten toksik değildir [15]. TRAIL toksisitesi

olmaması ile tutarlı olacak şekilde birçok insan dokusunda yapısal olarak eksprese edilmektedir [126].

İso, akne tedavisi için yaklaşık olarak 0,5-1 mg/kg/gün dozunda, 6 ay boyunca kullanılmaktadır. Kullanılan bu doz oranı kümülatif doz olarak 120-150 mg/kg'a tekabül etmektedir. Bununla birlikte, çok daha düşük dozların (5 mg/gün gibi düşük) hemen hemen aynı tedavi etkisine sahip olduğu fakat önemli ölçüde daha az yan etkisinin olduğu rapor edilmiştir [27]. İso sadece şiddetli akne vulgaris için değil, aynı zamanda rosacea, follikülit, sarkoidoz, granüloma annulare, seboreik dermatit, miyelodisplastik sendromlar, cilt neoplazmalarının kemoprevizi, perioriferatif dermatit ve çeşitli keratinizasyon bozuklukları gibi diğer dermatolojik durumların tedavisinde de kullanılmaktadır [28, 29].

İsonun gebelikte teratojenik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir [127]. İsoya karşı fetal maruziyetin engellenmesi, önemli bir güvenlik önlemi olarak kabul edilmektedir [15]. iPLEDGE programı, iso kullanan ve çocuk doğurma potansiyeli olan kadınlarda gebeliklerin önlenmesi için tasarlanan ve Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration) tarafından yönetilen bir dizi risk yönetim programlarının en sonuncusudur [128]. İsonun laboratuvar hayvanları ve insanlarda teratojenik etkiler gösterdiği rapor edilmiştir [129]. İnsanlarda, malformasyonların karakteristik modeli kraniyofasiyal, kardiyak, timik ve merkezi sinir sistemi yapılarını içermektedir [129-132]. En karakteristik anormalliklerden bazıları mikrotia, anotia, mikrognati, konotrunkal kalp defektleri ve aortik ark anomalileri, timik ektopya veya aplazi, serebellar vermis agenezi ve çeşitli nöronal göç anomalileridir [129]. Sendromun başlıca özellikleri iso'nun nöral krest hücreleri üzerindeki etkisi ile açıklanmaktadır [15]. ATRA, artmış apoptoz ile sonuçlanan [133] kraniyal nöral krest gen ekspresyonunun büyük ölçekli yeniden programlanmasını sağlar [134]. Hayvan çalışmaları iso uygulamasının nöral krest hücrelerinin apoptozunu arttırdığını doğrulamıştır [135-137]. Yapılan çalışmalar, embriyonik kökenli trigeminal ganglion nöroblastları ile sınırlı olan aşırı hücre ölümünün ganglion oluşumu sırasında iso uygulanmasını takip ettiğini ve malformasyonlara yol açtığını göstermektedir [135]. Fare embriyolarında ve primer hücre kültürlerinde iso'nun özellikle primer ve sekonder palatal süreçlerde belirgin bir genel büyüme geriliğine sebep olduğu belirtilmektedir [15]. Gebeliğin 10. gününde eksplante edilen ve 24 veya 48 saat süreyle iso'ya maruz bırakılan embriyolarda, nazal ve maksiller süreçlerin epitelyumunun altındaki mezenşimin piknotik çekirdekler (apoptoz belirtileri) içermesinin yanı sıra 3H-timidin içeren nükleus sayısının

önemli ölçüde azaldığı rapor edilmiştir [136]. Artan nöral krista hücresi apoptozu iso'nun indüklediği kraniyofasiyal malformasyonların en önemli mekanizmasıdır [138].

İso ile oral tedavinin genellikle alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) ve çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) trigliseritlerinin serum seviyelerindeki orta artışlarıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir [139-142]. İsoya bağlı hepatosit apoptozu, artmış serum transaminaz konsantrasyonlarını açıkladığı düşünülmektedir [15]. Hepatoma hücre hatları Hep3B ve HepG2'de ATRA ve iso hepatosit apoptozunu indüklediği gösterilmiştir [143]. Bununla birlikte, tedavi edilen hastalarda iso'nun hepatosit apoptozu indüklediğine dair doğrudan bir kanıt bulunmamaktadır. İsonun uyardığı FoxO proteinlerinin upregüle edilmiş ekspresyonunun, hepatik TRAIL'in artmış FoxO aracılı ekspresyonunu açıklayabileceği belirtilmiştir [144, 145]. Bununla birlikte, TRAIL'in hepatik hücre ölümü ve hepatik inflamasyonda kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir [146]. İso aracılı FoxO1 sinyalleme, iso'ya bağlı hipertrigliseridemi de açıklayabileceği düşünülmektedir [147-149]. FoxO1'in trigliserit açısından zengin VLDL'nin hepatik sentezini artıran mikrozomal trigliserit transfer proteinini upregüle ettiği bildirilmiştir [150, 151].

Yapılan çalışmalar, hipokampusün yeni nöronların sürekli olarak oluştuğu beyin bölgelerinden biri olduğunu göstermektedir [152-154]. Depresyon patogeneğinde hipokampal ve prefrontal korteks nörojenезinin azaldığı düşünülmektedir [152-154]. Özellikle depresyonun hayvan modellerinde duygudurum bozukluklarında etkili olan hipokampüse yeni nöronların eklenmesinin sorun olduğu rapor edilmiştir [154] fakat diğer taraftan antidepresan tedavinin kronolojik olarak klinik iyileşme ile aynı dönemde görülen nörojenезdeki artışla ilişkili olduğu bildirilmiştir [154, 155]. Hipokampüste depresyonla ilişkili bir başka düzensizlik hipokampal hacimde azalmadır. Farelere yapılan iso uygulamasının hem hipokampal nörojenезi hem de hipokampal hacim azalmasına neden olduğu belirtilmiştir [156, 157]. 48 saat boyunca 10 μ M iso'nun hipotalamik hücrelere uygulanmasının hücre büyümesini $45,6 \pm 13$ oranında azalttığı bildirilmiştir [158]. Griffin ve diğerleri (2010) yaptıkları çalışmada iso'nun hipotalamik hücre sayılarını azaltma özelliğinin farelerde gözlemlenen depresyona bağlı artış gösteren davranışları arttırabileceğini öne sürmüşlerdir [158]. ATRA'nın intraserebroventriküler olarak yetişkin sıçanlara uygulandığı başka bir çalışmada, hipokampüste retinoik asit reseptör alfa (RAR α) protein ekspresyonunun arttığı ve bunun ATRA ile indüklenen sinyalizasyon

mekanizmalarının aktivasyonuna işaret ettiği doğrulanmıştır ve sıçanlardaki ATRA ile indüklenen hipokampal nörogenezdeki bozuklukların depresyon benzeri semptomlarla ilişkili olduğu belirtilmiştir [159]. Nöronal farklılaşma sırasında yükselen retinoik asit indüklenebilir gen 1'in (RAI-1); şizofreni, bipolar bozukluk ve majör depresyon hastalarının beyinlerde anlamlı olarak upregüle edildiği rapor edilmiştir [160]. Bu nedenle, hipokampal nörogenezin iso aracılı baskılanmasının, iso'nun depresif etkilerini açıklayan makul bir biyolojik mekanizma sağlayabileceği ve önceden hipotalamik nörogenez bozuklukları olan bireylerin, iso ile güçlendirilmiş depresyon gelişimi açısından daha yüksek risk altında olabileceği bildirilmiştir [15]. Suarez, Serrano, Cova ve Baptista (2016), iso ile tedavi edilen akne hastalarıyla iso ile tedavi edilmeyen akne hastalarını karşılaştırmış ve hastaların %13,8'ine karşılık %8,3'ünde tedavi sırasında klinik açıdan anlamlı olarak kaygı ve/veya depresyon geliştiğini bildirmiştir [161]. Sundström ve diğerleri (2010) iso tedavisi gören hastaların tedaviden 6 ay sonrasına kadar intihar girişimi riski taşıdıklarını belirtmişlerdir [162]. Marron, Tomas-Aragones ve Boira (2013), iso ile tedavi edilen akneli hastalarda anksiyete ve depresyonun anlamlı olarak azaldığını bildirmişlerdir [163]. Bununla birlikte, hastaların alt gruplarındaki akne aracılı depresyon ile iso aracılı depresyonun, epidemiyolojik çalışmalarla doğru saptanamayan 2 farklı patojenik olgu olduğunu fark etmek önemlidir.

İso ile tedavi edilen hastaların büyük çoğunluğunda inflamatuvar bağırsak hastalığının (İBH) gelişmesi veya ağırlaşmasının gözlenmediği bildirilmiştir [164-169], ancak hastaların bir alt grubunda artmış İBH riski rapor edilmiştir [170-174]. Yapılan bir çalışmada, İBH'nin majör patojenik özelliğini göstermek için ileal ve kolonik epitelyumda intestinal epitelyal hücrelerin (İEH) aşırı ölümü bildirilmiştir ancak İBH'deki İEH ölümünün kesin nedeninin henüz tanımlanamadığı belirtilmiştir [175]. Bilimsel kanıt olmamasına rağmen İBH gelişimine eğilimin önceden belirlendiği hastaların bir alt grubunda, iso tedavisinin zaten var olan İEH apoptozunu kötüleştirebileceği düşünülmektedir [15].

Oral iso tedavisinin mukokutanöz yan etkilerinin doza bağımlı olduğu ve genellikle sebumun azalması, azalmış stratum korneum kalınlığı ve artmış transepidermal su kaybı ile birlikte cilt bariyer fonksiyonunu değiştirdiği bildirilmiştir [176]. Cilt kserozu ve keilitis; hemen hemen tüm tedavi edilen hastaları etkileyen, en erken ve en sık görülen yan etkilerdir. Epidermal keratinositlerin, kornifikasyon olarak bilinen terminal farklılaşması

ve apopitoza maruz kaldığı rapor edilmiştir [115, 116]. Ayrıca sebositlerin, apopitozun daha az anlaşılmış bir süreci olan holokrin sekresyon sürecinde de öldüğü belirtilmiştir [115]. Özellikle ATRA'nın hücre döngüsü kontrolü ve apopitoz ile ilişkili birçok geni düzenlediği ve epidermal keratinositlerde CASP-3, CASP-6, CASP-7 ve CASP-9 kaspazlarını indüklediği rapor edilmiştir [114]. ATRA'nın, akut promiyelositik lösemide ve erişkin T hücresi lösemisinde iso'nun terapötik etki mekanizmasında olduğu gibi TRAIL'i indüklediği gösterilmiştir [177-180]. Wu, Lee, Tsai ve Lin (2011) yaptıkları çalışmada TRAIL'in keratinositlerde hem farklılaşma hem de apopitozis indükleyicisi olduğunu rapor etmişlerdir [181]. TRAIL ile indüklenen apopitotik sinyalizasyon aktivasyonu yoluyla iso tedavisinin epidermal bariyer fonksiyonunu tehlikeye sokan epidermal hücre büyümesi ve apopitoz arasındaki homeostatik dengeyi bozduğu belirtilmiştir [182].

İso ile tedavi edilen akneli hastaların bir kısmında kas ile ilgili şikayetler ve kas tahribatının spesifik bir belirteci olan kreatin kinazın artmış kan düzeyleri bildirilmiştir [183-185]. Oral iso ile ilişkili istenmeyen kas etkileri miyalji ve sertlik olarak kendini gösterirken nadir durumlarda gerçek miyopati veya rabdomyoliz olacağı belirtilmiştir [15]. Kreatin kinazın özellikle fiziksel aktiviteye maruz kalan bireylerde zaman zaman normal değer 100 katına kadar yükseldiği bulunmuştur [186]. Yapılan çalışmalarda miyozit kas liflerinde artmış TRAIL ekspresyonu saptanmıştır [187]. Yeteri kadar bilimsel kanıt olmasa da iso ile indüklenen miyaljinin TRAIL aracılı kas hücresi apopitozu ile ilişkili olabileceği ve iso tedavisi sırasında kreatin kinaz salınımının arttığı bildirilmiştir [15].

Üreme çağındaki çiftlerin %10-15'ini etkileyen infertilite, bir çiftin doğum kontrol yöntemlerinden herhangi birini kullanmadan, en az bir yıl boyunca düzenli cinsel ilişkiye girmelerine rağmen gebeliğin meydana gelmemesi olarak tanımlanmaktadır [188]. Doğum kontrol yöntemi kullanmaksızın geçen 12 aylık sürenin sonunda çiftlerin %80'inde ilk 6 ay içinde gebelik meydana gelirken geri kalanların sadece %10'unda takip eden 6 ay içinde gebelik oluşmaktadır [189, 190]. Kadınlarda; yumurtlama düzensizliği, yumurtanın gelişmemesi ya da yeterli kalitede olmaması, tuba uterina tüplerinin olmaması veya doğuştan ya da farklı bir sebeple tıkalı olması, uterusun olmaması, uterusu şekil bozukluğu ya da oluşan miyom ve polipler, endometriozis, vajinismus ve yaşın ilerlemesi fertilite sorunlarına yol açabilmektedir. Erkeklerde; sperm sayısının ve sperm hareketinin azalması, sperm ve testis kaynaklı yapısal bozukluklar, varikosel ve ejakülasyon

bozuklukları infertiliteye neden olabilmektedir. Bununla birlikte genetik anomaliler, tiroid kaynaklı bozukluklar gibi endokrinolojik hastalıklar, diyabet ve epilepsi gibi hastalıklar, bazı ilaç ve kanser tedavileri, travma ve geçirilmiş bazı enfeksiyonlar, obezite, aşırı alkol ve sigara tüketimi gibi faktörler fertilitiyi olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Fertilité bazen birden fazla parametreye bağılı olarak azalırken bazen de infertilite nedeni bulunamamaktadır [12, 13].

İsonun birçok yan etkisi olduğu bilinmekle birlikte, özellikle üreme organları üzerindeki etkilerini açıklayan sadece birkaç çalışma vardır [8-10]. Çınar ve diğerleri (2017) iso ile yapılan sistemik tedavinin insanlarda fertilité üzerinde uzun süreli yan etkilerinin olmadığını rapor etmişlerdir [11].

Yapılan bir çalışmada, 6 ay süresince oral yolla toplam 120 mg/kg iso alan akneli erkek hastalarda fertilitenin etkilenmediği bildirilmiştir [14]. Günümüzde iso'nun erkek fertilitesi üzerine yan etkilere sahip olmadığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, iso uygulamasının yapıldığı hayvan deneyleri, bozulmuş spermatogenezis bulgularını rapor etmektedir [15]. Erişkin erkek gerbilleri (*Gerbillus cheesemani*) yapılan bir çalışmada iso'nun spermatogenezin neredeyse tamamen durmasına neden olduğu ve Leydig hücrelerinin sitoplazmasında değişiklikler yaptığı bildirilmiştir [191]. Başka bir çalışmada ATRA uygulamasının erişkin kertenkele olan *Podarcis siculada*'da spermatogenez bozukluğuna ve gelişmiş testiküler germ hücrelerinde apoptoza yol açtığı rapor edilmiştir [9].

Erkek sıçanların kullanıldığı bir deneyde iso'nun spermatogenetik aktivite üzerindeki zamana ve doza bağılı etkileri TUNEL testi ile apoptoz tayini, immünohistokimyasal işaretlemeler ile siklin D1, E₂F ve p53 ifadenmeleri ve Johnsen's skor değerlendirmesi incelenmiş. Erkek sıçanlar üç gruba ayrılmış. Birinci gruptaki erkek sıçanlara (n = 18) 1 mg/mL/gün ve ikinci gruptaki erkek sıçanlara (n = 18) 2 mg/mL/gün iso 21 gün boyunca uygulanmış. Kontrol grubundaki erkek sıçanlara (n = 6) çiçek yağı verilmiş. 7. (grup 1a ve 2a), 14. (grup 1b ve 2b) ve 21. (grup 1c ve 2c) günlerde, birinci gruptan altı sıçan ve ikinci gruptan altı sıçan kurbanı edilmiş ve bilateral orşiektomi yapılmış. Deney sonunda 21 gün boyunca 2 mg/ml/gün izotretinoin uygulamasının siklin D1 ve E₂F-pozitif hücrelerin sayısını azalttığı bildirilmiştir [8].

Pek çok organ üzerinde yan etkisi olan iso'nun insan ovaryum rezervi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada akne hastası olan 22 kadında ve akne hastası olmayan 22 kadında iso tedavisinin başlangıcında ve sonunda serum AMH düzeyleri ölçülmüş. P değeri 0,008 olmak üzere tedavi öncesi ortalama AMH düzeyi deney grubunda 5,77 ng/mL ve kontrol grubunda 3,79 ng/mL bulunmuş. Tedaviden sonra, deney grubundaki ortalama AMH düzeyi 4,69 ng/mL ölçülmüş ve p değeri 0,012 olmak üzere tedaviden sonraki AMH düzeyinin tedaviden önceki AMH düzeyinden istatistiksel olarak daha düşük olduğu bildirilmiş. P değeri 0,2 olmak üzere kontrol grubu için tedaviden sonraki AMH düzeyi ile tedaviden önceki AMH düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamış. İso tedavisinden sonra deney grubundaki AMH düzeylerindeki azalmanın iso'nun ovaryum rezervi üzerindeki yan etkisi ile ilişkili olabileceği rapor edilmiştir [192].

İsonun şiddetli aknesi olan kadın hastaların ovaryum rezervleri ve hormon seviyeleri üzerine etkisinin değerlendirildiği başka bir çalışmada 32 kadından elde edilen veriler değerlendirilmiş. Deney kapsamında tüm hastalara 5-8 ay süresince oral yolla kümülatif doz 120-135 mg/kg olacak şekilde 0,5-2 mg/kg/gün iso verilmiş ve FSH, LH ve E₂ düzeyleri, antral follikül sayısı ve ovaryum hacmi tedavi öncesinde ve sonrasında olmak üzere değerlendirilmiş. Tedaviden sonra elde edilen ortalama FSH, LH ve E₂ seviyeleri tedaviden önce elde edilen değerlere göre önemli ölçüde düşük bulunmuş ve tedavi sonrası elde edilen ortalama antral follikül sayısı ve ovaryum hacmi anlamlı olmamasına rağmen azalmış. Bu çalışmanın sonuçlarının, oral iso'nun ovaryum fonksiyonunda bir etkiye sahip olmadığı ancak iso'nun şiddetli aknesi olan kadın hastaların hormonlarının düzeylerini etkilediği bildirilmiştir [193].

Yapılan bir çalışmada araştırmacılar iso'nun dişi sıçanların yumurtalıkları üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Toplam 30 dişi sıçan, uygulanan iso dozuna göre eşit olarak üç gruba ayrılmış: 0 mg/kg/gün (grup 1), 7,5 mg/kg/gün (grup 2) ve 15 mg/kg/gün (grup 3). Uygulamadan 30 gün sonra, iso'nun yumurtalıklar üzerindeki etkileri, serum AMH (anti-Müllerian hormon) konsantrasyonlarının ölçülmesi, TUNEL testi ile apoptoz tayini ve proliferating cell nuclear antigen (PCNA) ile immünohistokimyasal işaretlemeler yapılarak değerlendirilmiş. Atretik folliküllerin yüzdesi, follikülogenezin her bir aşaması için hesaplanmış. Kontrol grubu ile 2 deney grubu karşılaştırıldığında serum AMH konsantrasyonlarının her iki iso grubunda da daha düşük olduğu bulunmuş. Kontrol grubuna göre atretik folliküllerin yüzdesi her iki iso grubunda daha yüksek bulunmuş. İso

gruplarında PCNA-pozitif granüloza hücrelerinin sayısının azalmış olduğu gözlemlenmiştir. Deney gruplarında apopitotik granüloza hücreli follikül sayısının arttığı belirtilmiştir [16].

Korkmaz ve diğerleri (2016) tarafından yapılan çalışmada, iso'nun yumurtalıklar üzerindeki geri dönüşümlü etkisi incelenmiştir. İso uygulamasından önce 16 adet Sprague-Dawley albinosunun kan örneklerine ait bazal AMH düzeyleri ölçülmüş ve ardından sıçanlar rastgele iki gruba ayrılmış: 0 mg/kg/gün (grup 1), 7,5 mg/kg/gün (grup 2). Kontrol grubuna 30 gün boyunca gavajla sadece 1,0 ml soya yağı verilirken deney grubuna gavajla soya yağı içinde süspanse edilmiş 7,5 mg/kg/gün iso verilmiştir. AMH düzeyleri 30. günde (son ilaçtan hemen sonra) ve 60. günde (son ilaçtan 1 ay sonra) ölçülmüş. Uygulama grubunda serum AMH seviyelerinin azaldığı, uygulama ortadan kalktıktan sonra serum AMH değerlerinin az da olsa geri dönüşümlü olarak arttığı ancak bunun anlamlı bir fark olmadığı rapor edilmiştir [17].

Aksoy ve diğerleri (2015) yaptıkları bir çalışmada, oral olarak kullanılan iso'nun üreme çağındaki akneli kadınlarda ovaryum rezervi üzerine etkisini; hormonal parametreler, AMH seviyesi, ovaryum hacmi ve antral follikül sayısını incelenerek değerlendirmişlerdir. Bu çalışma kapsamında akut iso tedavisi gören üreme çağındaki 82 akneli kadından elde edilen veriler analiz edilmiştir. Hastalar, tedavi öncesinde ovaryum rezervi açısından değerlendirilmiş ve iso tedavisinden 6 ay sonra hormonal parametreler, AMH, ovaryum hacmi ve antral follikül sayısı açısından tekrar değerlendirilmiştir. AMH [Tedavi öncesi: 2,20 ng/ml (1,14 – 4,07). Tedavi sonrası: 1,31 ng/ml (0,32 – 2,28); $p<0,001$], toplam antral follikül sayısı [Tedavi öncesi: 16 (14 – 18,25). Tedavi sonrası: 12,5 (10 – 15); $p<0,001$] ve ovaryum hacmi [Tedavi öncesi: 23 ml (18 – 29). Tedavi sonrası: 15 ml (13 – 18); $p<0,001$] saptanmış, tedavi öncesi ve sonrası süreç arasında anlamlı farklar bulunmuş. Oral iso ile tedavi edilen akneli hastalarda serum AMH, antral follikül sayısı ve ovaryum hacmi düzeylerini birlikte analiz eden bu çalışmanın sonucunda iso'nun ovaryum rezervi üzerinde olumsuz etki oluşturulduğu gösterilmiştir [194].

Önceki çalışmalarında iso'nun ovaryum rezervi üzerindeki etkisini göstermiş olan grup, sonraki çalışmasında sistemik iso'nun kadın doğurganlığı üzerindeki kronik etkilerini araştırmışlardır. İlk çalışmalarına dahil ettikleri 82 kadın hastanın 79'unu bu çalışmaya da dahil etmişlerdir. Sistemik iso tedavisinin sona ermesinden on iki ay sonra, hastalar aynı parametreler (AMH, ovaryum hacmi, antral follikül sayısı, FSH, LH, östradiol, serbest

testosteron ve toplam testosteron) kullanılarak tekrar değerlendirilmiş. AMH, ovaryum hacmi ve antral follikül sayısı ortalamalarındaki değişiklikler altıncı ve on sekizinci aylar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış. Başlangıç ve 18. aydaki ortalama AMH, ovaryum hacmi ve antral follikül sayısı değerlerinin istatistiksel olarak benzer olduğu rapor edilmiştir [11].

Büyüyen follikülerin önemli bir parçası da oositi çevresindeki granüloza hücrelerinden ayıran ekstrasellüler zona pellusidadır. Zona pellusida (ZP) oosit ve granüloza hücreleri tarafından sentezlenir ve ilk olarak primer follikülde tespit edilir. Oosit büyüdükçe zona pellusida kalınlaşır. Kalınlığı olgun follikül aşamasına kadar ortalama 18 µm'ye ulaşır. Matriks üç sülfatlanmış glikoproteinden oluşur, ZP1, ZP2, ZP3. ZP2 ve ZP3 yaklaşık olarak eşit ve ana parçaları oluşturur, ZP1 ise zona kütlelerinin yaklaşık olarak %15'ini oluşturur. Normalde zona pellusida üç proteinden oluşurken (ZP1/ZP2/ZP3), zona pellusida oluşumunda ZP3'ün esansiyel olduğunu düşündüren ZP1/ZP3 veya ZP2/ZP3 kombinasyonu zona matriksini oluşturabilir. Bununla birlikte ZP1/ZP3 matriksi çok incedir ve follikülogenezisin antral fazının geç dönemlerine kadar devam etmez. ZP2 veya ZP3'ten yoksun oosit gelişir fakat follikülogenezin sonraki aşamalarında yapıları bozulur ve gonadotropinlerle stimüle ovulasyonda tubalarda zonasız oositler görülür. Bu oositler her ne kadar *in vitro* ortamda döllenerek blastokist oluşturabilse de transfer edildiklerinde henüz canlı bir doğum görülmemiştir [195].

36 adet dişi sıçanın kullanıldığı bir çalışmada sıçanlar her birinde 12 denek olacak şekilde 3 gruba ayrılmış: kontrol, taşıyıcı (20 gün süresince 0,1 ml susam yağı subkutan olarak enjekte edilmiş) ve PCOS (0,2 ml susam yağında çözödürölen 60mg/kg dehidroepiandrosteron 20 gün boyunca subkutan olarak enjekte edilmiş ve PCOS oluşturulmuş grup). Deneklerin ovaryumlarından elde edilen dokularda zona pellusida kalınlığının ölçümü için elektron mikroskopik inceleme yapılmış. Değerlendirilen her bir folliküle ait zona pellusidanın 4 farklı bölgesini gösterecek şekilde X7500 büyöltmede 4 adet fotoğraf çekilmiş ve bu fotoğraflardan bilgisayar yazılımı programı ile kalınlık ölçümü yapılmış. Tüm gruplara ait zona pellusida kalınlıkları arasında anlamlı bir farklılık saptanmadığı rapor edilmiştir [105].

Öreme sistemine zarar veren serbest radikallerin üretiminden sorumlu olduğu düşünölen bisfenol A (BPA), yapılan bir çalışmada dişi sıçanlara uygulanmış ve antioksidan olan C

vitamininin ovaryum dokusu üzerindeki koruyucu etkisi incelenmiş. 20 gün süren bu çalışmada 24 adet dişi Wistar rat kullanılmış ve denekler her birinde 6 adet olacak şekilde 4 gruba ayrılmış: Kontrol, BPA (60 µg/kg/gün), C vitamini (150 mg/kg/gün) ve BPA + C vitamini. Sol ovaryum dokuları çıkarılıp stereolojik yöntemler kullanılarak incelenmiş. Çalışma sonunda BPA grubunda kontrol grubuna göre sekonder ($p < 0,05$) ve antral ($p < 0,001$) folliküllerdeki ZP kalınlığının önemli ölçüde azaldığı rapor edilmiş. Değerlendirilen parametreler açısından kontrol grubu ve BPA + C vitamini grubunun özdeş olduğu bildirilmiş [196].

Kontrol grubu ile susam yağı (çözücü) grubu zona pellusida kalınlığı açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,126$). Kontrol grubu ile düşük doz grubu karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p=0,046$). Kontrol grubu, yüksek doz grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p=0,002$). Düşük doz grubu ile yüksek doz grubu karşılaştırıldığında zona pellusida kalınlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamakla ($p=0,095$) birlikte yüksek doz grubu istatistiksel olarak fazla anlamlı farklılık göstererek düşük doz grubuna göre daha inceydi.

Yapılan bir çalışmada melatoninin, infertilite ve ovaryum disfonksiyonuna neden olan nikotin toksisitesi üzerindeki koruyucu etkisi araştırılmıştır. Araştırmacılar tarafından 32 adet yetişkin fare her birinde 8 denek olacak şekilde 4 gruba ayrılmıştır: Grup 1 (kontrol), Grup 2 (15 gün boyunca 40 µg/kg nikotin), Grup 3 (5 gün boyunca 10 mg/kg) ve Grup 4 (15 gün boyunca 40 µg/kg nikotin + 5 gün boyunca 10 mg/kg). Denekler 16. günde feda edildikten sonra histopatolojik ve morfometrik değerlendirmeler yapılmıştır. Çalışma sonunda kontrol ovaryumlarının primer folliküllerdeki primer oositlerin etrafında düzenli yapıda zona pellusida gözlendiği bildirilmiştir. Ancak sadece nikotin uygulanan grubun ovaryumlarında; folliküllerde dejenerasyon, granuloza hücrelerinin antral kavite içine deskuamasyonu ve oositlerin etrafında düzensiz yapıda zona pellusida gözlendiği rapor edilmiştir. Sadece nikotin uygulanan grubun ovaryumlarındaki dejeneratif semptomların çoğunlukla sekonder ve Graff folliküllerde tespit edildiği ve piknotik granuloza hücrelerinde vakuolizasyonun saptandığı bildirilmiştir. Kontrol grubuna göre sadece nikotin uygulanan grupta sekonder, Graff follikülleri ve korpus luteum sayısının anlamlı olarak azaldığı ($p < 0,05$) rapor edilmiştir [197].

Yapılan bir çalışmada yaygın olarak kullanılan monosodyum glutamatın yetişkin dişi sıçanların ovaryumları üzerine etkisi araştırılmıştır. Araştırmacılar tarafından sıçanlar her birinde 8 denek olacak şekilde 3 gruba ayrılmıştır: Grup A (0,004 mg/kg monosodyum glutamat), Grup B (0,008 mg/kg monosodyum glutamat) ve Grup C (kontrol). Deneklerden elde edilen ovaryum dokularının alışılmış histolojik takip yöntemine tabi tutulduğu ve parafin bloklardan alınan kesitlere rutin hematoksilin-eozin boyaması uygulandığı bildirilmiştir. Çalışma sonunda kontrol grubu ovaryumlarının normal histolojik yapıda olduğu, oositi çevreleyen granüloza ve teka hücrelerinin kompakt bir yapı gösterdiği ve primordiyal folliküllerin bulunduğu bildirilmiştir. Ancak deney grubu ovaryumlarında teka hücrelerinin hücresel hipertrofi gösterdiği, teka hücrelerini granüloza hücrelerinden ayıran bazal membranın bütünlüğünün bozulduğu ve stroma hücrelerinde vakuolizasyonların saptandığı rapor edilmiştir. Oosit ve granüloza hücrelerindeki dejeneratif değişikliklerin Grup B’de daha belirgin olduğu belirtilmiştir [198].

Bizim çalışmamızda ise düşük doz ve yüksek doz uygulanan iso tedavilerinin ovaryumlarda primer folliküllerin ileri gelişimini yani sekonder aşamasına geçmesini engellemediği belirlenmiştir. Ancak, PAS reaksiyonu uygulanarak histomorfolojik olarak değerlendirilen tüm gruplardaki kesitlerde multilaminar primer folliküller incelendiğinde kontrol grubu ve susam yağı grubundaki folliküllerin tüm yapısal elamanlarının normal yapıda olduğu gözlenirken, düşük doz grubunda zona pellusidanın kompakt yapısını kısmen kaybettiği gözlemlendi. Yüksek doz grubunda ise bazı multilaminar primer folliküllerde zona pellusida ya hiç gelişmemişti ya da düzenli morfolojik yapısını tamamen kaybetmişti. Bu grupta ayrıca multilaminar primer folliküllerde yer alan follikül hücreleri arasındaki bağlantı birimlerinin muhtemel dejenerasyonu sonucu intersellüler açılmalar ve follikül hücrelerinde intrasellüler vakuolizasyonlar saptandı.

Birçok araştırma grubu, TGFb süper ailesi genlerinin ve proteinlerinin ovaryum dokularında eksprese olduğunu göstermiştir [199-202]. Yapılan son çalışmalarda, primordiyal follikül evresinden ovulasyon ve korpus luteum oluşumuna kadar meydana gelen morfolojik ve genetik geçişin, ovaryum hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenleyen büyüme faktörü sinyal kaskadının aktivasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [201, 203, 204]. TGFb süper ailesinin genlerini içeren en önemli büyüme faktörleri memelilerin ovaryum somatik hücrelerinde ve oositlerde evrelere özgü bir şekilde eksprese edilirler ve böylece bu büyüme faktörleri follikülogenezin intraovaryan regülatörleri olarak

işlev görürler [201, 205, 206]. En önemli TGFb süper ailesi genleri follikülogenez boyunca ifade edilen, follikül büyümesi ve gelişiminin önemli basamaklarını düzenleyen BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-15 ve GDF-9'u içerir [48].

Memeli follikülogenezinin düzenlenmesinde TGFb süper ailesinin genlerinin rolü ilk olarak GDF-9^{-/-} mutasyonu taşıyan fareler kullanılarak araştırılmıştır [207]. Bu deneyler GDF-9 yokluğunda follikülogenezin primer follikül aşamasında tutulduğunu ve infertilitenin oluştuğunu göstermiştir. Laitinen ve diğerleri (1998), GDF-9'un cDNA analogu olan ve GDF-9b olarak da adlandırılan BMP-15'i bulup bu genin farelerde follikülogenez düzenlemesine dahil olduğunu bildirmişlerdir ve GDF-9 ile GDF-9b'nin follikül büyümesi ve gelişimi sırasında oositte birlikte eksprese edilip lokalize olduklarını göstermişlerdir [208]. Follikülerin büyüme ve gelişimi, oosit ve granüloza hücreleri tarafından üretilen birkaç önemli büyüme faktörünün sentezi ve sekresyonu aracılığıyla düzenlenir. Bu büyüme faktörleri oositler tarafından granüloza hücrelerine salınır ve böylece parakrin regülasyon yoluyla follikül-spesifik mekanizmaları aktive edilir. Yapılan çalışmalar oosite özgü faktörler olan TGF-b süper ailesinin üyeleri GDF-9 ve BMP-15'in rollerini göstermiştir [209]. TGF-b süper aile genlerinin ekspresyonlarının yanı sıra bu genlerin proteinlerinin immünohistokimyasal lokalizasyonu fare, domuz ve koyun dahil olmak üzere farklı hayvan modellerinde gösterilmiştir [209].

Fertilite için gerekli olan GDF-9'un yokluğunda follikül büyümesi primer aşamada bloklanmaktadır [31]. Bununla birlikte GDF-9, granüloza hücrelerinin proliferasyonunu, teka tabakalarının oluşumunu, teka hücrelerinde androjen biyosentezinin teşvik edilmesini [210] ve kumulus hücrelerinin büyümesini aktif olarak indüklemektedir [211]. GDF-9, oosit ve oositin çevresindeki somatik hücreler arasındaki iletişimde aktif olarak görev almaktadır [207, 212]. Buna karşılık farelerde BMP-15 yokluğu infertilite ile sonuçlanmamaktadır ancak bu durumdaki fareler subfertilidir, yumurtlama ve döllenme bozukluğu göstermektedir bu da peri-ovulatuvar dönemde BMP-15'in önemine işaret etmektedir [31].

Yapılan bir çalışmada GDF-9 proteininin follikülogenez sırasında erken primer follikül aşamasından itibaren sıçan oositlerinden eksprese edildiği ancak en yoğun immün işaretlemenin primer ve preantral folliküllerde görüldüğü rapor edilmiştir [213].

Bu çalışmada da GDF-9'un kontrol grubu ve çözücü grubunda primordiyal ve primer follikül aşamasındaki tüm oositlerde eksprese edildiği belirlendi. Ancak düşük doz grubunda ve yüksek doz grubunda yer alan primordiyal ve primer folliküllerdeki oositlerde GDF-9 ekspresyonu kontrol grubu ve çözücü grubuna göre anlamlı olarak azalmıştı. Sekonder folliküllerde yer alan oositlerdeki GDF-9 ekspresyonu değerlendirildiğinde ise tüm gruplar arasında farklılık gözlenmedi. Bu durum GDF-9 ekspresyonunun en yoğun primer follikül aşamasında gözlemlendiği bilgisini destekler nitelikteydi.

Northern blot ve *in situ* hibridizasyon analizleri ile BMP-15 için de benzer bir ekspresyon modeli ortaya konulmuştur. İzole edilen ovaryum cDNA'larından çıkarılan polipeptit sekansları ile sıçan GDF-9 prepropeptidinin 440 amino asit uzunluğunda olduğu ve olgun bölgenin 135 amino asit uzunluğunda olduğu belirtilirken, sıçan BMP-15 prepropeptidinin 391 ve olgun bölgenin 125 amino asit uzunluğunda olduğu belirtilmiştir. Bu deneyin sonucunda araştırmacılar; GDF-9'un sıçan ovaryumlarının primer folliküllerinin oositlerinde yüksek oranda eksprese edildiğini ve çoğunlukla erken follikülogenezde rol oynadığını, GDF-9 gibi BMP-15'in de benzer gelişim aşamalarında follikülogenezi düzenleyebilen bir büyüme faktörü olabileceğini göstermişlerdir [213].

TGF-b süper ailesi genleri, BMP / Smad sinyalizasyon kaskadını içeren yollar aracılığıyla aktifleşir. Hu koyunu olarak adlandırılan özel bir koyun türünde, bu sinyal yollarının Hu koyununun yüksek doğurganlığına etkisi incelenmiştir [214]. Bu çalışmada dişi koyunlar FecB (A746G) ve BMPRII gen mutasyonları için analiz edilmiş ve RT-PCR ekspresyon analizi ile BMP ile ilişkili genleri (BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 ve BMP-15), BMP reseptörleri (BMPRII, BMPRII ve BMPRII), Smad ailesi genleri (Smad-1, Smad-4 ve Smad-5) ve TGFBR1 ve GDF-9 gibi diğer TGF-b süper ailesi genleri tespit edilmiş. İncelenen tüm hayvanların, BMPRII'de (A746G) mutasyonlar için homozigot olduğu ve analiz edilen TGF-b süper ailesi genlerinin tümünün Hu koyunu ovaryumlarında eksprese edildiği bildirilmiştir. BMP-4, BMPRII, BMPRII, Smad-4, GDF-9 ve TGF-betaRI mRNA'larının ekspresyonu, yüksek fertiliteli dişi koyunların antral folliküllerinde düşük fertiliteli dişi koyunlara göre artarken, BMP15 ekspresyonunun azaldığı rapor edilmiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda TGF-b/BMP/Smad sinyalizasyon kaskadının, Hu koyununun ovaryum follikülogenezi sırasında önemli bir rol oynadığı ve BMPRII dışındaki TGF-b ile ilişkili genlerde meydana gelebilecek birkaç mutasyonun uygun follikülogenezi etkileyebileceği bildirilmiştir [214].

Memeli ovaryumlarında bulunan BMP ailesinin ekspresyonuna ve fonksiyonuna karşı olan bu büyük ilginin BMP proteinlerinin follikülogenez ve kadın fertilitésinin belirlenmesindeki kritik rolünün kanıtlarından doğduğu söylenmektedir. Yapılan kapsamlı çalışmalara rağmen, bu önemli düzenleyici moleküllerin hücresel ekspresyon bölgelerinin ve gen ekspresyonlarının döngü boyunca ovaryum hücre tipleri içinde nasıl değiştiğinin tam olarak anlaşılmadığı bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada BMP ligandları (BMP-2, BMP-3, BMP-3b, BMP-4, BMP-6, BMP-7, BMP-15), reseptörleri (BMPR-IA, -IB, -II), BMP antagonisti ve follistatinin sıçan ovaryumlarındaki normal östrus döngüsü üzerindeki mekânsal ve zamansal ekspresyon modellerinin ayrıntılı *in situ* hibridizasyon analizi değerlendirilmiştir. Çalışma sonunda tüm mRNA'ların ovaryum hücre tiplerinin (oosit, granüloza, teka interna, teka eksterna, korpus luteum, sekonder interstisyel, vasküler ve ovaryum yüzey epitelyumu) ana sınıflarında hücreye özgü bir şekilde eksprese edildiği ve çoğunun folliküler ve korpora luteal morfogenez ve histogenez sırasında dinamik değişikliklere uğradığı rapor edilmiştir. Bu çalışmalardan ortaya çıkacak genel kanının follikülojenez (seleksiyon ve atrezi), ovulasyon ve luteogenezin (luteinizasyon, luteoliz) gelişim programlarının, BMP genlerinin ekspresyon modellerinde oldukça dramatik mekansal ve zamansal değişimlerle birlikte bulunması olduğu söylenmektedir [215].

Yapılan bir çalışmada 23-25 günlük 45 adet dişi fare kullanılmış ve her birinde 15 denek olacak şekilde 3 grup oluşturulmuş: hiçbir işlemin yapılmadığı Grup I, subkutan olarak susam yağı enjekte edilen Grup II ve PCOS modeli oluşturulan Grup III. Deney sonunda elde edilen ovaryum dokularında GDF-9 ve BMP-15 immünofloresan işaretlemeleri için gerekli histolojik prosedür gerçekleştirilmiş. GDF-9 ve BMP-15 immüntutulum yoğunluğunun Grup III'de benzer olduğu ve diğer iki gruba göre primer follikülden sonraki basamaklarda anlamlı olarak azaldığı bildirilmiş ($p<0,001$ ve $p<0,001$). Aynı zamanda diğer gruplara göre Grup III'de pre-antral ve antral folikül sayısının arttığı rapor edilmiş [216].

Bu çalışmada BMP-15'in kontrol grubu ve çözücü grubunda primordiyal ve primer follikül aşamasındaki tüm oositlerde eksprese edildiği belirlendi. Ancak düşük doz grubunda ve yüksek doz grubunda yer alan primordiyal ve primer folliküllerdeki oositlerde BMP 15 ekspresyonu kontrol grubu ve çözücü grubuna göre anlamlı olarak azalmıştı. Sekonder folliküllerde yer alan oositlerdeki BMP 15 ekspresyonu değerlendirildiğinde ise tüm gruplar arasında farklılık gözlenmedi.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda izotretinoinin deney öncesi ve sonrası vücut ağırlık ölçümleri yapılarak ortalamaları alınan deneklerde gruplar arasında anlamlı bir ağırlık değişimine neden olmadığı anlaşılmıştır. Sadece düşük doz izotretinoin uygulanan grupta deney öncesi ve sonrası ağırlık ortalamalarının diğer gruplara göre fazla olması randomize olarak dağıtılan deneklerin bu grupta tesadüfen başlangıç ağırlıklarının zaten fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Çalışmamız sonucunda zona pellusida kalınlık farkı değerlendirildiğinde ise kontrol grubu ile deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir. Bu farklılık deney grubu deneklerde zona pellusidanın artan doza bağlı olarak incelmeye şekliyledir. Ayrıca histomorfolojik olarak PAS reaksiyonu ile incelenen multilaminar primer follikül aşamasındaki kumulus-oosit komplekslerinde düşük doz grubunda zona pellusidanın kompakt yapısını kısmen kaybettiği gözlenmiştir. Yüksek doz grubunda ise bazı multilaminar primer folliküllerde zona pellusidanın ya hiç gelişmediği ya da düzenli morfolojik yapısını tamamen kaybettiği gözlenmiştir. Bu grupta ayrıca histomorfolojik olarak multilaminar primer folliküllerde yer alan follikül hücreleri arasındaki bağlantı birimlerinin muhtemel dejenerasyonu sonucu intersellüler açılmalar ve follikül hücrelerinde intrasellüler vakuolizasyonlar belirlenmiştir.

Çalışmamızın moleküler bölümünü oluşturan GDF-9 ekspresyonlarının düşük doz grubunda ve yüksek doz grubunda yer alan primordiyal ve primer folliküllerdeki oositlerde kontrol grubu ve suam yağı (çözücü) grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. Ancak GDF-9 ekspresyonunun en yoğun primer follikül aşamasında gözlemlendiği bilgisini destekler nitelikte sekonder folliküllerde yer alan oositlerdeki GDF-9 ekspresyonu kontrol ve susam yağı (çözücü) grubunda olduğu gibi deney gruplarında da gözlenmemiştir.

Çalışmamızın BMP-15 ekspresyonlarının değerlendirildiği bölümünde ise kontrol grubu ve susam yağı (çözücü) grubunda primordiyal ve primer follikül aşamasındaki tüm oositlerde eksprese edildiği belirlenmiştir. Ancak düşük doz grubunda ve yüksek doz grubunda yer alan primordiyal ve primer folliküllerdeki oositlerde BMP-15 ekspresyonunun kontrol grubu ve çözücü grubuna göre anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. Sekonder folliküllerde

yer alan oositlerdeki BMP-15 ekspresyonu değerlendirildiğinde ise tüm gruplar arasında farklılık gözlenmemiştir.

Sonuç olarak izotretinoinin düşük doz uygulamasının primordiyal ve primer folliküllerde yer alan kumulus-oosit kompleksinde hasar belirtilerinin ilk sinyallerini oluşturduğu gözlenmiştir. Histolojik ve moleküler sonuçlarla ortaya konan bu bulgu, yüksek doz uygulamasında ise daha ileri olarak sergilenmiştir ve folliküllerin ileri farklanması multilaminar primer follikülde bloke edildiği, kumulus oosit komplekslerinin sekonder follikül aşamasından itibaren atretik follikülden çok dejeneratif bulgular sergilediği belirlenmiştir.

Literatürde izotretinoinin kısa ve uzun dönem etkileri genellikle az sayıda histomorfolojik ve çoğunlukla hormonal parametrelerle açıklayan araştırmalar yer almaktadır. Bu çalışmanın literatüre histomorfolojik, histometrik ve moleküler düzeyde katkı sağladığı düşünülmektedir. Çalışmamızın sonunda önerilen, izotretinoinin 30 günden daha uzun dönemde kronik etkilerinin aynı parametreler ile değerlendirilmesidir.

KAYNAKLAR

1. Dreno, B. ve Poli, F. (2003). Epidemiology of acne. *Dermatology*. 206(1), 7-10.
2. James, W. D., Berger, T. ve Elston, D. M. (2008). *Andrew's Deri Hastalıkları Klinik Dermatoloji*. (Çev. E. H. Aydemir). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi. (Eserin orijinali 2006'da yayımlandı). 231-250.
3. Knutsen-Larson, S., Dawson, A. L., Dunnick, C. A. ve Dellavalle, R. P. (2012). Acne vulgaris: pathogenesis, treatment and needs assessment. *Dermatologic Clinics*. 30(1), 99-106.
4. Cunliff, W. J. ve Simpson, N. B. (1998). *Disorders of the sebaceous glands*. Champion, R. H., Burton, J. L. ve Burns, D. A. (Editörler). Textbook of Dermatology London: Blackwell Science. 1927-1984.
5. Aydemir, E. H. (2011). Akne vulgaris; etyolojiden tedaviye. *Türk Pediatri Arşivi Dergisi*. 46 Özel Sayı: 132-134.
6. Strauss, J. S. ve Thiboutot D. M. (2008). *Diseases of sebaceous glands* (Yedinci Baskı). Freedberg, M. I., Eisen, A. Z., Wolf, K., Austen, K. F., Goldsmith, L. A. ve Katz S. I. (Editörler). Dermatology in General Medicine. New York: McGraw Hill Co. 687-712.
7. Thiboutot, D. (2004). Regulation of human sebaceous glands. *Journal of Investigative Dermatology*. 123, 1-12.
8. Gencoglan, G. ve Tosun, M. (2011). Effects of isotretinoin on spermatogenesis of rats. *Cutaneous and Ocular Toxicology*. 30(1), 55-60.
9. Comitato, R., Esposito, T., Cerbo, G., Angelini, F., Varriale, B. ve Cardone A. (2006). Impairment of spermatogenesis and enhancement of testicular germ cell apoptosis induced by exogenous all-trans-retinoic acid in adult lizard *Podarcis sicula*. *Journal of Experimental Zoology Part A Comparative Experimental Biology*. 305, 288-298.
10. Ferguson, S. A., Cisneros, F. J., Gough, B. J. ve Ali, S. F. (2005). Four weeks of oral isotretinoin treatment causes few signs of general toxicity in male and female Sprague-Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology*. 43, 1289-1296.
11. Cinar, S. L., Kartal, D., Aksoy, H., Cinar, E., Aydin, T., Öz, L., İmamoğlu, H., Ferahbas, A. ve Borlu, M. (2017). Long term effect of systemic isotretinoin on female fertility. *Cutaneous and Ocular Toxicology*. 36(2), 132-134.
12. Kırca, N. ve Pasinlioğlu, T. (2013). İnfertilite tedavisinde karşılaşılan psikososyal sorunlar. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar*. 5(2), 162-178.
13. Çelik, Ö. (Editör). (2011). *Yardımcı üreme teknikleri temel klinik ve embriyolojik uygulamalar*. Adana: Nobel Tıp Kitabevi. 101-137.

14. Çinar, L., Kartal, D., Ergin, C., Aksoy, H., Karadag, M. A. ve Aydın, T. (2016). The effect of systemic isotretinoin on male fertility. *Cutaneous and Ocular Toxicology*. 35, 296-299.
15. Melnik, B. C. (2017). Apoptosis may explain the pharmacological mode of action and adverse effects of isotretinoin, including teratogenicity. *Acta Dermato Venereologica*. 97, 173-181.
16. Abali, R., Yuksel, M. A., Aktas, C., Celik, C., Guzel, S., Erfan, G. ve Sahin, O. (2013). Decreased ovarian reserve in female Sprague-Dawley rats induced by isotretinoin (retinoic acid) exposure. *Reproductive Biomedicine Online*. 27, 184-191.
17. Korkmaz, E., Cetinkaya, N., Oz, M., Ozgu, E., Bas, S., Isikalan, M., Buyukkagnici, U., Caydere, M., Hucumenoglu, S. ve Gungor, T. (2016). The possibly reversible isotretinoin effect of decreased ovarian reserve in Sprague-Dawley albinos: part I, biochemical analyses. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. DOI: 10.1159/000445294.
18. Leyden, J. J., Del Rosso, J. Q. ve Baum, E. W. (2014). The use of isotretinoin in the treatment of acne vulgaris: clinical considerations and future directions. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*. 7(2), 3-21.
19. Rao, P. K., Bhat, R. M., Nandakishore, B., Dandakeri, S., Martis, J. ve Kamath, G. H. (2014). Safety and efficacy of low-dose isotretinoin in the treatment of moderate to severe acne vulgaris. *Indian Journal of Dermatology*. 59, 316.
20. Snyder, R. ve Thekkumkara, T. (2013). Interplay between EGR1 and SP1 is critical for 13-cis retinoic acid-mediated transcriptional repression of angiotensin type 1A receptor. *Journal of Molecular Endocrinology*. 50, 361-374.
21. Blaner, W. S. (2001). Cellular metabolism and actions of 13-cis-retinoic acid. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 45, 129-135.
22. Katsambas, A. D., Stefanaki, C. ve Cunliffe, W. J. (2004). Guidelines for treating acne. *Clinics in Dermatology*. 22, 439-444.
23. Sykes, N. L. Jr. ve Webster, G. F. (1994). Acne. A review of optimum treatment. *Drugs*. 48, 59-70.
24. Cunliffe, W.J. ve Goulden, V. (2000). Phototherapy and acne vulgaris. *British Journal of Dermatology*. 142, 855-856.
25. Owen, C. E. (2014). Treating acne with high-dose isotretinoin. *The Journal of the American Medical Association*. 311, 2121-2122.
26. Rasi, A., Behrangi, E., Rohaninasab, M. ve Nahad, Z. M. (2014). Efficacy of fixed daily 20 mg of isotretinoin in moderate to severe scar prone acne. *Advanced Biomedical Research*. 3, 103.
27. Sardana, K. ve Garg, V. K. (2010). Efficacy of low-dose isotretinoin in acne vulgaris. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*. 76, 7-13.

28. Akyol, M. ve Ozcelik, S. (2005). Non-acne dermatologic indications for systemic isotretinoin. *American Journal of Clinical Dermatology*. 6, 175-184.
29. Brelsford, M. ve Beute, T. C. (2008). Preventing and managing the side effects of isotretinoin. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*. 27, 197-206.
30. Kumar, T. R., Wang, Y., Lu, N. ve Matzuk, M. M. (1997). Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nature Genetics*. 15, 201-204.
31. Yan, C., Wang, P., DeMayo, J., DeMayo, F. J., Elvin, J. A., Carino, C., Prasad, S. V., Skinner, S. S., Dunbar, B. S. ve Dube, J. L. (2001). Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Molecular Endocrinology*. 15, 854-866.
32. Carabatsos, M. J., Elvin, J., Matzuk, M. M. ve Albertini, D. F. (1998). Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. *Developmental Biology*. 204, 373-384.
33. Pollard, J. W. ve Stanley, E. R. (1996). Pleiotropic roles for CSF-1 in development defined by the mouse mutation osteopetrotic. *Advances in Developmental Biochemistry*. 4, 153-193.
34. Sadler, T. W. (2011). *Langman's medikal embriyoloji*. (Çev. A. C. Başaklar) Ankara: Palme Yayıncılık. (Eserin orijinali 2009'da yayımlandı). 246-264.
35. Moore, K. L., Persaud, T. V. N. (2002). *Klinik yönleri ile insan embriyolojisi*. Yıldırım, M., Okar, İ. ve Dalçık, H. (Editörler). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 325-345.
36. Gartner, L. P. ve Hiatt, J. L. (2009). *Renkli histoloji atlası* (4. Baskı). (Çev. Ed. A. Dağdeviren, F. S. Müftüoğlu, G. Karabay). Güneş Tıp Kitabevleri. 343-368.
37. Ross, M.H. ve Pawlina, W. (2011). *Histology a text and atlas* (6. Baskı). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 830-895.
38. Arıncı, K. ve Elhan, A. (2001). *Anatomi 1. cilt*. Ankara: Güneş Kitabevi. 337-345.
39. Strandring, S. (2004). *Gray's anatomy*. Churchill Livingstone. 1321-1326.
40. Erdoğan, D., Hatipoğlu, M. T., Görgün, M. ve Ilgaz, C. (2007). *Özel histoloji*. Ankara: Hatiboğlu Yayınevi. 175-181.
41. Junqueira, L. C. ve Carneiro J. (2006). *Temel histoloji*. (Çev. Ed. Y. Aytekin ve S. Solakoğlu). Nobel Tıp Kitabevleri. (Eserin orijinali 2002'de yayımlandı). 449-458
42. Kierszenbaum, A. L. (2006). *Histoloji ve hücre biyolojisi*. (Çev. Ed. R. Demir). Ankara: Palme Yayıncılık. (Eserin orijinali 2002'de yayımlandı). 565-576.
43. Gürsoy, E. ve Ergin, K. (2007). *Dişi üreme sistemi atlası*. Nobel Tıp Kitabevleri. 3-12.

44. Guyton, A. C. ve Hall, J. E. (2006). *Text book of medical physiology* (11. Baskı). W.B. Saunders Company. 906-1026.
45. Ganong, W. F. (2002). *Tıbbi fizyoloji* (20. Baskı). (Çev. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği). Nobel Tıp Kitabevleri. (Eserin orijinali 2001’de yayımlandı). 419-433.
46. Kuyucu, Y. ve Tap, Ö. (2009). Oosit olgunlaşma süreci ve düzenleyici faktörler. *Arşiv*. 18, 227.
47. Picton, H. M., Haris, S. E., Muruvi, W. ve Chambers, E. L. (2008). The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction*. 136, 703-715.
48. Knight, P. G. ve Glistler, C. (2006). TGF-b superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*. 132, 191-206.
49. Fortune, J. E. (2003). The Early stages of follicular development: Activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*. 78, 135-163.
50. Webb, R., Garnsworthy, P. C., Gong, J. G. ve Armstrong D. G. (2004). Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *Journal of Animal Science*. 82(13), 63-74.
51. Liu, Y. X. (2007). Interaction and signal transduction between oocyte and somatic cells in the ovary. *Bioscience*. 12, 2772-2796.
52. Sahla, O., AAbusheika, N. ve Sharma, V. (1998). Dynamics of human follicular growth and in-vitro oocyte maturation. *Human Reproduction Update*. 4(6), 816-832.
53. Hammes, S. R. (2003). The further redefining of steroid-mediated signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100(5), 2168-2170.
54. Zhang, M., Ouyang, H. ve Xia, G. (2009). The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. *Molecular Human Reproduction*. 15(7), 399-409.
55. Abramovich, S. S., Edry, I., Galiani, D., Nevo, N. ve Dekel, N. (2006). Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. *Endocrinology*. 147, 2280-2286.
56. Motta, P. M., Makebe, S. ve Notta, S. A. (1997). The ultrastructure of human reproduction. 1. the natural history of the female germ cell: Origin, migration and differentiation inside the developing ovary. *Human Reproduction Update*. 3(3), 281-295.
57. Carlson, B. M. (2008). *Human embryology and developmental biology* (4. Baskı). Bölüm 1.
58. Schoenwolf, G. C., Bleyl, S. B., Brauer P. R. ve Francis-West, P. H. (2008). *Larsen’s human embryology* (4. Baskı). Bölüm 1.

59. Ross, M.H. ve Pawlina, W. (2011). *Histology a text and atlas* (6. Baskı). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 75-104.
60. Richard, F. J. (2007). Regulation of meiotic maturation. *Journal of Animal Science*. 85, 4-6.
61. Heikinheimo, O. ve Gibbons, W. E. (1988). The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine. *Molecular Human Reproduction*. 4(8), 745-756.
62. Tunquist, B. J. ve Maller, J. L. (2003). Under arrest: Cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes & Development*. 17, 683-710.
63. Fan, H. Y. ve Sun, Q. Y. (2004). Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction*. 70, 535-547.
64. Sun, Q. Y. ve Schatten, H. (2006). Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction*. 131, 193-205.
65. Miyazaki, S. ve Ito, M. (2006). Calcium signals for egg activation in mammals. *Journal of Pharmacological Sciences*. 100, 545-552.
66. Orisaka, M., Orisaka, S., Jiang, J. Y., Craig, J., Wang, Y., Kotsuji, F. ve Tsang, B. K. (2006). Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. *Molecular Endocrinology*. 20, 2456-2468.
67. Tománek, M. ve Chronowska, E. (2006). Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the pig ovary. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 44, 269-274.
68. Otsuka, F., Yao, Z., Lee, T. H., Yamamoto, S., Erickson, G. F. ve Shimasaki, S. (2000). Bone morphogenetic protein-15 Identification of target cells and biological functions. *Journal of Biological Chemistry*. 275, 39523-39528.
69. Otsuka, F., McTavish, K. J. ve Shimasaki, S. (2011). Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Molecular Reproduction and Development*. 78, 9-21.
70. Otsuka, F., Yamamoto, S., Erickson, G. F. ve Shimasaki, S. (2001). Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. *Journal of Biological Chemistry*. 276, 11387-11392.
71. Otsuka, F. ve Shimasaki, S. (2002). A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99, 8060-8065.
72. Otsuka, F., Moore, R. K., Iemura, S. I., Ueno, N. ve Shimasaki, S. (2001). Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 289, 961-966.

73. Çelik, Ö. (Editör). (2011). *Yardımcı üreme teknikleri temel klinik ve embriyolojik uygulamalar*. Adana: Nobel Tıp Kitabevi. 51-56.
74. Hussein, T. S., Froiland, D. A., Amato, F., Thompson, J. G. ve Gilchrist, R. B. (2005). Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *Journal of Cell Science*. 118, 5257-5268.
75. Yoshino, O., McMahon, H. E., Sharma, S. ve Shimasaki, S. (2006). A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103, 10678-10683.
76. Auffret N. (2003). What's new concerning the pathophysiology of acne? *Annals of Dermatology and Venerology Editorial*. 130, 5-10.
77. Bolognia, J. L., Jorizzo, J. L. ve Rapini P. R. (2003). *Dermatology* (2. Baskı). Edinburgh: Mosby. 531-535.
78. Oberemok, S. S. ve Shalita, A. R. (2002). Acne vulgaris, I: pathogenesis and diagnosis. *Cutis*. 70, 101-105.
79. Braun-Falco, O., Plewig, G., Wolf, H. H. ve Burgdorf, W. H. (2000). *Dermatology* (2. Baskı). Berlin: Springer Verlag. 1057-1081.
80. Burkhart, C. N. (2003). Clinical assessment of acne pathogenesis with treatment implications. *International Pediatrics*. 1, 14-19.
81. Polat, M., Lenk, N., Bingöl, S., Öztaş, P., İlhan, M. N., Artüz, F. ve Alli, N. (2008). Plasma homocysteine level is elevated in patients on isotretinoin therapy for cystic acne: A prospective controlled study. *Journal of Dermatological Treatment*. 19, 229-232.
82. Farrar, M. D. ve Ingham, E. (2004). Acne inflammation. *Clinics in Dermatology*. 22, 380-384.
83. Nagy, I., Pivarcsi, A., Kis, K., Koreck, A., Bodai, L., McDowell, A. ve Kemeny, L. (2006). Propionibacterium acnes and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes. *Microbes and Infection*. 8, 2195-2205.
84. Akamatsu, H., Horio, T. ve Hattori, K. (2003). Increased hydrogen peroxide generation by neutrophils from patients with acne inflammation. *International Journal of Dermatology*. 42, 366-369.
85. Brown, S. K. ve Shalita, A. R. (1998). Acne vulgaris. *Lancet*. 351, 1871-1876.
86. Tüzün, Y. ve Dolar, N. (2004). Güncel akne tedavisi. *Dermatose*. 3, 220-229.
87. Cunliffe, W. J., Holland, D. B. ve Jeremy, A. (2004). Comedone formation: etiology, clinical presentation, and treatment. *Clinics in Dermatology*. 22, 367-374.

88. Berson, D. S. ve Shalita, A. R. (1995). The treatment of acne: The role of combination therapies. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 32, 31-41.
89. Goldsmith, L. A., Bolognia, J. L., Callen, J. P., Chen, S. C., Feldman, S. R., Lim, H. W., Lucky, A. W., Reed, B. R., Siegfried, E. C., Thiboutot, D. M. ve Wheeland, R. G. (2004). Consensus conference on the safe and optimal use of isotretinoin: Summary and recommendations. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 50, 900-906.
90. Gollnick, H. ve Cunliffe, W. J. (2003). Management of acne. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 49, 1-37.
91. Zouboulis, C. C. (2001). Exploration of retinoid activity and the role of inflammation in acne: issues affecting future directions for acne therapy. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 15, 63-67.
92. Sardana, K. ve Seghal, V. N. (2003). Retinoids: Fascinating up-and-coming scenario. *The Journal of Dermatology*. 30, 355-380.
93. Mills, C. M. ve Marks, R. (1993). Adverse reactions to oral retinoids. *Drug Safety* 9, 280-290
94. Goulden, V., Layten, A. M. ve Cunliffe, W. J. (1994). Long-term safety of isotretinoin as a treatment for acne vulgaris. *British Journal of Dermatology*. 18, 543-552.
95. Kaymak, Y. ve İlter, Y. (2006). The results and side effects of systemic isotretinoin treatment in 100 patients with acne vulgaris. *Dermatology Nursing/Dermatology Nurses' Association*. 18, 576-580.
96. Leyden, J. J. (1998). The role of isotretinoin in the treatment of acne: personal observations. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 39, 45-49.
97. Lerman, S. (1992). Ocular side-effects of Accutane therapy. *Lens Eye Toxic Research*. 9, 429-438.
98. Diffey, B. L., Spiro, J. G. ve Hindson, T. C. (1985). Photosensitivity studies and isotretinoin therapy. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 12, 119-121.
99. Chu, T. ve Cunliffe, W. J. (1998). Roaccutane and adverse reactions. *Retinoids*. 14, 148-150.
100. Charles, N. E. ve Kent, J. K. (2001). Uses and complications of isotretinoin therapy. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 45, 150-157.
101. McLane, J. (2001). Analysis of common side effects of isotretinoin. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 45, 188-194.
102. Giovanna, J. J. (2001). Isotretinoin effects on bone. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 45, 176-182.

103. Gür, G., Allı, N., Güngör, E. ve İkizoğlu, G. (2002). İsoetretinoin tedavisi sırasında akne fulminans gelişen bir olgu. *Türkiye Klinikleri Dermatoloji Dergisi*. 12, 160-162.
104. Bertrand, E., Van Den Bergh, M. ve Englert, Y. (1995). Does zona pellucida thickness influence the fertilization rate? *Human Reproduction*. 10 (5), 1189-1193.
105. Dervişoğlu, H. (2014). Polikistik over sendromu oluşturulmuş sıçanlarda zona pellusida glikoproteinlerinin ekspresyonu ve ince yapısının incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*.
106. Saribas, G. S., Erdogan, D., Goktas, G., Akyol, S. N., Hirfanoglu, I. M., Gorgen, S. G., Coskun, N. ve Ozogul, C. (2016). Examining the protective effects of acetyl L-carnitine on cisplatin-induced uterine tube toxicity. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 36(8), 1086-1092.
107. Aktan, S., Özmen, E. ve Sanlı, B. (2000). Anxiety, depression and nature of acne vulgaris in adolescents. *International Journal of Dermatology*. 39, 354-357.
108. Hanna, S., Sharma, J. ve Klotz, J. (2003). Acne vulgaris: more than skin deep. *Dermatology Online Journal*. 9(3), 8.
109. Kellet, S. C. ve Gawkrödger, D. J. (1999). The psychological and emotional impact of acne and the effect of treatment with isotretinoin. *British Journal of Dermatology*. 140(2), 273-82.
110. Rubinow, D. R., Peck, G. L., Squillace, K. ve Gantt, G. G. (1987). Reduced anxiety and depression in cystic acne patients after successful treatment with oral isotretinoin. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 17, 25-32.
111. van der Meeren, H. L. M., van der Meeren, W. W. ve van der Hurk, C. M. A. M. (1985). The psychological impact of severe acne. *Cutis*. 36(1), 84-6.
112. Kaymak, Y., Kalay, M., Ilter, N. ve Taner, E. (2006). The incidence of depression related to isotretinoin treatment in 100 acne vulgaris patients. *Psychological Reports*. 99(3), 897-906.
113. Khan, M. Z., Naeem, A. ve Mufti, K. A. (2001). Prevalance of mental health problems in acne patients. *Journal of Ayub Medical College Abbottabad*. 13(4), 7-8.
114. Lee, D. D., Stojadinovic, O., Krzyzanowska, A., Vouthounis, C., Blumenberg, M. ve Tomic-Canic, M. (2009). Retinoid-responsive transcriptional changes in epidermal keratinocytes. *Journal of Cellular Physiology*. 220, 427-439.
115. Eckhart, L., Lippens, S., Tschachler, E. ve Declercq, W. (2013). Cell death by cornification. *Biochimica Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 1833, 3471-3480.
116. Costanzo, A., Fausti, F., Spallone, G., Moretti, F., Narcisi, A. ve Botti, E. (2015). Programmed cell death in the skin. *The International Journal of Developmental Biology*. 59, 73-78.

117. Peck, G. L., Olsen, T. G., Yoder, F. W., Strauss, J. S., Downing, D. T., Pandya, M., Danute, B. ve Arnaud-Battandier, J. (1979). Prolonged remissions of cystic and conglobate acne with 13-cis-retinoic acid. *The New England Journal of Medicine*. 300, 329-333.
118. Kligman, A. M., Wheatley, V. R. ve Mills, O. H. (1970). Comedogenicity of human sebum. *Archives of Dermatology*. 102, 267-275.
119. Zouboulis, C. C., Jourdan, E. ve Picardo, M. (2014). Acne is an inflammatory disease and alterations of sebum composition initiate acne lesions. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 28, 527-532.
120. Melnik, B. C. (2015). Linking diet to acne metabolomics, inflammation, and comedogenesis: an update. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. 8, 371-388.
121. Strauss, J. S., Stranieri, A. M., Farrell, L. N. ve Downing, D. T. (1980). The effect of marked inhibition of sebum production with 13 cis-retinoic acid on skin surface lipid composition. *Journal of Investigative Dermatology*. 74, 66-67.
122. Nelson A. M., Gilliland K. L., Cong Z., Thiboutot D. M. (2006). 13-cis Retinoic acid induces apoptosis and cell cycle arrest in human SEB-1 sebocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 126: 2178-2189.
123. Nelson, A. M., Cong, Z., Gilliland, K. L. ve Thiboutot, D. M. (2011). TRAIL contributes to the apoptotic effect of 13-cis retinoic acid in human sebaceous gland cells. *British Journal of Dermatology*. 165, 526-533.
124. Nelson, A. M., Zhao, W., Gilliland, K. L., Zaenglein, A. L., Liu, W. ve Thiboutot, D. M. (2008). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin mediates 13-cis retinoic acid-induced apoptosis of human sebaceous gland cells. *Journal of Clinical Investigation*. 118, 1468-1478.
125. Kelh  l  , H. L., Fyhrquist, N., Palatsi, R., Lehtim  ki, S., V  yrynen, J. P., Kubin, M. E., Kallioinen, M., Alenius, H., Tasanen, K. ve Lauerma A. (2016). Isotretinoin treatment reduces acne lesions but not directly lesional acne inflammation. *Experimental Dermatology*. 25, 477-478.
126. MacFarlane, M. (2003). TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicology Letters*. 139, 89-97.
127. Nau, H. (2001). Teratogenicity of isotretinoin revisited: species variation and the role of all-trans-retinoic acid. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 45, 183-187.
128. Shin, J., Cheetham, T. C., Wong, L., Niu, F., Kass, E., Yoshinaga, M. A., Sorel, M., McCombs, J. S. ve Sidney, S. (2011). The impact of the iPLEDGE program on isotretinoin fetal exposure in an integrated health care system. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 65, 1117-1125.

129. Coberly, S., Lammer, E. ve Alashari, M. (1996). Retinoic acid embryopathy: case report and review of literature. *Pediatric Pathology & Laboratory Medicine*. 16, 823-836.
130. Lammer, E. J., Chen, D. T., Hoar, R. M., Agnish, N. D., Benke, P. J., Braun, J. T., Curry, C. J., Fernhoff, P. M., Grix, Jr., A. W., Lott, I. T., Richard, J. M., ve Sun, S. C. (1985). Retinoic acid embryopathy. *The New England Journal of Medicine*. 313, 837-841.
131. Lynburg, M. C., Khoury, M. J., Lammer, E. J., Waller, K. O., Codero, J. F. ve Erickson, J. D. (1990). Sensitivity, specificity and positive predictive value of malformations in isotretinoin embryopathy. *Teratology*. 42, 513-519.
132. Fernhoff, P. M. ve Lammer, E. J. (1984). Craniofacial features of isotretinoin embryopathy. *Journal of Pediatrics*. 5, 595-597.
133. Wang, L., Mear, J. P., Kuan, C. Y. ve Colbert, M. C. (2005). Retinoic acid induces CDK inhibitors and growth arrest specific (Gas) genes in neural crest cells. *Development, Growth & Differentiation*. 47, 119-130.
134. Williams, S. S., Mear, J. P., Liang, H. C., Potter, S. S., Aronow, B. J. ve Colbert, M. C. (2004). Large-scale reprogramming of cranial neural crest gene expression by retinoic acid exposure. *Physiological Genomics*. 19, 184-197.
135. Johnston, M. C. ve Bronsky, P. T. (1991). Animal models for human craniofacial malformations. *Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology*. 11, 277-291.
136. Watanabe, T., Goulding, E. H. ve Pratt, R. M. (1988). Alterations in craniofacial growth induced by isotretinoin (13-cis-retinoic acid) in mouse whole embryo and primary mesenchymal cell culture. *Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology*. 8, 21-33.
137. Lammer, E. J. ve Armstrong, D. L. (1991). Malformations in hindbrain structures among humans exposed to isotretinoin (13-cisretinoic acid) during early embryogenesis. Morriss-Kay, G. (Editör). *Retinoids in Normal Development and Teratogenesis*. New York: Oxford University Press. 281-295.
138. Shuler, C. F. (1995). Programmed cell death and cell transformation in craniofacial development. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 6, 202-217.
139. Vieira, A. S., Bejamini, V. ve Melchioris, A. C. (2012). The effect of isotretinoin on triglycerides and liver aminotransferases. *Anais Brasileiros Dermatologia*. 87, 382-387.
140. Kızılyel, O., Metin, M. S., Elmas, Ö. F., Çayır, Y. ve Aktaş, A. (2014). Effects of oral isotretinoin on lipids and liver enzymes in acne patients. *Cutis*. 94, 234-238.
141. Hansen, T. J., Lucking, S., Miller, J. J., Kirby, J. S., Thiboutot, D. M. ve Zaenglein, A. L. (2016). Standardized laboratory monitoring with use of isotretinoin in acne. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 75, 323-328.

142. Lee, Y. H., Scharnitz, T. P., Muscat, J., Chen, A., Gupta-Elera, G. ve Kirby, J. S. (2016). Laboratory monitoring during isotretinoin therapy for acne: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of the American Medical Association Dermatology*. 152, 35-44.
143. Arce, F., Gätjens-Boniche, O., Vargas, E., Valverde, B. ve Díaz, C. (2005). Apoptotic events induced by naturally occurring retinoids ATRA and 13-cis retinoic acid on human hepatoma cell lines Hep3B and HepG2. *Cancer Letters*. 229, 271-281.
144. Zhang, X., Tang, N., Hadden, T. J. ve Rishi, A. K. (2011). Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochimica Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 1813, 1978-1986.
145. Modur, V., Nagarajan, R., Evers, B. M. ve Milbrandt, J. (2002). FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer. *The Journal of Biological Chemistry*. 277, 47928-47937.
146. Zheng, S. J., Wang, P., Tsabary, G. ve Chen, Y. H. (2004). Critical roles of TRAIL in hepatic cell death and hepatic inflammation. *Journal of Clinical Investigation*. 113, 58-64.
147. Melnik, B. C. (2011). Isotretinoin and FoxO1: a scientific hypothesis. *Dermatoendocrinology*. 3, 141-165.
148. Melnik, B.C., Bros, U. ve Plewig, G. (1987). Evaluation of the atherogenic risk of isotretinoin-induced and etretinate-induced alterations of lipoprotein cholesterol metabolism. *Journal of Investigative Dermatology*. 88(3), 39-43.
149. Bershad, S., Rubinstein, A., Paterniti, J. R., Le, N. A., Poliak, S. C., Heller, B., Ginsberg, H. N., Fleischmajer, R. ve Brown, W. V. (1985). Changes in plasma lipids and lipoproteins during isotretinoin therapy for acne. *The New England Journal of Medicine*. 313, 981-985.
150. Kamagate, A., Qu, S., Perdomo, G., Su, D., Kim, D. H., Slusher, S., Meseck, M. ve Dong, H. H. (2008). FoxO1 mediates insulin-dependent regulation of hepatic VLDL production in mice. *Journal of Clinical Investigation*. 118, 2347-2364.
151. Kim, D. H., Zhang, T., Ringquist, S. ve Dong, H. H. (2011). Targeting FoxO1 for hypertriglyceridemia. *Current Drug Targets*. 12, 1245-1255.
152. Duman, R. S. (2004). Depression: a case of neuronal life and death? *Biological Psychiatry*. 56, 140-145.
153. Sapolsky, R. M. (2001). Depression, antidepressants and the shrinking hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98, 12320-12322.
154. Vaidya, V. A., Fernandes, K. ve Jha, S. (2007). Regulation of adult hippocampal neurogenesis: relevance to depression. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 7, 853-864.

155. Apple, D. M., Fonseca, R. S. ve Kokovay, E. (2017). The role of adult neurogenesis in psychiatric and cognitive disorders. *Brain Research*. 1655, 270-276.
156. Sakai, Y., Crandall, J. E., Brodsky, J. ve McCaffery, P. (2004). 13-cis retinoic acid (Accutane) suppresses hippocampal cell survival in mice. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1021, 436-440.
157. Crandall, J. E., Sakai, Y., Zhang, J., Koul, O., Mineur, Y., Crusio, W. E. ve McCaffery, P. (2004). 13-cis retinoic acid suppresses hippocampal cell division and hippocampal dependent learning in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101, 5111-5116.
158. Griffin, J. N., Pinali, D., Olds, K., Lu, N., Appleby, L., Doan, L. ve Lane, M. A. (2010). 13-cis-Retinoic acid decreases hypothalamic cell number in vitro. *Neuroscience Research*. 68, 185-190.
159. Hu, P., Wang, Y., Liu, J., Meng, F. T., Qi, X. R., Chen, L., van Dam, A., Joëls, M., Lucassen, P. J. ve Zhou, J. (2016). Chronic retinoic acid treatment suppresses adult hippocampal neurogenesis, in close correlation with depressive-like behavior. *Hippocampus*. 26, 911-923.
160. Haybaeck, J., Postruznik, M., Miller, C. L., Dulay, J. R., Llenos, I. C. ve Weis, S. (2015). Increased expression of retinoic acid-induced gene 1 in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia, bipolar disorder, and major depression. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 11, 279-289.
161. Suarez, B., Serrano, A., Cova, Y. ve Baptista, T. (2016). Isotretinoin was not associated with depression or anxiety: a twelve-week study. *World Journal of Psychiatry*. 6, 136-142.
162. Sundström, A., Alfredsson, L., Sjölin-Forsberg, G., Gerdén, B., Bergman, U. ve Jokinen, J. (2010). Association of suicide attempts with acne and treatment with isotretinoin: retrospective Swedish cohort study. *British Medical Journal*. 341, 5812.
163. Marron, S. E., Tomas-Aragones, L. ve Boira, S. (2013). Anxiety, depression, quality of life and patient satisfaction in acne patients treated with oral isotretinoin. *Acta Dermato Venereologica*. 93, 701-706.
164. Alhusayen, R. O., Juurlink, D. N., Mamdani, M. M., Morrow, R. L., Shear, N. H. ve Dormuth, C. R. (2013). Canadian Drug Safety and Effectiveness Research Network. Isotretinoin use and the risk of inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. *Journal of Investigative Dermatology*. 133, 907-912.
165. Rashtak, S., Khaleghi, S., Pittelkow, M. R., Larson, J. J., Lahr, B. D., Murray, J. A. (2014). Isotretinoin exposure and risk of inflammatory bowel disease. *The Journal of the American Medical Association Dermatology*. 150, 1322-1326.
166. Racine, A., Cuerq, A., Bijon, A., Ricordeau, P., Weill, A., Allemand, H., Chosidow, O., Boutron-Ruault, M. ve Carbonnel, F. (2014). Isotretinoin and risk of inflammatory bowel disease: a French nationwide study. *The American Journal of Gastroenterology*. 109, 563-569.

167. Coughlin, S. S. (2015). Clarifying the purported association between isotretinoin and inflammatory bowel disease. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 1(2). DOI: 10.15436/2378-6841.15.007.
168. Lee, S. Y., Jamal, M. M., Nguyen, E. T., Bechtold, M. L. ve Nguyen, D. L. (2016). Does exposure to isotretinoin increase the risk for the development of inflammatory bowel disease? A meta-analysis. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 28, 210-216.
169. Lebwohl, B., Sundström, A., Jabri, B., Kupfer, S. S., Green, P. H. ve Ludvigsson, J. F. (2014). Isotretinoin use and celiac disease: a population-based cross-sectional study. *American Journal of Clinical Dermatology*. 15, 537-542.
170. Passier, J. L., Srivastava, N. ve van Puijenbroek, E. P. (2006). Isotretinoin-induced inflammatory bowel disease. *The Netherlands Journal of Medicine*. 64, 52-54.
171. Reddy, D., Siegel, C. A., Sands, B. E. ve Kane, S. (2006). Possible association between isotretinoin and inflammatory bowel disease. *The American Journal of Gastroenterology*. 101, 1569-1573.
172. Papageorgiou, N. P., Altman, A. ve Shoenfeld, Y. (2009). Inflammatory bowel disease: adverse effect of isotretinoin. *The Israel Medical Association Journal*. 11, 505-506.
173. Bharmal, R. ve Anderson, S. H. (2010). Exacerbation of inflammatory bowel disease with isotretinoin. *Journal of the Royal Society of Medicine Short Reports*. 1, 58.
174. Papaconstantinou, I., Stefanopoulos, A., Papailia, A., Zeglinas, C., Georgopoulos, I. ve Michopoulos, S. (2014). Isotretinoin and ulcerative colitis: a case report and review of the literature. *World Journal of Gastrointestinal Surgery*. 6, 142-145.
175. Blander, J. M. (2016). Death in the intestinal epithelium-basic biology and implications for inflammatory bowel disease. *Federation of European Biochemical Societies Journal*. 283, 2720-2730.
176. Shalita, A. R. (1987). Mucocutaneous and systemic toxicity of retinoids: monitoring and management. *Dermatologica*. 175, 151-157.
177. Altucci, L., Rossin, A., Raffelsberger, W., Reitmair, A., Chomienne, C. ve Gronemeyer, H. (2001). Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL. *Nature Medicine*. 7, 680-686.
178. Jiménez-Lara, A. M., Clarke, N., Altucci, L. ve Gronemeyer, H. (2004). Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells. *Trends in Molecular Medicine*. 10, 508-515.
179. Bell, B. A., Findley, H. W., Krischer, J., Whitehead, V. M., Holbrook, T., Haggard, M. E., Konrad, P. N., Hensley, M. ve Ragab, A. H. (1991). Phase II study of 13-cis-retinoic acid in pediatric patients with acute nonlymphocytic leukemia-a Pediatric Oncology Group study. *Journal of Immunotherapy*. 10, 77-83.

180. Maeda, Y., Miyatake, J., Sono, H., Matsuda, M., Tatsumi, Y., Horiuchi, F., Irimajiri, K. ve Horiuchi, A. (1996). 13-cis Retinoic acid inhibits growth of adult T cell leukemia cells and causes apoptosis; possible new indication for retinoid therapy. *Internal Medicine*. 35, 180-184.
181. Wu, N. L., Lee, T. A., Tsai, T. L. ve Lin, W. W. (2011). TRAIL-induced keratinocyte differentiation requires caspase activation and p63 expression. *Journal of Investigative Dermatology*. 131, 874-883.
182. Lippens, S., Denecker, G., Ovaere, P., Vandenabeele, P. ve Declercq, W. (2005). Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification. *Cell Death & Differentiation*. 12(2), 1497-1508.
183. Landau, M., Mesterman, R., Ophir, J., Mevorah, B., Alcalay, J., Harel, A. ve Nevo, Y. (2001). Clinical significance of markedly elevated serum creatine kinase levels in patients with acne on isotretinoin. *Acta Dermato Venereologica*. 81, 350-352.
184. Kaymak, Y. (2008). Creatine phosphokinase values during isotretinoin treatment for acne. *International Journal of Dermatology*. 47, 398-401.
185. Heudes, A. M. ve Laroche, L. (1998). Muscular damage during isotretinoin treatment. *Annals of Dermatology and Venereology*. 125, 94-97.
186. Chroni, E., Monastirli, A. ve Tsambaos, D. (2010). Neuromuscular adverse effects associated with systemic retinoid dermatotherapy: monitoring and treatment algorithm for clinicians. *Drug Safety*. 33, 25-34.
187. Alger, H. M., Raben, N., Pistilli, E., Francia, D. L., Rawat, R., Getnet, D., Ghimbovschi, S., Chen, Y., Lundberg, I. E. ve Nagaraju, K. (2011). The role of TRAIL in mediating autophagy in myositis skeletal muscle: a potential nonimmune mechanism of muscle damage. *Arthritis Rheumatology*. 63, 3448-3457.
188. Vayena, E., Rowe, P. ve Griffin P. (2002). Current practices and controversies in assisted reproduction: report of a meeting on medical, ethical and social aspects of assisted reproduction, held at *WHO Headquarters in Geneva-Switzerland*.
189. Mosher, W. D. ve Pratt, W. F. (1991). Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends. *Fertility and Sterility*. 56, 192.
190. Gnoth, C., Godehardt, D., Godehardt, E., Frank-Herrmann, P. ve Freundl, G. (2003). Time to pregnancy: results of the German prospective study and impact on the management of infertility. *Human Reproduction*. 18, 1959-1966.
191. Sadek, I. A. ve Abdul-Mohsen, M.H. (1999). Long-term administration of vitamin A and the process of spermatogenesis. *Eastern Mediterranean Health Journal*. 5, 123-129.
192. Aktürk, A. Ş., Abalı, R., Yüksel, M. A., Güzel, E. Ç., Güzel, S. ve Kıran, R. (2014). The effects of isotretinoin on the ovarian reserve of females with acne. *Gynecological Endocrinology*. 30(1), 30-33.

193. Öztürk, S., Öztürk, T., Ucak, H., Erden, I., Demir, B., Kayalı, A. ve Cicek, D. (2015). Evaluation of ovarian reserve and function in female patients treated with oral isotretinoin for severe acne: an exploratory study. *Cutaneous and Ocular Toxicology*. 34(1), 21-24.
194. Aksoy, H., Cinar, L., Acmaz, G., Aksoy, U., Aydin, T., Vurdem, U. E., Oz, L., Karadag, O. I. ve Kartal, D. (2015). The effect of isotretinoin on ovarian reserve based on hormonal parameters, ovarian volume and antral follicle count in women with acne. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. DOI: 10.1159/000371551.
195. Çelik, Ö. (Editör). (2011). Yardımcı üreme teknikleri temel klinik ve embriyolojik uygulamalar. *Adana: Nobel Tıp Kitabevi*. 10-11.
196. Mehranjani, M. S. ve Mansoori, T. (2016). Stereological study on the effect of vitamin C in preventing the adverse effects of bisphenol A on rat ovary. *International Journal of Reproductive Biomedicine (Yazd)*. 14(6), 403-10.
197. Mohammadghasemi, F., Jahromi 2, S. K., Hajizadeh, H., Homafar, M. A. ve Saadat, N. (2012). The protective effects of exogenous melatonin on nicotine-induced changes in mouse ovarian follicles. *Journal of Reproduction and Infertility*. 13(3), 143-150.
198. Eweka, A. O. ve Om'Iniabohs, F. A. E. (2011). Histological studies of the effects of monosodium glutamate on the ovaries of adult Wistar rats. *Annals of Medical and Health Sciences Research*. 1(1), 37-44.
199. Ergin, K., Gursoy, E., Basimoglu, K. Y., Basaloglu, H. ve Seyrek, K. (2008). Immunohistochemical detection of insulinlike growth factor-I, transforming growth factor-beta2, basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor-receptor expression in developing rat ovary. *Cytokine*. 43, 209-214.
200. Hatzirodos, N., Bayne, R. A., Irving-Rodgers, H. F., Hummitzsch, K., Sabatier, L., Lee, S., Bonner, W., Gibson, M. A., Rainey, W. E., Carr, B. R., Mason, H. D., Reinhardt, D. P., Anderson, R. A. ve Rodgers, R. J. (2011). Linkage of regulators of TGF-beta activity in the fetal ovary to polycystic ovary syndrome. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. 25, 2256-2265.
201. Nagashima, T., Kim, J., Li, Q., Lydon, J. P., DeMayo, F. J., Lyons, K. M. ve Matzuk, M. M. (2011). Connective tissue growth factor is required for normal follicle development and ovulation. *Molecular Endocrinology*. 25, 1740-1759.
202. Zhu, Y., Nilsson, M. ve Sundfeldt, K. (2010). Phenotypic plasticity of the ovarian surface epithelium: TGF-beta 1 induction of epithelial to mesenchymal transition (EMT) in vitro. *Endocrinology*. 151, 5497-5505.
203. Joseph, C., Hunter, M. G., Sinclair, K. D. ve Robinson, R. S. (2012). The expression, regulation and function of secreted protein, acidic, cysteine-rich in the follicle-luteal transition. *Reproduction*. 144, 361-372.
204. Kawano, Y., Zeineh, K., Furukawa, Y., Utsunomiya, Y., Okamoto, M. ve Narahara, H. (2012). The effects of epidermal growth factor and transforming growth factor-

- alpha on secretion of interleukin-8 and growth-regulated oncogene-alpha in human granulosa-lutein cells. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 73, 189-194.
205. Corduk, N., Abban, G., Yildirim, B. ve Sarioglu-Buke, A. (2012). The effect of vitamin D on expression of TGF beta1 in ovary. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*. 120, 490-493.
 206. Paradis, F., Novak, S., Murdoch, G. K., Dyck, M. K., Dixon, W. T. ve Foxcroft, G. R. (2009). Temporal regulation of BMP2, BMP6, BMP15, GDF9, BMPR1A, BMPR1B, BMPR2 and TGFBR1 mRNA expression in the oocyte, granulosa and theca cells of developing preovulatory follicles in the pig. *Reproduction*. 138, 115-129.
 207. Dong, J., Albertini, D. F., Nishimori, K., Kumar, T. R., Lu, N. ve Matzuk, M. M. (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*. 383, 531-535.
 208. Laitinen, M., Vuojolainen, K., Jaatinen, R., Ketola, I., Aaltonen, J., Lehtonen, E., Heikinheimo, M. ve Ritvos, O. (1998). A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. *Mechanisms of Development*. 78, 135-140.
 209. Piotrowska, H., Kempisty, B., Sosinska, P., Ciesiolka, S., Bukowska, D., Antosik, P., Rybska, M., Brussow, K. P., Nowicki, M. ve Zabel, M. (2013). The role of TGF superfamily gene expression in the regulation of folliculogenesis and oogenesis in mammals: a review. *Veterinari Medicina*. 58(10), 505-515.
 210. Solovyeva, E. V., Hayashi, M., Margi, K., Barkats, C., Klein, C., Amsterdam, A., Hsueh, A. J. W. ve Tsafriri, A. (2000). Growth differentiation factor-9 stimulates rat theca interstitial cell androgen biosynthesis. *Biology of Reproduction*. 63, 1214-1218.
 211. Pelosi, E., Simonsick, E., Forabosco, A., Garcia-Ortiz, J. E., ve Schlessinger, D. (2015). Dynamics of the ovarian reserve and impact of genetic and epidemiological factors on age of menopause. *Biology of Reproduction*. 92, 130.
 212. Elvin, J. A., Yan, C., Wang, P., Nishimori, K., ve Matzuk, M. M. (1999). Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9 deficient ovary. *Molecular Endocrinology*. 13, 1018-1034.
 213. Jaatinen, R., Laitinen, M. P., Vuojolainen, K., Aaltonen, J., Louhio, H., Heikinheimo, K., Lehtonen, E. ve Ritvos, O. (1999). Localization of growth differentiation factor-9 (GDF-9) mRNA and protein in rat ovaries and cDNA cloning of rat GDF-9 and its novel homolog GDF-9B. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 156, 189-193.
 214. Xu, Y., Li, E., Han, Y., Chen, L. ve Xie, Z. (2010). Differential expression of mRNAs encoding BMP/Smad pathway molecules in antral follicles of high- and low-fecundity Hu sheep. *Animal Reproduction Science*. 120, 47-55.

215. Erickson, G. F. ve Shimasaki, S. (2003). The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1(1), 9.
216. Koç, M. İ. (2012). Polikistik over sendromu oluşturulmuş fare over dokusunda, GDF-9 ve BMP-15 ekspresyonlarının ve ince yapı değişikliklerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*.







EKLER

EK-1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı

Evrak Tarih ve Sayısı: 10/07/2017-E.99046



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Candan ÖZOĞUL, Pınar KAÇAMAK, Gülistan Sanem SARIBAŞ, Saadet Özen AKARCA DİZAKAR, Aslı EMNİYET'ten oluşan, G.Ü.ET-17.041 kod numaralı ve "*Adolesan Dişi Sıçanlarda İzotretinoinin Oosit Maturasyonu Üzerine Etkisi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-17.041 and entitled "*The Effect of Isotretinoin on Oocyte Maturation in Adolescent Female Rats*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Hayvan Türü : Rat Wistar Albino(Dişi)
Hayvan Sayısı : 32

Ek:1 Liste

Ankara
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://hadyek.gazi.edu.tr/

Bilgi için :Esengül BOŞNAK
Genel Evrak Sorumlusu

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-2. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu Katılım Sertifikası



**XIX. DENEY HAYVANLARI
UYGULAMA VE ETİK KURSU**
23-31 Mayıs 2016
KATILIM SERTİFİKASI

Sayın, Pınar KAĞAMAK

Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı ile Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından, 23-31 Mayıs 2016 tarihleri arasında düzenlenen “Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kurs XIX” a katılarak, Teorik ve Pratik Eğitimleri başarı ile tamamlamış ve bu sertifikayı almaya hak kazanmıştır.

Prof. Dr. Süleyman BÜYÜKBERBER
REKTÖR

Prof. Dr. Leyla AÇIK
ETİK KURUL BAŞKANI

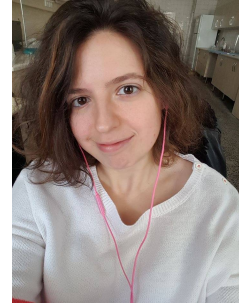
Doç. Dr. Turgay TEKİNAY
MERKEZ MÜDÜRÜ

Sertifika no: 2016/19-05

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Kaçamak, Pınar
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 13/04/1988, Manisa
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 05375956607
 e-mail : bylj88@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/Histoloji-Embriyoloji	Devam ediyor
Lisans	Ankara Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	2011
Lise	Y.D.A. Salihli Lisesi	2006

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2018-Devam ediyor	Bozok Üniversitesi	Arş. Gör.
2015-2017	Gazi Üniversitesi	Arş. Gör. (35. Madde)
2015-2015	Bozok Üniversitesi	Arş. Gör.

Yabancı Dil

İngilizce

Bildiriler

- Ozoğul, C., Başer Demircan, I., Barun, S., Kavutcu, M., Ilhan, M., Akyol, S. N., Hirfanoğlu, I. M., Bilgi, M., Sarıbaş, G. S., Kacamak, P. ve Emniyet, A. A. Immunohistochemical study of Osteopontin and Bcl-2 gene expression in kidney tissue in histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK) solution prepared with N-acetyl L-carnitine. 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 18-21 May 2017, Antalya-Turkey (Poster sunumu).

- Kaçamak, P., Özoğul, C., Sarıbaş, G. S., Dizakar Akarca, S. Özen. ve Emniyet, A. A. Adolesan diş sıçanlarda izotretinoinin oosit maturasyonu üzerine etkisi. 1th International Health Science and Life Congress, 02-05 May 2018, Burdur-Turkey (Poster Sunumu).
- Sert Emniyet, A. A., Özoğul, C., Sarıbaş, G. S., Dizakar Akarca, S. Özen. ve Kaçamak, P. Adolesan diş ratlarda izotretinoinin follikül aktivasyonundaki etkilerinin incelenmesi. 1th International Health Science and Life Congress, 02-05 May 2018, Burdur-Turkey (Poster Sunumu).





GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...

