



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ZEBRA BALIĞI'NIN
(*Danio rerio*) İÇ ORGANLARINDA
KLOMİFEN SİTRATIN OKSİDATİF
STRES PARAMETRELERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

NAZLI SEVİM GÖLÇÜK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Figen Esin KAYHAN

İSTANBUL, 2023



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ZEBRA BALIĞI'NIN
(*Danio rerio*) İÇ ORGANLARINDA
KLOMİFEN SİTRATIN OKSİDATİF
STRES PARAMETRELERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

NAZLI SEVİM GÖLÇÜK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Figen Esin KAYHAN

İSTANBUL, 2023

T E Ő E K K Ü R L E R

Lisans ve yüksek lisans hayatım boyunca gerek kişiliği gerek bilgi birikimi ile kendime örnek aldığım değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Figen Esin KAYHAN'a sonsuz teşekkürü borç bilirim.

Yüksek lisans dönemim boyunca tezimde ne zaman başım sıkışsa gidip çekinmeden danışabildiğim Dr. Öğr. Üyesi Salim Süner'e teşekkür ederim.

Lisans döneminden bu süreçlere kadar her zaman yanımda olan en motivasyonsuz günlerimizde bile birbirimizi her daim motive ettiğimiz bir laboratuvar ekibinden yeri geldiğinde benim için çok daha fazlası olan Bio.Serra TEKLER'e, yüksek lisansta gerek disiplinleri gerek bilgi birikimleriyle her sorumu sıklımadan ve bıkmadan yanıtlamış olan ve her daim bana karşı sevgi dolu olup, desteklerini her an hissettiğim Dr. Öğr.Üyesi Harika Eylül ESMER DURUEL, Dr, Şeyma TARTAR KIZILKAYA' ya teşekkürleri bir borç bilirim.

Bugünlere gelmemi sağlayan, maddi-manevi bütün desteği bugüne kadar bana vermiş olan sevgili babam Sabit Coşkun ÇAĞAN, annem Zeynep Gülşen ÇAĞAN ve abim Oğuzhan ÇAĞAN'a teşekkürlerimi iletmek isterim.

Yüksek lisans hayatım boyunca beraber yaşama fırsatı bulduğum teyzem Emine Gülcan GÜREL'e ve ailesine, sadece tez dönemi değil, hayatımın her anında bana devamlı destek olan biricik kız kardeşim Gizem PARLAK'a teşekkür etmek isterim.

Tez sürecimin her anına tanıklık eden, bazen sevinçlerimi bazen hüznlerimi benimle paylaşan biricik eşim Taylan Özgür GÖLÇÜK'e çok teşekkür ederim.

Eylül, 2023

Nazlı Sevim GÖLÇÜK

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
SEMBOLLER.....	ix
KISALTMALAR.....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
TABLO LİSTESİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. İnfertilite.....	1
1.1.1. Erkeklerde infertilite.....	2
1.1.2. Kadınlarda infertilite.....	2
1.2. İnfertilite Tedavilerinde Kullanılan Yöntemler.....	3
1.3. Klomifensitrat.....	4
1.3.1.1 Klomifensitrat etki mekanizması.....	5
1.3.1.2 Klomifen sitratın toksisitesi.....	6
1.4 Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	6
1.5 Serbest Radikallerin ve Reaktif Oksijen Türlerinin Biyolojik Etkileri	9
1.5.1 Antioksidanlar ve savunma	11
1.5.2 Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma hattı.....	12
1.5.2.1 Katalaz	14
1.5.2.2. Lipit peroksidasyonu, malondialdehid (MDA)	14

1.5.2.3. İndirgenmiş glutatyon.....	15
1.6. Toksikoloji De Kullanılan <i>in vitro</i> ve <i>in vivo</i> Yöntemler	16
1.6.1 Toksikolojide <i>in vitro</i> yöntemler	16
1.6.2. Model organizma olarak zebra balığı.	18
1.7. Amaç.....	19
2. MATERYAL VE YÖNTEM	21
2.1. Deneyler Sırasında Kullanılan Materyaller	21
2.1.1. Deneyler sırasında kullanılan kimyasal maddeler	21
2.1.2. Deneyler sırasında kullanılan cihazlar.....	22
2.1.3. Deneyler sırasında kullanılan sarf malzemeler.....	22
2.1.4. <i>in vivo</i> deneylerde kullanılan canlılar	23
2.1.4.1. Zebra balığının sistematikteki yeri ve biyolojisi	23
2.2. Klomifen sitratın <i>in vitro</i> ve <i>in vivo</i> Uygulamaları Sonrası Yapılan Deneyler	24
2.2.1 <i>in vitro</i> deney düzeneği.....	24
2.2.1.1. Hücre kültürü.....	24
2.2.1.2 Klomifen sitrat uygulaması.	25
2.2.1.3 MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür).....	25
2.2.2. <i>in vivo</i> Deney düzeneği.....	26
2.2.1.1. Doku homojenatlarının hazırlanması.....	28
2.2.1.2. Aebi yöntemi ile dokularda katalaz aktivitesi (CAT) tayini.....	29
2.2.1.3. Ledwozyw yöntemi ile dokularda lipid peroksidasyonu (MDA) tayini.	30
2.2.1.4. Bradford yöntemi ile dokularda protein seviyesi tayini	32
2.2.1.5. Beutler yöntemi ile dokularda indirgenmiş glutatyon (GSH) tayini	33
3. BULGULAR	35

3.1. Bulgular	35
3.1.1. Biyokimyasal bulgular.....	35
3.1.1.1 Aebi yöntemi ile dokularda katalaz enzim aktivitesi (CAT) tayini.....	35
3.1.1.2. Ledwozyw yöntemi ile dokularda malondialdehid (MDA) seviyesi tayini	37
3.1.1.3. Bradford yöntemi ile dokularda protein tayini	38
3.1.1.4. Dokularda indirgenmiş glutatyon seviyesi.	40
3.1.2 <i>İn vitro</i> sitotoksosite bulguları.....	42
4. TARTIŞMA.....	44
5. SONUÇLAR.....	49
KAYNAKLAR.....	51

ÖZET

ZEBRA BALIĞI'NIN (*Danio rerio*) İÇ ORGANLARINDA KLOMİFEN SİTRATIN OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Dünya çapında üreme çağındaki milyonlarca insanı ve aileleri etkileyen infertilite, erkek veya kadın üreme sisteminin bir hastalığıdır ve gebelik elde edilememesi ile tanımlanır. İnfertilite, çiftlerin %85'inde normal fizyolojide tanımlanabilir anomalilerden veya altta yatan hastalıktan kaynaklanmaktadır ve tedavisi için kullanılan etken maddelerden biri klomifen sitrat (KS) maddesidir. Klomifen Sitrat, yaygın olarak kullanılan anti östrojen bir hormon stimülasyonudur ve östrojenle rekabet etmek ve östrojen reseptör aktivitesini modüle etmek için tasarlanmıştır.

Bu çalışmanın amacı Klomifen Sitrat (KS)'in omurgalı model organizma Zebra balığı (*D.rerio*) karaciğer, beyin ve gonad dokusunda meydana getirdiği oksidatif stres seviyelerini araştırmaktır. Bu çalışmada 1,47 mg/L KS dozu iki ayrı uygulama dozu; 48 ve 72 saatlik uygulama olarak beyin, karaciğer ve gonad dokuları üzerindeki etkileri bazı biyokimyasal parametreler açısından incelenmiştir. KS'in sırasıyla; katalaz aktivitesi (CAT), malondialdehit (MDA), total protein (TP), indirgenmiş glutatyon (GSH) deneyleri yapılmıştır. Deneylerin sonucunda 48.saat karaciğer ve beyin dokularının CAT enzim aktivitelerinin kontrole göre anlamlı olarak arttığı bulunmuştur.

72. saat karaciğer dokusu CAT enzim aktivite sonuçlarının ise kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı arttığı tespit edilmiştir. Gonad dokusunun ise sadece 72.saatte CAT aktivitesinin anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. MDA seviyeleri beyin ve gonad dokularında 48. saatte anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Beyin dokusunda ise 72. saatte MDA seviyelerinde anlamlı bir azalma görülürken gonad dokusunda anlamlı bir artış saptanmıştır. Karaciğer dokusunda hem 48.saat hem de 72.satte MDA seviyeleri anlamlı olarak arttığı bulunmuştur. 48. ve 72. saat GSH seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında karaciğer ve gonad dokularında anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir. Beyin dokusu GSH seviyelerinde ise anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Beyin dokusuna ait TP seviyeleri her iki grupta kontrole göre anlamlı olarak artmıştır. Gonad dokusu 48. saatte anlamlı olarak azalırken, 72.saatte anlamlı olarak artmıştır. Karaciğer dokusunun her iki grubunda da anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

Bu çalışmanın sonucunda Klomifen Sitratt'ın zebra balığı karaciğer, beyin ve gonad dokularında az da olsa olumsuz oksidatif stres etkiye neden olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmanın gelecekte yapılacak olan infertilite tedavisine yönelik araştırmalara kaynak olabileceği düşünölmektedir.

Eylöl, 2023

Nazlı Sevim GÖLÇÜK



ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF CLOMIPHENE CITRATE ON OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN THE INTERNAL ORGANS OF ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Infertility, which affects millions of people of reproductive age worldwide along with their families, is defined as the inability to achieve pregnancy due to a disease of the male or female reproductive system. In about 85% of couples, infertility can be attributed to abnormalities in normal physiology or underlying diseases, and one of the active substances used for its treatment is Clomiphene Citrate (CC). Clomiphene Citrate is a widely used anti-estrogen hormonal stimulation that is designed to compete with estrogen and modulate estrogen receptor activity.

The aim of this study is to investigate the oxidative stress levels induced by clomiphene citrate (CC) in the liver, brain, and gonadal tissues of the vertebrate model organism Zebrafish (*D. rerio*). In this study, a dose of 1.47 mg/L CC was applied in two different application doses; 48 and 72 hours, and its effects on brain, liver, and gonadal tissues were examined in terms of some biochemical parameters. catalase (CAT) activity, malondialdehyde (MDA), total protein (TP), and reduced glutathione (GSH) experiments were conducted for CC. The results of the experiments showed that CAT enzyme activities of the liver and brain tissues significantly increased compared to the control at 48 hours. At 72 hours, CAT enzyme activity results in the liver tissue were found to be statistically significantly higher than the control. For gonadal tissue, CAT activity significantly increased only at 72 hours. MDA levels decreased significantly in brain and gonadal tissues at 48 hours. In brain tissue, there was a significant decrease in MDA levels at 72 hours, while gonadal tissue showed a significant increase. In the liver tissue, MDA levels significantly increased at both 48 and 72 hours. When compared to the control group, GSH levels at 48 and 72 hours showed a significant increase in liver and gonadal tissues. However, no significant results were obtained for GSH levels in brain tissue. TP levels of brain tissue increased significantly in both groups compared to the control. While gonadal tissue decreased significantly at 48 hours, it increased significantly at 72 hours. There was no significant change observed in the liver tissue of both groups.

As a result of this study, it was determined that Clomiphene Citrate causes a slight negative oxidative stress effect in zebrafish liver, brain, and gonadal tissues. This study is believed to serve as a resource for future research on infertility treatment.

September, 2023

Nazlı Sevim GÖLÇÜK



SEMBOLLER

%	:	Yüzde
°C	:	Santigrat Derece
~	:	Yaklaşık
µM	:	Mikromolar
¹ O ₂	:	Singlet Oksijen
Ca ⁺²	:	Kalsiyum
COX	:	Siklooksijenazlar
dH ₂ O	:	Distile su
H ₂ O ₂	:	Hidrojen Peroksit
HCl	:	Hidroklorik Asit
K ⁺	:	Potasyum
KCl	:	Potasyum Klorür
KH ₂ PO ₄	:	Mono Potasyum Fosfat
LOX	:	Lipoksijenazlar
mg	:	Miligram
Mg ⁺²	:	Magnezyum
MgCl ₂	:	Magnezyum Klorür
mL	:	Mililitre
NaCl	:	Sodyum Klorür
NADPH	:	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NaH ₂ PO ₄	:	Monosodyum Fosfat
NaOH	:	Sodyum Hidroksit
NOX	:	NADPH oksidaz
O ²⁻	:	Süperoksit radikali
⁻ OH	:	Hidroksil iyonu
pH	:	Hidrojenin Gücü
-SH	:	Tiyol grubu

KISALTMALAR

ART: Yardımcı üreme teknolojileri

CAT : Katalaz

DNA : Deoksiribonükleik Asit

DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü

DTNB : Ellman Reaktifi (5-5'- Ditiyobis-(2-Nitrobenzoik Asit))

EDTA : Etilendiamin Tetraasetikası

FSH: Folikül stimüle edici hormon

GnRH: Gonadotropin salgılatıcı hormon

GSH : İndirgenmiş Glutasyon

GSH-Px : Glutasyon Peroksidaz

GSH-Rd : Glutasyon Redüktaz

GSSG : Okside Glutasyon

GST : Glutasyon-S-Transferaz

HPG : hipotalamus-hipofiz-gonadal

HST: Hormon stimülasyon terapiler

ISSE : İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu

IUT:İntrauterin tohumlama

IVF: *in vitro* fertilizasyon

KS: Klomifen sitrat

LH: Lutenize edici hormon

LPO : Lipid peroksidasyonu

MDA : Malondialdehit

NADP+: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat

NO : Nitrik oksit

NOA: Obstrüktif olmayan

OA: Obstrüktif

PAFA: Çoklu doymamış yağ asitleri

PKOS : Polikistik over sendromu

RNT : Reaktif nitrojen türleri

ROT : Reaktif Oksijen Türleri

SERM: Seçici östrojen reseptör modülatörü

SOD : Süperoksit Dismutaz

sT : Serum testosteron

TBA : Tiyobarbitürik Asit

TBARS: Tiyobarbitürik asitle reaksiyona giren maddeler testi

TCA : Trikloroasetik Asit

TESE: Testiküler sperm ekstraksiyonu

TP : Total Protein

TRT: Testosteron replasman tedavisinin

TSH: Tiroid uyarıcı hormon

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. Klomifen sitrat maddesi kimyasal yapısı	5
Şekil 1.2. Serbest radikaller ile antioksidanların ilişkisi ve oksidatif stres.	7
Şekil 1.3. Serbest radikallerin türleri ve sınıflandırılması.	8
Şekil 1.4. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ve doğal enzimlerle organizmanın kendini savunması.	13
Şekil 1.5. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu.....	15
Şekil 2.1. Hücre kültürü akış şeması.	25
Şekil 2.2. Klomifen sitrat deney düzeneği.....	27
Şekil 2.3. Zebra balığı (<i>Danio rerio</i>) diseksiyon işlemi.....	27
Şekil 2.4. Zebra balığı (<i>Danio rerio</i>) anatomisi	28
Şekil 2.5. Dokularda MDA seviyesi tayini.....	31
Şekil 2.6. Bradford yöntemine göre dokularda protein seviyesi tayini	33
Şekil 3.1. Aebi yöntemi ile dokularda katalaz aktivitesi (CAT) tayini grafikleri.	36
Şekil 3.2. Ledwozyw yöntemi ile dokularda lipid peroksidasyonu (MDA) tayini grafikleri.	38
Şekil 3.3. Bradford yöntemi ile dokularda protein tayini grafikleri.	39
Şekil 3.4. Beutler yöntemi ile dokularda indirgenmiş glutatyon (GSH) tayini grafikleri.	41
Şekil 3.5. Klomifen sitrat dozlarına göre % hücre canlılığı grafiği.....	43

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1. Antioksidan savunma mekanizmaları.....	12
Tablo 1.2. MTT testinin avantaj ve dezavantajları.	18
Tablo 2.1. Deneyleer sırasında kullanılan kimyasal malzemeler	21
Tablo 2.2. Deney sırasında kullanılan cihazlar	22
Tablo 2.3. Deneyleer sırasında kullanılan sarf malzemeler	22
Tablo 2.4. Zebra balığı (<i>Danio rerio</i> , Hamilton, 1822)'nın sistematikteki yeri	23
Tablo 2.5. Doku homojenatin hazırlanışı.....	28
Tablo 2.6. Aebi yöntemi ile dokularda katalaz aktivitesi (CAT) tayini.....	29
Tablo 2.7. Ledwozyw yöntemi ile Dokularda lipid peroksidasyonu (MDA) tayini	31
Tablo 2.8. Bradford yöntemi ile Dokularda protein tayini.....	32
Tablo 2.9. Beutler yöntemi ile dokularda indirgenmiş glutatyon (GSH) tayini.....	34
Tablo 3.1. Aebi yöntemi ile dokularda katalaz aktivitesi (CAT) tayini bulguları	35
Tablo 3.2. Ledwozyw yöntemi ile dokularda MDA seviyesi tayini bulguları.....	37
Tablo 3.3. Bradford yöntemi ile dokularda protein tayini bulguları.....	39
Tablo 3.4. Beutler yöntemine göre indirgenmiş glutatyon seviyesi tayini bulguları	40
Tablo 3.5. MTT testi bulguları.....	42

1. GİRİŞ

Dünyada ve ülkemizde, çocuk sahibi olmak, soyun devamlılığı ve aile kavramının önemi dolayısıyla oldukça önemlidir. Bu yüzden üreme başarısızlığı olan infertilite (kısırlık), insan üreme sağlığı açısından önemli bir sorundur ve dünya çapında her yedi çiftten birini etkilemektedir. İnfertilite sorunu olan bireyler, toplumlarda, fizyolojik sorunların yansira soyun devamlılığı olamayacağı için çeşitli psikolojik problemlere dahi maruz kalabilmektedirler. Dünya çapında 48 milyon çift ve 186 milyon kişinin infertiliteden muzdarip olduğunu görülmektedir (Mascarenhas ve ark., 2012). İnfertilite, çiftlerin %85'inde normal fizyolojide tanımlanabilir anomalilerden veya altta yatan hastalıktan kaynaklanmaktadır. İnfertilitenin en yaygın nedenleri; yumurtlama disfonksiyonu, erkek faktörlü infertilite ve tubal bozukluklardır. İnfertil çiftlerin geri kalan %15'inde ise açıklanamayan infertilite vardır (Gelbaya ve ark., 2014).

İnfertilitenin gelecekte artması beklenmektedir, bu nedenle infertilitenin kapsamlı bir tanısal değerlendirilmesi, hedeflenen önleme ve tedavi sonuçlarında iyileşme sağlamak için çok önemlidir. Bu durum üreme dünya üzerinde üreme yardımcı ilaç kullanımını oldukça arttırmaktadır. Üreme ilaçları insanlarda üremeye yardımcı olmasının yanında birçok farklı sorunu meydana getirebileceği gibi vücuttan uzaklaştırıldıklarında diğer canlılara da zarar verebilmektedir. Üreme ilaçları vücuttan hidrosillenmiş ve metillenmiş metabolitler halinde idrar ve dışkı yoluyla atılır ve kanalizasyona karışır. Bu ilaçlar kanalizasyon arıtma tesisi tarafından tamamen bertaraf edilemez, bu da yer altı suyunun yanı sıra yüzey suyunun da kirlenmesine yol açar. Yüzey suyuna karışan bu ilaç artıkları doğal ortamdaki balıkları ve akuakültür balıklarının da etkilenmesine yol açmaktadır (Kaur ve ark., 2021).

1.1. İnfertilite

Dünya çapında 48 milyon çift ve 186 milyon kişinin infertiliteden muzdarip olduğunu görülmektedir (Mascarenhas ve ark., 2012). İnfertilite, çiftlerin %85'inde normal fizyolojide tanımlanabilir anomaliler veya altta yatan hastalıktan kaynaklanmaktadır. İnfertilitenin en yaygın nedenleri; yumurtlama disfonksiyonu, erkek faktörlü infertilite ve tubal bozukluklardır. İnfertil çiftlerin geri kalan %15'inde ise açıklanamayan infertilite vardır (Gelbaya ve ark., 2014).

1.1.1. Erkeklerde İnfertilite

Erkeklerde infertilite, çeşitli nedenlere bağlı olabilir ancak infertil erkeklerin yaklaşık %40'ında kesin bir tanımlama yoktur. Erkek infertilitesi çağımızda oldukça artmaya başlamıştır ancak neden arttığı açık değildir. Artan obezite seviyeleri ve endokrin bozucuların katkısının oldukça fazla olduğu düşünülmektedir (Kahn ve Brannigan, 2017; Cargnelutti ve ark., 2022). Erkeklerde infertilite sebeplerinden en önemlileri: hormonal bozukluklar (Krausz ve Riera-Escamilla, 2018), semenin dışarı atılmasındaki sorunlar (Kondoh, 2012), sperm yokluğu (azospermi), düşük sperm seviyeleri veya spermin anormal morfolojisi ve hareketi neden olur (Thonneau ve ark., 1991).

Erkek infertilitesi için tedavi seçenekleri, yardımcı üreme teknolojileri (ART'ler), yani *in vitro* fertilizasyon (IVF) ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ISSE) ile sınırlıdır. Erkek kısırlığında hem ISSE hem de IVF başarı oranları benzerdir ve %35'lik küresel ortalama ile uyumludur (Tournaye, 2012; Zarinara ve ark., 2020).

1.1.2. Kadınlarda İnfertilite

İleri yaş, yüksek vücut kitle indeksi, geçirilmiş pelvik ameliyatlar ve stres kadın infertilitesine sebep olan en önemli risk faktörleridir (Romero Ramos ve ark., 2008). Kadınlarda; ovuluar bozukluklar, açıklanamayan infertilite, pelvik yapışıklıklar, endometriozis, tubal anomaliler en sık tespit edilen hastalıklardır (Carson ve Kallen, 2021). Ayrıca kadın infertilitesinin diğer bir sebebi olan hormonal nedenler yalnızca üreme sistemi bozukluklarını değil, aynı zamanda üreme dışı endokrin bezleri (tiroid, adrenaller ve pankreas gibi) ve endokrin olmayan organları (karaciğer ve böbrekler gibi) da içermektedir (Unuane ve ark., 2011).

Yaş ve oosit kalitesi:

Yumurtalık yaşı, gebelik şansının güçlü bir belirleyicisidir (Baker, 1963). Yumurtlamanın başlamasını itibaren, her ay 40-500 folikülden oluşan bir hücre grubu gelişir ve bunlardan genellikle yalnızca biri oosit salgılar (Hodgen, 1982). Geriye kalan oositlerin sayısı ve kalitesi artan yaşla birlikte azalır bu da kadın doğurganlığında yaşa bağlı düşüşe yol açar (van Noord-Zaadstra ve ark., 1991; Farquhar ve ark., 2019).

Ovulatuvar bozukluklar:

Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre yumurtlama bozuklukları infertilite tanılarının yaklaşık %25'ini oluşturur (Carson ve Kallen, 2021). Yumurtlama bozuklukları; hipotalamus, hipofiz bezi, tiroid bezi, adrenal bez ve yumurtalıkları içeren endokrin bozukluklardan kaynaklanabilir (Baird, 1997).

Tubal, pelvik ve uterin anomaliler:

Fallop tüplerinin bloke olması veya pelvik yapışıklıklar nedeniyle tüplerin yumurtalıktan oosit toplayamaması olarak tanımlanan tubal infertilite, incelenen popülasyona bağlı olarak infertilite tanılarının % 11 ile % 67'sini oluşturur (Medicine, 2015).

Endometriozis:

Endometriyal dokunun uterus boşluğu dışında bulunmasıdır (Agarwal ve ark., 2019) İnfertilitesi olan kadınların %25 ila %40'ını etkilemektedir (Ozkan ve ark., 2008). Endometriozis; endometriyal dokunun büyümesine, kalınlaşmasına ve ardından her döngüde parçalanmasına neden olarak ağrılı adetlere, ağır adet kanamalarına veya adetler arasında kanamaya yol açan bir rahatsızlıktır. (Burney ve Giudice, 2012; Dunselman ve ark., 2014)

1.2. İnfertilite Tedavilerinde Kullanılan Yöntemler

İnfertilite tedavilerinde kullanılan yöntemleri tanıya özel olmakla beraber dişi ve erkek olarak farklı değerlendirilebilmektedir.

Kadınlarda yaygın olarak kullanılan infertilite tedavileri, ovülasyonu indüklemek için farmakolojik tedavilerin kullanımını içeren yumurtlama indüksiyonunu ve çok sayıda olgun yumurtalık folikülünü indüklemek amacıyla gerçekleştirilen yumurtalık stimülasyonunu içermektedir. Yumurtlama zamanında döllenmeyi sağlamak için zamanlı ilişki veya intrauterin tohumlama (IUT) kullanılabilir. Alternatif olarak, olgun oositler, ultrason kılavuzluğunda bir iğne (IVF) kullanılarak döllenme için doğrudan yumurtalıktan alınabilir (Carson ve Kallen, 2021).

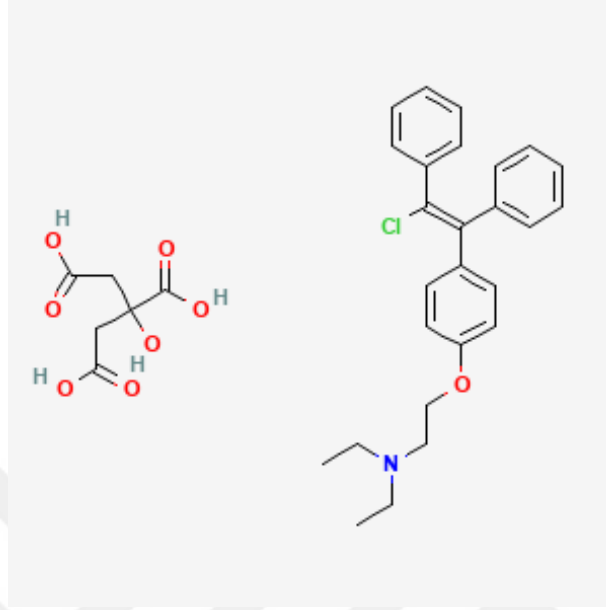
Yumurtlama indüksiyonu için sıklıkla iki oral ilaç kullanılır. Bunlar klomifen sitrat (KS) ve letrozol'dür. KS seçici bir östrojen reseptör regülatörüdür (Sharma ve Balasundaram, 2022). Letrozol, aromatazları bloke ederek östradiolün serum konsantrasyonlarını azaltır ve hipofiz gonadotropinlerini uyarır. Bu oral ajanlar, sınırlı endojen hipofiz-gonadotropin yanıtı gösterebilen veya hiç göstermeyen hipogonadotropik hipogonadizmi olan kadınlarda daha az yarar sağlamaktadır. Bu hastalarda foliküler olgunlaşma ve ovulasyonu indüklemek amacıyla pulsatil GnRH uygulaması endojen FSH ve LH'nın fizyolojik uyarımını geri kazandırır (Christou ve ark., 2017). Yumurtalık stimülasyonu, açıklanamayan infertiliteyi tedavi etmek için intrauterin inseminasyon ile birleştirilir; canlı doğum oranları tanıya, sperm canlılığına ve yumurtalık yanıtına bağlıdır (Hughes ve ark., 1998).

Erkek faktörlü infertilite için resmi olarak kabul edilmiş tedavi olmamasına rağmen, IUT hafif erkek infertilitesi için birinci basamak terapötik stratejidir. IUT, ejakülden izole edilen spermatozoa, doğal bir adet döngüsü sırasında veya klomifen sitrat, letrozol veya gonadotropinler kullanılarak yumurtalıkların uyarılmasından sonra tahmini yumurtlama zamanında doğrudan uterusu yerleştirilmesini içermektedir. (Veltman- Verhulst ve ark., 2016). Erkek faktörlü infertilite tedavilerinde, tipik IVF döngüsü gonadotropin stimülasyonunu ve ardından çoklu yumurtalık foliküllerinin aspirasyonunu içerir (Carson ve Kallen, 2021).

1.3 Klomifen sitrat

Klomifen sitrat [2-(4-(kloro-1,2-difeniletetil)-fenoksil)-N,N-dietiletanamin]; zayıf östrojenik özelliklere sahip stilben bazlı sentetik bir antiöstrojen bileşiktir. Klomifen sitrat, dolaşımdaki estradiolün negatif geri besleme etkisini bloke ederek yumurtalıklarda foliküler büyümeyi desteklemektedir (Adashi, 1984). Kimyasal olarak klomifen, seçici östrojen reseptör modülatörü (SERM) olarak görev yapan non-steroidal bir trifeniletillen türevidir. Hem östrojen agonisti hem de antagonistik etki göstermektedir (Greenblatt ve ark., 1961). Genel olarak, antagonistik bir bileşik olarak etki göstermektedir. Çünkü östrojen agonistik özellikleri yalnızca endojen östrojen seviyeleri aşırı düşük olduğunda ortaya çıkar. Yarılanma ömrü nispeten kısadır, bu nedenle seviyeleri uygulamadan sonra hızla yükselir ve tedaviden kısa süre sonra düşer

(Bahadur ve ark., 2020) .Uygulanan dozun yaklaşık %85'i bir hafta içinde temizlenir. Karaciğer yoluyla temizlenir ve dışkı yoluyla atılır (Mikkelson ve ark., 1986).



Şekil 2.1. Klomifen sitrat maddesi kimyasal yapısı (Compound Summary for CID 3033832, Clomiphene Citrate, n.d.)

Günümüzde infertilite tedavisi için çeşitli ilaçlar kullanılmaktadır, KS bu alanda kullanılan en yaygın ilaçlardan biridir (Khazaei ve ark., 2020; Ko ve ark., 2012). 1960'larda kadın infertilitesinin tedavisi için geliştirilmiş olan KS, seçici östrojen reseptör modülatörüdür (Greenblatt ve ark., 1961). SERM'ler, östrojenle rekabet etmek ve ilişkili olduğu kofaktörleri değiştirerek östrojen reseptör aktivitesini modüle etmek için tasarlanmış antiöstrojenlerdir (Nilsson ve Koehler, 2005). Başlangıçta kadın infertilite tedavisi için geliştirilmiş olmasına karşın, günümüzde hem erkeklerde hem de kadınlarda hipogonadizm ve infertilite tedavisinde yaygın olarak kullanılmakta ve başarılı sonuçlar elde edilmektedir (Khazaei ve ark., 2020). KS kadınlarda ovulasyon indüksiyonu için kullanılırken, erkeklerde Leydig hücrelerinde testosteron üretimini uyarmaktadır.

1.3.1. Klomifensitrat etki mekanizması

Seçici östrojen reseptör modülatörü olan KS; hipotalamus, yumurtalık, endometriyum ve serviksteki östrojen reseptörlerine seçici olarak bağlanır ve östrojenik ve anti östrojenik etkiler gösterir. Ayrıca hipotalamusta kısmi bir östrojen agonisti gibi davranarak östrojenik negatif geri besleme inhibisyonuna neden olmaktadır (Adashi,

1984). LH yanı sıra FSH salgılanmasını artırır, böylece erkeklerde de serum testosteron seviyelerinin arttırılmasını sağlamış olur (Wheeler ve ark., 2019). Ayrıca hipofiz baskılanmasını hafifletmek için bir koruyucu olarak da kullanılır (Liu ve ark., 2018; Feh ve Wadhwa, 2022)

1.3.2 Klomifen sitrat toksisitesi

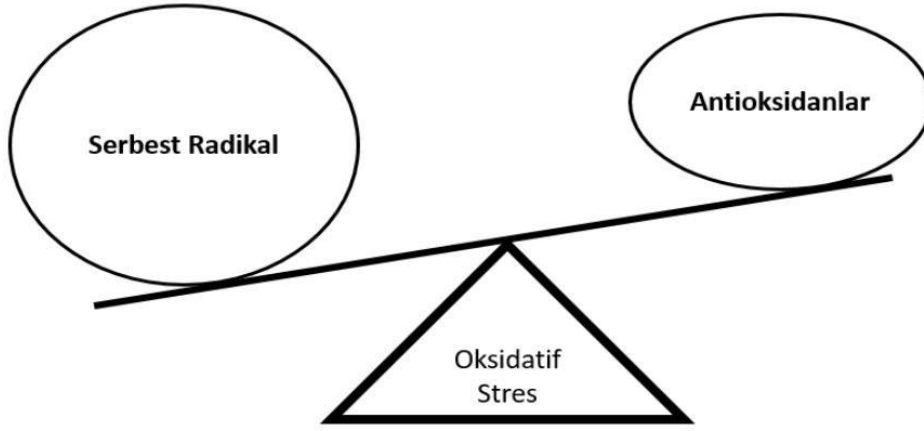
Klomifen kullanımından dolayı gelişen bazı ciddi reaksiyonlar, yumurtalık hiperstimülasyonu, çoğul gebelikler, trombositopeni, pankreatit, uzun süreli kullanımdan sonra yumurtalık kanseri riski, artmış malign melanom riski, ciddi görme bozukluğu ve karaciğer hasarıdır (Farzinvas, 2018; Feh ve Wadhwa, 2022).

KS tedavisi genotoksik hasarla da ilişkilendirilebilir, çünkü DNA polimerazı olmayan hücrelerde replikasyonu inhibe edebilen bileşikler oluşturabilir veya replikasyonlardan sonra çerçeve kayması mutasyonlarına neden olabilir (Ara ve Asmatullah, 2011; Arriaga-Alba ve ark., 1996). Başka bir hipotez, KS'nin endometrium ve uterus üzerinde anti-östrojenik etkilerinin olası varlığını içerir, bu da kan akışında bir azalmaya veya embriyogenezde değişikliğe neden olur (Forman ve ark., 2007) .

Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda farelerde KS uygulaması sonrası fetüste, beyin ve faringeal bölgede histolojik anomaliler tespit etmişlerdir (Ara ve Asmatullah, 2011).

1.4 Serbest radikaller ve oksidatif stres

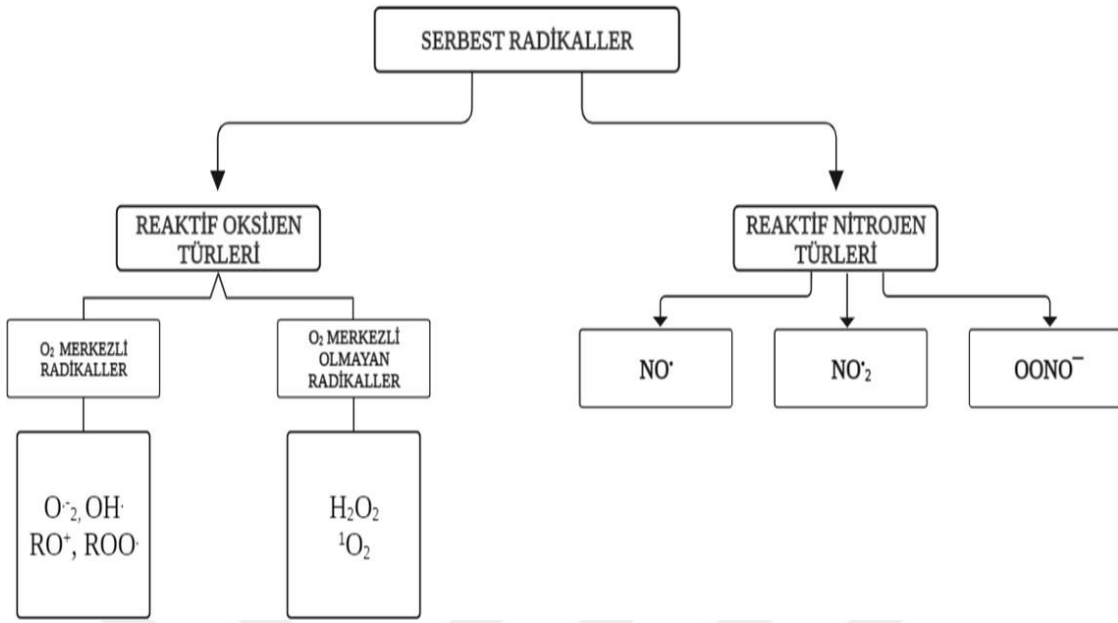
Oksijen, yaşam için gerekli olan en önemli elementtir. Metabolizma sırasında oksidasyon-redüksiyon süreci serbest radikaller veya oksidanlar üretir. Oksidan oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılması arasındaki denge, biyolojik süreçlerin sistematik işleyişi için esastır (Paramanya ve Ahmad, 2019). Hücre metabolizması sırasında da, enerji yaratan normal oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları; ROT: reaktif oksijen türleri veya RNT: reaktif nitrojen türleri adlandırılan toksik metabolik yan ürünleri açığa çıkardığı bilinmektedir (Joseph ve ark., 2015). Sağlıklı bir bedende ROT ve antioksidanlar denge halindedir. Ancak, ROT üretimi ve antioksidan koruyucu mekanizmalar arasındaki denge ROT lehine bozulabilir ve oksidatif stres adı verilen bir durum ortaya çıkabilir.(Firuza ve ark., 2011)



Şekil 1.2. Serbest radikaller ile antioksidanların ilişkisi. (<https://www.biorender.com> ile yapılmıştır.)

Serbest radikaller, en dıştaki orbitallerinde eşleşmemiş elektron içeren, molekül ağırlığı düşük, kısa ömürlü ara bileşiklerdir. Eşleşmemiş elektronlar serbest radikalleri diğer moleküllere karşı son derece reaktif hale getirir (Firuzi ve ark., 2011). Bu maddeler, her biri bir sonraki adımı tetikleyen ve farklı bir serbest radikali oluşturan bir dizi adımı içeren zincirleme reaksiyonlara yol açabilmektedir. Bu reaksiyonlar üç aşamadan meydana gelmektedir. Bunlar; başlama, yayılma ve sonlanma reaksiyonlarıdır. (Perrone ve ark., 2010).

Serbest radikaller; oksijen bazlı, azot bazlı, karbon bazlı ve sülfür bazlı olabilir ve içerdiği atoma göre isimlendirilmektedir (Salman ve Ashraf, 2013). Reaktif oksijen türleri arasında süperoksit (O_2^-), hidroksil (OH^-), peroksil (ROO^-), lipit peroksil (LOO^-), ve alkoksil (RO^-) radikalleri sayılabilir. Reaktif nitrojen türleri ise nitrik oksit (NO^-) ve nitrojen dioksit (NO_2^-) içermektedir (Kelly ve ark., 1998; Büyükuslu ve Yiğitbaşı, 2015).



Şekil 1.3. Serbest radikallerin türleri ve sınıflandırılması.

ROT ve RNT diğer nonradikal reaktif türlere kolay bir şekilde dönüşebilir. Aerobik canlılarda oksijenli solunum sonucu oksijen molekülünün tepkime sonucu bir elektron olarak indirgenmesi ile süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), iki elektron olarak indirgenmesi sonucu ise hidrojen peroksit (H_2O_2) radikali meydana gelmektedir. Tepkime devamında üçüncü elektronun eklenmesi ile ise yüksek derecede reaktif hidroksil radikali (OH^{\cdot}) ve dördüncü elektronun eklenmesi ile de su (H_2O) oluşmaktadır (Kelly ve ark., 1998; Büyüksulu ve Yiğitbaşı, 2015). Genellikle oksidanlar olarak adlandırılan hidrojen peroksit (H_2O_2), ozon (O_3), singlet oksijen (1O_2), hipokloröz asit ($HOCl$), nitrik asit (HNO_2), peroksinitrit ($ONOO^{\cdot-}$), dinitrojen trioksit (N_2O_3) ve lipid peroksit ($LOOH$) ise serbest radikaller arasında gösterilmezler (Barry Halliwell, 1999; Karabulut ve Gulay, 2016). Canlı vücudunda serbest radikaller lipid, protein ve DNA radikalleri olarak ve bazı ROT'lar ($O_2^{\cdot-}$, $^{\cdot}OH$, $^{\cdot}NO$, ve $ONOO^{\cdot-}$) halinde bulunur (Nakai ve Tsuruta, 2021). ROT'un kendine özgü biyokimyasal özellikleri canlı organizmaların gelişimi için gerekli mekanizmaların temelini oluştururken, ROT'un aşırı üretimi kanser, nörodejeneratif hastalıklar, (Barnham ve ark., 2004) inflamasyon, vb. gibi çok sayıda hastalıkta rol oynayan oksidatif strese yol açmaktadır (Yang ve ark., 2018).

1.5 Serbest Radikallerin ve Reaktif Oksijen Türlerinin Biyolojik Etkileri

Fizyolojik süreçlerde ya da patolojik tepkimeler sonucunda sentezlenen serbest oksijen radikalleri, sentez edildikleri yerde detoksifiye edilmezlerse zararlı etkiler oluşturmaktadır (B.Halliwell ve ark., 1992). Serbest radikallerin temel kaynağı olan oksijen molekülünün indirgenmesi sonucunda organizmalarda sık karşılaşılan reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. Serbest oksijen radikalleri metabolik yan ürünler gibi endojen olarak ortaya çıkabildikleri gibi hava kirliliği, sigara, UV ışığı veya iyonize radyasyon gibi eksojen fiziksel ve kimyasal reaktiflerle indüklenebilir (Frei, 1997; Pizzino ve ark., 2017).

Lipidler, hücre membranlarının yapısını koruyan ve hücrelerin işlevini kontrol eden temel bileşenleridir (Esterbauer, 1993). Lipitler serbest radikallerden etkilenen makromoleküllerin başında gelmektedir. Lipit peroksidasyonu, memeli hücre zarlarında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan, pentan, malondialdehit (MDA) gibi çeşitli ürünlere yıkılması tepkimesidir (Ayala ve ark., 2014; Büyüksulu ve Yiğitbaşı, 2015). Peroksidasyon 3 adımda gerçekleşir başlama, yayılma ve sonlanma adımlarından meydana gelmektedir (Kanner ve ark., 1987). Lipid peroksidasyonu başlatma adımında, hidroksil radikali gibi prooksidanlar karbon merkezli lipid radikalini (L-) oluşturan alilik hidrojeni uzaklaştırır. Yayılma aşamasında, lipid radikali (L-) oksijenle hızla reaksiyona girerek lipid peroksi radikali (LOO-) oluşturur ve bu da başka bir lipid molekülünden bir hidrojen kopararak yeni bir L- (zincirleme reaksiyona devam eder) ve lipid hidroperoksit (LOOH) oluşturur. Sonlandırma reaksiyonunda, E vitamini gibi antioksidanlar LOO- türlerine bir hidrojen atomu bağlar ve başka bir LOO- ile reaksiyona girerek radikal olmayan ürünler oluşturur (Yin ve ark., 2011; Ayala ve ark., 2014). Lipid peroksidasyonu sırasında; MDA, propanal, hekzanal ve 4-hidroksinonenal gibi birçok farklı aldehit türü meydana gelmektedir (Ayala ve ark., 2014). MDA, lipid peroksidasyonunun en mutajenik ürünü görülmektedir (Esterbauer ve ark., 1990). MDA, tiyobarbitürik asit (TBA) ile kolay reaksiyona girebilmesi nedeniyle lipid peroksidasyonu için uygun bir biyobelirteç olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır (Esterbauer ve Cheeseman, 1990; Ayala ve ark., 2014). Bununla birlikte, tiyobarbitürik asitle reaksiyona giren maddeler testi (TBARS), MDA'nın *in vivo* miktarının belirlenmesi için kullanılan diğer bir testtir (Giera ve ark., 2012). Lipid peroksidasyonu,

hücre membranında hasar meydana getirerek, hücrenin geçirgenliğini etkilemektedir. Hücre içine aşırı Ca^{+2} birikmesine neden olarak, hücre membranının bozulmasına ve dolayısıyla hücre ölümüne neden olmaktadır (Kac, 2004).

Proteinler, hücrelerde ve dokularda bol miktarda bulunmaktadır. Proteinler çeşitli oksidanlarla yüksek reaksiyon hızları nedeniyle oksitleyici ajanlar için önemli bir hedef haline gelmektedir (Hawkins ve ark., 2009; Demirci-çekiç ve ark., 2022). Oksidatif stres sonucunda oluşan başta hidroksil radikali olmak üzere reaktif oksijen türleri hücre içi proteinler üzerinde geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz oksidatif modifikasyona ve sonuçta oksidatif hasara yol açmaktadır (Investigations, 2015; Prokai ve ark., 2007). Proteinlerin reaktif oksijen türleri ile etkileşimi, amino asit yan zincirlerinin veya protein omurgasının oksidasyonuna ve bunun sonucunda karbonil türevi bileşiklerin oluşumuna ve protein-protein çapraz bağlanmalara neden olabilir (Davies, 2016). Proteinler yan zincirleri farklı amino asitler içerebildiğinden, proteinler üzerinde çok sayıda radikal oluşabilmektedir. Tiyol grubu ve aromatik yan zincire sahip amino asitler, yani sırasıyla sistein ve tirozin, oksidasyona en duyarlı olanlardır (Zhang ve ark., 2013). Protein karbonilasyonu ve tirozin nitrasyonu geri-dönüşümsüz oksidatif modifikasyonlar olarak kabul edilirken sistein modifikasyonların geri-dönüşümlü olduğu kabul edilmektedir (Prokai ve ark., 2007; Rao ve Møller, 2011) Bu modifikasyonlar önemlidir çünkü proteinlerin yapısal bütünlüğünde meydana gelen hasarlardan dolayı çeşitli enzimlerin katalitik aktivitesinin bozulmasına ve metabolik yolların düzenlenmesinde aksamalara neden olmaktadır (Andr ve ark., 2021).

DNA'nın reaktif oksijen türleri ile etkileşimi DNA-protein çapraz bağlanmasına, şeker ve baz modifikasyon ürünlerinin oluşumuna, iplik içi ve iplikler arası çapraz bağlanmaya, tek veya çift iplik kopmalarına neden olabilmektedir (Gonzalez-Hunt ve ark., 2018). Hidroksil radikali, karbon merkezli şeker radikalleri oluşturmak için DNA'nın şeker kısmı ile reaksiyona girer, bu da DNA ipliğinin kırılmasına, çeşitli şeker ürünlerinin ve abazik bölgelerin oluşmasına neden olur (Dizdaroglu ve Jaruga, 2012). DNA-protein çapraz bağlanması, DNA baz radikalinin, proteinlerin aromatik amino asidine veya amino asit radikaline eklenmesiyle gerçekleşebilir (Cooke ve ark., 2003). Endojen veya eksojen kaynaklardan kaynaklanan ROT'un DNA'da yol açtığı hasar çeşitli hastalıkların gelişme riskini arttırabilir (Guo ve ark., 2016).

1.5.1 Antioksidanlar ve savunma

Karbonhidrat, protein, lipid ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu geciktirebilen veya tamamen önleyebilen maddelere antioksidan, ve bu maddelerin aktivitelerine antioksidan savunma denir (Matés ve ark., 1999). Oksidanların belirli bir düzeyin üzerine çıkması ve antioksidanların yetersiz kalması sonucunda dengenin bozulması ile oksidan moleküller organizmanın protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asitler ve yararlı enzimlerini bozarak zararlı etkilere yol açmaktadır. Bu zararlı etkilerin meydana gelmesi oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır. Canlıların kendilerini koruyacak antioksidan savunma mekanizmaları bazı durumlarda yeterli gelmez ve eksojen antioksidanlara ihtiyaç duyulur. Bu nedenle vücuda dışardan koruyucu, engelleyici, iyileştirici özelliklere sahip antioksidanların alınması gerekir (Gülsüm SinemKasapçopur Özel, 2014). Antioksidan seviyeleri yeterli miktarda olmadığında, çoklu doymamış yağ asitleri (PAFA'lar), proteinler ve DNA dahil olmak üzere önemli biyolojik moleküller zarar görebilir bu da canlının sağlığı, büyümesini, gelişmesini olumsuz etkilemektedir (Surai ve ark., 2019).

Hücreler oksidatif hasara karşı enzimatik ve non-enzimatik antioksidan sistem ve moleküllerle korunurlar. Enzimatik antioksidanlar birincil savunma görevi görürken, enzimatik olmayan savunma antioksidanlar ikincil olarak görev alır.(El-Bahr Sabry Mohamed, v.d.) Antioksidan savunma katalaz, SOD vb. enzimler aracılığıyla olursa enzimatik antioksidan savunma; tokoferol, askorbik asit vb. maddelerle olursa nonenzimatik antioksidan savunma olarak tanımlanır (Gülsüm SinemKasapçopur Özel, 2014; Valko ve ark., 2007).

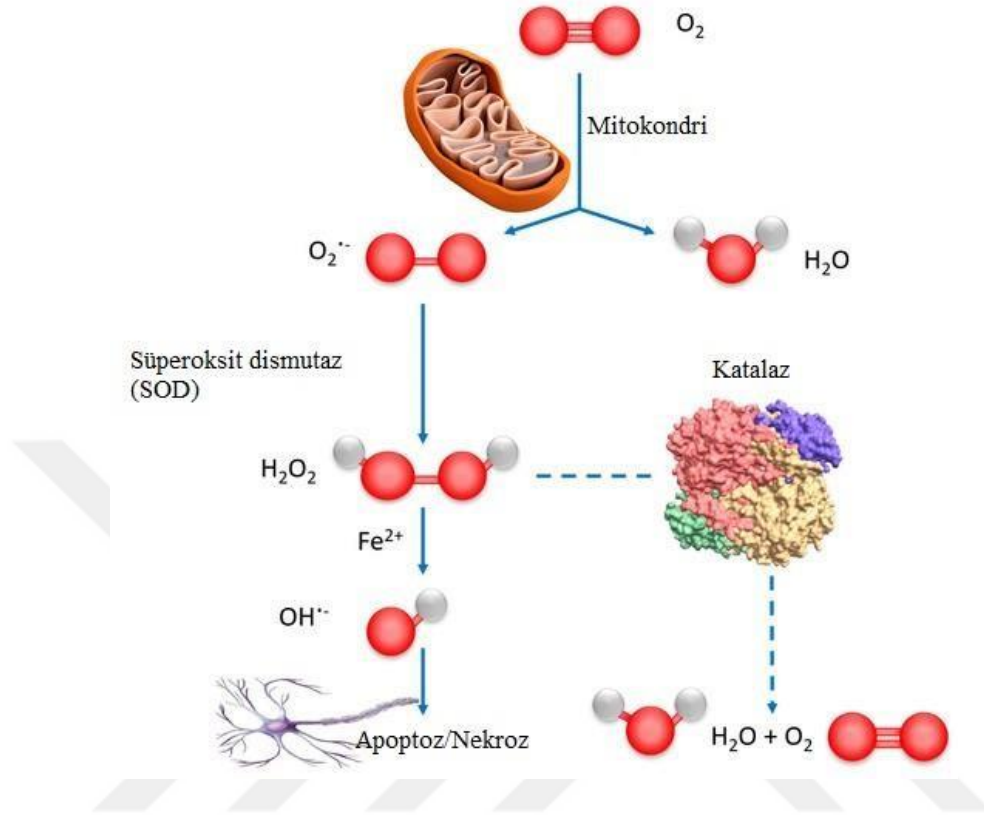
Tablo 1.1. Antioksidan savunma mekanizmaları.

<p>İlk olarak, oksijen kullanılabilirliğini azaltarak, ROS/RNS üretiminden sorumlu enzimlerin faaliyetlerini azaltarak, demir ve bakır proteinlere bağlı tutarak yeni radikal oluşumuna katılımlarını önleyerek serbest radikal üretimini azaltma girişimi</p>	<p>İkinci olarak, biyolojik sistemlerde serbest radikallerin ana kaynağı olan mitokondrinin bütünlüğünün korunması büyük önem taşımaktadır.</p>
<p>Üçüncü olarak, serbest radikallerin temizlenmesi, serbest radikallerin ve radikal olmayan toksik ürünlerin detoksifikasyonu antioksidan savunma stratejisinde önemli adımlardır.</p>	<p>Dördüncü olarak, E vitamininin aktif formda tutulmasına yardımcı olan E vitamini geri dönüşüm sistemi biyolojik antioksidan gücünü artırabilir.</p>
<p>Beşinci olarak, redoks sinyali, transkripsiyon faktörü ve vitajen aktivasyonu ve antioksidan ve detoksifikasyon aktivitelerine sahip koruyucu moleküllerin ek sentezi, anti-stres stratejisinin ana unsurlarıdır.</p>	<p>Altıncı olarak, hasarlı moleküllerin onarımından ve uzaklaştırılmasından hasarlı moleküllerin birikmesinin önlenmesinde ve proteostazın sürdürülmesinde önemli bir rol oynar</p>
<p>Apoptoz, otofaji ve son derece hasarlı hücreleri ortadan kaldırmak ve hasarların diğer hücrelere/dokulara aktarılmasını önlemek için bunlarla ilgilenen diğer süreçler antioksidan savunma ağının önemli unsurlarıdır (Surai et al., 2012)</p>	

1.5.2 Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma hattı

Enzimatik antioksidan savunması; SOD, CAT, glutatyon redüktaz, GTS, glutatyon peroksidaz, tridoksin redüktaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, peroksiredoksin ve metiyonin sülfoksitredüktaz gibi enzimatik aktivitesi bulunan savunma sistemidir. SOD;

O₂'yi dismüte ederken, katalaz ve peroksidazlar H₂O₂'yi detoksifiye ederler (Paithankar ve ark., 2021).



Şekil 1.4. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ve doğal enzimlerle organizmanın kendini savunması(*Molecules-V24-I17_20230912*, v.d.).

Üretilen ROS seviyeleri temel olarak mitokondri ile bağlantılıdır. Süperoksit radikalleri O₂⁻, süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından daha az toksik olan H₂O₂'ye dönüştürülür. Fe²⁺ varlığında, H₂O₂ moleküllerinin bazıları, çeşitli biyomoleküllere (proteinler, DNA ve lipitler) saldıran ve hücre ölümüne neden olan oldukça reaktif OH⁻ ROS'a indirgenebilir. Katalaz bu yolu bloke eder ve H₂O₂'yi zararsız su ve oksijene ayrıştırarak organizmaları kurtarır (Rakotoarisoa ve ark., 2019)

Enzimatik Olmayan Antioksidanlar; E vitamini, karotenoidler, polifenoller ve askorbik asit önemli fizyolojik işlevleri olan enzimatik olmayan antioksidanlardır ve vücutta sentezlenemedikleri için beslenme yoluyla sağlanmaları gerekir (George ve Abraham, 2006). C ve E vitaminleri, β-karoten ile birlikte antioksidan vitaminleri olarak bilinir ve oksidatif hasarın neden olduğu bazı hastalıkların önlenmesinde önemli bir rol oynar (McCall ve Frei, 1999). Glutasyon, ürik asit ve bilirubin de insan sıvılarında bulunan

küçük moleküler kütleli antioksidanlardır (Byers ve Perry, 1992). Glisin, glutatyon ve antioksidan olarak görev yapan proteinlerin sentezinde yer alan ve özellikle böbreklerin korunmasında rol oynayan bir başka enzimatik olmayan antioksidan öncüsü amino asittir (Vertuani ve ark., 2004).

1.5.2.1 Katalaz

Katalaz, H₂O₂'ye adapyanıtta çok önemli bir rol oynar (Izawa ve ark., 1996). Katalaz reaksiyonun bir şekilde glutatyon peroksidaz reaksiyonuna yardımcı olduğu ileri sürülmüştür. Bu enzimler, ROT'a karşı ikinci savunma kademesinde bulunur (Sepasi Tehrani ve Moosavi-Movahedi, 2018).

Normal koşullarda O₂, H₂O'ya indirgenir. Ancak bazı elektronlar bu yoldan kaçır ve hücreler için zararlı olan süperoksit radikaline dönüşür. Bu reaktif oksijen türleri, topluca süperoksit dismutazlar olarak adlandırılan belirli bir enzim sınıfı tarafından daha az zararlı hidrojen peroksite dönüştürülür. Fe²⁺ varlığında, H₂O₂ moleküllerinin bazıları çeşitli biyomoleküllere saldıran yüksek reaktifliğe dönüşebilir. Katalaz, H₂O₂'yi zararsız su ve oksijene dönüştürür ve böylece glutatyon peroksidazlar gibi diğer daha karmaşık enzimlerle birlikte organizmayı kurtarır. İlginçtir ki, aynı radikal iyonlaştırıcı radyasyonun neden olduğu dolaylı hasarın da ana sorumlusudur (Sepasi Tehrani ve Moosavi-Movahedi, 2018).

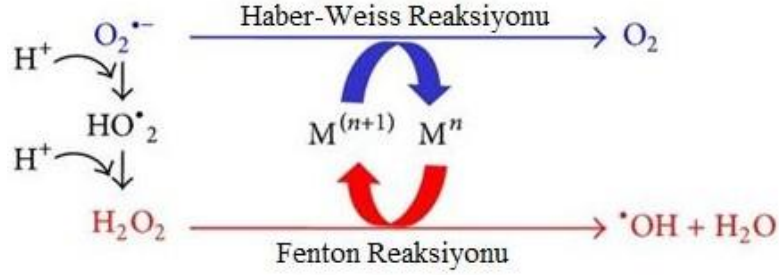
1.5.2.2. Lipit peroksidasyonu, malondialdehid (MDA)

Lipidler plazma membranı, golgi aygıtı, endoplazmik retikulum gibi hücresel birimlerin temel bileşenleridir. Lipid çift tabakalardan oluşan hücre zarları hücreyi çevreleyerek yapısal bütünlüğü sağlar. Doymamış yağ asitleri içeren lipitlerde çift bağların varlığı membran akışkanlığını artırır.

Bir membranın akışkanlığı fonksiyonlarını önemli ölçüde etkiler. Çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) ne kadar çok çift bağ içeriyorsa, o kadar akışkan olacaktır. Aynı zamanda bu özellik, molekül içindeki çift bağların düzenine bağlı olarak PUFA'ları otooksidasyona duyarlı hale getirir (Shchepinov ve ark., 2014; Demirci-çekiç ve ark., 2022).

Lipid peroksidasyonu iki farklı mekanizma ile gerçekleşir. Bunlar; enzimatik olmayan peroksidasyon ve enzimatik peroksidasyondur (Desai ve ark., 2014). Lipitlerin

enzimatik olmayan peroksidasyonu, bir radikalle veya radikal olmayan moleküllerden radikal türler üreterek başlatılabilir (Desai ve ark., 2014). Biyolojik sistemlerde bu, özellikle demir ve bakır olmak üzere çeşitli geçiş metallere varlığında Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları yoluyla gerçekleşir (Ayalave ark., 2014).



Şekil 1.5. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu. Geçiş metallere indirgenmiş formu (M^n), Fenton reaksiyonu yoluyla hidrojen peroksit (H_2O_2) ile reaksiyona girerek OH^- oluşumuna yol açar. Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$) de Haber-Weiss reaksiyonunda geçiş metallere oksitlenmiş formuyla (M^{n+1}) reaksiyona girerek M^n üretimine yol açabilir ve bu da yine redoks döngüsünü etkiler (Ayala ve ark., 2014).

1.5.2.3. İndirgenmiş glutatyon

Glutatyon (GSH) bir tripeptittir, γ -L-glutamil-L-sisteinilglisin, tüm memeli dokularında 1-10 mM konsantrasyonlarda oksidatif strese karşı savunma sağlayan tiyoldür. GSH aynı zamanda redoks sinyalinin önemli bir belirleyicisidir. Zenobiyotiklerin detoksifikasyonunda hayati öneme sahiptir ve hücre proliferasyonunu, apoptozu, bağışıklık fonksiyonunu ve fibrojenizi modüle etmektedir. Ökaryotik hücreler üç ana GSH rezervuarına sahiptir. Hücresel GSH'nin çoğu (%80-85) sitozoldedir; %10-15'i mitokondride ve küçük bir yüzdesi de endoplazmik retikulumdadır (Meredith ve Reed, 1982; Yuan ve Kaplowitz, 2009).

GSH'nin antioksidan işlevi büyük ölçüde GSH peroksidaz (GPx) katalizli reaksiyonlarla gerçekleştirilir; bu reaksiyonlar GSH, GSSG'ye oksitlenirken hidrojen peroksit ve lipid peroksiti azaltır (Lu, 2009). Organik peroksitler GPx ve GSH S-transferaz tarafından da indirgenebilir.

1.6. Toksikolojide Kullanılan *in vitro* ve *in vivo* Yöntemler

Toksikoloji zehirler bilimidir ve kimyasalların canlı organizmalar üzerindeki olumsuz etkilerini incelemeye odaklanmaktadır. Her madde, belirli dozlarda zehir olabilese de, toksikoloji öncelikle nispeten küçük miktarlara maruz kaldıktan sonra bu olumsuz etkilere neden olabilen maddelere odaklanmaktadır. Maddelerin toksisitesine ilişkin bilgiler; yeni bir ilacın geliştirilmesinden, çevresel bir kirleticinin etkilerinin modellenmesine kadar tüm toksikoloji uygulamaları için temeldir. Ayrıca, potansiyel olarak tehlikeli maddelere maruz kalma risklerinin değerlendirilmesinde; toksisite verilerinin kullanılmaktadır (Stine ve Brown, 2015).

Toksisite hakkında bilgi toplamak için çeşitli farklı yöntemler vardır. Öncelikle, bir kimyasal yapının gözlemlenmesi, bir kimyasalın canlı bir sistemdeki davranışına ilişkin güçlü bir gösterge verebilir. Bu sayede kimyasallar, toksisitesi daha önce gözlenmiş ve ölçülmüş olan benzer yapıdaki bileşiklerle karşılaştırılabilir. Kimyasal yapı ve toksisite arasındaki ilişki; yapı-aktivite ilişkisi olarak bilinir. Toksisite testleri için bir başka seçenek de *in vitro* testlerdir. *In vitro* toksisite testlerine örnek olarak kanserojen maddeleri belirlemek için hücre kültürlerinin kullanılması veya toksik maddelerin izole edilmiş, perfüze edilmiş organlar (karaciğer veya böbrek gibi) üzerindeki etkilerinin test edilmesi verilebilir. Bu testler toksisite mekanizmaları hakkında değerli bilgiler verebilir, ancak yine de doğaları gereği kapsamları sınırlıdır. Bir kimyasalın insan sağlığı üzerindeki potansiyel etkileri hakkında en iyi bilgiyi elde etmek için, *in vivo* yani hayvan testleri şu anda en etkili modeldir (Stine ve Brown, 2015).

1.6.1 Toksikolojide *in vitro* yöntemler

Toksikolojide *in vitro* yöntemlerde temel amaç, çeşitli tehlikeli kimyasal bileşiklere karşı insan reaksiyonunu hayvanlardan daha iyi temsil eden insan türevi hücrelerin kullanımının, insan toksikolojik etkilerine yönelik öngörülebilirliği artıracaktır (Fentem ve ark., 1998).

Kimyasal ajanların toksisitesi, geliştirilmiş olan birçok *in vitro* sitotoksisite deneylerinden biri ile değerlendirilebilir. En erken kabul edilen *in vitro* test sistemleri genotoksisite testleridir (Spielmann ve ark., 1998).

Sitotoksisite, çeşitli olaylar sonucunda hücrede belirli makromoleküllerin sentezinin engellenmesi ve hücrenin yapısının zarar görmesidir. Sitotoksisite testleri, hücrelerdeki bu hasarın boyutunu belirleyen *in vitro* test yöntemleridir (Riss ve Moravec, 2004). Hücre canlılığını veya sitotoksisitesini *in vitro* olarak tespit etmek için birçok yöntem kullanılmaktadır. Hücre canlılığını ölçmek için en yaygın kullanılan sitotoksisite test yöntemlerinden biri MTT'dir. Bu test yöntemi, 1983 yılında Mossman tarafından tanıtılan kolorimetrik bir yöntemdir (Ferrari ve ark., 1990; Niles ve ark., 2007). MTT reaktifi (3-(4,5 dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür), 4 nitrojen atomuyla çevrili pozitif yüklü, mono-tetrazolyum tuzları oluşturan sarı bir boyadır (Berridge ve ark., 2005; Ghasemi ve ark., 2021). MTT reaktifi pozitif yüklü olduğu için hücre zarından geçebilir. Böylece tetrazolyum tuzları hücredeki mitokondriyal dehidrogenaz enzimi tarafından mor renkli formazan kristallerine dönüştürülür. Formazan kristali miktarı canlı hücre sayısı ile doğru orantılı olarak artar (Otang ve ark., 2014). Oluşan kristaller uygun bir çözücüde (DMSO veya izopropil alkol) çözüldükten sonra spektrofotometrik veya mikropilaka okuyucu yöntemiyle okuma yapılır (Milheiro ve ark., 2016; ŞAHİN, v.d.).

Tablo 1.2. MTT testinin avantaj ve dezavantajları.

Avantajlar	Dezavantajlar
Diğer <i>in vitro</i> sitotoksosite test yöntemleriyle karşılaştırıldığında MTT analizi hassas bir testtir.(A. O. Da Costa et al., 1999).	MTT analizinin hassasiyeti hücreye göre farklılık gösterebilir türleri (Wan et al., 1994).
MTT analizi sırasında, formazan kristalleri ortamın uzaklaştırılması için yıkama işlemi yapılan tek işlemdir. Bu da MTT analizinin yapışkan olmayan hücre hatlarında kullanımı için bir avantaj sağlamaktadır (Plumb et al., 1989).	MTT analizinde hücre içinde kristaller oluşur. Çünkü bu kristaller suda çözünmezler, bu kristaller iyice çözülmemelidir çünkü kuyucuklar arasında absorban farklılıkları vardır.
MTT analizi, radyasyona maruz kalmadan daha kısa sürede daha fazla numuneyi analiz eder (Bruggisser et al., 2002; Wang et al., 1996)	MTT analizi, tetrazolyum boyasının formazana dönüşüm oranı metabolik aktivite ve mitokondri sayısına bağlıdır.

Danio rerio balığı ve hücrel modelleri toksikolojik ve çevresel araştırmalarda önem kazanmıştır yaygın olarak kullanılmaktadır (Eide ve ark., 2014; Sun ve ark., 2010). *D. rerio* karaciğerinden, 90'lı yıllardan beri balıklarla yapılan *in vivo* deneyler için umut verici bir alternatif model olarak kabul edilen ZFL (Zebra Balığı Karaciğeri) hücre hattı (Gasch ve ark., 2016; Miranda ve ark., 1993) ve birincil hepatositler olarak da adlandırılan birincil hepatosit kültürü (Reschly ve ark., 2007) elde edilmektedir. *D. rerio*'nun birincil hepatositleri gibi birincil kültürler avantajlı alternatiftir çünkü genellikle *in vivo* modele daha fazla benzerlik gösterirler (Costa ve ark., 2019).

1.6.2. Model organizma olarak zebra balığı

Model organizmalar, insan genomuna biyolojik ve genetik açıdan benzerliklerinden dolayı seçilirler. Model organizmaların genom dizilimlerinin bilinmesi sayesinde çeşitli hastalıkların fizyolojik ve biyolojik süreçleri anlaşılabilir (Gasch ve ark., 2016). Zebra

balığının çalışmalarda model organizma olarak kullanılması, George Streisinger ve Oregon Üniversitesi'ndeki meslektaşları tarafından önerilmiştir. Fare ile karşılaştırıldığında insan hastalıklarını modellemek için zebra balığı birçok avantaja sahiptir (López-Olmeda & Sánchez-Vázquez, 2011). Zebra balığı bilimsel çalışmalarda önemli bir balık olup, genetik ve deneysel araştırmalarda omurgalı model organizma olarak kullanılmaktadır. Zebra balığının yüksek üreme potansiyeli, yumurtaların şeffaf olması, embriyo gelişiminin dışı vücudunun dışında ve hızlı olması ayrıca birçok insan hastalığı ve gelişiminin takip edilebilmesi deneysel araştırmada omurgalı model organizma olarak tercih edilmektedir (Kutluyer & Aksakal, 2013). Zebra balığında spesifik enzim aktivitesinin ayarlanması farmakolojik ya da genetik stratejiler sayesinde kolaylıkla yapılabilmektedir. Birçok kimyasal bileşik spesifik enzim aktivitelerinde allosterik efektörleri kullanabilmektedir. Bağımsız bir şekilde kontrol edilebilen miktar ve inkübasyon süresi ile efektör kimyasallar tarafından enzim aktivitesi ayarlanması *in vivo* ortamlarda mümkündür. (Kayhan ve ark., 2018).

1.7 Amaç

Dünya çapında 48 milyon çift ve 186 milyon kişinin infertiliteden mustarip olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle infertilitenin kapsamlı bir tanısal değerlendirilmesi, önleme ve tedavi sonuçlarında iyileşme sağlamak çok önemlidir. Buna rağmen infertilitenin gelecekte de artması beklenmektedir. Bu durumda dünya üzerinde üremeye yardımcı ilaç kullanımının oldukça artacağı tahmin edilmektedir. Üreme ilaçları insanlarda üremeye yardımcı olmasının yanında birçok farklı sorunu meydana getirebileceği gibi vücuttan uzaklaştırıldıklarında diğer canlılara da zarar verebilmektedir. Üreme ilaçları vücuttan hidrosillenmiş ve metillenmiş metabolitler halinde idrar ve dışkı yoluyla atılır ve kanalizasyonuna karışır. Bu ilaçlar kanalizasyon arıtma tesisi tarafından tamamen bertaraf edilemez, bu da yer altı suyunun yanı sıra yüzey suyunun da kirlenmesine yol açar.

Gelişen dünya ile sık rastlanılan bir üreme problemi olan infertilite ile mücadelede için çok fazla üreme indükleyici oral ajanlar kullanılmaktadır. Bu oral ajanların üremeyi indüklerken organizma ve dokularda meydana getirebileceği oksidatif hasar göz ardı edilebilmektedir. Kimyasal olarak klomifen, seçici östrojen reseptör modülatörü (SERM) olarak görev yapan non-steroidal bir trifeniletillen türevidir. Uygulanan dozun

yaklaşık %85'i bir hafta içinde temizlenir. Karaciğer yoluyla temizlenerek, dışkı yoluyla atılır.

Yaptığımız literatür çalışmalarında klomifen sitrat etken maddesinin zebra balığı üzerine *in vivo* ve *in vitro* etkilerini araştıran çalışmalar bulunamamıştır. Bu neden ile çalışmamızda, klomifen sitrat etkisi *in vivo* olarak 1,47mg/L dozunda ve 48 ve 72 saat sürelerinde omurgalı model organizma olan ergin zebra balığına uygulanmış ve karaciğer, beyin ve gonad dokusundaki oksidatif stres parametrelerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, klomifen sitrat'ın *in vitro* olarak da farklı doz aralıklarında ZFL karaciğer epitel hücreleri üzerine etkileri 48 ve 72. saat uygulamalar sonucunda sitotoksisite testi ile araştırılması amaçlanmıştır.



2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Deneyler Sırasında Kullanılan Materyaller

2.1.1. Deneyler sırasında kullanılan kimyasal maddeler

Deneyler sırasında kullanılan kimyasal malzemeler ve markaları Tablo 2.1.'de yer almaktadır.

Tablo 2.1. Deneyler sırasında kullanılan kimyasal malzemeler

Kimyasalın Adı	Kimyasalın Markası
Etanol Absolut	Merck
Asetil Kolin İyodür	Merck
Bradford Reaktif	Sigma
DTNB	Sigma
E.D.T.A. Disodyum % 35	Multicell
Hidrojen Peroksit % 35	Merck
Sodyum Fosfat Dihidrat (NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O)	Merck
Hidroklorik Asit	Merck
Kalsiyum Klorid (CaCl ₂)	Merck
Meta – Fosforik Asit	Merck
N-Butanol (CH ₃ (CH ₂) ₃ OH)	Merck
Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Potasyum Fosfat (K ₂ HPO ₄)	Merck
Sodyum Hidrotit (NaOH)	Merck
Sodyum Bikarbonat (NaHCO ₃)	Merck
Sodyum Karbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck
Sodyum Klorür (NaCl)	Merck
Sükroz	Merck
Tiobarbiturik Asit (C ₄ H ₄ N ₂ O ₂ S)	Molychem
Trikloroasetik Asit (TCA) (CCl ₃ COOH)	Sigma
KCl	Merck

2.1.2. Deneyler sırasında kullanılan cihazlar

Deneyler sırasında kullanılan cihazların ve markaları Tablo 2.2.'de yer almaktadır.

Tablo 2.2. Deney sırasında kullanılan cihazlar

Deneyler sırasında kullanılan cihazlar	Cihazın Markası
Buzdolabı	Profilo
Derin dondurucu	ESCO
Etüv	Binder
Homojenizatör	Allsheng Bioprep-6
Hassas Terazı	Kern
Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica
Mikro Santrifüj	Herolab- Micro Gen 16
Vorteks	StuART Vortex Mixer SA8
Multimod Okuyucu	Biotek – Cytation 3
Serolojik Pipet Tabancası	Thermo Fisher
Dispenser	Isolab
Soğutmalı Santrifüj	Hermle Z326K
Spektrofotometre	Dynamica Halo SB-10
Su Banyosu	Nüve
Otomatik Pipetler	Rainin

2.1.3. Deneyler sırasında kullanılan sarf malzemeler

Deneyler sırasında kullanılan sarf malzemeler ve markaları Tablo 2.3.'te yer almaktadır.

Tablo 2.3. Deneyler sırasında kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzemenin Adı	Sarf Malzemenin Markası
15 ve 50 ml'lik steril plastik falkon tüp	CAPP
0,5, 1,5 ve 2 ml'lik steril/steril olmayan santrifüj tüpleri	Isolab
Bistüri ucu	Galena

Homojenizatör cam boncukları	Sigma Aldrich
Kurutma kağıdı	Isolab

2.1.4. *in vivo* deneylerde kullanılan canlılar

2.1.4.1. Zebra balığının sistematikteki yeri ve biyolojisi

Zebra balığının (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) anavatanı Güneydoğu Asya'dır ve Sazangiller ailesine ait bir balıktır. Çalışmamız Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 05.2023mar protokol numarası ile onay almıştır.

Sistematikteki yeri Tablo 2.4.'teki gibidir;

Tablo 2.4. Zebra balığı (*Danio rerio*, Hamilton, 1822)'nin sistematikteki yeri

Alem: Animalia

Şube: Chordata

Sınıf: Actinopterygii

Takım: Cypriniformes

Aile: Cyprinidae

Cins: *Danio*

Tür: *Danio rerio*

Zebra balığı ilk olarak 1970'li yıllarda Amerikalı araştırmacıları tarafından ıslah edilmiştir (Mione ve Trede, 2010). Zebra balığı (*Danio rerio* Hamilton, 1822) genetik, sinirbilim, gelişim, fizyoloji, toksikoloji ve biyotıp dahil olmak üzere birçok araştırma alanında en önemli model organizmalardan biri haline gelmiştir ve birçok insan hastalığının modeli olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Sa ve Lo, 2011).

Bu çalışma sırasında kullanılan zebra balıkları ticari olarak satın alınmıştır. Balıkların ortama alışması sağlandı ve 14/10 düzeninde aydınlık/karanlık ortamda tutulması

sağlanmıştır. Deneyden önce zebra balıkları 28°C su sıcaklığında tutuldu ve günde iki kez beslendi. Besleme için ticari olarak satın alınan pul ve canlı yemler kullanıldı. Tankın temizliğine dikkat ederek iki günde bir suyun yarısı değiştirildi ve akvaryumların dipleri süpürüldü.

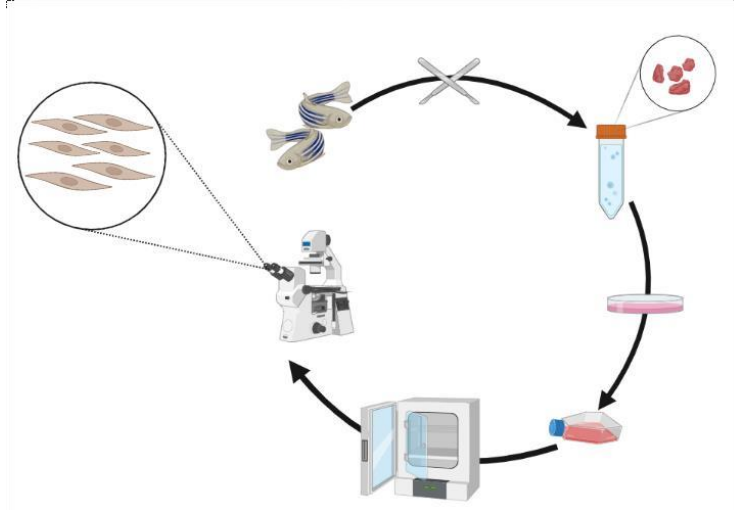
2.2. Klomifen Sitratın *in vitro* ve *in vivo* Uygulamaları Sonrası Yapılan Deneyler

2.2.1 *in vitro* deney düzeneği

2.2.1.1. Hücre kültürü:

Bu çalışmada American Type Culture Collection (ATCC) şirketinden temin edilen Zebra balığı (*Danio rerio*) ZFL (CRL2643) hücre hattı kullanıldı. ZFL (CRL 2643) hücre hattı toksikolojik deneylerde sıklıkla tercih edilmektedir. Bu hücreler; %50 L-15 (ATCC 30-2008), %35 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM HG GIBCO 12100), %15 Ham's F12 (GIBCO 21700) içeren hücre ortamı içinde yetiştirildi. Bu hücre ortamına ek olarak; 0.15 g/L sodyum bikarbonat 15 mm, HEPES, 0,01 mg/ml sığır insülini, 50 ng/ml fare EGF'si, %5 ısıyla inaktive edilmiş fetal sığır serumu, %0,5 Rainbow Trout Serumu ile desteklendi.

Hücrelerin ekimi; 75cm² alana sahip fitreli steril flasklara yapılmıştır ve ilk 24 saat flask tabanına yapışması için CO₂ inkübatöründe bekletilmiştir. Hücrelerin pasajlama ve kimyasal uygulama işlemleri laminar hava akıma sahip olan biyogüvenlik sınıf II kabin içerisinde steril koşullarda yapıldı. Pasajlama işlemi için 75cm²lik flask tabanının %75-80 oranında kaplandığında Tripsin EDTA Solüsyonu ile yapıldı. 3ml Tripsin-Edta ile 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra invert mikroskop ile hücrelerin flask tabanından ayrılması kontrol edilerek flaskın içindeki hücre süspansiyonu, hücre besiyeri ile 10ml'ye tamamlandı. Tamamı çekilen hücre süspansiyonu 15ml kapaklı tüp içine alınarak 200rpm ile 5 dakika santirifüj edildi.



Şekil 2.1. Hücre kültürü akış şeması. (<https://www.biorender.com> ile yapılmıştır.)

2.2.1.2 *İn vitro* Klomifen sitrat uygulaması

Klomifensitrat'ın 10 µg/ml, 5µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml, 0,625 µg/ml, 0,312 µg/ml, 0,156 µg/ml, 0,0781 µg/ml dozuna kadar seri seyretmeler ile uygulama maddesi elde edilmiştir. Seri seyretmeler halinde elde edilen dozlar 3 tekrar halinde 96 oluklu plakaya uygulanmıştır. Deney süresi 48 ve 72 saat olarak belirlenmiştir.

2.2.1.3 MTT:

MTT, tetrazolyum tuzuna dayalı, yalnızca canlı hücreleri ölçebilen ve çok oluklu plaka kullanılarak bir defada birçok sonuç alınabilen, hızlı ve uygun maliyetli bir hücre canlılık testidir. Bu canlılık testi çok yönlü ve niceldir ve yaygın olarak kullanılan birkaç proliferasyon ve sitotoksisite testleri için geleneksel tekniklere göre önemli bir ilerleme sağlamıştır (Mosmann, 1983). Her olukta 10^4 hücre olacak şekilde, 200µl hücre süspansiyonu 96 oluklu plakaya ekildi. Hücreler 24 saat boyunca tabana yapışması için inkübasyona bırakıldı. Doz verme işlemi öncesinde hücre ortamı 96 oluklu plakadan uzaklaştırılarak dPBS ile yıkama yapıldı. Doz verme işlemi için hücre ortamı kullanarak hazırlanmış olan 10µg/ml stok klomifen sitrat çözeltisinden 5µg/ml, 2,5µg/ml, 1,25µg/ml, 0,62µg/ml, 0,31µg/ml, 0,15µg/ml, 0,07µg/ml dozları seri seyretmeler halinde hazırlanarak uygulanmıştır. 96 oluklu plakada toplam hacim 200µl olacak şekilde dozlama başlatılmıştır. 48 ve 72 saatlik deney süreleri boyunca 28 inkübasyona bırakılmıştır.

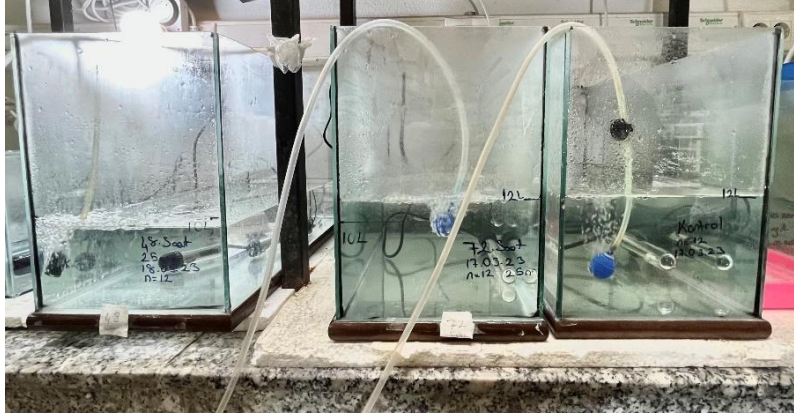
Madde uygulama süresi sonlandığında KS uzaklaştırıldı, 96 oluklu plaka 50µL dPBS ile yıkandı. MTT çözeltisi 1mg tartılarak 5ml dPBS içinde çözdürülerek hazırlandı ve 0.22µm por genişliği olan filtreden geçirildi. Her kuyu içinde MTT miktarı toplam hacmin yüzde on olacak şekilde 100µL hücre ortamı eklendi. 4 saat 28 'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda MTT-hücre ortamı karışımı 96oluklu plakadan uzaklaştırılarak 10µL DMSO eklenerek 15 dakika boyunca çalkalayıcıda bekletildi. Süre sonunda ELISA Multi Reader ile 570-640nm ile ölçümleri alındı.

2.2.2. *in vivo* deney düzeneği

Klomifen sitratın zebra balıkları üzerinde saatte %50 mortaliteye (LD50) neden olan dozunu hesaplayabilmek için 5,9 mg/L klomifen sitrat stok çözeltisinden %100, %50, %40, %35, %30, %25 olacak şekilde seyreltilmiş farklı dozlar seçilmiştir. Balıklar her akvaryumda dört adet balık olacak şekilde ana tanktan rastgele alınmıştır ve uygulama süresince balıklara yem verilmemiştir.

LD50 değerinin belirlenmesini takiben *in vivo* deney düzeneği oluşturulmuştur. Yine aynı şekilde bekleme tankındaki balıklar gruplara rastgele bir şekilde ve her akvaryumda 10 balık bulunması gözetilerek dağıtılmıştır.

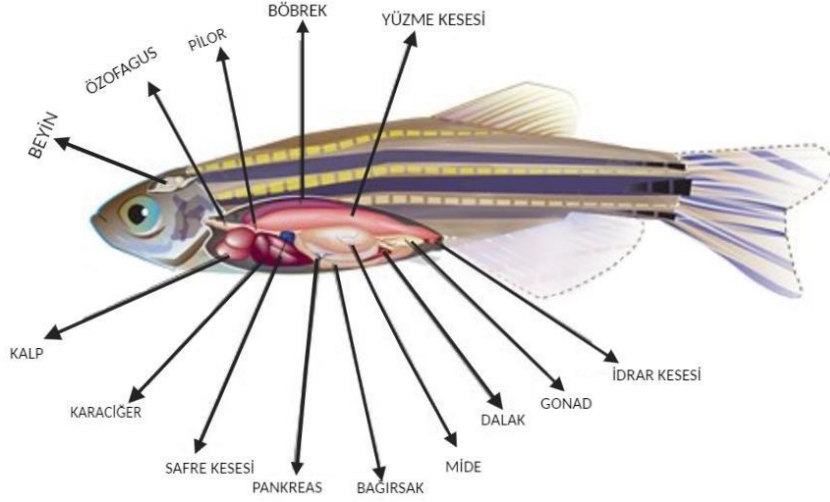
Uygulama dozu subletal dozu olacak şekilde; 1,47 mg/L olarak belirlenmiştir. Aynı koşullar altında iki akvaryum 48 ve 72. saat olarak belirlenmiştir. Uygulama yapılmayan akvaryumdaki balıklar kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Maruziyet süreci başladıktan sonra balıklara yem verilmemiştir. Uygulama 48. ve 72. saatte sonlandırılmıştır. Balıkların diseksiyonu öncesi soğuk şok uygulaması yapılmıştır. Diseksiyon işlemiyle balıklardan karaciğer, gonad ve beyin dokuları alınmıştır.



Şekil 2.2. Kломifen sitrat deney düzeneği



Şekil 2.3. Zebra balığı (*Danio rerio*) diseksiyon işleminin



Şekil 2.4. Zebra balığı (*Danio rerio*) anatomisi (<https://www.biorender.com> ile yapılmıştır.)

2.2.1.1. Doku homojenatlarının hazırlanması

Klomifen sitrata maruz bırakılan zebra balıklarında oluşan oksidatif stresin spektrofotometrik ölçümü için kullanılan hedef dokular doku parçalayıcı kullanılarak homojenize edilmiştir. Doku homojenatının hazırlanışı Tablo 2.5.'te gösterilmiştir. Kullanılan doku homojenatının pH'ı 8 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Tablo 2.5. Doku homojenatın hazırlanışı

Kimyasal İsmi	Kimyasal Miktarı
Distile su	1000 ml
Na ₂ HPO ₄	3,56 g
Sükroz	82,5 g

Homojenizasyon işleminin ardından 10000 rpm'e ayarlanmış soğutmalı santrifüjde 30 dakika +4 °C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı dikkatli bir şekilde farklı bir tüpe alınmış ve deneyler gerçekleşene kadar - 20°C'de saklanmıştır. Doku homojenatları kullanılacakları zaman +4°C'de tutulmuşlardır.

2.2.1.2. Aebi yöntemi ile dokularda katalaz aktivitesi (CAT) tayini

Aebi tarafından açıklanan kantitatif spektrofotometrik bu yöntem, hidrojen peroksit çözeltisinin ultraviyole absorbansındaki azalmayı gözlemleyerek katalaz tarafından katalize edilen hidrojen peroksitin parçalanmasını takip eder. Bu parçalanmanın takibi, deney çözeltisinde dokunun 1dakika bekletilmesinden sonra 240 nm’de absorbansın gözlemlenmesiyle yapılabilir (Aebi, 1974).

Deney tamponları:

Fosfat tamponu (50 mM, pH=7,0) (a+b çözeltisi):

a) 0,681g KH_2PO_4 tartılır, dH_2O ile 100 ml’ye tamamlanır.

b) 1,34 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılır, dH_2O ile 150 ml’ye tamamlanır.

pH 7 olacak şekilde a ve b çözeltisi birbiri ile karıştırılır.

Hidrojen peroksit çözeltisi (H_2O_2) (30 mM) + Fosfat tamponu: 0,31 ml H_2O_2 çözeltisinden alınır ve dH_2O ile 100 ml’ye tamamlanır.

Hidrojen peroksit çözeltisinin her deney öncesinde mutlaka taze olarak hazırlanması gerektiği unutulmamalıdır.

Tablo 2.6. Aebi yöntemi ile dokularda katalaz aktivitesi (CAT) tayini

Doku homejenatı deneyden önce 1/10 oranında seyreltilmeli 5dakika içinde çalışılmalıdır.		
	Örnek	Kör
Seyreltilmiş doku homejenatı	400 μl	400 μl
Fosfat tamponu	-	200 μl
H_2O_2 çözeltisi + Fosfat tamponu	200 μl	-

Her örnek için ayrı kör hazırlanacaktır. Deneyde fosfat tamponu ve H_2O_2 çözeltisi + Fosfat tamponu içerisine doku homejenatı eklendikten sonra 1dakika beklenir ve daha sonra 240nm’de köre karşı absorbansı kaydedilir.

Elde edilen değerler U/mg protein dk. olarak

2.2.1.3. Ledwozyw yöntemi ile dokularda lipid peroksidasyonu (MDA) tayini

Malondialdehit (MDA) serbest radikaller tarafından üretilen lipid peroksidasyonunun önemli bir ürünüdür ve hücre zarına zarar vermektedir. Ayrıca lipid metabolizmasının karaciğerdeki yağ asidi oksidasyonu ile ilişkili genler ile etkileşime girerek yapısında bozulma yapar (Lv ve ark., 2018).

Malondialdehit ile tiyobarbitirik asit (TBA) pembe renk ile sonuçlanan bir reaksiyon oluştururlar. Bu reaksiyonun spektrofotometrik ölçümü lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesini sağlayacaktır (Ledwozyw ve ark., 1986).

Deney sırasında kullanılan çözeltilerin hazırlanışı aşağıda verilmiştir:

- NaOH (1 M) : 40 g NaOH, toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.
- TBA tamponu (0,047 M) : 0,5 g TBA, 6 ml 1 M'lık NaOH içerisinde çözdürülür. Toplam hacim distile su ile 75 ml'ye tamamlanır.
- Triklorasetik asit (TCA) tamponu: 200 ml TCA, 50 ml HCl (%37 'lik) karıştırılır. Toplam hacim distile su ile 1000 ml olacak şekilde hazırlanır
- n-bütanol: Stok çözeltilerden kullanılır.

İki adet tüp alınarak üzerilerine kör ve numune olarak işaretleme yapıldı.

Deneyin yapılışı Tablo 2.7.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.7. Dokularda lipid peroksidasyonu tayini (MDA)

	Numune	Kör
Doku homojenatı	0.25 ml	-
Distile su	-	0.25 ml
TCA	1.25 ml	1.25 ml
Vortekslenir, oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilir.		
TBA	0.75ml	0.75ml
Vortekslenir daha sonra 30ddakika boyunca kaynar su banyosunda inkübasyona bırakılır.		
n-Bütanol	2 ml	2 ml
Örnekler vortekslenir. 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Bütanol fazı alınıp 532 nm'de köre karşı belirlenen absorbanslar kaydedilir.		



Şekil 2.5. Dokularda MDA seviyesi tayini

2.2.1.4. Bradford yöntemi ile dokularda protein seviyesi tayini

ROT seviyelerini yüksek doğruluk ve hassasiyetle doğrudan ölçmek zordur, çünkü bu reaktif türler kısa ömürlüdür ve redoks durum düzenleyicileri ile hızlı bir şekilde reaksiyona girmektedir. Bu nedenle, hücrelerin lipidlerinde, proteinlerinde ve nükleik asitlerinde bu reaktif türlerinin meydana getirdiği oksidatif hasar; ROT'un dolaylı ölçümü ile incelenebilmektedir.

Bradford yöntemi; Coomassie Brilliant Blue boyası ile proteinler arasında oluşan bağlanmalardan meydana gelen çözeltinin 595 nm'deki ölçümüdür (Bradford, 1976).

Deney sırasında kullanılan tamponlar:

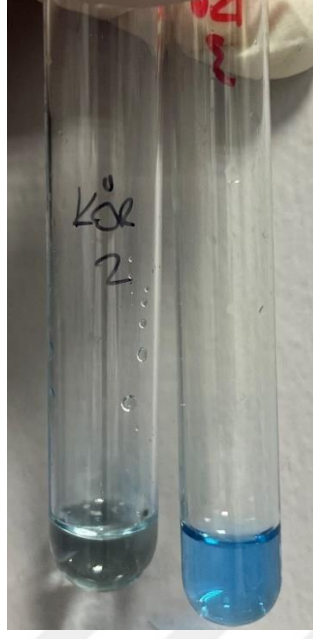
Deneylere başlamadan önce protein çalışma standart çözeltileri %20, 40, 60 ve 80 µg albumin içerecek şekilde distile suyla seyreltilir. Seyreltmeler sırasında %10 mg'luk albümin stok çözeltisi kullanılır.

Coomassie Brilliant Blue (Bradford reaktifi): Stok çözelti içerisinden alınır.

Deneyin yapılışı: Örnekler ile çalışılmadan önce S1, S2, S3, S4 ve kör (K) olarak işaretlenen tüplerdeki ölçümlerle protein standart grafiği hazırlanır. Daha sonrasında örneklerle yapılan ölçüm sonuçları bu grafikteki miktara göre hesaplanır. İçerisine örnek eklenecek tüpler örnek olarak, örnek eklenmeyecek tüpler de kör tüpler olarak işaretlenir. Deneyin yapılışı Tablo 2.8.'da gösterilmiştir.

Tablo 2.8. Dokularda protein tayini

	S1	S2	S3	S4	Örnek	Kör
%10'luk Albümin Çözeltisi	20µl	40µl	60µl	80µl	-	-
Doku Homojenatı	-	-	-	-	25µl	
Distile Su	780µl	760µl	740µl	720µl	775µl	800µl
Vorteks ile Karıştır.						
Coomassie Brilliant Blue	200µl	200µl	200µl	200µl	200µl	200µl
Vorteks ile Karıştır. Tüpler 15dakika oda sıcaklığında beklet.						
Süre sonunda 595nm'de köre karşı absorbanslar spektrofotometre ile kaydedilir.						



Şekil 2.6. Bradford yöntemine göre dokularda protein seviyesi tayini

2.2.1.4. Beutler yöntemi ile dokularda indirgenmiş glutatyon (GSH) tayini

GSH (γ - L- glutamil-L-sisteinil-glisin), tüm hücrelerin sitoplazmasında bulunan glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinin oluşturduğu suda çözünebilir bir tripeptittir (Labarrere & Kassab, 2022). GSH ayrıca, zenobiyotiklerin detoksifikasyonunda hayati önem taşıyan redoks sinyalinin önemli bir belirleyicisidir ve hücre çoğalmasını, apoptozu, bağışıklık fonksiyonunu ve fibrojenezini modüle eder (Lu, 2013). Ellman ayırıcı DTNB'nin sülfidril grupları içeren bileşiklerle reaksiyona girerek karışık bir disülfid (GS-TNB) ve 2-nitro-5-tiobenzoik asit (TNB) oluşturma kabiliyetine dayanmaktadır (Beutler, 1975). Yöntem spektrofotometrik olarak değerlendirilir.

Sodyum sitrat çözeltisi ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$): 10 g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, bir miktar dH_2O su içerisinde çözülür ve 1000 ml'ye tamamlanır.

Ellman reaktifi: 0,4 g DTNB, bir miktar $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ çözeltisinde çözülür ve 1000 ml'ye tamamlanır.

Proteinsizleştirme tamponu: 16,7 g metafosforik asit (HPO_3), 2g EDTA-Na tuzu ve 300 g sodyum klorür dH_2O 'da çözülür ve tümü karıştırılarak 1000 ml'ye tamamlanır.

Na_2HPO_4 çözeltisi (0,3 M): 42,6 gram Na_2HPO_4 , dH_2O 'da çözülür. Üzeri 1000ml'ye kadar tamamlanır.

Deneyin yapılışı: İki adet tüp alınır; numune ve kör olarak işaretlenir. Deneyin yapılışı Tablo 2.9.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.9. Beutler yöntemi ile dokularda indirgenmiş glutatyon (GSH) tayini

Deneye başlamadan önce doku homojenatı proteinsizleştirme çözeltisi ile muamele edilir

Doku homojenatı	100 µl
<u>Proteinsizleştirme</u> çözeltisi	150 µl

Vortekslenir

5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.

4000 rpm'de 10dakika santrifüj edilir süpernatant ayrılır.

	Numune	Kör
Distile su	-	200 µl
Süpernatant	200 µl	-
Na ₂ HPO ₄	800 µl	800 µl
<u>Ellman</u> ayıracı	100 µl	100 µl

Vortekslenir

5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.

Spektrofotometrede 412nm'de köre karşı ölçümler kaydedilir.

3. BULGULAR

Seçici Östrojen reseptör modülatörü (SERM) grubundan klomifen sitrat (KS) etken maddesinin literatür taramalarındaki dozları baz alınarak yeni LC50 dozu belirlenmiş ve zebra balığına uygulanarak karaciğer, beyin ve gonad dokularında oksidatif stres düzeylerindeki değişimler araştırılmıştır. Bu tez çalışmasında rastgele seçilen zebra balıkları; 2,5µmol klomifen sitrat ile 48 ve 72 saat boyunca muamele edilmiştir. Uygulama yapılmamış kontrol grubu ve deney grupları olmak üzere toplamda 3 akvaryum kullanılmıştır. Biyokimyasal olarak; katalaz, total protein, malondialdehit ve glutasyon seviyeleri belirlenmiştir. İstatistik analizler Graphpad Pad version 8.0.2 ile One-way ANOVA ile yapılmıştır.

3.1. Bulgular

3.1.1. Biyokimyasal bulgular

İnfertilite tedavilerinde oldukça sık kullanıma rastlanılan hormon stimülasyon yöntemlerinden olan seçici östrojen modülatörü grubunda yer alan klomifen sitrat 2,5µm olarak uygulanmış; 48 ve 72 saat boyunca yeniden uygulama yapılmamıştır. Bu tez çalışmasında; ilaç analizlerinde sıkça tercih edilen zebra balığı model organizma olarak kullanılmıştır. Oksidatif stres parametrelerinde biyokimyasal açıdan katalaz (CAT), glutasyon (GSH), malondialdehid (MDA) ve total protein (TP) düzeyleri analiz edilerek değerlendirilmiştir.

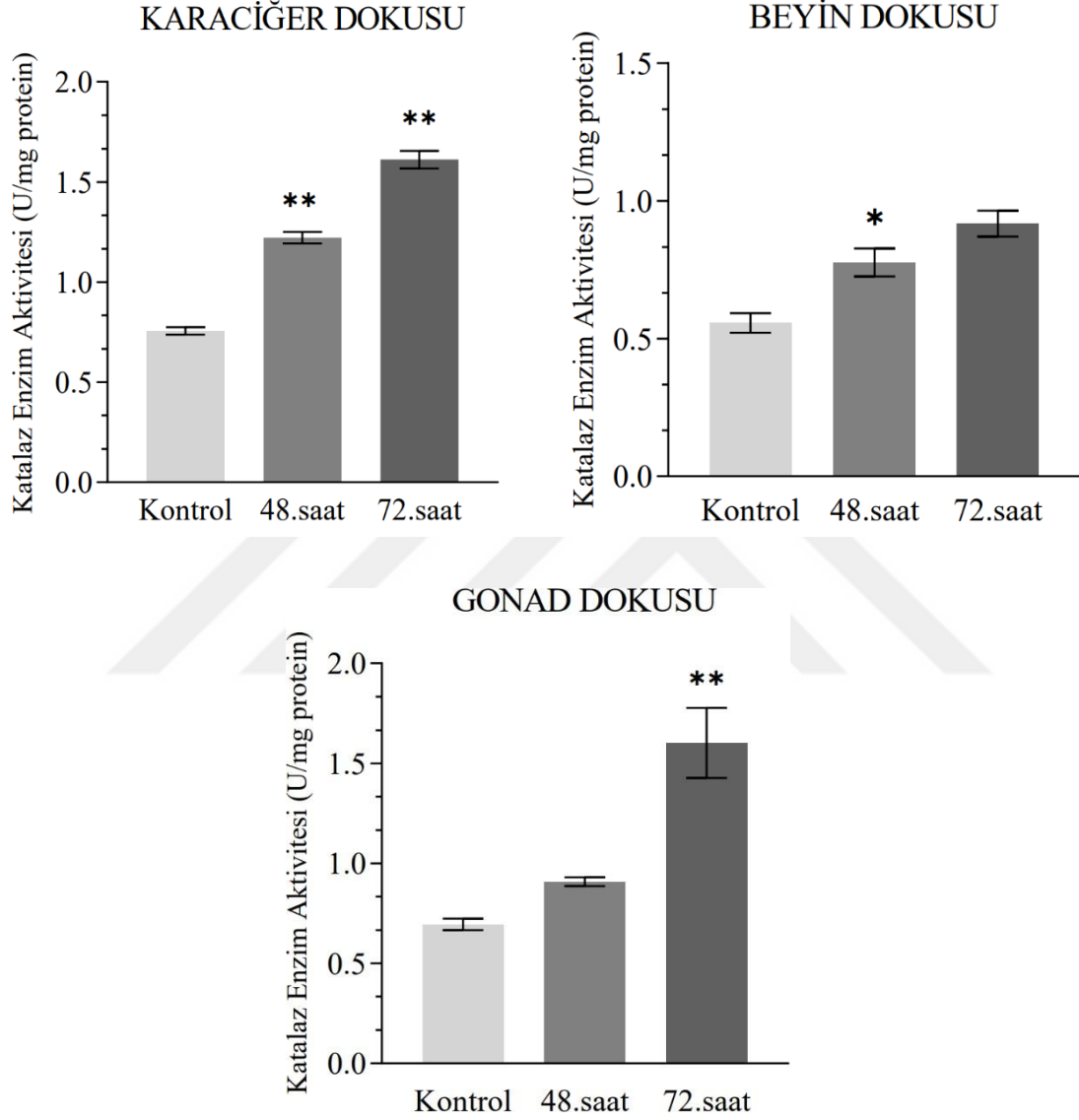
3.1.1.1 Aebi yöntemi ile dokularda katalaz enzim aktivitesi (CAT) tayini Tablo

3.1. Aebi yöntemi ile dokularda katalaz aktivitesi (CAT) tayini bulguları

Dokular	Kontrol	48.saat	72.saat
Karaciğer	0,7561±0,0189	1,222±0,0292**	1,611±0,0444**
Beyin	0,5571±0,0354	0,7766±0,0511*	0,9172±0,0469**
Gonad	0,6947±0,0289	0,9084±0,0213	1,602±0,176**

Karaciğer dokusunda yapılan incelemelerde 48. ve 72. saatlerde yapılan klomifen sitrat uygulamalarının sonucunda, katalaz enzim aktivitesinde kontrole göre artış olduğu saptanmıştır ($p<0,01$). 48. ve 72. saatlerde yapılan klomifen sitrat uygulamalarının

sonucunda beyin dokusunda kontrole göre artış gözlenirken ($p<0,01$); 48. Saatten 72.saate istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış gözlenmiştir. Zebra balığı gonad dokusu incelemesinde ise 48.saatte kontrole göre anlamlı olmayan bir artış saptanırken, kontrole göre 72.saatte anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0,01$).



Şekil 3.1. Aebi yöntemi ile dokularda katalaz aktivitesi (CAT) tayini grafikleri. Kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı sonuç verenler işaretlenmiştir (“*” ile işaretli, : $p<0,01$; ($p<0,05$) “**”).

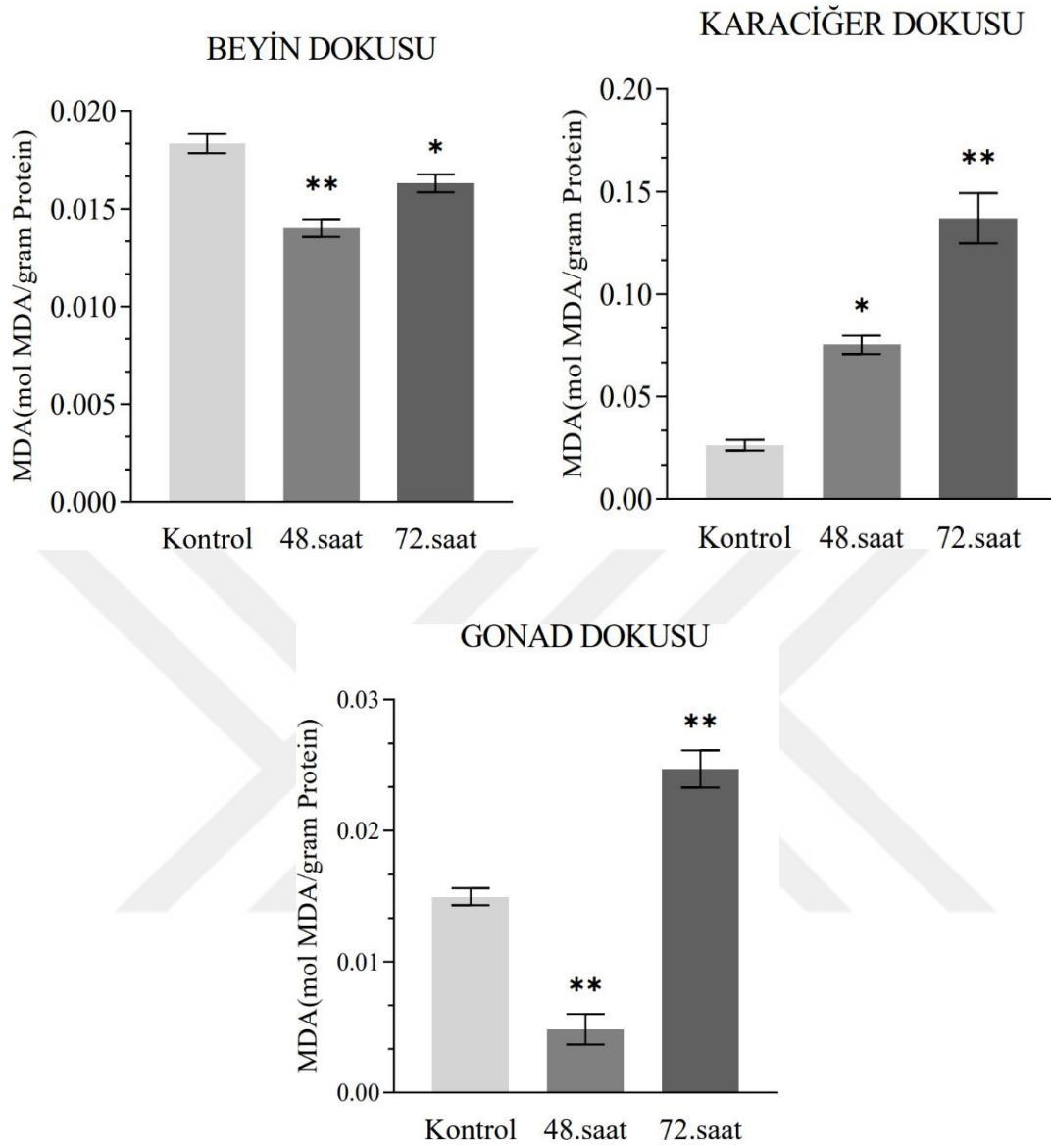
3.1.1.2. Ledwozyw yöntemi ile dokularda malondialdehid (MDA) seviyesi tayini

Klomifen sitrat etken maddesinin zebra balığında (*Danio rerio*) beyin, karaciğer ve gonad dokularındaki 48 ve 72 saat uygulanmaları sonrasında lipid peroksidasyonunun belirteçlerinden olan MDA seviyesinin üzerine etkisi belirlenerek Şekil 3.2' de gösterilmiştir. Sonuçlar (\pm standart hata) Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Ledwozyw yöntemi ile dokularda MDA seviyesi tayini bulguları

Dokular	Kontrol	48.saat	72.saat
Karaciğer	0,262 \pm 0,0026	0,752 \pm 0,0045*	0,137 \pm 0,012**
Beyin	0,0183 \pm 0,0004	0,014 \pm 0,0004**	0,016 \pm 0,00045*
Gonad	0,014 \pm 0,0006	0,0048 \pm 0,011**	0,024 \pm 0,0014**

Beyin dokusuna 48 saat ve 72 saat klomifen sitrat uygulanmasından sonra, MDA seviyesinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında değişimler gözlenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında klomifen sitratın 48.saat ($p<0,01$) ve 72.saat ($p<0,05$) uygulanması sonrasında gruplarda azalışı istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Karaciğerde klomifen sitratın 48.saat uygulamasında sonrasında MDA seviyesinin artış gösterdiği görülmüştür ($p<0,05$). Ayrıca karaciğerde klomifen sitratın 4.saat uygulamasında sonrasında MDA seviyesinin artış gösterdiği görülmüştür ($p<0,01$). Gonad dokusu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında klomifen sitratın 48.saat uygulamasında anlamlı bir azalış varken ($p<0,01$), 72.saat uygulanması sonrasında kontrol grubuna göre anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır ($p<0,01$).



Şekil 3.2. Ledwozyw yöntemi ile dokularda lipid peroksidasyonu (MDA) tayini grafikleri. Kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı sonuç verenler işaretlenmiştir (“*” ile işaretli,; $p < 0,01$; ($p < 0,05$) “**”).

3.1.1.3. Bradford yöntemi ile dokularda protein tayini

Reaktif oksijen türlerini ölçmede kullanılan yöntemlerden biri dokularda total protein tayinidir. Bu tez çalışmasında rastgele seçilen zebra balıkları; 2,5µmol klomifen sitrat ile 48 ve 72 saat boyunca muamele edilmiştir. Uygulama yapılmamış kontrol grubu ve deney grupları olmak üzere toplamda 3 akvaryum kullanılmıştır. Deney sonunda disekte

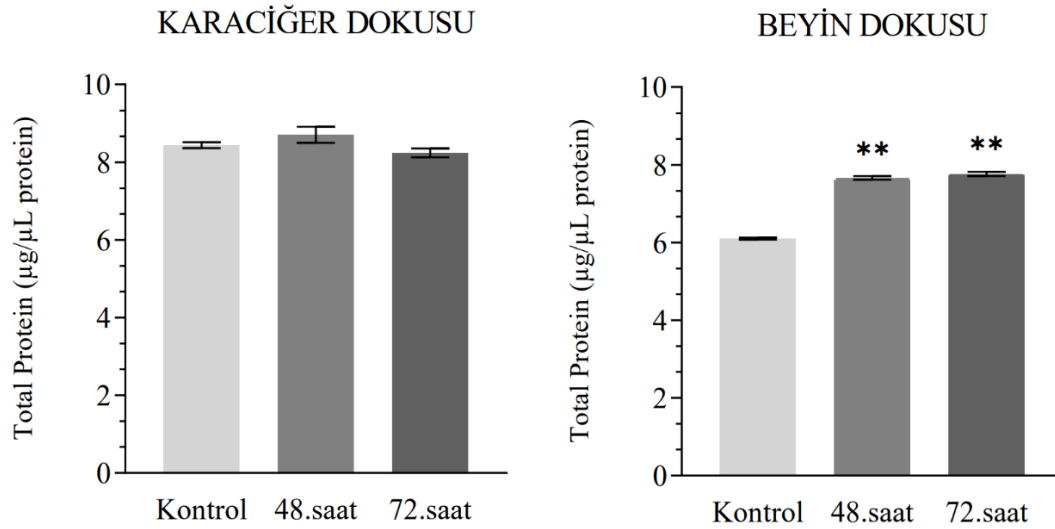
edilerek, Bradford yöntemine (Bradford, 1976) göre spektrofotometrik ölçümleri alınmıştır.

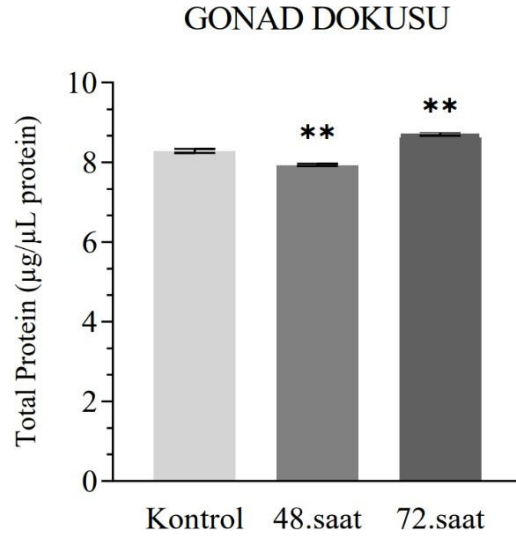
Sonuçlar (\pm standart hata) Tablo 3.3'te gösterilmiştir.

Tablo 3.3. Bradford yöntemi ile dokularda protein tayini bulguları

Dokular	Kontrol	48.saat	72.saat
Karaciğer	8,438 \pm 0,074	8,705 \pm 0,207	8,239 \pm 0,117
Beyin	6,335 \pm 0,2382	7,665 \pm 0,476**	7,723 \pm 0,0476**
Gonad	8,234 \pm 0,0529	7,932 \pm 0,0308*	8,653 \pm 0,0745**

Klomifen sitratın karaciğer uygulamayından 48.saatinde kontrole göre anlamlı olmayan bir artış gözlenmiştir. Yine karaciğer dokusunun 72.saat uygulaması da kontrole göre anlamlı olmayan bir azalış gözlenmiştir. Beyin dokusunun 48. Ve 72. Saat uygulamaları sonucunda her iki saatte de kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p < 0,01$). Ancak 48 ve 72. Saat aralığı birbiri ile karşılaştırıldığında anlamlı olmayan bir azalış gözlenmiştir. Gonad dokusunun 48. Saat uygulamasında kontrole göre anlamlı bir azalma ($p < 0,01$) söz konusuysen; 72. saat uygulamaları sonucunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış ($p < 0,01$) gözlenmiştir. Ancak 48 ve 72. Saat aralığı birbiri ile karşılaştırıldığında anlamlı olmayan bir değişim gözlenmiştir.





Şekil 3.3. Bradford yöntemi ile dokularda protein tayini grafikleri. Kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı sonuç verenler işaretlenmiştir (“**” ile işaretli,; $p < 0,01$; ($p < 0,05$) “*”).

3.1.1.4. Dokularda indirgenmiş glutatyon seviyesi

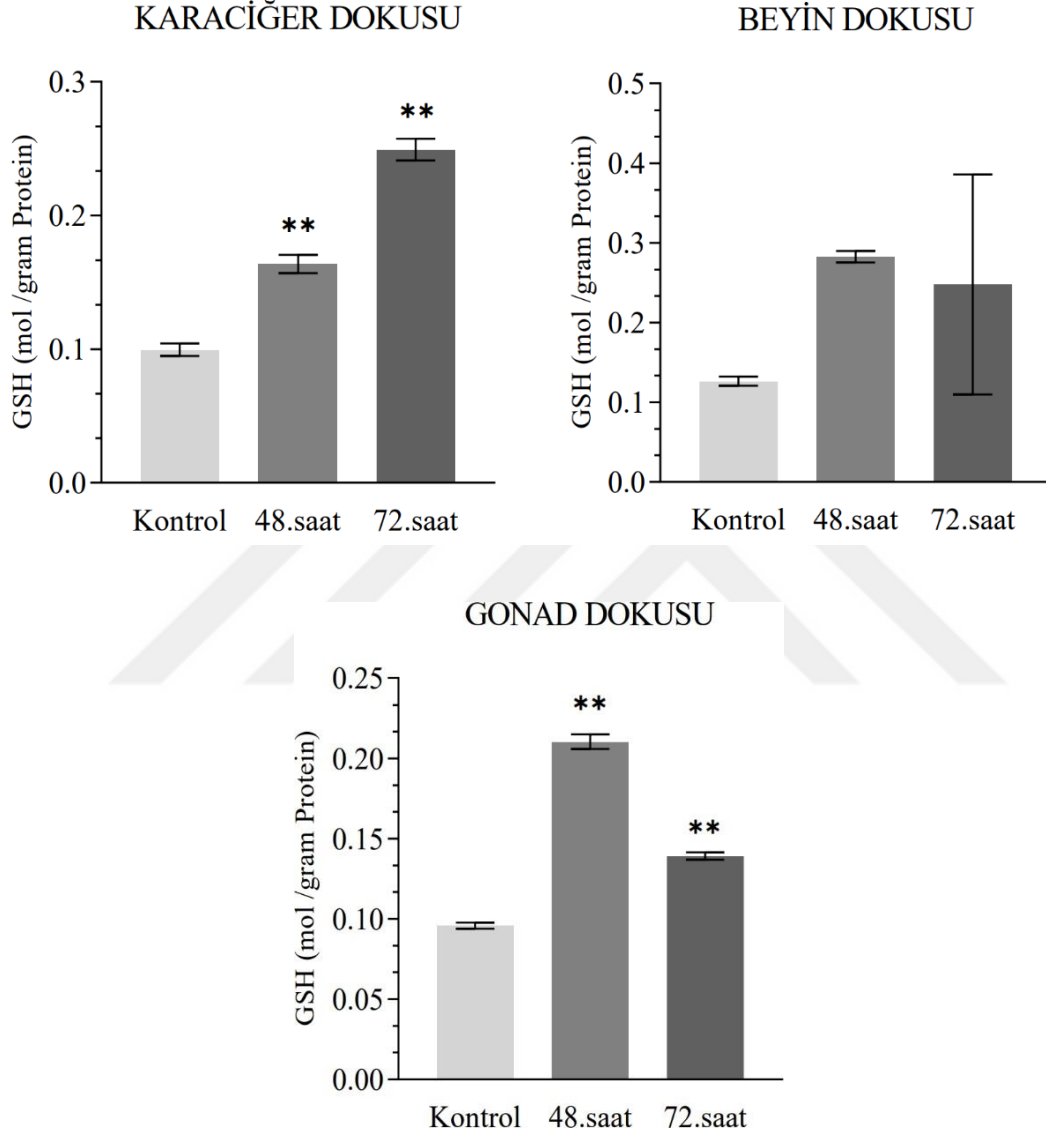
Klomifen sitrat maddesinin zebra balığında (*Danio rerio*) karaciğer, beyin ve gonad dokularındaki 48 ve 72saatlik uygulanmaları sonrasında GSH seviyesi üzerine etkisi belirlenerek şekil 3.4. te gösterilmiştir.

Tablo 3.4. Beutler yöntemine göre indirgenmiş glutatyon seviyesi tayini bulguları.

Dokular	Kontrol	48.saat	72.saat
Karaciğer	0,099 ±0,0046	0,163±0,0068**	0,249±0,008**
Beyin	0,126±0,0055	0,267±0,011	0,247±0,138
Gonad	0,095±0,001	0,2104±0,004**	0,004±0,002**

Karaciğer dokusunda 48 ve 72 saat klomifen sitrat uygulanmasından sonra GSH seviyesinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında değişimler gözlenmiştir. Bulgular kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında klomifen sitratın 48 ve 72 saat uygulanması sonrasında anlamlı bir şekilde GSH seviyesinde artış olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,01$). Beyin dokusuna uygulanan klomifen sitrat etken maddesinin 48 ve 72. Saat sonuçlarında GSH seviyelerinde değişimler gözlemlenmiş olsa da kontrol grubu ile

karşılaştırıldığında anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Gonad dokusunda 48 saat uygulaması yapılmış klomifen sitrat maddesi artışa ($p<0,01$) sebep olmuştur. Gonad dokusunda 72 saat uygulaması yapılmış klomifen sitrat maddesi GSH seviyesinde artışa sebep olmuştur ($p<0,01$) ancak artış 48. saate göre daha azdır.



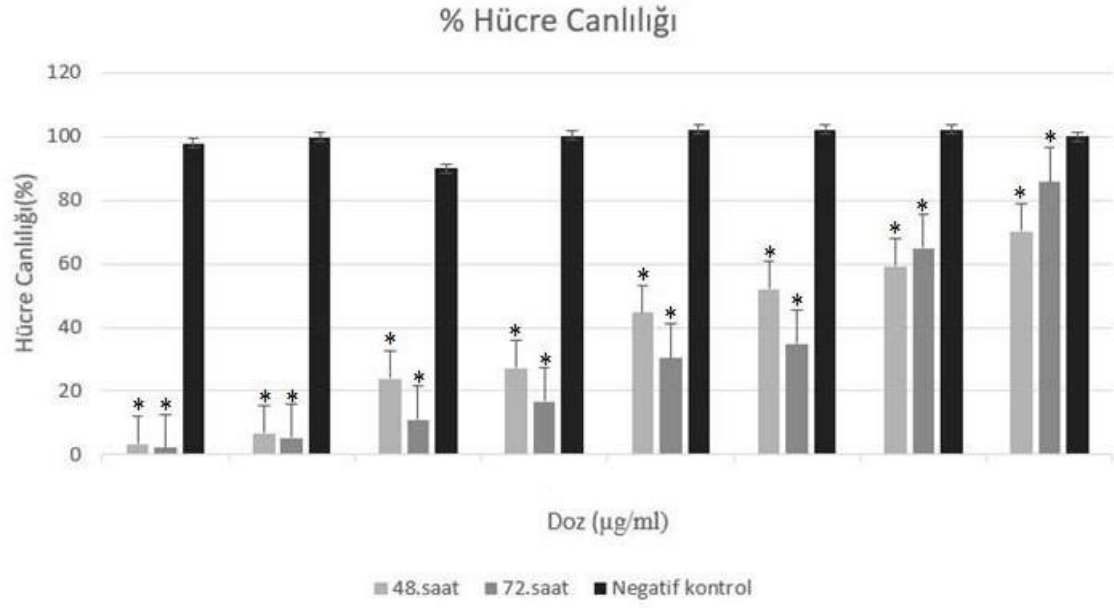
Şekil 3.4. Beutler yöntemi ile dokularda indirgenmiş glutatyon (GSH) tayini grafikleri. Kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı sonuç verenler işaretlenmiştir (“*” ile işaretli,; $p<0,01$; ($p<0,05$) “**”).

3.1.2 *İn vitro* sitotoksosite bulguları

ZFL CRL-2643 hücre proliferasyonunun değerlendirilmesinde; klomifen sitrat maddesinin 48 ve 72 saatlik uygulamasında Tek yönlü ANOVA ile gruplar arasında anlamlı fark bulundu [F= 119.382 p< 0,001]. Post Hoc yapılan Tukey testi sayesinde, Klomifen sitrat'ın 10 µg/ml dozundan seri seyreltmeler halinde elde edilen 0,07 µg/ml doza kadar tüm gruplarda doz miktarının azalmasına bağlı olarak hücre sayısı anlamlı olarak artmıştır. 48. ve 72. saat ölçümleri karşılaştırıldığında hücre canlılığında doza bağlı anlamlı bir azalma meydana gelmiştir. Kontrol grubuna göre 10 µg/ml grubu hücre canlılığını % 96 oranında anlamlı olarak (p<0,001) azaltmıştır.

Tablo 3.5. MTT testi bulguları.

Konsantrasyon	48. Saat	72. Saat
10 µg/ml	3,5108365±5,035*	2,2413883±3,549*
5 µg/ml	6,6784348±5,035*	5,1970533±3,549*
2,5 µg/ml	23,9261548±4,625*	10,9698347±3,26*
1,25 µg/ml	27,2629205±5,035*	16,6502956±3,549*
0,625 µg/ml	44,5719329±5,035*	30,4433627±3,549*
0,3125 µg/ml	52,0251054±5,035*	34,8152793±3,549*
0,1562 µg/ml	59,1350397±5,035*	64,8645427±3,549*
0,0781 µg/ml	70,1824066±4,625*	85,7389235±3,260*



Şekil 3.5. Klomifen sitrat dozlarına göre % hücre canlılığı grafiği.

4. TARTIŞMA

İnfertilite, dünya çapında üreme çağındaki milyonlarca insanı ve aileleri etkilemektedir (Zegers-Hochschild ve ark., 2017). İnsanlarda infertilite tedavisinde en sık kullanılan ilaçlar hormonal olmayanlardır. Klomifen sitrat yaygın olarak kullanılan sentetik yapıda östrojenlerdir. Üreme ilaçları, insanlar yararlarının dışında birçok farklı canlıyı etkilemektedir. Üreme ilaçları atık olarak yüzey suyunun yanı sıra yeraltı suyunun da kirlenmesine yol açar. Yüzey suyu ayrıca balıkların ve çiftlik hayvanlarının dışkılarında gelen bu tür ilaçlarla kirlenir (Kjaer ve ark., 2007). Bunlara ek olarak, bu ilaçların balıklar üzerindeki olumsuz etkileri arasında erkek balıkların cinsiyet değiştirmesi yer almaktadır (Tyler ve ark., 2005; D. D. M. Costa ve ark., 2010; Rankouhi ve ark., 2004). Bu veriler, bu ilaçlardan kaynaklanan bu görünmez kirliliğin etkisinin bilimsel olarak tasarlanmış analitik ve biyolojik çalışmalar yoluyla değerlendirilmesi için ciddi bir ihtiyaç olduğunu ileri sürmektedir (Kaur ve ark., 2021).

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidan, bu olaya da antioksidan savunma denir (Matés ve ark., 1999). Antioksidanlar yetersiz olup, denge bozulur ise oksidan moleküller yapı elemanları olan karbonhidrat, protein, lipid, nükleik asitler ve yararlı enzimlerin yapısını bozarak olumsuz sonuçlara yol açmaktadırlar. Bu olumsuzlukların bütünü oksidatif stres olarak nitelendirilir (Gülsüm SinemKasapçopur Özel, 2014).

Literatürde, tedavilerde sık tercih edilen seçici östrojen reseptör modülatör grubuna dâhil maddeler ve bu maddelerin oksidatif stres ile ilişkisini gösteren çalışmalar incelendiğinde çeşitli sonuçların elde edildiği görülmüştür. 2023 yılında Oluwadare ve arkadaşları klomifen sitrat ve karvediyol ile tedavi edilen sıçanların, tekli tedavi gruplarına kıyasla önemli bir antioksidatif aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. (Oluwadare ve ark., 2023). 2021 yılında Azouz ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kırk sekiz dişi sıçan rastgele sekiz bireyden oluşan altı gruba ayrılmıştır. Oluşturulan deney gruplarından birine ovülasyon indüksiyon ilacı olarak 1 mg/kg dozunda %0,5 karboksilmetil içinde çözdürülmüş klomifen sitrat verilmiş ve ovarium dokusunda MDA seviyeleri kontrole göre anlamı olarak artmıştır. Ovaryum dokusunun GSH seviyeleri kontrole göre azalmıştır. Hepatik doku incelendiğinde MDA seviyesi kontrole

göre anlamlı değişim gözlenmemiştir (Azouz ve ark., 2021). Őu anda MDA, SOD ve GSH-Px, vücudun oksidatif stres tepkisini değerlendirmek için ana göstergelerdir. Bu üç gösterge arasında MDA, oksidatif stres cevabını değerlendirmek için biyokimyasal bir belirteç olmasının yanı sıra lipid peroksidasyon hasarının da önemli bir ürünüdür; ve daha yüksek MDA seviyeleri, daha güçlü oksidatif stres tepkilerini gösterir (Y. Zhang ve ark., 2023). 2019 yılında Wahab ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada yirmi erkek Wistar sıçanına 35 günlük klomifen sitrat uygulanmış ve sonrasında yapılan testlerde gonad dokusunda MDA ve katalaz enzim aktivitesi seviyelerinde kontrole göre anlamlı olmayan azalma görülmüştür (Wahab ve ark., 2019).

Klomifen sitrat, maymun (Marut ve Hodgen, 1982) yumurtalıklarında estradiol 17 β seviyesini azaltan granüloza hücre apoptozunu indükler. Klomifen sitrat ile indüklenen hipooöstrojenik koşullar ROS oluşumunu indükleyebilir (Chaube ve ark., 2014, 2017)

2015 yılında Akomolafe ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *Tetracarpidium conophorum* ekstratı ve klomifen sitrat maddesi yetişkin erkek sıçanlara ekstrakt ve doğurganlık ilacı ile tedavi edilen gruplarla karşılaştırıldığında, serum fizyolojik tedavi edilen grupta (kontrol), CAT düzeyinde azalma gözlendi. Ekstrakt ve klomifen sitrat uygulanmış sıçanlarda testis dokusu ve yardımcı üreme bezlerinde MDA seviyeleri kontrole kıyasla anlamlı olarak azalmıştır. Tedavi edilmeyen sıçanlardaki bu azalma, kısmen enzimatik proteinlerin aşırı ROS üretimi ile oksidatif modifikasyonuna bağlı olabilir veya reaktif oksijen saldırılarına kronik maruz kalma nedeniyle sentez hızlarındaki azalmadan kaynaklanabilir (Sivarajve ark., 2011; Akomolafe ve ark., 2015). Ekstrakt ve fertilite ilacıyla tedavi edilen gruplarda antioksidan enzimlerin durumunda gözlenen artış, ekstrakt ve fertilite ilacının kodlayan genin promotör bölgesindeki güçlendirici bölgedeki antioksidan tepki elementleri üzerinde etkili olan antioksidan enzim sentezinin artmasından kaynaklanıyor olabilir (Ayoola ve ark., 2011). 2011 yılında süperovulasyon indüksiyon protokolü uygulanmış ratlarda yumurtalığıdaki hidrojen peroksit konsantrasyonu kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde artırmıştır. Öte yandan bu çalışmada melatonin ve klomifen sitratın birlikte uygulanması yumurtalığıdaki hidrojen peroksit oluşumunu arttırmıştır. Bu çalışmanın sonuçları klomifen sitratın ovaryumdaki katalaz aktivitesini azaltarak hidrojen peroksit konsantrasyonunu artırdığını ortaya koymaktadır (Tripathi ve ark., 2011). Bizim çalışmamızın aksine; klomifen sitrat uygulanmış ratlarda katalaz aktivitesinde maksimum azalma

gözlenmiştir. Klomifen sitrat, ile daha önceki yapılmış çalışmalarda; kanser hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimine ve apoptoza (Hayon ve ark., 1999), oositlerin mayotik olgunlaşması sırasında bozulmalara (London ve ark., 2000), granüloza hücrelerinde ve oositlerde apoptoza neden olmuştur (Chaube ve ark., 2005).

Al-amoudi tarafından 2016 yılında yapılan bir çalışmada 50 ve 100 mg/kg klomid verilen hayvanların total protein seviyelerinde önemli bir düşüş görülmüştür. Total protein konsantrasyonları için ortalama değerler kontrol, 50 mg/kg ve 100 mg/kg vücut ağırlığı grupları için sırasıyla $71,2 \pm 2,5$, $60,8 \pm 1,5$ ve $54,6 \pm 2,9$ olarak bulunmuştur (Al-amoudi, 2016).

Bir çok araştırmacı bu ilacın farklı iyi yanlarını belirtmiş olmasına rağmen (Ghanem ve ark., 2010; Willets ve ark., 2013) hastalar için testis tümörleri, jinekomasti, cilt alerjik reaksiyonları ve oküler semptomlar gibi birçok yan etkisi bulunmaktadır (Khazaei ve ark., 2020; Momenimovahed ve ark., 2019) ZFL hücrelerine 10µg/ml stok klomifen sitrat çözeltisinden 5µg/ml, 2,5µg/ml, 1,25µg/ml, 0,62µg/ml, 0,31µg/ml, 0,15µg/ml, 0,07µg/ml doz uygulamaları; farklı hücre hatlarında yapılan çalışmalarda olduğu gibi bizim çalışmamızda da canlı hücre sayısını anlamlı olarak azalttığı gözlenmiştir ve hücrelere sitotoksik etkili olduğu belirlenmiştir.

Klomifen sitrat, fare embriyo kültürüne uygulandığında; blastosist aşamasına ulaşan embriyoların yüzdesi, azalan klomifen sitrat konsantrasyonlarında %75, artan klomifen sitrat konsantrasyonunda ise %0 olarak görülmüştür. Aynı çalışmada; embriyo gelişimi üzerinde önemli olumsuz etkilerin kaydedildiği en düşük klomifen sitrat konsantrasyonu 10 ug/ml idi. Bu konsantrasyonda döllenme oranında %25 azalma, zamanında blastosist oluşumunda %33 azalma ve embriyo dejenerasyon hızında %36 artış olmuştur (Schmidt ve ark., 1985). Klomifen sitratın farklı bir hücre hattı olan MCF-7 hücreleri üzerindeki etkisi; iki günlük tedaviden sonra önemli ölçüde azaldı. Klomifen sitratın mikromolar konsantrasyonlarda hem ER-pozitif (MCF-7) hem de ER negatif (BT20) meme kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Elloumi-Mseddi ve ark., 2015) HeLa ve MDA-MB-231 hücrelerinde KS'nin hücre canlılığı üzerindeki etkisini ele almak için yapılan MTT deneyleri sonucunda hücrelerin büyümesini doza ve zamana bağlı bir şekilde inhibe ettiği ortaya konmuştur (Li ve ark., 2019).

Yapılan bir çalışmada klomifenin, reseptöre bağlanma sonrasında hücreye viral girişi baskılayarak SARS-CoV-2 ve varyantlarının enfeksiyonunu *in vitro* inhibe ettiğini ileri sürmüşleridir (Zu ve ark., 2021).

Öte yandan F. Costa ve arkadaşları, 2012 yılında klomifen sitratın, periferik kan mononükleer hücre sitotoksitesitesi üzerindeki etkisini değerlendirmek için deney yapmıştır. Genel olarak, 10 ve 20 µmol/l konsantrasyonlarında klomifen sitrat tedavileri, klomifen sitrat tarafından hücre canlılığı üzerinde olumlu bir etki gösteren mitokondriyal fonksiyonda bir artışa neden olmuştur (F. Costa ve ark., 2012).

Çalışmamızda zebra balığına 48 saat ve 72 saat boyunca literatür incelemesi sonucunda belirlenen LD50 dozu ile 1,47mg/L klomifen sitrat dozu uygulandıktan sonra karaciğer dokusunda; CAT, MDA, GSH aktiviteleri istatistiksel açıdan kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05$, $p<0,01$). Deney gruplarının TP seviyesinin kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda belirli düzeyde artış gözlenmiş ancak istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). GSH seviyesinde görülen az miktardaki artış, lipid peroksidasyonuna karşı, enzimatik olmayan bir antioksidan savunma oluşturabileceğini göstermektedir. Beyin dokusu üzerine olan etkiyi görebilmek için, zebra balıklarına 48 saat ve 72 saat klomifen sitrat dozu uygulanması sonucunda; CAT ve TP seviyelerinde anlamlı bir artış gözlenirken ($p<0,01$, $p<0,05$), MDA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p<0,05$). Beyin dokusunun 48. ve 72. saat sonuçları incelendiğinde GSH düzeyleri kontrole kıyasla artmış ancak istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. Elde edilen sonuçlara göre bir değerlendirme yapıldığında, MDA seviyesinde görülen azalma lipid peroksidasyon sürecini baskıladığını düşündürmektedir. Katalaz enzim aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla artış göstermesi, oksidatif stresin engellendiğini düşündürmektedir. Gonad dokusuna 48 ve 72 saat klomifen sitrat dozu uygulanması sonucunda zamana bağlı olarak sonuçlarda değişim meydana geldiği gözlenmiştir. Gonad dokusunda MDA ve TP seviyeleri incelendiğinde 48. saat verileri anlamlı olarak azalırken ($p<0,01$, $p<0,05$), 72. saat verileri anlamlı olarak artmıştır ($p<0,01$, $p<0,05$). Bu da bize gonad dokusunun zamana bağlı olarak klomifen sitrat maddesine duyarlı olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda klomifen sitratın hücresel düzeyde oluşturabileceği sitotoksitesite durumunu belirleyebilmek için MTT testi uygulanmıştır. Araştırmamızda MTT testi

sonucunda negatif kontrole kıyasla 48. ve 72. saat ve tüm klomifen sitrat dozlarında (10 µg/ml, 5µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml, 0,625 µg/ml, 0,312 µg/ml, 0,156 µg/ml, 0,0781 µg/ml) maksimum dozdan minimum doza kadar seyreltme verileri incelendiğinde % hücre canlılığındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (p<0,01, p<0,05).



5. SONUÇ

Üreme yardımcı ilaçlar günümüzde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Üreme sorunlarının bir nedeni oksidatif stres olmakla birlikte bu tez çalışmamızda üreme yardımcı ilaçların organizmaya yaptığı oksidatif hasarı inceledik.

Bu tez çalışmasında oksidatif stres parametreleri çeşitli yöntemler ile analiz edilmiştir. Çalışmada, sıklıkla tercih edilen seçici östrojen reseptör modülatör ilaçların etken maddelerinden olan klomifen literatür taraması ve yapılan LD50 dozuyla karar verilmiş 1,47mg/L dozu 48 ve 72 saat omurgalı model organizma olan zebra balığına uygulanmasının ardından, balığın beyin ve karaciğer ve gonad dokularında oksidatif stres parametreleri biyokimyasal yöntemlerle değerlendirilmiştir. Literatürde, klinikte sık tercih edilen seçici östrojen reseptör modülatör grubuna dâhil maddeler ve bu maddelerin oksidatif stres ile ilişkisini gösteren çalışmalar incelendiğinde çeşitli sonuçların elde edildiği gözlenmektedir.

- Katalaz enzim aktivitesi, karaciğer dokusunda hem 48. saatte hemde 72.saate, beyin dokusunda yalnızca 48. saatte ve gonad dokusunda ise 72. saatte kontrole göre anlamlı olarak artmış ve bu artış bize ilaçla muamele edilmiş olan dokularda meydana gelmiş olan bir hasarı göstermektedir.
- MDA seviyelerinin, karaciğer dokusunda 48. ve 72. saatte anlamlı olarak artmış olması lipit peroksidasyonun artmış olduğunun bir göstergesidir. Lipit peroksidasyonun artması oksidatif stres nedeniyle toksik yan ürün meydana geldiğini göstermektedir. Ayrıca beyin dokusunda 48. ve 72. saatte; gonad dokusunda yalnız 48. saatte meydana gelen MDA seviyerindeki azalma lipit metabolizmasında yine oksidatif hasardan dolayı meydana gelmiş bir aksama olabileceğini düşündürmüştür.
- Total protein seviyeleri beyin dokusunda her iki deney grubunda da anlamlı olarak artış göstermiştir. Bu artışı diğer testlerle belirlenmiş olan oksidatif hasarın bir sonucu olabileceğini düşündürmektedir.
- GSH seviyeleri karaciğer dokusunda hem 48. hemde 72. saate anlamlı olarak artmaktadır. Gonad dokusunda ise 48. saatte anlamlı olarak artış belirlenmiştir. Bu durum antioksidan savunma sisteminin devreye girdiğini göstermektedir.

ZFL hücre hattında klomifen sitratın meydana getirebileceği hasarı incelemek için MTT testi uygulanmıştır.

- Çalışma sonucunda; MTT testi, sonucunda 48 ve 72 saatlik uygulamalarda ve tüm klomifen sitrat dozları negatif kontrolle karşılaştırıldığında hücre canlılığını azalttığı gözlenmiştir.
- Hücrelerin ikiye katlanma süresi göz önüne alındığında, 48 saat klomifen sitrat uygulamalarından hücrenin 72 saat uygulamasına göre daha az etkilendiği gözlenmiştir. Bu durum uzun süreli maruziyetlerin hücre hattına ve organizmaya daha fazla zarar verebileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmanın sonucunda Klomifen Sitrat'ın zebra balığı karaciğer, beyin ve gonad dokularında az da olsa oksidatif stres etkiye neden olduğu belirlenmiştir. KS etken maddesi ile gelecekte gerçekleştirilecek çalışmaların, kronik, moleküler ve histolojik etkilerinin araştırılması önerilmektedir. Bu çalışmanın gelecekte yapılacak olan infertilite tedavisine yönelik araştırmalara kaynak olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Adashi, E. Y. (1984). Clomiphene citrate: mechanism(s) and site(s) of action--a hypothesis revisited. *Fertility and Sterility*, 42(3), 331–344.
[https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)48069-6](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)48069-6)
- Aebi, H. (1974). Catalase. In H. U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis (Second Edition)* (Second Edi, pp. 673–684). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-091302-2.50032-3>
- Agarwal, S. K., Chapron, C., Giudice, L. C., Laufer, M. R., Leyland, N., Missmer, S. A., Singh, S. S., & Taylor, H. S. (2019). Clinical diagnosis of endometriosis: a call to action. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 220(4), 354.e1-354.e12. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2018.12.039>
- Akomolafe, S. F., Oboh, G., Akindahunsi, A. A., & Afolayan, A. J. (2015). Antiperoxidative Activity of *Tetracarpidium conophorum* Leaf Extract in Reproductive Organs of Male Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 798491. <https://doi.org/10.1155/2015/798491>
- Al-amoudi, W. M. (2016). *Biochemical and Histological Effects of Clomiphene Citrate on Liver of Female Albino Rat. January 2012*, 1–7.
- Andr, C., Manuel, P., & Plou, F. J. (2021). *The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited : Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA , Lipids and Proteins) and Induced Pathologies*.
- Ara, C., & Asmatullah. (2011). Teratogenic and Embryotoxic Effects of Clomiphene Citrate in Developing Mice. *Asian-Australas J Anim Sci*, 24(8), 1053–1059.
<https://doi.org/10.5713/ajas.2011.10392>
- Arriaga-Alba, M., Flores-Paz, R., Díaz-Hernández, R., & González-Patiño, M. E. (1996). [Assessment of genetic toxicity of the exposure to clomiphene citrate, with various bacterial test systems]. *Ginecologia y obstetricia de Mexico*, 64, 490–497.
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014.

- Ayoola, A. O., Akinloye, O., Oguntibeju, O. O., Oke, J. M., & Odetola, A. A. (2011). Antioxidant activities of *Parquetina nigrescens*. *African Journal of Biotechnology*, *10*(24), 4920–4925.
- Azouz, A. A., Ali, S. E., Elsalam, R. M. A., Emam, S. R., Galal, M. K., Elmosalamy, S. H., Alsherbiny, M. A., Hassan, B. B., & Li, C. G. (2021). Modulation of steroidogenesis by *Actaea racemosa* and vitamin C combination , in letrozole induced polycystic ovarian syndrome rat model : promising activity without the risk of hepatic adverse effect. *Chinese Medicine*, 1–17.
<https://doi.org/10.1186/s13020-021-00444-z>
- Bahadur, A., Mundhra, R., Verma, N., Ajmani, M., Afreen, T., Prateek, S., & Chaturvedi, J. (2020). Clomiphene citrate in infertility. *Indian Obstetrics and Gynaecology*, *10*(4).
- Bahadur, A., Mundhra, R., Verma, N., Ajmani, M., Afreen, T., Prateek, S., & Chaturvedi, J. (2020). CLOMIPHENE CITRATE IN INFERTILITY. *Indian Obstetrics & Gynaecology*, *10*(4).
- Baird, D. T. (1997). Amenorrhoea. *The Lancet*, *350*(9073), 275–279.
- BAKER, T. G. (1963). A QUANTITATIVE AND CYTOLOGICAL STUDY OF GERM CELLS IN HUMAN OVARIES. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *158*, 417–433.
<https://doi.org/10.1098/rspb.1963.0055>
- Barnham, K. J., Masters, C. L., & Bush, A. I. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature Reviews Drug Discovery*, *3*(3), 205–214.
- Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, *11*, 127–152.
- Beutler, E. (1975). A manual of biochemical methods. *Grune & amp.*
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. In *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* (Vol. 72).

- Bruggisser, R., von Daeniken, K., Jundt, G., Schaffner, W., & Tullberg-Reinert, H. (2002). Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Medica*, 68(05), 445–448.
- Burney, R. O., & Giudice, L. C. (2012). Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertility and Sterility*, 98(3), 511–519.
- Büyükuslu, N., & Yiğitbaşı, T. (2015). *Reaktif Oksijen Türleri ve Obezitede Oksidatif Stres*. 5(3), 197–203. <https://doi.org/10.5455/musbed.20150604061607>
- Byers, T., & Perry, G. (1992). Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Annual Review of Nutrition*, 12(1), 139–159.
- Cargnelutti, F., Di Nisio, A., Pallotti, F., Spaziani, M., Tarsitano, M. G., Paoli, D., & Foresta, C. (2022). Risk factors on testicular function in adolescents. *Journal of Endocrinological Investigation*, 1–15.
- Carson, S. A., & Kallen, A. N. (2021). Diagnosis and Management of Infertility: A Review. *JAMA*, 326(1), 65–76. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.4788>
- Chaube, S. K., Prasad, P. V., Thakur, S. C., & Shrivastav, T. G. (2005). Estradiol protects clomiphene citrate-induced apoptosis in ovarian follicular cells and ovulated cumulus-oocyte complexes. *Fertility and Sterility*, 84, 1163–1172.
- Chaube, S. K., Shrivastav, T. G., Prasad, S., & Tiwari, M. (2014). *Clomiphene Citrate Induces ROS-Mediated Apoptosis in Mammalian Oocytes*. July, 52–58.
- Chaube, S. K., Tiwari, M., & Gupta, A. (2017). *Clomiphene Citrate and Oocyte Quality*. July. <https://doi.org/10.19080/GJORM.2017.01.555570>
- Christou, F., Pitteloud, N., & Gomez, F. (2017). The induction of ovulation by pulsatile administration of GnRH: an appropriate method in hypothalamic amenorrhea. *Gynecological Endocrinology*, 33(8), 598–601.
- Compound Summary for CID 3033832, Clomiphene citrate*. (n.d.). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Clomiphene-citrate>.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA

- damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17(10), 1195–1214.
- Costa, D. D. M., Neto, F. F., Costa, M. D. M., Morais, R. N., Garcia, J. R. E., Esquivel, B. M., & Ribeiro, C. A. O. (2010). Vitellogenesis and other physiological responses induced by 17- β -estradiol in males of freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 151(2), 248–257.
- Costa, F., Dornelles, E., Mânica-Cattani, M. F., Algarve, T. D., de Souza Filho, O. C., Sagrillo, M. R., Garcia, L. F. M., & da Cruz, I. B. M. (2012). Influence of Val16Ala SOD2 polymorphism on the in-vitro effect of clomiphene citrate in oxidative metabolism. *Reproductive BioMedicine Online*, 24(4), 474–481.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.01.009>
- Costa, S. R., Velasques, R. R., Hoff, M. L. M., Souza, M. M., & Sandrini, J. Z. (2019). Characterization of different DNA repair pathways in hepatic cells of Zebrafish (*Danio rerio*). *DNA Repair*, 83, 102695.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102695>
- Da Costa, A. O., De Assis, M. C., & Plotkowski, M. C. (1999). Comparative analysis of three methods to assess viability of mammalian cells in culture. *Biocell: Official Journal of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopia Electronica... et. Al*, 23(1), 65–72.
- Davies, M. J. (2016). Protein oxidation and peroxidation. *Biochemical Journal*, 473(7), 805–825.
- Demirci-çekiç, S., Özkan, G., Avan, A. N., Uzunboy, S., Çapanoğlu, E., & Apak, R. (2022). Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 209, 114477.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114477>
- Desai, S. N., Farris, F. F., & Ray, S. D. (2014). Lipid Peroxidation. In *Encyclopedia of Toxicology* (Third Edit, Vol. 2). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00327-4>

- Dizdaroglu, M., & Jaruga, P. (2012). Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Research*, 46(4), 382–419.
- Dunselman, G. A. J., Vermeulen, N., Becker, C., Calhaz-Jorge, C., D’Hooghe, T., De Bie, B., Heikinheimo, O., Horne, A. W., Kiesel, L., & Nap, A. (2014). ESHRE guideline: management of women with endometriosis. *Human Reproduction*, 29(3), 400–412.
- Eide, M., Rusten, M., Male, R., Helge, K., Jensen, M., & Goksøyr, A. (2014). A characterization of the ZFL cell line and primary hepatocytes as in vitro liver cell models for the zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 147, 7–17.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.023>
- El-Bahr Sabry Mohamed. (n.d.). Biochemistry of Free Radicals and Oxidative Stress. *Science International Volume 1 Issue 5, 2013, 1*.
scienceinternational.com/fulltext/?doi=sciintl.2013.111.117
- Elloumi-Mseddi, J., Jemel-Oualha, I., Beji, A., Hakim, B., & Aifa, S. (2015). Effect of estradiol and clomiphene citrate on Erk activation in breast cancer cells. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 35(2), 202–206.
<https://doi.org/10.3109/10799893.2014.951895>
- Esterbauer, H. (1993). Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57(5), 779S-786S.
- Esterbauer, H., & Cheeseman, K. H. (1990). [42] Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. In *Methods in enzymology* (Vol. 186, pp. 407–421). Elsevier.
- Esterbauer, H., Eckl, P., & Ortner, A. (1990). Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 238(3), 223–233.
- Farquhar, C. M., Bhattacharya, S., Repping, S., Mastenbroek, S., Kamath, M. S., Marjoribanks, J., & Boivin, J. (2019). Female subfertility. *Nature Reviews. Disease Primers*, 5(1), 7. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0058-8>
- Farzinvas, Z. (2018). A young woman with sudden visual field shimmering: A case

- report. In *Indian journal of ophthalmology* (Vol. 66, Issue 10, pp. 1504–1505).
https://doi.org/10.4103/ijo.IJO_515_18
- Feh, M. K. M., & Wadhwa, R. (2022). Clomiphene. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Fentem, J. H., Archer, G. E., Balls, M., Botham, P. A., Curren, R. D., Earl, L. K., Esdaile, D. J., Holzhütter, H. G., & Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on In Vitro Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA*, 12(4), 483–524.
[https://doi.org/10.1016/s0887-2333\(98\)00019-8](https://doi.org/10.1016/s0887-2333(98)00019-8)
- Ferrari, M., Fornasiero, M. C., & Isetta, A. M. (1990). MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *Journal of Immunological Methods*, 131(2), 165–172.
- Firuzi, O., Miri, R., Tavakkoli, M., & Saso, L. (2011). *Antioxidant Therapy: Current Status and Future Prospects*. 3871–3888.
- Forman, R., Gill, S., Moretti, M., Tulandi, T., Koren, G., & Casper, R. (2007). Fetal safety of letrozole and clomiphene citrate for ovulation induction. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada : JOGC = Journal d'obstetrique et Gynecologie Du Canada : JOGC*, 29(8), 668–671. [https://doi.org/10.1016/s1701-2163\(16\)32551-8](https://doi.org/10.1016/s1701-2163(16)32551-8)
- Frei, B. (1997). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins. *Linus Pauling Institute. Oregon State University*.
- Gasch, A. P., Payseur, B. A., & Pool, J. E. (2016). The power of natural variation for model organism biology. *Trends in Genetics*, 32(3), 147–154.
- Gelbaya, T. A., Potdar, N., Jevé, Y. B., & Nardo, L. G. (2014). Definition and epidemiology of unexplained infertility. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 69(2), 109–115.
- George, M., & Abraham, T. E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan—a review. *Journal of Controlled*

Release, 114(1), 1–14.

Ghanem, H., Shaer, O., & El-Segini, A. (2010). Combination clomiphene citrate and antioxidant therapy for idiopathic male infertility: a randomized controlled trial. *Fertility and Sterility*, 93(7), 2232–2235.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.01.117>

Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12827.

Giera, M., Lingeman, H., & Niessen, W. M. A. (2012). Recent advancements in the LC- and GC-based analysis of malondialdehyde (MDA): a brief overview. *Chromatographia*, 75, 433–440.

Gonzalez-Hunt, C. P., Wadhwa, M., & Sanders, L. H. (2018). DNA damage by oxidative stress: Measurement strategies for two genomes. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 87–94.

Greenblatt, R. B., Barfield, W. E., Jungck, E. C., & Ray, A. W. (1961). Induction of Ovulation with MRL/41: Preliminary Report. *JAMA*, 178(2), 101–104.

<https://doi.org/10.1001/jama.1961.03040410001001>

Gülsüm SinemKasapçopur Özel, Y. O. (2014). Antioksidanlar. *Journal*, 7(2), 41–52.

Guo, C., Li, X., Wang, R., Yu, J., Ye, M., Mao, L., Zhang, S., & Zheng, S. (2016). Association between oxidative DNA damage and risk of colorectal cancer: sensitive determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by UPLC-MS/MS analysis. *Scientific Reports*, 6(1), 1–9.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M., & Cross, C. E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 119(6), 598–620.

Halliwell, Barry. (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Research*, 31(4), 261–272.

Hawkins, C. L., Morgan, P. E., & Davies, M. J. (2009). Quantification of protein

- modification by oxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(8), 965–988.
- Hayon, T., Dvilansky, A., Oriev, L., & Nathan, I. (1999). Non-steroidal antiestrogens induce apoptosis in HL60 and MOLT3 leukemic cells; involvement of reactive oxygen radicals and protein kinase C. *Anticancer Research*, 19(3A), 2089–2093.
- Hodgen, G. D. (1982). The dominant ovarian follicle. *Fertility and Sterility*, 38(3), 281–300.
- Hughes, E. G., Collins, J. A., & Gunby, J. (1998). A randomized controlled trial of three low-dose gonadotrophin protocols for unexplained infertility. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 13(6), 1527–1531.
<https://doi.org/10.1093/humrep/13.6.1527>
- Investigations, E. (2015). *Oksidatif stres ve hücre içi lipit , protein ve DNA yapıları üzerine etkileri*. 6(3), 331–336. <https://doi.org/10.5799/ahinjs.01.2015.03.0545>
- Izawa, S., Inoue, Y., & Kimura, A. (1996). Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 320(1), 61–67.
- Joseph, N., Zhang-James, Y., Perl, A., & Faraone, S. V. (2015). Oxidative Stress and ADHD: A Meta-Analysis. *Journal of Attention Disorders*, 19(11), 915–924.
<https://doi.org/10.1177/1087054713510354>
- Kac, A. (2004). *Octreotide Improves Reperfusion-Induced Oxidative Injury in Acute Abdominal Hypertension in Rats*. 113–119.
<https://doi.org/10.1016/j.gassur.2003.09.026>
- Kahn, B. E., & Brannigan, R. E. (2017). Obesity and male infertility. *Current Opinion in Urology*, 27(5), 441–445.
- Kanner, J., German, J. B., Kinsella, J. E., & Hultin, H. O. (1987). Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 25(4), 317–364.
- Karabulut, H., & Gulay, M. S. (2016). Serbest Radikaller. *MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ DERGİSİ*, 4(1), 50–59.

- Kaur, H., Bansal, G. K., Althobaiti, F., Aldhahrani, A., Usmani, S., & Bala, M. (2021). Prevalence of reproductive drugs usage in humans and animals: A pilot study in Patiala city of India. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(7), 3727–3734. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.04.064>
- Kayhan, F. E., Eyl, H., & Duruel, E. (2018). *Biyolojik Araştırmalarda Zebra Balığının (Daniorerio Hamilton , 1822) Kullanılması ve Önemi The Use of Zebrafish (Danio rerio Hamilton , 1822) in Biological Research and Its Importance*.
- Kelly, K. A., Havrilla, C. M., Brady, T. C., Abramo, K. H., & Levin, E. D. (1998). Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environmental Health Perspectives*, 106(7), 375–384. <https://doi.org/10.1289/ehp.98106375>
- Khazaei, M., Asgari, R., & Bakhtiari, M. (2020). In vitro effects of clomiphene citrate on sperm parameters and fertilisation rate in male NMRI mice. *Andrologia*, 52(1), 1–5. <https://doi.org/10.1111/and.13451>
- Kjaer, J., Olsen, P., Bach, K., Barlebo, H. C., Ingerslev, F., Hansen, M., & Sørensen, B. H. (2007). Leaching of estrogenic hormones from manure-treated structured soils. *Environmental Science & Technology*, 41(11), 3911–3917.
- Kondoh, N. (2012). Ejaculatory dysfunction as a cause of infertility. *Reproductive Medicine and Biology*, 11(1), 59–64. <https://doi.org/10.1007/s12522-011-0108-3>
- Krausz, C., & Riera-Escamilla, A. (2018). Genetics of male infertility. *Nature Reviews Urology*, 15(6), 369–384. <https://doi.org/10.1038/s41585-018-0003-3>
- Kutluyer, F., & Aksakal, E. (2013). Sucul model organizmalar ve biyoteknolojide kullanımı. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 28(2), 101–107.
- Labarrere, C. A., & Kassab, G. S. (2022). Glutathione: A Samsonian life-sustaining small molecule that protects against oxidative stress, ageing and damaging inflammation. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1007816>
- Ledwozyw, A., Michalak, J., Stepień, A., & Kadziolka, A. (1986). The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta; International*

Journal of Clinical Chemistry, 155(3), 275–283. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(86\)90247-0](https://doi.org/10.1016/0009-8981(86)90247-0)

- Li, W., Lin, J., Shi, Z., Wen, J., Li, Y., Liu, Z., & Diao, A. (2019). Clomiphene citrate induces nuclear translocation of the TFEB transcription factor and triggers apoptosis by enhancing lysosomal membrane permeabilization. *Biochemical Pharmacology*, 162, 191–201. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.11.016>
- Liu, Y., Chen, Q., Yu, S., Wang, Y., He, W., Chang, H. Y.-N., Wang, B., Gao, H., Long, H., Wang, L., Lyu, Q., Ai, A., & Kuang, Y. (2018). Progesterin-primed ovarian stimulation with or without clomiphene citrate supplementation in normal ovulatory women undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: A prospective randomized controlled trial. *Clinical Endocrinology*, 88(3), 442–452. <https://doi.org/10.1111/cen.13532>
- London, S. N., Young, D., Caldito, G., & Mailhes, J. B. (2000). Clomiphene citrate-induced perturbations during meiotic maturation and cytogenetic abnormalities in mouse oocytes in vivo and in vitro. *Fertility and Sterility*, 73(3), 620–626.
- López-Olmeda, J. F., & Sánchez-Vázquez, F. J. (2011). Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Thermal Biology*, 36(2), 91–104.
- Lu, S. C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1–2), 42–59.
- Lu, S. C. (2013). *Biochimica et Biophysica Acta. BBA - General Subjects*, 1830(5), 3143–3153. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.008>
- Lv, Z., Xing, K., Li, G., Liu, D., & Guo, Y. (2018). Dietary genistein alleviates lipid metabolism disorder and inflammatory response in laying hens with fatty liver syndrome. *Frontiers in Physiology*, 9, 1493.
- Marut, E. L., & Hodgen, G. D. (1982). Antiestrogenic action of high-dose clomiphene in primates pituitary augmentation but with ovarian attenuation. *Fertility and Sterility*, 38(1), 100–104. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)46403-4](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)46403-4)
- Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S., & Stevens, G. A.

- (2012). National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Medicine*, 9(12), e1001356. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001356>
- Matés, J. M., Pérez-Gómez, C., & De Castro, I. N. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32(8), 595–603.
- McCall, M. R., & Frei, B. (1999). Free Radical. *Biol. Med.*, 26, 1034.
- Medicine, P. C. of the A. S. for R. (2015). Role of tubal surgery in the era of assisted reproductive technology: a committee opinion. *Fertility and Sterility*, 103(6), e37–e43.
- Meredith, M. J., & Reed, D. J. (1982). Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte. *Journal of Biological Chemistry*, 257(7), 3747–3753.
- Mikkelsen, T. J., Kroboth, P. D., Cameron, W. J., Dittert, L. W., Chungi, V., & Manberg, P. J. (1986). Single-dose pharmacokinetics of clomiphene citrate in normal volunteers. *Fertility and Sterility*, 46(3), 392–396.
- Milheiro, A., Nozaki, K., Kleverlaan, C. J., Muris, J., Miura, H., & Feilzer, A. J. (2016). In vitro cytotoxicity of metallic ions released from dental alloys. *Odontology*, 104, 136–142.
- Mione, M. C., & Trede, N. S. (2010). The zebrafish as a model for cancer. *Disease Models & Mechanisms*, 3(9–10), 517–523. <https://doi.org/10.1242/dmm.004747>
- Miranda, C. L., Collodi, P., Zhao, X., Barnes, D. W., & Buhler, D. R. (1993). Regulation of Cytochrome P450 Expression in a Novel Liver Cell Line from Zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 305(2), 320–327. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1429>
- molecules-v24-i17_20230912*. (n.d.).
- Momenimovahed, Z., Taheri, S., Tiznobaik, A., & Salehiniya, H. (2019). Do the Fertility Drugs Increase the Risk of Cancer? A Review Study. *Frontiers in Endocrinology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00313>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:

- application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Nakai, K., & Tsuruta, D. (2021). What Are Reactive Oxygen Species, Free Radicals, and Oxidative Stress in Skin Diseases? *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19). <https://doi.org/10.3390/ijms221910799>
- Niles, A. L., Moravec, R. A., Hesselberth, P. E., Scurria, M. A., Daily, W. J., & Riss, T. L. (2007). A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Analytical Biochemistry*, 366(2), 197–206.
- Oluwadare, O., Johnson, A., Adeola, I., Ajayi, B., Oyiza, G., Christanah, D., Kabirat, T., Esther, O., Oludipe, S., & Bamidele, V. (2023). Synergistic action of carvedilol and clomiphene in mitigating the behavioral phenotypes of letrozole-model of PCOS rats by modulating the NRF2 / NFKB pathway. *Life Sciences*, 324(March), 121737. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121737>
- Otang, W. M., Grierson, D. S., & Ndip, R. N. (2014). Cytotoxicity of three South African medicinal plants using the Chang liver cell line. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 11(2), 324–329.
- Ozkan, S., Murk, W., & Arici, A. (2008). Endometriosis and infertility: epidemiology and evidence-based treatments. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1127(1), 92–100.
- Paithankar, J. G., Saini, S., Dwivedi, S., Sharma, A., & Chowdhuri, D. K. (2021). Heavy metal associated health hazards: An interplay of oxidative stress and signal transduction. *Chemosphere*, 262, 128350.
- Paramanya, A., & Ahmad, A. (2019). ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN BIOLOGICAL SYSTEMS. *Middle East Journal of Science*, 5, 155–162. <https://doi.org/10.23884/mejs.2019.5.2.07>
- Perrone, S., Tataranno, M. L., Negro, S., Longini, M., Marzocchi, B., Proietti, F., Iaconi, F., Capitani, S., & Buonocore, G. (2010). Early identification of the risk for free radical-related diseases in preterm newborns. *Early Human Development*, 86(4), 241–244. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.03.008>

- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 8416763. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Plumb, J. A., Milroy, R., & Kaye, S. B. (1989). Effects of the pH dependence of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Research*, 49(16), 4435–4440.
- Prokai, L., Yan, L., Vera-Serrano, J. L., Stevens Jr, S. M., & Forster, M. J. (2007). Mass spectrometry-based survey of age-associated protein carbonylation in rat brain mitochondria. *Journal of Mass Spectrometry*, 42(12), 1583–1589.
- Rakotoarisoa, M., Angelov, B., Espinoza, S., Khakurel, K., Bizien, T., & Angelova, A. (2019). Cubic Liquid Crystalline Nanostructures Involving Catalase and Curcumin: BioSAXS Study and Catalase Peroxidatic Function after Cubosomal Nanoparticle Treatment of Differentiated SH-SY5Y Cells. *Molecules*, 24(17). <https://doi.org/10.3390/molecules24173058>
- Rankouhi, T. R., Sanderson, J. T., Van Holsteijn, I., Van Leeuwen, C., Vethaak, A. D., & Van den Berg, M. (2004). Effects of natural and synthetic estrogens and various environmental contaminants on vitellogenesis in fish primary hepatocytes: comparison of bream (*Abramis brama*) and carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicological Sciences*, 81(1), 90–102.
- Rao, R. S. P., & Møller, I. M. (2011). Pattern of occurrence and occupancy of carbonylation sites in proteins. *Proteomics*, 11(21), 4166–4173. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100223>
- Reschly, E. J., Bainy, A. C. D., Mattos, J. J., Hagey, L. R., Bahary, N., Mada, S. R., Ou, J., Venkataramanan, R., & Krasowski, M. D. (2007). Functional evolution of the vitamin D and pregnane X receptors. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 1–17.
- Riss, T. L., & Moravec, R. A. (2004). Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay and Drug Development Technologies*, 2(1), 51–62.

- Romero Ramos, R., Romero Gutiérrez, G., Abortes Monroy, I., & Medina Sánchez, H. G. (2008). [Risk factors associated to female infertility]. *Ginecología y obstetricia de Mexico*, 76(12), 717–721.
- Sa, F. J., & Lo, J. F. (2011). *Thermal biology of zebrafish (Danio rerio)*. 36, 91–104.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2010.12.005>
- ŞAHİN, B. (n.d.). IN VITRO CYTOTOXICITY TEST METHODS: MTT and NRU. *International Journal of PharmATA*, 3(2), 50–53.
- Salman, K. A., & Ashraf, S. (2013). *Reactive Oxygen Species: A link between chronic inflammation and cancer*.
- Schmidt, G. E., Sites, C., Mansour, R., Friedman, C. I., & Kim, M. H. (1985). Embryo toxicity of clomiphene citrate on mouse embryos fertilized in vitro and in vivo. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 153(6), 679–684.
[https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(85\)80260-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(85)80260-X)
- Sepasi Tehrani, H., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2018). Catalase and its mysteries. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 140, 5–12.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.03.001>
- Sharma, M., & Balasundaram, P. (2022). Ovulation Induction Techniques. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Shchepinov, M. S., Roginsky, V. A., Brenna, J. T., Molinari, R. J., To, R., Tsui, H., Clarke, C. F., & Manning-Boğ, A. B. (2014). Deuterium protection of polyunsaturated fatty acids against lipid peroxidation: a novel approach to mitigating mitochondrial neurological diseases. In *Omega-3 Fatty Acids in Brain and Neurological Health* (pp. 373–383). Elsevier.
- Sivaraj, A., Vinothkumar, P., Sathiyaraj, K., Sundaresan, S., Devi, K., & Senthilkumar, B. (2011). Hepatoprotective potential of *Andrographis paniculata* aqueous leaf extract on ethanol induced liver toxicity in albino rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science, Issue*, 204–208.
- Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., de Silva, O., Holzhütter, H.-G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., & Pfannenbecker, U. (1998). A study

on UV filter chemicals from Annex VII of European Union Directive 76/768/EEC, in the in vitro 3T3 NRU phototoxicity test. *Alternatives to Laboratory Animals*, 26(5), 679–708.

Stine, K. E., & Brown, T. M. (2015). *Principles of toxicology*. Crc Press.

Sun, L., Wen, L., Shao, X., Qian, H., Jin, Y., Liu, W., & Fu, Z. (2010). Screening of chemicals with anti-estrogenic activity using in vitro and in vivo vitellogenin induction responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 78(7), 793–799.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.12.020>

Surai, P. F., Kochish, I. I., Fisinin, V. I., & Kidd, M. T. (2019). *Antioxidant Defence Systems and Oxidative Stress in Poultry Biology: An Update*. 1–36.

Thonneau, P., Marchand, S., Tallec, A., Ferial, M. L., Ducot, B., Lansac, J., Lopes, P., Tabaste, J. M., & Spira, A. (1991). Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Human Reproduction (Oxford, England)*, 6(6), 811–816.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137433>

Tournaye, H. (2012). Male factor infertility and ART. *Asian Journal of Andrology*, 14(1), 103.

Tripathi, A., Premkumar, K. V, Pandey, A. N., Khatun, S., Kirti, S., Shrivastav, T. G., & Chaube, S. K. (2011). Melatonin protects against clomiphene citrate-induced generation of hydrogen peroxide and morphological apoptotic changes in rat eggs. *European Journal of Pharmacology*, 667(1–3), 419–424.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.06.005>

Tyler, C. R., Spary, C., Gibson, R., Santos, E. M., Shears, J., & Hill, E. M. (2005). Accounting for differences in estrogenic responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*: Salmonidae) and roach (*Rutilus rutilus*: Cyprinidae) exposed to effluents from wastewater treatment works. *Environmental Science & Technology*, 39(8), 2599–2607.

Unuane, D., Tournaye, H., Velkeniers, B., & Poppe, K. (2011). Endocrine disorders & female infertility. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology &*

Metabolism, 25(6), 861–873.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.beem.2011.08.001>

- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84.
- van Noord-Zaadstra, B. M., Looman, C. W., Alsbach, H., Habbema, J. D., te Velde, E. R., & Karbaat, J. (1991). Delaying childbearing: effect of age on fecundity and outcome of pregnancy. *British Medical Journal*, 302(6789), 1361–1365.
- Veltman-Verhulst, S. M., Hughes, E., Ayeleke, R. O., & Cohlen, B. J. (2016). Intra-uterine insemination for unexplained subfertility. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2, CD001838.
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD001838.pub5>
- Vertuani, S., Angusti, A., & Manfredini, S. (2004). The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Current Pharmaceutical Design*, 10(14), 1677–1694.
- Wahab, O. A., Princely, A. C., Oluwadamilare, A. A., Oore-oluwapo, D. O., Alli, O., & Alfred, E. F. (2019). *Original article Clomiphene citrate ameliorated lead acetate-induced reproductive toxicity in male Wistar rats*. 23(4), 336–343.
<https://doi.org/10.5935/1518-0557.20190038>
- Wan, H., Williams, R., Doherty, P., & Williams, D. F. (1994). A study of the reproducibility of the MTT test. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 5, 154–159.
- Wang, H.-Z., Chang, C.-H., Lin, C.-P., & Tsai, M.-C. (1996). Using MTT viability assay to test the cytotoxicity of antibiotics and steroid to cultured porcine corneal endothelial cells. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 12(1), 35–43.
- Wheeler, K. M., Sharma, D., Kavoussi, P. K., Smith, R. P., & Costabile, R. (2019). Clomiphene Citrate for the Treatment of Hypogonadism. *Sexual Medicine Reviews*, 7(2), 272–276. <https://doi.org/10.1016/j.sxmr.2018.10.001>

- Willems, A. E., Corbo, J. M., & Brown, J. N. (2013). Clomiphene for the treatment of male infertility. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, *20*(7), 739–744. <https://doi.org/10.1177/1933719112466304>
- Yang, B., Chen, Y., & Shi, J. (2018). Reactive Oxygen Species (ROS) -Based Nanomedicine [Review-article]. *Chemical Reviews*. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00626>
- Yin, H., Xu, L., & Porter, N. A. (2011). *Free Radical Lipid Peroxidation : Mechanisms and Analysis*. 5944–5972.
- Yuan, L., & Kaplowitz, N. (2009). Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Molecular Aspects of Medicine*, *30*(1–2), 29–41.
- Zarinara, A., Zeraati, H., Kamali, K., Mohammad, K., Rahmati, M., & Akhondi, M. M. (2020). The success rate and factors affecting the outcome of assisted reproductive treatment in subfertile men. *Iranian Journal of Public Health*, *49*(2), 332.
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., de Mouzon, J., Sokol, R., Rienzi, L., Sunde, A., Schmidt, L., Cooke, I. D., Simpson, J. L., & van der Poel, S. (2017). The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertility and Sterility*, *108*(3), 393–406. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.06.005>
- Zhang, W., Xiao, S., & Ahn, D. U. (2013). Protein oxidation: basic principles and implications for meat quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *53*(11), 1191–1201.
- Zhang, Y., Cao, S., Liang, J.-X., Ge, X., Hu, S.-H., Li, Y.-X., & Li, L.-H. (2023). The efficacy of Fuke Qianjin tablets combined with clomiphene citrate on infertility patients with polycystic ovary syndrome: A retrospective analysis. *Medicine*, *102*(27), e34162. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000034162>
- Zu, S., Luo, D., Li, L., Ye, Q., Li, R. T., Wang, Y., Gao, M., Yang, H., Deng, Y. Q., & Cheng, G. (2021). Tamoxifen and clomiphene inhibit SARS-CoV-2 infection by suppressing viral entry. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *6*(1), 10–13. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00853-4>

