



T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TEKRARLAYAN DOZLARDA METOTREKSAT
UYGULAMASINA KARŞI RESVERATROLÜN RAT
OVARYUMUNDAKİ KORUYUCU ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Kübra KİSMET AKA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SAĞLIK VE BİYOMEDİKAL BİLİMLER (DİSİPLİNLERARASI)
ANABİLİM DALI

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Şükriye YEŞİLOT

BURDUR-2021

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TEKRARLAYAN DOZLARDA METOTREKSAT
UYGULAMASINA KARŞI RESVERATROLÜN RAT
OVARYUMUNDAKİ KORUYUCU ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Kübra KISMET AKA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SAĞLIK VE BİYOMEDİKAL BİLİMLER (DİSİPLİNLERARASI)
ANABİLİM DALI

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Şükriye YEŞİLOT

Bu Araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 0615-YL-19 proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR-2021

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince bilgi, tecrübe ve deneyimlerini hiçbir zaman esirgemeyen, maddi ve manevi desteğini her zaman yanımda hissettiğim, birlikte çalışmaktan onur duyduğum çok değerli hocam ve danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Şükriye YEŞİLOT'a, yüksek lisans eğitimim ve deneysel çalışmalarda her zaman yanımda olan ve desteğini hep hissettiren değerli hocam Doç. Dr. Çiğdem AYDIN ACAR'a, deneysel analizlerde bilgileri, destekleri ve katkılarından dolayı değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Rahime ASLANKOÇ'a ve Arş. Gör. Dr. Meltem ÖZGÖÇMEN'e, yüksek lisans eğitimine başlamamda bana inanan ve desteğini esirgemeyen Sağlık ve Biyomedikal (Disiplinlerarası) Bilimler Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Mümin POLAT'a, deney hayvanlarının bakımı ile deney hayvanlarındaki çalışmalarım ve uygulamalarım emeği geçen Prof. Dr. Özlem ÖZMEN ve Vet. Hek. Simge GARLI'ya, desteklerinden dolayı bölüm arkadaşlarım A.T.T. Erdi Onur GÖKKAYA ve A.T.T. Aysel HANTRAK ŞİMŞEK'e, yüksek lisans eğitimi ve tez çalışmam sürecinde beni her zaman destekleyen çalışma arkadaşlarıma ve beni yalnız bırakmayan ve desteklerini esirgemeyen, bugünlere gelmemde büyük emekleri bulunan ve eğitim hayatım boyunca her türlü destekleriyle yanımda olan annem Habibe KISMET'e, kayınvalidem Emine AKA' ya, babam Mehmet KISMET'e, kardeşim Hıncal Kubilay KISMET'e, bu süreçte her türlü kahrımı çekerken her daim destek olan eşim Taha AKA' ya ve tabiki bu süreçte annelik duygusunu bana tattıran canım oğlum Tarık AKA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ETİK BEYAN

“Tekrarlayan Dozlarda Metotreksat Uygulamasına Karşı Resveratrolün Rat Ovaryumundaki Koruyucu Etkilerinin Değerlendirilmesi” başlıklı tez çalışmamdaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Dr. Öğretim Üyesi Şükriye YEŞİLOT danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Kübra KISMET AKA

Tarih: 20.08.2021

İmza:

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	i
KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
ETİK BEYAN	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vii
TABLOLAR	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Ovaryum	3
2.1.1. Ovaryum Anatomisi ve Fizyolojisi	4
2.1.2. Ovaryumun Histolojik Yapısı	4
2.1.3. Ovaryum Foliküllerinin Gelişimi	5
2.1.3.1. Primordiyal Folikül	6
2.1.3.2. Primer Folikül	6
2.1.3.3. Sekonder Folikül	7
2.1.3.4. Graaf Folikülü	7
2.1.3.5. Atretik Folikül	8
2.1.4. Ovaryum Embriyolojisi	8
2.2. Metotreksat	8
2.2.1. Kimyasal Yapısı	9
2.2.2. Metotreksatın Etki Mekannizması	10
2.2.3. Farmakokinetik ve Farmakodinamik Etkileri	10
2.2.4. Metotreksatın Yan Etkileri	11
2.2.5. İlaç Etkileşimi	12
2.3. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar	12
2.4. Resveratrol	14
2.4.1. Resveratrolün Yapısı ve Fiziksel Özellikleri	14
2.4.2. Resveratrolün Biyolojik Etkileri	15
2.4.3. Farmakolojik Özellikleri	16
2.4.4. Resveratrolün Antioksidan Etkileri	17
2.4.5. Resveratrolün Yan Etkileri	18
3. GEREÇ ve YÖNTEM	19
3.1. Gereç	19
3.1.1. Deney Hayvanları	19
3.1.2. Etik Kurul Onayı	19
3.1.3. Kullanılan İlaç ve Kimyasallar	19
3.2. Yöntem	19
3.2.1. Deney Planı	19
3.2.2. Kan ve Doku Örneklerinin Toplanması	21
3.2.3.1. Doku Örneklerinde Histokimyasal Çalışmalar	22
3.2.3.2. Doku Örneklerinde İmmünohistokimyasal Çalışmalar	23
3.2.4. Biyokimyasal Çalışmalar	25

3.2.5. Comet Assay	27
3.2.5.1. Comet Analizi İçin Kullanılan Çözeltiler	27
3.2.5.2. Lamların Hazırlanması	28
3.2.5.3. Deneyin Yapılışı	28
3.2.5.4. Görüntü Analizi	29
3.2.6. İstatistiksel Analiz	29
4. BULGULAR	30
4.1. Histolojik Parametreler	30
4.2. Biyokimyasal Parametreler	39
4.2.1. TAS, TOS ve OSI Ölçümleri	39
4.3. DNA Hasarı	42
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	51
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	63

ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	Ovaryumun yapısı (Gartner ve Hiatt, 2000).	3
Şekil 2.2.	Metotreksatın kimyasal yapısı (Sönmez ve ark., 2016).	9
Şekil 2.3.	Oksidatif denge (Özcan ve ark., 2015)	13
Şekil 2.4.	Resveratrolün trans ve cis yapıları (Sales ve Resurreccion, 2014).	15
Şekil 2.5.	Resveratrolün piceid formu (Yıkrazuul, 2010)	15
Şekil 2.6.	Resveratrolün etkileri (Karabulut, 2008).	16
Şekil 4.1.	Grup I'e ait ovaryum dokusu kesiti. H-E, x20.	32
Şekil 4.2.	Grup I'e ait ovaryum dokusu kesiti. H-E, x40.	33
Şekil 4.3.	Grup II'ye ait ovaryum dokusu kesiti. H-E, x20.	33
Şekil 4.4.	Grup II'ye ait ovaryum dokusu kesiti. H-E, x40.	34
Şekil 4.5.	Grup III'e ait ovaryum dokusu kesiti. H-E, x20.	34
Şekil 4.6.	Grup III'e ait ovaryum dokusu kesiti. H-E, x40.	35
Şekil 4.7.	Grup V'e ait ovaryum dokusu kesiti. H-E, x20.	35
Şekil 4.8.	Grup V'e ait ovaryum dokusu kesiti. H-E, x40.	36
Şekil 4.9.	Grup I'e ait ovaryum dokusu kesitinin TUNEL boyaması, x40.	37
Şekil 4.10.	Grup II'ye ait ovaryum dokusu kesitinin TUNEL boyaması, x40.	38
Şekil 4.11.	Grup III'e ait ovaryum dokusu kesitinin TUNEL boyaması, x40.	38
Şekil 4.12.	Grup V'e ait ovaryum dokusu kesitinin TUNEL boyaması, x40.	39
Şekil 4.13.	Gruplararası ovaryum TOS düzeyleri.	40
Şekil 4.14.	Gruplararası ovaryum TAS düzeyleri.	41
Şekil 4.15.	Gruplararası ovaryum OSI düzeyleri.	41
Şekil 4.16.	(A) Grup I'e ait Comet Assay görüntüsü.	42
Şekil 4.17.	(B) Grup II'ye ait Comet Assay görüntüsü.	43
Şekil 4.18.	(C) Grup III'e ait Comet Assay görüntüsü.	43
Şekil 4.19.	(D) Grup V'e ait Comet Assay görüntüsü.	44

TABLÖLAR

Tablo 2.1.	Metotreksat tedavisi sırasında karşılaşılan yan etkiler	11
Tablo 2.2.	Metotreksat düzeyini arttıran ilaçlar	12
Tablo 3.1.	Deney planı	21
Tablo 4.1.	Histolojik bulguların gruplar arasında derecelendirilmesi	31
Tablo 4.2.	TUNEL ile işaretlenme dereceleri	37
Tablo 4.3.	Deney gruplarına ait TAS, TOS ve OSI parametrelerinin analizi	39
Tablo 4.4.	Gruplara ait comet skoru analizi	42



SİMGELER ve KISALTMALAR

AICAR	Amino-imidazol Karboksamit Ribonükleotid
FPGS	Folilpliglutamat Sentaz
FSH	Folikül Stimulan Hormon
MTX	Metotreksat
NO	Nitrik Oksit
OSI	Oksidatif Stres İndeks
RES	Resveratrol
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
TAS	Total Antioksidan Kapasitesi
TOS	Total Oksidan Kapasitesi
UV	Ultraviyole



ÖZET

Tekrarlayan Dozlarda Metotreksat Uygulamasına Karşı Resveratrolün Rat Ovaryumundaki Koruyucu Etkilerinin Değerlendirilmesi

Metotreksat (MTX), folik asit antagonisti olup, klinikte birçok hastalığın tedavisinde kullanılan kemotörpötik bir ajandır. MTX yüksek dozlarda kullanıldığında sitotoksik etki gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuş, organ ve dokularda neden olduğu toksisitenin engellenmesinin gerekliliği ortaya çıkmıştır. Çalışmamızda dişi ratlarda MTX ile indüklenmiş ovaryum hasarına karşı güçlü bir antioksidan kabul edilen Resveratrol'ün (RES) koruyucu etkilerini araştırmayı amaçladık. Çalışmamızda Wistar Albino cinsi toplam 42 adet dişi rat (240-360 g) kullanarak, 7 grup (GrupI- Kontrol, GrupII- MTX (1.gün), GrupIII- MTX (1., 3. gün), GrupIV- MTX (1., 3., 5. gün), GrupV- MTX (1.gün) + RES, GrupVI- MTX (1., 3. Gün) + RES, GrupVII- MTX (1., 3., 5. gün) + RES) oluşturduk. Sıçanlara, ilk gün kontrol grubu hariç tüm gruplara 15 mg/kg intraperitoneal yoldan tek doz MTX uygularken; V., VI., ve VII. gruplara ise MTX uygulamasından 1 saat önce Resveratrol 20 mg/kg dozunda oral gavaj yolu ile verildi. III., IV., VI. ve VII. gruplara 3. gün, IV. ve VII. gruplara ise 5. gün olmak üzere tekrarlayan dozlarda MTX uygulaması yapıldı. Deneyin 8. günü anestezi altında ratlardan doku ve kan örnekleri alınarak sakrifiye edildi. Ratların ovaryum dokularında hematoksilin-eozin (H-E) boyaması ve TUNEL boyama yapılarak ışık mikroskopunda ovaryum hasarı değerlendirildi. Çalışmamızda alınan ovaryum doku örnekleri homojenize edilerek, TAS ve TOS aktiviteleri spektrofotometrik olarak tayin edildi. Ayrıca, Comet Assay yöntemi ile de kanda DNA hasarının değerlendirilmesi yapıldı. Grup IV ve VI'da birer hayvan kaldığı, VII'de ise hiç hayvan kalmadığı için bu gruplar değerlendirilmeye alınmadı. Biyokimyasal analizler sonucunda MTX grupları olan grup II ve III'de TOS düzeyi kontrol grubuna göre artış gösterirken grup V'de TOS düzeyinin anlamlı olarak düştüğü görüldü. Bununla beraber TAS düzeyi grup V'de grup II ve III'e göre anlamlı olarak arttı. H-E ile boyama sonucunda hasar oluşan MTX gruplarına kıyasla grup V'de birçok bulguda iyileşme gözlenmiştir. TUNEL boyama sonucunda en fazla pozitif boyanma; eşit miktarda grup II ve III'te daha sonra grup V'te gözlemlenmiştir. Ayrıca DNA hasar analizi gösteren comet skoru grup II ve III'de anlamlı olarak artarken, grup V'de anlamlı olarak azalmıştır. Bu çalışmanın sonuçları doğrultusunda resveratrolün antioksidan özelliğinden dolayı metotreksata bağlı ovaryum hasarına karşı koruyucu etkiler sağlayabileceği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Metotreksat, Ovaryum, Rat, Resveratrol.

ABSTRACT

Evaluation of Protective Effects of Resveratrol in Rat Ovarium Against Repeated Doses of Methotrexate

Methotrexate (MTX), a folic acid antagonist, is a chemotherapeutic agent used in the treatment of many diseases in the clinic. Studies have shown that MTX has a cytotoxic effect when used in high doses, and the necessity of preventing the toxicity it causes in organs and tissues has emerged. In our study, we aimed to investigate the protective effects of Resveratrol (RES), which is considered a powerful antioxidant, against MTX-induced ovarian damage in female rats. In our study, a total of 42 female Wistar Albino rats (240-360 g) were used, 7 groups (Group I- Control, Group II- MTX (1st day), GroupIII- MTX (1st and 3rd day), Group IV- MTX (1st, 3rd and 5th day), GroupV- MTX (1st day) + RES, GroupVI- MTX (1st and 3rd day) + RES, GroupVII- MTX (1st, 3rd and 5th day) + RES) have been created. While administering a single dose of MTX 15 mg/kg intraperitoneally to all groups except the control group on the first day; V., VI., and VII. Resveratrol was given to the groups by oral gavage at a dose of 20 mg/kg 1 hour before MTX administration. III., IV., VI. and VII. groups on the 3rd day, IV. and VII. on the 5th day, repeated doses of MTX were administered to the groups. On the 8th day of the experiment, tissue and blood samples were taken from the rats under anesthesia and they were sacrificed. Ovarian damage was evaluated under light microscope by performing hematoxylin-eosin (H-E) staining and TUNEL staining on ovarian tissues of rats. Ovarian tissue samples taken in our study were homogenized and TAS and TOS activities were determined spectrophotometrically. In addition, DNA damage in blood was evaluated by Comet Assay method. Since there was only one animal left in Groups IV and VI and none in Group VII, these groups could not be evaluated. As a result of biochemical analyzes, TOS levels increased in MTX groups, group II and III, compared to the control group, while TOS level decreased significantly in group V. However, the TAS level increased significantly in group V compared to groups II and III. Many findings were improved in group V compared to the MTX groups that were damaged as a result of staining with H-E. Maximum positive staining in TUNEL image; observed in equal amounts in groups II and III, then in group V. In addition, the comet score showing DNA damage analysis increased significantly in groups II and III, while it decreased significantly in group V. In line with the results of this study, it was observed that resveratrol may provide protective effects against methotrexate-induced ovarian damage due to its antioxidant properties.

Keywords: Methotrexate, Ovary, Rat, Resveratrol.

1. GİRİŞ

Neoplazilerden psöriazise (sedef hastalığı) uzanan geniş yelpazede birçok hastalığın tedavisinde kullanılan Metotreksat (MTX), bir folik asit antagonisti olup, dihidrofolat redüktaz enzimini bağlayarak DNA ve RNA sentezini inhibe eden antiproliferatif etkili bir ajandır (Fridlington ve ark., 2011; Hyoun ve ark., 2012). MTX; proteinler, lipidler ve miyelinin şekillenmesinde büyük önemi olan transmetilasyon reaksiyonlarına da belirgin olarak etki eder (Uzar, 2006). Metotreksat; nükleik asitlerin, timidilatların ve proteinlerin sentezini inhibe ederken malign ve bazı kanserli olmayan hücrelerde büyümeyi ve proliferasyonu baskılayarak özellikle hızla bölünen hücreler üzerinde toksik etkiye neden olur (Karri ve Vanithakumari, 2011). Buradan da anlaşılacağı gibi metotreksatın sitotoksik etkisi yalnızca kanser hücrelerine özgü olmayıp tüm vücut hücreleri üzerine olmaktadır.

MTX'in toksik etkileri hastadan hastaya değişkenlik gösterebilmektedir. Bu yüzden MTX kullanıldığı endikasyona bağlı olarak geniş bir doz aralığında kullanılmaktadır (Widemann ve Adamson, 2006). MTX'in en iyi bilinen yan etkilerinden bazıları hematolojik, hepatik ve pulmoner toksisite olarak sıralanmıştır (Kivity ve ark, 2014). Bazı raporlar MTX'in iskelet büyümesi, nöro, nefro ve üreme sistemleri üzerindeki toksik etkilerini tanımlamaktadır (Karri ve Vanithakumari, 2011). Bu yüzden metotreksat kullanımı esnasında antioksidan maddelerin birlikte verilmesinin dokular üzerindeki toksik etkiyi azaltıcı etkileri olduğu kanıtlanmıştır (Kabakçı ve ark., 2015).

Resveratrol (RES) (3,5,4-trihydroxystilbene) başlıca üzüm kabuğu olmak üzere yerfıstığı, ahududu, dut, erik ve bazı bitkilerde bulunmaktadır. Resveratrolün özellikle patojenlerin bitkilere saldırması, yaralanma veya ultraviyole (UV) ışığa maruz kalma sonucunda bitkiler tarafından üretilen bir fitoalleksin olduğu bilinmektedir. Bu maddenin aynı zamanda insanlarda da koruyucu olduğuna inanılmaktadır. Çünkü daha çok renkli üzümlerde bulunan resveratrol maddesinin antioksidant aktivite göstererek kılcal damarların tıkanmasını ve apolipoprotein, lipid sentezinin modülasyonu ile kılcal damarlarda trombosit birikmesini engellediği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Resveratrol hücre yaşam süresini uzatan ilk

moleküldür. Resveratrol'un sirtuin (SIRT2, insan SIRT1 homologu) aktivasyonu ile kalori kısıtlamasına yanıt olarak mantarlarda hücre yaşam süresini uzattığını çalışmalar göstermiştir. Resveratrol'ün sirtuinleri aktive ettiği insan ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalarla da gösterilmiştir. Resveratrol ile ilgili araştırmaların büyük çoğunluğu kanser üzerine yoğunlaşmış olup, bu bileşiğin, kanserin pek çok aşamasında durdurucu ve engelleyici özelliği olduğu belirlenmiştir (Karabulut, 2008; Keskin ve ark., 2009; Tunalı-Akbay ve ark., 2010; Yuluğ ve ark., 2013). Resveratrol'ün antioksidan potansiyeline ilaveten antikanser özelliğini sergilediği insan kanserleri üzerine yapılan farklı çalışmalarda da (meme, rahim ağzı, rahim, yumurtalık gibi) gösterilmiştir (Rauf ve ark., 2018).

Literatürde Metotreksat'ın yol açtığı toksisiteyi engellemeye yönelik çeşitli maddeler ile çalışmalar mevcut olmasına karşın, güçlü antioksidan etkiye sahip resveratrolün tekrarlayan dozlarda MTX verildiğinde ovaryum ve diğer dokulardaki koruyucu etkilerinin araştırılmamış olması bu çalışmanın özgünlüğünü arttırmaktadır. Tekrarlayan ve tek doz MTX uygulaması sonrası meydana gelen oksidatif organ hasarına karşı güçlü bir antioksidan olan resveratrol verilerek rat ovaryumu üzerindeki koruyucu etkisinin biyokimyasal, histokimyasal ve immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

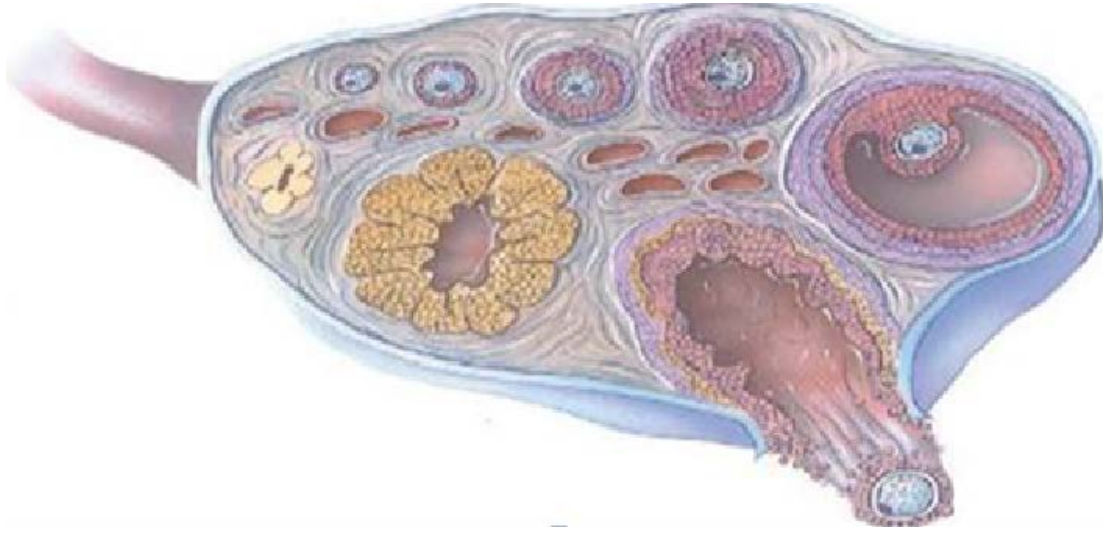
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryum

Dişilerin üreme sisteminde yer alan ovaryum, pelvik boşluğun sağ ve sol lateralinde yer alan bir çift organdır. Şekil itibari ile bademe benzetilmektedir (Roach ve Andreotti, 2017).

Ovaryum, dişilerde germ hücrelerinin büyümesini ve bunları ihtiva eden olgunlaşmış oositlerin fallop tüplerine geçişini sağlayan, her ay gerçekleşen siklusta hormonların etkisiyle biyolojik ve morfolojik değişiklikler yaşayan memeli organıdır (Kawashima ve Kawasmura, 2017).

Dişi üreme sisteminde fertilitayı sağlayan, karmaşık bir yapıya sahip olmakla birlikte oositlerin gelişip olgunlaşmasında en elverişli ortamı bulunduran, hem endokrin hem ekzokrin bir bezdir (Avila ve ark., 2016). Ovaryumun yapısı şekil 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Ovaryumun yapısı (Gartner ve Hiatt, 2000).

2.1.1. Ovaryum Anatomisi ve Fizyolojisi

3 cm boyunda, 1 cm kalınlıkta ve 1,5 cm ene sahip, bademe benzeyen şekli ile dişi üreme sisteminde bulunan ovaryumlar, pembemsi beyaz renkte bir çift organdır (Şen, 2019). Ağırlıkları 4-6 gr olan ovaryumlar pelvisin fossa ovarika denilen çukurluklarına yerleşmişlerdir. Dış kısımları tunika albuginea adı verilen sert bir bağ doku ile çevrelenmiş olup, yaş ilerledikçe bu zarın daha da kalınlaşarak sertleştiği görülmüştür (Soares ve ark., 2005).

Uterusun sağında ve solundaki duvarlarında bulunan ve periton katlantısından oluşarak ovaryumu askıda tutan mezovaryum, ovaryumlara kan damarlarını getiren peritoneal bir katlantı olup ovaryumun broad ligamentinin posterior yüzüne bağlanmasını sağlar. Ovaryumun tubal kutbu suspansory ligament tarafından pelvik duvara bağlanırken, uterin kutbu ise ovarian ligament ile uterusu bağlanır (Saladin, 2008).

Ovaryumun başlıca iki görevi vardır. Birincisi gamet üretmek, ikincisi ise steroid hormonlarının sentezlenmesidir. İlk fonksiyonu olan gamet üretiminde gelişen gamete oosit, olgunlaşan gamete ise ovum denilmektedir (Gartner ve Hiatt, 2006). İkinci fonksiyonunda steroid hormonlar yapısında östrojen ve progesteron salgılamaktadır. Östrojen; iç ve dış genital organların gelişip olgunlaşmasını ve adölesan dönemde sekonder cinsiyet karakterinin oluşmasını sağlarken, progesteron ise kadın iç genital organı olan uterin kaviteyi gebelik sürecine, meme bezlerini de laktasyona hazırlamaktadır (Şen, 2019).

2.1.2. Ovaryumun Histolojik Yapısı

Ovaryum iki kısımdan oluşur. İç kısmına medulla, dış kısmına ise korteks denilmektedir. Medulla kısmında kan damarları, sinirler ve stromal hücreler bulunurken korteks kısmı oosit içermektedir (Faddy ve ark., 1992).

Ovaryumları damarsal açıdan incelediğimizde, ovaryuma kanı getiren arterler hilustan girerek, medulla ve korteks sınırında plexus oluştururlar. Ovaryumun

venlerini oluşturanlar ise panpiniform pleksusudur. Abdominal kavitede bulunan bu venlerden soldaki renal venle birleşirken sağdaki ise vena cava inferiora bağlanır (Waugh ve Grant, 2001).

Adölesan dönemde ovarial yüzey düz bir yapıya sahipken üreme döneminde tekrarlayan ovulasyonlar yüzünden ovaryum yüzeyi düzensiz yapıdadır. Postmenapozal dönem geldiğinde ise ovaryumlar adölesan ve üreme dönemindekine göre dörtte bir küçülmüştür (Şen, 2019).

Sağlıklı bireylerin ovaryumlarında doğumla beraber ortalama 600-800 bin civarında primer oosit vardır fakat bunlardan 400 bini ovulasyona ulaşır. Gerisi ise atreziye uğrayarak dejenere olur (Dickey ve ark., 2002).

2.1.3. Ovaryum Foliküllerinin Gelişimi

Fertilite döneminde ovaryumlar farklılaşarak daha komplike organ haline gelirler. Bebeklik ve gençlik döneminde yumurtalıklar devinimsiz değildirler, sürekli olarak büyüme gösterirken bununla beraber ayrımlaşma ve bozulmalar yaşarlar (Peters, 1969).

İlk etap da overlerin gelişim süreci oosit adı altında primordiyal folikülde başlar. Birçok memelinin primordiyal folikül bulunan havuzu, ya memelilerdeki gibi embriyonun gelişimi sırasında ya da kemirgen canlılardaki gibi doğumdan sonra oluşur. Primordiyal foliküllerin olduğu bu küme dişilerde bulunan, yumurtlayabileceği oositlerin tedarik edilmesini sağlar. Hipofiz hormonlarındaki değişim üreme döngüsü sırasında kadınlarda ve primatlardaki folikül gelişimini başlatır (Balla ve ark., 2003).

Ovaryumdaki foliküllerden her döngüde seçilen bir grup folikül puberte döneminden başlayarak büyüme sürecine girer. Büyüme sürecindeki aşamalar ise primordiyal folikülden başlayarak primer, sekonder ve graaf folikülünü oluşturur (Güney, 2019).

2.1.3.1. Primordiyal Folikül

Primordiyal Foliküllere, ilk olarak gonadotropin hormonundan bağımsız bir şekilde gelişmiş halde fetal hayatın 3. ayında rastlanmaktadır (Silber, 2015). Folikül, yassı epitel folikül hücrelerine ve primer oosite sahiptir (Maheshwari ve Fowler, 2008). Bunlar korteksin içinde tek katlı folikül hücrelerinden oluşarak tunika albugineanın alt kısmında yer alırlar. Primordiyaller grup oluşturmuşlardır ve oositi sarmaktadırlar (Akıcıgil, 2020). Bu oosit yaklaşık olarak 25 µm çapa sahip ve küre şeklindedir (Koh ve ark., 2009). Ooplazmasında balbiani cisimcikleri, eser miktarda ribozom ve seyrek olarak da annulat lamelleri bulunmaktadır. Gonadotropinlerin uyarılmasından bağımsız olarak gelişim gösteren bu foliküller, mayoz 1'in profaz evresinde puberte dönemine kadar beklerler (Junqueira ve Carneiro, 2009; Zhang ve ark., 2014). Primordiyalden primer foliküle geçiş sürecinin geri dönüşü yoktur ve gelişmeye başlayan folikül ovulasyon ya da atrezi olana dek gelişimine devam etmektedir. (Kezele ve Skinner, 2003).

2.1.3.2. Primer Folikül

Yumurtalıklardaki ortalama 20'ye yakın primordiyal folikülün uyarılarak primer evreye dönüşmesi FSH (Folikül Stimulan Hormon) tarafından gerçekleştirilmektedir. Uyarılan bu foliküllerden sadece bir tanesi olgunlaşabilmektedir (Taşkın, 2005). Ergenlik döneminde overler bu foliküller ile dolmuştur (Kierszenbaum, 2006).

Primer folikül oositi, kübik granül hücrelerin tabakalanması ile oluşmuştur (Gougeon, 1996). İlk aşamayı oluştururken oositin büyümesi ile beraber etrafını çevreleyen hücreler kübik şekil alır ve böylece ortaya çıkan foliküle primer folikül denir. Oosit büyürken özel proteinler salgılanmaya başlar ve bunlar birleşerek folikül hücreleri ve oositin arasında zona pellusidanın oluşmasını sağlar. Erken primer folikül (Unilaminar primer folikül), tek tabakalı kübik hücrelerle çevrelenerek gelişen oositi tanımlamaktayken, çok katlı hücreler tarafından çevrelenen oosite ise geç primer folikül (multilaminar primer folikül) adı verilmektedir (Güney, 2019).

2.1.3.3. Sekonder Folikül

Sekonder folikül oluşurken kübik granüloza hücreler erimeye başlayarak hilal şeklinde boşluk oluşturur. Bunlara antrum denir. Antrumların içi hyalüronandan zengin folikül sıvısı ile doludur ve progesteron, östrojen ve androjen gibi steroid hormonlarını içermektedir (Bacha ve ark. 2012). Oluşan boşluklar ilk olarak küçüktür fakat bir araya gelerek büyürler (Akıncıgil, 2020).

Korona radiatayı oluşturan granüloza hücreleri zona pellusidaya komşudur ve oositi sarar. Daha sonra teka tabakası gelişip damardan zengin teka internayı ve stromaya benzer yapıda olan teka eksternayı oluşturur (Nahirney ve Ovale, 2009). Teka eksterna ile teka interna arasındaki sınır belirgin olmamasına rağmen granüloza ve teka folikülü arasındaki sınırdaki bazal membranın bulunmasından ve hücre morfolojilerinin farklılık göstermesinden dolayı belirginlik göstermiştir (Junqueira ve Carneiro, 2006).

2.1.3.4. Graaf Folikülü

Granüloza hücrelerindeki çoğalmayla birlikte folikül sıvısındaki artış çapının 2,5 cm büyüklüğe ulaşmasını sağlar. Büyüyerek olgunlaşan bu foliküle graaf folikülü denir. Tersiyer folikül olarak da bilinmektedir. Foliküller maksimum boyuta geldiğinde çoğalma aktiviteleri azalacaktır (Sadler, 2011).

Çok katlı ve damarsız yapıya sahip olan granüloza hücreleri foliküler kaviteyi çevreleyerek buraya doğru kumulus ooforus adında bir çıkıntı meydana getirir ve bu zona pellusida ile çevrili oosit içerir (Kuehnel, 2003).

Oosit foliküldeki mayoz bölünmenin ilk aşamasını gerçekleştirerek sekonder oosit olmakla birlikte döllenme olduğunda sekonder oositten ovum ve 2. polar cisimcik oluşmuştur (Akıncıgil, 2020). Oluşan bu yapılar döllenmeye kadar 2. mayoz bölünmede metafazda kalır. Ovulasyondan önce Luteinizan hormonun (LH) aniden artmasıyla mayoz bölünme uyarılır ve folikül rüptürü gerçekleşir. Ovulasyonla atılan sekonder oositin tubaya geçmesiyle ovaryumda ovulasyondan sonra geride kalan

granuloza ve teka lutein hücreleri korpus luteum yapısını oluşturur ve bu yapıda progesteron sentezi yapar (Ross ve Pawlina, 2011). Progesteron hormonu salgılatan korpus luteum; fertilizasyon gerçekleşirse ovaryumda gebelik korpus luteumu, gebelik gerçekleşmezse menstruasyon korpus luteumu oluştururken, döllenme meydana gelmediğinde ya da sona erdiğinde ise dejenere olarak korpus albicansı oluşturur (Erdost, 2016).

2.1.3.5. Atretik Folikül

Birçok folikül gelişim evresinde olgun hale geçmeden dejenere olarak işlevlerini kaybederler. Dejenerasyon sürecini takip eden folikül hücreleri büzülerek küçülür ve birbirlerinden ayrılarak otoliz olurlar. Şişen zona pellusida ve vasküler şekle gelen teka hücrelerinin yerlerini bağ dokusu alır (Eroschenko, 2013).

2.1.4. Ovaryum Embriyolojisi

Gonadlar, epitel proliferasyon ve altında yer alan mezenşimin artmasıyla oluşan uzunlamasına bir çift şişkinlik halinde ortaya çıkmaktadırlar. Primordiyal germ hücreleri yolk kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında belirir. Bu hücreler hareket ederek bağırsağın mezenteriumu üzerinden ilerleyerek primitif gonadal kabartıya gelir (Akıncıgil, 2020). Gonadal kabartıya ulaşamayan primordiyal germ hücreleri gelişemezler (Ross ve Pawlina, 2011).

Embriyoda cinsiyetin döllenme sırasında spermin taşıdığı X ya da Y kromozomu sayesinde belirlendiği bilinmektedir. XX kromozom düzenine sahip embriyoda sekonder kortikal kordonlar gelişirken medullar kordonlar gerilemektedir (Sadler, 2011).

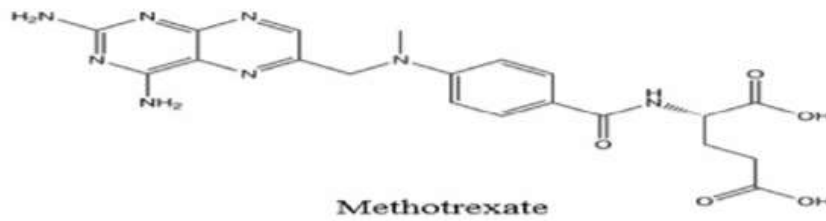
2.2. Metotreksat

Metotreksat, 1940 yıllarında geliştirilen bir folik asit antagonistidir (Chan ve Cronstein, 2002). 1950 ve 1960'lı yıllarda sıvı içermeyen, dayanıklı tümörlerin tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (Hashkes ve ark., 2013).

Metotreksat, meme ve akciğer kanseri, osteosarkom, birçok hematolojik hastalıklar, romatoid artrit, psoriasis, multiple skleroz gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Abolmaali ve ark., 2013). Ayrıca püstüler, eritrodermik formlar ve psoriatik artrit tedavilerinde de metotreksata başvurulmaktadır (Şentürk, 2016). Malign hastalıkların tedavisinde yüksek dozlarda kullanılırken, immün sistemi baskılayan hastalıklarda daha düşük dozlarda kullanılan terapötik bir ajandır (Öktem ve ark., 2006). Hücre bölünmelerini yavaşlatan bir ilaç olarak onkolojide yıllar boyu kullanım alanı bulmaktadır. Araştırmalar sonucunda oral ve intravenöz yoldan yapılan uygulamalarda metotreksatın merkezi sinir sistemi hariç tüm vücuda yayılabildiği görülmektedir (Işık ve ark., 1997). Metotreksat'ın tedavi edici ve yan etkileri kullanılan hastalarda değişebilirlik gösterebilmektedir (Widemann ve Adamson, 2006).

2.2.1. Kimyasal Yapısı

Metotreksat, 4-amino-4-deoksi-10-N-metilpteroilglutamik asit yapıya sahip bir kimyası vardır (Armağan ve ark., 2008; Sayılmaz ve ark., 2016). Metotreksatın kimyasal yapısı şekil 2.2'de gösterilmiştir. MTX, folik aside yapısal olarak benzerlik göstermektedir ve para-aminobenzoik asit ile pteridin grubuyla yapısal olarak yer değiştirebilir (Padmanabhan ve ark., 2009).



Şekil 2.2. Metotreksatın kimyasal yapısı (Sönmez ve ark., 2016).

2.2.2. Metotreksatın Etki Mekannizması

MTX, transformilaz enzimi olan amino-imidazol karboksamit ribonükleotid (AICAR) ile beraber pürin ve pirimidin sentezlerinde inhibe ettiği birçok enzim bulunmaktadır ve büyük oranda hücre bölünmesini baskılamaktadır. Bunun sonucunda novo pürin nükleotid sentezini engellemekle birlikte AICAR'nin çoğalması MTX'in anti-inflamatuar etkisine büyük katkı sağlayan adenozinin hücre içine birikmesi sonucunu ortaya çıkarır (Hashkes ve ark., 2013).

Bazı çalışmalarda MTX'in oksidatif stresin dokulardaki lipitleri ve DNA hasarını oksit durumuna getirerek hücre ölümleriyle ilgili gen ekspresyonlarını fazlaştıran hücre ölümünde rol aldığı ifade edilmektedir (Abd-Allah ve Sharaf El-Din, 2013).

Hızlı bölünen neoplastik hücrelerin tedavisinde en etkili olan birçok kemoterapötik ajan, yumurtalık fonksiyonları üzerinde kalıcı etkilere sahiptir. Bu da amenore, kısırlık ve hatta menopoza yol açabilmektedir. Bu etkiler, alkilleyici ajanlarda daha büyük ve MTX gibi antimetabolitlerde daha azdır (Hortu ve ark., 2020).

Karri'nin 2011 yılında yaptığı çalışmada; MTX'in etki mekanizmasını ortaya çıkarmak için yumurtalık, rahim, serviks ve vajinanın histolojisini incelemiştir. Çalışmanın sonuçları, doza bağlı bir tarzda MTX'in yumurtalıkta preantral ve antral foliküler büyümeyi kısıtladığını göstermektedir.

2.2.3. Farmakokinetik ve Farmakodinamik Etkileri

MTX, 25 mg/kg dozundan daha düşük oranlarda oral olarak uygulandığında gastrointestinal sistem tarafından tama yakın emilirken uygulanan doz arttığında bu oran azalacağı için intravenöz olarak uygulama tercih edilmektedir. İntravenöz uygulamadan sonra MTX plazmadan 3 kademedede elimine edilir. İlk kademedede hızlı bir dağılım görülürken, ikinci kademedede böbreklerdeki klirens 2-3 saatlik yarı ömür

sürmektedir. Üçüncü kademede ise yaklaşık 8-10 saatlik bir yarılanma ömrü bulunmaktadır (Brunton ve ark., 2006).

MTX yapı olarak folik aside benzediği için hücre içerisine indirgenmiş folat taşıyıcı ile taşınmaktadır (Tian ve Cronstein, 2007). Değişebilen oranlarda glutamat kümeleri olan bir çok metabolitten oluşan MTX, hücre içerisine girmesiyle fazla olan glutamat kısımları folilpoliglutamat sentaz (FPGS) enzimiyle MTX poliglutamatlarına dönüştürülürler (Gangjee ve ark., 2002). Doğal MTX, MTX poliglutamat ile karşılaştırıldığında hedef enzimlerde daha fazla afinitenin ve MTX etkinliğinin arttığı düşünülmektedir (Assaraf,2006).

2.2.4. Metotreksatın Yan Etkileri

MTX, timidilatlarla beraber nükleik asit ve protein sentezlerini baskılamaktadır. Bu sayede malign ve kanserli olmayan bazı hücrelerin büyümelerini ve çoğalmalarını önleyerek hızlı bölünen hücrelerde toksik etkiler oluşturmaktadır. Bazı sonuçlar MTX'in nörolojik, nefrolojik, ürolojik alanda ve iskelet büyümesinde toksik etkilerinin olduğu tanımlanmıştır (Karri, 2011). Oluşan yan tesirlerin birçoğunda MTX'in etkilemesi sonucu ortaya çıkan oksidatif stresin etkili olabileceği belirtilmiştir (Caron ve ark., 2009; Öktem ve ark., 2006; Uygur ve ark., 2019).

Tablo 2.1. Metotreksat tedavisi sırasında karşılaşılan yan etkiler (Şentürk, 2016).

Sık Karşılaşılan Yan Etkiler	Ciddi Yan Etkiler
Gastrointestinal sistem problemleri	Hepatotoksisite
Stomatit ve ağızda yara	Pulmoner değişiklikler
Karaciğer fonksiyonlarında bozulma	Enfeksiyon
Ekstremiteler demaküler punktant döküntü	Kemik iliği süpresyonu
Santral sinir sistemi semptomları	Lenfoproferatif hastalıklar
Alopesi	Nefrotoksisite
Ateş	
Hematolojik Değişiklikler	

Dubey ve ark. (2016), Hindistan’ da yaptıkları bir çalışmada uzun bir süre MTX kullanan 204 romatoid artrit hastasını incelemişler ve ortaya çıkan hepatotoksisitenin %6, hepatik fibrözün %2 olduğunu, biyopsi ile tanılanmışlardır. Yine bu çalışmada anemi ile lökopeni oranının %5,4 olduğu ortaya çıkmıştır.

2.2.5. İlaç Etkileşimi

MTX’ in metabolizmasını etkileyen birden fazla ilaç bulunmaktadır. Bunlar MTX’ in plazma düzeyinde toksik oranda artışına neden olurlar (Şentürk, 2016).

Tablo 2.2. Metotreksat düzeyini arttıran ilaçlar (Şentürk, 2016).

NSAİ İlaçlar	Antibiyotikler	Diğer İlaçlar
Solisilatlar	Trimetoprim-Sulfametaksazol	Barbitüratlar
Naproksen	Sulfanomidler	Kolşisin
İbuprofen	Penisilinler	Dipiradamol
İndometazin	Tetrasiklinler	Fenitoin
Fenilbütazon	Siprofloksazin	Probenesid
Sulfonilüre		Tiazid diüretikler
		Furosemid

NSAİ: Non-steroidal Antienflamatuar

2.3. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar

Dış orbitalinde bir ya da daha fazla çiftlenmemiş elektron barındıran vücutta oluşan kimyasal ürünlere serbest radikaller denilmektedir (Halliwell, 1994; Young ve Woodside, 2001). Serbest radikallerin kararsız yapıları hem organik hem de inorganik maddelerle reaksiyona girmelerine ve oksijen bulunan yapılarda reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasına sebep olurlar. Yapılan çalışmalar, kemoterapötik ürünlerin hem in vitro hem de in vivo ortamlarda ROS üretimine sebep olduğunu göstermiştir (Crohns ve ark., 2009; Simone ve ark., 2007; Weijl ve ark., 1997; White ve ark., 2006).

ROS’lar canlılık süreleri kısa olsa da hücredeki bileşenlerle proteinler, lipidler, karbonhidratlar, nükleik asitlerle etkileşime girerek kromozomlarda kırılmalara, DNA hasarlarına, oksidasyona, malign değişimlere, mutasyonlara hatta hücre

ölümlerine neden olabilen zararlı bileşiklerdir (Schoenberg ve Beger, 1990; Sinclair ve ark.,1990). Oksidatif denge şekil 2.3’de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Oksidatif denge (Özcan ve ark., 2015)

Hücrelerde meydana gelen ROS’lar, antioksidanlar tarafından yok edilir. Fakat bazen yok etme aşamasında antioksidanların bile yetersiz kalabileceği kadar çok ROS oluşmuş olabilir. Bu duruma oksidatif stres denilmektedir ve bunun sonucunda doku hasarları meydana gelmektedir (Akkuş, 1996).

Son zamanlarda antikanser ilaçlarla yapılan toksisite çalışmalarında oksidatif stress üzerinde durulmaktadır. Bu çalışmamızda da kullandığımız MTX’in geniş kullanım endikasyonlarına karşılık özellikle nefrotoksisite ve hepatotoksisite gibi yan etkileri karşımıza çıktığı için reaktif oksijen türlerinin meydana getirdiği oksidatif hasar sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Bu nedenle MTX toksisitesinden korunmak amacıyla tedavi sırasında antioksidanlarla birlikte kullanılması gerektiği sonucu ortaya çıkmaktadır (Uygur ve ark., 2019). Olas ve ark. (2001), yaptıkları bir çalışmada ROS’ların azalmasında resveratrolün etkisinin olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda bu bilgiler doğrultusunda MTX’in hasar oluşturuca etkilerine karşı koruyucu olarak resveratrolü kullanılmaktadır.

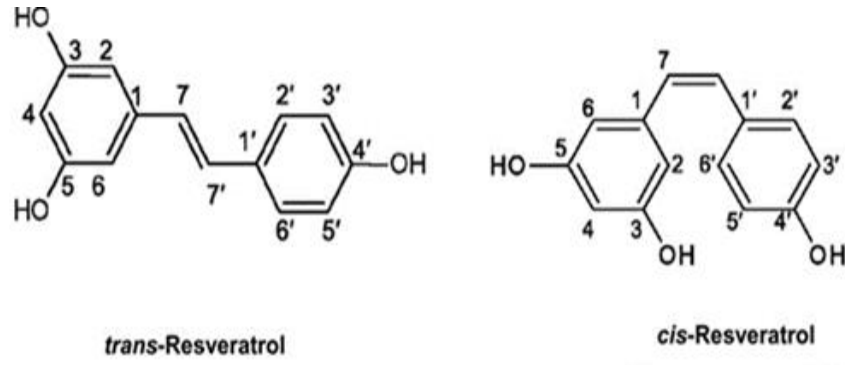
2.4. Resveratrol

Polifenol bir bileşik olan resveratrol, sağlık sektöründe dikkatleri üzerine çeken, yaşlanma karşıtı özelliği ortaya konulan güçlü bir antioksidandır (Baxter, 2008). Natürel yapıda bir stilben olan resveratrolün sentezi stilben sentaz enzimi tarafından yapılmaktadır (Mazza, 1995).

72 farklı bitkide bulunabilen resveratrolün, genellikle bitki meyvelerinin etli kısımlarında üretilmezken meyvelerinin kabuk ve yapraklarının üst kısımlarındaki stilben sentazdan üretimleri sağlanmaktadır. Üzüm, çilek, dut, yaban mersini, okaliptüs, zambak, alaçam, yer fıstığı kökü gibi bitkilerde stilben sentaz geni bulunmaktadır (Das ve Das, 2007). Patojenlerin saldırıları, ultraviyole ışınlar ve radyasyon, ağır metal varlığı, ozon, hava kirlilikleri ve iklim değişiklikleri bitkileri olumsuz etkilerken, koruyucu olarak stilben sentaz geni aktif hale gelerek resveratrolün üretiminin artırılması ile antioksidan görevi görmesi sağlanır (Ather ve ark., 2007).

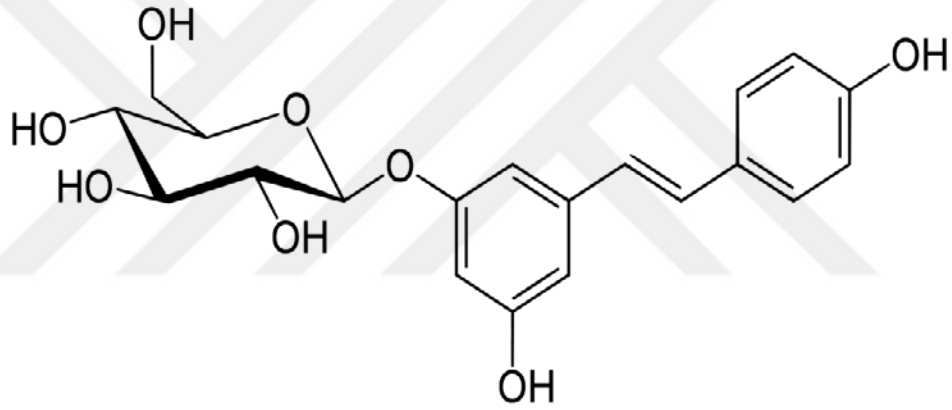
2.4.1. Resveratrolün Yapısı ve Fiziksel Özellikleri

Polifenolik bileşik olan resveratrol iki fenol halkasının bir stiren çift bağ ile bağlanması sonucu oluşur ve 3, 4, 5- trihidroksistilben olarak adlandırılır (Kuršvietienė ve ark., 2016). Formülü $C_{14}H_{12}O_3$ ile gösterilirken; yağda, suda, aseton ve metanolde kolay çözünebilen, 228,25 g/mol molekül ağırlığına sahip bir antioksidandır (Haneke, 2002). Resveratrolün trans- ve cis- olmak üzere biyolojik etkileri farklı olan iki formu mevcuttur (Pallas ve ark., 2013; Zhao ve ark., 2013). Resveratrolün trans ve cis yapıları şekil 2.4’de gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Resveratrolün trans ve cis yapıları (Sales ve Resurreccion, 2014).

Resveratrolün ayrıca trans ve cis formlarından farklı olarak glikozid yapıda piceid formu da bulunmaktadır ve şekil 2.5’de gösterilmektedir (Yikrazuul, 2010).

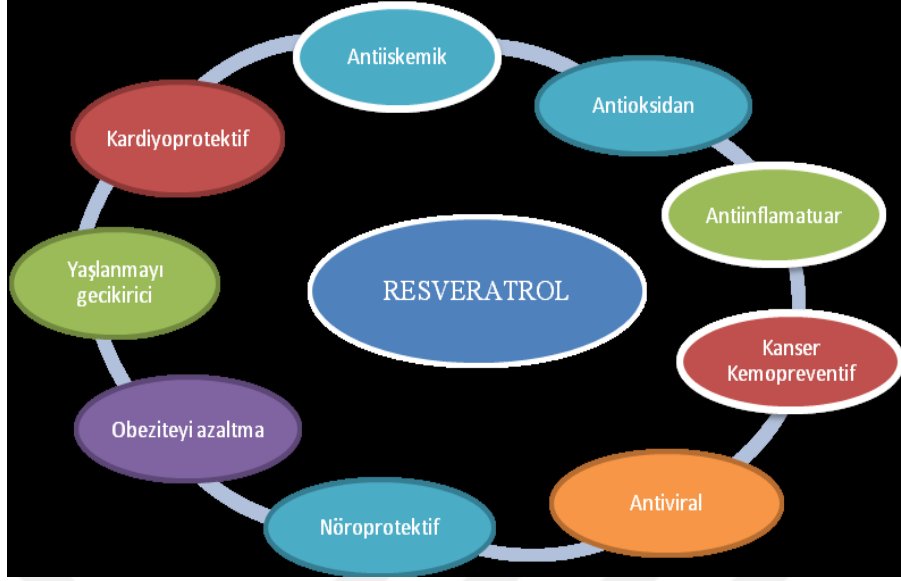


Şekil 2.5. Resveratrolün piceid formu (Yikrazuul, 2010)

Üzüm ekstraktlarında da bulunan ışıktan korundukça sabit kalan trans-resveratrol izomeri çalışmalarda diğer formlarına göre daha sık kullanılmaktadır (Das ve ark., 1999; Fremont, 2000). Dokulara taşınan ve hızlı emilen resveratrolün büyük bir kısmı idrar yolu ile atılmaktadır (Bertelli, 1998).

2.4.2. Resveratrolün Biyolojik Etkileri

Resveratrol oldukça geniş bir etki alanına sahiptir. Yapılan birçok araştırma ve çalışma alanları şekil 2.6’da özetlenmektedir (Karabulut, 2008).



Şekil 2.6. Resveratrolün etkileri (Karabulut, 2008).

Yapılan çalışmalar resveratrolün kalp- damar sistemi üzerinde faydalarının olduğunu, vücuttaki tümörlerin büyümesini yavaşlattığını ve antikanserojen özelliğini ortaya koymaktadır (Rocha-González ve ark., 2008). Bununla beraber resveratrol midede gastrit, ülser ve kanserin gelişmesine sebebiyet veren helicobacter pylorinin oluşumunu ve memelilerde malign hücrelerin gelişimini önlediğini göstermiştir (Mahady ve Penland, 2000).

Bazı çalışmalar ise kalp kaslarında, böbreklerde ve beyinde profilaktik özelliğe sahip olduğunu göstermektedir (Giovannini ve ark., 2001). Fransa’da yağ oranı yüksek gıdalarla beslenilmesine rağmen kırmızı şarap fazla tüketildiği için resveratrol tüketiminin arttığı, bunun da kalp hastalıklarına daha düşük oranda rastlanılmasına sebep olduğu şeklinde ilişkilendirilmektedir (Kopp, 1998). Colica ve ark. (2018) yaptıkları sistematik derleme çalışması ile resveratrolün kardiyoprotektif, nöroprotektif, kemopreventif ve antioksidan ajan olarak işlev gören iyileştirme ve önleyici potansiyeli hakkındaki en önemli bilimsel verileri özetlemişlerdir.

2.4.3. Farmakolojik Özellikleri

İlk olarak 1940’lı yıllarda Takaoka karaca ot kökünden (Veratrum grandiflorum) sonrasında ise 1960’larda Japon madımağı kullanarak oluşturulan

resveratrol; gonorede, fungal hastalıklarda ve cilt iltihaplarında tedavi maksadıyla kullanılmıştır (Nonomura ve ark., 1963). 1990'lı yıllarda ise şarapta bulunarak kardiyoprotektif özelliği ortaya çıkarılmıştır (Bertelli ve ark., 1995).

Farmakolojik olarak resveratrol geniş kullanım alanına sahiptir. Bu alanlardan analjezik, antioksidan, anti-aging, antiinflamatuvar etkiler en fazla bilinenler arasındadır (Cottart ve ark., 2010; Das ve ark., 2008). Ayrıca meme, mide, karaciğer, serviks, ovaryum dokularındaki kanser hücrelerinin proliferasyonunu baskılayan antikanser etkisi de bilinmektedir (Aggarwal ve ark., 2004; Nobili ve ark., 2009).

Düşük biyoyararlanıma sahip resveratrolü sağlam kişiler kullandığında plazmalarındaki resveratrol maksimum hıza 30-60 dakikada ulaşırken (Walle ve ark., 2004), sıçanlarda 120 dakikada kalp, 60 dakikada böbrek ve 30 dakikada ise karaciğer dokusunda maksimum derişim gösterdiği görülmüştür (Bertelli ve ark., 1996).

2.4.4. Resveratrolün Antioksidan Etkileri

Doğal bir polifenol olarak bilinen resveratrolün öne çıkan antioksidan özelliğinin yağların yükseltgenmesine bağlı apoptozisi önlemesine bağlı olduğu bilinmektedir (Frankel ve ark., 1993; Wang ve ark., 2002). İn vitro şartlarda potansiyel olarak antioksidan etkisinin olmamasına rağmen canlılarda güçlü bir antioksidan özelliğinin olduğu bildirilmiştir (Mukherjee ve ark., 2010). Antioksidan etkisi C vitamininden 30 kat, E vitamininden ise 50 kat daha fazla olduğu (Celotti ve ark., 1996), ayrıca trombositopeniyi kontrol altına aldığı ve arteriosklerozu engellediği bilinmektedir (Weindruch, 2003).

Resveratrol üzerine yapılan çalışmalarda nitrik oksit (NO) birleşimini uyarıp indüklenebilir nitrik oksit miktarını arttığı saptanmıştır. Resveratrol NO düzeylerini doza bağlı arttırınca, artan doza bağlı olarak hücre zedelenmelerinde azalmalar görülmüştür (Giovannini ve ark., 2001; Hung ve ark., 2000). Arteria cerebri mediyayı oklüde ederek oluşturulan iskemi beyinde nekrotik alan oluşturmuş ve resveratrolün

de bu oluşan alanı küçülttüğü bildirilmiştir. Resveratrolün bunları bir çok etkileri ile beraber özellikle antioksidan özelliği sayesinde yaptığı ileri sürölmektedir (Huang ve ark., 2001).

Ortega ve Duleba 2015 yılında yaptıkları çalışmada resveratrolün yumurtalıklara olan etkilerini sıçanlar üzerinde incelemişler ve resveratrolün foliküler rezervi arttırdığını ve yumurtalık ömrünü uzattığını bildirmişlerdir.

2.4.5. Resveratrolün Yan Etkileri

Hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda olumsuz yan etkilere rastlanmazken (Johnson ve ark., 2011), insanlar üzerinde yapılan çalışmalar bunu söylemek için oldukça azdır (Tome-Carneiro ve ark., 2013). Hangi miktarlarda kullanıldığında ortaya çıktığı bilinmeyen, açığa kavuşmayan yan etkilerin arasında en çok uykuya eğilim, baş dönmesi, oksipital ve frontal baş ağrıları, bacaklarda kas ağrıları görölmektedir (Cottart ve ark., 2010). Resveratrolün uzun süreli kullanımı için mutlaka güvenliği değerlendirilmeli, özellikle meme kanseri, over ve rahim kanserlerinde resveratrolün östrojenik aktivasyonu bilinmediği için bu gibi hastalıklarda takviyelerinden kaçınılmalıdır (Walter., 2001).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Deney Hayvanları

Deney hayvanları, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Deneysel Araştırma Merkezi'nden temin edildi ve deneysel çalışmamız yine aynı yerde gerçekleştirildi. Bu çalışmada ağırlıkları 240-360 gr arasında değişen Wistar Albino cinsi toplam 42 adet dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar standart ışık (12 saat gün ışığı/ 12 saat aydınlık), ısı (25°C) ve yeteri kadar ad libitum su ve yem (Yem Kurumu Standart Sıçan Yemi) ile toplam 7 gün süreyle beslendi ve deney toplam 8 günde tamamlandı.

3.1.2. Etik Kurul Onayı

Deneye, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 18.09.2019 tarihli ve 545 no'lu kararı doğrultusunda başlandı.

3.1.3. Kullanılan İlaç ve Kimyasallar

Metotreksat

Resveratrol

3.2. Yöntem

3.2.1. Deney Planı

Çalışmamızda her biri 6 adet dişi sıçandan oluşan 7 ayrı deney grubu oluşturuldu. Gruplar;

Grup I: Kontrol,

Grup II: Metotreksat (1. gün) (15 mg/kg i.p. MTX),

Grup III: Metotreksat (1.+ 3. gün) (15 mg/kg i.p. MTX),

Grup IV: Metotreksat (1.+ 3.+ 5. gün) (15 mg/kg i.p. MTX),

Grup V: Metotreksat (1. gün) + Resveratrol (7 gün süresince) (15 mg/kg i.p. MTX + 20 mg/kg/gün RES),

Grup VI: Metotreksat (1. + 3. gün) + Resveratrol (7 gün süresince) (15 mg/kg i.p. MTX + 20 mg/kg/gün RES),

Grup VII: Metotreksat (1. + 3. + 5. gün) + Resveratrol (7 gün süresince) (15 mg/kg i.p. MTX + 20 mg/kg/gün RES).

Sıçanlara, ilk gün II., III., IV. ve V. gruplara 15 mg/kg intraperitoneal yoldan tek doz MTX uygulanırken; V., VI., VII. gruplara ise MTX uygulamasından 1 saat önce antioksidan olarak kullandığımız Resveratrol 20 mg/kg dozunda oral gavaj yolu ile verildi. III., IV., VI. ve VII. gruplara 3. gün, IV. ve VII. gruplara ise 5. gün olmak üzere tekrarlayan dozlarda MTX uygulaması yapıldı (Kocaman ve Çolakoğlu, 2013). Resveratrol verilecek grupların (V, VI, VII) tedavi prosedürü 7 gün boyunca sürdü ve son uygulamayı takip eden 24 saat içinde yani 8. gün hayvanlar gruplar halinde i.m. olarak uygulanan %10'luk Ketamin HC1 (Ketalar; Alfamin) ve %2'lik Xylazine (Alfazin) anestezisi altında cerrahi ekzanguinasyon ile kurban edildi. Deney planı tablo 3.1'de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. Deney planı

Deney Grubu	Hayvan Sayısı	Doz	Deney Süresi
I. Kontrol	6	-	7 gün
II. MTX (1. Gün)	6	15 mg/kg/gün i.p. MTX	7 gün
III. MTX (1.+3. Gün)	6	15 mg/kg/gün i.p. MTX	7 gün
IV. MTX (1.+3.+5. Gün)	6	15 mg/kg/gün i.p. MTX	7 gün
V. MTX (1. Gün) +RES(7 gün süresince)	6	15 mg/kg/gün i.p. MTX + 20 mg/kg/gün RES	7 gün
VI. MTX (1.+3. Gün) +RES(7 gün süresince)	6	15 mg/kg/gün i.p. MTX + 20 mg/kg/gün RES	7 gün
VII. MTX (1.+3.+5. Gün) +RES(7 gün süresince)	6	15 mg/kg/gün i.p. MTX + 20 mg/kg/gün RES	7 gün

3.2.2. Kan ve Doku Örneklerinin Toplanması

Deneyin 8. günü ratlardan anestezi altında kesim öncesi intrakardiyak yöntemle alınan kan örnekleri Comet Testi için K3EDTA'lı tüplere toplandı. Daha sonra ratlar servikal dislokasyon yöntemiyle ötenazi edilerek nekropsileri yapıldı. Pelvik bölge açılarak ovaryum örnekleri alındı. TAS ve TOS analizleri için doku numuneleri alınarak analizin yapılacağı tarihe kadar -20 °C'de saklandı. Histolojik incelemeler için ovaryum doku örnekleri %10'luk nötral formaldehit çözeltisi içinde tespit edilip, rutin doku takip yöntemlerinden sonra parafine bloklandı. Histolojik incelemeler için Hematoksilen-Eozin (H-E) ve TUNEL boyama yöntemi kullanıldı.

3.2.3. Doku Takip Çalışmaları

En az 48 saat %10 nötral formalin solüsyonu içerisinde fiksasyonu sağlanan doku örnekleri, bir gece akan suda yıkama işlemine tabi tutulduktan sonra sırasıyla aşağıdaki işlemlerden geçirildi.

3.2.3.1. Doku Örneklerinde Histokimyasal Çalışmalar

a. Suyun Dokulardan Uzaklaştırılması (Dehidratasyon)

Dokular dereceli alkollerde sırasıyla belirtilen sürelerde bekletildi.

Alkol derecesi	Süre
%50	1 saat bekletildi.
%70	1 saat bekletildi.
%80	1 saat bekletildi.
%90	1 saat bekletildi.
%96	1 saat bekletildi.
%100	1 saat bekletildi.
%100	1 saat bekletildi.
%100	1 saat bekletildi.

b. Şeffaflandırma

Ksistolde 3-10 dk (Her 3 dk da bir kontrol edilerek işlem sonlandırıldı).

c. Parafin Emdirme

Sıvı parafin (60 °C etüvde) 30 dk bekletildi.

Katı parafin (oda sıcaklığında) 1 gece bekletildi.

d. Gömme

Sert parafin, içerisine gömülen dokularla bloklar halinde hazırlandı.

e. Kesit alma

Hazırlanan parafin bloklardan rotary mikrotom kullanılarak 4 mikron kalınlığında kesitler alındı.

Kesitlerin Hematoksilen-Eozin (H-E) ile Boyanması

Histokimyasal değerlendirme için preparatlara Hematoksilen- Eozin ile rutin boyama yapıldı. Uygulanan boyama protokolü sırasıyla aşağıda belirtilmiştir.

<u>Yapılan işlem</u>	<u>Süre</u>
1. Deparafinizasyon	
A) 60°C etüv	45 dk bekletildi.
B) Ksilol I	20 dk bekletildi.
C) Ksilol II	20 dk bekletildi.
2. Alkol serisi	
A) %96	10 dk bekletildi.
B) %90	10 dk bekletildi.
C) %80	10 dk bekletildi.
D) %70	10 dk bekletildi.
3. Distile Su	5 dk bekletildi.
4. Hematoksilen	2 dk bekletildi.
5. Çeşme suyu	5 dk bekletildi, sonra 2-3 tur akan suda yıkandı.
6. Asit alkol	3-4 sn
7. Çeşme suyu	5 dk bekletildi, sonra 2-3 tur akan suda yıkandı.
8. Eozin	2 dk bekletildi.
9. Çeşme suyu	5 dk sonra 2-3 tur akan suda yıkandı.
10. %70- %80- %90 alkol serisinden sırasıyla batır çıkar yaparak geçirildi.	
11. Ksilol	1 gece bekletildi.
12. Kapatma (Entellan)	

3.2.3.2. Doku Örneklerinde İmmünohistokimyasal Çalışmalar

Fiksasyonu sağlanan dokulara yukarıda sayılan doku takip işlemleri sırasıyla uygulanarak dokular parafine gömüldü. Rotary mikrotom ile lizinli lama 4 µm kalınlığında seri kesitler alınarak immünohistokimyasal boyama prosedürü uygulandı.

İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü

TUNEL Boyama Yöntemi

Sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı.

1. 4 µm kalınlığında elde edilen parafin kesitler etüvde 60°C etüvde 1 saat bekletildi.

2. Deparafinizasyon işlemi için Ksilol-1'de 10 dk, Ksilol-2'de 10 dk bekletildi.

3. Dehidratasyon işlemi için sırasıyla,

a. %100'lük alkolde 5 dk bekletildi.

b. %96'lık alkolde 5 dk bekletildi.

c. %90'lık alkolde 5 dk bekletildi.

d. %80'lik alkolde 5 dk bekletildi.

e. %70'lik alkolde 5 dk bekletildi.

4. Üç ayrı PBS solüsyonunda 5'er dk bekletildi.

5. Lam hidrofobik işaretleme kalemi (PAP Pen kalem, Immunopen) ile doku örneklerinin yeri belirlendikten sonra kesitler oda sıcaklığında 20 dakika 20 µg/ml Proteinaz K ile muamele edildi.

6. Üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.

7. Dokuların üzerini kaplayacak şekilde ve diğer dokularla karışmamasına dikkat edilerek nemli ortamda %3'lük H₂O₂ solüsyonu damlatıldı. 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.

8. Üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.

9. Dengeleyici tampon (equilibration buffer) ile oda ısısında 30 dk bekletildi.

10. Kesitler biotinli nükleotid karışımı (biotinylated nucleotide mix), rTdT enzimi ile dengeleyici solüsyondan oluşan rTdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) reaksiyon karışımı ile 37 °C'de 1 saat inkübatörde bekletildi.

11. Üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.

12. Stop Buffer'da 5 dk bekletildi.

13. Conjugate solüsyonunda 30 dk bekletildi.

14. Üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.
15. Dab krmojenle 15 dk muamele edildi.
16. Distile su da yıkama yapıldı.
17. Metil green ile 5 dk zıt boyma yapıldı.
18. Çeşme suyunda 5 dk yıkandı.
19. Sırasıyla %70, %80, %90 ve %100'lük alkol serilerinden batır çıkar yapılarak geçirildi.
20. Kesitler şeffaflaşana kadar ksilolde bekletildi.
21. Entellan kullanılarak kapama yapıldı.

Ovaryum dokusu kesitlerinde kontrol ve deney gruplarında histokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemler kullanılmış ve ovaryum dokusundaki hasarlanma-iyileşme değerleri; kamera destekli binoküler ışık mikroskobu (ECLIPSE Ni-U, Nikon, Tokyo, Japan) ile incelenmiştir.

3.2.4. Biyokimyasal Çalışmalar

-20 °C'de saklanan herbir gruba ait ovaryum dokuları oda sıcaklığına getirildikten sonra ayrı ayrı tartılarak 50 mM fosfat tamponu (ph 7.4) ile 10 kat dilüe edildi. Janke&Kuntel Ultraturrax T-25 (Almanya) marka doku parçalayıcı ile ve daha sonra UW-2070 Bandeun Electronic (Almanya) marka sonikatör ile muamele edilerek homojenizasyon tamamlandı. Doku örnekleri soğutmalı santrifüj ile 10.000 devir/dk, 10 dk. santrifüj edildi ve süpernatanı alınarak ependorf tüplere aktarıldı.

Elde edilen süpernatanalarda, Rel Assay Diagnostic Assay kitleri ve MultiskanGO (ThermoFisher Sci., Waltham, Massachusetts, USA) mikropilaka okuyucu kullanılarak spektrofotometrik yöntemle TAS (Total Antioxidant Status) ve TOS (Total Oxidant Status) parametreleri çalışıldı.

Total Antioksidan Kapasitesi (TAS)

Tüm deney gruplarına ait elde edilen doku homojenizatlarında ticari olarak alınan TAS kitleri ile spektrofotometrik protokol uygulanarak gerçekleştirildi. ABTS

(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) temelinde çalışan spektrofotometrik olarak ölçülen kolorimetrik bir metottur. Toplam antioksidan durumunu belirtmek için numunede bulunan antioksidanlar kit içeriğinde bulunan ABTS radikallerinin indirgenmesine sebep olarak ABTS'in koyu mavi-yeşil renginin kaybolmasına neden olur. Bu amaçla spektrofotometrede 660 nm absorbansında yapılan okuma ile toplam antioksidan miktarı belirlenir. Bu analiz stabil antioksidan bir solüsyon olan Trolox (Vit E analogu) ile kalibre edilir ve Trolox eşdeğeri (mmol Trolox Equiv/L) olarak ifade edilir (Erel, 2004).

Total Oksidan Kapasitesi (TOS)

Tüm deney gruplarına ait elde edilen doku homojenizatlarında ticari olarak alınan TOS kitleri ile spektrofotometrik protokol uygulanarak gerçekleştirildi. Bu test 530 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülen kolorimetrik bir metottur. Toplam oksidan durumu belirlenmede ticari olarak temin edilecek kitin çalışma prensibi şu şekildedir. Numunedeki oksidanlar demir iyon şelatlayıcı kompleksi okside eder. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamı içinde bol miktarda mevcut olan güçlendirici moleküller ile uzatılır. Ferrik iyon, bir asidik ortam içinde kromojen renkli bir kompleks yapar. Rengin yoğunluğu numunede olan oksidan miktarı ile doğru orantılıdır. Bu tahlil H₂O₂'le kalibre edilir ve sonuçlar H₂O₂ eşdeğeri (µmol H₂O₂ Equiv/L) olarak gösterilir (Erel, 2005).

Oksidatif Stres İndeks (OSI)

Oksidatif stres derecesinin bir indikatör parametresi olan Oksidatif Stres İndeksi; Total Oksidan Seviye (TOS – Birimi µmol H₂O₂ Eqv. / L) / Total Antioksidan Seviye (TAS – Birimi µmol Trolox equivalent/L) şeklinde bölünerek (OSI - Birimi AU) hesaplandı.

3.2.5. Comet Assay

3.2.5.1. Comet Analizi İçin Kullanılan Çözeltiler

Lizis Solüsyonu (500 ml stok solüsyon)

2,5 M NaCl,
100 mM EDTA,
10 mM Trizma base,
Tartılıp distile su ile 500 ml'ye tamamlandı.
100 ml çalışma solüsyonu:
%1 Triton X-100 1ml
%10 DMSO 10 ml

Alkali Elektrophorez Tamponu (300 mM NaOH/1mM EDTA)

500 ml elektrophorez tamponu:
300 mM NaOH
1 mM Na₂EDTA karıştırıldı. Distile su ile hacim 500 ml'ye tamamlandı
(pH> 13)

Nötralizasyon Tamponu

100 ml Nötralizasyon tamponu:
400 mM Tris HCL'in distile su ile hacmi 100 ml'ye tamamlandı (pH 7,4).

STOK PBS (1 litre)

Na₂HPO₄,
KCl,
KH₂PO₄,
NaCl,
Tris HCl,

Stok PBS için uygun oranlarda karıştırılıp hacmi distile su ile 1 litreye tamamlandı.

NMA

%1,5 NMA (75 mg NMA, 5 ml 10X PBS içinde)

LMA

%0,75 LMA (37,5 mg LMA, 5ml 10X PBS içinde)

3.2.5.2. Lamaların Hazırlanması

Lamlar sıcak zeminde ısıtıldı ve sıcak kalması sağlandı. 50 mg (0,05 gr) normal erime noktasına sahip agaroz (NMA) + 5 ml 1/10 dilüe edilmiş PBS de eritildi. Kabarcık kalmayınca kadar kaynatıldı ve 60 °C suda bekletildi. NMA'dan her bir lama 100 µl dökülerek lama froti şeklinde yayıldı ve donması için soğuk yüzeyde bekletildi.

3.2.5.3. Deneyin Yapılışı

Comet analiz çalışması için, 0,5 ml histopaque 1077 + 0,5 ml tam kan yavaş yavaş ilave edildi. 2100 rpm'de 30 dk oda sıcaklığında santrifuj edildi. Santürlüj sonrasında tüpte oluşan iki tabaka arasındaki bulanık kısımdan 500 µl çekildi ve 1/10 dilüe PBS (fosfat tamponu) ilave edilerek 1600 rpm 10 dk tekrar santürlüj edildi. Her seferinde süpernatant atıldı, pelet alındı. Hücreler çok yoğun ise 1/10 PBS ile yeniden sulandırıldı. Daha sonra, 40 mg (0,04 gr) LMA + 4 ml 1/10 dilüe PBS de eritildi, kaynatıldı, 37 °C su içine alındı. Hücrelerden 10 µl alındı ependorf içine yerleştirildi ve üzerine 90 µl low melting agar (LMA) eklendi. Bu hazırlanan karışımdan 80 µl alınarak daha önceden normal melting agarla (NMA) kaplanmış lamlara yerleştirildi ve üzeri lamelle kapatılarak 15 dakika +4 °C de bekletildi. 15 dakikanın sonunda lameller atılıp, lizis solüsyonuna konulup 60 dakika +4 °C de bekletildi. 60 dakikanın bitiminde, lamlar soğuk elektroforez tamponu ile dolu olan tanka yerleştirildi. Lamlar elektroforezin içine akım yönünde yerleştirilmiştir. Lamlar soğuk elektroforez

tamponu içinde karanlık ortamda +4 °C de 30 dk bekletilmiştir. Bu işlemden sonra, 300 mA-25 V da 25 dk elektroforez tankında yürütme işlemi yapıldı. İşlem sonrası elektroforezden lamalar çıkarıldı, kağıt havlu üzerine alındı ve nötralizasyon tamponundan her lama 5'er ml dökülerek nötralizasyonu için beklendi. Daha sonra, hücreleri içeren agaroz jeller yıkanmadan oda sıcaklığında bir saat kurumaya bırakıldı. Hazırlanan lamalar 60 µl Etidiyum bromür ile boyanarak okuma işlemi için hazırlandı. Okuma işlemi karanlık ortamda floresan ışık altında yapıldı. Her numune çift olarak değerlendirildi.

3.2.5.4. Görüntü Analizi

Numune başına 100 adet hücre floresan mikroskobu altında (Olympus BX 50, Japan) değerlendirildi. 40X'de skorlama yapıldı (Etidiyum bromür için floresan mikroskop, 488 nm dalga boyuna getirildi. Değerlendirilen her slayt kodlandı).

DNA kırıkları 5 kategoride değerlendirildi:

0= Hasarlanmamış hücreler,

1= En az hasarlanmış hücre,

2= Orta hasarlanmış hücre,

3= Maksimumda az hasarlanmış hücre,

4= Maksimum kuyruk uzunluğuna sahip olan hücreler ve maksimum hasara uğramış hücreler.

Her numunedeki hasarlanma derecesi 0-4 arası skorlandı ve böylece her numune için comet skoru elde edildi.

3.2.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler IBM SPSS 20.0 programı kullanılarak yapıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Histolojik analizde yarı kalitatif değerlendirme için Kruskal-Wallis testi kullanıldı. İkili grup karşılaştırmaları için parametrik olmayan Mann-Whitney U testi kullanıldı. Comet testi, TAS ve TOS analizlerinde gruplar arasında karşılaştırma için tek yönlü ANOVA (post hoc Tukey testi) kullanıldı. 0.05'in altındaki p değerleri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Histolojik Parametreler

Histokimyasal Bulgular

Kontrol grubuna ait (Grup I) ovaryum doku kesitlerinde normal histolojik yapılar gözlemlenmişken, kısmen de olsa bazı kesitlerde hemorajik alanlar gözlemlenmiştir (Tablo 4.1, Şekil 4.1, Şekil 4.2).

MTX verilen deney grubunun (Grup II-III-IV) ovaryum dokuları incelendiğinde kontrol grubuna göre; oosit dejenerasyonları, foliküllerin granuloza hücreleri arasında ayrılmalar, zona pellusida yapısında dejenerasyonlar, mononükleer hücre infiltrasyonları, özellikle korpus luteumlarda hemorajik alanlar, vasküler konjesyonlar, folikül sayısında azalmalar ve foliküler dejenerasyonlar gözlenmiştir. Grup IV'teki hayvan sayısı bire düştüğü için bu gruptaki bulgular istatistiksel olarak değerlendirilemezken, grup II ve grup III'teki bulgular değerlendirmeye alınmıştır (Tablo 4.1, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6).

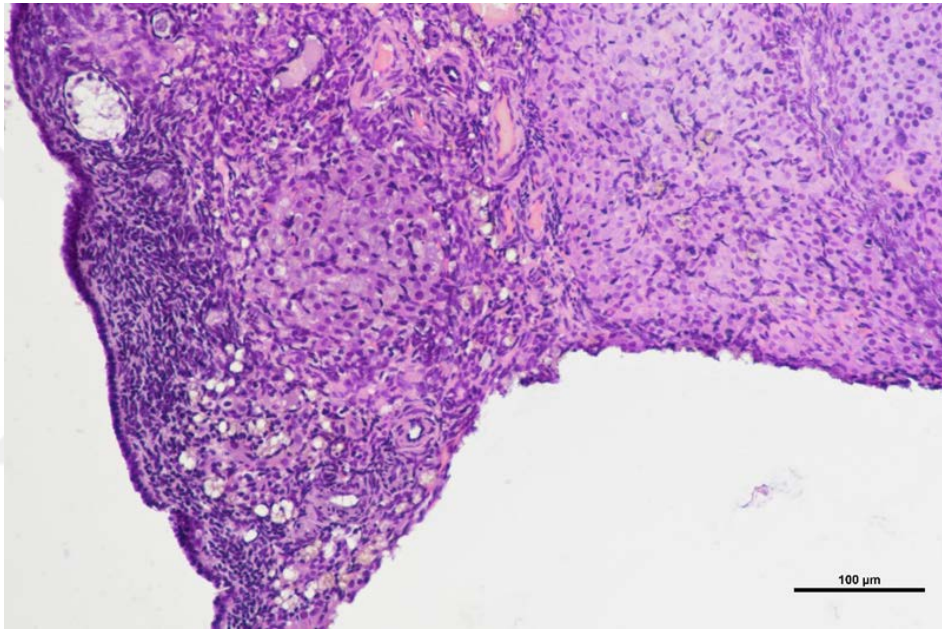
MTX ve RES birlikte verilen grupta ise (Grup V-VI-VII); hasar oluşan MTX grubuna kıyasla, hemorajik alanların oluşumu dışında birçok bulguda iyileşme gözlemlenmiştir. Grup VI'daki hayvan sayısı bire düştüğü ve grup VII'de ise hiç hayvan kalmadığı için bu gruplardaki bulgular değerlendirilemezken, grup V'teki bulgular değerlendirmeye alınmıştır (Tablo 4.1, Şekil 4.7, Şekil 4.8).

Tablo 4.1. Histolojik bulguların gruplar arasında derecelendirilmesi.

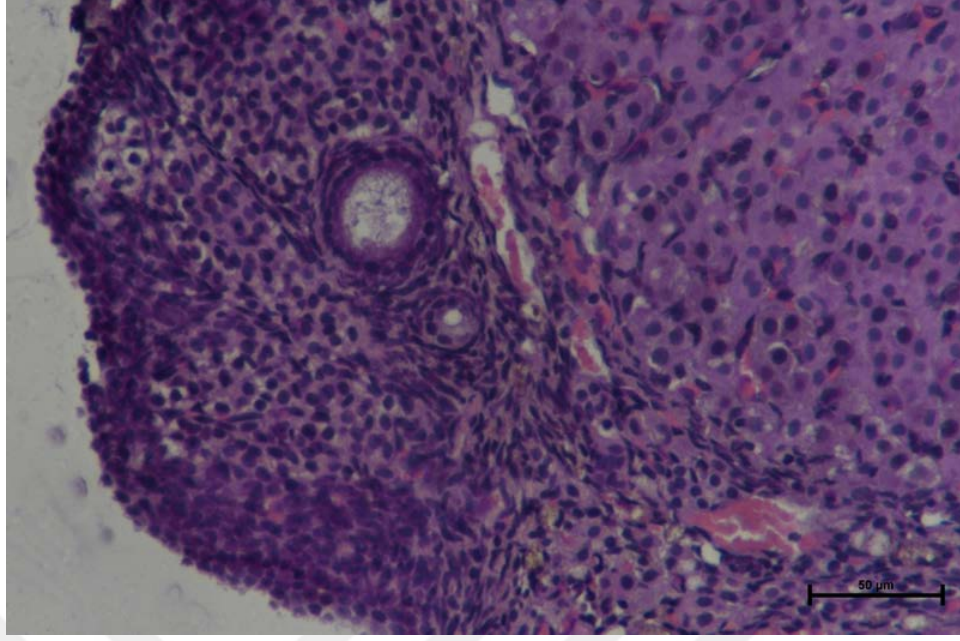
Gruplar	I. Grup: Kontrol (n=6)				II. Grup: MTX1 (n=6)				III. Grup: MTX2 (n=3)				IV. Grup: MTX3 (n=1)				V. Grup: MTX1+RES (n=4)				VI. Grup: MTX2+RES (n=1)				VII. Grup: MTX3+RES (n=0)			
Parametreler/ Skorları	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Oosit dejenerasyonları	6	0	0	0	1	1	1	3	0	0	3	0	0	0	0	1	0	4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Zona pellusida yapısında dejenerasyonlar	6	0	0	0	1	1	2	2	0	0	3	0	0	0	0	1	0	2	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Mononükleer hücre infiltrasyonları	6	0	0	0	1	1	2	2	0	1	2	0	0	0	1	0	0	3	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Folikül sayısında azalmalar	6	0	0	0	1	1	1	3	0	1	2	0	0	0	0	1	1	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Vasküler konjesyonlar	6	0	0	0	1	1	2	2	1	0	0	2	0	0	0	1	1	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Foliküllerin granuloza hücreleri arasında ayrılmalar	6	0	0	0	1	1	2	2	1	0	0	2	0	0	0	1	0	3	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Hemorajik alanlar	5	1	0	0	0	0	1	5	0	0	0	3	0	0	0	1	0	0	0	4	0	0	0	1	0	0	0	0
Foliküler dejenerasyonlar	6	0	0	0	1	1	2	2	0	0	3	0	0	0	0	1	0	3	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Kontrol ve deney gruplarına ait doku kesitlerinde incelenen yapısal değişiklikler (0-3) arası skorlanarak değerlendirildi.

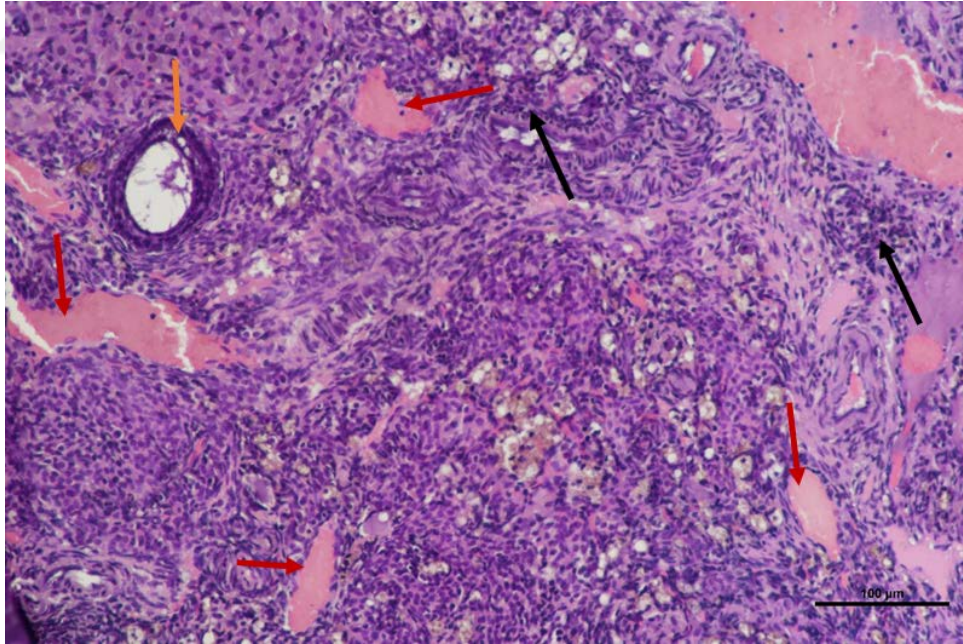
- 0: Hiçbir yapısal değişikliğin olmaması,
- 1: Hafif derecede,
- 2: Orta derecede,
- 3: Ciddi derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir.



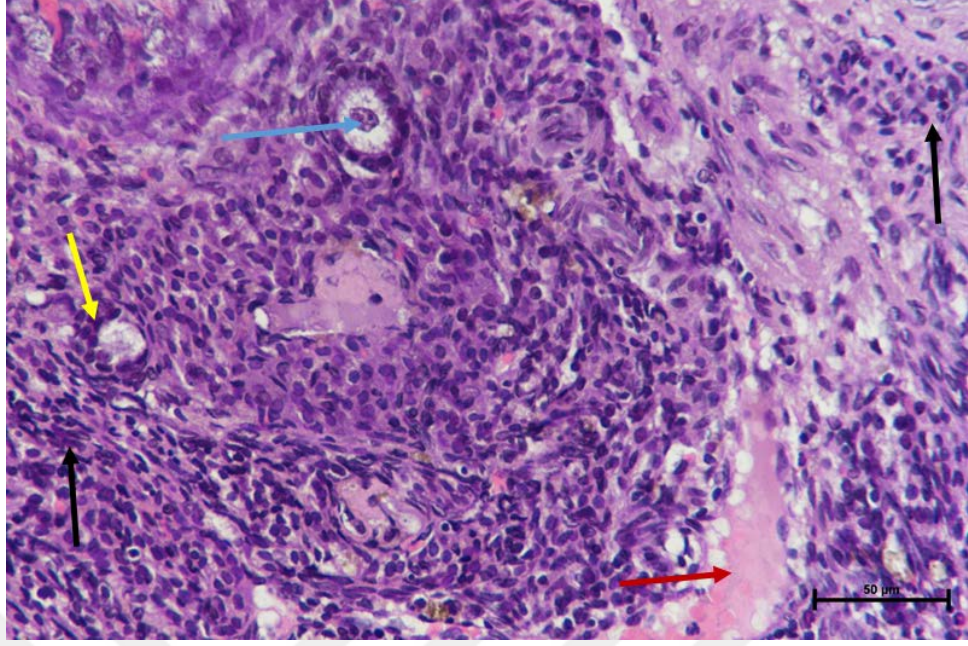
Şekil 4.1. Grup I'e ait ovaryum dokusu kesiti. Normal histolojik yapılar dışında kısmen de olsa hemorajik alanlar gözlemlenmiştir, H-E, x20.



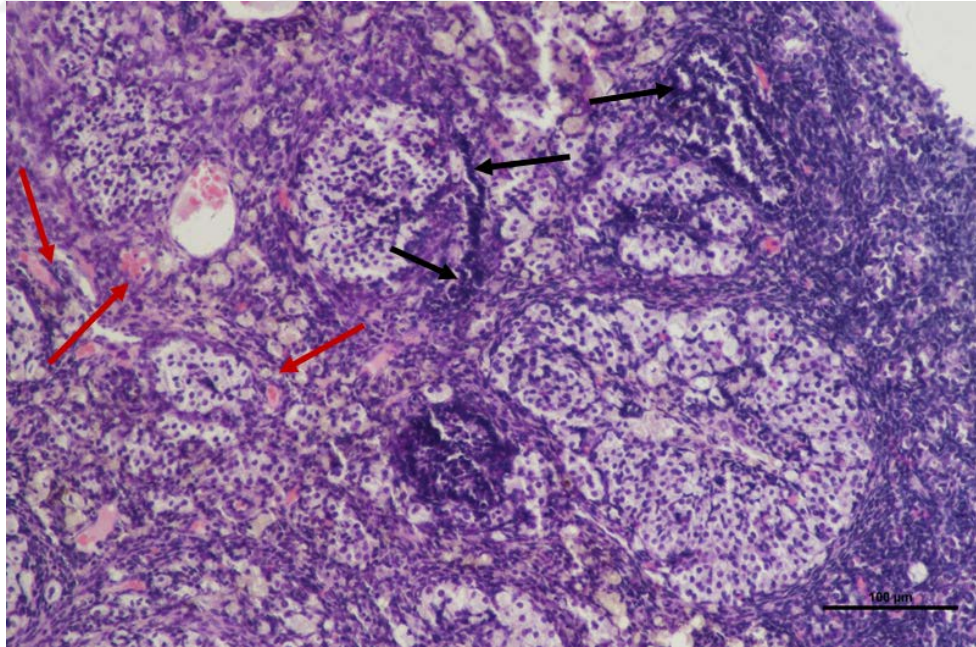
Şekil 4.2. Grup I'e ait ovaryum dokusu kesiti. Normal histolojik yapılar dışında kısmen de olsa hemorajik alanlar gözlemlenmiştir, H-E, x40.



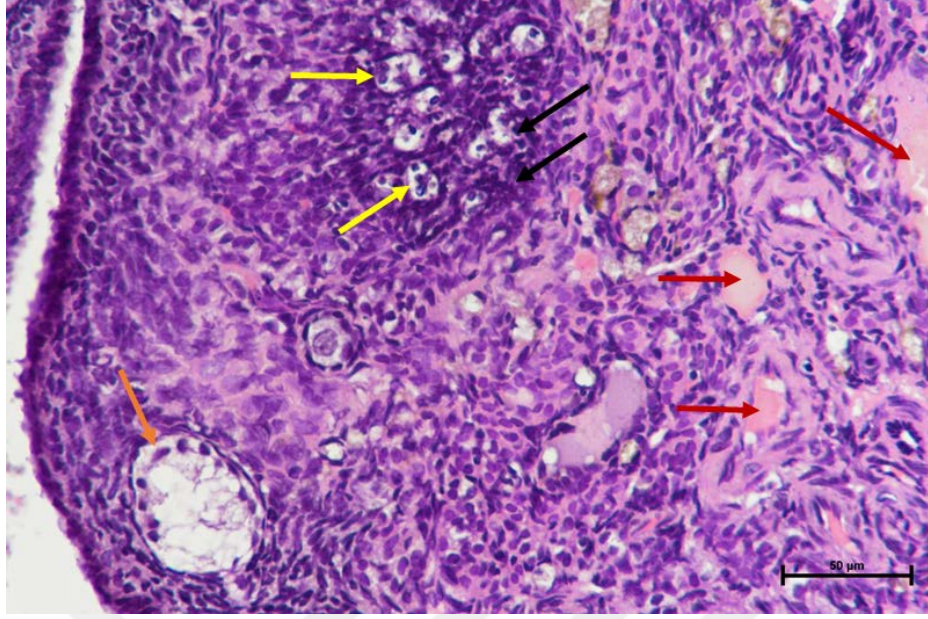
Şekil 4.3. Grup II' ye ait ovaryum dokusu kesiti. Siyah oklar; mononükleer hücre infiltrasyonlarını, kırmızı oklar; hemorajik alanları ve turuncu ok; granuloza hücrelerindeki ayrılmaları göstermektedir, H-E, x20.



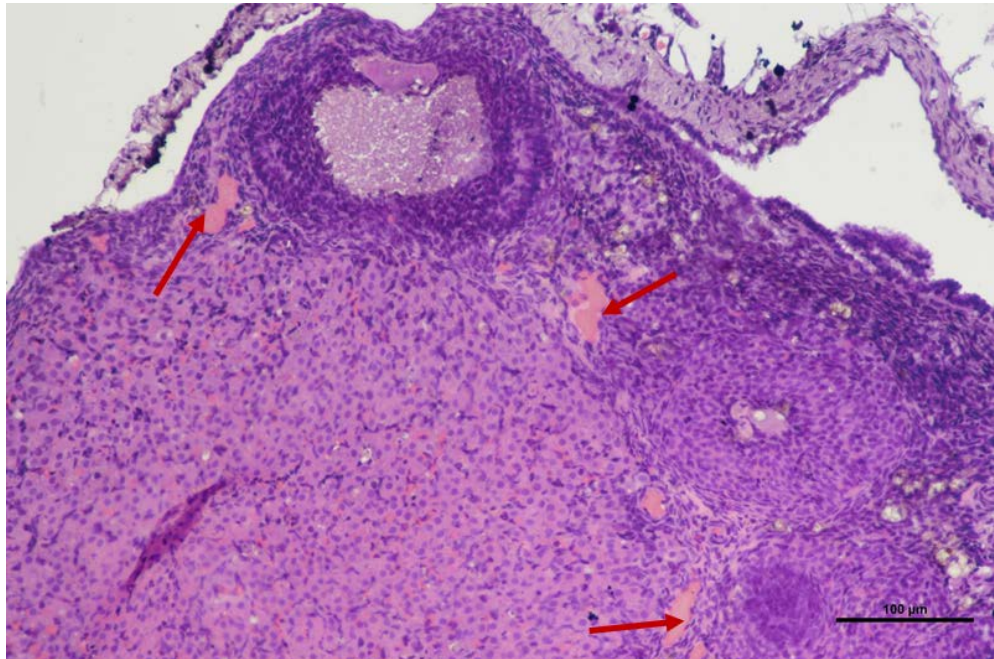
Şekil 4.4. Grup II'ye ait ovaryum dokusu kesiti. Siyah oklar; mononükleer hücre infiltrasyonlarını, kırmızı ok; hemorajik alanları, sarı ok; folikül dejenerasyonlarını ve mavi ok; oosit dejenerasyonunu göstermektedir, H-E, x40.



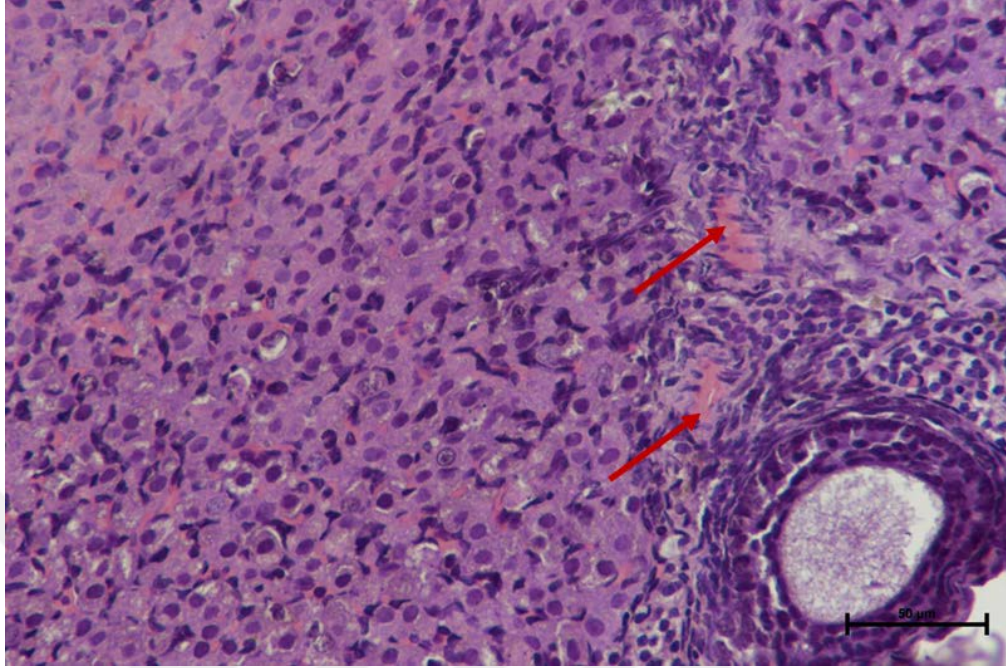
Şekil 4.5. Grup III' e ait ovaryum dokusu kesiti. Siyah oklar; mononükleer hücre infiltrasyonlarını, kırmızı oklar; hemorajik alanları göstermektedir, H-E, x20.



Şekil 4.6. Grup III'e ait ovaryum dokusu kesiti. Siyah oklar; mononükleer hücre infiltrasyonlarını, kırmızı oklar; hemorajik alanları, sarı oklar; folikül dejenerasyonlarını ve turuncu ok; granuloza hücrelerindeki ayrılmaları göstermektedir, H-E, x40.



Şekil 4.7. Grup V'e ait ovaryum dokusu kesiti. Kırmızı oklar; hemorajik alanları göstermektedir, H-E, x20.



Şekil 4.8. Grup V'e ait ovaryum dokusu kesiti. Kırmızı oklar; hemorajik alanları göstermektedir, H-E, x40.

İmmünohistokimyasal Bulgular

Ovaryum doku kesitlerinin immünohistokimyasal boyamalarında kontrol grubunda herhangi bir pozitif boyanmaya rastlanmamıştır (Tablo 4.2, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11).

MTX verilen grupta (Grup II-III-IV); Grup IV' teki hayvan sayısı bire düştüğü için bu gruptaki boyanmalar değerlendirilmeye alınmamıştır. Grup II ve grup III'teki kesitlerde ise eşit miktarda ve grup I'e kıyasla fazla miktarda pozitif boyanma gözlemlenmiştir (Tablo 4.2, Şekil 4.10, 4.11).

MTX ve RES birlikte verilen grupta ise (Grup V-VI-VII); hasar oluşan MTX grubuna kıyasla daha az oranda pozitif boyanma gözlemlenmiştir. Fakat grup VI' daki hayvan sayısı bire düştüğü ve grup VII'de ise hiç hayvan kalmadığı için bu gruplardaki boyanmalar değerlendirilmeye alınamazken, Grup V'te ise pozitif boyanmalar gözlemlenmiş ve değerlendirmeye alınmıştır (Tablo 4.2, Şekil 4.12).

Boyama dereceleri bakımından en fazla pozitif boyanma; eşit miktarda grup II ve III'te daha sonra grup V'te gözlemlenmiştir. Bulgularımız histopatolojik bulgularla paralellik göstermektedir.

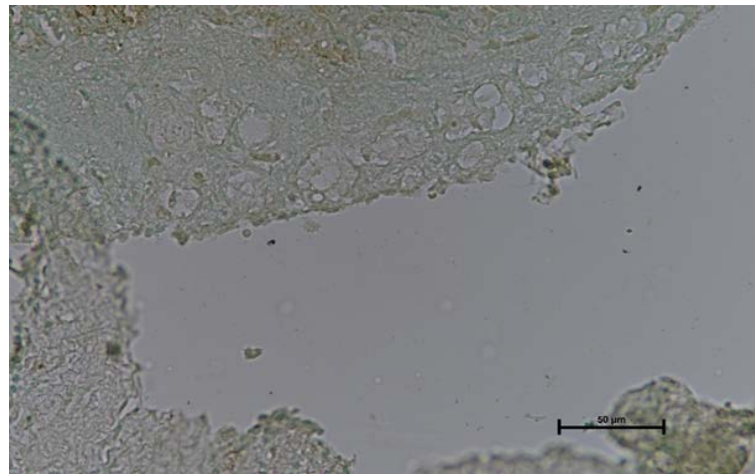
Tablo 4.2. TUNEL ile işaretlenme dereceleri.

	Grup I Kontrol	Grup II MTX1	Grup III MTX2	Grup V MTX1+RES
TUNEL	-	++	++	+

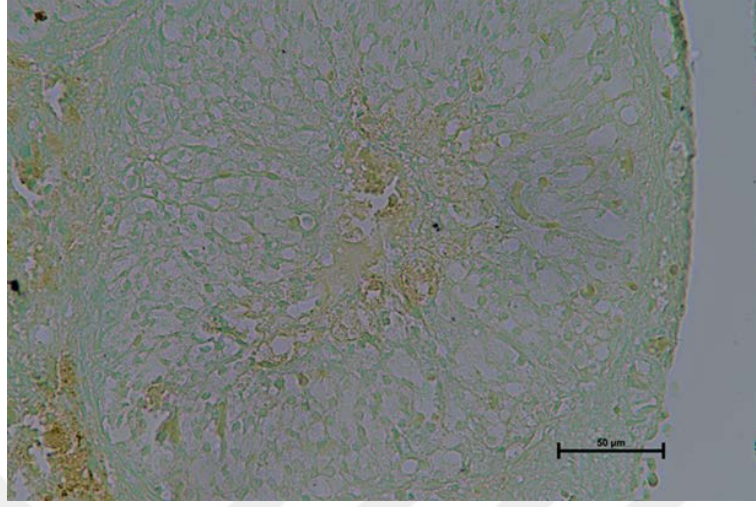
Kontrol grubu ile deney gruplarına ait ovaryum doku kesitlerinde incelenen immünohistokimyasal dereceler Refaiy ve ark. yapmış oldukları derecelendirmeye göre değerlendirilmiştir (Refaiy ve ark., 2011).

Kontrol ve deney gruplarına ait doku kesitlerinde incelenen yapısal değişiklikler (-, +++) arası skorlanarak değerlendirildi.

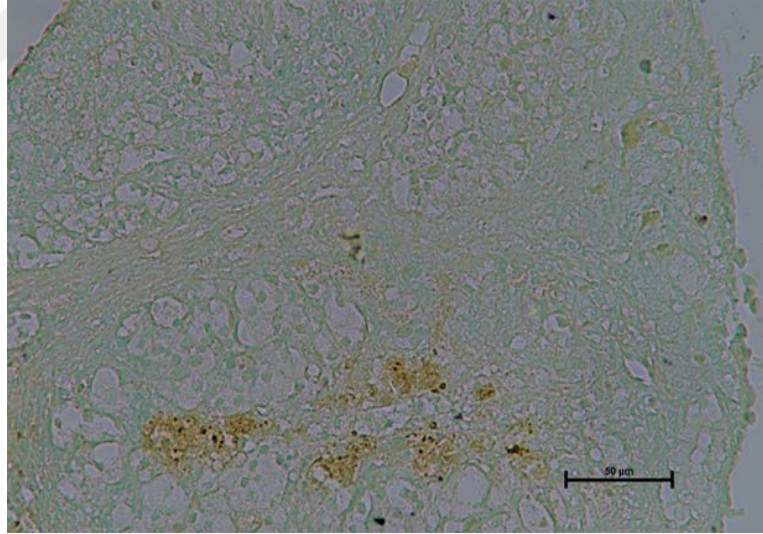
- : Boyanmanın olmamasını,
- /+ : Çok hafif derecede boyanma olmasını,
- +: Az derecede boyanma olmasını,
- ++: Orta derecede boyanma olmasını,
- +++ : Ciddi derecede boyanma olmasını ifade etmektedir.



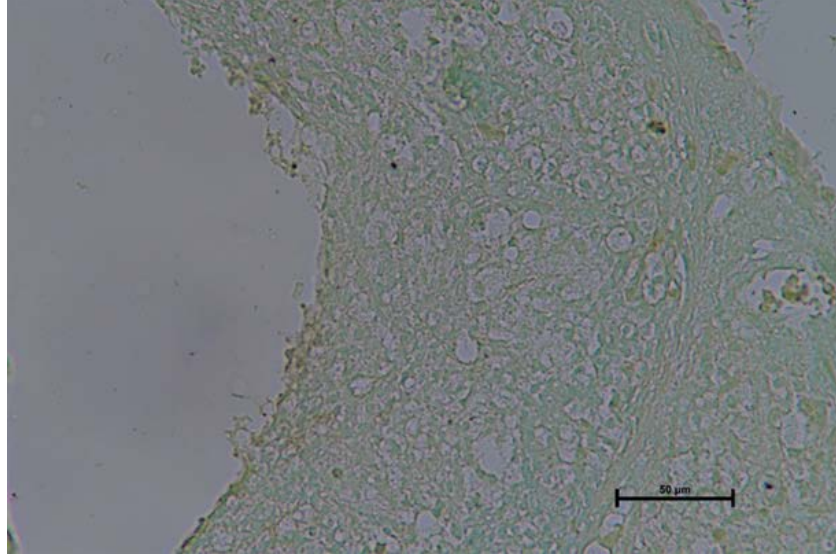
Şekil 4.9. Grup I'e ait ovaryum dokusu kesitinin TUNEL boyaması, x40.



Şekil 4.10. Grup II'ye ait ovaryum dokusu kesitinin TUNEL boyaması, x40.



Şekil 4.11. Grup III'e ait ovaryum dokusu kesitinin TUNEL boyaması, x40.



Şekil 4.12. Grup V'e ait ovaryum dokusu kesitinin TUNEL boyaması, x40.

4.2. Biyokimyasal Parametreler

4.2.1. TAS, TOS ve OSI Ölçümleri

Deney gruplarına ait ovaryum dokusu TAS, TOS ve OSI analiz sonuçları Tablo 4.3'te verildi.

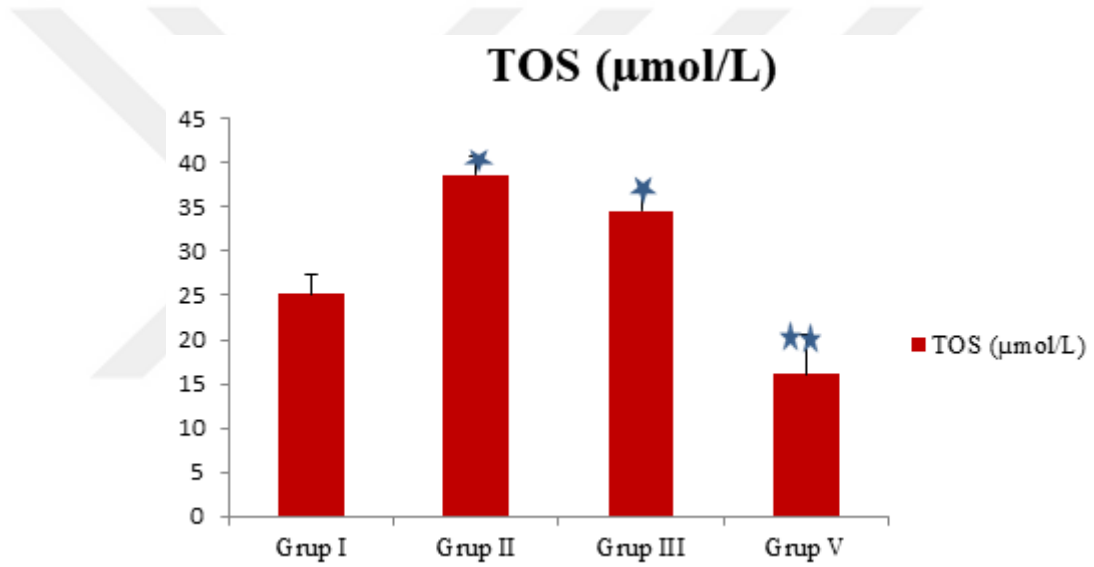
Tablo 4.3. Deney gruplarına ait TAS, TOS ve OSI parametrelerinin analizi.

Gruplar	TOS (µmol/L)		TAS (mmol/L)		OSI (AU)	
	Ort. ±SD	P	Ort. ±SD	P	Ort. ±SD	P
Grup I	25,13±2,28	**p=0.000	1,12±0,08	**p=0.041	2,24±0,32	**p=0.000
Grup II	38,62±2,12	*p=0.000	0,99±0,05	*p=0.041	3,87±0,30	*p=0.000
Grup III	34,53±2,15	*p=0.001	0,85±0,08	*p=0.001	4,06±0,69	*p=0.000
Grup V	16,06±4,45	*p=0.001	0,90±0,08	*p=0.002	1,80±0,62	**p=0.000
		**p=0.000				

Veriler ortalama ve standart sapma olarak sunuldu. Gruplar arasındaki karşılaştırmada one way ANOVA (post hoc Tukey testi) kullanıldı. *p: Kontrol grubuna, **p: Metotreksat1 grubuna göre kıyaslama. Grup I: kontrol, Grup II: MTX1, Grup III: MTX2, Grup V: MTX1+Res. (Diğer gruplar hayvan ölümlerine bağlı yetersiz hayvan sayısı nedeni ile istatistiksel analizlere dahil edilmemiştir).

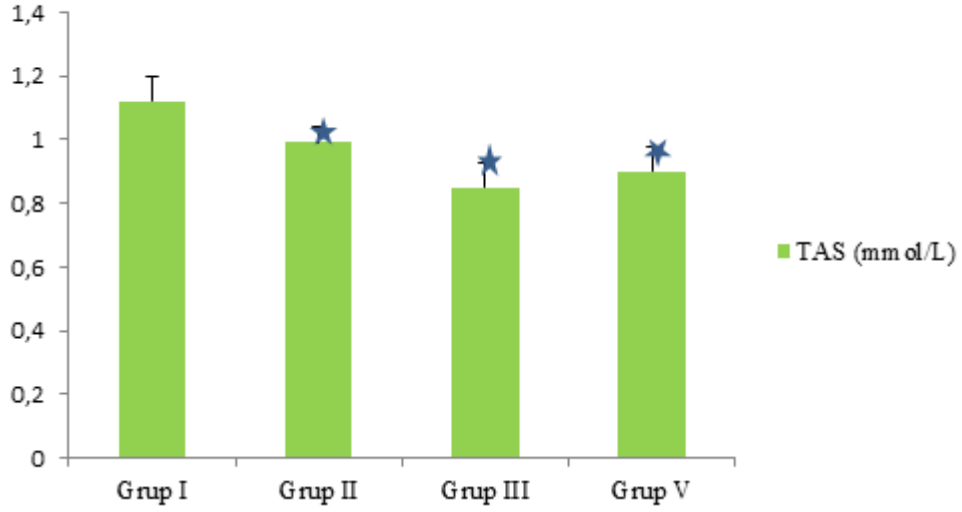
Kontrol grubuna kıyasla grup II ve Metotreksatın artan dozunun uygulandığı grup III'de TOS seviyesi anlamlı olarak artmıştır (Grup II ve Grup III sırasıyla *p=0.000, *p=0.001), (Şekil 4.9) . Grup II MTX dozu uygulanarak RES verilen

grupta (Grup V) hem kontrole hem de Grup II'ye göre TOS seviyelerinde anlamlı düşüş görülmüştür (sırasıyla $*p=0.001$, $**p=0.000$), (Şekil 4.9). Kontrole kıyasla TAS seviyeleri bütün gruplarda anlamlı olarak azalmıştır (sırasıyla $*p=0.041$, $*p=0.001$, $*p=0.002$), (4.10). Fakat grup II MTX dozu uygulanarak RES verilen grupta (Grup V) MTX1 (Grup II)'e göre TAS seviyelerinde anlamlı değişiklik olmamıştır ($p<0.05$), (Şekil 4.10). Oksidatif stresin göstergesi olan OSI değerleri grup II ve Metotreksatın artan dozunun uygulandığı grup III' de kontrole kıyasla anlamlı olarak artmıştır (sırasıyla $*p=0.000$, $*p=0.000$), (Şekil 4.11). MTX1 dozu uygulanarak RES verilen grupta (Grup V); MTX1 (Grup II)'e göre OSI seviyelerinde anlamlı düşüş görülmüştür ($**p=0.000$), (Şekil 4.11).



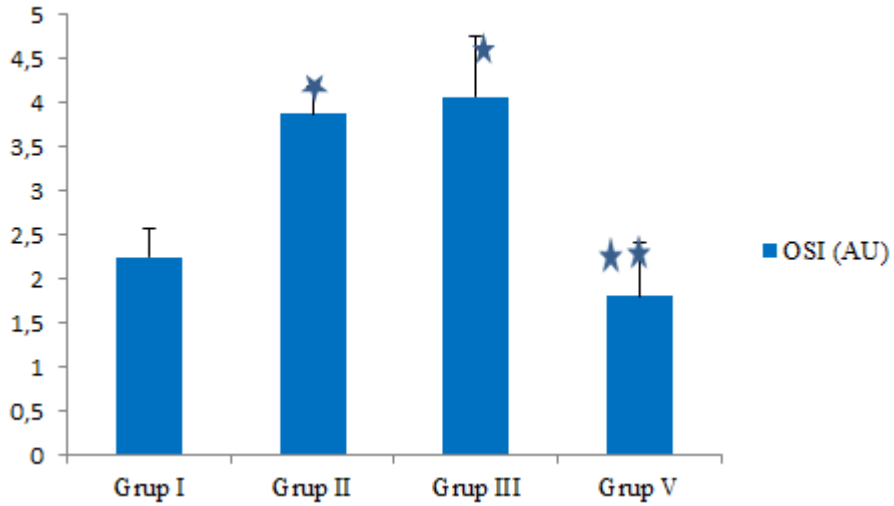
Şekil 4.13. Gruplararası ovaryum TOS düzeyleri. Grup I: kontrol, Grup II: MTX1, Grup III: MTX2, Grup V: MTX1+Res. (Diğer gruplar hayvan ölümlerine bağlı yetersiz hayvan sayısı nedeni ile istatistiksel analizlere dâhil edilmemiştir). $*p$: Kontrol grubuna göre kıyaslama, $**p$: MTX1 grubuna göre kıyaslama.

TAS (mmol/L)



Şekil 4.14. Gruplararası ovaryum TAS düzeyleri Grup I: kontrol, Grup II: MTX1, Grup III: MTX2, Grup V: MTX1+Res. (Diğer gruplar hayvan ölümlerine bağlı yetersiz hayvan sayısı nedeni ile istatistiksel analizlere dâhil edilmemiştir). *p: Kontrol grubuna göre kıyaslama.

OSI (AU)



Şekil 4.15. Gruplararası ovaryum OSI düzeyleri. Grup I: kontrol, Grup II: MTX1, Grup III: MTX2, Grup V: MTX1+Res. (Diğer gruplar hayvan ölümlerine bağlı yetersiz hayvan sayısı nedeni ile istatistiksel analizlere dâhil edilmemiştir). *p: Kontrol grubuna göre kıyaslama, **p: MTX1 grubuna göre kıyaslama.

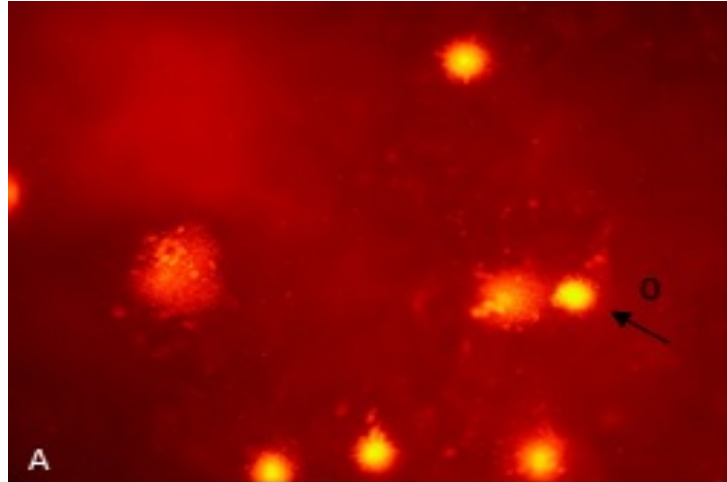
4.3. DNA Hasarı

Gruplarda oluşan DNA hasar analizi comet yöntemi ile gerçekleştirildi. Comet skoru analiz değerleri için gruplar arasında fark anlamlı bulunmuştur ($p=0.000$). Kontrol grubuna (Grup I) göre karşılaştırmada, grup II ve grup III'ün comet skoru anlamlı olarak arttı (sırasıyla, $p=0.043$, $p=0.000$) (Şekil 4.12, 4.13, 4.14). Grup V'in comet skoru grup II'ye göre anlamlı olarak azaldı (sırasıyla, $p=0.005$), (Şekil 4.12, 4.13, 4.14, 4.15). Gruplara ait istatistiksel hesaplamalar Tablo 4.4'te sunulmuştur.

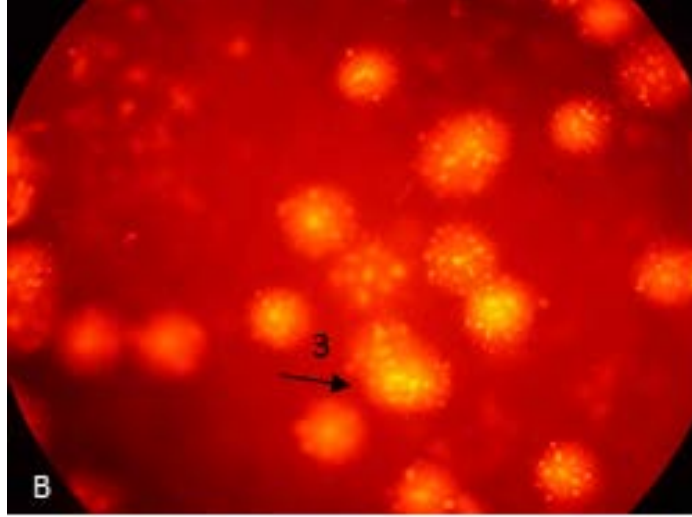
Tablo 4.4. Gruplara ait comet skoru analizi.

Gruplar	Comet score Arbitrary Unit)	
	Ortalama $\pm$ SD	P değeri
Grup I	121,50 $\pm$ 41,62	
Grup II	223,00 $\pm$ 92,61	* $p=0.043$
Grup III	342, 00 $\pm$ 20,88	* $p=0.000$
Grup V	79,40 $\pm$ 23,96	** $p=0.005$

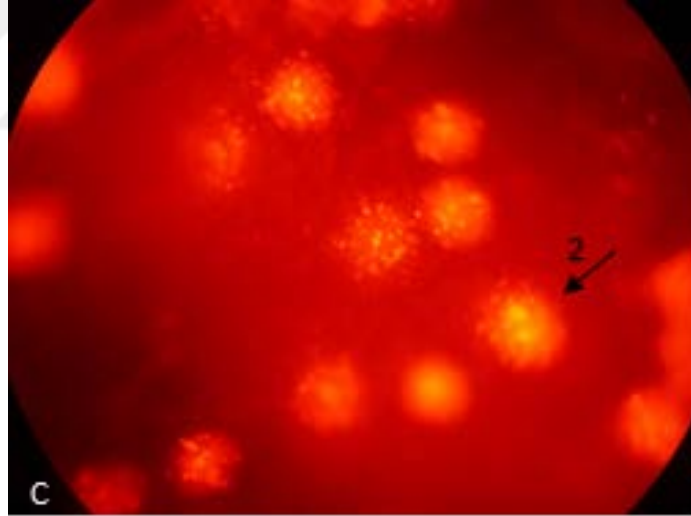
Veriler ortalama ve standart sapma olarak sunuldu. Gruplar arasındaki karşılaştırmada one way ANOVA (post hoc Tukey testi) kullanıldı. *p: Kontrol grubuna göre kıyaslama. **p: MTX1 grubuna göre kıyaslama. Grup I: kontrol, grup II: MTX1, grup III: MTX2, grup V: MTX1+RES.



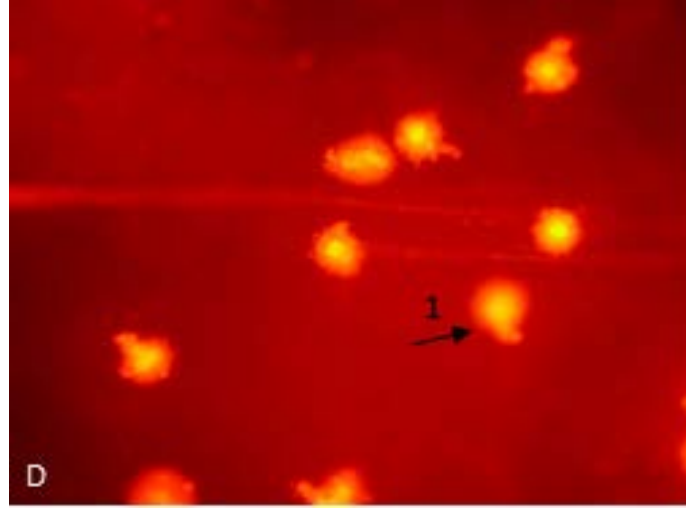
Şekil 4.16. (A) Grup I'e ait Comet Assay görüntüsü. Hasar derecesine göre hücreler hasarsız (göç etmemiş) ile ağır hasar gören (DNA göçü) olmak üzere beş katogoride (0, 1, 2, 3, 4) sınıflandırıldı.



Şekil 4.17. (B) Grup II'ye ait Comet Assay görüntüsü. Hasar derecesine göre hücreler hasarsız (göç etmemiş) ile ağır hasar gören (DNA göçü) olmak üzere beş katogarıde (0, 1, 2, 3, 4) sınıflandırıldı.



Şekil 4.18. (C) Grup III'e ait Comet Assay görüntüsü. Hasar derecesine göre hücreler hasarsız (göç etmemiş) ile ağır hasar gören (DNA göçü) olmak üzere beş katogarıde (0, 1, 2, 3, 4) sınıflandırıldı.



Şekil 4.19. (D) Grup V'e ait Comet Assay görüntüsü. Hasar derecesine göre hücreler hasarsız (göç etmemiş) ile ağır hasar gören (DNA göçü) olmak üzere beş katogarıde (0, 1, 2, 3, 4) sınıflandırıldı.

5. TARTIŞMA

Resveratrol (trans-3, 5, 40-trihidroksistilben), ultraviyole radyasyon ve mantar enfeksiyonu gibi stres koşulları altında aktive olan bir fitoaleksinin olarak bitkiler tarafından sentezlenen doğal bir polifenoldür (Gusman ve ark., 2001). Meyvelerde, sert kabuklu yemişlerde ve bazı şifalı bitkilerde bulunur ve çoğunlukla üzüm kabuğunda ve dolayısıyla kırmızı şarapta bulunur (Weinstein ve ark., 1997).

Üzüm, çilek ve şifalı bitkilerde bulunan doğal bir polifenol olan resveratrol, antioksidan ve anti-enflamatuar aktiviteler sergiler ve uzun ömürlü bir ajan olduğu öne sürülmüştür. Ayrıca, resveratrolün kardiyoprotektif özelliklere ve hem glikoz hem de lipid metabolizması üzerinde yararlı etkilere sahip olduğuna dair artan kanıtlar vardır. Son zamanlarda, çeşitli çalışmalar, resveratrolün çeşitli patolojik ve metabolik bozuklukları tedavi etmek için terapötik bir ajan olarak kullanımını incelemiştir. Ortega ve Dulebanın yaptığı bir çalışmada resveratrol sıçanlarda yumurtalık foliküler rezervini artırmış ve yumurtalık ömrünü uzatmıştır bu doğrultuda resveratrolün jinekolojik rahatsızlıkların tedavisindeki etkinliği için daha fazla araştırma gerektiğini savunmuşlardır (Ortega ve Duleba, 2015).

MTX, bazı romatizmal hastalık türlerinin tedavisinde sıklıkla önerilen en yaygın kullanılan ilaçlardan biridir. MTX, belirli kanserleri tedavi etmek için yüksek dozlarda bir folat antagonisti olarak da kullanılır. Raporlar, hücresel antioksidan enzimlerin konsantrasyonundaki azalmanın, etkilenen hücrelerin oksidatif hasara duyarlılığı ile sonuçlandığını göstermiştir. MTX etki mekanizmaları hala iyi bilinmemekle birlikte, bu ilacın antioksidan savunma sisteminin etkinliğini azaltmada ve ayrıca glutatyon seviyelerini düşürerek hücrelerin ROS'a duyarlılığını artırmada ana rol oynadığı varsayılmaktadır (Jalili ve ark., 2020).

MTX, başta malign olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Fakat sadece patolojik hücrelerde değil, sağlıklı hücrelerde de hasara neden olmaktadır. Hayati organlardan olan böbrek ve karaciğerle birlikte testis ve ovaryumlarda da negatif etkilerine rastlanmaktadır (Asci ve ark., 2017; Erdoğan ve ark., 2015; Vardı ve ark., 2010). Erdoğan ve arkadaşlarının yaptığı ile

Vardı ve ark. yaptığı iki farklı çalışmada karaciğer hücrelerinde MTX stromada konjesyon, vakuolar dejenerasyon ve sinuzoidlerde dilatasyona sebep olmuştur (Erdoğan ve ark., 2015; Vardı ve ark., 2010). MTX'in böbreklerdeki etkisini gösteren bir çalışmada ise inflamatuvar hücre infiltrasyonu, glomeruloskleroz ve tübüllerde nekrozun olduğu görülmüştür (Asci ve ark., 2017).

Çalışmamızda MTX'i 3 doz verdiğimiz IV. gruptan ve 2 doz MTX ile RES verdiğimiz VI. gruptan 5, 2 doz MTX verdiğimiz III. gruptan 3, 1 doz MTX ile RES verdiğimiz V. gruptan 2, 3 doz MTX ile beraber RES verdiğimiz VII. gruptan ise 6 ratımız ex olmuştur. Nedenini araştırmak için çalışmalara baktığımızda Şenol kemoterapik ajan kullanımının en sık görülen yan etkisinin kemik iliği baskılaması olduğunu ve bunun da sebep olduğu nötropeninin oluşturacağı enfeksiyonun en sık karşılaşılan ölüm nedeni olduğunu dile getirmiş (Şenol, 2004). Gönderen ve Kapucu da yaptıkları derlemede yine nötropeninin kemoterapinin en önemli yan etkisi olduğunu ve mortalite oranını yükselttiğini bildirmişlerdir (Gönderen ve Kapucu, 2009). Bizde ex nedenlerimizin bu doğrultuda olabileceğini düşünmekteyiz.

Halat tez çalışmasında MTX kaynaklı sıçan testis hasarını histolojik olarak incelediğinde intertisyel bölgelerde konjesyon ve ödem, bazal laminada ayrılmalar görmüştür (Halat, 2017). Güney ise tez çalışmasında erişkin sıçanların ovaryumunda MTX'in histopatolojik etkilerine baktığında vasküler konjesyon, kollojen artışı ve fibröz dokularda değişimler gözlemlemiştir, fakat istatistiksel bir anlamlılık bulamamıştır (Güney, 2019). Bizim çalışmamızda da sadece MTX'in verildiği deney grubumuzda sıçan ovaryumları histokimyasal olarak incelendiğinde oosit dejenerasyonları, foliküllerin granuloza hücreleri arasında ayrılmalar, zona pellusida yapısında dejenerasyonlar, mononükleer hücre infiltrasyonları, özellikle korpus luteumlarda hemorajik alanlar, vasküler konjesyonlar, folikül sayısında azalmalar ve foliküler dejenerasyonları gözlemledik.

McLaren ve ark. Metotreksat maruziyeti öyküsü olan ve daha sonra kontrollü ovaryan stimülasyon uygulanan infertilite hastalarında gebelik oranı, yumurtalık yanıtı ve endometriyal kalınlığı değerlendirmek için çalışma gerçekleştirmişlerdir. Metotreksat öncesi ve sonrası benzer doğurganlık tedavileri olan otuz beş hasta

belirlenmiştir. Bu grup içinde, metotreksata maruz kaldıktan sonraki 180 gün içinde bir IVF döngüsü meydana geldiğinde, toplanan oositlerde önemli bir düşüş gözlemlendi. Metotreksata maruz kaldıktan sonraki 180 gün sonra gerçekleştirilen döngüler, oosit üretiminde bir azalma göstermedi. Bu bulgular da McLaren ve arkadaşlarına metotreksatın oosit verimi üzerinde zaman sınırlı ve geri dönüşümlü bir etkisi olduğunu düşündürmektedir (McLaren ve ark., 2009).

Karabulut ratlar üzerinde yaptığı resveratrol ile ilgili çalışmasında böbrek, karaciğer, ileum ve midede resveratrolün hem histopatolojik hemde biyokimyasal olarak oksidatif stresi azaltarak, antioksidan aktiviteyi arttırdığını gözlemlemiştir. Yine başka bir resveratrol çalışmasında iskemi perfüzyon hasarını büyük ölçüde azalttığını bulmuştur (Karabulut, 2008).

Mokni ve ark. yaptıkları bir çalışmada antioksidan enzimlerde resveratrolün en iyi etkiyi 12,5 mg/kg dozda verildiğinde gerçekleştiğini tespit etmişlerdir (Mokni ve ark., 2007).

Şehirli ve ark. farelerde naftalinin sebep olduğu oksidatif strese karşı resveratrolün koruyucu etkilerini incelemiş ve naftalinin böbreklerde, akciğer ve karaciğer dokularında patolojik olarak değişiklikler yarattığını görmüş, 10 mg/kg verilen resveratrolün bu patojeniteyi azaltarak rejenerasyona sebep olduğunu bildirmiştir (Şehirli ve ark., 2008).

Gedik ve ark. sıçanlarda karaciğer iskemi/reperfüzyonun neden olduğu oksidatif stres ve histolojik değişiklikleri incelemiş ve çalışmalarında sıçanlara Şehirli ve arkadaşlarının verdiği doz olan 10 mg/kg resveratrol uygulamışlar ve koruyucu etkisinin olduğunu ortaya koymuşlardır (Gedik ve ark., 2008). Avni ve ark. ise rat overinde iskemi-reperfüzyon üzerine n-asetil sistein ve resveratrol'ün koruyucu etkisini inceleyen çalışmasını yaparlarken farelere 20 mg/kg resveratrol vermişler ve doku hasarında anlamlı azalmalar görmüşlerdir (Kılıç ve ark., 2016). Bizim çalışmamızda ise grup V,VI ve VII'ye MTX ile beraber farelere 20 mg/kg resveratrol verildi. Fakat VI. grubumuzda hayvan sayısı 1'e düştüğü ve VII. grubumuzda ise hiç hayvan kalmadığı için sadece V. grubu değerlendirmeye

aldığımızda histokimyasal bulgularımızda hasar oluşan grup II ve III'e kıyasla, hemorajik alanların oluşumu dışında birçok bulguda iyileşme gözlenmiştir.

Zhang ve ark. fareler üzerinde yaptıkları deneysel bir çalışmada resveratrolün kardiyomiyositlerde doksorubisinin sebep olduğu sitokrom c salınımını baskıladığını proapoptotik box proteinlerinin dışa vurumunu azaltarak apoptoza engel olduğunu ifade etmişlerdir (Zhang ve ark., 2011). Başka bir çalışmada ise Chen ve ark. yaşlanmaya başlamış sıçanların ovaryumları üzerinde çalışılmış ve resveratrolün bu süreçte folikül rezervini arttırdığını, atrezinin engellendiğini ileri sürmüşlerdir (Chen ve ark., 2010).

Özdemir deneysel çalışmasında kemoterapötik ajan olarak siklofosfomidin ratlarda oluşturduğu ovaryum hasarına karşı antioksidan olarak resveratrolü kullanmış ve etkilerini mikroskopik düzeyde incelemiştir. Siklofosfomid grubunda çok tabakaya sahip primer, sekonder ve graaf foliküllerinin teka hücrelerinde artmış olan TUNEL işaretlenmesi RES uygulaması sonucu azalmış ve bu azalma çok katlı primer foliküllerde anlamlı düzeyde gerçekleşmiştir. Bunun sonucunda kemoterapötik ajan kullanan dişilerde doğurganlığı korumak için resveratrolün bir seçenek olabileceği düşünülmüştür (Özdemir, 2014).

Biz de çalışmamızda kemoterapötik ajan olarak MTX ve antioksidan olarak RES'in etkilerine rat ovaryum dokularında apoptotik hücreleri işaretlemek üzere TUNEL boyama ile immünohistokimyasal olarak baktığımızda boyama dereceleri bakımından en fazla pozitif boyanmayı; eşit miktarda grup II ve III'te daha sonra grup V'te gözlemledik. Grup IV ve VI da 1 hayvan kaldığı, grup VII de ise hiç hayvan kalmadığı için bu grupları değerlendirmeye alamadık. Bu doğrultuda bulgularımız histopatolojik bulgularla paralellik gösterdi.

Atmaca ve ark. ratlarda yaptıkları 21 günlük deneyde suyla verilen sodyum florid toksisitesinde, intraperitoneal yoldan verilen resveratrolün oksidatif stres koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Plazma TOS, florid verdikleri grupta artmış, TAS seviyesi azalmıştır. Floridin resveratrolle verildiği grupta ise TOS ve TAS

değerleri kontrol grubuna yakın çıkmıştır. Böylece resveratrolün floridin sebep olduğu toksisitede faydalı olacağı sonucuna varılmıştır (Atmaca ve ark., 2014).

Güney tez çalışmasında MTX' in sıçan ovaryumunda yaptığı hasra karşı karayemişi antioksidan olarak kullanmış MTX grubuna ait MDA, TOS ve OSI seviyeleri kontrol grubuna göre artarken MTX + karayemiş grubunda ise MDA ve OSI MTX grubuna göre azalmıştır. Tezin sonucunda MTX kullanımında karayemişin koruyucu etkisinin olduğu görülmüştür (Güney, 2019). Ata ve arkadaşları da bizim çalışmamızda olduğu gibi MTX'in oluşturacağı yumurtalık hasrasına karşı sıçanlarda resveratrol kullanmıştır. MTX uygulanan grupta MDA daha yüksek bulunurken tGSH ve SOD daha düşük bulunmuştur. Sonuçta MTX in yaptığı yumurtalık hasrasına resveratrolün koruyucu etkisinin olduğu görülmüştür (Ata ve ark., 2019).

Mevcut çalışmamızda kontrol grubuna (grup I) kıyasla, MTX tek doz uyguladığımız grup II ve MTX'in artan dozunun uygulandığı grup III'ün TOS seviyesi anlamlı olarak artmıştır. Grup V'de hem grup I hem de grup II'ye göre TOS seviyelerinde anlamlı düşüş görülmüştür. Grup I'e kıyasla TAS seviyeleri anlamlı olarak azalmıştır. Fakat grup V'de grup II'ye göre TAS seviyelerinde anlamlı değişiklikler olmamıştır. Oksidatif stresin göstergesi olan OSI değerlerinde grup II ve MTX'in artan dozunun uygulandığı grup III'de kontrole kıyasla anlamlı olarak artış gözlenmiştir. Grup V'de grup II'ye göre OSI seviyelerinde anlamlı düşüş görülmüştür.

Kullanılan kemoterapötik ajanlardan dolayı organizmadaki oksidan ve antioksidan dengenin bozulmasıyla; protein, lipid ve karbonhidratlar oksidan hasarına karşı duyarlı oldukları için bu yapıdaki DNA ve moleküller zarar görebilmektedir (Wildburger ve ark., 2009; Zadak ve ark., 2009). DNA hasarına yol açtığı bilinen serbest oksijen radikalleri üzerindeki resveratrolün etkisi hakkında çalışmalar hala devam etmektedir. Güçlü bir antioksidan olan resveratrolün DNA'daki kırılmaları azalttığına dair çalışmalar mevcuttur (Burkitt ve Duncan, 2000). Fakat bu etkiye sahip anlamlı sonuçlar ortaya koymayan çalışmalar da literatürde yerini almıştır (Murcia ve Martinez-Tome, 2001).

Vadi yaptığı deneysel çalışmasında MTX uygulanan ratlarda resveratrolün DNA hasarına etkisini incelemiş ve kontrol grubu, MTX grubu, RES grubu, MTX+RES grubu olmak üzere 10'ar rattan oluşan 4 deney grubu meydana getirmiştir. Deney sonunda DNA hasarı incelendiğinde 4 grupta da 8-OHdG seviyeleri birbirine yakın çıktığı için istatistiksel bir önem tespit edilememiştir (Vadi, 2017).

Abdel Wahab BA ve Abdel Wahab MM, genç ratlarda yaptıkları çalışmada resveratrolün uzun süreli aralıklı hipoksi ile indüklenen nörodavranışsal eksikliklere karşı koruyucu etkisini incelemişler ve aralıklı hipoksinin 8-OHdG seviyelerinde artışa neden olduğunu, tedavisinde resveratrol kullanılan ratlarda ise sonuçların antagonize olduğunu bildirmişlerdir (Abdel Wahab BA ve Abdel Wahab MM, 2016). Alturfan ve arkadaşları akrilamid kaynaklı oksidatif strese karşı farklı dokular üzerinde resveratrol etkisini ratlar üzerinde incelemişler ve akrilamid verdikleri grupta DNA hasarını ifade eden 8-OHdG seviyesi istatistiksel olarak artarken, RES verdikleri grupta ise bu seviyenin önemli oranda düştüğünü bildirmişlerdir (Alturfan ve ark., 2011).

Bizim çalışmamızda ise DNA hasarını ortaya çıkarmak için comet yöntemi kullanıldı ve kontrol grubu ile kıyasladığımızda MTX verdiğimiz grup II ve grup III'ün comet skoru anlamlı olarak artarken, MTX+RES verdiğimiz grup V'de ise comet skoru anlamlı olarak azalma göstermiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yaptığımız deneysel çalışmada, dişi ratlarda Metotreksat ile oluşturulan ovaryum hasarında, araştırmalar sonucunda antioksidan özelliği kanıtlanan Resveratrol'ün doku hasarı ve toksisiteye karşı koruyucu etkilerinin araştırılması amacıyla deneysel hayvan modeli oluşturulmuş ve ovaryum dokularında histolojik parametreler, TAS ve TOS seviyeleri ve DNA hasarı açısından değerlendirmeler yapılmıştır.

Çalışmamızın sonuçlarını değerlendirdiğimizde; resveratrolün, ovaryumları tek doz metotreksata bağlı oluşan hasara karşı önemli ölçüde koruduğunu gördük, fakat tekrarlayan dozlarda MTX uyguladığımız gruplarda hayvan kayıpları yaşadığımız için resveratrolün MTX'in tekrarlayan dozlarına karşı etkisini inceleyemediğimizden koruyuculuğu gözlemleyemedik. Bu doğrultuda kanser tedavilerinde kullanılan metotreksat gibi kemoterapötik ilaçların ovaryumlarda istenmeyen bulgular ortaya çıkarmasıyla tekrarlayan dozlarına karşı yöntem arayışları sürmeli ve çalışmalar devam etmelidir.

Sonuç olarak elde ettiğimiz veriler doğrultusunda sıçan ovaryumunu biyokimyasal ve histolojik yönden incelediğimizde MTX'in oksidatif stres kaynaklı hasara sebep olduğunu, ovaryum dokularını korumak ve doğurganlığı devam ettirmek amacıyla oral olarak uyguladığımız resveratrolün tek doz MTX uygulandığında bu hasarı azalttığını söyleyebiliriz.

KAYNAKLAR

- Abd-Allah OM, Sharaf El-Din A (2013).** The possible protective effect of ginger against intestinal damage induced by methotrexate in rats. *Med. J. Cairo Univ.*, **81(1)**, 1073-1084.
- Abdel Wahhab A, Nada A, Arbid M (1999).** Ochratoxicosis: prevention of developmental toxicity by L-m methionine in rats. *J. Appl. Toxicol.*, **19(1)**, 7- 12.
- Abdel-Wahab BA, Abdel-Wahab MM (2016).** Protective effect of resveratrol against chronic intermittent hypoxia-induced spatial memory deficits, hippocampal oxidative DNA damage and increased p47Phox NADPH oxidase expression in young rats. *Behav. Brain Res.*, **305**, 65-75.
- Abolmaali SS, Tamaddon AM, Dinarvand R (2013).** A review of therapeutic challenges and achievements of methotrexate delivery systems for treatment of cancer and rheumatoid arthritis. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **71(5)**, 1115-1130.
- Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y (2004).** Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.*, **24(5A)**, 2783-2840.
- Akkuş İ (1996).** *Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri*. 1. Baskı, Konya: Mimoza Yayınları, s: 32-42.
- Akıncıgil H (2020).** *Sıçan ovaryumunda iskemi/reperfüzyon hasarı üzerine propolisin etkileri*. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Alturfan AA, Tozan-Beceran A, Şehirli AÖ, Demiralp E, Şener G, Omurtag GZ (2012).** Resveratrol ameliorates oxidative DNA damage and protects against acrylamide-induced oxidative stress in rats. *Mol. Biol. Rep.*, **39(4)**, 4589-4596.
- Armagan A, Uzar E, Uz E, Yılmaz HR, Kutluhan S, Koyuncuoglu HR, Soyupek S, Cam H, Serel TA (2008).** Caffeic acid phenethyl ester modulates methotrexate-induced oxidative stress in testes of rat. *Hum. Exp. Toxicol.*, **27(7)**, 547-552.
- Asci H, Ozmen O, Ellidag HY, Aydın B, Bas E, Yılmaz N (2017).** The impact of gallic acid on the methotrexate-induced kidney damage in rats. *J. Food Drug Anal.*, **25(4)**, 890-897.
- Assaraf YG (2006).** The role of multidrug resistance efflux transporters in antifolate resistance and folate homeostasis. *Drug Resist. Updat.*, **9(4-5)**, 227-246.
- Ata N, Kulhan NG, Kulhan M, Turkler C, Kiremitli T, Kiremitli S, Keskin Çimen F, Süleyman H, Toprak V (2019).** The effect of resveratrol on oxidative ovary-damage induced by methotrexate in rats (Resveratrol oxidative ovary-damage). *Gen. Physiol. Biophys.*, **38(6)**, 519-524.

Ather M, Back JH, Tang X, Kim KH, Kopelovich L, Bickers DR, Kim AL (2007). Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **224(3)**, 274-283.

Atmaca N, Atmaca HT, Kanici A, Anteplioglu T (2014). Protective effect of resveratrol on sodium fluoride-induced oxidative stress, hepatotoxicity and neurotoxicity in rats. *Food Chem. Toxicol.*, **70**, 191-197.

Avila J, Gonzalez-Fernandez R, Rotoli D, Hernandez J, Palumbo A (2016). Oxidative stress in granulosa-lutein cells from in vitro fertilization patients. *Reprod. Sci.*, **23(12)**, 1656-1661.

Bacha JR, William J, Bacha LM (2012). *Color atlas of veterinary histology*. 3rd Edition, United Kingdom: Wiley Blackwell, p: 243-244.

Balla A, Danilovich N, Yang Y, Sairam MR (2003). Dynamics of ovarian development in the FORKO immature mouse: structural and functional implications for ovarian reserve. *Biol. Reprod.*, **69(4)**, 1281-1293.

Bausinger J, Speit G (2016). The impact of lymphocyte isolation on induced DNA damage in human blood samples measured by the comet assay. *Mutagenesis*, **31(5)**, 567-572.

Baxter RA (2008). Anti-aging properties of resveratrol: review and report of a potent new antioxidant skin care formulation. *J. Cosmet. Dermatol.*, **7(1)**, 2-7.

Bertelli A, Bertelli AA, Gozzini A, Giovannini L (1998). Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs Exp. Clin. Res.*, **24(3)**, 133.

Bertelli AA, Giovannini L, Giannessi D, Migliori M, Bernini W, Fregoni M, Bertelli A (1995). Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *Int. J. Tissue React.*, **17(1)**, 1-3.

Bertelli AA, Giovannini L, Stradi R, Bertelli A, Tillement JP (1996). Plasma, urine and tissue levels of trans-and cis-resveratrol (3, 4', 5-trihydroxystilbene) after short-term or prolonged administration of red wine to rats. *Int. J. Tissue React.*, **18(2-3)**, 67-71.

Brunton LL, Lazo JS, Parker KL (2006). *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. New-York: Mc Graw-Hill Companies, p: 93-116.

Burkitt MJ, Duncan J (2000). Effects of trans-resveratrol on copper-dependent hydroxylradical formation and DNA damage: evidence for hydroxyl-radical scavenging and a novel, glu-tathione-sparing mechanism of action. *Arch. Biochem. Biophys.*, **381(2)**, 253-263.

- Caron JE, Krull KR, Hockenberry M, Jain N, Kaemingk K, Moore IM (2009).** Oxidative stress and executive function in children receiving chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer*, **53(4)**, 551-556.
- Celotti E, Ferrarini R, Zironi R, Conte LS (1996).** Resveratrol content of some wines obtained from dried Valpolicella grapes: Recioto and Amarone. *J. Chromatogr. A*, **730(1-2)**, 47-52.
- Chan ES, Cronstein BN (2002).** Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. *Arthritis Res.*, **4(4)**, 266-273.
- Chen CY, Wang YF, Huang WR, Huang YT (2003).** Nickel induces oxidative stress and genotoxicity in human lymphocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **189(3)**, 153-159.
- Chen ZG, Luo LL, Xu, JJ, Zhuang XL, Kong XX, Fu YC (2010).** Effects of plant polyphenols on ovarian follicular reserve in aging rats. *Biochem. Cell Biol.*, **88(4)**, 737-745.
- Colica C, Milanović M, Milić N, Aiello V, De Lorenzo A, Abenavoli L (2018).** A systematic review on natural antioxidant properties of resveratrol. *Nat. Prod. Commun.*, **13(9)**, 1195-1203.
- Collins AR (2014).** Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1840(2)**, 794-800.
- Cottart CH, Nivet-Antoine V, Laguillier-Morizot C, Beaudeux, JL (2010).** Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. *Mol. Nutr. Food Res.*, **54(1)**, 7-16.
- Crohns M, Liippo K, Erhola M, Kankaanranta H, Moilanen E, Alho H, Kellokumpu-Lehtinen P (2009).** Concurrent decline of several antioxidants and markers of oxidative stress during combination chemotherapy for small cell lung cancer. *Clin. Biochem.*, **42(12)**, 1236-1245.
- Das DK, Sato M, Ray PS, Maulik G, Engelman RM, Bertelli AA, Bertelli A (1999).** Cardioprotection of red wine: role of polyphenolic antioxidants. *Drugs Exp. Clin. Res.*, **25(2-3)**, 115-120.
- Das S, Das DK (2007).** Anti-inflammatory responses of resveratrol. *Inflamm. Allergy Drug Targets*, **6(3)**, 168-173.
- Das S, Lin HS, Ho PC, Ng KY (2008).** The impact of aqueous solubility and dose on the pharmacokinetic profiles of resveratrol. *Pharm. Res.*, **25(11)**, 2593-2600.
- Dickey RP, Taylor SN, Lu PY, Sartor BM, Rye PH, Pyrzak R (2002).** Effect of diagnosis, age, sperm quality, and number of preovulatory follicles on the outcome of multiple cycles of clomiphene citrate-intrauterine insemination. *Fertil. Steril.*, **78(5)**, 1088-1095.

Dubey L, Chatterjee S, Ghosh A. (2016). Hepatic and hematological adverse effects of long-term low-dose methotrexate therapy in rheumatoid arthritis: An observational study. *Indian J. Pharmacol.*, **48(5)**, 591-594.

Erdogan E, Ilgaz Y, Gurgor PN, Oztas Y, Topal T, Oztas E (2015). Rutin ameliorates methotrexate induced hepatic injury in rats1. *Acta Cir. Bras.*, **30(11)**, 778-784.

Erdost H (2016). *Dişi genital sistem*. Editör: Özer A. Veteriner Özel Histoloji. 3. Baskı. Bursa: Dora Yayıncılık, s: 219-251.

Erel O (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin. Biochem.*, **37(4)**, 277-285.

Erel O (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin. Biochem.*, **38(12)**, 1103-1111.

Eroschenko VP (2013). *DiFiore's atlas of histology with functional correlations (diFiore'nin histoloji atlası: fonksiyonel ilişkileriyle)*. Çev: Demir R, 12. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, s: 505-533.

Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF (1992). Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum. Reprod.*, **7(10)**, 1342-1346.

Frankel EN, German JB, Kinsella JE, Parks E, Kanner J (1993). Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, **341(8843)**, 454-457.

Fremont L (2000). Biological effects of resveratrol. *Life Sci.*, **66(8)**, 663-673.

Fridlington JL, Tripple JW, Reichenberg JS, Hall CS, Diven DG (2011). Acute methotrexate toxicity seen as plaque psoriasis ulceration and necrosis: a diagnostic clue. *Dermatol Online J.*, **17(11)**, 2.

Gangjee A, Dubash NP, Zeng Y, McGuire JJ (2002). Recent advances in the chemistry and biology of folypoly-γ-glutamate synthetase substrates and inhibitors. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, **2(3)**, 331-355.

Gartner LP, Hiatt JL (2000). *Color atlas of histology*. 3rd Edition, Baltimore: Lippincott Williams&Wilkins, p: 342.

Gartner LP, Hiatt JL (2006). *Color textbook of histology*. 3rd Edition, USA: Elsevier Health Sciences, p: 463-469.

Gedik E, Girgin S, Ozturk H, Obay BD, Ozturk H, Buyukbayram H (2008). Resveratrol attenuates oxidative stress and histological alterations induced by liver ischemia/reperfusion in rats. *World J. Gastroenterol.*, **14(46)**, 7101-7106.

Giovannini L, Migliori M, Longoni BM, Das DK, Bertelli AA, Panichi V, Filippi C, Bertelli A (2001). Resveratrol, a polyphenol found in wine, reduces ischemia reperfusion injury in rat kidneys. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **37(3)**, 262-270.

Gougeon A (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr. Rev.*, **17(2)**, 121-155.

Gönderen HHS, Kapucu S (2009). Nötropenik Hastada Nötropeniyi Değerlendirme Kriterleri ve Hemşirelik Bakımı. *Hacettepe Üniv. Hemş. Fak. Derg.*, **16(1)**, 69-75.

Gusman J, Malonne H, Atassi G (2001). A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis*, **22(8)**, 1111-1117.

Güney C (2019). *Erişkin sıçan ovaryumunda metotreksat hasarına karşı karayemişin etkileri.* Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

Halat M (2017). *Sıçanlarda metotreksat kaynaklı testis hasarı üzerine mezenkimal kök hücrenin histopatolojik etkisi.* Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.

Halliwell B (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.*, **52(8)**, 253-265.

Haneke KE (2002). *Review of toxicological literature, trans-resveratrol (501-36-0)* [PDF].
https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem_background/exsumpdf/resveratrol_508.pdf
(Erişim Tarihi: 12.02.2021)

Hashkes PJ, Becker ML, Cabral DA, Laxer RM, Paller AS, Rabinovich CE, Turner D, Zulian F (2013). Methotrexate: new uses for an old drug. *J. Pediatr.*, **164(2)**, 231-236.

Hortu I, Ozceltik G, Ergenoglu AM, Yigitturk G, Atasoy O, Erbas O (2020). Protective effect of oxytocin on a methotrexate-induced ovarian toxicity model. *Arch. Gynecol. Obstet.*, **301(5)**, 1317-1324.

Huang SS, Tsai MC, Chih CL, Hung LM, Tsai SK (2001). Resveratrol reduction of infarct size in Long-Evans rats subjected to focal cerebral ischemia. *Life Sci.*, **69(9)**, 1057-1065.

Hung LM, Chen JK, Huang SS, Lee RS, Su MJ (2000). Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovasc. Res.*, **47(3)**, 549-555.

Hyoun SC, Običan SG, Scialli AR (2012). Teratogen update: methotrexate. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.*, **94(4)**, 187-207.

Işık A, Işılay L, Erdemli EA, Akbay C, Anafarta K (1997). Sıçan testisinde metotreksat'ın ışık ve elektron mikroskop düzeyinde etkileri. *Ankara Üniv. Tıp Fak. Mecm.*, **50(3)**, 125-129.

Jalili C, Ghanbari A, Roshankhah S, Salahshoor MR (2020). Toxic effects of methotrexate on rat kidney recovered by crocin as a consequence of antioxidant activity and lipid peroxidation prevention. *Iran. Biomed. J.*, **24(1)**, 39-46.

Johnson WD, Morrissey RL, Osborne AL, Kapetanovic I, Crowell JA, Muzzio M, McCormick DL (2011). Subchronic oral toxicity and cardiovascular safety pharmacology studies of resveratrol, a naturally occurring polyphenol with cancer preventive activity. *Food Chem. Toxicol.*, **49(12)**, 3319-3327.

Junqueira LC, Carneiro J (2006). *Temel Histoloji*, (Çev.: Aytekin, Y., Solakoğlu, S.,) 10. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, s: 435-455.

Junqueira LC, Carneiro J (2009). *Temel Histoloji*, (Çev.: Aytekin, Y., Solakoğlu, S.,) 11. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, s: 435-438.

Kabakcı M, Kurutas EB, Bakarıs S, Güngör M (2015). The effect of erythropoietin on methotrexate-induced renal damage in rats: biochemical and histopathological studies. *Çukurova Med. J.*, **40(1)**, 98-106.

Karabulut AB (2008). Resveratrol ve etkileri. *Türkiye Klinikleri J. Med. Sci.*, **28(6)**, 166-169.

Karri S (2011). Effect of methotrexate and leucovorin on female reproductive tract of albino rats. *Cell Biochem. Funct.*, **29(1)**, 1-21.

Kawashima I, Kawasmura K (2017). Disorganization of the germ cell pool leads to primary ovarian insufficiency. *Reproduction*, **153(6)**, 205-213.

Keskin N, Noyan T, Kunter B (2009). Resveratrol ile üzümünden gelen sağlık. *Türkiye Klinikleri J. Med. Sci.*, **29(5)**, 1273-1279.

Kezele P, Skinner, MK (2003). Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. *Endocrinology*, **144(8)**, 3329-3337.

Kilic A, Uyanıkoğlu H, Incebiyik A (2016). Rat overinde iskemi-reperfüzyon üzerine N-Asetil sistemin ve resveratrol'ün koruyucu etkisi. *Dicle Tıp Derg.*, **43(2)**, 229-236.

Kierszenbaum A (2006). *Histoloji ve hücre biyolojisi*, (Çev.: Demir R.), Ankara: Palme yayıncılık, s: 565-568.

Kivity S, Zafir Y, Loebstein R, Pauzner R, Mouallem M, Mayan H (2014). Clinical characteristics and risk factors for low dose methotrexate toxicity: a cohort of 28 patients. *Autoimmun. Rev.*, **13(11)**, 1109-1113.

- Kocaman N, Çolakoğlu N (2013).** Tekrarlayan Dozlarda Metotreksat Uygulamasının Sıçan Böbrek Dokusu Üzerine Etkileri. *Fırat Tıp Derg.*, **18(4)**, 198-202.
- Koh S, Lee K, Wang C, Cabot RA, Machaty Z (2009).** STIM1 regulates store-operated Ca^{2+} entry in oocytes. *Dev. Biol.*, **330(2)**, 368-376.
- Kopp P (1998).** Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'?. *Eur. J. Endocrinol.*, **138(6)**, 619-620.
- Kuehnelt W (2003).** *Color atlas of cytology, histology and microscopic anatomy*. 4nd Edition, Luebeck: Georg Thieme Verlag, p: 400-404.
- Kuršvietienė L, Stanevičienė I, Mongirdienė A, Bernatoniene J (2016).** Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. *Medicina*, **52(3)**, 148-55.
- Mahady GB, Pendland SL (2000).** Resveratrol inhibits the growth of helicobacter pylori in vitro. *Am. J. Gastroenterol.*, **95(7)**, 1849.
- Maheshwari A, Fowler PA (2008).** Primordial follicular assembly in humans: revisited. *Zygote*, **16(4)**, 285-296.
- Mazza G (1995).** Anthocyanins in grapes and grape products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **35(4)**, 341-371.
- McLaren JF, Burney RO, Milki AA, Westphal LM, Dahan MH, Lathi RB (2009).** Effect of methotrexate exposure on subsequent fertility in women undergoing controlled ovarian stimulation. *Fertil. Steril.*, **92(2)**, 515-519.
- Mokni M, Elkahoui S, Limam F, Amri M, Aouani E (2007).** Effect of resveratrol on antioxidant enzyme activities in the brain of healthy rat. *Neurochem. Res.*, **32(6)**, 981-987.
- Mukherjee S, Dudley JI, Das, DK (2010).** Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. *Dose Response*, **8(4)**, 478-500.
- Murcia MA, Martinez-Tome M (2001).** Antioxidant activity of resveratrol compared with common food additives. *J. Food Prot.*, **64(3)**, 379-384.
- Nahirney PC, Ovale WK (2009).** *Netter temel histoloji*. (Çev. Edit.: Muftuoğlu S., Kaymaz F., Atilla P.), Ankara: Günes Tıp Kitabevi, s: 400-425.
- Nobili S, Lippi D, Witort E, Donnini M, Bausi L, Mini E, Capaccioli S (2009).** Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol. Res.*, **59(6)**, 365-378.
- Nonomura S, Kanagawa H, Makimoto A (1963).** Chemical constituents of polygonaceous plants. i. studies on the components of ko-j o-kon.(polygonum cuspidatum sieb. et zucc.). *Yakugaku Zasshi*, **83**, 988-990.

Olas B, Wachowicz B, Szewczuk J, Saluk-Juszczak J, Kaca W (2001). The effect of resveratrol on the platelet secretory process induced by endotoxin and thrombin. *Microbios*, **105(410)**, 7-13.

Ortega I, Duleba AJ (2015). Ovarian actions of resveratrol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1348(1)**, 86-96.

Öktem F, Yılmaz R, Ozguner F, Olgar S, Ayata A, Uzar E, Uz E (2006). Methotrexate-induced renal oxidative stress in rats: the role of a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. *Toxicol. Ind. Health*, **22(6)**, 241-247.

Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yöntem Z (2015). Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA. *J. Clin. Exp. Invest.*, **6(3)**, 331-336.

Özdemir HÜ (2014). *Resveratrolün sıçanlarda siklofosfomide bağlı ovaryum hasarı üzerindeki etkilerinin ışık ve elektron mikroskopik düzeyde incelenmesi.* İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Padmanabhan S, Tripathi DN, Vikram A, Ramarao P, Jena GB (2009). Methotrexate-induced cytotoxicity and genotoxicity in germ cells of mice: intervention of folic and folinic acid. *Mutat. Res.*, **673(1)**, 43-52.

Pallàs M, Porquet D, Vicente A, Sanfeliu C (2013). Resveratrol: new avenues for a natural compound in neuroprotection. *Curr. Pharm. Des.*, **19(38)**, 6726-6731.

Peters H (1969). The development of the mouse ovary from birth to maturity. *Acta Endocrinol.*, **62(1)**, 98-116.

Rauf A, Imran M, Butt MS, Nadeem M, Peters DG, Mubarak MS (2018). Resveratrol as an anti-cancer agent: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **58(9)**, 1428-1447.

Refaiy A, Muhammad E, ElGanainy E (2011). Semiquantitative smoothelin expression in detection of muscle invasion in transurethral resection and cystectomy specimens in cases of urinary bladder carcinoma. *Afr. J. Urol.*, **17(1)**, 6-10.

Roach MK, Andreotti RF (2017). The normal female pelvis. *Clin. Obstet. Gynecol.*, **60(1)**, 3-10.

Rocha-González HI, Ambriz-Tututi M, Granados-Soto, V (2008). Resveratrol: a natural compound with pharmacological potential in neurodegenerative diseases. *CNS Neurosci. Ther.*, **14(3)**, 234-247.

Ross MH, Pawlina W (2011). *Histology: a Text and Atlas.* 6nd Edition, Netherland: Lippincott Williams & Wilkins, p: 98-104.

Ross MH, Pawlina W (2011). *Histology: a Text and Atlas.* 6nd Edition, Netherland: Lippincott Williams & Wilkins, p: 830-894.

Sadler TW (2011). *Langman's medical embryology*. 12nd Edition, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p: 243-245.

Saladin KS (2008). *Human anatomy*. 2nd Edition, New York: The McGraw-Hill, p: 749-750.

Sales JM, Resurreccion AV (2014). Resveratrol in peanuts. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **54(6)**, 734-770.

Sayılmaz A, Karabulut Y, Özgörgülü A (2016). The histopathological evaluation of healing effects of vitamin C administered before methotrexate therapy on testicular injury induced by methotrexate. *Turk. J. Urol.*, **42(4)**, 235-239.

Schoenberg MH, Beger HG (1990). Oxygen radicals in intestinal ischemia and reperfusion. *Chem. Biol. Interact.*, **76(2)**, 141-161.

Silber S (2015). Unifying theory of adult resting follicle recruitment and fetal oocyte arrest. *Reprod. Biomed. Online*, **31(4)**, 472-475.

Simone CB, Simone NL, Simone V, Simone CB (2007). Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival. *Altern Ther Health Med.*, **13(1)**, 22-28.

Sinclair AJ, Barnett AH, Lunec J (1990). Free radicals and antioxidant systems in health and disease. *Br. J. Hosp. Med.*, **43(5)**, 334-344.

Soares M, Sahrari K, Chiti MC, Amorim CA, Ambroise J, Donnez J, Dolmans MM (2015). The best source of isolated stromal cells for the artificial ovary: medulla or cortex, cryopreserved or fresh?. *Hum. Reprod.*, **30(7)**, 1589-1598.

Sönmez MF, Çilenk KT, Karabulut D, Ünalmiş S, Deligönül E, Öztürk İ, Kaymak E (2016). Protective effects of propolis on methotrexate-induced testis injury in rat. *Biomed. Pharmacother.*, **79**, 44-51.

Şehirli Ö, Tozan A, Omurtag GZ, Cetinel S, Contuk G, Gedik N, Şener G (2008). Protective effect of resveratrol against naphthalene-induced oxidative stress in mice. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **71(1)**, 301-308.

Şen E (2019). *Sıçan ovaryum dokusunda doksorobisin ile indüklenmiş folliküler apoptotik aktivasyonda dialil disülfitin koruyucu etkisi*. Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa.

Şenol E (2004). *Son bir yılda febril nötropenide ne oldu? Etkenler ve epidemiyoloji (literatür değerlendirilmesi)*. Üçüncü Febril Nötropeni Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu. 27-29 Şubat. Bilkent Oteli, Ankara.
https://www.febrilnotropeni.net/pdf/3_MSEK/literatur_degerlendirmesi.pdf (Erişim Tarihi: 17.08.2021)

Şentürk N (2016). Metotreksat. *Turkderm*, **50**, 20.

Taşkın L (2005). *Kadın hastalıkları hemşireliği*. 9. Baskı, Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları, s: 24-27.

Tian H, Cronstein BN (2007). Understanding the mechanisms of action of methotrexate. *Bull. NYU Hosp. Jt. Dis.*, **65(3)**, 168-173.

Tomé-Carneiro J, Larrosa M, González-Sarriás A, Tomas-Barberan FA, Garcia-Conesa MT, Espin JC (2013). Resveratrol and clinical trials: the crossroad from in vitro studies to human evidence. *Curr. Pharm. Des.*, **19(34)**, 6064-6093.

Tunalı-Akbay T, Sehirli O, Ercan F, Sener G (2010). Resveratrol protects against methotrexate-induced hepatic injury in rats. *J. Pharm. Sci.*, **13(2)**, 303-310.

Uygur AG, Şingirik E, Yücel AH (2019). Metotreksat kaynaklı hasarlarda alfa lipik asit'in koruyucu etkisi. *Arşiv Kayn. Tar. Derg.*, **28(3)**, 227-236.

Uzar E (2006). *Metotreksat uygulanan ratların siyatik sinir ve medulla spinalisinde oksidan/antioksidanların durumu: kafeik asit fenetil ester'in antioksidan koruyucu etkisi*. Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı. Isparta.

Vadi M (2017). *Resveratrolün metoterksat uygulanan ratlarda total oksidan-antioksidan durumuna ve DNA hasarına etkisi*. Yüzüncüyıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Van.

Vardi N, Parlakpınar H, Cetin A, Erdogan A, Cetin Ozturk I (2010). Protective effect of β -carotene on methotrexate-induced oxidative liver damage. *Toxicol. Pathol.*, **38(4)**, 592-597.

Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Walle UK (2004). High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metabol. Dispos.*, **32(12)**, 1377-1382.

Walter P (2001). Towards ensuring the safety of vitamins and minerals. *Toxicol. Lett.*, **120(1-3)**, 83-87.

Wang Q, Xu J, Rottinghaus GE, Simonyi A, Lubahn D, Sun GY, Sun AY (2002). Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. *Brain Res.*, **958(2)**, 439-447.

Waung A, Grant A (2001). *Ross and Wilson anatomy and physiology in health and illness*. 9nd Edition, London: Churchill Livingstone, p: 289-293.

Weijl NI, Cleton FJ, Osanto S (1997). Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. *Cancer Treat. Rev.*, **23(4)**, 209-240.

Weindruch R (2003). Caloric restriction gene expression and aging. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, **17(2)**, 58-59.

Weinstein JN, Myers TG, O'Connor PM, Friend SH, Fornace AJ, Kohn KW, Fojo T, Bates SE, Rubinstein LV, Anderson NL, Buolamwini JK, Van Osdol WW, Monks AP, Scudiero DA, Sausville EA, Zaharevitz DW, Bunow B, Viswanadhan VN, Johnson GS, Wittes RE, Paull KD (1997). An information-intensive approach to the molecular pharmacology of cancer. *Science*, **275**(5298), 343-349.

White AC, Sousa AM, Blumberg J, Ryan HF, Fanburg BL, Kayyali US (2006). Plasma antioxidants in subjects before hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, **38**(7), 513-520.

Widemann BC, Adamson PC (2006). Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist*, **11**(6), 694-703.

Wildburger R, Mrakovcic L, Stroser M, Andrisic L, Borovic Sunjic S, Zarkovic K, Zarkovic N (2009). Lipid peroxidation and age-associated diseases-cause or consequence? Review Citation. *Turk. Klin. Tip Bilim. Derg*, **29**, 189-193.

Yikrazuul (2010). File: Piceid.svg.
<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Piceid.svg>. (Erişim Tarihi: 14.12.2020).

Young IS, Woodside JV (2001). Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.*, **54**(3), 176-186.

Yuluğ E, Türedi S, Alver A, Türedi S, Kahraman C (2013). Effects of resveratrol on methotrexate-induced testicular damage in rats. *Scientific World J.*, **28**, 1-6.

Zadak Z, Hyspler R, Tichá A, Hronek M, Fikrová P, Rathouská J, Hrnčiariková D, Stetina R (2009). Antioxidants and vitamins in clinical conditions. *Physiol. Res.*, **58**(1), 13-17.

Zhang C, Feng Y, Qu S, Wei X, Zhu H, Luo Q, Liu M, Chen G, Xiao, X (2011). Resveratrol attenuates doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis in mice through SIRT1-mediated deacetylation of p53. *Cardiovasc. Res.*, **90**(3), 538-545.

Zhang W, Chen Q, Yang Y, Liu W, Zhang M, Xia G, Wang C (2014). Epidermal growth factor-network signaling mediates luteinizing hormone regulation of BNP and CNP and their receptor NPR2 during porcine oocyte meiotic resumption. *Mol. Reprod. Dev.*, **81**(11), 1030-1041.

Zhao YN, Li WF, Li F, Zhang Z, Dai YD, Xu AL, Qi C, Gao JM, Gao J (2013). Resveratrol improves learning and memory in normally aged mice through microRNA-CREB pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **435**(4), 597-602.

