

T.C.  
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PRENATAL UYGULANAN DİKLOFENAK SODYUMUN POSTNATAL  
SIÇAN OVARYUM PREANTRAL FOLLİKÜL SAYISINA  
ETKİLERİNİN STEREOLOJİK YÖNTEMLERLE  
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Neşe ÇÖLÇİMEN  
TIBBİ HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
(TIP PROGRAMI)

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Murat Çetin RAĞBETLİ

VAN-2013

T.C.  
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PRENATAL UYGULANAN DİKLOFENAK SODYUMUN POSTNATAL  
SIÇAN OVARYUM PREANTRAL FOLLİKÜL SAYISINA  
ETKİLERİNİN STEREOLOJİK YÖNTEMLERLE  
ARAŞTIRILMASI**

Dr.Neşe ÇÖLÇİMEN  
TIBBİ HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
(TIP PROGRAMI)

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Murat Çetin RAĞBETLİ

VAN-2013

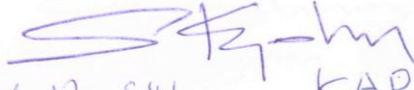
“Bu çalışma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından  
Proje No:2013-SBYE-D053 olarak desteklenmiştir.”

T.C.  
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

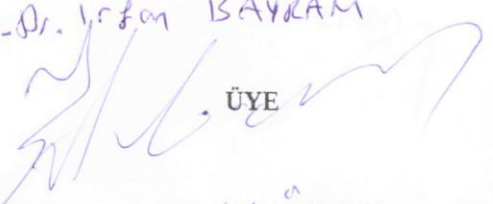
**PRENATAL UYGULANAN DİKLOFENAK SODYUMUN POSTNATAL  
SIÇAN OVARYUM PREANTRAL FOLLİKÜL SAYISINA  
ETKİLERİNİN STEREOLOJİK YÖNTEMLERLE**

**ARAŞTIRILMASI**

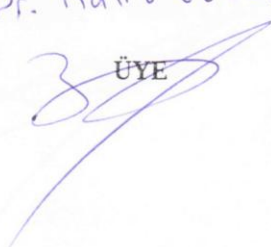
Dr. Neşe ÇÖLÇİMEN  
TIBBİ HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
(TIP PROGRAMI)  
DOKTORA TEZİ

  
Prof. Dr. Süleyman KAPLAN  
BAŞKAN

  
Prof. Dr. Murat Çetin RAĞBETLİ  
ÜYE

  
Prof. Dr. İrfan BAYRAM  
ÜYE

  
Yard. Doç. Dr. M. KAYA  
ÜYE

  
Yard. Doç. Dr. Halil ÖZLÜ  
ÜYE

TEZ KABUL TARİHİ

07/09/2013

## TEŞEKKÜR

Histoloji ve Embriyoloji eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi, yardım ve desteğini esirgemeyen Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Murat Çetin RAĞBETLİ' ye ve Yrd. Doç. Dr. Mikail KARA'ya, İstatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Sıddık KESKİN'e ayrıca laboratuvar çalışmalarım ve tezimin her aşamasında yardımda bulunan Veysel AKYOL'a, patoloji laboratuvarının tüm çalışanlarına ve tezime emeği geçen herkese özellikle aileme, ayrıca 2013-SBYE-D053 No'lu proje olarak desteklerinden ötürü Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| Tez kabul tarihi .....                                             | III  |
| Teşekkür .....                                                     | IV   |
| İçindekiler .....                                                  | V    |
| Simgeler ve kısaltmalar .....                                      | VII  |
| Şekiller Listesi .....                                             | VIII |
| Tablolar Listesi.....                                              | VIII |
| 1.GİRİŞ .....                                                      | 1    |
| 2.GENEL BİLGİLER .....                                             | 4    |
| 2.1. Ovaryum .....                                                 | 4    |
| 2.1.1. Ovaryum embriyolojisi.....                                  | 4    |
| 2.1.2. Ovaryum anatomisi.....                                      | 6    |
| 2.1.3. Ovaryum histolojisi.....                                    | 8    |
| 2.1.4. Ovaryum fizyolojisi .....                                   | 9    |
| 2.2. Nonsteroidal Antiinflatuar İlaçlar.....                       | 12   |
| 2.2.1. Nonsteroidal antiinflatuar ilaçların tarihçesi.....         | 12   |
| 2.2.2 Nonsteroidal antiinflatuar ilaçların etki mekanizmaları..... | 13   |
| 2.2.3. Nonsteroidal antiinflatuar ilaçların genel özellikleri..... | 15   |
| 2.2.4. Nonsteroidal antiinflatuar ilaçların sınıflandırılması..... | 15   |
| 2.3. Diklofenak Sodyum.....                                        | 16   |
| 2.3.1. Diklofenak sodyumun kimyasal yapısı.....                    | 16   |

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.3.2. Diklofenak sodyumun formülü.....                                   | 17 |
| 2.3.2. Diklofenak sodyumun farmakolojisi.....                             | 17 |
| 2.3.4. Diklofenak sodyumun gebelikte kullanımı.....                       | 18 |
| 2.4. Stereoloji Nedir? .....                                              | 19 |
| 2.4.1. Stereolojik metotlar.....                                          | 19 |
| 2.4.2. Disektör.....                                                      | 23 |
| 2.4.3. Cavalieri Metodu .....                                             | 23 |
| 2.4.3.1 Hacim hesaplaması için kesit yüzey alanlarının hesaplanması.....  | 26 |
| 2.4.3.2 Toplam hacmin hesaplanması .....                                  | 27 |
| 2.4.3.3 Bileşen hacmi ve hacim oranlarının hesaplanması .....             | 28 |
| 2.4.3.4 Hacim oranından bileşenin toplam hacminin bulunması.....          | 28 |
| 2.4.3.5 Nokta sayım yöntemi ile alan ve hata miktarının hesaplanması..... | 30 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM .....                                                  | 32 |
| 3.1. Gereç .....                                                          | 32 |
| 3.2. Yöntem.....                                                          | 34 |
| 3.2.1. Ovaryum dokusunun kesit işlemleri.. .....                          | 34 |
| 3.2.2. Ovaryum dokusunun boyama işlemleri .....                           | 35 |
| 3.3. İstatik Analiz .....                                                 | 36 |
| 4. BULGULAR.....                                                          | 37 |
| 5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....                                                  | 46 |
| ÖZET .....                                                                | 50 |
| SUMMARY .....                                                             | 51 |
| KAYNAKLAR .....                                                           | 52 |
| ÖZGEÇMİŞ.....                                                             | 57 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|              |                                                    |
|--------------|----------------------------------------------------|
| <b>CE</b>    | : Coefficient Error                                |
| <b>CV</b>    | : Coefficient of Variation                         |
| <b>DA</b>    | : Ductus arteriosus                                |
| <b>FDA</b>   | : Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi |
| <b>HK</b>    | : Hata Katsayısı                                   |
| <b>İM</b>    | : İntra müsküler                                   |
| <b>İM</b>    | : Işık Mikroskobu                                  |
| <b>NSAİİ</b> | : Nonsterodial Antiinflamatuvar İlaç               |
| <b>PG</b>    | : Prostaglandin                                    |
| <b>SPSS</b>  | : Statistical Package for the Social Sciences      |
| <b>SRÖ</b>   | : Sistematik Rastgele Örnekleme                    |
| <b>OBJ</b>   | : Objektif                                         |
| <b>PGH</b>   | : Primordiyal Germ Hücreleri                       |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. Üç haftalık embriyoda, primordiyal germ hücreleri.....                                                                                     | 5  |
| Şekil 2. Overlerin anatomisi .....                                                                                                                  | 6  |
| Şekil 3. Over korteksi çeşitli büyüme evrelerindeki veya atrezik foliküller .....                                                                   | 10 |
| Şekil 4. Diklofenak Sodyum kimyasal yapısı.....                                                                                                     | 17 |
| Şekil 5. Kesitlerde boyut azalması . ....                                                                                                           | 20 |
| Şekil 6. Kesit yöneliminin iz düşüm sayısına etkisi .....                                                                                           | 21 |
| Şekil 7. Tanecik yöneliminin kesitlerdeki izdüşüm sayısına etkisi. ....                                                                             | 21 |
| Şekil 8. Doku içerisinde bulunan farklı büyüklükteki tanecikler ve iki boyutlu<br>düzlemlerdeki izdüşümleri. ....                                   | 22 |
| Şekil 9. Noktalı alan ölçüm cetveli.....                                                                                                            | 26 |
| Şekil 10. Cavalieri yöntemi ile hacim hesaplaması yapılırken, kesitlerin hep aynı yöne<br>bakan yüzeylerinin ölçümü için kullanılmasının önemi..... | 28 |
| Şekil 11. Bileşik bir noktalı alan ölçüm cetveli.....                                                                                               | 29 |
| Şekil 12. Dört haftalık sıçanların beslendiği kafesler.....                                                                                         | 33 |
| Şekil 13. Ovaryum makroskobik görünümü .....                                                                                                        | 33 |
| Şekil 14. Kesit alınan mikrotom.....                                                                                                                | 34 |
| Şekil 15. Sayımda kullanılan fotoğraf ataşmanı ilave edilmiş mikroskop.....                                                                         | 35 |
| Şekil 16. Gruplara ait ovaryum total volüm nokta sayısı.....                                                                                        | 39 |

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 17.</b> Gruplara ait ovaryum primordiyal folikül sayısı.....            | 40 |
| <b>Şekil 18.</b> Denek grubuna ait ovaryum (Masson Trikrom, x40 Obj ).....       | 42 |
| <b>Şekil 19.</b> Denek grubuna ait ovaryum (Masson Trikrom, x4 Obj) .....        | 42 |
| <b>Şekil 20.</b> Kontrol grubuna ait ovaryum (Hematoksilen-Eozin, x4 Obj).....   | 43 |
| <b>Şekil 21.</b> Kontrol grubuna ait ovaryum (Hematoksilen-Eozin, x40 Obj) ..... | 43 |
| <b>Şekil 22.</b> Denek grubuna ait ovaryum (Hematoksilen-Eozin, x4 Obj).....     | 44 |
| <b>Şekil 23.</b> Denek grubuna ait ovaryum (Hematoksilen-Eozin, x40 Obj).....    | 44 |
| <b>Şekil 24.</b> Sham grubuna ait ovaryum (Hematoksilen-Eozin, x4 Obj) .....     | 45 |
| <b>Şekil 25.</b> Sham grubuna ait ovaryum (Hematoksilen-Eozin, x40 Obj) .....    | 45 |

## TABLolar LİSTESİ

|                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.</b> Sistematik rastgele örnekleme planının hata katsayısını (CE) hesaplamak için kullanılan tablo örneği ..... | 31 |
| <b>Tablo 2.</b> Denek ,kontrol ve sham grubuna ait CV ve CE değerleri.....                                                 | 37 |
| <b>Tablo 3.</b> Denek grubuna ait ovaryum volüm nokta sayıları ve total volümleri.....                                     | 38 |
| <b>Tablo 4.</b> Sham grubuna ait ovaryum volüm nokta sayıları ve total volümleri .....                                     | 38 |
| <b>Tablo 5.</b> Kontrol grubuna ait ovaryum volüm nokta sayıları ve total volümleri.....                                   | 39 |
| <b>Tablo 6.</b> Gruplara ait ovaryum total primordiyal folikül sayısı .....                                                | 40 |
| <b>Tablo 7.</b> Tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları .....                                                 | 41 |

## 1.GİRİŞ

Birçok hastalığın tedavisinde ilaç kullanımı vazgeçilmez bir yöntemdir. Burada önemli olan nokta ilaç seçimi konusudur. Özellikle gebelik dönemi, ilaç kullanımı risklerini ve ilaç etkilerini değerlendirerek daha dikkatli ilaç seçimi gerektirir. Bazı ilaçlar ve kimyasal maddeler gebelik süresince fetüs üzerinde zararlı etki göstererek, fetusta kalıcı morfolojik ve fonksiyonel değişikliklere neden olabilirler. Son yıllarda gelişen teknoloji her alanda olduğu gibi sağlık alanında da tüketici bir toplum ortaya çıkarmıştır. Bunun bir sonucu olarak, ilaç tüketimi kontrolsüz bir şekilde artmıştır. Bu nedenle ve ayrıca gebelik döneminin ileri yaşlarda yaşanır olması, birçok hastalıkla birlikte bu sürecin geçirilmeside bu dönemde ki ilaç kullanımındaki artışı etkilemiştir. Ülkemizde en çok tüketilen ilaçlar; antibiyotikler, ağrı kesiciler ve antiromatizmal ilaç gruplarıdır. Bunlardan Nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) dünyada en çok kullanılan ilaçlardır. Ülkemizde de bu grup ilaçların toplam ilaç tüketimindeki yeri % 25’dir (Gökalp ve Mollaoğlu, 2003). Bağımlılık yapmadığı için birçok romatizmal hastalığın uzun süreli tedavisinde kullanılırlar ve NSAİİ genelde anti-romatizmal ilaç olarak bilinirler. Antiinflamatuvar özelliklerinden dolayı kas iskelet rahatsızlıklarında ve eklem hastalıklarında da tercih edilmektedirler. Ayrıca NSAİİ’lar grubundan olan Diklofenak sodyumun primer dismenorede, rahim içi araçların neden olduğu dismenorede ve menorajileri tedavi etmede, erken doğum, semptomatik polihidroamnios ve preeklampsiyi önlemede sıklıkla kadın hastalıkları ve doğum uzmanlarınca da kullanıldığı bilinmektedir (Odacı ve ark., 2001 (2-5))

NSAİİ’ların romatoid artirit tedavisindeki etkisi aspirin ve indometazinde araştırılmıştır. NSAİİ’nin gebelik süresince kullanımının annede ve fetusda yan etkilere yol açtığı bildirilmiştir. Antiromatizmal ilaçların gebelikte kullanımı ile ilgili bilgiler sınırlıdır bu nedenle gebeliğin son trimesterinde tokolitik veya artrit tedavisi amacıyla uygulamada kullanılan NSAİİ’da çok dikkatli olunmalıdır. Gebelikte verilen diklofenak sodyum’un doğum ve gebelik süresini uzattığı yapılan çalışmalarda tesbit edilmiştir. Prenatal dönemde oligohidroamnios, hidrops fetalis, duktus arteriosusta (DA) kasılma, ileal perforasyon, beyinde kistik lezyonlara ve özellikle karaciğerde parankimal dejenerasyona yol açtığı bildirilmiştir (Gökçimen ve ark., 2003 ). Bu tür ilaçların prostaglandinlerin sentezini inhibe

ederek etki gösterdiği, plasental bariyeri geçerek fetal dolaşıma girdiği, toksik etkilerini çeşitli organ ve dokularda gösterdiği bilinmektedir. Yine prenatal dönemde kullanılan NSAİİ'lerin fetüsün organ gelişimini olumsuz etkilediği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Bu nedenle bu grup ilaçlar fetüs ve yeni doğanlarda ciddi yan etkilere ve hatta malformasyonlara neden olabilirler. Yapılan birçok çalışmada bu bilgiyi destekler niteliktedir. Örneğin, Prenatal dönemde uygulanan 1mg/kg NSAİİ'nin postnatal dönemde sıçan akciğer kapiller sayısı üzerine etkisi değerlendirilmiş, denek grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir (Kaplan ve ark., 1994).

Deneyssel hayvan çalışmaları NSAİİ'nin kullanımının fetüse zararlı etkisinin; malformasyon (Persaud ve Moore, 1974), duktus arteriozusun kapanması (Haris, 1980; Rudolf, 1981) ve bunun akabinde gelişen pulmoner arteriel hipertansiyon (Carp ve ark., 1998)) şeklinde olduğunu göstermiştir. NSAİİ'lerin (Diklofenak sodyum vb.), fetüste ve yenidoğanda toksik etkiler meydana getirirken, gebelerde gebelik ve doğum süresini uzattığı tesbit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda NSAİİ'lerin sıçanların normal gebelik süresini 21-23 günden 28-29 güne kadar uzattığı ve aynı durumun NSAİİ kullanan gebelerde de olduğu gözlenmiştir (Gökçimen ve Malas, 2003).

Brooks ve Needs,(1985) yaptıkları çalışmada gebe sıçanlara 5 mg/kg diklofenak sodyum uygulanmasıyla fetusların kaburgalarında deformitelere yol açtığını bildirilmişlerdir. Aksine Russel (1986) yaptığı çalışmasında ise gebe tavşanlarda 10mg/kg diklofenak uygulanmasının herhangi bir teratojenik etki göstermediğini rapor etmiştir. Yine Rağbetli ve ark., (1996) yaptıkları çalışmalarında, prenatal diklofenak sodyuma (1 g/kg günlük) maruz bırakılan postnatal 20 haftalık erkek sıçanların dorsal hipokampus tabakalarının kalınlıklarında herhangi bir değişiklik oluşturmadığını rapor etmişlerdir.

Gebelikte kullanılan NSAİİ'ler ductus arteriosus'da kasılmaya sebep olmakta ve bunun sonucunda sağ ventrikül yetmezliği ve pulmoner hipertansiyon gelişmektedir, yeni doğanda karaciğer parankiminde vakuoler ve granüler dejenerasyonlar görüldüğü rapor edilmiştir ( Cotran ve ark.,1999).

NSAİİ'ler infertiliteye sebep olmaktadırlar. Her ovulasyondan sonra birçok memelide implantasyona gerçekleşmesini sağlayacak endometrial değişiklikler gerçekleşir. Ovülasyondan sonra Blastosistin implantasyonu için uygun bir endometrial ortam oluşmasına, bu bölgede prostaglandinlerin artışının katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Pakrasi ve Dey. 1982; Kennedy, 1997). Preimplantasyon döneminden itibaren sıçanlara bir prostaglandin

sentetaz inhibitörü olan diklofenak sodyum uygulanmış, zigot implantasyon oranı ve gebelik süresi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada denek grubu sıçanların gebelik süresinin kontrol grubundan anlamlı derecede daha uzun olduğu tesbit edilmiştir. Bu çalışma gebeliğin ilk yarısında uygulanan prostaglandin inhibe edici ajanların, gebeliğin sonunda doğum eyleminin başlamasını geciktirerek, gebelik süresini uzatabileceğini göstermiştir. Bu sonuç gebeliğin ilk yarısında uygulanan antiprostaglandinlerin, prostaglandin sentezi üzerinde veya sentez edildiği ortamda uzun süreli bozukluk meydana getirmiş olması ile açıklanmıştır (Kökçü ve ark., 1992). Başka bir çalışmada, diklofenak sodyum uygulanan sıçanlarda blastosist implantasyonunu % 34 oranında geciktiği bildirilmiştir (Carp ve ark., 1998).

Güven ve ark., (2013) yaptıkları bir çalışmada prenatal yaşamda diklofenak sodyum uygulanan dişi ratlarda ovaryum ve uterus boynuzunun volümleri üzerine sterolojik bir araştırma yapmışlar volümlerde anlamlı değişiklik olmadığını tesbit etmişler.

NSAİİ'nin klinik uygulamalarda kullanımında yapılan çalışmalarda, kırık sonrası sık kullanımı olan antiinflamatuvar ilaç diklofenak sodyumun, sıçan tibia kırıklarında insanlara uygulanan doz aralığında ve kırık sonrası on günlük kullanımda kallus gelişimi ve kırık iyileşmesini olumsuz yönde etkilemediği sonucuna varılmıştır (Akman ve ark., 2001)

Jarko-Levin Sendromu, Spondilocostal Disostoz gibi çok nadir olarak görülen konjenital anomalilerin son on yıl içinde ülkemizde de görüldüğünün bildirilmiş olması NSAİİ'nin yaygın bir şekilde ülkemizde de kullanıldığını desteklemektedir. Bu bilgiler ışığında NSAİİ'nin gebelikte hekimler tarafından tercih edilmesinde daha dikkatli olunması önerilmektedir (Gökçimen ve Malas, 2003).

Literatür taramamızda diklofenak sodyumun gebe ve fetus üzerine etkisini araştıran yayınlar mevcut olsa da Prenatal dönemde uygulanan Diklofenak sodyumun 4 haftalık dişi fetus ovaryum preantral folikül sayısı üzerine etkisini gösteren stereolojik olarak yapılan bir çalışmaya rastlamadık. Çalışmamız ve sonuçları bu alanda yeni bilgiler olduğundan orjinal bir araştırma özelliği taşımaktadır.

Bu çalışmanın amacı; NSAİİ grubundan olan diklofenak sodyumun gebelikte uygulanması sonucu dişi fetusun over morfolojik volümü ve preantral folikül sayısına olan etkilerinin stereolojik metotlarla araştırmaktır.

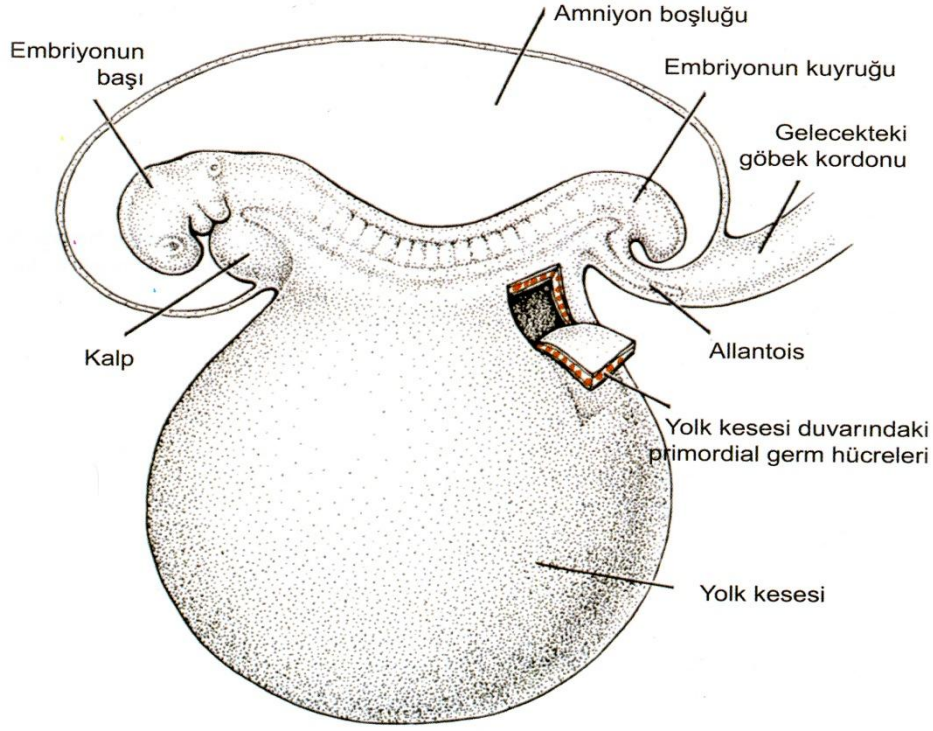
## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Ovaryum

#### 2.1.1. Ovaryum embriyolojisi

Embriyonal gelişim, dişi gamet (oosit) ve erkek gamet (sperm) birleşerek zigot oluşturmaya anlamına gelen döllenme (fertilizasyon) ile başlar. Gametler ikinci hafta boyunca epiblastın içinde oluşan ve daha sonra da yolk kesesine göç eden primordiyal germ hücrelerinden (PGH) köken alırlar. Primordial germ hücreleri dördüncü haftadan itibaren, bu sefer yolk kesesinden, gelişmekte olan gonadlara doğru yerleşmeye başlar ve hedeflerine beşinci haftada ulaşırlar. Göç sırasında başlayan mitotik bölünmelerle sayıca kalabalıklaşan hücrelerin bu durumu gonada ulaştıktan sonra da devam eder. Fertilizasyona hazırlık amacıyla germ hücreleri gametogenez sürecine girerler. Gametogenez sırasında mayozla kromozom sayısı azalır. Daha sonra da sitodiferansiyasyonla gamet hücreleri olgunlaşırlar (Sadler, 2005).

Embriyonik yaşamın yaklaşık birinci ayında, primordiyal germ hücrelerinden oluşan küçük bir hücre topluluğu vitellüs kesesinden gonad taslağına göç eder. Gonadlarda bu hücreler bölünerek oogonyumlara dönüşür. Bölünmeler o kadar yoğundur ki, uterus içi yaşamın ikinci ayında yaklaşık 600.000 beşinci ayı dolaylarında da 7 milyonun üzerinde oogonyum vardır. Üçüncü aydan başlayarak oogonyumlar birinci mayoz bölünmenin profaz evresine girmeye başlar, ancak bölünme diploten evresinde durarak mayoz bölünmenin diğer evrelerine ilerlemez ve puberteye girilene kadar birinci mayotik bölünmelerini tamamlamazlar. Bu hücreler primer (birinci) oositlerdir ve foliküler hücreler olarak adlandırılan yassı hücrelerle çevrilidir. Gebeliğin yedinci ayına ulaşıldığında, oogonyumların çoğu primer oositlere dönüşmüştür. Ancak, atrezi olarak adlandırılan bir yıkımla (dejeneratif süreçle) primer oositlerin çoğu yok olur. Sonuç olarak puberte (ergenlik) dolaylarında overler yaklaşık 300.000 oosit içerir. Atrezi, kadının üreme çağı boyunca sürer ve 40- 45 yaşlarında yaklaşık 8000 oosit kalır. Ortalama 28 günlük her aybaşı döngüsünde genellikle tek bir oosit atıldığından ve kadının doğurganlık çağı 30-40 yıl sürdüğünden, sadece 450 kadar oosit atılmış olur. Tüm diğer oositler atrezi yoluyla yok edilirler (Junqueira ve Carneiro, 2006).



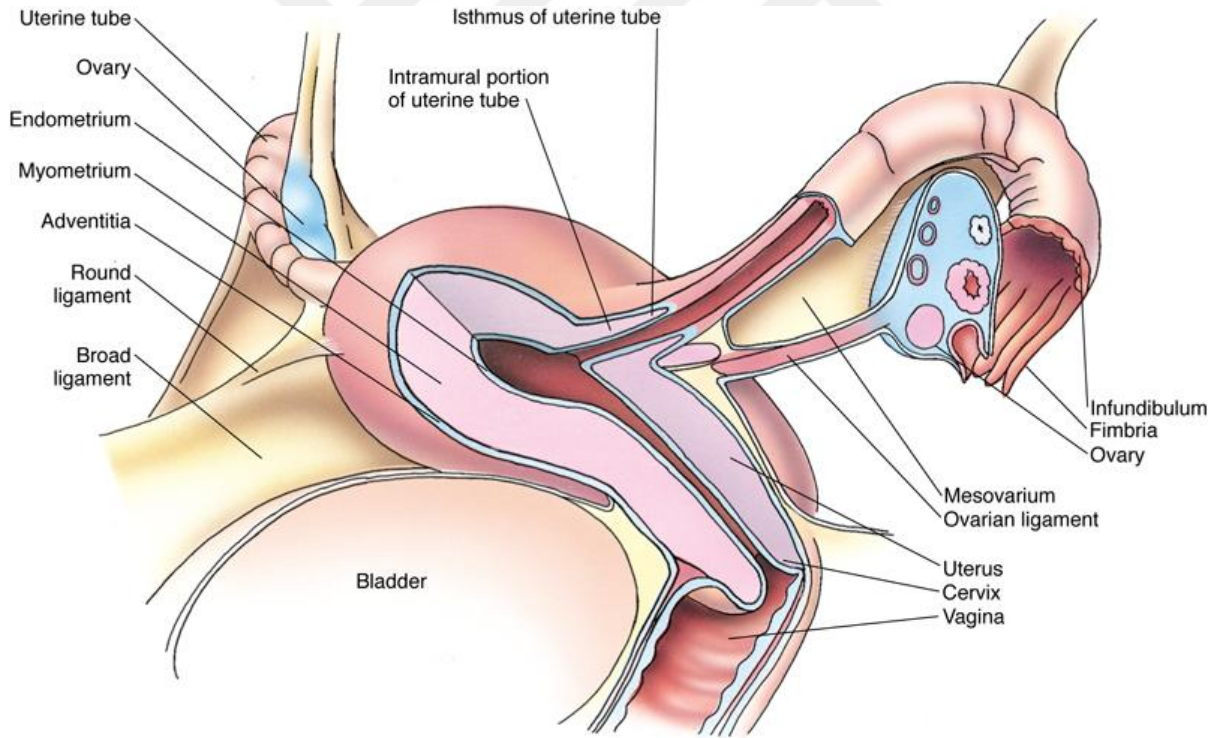
**Şekil 1.** Üç haftalık embriyoda, primordiyal germ hücrelerinin yolk kesesi duvarında daha sonra umbilikal kord haline gelecek olan yapının yakınında bulundukları görülmektedir. Bu hücreler daha sonra gelişmekte olan gonadlara göç edeceklerdir (Saddler, 2005).

Puberteye ulaşıldığında dişi gonad artık primordiyal foliküllerden beslenen bir folikül havuzuna sahip olmuş durumdadır. Her ovarial siklusta bu havuzdan seçilen 5 ila 15 arasında değişen sayıda primordiyal folikül 3 aşamadan geçerek olgunlaşmaya başlar; 1) primer veya preantral; 2) sekonder veya antral (aynı zamanda veziküler veya Grafiyaan olarak da bilinir) ve 3) preovulatuvar. Bunlar arasında en uzun süren dönem antral evredir. Preovulatuvar evre yaklaşık 37 saat sürer. Hala diploten devresinde istirahat halinde olan primer oosit büyümeye başladığında, oositi çevreleyen yassı epitel hücreleri önce kübikleşir, sonra çoğalarak çok sıralı bir epitel tabakası oluşturur. Çoğalan bu hücrelere granüloza hücreleri denir. Bu biçimiyle folikül artık primer folikül olarak adlandırılır. Granüloza hücreleri kendilerini çevrelerindeki, teka folikülü olarak bilinen stromal hücrelerden ayıran bir bazal membran üzerinde otururlar. Granüloza hücreleri ve oosit tarafından salgılanan glikoprotein yapısındaki bir madde oositin çevresinde zona pellusida adıyla bilinen bir tabaka oluşturur. Folikül

büyümeye devam ederken teka folikülünün hücreleri salgı yapan hücrelerden oluşan teka interna ve fibroblast benzeri hücreler içeren bağ dokusundan oluşan fibröz bir kapsül olan teka eksterna adlı iki belirgin tabaka şeklinde farklanır. Oositi çevreleyen granüloza hücreleri bozulmadan kalarak kümulus ooforusu oluştururlar (Sadler, 2005 ).

### 2.1.2. Ovaryum anatomisi

Bir çift badem şeklinde üreme organıdır. Overler; grimsi pembe renkte, 3 cm uzunluğunda, 1.5 cm genişliğinde ve 1cm kalınlığında, 4-6 gr ağırlığındadır. Dişi üreme hücresini (ovum) üretirler. Dişi üreme sistemini düzenleyen Steroid yapıdaki hormonları oluşturur ve salgırlar. Overler, pelvis minörün dış duvarında ve fossa ovarii denilen çukurun içinde yerleşmişlerdir. Fossa ovarii, önde oblitere olmuş arteria umblikalis, arkada üreter ve A.İliaka interna ile sınırlanmıştır (Ferner ve Staubsant, 1982 ). (DiSaia, 1994).



Şekil 2. Overlerin anatomisi. ( kadın üreme anatomisi Göktepeliler.com 141.ipg)

Over yüzeyi basit ya da kübik epitelle örtülüdür; bu epitel germinal epitel olarak adlandırılır. Germinal epitelin altında, ovaryuma beyazımsı rengini veren ve tunika albuginea olarak adlandırılan tıkHz bir bağ dokusu katmanı bulunur. Tunika albugineanın altında oositleri

içeren ovaryum foliküllerinin bol miktarda bulunduğu (kortikal bölge) yer alır. Foliküller, kortikal bölgenin bağ dokusu (stroma) içinde gömülüdür. Bu stroma tipik iğ biçiminde fibroblast içerir ve bu fibroblastlar, hormonal uyarılara diğer organların fibroblastlarından farklı yanıt verir. Overler korteks (germinal hücreler, çeşitli evrelerdeki foliküller, teka hücreleri, granüloza hücreleri ve çeşitli evrelerdeki korpus luteum hücreleri içeren) bölümü ve medulla (teka hücreleri, bağ dokusu kan damarları ve sinirler içeren) bölümlerinden oluşur (Ackermann, 2006 ).

Ovaryumun en iç kısmı gevşek bağ dokusu içinde zengin bir damar yatağı içeren medüller bölgedir. Korteks ile medulla bölgeleri arasında kesin bir sınır yoktur (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Overlerin dış yüzü ovulasyon başlamadan önce düzdür. Ovulasyon ile graff folikülünün oluşması yüzeyde çukurluklara neden olur. Ovulasyondan sonra ise oluşan korpus luteumun dejenerasyonunu gösteren skar dokusu ile büzülmeler görülebilir. Overin konumu doğum yapan kadınlarda değişiklik gösterir. İlk doğumla birlikte yeri değişen over bir daha normal yerine dönmez. Over, hareketli bir organdır (Ferner ve Staubcsant, 1982). Ayakta dururken overin uzun eksenini vertikaldir. Facies medialis ve facies lateralis adı verilen iki yüzü, ekstremitas uterina (alt) ve ekstremitas tubaria (üst) denilen iki ucu margo mesoovarii (ön) ve margo liber (arka) diye isimlendirilen iki kenarı vardır (Grant, 1972), ( DiSaia, 1994)

Overler embriyonal hayatta karın arka duvarında böbreklerin yanında yerleşmişlerdir. Sonra yavaş yavaş pelvise inerler. Erişkinlerde periton ile örtülü olmadığı için yüzeyleri parlak değildir. Dıştan tunika albuginea ile sarılmıştır. Yaş ilerledikçe bu zar kalınlaşır (Moore, 1985).

Over, korteks ovarii ve medulla ovarii olmak üzere iki bölüme ayrılır. Korteks folliküllerin yer aldığı dışta bulunan kısımdır. Medulla ise içte yer alır. Hilum ovarii, dıştan tamamen korteks tabakası ile sarılıdır. Medulla da çok sayıda damar ve bol elastik fibril vardır. Mesoovaryum'dan bazı düz kas lifleri hilusu geçerek overin medullasına girebilir. Overin hareketlerinde düz kas liflerinin etkisi olabilir (Moore, 1985).

Overlerdeki ovumun gelişmesiyle üreme başlar. Her ay menstrüel siklusun ortasında tek bir yumurta, bir ovaryum folikülünden abdominal boşluğa fırlatılır. Bu yumurta daha sonra fallop tüplerinden uterusu geçer. Eğer bir sperm tarafından döllenirse, uterusu implante olarak, fetüs, plasenta ve fetal membranlar gelişir. Fetal yaşamda ovaryumun dış yüzeyi, embriyolojik olarak germinal plak epitelinden kaynaklanan germinal epitelle örtülüdür. Fetüs gelişirken, germinal epitelde primordiyal ovumlar farklılaşarak ovaryum korteksindeki

maddeye doğru göçerler. Ovum etrafında, ovaryum stromasının (ovaryum destek dokusu) iç hücrelerinden ibaret bir tabaka oluşturarak onlara epiteloid karakter kazandırır. Bu hücreler granuloza hücreleridir. Granuloza hücrelerinin oluşturduğu tek katlı bir tabaka ile çevrili ovuma primordiyal folikül denir (Guyton, 1986 )

Gebeliğin 30. haftasında fetüsteki ovaryumların sayısı 7 milyona ulaşır, fakat bunların çoğu hızla dejenere olarak, doğum sırasında iki ovaryumda 2 milyonun altına pubertede 300.000- 400.000' e iner. Daha sonra kadının üreme çağında, yaklaşık 13 yaşından 50 yaşına kadar, her ay ovumlarını fırlatacak kadar gelişebilen 450 kadar folikül bulunur; geri kalanı dejenere (atretik) olur. Üreme yeteneği sona erdiği (menapoz) zaman, overlerde ancak birkaç primordiyal folikül vardır, bunlar da kısa zamanda dejenere olur (Guyton, 1986 ).

### **2.1.3. Ovaryum histolojisi**

Overlerin birbiri ile ilişkili iki fonksiyonu vardır. Dişi cinsiyet hücrelerini üretmek (oogenesis) ve steroid hormonlarını salgılamaktır (steroidogenesis). Histolojik kesitlerde overler, içte medulla ve dışta korteks bölgelerini içerirler. Korteks, medullayı dıştan saran, ince kollagen liflerden ve iç biçimi fibroblast benzeri hücrelerden zengin sıkı bağ dokusudur. Medulla daha açık renk boyanan dar bir bölgedir. Zengin kan ve lenf damarları, sinirleri, az miktarda elastik lifler ve düz kas hücrelerini içeren gevşek bağ dokusu yapısındadır. Korteks, over foliküllerini içerir. Follikül etrafında düz kas hücreleri bulunur. Medulla ile korteks arasında belirgin bir sınır yoktur. Hilusta korteks kesintiye uğrar ve mesoover medullaya doğru devam eder. Küçük düzensiz kanal kalıntıları olan reteoveriler bu bölgede bulunabilirler. Diğer büyük epiteloid hücre türü hilus hücreleridir. Over hilusunda ve mezooverde küçük gruplar halinde bulunurlar. Kolesterol esterlerinden zengin çok sayıda lipid damlaları ve lipofuksin pigmenti içerirler (Cormack, 1987; Disaia, 1994; Ackermann, 2006).

Overin yüzeyi tek katlı kübik ya da yassı germinal epitelle örtülüdür. Epitel, overi döşeyen mesotelyum ile devam eder. Eskiden germinal epitelin ilkel cinsiyet hücrelerinin kaynağı olduğu düşünülüyordu. Bugün artık ilkel cinsiyet hücrelerinin gonad dışı bölgeden vitellus kesesinden köken aldıkları ve gonadlara göç ettikleri belirlenmiştir. Sıkı bağ dokusu yapısındaki ince tunika albuginea, germinal epitel altında yer alır (Ross ve ark., 1989 ve Cormack,1987)

#### 2.1.4.Ovaryum fizyolojisi

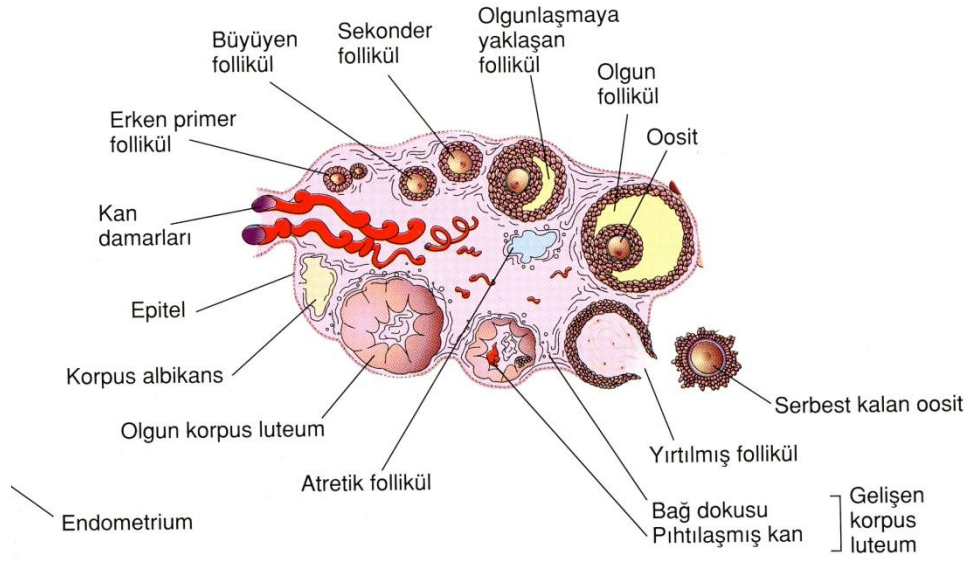
Overler korteks (germinal hücreler, çeşitli evrelerdeki foliküller, teka hücreleri, granüloza hücreleri ve çeşitli evrelerdeki korpus luteum hücreleri içerir) ve medulla (teka hücreleri, bağ dokusu kan damarları ve sinirler içerir) bölümlerinden oluşur (Ackermann, 2006 ).

**Korteks:** Over korteksi oositlerin beslenmesi, depolanması, atılması ve ovulasyon sonrası kalan korpus luteumun devamı ve yok edilmesi ile ilgili fiziksel ve kimyasal gereksinimleri içerir (Ackermann, 2006).

**Foliküller:** Kadında over kaynaklı hücrelerin mitozla proliferasyonu doğumdan önce sona erer ve oogonyumların tümü ilk mayoz bölünmeye uğrarlar. Daha sonra profaz evresine girerek primer oositler haline dönüşürler. Etraflarında over mezenkimal hücreleri oluşur ve primordiyal foliküller haline gelirler. Primordiyal foliküllerin karakteristiği olan düz epitel daha kolumnar hale gelir ve primer folikülü oluşturur. Büyük kısmı dejenere olur ancak erişkin döneme kadar canlı kalanlar primer folikül olarak kalırlar ve oositler ilk mayoz bölünmenin profaz fazında kalır. Primer foliküller pubertede büyümek üzere toplanmaya başlarlar.

**Primer foliküller:** Foliküllerin hemen hemen tümü primer foliküldür. Folikül yaklaşık 20 mikrometre çapında yuvarlaktır ve içindeki oosit granüloza hücre tabakası, bazal membran ve teka hücre tabakaları ile çevrilidir. Bu foliküllerin tümü doğumda mevcuttur ve olgun dönemde kalanlar orijinal büyüklüklerinin iki veya üç katına çıkarlar. Merkezde bir oosit mevcuttur ve o oosit germinal vezikül denilen büyük bir nükleusa sahiptir. Bu foliküller içinde en gelişmiş olanında küçük antral sıvı havuzu ile granüloza hücrelerinden ayrılan bir oosit bulunur (Ackermann, 2006).

**Preantral, antral ve graaf folikülleri :** Kadın yaşamı boyunca menapozdan önce her ay 6-12 primer folikül geliştirir. Bir ay boyunca bu foliküller birkaç yüz mikrometre çapına ulaşırlar. Bu zaman boyunca oosit başlangıç büyüklüğünün yaklaşık on katına çıkar ve zona pellusida denilen bir glikoprotein tabaka sentezler. Bu tabaka oositi çevreler ve oositi granüloza hücre tabakasından ayırır.



**Şekil 3.** Over korteksi çeşitli büyüme evrelerindeki veya atrezik folicüllerin bulunduğu bir yerdir. Ayrıca korpus luteum içerir. Korpus luteum oositin atılmasından sonra graaf folikülünden gelişir. Korpus albicans korpus luteumun ölümünden sonra oluşan skar dokusudur (Moore ve Persaud, 2002).

Granüloza ve teka hücreleri mitoz ile bölünürler ve sekonder folikülün karakteristiği olan çok tabakalı kolumnar epitel oluştururlar. Epitel çok hızlı büyür ve iç yapısı asimetrik hale gelir. Bu evreye ulaşan foliküllere preantral folikül adı verilir (Ackermann 2006).

**Preantral folikül:** Preantral faz 8-12 gün sürer ve bu faz boyunca folikül içinde esas olarak teka interna hücrelerinden kaynaklanan artan miktarda gonadal steroidler oluşur. Preantral foliküllerin birçoğu atreziye uğrar ve yok olur. Kalanlar ise dolaşımdaki gonadotropinlerin etkisi altında antral foliküllere ve en sonunda graaf foliküllere dönüşürler.

**Antral foliküller ve graaf folikülü:** Luteinizan hormon sekresyonu preantral foliküllerin daha fazla antral sıvı biriktirmesine yol açar. Daha sonra bunlardan dominant olan (graf folikülü) yaklaşık 25 mm'ye ulaşır ve olgunlaşma döngüsünün yaklaşık 14. gününde patlayarak oositi dışarı atar. Oositin ilk mayoz bölünmesi ovulasyondan hemen önce gerçekleşir. Ortaya çıkan yavru hücrelerden biri sitoplazmanın büyük kısmını alır ve buna sekonder oosit adı verilir ve sekonder oosit hızla ikinci mayoz bölünmenin metafaz evresine geçer o evrede kalır. Diğer yavru hücreye ilk polar cisimcik adı verilir ve bu hücre parçalanır. Sekonder oosit fertilize olduğunda ikinci bölünmesini tamamlar. Bu bölünmelerden ortaya

çıkan yavru hücrelerden biri embriyo oluşumuna doğru ilerlerken diğeri ikinci polar cismi oluşturur ve atılır.

**Folikülün yırtılması:** Yırtılan folikül hızla kanla dolar (korpus hemorajikum). Teka ve granüloza hücreleri çoğalır, kan rezorbe olur ve yerini luteinleşmiş granüloza ve teka hücreleri alır (Ackermann, 2006).

**Atretik foliküller:** Over korteksi aynı zaman da atreziye uğrayan preantral foliküller de içerir. Bu olay kadının yaşam süresince oositlerin sayısının azalmasına yol açar (Ackermann, 2006).

**Korpus luteum:** Oositini atan folikülün son evresidir. LH reseptörleri içerir. Uyarılması korpus luteumun ana steroidi olan progesteronun sentezini artırır. Gebelik gerçekleştiğinde korpus luteum varlığı devam eder ve ovulasyonu baskılamak ve endometriumu implantasyona hazırlamak üzere östrojen ve progesteronun yüksek düzeyde kalmasını sağlar. Gebelik olmadığında korpus luteum geriler ve menstrual döngünün son 4 gününde dejenere olur. Skar dokusu olan korpus albicans halini alır (Ackermann, 2006).

**Overlerin Endokrin Fonksiyonları:** Foliküldeki teka ve granüloza hücreleri overlerin endokrin fonksiyonlarını yerine getirirler. Bunlar LH ve FSH tarafından kontrol edilirler. Başlıca over hormonları; progesteron ve östrojenlerden östradiol ve östrondur. Hepsi de kolesterolden, teka ve granüloza hücrelerinin iş birliği ile oluşturulur. Teka hücreleri asetattan kolesterol sentezleme yeteneğine sahip olmakla birlikte, kolesterolün ana kaynağı LDL 'dir. Steroid yapımı menstrual döngünün farklı evrelerinde büyük farklılıklar gösterir (Ackermann, 2006).

**Progesteron sentezi ve sekresyonu:** Progesteronun ana kaynakları korpus luteum ve plasentadır. Foliküllerin katkısı kısmen daha azdır ancak foliküler fazda kadında progesteronun düzeyinin erkektekine kıyasla üç kat daha fazla olduğu bilinmektedir. Kanda % 80 bağlı bulunurken, % 20'si serbest olarak bulunur (Ackermann, 2006).

**Östrojenlerin sentezi ve sekresyonu:** Östrojenler esas olarak foliküllerin granüloza hücrelerinden, korpus luteum ve plasentadan salgılanır. Teka hücreleri FSH reseptörü içermedikleri ve yeterli miktarda aromataz aktivitesine sahip olmadıklarından östrojen açısından katkıları oldukça düşüktür. Bu nedenle östrojen sentezi için teka hücrelerine bağımlıdırlar. Progesteron gibi dolaşımdaki östrojenlerin sadece % 2 'si serbesttir. Büyük kısmı albümine (%60) ve gonadal steroid bağlayan globuline (%38) bağlıdır (Ackermann, 2006).

## **2.2. Non Steroidal Antiinflamatuvar İlaçlar**

### **2.2.1 Tarihçesi**

NSAİİ'lerin keşfedilmesi M.Ö 3500 kadar uzanır. Mısır papirüslerinde, karın ve eklem ağrıları için mersin ağacı kabukları kullanıldığı görülmektedir (Wang ve ark., 1995) . M.S 30'larda ise inflamasyonun ölçütleri tanımlanmış ve söğüt ağacı yaprakları bunları yok etmede kullanılmıştır (Koçar ve ark., 1997). NSAİİ terimi ise ilk defa 1949'da Fenilbutazon için kullanılmıştır. NSAİİ'lerin çeşitli hastalıklarda kullanımı hızlandırılmış ancak 1971'e kadar bu ilaçların etki mekanizmalarıyla ilgili kesin bir açıklama yapılamamıştır. 1971'de Sir John Vane araşidonik asit mekanizmasını ve bu mekanizmada antiinflamatuvarların yerini göstermiştir (Vane, 2001). 1976 yılında ise prostaglandin endoperoksit sentetaz (PGHS) veya siklooksijenaz (COX) adı ile adlandırılan enzim bulunmuştur (Vane 2001 April ve Haşçelik 2001 Ocak). Antiinflamatuvarların tümü aynı etkiye sahip değildir. 1990'da Needleman siklooksijenaz enzimlerinin birden fazla olduğunu bildirerek COX'un izoenzimlerinden bahsetmiştir, 1991'de ise Xie ve arkadaşları tarafından COX-2 tanımlanıp ve klonlandı (Yeğin 2004, Hinz ve Brune 2002, Haşçelik 2001, Koçar ve ark., 1997). Son yıllarda COX-3 izoenziminden söz edilmektedir. COX enziminin birden fazla izoenziminin olması etki farklılığını ve yan etki sıklığının değişikliğini açıklamaya yardımcı olmaktadır (Ketenci, 1998).

### **2.2.2 Etki mekanizmaları**

NSAİİ'lerin çoğu etkilerini prostaglandin sentezini azaltarak gösterirler (Yeğin 2004, Haşçelik 2001, Tıkız 2000, Deniz ve ark., 2000). Prostaglandinler, yapılarında bir halka taşıyan 20 karbonlu doymamış yağ asidi türevleridir. Bu bileşikler bazen eikozanoitler olarak da adlandırılırlar; 'eikoza' 20 karbon atomlu anlamına gelmektedir (Oktay, 1998). Prostaglandinler ve ilgili bileşikler hemen her doku tarafından az miktarda sentezlenirler. Genellikle sentezlendikleri dokuda lokal olarak etkilidirler ve etki bölgelerinde hızla etkin olmayan metabolitlere çevrilirler. Bu nedenle kan dolaşımında yüksek konsantrasyonlarda bulunmazlar. TXA<sub>2</sub> (Tromboksan A<sub>2</sub>), lökotrienler, hidroperoksieikozatetraenoik asit ve hidroksieikozatetraenoik asit (HPETE-HETE) prostaglandinlere benzeyen lipidlerdir ve benzer öncü maddelerden, ortak yollardan geçerek sentezlenirler (Oktay, 1998).

Prostaglandinler çoğu etkilerini hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlanarak sağlarlar. Endojen olarak dokuda üretilen prostaglandinler ve metabolitleri belirli bir hücre tipinin verdiği yanıtların ince ayarını yapan lokal sinyaller olarak davranırlar. Fonksiyonları dokudan dokuya çok büyük farklılıklar gösterebilir. Örneğin; TXA2'nin trombositlerden salgılanması yeni trombositlerin toplanmasını sağlamaktadır. Ancak diğer dokulardaki TXA2'nin yüksek konsantrasyonları daha farklı bir sinyal taşır; örneğin belirli bazı düz kas hücrelerinde TXA2 kasılmaya neden olur. Prostaglandinler allerjik ve inflamatuvar reaksiyonlarda salgılanan kimyasal mediyatörlerin bir grubunu oluşturmaktadır (Mardini ve Fitzgerald 2001, Oktay 1998). Prostaglandinler 20 karbonlu bir yağ asidi olan araşidonik asitten sentezlenirler. Araşidonik asit hücre zarlarında fosfolipitlerin yapısında bulunmaktadır (Narushima 2003, Gökçimen ve ark., 2000, Ketenci 1998). Serbest araşidonik asit doku fosfolipitlerinden fosfolipaz A2 ve diğer açıl hidrolazların etkisiyle açığa çıkar. Bu olay hormonların ve diğer uyarıların kontrolü altındadır (Oktay, 1998). Eikozanoitlerin araşidonik asitten sentezlenmesinde rol oynayan iki önemli yol vardır (Hasçelik 2001, Oktay 1998 ).

#### **2.2.2.1 Lipooksijenaz Yolu**

Çeşitli lipooksijenazlar araşidonik asitten 5-HPETE, 12 HPETE ve 15-HPETE sentezlenmesini sağlarlar. Bunlar araşidonik asitin dayanıklı bir yapıya sahip olmayan peroksitlenmiş türevleridirler ve sentezlendikleri dokuya bağlı olarak hidroksillenmiş türevleri olarak HETE'lere, lökotrienlere veya lipoksinlere dönüştürülürler (Tıkız 2000, Oktay 1998).

#### **2.2.2.2 Siklooksijenaz Yolu**

Prostaglandinler, tromboksanlar ve prostasiklinler gibi halka yapısı taşıyan tüm eikozanoitler siklooksijenaz yoluyla sentezlenirler. Siklooksijenaz enziminin iki farklı gen tarafından ve farklı fizyopatolojik olaylarca uyarılan iki alt grubu bulunmaktadır (Yeğin 2004, Madrıgal IL ve ark., 2002, Tıkız 2000 ve Oktay 1998).

##### **2.2.2.2.1 Siklooksijenaz-1**

COX-1 enzimi genelde homeostazisi düzenleyici özelliktedir (Madrıgal IL ve ark., 2002; Norian ve Clive 2002) ve aktivitesi genelde sabittir (Hinz ve Brune, 2002). COX-1 70 kd ağırlığındadır (Ketenci, 1998) ve dokuzuncu kromozomda bulunan bir gen tarafından kodlanmaktadır (Hinz ve Brune 2002).

Enzim etkinliği genel olarak dört farklı bölgede bulunmaktadır (Tıkız, 2000).

-Trombositlerde: Araşidonik asitin TXA2'ye dönüşmesini sağlar. Trombositlerdeki TXA2 yapımındaki azalma sonucu trombosit toplanması ve vazokonstriktif etki, dolayısı ile tromboza eğilim azalır (Yeğın 2004, Tıkız 2000, Ertenli ve Öztürk 2000, Şahin 2007) .

-Mide Mukozasında: Yaygın olarak bulunur (Madrıgal IL ve ark. 2002), hücre koruyucu prostaglandinlerin oluşumundan sorumludur. Baskılanması sonucu mide mukozasında koruyucu etki sağlayan prostaglandinlerin sentezi azalır ve ülser oluşumu kolaylaşır (Yeğın 2004, Tıkız 2000, Ertenli ve Öztürk 2000, Şahin 2007, Bjarnason I ve ark., 1997) .

-Vasküler Endotelde: Özellikle aterosklerotik bölgelerdeki Prostatiklin (PGI2) üretiminde rol oynadığı deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (Yeğın 2004, Tıkız 2000, Ertenli ve Öztürk 2000, Ketenci 1998).

-Böbrek ve Vasküler Yapıda: Toplayıcı kanallarda ve Henle kulpunda yaygın olarak bulunmaktadır. Bu bölgede prostaglandin E sentezini uyarak böbrek kan akımını arttırarak su ve tuz tutulumunu azaltır (Yeğın 2004, Ertenli ve Öztürk 2000, Şahin 2007, Bjarnason I ve ark., 1997) .

#### **2.2.2.2 Siklooksijenaz-2**

Ağırlığı COX-1 ile eşit olup birinci kromozomdaki bir gen tarafından kodlanmaktadır. Aminoasit dizilimi yaklaşık olarak % 60 oranında COX-1 ile benzerlik gösterir (Yeğın 2004, Ertenli ve Öztürk 2000, Ketenci 1998). COX-2 geni inflamasyon başta olmak üzere birçok durumda uyarılabilir (Campell ve De Beaux 1992). Sitokinler ve büyüme faktörleri bu enzimin işlerliğini artırır (Hinz ve Brune 2002, Ertenli ve Öztürk 2000, Ketenci 1998, Bjarnason I ve ark., 1997, Aspirin ve kolon kanseri ). İnflamatuar süreçlerde COX-2 aktivitesinde belirgin artış olmaktadır (Krause MM ve ark., 2003).

Günümüzde 3 tip COX inhibitörü mevcuttur (Mardini ve Fitzgerald, 2001, Tıkız, 2000).

Aspirin; Hem COX-1 hem de COX-2' yi baskılar (Yeğın, 2004). Ancak COX-1 enzimine daha seçicidir. Özellikle düşük dozlarda trombositlerdeki COX-1 enzimini geri dönüşümsüz olarak durdurur (Şahin, 2007) . Bu etkisi nedeniyle kalp koruyucu olarak sıklıkla tercih edilir. Yüksek dozlarda endoteldeki COX-2 enzimini baskılaması nedeniyle PGI2

sentezini azalttığı için kalp koruyucu etki göstermesi amacıyla 300 mgr ve altındaki dozlar tercih edilir (Tıkız, 2000).

Nonspesifik NSAİİ; Hem COX-1 hem de COX2 enzimini değişik derecelerde, değişik seçicilikte baskılar (Kalgutkar ve ark., 2000).

Selektif COX-2 İnhibitörleri (koksibler); Bu grup ilaçlar NSAİİ'ler ile aynı analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar etkinlikte olan fakat COX-1 üzerine etkileri olmadığı için midede yan etkileri düşük derece olan ilaçlardır (Tıkız, 2000). Son zamanlarda kalp krizi riskleri nedeniyle gündeme oturmuş ve toplatılmışlardır (Mardini ve Fitzgerald, 2001).

### **2.2.3. Genel özellikleri**

Çoğu organik asit yapısındadır. PH azaldıkça ilaçların lipitte çözünen non-iyonize miktarları artıp, ilacın hücre zarının lipit yapısıyla birleşimi fazlaşacağından, NSAİİ'ler seçici olarak mide, böbrek medullası ile iskemik ve inflamasyonlu bölgeler gibi asiditesi fazla olan dokularda daha fazla birikirler (Ertenli ve Öztürk, 2000).

### **2.2.4.Sınıflandırılması**

Pek çok sınıflandırma şekli vardır. Çoğu kaynakta NSAİİ'ler iki şekilde sınıflandırılmıştır (Hasçelik ,2001, Ketenci, 1998).

#### **2.2.4.1 Kimyasal Yapılarına Göre**

Salisilatlar

-Asetil Salisilat: Aspirin

-Nonasetil Salisilat: Diflunisal, Mg trisalisilat, Sodyum salisilat, salisilat, benarilat

Asetik Asitler

-Indol Asetik Asitler: Indometazin, tolmetin, asematezin, sulindak

-Fenil Asetik Asitler (Aril Asetik Asitler) : Diklofenak fenklofenak, alklofenak

-Pranokarboksilik Asitler: Etodolak

Propiyonik Asitler

Ibuprofen, ketoprofen,naproksen, flurbiprofen,tiaprofenik asit,oxaprozin

Fenomatlar (Antranilik Asitler)

Mefenamik asit, flufenamik asit, meklofenamik asit, niflumik asit

Heteroarıl Asetik Asit Türevleri

Keterolak

Enolik Asitler

-Oksikam Türevleri (Enolik Asitler): Piroksikam, Sudoksikam, oksikam, tenoksikam

-Prazolon Türevleri: Fenilbutazon, oksifenbutazon, azapropazon

Nonasidik Türevler: Nabumeton, prokuazon, tinoridin, fluprokuazon (Hasçelik, 2001; Ertenli ve Öztürk 2000; Koçar ve ark., 1997).

#### **2.2.4.2 Yarı Ömürlerine Göre**

1-Kısa Yarı Ömürlüler ( $T_{1/2}$ : 6 saatin altında)

Aspirin, diklofenak, etodolak, ibuprofen, indometazin, ketoprofen, tolmetin, mefenamik asit, flufenamik asit

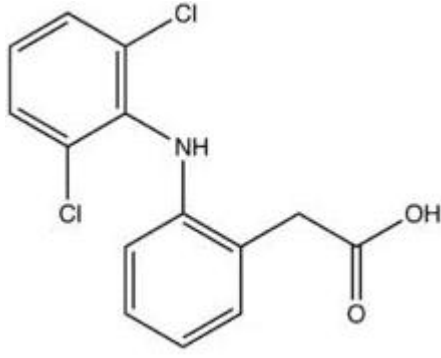
2-Uzun Yarı ömürlüler ( $T_{1/2}$ : 10 saatin üstünde)

Diflunisal, nabumeton, naproksen, proksikam, tenoksikam, tenidap, fenilbutazon, azapropazon, sulindak (Hasçelik, 2001; Ertenli ve Öztürk, 2000; Koçar ve ark., 1997).

### **2.3 Diklofenak Sodyum**

#### **2.3.1 Kimyasal yapısı**

Fenil asetik asit türevi bir NSAİİ'dir. Kimyasal yapısı 2-[2-(2,6-diklorofenil)aminofenil] etanoik asit şeklindedir (şekil 4), Moleküler ağırlığı 296.148 g/mol, moleküler formülü  $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$ 'dir.



**Şekil 4.** Diklofenak Sodyumun Kimyasal Yapısı

### 2.3.2 Diklofenak sodyumun formülü

Beher üç ml'lik steril ampul; 75 mg Diklofenak sodyum; 30 mg Mannitol; üç mg Asetilsistein; 105 mg Benzil alkol; 600 mg Propilen glikol; 0.7 mg Sodyum hidroksit ve kafi miktarda enjeksiyonluk su içerir (Novartis ilaç sektörü İstanbul Türkiye). [www.novartis.com.tr](http://www.novartis.com.tr) – Novartis

### 2.3.3 Diklofenak sodyumun farmakolojisi

Aneljezik, antipiretik ve antiinflamatuvar etkilidir ve bu etkilerini siklooksijenaz enzimi inhibisyonu ile prostaglandin sentezini baskılayarak gösteren bir Fenilasetik asit türevidir. Osteoartrite tedavisinde indometasin kadar, Romatoit artrit tedavisinde de aspirin ve indometasin kadar etkilidir. Mide ve deudonum mukozasını bozucu etkisi diğer NSAİİ'lerin çoğuna göre daha zayıftır. Mide bağırsak kanalından çabuk ve tam olarak emilir. Karaciğerden ilk geçiş metabolizması nedeniyle absorbe olan dozun ancak %50 kadarı sistemik dolaşıma katılır. Maksimum plazma değerine 1,5-2 saatte erişir. En yüksek plazma düzeyine ulaşıldıktan 2-4 saat sonra sinoviyal sıvıda da doruk düzeylere erişilir ve bu konsantrasyonda, plazmadakinden daha yüksek olarak kalır. Plazma proteinlerine bağlanma oranı %99'un üzerindedir. Diklofenak aspirin ile birlikte verilirse diklofenak sodyumun plazma düzeyini belirgin şekilde azaltır. Karaciğerde metabolize olur. Esas olarak hidrosillenmek ve konjugasyon suretiyle inaktive edilir. Metabolitleri ise daha sonra glukuronid ve sülfat bileşikleri halinde idrar (%65) veya safra (%35) ile atılır. Böbreklerden ve kısmen karaciğerden itrah edilir. Eliminasyon yarılanma ömrü 1,2-1,8 saat kadardır (Kayaalp, 2009). Bir prostaglandin sentetaz inhibitörü olan diklofenak sodyum özellikle romatizmal olgularda, eklem enflamasyonlarında ateş, sabahları görülen katılıkta yarar sağlarken fonksiyonları da düzeltir. 75 mg intramüsküler yoldan olarak uygulanır. Plazma

konsantrasyonu, verilen dozla doğru orantılıdır. Önerilen doz ve sürelerde kullanıldığında plazmada birikim yapmaz. Diklofenak sodyum'un %99'undan fazlası, geri dönüşümlü olarak plazma albuminine bağlanır. 1,5-2 saatte maksimum plazma düzeyine erişir. En yüksek plazma düzeyine erişdikten 2-4 saat sonra sinoviyal sıvıda da doruk düzeylere erişilir ve bu konsantrasyonda, plazmadakinden daha yüksek olarak kalır. Karaciğer ve böbrek fonksiyon bozukluklarında, ilacın farmakokinetiği değişmemektedir. Aynı şekilde, farklı yaş gruplarındaki hastalarda; absorpsiyon, metabolizma ve eliminasyonda farklılık gözlenmemiştir. (Kayaalp, 2009). NSAİ ilaçlar siklooksijenaz (COX-1, COX-2) enzimini inhibe etmek yoluyla etkisini gösterirler. Düzenli olarak aspirin ya da NSAİ kullanan insanlarda kolorektal kanser gibi bazı kanser tiplerinin sıklığında azalma gösterilmiştir (Morgan, 1996; Hussain ve ark., 2003). COX'ın aracılık ettiği prostaglandin biyosentezinin baskılanması yoluyla bu etkinin gerçekleştiği düşünülmektedir (Chen ve ark., 2004). NSAİ'lar, bazı kemirgen deneylerinde karsinogenezde inhibisyona neden olduğu ve ailesel adenomatoz polipozis'li hastalarda premalign kolorektal poliplerde gerilemeye neden oldukları bildirilmiştir (Hashimoto ve ark., 2004).

#### 2.3.4 Diklofenak sodyumun gebelikte kullanımı

Gebelikte ilaç kullanımı konusunda, ilaçların etkilerine yönelik prospektif klinik çalışma yapmak etik olmadığından yeterli ve iyi kontrollü çalışma yapılamamaktadır ve bu yüzden bu konuda bilgilerimiz sınırlıdır. Amerika Birleşik Devletleri gıda ve ilaç dairesi (FDA) ilaçları 5 kategoride sınıflamıştır. **A kategorisi:** Gebelerde en güvenilir ilaçlardır. İlk trimestirde fetüs üzerinde kontrollü çalışmalarda zararlı olduğu gösterilmemiştir. **B kategorisi:** Deney hayvanlarında teratojenik etki göstermemiştir ama gebe kadınlarda klinik deneyler yetersiz veya deney hayvanında yapılan çalışmalar fötotoksik etki gösterilmiş ancak gebelerde yapılan kontrollü çalışmada klinik bu fötotoksik etkisi doğrulanmamıştır. Gerekli ise bu kategoride ki ilaçlar rahatlıkla gebede kullanılabilir. **C Kategorisi:** Embriyosit ve teratojenik etkileri gösterilmiştir, ya da deney hayvanı ve hamilelerde ilaç incelenmemiştir. **D Kategorisi:** Bu kategoride ki ilacın insanda fetüs üzerinde zararlı etkisi kanıtlanmıştır. Ancak gebede terapötik yararı fetusta beklenen zararından fazla ise yaşamı tehdit eden bir durumun tedavisinde alternatifsiz olarak kullanılması zorunluysa kullanılabilir (kâr-zarar oranı dikkate alınarak). **X Kategorisi:** Bu kategorideki ilaçların deney hayvanları ve gebelerde fetusa zararlı etkisi gösterilmiştir (Süzer, 2005). Diklofenak Sodyumu kategori B/D (gebeliğin 1.ve 2. trimesterinde B, son trimesterinde D) olarak kabul ediliyor (Ommaty, 2009). FDA kategori C olarak kabul etmektedir.

## **2.4. Stereoloji Nedir?**

### **2.4.1. Stereolojik metotlar**

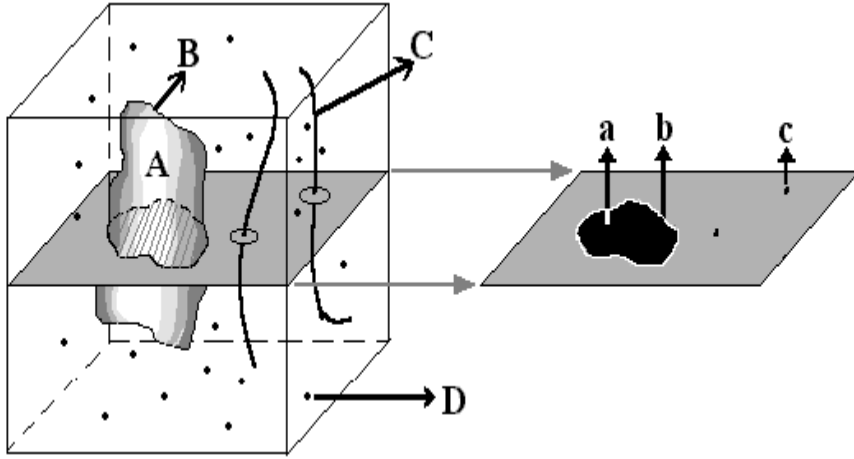
Stereolojik uygulamalar, biyolojik yapıların geometrik özelliklerini (hacim, yüzey alanı, sayı v.b.) hesaplama yolu ile belirlememizi sağlar. Bu sayede ince yapıdan sistemik düzeye kadar yer alan oldukça farklı büyüklükteki elemanlarda yapısal değişiklikleri belirleyebiliriz. Stereolojik uygulamalar ile sağlanan bu bilgi, biyolojik yapıların kesitlerdeki (mikroskopi; radyolojide kullanılanlar gibi) görüntülerinden elde edilir (Ünal ve ark., 2002).

Stereolojik metotlar, organizmanın makroskobik ve mikroskobik yapılarının morfolojisi ile ilgilenen tüm bilim dallarındaki araştırmacıların bilmesi gereken konulardan biridir. Bunun sebebi ise, canlıdaki olayların üç boyutlu olan yapılarda gerçekleşmesine rağmen, bu yapılardan alınan iki boyutlu kesitlerin, ilgili yapı-organ hakkında genellikle doğru bilgi sağlayamamasıdır. Organ ve yapılarda bulunan objelerin sayısı, uzunluğu, yüzey alanı, hacmi ve hacim bileşenleri gibi geometrik özellikler ile ilgili gerçekçi bilgiler ancak stereolojik yöntemler kullanılarak elde edilebilir (Ünal ve ark., 2002)

Yapılan mikroskobik çalışmaların başlangıcından günümüze kadar, ilgili biyolojik yapı içerisindeki taneciklerin sayısını bulmak için birçok yöntem kullanılmıştır. Metotların çok sayıda olmasının sebebi her metodun kendi içerisinde bazı hata kaynaklarına sahip olmasıdır. Bu metotların hatalarını düzeltmek içinde yeni metotlar icat edilmiştir. Güvenirliği açısından en çok ilgi çeken ve sıklıkla kullanılmakta geçerli olan yöntem ise stereolojik metotlardır (Ünal ve ark., 2002).

Stereolojik metotlar çok geniş bir yöntem olması sebebiyle çalışmamızda, stereolojinin yalnızca bizim çalışmamızla ilgili olan kısmı olan cavalier metodunu almış bulunuyoruz. Doku içindeki hücre veya hücre içi elemanlarının sayısı bulunmak istendiğinde, yapı kesitler haline getirilerek mikroskop altında incelenir. Mikroskop altında incelenen yapıların tümü, gerçekte üç boyutlu yani uzunluk, genişlik ve yüksekliğe sahip öğelerdir. Oysa bunların mikroskobik incelemelerinde kullanılan kesit görüntüleri, yapıların iki boyutu (x ve y eksenleri) hakkında bir fikir verirken, derinlik (z eksen) ile ilgili olarak araştırmacıya doğrudan bilgi sağlamazlar. Mikroskobik çalışmaların başlangıcından yeni stereolojik metotların ortaya çıkışına kadar olan süre boyunca kullanılan yöntemlerde derinlik boyutu görmezden gelinmiş veya bir takım yetersiz düzeltme faktörleriyle, bu verinin yokluğu

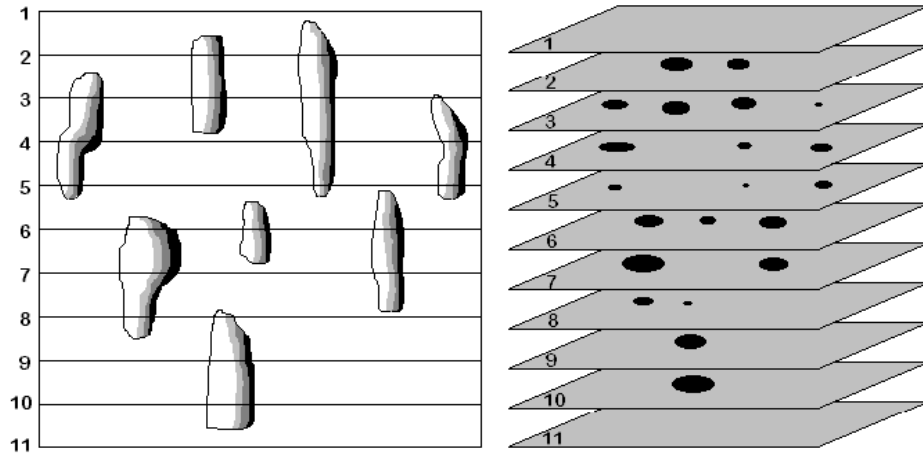
doldurulmaya çalışılmıştır. Kesit alma işlemini ve sonuçta elde edilen kesit kavramını yakından irdelemek, boyut azalması olayının önemini ortaya koyar. Herhangi bir yapının iki boyutlu bir kesit düzlemi ile ortaya çıkan izdüşümü, esas yapının sahip olduğu boyut sayısından bir eksik boyuta sahip olacaktır (Ünal ve ark., 2002).



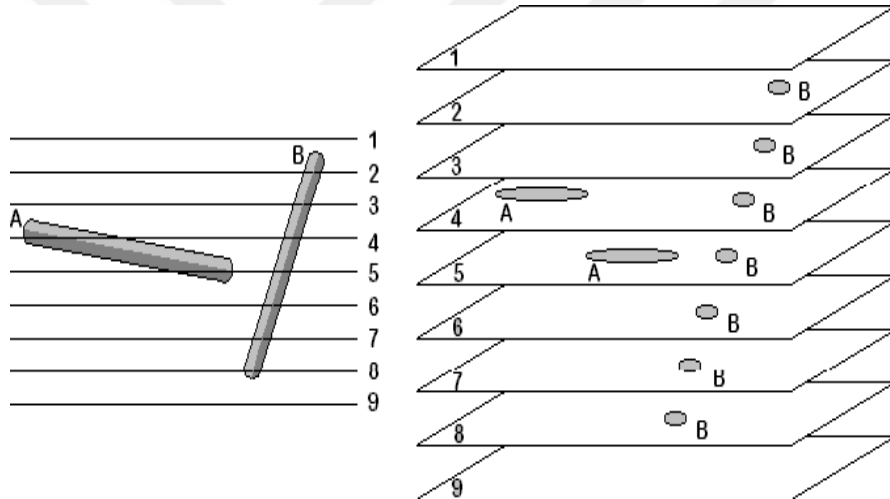
Şekil 5. Kesitlerde boyut azalması (Ünal ve ark., 2002).

Şekildeki üç boyutlu bir hacim içerisinde alınan iki boyutlu bir kesitte; üç boyutlu katı bir eleman olan (A) taneciği, iki boyutlu bir düzlemde kesildiğinde, ortaya iki boyutlu bir izdüşüm çıkmaktadır (a). Benzer şekilde, iki boyutlu bir yüzey (B), iki boyutlu bir kesit düzleminde tek boyutlu bir çizgi olarak (b). Tek boyutlu bir çizgi (C), sıfır boyutlu bir nokta olarak (c) görülürken, sıfır boyutlu bir nokta (D) ise iki boyutlu kesitte görülmeyecektir (Şekil 13)

Eski metotlarda kullanılan temel mantık, taraflı bir ön çalışma yapılarak, izdüşüm sayısının parçacık sayısına eşit olduğu kabul edilmektedir. Oysa kesitlerde ortaya çıkan parçacık sayısı, sadece parçacık izdüşüm sayısına değil, aynı zamanda kesit yönü, parçacık büyüklüğü ve parçacık yönelimi gibi parametrelere de bağlıdır (Ünal ve ark.,2002).



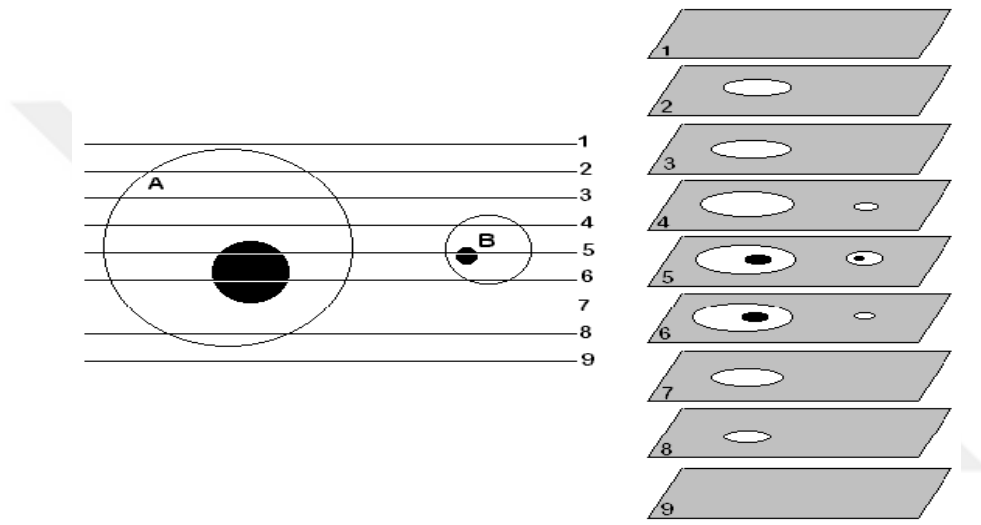
**Şekil 6.** Kesit yöneliminin iz düşüm sayısına etkisi (Ünal ve ark., 2002).



**Şekil 7.** Tanecik yöneliminin kesitlerdeki izdüşüm sayısına etkisi. Doku içerisinde bulunan farklı yönelimdeki tanesikler (solda) ve iki boyutlu düzlemlerdeki (sağda) izdüşümleri. Kesit düzlemine dik duran (B) taneciği A taneciğine göre daha çok sayıdaki kesitte izdüşüm vermiştir (Ünal ve ark., 2002).

Kesit düzlemine dik duran partiküller yatık olan partiküllere göre daha çok kesitte izdüşüm vermektedir. Doku içinde yatık duran A partikülü ve dik duran B partikülünün aynı yönde alınan kesitlerdeki izdüşümlerinde A partikülün 2, B partikülünden ise 7 kesit düzleminde olduğu görülür (Şekil 6). Doku içindeki partikül yerleşim ve yönelim farklılıkları alınan kesit düzlemlerinde gözlenen izdüşümlerin sayısına etki etmektedir. Bir büyük ve bir küçük hücre ile bunların çekirdeklerinin kesitlerde ortaya çıkan izdüşümleri ele alındığında büyük hücre 5, çekirdeği 2, küçük hücre 3, çekirdeği ise 1 kesitte ortaya çıkmıştır (Şekil 6). Partikül büyüklüğü göz önüne alınmadığı takdirde, doğrudan izdüşüm sayısından partikül

sayısına ulaşmanın olmadığı görülmektedir. Son yıllarda, ‘sistemik rastgele örnekleme’ (SRÖ) modeli olarak tarif edilen tarafsız ve etkin bir örnekleme modeli geliştirilmiştir. Çünkü yapılan çalışmalardaki hataları düzeltme (çeşitli düzeltme formülleri ile) faktörleri yeterli bulunmamıştır. Dolayısıyla bu model temelde bileşenlerine ayrılarak incelenmesi gereken yapılarda bir örnekleme yapılacağı zaman, tüm bileşenlerine yapıyı temsil edebilme açısından eşit olasılıklı şans verilmesi temeline dayanmaktadır (Ünal ve ark., 2002).



**Şekil 8.** Doku içerisinde bulunan farklı büyüklükteki tanecikler ve iki boyutlu düzlemlerdeki izdüşümleri. Büyük ebatlı tanecik (A), küçük ebatlı (B) taneciğe göre daha çok sayıda izdüşüm verir (Ünal ve ark., 2002).

Çalışmalarda doğru sonuca ulaşmanın şartlarından en başta geleni işlemlerin her aşamasında sistemik rastgele örnekleme koşuluna bağlıdır. Burada ‘sistemik’ kelimesi ile ilgilenilen bölgede yapılan bir ön çalışma sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda örnekleminin tekrar edilen periyodu, ‘rastgele’ kelimesiyle ise belirlenen periyodun ilk elemanın tarafsız bir biçimde seçilmesi anlatılmaktadır. İstatiksel olarak, etkin bir örnekleme, ne kadar çok örnek üzerinde uygulanırsa, yapının her noktasına eşit örnekleme şansı tanıdığı için, homojen ve verimli bir örnekleme elde etme şansıda o kadar artar (Ünal ve ark., 2002).

Stereolojik metotlarda kullanılan yöntem ve prensiplerin büyük bir kısmı, SRÖ mantığının çeşitlemeleri olarak düşünülebilir. Partikül sayımı, alan hesaplamaları, alan ve hacim oranları gibi hesaplamalarda, ilk şart çalışılan yapının her aşamada (parçaların seçimi, kesitlerin örnekleme, sayım alanlarının ve alan örneklerinin belirlenmesi vb.) sistemik ve

rastgele bir tarzda örneklenmesidir (Ünal ve ark., 2002).

#### **2.4.2. Disektör**

Disektör ilk kez 1984 yılında Sterio tarafından tarif edilmiştir. Bu yöntemle; ilgilenilen objenin büyüklüğü, biçimi, doku ya da organ içerisindeki partikül sayısı, kesitlerin alınma yönü, sayılacak olan partikül büyüklüğü, doku içindeki yönelimi ve dokunun histolojik işlemler sırasında büzüşme ve genişlemesi gibi hesaplama hatalarına sebep olabilen tüm hata kaynaklarından bağımsız olarak ‘tarafsız’ bir biçimde hesaplanabilmektedir (Ünal ve ark., 2002).

#### **2.4.3. Cavalieri Metodu**

Stereolojik yöntemlerde en sık kullanılan hacim hesaplama yolu Cavalieri metodu ; ilk kez İtalyan matematikçi Bonaventura Cavalieri tarafından XVII. yüzyılda ortaya konmuştur ve (Canan ve ark., 2002).

Cavalieri metodunu uygulamak için, hacmi hesaplanmak istenen yapı eşit aralıklı birbirine paralel kesitlerle başından sonuna kadar dilimlere ayrılır. Daha sonra her bir dilimin aynı yöne bakan yüzeylerinin alanları uygun bir yöntemle hesaplanır. Tüm dilimlerden elde edilen toplam yüzey alanı değeri, dilimlerden kullandığımız ortalama dilim kalınlığı ile çarpılırsa, yapının toplam hacminin tarafsız bir hesaplaması elde edilir. Bunu matematiksel olarak şu şekilde formülleştirebiliriz:

$$V_{ref} = \sum a_i \cdot t \quad (\text{Eşitlik 1})$$

Formülde  $V_{ref}$  ilgilendiğimiz yapının toplam veya diğer bir ifade ile referans hacmini;  $a_i$ ,  $i$  numaralı kesitteki yapı izdüşümünün (veya izdüşümlerinin toplam) yüzey alanını;  $t$  ise ortalama kesit veya dilim kalınlığı belirtir. Bu yöntemle, gerek mikroskopik, gerekse makroskopik ölçekte, etrafındaki yapılarla ilişkilerine bakılmaksızın, sınırları yeterli kesinlikte belirlenebilen her türlü yapının hacmi hesaplanabilir (Canan ve ark., 2002).

#### **Disektör Cavalieri Uygulaması**

Kesit kalınlığı ölçümünü ortadan kaldırarak toplam obje sayısını veren bir uygulama, 1988 yılında Pakkenberg ve Gundersen tarafından tanımlanan disektör-Cavalieri kombinasyonudur. Bu uygulamanın esası, obje yoğunluğu ( $N_v$ ) ile referans hacminin ( $V_{ref}$ ,

objelerin yer aldığı yapının hacmi) aynı kesitlerden elde edilmesine dayanır. Sonuçta toplam partikül sayısı (N), her ikisini çarpımından elde edilir,

$$N = N_v \times V_{ref} \quad (1)$$

Her iki parametre de aynı kesitlerden elde edildiğinden, meydana gelen doku deformasyonu ve sahip oldukları kesit kalınlığı ikisi için aynı olacaktır. En son işlemde (N'nin hesaplanması sırasında) biri pay, diğeri paydada yer alan aynı kesit kalınlıkları birbirlerini götürülecektir (Pakkenberg ve Gundersen, 1988 ve 1989).

Görüleceği gibi bu kombinasyonda N iki aşamada elde ediliyor. Bunun için araştırılan yapı önce tümü ile kesitler haline getirilir ve bunlardan SRÖ ile kesit çiftleri alınır. Bu kesit çiftlerinden daha önce değinildiği gibi disektörler ile  $N_v$  hesaplanır:

$$N_v = \frac{\sum Q^-}{t} \times \sum a \text{ (çerçeve)} \quad (2)$$

Yapının hacmi ( $V_{ref}$ ) her kesit çiftlerindeki bir kesit kullanılarak hesaplanır. Hacim hesabı için Cavalieri metondundan yararlanılır. Hatırlanacağı gibi bu metod herhangi bir yapının hacmini, t kalınlığındaki toplam profil alanlarını kesit kalınlığı (t) ile çarpmak yeterlidir:

$$V_{ref} = t \times \sum a \text{ (profil alan)} \quad (3)$$

Bu hacim hesabında da bütün kesitlerin kullanılması gerekmez. Her k. Kesiti kullanmak yeterlidir. Bu durumda eşitlik-3,

$$V_{ref} = t \times k \times \sum a \text{ (profil alan)} \quad (4)$$

şeklini alır. Kesitlerdeki profil alanları ise nokta sayımı ile oldukça çabuk ve etkin bir biçimde belirlenebilir. Bunun için sistematik test noktaları içeren sondalardan yararlanılır. Sondadaki her nokta (P) belirli bir alanı,  $a/p$ , temsil eder. Böyle bir sonda, profil üzerine rastgele bir şekilde düşürüldükten sonra profil üzerine rastgelen noktalar (P) sayılır. Toplam nokta sayısı her bir noktanın temsil ettiği alan ile çarpıldığında profilin alanı hesaplanmış olur (Gundersen ve ark., 1988a);

$$\Sigma a \text{ (profil alan)} = a/p \times \Sigma P \quad (5)$$

Profil alanına ait bu değerler eşitlik - 4'teki yerine konulduğunda eşitlik şu şekle dönüşür;

$$V_{ref} = t \times k \times a/p \times \Sigma a \quad (6)$$

$N_v$ 'yi veren eşitlik-2 ile  $V_{ref}$  'i veren eşitlik-6, eşitlik-1' deki yerlerine konulursa;

$$N = N_v \times V_{ref} = \Sigma Q^- / t \times \Sigma a(\text{çerçeve}) \times [t \times k \times a/p \times \Sigma P] \quad (7)$$

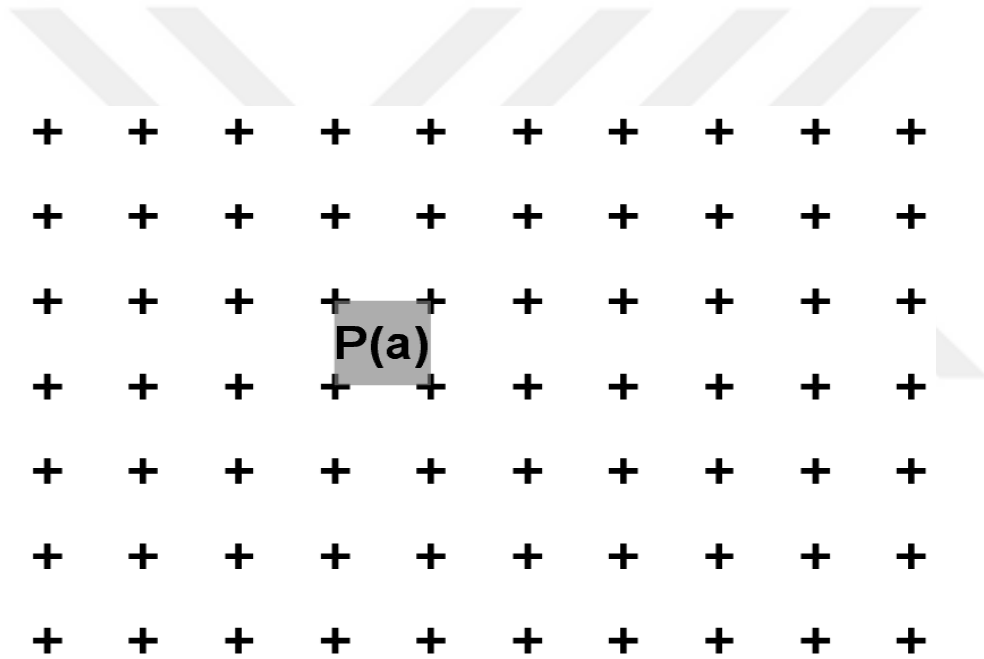
olur. Bu eşitlikle  $a$  (çerçeve) alanında sayılan objelerin ortalaması olarak  $\bar{Q}^-$  konur (ortalama  $\bar{Q}^-$ ) ve t'ler sadeleştirilse formül;

$$N = \bar{Q}^- \times \Sigma P \times k \times \frac{(a/p)}{a(\text{çerçeve})} \quad (8)$$

şekline indirgenir. Görüleceği gibi  $N$ 'nin elde edildiği bu en son eşitliğe göre kesit kalınlığının bilinmesi gerekmiyor. Dikkat edilecek olursa, bu hesaplama şeklinin takip ve kesit alımı sırasında meydana gelen doku deformasyonunda da etkilenmediği görülür. Çünkü bunlardan hiçbiri aynı kesitlerde tanımlanan alanların oranı olan  $[a/p] / a$  (çerçeve)'yi etkilemeyecektir. Ayrıca, karşılaştırılan gruplarda dokularda meydana gelecek olan deformasyonun eşit olmasında gerekmez (Pakkenberg ve Gundersen, 1988 ve 1989).

#### 2.4.3.1 Hacim hesaplaması için kesit yüzey alanlarının hesaplanması

Cavalieri hacim hesaplama yöntemi için ilk aşama, ilgilendiğimiz bölgenin izdüşümlerinin (kesitlerdeki görüntülerinin) alanlarını hesaplamaktır. Bu yöntem ise, bilgisayar destekli görüntü analiz cihazları aracılığıyla, planimetrik olarak izdüşüm alanlarını doğrudan ölçmektir. Bu yolla uygun biçimde ayarlaması (kalibrasyonu) yapılmış, mikroskop görüntülerini işlemek üzere tasarlanmış bir bilgisayar yazılımı ile sınırlandırılan herhangi bir bölgenin yüzey alanı ölçülebilir. Bu yöntem oldukça hızlı ve güvenilir olmasına rağmen, birçok durumda, özellikle bu cihazların yüksek maliyetlerine bağlı olarak, böyle bir sistem bulunamayabilir (Canan ve ark., 2002). Stereolojide en sık kullanılan izdüşüm alanı hesaplama yolu, ‘noktalı alan ölçüm cetvelleri’nden faydalanmaktadır.



Şekil 9. Noktalı alan ölçüm cetveli

Noktalı alan ölçüm cetvelleri (Şekil 9) birbirinden eşit aralıklarla ayrılmış noktalardan (şekilde artıların kollarının birleşim yeri) oluşan sistematik nokta dizgeleridir. Böyle bir dizgide, her bir artı işaretinin orta noktası, cetveldeki bir noktayı temsil ederken, bu noktalardan her biri ise, dört adet noktanın arasında kalan bir birim cetvel alanını temsil eder ( $P(a)$ ). Aralarındaki sabit mesafesi bilinen böyle bir noktalı alan ölçüm cetveli, alanı hesaplanmak istenen herhangi bir kesit görüntüsü üzerine rastgele biçimde atılırsa, yapının kesitteki izdüşümü üzerine isabet edecek noktaların sayısı, bu izdüşümün kesitte temsil ettiği alan miktarıyla doğru orantılı olacaktır (Canan ve ark., 2002).

Kısaca, izdüşüm ne kadar büyükse içine o kadar fazla sayıda nokta isabet edecektir. Bu noktalardan her biri belli bir birim alanı ( $P(a)$ ) temsil ettiğinden, ilgilendiğimiz izdüşümün sınırları içine düşen toplam nokta sayısının ( $\Sigma P_i$ ) bu birim alan değeriyle çarpımı, bize o kesitteki izdüşümün toplam alanının ( $A_i$ ) tarafsız bir hesaplamasını verecektir (Canan ve ark., 2002).

$$A_i = \Sigma P_i \cdot P(a) \quad (\text{Eşitlik 2})$$

Böyle bir formül ile hesaplanan bir alan ölçümü, hem uygulamada oldukça basit, hem de istatistiksel olarak daha doğru sonuçlar verecektir. Noktalı alan ölçüm cetvelleri ile yapılan alan hesaplamalarının, uygun sıklıkta noktalar içeren cetveller kullanıldığında, diğer görüntülü analiz sistemleriyle yapılan hesaplamalar kadar doğru sonuçlar vermektedir (Gundersen ve Jensen, 1987). Genellikle, şeffaf bir asetata çizilmiş noktalar dizgesi yeterli olmakta ve büyütme derecesi doğru bir biçimde saptandıktan sonra, mikroskopta gözlenen, monitöre veya bir başka görüntü ortamına yansıtılan veya fotoğraflanmış her türlü görüntü üzerinde rahatça uygulanabilmektedir. Tek bilinmesi gereken, cetveldeki noktalar arasındaki uzaklığın, büyütme derecesine göre doku düzeyindeki gerçek uzunluğudur. Büyütme derecesini bulmanın en güvenilir yolu, bir mikrometrik disk kullanmaktır (Canan ve ark., 2002).

Bir diğer önemli hususda, kullandığımız noktalı alan cetvelinin nokta sıklığıdır. Genellikle, sınırları karmaşık bir yapılanma gösteren iç içe izdüşümler için daha sık yerleşimli noktalar kullanmak gerekirken, düzgün sınırlara sahip yumuşak hatlı yapılar için daha seyrek noktalar yeterli olmaktadır. Nokta sıklığını artırmak, hesaplamaların daha doğru olmasını sağlasa da, belli bir hata payı dâhilinde, mümkün olan en seyrek nokta dizgesini kullanarak bu ölçümleri gerçekleştirmek daha doğru olacaktır.

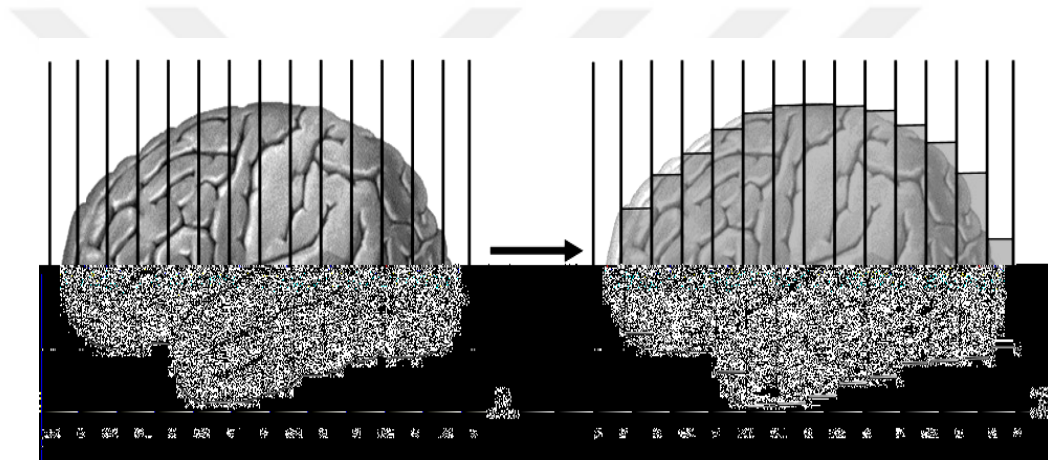
Gundersen ve Jensen, (1987) tarafından önerilen tarzda bir nomogram, çalışacağımız yapıya uygun noktalı alan ölçüm cetveli seçiminde yardımcı olabilir.

#### **2.4.3.2 Toplam hacmin hesaplanması**

Toplam hacmi elde etmek için, ilk önce kesitlerde ilgilendiğimiz bölgenin izdüşümlerinin toplam alanını hesaplamak sonrada bu toplam alan değerini, dilimleri veya kesitleri elde ederken kullandığımız ortalama kesit kalınlığı değeriyle çarpmamız yeterli

olacaktır. Bu şekilde yapının toplam hacminin tarafsız bir hesaplamasını elde etmekteyiz. Kesitlerin alınması sırasında, toplam kesit sayısının çok fazla olmasından dolayı belli bir örnekleme yapılıyorsa, hacim hesaplamasında bu husus dikkate alınarak hesaplanmalıdır (Canan ve ark., 2002).

Alan hesaplaması yapılan kesit yüzeylerinde ise dilimlerimiz ister makroskobik ister mikroskobik olsun, belli ve sonlu bir kalınlığa sahiptir ve iki kesme düzlemi ile oluşturulduklarında ‘alt’ ve ‘üst’ olarak iki yüzden oluşurlar. Cavalieri metodu ile hacim hesaplaması için, yüzey alanı ölçümleri, bir yapıdan alınmış tüm kesitlerin hep aynı yöne bakan yüzeylerinde gerçekleştirilmelidir (Şekil 9) (Canan ve ark.,2002).



**Şekil 10:** Cavalieri yöntemi ile hacim hesaplaması yapılırken, kesitlerin hep aynı yöne bakan yüzeylerinin ölçüm için kullanılmasının önemi.

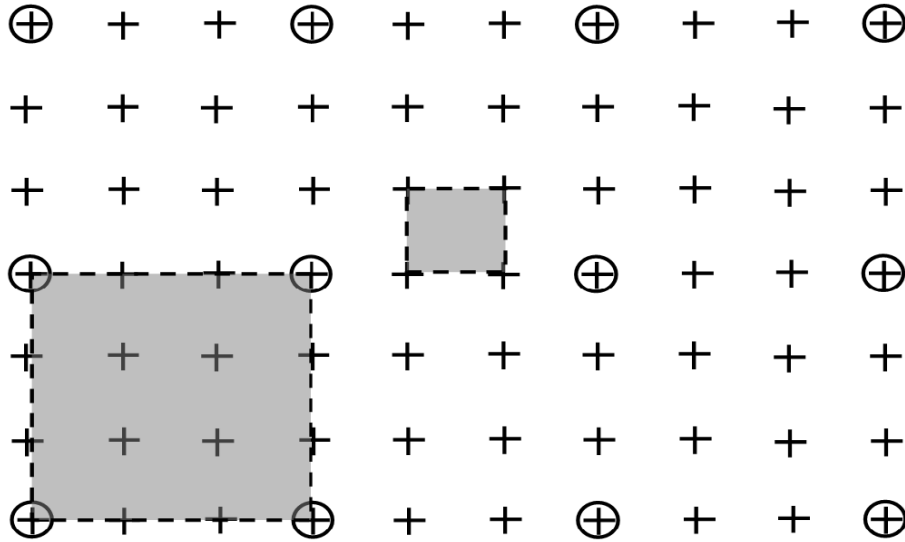
#### **2.4.3.3 Bileşen hacmi ve hacim oranlarının hesaplanması**

Herhangi bir yapı içerisindeki bir bileşenin kesit görüntüleri üzerindeki izdüşümlerine isabet edecek rastgele noktaların sayısı, o yapının hacmiyle ve dolayısıyla kesitlerde ortaya çıkan izdüşümlerinin alanlarıyla doğru orantılıdır. Bilinen sıklıkta noktalar içeren bir alan ölçüm cetvelinin, kesit görüntüleri üzerine rastgele atılması sonucu, ilgilenilen bileşenin izdüşümleri üzerine düşen toplam nokta sayısının hesaplanması ve bu değerin ortalama kesit kalınlığı ile çarpılması, bileşen hacminin tarafsız bir hesaplanmasını verir (Canan ve ark.,2002).

#### **2.4.3.4 Hacim oranından bileşenin toplam hacminin bulunması**

Hacmi veya hacim oranı hesaplanmak istenen bileşen, yapının tamamına göre oldukça

küçük bir hacim kaplayabilir ve buna bağlı olarak kesitlerde ortaya çıkan izdüşümleri, yapının tamamına göre oldukça küçük yüzey alanlarına sahip olabilirler. Böyle bir durumda nokta sıklığı bileşen için seyrek kalacağından referans hacme çok fazla sayıda nokta düşecek ve gereksiz yere çok fazla nokta sayılması gerekecektir. Böyle bir durumda bileşik noktalı alan ölçüm cetveli kullanılabilir (Şekil 11). Bu tip bir cetvelde, sık ve seyrek olmak üzere iki tip nokta dizgesi bir arada bulunur. Şekil 11’de etrafı dairelerle çevrili noktalar seyrek noktaları, diğerleri ise (daire ile çevrilmemiş noktalarla beraber) sık nokta dizgesini temsil ederler. Dolayısı ile daire ile çevrilmemiş noktalar A ile gösterilen büyük bir birim alanı ve sık noktalar ise ‘a’ ile gösterilen küçük birim alanları temsil eder. Böyle bir cetvel, uygun bir şekilde ayarlanıp bileşenler içeren bir yapının kesit görüntüleri üzerine atılırsa, yapının toplam hacmi için daire ile çevrelenmiş noktalar sayılırken, bileşen izdüşümleri için sık nokta dizgesindeki noktalar dikkate alınır. Böylece referans hacim için çok fazla nokta saymaya gerek kalmadan, etkin bir şekilde hacim oranı hesaplamaları gerçekleştirilir (Canan ve ark., 2002).



**Şekil 11.** Bileşik bir noktalı alan ölçüm cetveli. Her bir büyük kare küçük karenin 9 katı büyüklükte bir alanı tanımlamaktadır.

Hacim oranı hesaplamasında şekil 10’deki noktalı alan ölçüm cetvelini dikkate alırsak, şu şekilde bir formül yazılabilir (Canan ve ark., 2002).

$$\hat{V}_v(Y, ref) \frac{P(Y)}{9.P(ref)} \quad (\text{Eşitlik 3})$$

Burada,  $V_v(Y, ref)$ , Y bileşeninin referans hacim içindeki hacim oranını;  $P(Y)$ , Y bileşeninin kesitlerde ortaya çıkan izdüşümleri üzerine isabet eden –küçük- noktaların toplam sayısını;  $P(ref)$  ise referans hacim içine isabet eden toplam –büyük- nokta sayısını ifade etmektedir. Paydadaki  $P(ref)$  değerinin dokuz katının alınması, nokta takımları arasındaki ilişkiden kaynaklanmaktadır. Alan hacim hesaplamalarında hesaplamamanın doğruluğunu artırmanın bir yolu ise, her bir görüntü için noktalı cetveli birden fazla (genellikle üç kez) rastgele olarak uygulamak ve elde edilen nokta sayısı değerlerinin ortalamalarını almaktır. Böylelikle tüm kesitler için oldukça kesin bir alan ve sonuçta hacim hesaplaması değeri elde edilmektedir (Canan ve ark., 2002).

#### **2.4.3.5 Nokta sayım yöntemi ile alan ve hata miktarının hesaplanması**

Genellikle nokta sayım yöntemiyle hacim veya hacim oranı hesaplamalarında, uygulanan yöntemin toplam değişkenlik (hata katsayısı (HK) ) miktarı bir formülle hesaplanır.

Burada VarSRÖ uygulanan sistematik rastgele örnekleme yönteminin değişkenlik miktarının bir hesaplamasıdır. NOİSE değeri ise, nokta sayım tekniğiyle yapılan alan ölçümleri için hesaplanabilir.

$$\% \text{ NOİSE} = 100 * \text{NOİSE} / \text{HK} \quad (\text{Eşitlik 4})$$

Yapılan çalışma sonrasında hesaplanan HK değeri % 5 ve altında ise örnekleme yönteminin uygun olduğuna kara verilir. Hata katsayısının % 5’den büyük olduğu durumlarda % NOİSE değerine bakılır. Bu değer % 25 ve altında ise kullanılan noktalı alan ölçüm cetvelinin nokta sıklığı uygun ancak her bir birey için kullanılan kesit sayısının yetersiz olduğu düşünülür. Bu durumda kesit sayısı artırılarak hata katsayısı istenen düzeye çekilir. % NOİSE değeri 25 üzerinde ise kullanılan noktalı alan ölçüm cetvelinin nokta sıklığının yetersiz olduğu düşünülür. Böyle bir durumda nokta artırılarak uygun değerdeki HK elde edilir (Canan ve ark., 2002).

**Tablo 1:** Sistematik rastgele örnekleme planının hata katsayısını (CE) hesaplamak için kullanılan tablo örneği.

| Kesit no(i) | Pi         | Pi.Pi | Pi.P.i+1 | Pi.P.i+2 |
|-------------|------------|-------|----------|----------|
| 1           |            |       |          |          |
| 2           |            |       |          |          |
| 3           |            |       |          |          |
| 4           |            |       |          |          |
| 5           |            |       |          |          |
| 6           |            |       |          |          |
| 7           |            |       |          |          |
| 8           |            |       |          |          |
| 9           |            |       |          |          |
| 10          |            |       |          |          |
| 11          |            |       |          |          |
| 12          |            |       |          |          |
| 13          |            |       |          |          |
| 14          |            |       |          |          |
| 15          |            |       |          |          |
| toplam      | $\Sigma P$ | A     | B        | C        |

$$NOİSE= 0,0724.(b/\sqrt{a})$$

Formüldeki n değeri, incelenen kesit sayısını,  $\Sigma P$  değeri tüm kesitlerde ilgili alan üzerine isabet edip sayılan toplam nokta sayısını gösterir.  $b/\sqrt{a}$  değeri ise ilgilenilen yapının kesitlerde ortaya çıkan izdüşüm karmaşıklığını gösterir. Sistematik rastgele örnekleme varyansının hesaplanmasına ilişkin formüldeki A, B, C değerleri ise, kesitler arasında, ilgili alanlara isabet eden nokta sayılarının değişkenliğini belirleyen bir tablo yardımıyla ( Tablo 1) hesaplanabilir. Bu tabloda i, kesit numarasını simgelemektedir. Pi. Pi olarak belirtilen sütuna, her bir kesitte sayılan noktaların sayılarının kareleri yazılır. Bir sonraki Pi. Pi+1 başlıklı sütun ise, herhangi bir kesitteki nokta sayısının, bir sonraki kesitteki nokta sayısı ile çarpımı yazılır. Pi. Pi+2 başlıklı kolon da bir kesitteki nokta sayısı ile ondan iki sonraki kesitteki noktaların sayılarının çarpımı içindir. Bu kolonlardaki verilerin toplanması sonucu sırasıyla A, B, C değerleri elde edilir. Bu değerler daha sonra 4 numaralı eşitlikte yerlerine yerleştirilerek, sistematik rastgele örnekleminin değişim katsayısı hesaplanır. Bu değer 0.05 civarında veya ondan küçük olduğu durumda çalışmada kullanılan örnekleme planı yeterli kesinlikte kabul edilir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereç

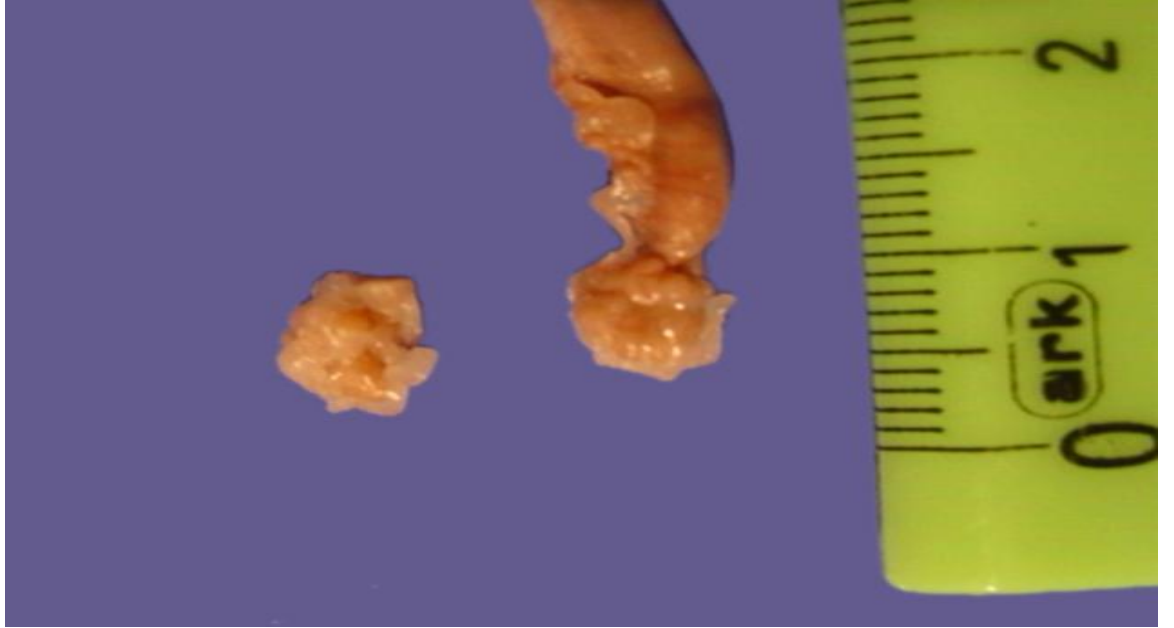
Çalışmamıza YYÜ Tıp Fakültesi Etik kurulundan izin alınarak başlandı (26.03.2009 Karar No:04). Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen yetişkin, ağırlıkları (150- 200) gr. olan, daha önce hiç çiftleşmemiş 9 adet Wistar Albino dişi sıçan kullanıldı.

Üç dişi bir erkek sıçan çiftleşme için 24 saat aynı kafeste tutuldu daha sonra ayrı kafeslere alındılar. Dişi sıçanlar randomize olarak denek (3 adet), kontrol (3 adet), sham (3 adet) olmak üzere 3 gruba ayrıldılar. Çiftleşme sonrası dişi sıçanlarda vaginal plak gözlenenler, gebeliğin sıfıncı '0.' günü kabul edildi. Sıçanlar, 12/12 saat aydınlık/ karanlık ışık periyodunda,  $21 \pm 2$  °C'lik oda ısısında barındırıldı ve standart pelet yem ve musluk suyu ile ad libidum beslendi. Denek grubu olarak ayrılan sıçanlara gebeliklerinin 5. günden itibaren 15 gün süreyle günde bir kez 1cc (1mg/kg) diklofenak sodyum (Voltaren, 75mg/3 ml ampul, CIBA GEICY, İstanbul) i.m (İntramüsküler) yolla enjekte edildi. Sham grubu gebe sıçanlara ise, aynı miktarda serum fizyolojik enjekte edildi. Kontrol grubuna ise herhangi bir işlem yapılmadı.

Sıçanlar enjeksiyon süresince her gün tartıldılar ve kayıtları alındı. Doğuma yakın her sıçan ayrı kafese alındı ve doğum günü postnatal 'O' sıfıncı gün kabul edildi. Postnatal (3-4 hafta arası) yavruların erkek ve dişileri ayrılarak farklı kafese alındı. (Erkek ve dişi ayrımı perine mesafesi ve testis varlığına göre yapıldı). Deney sonunda her gruptan (denek, kontrol, sham) 6 adet hepsi 4 haftalık 18 adet yavru sıçan elde edildi. Yavru dişi sıçanlara ketalar anestezisi (50 mg/kg) altında intrakardiyak yolla sol kalpten bir kanül vasıtasıyla perfüzyon işlemi uygulandı. Kalbin sağ atriumu kesilerek açıldı ve berrak sıvı akıncaya kadar kanın boşalması sağlandı. Akabinde serum fizyolojik ve 0,5 ml'lik heparin verildi, ardından % 10 nötral formaldehitte tespit edildi, ilgili bölgeler beyazlaşmaya kadar işleme devam edildi. Yavru sıçanların, karın ön duvarı açıldı sağ overin abdomen boşluğundaki yeri belirlendi ve cetvelle boyu ölçüldü (Şekil 13). Akabinde overler uterus ile birlikte dışarı alındı. Overler tuba uterinallardan disseke edilerek ayrıldı. Işık mikroskobu histolojik takip prosedürü uygulamak için %10 formalinde 72 saat tespit edildi.



Şekil 12. Dört haftalık sıçanların beslendiği kafesler



Şekil 13. Ovaryumun makroskopik görüntüsü

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. Ovaryum dokusunun kesit işlemleri

Sağ over rutin ışık mikroskopik histolojik doku takip işlemlerinden geçirilerek parafine gömüldü. Her dokudan 5µm kalınlığında 40 kesitte bir çift olmak üzere ortalama 6 kesit alındı, alınan kesitler deparafinize edildikten sonra Hematoksilen-Eozin boyama işlemi uygulandı. Kesit aldığımız Rotary mikrotom Şekil 14’de görülmektedir. Stereolojik analizlerden hacim ölçümü için, Cavalieri prensibinin modifiye metodu:  $V_{ref} = t \times \Sigma a$  kullanıldı (Gundersen ve Jensen, 1987). Yapının hacmi ( $v_{ref}$ ); t kalınlığındaki toplam profil alanları ( $\Sigma a$ ); kesit kalınlığı (t).

Sonrasında total doku hacim oranları, Shetereom 1.5 version paket programında verilmiş noktalı alan cetveliyle hesaplandı (Gundersen ve ark., 1988; Howard ve Reed, 1998). Sonuçların istatistik karşılaştırılması yapıldı. Fotoğraflar için AxioVision 3,1 Zeiss axioplan 2 imaging Germany, Göttingen (Şekil 15) kullanıldı. Preantral follikül sayımı için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$N = \bar{Q}^- \times \Sigma P \times k \times \frac{(a/p)}{a(\text{çerçeve})}$$

a (çerçeve) alanında sayılan objelerin ortalaması olarak  $\bar{Q}^-$  dur (ortalama  $\bar{Q}^-$ ). Sondadaki her nokta (P) belirli bir alanı, a/p, temsil eder (a: alan).



Şekil 14. Kesit alınan mikrotom (Leica Model 2125RT Çin malı (Nussloch))



**Şekil 15.** Sayımda kullanılan fotoğraf ataşmanı ilave edilmiş mikroskop ( Zeiss Axioskop 4 Carl Zeis Göttingen Germany)

### **3.2.2. Ovaryum dokusunun boyama İşlemleri**

Çalışmamızda Preantral folliküllerin ayrımını yapılabilmesi ve over dokusunun genel yapısının incelenmesi için Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi kullanıldı (Bancroft ve Gamble 2008’ den modifiye edilerek).

Hematoksilen-Eozin boyama şu prosedüre göre uygulandı:

1. Deparafinizasyon yapıldı.
2. Rehidratasyon işlemi için %95, %80, %70, %60 etil alkol serilerinde 2 şer dakika tutuldu.
3. Akarsuda 5 dk. yıkandı.
4. Hematoksilen solüsyonunda 5 dk. bekletildi.
5. Akarsuda 5 dk. yıkandı.
6. Diferansiyasyon işlemi için Asit Alkol solüsyonuna 1-3 saniye batırılıp çıkarıldı.
7. Akarsuda 5 dk. yıkandı.
8. Eozin solüsyonunda 2-3 dk. bekletildi.

9. Akarsuda 1-5 dk. yıkandı.
10. % 80 Alkol içinde 1 dk. tutuldu.
11. % 95 Alkol içinde 1 dk. tutuldu
14. Ksilol'de 1 saat bekletildi.
15. Entellan damlatılarak lamelle kapatıldı (Bangroft ve Gamble 2008).(Modifiye edilerek)

### 3.3. İstatiki Analiz

Ön yargıyı ortadan kaldırmak ve gözlem güvenirliğini sağlamak için dişi sıçanların grupları denek, kontrol, sham kodlama usulü (kör çalışma) ile hacim hesaplaması yapıldı.

Üzerinde durulan özellikler bakımından, tanımlayıcı istatistikler; ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değer olarak ifade edilmiştir. Bu özellikleri bakımından grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Hesaplamalarda, istatistik anlamlılık düzeyi olarak %5 alınmış ve hesaplamalar için SPSS istatistik paket programı kullanılmıştır.

#### 4.BULGULAR

Denek, kontrol ve sham grubundaki ovaryum total doku hacimleri, nokta sayıları, total preantral folikül sayısı Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı. Gurupların varyasyon katsayı değerleri (CV), denek grubunda; 0.13, kontrol grubunda; 0.21, sham grubunda; 0.19 olduğundan; %20'i ve altında olması grupları teşkil eden birey sayısının yeterli olduğu tespit edildi (Tablo 2).

Ovaryum denek grubunun total volumünün, ovaryum kontrol grubu total volumüne göre değişmediği tesbit edildi ve değerler istatistik, açıdan anlamlı bulunmadı (Tablo 7).

Ovaryum denek grubunun, volum nokta sayıları ile ovaryum kontrol grubunun volum nokta sayılarına göre değişmediği tespit edildi ve değerler istatistik, açıdan anlamlı bulunmadı (Tablo 2-4).

Ovaryum denek grubu total preantral folikül sayısının, ovaryum kontrol grubu total preantral folikül sayısına göre değişmediği tespit edildi ve değerler istatistik, açıdan anlamlı bulunmadı (Tablo 7).

**Tablo 2.** Denek, Kontrol ve Sham grubuna ait CV ve CE değerleri

| SIÇAN                          | Coefficient Error (CE) | SIÇAN                          | Coefficient Error (CE) | SIÇAN                          | Coefficient Error (CE) |
|--------------------------------|------------------------|--------------------------------|------------------------|--------------------------------|------------------------|
| Denek 1                        | 0.0406246              | Kontrol 1                      | 0.0430700              | Sham 1                         | 0.0385                 |
| Denek 2                        | 0.0330905              | Kontrol 2                      | 0.0382775              | Sham 2                         | 0.0354                 |
| Denek 3                        | 0.0396358              | Kontrol 3                      | 0.0579546              | Sham 3                         | 0.0321                 |
| Denek 4                        | 0.0341902              | Kontrol 4                      | 0.0342958              | Sham 4                         | 0.0367                 |
| Denek 5                        | 0.0425086              | Kontrol 5                      | 0.0342228              | Sham 5                         | 0.0382                 |
| Denek 6                        | 0.0380822              | Kontrol 6                      | 0.0334504              | Sham 6                         | 0.0353                 |
| *Coefficient of Variation (CV) | 0.13                   | *Coefficient of Variation (CV) | 0.21                   | *Coefficient of Variation (CV) | 0.19                   |

*\*Değişim Katsayısı (Coefficient of Variation, CV)*

**Tablo 3.** Denek grubuna ait ovaryum hacim nokta sayıları, hacim ve hata katsayıları (CE)

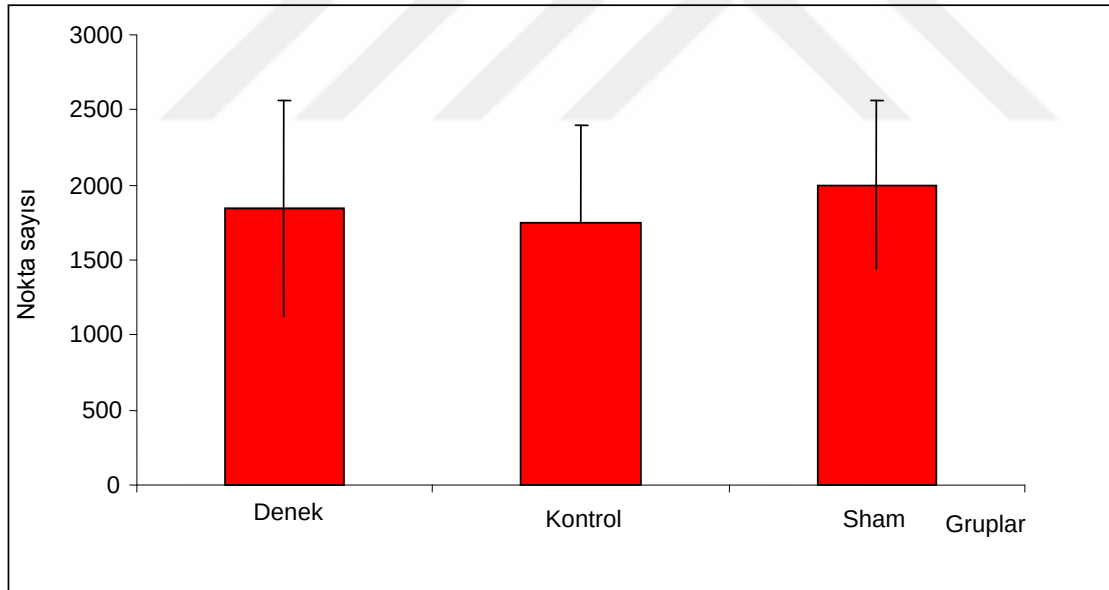
| SIÇAN   | Ovaryum hacim nokta sayısı | Ovaryum Total Hacim (cm <sup>3</sup> ) | CE     |
|---------|----------------------------|----------------------------------------|--------|
| Denek 1 | 1556                       | 0.778                                  | 0.0406 |
| Denek 2 | 2433                       | 1.216                                  | 0.0330 |
| Denek 3 | 1371                       | 0.685                                  | 0.0396 |
| Denek 4 | 3063                       | 1.531                                  | 0.0341 |
| Denek 5 | 1255                       | 0.627                                  | 0.0425 |
| Denek 6 | 1429                       | 0.714                                  | 0.0380 |
| Ort     | 1851.16                    | 0.925                                  | 0.0379 |

**Tablo 4.** Sham grubuna ait ovaryum hacim nokta sayıları, hacim ve hata katsayıları

| SIÇAN  | Ovaryum Hacim Nokta Sayısı | Ovaryum Total Hacim (cm <sup>3</sup> ) | CE     |
|--------|----------------------------|----------------------------------------|--------|
| Sham 1 | 1241                       | 0.620                                  | 0.0385 |
| Sham 2 | 2340                       | 1.170                                  | 0.0354 |
| Sham 3 | 2298                       | 1.149                                  | 0.0321 |
| Sham 4 | 2758                       | 1.379                                  | 0.0367 |
| Sham 5 | 1719                       | 0.859                                  | 0.0382 |
| Sham 6 | 1655                       | 0.827                                  | 0.0353 |
| Ort    | 2001.83                    | 1.000                                  | 0.0360 |

**Tablo 5.** Kontrol grubuna ait ovaryum hacim nokta sayıları ve hata katsayıları

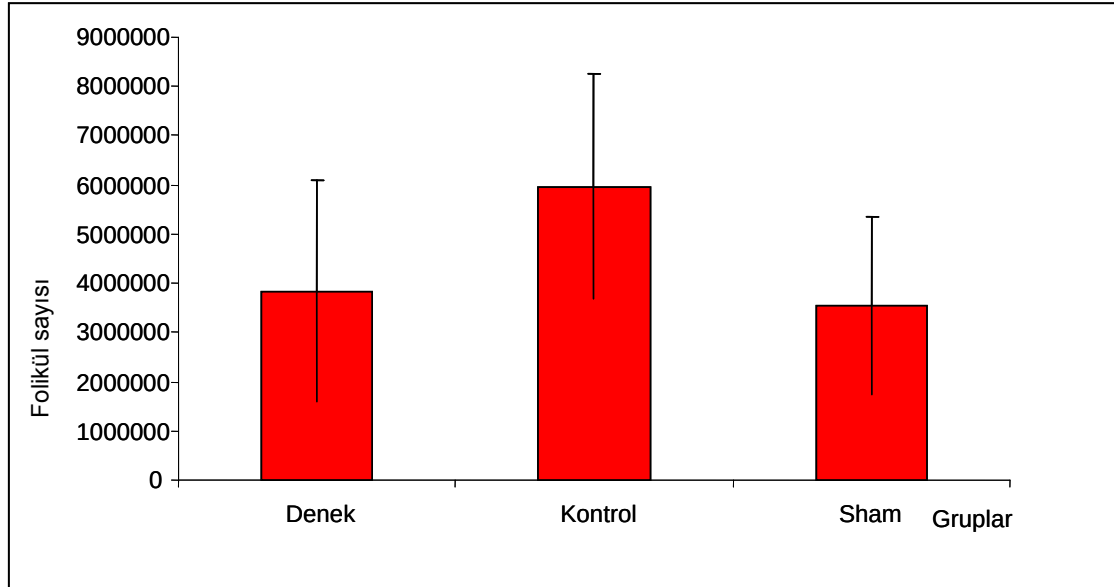
| SIÇAN     | Ovaryum Hacim Nokta Sayısı | Ovaryum Total Hacim (cm <sup>3</sup> ) | CE     |
|-----------|----------------------------|----------------------------------------|--------|
| Kontrol 1 | 1216                       | 0.608                                  | 0.0430 |
| Kontrol 2 | 1324                       | 0.662                                  | 0.0382 |
| Kontrol 3 | 935                        | 0.467                                  | 0.0570 |
| Kontrol 4 | 2293                       | 1.146                                  | 0.0342 |
| Kontrol 5 | 2385                       | 1.192                                  | 0.0342 |
| Kontrol 6 | 2309                       | 1.154                                  | 0.0334 |
| Ort       | 1743.66                    | 0.871                                  | 0.0344 |



**Şekil 16.** Gruplara ait ovaryum total volüm nokta sayısı  
Denek : Diklofenak Sodyum, Sham: Serum Fizyolojik verilmiş olan sıçanlar

**Tablo 6.** Gruplara ait ovaryum toplam primordiyal folikül sayısı

| SIÇAN     | Ovaryum toplam primordiyal hücre sayısı (N) | Ovaryum primordiyal hücre sayısı (Q <sup>-</sup> ) |
|-----------|---------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Denek 1   | 3688.74                                     | 211                                                |
| Denek 2   | 3547.36                                     | 258                                                |
| Denek 3   | 5081.99                                     | 295                                                |
| Denek 4   | 3956.31                                     | 264                                                |
| Denek 5   | 4634.71                                     | 249                                                |
| Denek 6   | 6012.35                                     | 285                                                |
| Kontrol 1 | 2918.14                                     | 322                                                |
| Kontrol 2 | 5536.86                                     | 248                                                |
| Kontrol 3 | 4308.11                                     | 273                                                |
| Kontrol 4 | 4541.65                                     | 244                                                |
| Kontrol 5 | 5644.85                                     | 315                                                |
| Kontrol 6 | 9174.92                                     | 274                                                |

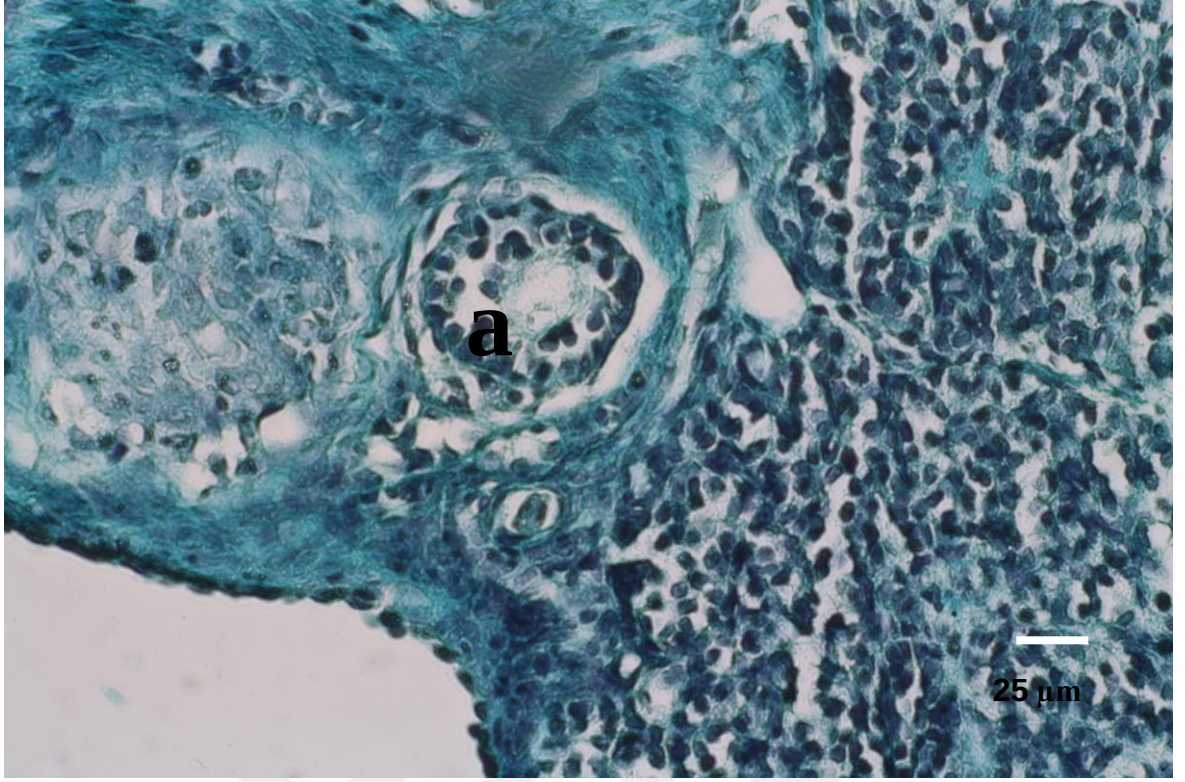


**Şekil 17.** Gruplara ait ovaryum follikül sayısı Denek: Diklofenak Sodyum, Sham: Serum Fizyolojik verilmiş olan sıçanlar.

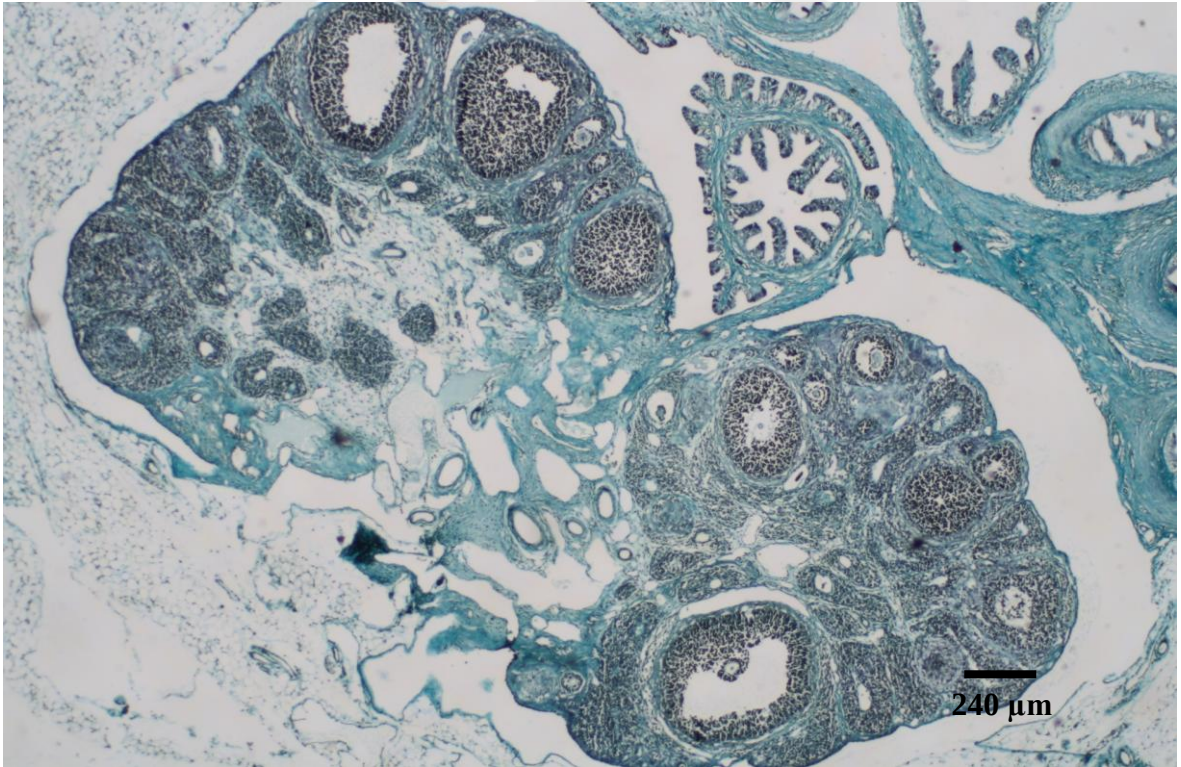
**Tablo 7.** Tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları

|                                               | Gruplar | N | Medyan  | Ort.    | St. Sapma  | Min.    | Mak.    | p     |
|-----------------------------------------------|---------|---|---------|---------|------------|---------|---------|-------|
| Ovaryum<br>volüm<br>nokta<br>sayısı<br>(Alan) | Denek   | 6 | 1492,50 | 1846,67 | 720,22     | 1255    | 3036    | 0,612 |
|                                               | Kontrol | 6 | 1808.50 | 1743.67 | 654.40     | 935     | 2385    |       |
|                                               | Sham    | 6 | 2008.50 | 2001.83 | 557.32     | 1241    | 2758    |       |
| Total<br>Preantral<br>folikül<br>sayısı       | Denek   | 6 | 3080900 | 3833720 | 2255548.52 | 2359400 | 8331360 | 0,143 |
|                                               | Kontrol | 6 | 6145640 | 5969260 | 2278184.39 | 2730200 | 8404760 |       |
|                                               | Sham    | 6 | 3216600 | 3555873 | 1811412.88 | 1141720 | 6619200 |       |

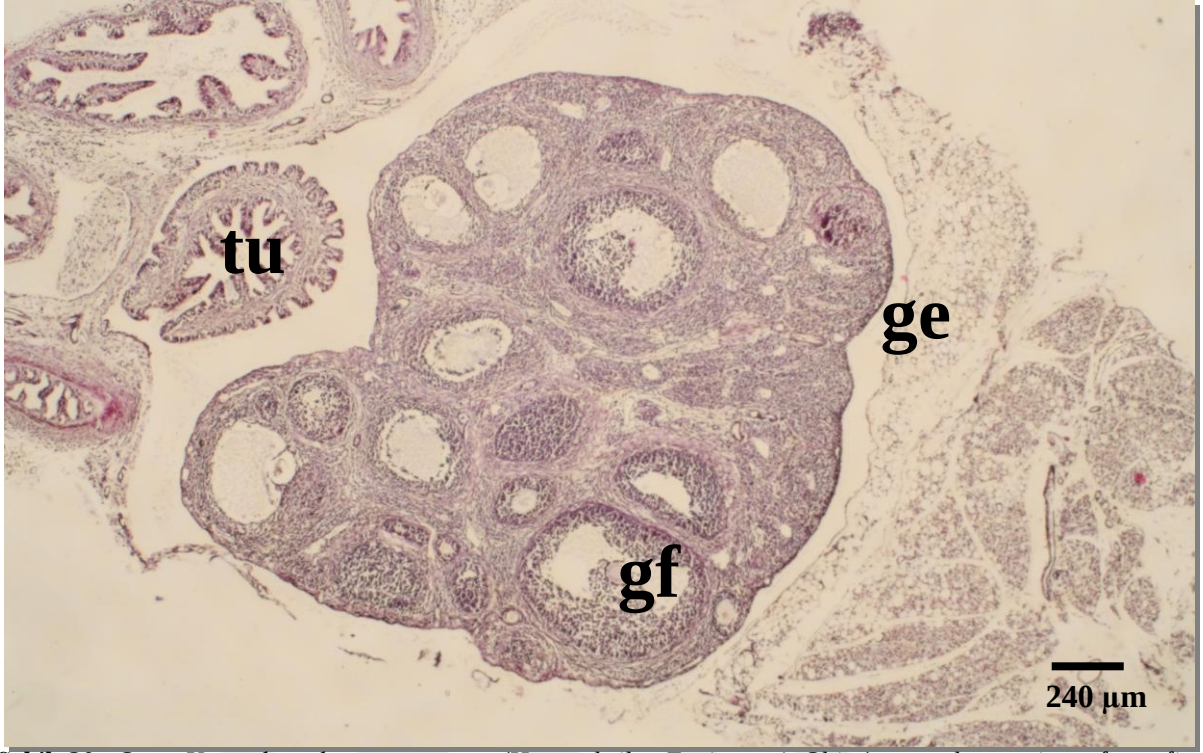
Denek: Diklofenak Sodyum, Sham: Serum fizyolojik verilmiş olan sıçanlar.



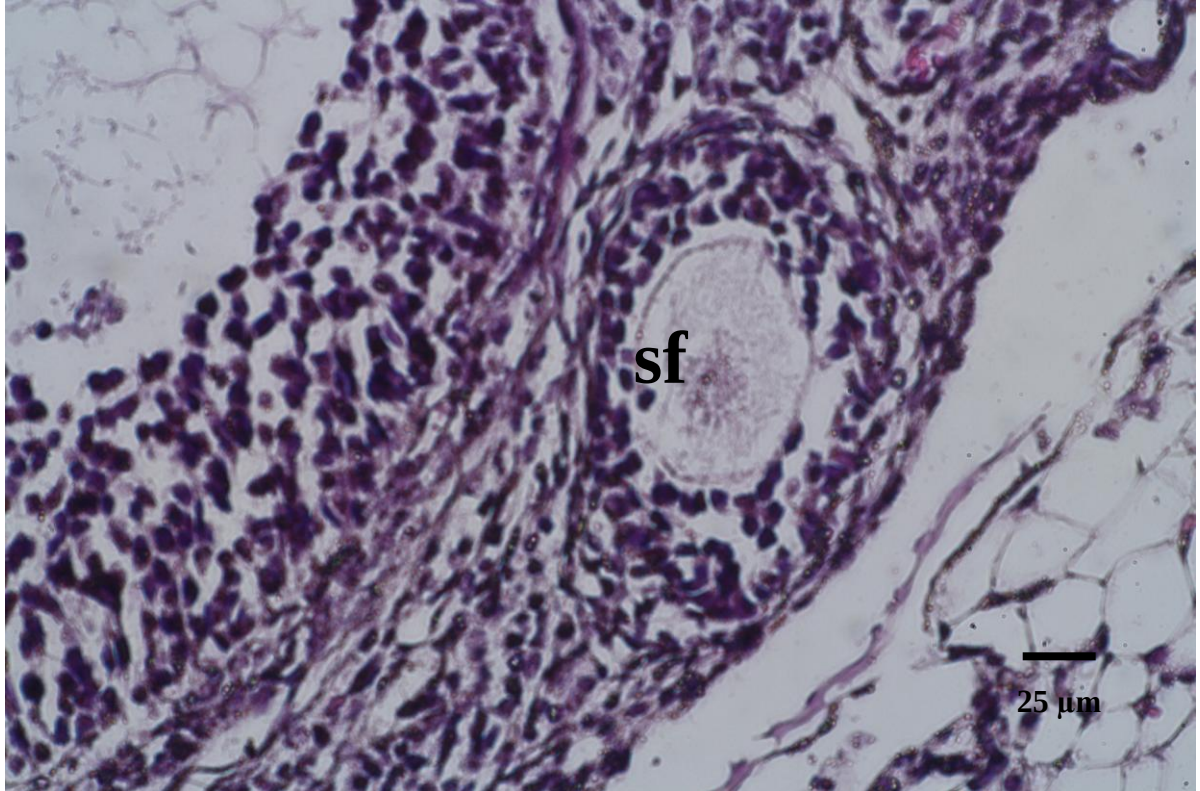
**Şekil 18.** Over Denek grubu görüntüsü (Masson Trikrom x 40 Obj.) a: Preantral Folikül.



**Şekil 19.** Over Denek grubu görüntüsü (Masson Trikrom x 4 Obj.).



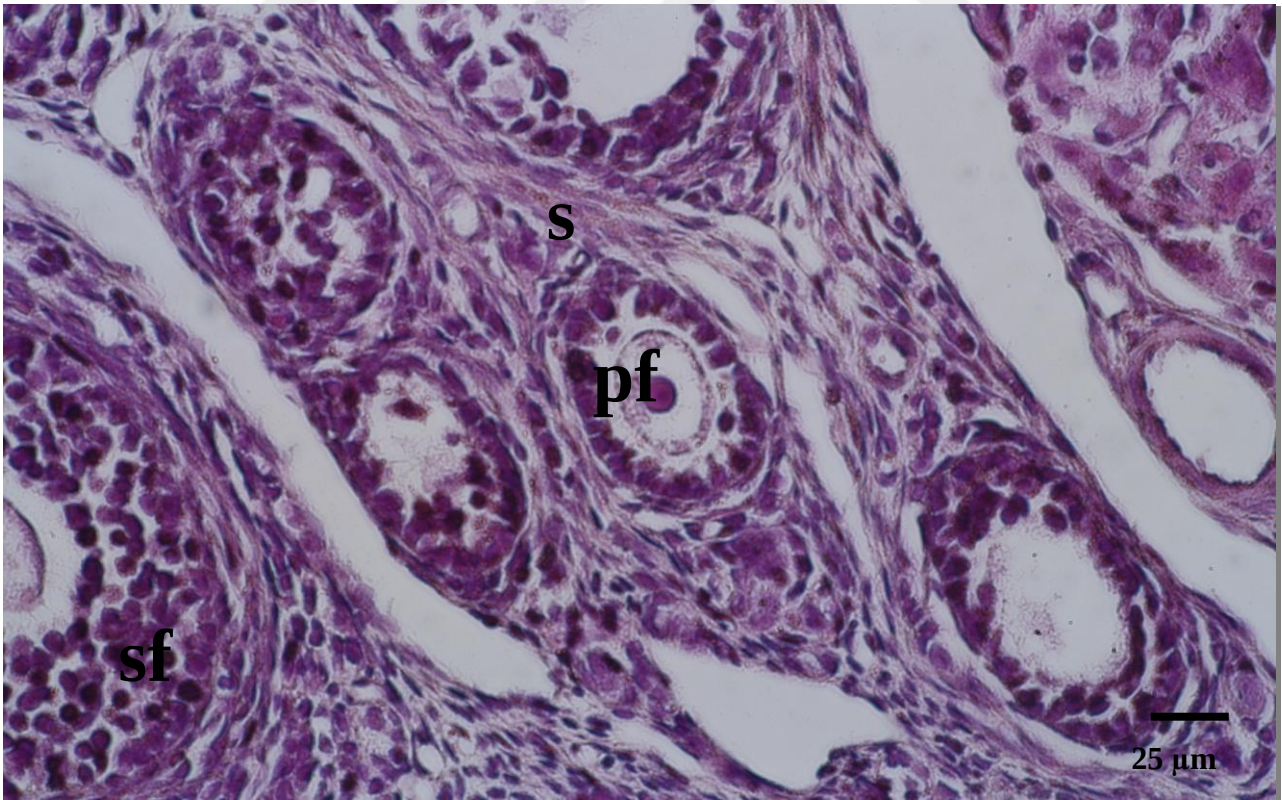
**Şekil 20.** Over Kontrol grubu görüntüsü (Hematoksilen-Eozin x 4 Obj. ) tu: tuba uterina gf: grafiyan folikül ge: germinal epitelyum.



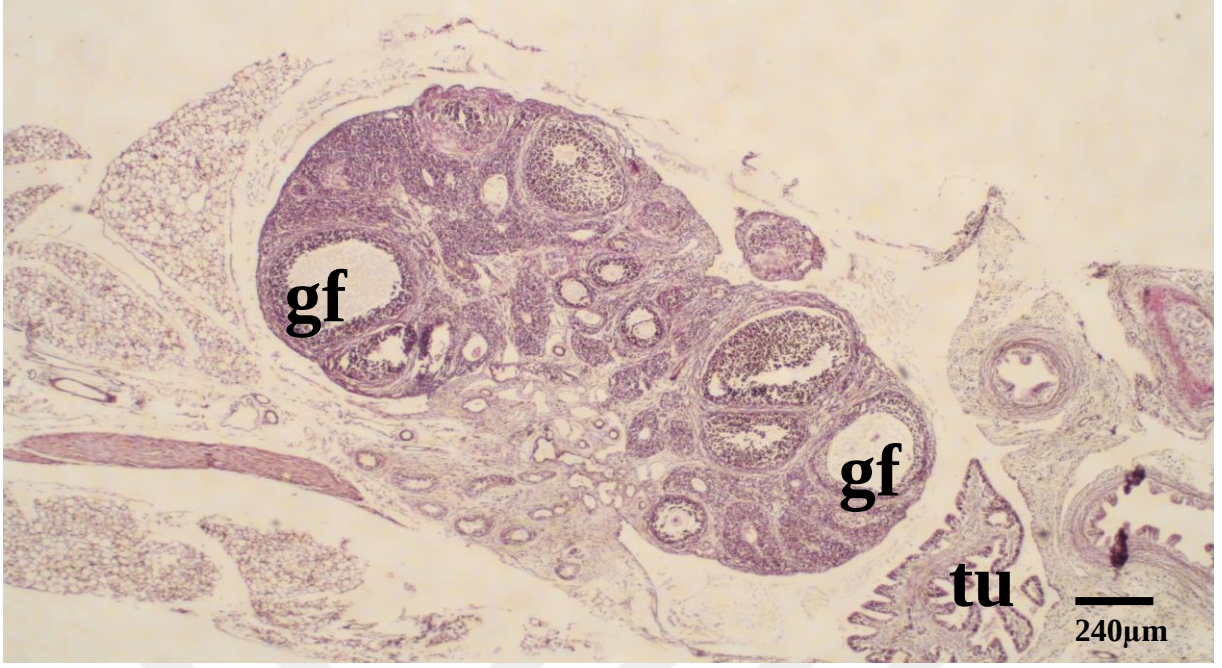
**Şekil 21.** Over kontrol grubu görüntüsü (Hematoksilen-Eozin x 40 Obj. ) sf:sekonder folikül



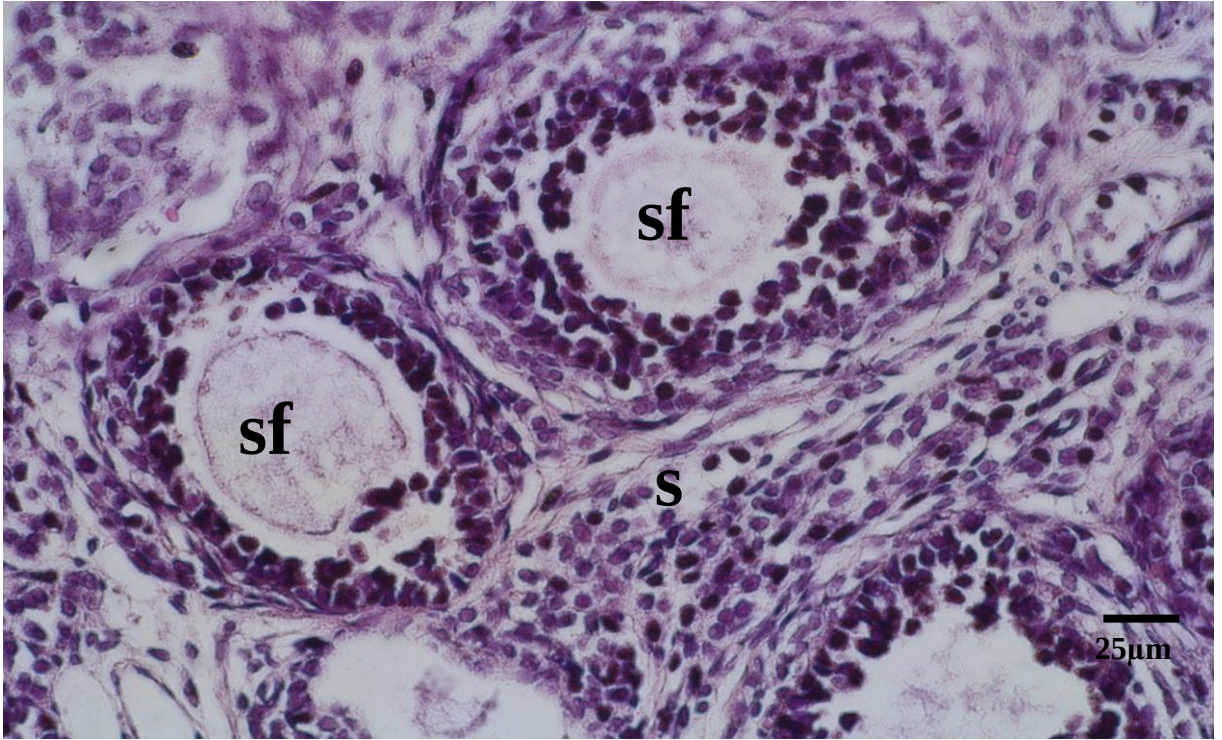
Şekil 22. Over Denek grubu görüntüsü (Hematoksilen-Eozin x 4 Obj.) cl; corpus luteum gf; graaf folikül



Şekil 23. Over Denek grubu görüntüsü (Hematoksilen-Eozin x 40 Obj) pf:primer folikül sf:sekonder folikül  
s:stroma



Şekil 24. Over Sham grubu görüntüsü (Hematoksilen-Eozin x 4 Obj.) gf: graaf folikül, tu; tuba uterina



Şekil 25. Over Sham grubu görüntüsü (Hematoksilen-Eozin x 40 Obj.) s; stroma, sf; sekonder folikül

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Nonsteroidal antiinflatuar ilaçlar (NSAİİ); antiinflatuar, antipiretik ve analjezik etkilerini prostanoid oluşumunda anahtar enzimler olan Siklooksijenaz-1 ve 2'yi inhibe ederek gösterirler. Bu enzimlerin inhibisyonu sadece prostanoid düzeyini azaltmakla kalmaz aynı zamanda renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi ve renal vasküler tonisite ile etkileşerek böbrekte ve birçok patofizyolojik süreçte rol oynarlar. Nonsteroidal antiinflatuar ilaçlar (NSAİİ) tüm dünyada ve de ülkemizde en çok kullanılan ilaç grubudur. Özellikle romatizmal hastalıkların tedavisinde uzun süreli ilaç kullanımı gerektiğinden ve bağımlılık yapmadığından NSAİİ' lar yaygın olarak kullanılmaktadır. NSAİİ prototipi aspirin olup 1000 yıldan beri kullanılmaktadır. 1991 yılında yapılan bir araştırmada ABD'de aspirinin yılda 6000 ton kullanıldığı gösterilmiştir (Waissmann, 1991). Bizde çalışmamızda selektif olmayan NSAİİ grubundan olan diklofenak sodyumu kullandık. Diklofenak sodyum ülkemizde birçok firma tarafından değişik isimler adı altında piyasaya sürülmüştür. Dikloron (tablet, ampul), Voltaren (ampul, göz damlası), miyadren (ampul, tablet), diclomec (jel, ampul) bunlara bir kaç örnektir (Ommaty, 1988). Yapılan çalışmalarda yaygın kullanılan diklofenak sodyumun vücutta birçok sistemde istenmeyen yan etkilere yol açtığı ve organ ve dokuların yapısını bozduğu gösterilmiştir. Bu yan etkilerin başta gelenleri midede; hazımsızlık, stomatit, kanama, ülser, ciltte; ilaç erupsiyonları, eritema multiforme, büllöz erupsiyonlar, püstüler psöriazis, kanda; trombositopeni, nötropeni, aplastik anemi, hemolitik anemi, böbreklerde; hipertansiyon, akut renal yetmezlik, interstisyel nefrit, karaciğerde; Reye sendromu, hepatit, akciğerlerde; astım ve anafilaktik reaksiyonlar, pulmoner ödem, pulmoner alveolitis, merkezi sinir sisteminde; bulantı, baş ağrısı, baş dönmesi, aseptik menenjitdir (Brooks, 1988; Odacı ve ark., 2001).

Aktif romatizmal hastalıkların gebelikte tedavi edilmesi, fetusun sağlıklı bir şekilde gelişmesi ve anne sağlığı açısından önemlidir. Bu grup ilaçların bu dönemde kullanımının oluşturacağı ilaç etkilerine yönelik prospektif klinik çalışma yapmak etik olmadığı için konuyla ilgili bilgilerimiz sınırlıdır. Romatoid artirit tedavisinde NSAİİ' ların etkisi aspirin ve indometazinde araştırılmıştır. İbuprofen, ketoprofen, sulindak ve diklofenak'ın gebelikte kullanımıyla ilgili sınırlı bilgiler mevcuttur. NSAİİ' ların gebelik süresince kullanımının annede ve fetusda yan etkilere yol açtığı bildirilmiştir. Hamileliğin son trimestirinde artrit

veya tokolitik tedavi amacıyla uygulamada kullanılan NSAİİ'da çok dikkatli olunmalıdır. Gebelikte verilen diklofenak sodyum'un gebelik ve doğum süresini uzattığı, oligohidroamnios, hidrops fetalis ileal perforasyon, beyinde kistik lezyonlar, karaciğerde parankimal dejenerasyona yol açtığı tesbit edilmiştir. Ayrıca duktus arteriosusta (DA) kasılma yaparak erken kapanmasına yol açtığı ve sağ ventrikül yetmezliği, pulmoner hipertansiyon ve hatta fetusun ölüme neden olabileceği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Gökçimen ve Malas 2003).

Yapılan bir çalışmada 10 gün süreyle Diklofenak sodyum (0.2 mg/kg) uygulanan denek grubu sıçanların, overleri histopatolojik olarak incelenmiş, denek grubuna göre sekonder folikül sayısında düşüşün istatistik açıdan anlamlı derecede olduğu, tersiyer folikül sayısında ise farklılık olmadığı gözlenmiştir (Üstün ve ark., 1992). Bu çalışmanın sonuçları çalışmamızda preantral folikül sayısı sonuçlarıyla örtüşmektedir, çalışmamızdan farkı stereolojik olmamasıdır.

Kökçü ve ark., (1992) yaptığı çalışmada Diklofenak sodyum uygulanan ve uygulanmayan iki grubun gebelik süreleri ve doğan fetüs sayılarının dağılım oranları arasında önemli farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Sıçanların normal gebelik süresinin 21-23 günden NSAİİ kullanımıyla 28-29 güne kadar uzamaktadır (Gökçimen ve ark., 2003). NSAİİ kullanan gebelerde de benzer durum gözlenmiştir (Ostenson ve ark., 1998).

Sıçanlar üzerine yapılan başka bir çalışmada gebeliklerinde diklofenak sodyum kullanılmış 4 ve 20 haftalık erkek sıçanlarda optik sinir incelenmiş. Sonuçta total akson sayısı ve aksonların sayısal yoğunluğunda yapısal ve morfometrik değişiklikler olduğu ve miyelin kılıf kalınlığının azaldığı gözlenmiştir (Çolakoğlu ve ark., 2013).

NSAİİ'lerin kullanımı infertiliteye neden olabilir. Ovulasyon için COX-2 enzimi gerekli olup, yapılan bir çalışmada COX-2 eksik olan farelerin infertil oldukları gözlenmiştir (Dinchuk, 1995). Carp ve arkadaşları (1988), diklofenak sodyum uygulanan sıçanlarda blastosist implantasyonunu % 34 oranında geciktirdiğini tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmalarda gebeliğin farklı zamanlarında uygulanan diklofenak sodyumun fetüste farklı etkiler oluşturacağı bildirilmiştir (Odacı ve ark., 2001). Gebeliklerinde değişik dozlarda diklofenak sodyum uygulanmış sıçanlarda yüksek doz ile orantılı olarak teratojen etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Chan ve ark., 2001). Brooks ve Needs (1985), gebe sıçanlara uygulanan 5 mg/kg diklofenak sodyumun, fetüs kaburgalarında defektlere neden olduğunu tesbit etmişlerdir. Bununla birlikte 10 mg/kg diklofenak sodyum uygulanan tavşanlarda herhangi bir teratojen etki görülmediği de bildirilmektedir (Russel, 1986). Yapılan

Çalışmalarda bizim çalışmamızdan farklı dozların kullanılmasından kaynaklı, farklı sonuçlar elde edildiğini düşünmekteyiz.

Gebelikte ve normal dozda kullanılan diklofenak sodyumun doğan yavruların (20 haftalık) karaciğer ve akciğeri üzerine etkisi araştırılmasının yapıldığı çalışmalarda istatistiki olarak bir fark bulunmamıştır (Rağbetli ve ark., 2009a, 2009b). Bu alışmalar da bizim yaptığımız çalışmadaki total volüm bulgusu ile örtüşmektedir, dokular farklı fakat çalışmalar morfolometrik olarak benzerdir.

Bir başka çalışmada klinik uygulamada, kırık sonrası yaygın kullanımı olan, antienflamatuvar ilaç diklofenak sodyumun, insanlara uygulanan doz aralığında ve kırık sonrası on günlük kullanımda sıçan tibia kırıklarında kallus gelişimi ve kırık iyileşmesini olumsuz yönde etkilemediği sonucuna varılmıştır. (Akman ve ark., 2001). Çalışmamızdan farklı verilen diklofenak sodyumun postnatal 20 haftalık sıçan dokuları üzerinde total volüm oranlarının araştırılmamasıdır.

Kaplan ve ark., (1994b)'larının yaptığı bir başka çalışmada 5mg/kg i.m. uygulanan diklofenak sodyumun göbek bağı damar çapı üzerine etkisi olmadığı fakat göbek bağı uzunluğu ve fetal, plental ağırlıkta anlamlı artış olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızdan farklı, diklofenak sodyum doz aralığının fazla olmasından kaynaklanmış olabilir. Ancak morfolometrik olması yönünden çalışmamıza benzerdir.

Kökçü ve ark., (1992) alışmalarında denek grubundaki erişkin gebe sıçanlara gebeliğin 4. gününden itibaren 14 gün süreyle 0,2 mg/kg diklofenak sodyum uygulamışlar. Denek grubu sıçanların gebelik süresinin önemli derecede uzadığını ve doğan fetus sayısının daha az olduğunu tesbit etmişlerdir. Sonuçta; diklofenak sodyumun desidual defekte neden olabileceği sonucuna varmışlardır. Çalışmamızla ortak noktası prenatal diklofenak sodyumun kullanılmasıdır. Çalışmamızda gebelik süresinde uzama ve fetus sayısında kontrol grubuna göre farklılık tesbit etmedik. Bu sonuçlarımızın kullandığımız diklofenak sodyum dozunun düşüklüğünden kaynaklanmış olabileceğine bağladık.

Güven ve ark., (2013) yaptıkları stereolojik bir çalışmada prenatal yaşamda diklofenak sodyum uygulanan dişi sıçanlarda ovaryum (medulla, korteks, Graaf folikül ve corpus luteum volümleri ile granüloza, teka hücreleri ve antrum volümleri) ve uterus boynuzunun volümleri incelenmiştir. Dokuların volümlerinde anlamlı değişiklik olmadığı tesbit edilmiştir. Bu çalışmada bizim çalışmamızdaki total volüm bulgusu ile örtüşmektedir. Bizim alışmamızda ek olarak preantral folikül sayısında da değişiklik olmadığı tesbit edilmiştir.

Literatür taramalarımızda Prenatal diklofenak sodyum uygulamasının postnatal 4 haftalık yavru sıçan over dokusu üzerine morfometrik etkilerini araştıran çalışmaya rastlamadık. Over dokusunun total volümü ve peantral folikül sayımı ile ilgili olarak çalışmamızın dünya bilgileri için yeni olduğu söylenebilir. Stereolojik metotlar, doku ve yapıların geometrik analizini ifade eden ve iki boyutlu kesitlerden yapıların yoğunluk, sayı, hacim vb. gibi nicelikleri tarafsız bulmayı sağlayan metotlardır. Stereolojik metodlar tarafsız ve doğruluğu keskin kabul gören yöntemlerdir (Kaplan ve ark., 1997). Çalışmamızda da bu yöntemi kullanarak over dokusunun değerlendirmesini yaptık.

### **Özetle Sonuçlar;**

Gebe sıçanlara uygulanan diklofenak sodyumun (1mg/kg), postnatal 4 haftalık sıçan overinde preantral follikül sayısı ve total doku völümü üzerine etkisi stereolojik yöntemlerle araştırıldı. Denek, sham ve kontrol gruplarının, total doku völümleri Cavalieri prensibi ile hesaplandı ve sonuçlar karşılaştırıldı. Denek, sham ve kontrol guplarının total doku volümleri arasında istatistik, yönden anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi. Postnatal overlerin preantral folikül sayıları stereolojik yöntemler kullanılarak sayıldı ve istatistiki olarak karşılaştırılmasında anlamlı fark olmadığı tesbit edildi. Bulduğumuz sonuçların diklofenak sodyumun düşük dozda (1mg/kg) kullanılmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Konuyla ilgili yapılacak ileri çalışmalarda diklofenak sodyumun daha yüksek dozlarda uygulanmasını ve elektron mikroskobik olarak foliküllerin ultrastrüktürel yapısının stereolojik olarak araştırılmasını önermekteyiz.

## ÖZET

**Çölçimen Neşe, Prenatal uygulanan diklofenak sodyumun postnatal sıçan ovaryum preantral follikül sayısına etkilerinin stereolojik yöntemlerle araştırılması Y.Y.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, Van, 2013.** Non selektif nonsteroidal antiinflamatuvar ilaç grubundan olan Diklofenak sodyum, analjezik, antiinflamatuvar ve antipiretik etkilere sahiptir. Bu etkilerinden dolayı gebelikte çeşitli endikasyonlarda kullanılmaktadır. Gebelik süresi ve doğumun uzamasına yol açmakta, plasenta bariyerini geçerek fetüse etki etmektedir. Dişi üreme sisteminin bir parçası olan Overler, ovum üretmekte ve hormon salgılamaktadırlar. Çalışmamızın amacı gebe sıçanlara uygulanan diklofenak sodyumun postnatal 4 haftalık yavru sıçanların over morfolojisi üzerine etkilerinin stereolojik yöntemlerle araştırılmasıdır. 9 adet erişkin Wistar Albino sıçan alındı. Sıçanlar bir gece 3 dişi bir erkek olacak şekilde çiftleşmeye bırakıldı. Çiftleşmenin ertesi günü vaginal plak gözlenen dişi sıçanlar, gebeliğin sıfırıncı günü olarak kabul edildi. Sıçanlar, 12/12 saat aydınlık/ karanlık ışık periyodunda,  $21 \pm 2$  °C'lik oda ısısında barındırıldı ve standart pelet yem ve musluk suyu ile beslendi. Denek ve sham grubuna gebeliğin beşinci gününde enjeksiyona başlandı, her gün 15 gün süreyle 1mg/kg diklofenak sodyum ve 1cc serum fizyolojik olmak üzere uygulandı. Çalışmamızda denek, sham ve kontrol gruplarından 6' şar adet olmak üzere toplam 18 adet yavru sıçan 4 haftalık olunca derin anestezi altında perfüzyona alınarak sağ over dokusu çıkarıldı. Rutin ışık mikroskopik histolojik takip metodları uygulandıktan sonra dokular parafine gömüldü. Dokulardan belirli aralıklarla 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. İlk kesit rastgele seçildi, her 40. kesit çifti alındı. Kesitler, Hematoksilen-Eozin ile boyandı ve Cavalieri prensibinin modifiye metodu kullanıldı. Total doku volümleri noktalı alan ölçüm cetveli ile ölçüldü. Stereolojik inceleme sonucu, gebelikte uygulanan diklofenak sodyumun postnatal 4 haftalık deneklerle karşılaştırıldığında kontrol grubu total doku volümlerinin ve preantral folikül sayısının değişmediği, istatistiki açıdan anlamlı bulunmadığı tespit edildi.

**Anahtar kelimeler:** Diklofenak sodyum, gebelik, ovaryum, preantral folikül sayısı, sıçan, stereoloji

## SUMMARY

**Cölcimen Nese, Investigation of the effect of prenatally exposed diclofenac sodium on the postnatal rat ovary preantral follicle numbers using stereological methods. Yuzuncu Yıl University, Institute of Health Sciences, Doktora Thesis in Department of Medical Histology and Embryology, Van, 2013.** Diclofenac sodium, non-selective nonsteroidal anti-inflammatory drug group, has analgesic, antiinflammatory and antipyretic effects. Because of these effects, it is used in various indications in pregnancy. It leads to a long period of gestation and birth, affecting the fetus by passing the placental barrier. The Ovaries part of the female reproductive system, produces ovum and secretes hormones. The aim of our study was to investigate the effects of prenatally applied diclofenac sodium on the morphometry of the 4 week young ovaries by stereological methods. 9 adult Wistar Albino rats were taken. The rats were allowed to mate overnight with a female three-female. The next day female rats which vaginal plaques were observed was considered as the day '0' of the pregnancy. The rats were housed in a room temperature of  $21 \pm 2$  °C in a light / dark light period of 12/12 hours and fed with standard pellet feed and tap water. The injections in the sham (1cc SF) and the experimental group (1cc; 1mg/kg diclofenac sodium ) were started on the fifty day of pregnancy and applied for 15 days. In our study, a total of 18 pups, 6 'from sham and control groups, were taken under perfusion under deep anesthesia for 4 weeks and right overgrowth was removed. After routine light microscopic histological follow-up methods were applied, the tissue were embedded in paraffin. Tissue sections of about 5 microns thick were taken at regular intervals. The first section was chosen at random and every 40th section pairs were taken. Sections were stained with hematoxylin-eosin. Modified method of Cavalieri's principle was used for stereological analysis. Total tissue volumes were measured with pointed field scale. When the subjects exposed to diklofenac sodium during pregnancy were compared with control group at 4 weeks postnatal, there were no significant differences regarding total tissue volume and number of primordial follicles with stereological analysis.

**Key words:** Diclofenac sodium, pregnancy, ovarium, preantral follicles numbers, rat, stereology

## KAYNAKLAR

Akman Ş, Göğüş A, Şener N, Bilgiç B, Aksoy B (2001). Sıçan tibia kırıkları sonrası uygulanan diklofenak sodyumun kırık kaynaması üzerine etkisi. *Hacettepe Ortopedi Dergisi* 11, 2 -55

Ackermann U, Basc, Masc, PhD (2006). *PDQ Fizyoloji*, 1.Baskı (Çeviri) Yeğen B.Ç, Kurtel H, Alican İ, İstanbul Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı. 447-453, İstanbul Medikal Yayıncılık.

Aspirin ve kolon kanseri (2010). *Tıp Bilimleri Dergisi*, Journal of Medical Sciences.

Bancroft JD, Gamble M (2008). Theory and Practice of Histological Techniques, *Churchill Livingstone Elsevier, China*, 68-69.

Brooks PM, Needs C (1985). Antirheumatic medication in pregnancy (letter). *Br J Rheumatol*, 24 ,4, 382.

Bjarnason I, Zanelli G, Smith T, Prouse P, Williams P, Smethurst P ve ark. (1997). Non-steroidal Antiinflammatory drug-induced intestinal inflammation in humans. *Gastroenterology* Seb.93 ,3 480-489.

Campell K L, De Beaux AC (1992). Non steroidal anti-inflammatory drugs and appendicitis in patients aged over 50 years. *Br J Surg*.79,9,967-968.

Canan S, Şahin B, Odacı E, Ünal B, Aslan H, Bilgiç S, Kaplan S (2002). Toplam hacim, hacim yoğunluğu ve hacim oranlarının hesaplanmasında kullanılan bir stereolojik yöntem, Cavalieri Prensibi. Türk Hekimler Birliği Vakfı. *Türkiye Klinikleri Tıp bilimleri Dergisi Özel Sayısı*, Stereolojide Temel Kavram ve Yöntemler. Cilt: 22, Sayı: 1 (Ek) Sayfa 7-14.

Carp HJA, Fein A, Nebel L (1988). Effect of diclofenac on implantation and embryonic development in the sıçan. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 28, 273-277.

Chan LY, Chiu PY, Siu SSN, Lau TK (2001). A study of diclofenac-induced testisgenesis during organogenesis using a whole sıçan embryo culture model department of obstetric and gynaecology, prince of Wales Hospital, the Chinese University of Hong Kong Shatin, Hong Kong. To whom correspondence should be addressed at: Department of Obstetric Gynaecology, Prince of Wales Hospital, The Chinese University of Hong Kong, Shatin, Hong Kong. *Human Reproduction* Vol,16 No,11 pp, 2390-2393.

Çolakoğlu S, Aktaş A, Raimondo S, Türkmen A, Altunkaynak B, Odacı E, Geuna S, Kaplan S (2013). Prenatal exposure of saline and diclofenac sodium on the optic nerve of week-old and 20 week-old male rats: a stereological and histological study. *Biotechnic & Histochemistry*, 21-49.

Dalcık H (2002). İstanbul Nobel Tıp Kitapevi. 6. Baskı, 329-330, 109-110.

Deniz G, Saygı Ş (2000). Selektif COX-2 inhibitörlerinin klinik önemi ve gastrointestinal toksisitesi olmayan yeni antiinflamatuvar ajanlar. *Tıp Bilimleri Dergisi* 20,2.

Dinchuk JE (1995). Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature*, 378: 406-409.

Dişel U (2005). Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı Meme kanserinde siklooksijenaz-2 ve kliniko-patolojik parametreler ile ilişkisi. *Yan Dal Uzmanlık Tezi*, Adana.

DiSaia PJ, Clinical Anatomy of the Female Genital Tract in 6<sup>th</sup> Ed, *Danforth's Obstetrics and Gynecology* (1994) ,7<sup>th</sup> Ed, St.Louis ,J.B.Lippincott Company, (I), 1-9.

Ertenli İ, Öztürk MA (2000). Spesifik COX-2 inhibitörleri. *Romatizmal Hastalıklara Giriş*. 16, 208-216.

Ferner H, Staubcsant J, *Sobotta Atlas of Human Anatomy* (1982), Vol.2, Munchen.

Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby, A,West MJ (1988). Some new, simple, efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis*, 96,379-394

Gundersen, HJ. Jensen, EB. (1987). The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microscopy*, 1147, 229-263.

Gökçimen A ve Malas MA (2003). Nonsteroidal anti-inflamatuvar ilaçların gebelikteki toksisiteleri ile ilgili literatürlerin gözden geçirilmesi. *Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 10-13, 50 - 52.

Gökalp O, Mollaoğlu H (2003). Uygun olmayan ilaç kullanımı. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 10,17-20

Gökçimen A, Akdoğan M, Karaöz E, Çiçek E, Malas MA, Öncü M (2000). Yüksek doz diklofenak sodyum uygulanan sıçanların karaciğer ve böbrek dokularında meydana gelen yapısal ve biyokimyasal değişiklikler. *Yeni Tıp Dergisi* 17,2,72-77.

Guyton AC, Hall JE (1986). Çeviri, Çavuşoğlu H, Yeğen B.Ç, Gökhan Nİ, *Textbook of Medical Physiology Tıbbi Fizyoloji* 7. Baskı Nobel Tıp Kitapevi, W.B, Saunders Company,1401-1402.

Güven D, Altunkaynak BZ, Ayrancı E, Kaplan S, Bildircin FD, Kesim Y, Rağbetli MÇ (2013). Stereological and histopathological evaluation of ovary and uterine horns of female rats prenatally exposed to diclofenac sodium. *J Obstet Gynaecol*. 2013 Apr, 33, 3, 258-263.

Hashimoto Y, Kondo Y, Kimura G, Matsuzawa I, Sato S, Ishizaki M, Imura N, Akimoto M, Hara S (2004). Cyclooxygenase-2 expression and relationship to tumour progression in human renal cell carcinoma, *Histopathology*, 44: 353-359.

Hasçelik Z (2001 Ocak). Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar. *Sted*.10,25-28.

Hinz B, Brune K (2002). Cyclooxygenase -2-10 years later. *J Pharmacol Exp Ther* 300,2,367-375.

Harris WH (1980). The effects of repeated doses of indomethacin on fetal rabbit mortality and on the patency of the ductus arteriosus, *Feb*,58,2, :212-6.

Hussain T, Gupta S, Mukhtar H (2003). Cyclooxygenase-2 and prostate carcinogenesis. *Cancer Lett*, 191,125-135.

Junqueira LC, Carneiro J (2006). (çeviri: Aytekin Y, Solakoğlu S.) *Temel Histoloji* Nobel Tıp Kitapevi Çeviri İstanbul, 456-457.

Kadın üreme anatomisi, Göktepeliler.com 141.ipg (24.01.2011)

Krause MM, Brand MD, Krauss S, Meisel C, Vergn H, Burmester GR, Butt-gereit F, (2003). Nonsteroidal antiinflammatory drugs and a selective cyclooxygenase 2 inhibitor uncouple mitochondria in intact cells. *Arthritis Rheum* 48, 1438-1444.

Ketenci A, (1998). Nonsteroid antiinflamatuvar kullanımına yeni bir bakış; COX-1, COX-2. *Prognoz*.1,4,210-217.

Koçar İH, Halbant S, Turan M ,(1997). Nonsteroid Antiinflamatuvar ilaçların klinik kullanımı . *Klinik Bilimler* 1,28-46.

Kalgutkar AS, Crews BC, Rowlinson SW, Marnett AB, Kozak KR, Remmel RP, Marnett LJ, (2000). Biochemically based design of cyclooxygenase-2(COX-2) inhibitors; facile conversion of nonsteroidal antiinflammatory drugs to potent and highly selective COX-2 inhibitors. *Proc.Natl.Acad Sci USA* 97,2,925-30.

Kaplan S, Rağbetli MÇ, Bilgiç S, Balat Ö, Çiftçi N, Kökçü A, (1994b). The Effects of Diclofenac Sodium on Umbilical Cord Length, Umbilical Cord Vessel Diameters, Placental Weight and Fetal Weight. *Tr. J, of Medical Sciences*, 20 (1994): 155-157

Kaplan S, Canan S, Şahin B, Ünal B, (1997). *Stereolojik Metodlar ve Uygulamaları Kursu Notları*. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Samsun.

Kaplan S, Çiftçi N, Korkmaz A, Rağbetli MÇ, Bilgiç S, Balat Ö, Erdinç N (1994a). Fötal

yaşamda uygulanan nonsteroidal antiinflamatuvar ilacın postnatal dönemde akciğer kapiller sayısına etkilerinin araştırılması. *O.M.Ü. Tıp Dergisi* 11(2): 97-100.

Kayaalp O (2009). *Oğuz Kayaalp Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji* 32.yıl 12. Baskı 2. cilt sayfa 854.

Kennedy TG (1997). Evidence for role for prostaglandins the initiation of blastocist implantation in the rat. *Biol Reprod*; 16: 286-291.

Kökçü A, Üstün C, Çokşenim Ş, Balat Ö (1992). Gebe sıçanlara uygulanan diklofenak sodyumun fetüs sayısı ve gebelik süresine etkisi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastalıkları ve Doğum ABD, Samsun *T Klin Jineköl Obst*, 2, 295-297.1.

Madrigal IL, Lopez HS, Alcala FC (2002). Inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2: Usos potenciales en perros. *Vet Mex* 33,3,285-307.

Mardini IA, Fitzgerald GA (2001). Selective inhibitors of cyclooxygenase-2: Agrowing class of antiinflammatory drugs. *Molecular Interventions* 1,1, 30-38.

Morgan G (1996). Non-steroidal anti-inflammatory drugs and the chemoprevention of colorectal and nonaspirin oesophageal cancers, *Gut*, 38: 646-648.

Moore LK, ve Persaud TVN (2002). Systema Skeletale ve Ekstremiteler. *The Developing Human Clinically Oriented Embryology*. Çev. Editörü;Yıldırım M, Okar İ,

Moore K. Clinically Oriented Anatomy (1985). 2<sup>nd</sup> Ed., Baltimore: Williams and Wilkins, Narushima S, Spitz D R, Oberley L W, Toyokuni S, Miyata T, Gunnett C A ve ark. (2003). Evidence for oxidative stres in NSAID-Induced colits in IL 10-/- Mice. *Free Radical Biology & Medicine* 34,9,1153-66.

Norian G, Clive D (2002). Cyclo-oxygenase-2 Inhibitors and the kidney: a case for). *Caution. Drug Saf* 25,3, 165-172.

Odacı E, Korkmaz A, Ayas B, Rağbetli MÇ, Çiftçi N (2001). Prenatal Dönemde Uygulanan diklofenak sodyumun, postnatal dönemde sıçanın eklem kıkırdak dokusuna etkisi. *Türkiye klinikleri tıp bilimleri dergisi*, 21, 278-281.

Ommaty R (1988). *Vademecum 98 Modern İlaç Rehberi.*: Feryal Matbaası. Sayfa 1084-5, Ankara.

Oktay Ş (1998).Antiinflamatuvar İlaçlar. *Farmakoloji*: Nobel Tıp Kitabevleri,401-19.

Pakrasi PL, ve Dey SK (1982). Blastocyst is the source of prostagladins in the implantation site in the rabbit. *Prostaglandins*: 24; 72-77.

Persaud TVN ve Moore KL (1974). Inhibitors of prostaglandin synthesis and fetal development. *Lancet*:93.

Rağbetli MC, Kaplan S, Korkmaz A, Albayrak D (1996). Fötal yaşamda uygulanan diklofenak sodyumun postnatal 20 haftalık erkek sıçan hipokampusunun tabaka kalınlığına etkisi *Tr.J.of Biology* 21, 299-305.

Rağbetli C, Aydinlioğlu A, Kara M, Rağbetli MC, İlhan F (2009a). Effects of diclofenac sodium on the rat liver in postnatal period. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 8,9,: 1761-1764.

Rağbetli C, İlhan F, Aydinlioglu A, Kara M, Rağbetli MC (2009b). A histological investigation concerning the effects of diclofenac sodium to the lung in 4- and 20-week-old sıçans treated prenatally. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine Early Online*, 1-5.

Ross MH, Reith E J, Romrell LJ. *Histology a text and atlas* (1989). Philadelphia: Williams and Wilkins, 679-682.

Russel JG (1986). Antirheumatic medication in progranı (letter). *Br J Rheumatol* 25,2, 229.

Sadler TW (1996). *Langman Medical Embriology* Palme Yayıncılık (çeviri Başaklar CA). 278-284, Ankara.

Şahin A (2007). [www.algoloji.org.tr/analjezikler](http://www.algoloji.org.tr/analjezikler). Türk Algoloji Derneği

Tıkız C (2000). Selektif Siklooksijenaz-2 (C0X-2) inhibitörleri KOKSİB'ler; [http: // www.ftr.org.tr/](http://www.ftr.org.tr/) Dergi.

Vana J (2001 April). Selektif C0X-2 inhibitörlerinin ortaya çıkması. COX-2 İnhibitörlerine Olan İnanişlar ve Gerçekler. Abstracts From an İnternational Symposium,7.

Yeğın A (2004). Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar. *Türkiye Klinikleri Farmakoloji Özel* 2,1,46-51.

Wang JF, Greenberg SS, Spitzer JJ (1995). Chronic alcohol administration stimulates nitric oxide formation in the rat liver with and without pretreatmentby lipopolysaccharide . *Alcohol Clin Exp Res* 19,387-393.

Waissmann G (1991). Aspirin, *Sci Am*, 264, 84-90.

## ÖZGEÇMİŞ

Neşe ÇÖLÇİMEN 1974 yılında Van da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimi Van'da tamamladı. 1999 yılında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesinden mezun oldu. 2005 yılında Kadın Hastalıkları ve Doğum Uzmanı oldu. Van ve çeşitli illerdeki hastanelerde Kadın Hastalıkları ve Doğum Uzmanı olarak görev yaptı. Halen Erciş'te özel bir tıp merkezinde Kadın Hastalıkları ve Doğum Uzmanı olarak çalışmaktadır. 2009 yılı Eylül ayında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Doktora eğitimine başladı.