

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GEBELİKTE UYGULANAN DİKLOFENAK SODYUM VE
TİMOKİNONUN POSTNATAL 4 VE 10 HAFTALIK SIÇAN
OVARYUM PREANTRAL FOLLİKÜL SAYISINA ETKİLERİNİN
STEREOLOJİK YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI**

Biyolog Ayfer KÖRKOCA
TIBBİ HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Murat Çetin RAĞBETLİ

VAN-2018

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GEBELİKTE UYGULANAN DİKLOFENAK SODYUM VE TİMOKİNONUN
POSTNATAL 4 VE 10 HAFTALIK SIÇAN OVARYUM PREANTRAL
FOLLİKÜL SAYISINA ETKİLERİNİN STEREOLOJİK YÖNTEMLE
ARAŞTIRILMASI**

Biyolog Ayfer KÖRKOCA
TIBBİ HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Murat Çetin RAĞBETLİ

VAN-2018

Bu tez çalışması Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından 02.06.2016 tarih ve TDK-2016-5304 nolu proje olarak desteklenmiştir.

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GEBELİKTE UYGULANAN DİKLOFENAK SODYUM VE TİMOKİNONUN
POSNATAL 4 VE 10 HAFTALIK SIÇAN OVARYUM PREANTRAL
FOLLİKÜL SAYISINA ETKİLERİNİN STEREOLOJİK YÖNTEMLE
ARAŞTIRILMASI**

Biyolog Ayfer KÖRKOCA
TIBBİ HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ



Jüri Başkanı

Prof.Dr. Süleyman KAPLAN



ÜYE

Prof.Dr. Murat Çetin RAĞBETLİ

ÜYE



Prof.Dr. Yasin TÜLÜCE

ÜYE

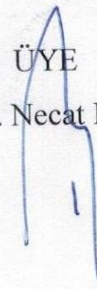
.....

Yrd.Doç.Dr. Mikail KARA



ÜYE

Yard.Doç.Dr. Necat KOYUN



TEZ KABUL TARİHİ

19/01/2018

TEŞEKKÜR

Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi, yardım ve desteğini esirgemeyen Tıp Fakültesi Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Murat Çetin RAĞBETLİ' ye ve Anabilim Dalı öğretim üyeleri Yrd. Doç. Dr. Mikail KARA ve Yrd. Doç. Dr. Neşe ÇÖLÇİMEN'ne, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Yasin TÜLÜCE'ye, Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hasan YILMAZ'a, Anatomi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Necat KOYUN'a, ELISA çalışmam için gerekli imkanları sağlayan Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr.Semiha DEDE'ye İstatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Sıddık KESKİN'e, ayrıca Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Müdürü Doç. Dr Yıldray BAŞBOĞAN'a ve Orhan ASLAN'a ve laboratuvar çalışmalarımda tezimin her aşamasında yardımda bulunan Veysel AKYOL'a, Öğr. Gör. Fikret ALTINDAĞ'a, Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğr.Gör. Sadi ELASAN'a, patoloji laboratuvarı tüm çalışanlar ve özellikle Melek BUDAK'a ve manevi desteğini benden esirgemeyen Aileme, 02.06.2016 tarih ve TDK-2016-5304 No'lu proje olarak desteklerinden ötürü Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na, teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
Teşekkür	III
İçindekiler	IV
Simgeler ve Kısaltmalar.....	VI
Şekiller Dizini.....	VIII
Tablolar Dizini.....	XII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Ovaryum	7
2.1.1. Ovaryum embriyolojisi	7
2.1.2. Ovaryum anatomisi.....	10
2.1.3. Ovaryum histolojisi	12
2.1.4. Ovaryum follikülleri.....	14
2.1.5. Ovaryum korpusları.....	23
2.1.6. Menopoz sonrası ovaryum.....	25
2.1.7. Ovaryum fizyolojisi.....	26
2.2. Anti-Müller Hormonu	33
2.3. Non-Steroidale Anti İnflamatuvar İlaçlar (NSAI).....	36
2.3.1. Etki mekanizmaları	38
2.3.2. Diklofenak Sodyum.....	41
2.4. Timokinon	42
2.4.1. Kimyasal bileşenleri	43
2.4.2. Etki mekanizmaları	44
2.5. Stereoloji.....	46
2.5.1. Fiziksel disektör	50
2.5.2. Tarafsız sayım çerçevesi sayım kuralları.....	51
2.6. Cavalieri Prensibi	53
2.7. Cavalieri-Disektör Kombinasyonu	56
2.8. ELISA.....	58
2.8.1. Kompetitif ELISA.....	58

2.8.2. Non-kompetitif ELISA	59
2.9. Transmisyon (Geçirgenli) Elektron Mikroskobu	60
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	63
3.1. Gereç.....	63
3.1.1. Deneyin uygulaması.....	63
3.1.2. Kullanılan cihazlar.....	64
3.2. Yöntem.....	64
3.2.1. Perfüzyon işlemi	64
3.2.2. Dokuların histolojik takibi ve hazırlanması	65
3.2.3. Stereolojik çalışma	67
3.2.4. Korpus luteumların sayımı:.....	74
3.2.5. Ovaryumun toplam hacminin hesaplaması.....	75
3.2.6. Büzüşme oranı hesaplanması.....	76
3.2.7. ELISA çalışma prosedürü.....	77
3.2.8. Geçirgenli elektron mikroskobun çalışma prosedürü.....	79
4. BULGULAR.....	83
4.1. Ovaryum Hacim Bulguları.....	83
4.2. Sıçanlarda 4 ve 10 Haftalık Ovaryum Follikül Sayım Bulguları.....	90
4.3. Korpus Luteum Bulguları.....	90
4.4. ELISA Bulguları.....	91
4.5. İstatistiksel Analiz.....	97
4.6. Histopatolojik ve Mikroskobik Bulgular	112
4.7. TEM Bulguları.....	121
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	124
ÖZET.....	135
SUMMARY.....	136
KAYNAKLAR.....	137
ÖZGEÇMİŞ.....	149
EKLER.....	150
EK 1. Tez Orjinallik Rapaoru.....	151
EK.2. Etik Kurul Raporu.....	152

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMH	: Anti-Müller hormon
Bcl-2	: Kemik Morfogenik Proteini
CE	: Hata katsayısı
COX	: Siklooksijenaz
COX-1	: Siklooksijenaz-1
COX-2	: Siklooksijenaz-2
CV	: Değişim katsayısı
DS	: Diklofenak sodyum
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EM	: Elektron mikroskobu
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
GDF-9	: Büyüme ve gelişme faktörü 9
GnHR	: Gonodotropin Releasing Hormon
gr	: Gram
HBV	: Hepatit B virüsü
HCV	: Hepatit C virüsü
hCG	: Human Caryonik gonodotropin
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
IL-1	: Interleukin -1
IVF	: In Vitro Fertilizasyon
Kg	: Kilogram
KL	: Korpus luteum
LH	: Lütein hormon
LO	: Lipooksijenaz
mg	: Milligram
ml	: Millilitre
μ	: Mikron
ng	: Nanogram
NF-κB	: Nükler faktör kappa B
NSAII	: Non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlar
NS	: Nigella sativa

OMI	: Oosit Maturasyon İnhibitörü
p53	: Tümör protein 53
PCOS	: Polikistikover sendromu
PG	: Prostaglandin
PGD2	: Prostaglandin-D2
PGE	: Prostaglandin E
PGE2	: Prostaglandin-E2
PGI2	: Prostatiklin
SF	: Serum fizyolojik
SRÖ	: Sistemik Rastgele Örneklem
SUDS	: Single use diagnostic system
TEM	: Geçirimli Elektrom Mikroskopu
TGFb	: Transforming growth faktör b
TDF	: Testis belirleme faktörü
TNF- α	: Tümör nekroz faktör
TQ	: Timokinon

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1.** Beş haftalık embriyoda, mezonefrozun mediyalinde yerleşmiş, sölom epitelinde ve altındaki mezenşimin çoğalmasıyla meydana gelen gonadal primordiyum görülmektedir..... 7
- Şekil 2.** A, Beş haftalık embriyoda, primordiyal germ hücrelerinin vitellüs kesesinden, gonodal kabartıya göçü izlenmektedir. B kaudalde gonadal kabartıların lokalizasyon ve kapsamaları görülmüyor. C subrenal bezler, gonadal primordiyum ve primordiyal germ hücrelerinin gonadlara göçleri izlenmektedir. D, gonadal kordonlar görülmektedir. E, farklılaşmamış gonadlar paramezonefrik kanalların yanında yer almaktadır 8
- Şekil 3.** Testisin ve overin embriyonik gelişimi..... 10
- Şekil 4.** Kadın iç genital organları şematik çizimi. Uterus duvarının, tuba uterinalar ve vajina, Ovaryumun uterusu bağlanmasına ve fallop tüpü ile ilişkisine şematize edilmektedir 11
- Şekil 5.** (a) Ovaryumun histolojik yapısı, (b) primordiyal follikül (c) primer follikül (d) sekonder ya da antral follikül (e) graaf veya preovulatuvar follikül (f) korpus luteum, (g) korpus albicans 14
- Şekil 6.** a. Primordiyal follikülün şematik çizimi, b. Primordiyal follikülün bu fotomikrografı görülmektedir 16
- Şekil 7.** a. Primer (Unilaminer) follikül şematik çizimi. b. Primer follikülün fotomikrografisi. x640..... 17
- Şekil 8.** Preantral (Geç Primer) follikülün bu şematik çizimi, çok tabakalı granüloza hücreleri, zona pellusida, dış tabakada bulunan hücrelerin bazal lamina, teka hücreleri, balbiani cisimciği, kortikal göstermektedir 18
- Şekil 9.** Sekonder veya antral folikül. Sekonder follikülün, granüloza hücreleri, sıvı dolu antrumunu gösteren şematik çizim. Burada Call-Exner cisimcikleri bazal laminanın, teka internanın ve teka eksternanın göstermektedir 20
- Şekil 10.** Graaf follikül kumulus ooforus, oositi, geniş antrum (A), korona

	radiyata b. Matür bir sekonder follikülün fotomikrografı görülmeğtedir x45.....	21
Şekil 11.	Postmenopozal ovaryum	25
Şekil 12.	Oogenez ve mayoz bölünmenin aşamaları	27
Şekil 13.	Hipofiz, ovaryum, kanda hormonal seviye ve uterus arasındaki ilişki.	29
Şekil 14.	Ovaryum follikülleri ve salgıları	34
Şekil 15.	Hücre membranında bulunan araşidonik asitten çeşitli enzimlerle oluşan prostanoidler	39
Şekil 16.	Diklofenak sodyum kimyasal yapısı.....	41
Şekil 17.	Timokinonun kimyasal yapısı.....	42
Şekil 18.	<i>Nigelle sativa</i> bitkisi.....	43
Şekil 19.	<i>Nigelle sativa</i> tohumu.....	43
Şekil 20.	En küçük tanecik çapın göre kesit kalınlığını belirlenmesi.....	49
Şekil 21.	Disektör yönteminin esası olan disektör sondasının şematik gösterimi.	50
Şekil 22.	Tarafsız sayım çerçevesi. Devamlı çizgiler yasak kenarları, kesikli çizgiler ise serbest kenarları göstermektedir. Çerçevenin alanı (A), iki kenarının çarpımıdır (axb)	51
Şekil 23.	Kesitlerden biri (A) örnek, diğeri (B) gözlem kesitidir. Örnek kesitte bulunup, gözlem kesitinde bulunmayan parçacık izdüşümleri, disektör parçacık (Q) olarak sayılır. Temel olarak, ince ve kesikli çizgiler “dâhil” kenarlar, kalın ve devamlı çizgiler de “hariç” veya “yasak” kenarlardır. Yani kesikli çizgilere rastlayan tanecikler sayılırken, devamlı çizgilere isabet eden tanecikler sayım dışı bırakılır. İşaretlenmiş (*) nesneler sayılırken diğeri sayılmaz.....	52
Şekil 24.	Noktalı alan ölçüm cetveli.....	54
Şekil 25.	Geçirgenli elektron mikroskobu ile elde edilen hücrenin çekirdek görüntüsü. H heterokromatini Ç çekirdekçiği göstermektedir. x25000.	62
Şekil 26.	Sıçan kalbinden insülin iğnesiyle kan almak.....	65
Şekil 27.	Perfüzyon öncesi ve sonrası.....	65
Şekil 28.	Sıçandan ovaryum dokusunun çıkarılması ve ebatlarının ölçülmesi....	66
Şekil 29.	ELISA prosedüre göre standart kuyucukların dilüsyon şeması.....	77
Şekil 30.	ELISA sonuçları için standart eğri oluşturulması.....	78

Şekil 31.	A ve B’de Kontrol grubu 10 haftalık sıçan ovaryumunda maksimum korpus luteum sayısı ve medulla ve korteks görülmektedir. x1. Bar:500 µm.....	113
Şekil 32.	A ve B’de DS 10 haftalık sıçam ovaryumunda maksimum korpus luteum sayısında azalma kortekste incelendiğini göstermektedir. x1. Bar:500 µm.....	114
Şekil 33.	A ve B’de DS 10 haftalık sıçan ovaryumun medulasında vasküler yapıda minimal ektazi, hafif orta derecede konjesyon ile birlikte lenfaktasizi mevcut. Medulla kalınlaşması artmış, korteks incelmıştır ve korpus luteum x1. Bar:500 µm.....	115
Şekil 34.	A, B, C’de DS ve TQ 10 haftalık sıçan ovaryumunda spiral arterlelerde ve medullada orta şiddette ektazi ve ödem daha belirgin. Ayrıca medulla artmış, korteks azalmış. Bununla beraber luteinize granüloza hücrelerinde artış mevcut. Fakat maksimum korpus luteum sayısında kontrole göre belirgin bir azalma yok. x1. Bar:500 µm.....	116
Şekil 35.	A, B’de TQ grubunda 10 haftalık sıçan ovaryumun medulasında vasküler yapıda minimal ektazi, orta derecede konjesyon ile birlikte lenfaktasizi mevcut. Medulla belirgin şekilde kalınlaşması artmış, korteks incelmıştır ve maksimum korpus luteum sayısı azalmıştır. x1. Bar:500 µm.....	117
Şekil 36.	A ve B 4 haftalık kontrol grubu. P preantral follikülü ve EA erken antral follikülü göstermektedir. x1 A x1. Bar:500 µm, B x1. Bar:1000 µm	118
Şekil 37.	DS grubu 4 haftalık ovaryum. P preantral follikülü ve EA erken antral follikülü göstermektedir. x1. Bar:1000 µm.....	119
Şekil 38.	DS-TQ gruplarına ait 4 haftalık ovaryumların kontrol grubuna göre preantral ve erken antral follikül sayısında anlamlı artış görüldü. P preantral follikülü ve EA erken antral follikülü göstermektedir. x1. Bar:1000 µm.x1.....	120
Şekil 39.	TQ grubu 4 haftalık kontrol grubuna göre preantral ve erken antral sayısında ile toplam (P=0.024) ve korteks hacminde anlamlı artma	

	gözlendi.....	121
Şekil 40.	Kontrol grubu 4 haftalık Geçirgenli Elektron Mikroskobu görüntüsü...	122
Şekil 41.	Serum Fizyolojik grubu 4 haftalık Geçirgenli Elektron Mikroskobu görüntüsü.....	122
Şekil 42.	DS grubu 4 haftalık ovaryum oositi TEM görüntüsü.....	123
Şekil 43.	TQ grubu 4 haftalık ovaryum oositi TEM görüntüsü.....	123

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1.	AMH için optik dansite ve konsantrasyon karşılığı.....	78
Tablo 2.	Kontrol grubu 10 haftalık sıçan ovaryumunda hacim ve yüzdeleri.....	85
Tablo 3.	SF grubu 10 haftalık sıçan ovaryumunda hacim ve yüzdeleri	85
Tablo 4.	DS grubu 10 haftalık sıçan ovaryumunda hacim ve yüzdeleri.....	86
Tablo 5.	DS-TQ grubu 10 haftalık sıçan ovaryumunda hacim ve yüzdeleri.....	86
Tablo 6.	TQ grubu 10 haftalık sıçan ovaryumunda hacim ve yüzdeleri.....	87
Tablo 7.	Kontrol grubu 4 haftalık sıçan ovaryumunda hacim ve yüzdeleri.....	87
Tablo 8.	SF grubu 4 haftalık sıçan ovaryumunda hacim ve yüzdeleri.....	88
Tablo 9.	DS grubu 4 haftalık sıçan ovaryumunda hacim ve yüzdeleri.....	88
Tablo 10.	DS-TQ grubu 4 haftalık sıçan ovaryumunda hacim ve yüzdeleri.....	89
Tablo 11.	TQ grubu 4 haftalık sıçan ovaryumunda hacim ve yüzdeleri.....	89
Tablo 12.	Kontrol grubuna ait 10 haftalık sıçan ovaryumlarında follikül değerleri, KL sayısı ve serum AMH'nin ng/ml bulguları.....	92
Tablo 13.	Serum Fizyolojik grubuna ait 10 haftalık sıçan ovaryumlarında follikül değerleri, KL sayısı ve serum AMH'nin ng/ml bulguları.....	92
Tablo 14.	DS ait grubuna 10 haftalık sıçan ovaryumlarında follikül değerleri, KL sayısı ve serum AMH'nin ng/ml bulguları.....	93
Tablo 15.	DS-TQ grubuna ait 10 haftalık sıçan ovaryumlarında follikül değerleri, KL sayısı ve serum AMH'nin ng/ml bulguları.....	93
Tablo 16.	TQ grubuna grubuna ait 10 haftalık sıçan ovaryumlarında follikül değerleri, KL sayısı ve serum AMH'nin ng/ml bulguları.....	94
Tablo 17.	Kontrol grubuna ait 4 haftalık sıçan ovaryumlarında follikül değerleri, KL sayısı ve serum AMH'nin ng/ml bulguları.....	94
Tablo 18.	SF grubuna ait 4 haftalık sıçan ovaryumlarında follikül değerleri, KL sayısı ve serum AMH'nin ng/ml bulguları.....	95
Tablo 19.	DS grubuna ait 4 haftalık sıçan ovaryumlarında follikül değerleri, KL sayısı ve serum AMH'nin ng/ml bulguları.....	95
Tablo 20.	DS-TQ grubuna ait 4 haftalık sıçan ovaryumlarında follikül değerleri, KL sayısı ve serum AMH'nin ng/ml bulguları.....	96
Tablo 21.	TQ grubuna ait 4 haftalık sıçan ovaryumlarında follikül değerleri, KL sayısı ve serum AMH'nin ng/ml bulguları.....	96

Tablo 22.	Sıçanlarda 10 haftalık ovaryum hacim ölçümlerinin istatistiksel sonuçları.....	97
Tablo 23.	Sıçanlarda 4 haftalık ovaryum hacim ölçümlerinin istatistiksel sonuçları.....	98
Tablo 24.	Sıçanlarda 10 haftalık ovaryum follikülleri ve korpus luteum sayısı ile serum AMH ng/ml değeri.....	99
Tablo 25.	Sıçanlarda 10 haftalık ovaryum follikülleri ve korpus luteum sayısı ile serum AMH ng/ml değeri.....	100
Tablo 26.	Sıçan ovaryumlarının toplam hacim ölçümleri ve standart sapmaları (10 haftalık).....	101
Tablo 27.	Sıçan ovaryumlarının korteks hacim ölçümleri ve standart sapmaları (10 haftalık).....	101
Tablo 28.	Sıçan ovaryumlarının medulla hacim ölçümleri ve standart sapmaları (10 haftalık).....	102
Tablo 29.	Sıçan ovaryumlarının medulla hacminin /korteks hacimine yüzde oranı ve standart sapmaları (10 haftalık).....	102
Tablo 30	Sıçan ovaryumlarının medulla hacminin /toplam hacimine yüzde oranı ve standart sapmaları (10 haftalık).....	103
Tablo 31.	Sıçan ovaryumlarının toplam hacim ölçümleri ve standart sapmaları (4 haftalık).....	103
Tablo 32.	Sıçan ovaryumlarının korteks hacim ölçümleri ve standart sapmaları (4 haftalık).....	104
Tablo 33.	Sıçan ovaryumlarının medulla hacim ölçümleri ve standart sapmaları (4 haftalık).....	104
Tablo 34.	Sıçan ovaryumlarının medulla hacminin /korteks hacimine yüzde oranı ve standart sapmaları (4 haftalık).....	105
Tablo 35	Sıçan ovaryumlarının medulla hacminin /toplam hacimine yüzde oranı ve standart sapmaları (4 haftalık).....	105
Tablo 36.	Sıçan ovaryumların primordiyal follikül sayısı ve standart sapmaları (10 haftalık).....	106
Tablo 37.	Sıçan ovaryumların primer follikül sayısı ve standart sapmaları (10 haftalık).....	106

Tablo 38.	Sıçan ovaryumların preantral follikül sayısı ve standart sapmaları (10 haftalık).....	107
Tablo 39.	Sıçan ovaryumların erken antral follikül sayısı ve standart sapmaları (10 haftalık).....	107
Tablo 40.	Sıçan ovaryumların AMH'nın salgılandığı toplam follikül sayısı ve standart sapmaları (10 haftalık).....	108
Tablo 41.	Sıçan ovaryumların serum AMH değeri ve standart sapmaları (10 haftalık).....	108
Tablo 42.	Sıçan ovaryumlarında korpus luteum sayısı ve standart sapmaları (10 haftalık).....	109
Tablo 43.	Sıçan ovaryumlarında primordiyal follikül sayısı ve standart sapmaları (4 haftalık).....	109
Tablo 44.	Sıçan ovaryumlarında primer follikül sayısı ve standart sapmaları (4 haftalık).....	110
Tablo 45.	Sıçan ovaryumlarında preantral follikül sayısı ve standart sapmaları (4 haftalık).....	110
Tablo 46.	Sıçan ovaryumlarında erken antral follikül sayısı ve standart sapmaları (4 haftalık).....	111
Tablo 47.	Sıçan ovaryumlarında AMH'nın salgılandığı toplam follikül sayısı ve standart sapmaları (4 haftalık).....	111
Tablo 48.	Sıçan ovaryumlarında serum AMH değeri ve standart sapmalar (4 haftalık).....	112

1. GİRİŞ

Non-steroid anti-inflamatuar ilaçlar (NSAII'ler) ateş, ağrı ve inflamasyonu tedavi etmek için reçete edilen en yaygın ilaçlardır (Ostensen ve Skomsvoll, 2004). Birçok romatizmal hastalık doğurganlık çağından kadınları aynı zamanda gebeleri olumsuz etkilemektedir. Romatizmal hastalıkların sık görülmesinden dolayı takibi ve tedavisi çok önemlidir. Gebelikte bu ilaçların teratojenite potansiyeli, fetal organlara, fetal büyümeye, yenidoğana etkisi ve çocuktaki uzun vadeli etkileri göz önüne alınmalıdır (Antonucci ve ark., 2012). Gebelik sırasında romatoid artrit gibi iltihaplı artritli bazı hastalıklar (gebelik sürecini etkileyebildiği) gibi gebenin ve fetüsün sağlığını riske sokabilirler. Bazen gebeliğin de romatizmal hastalıkları alevlendirdiği bilinmektedir. Gebelik sırasında romatizmal hastalıklar fetus kaybına, intrauterin gelişme geriliğine ve prematüre doğuma neden olabilir. Gebelik sırasında, hastalık aktivitesini kontrol etmek için kullanılan anti-romatizmal ilaçlar hem gebeye hem de taşıdığı fetüste komplikasyona yol açabilmektedir (Borman ve Özdemir, 2015).

NSAII'lerin hepsi az ya da çok güçlü siklooksijenaz inhibitörleridir. Siklooksijenaz-1 (COX-1) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) enzimlerini inhibe ederek prostaglandin (PG) sentezini baskırlar. NSAII'lerin COX-1 ve COX-2'ye etkileri farklılık gösterebilir. Bununla beraber DS güçlü siklooksijenaz inhibitörü olduğu gibi lipooksijenaz (LO) enzimini yolunu engelleyerek etkiler (Özalp Dural, 2002).

Gebelikte NSAII'lerin kullanım nedenleri kronik inflamatuvar bağırsak veya kronik romatizmal hastalıkları tedavi etmektir (Ostensen ve Skomsvoll, 2004). Doğurganlık çağında kadınlara NSAII primer dismenore ve intrauterin kontraseptif cihazla uyarılan dismenore ve menorajide tercih edilen tedavi yöntemidir. NSAII, menoraji, erken doğum eylemi ve polihidramniosların etkili bir şekilde kontrol altına alınması ve preeklampsinin önlenmesi için kullanılabilir, ancak klinik araştırmalara da ihtiyaç vardır (Dawood, 1993). Bulgular COX inhibitörlerinin gebeliğin son üç ayında uygulandığında hem insanlarda hem de hayvanlarda gebeliği uzattığını göstermektedir (Ostensen ve Skomsvoll, 2004).

Hamile kadınlara verilen NSAII'ler plasentayı geçer ve ilacın türüne, tedavinin doz ve süresine ve gebelik süresine embriyo-fetal ve neonatal üzerine advers etkilere

neden olabilir (Antonucci ve ark., 2012). Plösentel geçiş gebelik yaşına bağlı değil her durumda geçişi devam eder. İlaçların yarılanma ömrü fetal dolaşımda (14.7 saat) meternal dolaşımda (2.2 saat) daha uzundur (Vermillion ve Newman, 1999). Bu da fetüsün ilacın olumsuz etkilerine daha fazla maruz kalma anlamına gelmektedir. Bu etkiler NSAII'lerin etki mekanizmalarından ve gebelik sırasında ortaya çıkan ilaç farmakokinetiğindeki fizyolojik değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Hamilelik sırasında, fizyolojik değişiklikler ilaçların farmakokinetiğini etkileyebilir. Bu değişikliklerin çoğu erken gebelik ve daha çok üçüncü trimesterde belirgindir (Stika ve Frederiksen, 2001).

NSAII'ler doğum öncesi maruz kaldıktan sonra fetal ve neonatalde beyin, böbrek, akciğer, iskelet, gastrointestinal sistem ve kardiyovasküler sisteme advers etkileri bildirilmiştir. NSAII'ler ancak gebelikte annenin yararının potansiyel fetal risklerden ötürü daha düşük etkili dozdan verilmelidir (Antonucci ve ark., 2012). Son on yılda, birçok çalışma doğum öncesi annenin NSAII kullanımı, yeni doğanda konjenital kalp malformasyonlar ile ilişkisi belgelenmiş (Cappon ve ark., 2003). Fetüsta duktus arteriosus erken kapanması ölüme veya pulmoner hipertansiyona yol açabilir (van Overmeire ve Chemtob, 2005). Gebeliğin 35. haftasında maternal DS tedavisini sonra ductus arteriosusun ilişkin prenatal bir olguda, gebeliğin 37. haftasındaki fetal ekokardiyografide, orta triküspit yetersizlik, pulmoner yetmezlik ve ductus arteriosussa tamamen kapanması ile genişleyen sağ ventrikül görüldüğü bildirilmiştir. İndometasinin prenatal duktus daralmasına etkisi iyi bilinmesine rağmen DS gibi yaygın olarak reçete edilen NSAII eşit derecelerde zararlı bir etkiye sahip olabilmektedir ve gebeliğin üçüncü trimestrinde kaçınılmalıdır (Auer ve ark., 2004). Gebeliğin erken dönemlerinde ise NSAII'leri kullanan kadınların, konjenital anomalili, özellikle kardiyak septal defektli ocuk sahibi olma riskinin daha yüksek olabileceğini bildirilmiştir (Ofori ve ark., 2006). Ayrıca insan gebeliğinin ilk trimestrinde DS plasenta transferini araştırmak için yapılan bir çalışmada; gebeliğin 8. ve 12. haftaları arasındaki gebeliğin cerrahi sonlandırılmasına tabi 30 hastaya işlem öncesi iki doz DS sonra ilgili serum örnekleri, amniyotik sıvı, coelomik sıvı ve fetal doku, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile analiz edinilmiştir. DS, maternal venöz örneklerde bulunan konsantrasyonda olduğu gibi, tüm fetal doku örneklerinde de saptanmıştır. DS'un birinci trimesterde insan plasentasını kolayca geçtiği de böylece doğrulandı. NSAII'lerin transplasental geçişi

sonucu COX'un aktivitesinin önlemesinden dolayı fetus üzerindeki olumsuz etkileri olduğu bildirilmiştir (Siu ve ark., 2002). Fetüste ağız palatin bölgenin gelişiminde önemli rol oynayan PG'leri inhibe eden NSAII'lerden özellikle sulindak teratojenik etki göstererek yarık damağa sebep olabilmektedir. İn vivo ve in vitro fare palatal füzyonu üzerine çeşitli steroid anti-inflamatuvar (naproksen, sulindak, indometasin, diklofenak ve mefenamik asit) ilaçların etkilerini belirlendiği bir çalışmada, farklı frekanslara yavrularda yarık damak oluşumuna yol açtığı ve en teratojenik sulindak olduğu belirlenmiştir (Montenegro ve Palomino, 1990).

Yapılan başka bir çalışmada gebeliğin 5. gününde verilen indometamisin blastomerin uterusu implantasyonunu engellediği için düşüklüğe neden olduğu belirtilmektedir (Kennedy, 1977). Embriyo implantasyonu, implante edilebilen bir blastosit ile alıcı rahim arasındaki yakın etkileşimi içermekte ve implantasyon dönemi olarak bilinen sınırlı bir süre içinde gerçekleşir (Zhang ve ark., 2013). Desidualizasyonun tıpkı modifiye bir inflamatuvar reaksiyon olarak düşünülebileceğini ileri sürülmektedir. DS tedavisi uygulanmayan kontrollerde % 72'lik implantasyon hızı olmasına rağmen in vitro DS tedavisinden sonra sadece % 35-41'lik bir implantasyon hızı belirlenmiştir. DS verilen taşıyıcı annelerde, embriyoların yalnızca % 7'si normal, % 34'ü ise büyüme geriliği görülmüştür. Anneye uygulanan DS sürmekte olan implantasyon ve plasentasyon sürecini engellemektedir (Carp ve ark., 1988).

DS üreme çağındaki kadınlarda da yaygın olarak kullanılan NSAII ilaçtır. On gün süreyle, günde bir kez 100 mg DS doğurgan çağındaki kadınlarda ovulasyonda önemli bir inhibisyona neden olduğu gözlenmiştir (Sherif ve ark., 2014). Başka bir çalışmada ise DS alanların % 94'ü (Voltaren, Zipsor, Pen NSAII). Ovaryumda COX-2 aktivitesinin inhibisyonu ve ardından, PG sentezinin inhibisyonu ile oosit salınımını önlenmekte, follikül rüptürü görülmekte, PGE2 ile düzenlenen kumulüs genişlemesinin önlendiği, oositin granüloza hücrelerine yakalandığı ve böylece ovulasyonun başarısız olduğu bildirilmektedir (Duffy ve Stouffer, 2002). Ovulasyon, implantasyon, desidualizasyon, fertilizasyon ve doğum gibi birçok üreme işlemi PG ligand-reseptör etkileşimlerine bağlıdır (Matsumoto ve ark., 2001). NSAII'lerin kullanımı, normal farelerde infertiliteye neden olabilmektedir. Çünkü COX-2 ve COX-1 farelerde, zayıf ovulasyona (oosit sayıları açısından), düşük dölleme oranlarına, implantasyonun

başarısızlığına ve yetersiz desidualizasyona sebep olmaktadır (Lim ve ark., 1997). NSAII'leri kullanımı ile ilgili şimdiye kadar yapılan çalışmalarda birçok memeli türlerinin maymunlarda (Duffy ve Stouffer, 2002), sıçanlarda (Gaytan ve ark., 2002), farelerde (Downs ve Longo, 1982), ineklerde (De Silva ve Reeves, 1985) ovulasyonu engellediği bildirilmiştir. NSAII'lerle (Diklofenak sodyum, ketoprofen, salisilik asit, mefenamik asit ve asetil salisilik asit) indüklenen anti-ovulasyon aktiviteyi değerlendirmek için medaka cinsi balıklar üzerine yapılan bir çalışmada, DS % 50 oranında inhibisyona neden olan en yüksek anti-ovulasyon aktiviteye sahip olduğu belirlendi (Yokota ve ark., 2016).

Aşırı NSAII kullanımı ile artan spontan sayısı/oranı arasında bir bağlantı olduğu belirlenmiştir. Düşükten önce bir hafta boyunca indometasin, Diklofenak ve naproksen verildikten sonra spontan düşüklerde bir artış gözlemlenmiştir (Daniel ve ark., 2015). Düşük riski prenatal NSAII kullanımı sonucunda %80 oranında arttırmaktadır (Li ve ark., 2003).

Nigella sativa (NS) tohumlarından elde edilen yağının aktif bileşenleri; Timokinon (TQ), ditimokinon, timohidrokuinon ve timol bileşikleridir (Ghosheh ve ark., 1999). TQ sıçan peritoneal lökositlerindeki araşidonik asit metabolizmasının hem COX hem de LO yollarını inhibe etmektedir. Bu yüzden TQ hem COX'un (El Mezayen ve ark., 2006) hem de LO yolunun (Mansour ve Tornhamre, 2004) inhibisyonu sağlamaktadır. Ayrıca TQ'nun polimorfonükleer lökositlerden olan 5-lipooksijenazı ve 5-hidroksieikozatetraenoik asit üretimini inhibe ettiği ve böylece TQ'nun inflamatuvar hastalıkların iyileştirilmesinde etkili olabileceği bildirilmektedir (El-Dakhakhny ve ark., 2002). Pankreas duktal adenokarsinoma hücrelerinde TQ'nun doza ve zamana bağlı olarak, anti-inflamatuvar ve proapoptotik etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Chehl ve ark., 2009). Benzer çalışmada TQ'nun solunum yollarının inflamasyonunu zayıflatıldığını böylece COX-2 protein ekspresyonunun ve prostaglandin-D2 (PGD2) üretiminin inhibisyonuyla eşzamanlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca TQ, COX-1 ekspresyonu ve prostaglandin-E2 (PGE2) üretimi üzerinde hafif bir inhibitör etki yaptığı da belirtilmiştir (El Mezayen ve ark., 2006). NS'nın etanolik özütü sıçanlara intraperitoneal verildiğinde, % 0.6 asetik asit ile başlatılan nosiseptif üzerine DS ile üretilen analjezik etkinlikten daha az olmasına rağmen, anlamlı ($p < 0.05$) analjezik etkiye sahip olduğu

belirlenmiştir (Bashir ve Qureshi, 2009). NS'nın esansiyel yağı, hem sistemik hem de lokal uygulanmaları, antiinflamatuvar etki göstermektedir (Hajhashemi ve ark., 2010). Bu veriler ışığında TQ anti-inflamatuvar etkisi DS'uma yakın olduğu fikrini vermektedir.

NS yağının ovaryumların iskemi ve reperfüzyondan kaynaklanan doku hasarını, tersine çevrilmiştir (Bayır ve ark., 2012). Başka bir çalışmada ise NS, ovaryum, rahim ve vajina ağırlığında belirgin bir düşüşe neden olduğu bildirilmiştir. Ovaryum dokunun protein ve glikojen seviyesinde düşme, üreme dokularında ise kolesterol düzeyinde belirgin artış gözlenmiştir. Östrojen döngüsünün sıçanlarda diastöz fazı uzamış ve böylece Ovaryum follikül dejeneratif değişiklikler göstermiştir. Bu çalışmalar yanında hematolojik parametreler değişmediği, fakat, dişi sıçanlarda NS kullanımı, genel fizyolojiyi değiştirmeden antiöstrojenik bir yapıya sahip olduğunu göstermiştir (Yadav ve Agarwal, 2011).

NS yağı hem erkek hem de dişi üreme hormonların miktarını arttırdığı bildirilmiştir. NS yağı erkekler için lüteinleştirici, FSH ve testosteron, kadınlarda LH, FSH, östrojen ve progesteron düzeylerinde belirgin artışlar kaydedildiği bildirilmiştir. Ayrıca NS yağı gebe sıçanlara verildiğinde, doğan sıçanların büyüklüğünde ve ağırlığında belirgin bir artış olduğu, hadım edilen erkek sıçanlara verildiğinde ise serum testosteron konsantrasyonunda ve aksesuar bez ağırlığında belirgin artışlar olduğu bildirilmiştir (Farooq ve Hayfaa, 2011). NS menopozda karşılaşılan kilo alımı, lipid profili ve kan glikozunun yanı sıra hormonal seviyenin değişiminde, menopoz sırasında metabolik sendrom hastalıklarında önemli bir rol oynamaktadır (Parhizkar ve ark., 2011). NS tedavisinden sonra, menopoz semptomlarının prevalans ve şiddetinde belirgin bir derecede düşüş olduğu tespit edilmiştir (Latiff ve ark., 2014). NS tohumlarının uçucu yağı sıçan ve Kobay uterin düz kasının spontan kasılmasını ve aynı zamanda oksitosin uyarımı ile indüklenen kontraksiyonları inhibe ettiği belirlenmiştir (Aqel ve Shaheen, 1996).

NS'nın erkek üreme sistemi ve dolayısıyla fertiliteye etkilerini araştıran bir çalışmada, üreme organlarının ağırlığında belirgin bir artış olduğu, kauda epididimislerde ve testis kanallarında sperm hareketliliğinde ve sayısında anlamlı bir artış meydana geldiği görülmüştür. Spermatogenesis ile primer ve sekonder spermatositlerde, epididimislerde spermatozoa sayısı artmış, vas deferens lümeni

spermle dolduğu görülmüştür. Seminal vezikül ve prostatın ekstrasyon faaliyetlerinde, seminifer tüpünde ise spermatogenezis aktivitesinde anlamlı artış gözlenmiş, testiküler hücre popülasyonu olan spermatozoit ve spermatid sayısının anlamlı arttığı da bildirilmiştir (Mukhallad ve ark., 2009). NS'nın alkollü özütü yüksek dozlarda erkek sıçanlarda, doğurganlık potansiyelini, LH ve testosteron konsantrasyonunu artırabileceğini göstermiştir. NS L. tohum yağının anormal sperm morfolojisi % 30'dan düşük veya sperm sayısı 20×10^6 / ml'nin altında veya A ve B tipi motilite sırasıyla % 25 ve % 50'nin altında İranlı infertil erkeklerde etkileri araştırılmış, günlük 5 ml N. sativa yağının iki ay süreyle alınmasının, infertil erkeklerde anormal sperma kalitesini olumsuz etkileri olmadan iyileştirdiği sonucuna varılmıştır (Parandin ve ark., 2012).

Özetle DS ve TQ benzer şekilde araşidonik asit metabolizmasının hem COX hem de LO yollarını inhibe ederek, COX-2 ve COX-1'nin inhibisyonu sağladığı izlenimini vermektedir. Ayrıca DS ovaryumunda ovulasyon bozukluklarına ve ovulasyon reversibl engellediği, implantasyonu kısmen önlediği ve kısmen abortusa sebep olduğu belirlenmiş ve böylece fertilitiyi olumsuz etkilediği bildirilmiştir. DS ve TQ gebelikte uygulandığında postnatal juvenil (4 haftalık) ve genç (10 haftalık) dönemlerinde dişi ovaryum rezervine (primordiyal follikül sayısına), primer, preantral ve erken antral follikül havuzuna etkileri belirlenmemiştir. Özellikle ovaryumda preantral ve erken antral folliküllerde sentezlenen anti-müller hormona (AMH), ovulasyona etkisine dair yayına rastlanmadı. Ayrıca serum AMH değeri ovaryum follikülü havuzunun boyutu ve ovaryum disfonksiyonu için ideal bir belirteç olduğu bilinmektedir. AMH'de dalgalanmalar büyümekte olan follikül sayısındaki bir dalgalanmaya sebep olup olmadığı belirlenmemiştir. Bu çalışmada stereolojik yöntemler ile primordiyal follikül havuzu, büyümekte olan (primer, preantral ve erken antral) follikül sayısı özellikle tarafsız sayım yöntemi olan fiziksel disektör metotla belirlenerek ve ELISA yöntemi ile serum AMH değerleri belirlenecektir. Serum AMH değerinde bir dalgalanma varsa preantral faz ve erken antral follikül sayısındaki etkisinin değişiminden kaynaklanacağı düşünüldü.

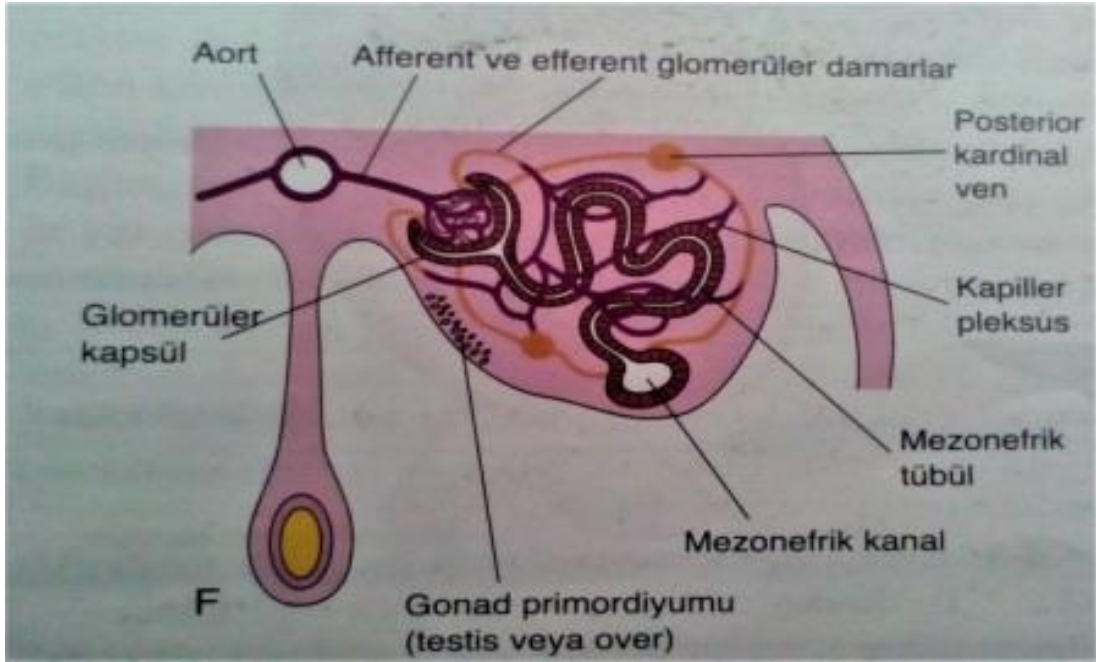
Özet olarak bu çalışmada gebelikte uygulanan DS ve TQ'un postnatal 4 ve 10 haftalık sıçan ovaryum preantral (primordiyal, primer ve preantral) follikül sayısına etkilerinin stereolojik yöntemle araştırılması planlandı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryum

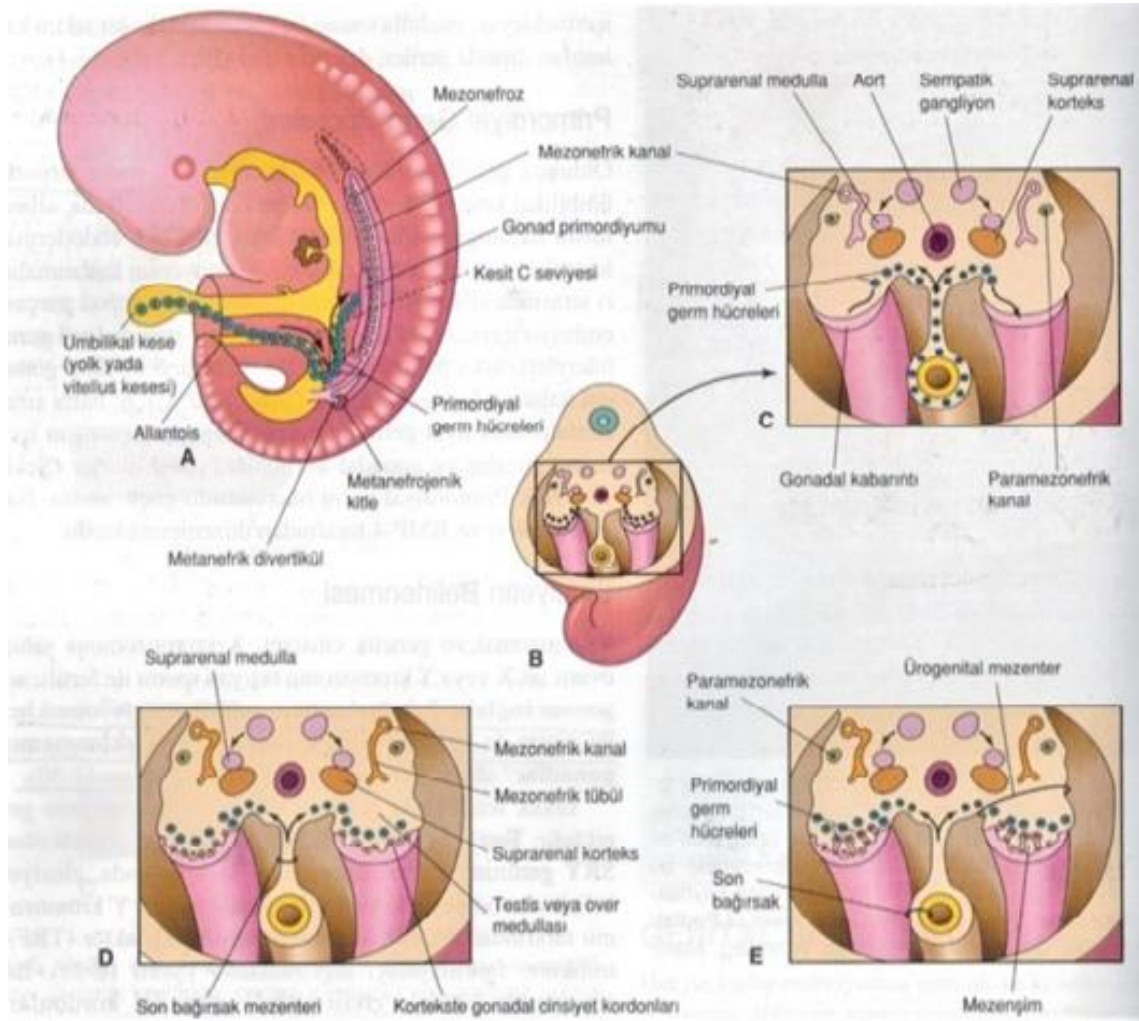
2.1.1. Ovaryum embriyolojisi

Ovaryum badem şeklinde bir çift üreme bezidir, her iki tarafta lateral pelvik duvarına yakın yerleşmiştir. X kromozomları ovaryum gelişimi için genleri taşırken ovaryan organogenezde otozomal bir geninde rol oynaktadır. Gonad gelişiminin ilk safhaları, beşinci haftada ortaya çıkar. Mezonefrozun mediyalinde, sölom epitelinde bir kalınlaşma meydana gelir. Bu epitelin (sölom epitelinde) ve altındaki mezenşimal hücrelerin çoğalmasıyla, mezonefrozun mediyalinde bir gonadal (genital) kabarık oluşur. Parmak şeklindeki epitel kordonları (birincil cinsiyet kordonları), alttaki mezenşimin içine doğru kısa sürede büyür (Moore ve Persaud, 2009). Böylece gonadal primordiyum oluşur (Şekil 1).



Şekil 1. Beş haftalık bir emriyoda, mezonefrozun mediyalinde yerleşmiş, sölom epitelinde ve altındaki mezenşimin çoğalmasıyla meydana gelen gonadal primordiyum görülmektedir (Moore ve Persaud, 2009).

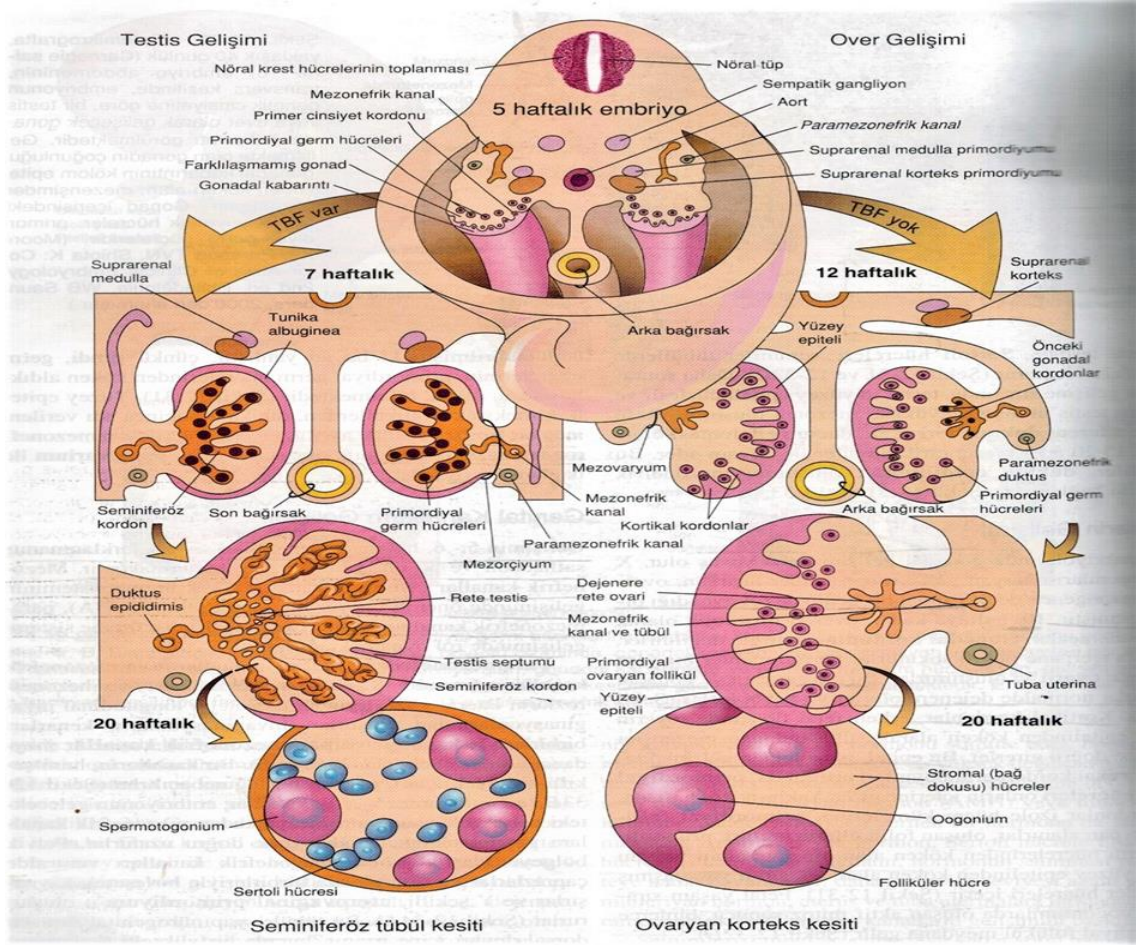
Oldukça geniş, sferik primordiyal germ hücreleri dördüncü haftanın başında vitellüs kesesinden, allantoisin başlangıç yerine yakın endodermal hücreler arasında ortaya çıkar. Embriyonun katlanmaları sırasında, vitellüs kesesinin dorsal parçası embriyo içerisine dâhil olur. Bu arada primordiyal germ hücreleri arka barsağın dorsal mezenteri boyunca gonadal kabartılara göç eder. 6. haftasında Primordial germ hücreleri altındaki mezenşim içerisine girerler ve kordonlara dâhil olur. Primordial germ hücrelerinin göçü, stella, frangilis genleri ve kemik morfogenetik proteinler BMP-4 tarafından düzenlenir (Moore ve Persaud, 2009) (Şekil 2).



Şekil 2. A, Beş haftalık embriyoda, primordiyal germ hücrelerinin vitellüs kesesinden, gonadal kabartıya göçü izlenmektedir. B kaudalde gonadal kabartıların lokalizasyonu ve kapsamaları görülmüyor. C subrenal bezler, gonadal promordiyum ve primordiyal germ hücrelerinin gonadlara göçleri izlenmektedir. D, gonadal kordonlar görülmektedir. E,

farklılaşmamış gonadlar paramезonefrik kanalların yanında yer almaktadır (Moore ve Persaud, 2009).

Gelişimin 7. haftasına kadar, dış genital organlar her iki cinsde de birbirine benzer ve bu safha farklılaşmamış gonad olarak adlandırılır. Eğer embriyo XY cinsiyet kromozomuna sahipse, Y kromozomu kısa kolu üzerinde bulunan bir grup gen yanısıra belirlenen SRY geni tarafından sentezlenen Testis Belirleme Faktörü primordiyal gonadın testise farklılaşmasını sağlar. Böylece medulla testise farklılaşır ve korteks, birtakım kalıntılar dışında geriler. Eğer embriyo XX cinsiyet kromozomuna sahipse ve TDF yokluğunda, farklılaşmamış gonadın korteksi over yönünde değişim gösterir ve medulla geriler. Over dışta korteks ve içte de medulladan oluşacak şekilde farklılaşır. Embriyonun katlanmaları sırasında vitellüs kesesinin dorsal parçası embriyonun içine dâhil olur. Primordiyal germ hücreleri gonadlara ulaştınca, oogonyumlara dönüşürler ve mitozla çoğalırlar. 20. haftanın sonlarına kadar, mitozla bölünmeye devam ederler. Primordiyal germ hücreleri intra uterin yaşamın 7. ayından başlayarak doğuma kadar I. mayoz bölünmeye girer ve puberteye kadar birinci mayozun profaz evresinde (Moore ve Persaud, 2009). Kroosing- over tamamlandıktan sonra (Kierszenbaum, 2006) bu evrede puberteye kadar bekler (Şekil 3). Bu arada uterus içi yaşamın beşinci ayı civarında mitoz o kadar yoğundur ki 7 milyonun üzerinde oogonyum oluşur. Beşinci aydan sonra mitoz yavaşlar ve doğumdan sonra yeni oogonium oluşmaz (Köylü, 2014). Over gelişimi sırasında dişilerde kortikal kordonlar, erken fetal dönemde, overin yüzey epitelinden köken alarak, altta bulunan mezenşim içerisine doğru girerler. Kortikal kordonlar boyutları arttığında, primordiyal germ hücreleri onların içlerine girer. Yaklaşık 16. haftada bu kordonlar izole hücre kümelerine (primordiyal folliküller) dönüşürler. Primordiyal folliküllerin her biri primordiyal germ hücrelerden köken alan bir oogonium (primer oosit) ve onu saran, yüzey epitelinden köken alan tek sıralı hücreleri içerir (Moore ve Persaud, 2009).



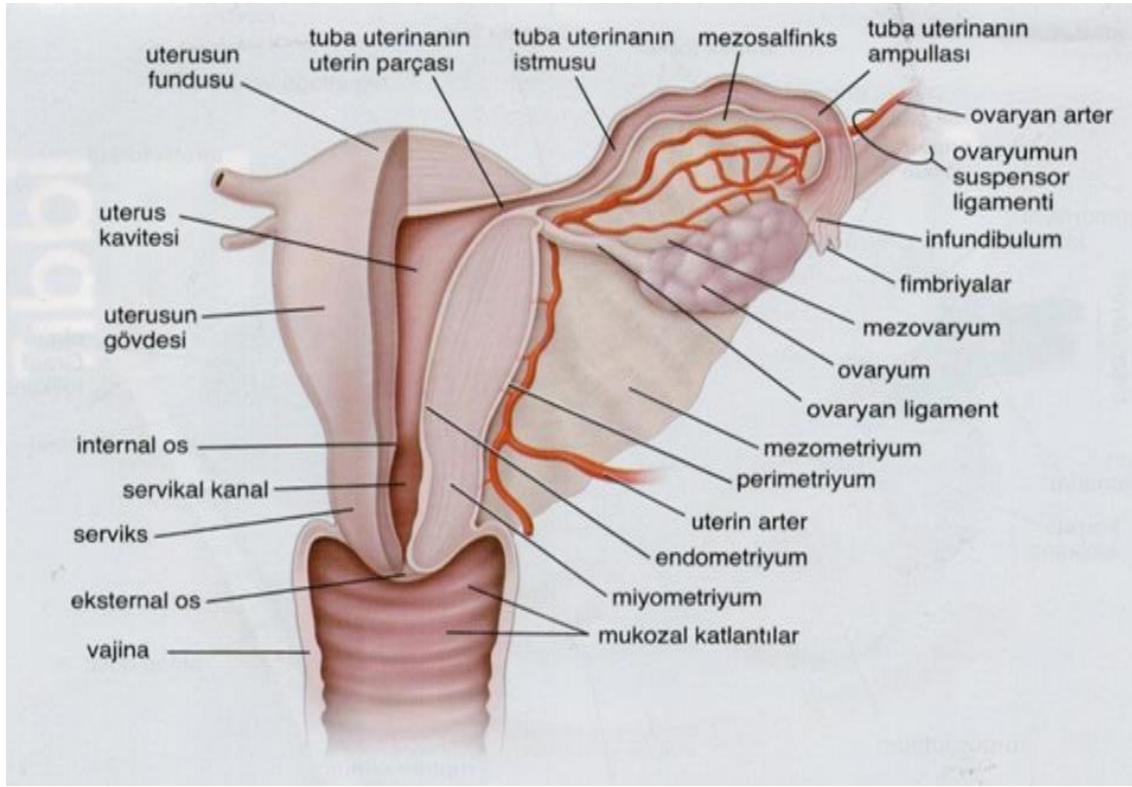
Şekil 3. Testisin ve overin embriyonik gelişimi (Moore ve Persaud, 2009).

Puberteye kadar primordiyal folliküller içine yerleşen primer oositler I. mayotik bölünmelerini tamamlamazlar. Primer oositler 46 kromozom taşır. Primer oositleri çevreleyen hücreler oosit maturasyon inhibitörü (OMI) salgılayarak, oositin mayotik bölünme sürecini durdururlar (Köylü, 2014). Erkeklerde puberte sonrasında primer spermatozonyum yapımı devam ederken dişilerde doğumdan sonra oosit oluşmaz. Puberteye kadar dişi gonad artık preantral folliküller olarak adlandırılan primordiyal ve primer folliküller içeren bir follikül havuzuna sahiptir (Moore ve Persaud, 2009).

2.1.2. Ovaryum anatomisi

Ovaryum, pelvis minörün dış duvarında ve fossa ovarii (Waldeyer'in ovaryan çukuru) denilen çukurun içinde yerleşmiştir. Bu çukur, önden lig. umilcale medialis, oblitere olmuş a. umbilicalis, arkada üreter ve a. iliaka interna ile sınırlanmıştır. Çukurun tabanında, arter ve vena obturatoria ile nöro obturatorius geçer. Üst ucu

mediale bakar. Vena iliaca externaya yakındır. İçinde arter ve vena ovarikanın bulunduğu lig. suspensorium ovari bu uca tutunur. Tuba uterina'nın infundibulum parçasında çıkan fibria ovarica'lar da bu ucun üzerindedir. Alt ucu laterale bakar. ligament ovarii proprium denilen ligament ile uterus'un cornu'suna bağlanır. Bu ligament gubernaculum'un kalıntısıdır ve lig. latum uteri içindedir. Ön kenarı (margo messovaricus), tuba uterina ve mezosalpinksin arkasında yer alan mezenter ile lig. latum uter'nin üst sınırına yakın, arka yüzüne tutunur. Mesovarium içinde, hilum ovari'ye giden damarlar ve sinirler bulunur. Hilum ovari, ovaryumun mesovaryuma tutunduğu kenardır. Arka kenarı (margo liber), serbesttir ve üretere bakar (Ozan, 2014) (Şekil 4).



Şekil 4. Kadın iç genital organları. Uterus duvarının, tuba uterinalar ve vajina, ovaryum ve ligamentler görülmektedir. Ovaryumun uterusu bağlanmasını ve fallop tüpü ile ilişkisi şematize edilmektedir (Mescher, 2015).

Ovaryum; grimsi pembe renkte, boyutları 3x1.5x1 cm, erişkinlerde ortalama değer 5x3x1 cm'dir, 4-6 g ağırlığındadır (Mescher, 2015). Embriyonal hayatta ovaryumlar, karın arka duvarında böbreklerin yanında bulunurlar. Sonra da yavaş yavaş pelvise inerler (Moore ve Persaud, 2009). Bu iniş gubernaculumun kontrolü altındadır.

Gubernaculum, yukarıda ovaryumların alt uçlarından tuba uterinaların uterusu girdiği yere yakın uterusu tutunur. Aşağıda ise gelecekte labium majus olan bölgedeki fasyaya tutunur. İleri dönemde gubernaculumun kraniyal parçası lig. ovarii proprium, kaudal parçası da lig. Teres uteri olarak kalır (Ozan, 2014). Ovaryumlar erişkinlerde periton ile örtülü olmadığı için yüzeyleri parlak değildir. Tunika albuginea korteksteki bağ dokunun kalınlaşması ile oluşur (Moore ve Persaud, 2009).

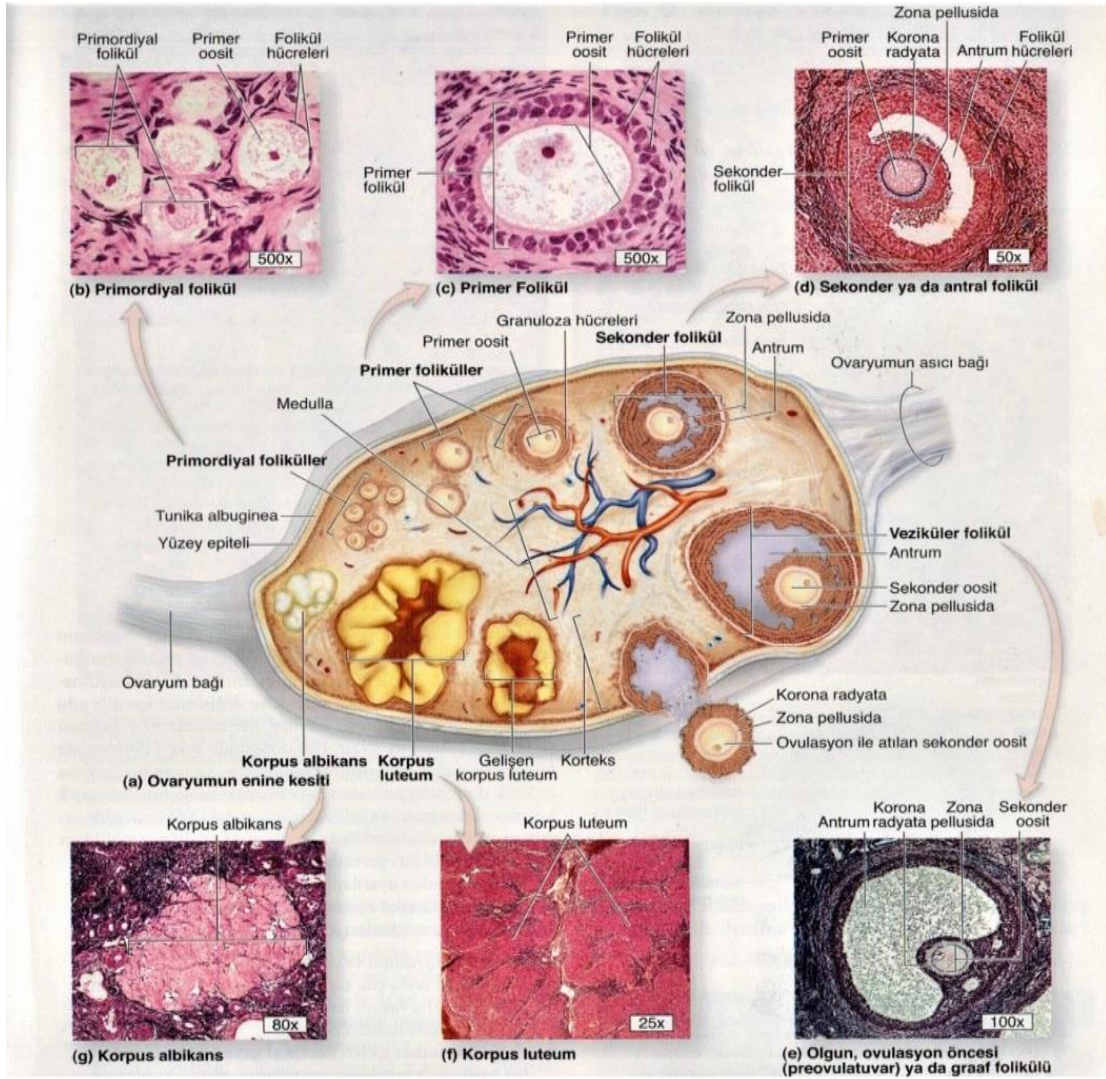
Ovaryumları aort abdominalisin dalları olan a. ovarica'lar besler ve a.v. ilyaca externa'nın üzerinden geçerek a. uterina'nın dalları ile anastomoz yapar. Hilum ovarii'den çıkan venleri, plexus pampiniformis denilen bir venöz ağ oluşturur. Ağ oluşturulan venler birleşerek v. ovarica'yı yapar. Sol ovaryan ven, v. renalis sinistra'ya, sağ ovaryan ven ise v. cava inferioro'a açılır. Ovaryum'lar lenf damarları, lateral aortik (paraaortik) lenf düğümlerine gider. Sempatik sinirler T 10-11 den gelir. Ovaryumun ağrı duyusunu taşır (Ozan, 2014).

Mesoovaryum'dan bazı düz kas lifleri hilum ovarii'yi geçerek ovaryum medullasına girebilir. Ovaryumların hareketlerinde bu düz kas liflerinin etkisi olabilir (Moore ve Persaud, 2009).

2.1.3.Ovaryum histolojisi

İnsan dişi üreme sistemi; ovaryum, bir çift tuba uterina, tek bir uterus ve vajinada oluşan iç genital ile labia majör, labia minör ve klitoriste oluşan dış genital organlardan oluşur. Dişi üreme sistemi dişi gametleri oluşturur, cinsiyet hormonları salgılar, döllenme için ortam sağlar, fetüsü doğuma kadar taşır ve fetüsü bütün gelişim için gerekli ortamı sağlar (Ovale ve Nahirney, 2009). Bu sistem içinde yer alan ovaryumlar pelvis boşluğunun derinlerine yerleşmiş, bir kısmı mezoovaryum adı verilen periton katlantısı aracılığıyla broad ligament, diğer bir kısmı da ovaryum ligamenti aracılığıyla uterus duvarına tutunmuştur (Eroschenko, 2013). Ovaryumlar dıştan priton ile örtülüdür. Ovaryumun erişkinde boyu 3 cm, eni 2 cm ve kalınlığı 1cm olan solid, badem biçiminde bir bezdir (Mescher, 2015).ortalama 6 g ağırlığındadır (Ozan, 2014). Boyutları ve histolojik görünimleri menstrual siklus, gebelik ve postmenopozal dönemlerde değişir (Ovale ve Nahirney, 2009).

Histolojik kesitlerde ovaryumlar içte medulla ve dışta korteks olmak üzere 2 bölgeye ayrılır (Eşrefoğlu, 2009). Ovaryumun yüzeyi basit ya da kübik epitelle kaplıdır. Bu epitel germinal epitel olarak adlandırılrsa da, ovaryumun kaynağı değil peritonel kaviteyi örten modifiye mezotel hücreleridir (Moore ve Persaud, 2009). Bir grup araştırmacı germinal epitelde oosit geliştirmişlerdir. Bu da germinal epitelin bipotent hücreler olduğunu göstermektedir (Eşrefoğlu, 2011). Germinal epitelin altında, ovaryumun beyazımsı rengini veren ve tunika albuginea olarak adlandırılan sıkı bir bağ dokusu katmanı bulunur (Moore ve Persaud, 2009) ve tüm ovaryumu bir kapsül gibi sarar (Eşrefoğlu, 2011). Tunika albuginea'nın altında oositleri içeren ovaryum folliküllerinin bol miktarda bulunduğu kortikal bölge yer alır. Çocukluk çağında ovaryum korteksinde bol miktarda primordiyal folliküller puberteden sonrada rüptüre folliküllerin yerini alan KL yer alır (Ovale ve Nahirney, 2009). Folliküller, kortikal bölgenin bağ dokusu (stroma) içinde gömülüdür. Bu stroma tipik iğ biçiminde fibroblast içerir ve bu fibroblastlar, hormonla uyarılara diğer organların fibroblastlarından farklı yanıt verir. Korteks, ovaryum folliküllerini içeren, medullayı dıştan saran ince kollagen liflerden ve iğ biçimli fibroblast benzeri hücrelerden oluşan zengin sıkı bağ dokusudur. Ovaryumun en iç kısmı gevşek bağ dokusu içinde zengin bir damar yatağı içeren medulla bölgesidir. Medulla zengin kan ve lenf damarları, sinirleri, az miktarda elastik lifler ve düz kas hücrelerini içeren gevşek bağ dokusu yapısındadır. Korteks ile medulla bölgeleri arasında kesin bir sınır yoktur (Junquera ve Carneiro, 2009; Eşrefoğlu, 2011; Mescher, 2015) (Şekil 5). Hilusta korteks kesintiye uğrar ve mesoover medullaya doğru devam eder. Küçük düzensiz kanal kalıntıları olan reteoveriler bu bölgede bulunabilir. Büyük epiteloid olan hücreler hilus hücreleridir. Ovaryum hilusunda ve mezooverde küçük gruplar halinde bulunurlar. Kolesterol esterlerinden zengin çok sayıda lipid damlaları ve lipofuksin pigmenti içerirler (Ovale ve Nahirney, 2009) .



Şekil 5. (a) Ovaryumun histolojik yapısı, (b) primordiyal follikül, (c) primer follikül, (d) sekonder ya da antral follikül, (e) graaf veya preovulatuvar follikül, (f) korpus luteum, (g) korpus albicans (Mescher, 2015).

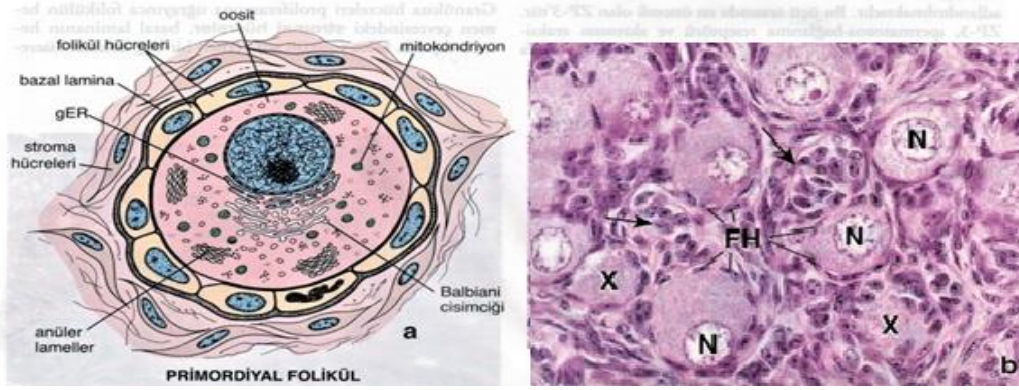
2.1.4. Ovaryum follikülleri

Ovaryumda follikülogenez olayı istirahat halindeki primordial folliküllerin aktivasyonu ile başlar. Follikülogenezis gonadotropine bağlı olmayan (preantral) ve gonadotropine bağlı (antral ve graaf) olan iki ana aşamada oluşur. Follikülogenezis uykudaki primordiyal follikülün büyüyerek pimer, preantral, antral ve preovulatuvar folliküllerin oluşmasıdır. Follikülogenezis ovaryumun korteksinde gerçekleşir (Köylü, 2014).

Primordiyal germ hücreleri fetal dönemin 3. ayından itibaren vitellüs endoderminde gelişmeye başlar. Dorsal mezenter boyunca göç edip ovaryuma ulaşır. Oogonyumlara farklılaşır. 5. aydan itibaren oogonyumla mitozla çoğalır ve sayıları 6-7 milyona ulaşır. Bir kısmı primer oosite diğer kısmı ise atreziye uğrar (Köylü, 2014). Elektron mikroskopunda oosit organelden zengin, belirgin golgi kompleksi, yaygın bir endoplazma retikulumu, bol mitokondriyon, lizozom içerir. Çapları 25-30 µm olan oositler, geniş ve veziküler nükleuslu, belirgin bir ve birkaç heterokromatik nükleouluslu yuvarlak hücrelerdir (Eşrefoğlu, 2011). Oosit eksantrik bir nükleusa sahiptir ve ooplazma adı verilen stoplazma, anüler lameller ve balbani cisimciği içermektedir. Balbani cisimciği golgi membranlarının ve veziküllerinin, endoplazmik retikulum birlikte birçok mitokondriumun ve lizozomlarının oluşturduğu bir kümedir. Anüler lameller bir nüklear zarf kesitler dizisidir. Dizideki her tabaka por yapıları içerir ve bunlar morfolojik olarak nüklear porların yapısıyla özdeşirler (Ross ve Pawlina, 2014).

Primordiyal follikül

Primordiyal folliküller primer oositi içerir ve tek sıralı yassı follikül hücreleriyle sarılıdır (Junqueria ve Carneiro, 2009). Primordiyal follikül etrafında düz kas hücreleri de bulunur (Şekil 6). Primordiyal folliküllerin çevresindeki tek katlı epitel (yassı granüloza) hücreler oositin beslenmesini sağlarken aynı zamanda oositin olgunlaşmasını baskılayan OMI faktörü de salgılar. Bu faktör oositi mayozun profaz safhasında kalmasını sağlar (Eşrefoğlu, 2011). Primordiyal folliküller dıştan bir bazal laminayla sınırlandırılmıştır. Primordiyal folliküller erken gelişimi gonodotropin stimülasyonundan bağımsızdır (Ross ve Pawlina, 2014). Puberteden önce primordiyal folliküller hemen tunika albüginanın altındadır (Eşrefoğlu, 2011). Primer oositi birinci mayoz bölünmenin profazın diploten evresinde 12-50 yıl arreste uğrar (Ross ve Pawlina, 2014).

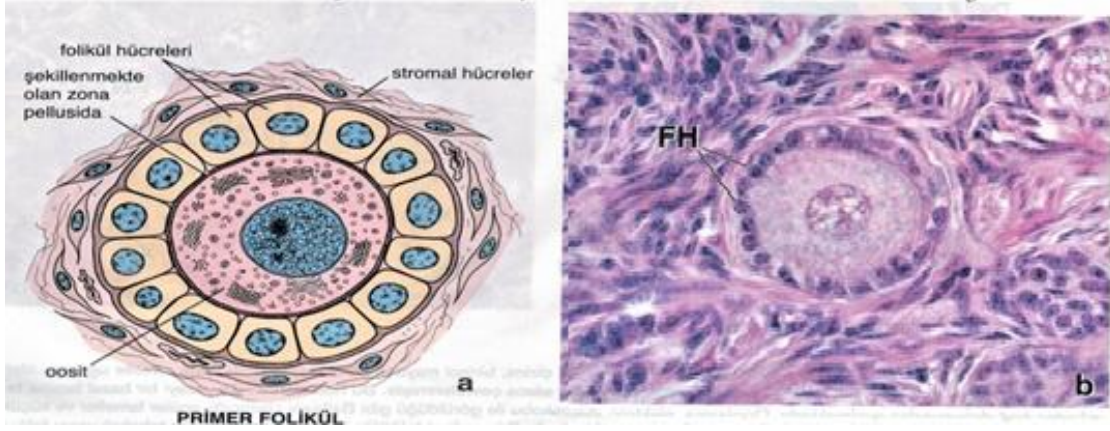


Şekil 6. a. Primordiyal follikülün şematik çizimi, b. Primordiyal follikülün bu fotomikrografı görülmektedir. N primordiyal oositi, FH follikül hücresi. (X640, Ross ve Pawlina, 2014).

Primer follikül

Primordiyal follikülleri gelişmesi, primer oositin ve oositi çevreleyen yassı hücrelerin ve stromasının büyümesiyle başlar (Eşrefoğlu, 2011). Follikül hücreleri mitozla bölünür ve büyüyen oositin çevresinde tek katlı kübik epitel olur. Tek katlı kübik hücrelerle çevrili olan primer folliküllere unilaminer, çok katlı küpük hücrelerle çevrili olanlara multilaminer (preantral) primer follikül denir (Mescher, 2015). Primer follikül 50-80 µm büyüklüğüne ulaştığında zona pellusida görülür. Follikül büyüdükçe özel proteinler salgılanır ve bu proteinler bir araya gelerek zona pellusidayı oluşturur. Zona pellusida oosit ile granüloza hücreleri arasındadır (Şekil 7). Eksraselüler madde olan zona pellusida granüloza hücreleri ve oosit tarafından salgılanan glikoprotein yapısında bir maddedir ve oositin çevresinde bir tabaka oluşturur (Ross ve Pawlina, 2014). Zona pellusida fertilizasyon sırasında spermin türe özgü ovuma bağlanmasını sağlar (Düzova ve Emre, 2011). Zona pellusida, en az üç farklı sülfatlanmış glikoprotein (ZP1, ZP2, ZP3) içeren kalın amorf bir örtüdür (Çelik ve Yıldırım, 2010). Bu üçü arasında en önemli olan ZP3'tür. ZP3 spermatozoa bağlama reseptörü ve akrozom reaksiyonu indükleyicisi olarak fonksiyon görmektedir (Ross ve Pawlina, 2014). follikül hücrelerin uzantıları (filopodlar) ve oositin mikrovillusları zona pellusida içerisinde gap junction bağlantılarıyla birbirleriyle haberleşir (Mescher, 2015). Memelilerde primer follikülün oositinin membranını hemen altında kortikal granüller denilen granüller görülür. Bu granüllerin proteazlardan zengin içerikleri spermiyumla

karşılanınca salgılanır. Primer ve preantral folliküller AMH salgılar (Moore, 2009; Eşrefoğlu, 2011).

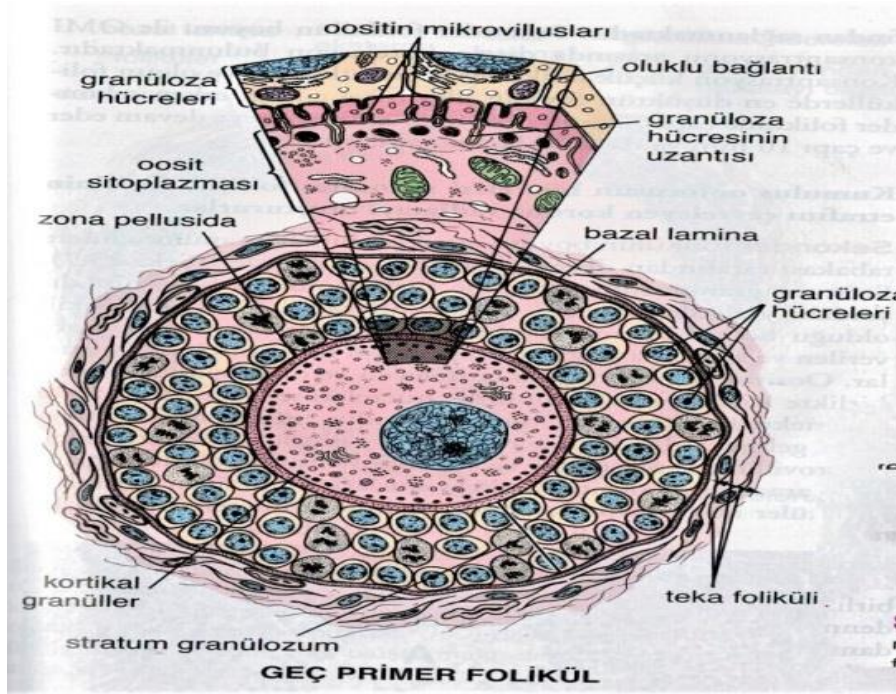


Şekil 7. Primer (Unilaminer) follikül. b. Primer follikülün fotomikrografisi. X640. (Ross ve Pawlina, 2014).

Preantral follikül (multilaminer follikül)

Primer follikülün büyümesi ve onu çevreleyen granüloza hücre tabaka sayısı artınca bu folliküle preantral follikül denir. Preantral follikül antrum olmaksızın, birden fazla kübik granüloza hücresi tabakası ile çevrilidir. Stroma hücreleri granüloza hücrelerin etrafını teka hücreleri denilen sıkı bağ dokusu çevreler (Leung ve Adashi, 2004; Eşrefoğlu, 2011). Granüloza hücreleri arasında zonula okludenslere sahip değildirler çünkü ovumun ve folliküllerin beslenmesi için makro moleküllerin kandan geçmesi gerekir (Ross ve Pawlina, 2014). folliküller kan damarından zengin teka interna ve düz kas ve kollejen liflerden oluşan teka eksterna ile kuşatılır (Eşrefoğlu, 2011). Teka interna yüksek düzeyde vaskülarizedir ve kübik salgı hücrelerinden oluşmuş bir iç tabakadır. Teka interna hücreleri çok sayıda LH reseptörlerine sahiptir. LH stimülasyonuna yanıt olarak östrojen prekürsörleri olan androjenleri salgılar. Zengin küçük damar ağına sahiptir. Teka eksterna dış bağ dokusu hücreleri tabakasıdır. Temel olarak düz kas hücreleri kollejen lifler demetini içermektedir. Teka interna ile granüloza hücreleri arasında bazal lamina bulunmaktadır. Teka tabakaları ve onu dıştan çevreleyen stroma arasında sınır belirgin değildir. Oosit olgunlaştıkça organellerin dağılımı değişir. Golgi, mitokondrium, granüllü endoplazmik retikulum ve veziküler cisimciklerin sayısı artar. Oositin oolemması hemen altında kortikal granülleri yer alır. Kortikal granülleri

(salgı granülleri) ovum sperm tarafında aktive edildiğinde ekzositoz ile serbestleştirilen proteazları içermektedirler. Fertilizasyonda kortikal granülleri yüzeye doğru hareket ederler ve oolemma ile kaynaşırlar. Oolemma yeniden düzenlenir. Fertilizasyonda polispermi engellemek için krotikal granüller perivitelin aralığa salgılanır. Perivitelin aralık oosit ve onu çevreleyen granüloza hücreleri arasında bulunur (Şekil 8). Granüloza hücrelerinde ince uzantılar oluşur ve oosite doğru uzanır. Granüloza hücrelerinin uzantıları oositin mikrovilluslarıyla iç içe geçer ve bazıları da oositin plazma membranının içine doğru invajine olur. Uzantılar plazma membranına temas edebilirler fakat sitoplazmik devamlılık sağlamaz (Ross ve Pawlina, 2014)

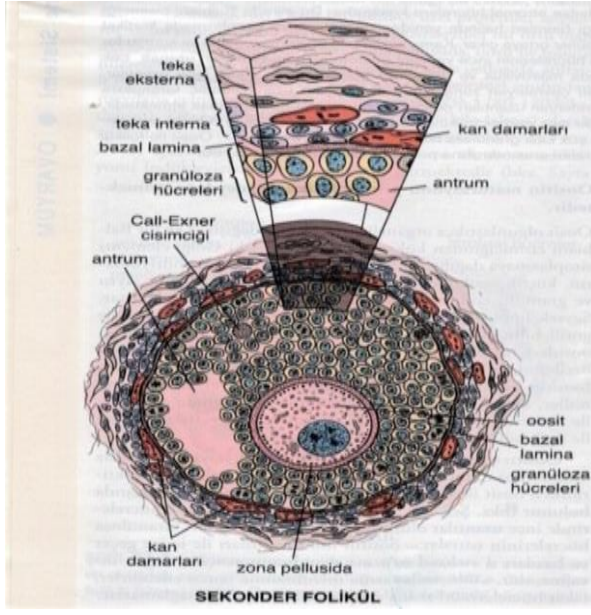


Şekil 8. Preantral (Geç Primer) follikülün bu şematik çizimi, çok tabakalı granüloza hücreleri, zona pellusida, dış tabakada bulunan bazal lamina, teka hücreleri, balbiani cisimciği ve kortikal granüller göstermektedir (Ross ve Pawlina, 2014).

Sekonder follikül

Stratum granulozum 6-12 hücre katına sahip olunca bu hücreler arasında follikül sıvısı ile dolar ve hilal biçimde tek bir kavite oluşur. Kaviteler birleşerek antrum adı verilen aralarında düzensiz boşluklar meydana gelir (Ross ve Pawlina, 2014) (Şekil 9). Granüloza hücreleri tarafından sentezlenen likör sıvı: Steroid hormonlardan

(progesteron, androjenler ve östrojenler), glikozaminoglikanlardan, steroid bağlayıcı proteinlerden (Junqueira ve Carneiro, 2009), büyüme faktörlerinden, plazminojenden, antikoagulant heparan sülfat proteoglikandan (Mescher, 2015), hiyaluronik asitten (Ovale ve Nahirney, 2009) ve gonadotropinlerden (Kierszenbaum, 2006) zengindir. Ayrıca granüloza hücreleri tarafından salgılanan Call-Exner cisimcikleri olarak adlandırılan hyaluronan ve proteoglikanlar içeren ekstraselüler materyal görülebilir. Bu aşamaya gelen folliküle sekonder ya da antral follikül denir. Eksantrik yerleşimli yaklaşık 125µm çapına ulaşan oosit daha fazla büyümmez. Büyümenin inhibisyonu, granüloza hücreleri tarafından antral sıvıya salgılanan AMH tarafından sağlanmaktadır. Büyük ölçüde granüloza hücrelerinin proliferasyonu ile hacimce büyüyen primer folliküller, kortikal stromanın derinliklerine doğru ilerler. Oosit ve follikül gelişimi için FSH, büyüme faktörleri ve kalsiyum iyonları gerekir (Ross ve Pawlina, 2014). Ayrıca follikülün büyümesi angiogenesize de bağlıdır. Bilindiği gibi biri teka eksterna diğeri teka interna tabakasında olmak üzere iki kapiller ağ bulunmaktadır. Ancak bu kapiller bazal membranı geçemedikleri için granüloza hücreleri ovulasyona kadar damarsızdır. Antral folliküllere nazaran ovulasyona giden preovulator folliküllerde kapiller ağ daha fazladır, daha fazla gonadotropine maruz kalmaktadır ve diğer folliküllere göre büyümesi, gelişmesi daha fazladır. Bu da ovulasyona gidecek follikülü belirler. FSH'nin etkisiyle granüloza hücresinde aromatoz enzim salgılanır. Aromatoz enzim androstenedioni östrojene dönüştürür (Eşrefoğlu, 2011; Köylü, 2014). Sekonder follikülün boyutu ile AMH konsantrasyonu arasında direkt korelasyon bulunmaktadır. Konsantrasyon küçük folliküllerde en yüksek büyük folliküllerde en düşüktür. Erken sekonder follikül çapı 0,2 mm olan follikül, büyümeye devam eder ve çapı 10 mm yada daha fazlasına ulaşır. follikül içerisinde likör sıvı artıp antrum genişledikçe bir grup granüloza hücreleri oositin etrafını sarar ve kumulus ooforus adı verilen bir tümsek oluşur (Şekil 9). Oositin hemen etrafını saran hücrelere korona radiata denir (Ross ve Pawlina, 2014)



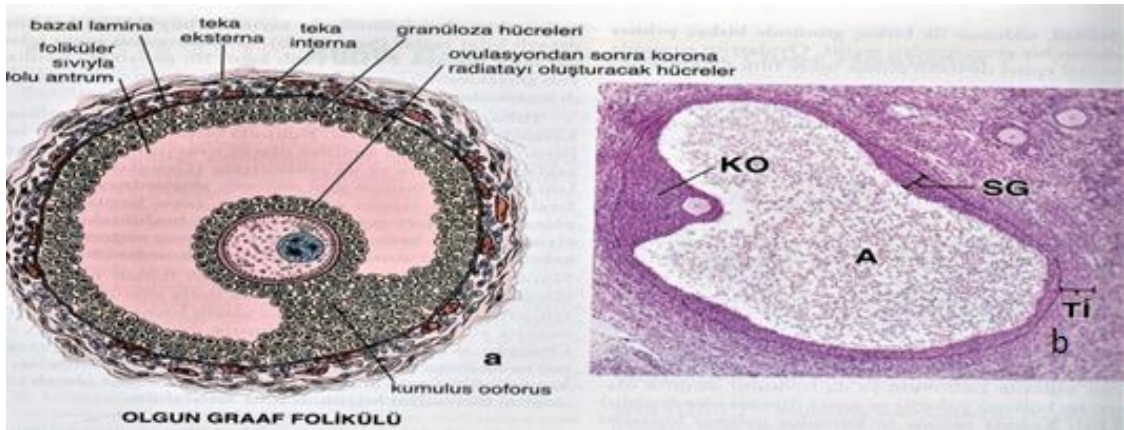
Şekil 9. Sekonder veya antral follikül. Sekonder follikülü, granüloza hücreleri ve sıvı dolu antrumunu gösteren şematik çizim. Burada Call-Exner cisimcikleri bazal lamina, teka interna ve teka eksterna gösterilmektedir (Ross ve Pawlina, 2014)

Graaf follikül

Graaf follikül çapı yaklaşık 10 mm ya da daha fazladır. Büyüklüğünden dolayı ovaryum yüzeyinde çıkıntılar oluşturur. Maksimum boyutuna ulaştınca granüloza hücrelerinde mayoz bölünme azalır. Antrum boyutu arttıkça granüloza tabakası incelir (Şekil 10) (Ross ve Pawlina, 2014). Bu dönemde graaf follikül I. mayoz bölünmesini tamamlamış ve II. mayoza girmiş sekonder oositi taşır. Tipik olarak üç ana bölümden incelenir; graaf follikül küçük, orta, geniş, folliküller olalark sınıflandırılabilir. follikül büyümesini sürdürür. follikülün büyüklüğü 10 mm'ye ulaştınca oosit ve oositi çevreleyen hücrelerin diğer hücrelerle bağlantısı gevşer ve böylece atılması kolaylaşır. Teka interna hücreleri sitoplazmasında lipid biriktirerek steroid sentezleyen hücre özelliğini kazanır (Moore, 2009; Eşrefoğlu, 2011).

Korona radyata mikrovillusu ile oositin mikrovillusları arasında gap junction tipi bağlantı kompleksi bulunur. Bu dönemde kumulus ooforus belirgindir. Gerek follikülogenezisde gerekse oogenesizde oosit ve onun kompleksleri gap junction bağlantıyla haberleşirler (Eşrefoğlu, 2011). Gap junction tipi bağlantılar sayesinde oosit

ile granüloza ve teka hücreleri arasında haberleşme aynı zamanda hücrelerin birbirlerini aktifleştirmesini sağlar. Ayrıca hipofiz ve ovaryum hormonlarının birbirleri arasındaki düzenli döngüsünü sürdürür. Gap junctionla folliküllele ovaryum hormonları arasında sürekli bir iletişimi sürdürülmekte, metabolit, amino asit, sinyal proteinleri taşınma gibi işlevleri yıllarca uyum halinde gerçekleştirirler (Çelik ve Yıldırım, 2010). follikülün büyümesi için başlıca FSH, epidermal büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü ve kalsiyum iyonlarına ihtiyaç vardır. Folükülün büyüklüğü granüloza hücreleri tarafından salgılanan OMI kontrolü altındadır. follikülün gelişimi vaskülarizasyona da bağımlıdır. Follikül anjiogenezsisi kontrol eden endotelial büyüme faktörüdür (Eşrefoğlu, 2011). Follikülün büyümesi ve farklılaşması; Trasforming growth faktör b (TGFb) gibi büyüme faktörlerle oluşur. TGFb ailesi, activin, inhibin, AMH, büyüme ve gelişme faktörü 9 (GDF-9) ve kemik morfogenetik proteinlerinden oluşur. Bu faktörler hücre büyümesi, morfogenez, hücre farklılaşması ve apoptoz gibi biyolojik olaylarda çok önemli rol oynarlar. Primordiyal follikülün tamamen gelişmiş sekonder folliküle dönüşmesi için büyüme faktörler eşliğinde 290 gün ya da 10 düzenli menstrüel siklus gereklidir (Çelik ve Yıldırım, 2010).



Şekil 10. Graaf follikül kumulus ooforus (KO), oositi, geniş antrum (A), korona radyata, granüloza hücreleri (SG), teka interna (Tİ), a olgun graaf follikül şematik çizimi ve b. matür bir sekonder follikülün fotomikrografi görülmektedir, x45 (Ross ve Pawlina, 2014).

Preovulatar Follikül

Preovulatar ovulasyona giden folliküldür. Antrum oluşumundan sonra büyümesi hızlanır ve sıvı birikimi çoğalır. Tersiyer (graaf) follikülden preovulatar folliküle kadar geçen zaman 60 gündür. Preovulatar follikülün dominant hale gelmesi için 15-20 gün daha gereklidir. Böylelikle büyüklüğü 1 cm ye ulaşır ve ovaryumun yüzeyine doğru kabarılaşır. Oosit ve oositi çevreleyen hücrelerin diğer granüloza hücreleriyle olan bağlantıları gevşer. Böylece oosit atılmaya hazır olur. Bu dönemde teka hücreleri stoplazmasında lipit biriktirirler ve steroid sentezleyen hücre özelliğini kazanırlar. LH ile androjenler salgılanır. Sekonder oosit likör sıvı içinde yüzer duruma gelir ve ovulasyondan hemen önce küçük bir alanın kanlanması bozulur ve bu alana stigma denir (Eşrefoğlu, 2011). LH pikinden sonra granüloza hücrelerinden inflamatuvar sitokinler ve hidrolitik enzimlerin salgılanmasını sağlar. COX-2, plazminojen aktivatörü ve metaloproteazların içinde bulunduğu çeşitli faktörler, follikülün yırtılmasını sağlar. Ovulasyonda etkili olan faktörler; folliküler sıvının hacim ve basıncının artması, follikül duvarının plazminojenlerle enzimatik olarak parçalanması, oosit-kumulus kompleksi ile stratum granüloza arasında glikozaminglikan birikmesi, PG'lerin teka intinadaki düz kaslarda oluşturduğu kontraksiyondur (Düzova ve Emre, 2011). Preovulatar follikül II. mayozun II. metafazda ovulasyona uğrar, follikül tuba uterinaya atılır, 24 saat canlı kalır ve bir spermle döllenirse II. mayoz tamamlanır, ovum ve II polar cisimcik oluşur, döllenemezse II. mayoz tamamlamadan atrezi olur (Çelik ve Yıldırım, 2010; Eşrefoğlu, 2011). Her menstrüel siklusta ovulasyona uğrayan dominant follikül yaklaşık bir yıl önce ortaya çıkan primordiyal follikülden meydana gelir (Çelik ve Yıldırım, 2010).

Atretik follikül

Puberte dolaylarında ovaryumlar yaklaşık 400.000 oosit içerir. Atrezi, en fazla fetal dönemde olmak üzere, yeni doğan da 2 milyon olan primordiyal follikül büyük bir kısmı ortadan kaldırılır ve puberteden sonra dişinin üreme çağı boyunca devam eder. Her ay (28 gün) yaklaşık 7. günde 6-12 follikül gelişir ve içlerinden sadece biri dominant hale gelir, gerisi atreziye uğrar. Genellikle tek bir oosit serbest bırakıldığından ve dişinin doğurganlık çağı 30-40 yıl sürdüğünden, yalnızca 450 kadar oosit salınmış olur (Eşrefoğlu, 2011; Mescher 2015). Atreziye ilk olarak oosit büzülerek lizize uğrar. Bunun ardından follikül hücreleri piknotikleşirler, birbirinden ayrılır ve otolize uğrarlar.

Zona pellusida şişer. Teka hücreleri uzun kordonlar şeklinde düzenlenir, dejenere olurlar ve yerlerini daha sonra bağ dokusu doldurur. Stromada çok sayıda makrofajlar vardır (Ovale ve Nahirney, 2009). Bu atrezinin sebebi oositin ölümü veya granüloza hücrelerinin ölümüne bağlı olabilir (Çelik ve Yıldırım, 2010).

2.1.5. Ovaryum korpusları

Ovulasyon sonrası geriye kalan hücreler korpusları oluşturur.

Korpus hemorajikum

Ovulasyon sonrası teka internadaki kapillerin yatağın yırtılmasıyla follikül boşluğuna az miktarda kanama olur ve korpus hemorajikum oluşur. Bağ dokusu hücrelerinin follikülü istila etmesi ile granüloza ve teka hücreleri morfolojik değişikliğe uğrarlar (Eşrefoğlu, 2011).

Korpus luteum

Geçici endokrin doku özelliğini kazanan yapılardır (Eşrefoğlu, 2011). Oositini atan follikülün geriye kalanı, korpus luteum (KL) olarak bilinen bir yapıyı oluşturur. Follikül kollabe olur ve içeriye doğru çok fazla çöküntüler ve kıvrılmalar oluşur ve lümeni fibrin içeren sıvı ve kan ile dolar. Antral boşluktaki bu çökelti pıhtıya dönüşür ve yerini fibröz skar dokuya bırakır (Ovale ve Nahirney, 2009). Doğal süresi 14 gündür. LH reseptörleri içerir (Köylü, 2014). Korpus luteum az miktarda teka lutein, çok miktarda granüloza lutein, fibroblast, endometriyal hücreler ve ümmün hücrelerinden meydana gelir. Uyarılması KL'un ana steroid olan progesteronun (10-12 gün) (Ovale ve Nahirney, 2009) yanında östradiol ve inhibin A sentezini sağlar (Düzova ve Emre, 2011). Progesteron da uterusu gebeliğe hazırlar (Junquera ve Carneiro, 2009). Ovulasyondan sonra granüloza hücreleri bölünmemesine rağmen boyutlarında büyük bir artış gözlenir. Bu hücreler KL'un %80 ini oluştururlar. Teka internanın hücreleri de teka lutein hücrelerini oluşturarak KL'un oluşumuna katkıda bulunurlar (Junqueira ve Carneiro, 2006; Mescher, 2015). KL 10-12 gün süreyle hormon salgılamak üzere programlanmıştır. Daha ileride LH uyarısı olmadığında ve gebeliğin yokluğunda KL tüm ana hücreleri steroid yapımını durdurur, geriler, apoptoza girer ve doğal ölüm ile dejenerasyona uğrar (Junquera ve Carneiro, 2009).

Gebelik korpus luteumu

Zigotun fertilizasyon ve implantasyon gerçekleşirse gebelik KL' u oluşur. Korpus luteumu varlığı luteotropin denen parakrin ve endokrin salgıların kombinasyonuna bağlıdır. Parakrin luteotropin ovaryumda lokal olarak üretilirler, bunlar östrojenler, IGF-1 ve II' dir (İnsülin Benzeri Büyüme faktörü I ve II). Endokrin luteotropin; hCG (Humaen Caryonik gonodotropin), LH, prolaktin ve insilündür. hCG karyon trofoplastları tarafından sentezlenir ve KL üzerindeki reseptörleri stimule ederek dejenerasyonunu engeller. LH ve prolaktin pitütier bez tarafından salgınır. Gebelik KL ' u dan üretilen progesteron ovaryum folliküllerinin siklik değışikliğini bloke eder (Ross ve Pawlina, 2014). Progesteron aynı zamanda uterusu gebeliğe hazırlar (Junqueria ve Carneiro, 2009). Erken gebelikte gebelik KL' u 2-3 cm' dir ve ovaryumun büyük bir kısmını doldurur. Fonksiyonu gebeliğin 8. haftasında kademeli olarak azalır fakat gebelik süresince devam eder. Gebeliğin 6. haftasında plesenta kademeli olarak KL' un fonksiyonlarını üstlenir (Ross ve Pawlina, 2014).

Menstruasyon korpus luteumu

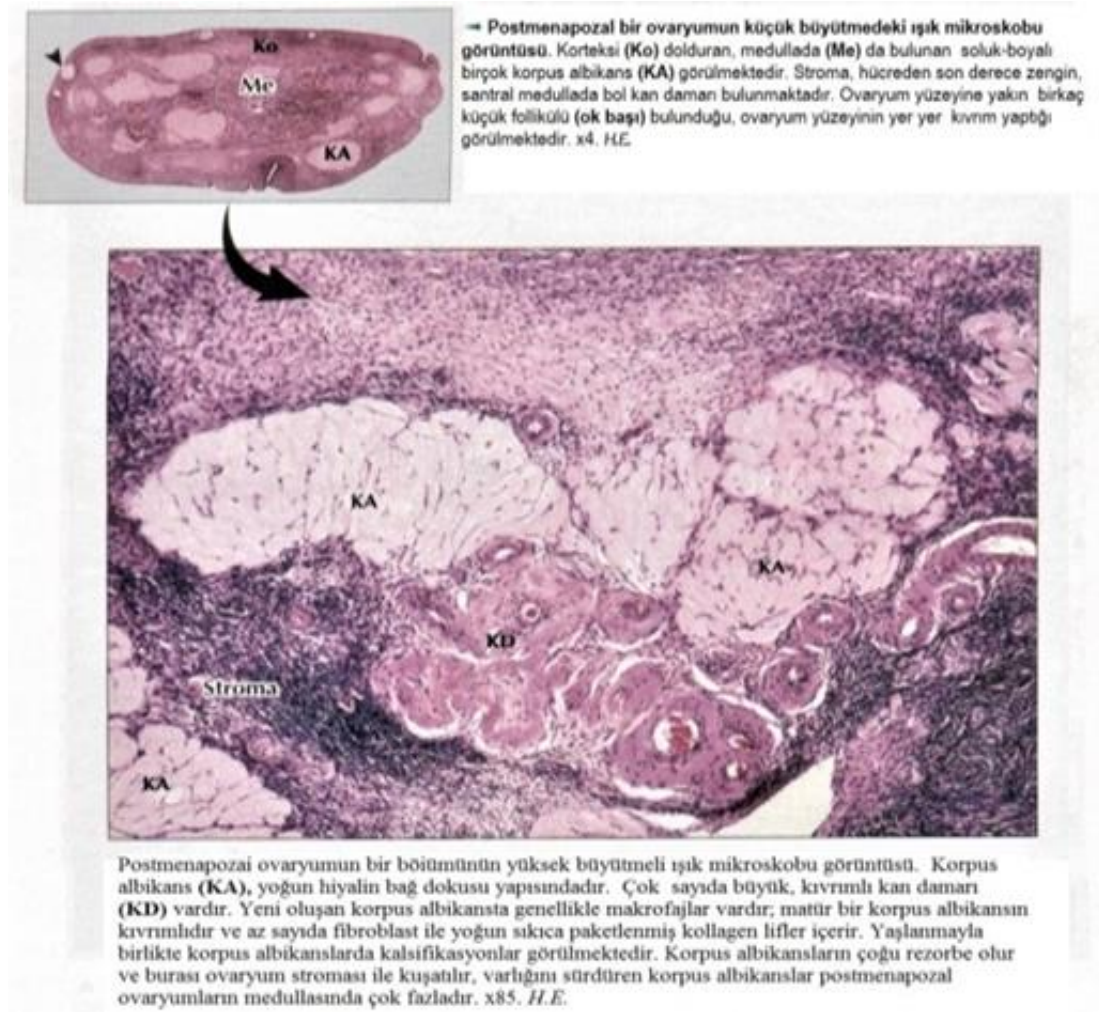
Gebelik olmazsa KL' unda progesteron üretimini durdurur. Gebelik için düzenlenen uterusun mukozasının bir bölümünün progesteron üretimi durdurulduğundan dolayı dökülür ve menstruasyon oluşur. Korpus luteum bozulduktan sonra kandaki steroid miktarı azalır ve bir başka follikülü uyarmak ve bir sonraki menstruasyon döngüyü başlatmak üzere FSH salgısı yeniden artar. Yalnızca bir menstruasyon boyunca varlığını sürdüren KL' a menstruasyon KL' u denir (Ross ve Pawlina, 2014).

Korpus albicans

Menstruasyon KL' u ovulasyondan yaklaşık 12 gün sonra korpus albicans' a dönüşür ve bir süre sonra yerini bağ dokusuna bırakır. Burada kademeli olarak beyaz bir skar dokusu oluşur ve yapı korpus albicansa dönüşür (Eşrefoğlu, 2011).

2.1.6. Menopoz sonrası ovaryum

Menopoz üreme periyodunun bittiğini ifade eder. Bu dönemde ovaryum artık oosit atamaz ve hormon üretemez. Postmenopozla ovaryumların hacmi küçülür. Bu evredeki ovaryumlar birkaç gelişmemiş büyükçe follikül ile korpus albikansa dönüşmüş birçok KL kalıntısı içeren buruşuk bir görüntü sergiler. Yaşla birlikte stroma daha yoğunlaşır, tunika albuginea kalınlaşır, ovaryum yüzey epiteli ise çok inceldir. Yaşlı ovaryumlarında büyük, anormal, sıvıyla dolu kistlik folliküller yaygın olarak görülür (Ovale ve Nahirney, 2009) (Şekil 11).



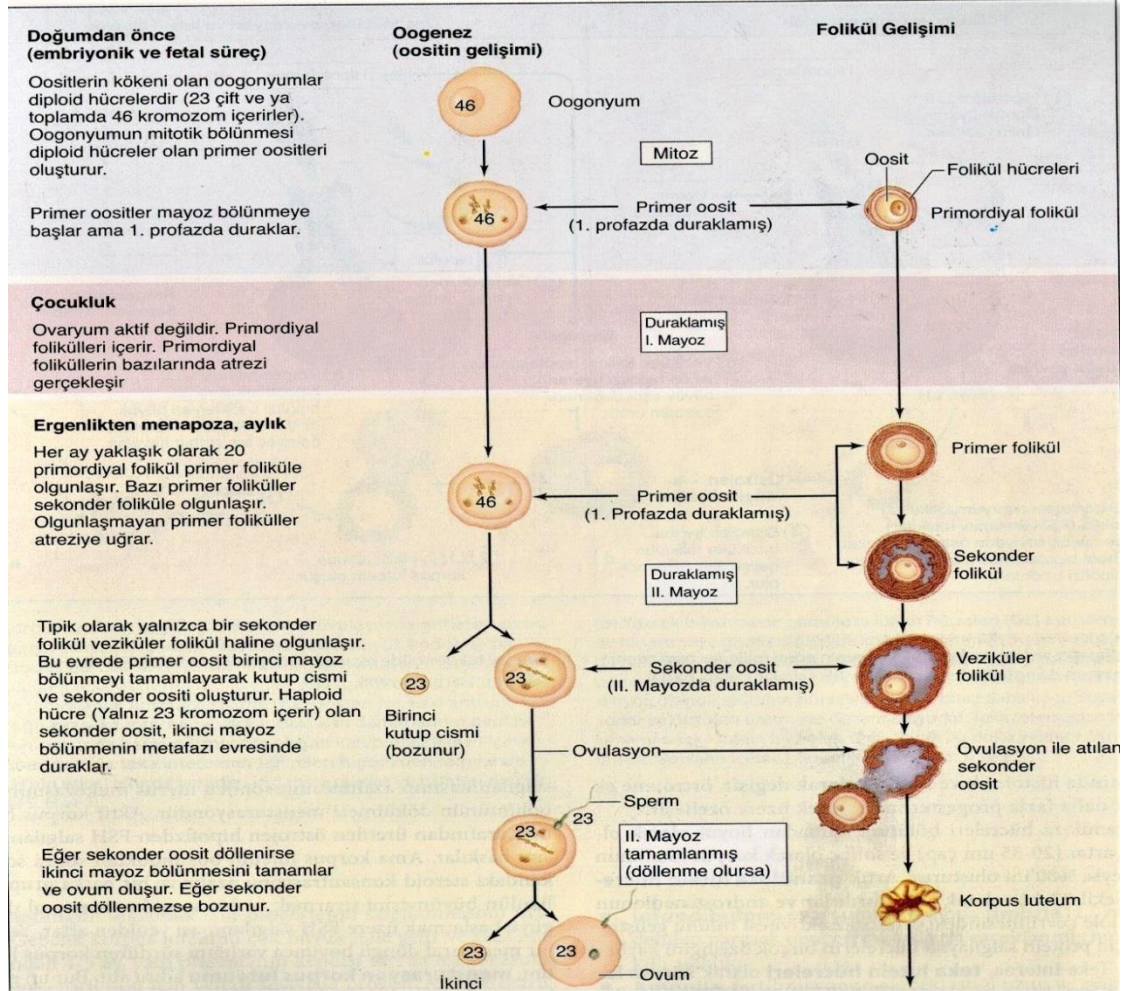
Şekil 11. Postmenopozal ovaryum (Ovale ve Nahirney, 2009).

2.1.7. Ovaryum fizyolojisi

Overler endokrin ve ekzokrin özelliğine sahip organlardır. Overin oositi üretmesi ekzokrin fonksiyonu iken, östrojen, progesteron ve anti-müller üretmesi endokrin fonksiyonudur (Eşrefoğlu, 2011; Köylü, 2014). Overler hem oogenesiz hem de follikülogenezisin gerçekleştiği yerdir (Köylü, 2014). Oogenesiz embriyonik dönemde 3. hafta dolaylarında primordiyal germ hücreleri vitellüs endodermi dorsal mezenter boyunca göç edip ovaryuma ulaştıktan sonra burada oogoniumlara farklılaşması ve mitozla çoğalarak 5. ayda 6-7 milyona ulaşmasıdır (Moore ve Persaud, 2009; Köylü, 2014). Oogoniumlar büyük bir kısmı apoptoza uğrar, geriye kalanlar farklılaşarak primer oosite (2 milyon) dönüşür. Doğundan önce tüm oogoniumlar primer oosite dönüştükten sonra yeni oogonium oluşmaz (Köylü, 2014). Primer oositler granüloza hücreleri tarafından çevrilerek oluşan küçük folliküllere dönüşür (Eşrefoğlu, 2011). Doğumdan puberteye kadar ovaryumlar inaktiftir. Primordiyal folliküller oosit AMH salgılayarak oositin olgunlaşmasını engeller. 9-10 yaşlarında FSH ve LH salgısı başlar ve 11-16 yaşlarda gittikçe artar. FSH ve LH salgılanmasıyla folliküllerde büyüme görülür. Yaklaşık iki yıl sonra LH düzeyi keskin bir şekilde arttıktan sonra ilk menstruasyon (11 ± 2) görülür. İlk birkaç menstrüasyonda ovulasyonsuzdur (yumurtlama gerçekleşmez). Pubertede ovaryumda yaklaşık 400.000 oosit vardır. İlk birkaç menstruasyon ile menopoza kadar (13-52 yaş) toplam 500-700 primer oosit ovulasyonla uğrar, gerisi atrofiye uğrar (Köylü, 2014).

Primer oositlerin tamamı prenatal dönemde 8. haftada 1. mayozun profaz evresine girer. Ancak profaz evresinde puberteye kadar durur. Puberte ile menopoza arasında herhangi bir menstruasyon siklusunda gelişmeye başlayıncaya kadar bekler. Bu bekleme süresine diktiyoten dönemi denir. Bu dinlenme dönemini sağlayan follikül granüloza hücreleri tarafında salgılanan AMH sağlamaktadır. Pubertede gonodotropin releasing hormon (GnHR) uyarmasıyla FSH ve LH salgılanır. FSH folliküllerin büyümesini, LH ise ovulasyonu sağlar. Dolayısıyla primer oosit LH'nin salgısının pik yaptığı zamanda 1. mayoz bölünmesini tamamlar. 1. mayozda 23 tek kromozom (23x) sahip iki hücre oluşur. Bunlardan biri sekonder oositir. Besince zengin ve ebatça büyük, diğeri küçük ve besince fakir I. kutup hücresidir. Bu arada sekonder oosit II. mayoz bölünmeye girer fakat metafaz evresinde durur, ovulasyona uğrar ve fibrialar

tarafında yakalanır, tuba uterinaya alınır. Sekonder oosit spermle döllenirse II. mayoz tamamlanır. II. mayoz sonrasında 23 kromozom içeren ovum ve II. polar cisimciği oluşur (Köylü, 2014). Döllenme gerçekleşmezse 24 saat canlı kalır II. mayoz tamamlamadan atrezi olur (Çelik ve Yıldırım, 2010; Eşrefoğlu, 2011) (Şekil 12).



Şekil 12. Oogenez ve mayoz bölünmenin aşamaları (Mescher, 2015).

Ovaryum Siklusu

Kadın cinsel siklusu sırasında ovaryumların görülen değişikliklere ovaryum siklusu denir (Köylü, 2014). Ovaryan döngü ile her ay follikülogenezis gerçekleşir (Düzova ve Emre, 2011). Ovaryum siklusu gonadotropinlere bağlıdır (FSH, LH). Gonadotropinler yaklaşık her 28 günde ovaryumların yeni folliküllerin gelişimini sağlar. Folliküllerden sadece biri dominant follikül siklusun 14. gününde bir ovum

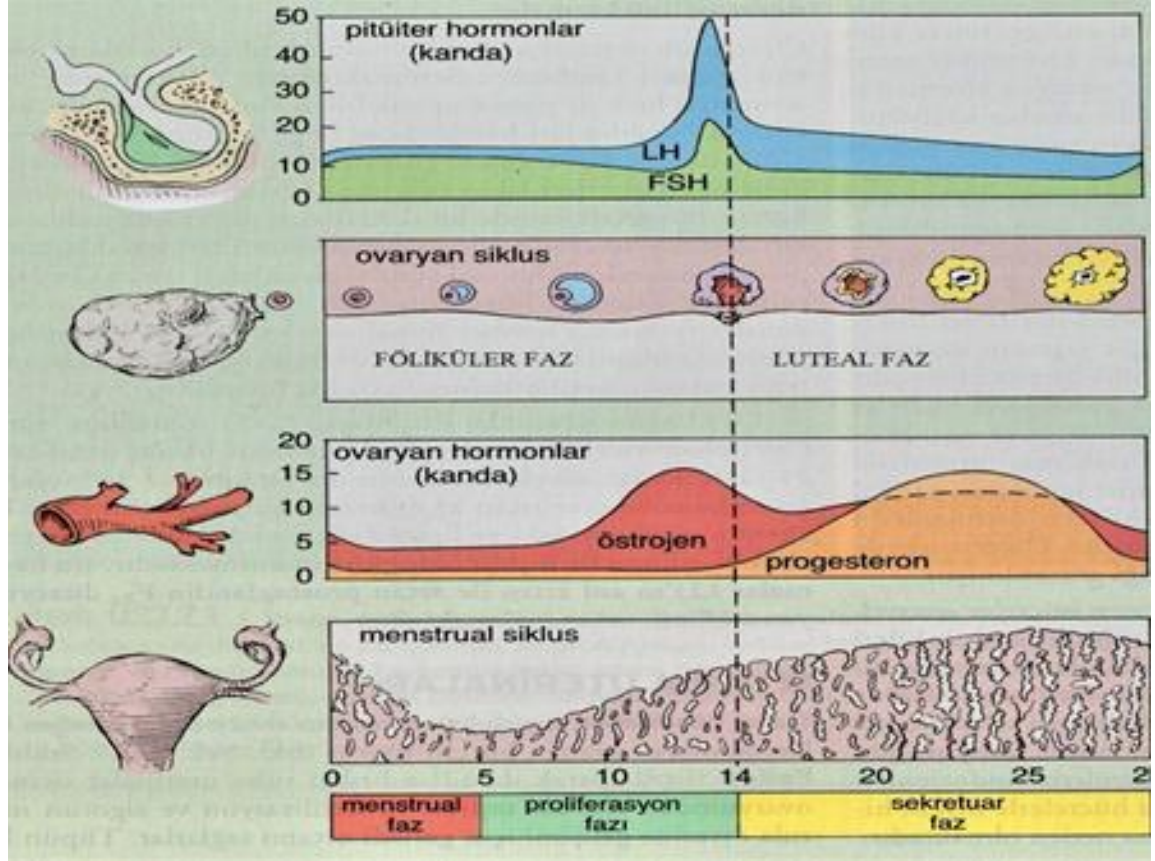
(yumurta) karın boşluğuna atılır. Gonadotropinler sadece bir siklusta bir kez ovulasyona neden olurlar (Köylü, 2014).

Ovaryum siklusunun eşit süreli iki evresi vardır. Bunlar folliküler evre ve luteal evredir. Ovaryum siklusunun ovulasyona kadar olan ilk yarısına (1-14. günler) folliküler evre, ovulasyondan sonraki (14-28. günler) ikinci yarısına luteal evre denir. Folliküler evrede FSH, luteal evrede LH etkilidir. FSH folliküllerin gelişimini sağlar ve granüloza hücrelerini etkilerken LH ise teka hücrelerini, ovulasyonu ve ovulasyondan sonra kalan follikülün KL'a dönüşmesini sağlar. Folliküler evre ve luteal evre arasında ovulasyon olayı gerçekleşmektedir (Köylü, 2014).

Folliküler evre

Folliküler evre ovaryum siklusun ovulasyona kadar devam eden ilk evresidir (1-14. günler) ve folliküller gelişir. Bu evre uterusda folliküler veya proliferatif dönemle paralel devam eder ve menstruasyon kanamasının birinci gününe tekabül eder. Bu evrede dominant follikül, 17 b-östradiol ve inhibin B yüksek oranlarda üretilir. Östradiol yüksek konsatrasyonda iken hipotalamus ve hipofizde düşük amplitütlü ve yüksek frekanslı östradiolün pozitif geribildirim mekanizması ile gonadotropin hormonu salgısında pik meydana gelir. İnhibin B ve FSH artar (Düzova ve Emre, 2011). Bu dönemde FSH baskındır ve her ay yaklaşık 7. günde 6-12 follikül gelişir ve sadece 1 adet dominant hale gelir, gerisi atreziye uğrar. Follikülün gelişiminde en önemli hormon FSH ile birlikte östrojen hormonudur. Östrojenin önemli iki pik noktası vardır. Biri ovulasyondan hemen önce diğeri luteal fazın ortasında. Primer follikülerin gelişimi lokal faktörlerin etkisi altında iken sekonder follikülden preovulatuara kadar folliküllerin gelişimi FSH'ın kontrolündedir. Primer oosit önce etrafındaki granüloza hücrelerin mitozla çoğalması için aktivin salgılar. Çoğalan granüloza hücreleri stratum granüloza tabakasını oluşturduktan sonra ovaryumun intersitiyal hücrelerinden kaynaklanan iç hücreleri granüloza hücrelerin etrafını sararak teka adı verilen ikinci bir hücre kitlesini oluşturur. Teka tabakası teka interna ve teka eksterna diye iki tabakaya ayrılır. Teka eksterna damarsı bir yapıdır ve follikülün kapsülünü sara ve teka interna steroid yapıda androjenleri salgılar. Androjenler aromatöz etkiye sahip granüloza tabakasına geçerek östrojene ve östradiol dönüşür. Bu arada follikülün içinde antrumlar oluşur ve antrumlara östradiol birikerek sekonder follikül oluşur. Bu aşamadan sonra

gelişen tüm folliküllerde etkili olan hormon FSH'dır. Olgunlaşan follikülün boyu 1,5-2 cm ye ulaşacak kadar büyür ve graaf follikül oluşur. Graaf follikül sekonder oositi taşır ve bir süre sonra ovulasyona uğrar diğer folliküller atreziye uğrar (Köylü, 2014) (Şekil 13).



Şekil 13. Hipofiz, ovaryum, dolaşımda hormonal seviye ve uterus arasındaki ilişki (Ross ve Pawlina, 2014).

Yukarıdaki şekil incelendiğinde ovaryum siklusunun, pitüiterin gonadal hormonlar ile uterus arasında nasıl bir bağlantı olduğu görülebilir. Ovaryum folliküler evredeyken folliküller gelişmekte, pitüiter bezden FSH fazla miktarda salgılanır. Uterusta ise menstrual siklusun menstrual ve proliferasyon fazını gerçekleştirmektedir. Ovaryumda LH pikinden sonra ovulasyon gerçekleşmekte akabinde KL oluşmaktadır. Ovaryumda ovulasyondan sonra luteal evre başlamıştır. Ovaryum luteal evredeyken progesteron ve östrojen salgılanmakta, Pitüiter bezden FSH azalmakta ve LH salgısı devam etmekte ve aynı zamanda uterus sekretuar fazı gerçekleşmektedir.

Ovulasyonun gerçekleşmesi için LH yükselmesi, follikül duvarının yani granüloza, teka interna ve eksterna tabakası, tunika albuginea ve ovaryumun yüzey epitelinin açılması (erimesi) gerekir. Luteal evrede LH 8-10 kat artarken FSH 2-3 kat artar ve ovulasyon gerçekleşir. LH uterus proliferasyonunun 14. gününde pik yapar ve preovulatuvar follikül ovulasyona uğrar. 14. gün sabittir süresi değişmez çünkü KL'un ömrü 14 (Köylü, 2014) veya 10-12 (Junqueria ve Carneiro, 2009) günlüktür. Bu aşamada LH granüloza hücrelerinden PG, lökotrien ve plazminojen aktivatörü enzim salgılatır. Ovulasyondan önce kollejenaz enzimi artar. Prostaglandin ve lökotrienler teka eksternadaki ve follikül çevresindeki düz kasları uyararak permeabilite artar, vazokonstriksiyon ve vazodilatasyon vasküler değişikliklere yol açarak ovulasyona katkıda bulunur. Plazmin follikülün bazal laminayı parçalar ve kollejenaz ise teka ve tunika albugineada kollejen fibrillerinin parçalanmasını sağlar ve böylece stigma (makula pellusida) oluşur. Yarım saat stigmada follikül sıvısı sızmaya başlar ve iki dakika sonra follikül ve duvarını eriterek sekonder oosit onu çevreleyen korona radyata, kumulus ooforus ile birlikte bir miktar sıvıyla ovulasyon gerçekleşir, karın boşluğuna atılır ve fibriyalar tarafında yakalanır. Bazı durumlarda 2-3 ve daha fazla oosit atılabilir (çoklu gebelik) ve bazen de oosit hiç atılmayabilir (anovulatuvar) (Köylü, 2014).

Luteal evre

Luteal evre (14-28 günler) Luteal evre ovaryum siklusunun ovulasyondaki ikinci yarısıdır. Ovaryumun luteal evresi uterusun sekretuar dönemiyle paralel devam eder. Ovulasyondan sonra geriye kalan granüloza ve teka interna hücrelerinin değişime uğrayarak (lutein hücreleri), progesteron ve östrojen salgılayan endokrin bir yapı olan KL'a dönüşür ve bu salgılarla uterus uyararak sekretuvar dönemini oluşturur (Düzova ve Emre 2011). Lutein hücreleri çapı büyür ve lipid miktarı artarak sarımtırak (luteinizasyon) bir renk alır. Teka lutein hücreleri androstenedion ve testosteron salgılar ancak bunlar granüloza lutein hücrelerinde aromatoz enzimi sayesinde östrojene ve progesterona dönüşür. Ovulasyondan 4-6 gün sonra en yüksek seviyeye ulaşır ve 9-11 gün sürer. Korpus luteumun varlığı dölenme olup olmamasına göre değişiklik gösterir (Köylü, 2014). Dölenme olmazsa KL menstrüasyon KL'a dönüşür. 9-11 günlerde gerilemeye başlar. 14. günde KL doğal olarak otolize uğrar ve makrofajlarca ortadan

kaldırılır ve korpus albikansa dönüşür. KL'da salgılanan özellikle östrojen ve progesteron ile inhibin artması negatif geri besleme ile LH ve FSH salgılamasını baskılar. Korpus luteumun ömrü LH ve FSH seviyesine bağlıdır ve azalması dejenerasyonuna sebep olur. Korpus luteum gerileyip östrojen ve progesteron hormonlarının seviyesi düşünce hipofiz bezinden önce FSH sonra LH tekrar salgılanmaya başlar. Böylece yeni bir siklus tekrar başlar (Köylü, 2014) (Şekil 13). Dölenme olursa KL gebelik luteumu olarak adlandırılır. İmplatasyon sonrasında gelişmeye başlayan plesantada sinsityotrofoblastlar hCG salgılamasıyla KL gelişmesini sürdürür. hCG azalan LH'nin yerini alır. Doğumdan sonra Korpus luteum gerilerek korpus albikansa dönüşür (Köylü, 2014).

Ovaryum fonksiyonlarının düzenlenmesi ve hormonları

Ovaryum üç grup hormonun kontrolü altında çalışır. Bunlar : (1) Gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH); hipotalamusta arkuat çekirdekte salgılanır. (2) FSH ve LH: Adenohipofizden salgılanır ve salgıları GnRH ile başlar. (3) Östrojen ve Progesteron: FSH ve LH etkisinde ovaryumların salgılanır. Aylık cinsel siklus esnasında bu hormonların salgı miktarı değişkenlik gösterir. Hipotalamus-hipofizer-ovaryal aks kontrolü ile kadında birbirleri ile paralel iki siklus; ovaryum siklusu ve uterus siklusu ortaya çıkar (Köylü, 2014).

Çeşitli dış uyarılarla (kanda düşük östrojen ve progesteron seviyesi) GnRH sentezleyerek adenohipofizden FSH ve LH arttırmaktadır (Türköz ve Çelik, 2011). Arkuat çekirdeğindeki nöronlarda salgılanan GnRH bu nöronların uzantılarıyla hipotalamusun median eminence bölgesinde sonlanır. GnRH buradan hipofizal portal sistemle adenohipofize taşınır ve burada FSH ve LH salınımına sebep olur. GnRH salgısı asıl östrojen olmak üzere progesteron tarafında kontrol edilir. Östrojenin artması GnRH'nin salgısını azaltır. GnRH azalması FSH ve LH azalmasına sebep olur. Östrojenin azalması GnRH artmasına ve dolayısıyla FSH ve LH artmasına sebep olur (Köylü, 2014).

FSH ve LH glikoprotein yapısında büyük moleküllü hormonlardır. Her bir molekül alfa (α) ve beta (β) alt birimlerinden oluşur. FSH ve LH'nin biyolojik etkilerinden β alt birimleri sorumludur. FSH ve LH kan dolaşımı yoluyla ovaryumun

değişik hücre gruplarını etkileyerek steroid ve protein yapıda çok sayıda hormon sentezini ve üreme hücrelerinin (follikülleri) geliştirerek olgunlaşmasını düzenlemektedir (Türköz ve Çelik, 2011). FSH ve LH'nın overlerdeki spesifik reseptörlerine bağlanması overde follikül büyümesi ve olgunlaşmasını sağlarken aynı zamanda hem hipofiz hem de hipotalamusa geri besleme regülasyon sağlayan östrojen ve progesteronun salgılanmasını sağlar (Köylü, 2014). Primordial ve primer follikül gelişimini uyaran implus kesin olarak bilinmemekle birlikte, primer follikülden sonraki gelişim FSH bağımlıdır. Salınan FSH'nın çok katlı primer folliküldeki granüloza hücrelerinin membranlarında bulunan reseptörlerine bağlanması bu folliküllerin sekonder folliküle dönüşümünü uyarır aynı zamanda 17 β -estradiol (östrojen) üretimini sağlayan aromatoz enzimini ve FSH salınımının düzenlemesinde rol alan inhibin, aktivin, folistatin gibi diğer bazı hormonları da üretir. FSH ve LH etki mekanizması ikinci haberci olarak c-AMP üzerinden gerçekleşir. c-AMP, protein kinaz oluşmasını ve cinsiyet hormonlarının sentezini uyaran anahtar enzimlerin fosforilasyonunu sağlar. FSH ovaryumda granüloza hücrelerinde, LH teka interna hücrelerinde reseptörleri vardır ve bu hücrelere bağlanırlar. LH teka interna hücrelerindeki reseptörlerine bağlanması ve teka hücrelerinin oksidazlar ve 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz ile kolesterolü, androjenlere (androstenedion ve testosterona) çevirir, androjenler granüloza hücrelerine geçerek FSH'nın etkisiyle sentezlenen aromatoz enzimi ile östradiole dönüşür. Bu olaya 'iki hücre-iki gonadotropin teorisi' denir (Köylü, 2014) Ovaryum siklusunun folliküler evresinde 12-13. günlerde çok miktarda östrojen salgılanır. Artan östrojen pozitif geri besleme ile adenohipofizden LH salınımını aniden artırır. LH'nın ani artışı ilk önce ovulasyona daha sonra KL'un oluşmasına ve KL'dan progesteronun salgılanmasına sebep olur. Artan östrojen ve progesteron miktarı GnRH, FSH ve LH salınımını inhibe eder (Köylü, 2014).

Başlıca ovaryum hormonları; progesteron, östrojen, AMH, inhibin, aktivin ve folistatin hormondur. Androjen, östrojen ve progesteron steroid yapıda hormonlardır. Steroid yapıda hormonların tamamı kolesterolden, teka ve granüloza hücrelerinin iş birliği ile sentezlenmektedir (Türköz ve Çelik, 2011).

Östrojen başlıca ovaryumlar olmak üzere plesenta ve ovaryum dışı yapılardır (böbrek üstü bezler). Cinsel olgunluğa ulaşmış dişilerin kanında en baskın olarak

bulunan östrojen; 17 B-östradiol (E2), postmenapozal dönemde östron (E1), gebelikte ise östriol (E3) hormonudur. Progesteron, steroid yapılı 21 karbonludur ve kolesterolden sentezlenmektedir. Progesteron sentezi ovaryumlarda ve folliküllerde meydana gelmektedir. Bu dokularda kolesterol dezmolaz etkisi ile kolesterolden pregnenolon ve daha sonrada progesterona dönüşmektedir (Türköz ve Çelik, 2011). İnhibin-B granüloza hücrelerinde salgılanan bir glikoproteindir ve hipofizden FSH salınımını inhibe eder (Çitili ve Oral, 2011). Ovaryumda salgılanan önemli bir diğer hormon AMH'dır. Bu hormonu ayrı bir başlık altında aşağıda işlenecek.

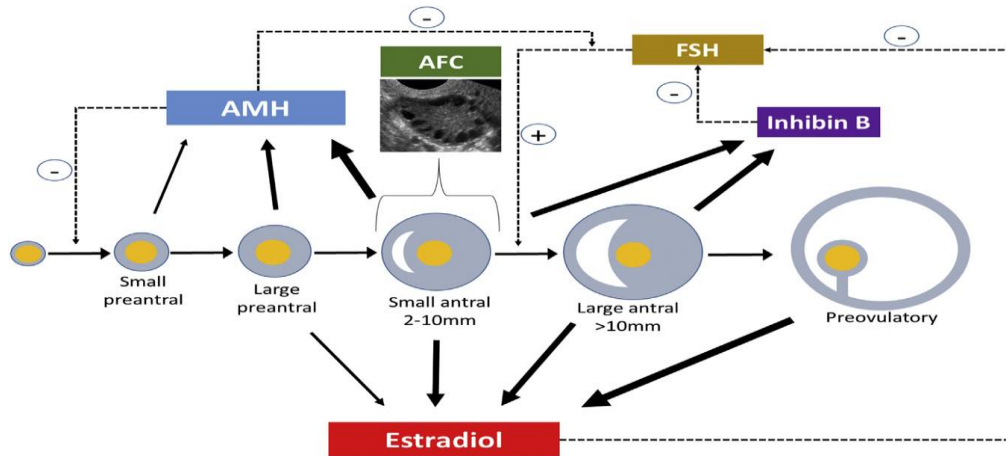
2.2. Anti-Müller Hormonu

AMH, transforme edici büyüme faktörü (TGF) süper ailesinin üyesi olan dimerik bir glikoproteindir. Sadece gonadlarda üretilir ve folliküler büyüme ve gelişmenin düzenlenmesine katılır (La Marca ve Volpe, 2006). AMH doğrudan preantral ve antral folliküllerden salgılanır ve follikül sayısındaki yaşla ortaya çıkan azalmayı yansıtan yararlı bir özelliğe sahiptir. Serum AMH düzeyleri, yumurtalık rezervini ölçmek için gonadotropin'den etkilenmediği için güvenilirliği yüksek bir belirteçtir ve AMH menstrüel sikluslar içerisinde veya arasında minimal değişkenlik gösterir (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine). Primordial folliküllerde AMH ekspresyonu gözlenmezken, primer folliküllerin granüloza hücrelerinin % 74'ü çok az sentezlenir. AMH ekspresyonunun en yüksek seviyesi, preantral ve küçük antral folliküllerin çapı <4 mm olan granüloza hücrelerinde salgılanır. Büyük (4-8 mm) antral folliküllerde, AMH ekspresyonu giderek kaybolur. İnsan AMH ekspresyonunda, follikülogenezde AMH'nin önemli bir rol oynamaktadır (Weenen ve ark., 2004). AMH'nin follikülogenez sırasında iki önemli düzenleyici aşamayı etkilemektedir. İlki, AMH primordial folliküllerin büyümekte olan havuza girmesini engellerken, ikincisi, AMH folliküllerin FSH hassasiyetini düşürür. Bu yolla, AMH, yumurtalık follikül büyümesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Gruijters, 2003). AMH konsantrasyonları, antral follikül sayısı ile bağlantılı olduğu gibi yaş ile de korelasyon göstermektedir. AMH konsantrasyonları yumurtalık yaşlanmasında yeni bir belirteç olabilir (de Vet, 2002). AMH (AMH) embriyonik dönemde erkeklerde testis Sertoli hücreleri tarafından, kadınlarda ovaryumda üretilir. Embriyoda üreme organlarının gelişiminde AMH önemli rol oynar (Moore ve Persaud,

2014). AMH'nın zayıf over yanıtını, antral follikül sayısı değerlendirilmesi ve aşırı yanıt veren ovaryumu da belirler (Kwee ve ark., 2007)

Yakın zamanda, AMH tip II reseptörü (AMHR II) ve mRNA'larının çoğunlukla preantral ve küçük antral folliküllerden granüloza hücrelerde eksprese edildiği belirlendi. KL'da, büyük antral folliküllerde, primordial folliküllerde ve oositlerinde az veya hiç salgılanmaz. Ayrıca AMH teka ve interstisyel hücrelerde de salgılanmaz. Folliküller atretik hale geldiğinde azalmış bir AMH seviyesi vardır. Sıçanlarda doğum sonrası 5. günde, toplam over AMH ekspresyonu düşüktür ve küçük preantral folliküllerde bulunur. Postnatal gelişmenin ilk haftalarında, preantral folliküllerde AMH ekspresyonu artar ve daha sonra oluşan küçük antral follikülleri de AMH eksprese eder (Baarends ve ark., 1995).

Günümüze kadar yapılan birçok çalışmada düşük serum AMH düzeylerinin azalmış over rezervi ile ilişkili olduğu ve siklus gününden bağımsız olarak over rezervi hakkında bilgi verdiği gösterilmiştir (Gruijters, 2003; van Rooij, 2002). Ovarian rezervinin en iyi tahmini, Transvajinal ultrason, inhibin B artışı ve ovaryumların bazal hacmini eşzamanlı olarak içeren çoklu regresyon tahmin modelinde belirlenebilir ancak AMH diğer yaygın olarak kullanılan ovarian rezerv testlerine göre daha çok tercih edilir (Şekil 14).



Şekil 14: Ovaryum follikülleri ve salgıları, AFC antral follikül sayısı (Tal ve Seifer, 2017).

Yukarıdaki şekil incelendiğinde AMH primer ve sekonder (çoğunlukla erken antral) folliküllerin granüloza hücreleri tarafından üretilir. Ayrıca östradiolun büyük preantral folikülden preovulatuara kadar tüm folliküllerden sentezlenmektedir. Preovulatar dönemde en büyük folliküllerde estradiol üretimi artar. İnhibin B, küçük ve büyük antral folliküllerin granüloza hücreleri tarafından üretilir. Hem östradiol hem de inhibitör B, FSH hipofiz sekresyonunu inhibe eder (Tal ve Seifer, 2017).

Transvajinal ultrason ile her iki yumurtalıktaki küçük antral follikül sayısı, kalan primordiyal follikül havuzunun boyutunu iyi yansıtabilir, fakat erken folliküler fazda transvajinal USG gerekmektedir (Scheffer ve ark., 1999). Serum AMH, Transvajinal ultrasona kıyasla daha az bireysel intra ve inter-siklus varyasyon gösterdiği ve bu nedenle subfertil kadınlarda over rezervinin değerlendirilmesinde daha güvenilir ve sağlam bir araç olarak düşünülür (van Disseldorp ve ark., 2010). Menstrüel döngü boyunca AMH konsantrasyonları sabittir. AMH ölçümünün en köklü rolü kadınlarda In Vitro Fertilization (IVF) tedavisine ve yumurtalık hiperstimülasyon sendromu riski taşıyan kadınların belirlenmesinde açık bir değere sahiptir (Anderson ve ark., 2012).

Serum AMH düzeyleri, bebeklikten çocukluk dönemine kadar hafif yükselir ve 15-18 yaşlarında maksimuma ulaşır ve bundan sonra AMH seviyeleri 20'li yılların başlarına kadar istikrarlı devam eder, 25 yaşından itibaren AMH seviyeleri yaş arttıkça azalır, serum AMH düzeyleri yaşla ters ilişkilidir (Lie Fong ve ark., 2012). Serum AMH düzeyleri yaşla birlikte azalırken, bu azalma, büyümekte olan follikül sayısındaki azalma ile doğrudan ilişkilidir (Kevenaar ve ark., 2006). Ayrıca kemoterapiden sonra doğurganlık riskinin değerlendirilmesi, PCOS (polikistikover sendromu) tanısında ve granüloza hücre tümörlerinde bir tümör işaretleyicisi belirlenmesinde kullanılmaktadır (Anderson ve ark., 2012). Ayrıca çocukluk çağındaki kanserlerin tedavisinden sonra yumurta yaşlanmasının riski taşıyan kadınlar için yararlı olmaktadır (Kevenaar ve ark., 2006). Bunun yanında yumurtalık tepkisinin kestirmek ve over yanıtları zayıf olan ve kadınların belirlenmesinde önemli bir yere sahiptir (Anderson ve ark., 2012). AMH'nin azalması primordiyal follikül havuzundaki follikül sayısının azalmasına bağlı olduğu da düşünülmektedir. AMH'yi yumurtalık follikülü havuzunun boyutu ve yumurtalık disfonksiyonu için ideal bir belirteçtir (Visser, 2006). Aynı zamanda serum AMH düzeyleri over rezervinin tarama testinden ziyade, kötü yumurtalık yanıtının tanısal bir

testi olabilir (Maheshwari ve ark 2009). Bununla beraber yumurtalık rezervi için geniş bir test yelpazesinin varlığı, tek bir testin yeterince kesin bir sonuç vermediğini göstermektedir (Johnson ve ark., 2006).

Büyüyen follikül sayısının primordial follikül sayısı ile korele olduğunu gözlenen fare çalışmasında, benzer şekilde, AMH düzeyleri ile primordial follikül sayısı arasında güçlü bir korelasyon tespit edilmiştir. Serum AMH seviyeleri yaşlanan farelerde primordiyal follikül havuzunun boyutunu yansıtmakta, bu nedenle, AMH, yumurtalık rezervinin kantitatif yönünü değerlendirmek için mükemmel bir belirteçtir (Kevenaar ve ark., 2006).

AMH değeri perimenapozal-menopozal dönemde 0,6 ng/ml'den küçüktür ve ovaryum rezervinin çok az veya hiç olmadığını ifade eder. Çok sayıda küçük follikül ile birlikte olan polikistik over sendromu, AMH düzeyini 2-5 katına kadar yüksek olabilir. Bu yüksek değerler ovulasyonsuz ve düzensiz döngülerin belirteci olarak değerlendirilebilir (Laven ve ark., 2004). Doğurganlığı ispatlanmış ve gebelik kaybı geçmişi olan kadınlarda AMH düzeyleri: düşük (<1.00 ng / ml, $n = 124$); normal (referansı $1.00-3.5$ ng / ml, $n = 595$); ve yüksek (> 3.5 ng / ml, $n = 483$) tespit edilmiştir. Sonuç olarak daha düşük ve daha yüksek AMH değerleri belirlenmiştir (Zarek ve ark., 2015).

Yaşlanma ile birlikte yumurtalık folliküllerinin kademeli olarak azalması primer, preantral ve antral folliküllerden salınan AMH ve inhibin B düzeylerinde azalmalara neden olur. Merkezi negatif geri beslemedeki azalmalar, hipofiz FSH salgılanmasında bir artışa neden olur. Bunu, geç luteal ve erken folliküler FSH düzeylerinde bir artış takip eder. Böylece, yeni folliküllerin daha erken büyümesi hızlanır; buna adet döngüsünün 2-3. günlerinde ölçülen bazal estradiol düzeylerinde bir artış olur. Folliküler fazın uzunluğu kısalır, bu da menstrüel siklusun toplam uzunluğunun da azalması demektir (Park ve ark 2016).

2.3. Non-Steroid Anti İnflamatuvar İlaçlar (NSAI)

NSAI kullanılmayan alanları, etki mekanizmaları yan etkileri benzer olsa da, kimyasal yapıları farklı ilaçlardır ve kimyasal yapılarına göre sınıflandırılırlar. Etki

güçleri ve farmakokinetik özellikleri farklı olmasına rağmen değişen derecelerde antipretik ve antiinflamatuvar etkiye sahiptir. Antitrombosit etki çoğunda görülür. Glukokortkoidler gibi antiinflamatuvar etki gösterdiklerinden dolayı aralarındaki farklılıkları belirtmek için NSAII olarak adlandırılırlar (Dural Esen, 2002)

NSAII'lerin hepsi az ya da çok güçlü COX inhibitörleridir. COX-1 ve COX-2 enzimini inhibe ederek PG sentezini baskırlar. NSAII'ler COX-1 ve COX-2'ye selektivitesi farklılık gösterebilir. Bazı NSAII'ler dışında (indometazin diklofenak gibi) çoğu LO enzimini etkilemezler (Dural Esen, 2002).

Yeni türevlerin dışında kimyasal yapı olarak zayıf asitlerdir. Yağda fazla çözünürler. GİS'den emilimleri iyidir. Değişen oranlarda (çoğunlukla yüksek oranda) plazma proteinlerine bağlanırlar. Bu ilaçların çoğu sinovyal sıvıya iyi penetre olur. Burada birikebilirler. Karaciğerde metebolize olurlar. Çoğu glukuronid konjugatları şeklinde böbreklerde atılırlar. Eliminasyon yarı ömürleri 1-2 saaten 70-80 saate kadar uzayabilen değişkenliktedir (Dural Esen, 2002).

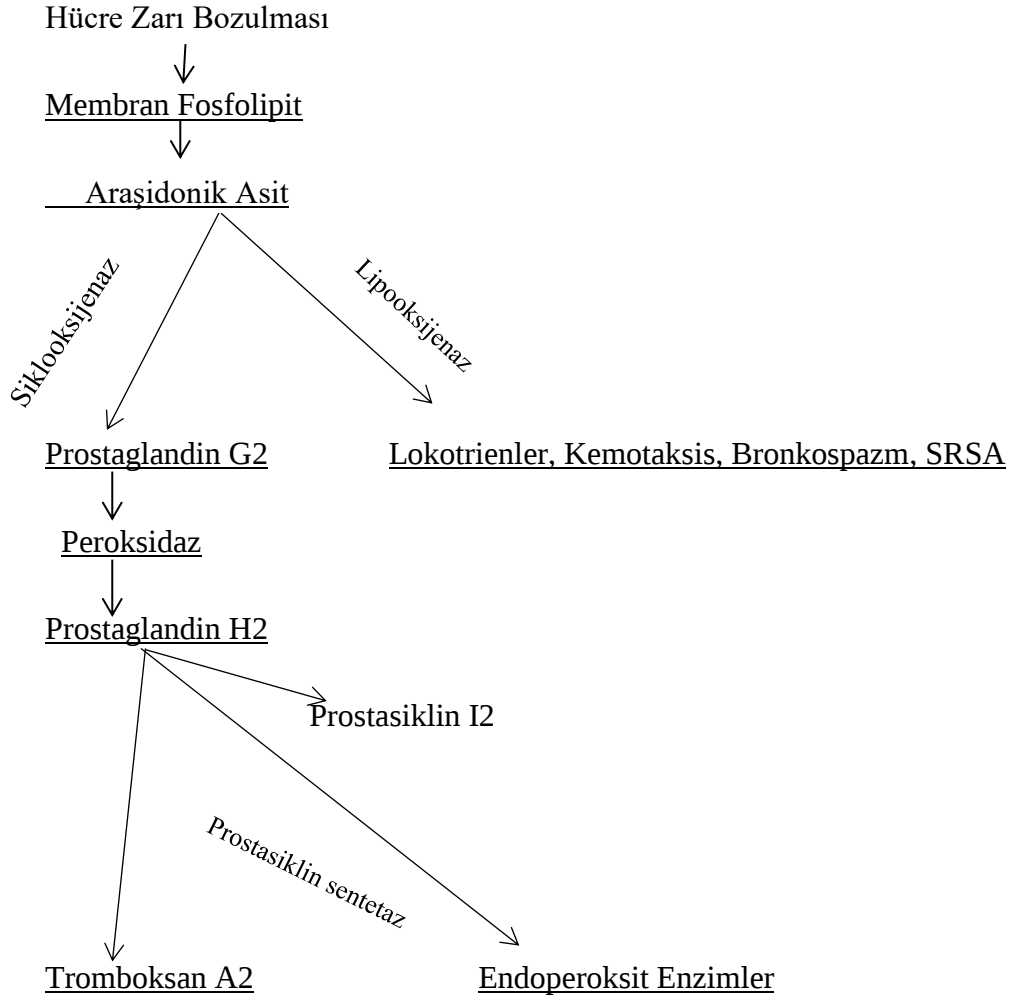
Eski Mısır ve Yunan yerlilerinin söğüt ağacı kabuğu, mersin ağacı yaprağı vb. bitkilerden ekstrakte ettikleri salisilatları ağrı, ateş ve ödemi tedavi etmekte kullandıklarına ilişkin kaynaklar bulunmuştur. 1763 yılında Edward Stone söğüt ağacı kabuğundan elde ettiği tozu, ateş düşürmek için kullanmıştır. Almanya'da 1860 yıllarında salisilik asidin sentez yoluyla elde edildi. 1875'ten itibaren sodyum salisilat tedavide antipretik olarak kullanıldı. Bayer'de kimyacı Felix Hoffman 1899'da asetil salisilik asitti sentez edilerek (aspirin) piyasaya sürdü. Aspirin, NSAII'lar için prototip olarak kabul edilmiştir. NSAII'ler aspirin benzeri ilaçlar adı altında tanımlanmıştır. Antiinflamatuvar ilaçlardan fenilbutazon 1949'da, indometazin 1963'te antiromatizmal olarak tedaviye girmişlerdir. Vane, 1971 yılında NSAII'ların etki mekanizmasının PG sentez inhibisyonu olduğu gösterilmiştir. Simmons ve ark. 1989, COX-1 ve COX-2 olarak COX enzimlerinin 2 izoform olduğunu tanımlamışlardır. Selekoksisib ve rofekoksib özellikle COX-2 enzim inhibitörleri olarak 1999'da kullanıma sunulmuştur. İlk NSAII'lerden sonra ibuprofen, naproksen, piroksikam, diklofenak, sulindak vb. pek çok NSAII sentez edilmiş ve hala kullanılmaktadır (Dural Esen, 2002).

2.3.1. Etki mekanizmaları

Antiinflamatuvar etki

Antiinflamatuvar etki; NSAII'ların antiinflamatuvar, analjezik ve antipiretik etkileri vardır. Bunların temel mekanizması periferide prostanooidlerin sentez enzimi olan COX'u (PG sentetaz) inhibisyon etmesidir. NSAII'ların sadece PG sentezinin engellenmez aynı zamanda kemotaksinin inhibisyonu, sitokinlerin oluşumunun azaltılması yaparlar (Dural Esen, 2002).

Kronik inflamasyonda lökositlerden serbestlenen lizozomal enzimler hücre membranındaki fosfolipidlerden araşidonik asidi ayırır. Araşidonik asitten siklooksijenaz enzimi (COX-1, COX-2) ile prostasiklin (PGI₂), PG, tromboksan A₂ açığa çıkar. LO enzimi aracılığı ile de lökotrienler sentezlenir (Şekil 15). Prostaglandinlerin ve lökotrienlerin inflamasyonun başlatırlar. En etkili inflamatuvar prostanooidler PGE₂ ve PGI₂'dir. İnflamasyonun akut fazında monositer makrofajlar ve epitelden serbestlenen sitokinler de önemli rol oynar. Özellikle interlokin -1 (IL-1) ve tümör nekroz faktör (TNF- α) inflamasyonda en etkinli sitokinlerdir. Sitokinler ateş, granüllü lökositlerin aktivasyonu, COX ve LO'un indüksiyonu ve öteki sitokinlerin uyarılar. Ayrıca COX-2'nin kolon kanseri gelişimini artırdığı belirtilmektedir. Aktif oksijen radikalleri de inflamatuvar reaksiyonlarda artar. NSAII'ların çoğunun inflamasyon lökotrienler ve diğer mediatörler üzerinde etkinlikleri yoktur. Buna karşın antiinflamatuvar etki gösterirler. Bu çelişki; NSAII'ların etki mekanizmalarının sadece PG sentez inhibisyonu olmadığını düşündürür. NSAII'lerin periferide prostanooidlerin sentezini baskılayarak lökosit inflamatuvar bölgeye göçünü ve kemotaksinin inhibisyonunu, fagositozun önlenmesini sağlar. Ayrıca sitokinerin (interlokin-1, TNF) oluşumunu azaltırlar. Aktif oksijen radikallerinin artışını engellerler. Lizozomal enzimlerin salınmasını baskılar. Bradikinine bağlı inflamasyon belirtilerini önlerler. Süperoksit üretimini baskırlar. Membranlardan fosfolipaz-C aktivitesini inhibe ederler. Kıkırdak metabolizmasını etkiler. Plazma proteinlerinden antiinflamatuvar peptid oluşumunu uyarır. Bazı NSAII'lar değişen derecelerde LO enzimini yolunu inhibe eder (Dural Esen, 2002).



Şekil 15. Hücre membranındı bulunan araşidonik asitten çeşitli enzimlerle oluşan prostanoidler (Gökçimen ve Malas, 2003).

Analjezik etki

Ağrı yapıcı kimyasal ve mekanik etkenler periferilerde PG sentezini artırır. PG ve PGE₂, bradikinin ve öteki aljezik mediyatörlere de nosiseptörlerin duyarlılığını artırır ve hiper-aljezik ağrı mediyatörleri olarak görev yaparlar. Siklooksijenaz enzimi (COX-1 ve COX-2) hiper-aljezinin santral ve periferik mekanizmalarını düzenlemekte oldukça etkilidir. NSAII'lar periferde PG oluşumunu baskılayarak nosiseptörlerin ağrı mediyatörlerine duyarlılığını baskılar. Ağrının algılanmasını azaltırlar. Ağrıdan başka duyuları etkilemezler. NSAII'lar periferik etkili analjeziklerdir fakat merkezi sinir sistemin'de de PG sentezini inhibe ederler ve santral yoldan da analjezi sağlayabilirler (Dural Esen, 2002). Hem geleneksel non-seçici NSAII'leri hem de selektif COX-2

inhibitörlerini içeren nonsteroid anti-inflamatuar ilaçlar (NSAII'ler) anti-inflamatuar ve analjezik etkileri için yaygın olarak kullanılmaktadır. NSAII'ler, ağrının biyokimyasal olarak tanınması ve iltihaplanma sürecinde COX yolağının bütünleşik rolü nedeniyle ağrı gidermede gerekli bir seçimdir (Simon, 1996).

Çeşitli etkiler

NSAII'ların terapötik etkileri de vardır. Menstürasyon esnasında endometriyumdan açığa çıkan PG'lerle oluşan primer dismenorenin şiddetli ağrıları ve diğer semptomları hafifletirler. Yeni doğanda geciken ductus arteriosus'un kapanmasını da sağlarlar.

NSAII'ların antitrombotik istenmeyen etkilerdir. NSAII'lar trombositlerin COX'ını inhibe ederler. NSAII'lar tromboksan A2 ile PG sentezini engellerler. Böylece trombosit agregasyonunu engellenir ve kanama zamanını uzatır. Antitrombotik etkisi geri dönüşümsüzdür. Bundan dolayı aspirin kardiyovasküler hastalarda koruma amaçlı kullanılır (Dural Esen, 2002).

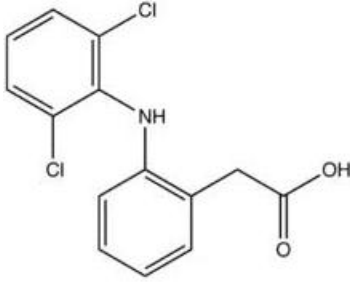
NSAII'larla prostaglandin sentezi inhibisyonu

COX-1 normalde gastro intestinal sistemde, böbrekte, trombositlerde ve endotelial hücrelerde fazla miktarlarda salgılanır. Tromboksan A2 ve PG'lerin oluşumuna aracılık eder. COX-1, midede PGE2 ve PGI2 sentezini sağlar. PG'ler normalde hücrel olayları düzenler. Özellikle mide mukozasının bütünlüğünü korur yani koruyucu etkiye sahiptir. Ayrıca trombosit fonksiyonunu düzenler. Vasküler hemostaza aracılık ederler. Böbrek kan akımını ve fonksiyonlarını düzenlerler (Dural Esen, 2002).

COX-2 izoformu indüklendiğinde ortaya çıkar. Fizyolojik durumlarda birkaç özel dokuda, düşük düzeyde bulunur. COX-2 böbrek gelişiminde, ovulasyon ve doğumda, bilinmeyen beyin fonksiyonlarında PG oluşumuna aracılık eder (Dural Esen, 2002).

2.3.2. Diklofenak sodyum

Beher üç ml'lik steril ampul; 75 mg DS; 30 mg mannitol; üç mg asetilsistein; 105 mg benzil alkol; 600 mg Propilen glikol; 0,7 mg sodyum hidroksit ve yeteri miktarda enjeksiyonluk su içerir (Şekil 16) (Novartis ilaç sektörü İstanbul Türkiye).



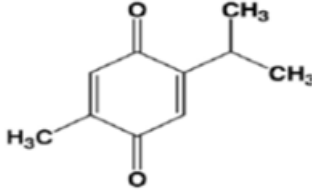
Şekil 16. Diklofenak sodyum kimyasal yapısı (Novartis ilaç sektörü İstanbul Türkiye).

Fenil asetik asit türevidir. DS güçlü COX inhibitörüdür. Lökotrienlerin sentezini de engeller. Lökositlerden salınan araşidonik asidin intraselüler konsantrasyonunu azaltır. Oral yoldan alındığında emilimi iyidir. DS 25 dakika ile 6 saat arası kanda konsantrasyonu doruk noktaya ulaşır. Plazma proteinlerine %99 oranında bağlanır. Sinovyal sıvıda birikir ve böylece etkisi uzun sürer. Sistemik biyoyararlanımı ilk geçiş etkisinden dolayı %50 oranında azalır. Karaciğerde DS metabolize olur. Bu metabolit ve diğer hidroksillenmiş şekilleri büyük oranda idrarla, %35 oranında da safraya atılır. Eliminasyon yarı ömrü 1-2 saattir. Romatoid artrit, osteoartrit ve ankilozan spondilitin uzun süreli tedavisinde oldukça etkilidir. Diklofenak sodyum veya potasyum tuzu şeklinde kullanılır. Parenteral yoldan kullanmak için (im. enjeksiyon) ve cilde lokal uygulamaya özgü jel şeklinde preparatları, solüsyonları, supozitivarları ve oftalmik preparatları vardır (Dural Esen, 2002).

DS ile de uzun süreli tedavi sırasında kan sayımları yapılması tavsiye edilir. Diğer NSAII ilaçlar gibi, trombosit agregasyonunu geçici olarak inhibe edebilir. Hamilelik esnasında, sadece mecbur kalınan durumlarda ve etkili en düşük dozunda uygulanmalıdır. DS için de hamileliğin özellikle son 3 ayı için geçerlidir (uterus tembelliği ve/veya ductus arteriosusun erken kapanması olasılığından dolayı). Günde 3 defa verilen 50 mg'lık oral dozları takiben, etken madde süte geçer, fakat bebekte istenmeyen etki oluşturmamak kadar küçük miktarlardadır (Abacıoğlu ve ark., 2004).

2.4. Timokinon

TQ (C₁₀H₁₂O₂, 2-izopropil-5-metil 1, 4-benzokinon) çörek otu uçucu yağında % 18,4-24 oranında bulunan en önemli biyoaktif bileşendir (Pari ve Sankaranarayanan, 2009) (Şekil 17).



Şekil 17. TQ'nun kimyasal yapısı (Pari ve Sankaranarayanan 2009).

Bitkinin faydalanılan kısmı tohumlarıdır. Tohumları Ortadoğu ve Hindistan'da bahat olarak kullanılmaktadır. Ayrıca tıpta gaz ve idrar söktürücü, bronşit öksürüğü hafifletici, anne sütü arttırıcı, bel gevşekliği, solucan düşürücü, tansiyon düşürücü, sarılıkta, soğuk algınlığı, çeşitli romatizma, astım, kullanılmaktadır (Baytop, 1984; Koç, 2002).

NS (çörek otu)'nın anavatanı Doğu Akdeniz ve Güney Avrupa veya Batı Asya olarak bilinmektedir. İkinci vatanı olarak Kuzey Amerika, Hindistan ve Türkistan'dır. Ülkemizde yabani olarak bulunur. Birçok ilimizde tarımı yapılmaktadır. Ülkemizde 12 kadar Nigella türü yetişmektedir. NS tek yıllık bir bitkidir. Fazla sayıda ince iplik şeklinde dikine gelişen gövde, kök ve otsu bir yapıya sahiptir. Üç parçalı yaprakları, beyaz, açık-mavi, sarımsı hermofrodik çiçekleri, siyah tohumlu bir bitkidir. Tohumun 2.5-4x1.5-2.8x1 mm ebatlındadır (Koç, 2002) (Şekil 18 ve 19).



Şekil 18. *Nigella sativa* bitkisi (Anonim-1) Şekil 19. *Nigella sativa* tohumu (Anonim-2)

2.4.1. Kimyasal bileşenleri

NS yağı'nın içindeki aktif bileşenlerin TQ, ditimokinon, timohidrokuinon ve timol bileşiklerin içermektedir (Ghosheh ve ark., 1999). NS tohumlarının yüksek miktarda yağ (% 30-48) içerdiğini ve ana doymamış yağ asitleri; linoleik asit, oleik asitin, doymuş yağ asitleri; sırasıyla palmitik stearik ve miristik asitler, tokoferol içeriği açısından zengin ve antioksidan olduğu bildirmiştir (Al-Naqeeb ve ark., 2009). Bunlara ilaveten sabit yağlardan linoleik asit (% 55,6), uçucu yağ başlıca bileşikler, trans-anetol (% 38.3), p-simen (% 14.8), limonen (% 4.3), ve karvon (% 4.0) bildirmişlerdir. Başka bir yayında uçucu yağın ana bileşenleri; para-simen (% 54.13), alfa-tüjen (% 10.43), hidrokarbol (% 10.40), uzun oyplen (% 6.97), beta-pinen (% 3,10) ve diğer bileşenlerin miktarı eser miktarda bulunmuştur (Nickavar ve ark., 2003). Diğer bir çalışmada fixed oil %32-%40, volatile oil %0,4-%0.45, protein %16-%19.9, minerals %1.79-%3.74, karbonhidrat %33.9, fiber %5.5, su %6 oranlarını bulmuşlardır (Randhawa and Al-Ghamdi, 2002).

Yapılan çalışmalar NS, anti-kanserojenik, anti-tümöral (Badary, 1999), anti-ülserojenik (Kanter, 2008), anti-bakteriyel (Halawani 2009), anti-inflamatuar ve analjezik, anti-nosiseptif (Randhawa and Al-Ghamdi, 2002), anti-oksidan (Badary ve ark., 2000), hipoglisemik (Badary ve ark 1998; Badary, 1999), anti-diyabetik (Fararh ve ark., 2005) özellikleri vardır. Ayrıca anjiyogenezi azaltmakta ve bağışıklık sistemini güçlendirici (Salem, 2005) etkilerinin olduğunu da bildirilmiştir. Hormona dirençli

prostat kanserinin yanı sıra hormona duyarlı tedavide etkili olmaktadır (Kaseb ve ark., 2007). TQ kronik toluene maruz kalan sıçanlarda meydana gelen norodejenerasyona karşı potansiyel koruyucu etkiye sahip (Kanter ve ark., 2005).

2.4.2. Etki mekanizmaları

Anti-oksidan etki

NS güçlü bir süper oksit anyon temizleyicisidir (Badary ve ark., 2000). İnsan merkezi sinir sistemde taklit eden deneysel otoimmün ensefalomyelit fare modelinde, TQ'nun antioksidan etkiler % 90 oranında koruyucu ve % 50 oranında tedavi etmektedir (Mohamed ve ark., 2009).

Anti-diyabetik etki

TQ kan glikoz seviyesinin düşmesine neden olmaktadır ve antihiperglisemik potansiyelini belirlenmiştir. Bununla beraber hipoglisemiye neden olmamaktadır (Pari ve Sankaranarayanan, 2009). N. sativa yağının, β -hücrelerinin fonksiyonu üzerinde uyarıcı bir etkisini olduğunu, serum insülin düzeyinde artışın sonucu N. sativa yağının tip 2, benzeri insülinotropik özelliklere sahip olduğunu gösterilmiştir (Fararh ve ark., 2005). Diğer bir çalışmada; STZ ile diyabet oluşturulan farelerde gebelik esnasında TQ verilmesinin embriyoların maturasyonu ve büyüklüklerinde artışa neden olduğu ve serbest radikalleri azaltıp embriyo malformasyon oranlarını düşürdüğü bildirilmektedir. Bazı çalışmalarda antidiyabetik etkisinde dolayı pankreasın langerhans adacıklarındaki rejenerasyonunun rol oynadığını göstermişlerdir. Sonuç olarak, NS, β -hücrelerini oksidatif strese karşı korumak için klinik olarak faydalı olabileceğini bildirmişlerdir (Kanter ve ark., 2004).

Anti-tümoral ve anti-kanserojenik etki

TQ'nun apoptoz indüklediği ve S ve G 1 hücre döngüsü üzerine etki göstererek kanser hücrelerini öldürdüğünü ve kanserli olmayan hücrelerin ise TQ'na nispeten dirençli olduğunu göstermişlerdir (Shoieb ve ark., 2003). TQ'nun deri tümörlerine karşı güçlü kimyasal tepki önleme faaliyetlerine sahiptir. Hücrelerin TQ'nun büyümeyi önleyici etkilere karşı G0 / G1 hücre döngülerini baskılar. Özellikle tümör gelişiminin

erken evrelerinde, TQ'nun kemopreventif bir madde olarak potansiyel bir rolünü desteklemektedir. TQ ve ditimokinon, sitotoksik etkisini, hücre G1 fazında iken apoptozu tetikleyerek durdurmaktadır. Hücre büyümesinin durdurulması ise p53'ün gen ekspresyonu ile protein ekspresyonunun arttırılması ve anti-apoptotik, anti apoptik gen (Bcl-2) proteininin inhibe edilmesi ile sağlanmaktadır (Gali-Muhtasib ve ark., 2004a). TQ'nun göğüs ve ovaryum adenokarsinomu (kolorektal kanser) gibi pek çok kanser çeşidinde hücrelerin proliferasyonu üzerine inhibitör etki göstermektedir (Gali-Muhtasib ve ark., 2004b). Hücre kültürü ile yapılan bir çalışmada; hücre ölümüne ve tümör büyümesini inhibe edici aktivitelere ek olarak, TQ'nun anjiyogenez ve metastaz dâhil olmak üzere diğer tümör oluşturuıcı süreçleri hem in vitro hem de in vivo etkilediği bulunmuştur. Üstelik osteosarkomda TQ'un antitümör ve anti-anjiyogenik aktivitesinin olası bir altta yatan mekanizması, Nükleer Faktör kappa B'nin ve aşağı akış efektör moleküllerinin inhibisyonu olduğunu belirtilmiştir (Peng ve ark., 2012). Nigelle satıva 'nın etanolik ekstraktının kolon tümörlerinin ilerlemeyi geciktirebildiğini, yayılmayı kısıtladığını ve kolon tümörlerinin agresifliğini hafiflettiğini bildirmişlerdir. Böylece, NS'nın etanolik ekstraktının kolon kanserinin birincil korunmasında umut verici bir aday olabileceğini bildirmişlerdir (Asfour ve ark., 2013). Kolon kanseri ve lösemi tedavisinde TQ zengin fraksiyonunun ve TQ'nun potansiyel kullanımını desteklediğini belirtilmektedir (Norsharina ve ark., 2011).

Kardiyovasküler etki

NS'nın uçucu yağının, merkezi etkili antihipertansif bir ajan olma potansiyeline sahip olduğunu belirtmiştir (El Tahir ve ark., 1993). (0.5mg/kg/gün) TQ verilen sıçanlarda ortalama arteriyel basınç sırasıyla yüzde 22 ve yüzde 18'e düştü ve aynı zamanda diüretik olduğunu belirtilmiştir (Zaoui ve ark., 2000). TQ'nun enzimatik ve enzimatik olmayan sistemlerde in vitro süperoksit radikal üretimini inhibe ettiği, sıçanlarda nitro-l-arginin metil esterlerinden kaynaklanan, hipertansiyon ve böbrek hasarı karşı koruduğunu belirtmişlerdir (Khattab ve Nagi, 2007). Kalbi ve diğer hayati organları iskemiye karşı korur ve miyokardiyal enfeksiyon ve iskemi-iskemi olaylarını azaltmaktadır (Bader, 2015).

Karaciğer üzerine koruyucu etkileri

Kurşun asetatı maruz kalan hayvanların NS ile kombine tedavisi hem biyokimyasal hem histopatolojik bulguların yanı sıra hasar gören alanlarda azalma olduğunu gösterilmiştir (Farrag ve ark., 2005). TQ'un güçlü bir süperoksit radikal süpürücüsü olduğunu, uzaklaştırma gücünün süperoksit karşı süperoksit dismutaz kadar etkili olduğunu belirtilmiştir (Nagi ve Mansour, 2000). NS'nın hepatotoksistide lipid peroksidasyonunu önlemek, antioksidan savunma sistemini aktivitesini arttırmak ve karaciğer hasarını önlemek için kullanılabileceğini böylece karaciğeri koruduğunu göstermişlerdir (İlhan ve Seçkin, 2005). Başka bir çalışmada TQ'un lipid peroksidasyonu ve inflamasyonda azalma ve ayrıca apoptozu kesintiye uğratarak karaciğer ve böbrek dokusunda etanol toksisitesine karşı koruyucu etkileri olabileceğini göstermişlerdir (Hosseini ve ark., 2017). Laboratuvar hayvanlarına oral olarak verilen TQ'nun kimyasal karsinogenlere ve toksisiteye karşı umut verici profilaktik tespit edilmiştir (Nagi ve Almakki, 2009).

2.5. Stereoloji

Yunancada stereoloji terimi, üç boyutlu cisim anlamına gelen “stereos” kelimesinden türemiştir (Mouton, 2002). Stereoloji, üç boyutlu örneklerin, iki boyutlu kesitlerinden elde edilen veriler kullanılarak, gerçekte üç boyutlu özelliklerine ait yorumlar yapmaya yarayan bilim dalı olarak tanımlanmaktadır (Mayhew ve Gundersen,

1996). Stereoloji hemen hemen bütün bilim dalları tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır. Makroskobik ve mikroskobik yapıların morfolojisi, organ ve yapılardaki hücre sayısı, organın uzunluğu, hacmi, yüzey alanı, hacim bileşenleri gibi geometrik özellikler stereolojik yöntemler kullanılarak hesaplanabilmektedir. Klinikte hastalıkların teşhisi, etkilerinin belirlenmesi, tedavinin ya da cerrahi uygulamalarının takibi gibi konularda stereoloji sıklıkla kullanılmaktadır (Akalan ve Çevik Demirkan, 2013). Biyolojik yapılardaki taneciklerin toplam sayılarının veya birim hacime düşen sayısal yoğunluklarının belirlenmesi, birçok çalışma için vazgeçilmez bir parametredir (Ünal ve ark., 2002). Bu parametreye stereolojik çalışmalarla ulaşılabilmektedir.

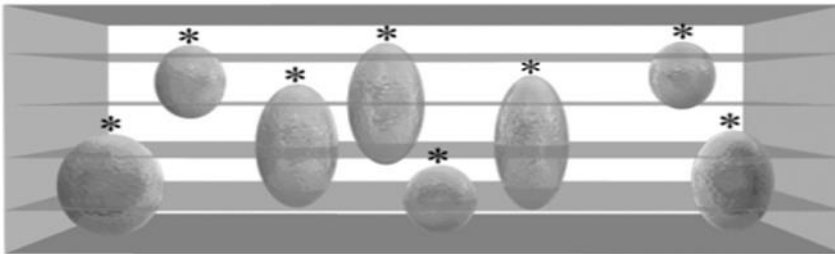
Mikroskop altında incelenen yapıların tümü, gerçekte üç boyutlu yani uzunluk, genişlik ve yüksekliğe sahip öğelerdir. Oysa bunların mikroskobik incelemelerinde kullanılan kesit görüntüleri, yapıların iki boyutu (x ve y eksenleri) hakkında fikir verirken, derinlik (z ekseni) ile ilgili olarak araştırmacıya doğrudan bilgi sağlamamaktadır. 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. Daha sonra ilgilenilen objeleri üç boyutlu olarak değerlendiren yaklaşımlardan biri olan "disektör" metoduyla, yapıların derinlik boyutu da göz önüne alınarak yöntem geliştirilmiştir. Böylece daha güvenilir sonuçlar elde edilmiştir (Ünal ve ark., 2002). Disektör ilk kez Cruz-Orive tarafından tarif edilmiştir. Cruz-Orive göre stereoloji, bir nesnenin geometrik ve istatistiksel yapısı hakkında nicel bilgileri elde etmek için nesnenin kesitlerini kullanan bir yöntem olarak tanımladı (Cruz-Orive, 1993). Disektörün temel mantığı, taneciklerin kesit alma doğrultusu boyunca ilk ortaya çıktıkları veya son görüldükleri kısımları, yani taneciklerin “uçlarını” bulmaktır (Gundersen ve ark., 1988a). Her taneciğin şekli ve yöneliminden bağımsız olarak, bir yönde bir tek ucu olduğu düşünülürse, bu mantıkla gerçek tanecik sayısına ulaşılması sağlar. Disector yöntemi kullanılarak yapılacak bir çalışmada, herhangi bir sayısal çokluk; ilgilenilen objenin büyüklüğü, biçimi, doku içindeki yerleşimi, alınan kesitlerin kalınlıkları ve dokuların büzüşme veya genişlemelerinden doğabilecek faktörlerden etkilenmeksizin hesaplanabilmektedir (Sterio 1984). Sahip olduğu bu özellikleri nedeniyle disektör yöntemi sayısal biyolojik çoklukların hesaplanmasında bilinen en tarafsız ve etkin yöntemdir (Ünal ve ark., 2002). Disektör yöntemi, iki boyutlu iki kesit

düzleminin kullanılmasıyla oluşturulan üç boyutlu bir "sonda" yardımıyla, bilinen bir hacimde yer alan taneciklerin sayılarını, şekillerinden, büyüklüklerinden ve yönelimlerinden bağımsız olarak belirleyebilme olanağı sağlar. Dolayısıyla, bu yaklaşımın temeli, belirli bir "t" mesafesi ile birbirlerinden ayrılmış iki paralel kesit düzleminden oluşmaktadır. Disektör metodu ile yapılacak sayımın kuralları da oldukça basittir. İzdüşümü bu kesit çiftlerinden sadece birinde gözlenip diğerinde gözlenmeyen tanecikler sayıma dâhil edilir. Stereoloji terminolojisinde, bu şekilde sayılabilen tanecik izdüşümleri "disektör taneciği" olarak isimlendirilir ve " Q^- " simgesi ile gösterilirler. Charleston bu yöntemle, sinapslar, nöronlar ve kanser hücreleri, glomerüler cisimler ve yumurtalık follikülleri dâhil olmak üzere geniş bir histolojik uygulamalarının pratik örnekleriyle gösterilmiştir (Gundersen ve ark., 1988a).

Stereoloji tarafsızlık, etkinlik, sistematik rastgele örnekleme (SRÖ) esaslarına dayanır. "Tarafsızlık"; gerçek değerden sistematik bir sapma göstermemek, "etkinlik" ise makul bir sürede minimum değişkenlik göstermek demektir (Gundersen ve ark., 1988a). Etkinlik, yapılacak biyolojik araştırmada kaynakların (materyal, malzeme, zaman) optimum düzeyde kullanılması böylece gerçek değere en yakın değeri bulmayı, yani daha kısa zamanda daha az hatalı iş yapmayı ifade eder (Gundersen ve Jensen, 1987; Mouton, 2002). SRÖ "sistematik" sözcüğü, ilgili yapıdan alınan kesitlerin veya kesit üzerindeki inceleme alanlarının önceden belirlenmiş aralıklarla, yani sistematik aralıklarla örneklenmesidir. "Rastgele" sözcüğü ise bu sistematik örneklemenin örnekleme aralığı içerisinde rastgele bir sayı ile başlamasını ifade eder ve böylece yapının her noktası eşit olarak örneklenme şansına sahip olur (Gundersen ve ark., 1988a). Çünkü mikroskopik analizlerde üzerinde çalışılacak biyolojik dokunun örneklenmesi sistematik taraflılıktan uzak değildir. Örnekleme yapılacak nesnenin her bir parçası eşit oranda örneklenme şansına sahip olmalıdır (Cruz-Orive, 1999). Nesnenin her parçasına örneklemede eşit şans verilerek örneklemenin taraflılığı önlenir (Howard ve Reed, 1998). SRÖ, rastgele yapılan örnekleme göre istatistiki anlamda gerçeğe daha yakın sonuçlar elde edilmesini sağlar (Gundersen ve ark., 1999). SRÖ, önceden belirlenmiş sabit bir örnekleme aralığı boyunca, ilk aralık içinden rasgele bir noktadan başlamak suretiyle, ilgilenilen yapının tamamının sistematik bir şekilde örneklenmesini içerir. Örneğin, her 40. kesiti veya parçayı seçmeye karar verildiğinde ilk 40 kesit içinde rasgele bir kesitle başlanması, örneğin 7-8 kesit çifti alındığında, bir

sonraki kesit çiftleri ise 47.-48., 87.-88., gibi kesit alma devam edilir. Böylelikle örnekleme rasgeleli özelliğini sağlar (Canan ve ark., 2002a). SRÖ, rastgele yapılan örnekleme göre istatistiki anlamda gerçeğe daha yakındır (Gundersen ve ark., 1999). Burada “sistematik” sözcüğü, dokudan alınan kesitlerin önceden belirlenmiş aralıklarla, yani sistematik aralıklarla örneklenmesini, “rastgele” sözcüğü ise bu sistematik örnekleme aralığı içerisinde ilk aralığın rastgele bir sayı ile başlamasını ifade eder (Gundersen ve ark., 1988a).

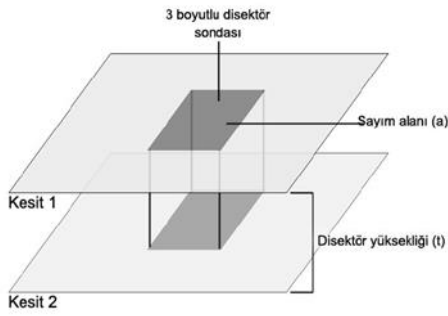
Stereolojik bir çalışmaya başlanacağı zaman ilk önce bir ön çalışma yapılır. Ön çalışmada; sayılacak taneciğin sayısal miktarı, boyutunun büyüklüğü, kesit kalınlığının, dokuyu temsil edecek oranda en az miktarda preparat sayısının belirlenmesi, uygun histolojik takip ve boyama işleminin seçilmesi çalışmayı en iyi şekilde tamamlamayı sağlar. En küçük tanecik çapın göre kesit kalınlığı belirlenir. Çünkü büyük taneciğe göre belirlenirse daha küçük tanecikler kesit düzleminde daha az görülecektir (Şekil 20). Kesit kalınlığı sayılacak taneciğin çapının üçte biri ya da dörtte biri kadar olmalıdır (Ünal ve ark., 2002). Örneğin primordiyal follikül çapı yaklaşık 25-30 μm 'dır (Eşrefoğlu, 2011). Kesit kalınlığı yaklaşık $25/3 \approx 7$ μm 'dır. Hata katsayısı 0.05 ve daha küçük (Cruz-Orive ve Weibel, 1990) verecek şekilde kesit sayısı belirlenir. Ön çalışmada sayılacak taneciğin sayısal miktarı bir kaç binlerle ve daha fazlaysa uygun örnekleme yapılır (West, 1993). Bunlardan biri dokuda fraksiyonlama yapmaktır (Canan ve ark., 2002b). Sayısal tanecik miktarı bir kesitte bir kaç yüz kadar ise fraksiyonlama yapılmayabilir, dokuda disektör yönteminin kuralına uyarak sayım yapılabilir (Gundersen ve Jensen, 1987; West, 1993). Fraksiyonlama fiziksel ve optik olmak üzere iki şekilde yapılır. Disektör sayım yöntemi de kendi arasında fiziksel ve optik disektör olmak üzere iki şekilde uygulanır (Gundersen, 1986).



Şekil 20. En küçük tanecik çapın göre kesit kalınlığının belirlenmesi (Ünal, 2002).

2.5.1. Fiziksel disektör

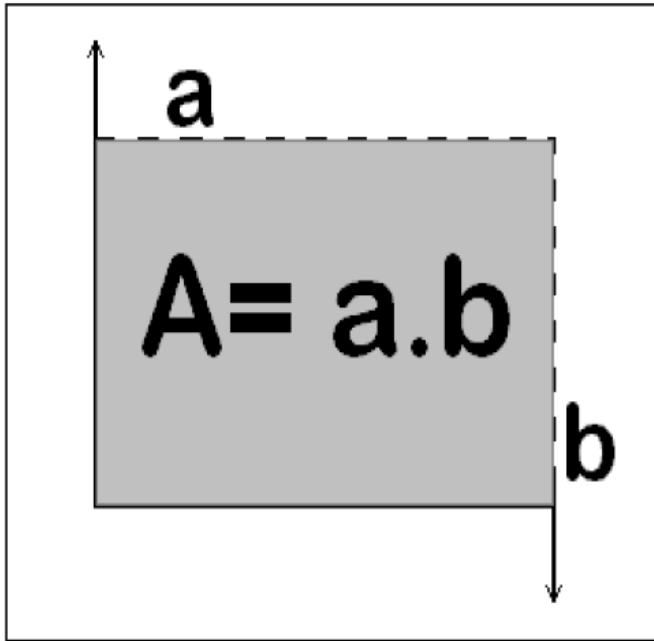
Disektör; bilinen bir "t" mesafesi ile birbirinden ayrılmış ardışık iki kesit düzleminden oluşan ve üç boyutlu (eni, boyu ve yüksekliği) sanal bir hacimde sayı parametresinin hesaplanmasına imkân veren bir yöntemdir. Ön çalışma ve fiziksel fraksiyonlamadan sonra doku takip işlemlerinden sonra mikrotomda kesit alacak hale getirilir. Kesit alma aşamasında, seri kesit düzlemlerinin birbirlerine paralel olması ve tüm kesitlerin aynı kalınlıkta olması oldukça önemlidir Sayılacak tanecik çapına göre kesit kalınlığı (disektör yüksekliği) belirlenir (Şekil 21) (Ünal ve ark., 2002).



Şekil 21. Disektör yönteminin esasları olan disektör sondasının şematik gösterimi (Ünal ve ark., 2002).

Bu aşamada disektör kuralına göre SRÖ yapılır. Örneğin 40 ta bir kesit alınacaksa ilk kesit rastgele 1-40 arasından seçilen bir sayıyla başlanır sonraki kesitler içinde bu sayıya 40 ilave ederek devam edilir (Canan ve ark., 2002b). Doku bitinceye kadar sistematik olarak devam edilir. Disektör yöntemi gereği lam üzerine ardışık iki kesit alınır. Bu iki adet kesit düzleminden birisi "örnek", diğeri "gözlem" kesiti olarak adlandırılır (Sterio, 1984). Disektör taneciğinin sayımı, örnek kesitinde bulunup gözlem kesitinde bulunmayan izdüşümlerin sayılmasıdır. Bazı dokularda sayılacak taneciğin çapı oldukça büyüktür. Örneğin böbrek glomerül çapı oldukça büyüktür. Böyle durumlarda ardışık kesit alınmaz. Gözlem kesiti alındıktan sonra arasında belirli sayıda kesit atılır ve gözlem kesiti alınır. Burada kesit kalınlığı artık disektör yüksekliği değil örnek ve gözlem kesitler arasındaki gerçek mesafeye eşit olacaktır. Disektör taneciğinin sayımı için belirli kriterlere göre sayılır. Burada taneciğin "uçları (alt veya üst)" sayılabildiği gibi, sayılacak taneciğin çekirdeği, follikül hücreleri, follikülün oosit çekirdeği (Mayers ve ark., 2004), glomerülü kapsülü, glomerülün (Ünal ve ark. 2002)

kendisi gibi kriterler göz önüne alınarak sayılabilir. Örneğin tanecik sayımı çekirdeğine göre yapılacaksa tüm kesitlerde aynı şekilde sadece taneciğin çekirdeği görülünce sayılır, kesitler karşılaştırılırken de aynı taneciğe ait ya da farklı taneciklere ait olan iz düşümlerin birbirinden iyi bir biçimde ayırt edilmesi gerekir. Sayım sırasında uyulması gereken kuralların biride her bir taneciğin sadece bir defa sayılmasını sağlamaktır (Gundersen, 1986). Kesitler karşılaştırıldığında birbirlerine karşılık gelen aynı alanların bulunması gerekir. Alanlar belirlendikten sonra, sayımların yapılabilmesi için, uygun büyüklükteki belli bir bölgenin bir sayım çerçevesiyle sınırlandırılması gereklidir. Bu disektör sayım metodunda en önemli basamağıdır. Sayım çerçeveleri arasında bilinen en tarafsız kurallara sahip olanı, ‘tarafsız sayım çerçevesi’dir (Şekil 22). Gundersen1977’te, ‘tarafsız sayım çerçevesi’ olarak adlandırılan bir sayım çerçevesi modeli geliştirmiştir (Ünal ve ark., 2002).



Şekil 22. Tarafsız sayım çerçevesi. Devamlı çizgiler yasak kenarları, kesikli çizgiler ise serbest kenarları göstermektedir. Çerçevenin alanı (A), iki kenarının çarpımı ($a \times b$) dir (Gundersen 1977).

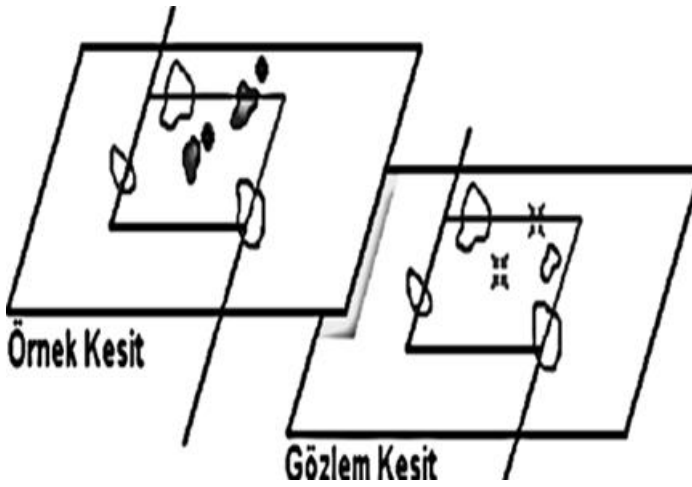
2.5.2. Tarafsız sayım çerçevesinin sayım kuralları

1- İzdüşümleri tamamen sayım çerçevesi içerisinde kalan, yani herhangi bir kenar veya köşeyle kesişmeyen tanecikler sayıma dâhil edilir.

2- Çerçevenin "yasak" çizgileri ile ifade edilen kenarlar ile kesişen izdüşümleri sayılmazlar.

3- Serbest çizgi ile temas eden tanecik izdüşümleri sayıma dâhil edilir.

4- Çerçevenin yasak çizgilerinin uzantıları ile herhangi bir şekilde kesişen izdüşümleri de sayıma dâhil edilmezler (Gundersen, 1977). Sayım çerçevesi ve sayım kuralları bir örnekle açıklanmıştır (Şekil-23).



Şekil 23. Kesitlerden biri (A) örnek, diğeri (B) gözlem kesitidir, örnek kesitte bulunup, gözlem kesitinde bulunmayan parçacık izdüşümleri, disektör parçacık (Q^-) olarak sayılır. Temel olarak, ince ve kesikli çizgiler “dâhil” kenarlar, kalın ve devamlı çizgiler de “hariç” veya “yasak” kenarlardır. Yani kesikli çizgilere rastlayan tanecikler sayılırken, devamlı çizgilere isabet eden tanecikler sayım dışı bırakılır. İşaretlenmiş (•) nesneler sayılırken diğerleri sayılmaz (Gundersen,1986).

Bu çerçevenin ve sayım kuralının temel mantığı, iki boyutlu düzlemlerde bir taneciğin yalnızca ilgili alanda örneklenmesini sağlamaktır. Şekil-22'de görüldüğü gibi, alınan iki ardışık kesitten, örnek kesitte bulunup, gözlem kesitinde bulunmayan tanecikler, disektör hacmi içinde (t kalınlıkta) sayılır. Tanecik izdüşümlerinin herhangi bir ucu şayet devamlı çizgilerle ifade edilen yasak bölge ve bunların uzantıları ile temas etmiyorsa sayıma dâhil edilir, temas ediyorsa sayıma dâhil edilmez. Disektör yöntemi uygulayarak, belli adımlarla, tüm kesitler üzerinde sayımlar yapılır. Sonuçta, disektör taneciklerini (Q^-) sayısal değeri belirlenmiş olur. Bu değerlerden yola çıkarak, birim

hacime düşen tanecik sayısını, ya da diğer bir deyişle sayısal yoğunluk (N_v) değerini aşağıdaki gibi hesaplanabilir:

$$N_v = \sum Q^- / \sum V_{dis}$$

N_v =Sayısal yoğunluk.

$\sum Q^-$ =Bir hayvan dokusunda hesaplanan toplam disektör parçacığı.

$\sum V_{dis}$ =Birim hacime düşen tanecik sayısı (Ünal ve ark., 2002).

Toplam tanecik sayısını hesaplamak için ise, yapının toplam hacmini bilinmesi gereklidir. Bunun için en uygun yöntem Cavalieri hacim prensibine göre hacim hesaplama yöntemidir. Tarafsız bir yöntemle elde edilmiş olan toplam hacim değeri, disektör yönteminden elde edilen sayısal yoğunluk değeri ile çarpıldığında, bize ilgilendiğimiz taneciklerin tüm yapıdaki toplam sayısının tarafsız bir hesabını verecektir (Ünal ve ark., 2002). Formül aşağıda verilmiştir.

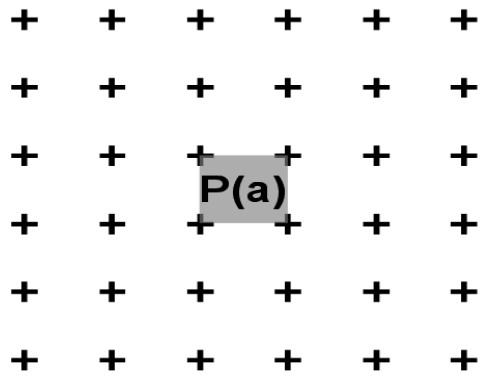
$$N = N_v \times V_{ref}$$

Doğrudan toplam sayı hesaplamasına yönelik fraksiyonlama yöntemi ile elde edilen oranların disektör kurallarına göre yapılan sayımların çarpımı, toplam sayıya ulaşmayı sağlayan bir başka örnekleme ve sayım yöntemidir (Gundersen, 1986).

2.6. Cavalieri Prensibi

Stereolojik yöntemlerde toplam hacmi hesaplamak için yaygın olarak Cavalieri prensibi kullanılır (Gundersen, 1988b). Oldukça basit ve ucuz olan Cavalieri prensibi, gerek makroskobik, gerekse mikroskobik tüm yapıların hacim ve onunla ilişkili ölçümlerinde rahatlıkla kullanabilir. Düzensiz şekilli nesnelerin hacmini hesaplamaya yarayan bu yöntem İtalyan matematikçi Bonoventura Cavalieri tarafından XVII yılında geliştirilmiştir. Cavalieri prensibini uygulamak için, hacmi hesaplanmak istenen yapı eşit aralıklar ile ve birbirine paralel olarak dilimlere ayrılır. Daha sonra ise her bir dilimin aynı yöne bakan kesit yüzeylerinin alanları hesaplanır ve tüm dilimlerden elde edilen yüzey alanları toplanarak, ortalama dilim kalınlığı ile çarpılır. Sonuçta elimizdeki yapının toplam hacmini tarafsız bir şekilde hesaplanır (Canan ve ark., 2002).

Cavalieri yöntemiyle hacim hesaplamak için ilk önce, kesitlerdeki alanlarını hesaplamaktır. Bu alanlar, bilgisayar destekli görüntü analiz cihazları aracılığıyla, planimetrik olarak izdüşümü alanlarını doğrudan ölçmektir (sterio programı). Bu yöntem oldukça hızlı ve güvenilirdir. Bu program yoksa bu program kadar güvenilirli kesitlerin bilgisayar görüntüleri üzerine konulan noktalı alan ölçüm cetvellerinden (Şekil 24) (genellikle, şeffaf bir asetata çizilmiş noktalar dizgesi) faydalanılarak hesaplanabilir. Noktalı alan ölçüm cetvelleri ve sterio programında noktalar birbirinden eşit aralıklarla ayrılmış noktalardan 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 (a/p) (Canan ve ark., 2002a).



Şekil 24. Noktalı alan ölçüm cetveli (Canan ve ark., 2002a).

Yukarıdaki şekilde cetvelde artı işaretlerini merkezleri ile simgelenen her bir nokta, $P(a)$ ile gösterilen bir birim alanı temsil eder. Dolayısıyla, böyle bir cetvel rasgele olarak bir kesit yüzeyine atılırsa, kesit yüzeyi içerisine isabet eden noktaların sayısı, bize o yüzeyin kaç birim kare olduğunu gösterecektir. Burada nokta sayımı yaparken kaçırlık objektifte dokuların görüntüsü çekilmişse; o objektifte büyütme oranı hesaplanır (Canan ve ark., 2002a).

Bu cetvel, büyütme derecesi doğru bir biçimde saptandıktan sonra, mikroskopta gözlenen, monitöre veya fotoğraflanmış her türlü görüntü üzerinde rahatça uygulanabilmektedir. Tek bilinmesi gereken, cetveldeki noktalar arasındaki uzaklığın, büyütme derecesine göre doku düzeyindeki gerçek uzunluğunun hesaplanmasıdır. Büyütme derecesini bulmak için mikrometrik disk kullanılabilir, Noktalı alan cetvelinin

nokta sıklığı; genellikle, sınırları iç içe karmaşık yapılanma gösteren izdüşümleri için daha sık, düzgün sınırlara sahip yapılar için daha seyrek noktalar yeterli olmaktadır. Nokta sıklığını için hata katsayısı ($CE < 0.05$ ten küçük olacak şekilde) mümkün olan en seyrek nokta dizgesini kullanılır. Noktalı alan cetveliyle kesitteki izdüşümü üzerine isabet edecek noktaların sayısı hesaplanır (Canan ve ark., 2002a). Bu noktalardan her biri belli bir birim alanı (a/p) temsil eder. İlgilendiğimiz izdüşümün sınırları içine düşen toplam nokta sayısının (ΣP_i) bu birim alan (a/p) değeriyle çarpımı, bize o kesitteki izdüşümün toplam alanının (Σa_i) tarafsız bir hesaplamasını verecektir. Noktalı cetvelde iki nokta arasındaki alan hesapladıktan sonra, toplam hacmi elde etmek için kesit kalınlığı ile (Gundersen, 1986), örnekleme oranı (Gundersen ve ark., 1988b) ve toplam nokta sayısı çarpılır.

$$\Sigma V = \Sigma P_i \times k \times t \times (a/p) \text{ (Gundersen ve ark., 1988b)}$$

ΣP_i =Noktalı alan ölçüm cetveli yardımıyla bir dokunun tamamında kaç nokta sayıldığını belirtir.

k =Adım aralığı, kaçta bir kesit çiftinin alındığını ifade eder.

t =Kesit kalınlığı.

(a/p) =Noktalı alan cetvelde bir noktanın temsil ettiği alan.

Bu değer daha sonra istenilirse histolojik işlemler sırasında doku büzüşme faktörü ilave edilir.

Nokta sayım yöntemi ile alan ve hata katsayısının (CE) hesaplanması (Noise): Genellikle nokta sayım yöntemiyle hacim veya hacim oranı hesaplamalarında, uygulanan yöntemin toplam değişkenlik hata katsayısı (CE) miktarı bir formülle hesaplanır (Canan ve ark., 2002a).

Hata katsayısı (coefficient of error, CE) değeri % 5 ve altında ise örnekleme stratejisinin uygun olduğuna karar verilir. Hata katsayısının % 5 den büyük olduğu durumlarda % noise 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 anlamına gelir. Bu durumda kesit sayısı arttırılarak hata

katsayısı istenen düzeye çekilir. % noise değeri 25 üzerinde ise kullanılan noktalı alan ölçüm cetvelinin nokta sıklığının yetersiz olduğu sonucuna varılır. Bu durumda nokta sayısı atılarak uygun değerdeki CE elde edilir (Canan ve ark., 2002a).

2.7. Cavalieri-Disektör Kombinasyonu

Morfometrik çalışmalarda, bir organın veya dokunun toplam hacimdeki toplam tanecik sayısı önemli bir parametredir (Ünal ve ark., 2002). Bir ovaryumun toplam hacminde primordiyal follikül, testisin toplam hacminde sertoli, leydig hücre sayısı hesaplamak için Cavalieri-disektör kombinasyonundan faydalanılabilir. Bu yöntemle kesit kalınlığı ölçümünü ortadan kaldırarak belli bir hacimde toplam tanecik sayısına ulaşılabilir. Burada esas olan, referans bir hacimde (V_{ref}), taneciğin sayısal yoğunluğu (N_v) aynı kesitlerden elde edilmesine dayanır. Sonuçta dokunun tamamındaki toplam tanecik sayısı (N), N_v ile V_{ref} çarpımından elde edilir,

$$N_v = \sum Q^- / \sum V_{dis} \text{ (Ünal ve ark., 2002)}$$

N_v =Sayısal yoğunluk

$\sum Q^-$ =Bir hayvanda hesaplanan toplam disektör parçacığı

$\sum V_{dis}$ =Çalışmada kullanılan dokunun toplam disektör hacmidir. $\sum V_{dis}$ ise aşağıdaki formül ile hesaplanır.

$$\sum V_{dis} = \sum p \times a(\text{çerçeve}) \times t$$

$\sum p$ =Disektör parçacığının sayıldığı alan sayısı

$a(\text{çerçeve})$ =tarafsız sayım cetvelinin alanı

t =kesit kalınlığına

Howard ve Reed, 1998'de dokunun tamamındaki toplam tanecik sayısı aşağıdaki formülle ifade etmiştir.

$$N = N_v \times V \text{ (Howard ve Reed, 1998).}$$

N =Toplam follikül sayısı.

N_v =Disektör taneciğın sayısal yoğunluğu.

V =Disektör taneciğı sayıldığı dokunun hacmi (Cavalieri prensibine göre hesaplanan hacim)

N_v değeri aynı zamanda Howard ve Reed, (1998) de aşığıda belirtilen formüllerde ifade etmişlerdir.

$$N_v = \frac{\sum Q^-}{\sum p \times a/f \times h} \quad (\text{Howard ve Reed, 1998})$$

N_v =Sayısal yoğunluk

$\sum Q^-$ =Bir dokuda toplam disektör taneciğı

$\sum p$ =Disektör parçacığın sayıldığı alan sayısı

h =Kesit kalınlığı

a/f = a (çerçeve)=Toplam disektör partikülünün sayıldığı tarafsız sayım çerçevenin alanı.

Cavalieri prensibi hacim formülü aşığıda gösterilmiştir.

$$V = \sum V = \sum P_i \times k \times t \times (a/p) \quad (\text{Howard ve Reed, 1998})$$

V =Disektör taneciğı sayıldığı dokunun hacmi,

$\sum P_i$ =Noktalı alan cetvelinde toplam nokta sayısıdır.

k =Adım aralığı

$t=h$ =Kesit kalınlığı.

(a/p) =Noktalı alan cetvelde bir noktanın temsil ettiği alan.

Formüller yeniden düzenlenerek birleştirildiğinde ve gerekli sadeleştirmeler yapıldığında çalışmada kullanılan formül elde edilir. Burada sonuçta elde edilen formül;

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

N =Referans bir hacimde toplam tanecik sayısı.

$\bar{Q}$ =Disektör yöntemiyle elde edilen ortalama tanecik sayısını ifade eder. Disektör yöntemiyle elde edilen tanecik sayısının (Q), sayımın yapıldığı toplam alan sayısına bölünmesi ile elde edilir. Toplam alan sayısı ise; bir dokunun tamamında kaç alanda tanecik sayılmışsa, o alanların tümünün sayısal miktarını ifade eder (Howard ve Reed, 1998).

ΣP_i =Noktalı alan ölçüm cetveli yardımıyla bir dokunun tamamında kaç nokta sayıldığını belirtir.

k =Örnekleme oranı, kaçta bir alındığını ifade eder

(a/p) =Noktalı alan cetvelde bir noktanın temsil ettiği alan.

$a(\text{çerçeve})$ =Tarafsız sayım cetveli.

2.8. ELISA

Antijen veya antikordan herhangi birisinin katı bir faza absorbe edilmesiyle gerçekleştirilen, enzyme-linked-immunoabsorbent assay (ELISA), antijen arandığında antikorun, antikor arandığında antijenin katı bir faza bağlanmasıdır. Katı faz olarak mikropalak kuyucuklar, plastik boncuklar, plastik tüpler, manyetik parçacıklar ve filtreli lateksler kullanılır. Yöntem hasta örneğinde aranılan antijen ya da antikorun, işaretli antikor ya da antijene bağlanması, enzim aktivitesinin, özgül substrat ile test edilmesi esasına dayanır. Genel olarak 2-3 saat gibi bir süre içerisinde sonuç alınabilmektedir, kompetitif olanlar daha kısa sürede sonuç vermektedir (Willke ve ark., 2017).

2.8.1. Kompetitif ELISA

Kompetitif yöntemde test edilen örneklerde işaretlenmemiş antijen veya antikorun önceden işaretlenmiş bir antijen veya antikorların katı faza (mikropalaklara) absorbe edilmiş antikor veya antijene bağlanmak için yarışabilmesidir. Katı faza aranan analite özgül antijen veya antikor absorbe edilmiştir. Kompetitif yöntemler tek ve iki adımda gerçekleşir (Willke ve ark., 2017).

Hasta örneğinde antijen aranması katı faza antijen bağlanarak da yapılabilir. Bu yöntemde yine hasta örneği önce işaretli antikörler ile reaksiyona girmesi için inkübe edildikten sonra, antijenlerin bağlanmış olduğu katı faza eklenir. Eğer hasta serumunda antijen var ise işaretli antikörler ile reaksiyona girdiğinden, katı fazdaki antijenlerle reaksiyon gerçekleşmeyecek ve yıkama ile katı fazdaki antijenler ile immunkompleks oluşturmayan işaretli antikörler yıkama işlemiyle uzaklaştığından test sonucunda renk değişimi olmayacaktır (Willke ve ark. 2017).

2.8.2. Non-kompetitif ELISA

Non-kompetitif ELISA klinik laboratuvarlarda daha fazla kullanılan immünolojik yöntemlerden birisidir. İndirekt ve Sandviç ELISA olarak adlandırılan iki farklı yöntemi vardır (Willke ve ark. 2017)

İndirekt ELISA

Bu yöntemde kuyucuklara antikora özgül antijen bağlanmıştır ve hasta örnekleri eklendiğinde özgül antikörler varsa antijen-antikör (Ag-Ab) kompleksi oluşur. İnkübasyondan, insan immunoglobulinine (anti IgG veya anti IgG/IgM) karşı enzim ile işaretlenmiş antikör içeren konjugat eklenir. Konjugat işaretli test antikörüne bağlanır. Reaksiyonda antikör-enzim veya antijen-konjugat bağlanmış ise renk oluşturan substrat eklenir (Willke ve ark. 2017).

Sandviç ELISA

Bu yöntemde aranan antijene spesifik antikörler ile kaplanmış mikropiplaklar kullanılır. Spesifik antikörle kaplı kuyucuklara test edilecek antijen eklenir. Eğer test örneğinde aranan antijen varsa antikör bağlanır, antijen-antikör reaksiyonu gerçekleşir, yıkama işlemiyle ile uzaklaştırılmaz. Daha sonra aranan antijenin farklı bir epitopuna özgül ve enzim ile işaretli ikinci antikör (konjugat) eklenir. Kuyucuklardaki antikör-antijen kompleksi enzim işaretli test antikörüne bağlanır. Sonuç olarak en dışta antikör-enzim, ortada antijen ve içte de antikör olacak şekilde (Ab-Ag-Ab) katlı bir sandviç oluşur. Enzim tarafından renkli bir ürüne dönüşen substratın eklenmesi sonrasında stop solusyonuyla reaksiyon durdurulup, plağın optik dansitesinin ölçülmesi ile kantitatif olarak ürün ölçülür (Willke ve ark. 2017).

2.9. Transmisyon (Geçirgenli) Elektrom Mikroskobu

Elektron mikroskobunun ışın demetinin dalga boyu ışık mikroskobu ışınının yaklaşık olarak $1/2000$ 'i olmasıdır. Bu sayede rezölasyon 10^3 kat attırmaktadır. Transmisyon (Geçirgenli) Elektrom Mikroskobu (TEM) de bir elektron demeti bir numune ile etkileşimiyle görüntü oluşmaktadır. Elektrom demeti haricinde TEM ışık mikroskobuna benzer (Ross ve Pawlina, 2014). TEM çalışma prensibi: Isıtılmış tungsten filament gibi bir elektron kaynağı yani katot elektron tabancası ile elektron saçar. Bu elektronlar anoda doğru çekilir. Katot kapağı ile anot arasındaki elektiriksel fark ile elektronlara 20.000-200.000 volt arasında hızlandırma voltajı uygular ve böylelikle elektron demeti oluşur.

TEM'de mercekler kondansör, objektif ve projektör merceklerdir. Kondansör merceği elektron demetini şekillendirir ve çapını değiştirir. Objektif merceği numuneden geçen demeti odaklar ve büyütülür. Bir ya da daha fazla projektör mercek görüntüyü daha da büyütülür. Görüntü, fosfor kaplı floresan ekranda izlenir. Fotografik plak üzerin de fotoğraflanır. Numunede elektronların geçtiği bölgeler parlak görünür. Numunenin koyu bölümleri elektronları absorbe etmiş ya da saçmıştır. Gözlem ekranında görüntüyü bir monitörden izlemek için ışığa duyarlı bir sensörü bulunan bir elektron dedektörü yerleştirilir. Bu görüntüleri ya da videoların bilgisayarlarda dijital formatta arşivlenebilmektedir (Ross ve Pawlina, 2014).

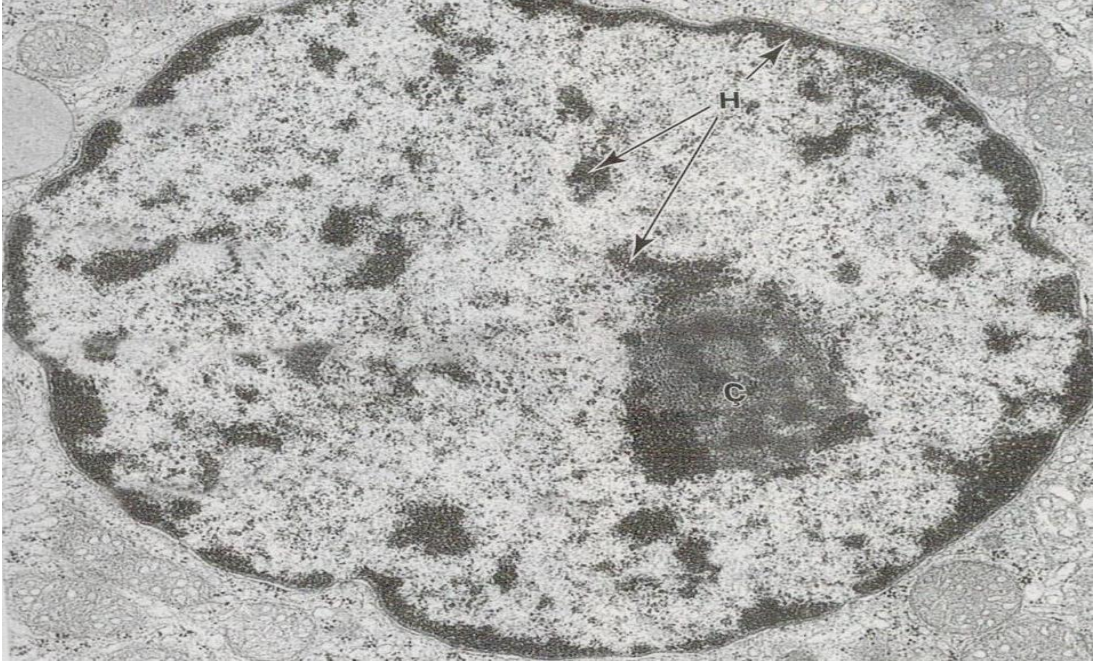
Elektron mikroskopi için numune hazırlığı daha hassastır ve ışık mikroskobununkine benzemektedir. TEM'de kullanılan numuneler 3-4 kat küçük ya da incedir. Elektron demeti dalga boyu yaklaşık 0,1 nm olan TEM'in teorik olarak 0,05 nm rezölasyonu vardır. Numunelerin rutin hazırlığı glutaraldehid fiksasyonu ile başlar. İdeali hayvandan dokuyu çıkarılmadan tamponlanmış glutaraldehid ile tesbit edilmeleri gerekir. Amaç glutaraldehid, proteinleri çapraz bağlama süretiyle korumaktadır. Bunu tampon solüsyon ile çalkalama; akabinde osmiyum tetroksit ile fiksasyon takip eder. Osmiyum, ağır metaldir ve aynı zamanda hücreye ve doku yapılarına elektron yoğunluğu kazandırmaktadır. Böylece TEM'de görüntü oluşumunu iyileştirmektedir. TEM için doku parçaları 1 mm^3 'ten büyük olmayanlar fikse edilir. Dehidrasyon işlemi, ışık mikroskopide kullanılanla aynıdır. Doku, monomerik rezin (reçine) de, sıklıkla da epoksi rezin ile infiltre edilir. Daha sonra polimerize edilir (Ross ve Pawlina, 2014).

Ultramikrotomlarda elmas bıçaklar kullanılır. Epoksi rezine (plastığe) gömülen dokudan kesit alınır (Ross ve Pawlina, 2014).

Elektronların sınırlı penetrasyon yetenekleri nedeniyle, TEM kesitlerinin kalınlıkları 50 nm ile 150 nm'den fazla olmamalıdır. Elmas bıçakla kesilen kesitler tutmak için çok incedirler. Bu kesitler, sıvı içinde bıçak kenarından uzaklaştırmak için yüzdürülürler ve plastik kaplı bakır ağırlı gridler üzerine toplanırlar. Gridlerin, üzerinde seri kesitleri inceleyebilmek için 50-400 delik/inç kadar delikleri ya da özel yuvaları bulunmaktadır. Elektron demeti numunenin üzerine odaklanır, içinden geçmesi sağlanır. Sonra da bakır griddeki deliklerden geçer ve oluşur. Bu görüntü gözlem ekranına, fotografik filme odaklanır ve görüntü elde edilir (Ross ve Pawlina, 2014).

TEM kesitlerinin doğal kontrastlarını arttırmak için boyanmaları gereklidir. Böylece hücre yapısının detayları daha net görülebilir veya fotoğraflar anabilir. Genelde numuneye ağır metal iyonları eklenmesi ile boyanmaktadır. Ağır metal iyonları, ya dokuya fiksasyon ve dehidrasyon sırasında ya da kesit alındıktan sonra kesitlerin iyonların solüsyonlarına daldırılması suretiyle yapılır. Rutin olarak kullanılan bir fiksatif olan osmiyum tetroksit, membranların fosfolipidlerine bağlanır ve membranlara ek yoğunluk katar (Ross ve Pawlina, 2014).

Uranil nitrat hücre bağlantı komplekslerinin ve diğer bölgelerin yoğunluğunu ayrıca dehidrasyonda kullanılan alkol solüsyonlarının da etkinliğini arttırmak için eklenir. Arkasından uranil asetat ve kurşun sitrat solüsyonlarına daldırılır, yüksek rezolüsyonlu, yüksek kontrastlı elektron mikrograflar elde edilir (Ross ve Pawlina, 2014).



Şekil 25. Geçirgenli Elektron Mikroskobu ile elde edilen hücrenin çekirdek görüntüsü.
H heterokromatini, Ç çekirdekçiyi göstermektedir. x25000 (Mescher, 2015).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Deneyin uygulaması

Bu çalışmayı gerçekleştirmek için, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 02.06.2016 tarih ve TDK-2016-5304 proje kodu ile onayı alındıktan sonra başlandı. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından 20 adet *Wistar albino* türü dişi sıçan sağlandı. Çalışmada ağırlıkları (200-350) g arasında olan daha önce hiç çiftleşmemiş 20 adet erişkin *Albino Wistar* cinsi dişi sıçan ve kullanıldı. Çiftleşme için 4 adet dişi sıçan için 1 erkek sıçan 24 saat, 38×12×30 cm boyutlardaki aynı kafeste tutuldu. Çiftleşme sonrası dişi ve erkek sıçanlar ayrı kafeslere alındı. Damızlık olarak kullanılan erkek sıçanlar, çiftleşmeden sonra üretim ünitesine iade edildi. Dişi sıçanlar denek olarak kullanıldı. Her grupta 4 adet dişi kullanıldı.

Dişi sıçanların çiftleştiği gün gebeliğin sıfıncı günü olarak kabul edildi. Sıçanlar her gün tartıldı, ağırlıklarındaki artış gebeliklerinin göstergesi olarak kabul edildi. Sıçanlar 12 saat normal ışık ve karanlık siklusu ile (21 ±2 °C) takibe alınarak, yem ve suları standartlara uygun olarak verildi.

Çiftleşme olayının ardından 5 gün sonra 1. gruba gebeliğin 5. gününden itibaren 10 gün süreyle günde bir kez 6.1mg/kg DS (Voltaren, 75mg/3 ml ampul, CIBA GEICY, İstanbul) intramüsküler (IM) enjekte edildi. Sıçanlara uyguladığımız 6.1mg/kg DS dozu insanlarda kullanılan 1mg/kg DS dozuna karşılık geldiği bildirilmiştir (Aksoy ve ark. 2010). 2. gruba gebeliklerinin 5. gününden itibaren 10 gün süreyle günde bir kez 6.1mg/kg DS IM olarak enjekte edildi aynı gruba 5mg/kg/gün dozunda TQ (Santa Cruz 2 mg) (ısıtılmış distile suda eritildikten sonra) içme sularına katılarak oral olarak verdi. 3. gruba sadece 5mg/kg/gün dozunda TQ içme sularına katılarak oral olarak verdi. 4. gruba, gebeliklerinin 5. gününden itibaren 10 gün süreyle günde bir kez 1ml/kg serum fizyolojik IP yolla enjekte edildi. 5. gruba herhangi bir işlem (pür kontrol) yapılmadı. TQ'nun çeşitli dozlarda (4, 8, 12,5, 25 ve 50 mg/kg, i.p) oral olarak verilmesi biyokimyasal parametreleri değiştirmemiştir, ancak, yüksek dozlarda (90,3 mg/kg)

verildiğinde öldürücü etki göstermiş (Mansour ve ark 2001). Bu nedenlerden dolayı yaklaşık en küçük doz olarak TQ 5mg/kg oral olarak verildi.

Doğuma yakın her gebe sıçan ayrı kafese alındı. Doğumdan sonra, anaç sıçan ve yavruların günlük bakımları sağlandı. Doğumdan sonra 21 ve 22 günlerde sütten kesilen yavrular dişi ve erkek olarak birbirinden ayrıldı erkek sıçanlar sakrifiye edildi, dişi yavrular gruplarına göre ayrı kafeslere alındı. Sütten kesilen dişi sıçanlar 4 ve 10 haftalık olmak üzere iki ana gruba ayrıldı. Her iki ana grup kendi aralarında 5 alt gruba ayrıldı. Her grup için postnatal 7'şer dişi yavru sıçan ayrıldı. Bu çalışmada toplam 70 yavru sıçan kullanıldı. İlaç ve serum fizyolojik verilen anaç sıçanlar anestezi altında sakrifiye edildi. Kontrol grubuna ait anne sıçanlar Deney Hayvanları Laboratuvarı'na iade edildi.

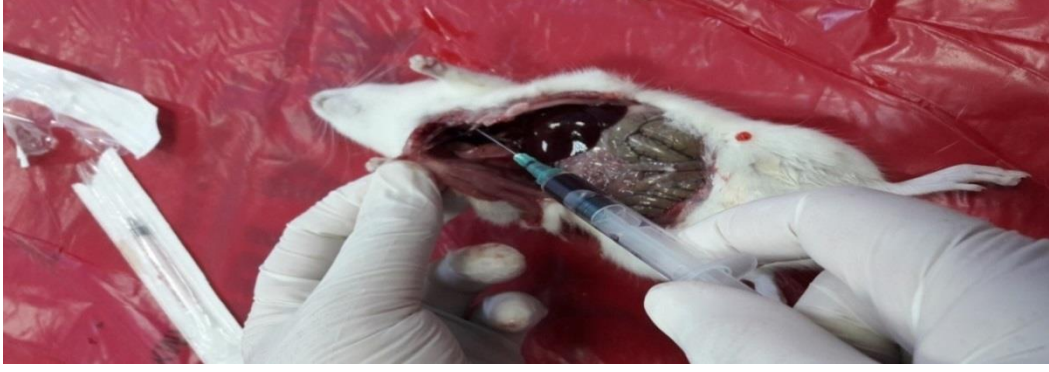
3.1.2 Kullanılan cihazlar

Laboratuvarda; SHANDON Citadet 2000 oto teknikon takip cihazı, Leica Model 2125RT (Nussloch) marka rotary, Nuve marka TS-5151 etüv, Thermo Shandon marka su banyosu kullanıldı. DS (Voltaren, 75mg/3 ml ampul, CIBA GEICY, İstanbul, IM) ve TQ (Santa Cruz 2 mg.) kullanıldı. Follikül sayımında fotoğraf atışmanlı Zeiss axioskop 4 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) mikroskop, hacimde ise AxioVision 3,1 (Zeiss axioplan 2 imaging Göttingen Germany) mikroskobu kullanıldı. Ovaryumda salgılanan serum AMH değerini belirlemek için mikro ELISA yöntemi kullanıldı. Shanghai LZ Biotech Co., Ltd China Cat No: YHB0745Ra ELISA kiti kullanıldı. Mikro ELISA çalışması Veterinerlik Fakültesi Biyokimya ABD. laboratuvarında, Zenyty 200rt (Mikro ELISA Okuyucu) kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Perfüzyon işlemi

Sıçanlar 4 ve 10 haftalık olduğunda 50 mg/kg ketalar'dan 0.1 ml ve 0.2 rampon karışımı ile derin anesteziye alınarak kalbin sağ atriumda AMH belirlemek için 2cc kan alındı (bkz şekil: 22). Kan örnekleri hemoliz olmaması için insülin iğnesi çıkarıldıktan sonra biyokimya tüpüne enjekte edildi. Biyokimya tüplerine grupların adları ve sıçan numaraları yazıldı.



Şekil 26. Sıçan kalbinden insülin iğnesiyle kan alınması.

Akabinde kalbin sol ventrikülünden bir kanül vasıtasıyla önce kanın pıhtılaşmasını önleyen 1ml'lik heparin ve ardından serum fizyolojik verildi. Kalbin sağ atriuma bir kesi atılarak kanın tamamen akıtılması sağlandı. Sıçanın tüm kanı akıtılıp serum fizyolojik görülünce ve ilgili bölgeler (örneğin böbrek ve karaciğer) beyazlaşmaya kadar işleme devam edildi, ardından % 10'luk nötral formaldehit verilerek canlıda dokuların tespiti için perfüzyon işlemi tamamlandı (Şekil: 23).



Şekil 27. Perfüzyon öncesi ve sonrası

3.2.2. Dokuların histolojik takibi ve hazırlanması

Perfüzyon işleminden sonra yavru sıçanların ilk olarak alınan kan örnekleri 10000 devirde 10 dakika santrüfuj edilerek serumlarına ayrıldı. Serum örnekleri -20 °C dipfırızda çalışma yapılacağı zamana kadar tutuldu. Daha sonra sıçanların karın ön duvarı diseksiyonla açılarak, ovaryum dokusu çıkarıldı büyüteç altında ovaryumların etrafındaki dokulardan temizlendi ve bir cetvelle eni, boyu, yüksekliği ölçüldü. Kontrol

grubu 4, 10 haftalık ovaryumlar sırasıyla yaklaşık ovaryum ebatları 4x3x1 ve 6x5x2mm olarak ölçüldü (Şekil 28).



Şekil 28. Sıçandan ovaryum dokusunun çıkarılması ve ebatlarının ölçülmesi.

Çıkarılan ovaryumlar tespiti için % 10'luk tampon formaldehitte bekletildi. Sonra bovin solusyonunda 24 saat bekletilerek tespiti güçlendirildi. Akabinde akan çeşme suyun altında 24 saat tutuldu. %70'lik alkolde 5 saat bekletildi. Dokular SHANDON Citadet 2000 oto teknikon cihazında takibe alındı. %70'lik alkolle takibe başlandı, sırayla %75, %80, %90, %96 ve %96'lık alkollerde, üç adet ksilende olmak üzere tüm tanklarında birer saat bekletildi. İki adet parafin tankında 2.5 saat bekletildi. Takip işlemi bittikten sonra Ovaryumlar boyuna göre 60°C'de sıvı parafine gömüldü. Parafin bloklar +4 °C'de bekletildi, Leica Model 2125RT (Nussloch, China) marka rotary mikrotomdan 7µ kalınlığında kesitler alındı. 10 haftalık sıçan ovaryumunda 1/17 kesit alınırken, ilk kesit rastgele 1-17 arasından kura ile seçilen bir sayıyla başlandı. Bu sayı 7. ve 8. kesit çifti olarak seçildi. Bir sonraki kesitler bu sayıya 17 ilave ederek 24-25 kesit çifti alındı ve doku bitinceye kadar devam edildi ve ortalama 15-18 kesit elde edildi. 4 haftalıklarda 10'da bir, yukarıda belirtildiği gibi, SRÖ göre kesit alındı ve ortalama 15-20 arası kesit elde edildi. Bununla beraber alınan kesitler birbirlerine paralel olması için hep 7µ kalınlığında kesitler alındı. Ardışık kesit çiftlerinden birisi örnek kesiti, diğeri gözlem kesiti olarak seçildi. Parafin erimesi için 80 derecede 40 dakika etüvde bekletildi, deparafinizasyon ve boyama işlemi yapıldı. Deparafinizasyon için ksilenlerin her birinde (1., 2. ve 3. ksilende) 20'şer dakika bekletildi. Akabinde alkollerde (%70, %80, %96'lık alkol serilerinde) 10'nar dakkika bekletildi. Alkolün

dokuda uzaklaşması için hafif akan çeşme suyu altında 10 dakika tutuldu. Boyama için Hematoksilende 5 saniye tutuldu. Tekrar hafif akan çeşme suyu altında 2 dakika tutuldu. Eozinde 15 saniye ve akarsu altında tekrar 2 dakika tutuldu. Kesikler entellan ile kapatıldı.

3.2.3. Stereolojik çalışma

Çalışmada kullanılan tüm ovaryumlar işleme tabi tutulmadan önce kontrol grubuna ait bir ovaryumda stereolojik ön çalışma yapıldı. Disektör sayım yöntemine göre primordiyal, primer, preantral ve erken antral folliküllerin toplam sayımı için folliküllerin morfolojik sınıflandırılması ve sayım kriterleri belirlendi. Cavalieri prensibine göre ovaryumun toplam, korteks ve medulla hacimleri ile medullanın kortekse ve toplam hacime oranı hesaplandı.

Stereolojik ön çalışma

Ovaryumda stereolojik bir çalışma yaparken yayınlanan benzer çalışmaların incelenmesi oldukça yararlı olmaktadır. Bununla beraber stereolojik bir ön çalışma yapmak her zaman daha doğru ve daha az hata yapmayı sağlar. Bu amaçla ön çalışma yapıldı.

1- Preantral faz ve erken antral folliküllerin morfolojik sınıflandırılması yapıldı.

2- Ön çalışmada dokuda fraksiyonlama yapılmadan ovaryumu bütün olarak blokklanmasına karar verildi. Çünkü sayılacak parçacık birkaç yüz arasında değişiyorsa fraksiyonlama yapılmayabilir. Dokuyu temsil edecek oranda en az 100-200 tanecik sayacak miktarda preparat (kesit) sayısı belirlenir (Gundersen, 1986).

3- Tanecik boyutunun büyüklüğüne (çapına) göre kesit kalınlığı belirlendi. Kesit kalınlığı sayılan en küçük çaplı taneciğin 1/3 veya 1/4'ünden küçük olmalıdır (Ünal B. Ve ark). Bu yüzden en küçük follikül olan primordiyal follikül çapına (25-30 µm'dır) (Eşrefoğlu, 2011) göre kesit kalınlığı belirlendi. Kesit kalınlığı 25/3 yaklaşık 7 µm olarak alındı.

4- Çalışmada, "hata katsayısının" HK (coefficient of error, CE), 0.05 ten küçük (Cruz-Orive ve Weibel, 1990) olması için sayılan parçacık en az 100-200 (Gundersen,

1986) arasında olacak şekilde uygun örnekleme alan cetveli hazırlandı. Ölçüm yoğunluğu için 4 haftalık sıçan ovaryumunda 15-20 arası kesit ve her 10 kesitte biri, 10 haftalık sıçan ovaryumunda 15-18 arası kesit ve her 17 kesitte bir alınmasına karar verildi. Ön çalışmada HK değeri ortalama olarak 0.03 olarak hesaplandı.

5- Bireyler arası nicelik farklılıklarının Değişim Katsayısı (DK), toplam değişken en aza indirmek proje aşamasında için her grupta hayvan sayısı 7 olarak kabul edildi. Sayım için uygun tarafsız sayım çerçeveleri belirlendi ve çerçeve alanları hesaplandı (Ünal ve ark., 2002). Varyasyon katsayısı istatistiksel anlamda ($P < 0.005$) olması için (CE ve CV), primordiyal ve primer (unilaminer) follikül sayımı 4'lük objektifte $44\ 944\ \mu\text{m}^2$ aralıklarla ilerleyerek daha fazla alanda sayım yapıldı. Preantral ve erken antral follikül sayımı için geniş sayım çerçevesi kullanarak 10'luk objektifte ve $265\ 225\ \mu\text{m}^2$ tarafsız sayım çerçevesiyle tanecik sayımı yapıldı.

Sayım için kullanılan örnekleme alan cetvelinde sistematik bir şekilde ilerlendi ve rasgele biçimde dokunun başlangıç noktasında herhangi bir yerinde başlandı. Disektör kuralına göre SRÖ yapıldı (Gundersen ve Jensen, 1987). Kesit çiftlerinin örnek kesitte bulunup, gözlem kesitinde bulunmayan tanecikler, tarafsız sayım çerçevesinin kurallarına göre sayıldı (Ünal ve ark., 2002). Tarafsız sayım çerçevesinin sayım kurallarına göre sayım yapıldı.

Çalışmayı hatasız ve eksiksiz tamamlamak için, mikrotom, doku takip cihazı, etüv, su banyosu, deparafinizasyon, boyama, lam kırılma gibi hatalara karşı bir yedek lam alındı. Yedek lamların asıl lamların ardışığı olmasına dikkat edildi. ELISA çalışması için sıçan serumları ikiye ayrılarak yedekleri elde edildi.

Disektör sayım yöntemine göre follikül sayımı

Folliküllerin morfolojik sınıflandırılmasında kriterler belirlendi. Çalışmada primordiyal, primer, preantral ve erken antral folliküller sayıldı. Primordiyal folliküler, oositi çevreleyen tek tabaka yassı granüloza hücrelerinin gözlemlendiğinde (Eşrefoğlu, 2011) sayıldı. Hem kübik hem de yassı granüloza hücrelerle çevrili transizyon folliküler (geçiş folliküller) görüldüğünde ve yassı hücreler baskın olduğunda primordiyal olarak sayıldı (Pedersen ve Peters'in 1968; Alves ve ark., 2015). Primer folliküller, oositi

çevreleyen tek tabakalı kübik granüloza hücrelerin varlığında (Mescher, 2015.) sayıldı. Preantral folliküller (multilaminar) antrum olmaksızın, birden fazla kübik granüloza hücresi tabakası ile çevrelendiği (Leung ve Adashi, 2004; Eşrefoğlu, 2009) ve erken antral folliküller antral boşluklar görüldüğünde yani antral folliküllerde açıkça bir veya iki antral boşluğa sahip olduğunda (Mayers ve ark., 2004) sayıldı.

Sayım kriterleri için ovaryumun heterojen yapısı nedeniyle primordiyal, primer ve diğer folliküller arasında var olan büyük boyut farklarından dolayı follikül sayılarını belirlemek için farklı yöntemlerin kullanılması gerekmektedir (Mayers ve ark. 2004).

Primordiyal ve primer folliküller, oositi ve onu çevreleyen granülaza hücreleri ile birlikte referans bölümüne uygulanan tarafsız sayım çerçevesinde üst ve sağ yan kesikli sınırlarına değen ve tamamen çerçevenin içinde kalan folliküller sayıma dâhil edildi. Sayım çerçevesinin alt ve sol devamlı sınırlarına değen, çerçevenin dışında kalan (Gundersen, 1986) ve parçalanmış folliküller sayıma dâhil edilmedi. Böylece bir ovaryumda ham primordiyal ve primer follikül sayısı (Q^-) hesaplandı.

Preantral ve erken antral follikül çapları oldukça birbirinden değişkenlik gösterdiğinden oosit çekirdeği referans alındı. Çekirdek sayısı folliküller sayısına eşitleyerek preantral ve erken antral follikül sayıldı. Preantral ve erken antral ardışık kesitler kullanarak oosit çekirdeği görünen örnek kesitine uygulanan tarafsız sayım çerçevesi içinde, sağ üst ve sağ yan kesikli çizgilere değen yani dışlama sınırları ile kesişmeyen (Gundersen, 1986) ve gözlem bölümünde ise görünmeyen folliküller sayıldı. Sayım çerçevesinin alt ve sol devamlı sınırlarına değen ve dışında olanlar sayıma dâhil edilmedi (Gundersen, 1986). Böylece ham preantral ve erken antral follikül sayıları (Q^-) hesaplandı. Hesaplanan tüm folliküller toplam alana bölünerek ortalama follikül sayısı bulundu ($\bar{Q}^-$).

Primordiyal, primer, preantral ve erken antral folliküllerin toplam sayımı için primordiyal ve primer folliküller 40'lık objektifte, örnekleme alan cetvelinde adım aralığı 212×212 (44944) μm^2 olacak şekilde 6762 μm^2 tarafsız sayım çerçevesi kullanıldı. Preantral ve erken antral oosit çekirdek sayısı preantral ve erken antral follikül sayısına eşitlenerek (Mayers ve ark., 2004) 1'luk objektifte, örnekleme alan

cetvelinde 425×425 (180625) μm^2 adım aralığı olacak şekilde 265225 μm^2 tarafsız sayım çerçevesi kullanıldı.

Bir ovaryumda toplam follikülleri sayısının (N) hesaplanması için kullanılan formül aşağıda gösterilmiştir:

$$N = \bar{Q} \times \sum Pi \times k \times \frac{(a/p)}{a(\text{çerçeve})} \text{ (Howard ve Reed, 1998)}$$

N=Toplam follikül sayısı,

$\bar{Q}$ =Ortalama follikül sayısı,

k=Kaç adımda bir kesit alındığını ifade eder yani adım aralığıdır.

$\sum Pi$ =Noktalı alan cetvelinde toplam nokta sayısı,

(a/p)=Noktalı alan cetvelde bir noktanın temsil ettiği alandır.

a(çerçeve)=Tarafsız sayım çerçevesinin alanıdır.

(a/p)= Noktalı alan cetvelinde bir noktanın temsil ettiği alanın hesaplanması; büyütme derecesine göre (örneğin 4'lük objektifte), ovaryum düzeyindeki gerçek uzunluğunun karşılığının hesaplanması gerekir. Bu amaçla iki nokta arasındaki mesafe bir cetvel yardımıyla ölçüdür. Bu mesafe 24 mm olarak hesaplandı ve 24 000 μm çevrildi. Büyütme oranı mikrometrik disk yardımıyla bulundu. Mikrometrik disk yardımıyla 4'lük objektifte 6'mm=50' μm karşılık geldiği bulundu. 6mm uzunluğun karşılığı olarak 6000 μm elde edildi.

$$\text{Büyütme oranı} = 6000/50 = 120$$

Büyütme oranı 120 olarak bulundu. Bu oran bize 1mm'yi kaç defa büyüttüğümüzü göstermektedir.

Noktalı alan cetvelinde iki nokta arası uzunluk büyütme oranına bölerek iki nokta arasının sanal uzunluğunu mikrometre karşılığı bulundu. İki nokta arasındaki uzunluk:

24000 μm olarak yukarıda hesaplandı. Bu durumda İki nokta arındaki sanal uzunluk= $24000/120=200 \mu\text{m}$ 'dir.

Dolayısıyla 200 μm , iki nokta arasındaki uzunluk olan 24 mm'nin sanal ortamda μm karşılığıdır. Bu durumda; noktalı alan ölçüm cetveldeki bir nokta alan:

$(a/p)= 200 \times 200 = 40000 \mu\text{m}^2$ dir. (a/p) değeri Cavalieri prensibine göre hacim hesaplanmasında ve toplam follikül sayısında kullanıldı.

Tarafsız sayım çerçevesinin alanın hesaplanması; çalışmada folliküllerin çapları birbirinden oldukça farklı oldukları için, iki ayrı tarafsız sayım çerçevesi kullanıldı. Primordiyal, primer (unilaminer) follikülleri 40'luk ve 6762 μm^2 tarafsız sayım çerçevesi ve preantral ve erken antral 10'luk objektifte ve 265 225 μm^2 tarafsız sayım cetveli kullanıldı.

Tarafsız sayım çerçevesinin bir kenarının uzunluğu cetvelle ölçüdür. Bu değer μm 'ye çevrildi. Sayım yapıldığı objektifin derecesi göz önüne alınarak, büyütme oranı hesaplanır. Tarafsız sayım çerçevesinin bir kenarının μm uzunluğu büyütme oranına bölünerek bu uzunluğun sanal ortamda doku seviyesindeki mikrometre karşılığını bulundu. İki kenarının çarpılması ile a(çerçeve)'nin alanı hesaplandı. Çalışmada kullanılan a (çerçeve)'lerin alanlarının hesaplanması aşağıda gösterilmiştir.

Tarafsız sayım çerçevenin alanının 40'luk objektifte hesaplanması; 40'luk büyütmedeki 38 mm karşılığı 50' μm . Bu büyütmede primordiyal ve primer (unilaminer) follikülleri sayıldı. a(çerçeve)'nin bir kenarının uzunluğu (a) = 6.25 cm'dir. 40'luk objektif için hesaplamalar.

$38 \times 1000 = 38000 \mu\text{m}$ 'ye çevrildi. Bu sayı 50 μm 'ye bölünerek büyütme oranı hesaplandı.

$$\text{Büyütme oranı} = 38\ 000/50 = 760$$

a(çerçeve) bir kenarının uzunluğu 62.5mm'dir. $62.5 \times 1000 = 62500 \mu\text{m}$ 'dir. Bu sayı büyütme oranına bölünür. Böylece a(çerçeve)'nin bir kenarının sanal ortamda doku üzerinde mikrometre karşılığı bulunmuş olur.

a(çerçeve)'nin bir kenarın sanal uzunluğu=62500/760=82.23 μm 'dir. Dolayısıyla a (çerçeve)'nin alanı:

$$a(\text{çerçeve})=a \times a$$

a=tarafsız sayım cetvelinin bir kenarının uzunluğudur.

$$a(\text{çerçeve})'nin alanı= 82.23 \times 82.23 = 6762 \mu\text{m}^2$$

Tarafsız sayım çerçevenin alanının 10'luk objektifte hesaplanması; 10'luk objektifte 50' μm karşılığı 10 mm'dir. Bu objektifte Preantral (Multilaminer) ve erken antral follikül sayıldı. 10'luk objektif için hesaplamalar:

$$10\text{mm} \times 1000 = 10000 \mu\text{m}'ye \text{ çevrildi.}$$

$$\text{Büyütme Oranı} = 10000/50 = 200 \text{ hesaplandı.}$$

$$a(\text{çerçeve}) \text{ bir kenarının boyu} = 103\text{mm} = 103 \times 1\ 000 = 103000 \mu\text{m}$$

$$a(\text{çerçeve})'nin bir kenarının sanal uzunluğu = 103\ 000/200 = 515 \mu\text{m.}$$

$$a(\text{çerçeve})'nin alanı = 515 \times 515 = 265\ 225 \mu\text{m}^2$$

10 haftalık kontrol grubu sıçan ovaryumunda primordiyal, primer (unilaminer), preantral (multilaminer) ve erken antral folliküllerin sayımı için adım aralığı = 17, kesit kalınlığı 7 μm , (a/p)=40000 μm^2 , 40'luk objektifte 6762 μm^2 , 10'luk objektif 265 225 μm^2 'lik tarafsız sayım çerçevesi kullanıldı. Elde edilen follikül sayıları örnekleme alan cetvelindeki fraksiyonlama oranıyla çarpıldığında 10 haftalık kontrol grubu bir sıçan ovaryumunda ham primordiyal follikül sayısı (Q^-)=366, ham primer (unilaminer) follikül sayısı (Q^-)=80, ham preantral (multilaminer) follikül (Q^-)=128, ham erken antral follikül için (Q^-)=144'tür. 4 haftalık sıçan ovaryumunda ham primordiyal (Q^-) =384, ham primer (unilaminer) follikül (Q^-) =112, ham preantral (multilaminer) follikül (Q^-) =192, ham erken antral follikül için (Q^-)=112 olarak hesaplandı.

Kontrol grubu 10 haftalık primordiyal follikül ham sayısı= (Q^-) =366 ve primer (unilaminer) ham follikül sayısı=80'dir. Bu folliküller 4'lük objektifte, örnekleme alan cetvelinde 16 da bir ilerleyerek 3282 alan taranarak elde edildi. Preantral ham follikül

(Q⁻)=128, erken antral ham follikül için (Q⁻) =144 olarak hesaplandı. Bu folliküller 1'lik objektifte örnekleme alan cetvelinde 16 da bir ilerleyerek 161 alan taranarak elde edildi. Bu durumda bir alana düşen ortalama follikül sayıları aşağıda gösterilmiştir:

$$\bar{Q}^-_{(\text{primordiyal})} = \frac{366}{3282 \times 16} = 0.0069$$

$$\bar{Q}^-_{(\text{primer})} = \frac{80}{3282 \times 16} = 0.0015$$

$$\bar{Q}^-_{(\text{preantral})} = \frac{128}{161 \times 16} = 0.0496$$

$$\bar{Q}^-_{(\text{erken antral})} = \frac{144}{161 \times 16} = 0.0559$$

$\Sigma P_i = 4023$ Cavalieri prensibine göre bir ovaryumda sayılan toplam nokta sayısıdır. 10 haftalık kontrol grubu bir sıçan ovaryumunda toplam nokta sayısı 4023 olarak hesaplandı.

$$(a/p) = 40000 \mu\text{m}^2$$

$$a(\text{çerçeve})' \text{nin alanı} = 6762 \mu\text{m}^2 \text{ 40'lık objektifte}$$

$$a(\text{çerçeve})' \text{nin alanı} = 265225 \mu\text{m}^2 \text{ 10'lik objektifte}$$

$$k = \text{Adım aralığı} = 17$$

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

Disektör-Cavalieri Kombinasyonuna formülünde veriler yerlerine yerleştirildi 10 haftalık bir sıçan ovaryumunda toplam disektör parçacık sayısı hesaplandı. Hesaplamalar aşağıda verilmiştir.

$$N = 0.0069 \times 4023 \times 17 \times \frac{40000}{6762} = 2791 \text{ primordiyal follikül}$$

$$N = 0.0015 \times 4023 \times 17 \times \frac{40000}{6762} = 606 \text{ Primer follikül}$$

$$N = 0.0496 \times 4023 \times 17 \times \frac{40000}{265225} = 513 \text{ preantral follikül}$$

$$N=0.0559 \times 4023 \times 17 \times \frac{40000}{265225} = 576 \text{ erken antral follikül sayısı}$$

Fiziksel disektörün sayım prensibine göre 10 haftalık kontrol grubu sıçan ovaryumlarında hesaplamalar yapıldı ve ilgili formüller kullanıldı. 2791 primordiyal, 606 primer (unilaminer) follikül, 513 preantral ve 576 erken antral follikül sayısıdır. Bu yöntemle diğer 10 haftalık sıçan gruplarında da yapıldı. Tüm sonuçlar ve CD değerleriyle beraber bulgular kısmında Tablo12-16'larda gösterilmiştir. Bu sayım, Cavalieri-disektör sayım prensibi kombinasyonuna göre tek bir formülle dayanarak elde edilmiştir. Bu işlemler 4 haftalık sıçan ovaryumuna da uygulandı, tüm sonuçlar bulgular kısmında CV değerleriyle beraber, Tablo17-21'larda gösterilmiştir.

3.2.4. Korpus luteumların sayımı

Dişi sıçanlarda juvenil dönem 3-4,5 hafta arasındadır. Juvenil dönemde folliküller östrojen sekresyonuna başlarlar. Juvenil dönemden üç gün sonra peripubertal dönem başlar. Peripubertal dönemde uterus suyla doludur. Bu dönemde gonadotropinlerdeki artış ilk ovulasyonlara neden olur. Ovaryum gelişimi gonadotropinlere, FSH, LH, GnRH, prolaktin ve büyüme hormonu bağlıdır (Advis ve Ojeda, 1979). Dişi sıçanlarda puberteye vaginal açıklık ve ilk proöstrüsün girmesiyle başlar. Vaginal açıklık ilk defa 33-42. günlerde, vücut ağırlığı yaklaşık 100 gram iken meydana gelir (Maeda ve ark., 2000). Sıçanlarda proöstrüs döneminde salınan LH dalgaları ovaryumda preovulatuvar folliküllerde (preovulatör follikül 0,9-1,0 mm çapında) ovulasyonun meydana gelir ve KL'un oluşmasına neden olur (Fortune, 1994). Bu durumda 4 haftalık sıçan juvenil dönemdedir ve puberteye ancak 5-6 haftalar arasında girmektedir. Dolayısıyla çalışmada 4 haftalık sıçan ovaryumların hiçbirinde KL'a rastlanmadığı için sayılamadı.

Çalışmada 10 haftalık sıçan ovaryumunda ovulasyon göstergesi olan KL sayıldı. Bir ovaryumda elde edilen tüm lamalar Zeiss Axioskop 4 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) mikroskopunda, bütünlüğü bozulmamış, sınırları belirgin olan genç ve yaşlı tüm KL'lar sayıldı. En fazla KL sayısına sahip kesit belirlendi. O kesitteki toplam KL sayısı hesaplandı. Sonuçlar bulgular kısmında Tablo 12-16'larda verilmiştir.

3.2.5. Ovaryumun toplam hacminin hesaplaması

Ovaryumun toplam hacim (ΣV) hesaplamak için Cavalieri prensibi kullanıldı. ΣP_i = Noktalı alan ölçüm cetveliyle bir ovaryumda toplam nokta sayısını hesaplanması için tüm kesitler 4'lük objektifte fotoğrafları çekildi. Tüm kesitlerin hep aynı yöne bakan kesitlerin yüzleri ölçüm için kullanıldı. Shtereom 1.5 paket programında ilk olarak kalibrasyonu yapıldı, 4'lük objektife göre noktalı alan cetveli açıldı ve fotoğraflar üzerine görüntülendi. Kesit kalınlığı $7\mu m$ olarak yazıldı. HK 0.05<olacak şekilde, iki nokta arası mesafe belirlendi. Önce medullaya düşen noktalar sayıldı sonra kortekse düşen noktalar sayıldı. Medulla ve kortekse düşen tüm noktalar toplanarak ovaryuma düşen toplam nokta sayısı hesaplandı. Dolayısıyla medulla, korteks ve toplam ovaryum hacimleri ayrı ayrı hesaplanırdı ve medullanın kortekse ve medullanın toplam hacime oranı belirlendi.

$$\Sigma V = \Sigma P_i \times k \times h \times (a/p) \text{ (Howard ve Reed, 1998)}$$

$$\Sigma P_i = \text{Noktalı alan cetvelinde toplam nokta sayısı} = 4023$$

$$k = \text{Adım aralığı ifade eder} = 17$$

$$h = \text{Kesit kalınlığı} = 7\mu m$$

$$(a/p) = \text{Noktalı alan cetvelde bir noktanın temsil ettiği alan} = 40000 \mu m^2$$

$$\Sigma V = 4023 \times 17 \times 7 \times 40000 = 19\,149\,480\,000 \mu m^3$$

$$\Sigma V = \frac{19\,149\,480\,000}{1000 \times 1000 \times 1000} = 19.14948 \text{ mm}^3.$$

Buna göre 10 haftalık kontrol grubuna ait bir sıçan ovaryumunun Cavalieri prensibine göre hacmi 19.14948 mm^3 'dür. Bu işlem tüm ovaryumlara uygulandı. Ayrıca deney grupların korteks ve medulla hacimleri hesaplandı. Deney grubuna ait Cavalieri prensibine göre tüm hacim ve CD değerleri sonuçları bulgular kısmında tablo 2-10 ve 11'da gösterilmiştir.

3.2.6. Büzüşme oranı hesaplanması

Sıçan ovaryumların diseksiyonundan hemen sonra bir cetvel yardımıyla ve büyüteç altında eni ve boyu ölçüldü. Örneğin 10 haftalık bir sıçan ovaryumun boyu ve eni (6×5) mm olarak ölçüldü. Aynı rat ovaryumu doku takip, boyama işleminden sonra lam üzerindeki o kesitin en geniş eni ve boyu aynı cetvelle itinayla ölçüldü. Ovaryumun en geniş yüzey alanı 5×4mm olarak ölçüldü. Aşağıdaki formül kullanılarak % büzüşme hesaplandı.

$$\text{Büzüşme oran \%} = \frac{\text{İşlem sonrası ovaryumun yüzey alanı}}{\text{İşlem öncesi ovaryumun yüzey alanı}} \text{ (Noorafshan ,2013)}$$

Bu işlem 70 sıçan ovaryumu için yapılarak her bir ovaryumun büzüşme oranı hesaplandı. Her grubun kendi içinde ortalaması alındı ve ortalama büzüşme değeri bulundu.

$$\text{Büzüşme oranı \%} = \frac{5 \times 4}{6 \times 5} = \%66$$

Kontrol grubuna ait 10 haftalık sıçanlardaki ovaryum dokularının büzüşme oranı %66'dır. Cavalieri prensibine göre hesaplanan hacime büzüşme oranı ilave edildi.

$$\Sigma V = 19.14948 \times \%66 = 31.788 \text{ mm}^3.$$

Bu değer bir ovaryumun doku takibinden sonra hesaplanan hacimidir. Diğer sonuçlar ve CD değerleri bulgular kısmında tablo 2-10 ve 11'da gösterilmiştir.

Sıçan ovaryumuna ait medullanın korteks hacime oranı aşağıda gösterilen formülle hesaplandı.

$$V_v \% \text{medulla} = \frac{\sum_{i=1}^n p \text{ medulla hacim}}{\sum_{i=1}^n p \text{ korteks hacim}}$$

$$V_v \% \text{medulla} = \frac{2.717}{16.078} = \%16.898$$

Kontrol grubuna ait 10 haftalık sıçan ovaryum medullasının korteks hacime oranını %16.898'dir. Diğer sonuçlar ve CD değerleri bulgular kısmında tablo 2-10 ve 11'da gösterilmiştir.

Sıçan ovaryumuna ait medullanın toplam hacime oranı aşağıda gösterilen formülle hesaplandı.

$$V_V \%medulla = \frac{\sum_{i=1}^n p \text{ medulla hacim}}{\sum_{i=1}^n P \text{ toplam hacim}}$$

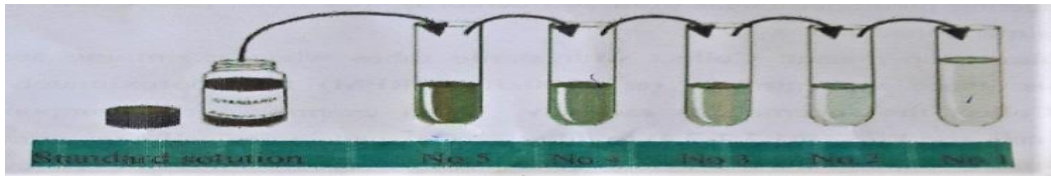
$$V_V \%medulla = \frac{2.717}{19.149} = \%14.188$$

Kontrol grubuna ait 10 haftalık sıçan ovaryum medullasının toplam hacime oranı %14.188'dir. Diğer sonuçlar ve CD değerleri bulgular kısmında tablo 2-10 ve 11'da gösterilmiştir.

3.2.7. ELISA çalışma prosedürü

Biotech Co., Ltd. China Cat No: YHB0745Ra ELISA kiti ait çalışma prosedürü:

1. Sıçanlara ait serum örnekleri -20 de diprizde çıkarıldı ve oda sıcaklığına getirildi. Sıçan serumları gruplarına göre ayrıldı. Listelenerek kuyucuklardaki yerleri belirlendi.



Şekil 29. ELISA prosedürüne göre standart kuyucukların dilüsyon şeması.

2. İlk beş kuyucuk standartlar için ayrıldı. Bu amaçla beş tüpe 120µl standart solusyonu konuldu. İlk kuyucuğa 120µl standart konuldu ve iyice pipetlendi. İlk kuyucuktan 120µl alınarak 2. kuyucuğa pipetlendi. Bu işlem son kuyucuğa kadar devam edildi. Son kuyucukta toplan hacim 240µl'ye ulaştı (Şekil 25).

3. İlk beş kuyucuğa dilüe edilmiş standarttan 50µl dilüent pipetlendi. Diğer kuyucuklara 40µl sıçan serumları pipetlendi. 50µl streptomisin-HPR standart kuyucukların ve sıçan serumların üzerine pipetlendi. Akabinde 10µl MİS-AMH antibodies sadece çalışma serumlarının üzerine pipetlendi. Ayrıca bir kuyucuk blank olarak ayrıldı. Bu kuyucuğa hiçbir şey konulmadı.

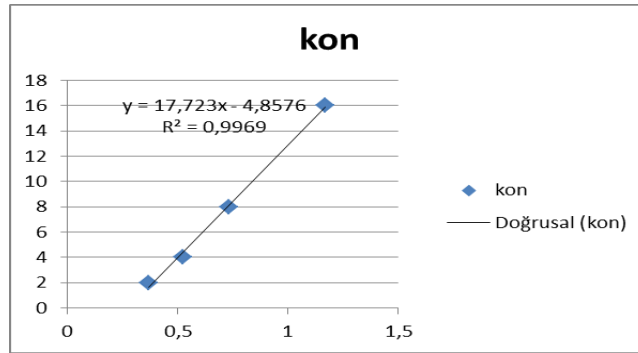
4. Mikrostriplerin üzeri mikroflimle kapatıldı ve 37 °C, 60 dakika inkübasyona bırakıldı.

5. Yıkama soluyunu 1/30 oranında hazırlandı ve mikrostripler 5 defa yıkandı. Ters çevrilip kurutma kâğıdına birkaç kez vurularak kurutulması sağlandı.

6. Her kuyucuğa Chromogen Solution A 50µl ve Chromogen Solution B 50µl pipetlendi, 15 dakika karanlık odada inkube edildi.

7. Stop solution 50µl her kuyucuğa pipetlendi.

8. 450 nm de okuyucuda mikrostripler okutuldu.



Şekil 30. ELISA sonuçları için standart eğri oluşturulması. Konsatrasyon (kon)

$R^2=0,9969$ olması çalışmanın %100 yakın çıktığını ifade eder.

Tablo 1. AMH için optik dansite ve konsantrasyon karşılığı

Konsatrasyon	OD	ng/ml
500	1.689	32 ng/ml
250	1.17	16 ng/ml
125	0.796	8 ng/ml
62,5	0.524	4 ng/ml
31,25	0.365	2 ng/ml
Blank	0.102	0 ng/ml

Veriler standart eğri oluşturularak değerlendirildi. 450 nm konsantrasyonları 2ng/ml→32ng/ml (Biotech Co., Ltd. China Cat No: YHB0745Ra ELISA kiti referans değerlerine) göre düşük, normal ve yüksek olarak AMH hormon değeri ng/ml ölçüldü.

Bu değerler 1.00 ng/ml küçük ise düşük, 1.00-3.5 ng / ml arasındaki değerler normal, 3.5'ten bk değerler yksek (Zarek SM ark., 2015) olarak değerlendirildi. Ayrıca daha düşük ve daha yksek AMH değerleri de belirlendi. ELISA alışmalarında CD değeri %15'in altında olması sonuçların çok iyi olduğunu göstermektedir %15 üzerinde olan değerlerde pipetleme ve laboratuvar hatalarından kaynaklanmaktadır (Stanton SJ and Schultheiss OC, 2009). Çalışmada ELISA için CD= 0.2-0.4 olarak bulundu.

Serum AMH ve CD sonuçları bulgular kısmında Toblo 12-21'larda verilmiştir.

3.2.8. Geçirgenli elektron mikroskobun çalışma prosedürü

Geçirgenli elektron mikroskobun alışması Dicle Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinde gerçekleştirilmiştir

Kullanılan kimyasal maddeler

Glutaraldehit: Dokuların fiksasyonunda kullanılmıştır.

Paraformaldehit: Dokuların fiksasyonunda kullanılmıştır.

0,1 M Sodyum fosfat tamponu: Dokuların fiksasyonu için kullanılmıştır.

Osmium tetroksit: Dokuların ikinci fiksasyonu için kullanılmıştır.

Ethanol: Doku takibinde kullanılmıştır.

Propilen oksit: Doku takibinde kullanılmıştır.

Araldit resin: Dokuların gömülmesinde kullanılmıştır.

Toluidin blue: Dokuların yarı ince kesitlerinin boyanmasında kullanılmıştır.

Potasyum fosfat: Tampon hazırlanmasında kullanılmıştır.

Sodyum fosfat: Tampon hazırlanmasında kullanılmıştır.

Uranyl asetat: Dokuların ince kesitlerinin boyanmasında kullanılmıştır.

Elektron mikroskopunda kullanılan kimyasal maddelerin içerikleri ve hazırlanması

Osmium tetroksit'in hazırlanması

Yüzde 2 lik osmium tetroksit hazırlamak için siyah bir şişeye 5ml distile su konulduktan sonra osmium tetroksit ampülü şişe içinde çalkalanarak kırılır ve 24 saat beklenir.

Araldit'in hazırlanması

Araldit CY 212 0.02 M (20 ml)

Dodesennilsukinik anhidrit (DDSA) 0.02 M (20ml)

Benzil dimetilamin (BDMA) 0,0006 M (0.6ml)

Dibutilfitalat 0.001 M (1 ml)

Maddeler yukarıdaki sırayla hava kabarcıkları yok oluncaya kadar oda sıcaklığında karıştırılır

Toluidin blue boyasının hazırlanması

Toluidin blue 0.001 M (1g)

Borax 0.001 M (1g)

Distile su 0.01 M (100ml)

Toluidin blue boyası yukarıda verilen maddelerin sırasıyla karıştırılmasıyla ısıtıcı tablada hazırlanır.

Kurşun Nitrat Hazırlanması

Kurşun nitrat 0.001 M (1.33g)

Sodyum sitrat 0.001 M (1.79g)

Distile su 0.03 M (30ml)

Yukarıda verilen maddeler karıştırılarak 50 ml lik beherde yavaş bir şekilde 30 dakika süre ile karıştırılır ve daha sonra bu karışım 50 ml distile su ile tamamlanır.

Uranil Asetat Hazırlanması

Uranil asetat etil alkolde çözünerek yanına NaOH tabletlerden konulur ve 2 saat beklenilir.

Örneklerin elektron mikroskobu incelemesi için hazırlanması

Sıçan ovaryum dokularının tampon formaldehit solusyonundan sonra 12 saat akar su altında tutuldu. pH:7.4 0.1 M fosfat tamponu ile %2.5'lik glutaraldehit (pH: 7.2) solusyonu içerisinde gerçekleştirilmiştir. %2,5'lik glutaraldehit içerisinde 24 saat boyunca dokuların ilk fiksasyonu yapılmıştır. Daha sonra 3 kere 15'er dakikada bir değiştirilmek suretiyle pH: 7.4, 0.1M fosfat tamponu ile yıkanmıştır. İkinci fiksasyon olan osmium tetroksit içerisinde 2 saat rotatorda döndürülerek oda sıcaklığında bekletilmiştir. Doku daha sonra 3 kez 15'er dakika fosfat tamponunda yıkanmıştır. Dehidratasyon işleminde, +4 °C' de %50, %70, %90'lik etil alkolde 2 şer kez 15'er dakika; %96, %100'lik etil alkolde 2'şer kez 30 dakika olarak uygulanmıştır. Daha sonra dokular propilen oksitte 2 kez 30'ar dakika, rotatorda 1:1 oranındaki propilen oksit ve araldit karışımında 2 saat bekletilmiştir. Dokular saf araldit içerisinde rotatorda bir gece bekletildikten sonra gömme işlemi yapılmıştır. Polimerizasyon işlemi 2 gün boyunca 60°C lik etüvde gerçekleştirilmiştir.

Yarı ince kesitlerin alınması

Plastik bloklar trimlendikten sonra Leica ultramikrotomda 80nm'lik yarı ince kesitler alınmıştır. Alınan ince kesitler, petri kabına konulan toluidin blue boyası içinde 7 dakika bekletilmiştir. Daha sonra kesitler temiz petri kabına konulan distile su içinde 2-3 dakika bekletildikten sonra fazla boyadan arındırılmıştır. Lamlara alınıp kuruduktan sonra ışık mikroskobunda incelenerek bölge seçimi yapılmıştır.

İnce kesitlerin alınması

70-100 nm olan ince kesitler 200 mesh bakır gridler üzerine alınıp %2'lik uranil asetat'ta 1 saat süresince boyanmıştır. Gridler, fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra 15

dakika kurşun asetat ile muamele edilmiştir. Kurşun asetat ile muamelesinden sonra tekrar yıkanmış, böylece numuneler elektron mikroskobunda incelemeye hazır hale getirilmiştir.

Örneklerin geçirgenli elektron mikroskobunda incelenmesi

Örnekler Dicle Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinde bulunan Jeol Marka JEM-1100 model TEM ile incelenmiş ve sitopatolojik değişiklikler aynı elektron mikroskobuna bağlı GATAN marka, 782 yandan girişli ES500W Erlangshen Model CCD kamera ile fotoğraflanmıştır.

4. BULGULAR

Gebe sıçanlara uygulanan DS'un (Voltaren, 75mg/3 ml ampul, CIBA GEICY, İstanbul, IM) ve TQ'un doğum sonrası 4 ve 10 haftalık yavru sıçanların ovaryumlarında toplam hacim, korteks hacim, medulla hacim ile primordiyal, primer, preantral ve erken antral follikül sayısı üzerine etkisi stereolojik ve biokimyasal yöntemle araştırıldı. Ayrıca gebelikte kullanılan DS ve TQ'un postnatal ovaryumların ovulasyona, toplam, korteks, medulla hacimlerine ayrıca medullanın korteks ve toplam hacim oranına etkileri stereolojik yöntemlerle değerlendirildi. Dolayısıyla DS ve TQ'un postnatal dişi ovaryumda etkileri belirlendi.

Çalışmamızda; 4 haftalık ve 10 haftalık sıçanlarda primordiyal, primer, preantral, erken antral folliküllerin sayımı için fotoğraf atışmanlı mikroskop (Zeiss Axioskop 4 Carl Zeus Göttingen, Germany) kullanılarak belirlendi. Stereolojik olarak Cavalieri-disector prensibi kullanılarak hesaplandı. Cavalieri yöntemine göre Shtereom 1.5 paket programı hacim ölçümü için kullanıldı. AMH mikro ELISA yöntemiyle çalışıldı ve Biotech Co., Ltd China Cat No: YHB0745Ra ELISA kiti kullanıldı.

4.1. Ovaryum Hacim Bulguları

Çalışmada 10 haftalık sıçan ovaryumunda; Kontrol grubu ortalama toplam hacim 18.501mm^3 , korteks hacim 15.425mm^3 , medulla hacim 3.024mm^3 ile medullanın kortekse oranı 19.671 ve medullanın toplam hacime oranı 16.278 yüzde olarak hesaplandı. Büzüşme oranı ilave edildikten sonra toplam hacim 30.630mm^3 olarak hesaplandı (Tablo 2). SF grubunda ortalama toplam hacmi 10.681mm^3 , korteks hacmi 8.799mm^3 , medulla hacmi 1.883mm^3 ile medullanın kortekse 19.97 ve toplam hacime oranı 17.771 yüzde olarak hesaplandı. Büzüşme oranı ilave edildikten sonra toplam hacim 17.730mm^3 olarak hesaplandı (Tablo 3). DS grubunda ortalama toplam hacim 14.634mm^3 , korteks hacim 11.320mm^3 , medulla hacim 3.310mm^3 ile medullanın yüzde olarak kortekse 27.941 ve toplam hacime oranı 22.731 olarak hesaplandı. Büzüşme oranı ilave edildikten sonra 24.291mm^3 olarak hesaplandı (Tablo 4). DS-TQ grubunda ortalama toplam hacim 13.497mm^3 , korteks hacim 10.280mm^3 , medulla hacim 3.217mm^3 ile medullanın kortekse 31.273 ve toplam hacime oranı 24,587 yüzde olarak hesaplandı. Büzüşme oranı ilave edildikten sonra 17.880mm^3 olarak hesaplandı (Tablo

5). TQ grubunda ortalama toplam hacim 16.168mm^3 , korteks hacim 12.342mm^3 , medulla hacim 3.546mm^3 ile medullanın kortekse 28.652 ve toplam hacime oranı 21.93 yüzde olarak hesaplandı. Büzüşme oranı ilave edildikten sonra 26.501mm^3 olarak hesaplandı (Tablo 6).

Çalışmada 4 haftalık sıçan ovaryumda; Kontrol grubu ortalama toplam hacim 3.019mm^3 , korteks hacim 2.721mm^3 , medulla hacim 0.297mm^3 ile medullanın kortekse 11.004 ve toplam hacime oranı 10.078 yüzde olarak hesaplandı. Büzüşme oranı ilave edildikten sonra 4.529mm^3 olarak hesaplandı (Tablo 7). SF grubu ortalama toplam hacim 3.203mm^3 , korteks hacim 2.833mm^3 , medulla hacim 0.263mm^3 ile medullanın kortekse 9.994 ve toplam hacime oranı 8.791 yüzde olarak hesaplandı. Büzüşme oranı ilave edildikten sonra 4.826mm^3 olarak hesaplandı (Tablo 8). DS grubu 4 haftalık sıçan ovaryumun ortalama toplam hacim 3.041mm^3 , korteks hacim 2.718mm^3 , medulla hacim 0.352mm^3 ile medullanın kortekse 12.776 ve medullanın toplam hacime oranı 11.930 yüzde olarak hesaplandı. Büzüşme oranı ilave edildikten sonra 4.456mm^3 olarak hesaplandı (Tablo 9). DS-TQ grubu ortalama toplam hacim 2.432mm^3 , korteks hacim 3.092mm^3 , medulla hacim 0.340mm^3 ile medullanın kortekse 11.450 ve toplam hacime oranı 10.004 yüzde olarak hesaplandı. Büzüşme oranı ilave edildikten sonra 5.148mm^3 olarak hesaplandı (Tablo 10). TQ grubu ortalama toplam hacim 4.054mm^3 , korteks hacim 3.560mm^3 , medulla hacim 0.488mm^3 ile medullanın kortekse 13.592 ve toplam hacime oranı 12.180 yüzde olarak hesaplandı. Büzüşme oranı ilave edildikten sonra 6.092mm^3 olarak hesaplandı (Tablo 11).

Tablo 2. Kontrol grubu 10 haftalık sıçan ovaryumunda hacim ve yüzdeleri

Kontrol 10 haftalık	Toplam hacim (mm) ³ CD=0.1	Korteks hacim (mm) ³ CD=0.1	Medulla hacim (mm) ³ CD=0.2	Medulla/ korteks % oran CD=0.2	Medulla/ Toplam hacim % oran CD=0.1	%61 Büzüşme CD=0.09	HK
Sıçan 1	19.149	16.078	2.717	16.898	14.188	30.829	0.01
Sıçan 2	18.054	14.296	3.759	26.264	20.820	29.066	0.01
Sıçan 3	18.287	16.036	2.250	14.030	12.303	30.356	0.01
Sıçan 4	17.597	14.906	2.691	18.053	15.295	28.331	0.01
Sıçan 5	14.299	11.763	2.535	21.550	17.728	28.014	0.01
Sıçan 6	19.203	16.699	2.503	14.988	13.034	30.916	0.01
Sıçan 7	22.915	18.198	4.716	25.914	20.580	36.895	0.01
Ort.	18.501	15.425	3.024	19.671	16.278	30.630	0.01

Tablo 3. SF grubu 10 haftalık sıçan ovaryumunda hacim ve yüzdeleri

SF 10 haftalık	Toplam hacim (mm) ³ CD=0.11	Korteks hacim (mm) ³ CD=0.08	Medulla hacim (mm) ³ CD=0.2	Medulla/ Korteks % oran CD=0.2	Medulla/ Toplam hacim % oran CD=0.1	%66 Büzüşme mm ³ CD=0.1	HK
Sıçan 1	10.520	8.848	1.672	18.896	15.893	17.463	0.02
Sıçan 2	10.085	8.405	1.680	19.986	16.658	16.741	0.02
Sıçan 3	9.964	8.384	1.580	18.838	15.857	16.540	0.02
Sıçan 4	8.943	7.635	1.308	17.131	14.625	14.845	0.02
Sıçan 5	10.154	8.532	1.622	11.234	19.010	16.855	0.03
Sıçan 6	12.689	9.990	2.699	27.017	21.270	21.061	0.02
Sıçan 7	12.415	9.797	2.618	26.722	21.087	20.608	0.02
Ort.	10.681	8.799	1.883	19.975	17.771	17.730	0.02

Tablo 4. DS grubu 10 haftalık sıçan ovaryumunda hacim ve yüzdeleri

DS 10 haftalık	Toplam hacim (mm) ³ CD=0.1	Korteks hacim (mm) ³ CD=0.1	Medulla hacim (mm) ³ CD=0.2	Medulla/ Korteks % oran CD=0.2	Medulla/ Toplam hacim % oran CD=0.1	%66 Büzüşme mm ³ CD=0.1	HK
Sıçan 1	12.196	9.455	2.741	28.989	22.474	20.245	0.02
Sıçan 2	12.043	9.170	2.873	31.330	23.856	19.991	0.02
Sıçan 3	17.735	14.789	2.946	19.920	16.661	29.440	0.01
Sıçan 4	12.305	9.372	2.933	18.636	23.835	20.426	0.02
Sıçan 5	17.345	13.804	3.547	25.655	20.449	28.792	0.01
Sıçan 6	13.485	10.500	2.984	28.422	22.128	22.385	0.01
Sıçan 7	17.326	12.147	5.148	42.633	29.712	28.761	0.01
Ort.	14.634	11.320	3.310	27.941	22.731	24.291	0.01

Tablo 5. DS -TQ grubu 10 haftalık sıçan ovaryumunda hacim ve yüzdeleri.

DS-TQ 10 haftalık	Toplam hacim (mm) ³ CD=0.1	Korteks hacim (mm) ³ CD=0.2	Medulla hacim (mm) ³ CD=0.1	Medulla/ Korteks % oran CD=0.2	Medulla/ Toplam hacim % CD=0.2	%66 Büzüşme mm ³ CD=0.1	HK
Sıçan 1	16.878	13.888	2.990	21.532	17.715	28.017	0.01
Sıçan 2	12.135	9.100	3.035	33.353	25.010	20,144	0.02
Sıçan 3	15.993	12.420	3.572	28.764	22.334	25.548	0.01
Sıçan 4	12.518	8.986	3.531	39.300	28.207	20.779	0.02
Sıçan 5	10.153	7.178	2.975	27.519	29.301	16.853	0.02
Sıçan 6	11.890	8.068	3.822	47.374	32.144	19.73	0.02
Sıçan 7	14.913	12.318	2.595	21.066	17.401	24.755	0.01
Ort.	13.497	10.280	3.217	31.273	24,587	17.880	0.02

Tablo 6. TQ grubu 10 haftalık sıçan ovaryumunda hacim ve yüzdeleri

TQ 10 haftalık	Toplam hacim (mm) ³ CD=0.1	Korteks hacim (mm) ³ CD=0.1	Medulla hacim (mm) ³ CD=0.3	Medulla/ Korteks % oran CD=0..2	Medulla/ Toplam hacim % oran CD=0.2	%63 Büzüşme mm ³ CD=0.1	HK
Sıçan 1	16.707	13.615	3.013	22.071	18.036	27.232	0.01
Sıçan 2	18.873	13.937	4.936	35.416	26.153	30.762	0.01
Sıçan 3	13.506	11.138	2.365	21.239	17.509	22.014	0.01
Sıçan 4	16.588	11.592	4.996	43.098	30.118	27.033	0.01
Sıçan 5	17.369	14.503	2.862	19.757	16.478	28.832	0.01
Sıçan 6	17.455	14.099	3.356	23.803	19.226	28.973	0.01
Sıçan 7	12.675	9.377	3.298	35.177	26.019	20.660	0.01
Ort.	16.168	12.342	3.546	28,652	21.936	26.501	0.01

Tablo 7. Kontrol grubu 4 haftalık sıçan ovaryumunda hacim ve yüzdeleri.

Kontrol 4 haftalık	Toplam hacim (mm) ³ CD=0.1	Korteks hacim (mm) ³ CD=0.1	Medulla hacim (mm) ³	Medulla/ Korteks % oran CD=0.2	Medulla/ Toplam hacim % oran CD=0.2	%50 Büzüşme mm ³ CD=0.1	HK
Sıçan 1	3.398	3.081	0.305	9.923	8.975	5.097	0.03
Sıçan 2	3.026	2.769	0.256	9.245	8.460	4.539	0.03
Sıçan 3	3.277	2.885	0.411	14.266	13.457	4.915	0.03
Sıçan 4	2.677	2.397	0.280	10.459	11.681	4.015	0.03
Sıçan 5	2.704	2.520	0.184	7.309	6.804	4.059	0.03
Sıçan 6	3.386	2.994	0.384	14.896	11.340	5.079	0.03
Sıçan 7	2.665	2.402	0.262	10.929	9.831	3.997	0.03
Ort.	3.019	2.721	0.297	11.004	10.078	4.529	0.03

Tablo 8. SF grubu 4 haftalık sıçan ovaryumunda hacim ve yüzdeleri

SF 4 haftalık	Toplam hacim (μm) ³ CD=0.2	Korteks hacim (mm) ³ CD=0.2	Medulla hacim (mm) ³	Medulla/ Korteks % oran CD=0.1	Medulla/ Toplam hacim % oran CD=0.2	%53 Büzüşme mm ³ CD=0.2	HK
Sıçan 1	2.920	2.126	0.225	10.583	7.705	4.467	0.03
Sıçan 2	4.166	3.818	0.348	9.137	8.353	6.373	0.03
Sıçan 3	3.473	3.132	0.262	8.385	7.543	5.313	0.03
Sıçan 4	2.448	2.243	0.205	9.139	8.374	3.764	0.04
Sıçan 5	2.187	2.026	0.16	7.930	7.315	2.813	0.04
Sıçan 6	3.304	2.920	0.372	12.700	11.259	5.055	0.03
Sıçan 7	3.920	3.567	0.431	12.087	10.99	5.997	0.03
Ort.	3.203	2.833	0.263	9.994	8.791	4.826	0.03

Tablo 9. DS grubu 4 haftalık sıçan ovaryumunda hacim ve yüzdeleri

DS 4 haftalık CD=0.1	Toplam hacim (μm) ³ CD=0.1	Korteks hacim (mm) ³ CD=0.1	Medulla hacim (mm) ³	Medulla/ Korteks % oran CD=0.1	Medulla/ Toplam hacim % oran CD=0.1	%50 Büzüşme mm ³ CD=0.1	HK
Sıçan 1	3.179	2.908	0.270	9.299	8.493	4.768	0.03
Sıçan 2	2.642	2.311	0.331	12.528	14.068	3.490	0.04
Sıçan 3	2.073	1.803	0.270	14.975	13.024	3.109	0.03
Sıçan 4	3.763	3.371	0.392	11.628	10.417	5.644	0.03
Sıçan 5	2.763	2.422	0.341	14.077	12.341	3.812	0.03
Sıçan 6	3.512	3.053	0.458	14.019	13.037	5.338	0.03
Sıçan 7	3.356	3.159	0.407	12.903	12.127	5.034	0.03
Ort.	3.041	2.718	0.352	12.776	11.930	4.456	0.30

Tablo 10. DS-TQ grubu 4 haftalık sıçan ovaryumunda hacim ve yüzdeleri.

DS-TQ 4 Haftalık	Toplam hacim (mm) ³ CD=0.1	Korteks hacim (mm) ³ CD=0.1	Medulla hacim (mm) ³	Medulla/ Korteks % oran CD=0.1	Medulla/ Toplam hacim % oran CD=0.1	%50 Büzüşme mm ³ CD=0.1	HK
Sıçan 1	3.484	3.175	0.309	9.753	8.869	5.226	0.03
Sıçan 2	3.269	2.881	0.388	13.469	11.869	4.903	0.03
Sıçan 3	3.818	3.473	0.344	11.972	9.009	5.727	0.03
Sıçan 4	2.677	2.359	0.317	13.451	11.841	4.015	0.03
Sıçan 5	2.971	2.716	0.254	9.379	8.549	4.456	0.03
Sıçan 6	4.272	3.896	0.376	9.657	8.801	6.408	0.03
Sıçan 7	3.535	3.143	0.392	12.468	11.089	5.302	0.03
Ort.	2.432	3.092	0.340	11.450	10.004	5.148	0.03

Tablo 11. TQ grubu 4 haftalık sıçan ovaryumunda hacim ve yüzdeleri

TQ 4 haftalık	Toplamh acim (mm) ³ CD=0.1	Korteks hacim (mm) ³ CD=0.1	Medulla hacim (mm) ³	Medulla/ Korteks % oran CD=0.2	Medulla/ Toplam hacim % oran CD=0.2	%50 Büzüşme mm ³ CD=0.1	HK
Sıçan 1	4.758	4.069	0.654	16.072	13.745	7.137	0.02
Sıçan 2	3.763	3.373	0.390	10.447	10.367	5.644	0.03
Sıçan 3	4.308	3.971	0.337	8.486	9.217	6.462	0.03
Sıçan 4	4.535	4.037	0.497	12.330	10.959	6.802	0.02
Sıçan 5	3.943	3.343	0.599	17.915	15.191	5.993	0.03
Sıçan 6	4.016	3.374	0.642	19.027	15.986	6.024	0.03
Sıçan 7	3.053	2.752	0.299	10.864	9.793	4.579	0.03
Ort.	4.054	3.560	0.488	13.592	12.180	6.092	0.03

4.2. Sıçanlarda 4 ve 10 Haftalık Ovaryumun Follikül Sayım Bulguları

Kontrol grubu 10 haftalık sıçan ovaryumunda; ortalama primordiyal 2929, primer 719, preantral 478, erken antral 524 ve AMH'nın salgılandığı toplam follikül sayısı 997 olarak belirlendi (Tablo 12). SF grubu ortalama primordiyal 2061, primer 848, preantral 403, erken antral 374 ve AMH'nın salgılandığı toplam follikül sayısı 734 olarak belirlendi (Tablo 13). DS grubu ortalama primordiyal 2013, primer 580, preantral 434, erken antral 538 ve AMH'nın salgılandığı toplam follikül sayısı 814 olarak belirlendi (Tablo 14). DS-TQ grubu ortalama primordiyal 2874, primer 781, preantral 293, erken antral 279 ve AMH'nın salgılandığı toplam follikül sayısı 553 olarak belirlendi (Tablo 15). TQ grubu ortalama primordiyal 2485, primer 570, preantral 356, erken antral 307 ve AMH'nın salgılandığı toplam follikül sayısı 663 olarak belirlendi (Tablo 16).

Kontrol grubu 4 haftalık sıçan ovaryumunda; ortalama primordiyal 2623, primer 849, preantral 428, erken antral 318 ve AMH'nın salgılandığı toplam follikül sayısı 745 olarak belirlendi (Tablo 17). SF grubu 4 haftalık sıçan ovaryumunda ortalama primordiyal 2970, primer 669, preantral 441, erken antral 341 ve AMH'nın salgılandığı toplam follikül sayısı 768 olarak belirlendi (Tablo 18). DS grubu 4 haftalık sıçan ovaryumunda ortalama primordiyal 2327, primer 843, preantral 355, erken antral 179 ve AMH'nın salgılandığı toplam follikül sayısı 544 olarak belirlendi (Tablo 19). DS-TQ grubu 4 haftalık sıçan ovaryumunda ortalama primordiyal 2235, primer 416, preantral 615, erken antral 413 ve AMH'nın salgılandığı toplam follikül sayısı 1053 olarak belirlendi (Tablo 20). TQ grubu ortalama primordiyal 2615, primer 579, preantral 657, erken antral 538 ve AMH'nın salgılandığı toplam follikül sayısı 1118 olarak belirlendi (Tablo 21).

4.3. Korpus Luteum Sayım Bulguları

Çalışma grubunun sadece 10 haftalık sıçan ovaryumunda stereolojik olarak sistematik rastgele kuralına göre ve 1/17 alınan ardışık, boyalı kesitlerde sayım yapıldı. Sayım kriteri olarak; sadece örnek kesitlerde ve bütünlüğü bozulmamış, sayısal olarak en çok KL'ları içeren kesitler esas alındı. Bu şekilde sadece bir kesitteki en fazla KL'lar sayıldı. Kontrol grubunda 10 haftalık sıçan ovaryumunda ortalama maksimum KL

sayısı 13 (Tablo 12), serum fizyolojik 10 (Tablo 13), DS 8 (tablo 14), DS-TQ 11(Tablo 15) ve TQ 8 (Tablo 16) olarak sayıldı.

Çalışma grubunun 4 haftalık sıçam ovaryumunda KL'lara rastlanmadığı için sayım yapılamadı.

4.4. ELISA Bulguları

Çalışma grubunda yer alan tüm sıçan serum örnekleri mikro ELISA yöntemiyle kit prosedürüne göre çalışıldı, 450nm de okutuldu. Elde edilen optik dansite verileri standart eğri oluşturulması için ng/ml'ye çevrildi. Sıçanlarda elde edilen sonuçlar 10 ve 4 haftalık kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Ayrıca sıçan serum AMH değeri insanlardaki serum AMH değerleriyle karşılaştırıldı. 1.00 ng/ml<ise düşük, 1.00-3.5 ng/ml arasındaki değerler normal, 3.5ng/ml'den büyük değerler yüksek (Zarek SM ve ark. 2015) olarak değerlendirildi. Anadol ve ark., (2016) sıçanların kontrol grubu serum AMH değeri 3.96±0.53 ng/ml olarak, ovaryohisterektomi yapılan sıçanlarda serum AMH değeri <0.312 ng/ml (P<0.05) olarak bildirmektedir.

Çalışmada kontrol grubu ait 10 haftalık sıçan ovaryumunda ortalama serum AMH değeri 2.258 ng/ml (Tablo 12), serum fizyolojik 3.880 ng/ml (Tablo 13), DS 6.191 ng/ml (tablo 14), DS-TQ 4.243 ng/ml (Tablo 15) ve TQ 6,00 (Tablo 16) olarak belirlendi.

Kontrol grubuna ait 4 haftalık sıçan ovaryumunlarında ortalama serum AMH değeri 2.00 ng/ml (Tablo 17), serum fizyolojik 3.00 ng/ml (Tablo 18), DS 2.22 ng/ml (tablo 19), DS-TQ 2.26 ng/ml (Tablo 15) ve TQ 2.20 ng/ml (Tablo 16) olarak belirlendi.

Tablo 12. Kontrol grubuna ait 10 haftalık sıçan ovaryumlarında follikül değerleri, KL sayısı ve serum AMH'nin ng/ml bulguları.

Kontrol 10 haftalık	Primordiyal follikül CD=0.2	Primer follikül CD=0.1	Preantral follikül CD=0.1	Erken Antral follikül CD =0.1	AMH- STFS CD =0.1	KL CD =0.1	AMH ng/ml CD=0.1
Sıçan 1	2791	606	513	576	1089	13	2.042
Sıçan 2	2048	650	413	660	1073	14	1.747
Sıçan 3	3029	757	402	452	854	13	1.952
Sıçan 4	3796	830	499	403	862	10	1.401
Sıçan 5	2153	597	428	482	910	10	2.705
Sıçan 6	3145	887	525	656	1181	13	2.722
Sıçan 7	3538	707	567	441	1008	16	1.834
Ort.	2929	719	478	524	997	13	2.258

Tablo 13. SF grubuna ait 10 haftalık sıçan ovaryumlarında follikül değerleri, KL sayısı ve serum AMH'nin ng/ml bulguları.

SF 10 haftalık	Primordiyal follikül CD=0.2	Primer follikül CD=0.06	Preantral follikül CD=0.09	Erken Antral follikül CD=0.2	AMH- STFS CD=0.1	KL CD =0.1	AMH ng/ml CD=0.2
Sıçan 1	3747	780	443	394	837	9	3.087
Sıçan 2	2291	881	401	351	452	11	3.595
Sıçan 3	3280	745	358	405	763	12	2.909
Sıçan 4	2696	898	447	335	782	12	2.991
Sıçan 5	2192	923	367	314	681	8	5.276
Sıçan 6	2041	850	440	330	770	8	4.305
Sıçan 7	2061	858	366	488	854	7	5.061
Ort.	2061	848	403	374	734	10	3.88

Tablo 14. DS grubuna ait 10 haftalık sıçan ovaryumlarında follikül değerleri, KL sayısı ve serum AMH'nin ng/ml bulguları.

DS 10 haftalık	Primordiyal follikül CD=0.1	Primer follikül CV=0.2	Preantral CD=0.1	Erken Antral follikül CD=0.1	AMH -STFS CD=0.05	KL CD=0.2	AMH ng/ml CD=0.4
Sıçan 1	2397	719	576	288	864	7	9.174
Sıçan 2	1933	743	466	259	725	8	4.955
Sıçan 3	1577	573	636	231	867	9	3.953
Sıçan 4	1673	456	616	168	784	8	3.982
Sıçan 5	2168	406	573	220	793	6	10.727
Sıçan 6	2349	503	426	355	781	12	3.897
Sıçan 7	1991	663	475	329	814	6	6.649
Ort.	2013	580	538	263	814	8	6.191

Tablo 15. DS-TQ grubuna ait 10 haftalık sıçan ovaryumlarında follikül değerleri, KL sayısı ve serum AMH'nin ng/ml bulguları.

DS-TQ 10 haftalık	Primordiyal follikül CD=0.1	primer follikül CD=0.1	Preantral follikül CD=0.2	Erken Antral follikül CD=0.1	AMH - STFS CD=0.1	KL CD=0.1	AMH ng/ml CD=0.3
Sıçan 1	2750	916	240	288	528	12	3.908
Sıçan 2	2229	913	332	196	528	12	3.630
Sıçan 3	3245	695	293	276	439	10	3.752
Sıçan 4	3035	850	243	291	534	10	3.089
Sıçan 5	2938	587	387	341	728	8	6.143
Sıçan 6	2736	651	200	351	551	8	6.422
Sıçan 7	3182	856	353	210	563	14	2.757
Ort.	2874	781	293	279	553	11	4.243

Tablo 16. TQ grubuna ait 10 haftalık sıçan ovaryumlarında follikül değerleri, KL sayısı ve serum AMH'nin ng/ml bulguları.

TQ 10 haftalık	Primordiyal follikül CD=0.2	Primer follikül CD=0.1	Preantral follikül CD=0.1	Erken Antral follikül CD =0.3	AMH- STFS CD =0.2	KL CD =0.3	AMH ng/ml CD=0.2
Sıçan 1	1596	456	446	357	803	8	4.068
Sıçan 2	2438	464	309	220	529	7	5.741
Sıçan 3	2918	707	290	207	497	5	7.330
Sıçan 4	2436	463	310	221	531	5	8.603
Sıçan 5	3280	587	396	446	842	14	4.046
Sıçan 6	2886	577	460	430	890	8	7.207
Sıçan 7	1839	735	283	270	552	8	6.562
Ort.	2485	570	356	307	663	8	6.00

Tablo 17. Kontrol grubuna ait 4 haftalık sıçan ovaryumlarında follikül değerleri, KL sayısı ve serum AMH'nin ng/ml bulguları.

Kontrol 4 haftalık	Primordiyal follikül CD=0.1	Primer follikül CD=0.2	Preantral follikül CD=0.1	Erken Antral follikül CD=0.1	AMH- STFS CD=0.1	AMH ng/ml CD=0.3
Sıçan 1	2851	916	370	246	616	2.798
Sıçan 2	2321	677	476	283	759	2.722
Sıçan 3	2510	1195	419	366	785	3.043
Sıçan 4	2191	836	419	309	722	1.996
Sıçan 5	3273	1028	406	258	664	3.021
Sıçan 6	2258	645	380	415	795	1.815
Sıçan 7	2956	646	524	349	873	1.798
Ortalama	2623	849	428	318	745	2.00

Tablo 18. SF grubuna ait 4 haftalık sıçan ovaryumlarında follikül değerleri, KL sayısı ve serum AMH'nin ng/ml bulguları.

SF 4 haftalık	Primordiyal follikül CD=0.2	Primer follikül CD=0.05	Preantral follikül CD=0.1	Erken Antral follikül CD=0.2	AMH- STFS CD=0.1	AMH ng/ml CD=0.3
Sıçan 1	3974	612	302	385	687	0.524
Sıçan 2	3025	641	425	255	680	3.211
Sıçan 3	3256	708	422	317	739	6.876
Sıçan 4	3260	724	443	307	750	1.832
Sıçan 5	2970	665	549	366	915	2.705
Sıçan 6	2103	630	541	492	933	1.152
Sıçan 7	2205	701	402	268	670	4.084
Ortalama	2970	669	441	341	768	3.00

Tablo 19. DS grubuna ait 4 haftalık sıçan ovaryumlarında follikül değerleri, KL sayısı ve serum AMH'nin ng/ml bulguları.

DS 4 haftalık	Primordiyal CD=0.1	Primer CD=0.2	Preantral CD=0.1	Erken Antral CD=0.2	AMH- STFS CD=0.1	AMH ng/ml CD=0.3
Sıçan 1	2443	905	409	112	521	3.106
Sıçan 2	1914	604	265	159	424	1.815
Sıçan 3	1943	583	323	161	484	2.321
Sıçan 4	2235	1166	373	224	597	1.222
Sıçan 5	2201	792	411	123	534	1.309
Sıçan 6	2671	1130	353	223	576	2.530
Sıçan 7	2881	720	354	248	672	3.211
Ortalama	2327	843	355	179	544	2.21

Tablo 20. DS-TQ grubuna ait 4 haftalık sıçan ovaryumlarında follikül değerleri, KL sayısı ve serum AMH'nin ng/ml bulguları.

DS-TQ 4 haftalık	Primordiyal CD=0.1	Primer CD=0.1	Preantral CD=0.1	Erken Antral CD=0.1	AMH- STFS CD=0.01	AMH ng/ml CD=0.2
Sıçan 1	1858	530	592	507	1099	2.339
Sıçan 2	1841	368	728	383	1113	2.251
Sıçan 3	2704	416	536	402	983	1.518
Sıçan 4	2355	362	549	487	1036	1.798
Sıçan 5	2808	401	662	389	1051	3.071
Sıçan 6	2030	387	669	433	1102	2.862
Sıçan 7	2050	445	568	416	987	2.042
Ortalama	2235	416	615	413	1053	2.26

Tablo 21. TQ grubuna ait 4 haftalık sıçan ovaryumlarında follikül değerleri, KL sayısı ve serum AMH'nin ng/ml bulguları.

TQ 4 haftalık	Primordiyal follikül CD=0.1	Primer follikül CD=0.1	Preantral follikül CD=0.1	Erken Antral follikül CD=0.1	AMH- STFS CD=0.01	AMH ng/ml CD=0.2
Sıçan 1	2335	406	542	610	1152	1.6584
Sıçan 2	2469	594	690	640	1331	2.9296
Sıçan 3	2282	496	564	706	1270	1.8268
Sıçan 4	3182	809	867	495	1362	3.1190
Sıçan 5	2542	813	822	528	1350	2.7229
Sıçan 6	2150	488	627	385	1009	2.5484
Sıçan 7	3348	449	489	399	837	1.5778
Ort.	2615	579	657	538	1187	2.2

4.5. İstatistiksel Analiz

Üzerinde durulan özellikler için tanımlayıcı istatistikler; medyan, ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değer olarak ifade edilmiştir. Bu özellikler bakımından grupları karşılaştırmada Kruskal-Wallis analizi yapılmıştır. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi %5 olarak alınmış ve hesaplamalar için SPSS (Ver.20) istatistik paket programı kullanılmıştır. İstatistiksel veriler Tablo 22-25’lerde sonuçları verilmiştir.

Tablo 22. Sıçanlarda 10 haftalık ovaryum hacim ölçümlerinin istatistiksel sonuçları.

		Medyan	Ort.	St. Sap.	Min.	Mak.	p.
Toplam hacim mm ³	Kontrol	18.287 a	18.501	2.553	14.299	22.915	0.001
	SF	10.154 d	10.681	1.368	8.943	12.689	
	DS	13.485bc	14.634	2.696	12.043	17.735	
	DS-TQ	12.518 c	13.497	2.458	10.153	16.878	
	TQ	16.707ab	16.168	2.242	12.675	18.873	
Korteks hacim (mm) ³	Kontrol	16.036a	15.425	2.044	11.763	18.198	0.001
	SF	8.532d	8.799	.834	7.635	9.990	
	DS	10.500bc	11.320	2.290	9.170	14.789	
	DS-TQ	9.100cd	10.280	2.560	7.178	13.888	
	TQ	13.615b	12.609	1.925	9.377	14.503	
Medulla hacim (mm) ³	Kontrol	2.691a	3.024	0.887	2.250	4.716	0.004
	SF	1.672 b	1.883	0.545	1.308	2.699	
	DS	2.946a	3.310	0.850	2.741	5.148	
	DS-TQ	3.035 a	3.217	0.432	2.595	3.822	
	TQ	3.298 a	3.547	1.023	2.365	4.996	
Medulla /korteks hacimin % oranı	Kontrol	18.053b	19.671	5.001	14.030	26.264	0.01
	SF	18.896b	19.975	5.509	11.234	27.017	
	DS	28.422a	27.941	8.008	18.636	42.633	
	DS-TQ	28.764a	31.273	9.552	21.066	47.374	
	TQ	23.803a	28.652	9.110	19.757	43.098	
Medulla/toplam hacimin % oranı	Kontrol	15.295c	16.278	3.486	12.303	20.820	0.01
	SF	16.658bc	17.771	2.680	14.625	21.270	
	DS	22.474ab	22.731	3.952	16.661	29.712	
	DS-TQ	25.010a	24.587	5.724	17.401	32.144	
	TQ	21.226ab	21.934	5.375	16.478	30.118	
%61büzüşme faktörü ilaveli toplam hacim	Kontrol	30.356a	30.630	3.001	28.014	36.895	0.001
	SF	16.855d	17.730	2.271	14.845	21.061	
	DS	22.385bc	24.291	4.476	19.991	29.440	
	DS-TQ	20.779c	22.261	3.926	16.853	28.017	
	TQ	27.232b	26.501	3.759	20.660	30.762	

Tablo 23. Sıçanlarda 4 haftalık ovaryum hacim ölçümlerinin istatistiksel sonuçları.

		Medyan	Ort.	St. Sap.	Min.	Mak.	p.
Toplam hacim (mm)³	Kontrol	3.026b	3.019	0.338	2.665	3.398	0.02
	SF	3.304b	3.203	0.731	2.187	4.166	
	DS	3.179b	3.041	0.582	2.073	3.763	
	DS-TQ	3.484b	3.432	0.529	2.677	4.272	
	TQ	4.016a	4.054	0.562	3.053	4.758	
Korteks hacim (mm)³	Kontrol	2.769b	2.721	0.283	2.397	3.081	0.04
	SF	2.920b	2.833	0.719	2.026	3.818	
	DS	2.908b	2.718	0.557	1.803	3.371	
	DS ve TQ	3.143ab	3.092	0.504	2.359	3.896	
	TQ	3.374a	3.560	0.487	2.752	4.069	
Medulla hacim (mm)³	Kontrol	0.280	0.297	0.078	0.184	0.411	0.05
	SF	0.262	0.286	0.099	0.160	0.431	
	DS	0.341	0.353	0.071	0.270	0.458	
	DS-TQ	0.344	0.340	0.050	0.254	0.392	
	TQ	0.497	0.488	0.148	0.299	0.654	
Medulla /korteks hacimin % oranı	Kontrol	10.459	11.004	2.708	7.309	14.896	0.14
	SF	9.139	9.994	1.842	7.930	12.700	
	DS	12.903	12.776	1.896	9.299	14.975	
	DS-TQ	11.972	11.450	1.815	9.379	13.469	
	TQ	12.330	13.592	4.070	8.486	19.027	
Medulla/toplam hacimin % oranı	Kontrol	9.831ab	10.078	2.243	6.804	13.457	0.02
	SF	8.353b	8.778	1.624	7.315	11.259	
	DS	12.341a	11.930	1.884	8.493	14.068	
	DS-TQ	9.009ab	10.004	1.521	8.549	11.869	
	TQ	10.959a	12.180	2.746	9.217	15.986	
%50 büzüşme faktörü ilaveli toplam hacim	Kontrol	4.539b	4.529	0.507	3.997	5.097	0.02
	SF	5.055b	4.826	1.249	2.813	6.373	
	DS	4.768b	4.456	0.982	3.109	5.644	
	DS-TQ	5.226ab	5.148	0.793	4.015	6.408	
	TQ	6.024a	6.092	0.840	4.579	7.137	

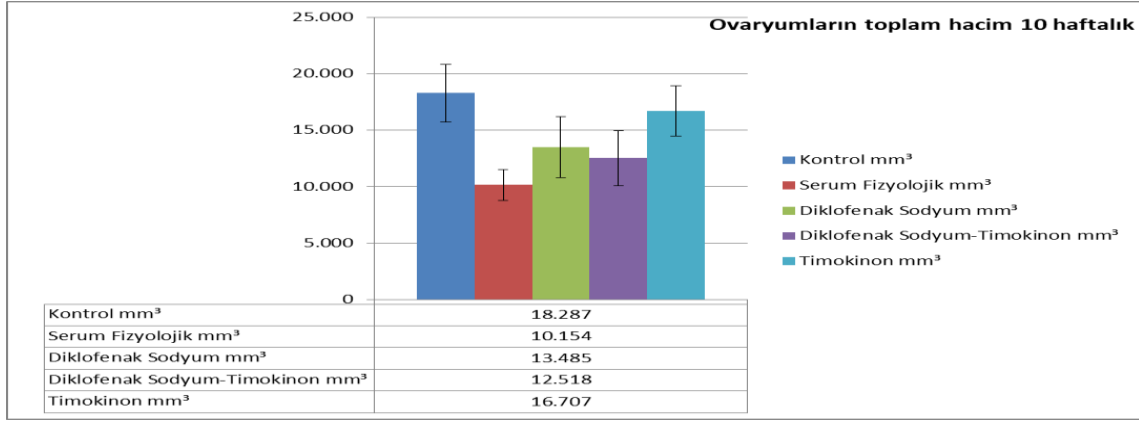
Tablo 24. Sıçanlarda 10 haftalık ovaryum follikülleri ve korpus luteum sayısı ile serum AMH ng/ml değeri

		Median	Mean	St. Sap.	Min	Max	p.
Primordiyal follikül	Kontrol	3029a	2929	655	2048	3796	0.03
	SF	2291ab	2615	665	2041	3747	
	DS	1991b	2013	315	1577	2397	
	DS-TQ	2938a	2874	345	2229	3245	
	TQ	2438ab	2485	605	1596	3280	
Primer follikül (unilaminer)	Kontrol	707a	719	111	597	887	0.001
	SF	858a	848	64	745	923	
	DS	573b	580	132	406	743	
	DS-TQ	850a	781	134	587	916	
	TQ	577b	570	117	456	735	
Preantral follikül (multilaminer)	Kontrol	499a	478	64	402	567	0.001
	SF	401b	403	40	358	447	
	DS	573a	538	82	426	636	
	DS-TQ	293c	293	68	200	387	
	TQ	310bc	356	76	283	460	
Erken antral follikül	Kontrol	482a	524	106	403	660	0.001
	SF	351b	374	60	314	488	
	DS	259c	264	65	168	355	
	DS-TQ	288c	279	59	196	351	
	TQ	270c	307	103	207	446	
AMH'nın salgılandığı toplam follikül sayısı	Kontrol	1008a	997	125	854	1181	0.001
	SF	770bc	734	136	452	854	
	DS	793b	804	50	725	867	
	DS-TQ	534d	553	87	439	728	
	TQ	552cd	663	172	497	890	
Korpus luteum sayısı	Kontrol	13a	13	2	10	16	0.006
	SF	10a	10	2	7	12	
	DS	8b	8	2	6	12	
	DS-TQ	10ab	11	2	8	14	
	TQ	8b	8	3	5	14	
Serum AMH ng/ml Değeri	Kontrol	2.042c	2.258	0.464	1.747	2.801	0.001
	SF	3.595bc	3.889	0.997	2.909	5.276	
	DS	5.191a	6.191	2.780	3.897	10.728	
	DS-TQ	3.958ab	4.543	1.198	3.630	6.423	
	TQ	6.562a	6.223	1.712	4.046	8.604	

Tablo 25. Sıçanlarda 4 haftalık ovaryum follikülleri ve korpus luteum sayısı ile serum AMH ng/ml değeri.

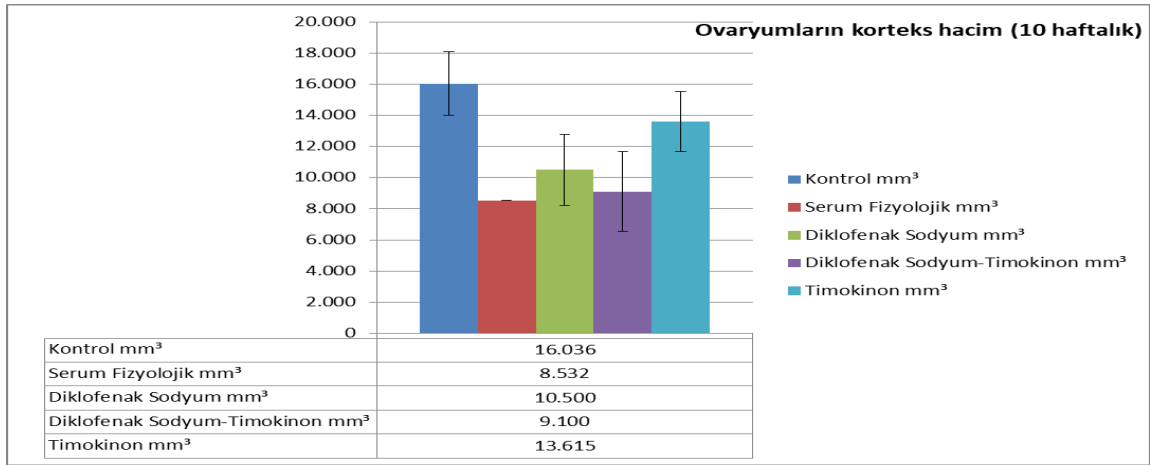
		Median	Mean	St. Sap	Min	Maximum	p.
Primordiyal follikül	Kontrol	2510	2623	410	2191	3273	0.08
	SF	3025	2970	647	2103	3974	
	DS	2235	2327	361	1914	2881	
	DS-TQ	2050	2235	395	1841	2808	
	TQ	2469	2615	464	2150	3348	
Primer follikül (unilaminer)	Kontrol	836a	849	212	645	1195	0.001
	SF	665ab	669	43	612	724	
	DS	792a	843	236	583	1166	
	DS-TQ	401c	416	58	362	530	
	TQ	496bc	579	168	406	813	
Preantral follikül (multilaminer)	Kontrol	419b	428	55	370	524	0.001
	SF	425b	441	85	302	549	
	DS	354b	355	51	265	411	
	DS-TQ	592a	615	72	536	728	
	TQ	627a	657	143	489	867	
Erken antral follikül	Kontrol	309c	318	62	246	415	0.001
	SF	317c	341	81	255	492	
	DS	161d	179	53	112	248	
	DS-TQ	416b	431	48	383	507	
	TQ	528a	538	121	385	706	
AMH'nın salgılandığı toplam follikül sayısı	Kontrol	759c	745	86	616	873	0.001
	SF	739c	768	111	670	933	
	DS	534d	544	80	424	672	
	DS-TQ	1051b	1053	54	983	1113	
	TQ	1270a	1187	200	837	1362	
Serum AMH değeri ng/ml	Kontrol	2.722	2.456	0.564	1.798	3.043	0.58
	SF	3.212	2.970	1.067	1.824	4.084	
	DS	2.322	2.402	0.576	1.815	3.212	
	DS-TQ	2.252	2.269	0.553	1.519	3.072	
	TQ	2.548	2.340	0.639	1.578	3.119	

Tablo 26. Sıçan ovaryumlarının toplam hacim ölçümleri ve standart sapmaları (10haftalık).



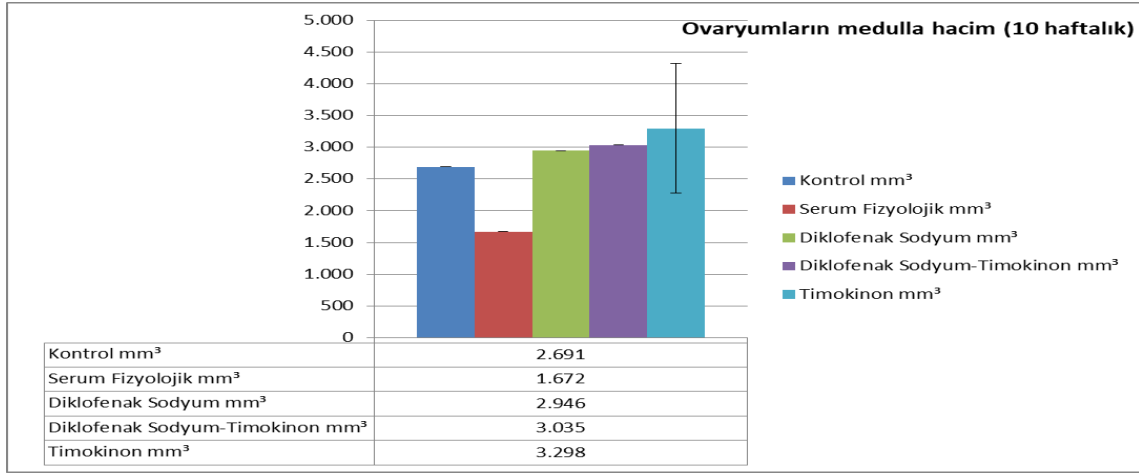
SF, DS, DS-TQ ve TQ grubu 10 haftalık ovaryumların kontrol grubuna göre toplam hacminin tüm p değerlerinde ($p=0.001$) anlamlı azaldığı belirlendi (Tablo 26).

Tablo 27. Sıçan ovaryumlarının korteks hacim ölçümleri ve standart sapmaları (10 haftalık).



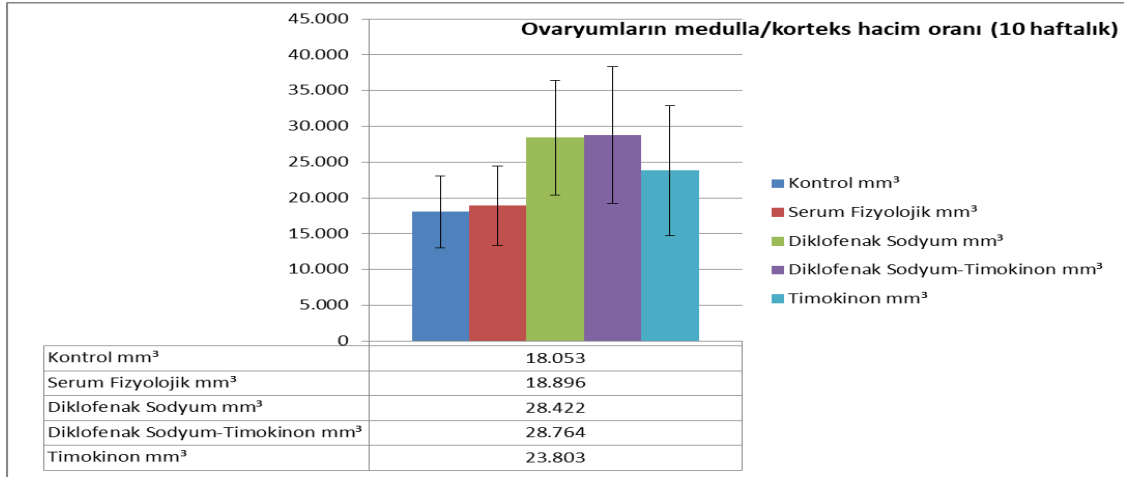
DS, DS-TQ ve TQ grubu 10 haftalık ovaryumların kontrol grubuna göre korteks hacminin anlamlı azaldığı ($p\leq 0.05$), bu azalma DS, DS-TQ grubunda daha belirgin olduğu belirlendi (Tablo 27).

Tablo 28. Sıçan ovaryumlarının medulla hacim ölçümleri ve standart sapmaları (10 haftalık).



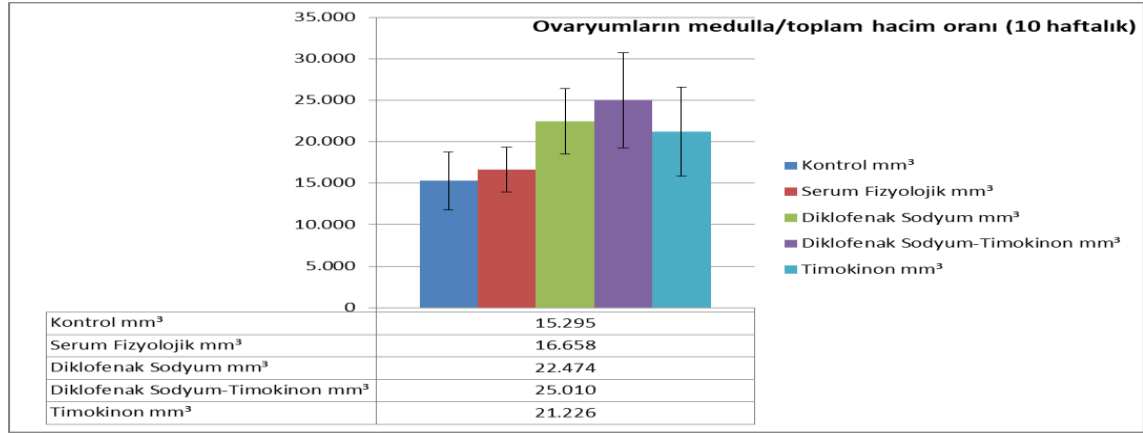
DS, DS-TQ ve TQ grubu 10 haftalık ovaryumların kontrol grubuna göre medulla hacminin anlamlı arttığı belirlendi ($p \leq 0.05$), (Tablo 28).

Tablo 29. Sıçan ovaryumların medulla hacminin /korteks hacmine yüzde oranı ve standart sapmaları (10 haftalık).



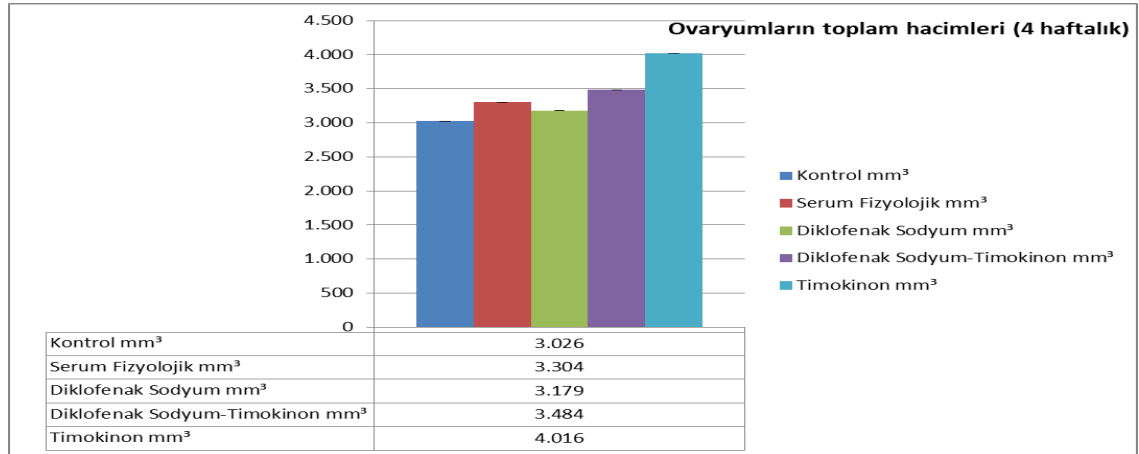
DS, DS-TQ ve TQ grubu 10 haftalık ovaryumların kontrol grubuna göre medulla hacmi/kortekse hacime % oranı anlamlı arttığı belirlendi ($p \leq 0.05$), (Tablo 29).

Tablo 30. Sıçan ovaryumların medulla hacminin /toplam hacimine yüzde oranı ve standart sapmaları (10 haftalık)



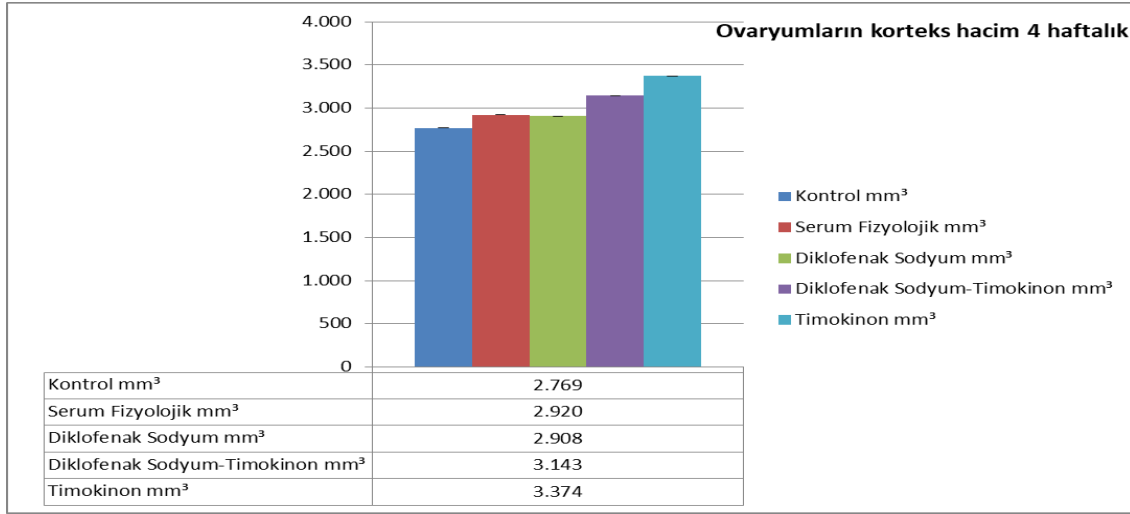
DS, DS-TQ ve TQ grubu 10 haftalık ovaryumların kontrol grubuna göre medulla hacmi/toplam hacime yüzde oranı anlamlı arttığı ($p \leq 0.05$), bu artış DS, DS-TQ grubunda daha belirgin olduğu belirlendi (Tablo 30).

Tablo 31. Sıçan ovaryumlarının toplam hacim ölçümleri ve standart sapmaları (4 haftalık).



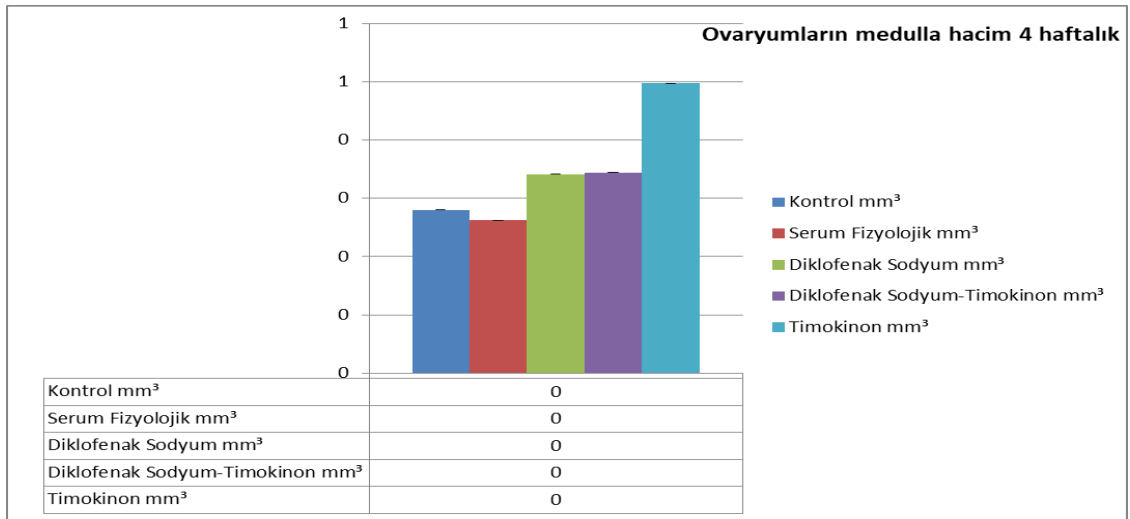
TQ grubu 4 haftalık ovaryumların toplam hacmi kontrol grubuna göre anlamlı artış olduğu belirlendi ($P=0.002$) (Tablo 31). DS ve DS-TQ grupların toplam hacmi kontrol grubuna göre anlamlı bir fark görülmedi.

Tablo 32. Sıçan ovaryumlarının korteks hacim ölçümleri ve standart sapmaları (4 haftalık).



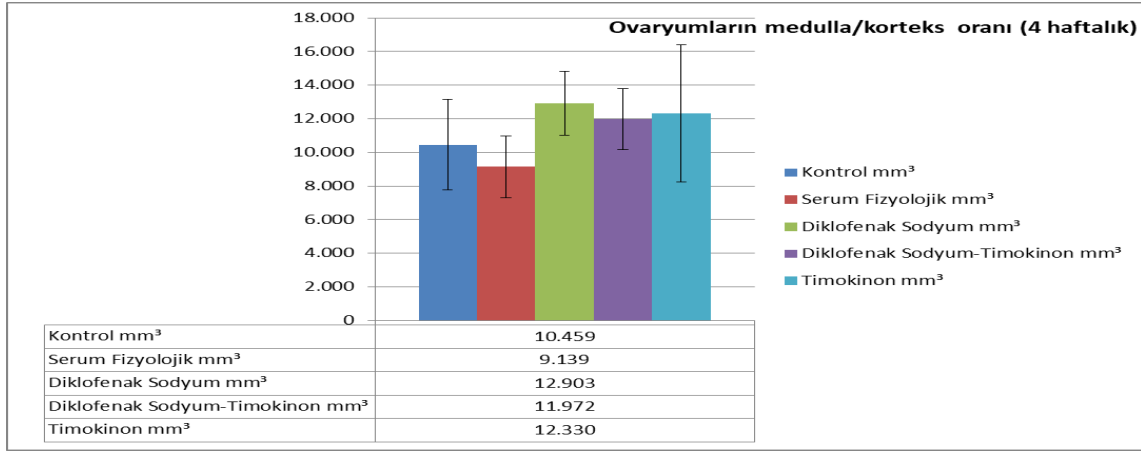
TQ grubu 4 haftalık ovaryumların korteks hacmi kontrol grubuna göre anlamlı artış belirlendi ($P=0.04$) fakat DS, DS-TQ grubunda anlamlı bir fark belirlenmedi (Tablo 32).

Tablo 33. Sıçan ovaryumlarının medulla hacim ölçümleri ve standart sapmaları (4 haftalık).



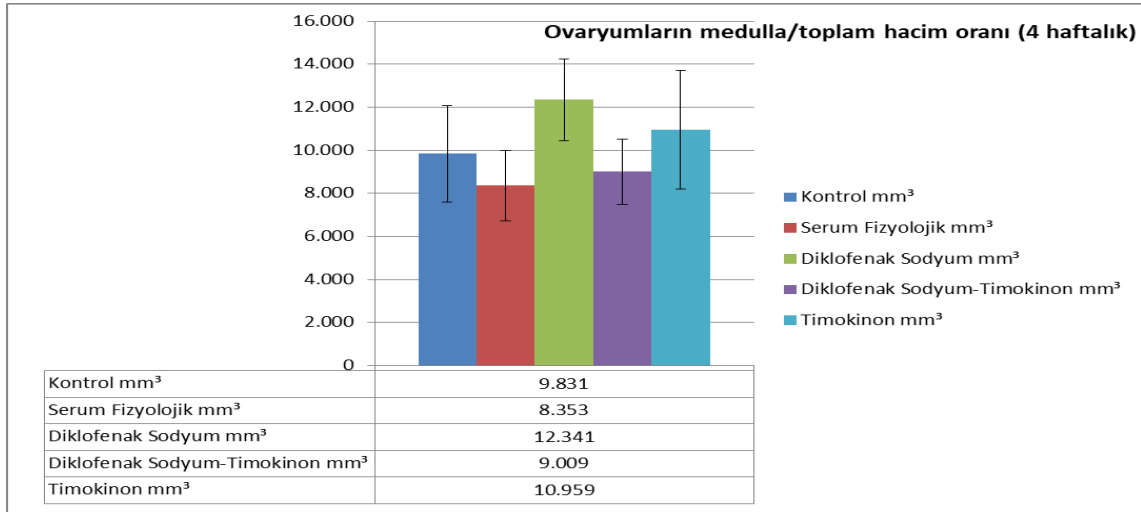
DS, DS-TQ ve TQ grubu 4 haftalık ovaryumların medulla hacmi kontrol grubuna göre anlamlı bir fark belirlenmedi ($P=0.05$) (Tablo 33).

Tablo 34. Sıçan ovaryumlarının medulla hacminin /korteks hacimine yüzde oranı ve standart sapmaları (4 haftalık).



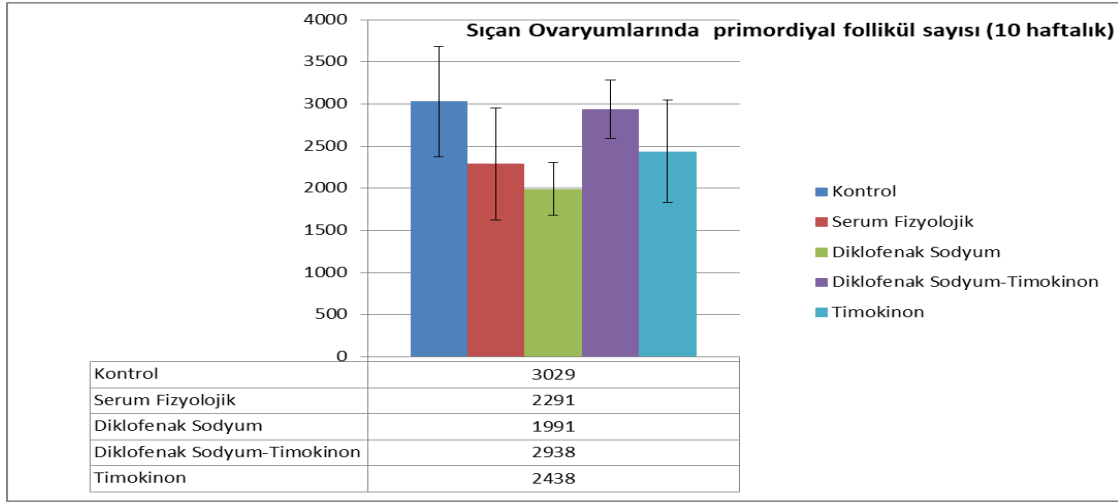
DS, DS-TQ ve TQ grubu 4 haftalık ovaryumların medulla hacminin/korteks hacimine oranı kontrol grubuna göre anlamlı bir fark belirlenmedi (P=0.05) (Tablo 34).

Tablo 35. Sıçan ovaryumlarının medulla hacminin /korteks hacimine yüzde oranı ve standart sapmaları (4 haftalık).



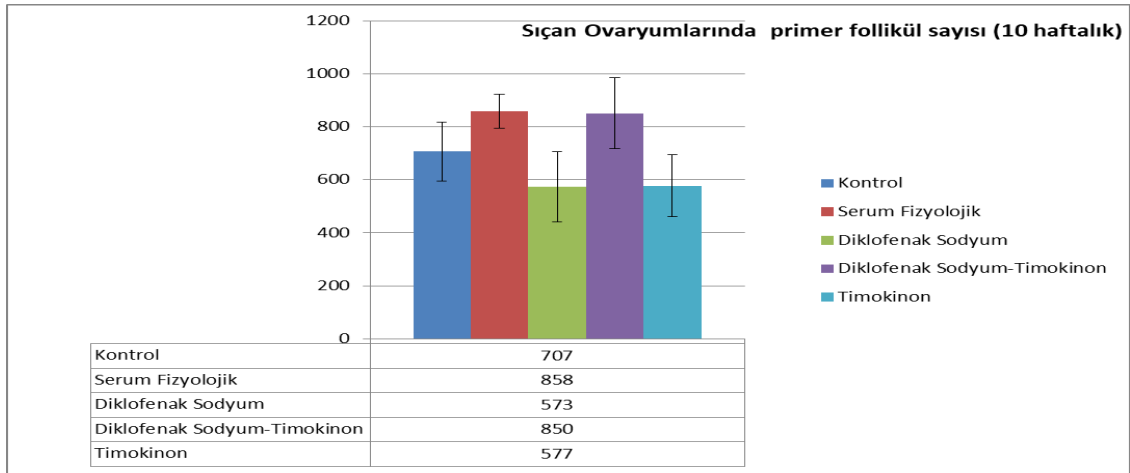
DS, DS-TQ ve TQ grubu 4 haftalık ovaryumların medulla hacminin/toplam hacimine oranı kontrol grubuna göre anlamlı bir fark belirlenmedi (P=0.05) (Tablo 35).

Tablo 36. Sıçan ovaryumların primordiyal follikül sayısı ve standart sapmaları (10 haftalık).



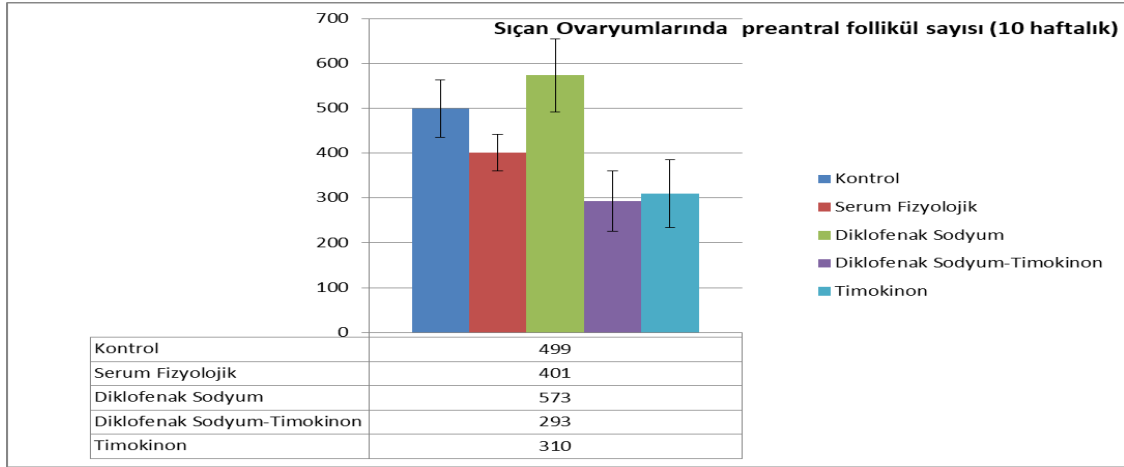
DS, DS-TQ ve TQ grubu 10 haftalık ovaryumların primordiyal follikül sayısı kontrol grubuna göre anlamlı bir fark belirlenmedi (Tablo 36).

Tablo 37. Sıçan ovaryumların primer follikül sayısı ve standart sapmaları (10 haftalık).



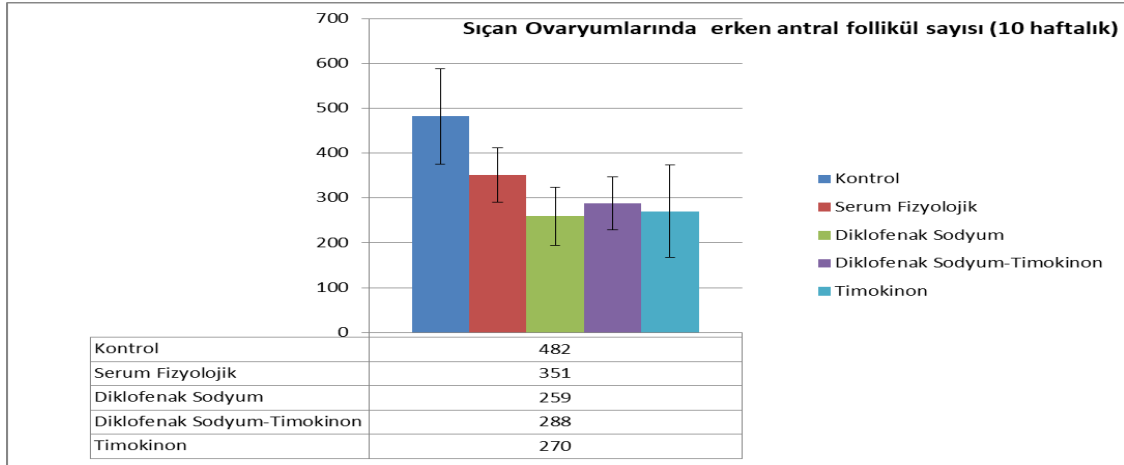
DS ve TQ grubu 10 haftalık ovaryumların primer follikül sayısı kontrol grubuna göre anlamlı azalma olduğu ($p \leq 0.05$) fakat DS-TQ grubunda anlamlı bir fark olmadığı belirlendi (Tablo 37). DS grubu ovaryumların ise primer follikül sayısı anlamlı bir fark görülmedi.

Tablo 38. Sıçan ovaryumların preantral follikül sayısı ve standart sapmaları (10 haftalık).



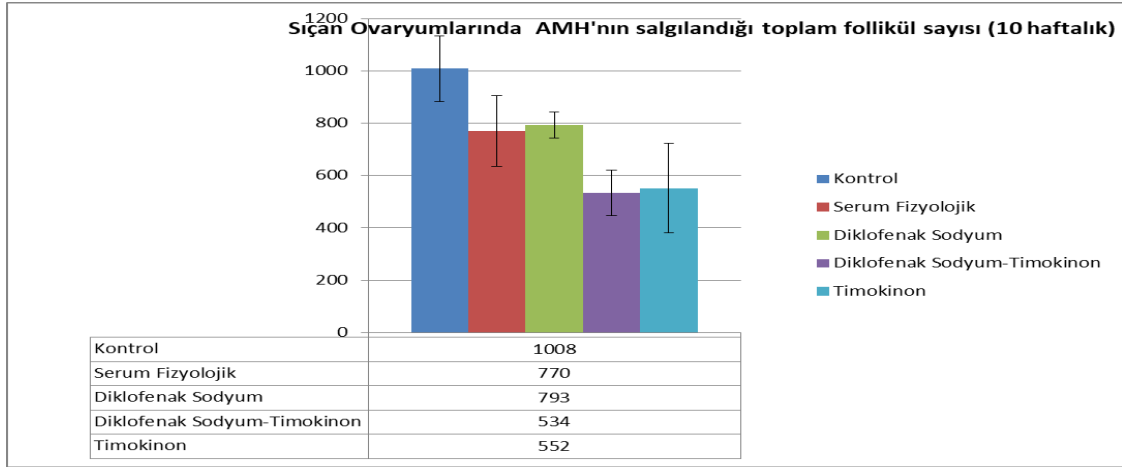
DS-TQ ve TQ grubu 10 haftalık ovaryumların preantral follikül sayısını kontrol grubuna göre anlamlı azalttığı ($p \leq 0.05$) dolayısıyla TQ'un preantral follikül sayısını azallığı belirlendi (Tablo 38). DS grubu 10 haftalık ovaryumların preantral follikül sayısı kontrol grubuna göre anlamlı bir fark görülmedi.

Tablo 39. Sıçan ovaryumların erken antral follikül sayısı ve standart sapmaları (10 haftalık).



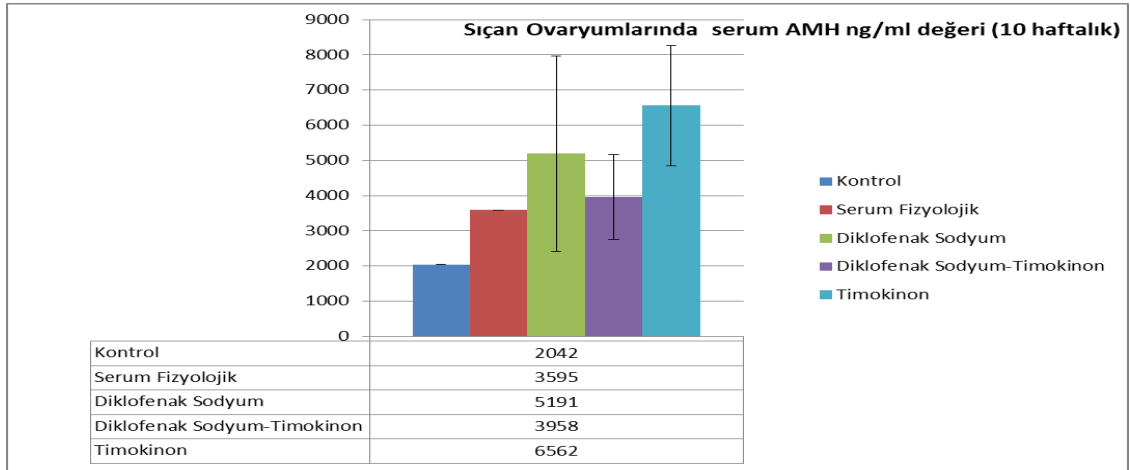
DS, DS-TQ ve TQ grubu 10 haftalık ovaryumların erken antral follikül sayısı kontrol grubuna göre anlamlı azaldığı belirlendi ($p \leq 0.05$) (Tablo 39).

Tablo 40. Sıçan ovaryumlarının AMH'nın salgılandığı toplam follikül sayısı ve standart sapmaları (10 haftalık).



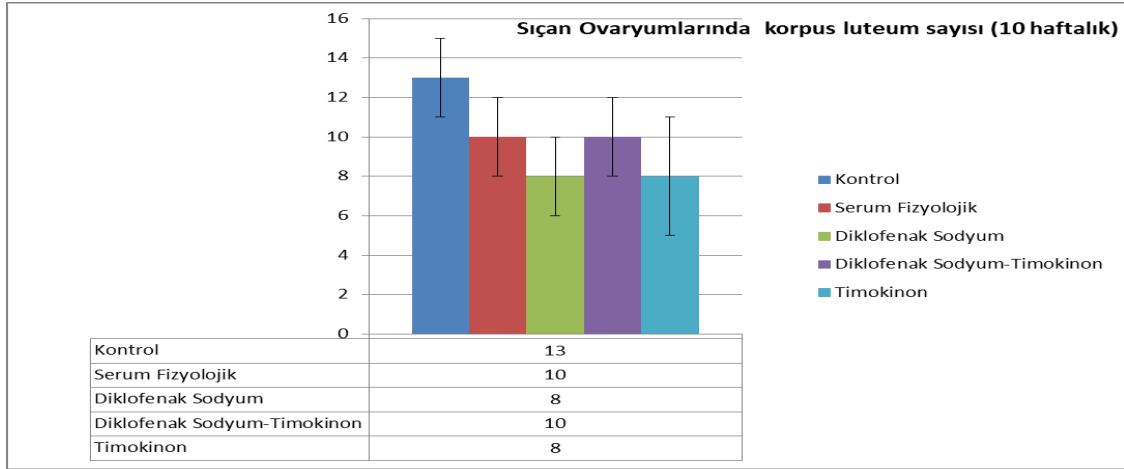
DS, DS-TQ ve TQ grubu 10 haftalık ovaryumların AMH'nın salgılandığı toplam follikül sayısı kontrol grubuna göre anlamlı azaldığı belirlendi ($p \leq 0.05$) ve bu azalma DS-TQ ve TQ grubunda daha belirgindi (Tablo 40).

Tablo 41. Sıçan ovaryumlarının serum AMH değeri ve standart sapmaları (10 haftalık).



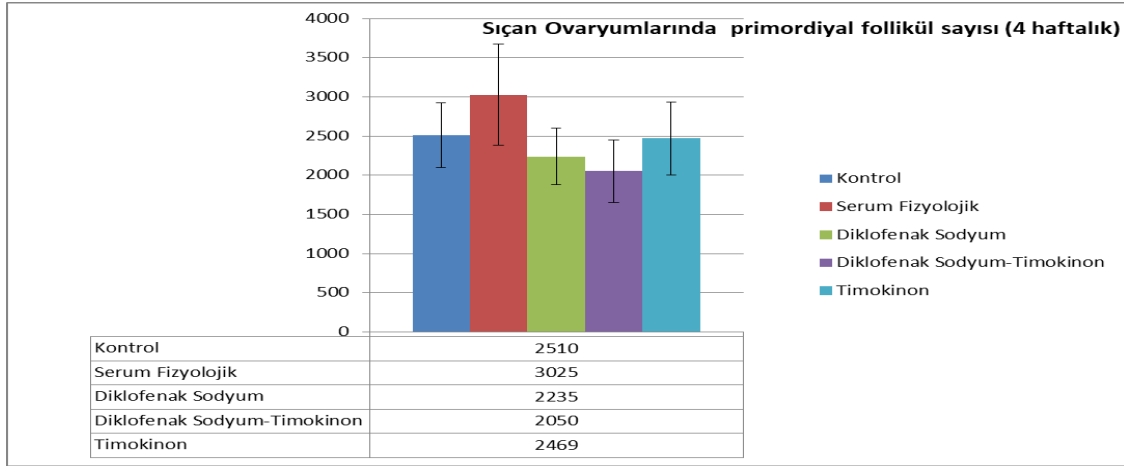
DS ve TQ grubu 10 haftalık postnatal sıçanlarda serum AMH değeri kontrol grubuna göre anlamlı artış belirlendi ($p \leq 0.05$) (Tablo 41).

Tablo 42. Sıçan ovaryumlarında korpus luteum sayısı ve standart sapmaları (10 haftalık).



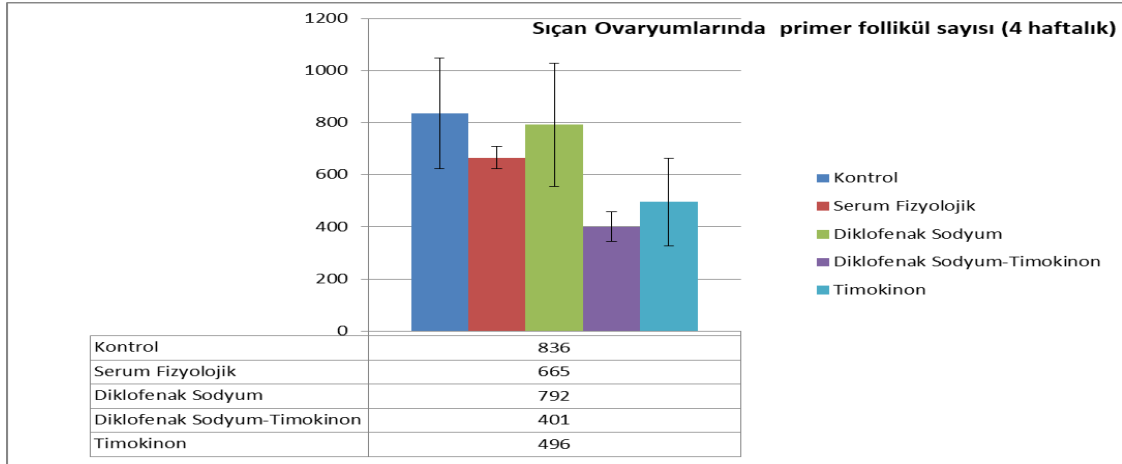
DS ve TQ grubu 10 haftalık ovaryumların KL sayısı kontrol grubuna göre anlamlı azalma olduğu belirlendi ($P=0.006$) (Tablo 42).

Tablo 43. Sıçan ovaryumlarında primordiyal follikül sayısı ve standart sapmaları (4 haftalık).



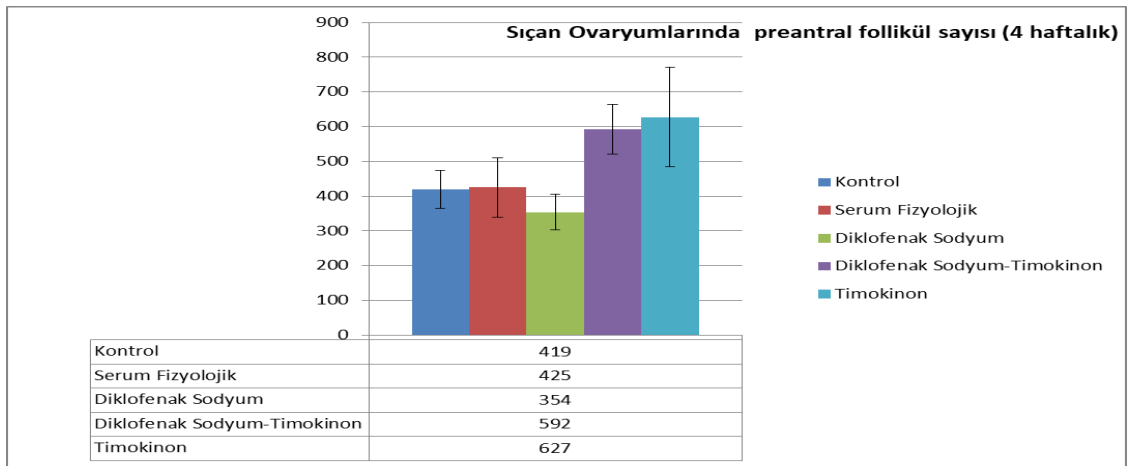
DS, DS-TQ ve TQ grubu 4 haftalık ovaryumların primordiyal follikül sayısı kontrol grubuna göre anlamlı bir fark belirlenmedi (Tablo 43).

Tablo 44. Sıçan ovaryumlarında primer follikül sayısı ve standart sapmaları (4 haftalık).



DS-TQ ve TQ grubu 4 haftalık ovaryumların primer follikül sayısı kontrol grubuna göre anlamlı azaldığı belirlendi ($p \leq 0.05$) (Tablo 44). Zamanlar arası karşılaştırıldığında TQ 4 ve 10 haftalık ovaryumların primer follikül sayısını anlamlı olarak azalttığı ($p \leq 0.05$) belirlendi.

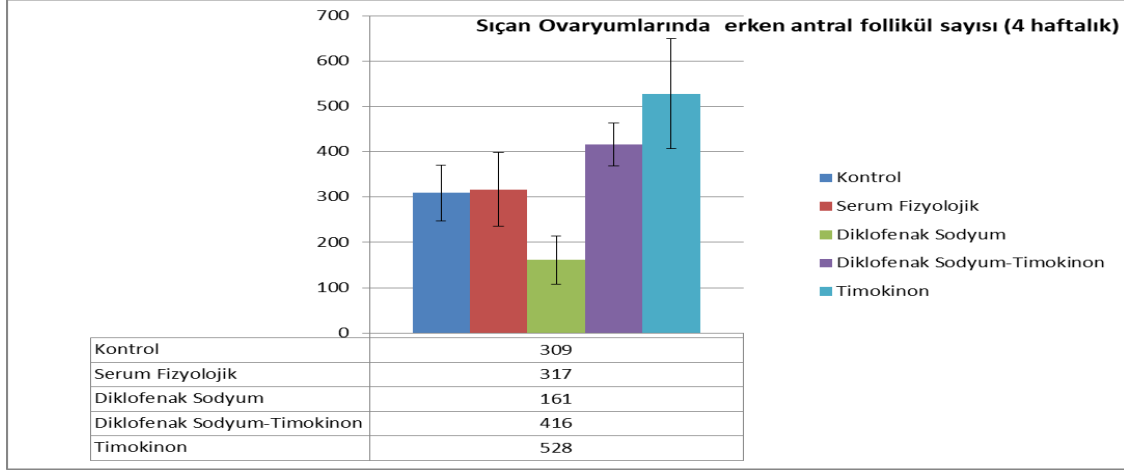
Tablo 45. Sıçan ovaryumlarında preantral follikül sayısı ve standart sapmaları (4 haftalık).



TQ grubu 4 haftalık ovaryumların preantral follikül sayısı kontrol grubuna göre anlamlı arttığı ($p \leq 0.05$) belirlendi (Tablo 45). TQ grubu 4 ve 10 haftalık ovaryumların preantral follikül sayısı karşılaştırıldığında; 4 haftalık sıçan ovaryumlarında anlamlı arttığı, 10

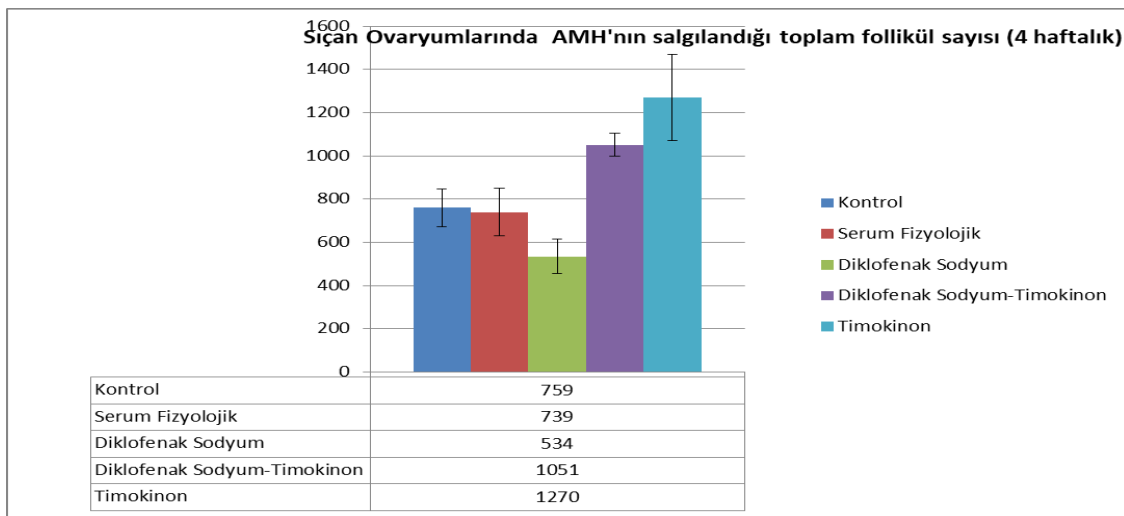
haftalıklarda ise anlamlı azaldığı ($p \leq 0.05$) fakat serum AMH değeri 10 haftalıklarda anlamlı arttığı, 4 haftalıklarda ise anlamlı bir fark görülmedi.

Tablo 46. Sıçan ovaryumlarında erken antral follikül sayısı ve standart sapmaları (4 haftalık).



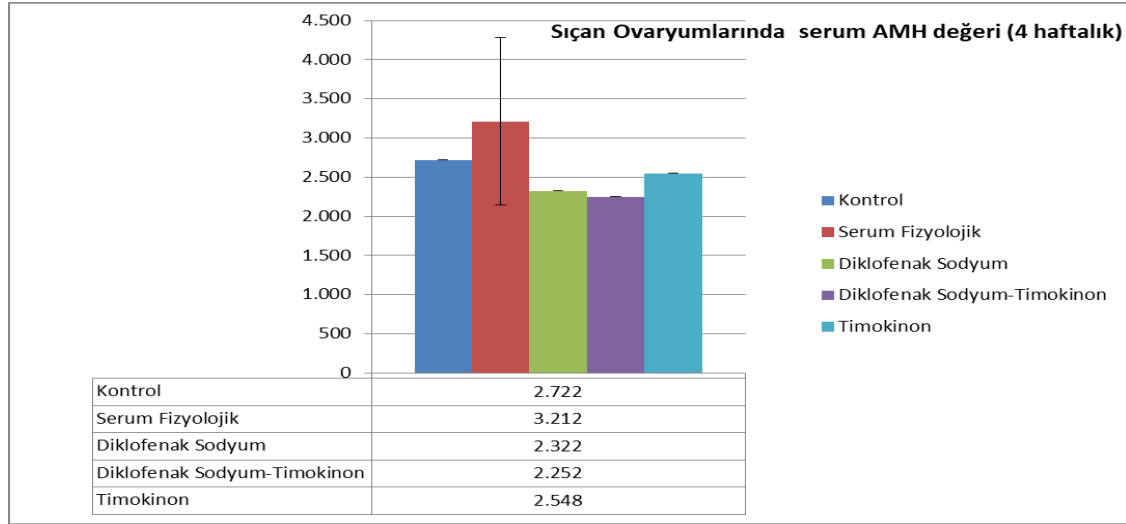
DS grubu 4 haftalık ovaryumların erken antral follikül sayısı kontrol grubuna göre anlamlı azalma, DS-TQ ve TQ grubunda anlamlı artma belirlendi ($p \leq 0.05$) (Tablo 46). DS ve TQ 10 haftalıklarda erken antral follikül sayısının da aynı, 4 haftalık ovaryumların ise farklı etki gösterdiği belirlendi.

Tablo 47. Sıçan ovaryumlarında AMH'nın salgılandığı toplam follikül sayısı ve standart sapmaları (4 haftalık).



TQ grubu 4 haftalık ovaryumların AMH'nın salgılandığı toplam follikül sayısı kontrol grubuna göre anlamlı arttığı ve DS grubunda ise anlamlı azaldığı belirlendi ($p \leq 0.05$) (Tablo 47).

Tablo 48. Sıçan ovaryumlarında serum AMH değeri ve standart sapmaları (4 haftalık).



DS, DS-TQ ve TQ grubu 4 haftalık sıçanların serum AMH değeri kontrol grubuna göre anlamlı bir fark belirlenmedi ($P > 0.05$) (Tablo 48).

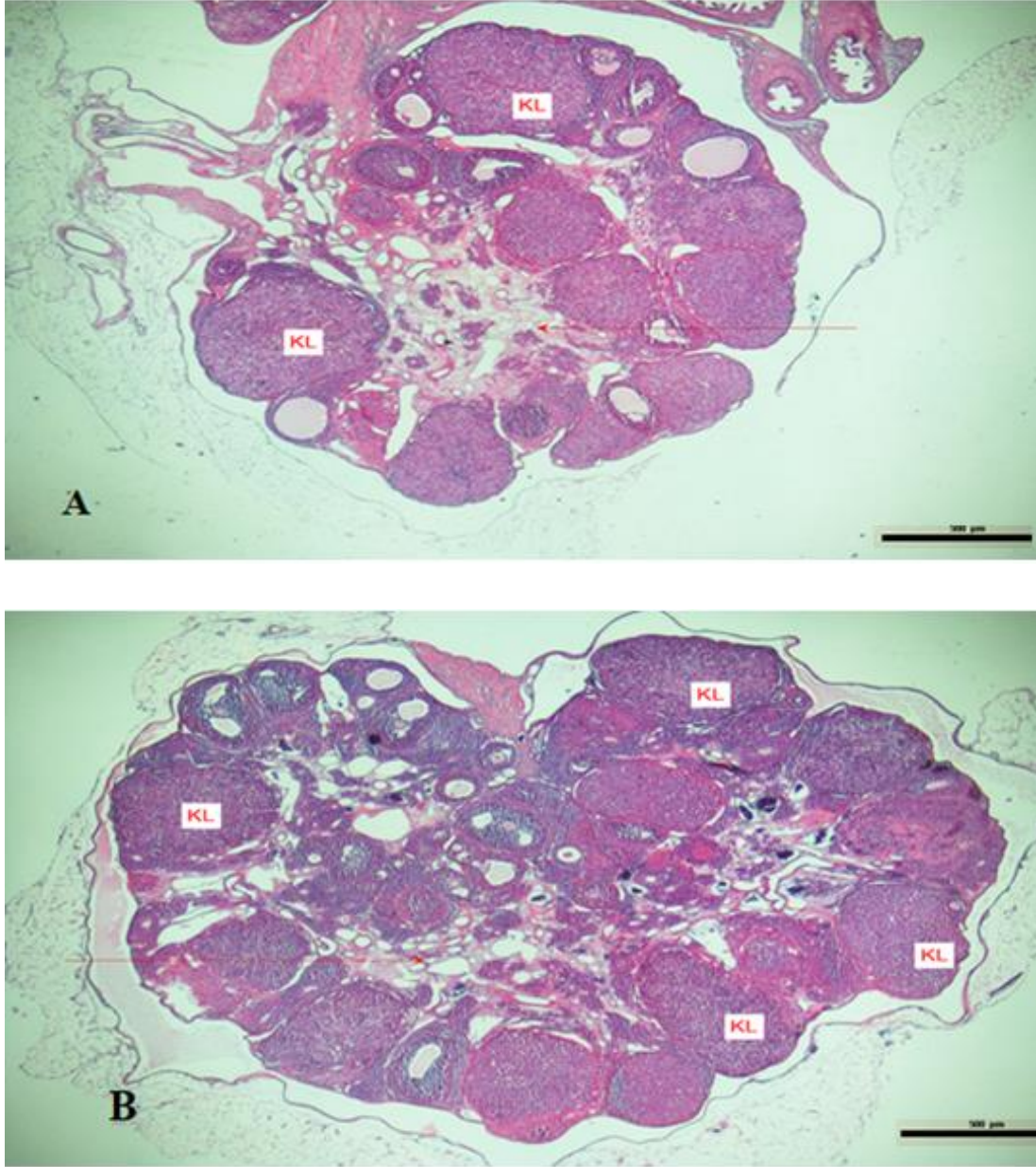
4.6. Histopatolojik ve Mikroskopik Bulgular

Anjiyogenez adı verilen yeni kan damarlarının oluşumu kanser ve kronik inflamasyon gibi birtakım patolojik koşullarda ortaya çıkar. Son bulgular COX izo enzimlerinin indüklenebilir formunun COX-2 anjiyogenezin kuvvetli bir uyarıcısı olarak hareket ettiğini göstermektedir (Monnier, 2005).

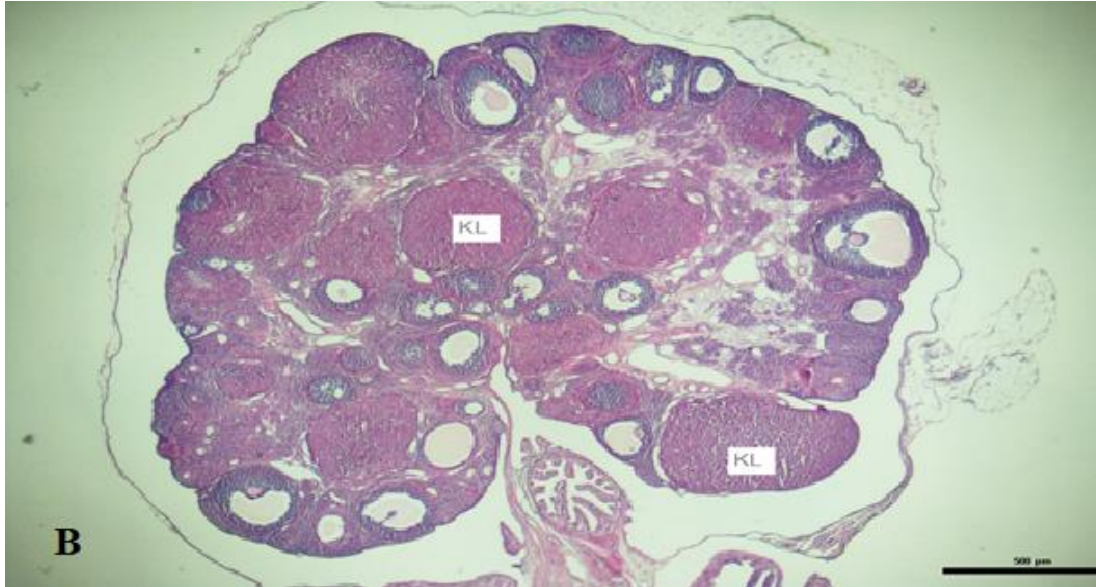
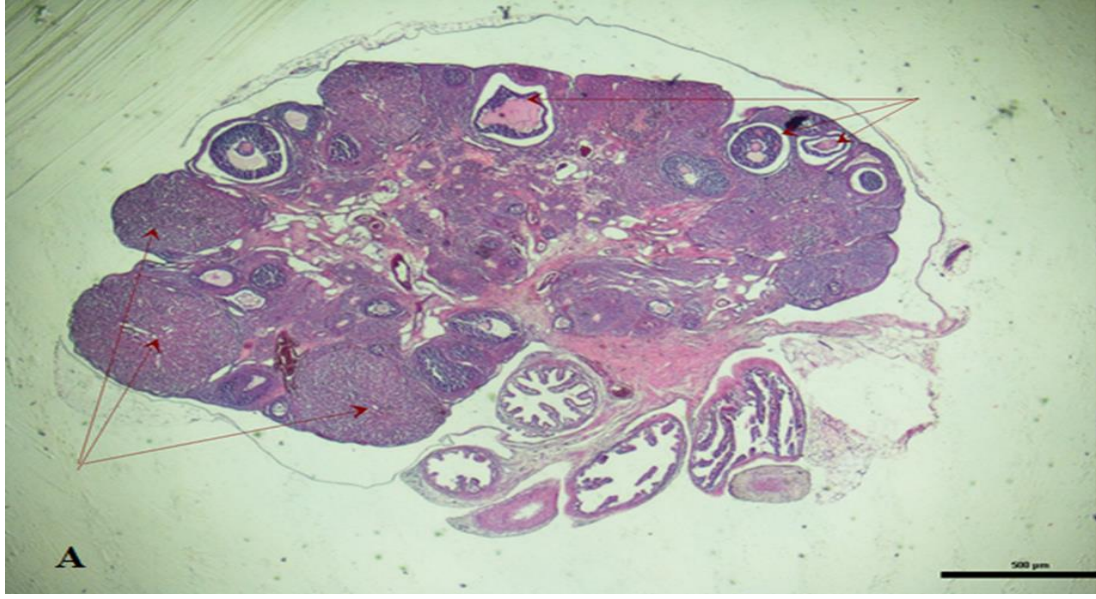
DS 10 haftalık sıçan ovaryumun medullasında vasküler yapıda minimal ektazi, hafif orta derecede konjesyon ile birlikte lenfektasizi mevcuttur. Medulla kalınlaşması artmış, korteks incelmıştır ve KL sayısı azalmış olduğu gözlenmiştir (Şekil 33).

DS-TQ 10 haftalık sıçan ovaryumunda spiral arterlelerde ve medullada orta şiddette ektazi ve ödem daha belirgindi. Ayrıca medulla hacmi artmış, korteks ise azaldığı gözlemlendi. Bununla beraber luteinize granüloza hücrelerinde artış olduğu gözlemlendi (Şekil 34).

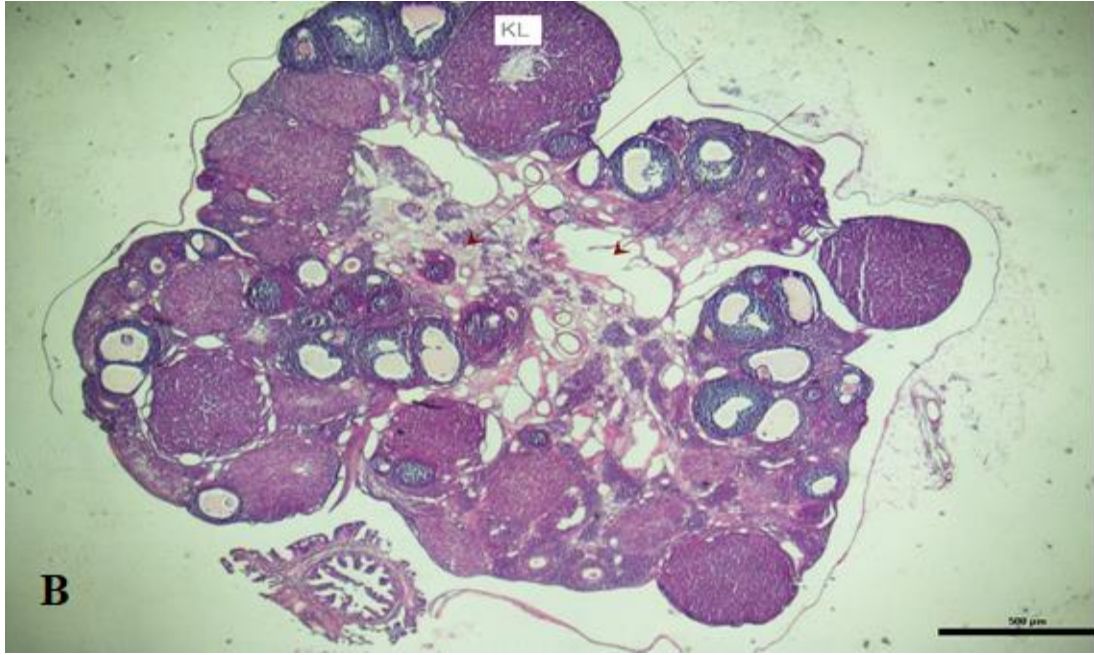
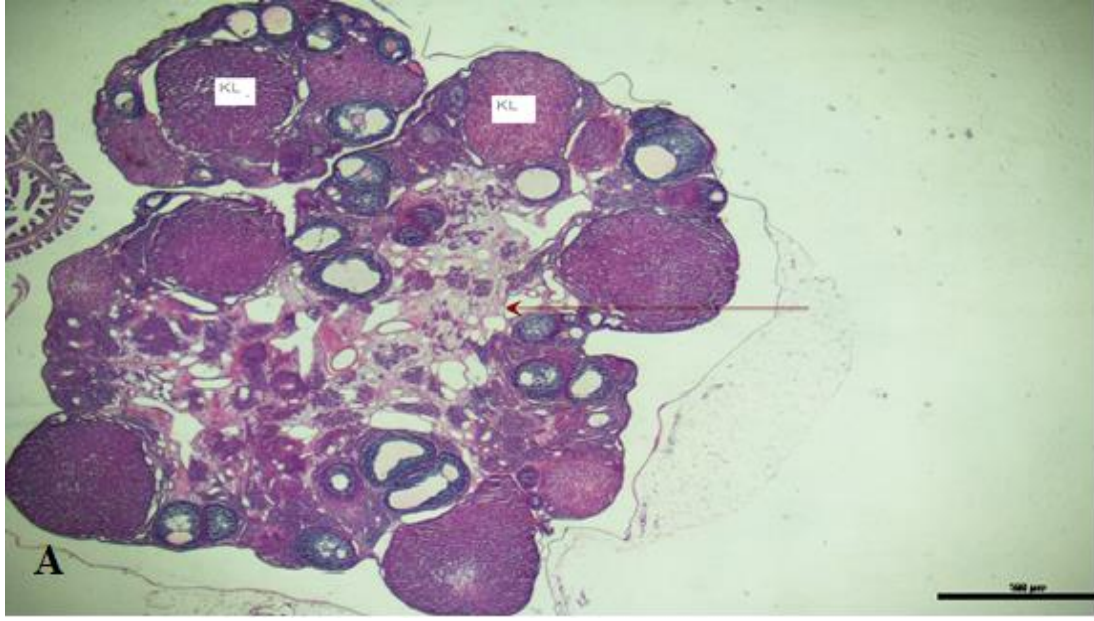
TQ grubunda 10 haftalık sıçan ovaryumun medulasında vasküler yapıda minimal ektazi orta derecede konjesyon ile birlikte lenfektazisi mevcuttur. Medulla belirgin şekilde kalınlaşması artmış, korteks incelmıştır ve KL sayısı azalmış olduğu tesbit edilmiştir (Şekil 35). Fakat 4 haftalık sıçan ovaryumlarında medulla ve korteks yapısında 10 haftalıklara gibi bir fark görülmedi (Şekil 36-39'a kadar).



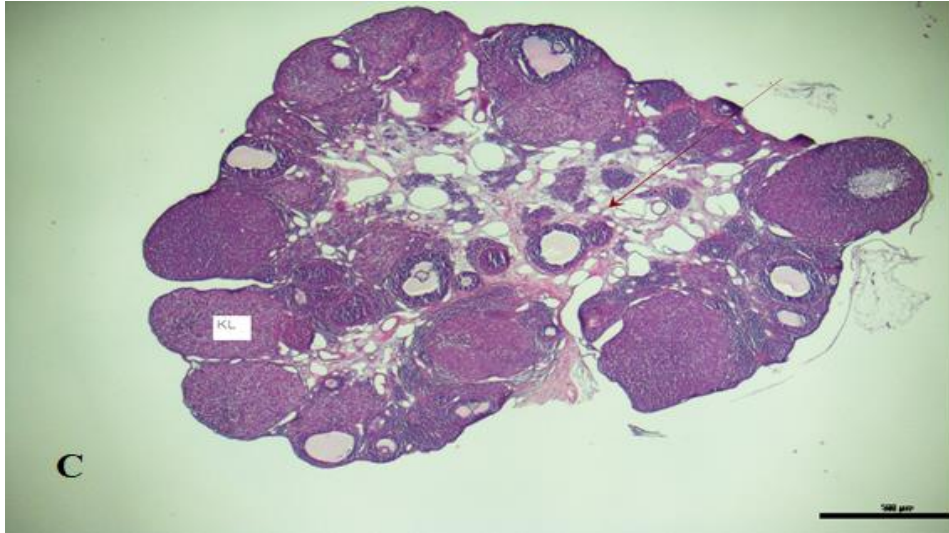
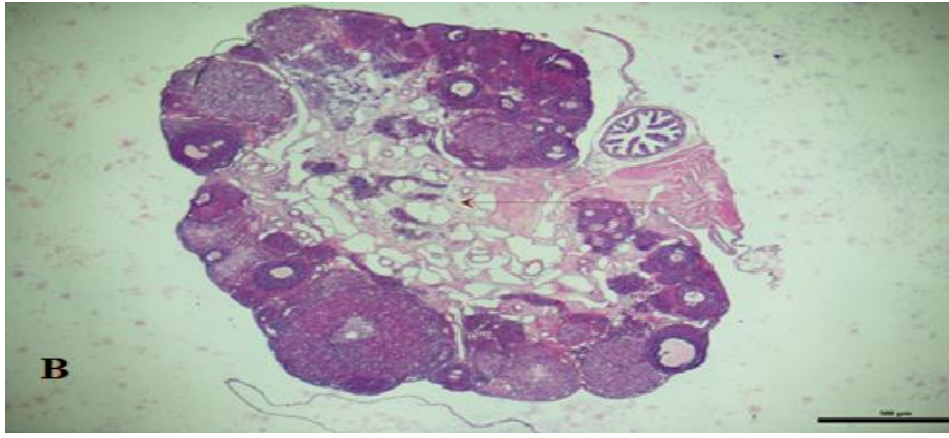
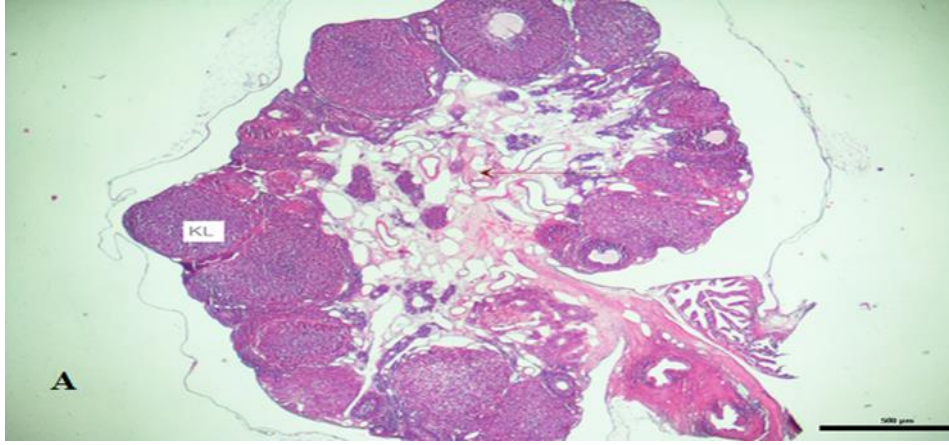
Şekil 31. A ve B’de Kontrol grubu 10 haftalık sıçan ovaryumunda maksimum KL sayısı, medulla ve korteks görülmektedir. Ok medullayı göstermektedir. x1. Bar: 500 µm.



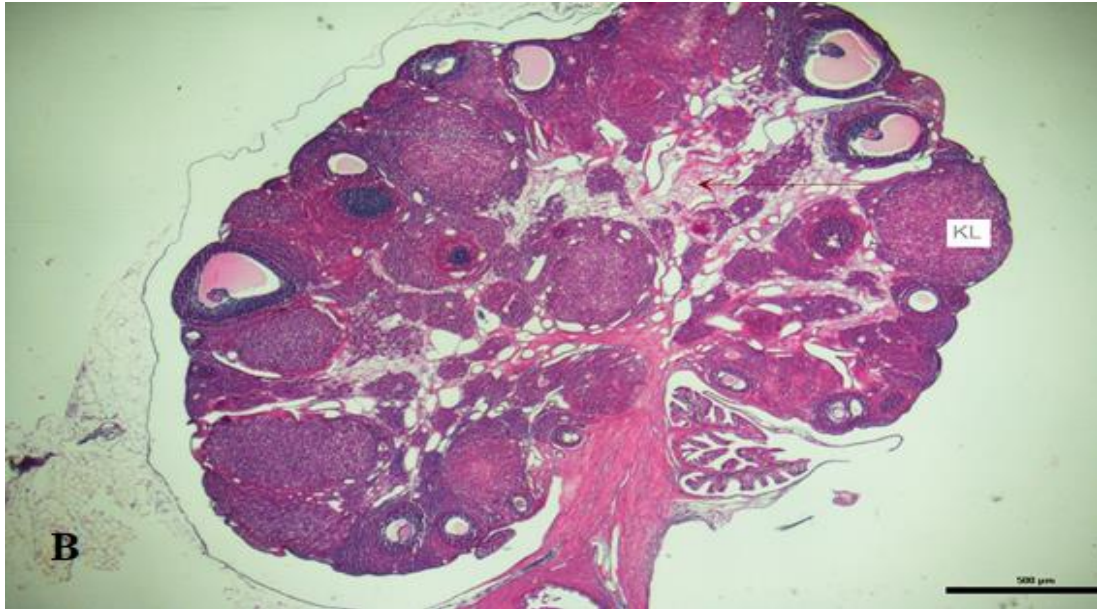
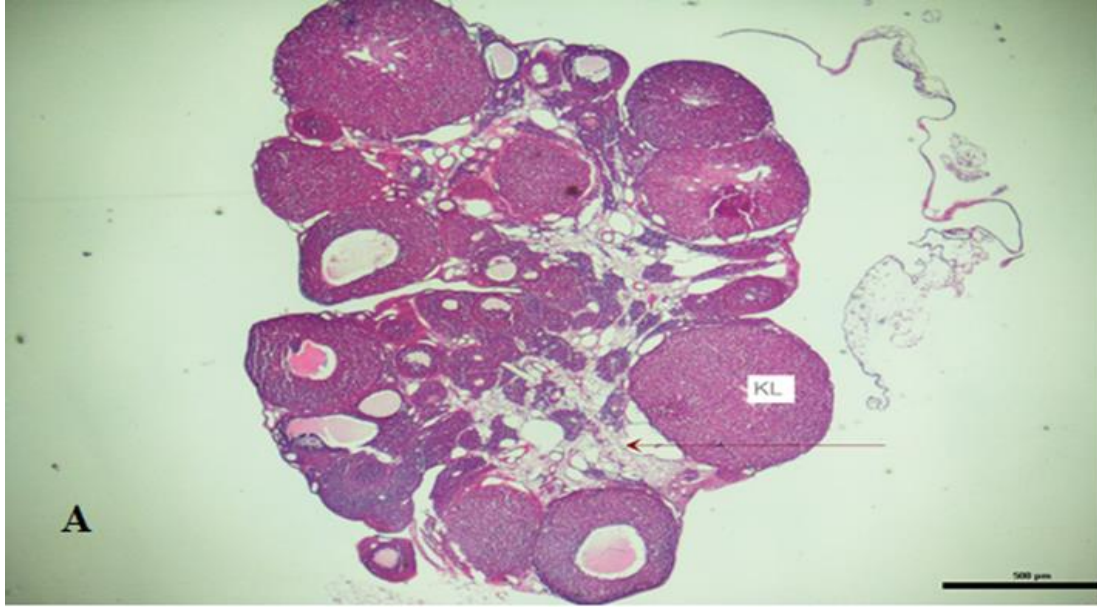
Şekil 32. A ve B’de DS 10 haftalık sıçan ovaryumunda maksimum KL sayısında azalma ve korteksin inceldiğini göstermektedir. Oklar KL’u ve bozulmuş follikülleri göstermektedir. x1. Bar: 500 µm.



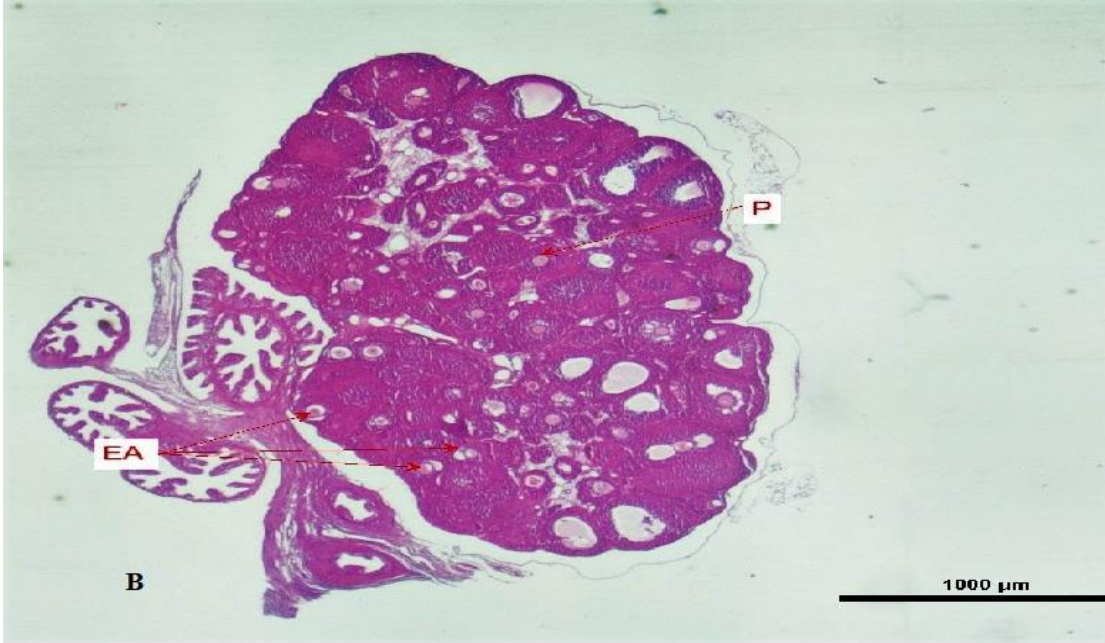
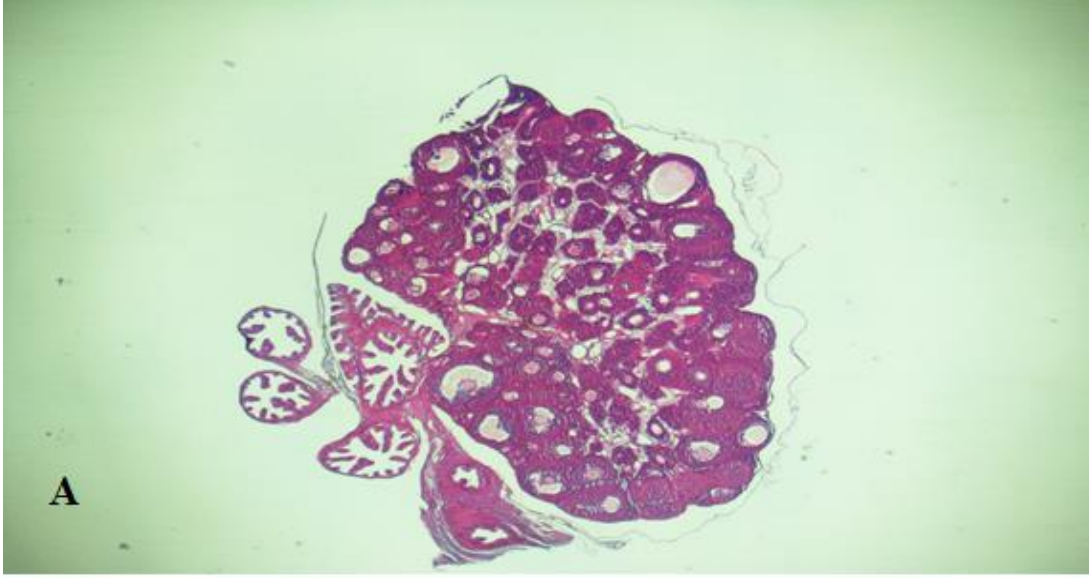
Şekil 33. A ve B’de DS 10 haftalık sıçan ovaryumun medulasında vasküler yapıda minimal ektazi, hafif orta derecede konjesyon ile birlikte lenfaktasizi mevcut, medulla kalınlaşması artmış, korteks incelmıştır ve korpus luteum sayısı azalmıştır. KL korpus luteumu, Ok medullayı göstermektedir. x1. Bar:500 µm.



Şekil 34. A. B. C’de DS-TQ grubuna 10 haftalık sıçan ovaryumunda spiral arterlelerde ve medullada orta şiddette ektazi ve ödem daha belirgindir. Ayrıca medulla artmış, korteks azalmıştır. Bununla beraber luteinize granüloza hücrelerinde artış gözlemlenmiştir. x1. Bar:500 μ m.



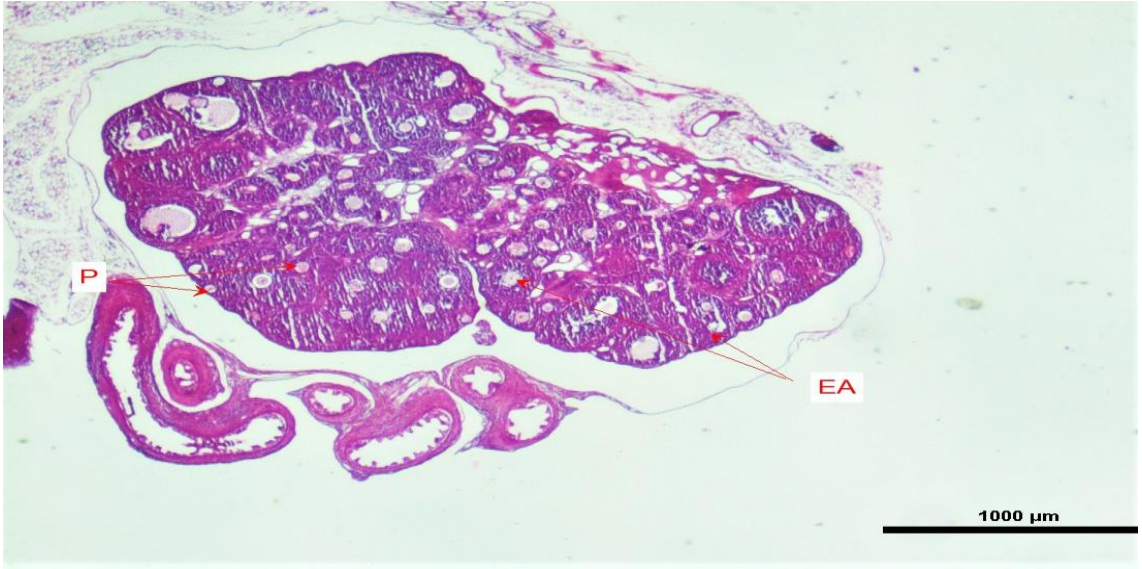
Şekil 35. A. B’de TQ grubunda 10 haftalık sıçan ovaryumun medulasında vasküler yapıda minimal ektazi, orta derecede konjesyon ile birlikte lenfaktasizi mevcut. Medulla belirgin şekilde kalınlaşması artmış, korteks incelmıştır ve maksimum KL sayısı azalmıştır, Ok medullayı göstermektedir. x1. Bar:500 µm.



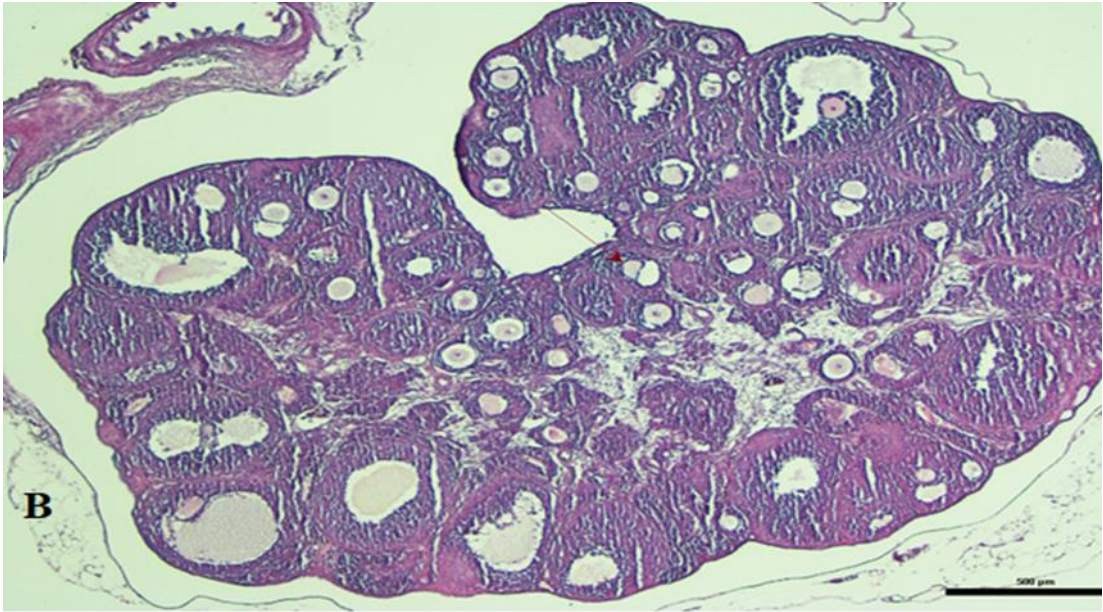
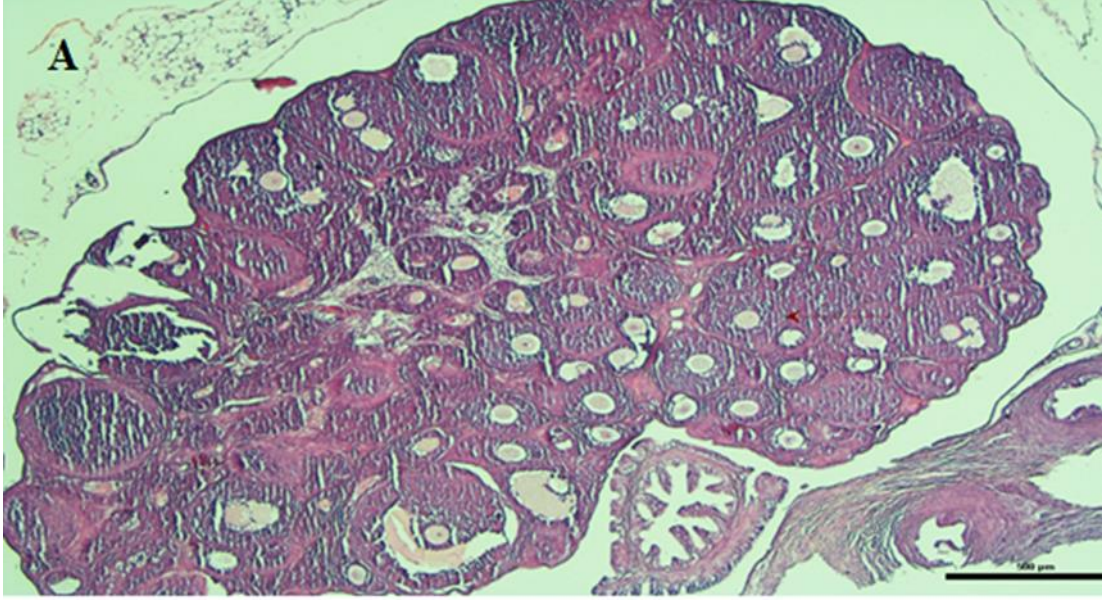
Şekil 36. A ve B 4 haftalık kontrol grubuna ait ovaryumu göstermektedir. P preantral follikülü ve EA erken antral follikülü göstermektedirA x1. Bar:500 µm, B x1. Bar 1000 µm.



Şekil 37. DS grubu 4 haftalık ovaryum. P preantral follikülü ve EA erken antral follikülü göstermektedir. x1. Bar:1000 µm.



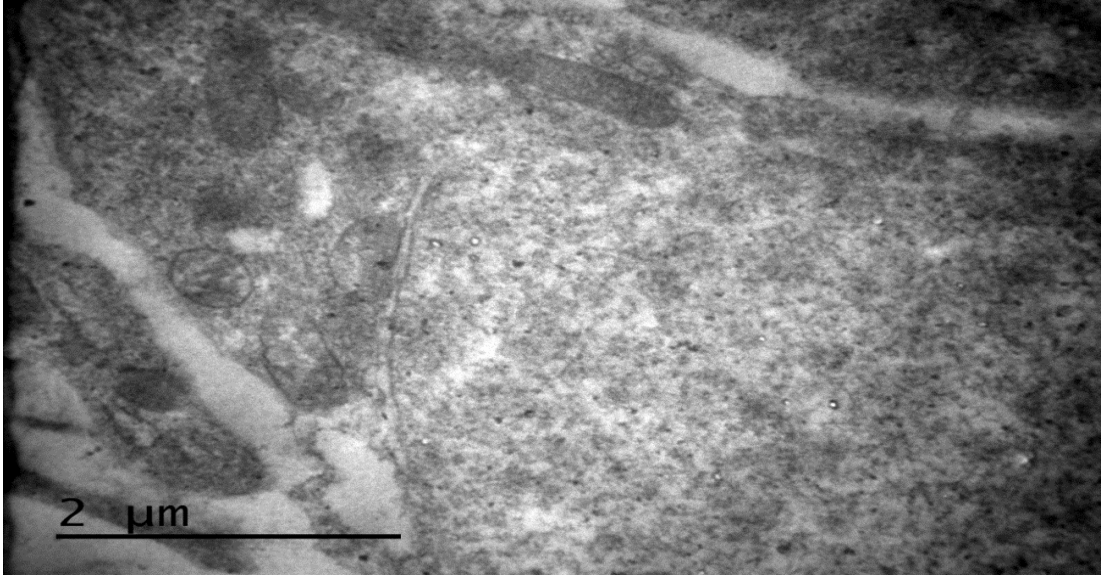
Şekil 38. DS-TQ gruplarına ait 4 haftalık ovaryumların kontrol grubuna göre preantral ve erken antral follikül sayısında anlamlı artış görüldü P preantral follikülü ve EA erken antral follikülü göstermektedir. x1. Bar:1000 µm.



Şekil 39. A ve B’de TQ gruplarına ait 4 haftalık ovaryumların kontrol grubuna göre preantral ve erken antral follikül sayısında anlamlı artış görüldü. x1. Bar:500 µm.

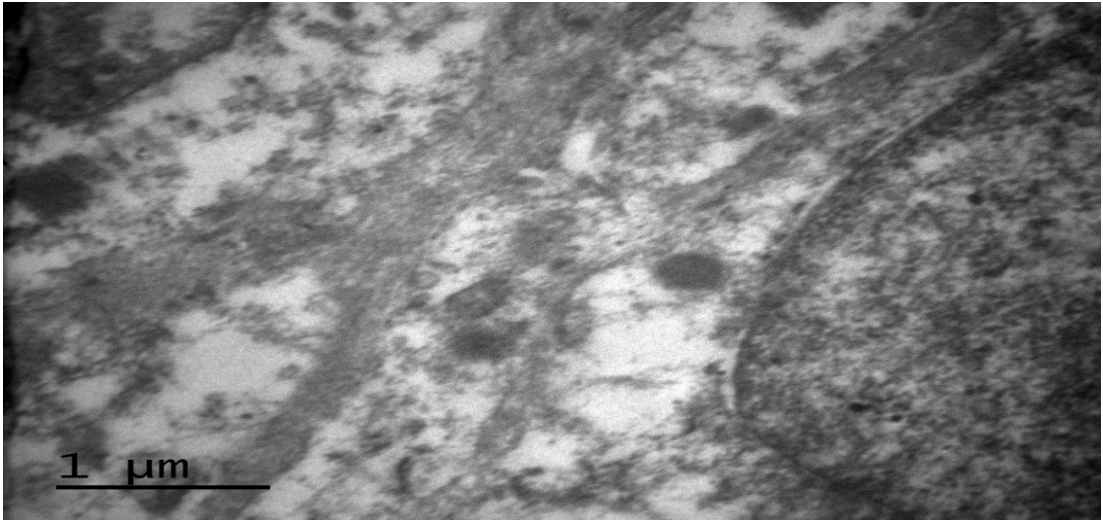
4.7. TEM Bulguları

TEM ile oosit çekirdeği, çekirdek zarı, sitoplazma ve mitokondrion ince yapısı gözlemlendi. Mitokondriyal membranın iç ve dış zarın bütünlüğünde olabilecek değişiklikler arandı.



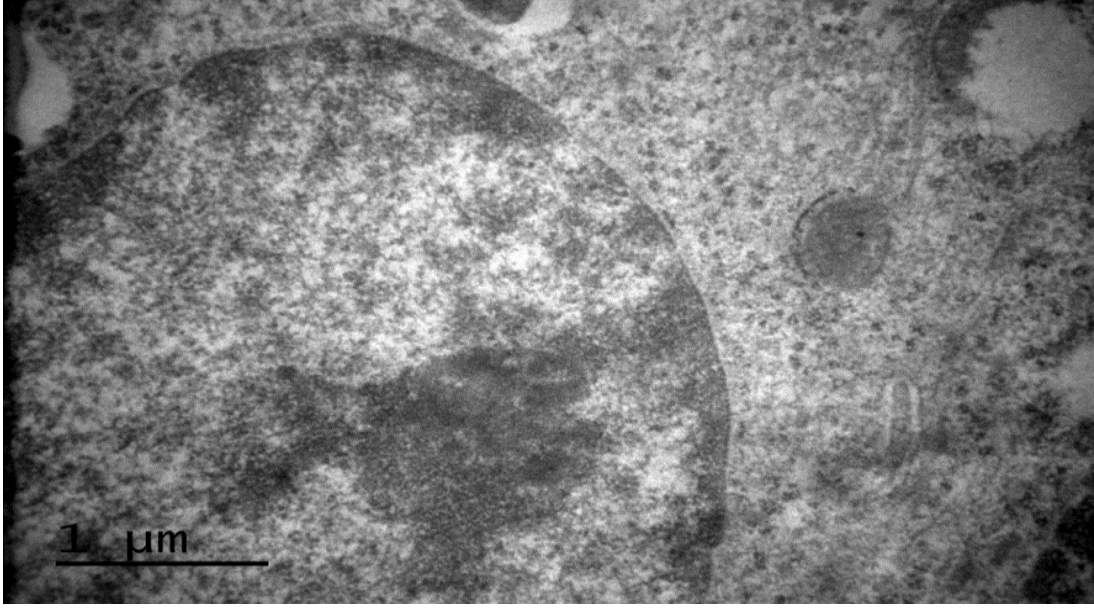
Şekil 40. Kontrol grubu 4 haftalık ovaryuma ait TEM görüntüsü.

Kontrol grubu 4 haftalık sıçan ovaryumlarına ait TEM fotoğrafları incelendiğinde; oosit çekirdek zarı ve sitoplazmik yapılar normal görünüme sahip oldukları gözlemlendi (Şekil 40).



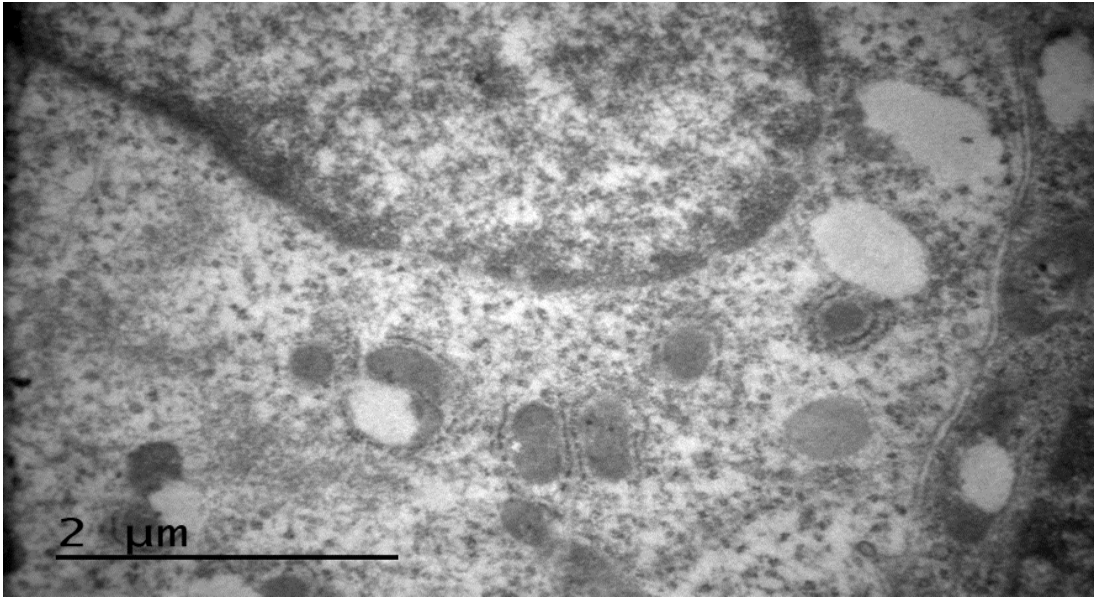
Şekil 41. TQ grubu 4 haftalık ovaryuma ait TEM görüntüsü.

TQ grubu 4 haftalık sıçan ovaryumlarına ait TEM fotoğrafı incelendiğinde; çekirdek zarı normal ancak sitoplazmada erimeler söz konusudur (Şekil 41).



Şekil 42. DS grubu 4 haftalık ovaryuma ait oositin TEM görüntüsü.

DS grubuna ait 4 haftalık ovaryuma ait TEM fotoğrafı incelendiğinde; oosit hücre çekirdeği ve çekirdekçinin yanısıra stoplazmik yapılar normal görünümlü olduğu belirlendi (Şekil 42).



Şekil 43. Seyum Fizyolojik grubu 4 haftalık ovaryum oositi TEM görüntüsü.

Sıçan ovaryumlarından 4 haftalık Serum fizyolojik grubu TEM fotoğrafı incelendiğinde; çekirdek zarı ve raf yapıları belirgin olarak orta hatta gözlenmektedir (Şekil 43).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamıza gebelikte uygulanan DS ve TQ'un postnatal 4 ve 10 haftalık preantral follikül (primordiyal, primer, preantral follikül) sayısı üzerine etkilerinin setreolojik metotlarla ve serum AMH değerlerine etkisi ELISA yöntemiyle araştırıldı. Ayrıca çalışmamızda erken antral ve AMH'nın salgılandığı toplam folliküllerin de sayımı yapıldı. Bunun yanında çalışma gruplarında Cavalieri prensibine göre toplam, korteks, medulla hacimleri ile medullanın kortekse ve toplam hacime oranı hesaplandı. Tüm ovaryumların büzüşme oranı hasaplanarak toplam hacim hesaplamasına ilave edildi ve gerçek hacimleri hesaplandı.

Kaynak taramalarımızda Rezaee ve ark., (2015) Cavalieri prensibine göre >120 günlük sıçan ovaryumlarının kontrol grubunda toplam hacmi 16.4 mm^3 , primordiyal follikül sayısı 1658, primer ve preantral follikülün toplam sayısı 1608 olarak tesbit etmiştir. Aynı prensibe göre Mehranjani ve Mansoori (2016) çalışmalarında >120 günlük kontrol grubu sıçan ovaryumun toplam hacim 18.16 mm^3 , toplam korteks $15.77 \pm 1 \text{ mm}^3$ ve toplam medulla $2.39 \pm 0.4 \text{ mm}^3$, primordiyal follikül sayısı 3164, primer ve preantral ait toplam follikül sayısı 1235 olarak belirlemiştir. Mehranjani ve ark., (2010) >120 günlük kontrol grubu sıçan ovaryumunda toplam hacmi 9.1 mm^3 , korteks hacmi $7.8 \pm 0.8 \text{ mm}^3$, medulla hacmi $3.5 \pm 0.8 \text{ mm}^3$ belirlemişlerdir. Mayers (2004) 70 günlük sıçan ovaryumunda fiziksel disektör yöntemlerini kullanarak 1930-2227 arası primordiyal, 135-265 arası primer follikül hasaplamıştır. Noorafshan (2013) primer ve preantral ait toplam follikül sayısı 939 olarak bulmuşlardır. Çalışmada 10 haftalık kontrol grubunda ortalama primordiyal follikül sayısı 2485, primer ve preantral toplam follikül sayısı 926, 4 haftalık kontrol grubunda ise ortalama olarak primordiyal 2615, toplam primer ve preantral follikül sayısı 1236 olarak hesaplandı (bkz. Tablo 12). Bu durumda çalışmamız 10 haftalık kontrol grubu primordiyal follikül sayısı, Mayers (2004) bildirdiği primordiyal follikül sayısı ile uyumlu iken primer ve preantral toplam sayısı ise Noorafshan (2013) bildirdiği primer ve preantral toplam follikül sayısı ile uyumlu olduğu gözlemlendi. Aynı zamanda Mehranjani ve Mansoori (2016) >120 primordiyal, primer ve preantral toplam follikül sayısı ile yaklaşık olarak uyumlu çıkmaktadır. Çalışmamızda 70 günlük kontrol grubu sıçan ovaryumunun toplam hacim 18.501 mm^3 , korteks toplam hacim 15.425 mm^3 , medulla toplam hacim 3.024 mm^3

olarak hesaplandı (Tablo 2 ve 3). Serum fizyolojik grubu 70 günlük ovaryum toplam hacim 10.681 mm^3 , korteks hacim 8.799 mm^3 , medulla hacim 1.883 mm^3 olarak hesaplandı. Çalışmamızın kontrol grubunun Cavalieri prensibine göre hesaplanan toplam hacim, korteks ve medulla hacim verileri Mehranjani ve Mansoori (2016) yaptıkları çalışmada sıçanlar arasında gün farkı olmasıyla beraber uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca çalışmamızda Serum fizyolojik grubu ait hacim verileri Mehranjani ve ark., (2010) yaptığı çalışmanın kontrol grubu hacimleri ile uyum göstermektedir. Çalışmamızda kontrol grubu 4 haftalık ovaryumlara ait toplam hacim 3.026 mm^3 , korteks hacim 2.721 mm^3 , medulla hacim 0.297 mm^3 , serum fizyolojik grubu toplam hacim 3.304 mm^3 , korteks hacim 2.920 mm^3 , medulla hacim 0.262 mm^3 olarak hesaplandı.

DS, DS-TQ ve TQ grubu 10 haftalık sıçan ovaryum toplam hacimleri kontrol ve SF grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark belirlenmedi (Tablo 2-6 ve 26).

DS, DS-TQ ve TQ grubu 10 haftalık sıçan ovaryumların korteks hacimleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldığı ($p \leq 0.05$) ve bu azalma DS-TQ grubunda daha belirgindir (Tablo 4-6 ve 27). DS, DS-TQ ve TQ grubu 10 haftalık sıçan ovaryumların korteks hacminin histopatolojik bulgulara korteksin incelendiği medullanın kalınlaştığı belirlendi. Dolayısıyla hem stereolojik hem de histopatolojik olarak veriler birbirleriyle örtüşmekte olduğu gözlemlendi (Şekil 34-35).

DS, DS-TQ ve TQ grubu 10 haftalık sıçan ovaryum ait medullanın toplam hacimi kontrol grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmedi ($p \geq 0.05$) (Tablo 4-6 ve 28). DS, DS-TQ ve TQ grubu 10 haftalık sıçan ovaryumların medulla hacminin korteks hacmine ve toplam hacime oranları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak arttığı gözlemlendi ($p \leq 0.05$) (Tablo 5 ve 29). Bu artış DS ve DS-TQ grubunda daha belirgindir. DS ve TQ aynı etki göstererek sıçan ovaryumların medulla hacminin toplam hacime ve korteks hacime oranını anlamlı olarak arttırdığı gözlemlendi ($p \leq 0.05$) (Tablo 4-6 ve 30).

DS-TQ ve TQ grubu 4 haftalık sıçan ovaryumların toplam hacimleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı artış gözlemlendi ($p \leq 0.05$) bu artış TQ grubunda daha

belirgidi. SF ve DS grubna ait ovaryumların toplam hacimleri kontrol grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmedi ($p \geq 0.05$) (Tablo 5-6 ve 31).

DS-TQ ve TQ grubu 4 haftalık sıçan ovaryumların korteks hacimleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı artış gözlendi ($p \leq 0.05$) bu artış TQ grubunda daha belirgidi. SF ve DS grubna ait ovaryumların korteks hacimi kontrol grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmedi ($p \geq 0.05$) (Tablo 5-6 ve 32).

SF, DS, DS-TQ ve TQ grubu 4 haftalık sıçan ovaryumların medulla hacimleri ile medulla hacminin korteks hacmine ve topla hacimine oranları kontrol grubula karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlenmedi ($p \geq 0.05$) (Tablo 6-11 ve 44). Güven ve ark., (2013) gebe sıçanlara günde 1mg/kg, gebeliğin 5. gününden 15. gününe kadar uyguladıkları DS'un postnatal 4 haftalık sıçan ovaryumların korteks hacminde anlamlı artış olduğunu bildirmişlerdir. Oysa çalışmamızda gebe sıçanlara günde 6.1mg/kg, gebeliğin 5. gününden 15 gününe kadar uygulanan DS'un doz miktarı fazla olmasına rağmen DS grubu 4 haftalık sıçan ovaryumlarının korteks hacminin anlamlı bir artış tarafımızdan gözlenmedi ($p \geq 0.05$).

Disektör sayım prensibine göre SF, DS, DS-TQ ve TQ grubu 4 ve 10 haftalık sıçan ovaryumların primordiyal follikül sayısı kontrol grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmedi ($p \geq 0.05$) (Tablo 12, 17,36 ve 43).

DS grubu 4 ve 10 haftalık sıçan ovaryumların primer follikül sayısı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 4 haftalık ovaryumlarda anlamlı bir fark gözlenmedi ($p \geq 0.05$) (Tablo 19 ve 44) fakat 10 haftalık ovaryumlarda anlamlı olarak azaldığı gözlendi ($p \leq 0.05$) (Tablo 14 ve 37). DS grubu 4 ve 10 haftalık sıçan ovaryumların preantral ve erken antral follikül sayısı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında preantral follikül sayısında anlamlı bir fark gözlenmedi ($p \geq 0.05$) (Tablo 14, 19, 38 ve 45) fakat erken antral follikül sayısı anlamlı olarak azaldığı gözlendi ($p \leq 0.05$) (Tablo 14, 19, 39 ve 46). Bundan dolayı AMH'nın salgılandığı toplam follikül sayısı da anlamlı olarak azaldığı belirlendi ($p \leq 0.05$) (Tablo 14, 19, 40 ve 47). DS grubu 4 ve 10 haftalık sıçan serum AMH ng/ml değeri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 4 haftalık sıçanlarda anlamlı bir fark gözlenmedi ($p \geq 0.05$) (Tablo 19 ve 48) fakat 10 haftalık sıçanlarda

anlamli artiş gözlendi ($p \leq 0.05$) (Tablo 14 ve 41). DS grubu 10 haftalik ovaryumlarda erken antral follikül sayısında azalma artam serum AMH ng/ml değerine bağlı olabilir.

TQ grubu 4 ve 10 haftalik sıçan ovaryumların primer follikül sayısı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamli olarak azaldığı gözlendi ($p \leq 0.05$) (Tablo 16, 21, 37 ve 44). TQ grubu 4 ve 10 haftalik sıçan ovaryumların preantral, erken antral ve AMH'nın salgılandığı toplam follikül sayısı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 4 haftaliklarda anlamli olarak artiş ($p \leq 0.05$), 10 haftaliklarda anlamli azalma ($p \leq 0.05$) gözlendi. TQ grubu 4 ve 10 haftalik sıçan serum AMH ng/ml değeri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 4 haftalik sıçanlarda anlamli bir fark gözlenmedi ($p \geq 0.05$) (Tablo 16, 21) fakat 10 haftalik sıçanlarda anlamli artiş ($p \leq 0.05$) gözlendi. TQ grubu 10 haftalik ovaryumların preantral erken antral ve AMH'nın salgılandığı follikül sayısı 4 haftalik ovaryum göre azalması artan serum AMH ng/ml değerine bağlı olabilir.

DS ve TQ birlikte uygulandığı DS-TQ grubu 4 ve 10 haftalik sıçan ovaryumların primordiyal preantral, erken antral ve AMH'nın salgılandığı toplam follikül sayısı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha çok TQ grubuna benzer etki gösterdiği belirlendi (Tablo 15, 20, 36-40 ve 43-47).

DS ve TQ grubu 4 haftalik sıçan ovaryumlarında KL'a rastlanmadığı için sayılmadı. DS ve TQ grubu 10 haftalik sıçan ovaryumların KL sayısı kontro grubuna göre anlamli olarak azaldığı ($p \leq 0.05$) (Tablo 14-16 ve 42) buna karşı AMH değeri anlamli olarak artiş gözlendi (Tablo 14, 16, 42). Korpul luteum sayısı dolayısıyla ovulasyonun azalma DS ve TQ'un COX -2 inhibe etmesine bağlı olduğu söylenebilir.

Literatür incelemesinde çeşitli sebeplerden dolayı NSAIİ'lerin doğurgan yaştaki kadınların ovaryumudaki ovulasyonu olumsuz etkilediğı bildirilmiştir (Gaytan ve ark., 2006; Akil ve ark., 1996; Sherif ve ark., 2014). Normalde ovulasyonda LH dalgalanmasından sonra granüloza hücreleri inflamatuvar stokinlerini ve hidrolik enzimlerin salgılar. Siklooksijenaz-2 (COX-2), plazminojen aktivatörü ve metaloproteazların içinde bulunduğu çeşitli faktörler de follikülün yırtılmasını sağlar. Bu faktörler; folliküler sıvının hacim ve basıncının artması, follikül duvarının plazminojenlerle enzimatik olarak parçalanması, oosit-kumulus kompleksi ile stratum granüloza arasında glikozaminoglikan birikmesi, PG'lerin teka internadaki düz kaslarda

kontraksiyonlar oluşturması ile ovulasyon gerçekleşmektedir (Düzova ve Emre, 2011). DS ise güçlü COX-2 inhibitörüdür ve aynı zamanda lökotrienlerin sentezini de engeller ve sitokinlerin oluşumunun azaltırlar (Özalp Dural, 2002). Oysa COX-2, preovulatuvar follikülün ovulasyonunda ve döllenmiş zıgotun implantasyon üzerine büyük etkiye sahiptir. NSAII'ler. COX-2 inhibisyonuna bağlı olarak şimdiye kadar araştırılan tüm memeli türlerinde ovulasyonu inhibe ettiği bildirilmektedir. NSAII tedavisinde kadınlarda ovulasyon bozukluğuna ve dolayısıyla infertilitenin nedenlerinden bir olabileceği bildirilmiştir (Gaytan ve ark., 2006). 10 gün boyunca, günde 100mg bir kez DS doğurgan çağında kadınlarda ovulasyonu önemli bir şekilde geri dönüşümlü olarak inhibe ettiği bildirilmiştir (Sherif ve ark., 2014). Ovaryum COX-2 aktivitesinin inhibisyonu ve ardından, PG sentezinin inhibisyonu ile oosit salınımını önlediği, follikül rüptürü görüldüğü, PGE2 ile düzenlenen kumulus genişlemesinin önlediği, oositin granüloza hücrelerine yakalandığından dolayı ovulasyonun başarısız olmasına neden olduğu bildirilmiştir (Duffy, 2002).

Ayrıca insan gebeliğinin ilk trimesterinde DS plasenta transfer olduğu, maternal venöz örneklerde bulunan konsantrasyona benzer şekilde, tüm fetal doku örneklerinde saptanmıştır (Siu ve ark., 2002). Plesental geçiş gebelik yaşına bağlı değil her durumda geçişi devam eder. İlaçların yarılanma ömrü fetal dolaşımda (14.7 saat) maternal dolaşımda (2.2 saat) daha uzundur (Vermillion ve Newman, 1999). Bu durumda DS gebeden daha ziyade fetüsü etkilemektedir.

Çalışmamızda gebelikte uygulanan DS postnatal 4 ve 10 haftalık sıçan ovaryumlarında kontrol grubuna göre erken antral follikül sayısında anlamlı ($p \leq 0.05$) olarak azaldığı belirlendi. DS'un ovarian follikulogenezis üzerine etkisini araştıran bir çalışmada 10 gün süre ile günde bir kez 0.2 mg/kg DS subkutan olarak 15 erişkin sıçana verilmiştir. Sonuçta sekonder follikül sayısının anlamlı derecede düşük olduğu ($p < 0.05$), tersiyer follikül sayısında ise farklılık olmadığı ($p > 0.05$) bildirildi (Üstün ve ark., 1993). Gebe sıçanlara DS postnatal 4 haftalık yavru ovaryumunda etkilerinin belirlemek için gebelik dönemde 5. gününden 15 gün boyunca günde 1 mg/kg. IM olarak verilen başka bir çalışmada primordiyal folliküllerin üzerine etkisi araştırılmış ve primordiyal follikül sayısında anlamlı bir fark görölmediği bildirilmiştir (ölimen ve ark., 2017). Çalışmamız hem Üstün ve ark., (1993) hem de çölçimen ve ark., (2017) alışmalarıyla

kısmen örtüşmektedir. Çünkü DS 4 ve 10 haftalıklerde primordiyal follikül sayısında anlamlı bir fark gözlenmedi fakat erken antral follikül sayısı anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ($p \leq 0.05$).

DS ve TQ arasıdonik asit metabolizmasının COX (Özalp Dural, 2002; El Mezayen ve ark., 2006) ve LO (Özalp Dural, 2002; Mansour ve Tornhamre. 2004) yollarını inhibe etmektedir. DS ve TQ'un COX-2 (Özalp Dural, 2002) ve Prostaglandin-D2 (PGD2) ayrıca, COX-1 ekspresyonunu ve Prostaglandin-E2 (PGE2) üretimi üzerinde inhibitör etki yaptığı fakat TQ'nun COX-1 ekspresyonunu ve Prostaglandin-E2 (PGE2) inhibitör etkisini hafif olduğu belirtmişlerdir (El Mezayen ve ark., 2006). Bunun yanında NS ovaryum folliküllerinde dejeneratif değişiklikler gösterdiği bildirilmiştir (Yadav ve Agarwal, 2011). Sonuç olarak gebelikte uygulanan DS ve TQ postnatal dişi ovaryumda da benzer şekilde erken antral follikül ve korpus luteum sayısını anlamlı olarak azaltılı ($p \leq 0.05$) ayrıca ovulasyonu kısmen önlediği belirlendi. Gebelikte uygulanan DS ve TQ postnatal 10 haftalık dişi ovaryumda ovulasyonu geridönüşümsüz bir şekilde azaldığı belirlendi. Çalışmamızın literatür için yeni bir bilgi olduğu söylenebilir ve diğer çalışmalardan bu yönüyle ayrılmaktadır.

Çalışmamızda serum AMH değeri kontrol grubuna göre DS ve TQ grubu sıçanlarda attığı belirlendi ($p \leq 0.05$). AMH 'nın artması ovaryumda primer, preantral ve erken antral sayısını azaltabilir. Literatür çalışmalarında AMH primer ve sekonder (çoğunlukla erken antral) folliküllerin granüloza hücreleri tarafından sentezlendiği bildirilmektedir (Tal ve Seifer, 2017). Ayrıca AMH'nın doğrudan preantral ve erken antral folliküllerden salgılandığı da bildirilmektedir. Serum AMH düzeyleri yumurtalık rezervini ölçmek için gonadotropin'den etkilenmediği için güvenilirliği yüksek bir belirteçtir ve AMH menstrüel sikluslar içerisinde veya arasında minimal değişkenlik gösterir (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine). Ayrıca Primordial folliküllerde AMH ekspresyonu gözlenmezken, primer folliküllerin granüloza hücrelerinin % 74'ü çok az sentezlenir. AMH ekspresyonunun en yüksek seviyesi, preantral ve küçük antral (erken antral) folliküllerin granüloza hücrelerinde salgılanır. Büyük antral folliküllerde, AMH ekspresyonu giderek kaybolur (Weenen ve ark., 2004). Ayrıca yakın zamanda, AMH tip II reseptörü (AMHR II) ve mRNA'larının çoğunlukla preantral ve küçük antral folliküllerden granüloza hücrelerde eksprese

edildiği belirlendi. AMH KL’da, büyük antral folliküllerde, Primordial folliküllerde ve oositlerinde az veya hiç salgılanmaz. AMH teka ve interstisyel hücrelerde de salgılanmaz (Baarends ve ark., 1995). Dolayısıyla serum AMH değerinde artış özellikle preantral ve erken antral follikül sayısını azaltabilir. Çalışmamızda DS ve TQ 10 haftalık sıçanlarda serum AMH değeri anlamlı olarak artışı ($p \leq 0.05$), preantral (TQ grubunda) erken antral follikül (DS ve TQ grubunda) sayısının anlamlı olarak azalmasına neden olabilir ($p \leq 0.05$).

AMH ekspresyonu, follikülogenezde önemli bir rol oynamaktadır (Weenen ve ark., 2004). AMH'nin follikülogenez sırasında iki önemli düzenleyici aşamayı etkilemektedir. İlki, AMH primordiyal folliküllerin büyümekte olan havuza girmesini engellerken, ikincisi AMH folliküllerin FSH hassasiyetini düşürür. Bu sebeplerden dolayı AMH, yumurtalık follikül büyümesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Gruijters. 2003). Çalışmamızda artmış AMH değeri DS ve TQ grubu 4 ve 10 haftalık ovaryunların primer follikül sayısını anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ($p \leq 0.05$). Sonuç olarak artmış AMH değeri follikülogenezisi etkileyerek yeni folliküllerin büyümekte olan follikül havuzuna girmesini kısmen engelleyebilir ve sayısını azaltabilir.

DS ve TQ grubunda AMH’nin artışı negatif geri besleme mekanizmasına da bağlı olabilir. Normalde ovaryum siklusunun folliküler evresinde 12-13. günlerde çok miktarda östrojen salgılanır. Artan östrojen pozitif feedback ile adenohipofizden LH salınımını aniden arttırır. LH’nin ani artışı ilk önce ovulasyona daha sonra KL’un oluşmasına ve KL’dan progesteronun ve östrojenin salgılanmasına sebep olur. Artan östrojen ve progesteron miktarı GnRH, FSH ve LH salınımını inhibe eder (Köylü. 2014). Çalışmamızda DS ve TQ grubunda KL sayısında kontrol grubuna göre anlamlı ($P=0.006$) azaldığı görüldü. Korpus luteum sayısında azalma, östrojen ve progesteron salgısının azalmasına sebep olabilir. Progesteron ve östrojenin azalması ise geri besleme mekanizmasında azalmaya neden olabilir. Merkezi geri besleme azalması, hipofiz follikül uyarıcı hormonun (FSH) salgılanmasında bir artışa neden olur. Bunun sonucunda, geç luteal ve erken folliküler FSH düzeylerinde bir artış takip eder. Böylece, yeni folliküllerin daha erken büyümesi hızlanır; buna ilaveten adet döngüsünün 2-3. günlerinde ölçülen bazal estradiol düzeylerinde bir artış olur. Folliküler fazın uzunluğu

kısalır, bu da menstrüel siklusün toplam uzunluğunu azaltır (Park ve ark., 2016). Buda folliküllerin daha erken büyümesine ve serum AMH oranını artmasına sebep olabilir (Joop 2004).

Serum AMH'un değerleri aynı zamanda zayıf over yanıtını, antral follikül sayısının değerlendirilmesi ve aşırı yanıt veren ovaryumu da belirler (Kwee, 2007). Serum AMH düzeyleri over rezervinin tarama testinden ziyade, kötü yumurtalık yanıtının tanısasal bir testi olabilir (Maheshwari ve ark., 2009). Bunun yanında yumurtalık tepkisinin kestirmek ve over yanıtları zayıf olan ve kadınların belirlenmesinde önemli bir yere sahiptir (Anderson ve ark., 2012). AMH'nin azalması primordiyal follikül havuzundaki follikül sayısının azalmasına bağlı olduğu da düşünülmektedir. AMH'yi yumurtalık follikülü havuzunun boyutu ve yumurtalık disfonksiyonu için ideal bir belirteçtir (Visser, 2006). Çalışmamızda 10 haftalık ovaryumların hem DS hem de TQ grubunda AMH'nin artmasına rağmen primordiyal follikül sayısında anlamlı bir azalma görülmedi fakat ovulasyonunun kısmen azalmasına bağlı olarak ovaryumun fonksiyonlarında bir bozulma olabilir. AMH serum seviyesinin artmasının küçük antral folliküllerin androjen kaynaklı aşırı üretimin bir sonucudur ve her follikül AMH üretmektedir (Pigny ve ark., 2003).

Maternal uygulanan DS sürmekte olan implantasyon ve plasantasyon sürecini engellediğini, buna karşın in vitro maruz kalmanın ardından embriyonun etkiden kurtulabileceğini gösterildi (Carp ve ark., 1988). Yapılan başka bir çalışmada blastomerin uterusu imlasyonu engellediği için düşüklüğe neden olduğu belirtilmektedir (Kennedy, 1977). Ovulasyon, implantasyon, desidualizasyon, fertilizasyon ve doğum gibi birçok üreme işlemi PG ligand-reseptör etkileşimlerine bağlıdır (Matsumoto ve ark., 2001). NSAII'lerin kullanımı, normal farelerde infertiliteye neden olabilir. COX-2-ve COX-1 farelerde, zayıf ovulasyona (oosit sayıları açısından), düşük dölleme oranlarına, implantasyonun başarısızlığına ve yetersiz desidualizasyona sebep olmaktadır (Lim ve ark., 1997). Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından özellikle DS-TQ grubu gebe sıçanlarda kontrol ve serum fizyolojik grubuna göre hem gebe sıçan sayısı ve bunlarda doğan yavru sayısı belirgin bir şekilde azdı. Yeteri kadar yavru elde etmek için ağırlıkları (200-350) g arasında olan daha önce hiç çiftleşmemiş deney grubu haricinde toplamda 20 adet Wistar Albino cinsi dişi sıçan

tekrar gebe bırakıldı. Bu dişilerde doğan yavru sayısı 6-3 arasında değişmekteydi. Ayrıca bu grupta gebe kalan dişi sayısı gebe olmayan dişi sayısına göre daha azdı.

NSAII'ler hamile kadınlara tedavi etmek için reçete edilen en yaygın ilaçlardır (Ostensen ve Skomsvoll, 2004). NSAII'lerin şimdiye kadar yapılan çalışmalarda birçok memeli türlerinin maymunlarda (Duffy ve Stouffer., 2002), sıçanlarda (Gaytan ve ark., 2002), farelerde (Downs ve Longo, 1982), ineklerde (De Silva ve Reeves, 1985) ovulasyonu engellediği bildirilmiştir. DS %50 oranında inhibisyona neden olan en yüksek anti-ovulasyon aktiviteye sahip olduğu belirlendi (Yokota ve ark., 2016). Bununla beraber diklofenak ve naproksen verildikten sonra spontan düşüklerde bir artış gözlemlenmiştir (Daniel ve ark., 2015). Düşük riski prenatal NSAII kullanımı sonucunda % 80 oranında arttırmaktadır (Li ark., 2003). Aynı zamanda DS, üreme çağındaki kadınlarda da yaygın olarak kullanılan steroid olmayan bir anti-inflamatuar ilaçtır (Siu ve ark., 2002). Dolayısıyla tedavi için uygulanan DS doğurgan çağındaki kadınlar ovaryumlarında ovulasyonu engellemekte ve geri dönüşümlü olarak infertiliteye neden olmaktadır (Sherif ve ark., 2014). Bu kadınların DS'un tedavisinden sonra gebe kaldıkları bildirilmektedir. Oysa çalışmamızda 10 haftalık postnatal sıçan ovaryumunda etkisi kısmen geri dönüşümsüz olmaktadır.

Sonuç ve öneriler

Gebelik boyunca 5. günden itibaren 10 gün süreyle uygulanan DS ve oral olarak verilen TQ'un postnatal 4 ve 10 haftalık sıçanlarda ovaryum preantral follikül sayısına etkileri stereolojik tarafsız sayım yöntemi ile ele alındı. Ayrıca çalışmamızda primordiyal, primer, erken antral ve AMH'nın salgılandığı toplam folliküllerin de sayımı yapıldı ve serum AMH değerlerine etkisi ELISA yöntemiyle araştırıldı. Bunun yanında çalışma gruplarında Cavalieri prensibine göre toplam, korteks, medulla hacimleri ile medullanın kortekse ve toplam hacime oranı hesaplandı. Sonuçlar şöyledir;

1) DS, DS-TQ ve TQ grubu 10 haftalık sıçan ovaryumun medulla haciminin korteks ve toplam hacime oranı arttığı gözlemlendi ($p \leq 0.05$). DS ve TQ aynı etki göstererek sıçan ovaryumların medulla hacminin toplam hacime ve korteks hacmine oranı anlamlı olarak arttırdığı sonucuna varıldı ($p \leq 0.05$).

2) Disektör sayım prensibine göre SF, DS, DS-TQ ve TQ grubu 4 ve 10 haftalık sıçan ovaryumların primordiyal follikül sayısı kontrol grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmediği ($p \geq 0.05$). DS ve TQ'nun primordiyal follikül sayısına etkisi olmadığı sonucuna varıldı.

3) DS grubu primer follikül sayısı 4 haftalık ovaryumlarda anlamlı bir fark gözlenmedi ($p \geq 0.05$) fakat 10 haftalık ovaryumlarda anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ($p \leq 0.05$). DS grubu 10 haftalık ovaryumların primer follikül sayısının azalması, artmış serum AMH değerine bağlı olabileceği sonucuna varıldı.

4) DS grubu 4 ve 10 haftalık sıçan ovaryumların preantral follikül sayısı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlenmedi ($p \geq 0.05$) DS'nin postnatal ovaryumların preantral follikül sayısına etkisi olmadığı sonucuna varıldı.

5) DS grubu 4 ve 10 haftalık sıçan ovaryumların erken antral follikül sayısı anlamlı olarak azaldığı ($p \leq 0.05$) dolayısı AMH'nin salgılandığı toplam follikül sayısı da anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ($p \leq 0.05$). DS grubu 10 haftalık ovaryumların KL sayısı anlamlı olarak azaldığı ($p \leq 0.05$) fakat serum AMH değeri anlamlı arttığı gözlemlendi ($p \leq 0.05$). DS'nin postnatal ovaryumlarda folikülogenezis ve ovulasyon üzerine olumsuz etkileri olduğu sonucuna varıldı.

6) TQ grubu 4 haftalık sıçan ovaryumların preantral, erken antral ve AMH'nin salgılandığı toplam follikül sayısı anlamlı olarak arttığı ($p \leq 0.05$) fakat 10 haftalıklarda anlamlı olarak azaldığı ($p \leq 0.05$) gözlemlendi. TQ grubu haftalık 4 sıçanlarda serum AMH ng/ml değerlerinde anlamlı bir fark gözlenmedi ($p \geq 0.05$) fakat 10 haftalık sıçanlarda anlamlı olarak artış ($p \leq 0.05$) gözlemlendi. TQ grubu 10 haftalık sıçanların serum AMH ng/ml değerinin artması preantral ve erken antral follikül sayısını azalmasına neden olabilir. Dolayısıyla TQ'nun serum AMH değerini arttırdığı ve folikülogenezis olumsuz etkilediği sonucuna varıldı.

7) DS ve TQ grubu 10 haftalık sıçan ovaryumların KL sayısı kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ($p \leq 0.05$). Korpul luteum sayısı dolayısıyla ovulasyon sayısında azalma DS ve TQ'un COX -2 inhibitörü olmasına bağlı olabilir sonucuna varıldı.

8) eşitli kimyasalların ovaryan follikül sayısına, follik logenezis üzerine etkileri sayısal olarak belirlemek için stereoloji en etkin tekniktir ancak mekanizmada etkenin belirlenmesi için yardımcı tekniklere de ihtiyaç vardır. Örneğin; immünohistokimyasal, biyokimyasal, hormon analizleri.

ÖZET

Körkoca A. Gebelikte Uygulanan Diklofenak Sodyum ve Timokinonun Postnatal 4 ve 10 Haftalık Sıçan Ovaryum Preantral Follikül Sayısına Etkilerinin Stereolojik Yöntemle Araştırılması, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Van 2018. Diklofenak Sodyum (DS) gebelikte uygulandığında embriyo, fetus ve yenidoğan üzerine zararlı etkilere neden olduğu bildirilmektedir. Timokinon (TQ) ise ovaryum folliküllerinde değişikliklere yol açtığı bildirilmektedir. Bu çalışmada gebelikte uygulanan DS ve TQ'un postnatal sıçan ovaryumlarında preantral follikül sayısına etkileri araştırıldı. Çalışma için 20 Albino Wistar dişi sıçanlar rastgele grublara ayrıldı. Sıçanlar gebeliğin beşinci gününde 10 gün süreyle; 1. gruba 6.1mg/kg DS IM uygulandı, 2. gruba 6.1mg/kg DS IM enjekte edildi ve 5mg/kg/gün TQ oral olarak verildi. Aynı sürede 3. gruba 5mg/kg/gün yalnızca TQ oral olarak verildi, 4. gruba ise 1ml/kg/gün Serum Fizyolojik IP enjekte edildi. 5. gruba herhangi bir işlem uygulanmadı. Postnatal dişi yavrular 4 ve 10 haftalık grublara ayrıldı. Sıçanlar 4. ve 10. haftanın sonunda anestezi altında, sağ atriumdan kan (2 cc) ve perfüzyon yapılarak akabinde sağ overler alındı. Overlerin Bouin tesbitinden sonra, rutin histolojik takibi yapıldı. Hematoksilen-Eozin ile boyandı. Follikül sayımında fiziksel disektör yöntemi, over hacmi belirlemede Cavalieri prensibi kullanıldı. ELISA yöntemi ile de AMH değeri belirlendi. İstatistik için Kruskal-Wallis analiz testi kullanıldı. Bulgular; DS grubu 4 ve 10 haftalık ovaryumların preantral folliküllerin sayısında anlamlı bir fark görülmedi fakat erken antral follikül sayısını anlamlı azalma gözlemlendi ($p \leq 0.05$). TQ grubu 4 haftalık ovaryumların preantral ve erken antral follikül sayısını anlamlı artırdı ($p \leq 0.05$) ve 10 haftalık ovaryumlarında ise anlamlı azalma gözlemlendi ($p \leq 0.05$). Deney gruplarının tümünde primordiyal follikül sayısında anlamlı bir fark gözlemlenmedi. DS ve TQ grubu 10 haftalık ovaryumların korpus luteum sayısında anlamlı azalma ve AMH değerinde anlamlı artış belirlendi ($p \leq 0.05$). DS ve TQ 10 haftalık ovaryumların medulla hacminin korteks hacmine oranını anlamlı olarak artırdığı gözlemlendi ($p \leq 0.05$). Sonuç olarak. Gebelikte uygulanan DS'nin postnatal 4 ve 10 haftalık ovaryumların preantral folliküllerin sayısına etkisi olmadığı fakat erken antral follikül sayısını anlamlı azalttığı gözlemlendi. TQ 4 haftalık ovaryumlarda preantral ve erken antral follikül sayısını artırdığı fakat 10 haftalıklarda azalttığı gözlemlendi. Hem DS hem de TQ 10 haftalık sıçanlarda serum AMH değerini anlamlı artırması ve korpus luteum sayısını ise anlamlı azaltması ovulasyon kısmen önleyebileceği fikrini verdi. Ayrıca DS ve TQ 10 haftalık ovaryumların medulla/korteks hacmini artırdığı belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Timokinon, Diklofenak Sodyum, Preantral follikül sayısı, Sıçan, Stereoloji.

SUMMARY

Körkoca A. Investigation of effects of Diclofenac sodium and thymoquinone administered during pregnancy on ovarium follicle number of postnatal 4 and 10 weeks old rats with stereological method. Van Yuzuncu Yil University, Institute of Health Sciences, Department of Medical Histology and Embryology, PhD. Thesis, Van 2018. Diclofenac sodium (DS) is reported to cause some deleterious effects on embryo, fetus and neonatals. Thymoquinone (TQ) is known for its alterations on ovarium follicles. In this study, effects of diclofenac sodium and thymoquinone administered during pregnancy on preantral follicle numbers in rat overs. 20 albino Wistar rats were divided into groups randomly for the study. Rats were administered at 5th day of pregnancy and continued for 10 days; 6.1 mg/kg DS IM was administered to 1st group, 6.1 mg/kg DS IM was injected and TQ was given orally as 5 mg/kg/day to 2nd group. During same time period, only Thymoquinone was administered orally as 5 mg/kg/day to 3rd group. 4th group was administered 1 ml/kg/day saline solution IP. 5th group in any transaction implemented. Postnatal female offspring was separated into groups of 4 and 10 weeks of old. At the end of 4th and 10th weeks, blood (2 cc) was withdrawn from right atria and perfused, then right overs were extracted under anesthesia. Ovaries were fixed in Bouin and later routine histological investigation follow-up was performed. They were stained with Hematoxylen-Eosin. Physical dissector method for estimating follicle number and Cavalieri's principle for estimating the ovary volumes were used. ELISA method was used for quantitative measurement of anti-mullerian hormone (AMH). Kruskal-Wallis test was used for statistical analysis. Diclofenac sodium group showed a significant decrease in antral follicle number ($p \leq 0.05$) in 4 week old ovary, primary, early antral follicle number and corpus luteum number ($p \leq 0.05$) decreased significantly at 10 week old ovary and an increase in AMH value ($p \leq 0.05$) was observed. In thymoquinone group significant increase in preantral and antral follicle numbers in 4 weeks old ovarium ($p \leq 0.05$) and a significant decrease in primary, preantral, early antral follicle and number of corpus luteum ($p \leq 0.05$), a significant increase in AMH value ($p \leq 0.05$) was observed. No significant difference in primordial follicle number in all groups was observed. DS and TQ grubu10 weekly cortex volume ratio of ovaries was observed medulla volume increased significantly. As a result it was observed that DS did not affect the number of prenatal follicles in postnatal ovaries but decreased significantly primary, early antral follicle number at 10 week old ovary. TQ increased the number of preantral follicles at 4 weeks and decreased at 10 weeks. Both DS and TQ gave the idea that ovulation could be partially prevented by a significant increase in serum AMH and a significant reduction in corpus luteum counts in 10 week old rats. In addition, DS and TQ 10 week old ovaries were found to increase medulla/cortex volume.

Keywords: Thymoquinone, Diclofenac Sodium, Preantral follicle number, Rat, Stereology.

KAYNAKLAR

- Abacıoğlu N, Onursan E, Hatunoğlu E, Abacıoğlu H (2004). Güncel Farmalist 9. Baskı, Türkiye Tıbbi İlaç Rehberi. Palme Yayınları, Ankara, 426-432.
- Advis JP, Ojeda SR (1979). Acute and delayed effects of anterior pituitary transplants in inducing precocious puberty in female rat. *Biol Reprod*, 20, 879–887.
- Aqel M, Shaheen R (1996). Effects of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds on the uterine smooth muscle of rat and guinea pig. *J Ethnopharmacol*, 52,1, 23-26.
- Akalan MA, Çevik Demirkan A (2013). Stereoloji ve veteriner hekimlikte kullanım alanları. *YYU Veteriner Fak Derg*, 24, 2, 95 - 100.
- Akil M, Amos RS, Stewart P (1996). Infertility may sometimes be associated with NSAID consumption. *Br J Rheumatol*, 35, 1, 76-8.
- Aksoy A, Kolbakır F, Hökelek M (2010). Laboratuvar Hayvanları. Ondokuz Mayıs Üniversitesi yayınları no: 132, Samsun.
- Al-Naqeeb G, Maznah I, Al-Zubairi AS (2009). Fatty acid profile, α -tocopherol content and total antioxidant activity of oil extracted from *Nigella sativa* seeds. *Int J Clin Pharmacol*, 5, 4, 244-250.
- Alves KA, Alves BG, Rocha CD, Visonná M, Mohallem RF, Gastal MO, Jacomini JO, Beletti ME, Figueiredo JR, Gambarini ML, Gastal EL (2015). Number and density of equine preantral follicles in different ovarian histological section thicknesses. *Theriogenology*, 83, 6, 1048-55.
- Anadol E, Yar Sağlam AS, Yarım GF, Gültiken N (2016). Serum concentrations of anti-mullerian hormone and its expression in the remnant ovarian tissue of rats with experimentally induced ovarian remnant syndrome. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 22, 4, 545-550.
- Anderson RA, Nelson SM, Wallace WH (2012). Measuring anti-mullerian hormone for the assessment of ovarian reserve: When and for whom is it indicated? *Maturitas*, 71, 1, 28-33.
- Anonim 1 (2015). La *Nigella sativa*: La graine qui guérit de tout sauf de la mort. <http://ivoirois.com/wordpress/index.php/la-nigella-sativa-la-graine-qui-guerit-de-tout-sauf-de-la-mort/>. Erişim Tarihi 04.01.2018.
- Anonim 2 (2015). La *Nigella sativa*: La graine qui guérit de tout sauf de la mort. <http://ivoirois.com/wordpress/index.php/la-nigella-sativa-la-graine-qui-guerit-de-tout-sauf-de-la-mort/>. Erişim Tarihi 04.01.2018.
- Antonucci R, Zaffanello M, Puxeddu E, Porcella A, Cuzzolin L, Pilloni MD, Fanos V (2012). Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in pregnancy: Impact on the fetus and newborn. *Curr Drug Metab*, 13, 4, 474-90.

- Asfour W, Almadi S, Haffar L (2013). Ethanolic Extract of *Nigella sativa* Seeds Lacks the Chemopreventive Efficacy in the Post Initiation Phase of DMH-Induced Colon Cancer in a rat model. *Pharmacology & Pharmacy*, 4, 222-230.
- Auer M, Brezinka C, Eller P, Luze K, Schweigmann U, Schwarzler P (2004). Prenatal diagnosis of intrauterine premature closure of the ductus arteriosus following maternal diclofenac application. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 23, 5, 513–516.
- Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P, Hoogerbrugge JW, van Leeuwen EC, Themmen AP, Grootegoed JA (1995). Anti-mullerian hormone and anti-mullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology*, 136, 11, 4951–4962.
- Bader AAA (2015). Anti-ischemic properties of *Nigella sativa* against cardiac and non-cardiovascular ischemia. *Int J Clin Pharmacol Toxicol*, 5, 1, 53-61.
- Badary OA (1999). Thymoquinone attenuates ifosfamide-induced Fanconi syndrome in rats and enhances its antitumor activity in mice. *J Ethnopharmacol*, 67, 135-142.
- Badary OA, Abdel-Naim AB, Abdel-Wahab MH, Hamada FM (2000). The influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats. *Toxicology Mar*, 143, 3, 219-26.
- Bashir MU, Qureshi HJ (2009). Analgesic effect of *Nigella sativa* seeds extract on experimentally induced pain in albino mice. *J Coll Physicians Surg Pak*, 20, 7, 464-7.
- Bayir Y, Karagöz Y, Karakus E, Albayrak A, Sengul O, Can I, Yayla N, Küskün U, Keles MS (2012). *Nigella sativa* reduces tissue damage in rat ovaries subjected to torsion and detorsion: Oxidative stress, proinflammatory response and histopathological evaluation, *Gynecol Obstet Invest*, 74, 1, 41–49.
- Baytop T (1984). Türkiye’de Bitkiler İle Tedavi. İ.Ü. Yayınları No: 3255.
- Borman P, Özdemir O (2015). Gebelik döneminde romatizmal hastalıklar ve antiromatizmal ilaç kullanımı. *Turk J Phys Med Rehab*, 61, 4, 358-365.
- Canan S, Şahin B, Odacı E, Ünal B, Aslan H, Bilgiç S, Kaplan S (2002a). Total hacim, hacim yoğunluğu ve hacim oranlarının hesaplanmasında kullanılan bir stereolojik yöntem: Cavalieri prensibi. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 22, 1, 7-14.
- Canan S, Şahin B, Ünal B, Aslan H, Bilgiç S, Kaplan S (2002b). Parçacıkların total sayısının hesaplanması için bir metot: Parçalama, *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 22, 1, 30-46.
- Cappon GD, Cook JC, Hurtt ME (2003). Relationship between cyclooxygenase 1 and 2 selective inhibitors and fetal development when administered to rats and rabbits during the sensitive periods for heart development and midline closure. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 68, 1, 47-56.

- Carp HJ, Fein A, Nebel L (1988). Effect of diclofenac on implantation and embryonic development in the rat. *Eur J Obstet Gyn R B*, 28, 3, 273-277.
- Chehl N, Chipitsyna G, Gong Q, Yeo CJ, Arafat HA (2009). Anti-inflammatory effects of the *Nigella sativa* seed extract, thymoquinone, in pancreatic cancer cells. *HPB* (Oxford), 1, 5, 373-81.
- Cruz-Orive LM (1980). On the estimation of particle number. *J Microsc*, 120, 1, 15-27.
- Cruz-Orive LM ve Weibel ER (1990). Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *Am J Psychol*, 258, 4, 148-156.
- Cruz-Orive LM (1993). Systematic sampling in stereology, *B Int Statist Inst*, 55, 2, 451-468.
- Cruz-Orive LM (1999). Unbiased Stereology: Three dimensional measurement in microscopy. *J Anat*, 194, 1, 153-157.
- Çelik Ö ve Yıldırım A (2011). Follikülogenezisin Moleküler Temelleri, içinde “Yardımcı Üreme Teknikleri Temel Klinik ve Embriyoloji Uygulamaları”. Editör Ö Çelik, Bölüm 1, Adana Nobel Kitabevi.
- Çitili İ ve Oral E, (2011). Ovulasyon indüksiyonunda zayıf yanıt veren hastaların yönetimi, bölüm 2, içinde “Yardımcı Üreme Teknikleri Temel Klinik ve Embriyoloji Uygulamaları”. Editör Ö Çelik, Bölüm 2, Adana Nobel Kitabevi.
- Çölçimen N, Rağbetli MÇ, Kara M, Arıhan O, Akyol V (2017). Investigation of the effects of diclofenac sodium in rat ovary on the number of preantral follicles by stereological methods in prenatal period. *East J Med*, 22, 3, 80-84.
- Daniel S, Koren G, Lunenfeld E, Levy A (2015). NSAIDs and spontaneous abortions—true effect or an indication bias? *Brit J Clin Pharmacol*, 80, 4, 750–754.
- Dawood MY (1993). Nonsteroidal antiinflammatory drugs and reproduction. *Am J Obstet Gynecol*, 169, 5, 1255-65.
- De Silva M and Reeves JJ (1985). Indomethacin inhibition of ovulation in the cow. *J Reprod Fertil*, 75, 2, 547-549.
- De Vet A, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC (2002). Anti-mullerian hormone serum levels: A putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril*, 77, 2, 357-62.
- Downs SM ve Longo FJ (1982). Effects of indomethacin on preovulatory follicles in immature, superovulated mice. *Am J Anat*, 164,3, 265-74.
- Duffy DM ve Stouffer RL (2002). Follicular administration of a cyclooxygenase inhibitor can prevent oocyte release without alteration of normal luteal function in rhesus monkeys. *Hum Reprod*, 17, 11, 2825–2831.
- Dural Esen ÖA (2002). Farmakoloji. 3. Baskı, Nobel Tıp Yayınevi. İstanbul, 255-259

Düzova H ve Emre H (2011). Menstrüel Fizyoloji, bölüm 1, içinde “Yardımcı Üreme Teknikleri Temel Klinik ve Embriyoloji Uygulamaları” Editör Ö Çelik, Bölüm 1, Adana Nobel Kitabevi.

El-Dakhakhny M, Madi NJ, Lember N, Ammon HP (2002). *Nigella sativa* oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. *J Ethnopharmacol*, 81, 2,161-4.

El Mezayen R, El Gazzar M, Nicolls MR, Marecki JC, Dreskin SC, Nomiyama H (2006). Effect of thymoquinone on cyclooxygenase expression and prostaglandin production in a mouse model of allergic airway inflammation. *Immunol Lett*, 106, 1, 72-81.

El Tahir KE, Ashour MM, Al-Harbi MM (1993) The cardiovascular actions of the volatile oil of the black seed (*Nigella sativa*) in rats: elucidation of the mechanism of action. *Gen Pharmacol*, 24, 5, 1123-31.

Eroschenko VP (2013). diFiore Histoloji Atlası. 12. Baskıdan Çeviri, Editör, R Demir, *Palme Yayınları*, 785.

Eşrefoğlu M (2009). Temel Histoloji. 1. Baskı, Medipres yayıncılık. 221-249.

Eşrefoğlu M (2011) Follikülogenezis, Bölüm 1, içinde “Yardımcı Üreme Teknikleri Temel Klinik ve Embriyoloji Uygulamaları”, Editör Ö Çelik, Bölüm 1, Adana Nobel Kitabevi.

Fararh KM, Shimizu Y, Shiina T, Nikami H, Ghanem MM, Takewaki T (2005). Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters. *Res Vet Sci*, 79, 219-223.

Farooq TJ ve Hayfaa MAA (2011). The effects of *Nigella sativa* oil administration on some physiological and histological values of reproductive aspects of rats. *Iraqi J Vet Med*, 35, 2, 52 – 60.

Fortune JE (1994). Ovarian Follicular Growth and Development in Mammals. *Biol Reprod*, 50, 225-232.

Gali-Muhtasib HU, Abou Kheir WG, Kheir LA, Darwiche N, Crooks PA (2004a). Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes. *Anticancer Drugs*, 15, 4, 389-99.

Gali-Muhtasib HU, Diab-Assaf M, Haddadin MJ (2004b). Quinoxaline 1,4-dioxides induce G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Cancer Chemoth Pharm*, 55(4), 369-78.

Gaytan F, Tarradas E, Morales C, Bellido C, Sanchez-Criado JE (2002). Morphological evidence for uncontrolled proteolytic activity during the ovulatory process in indomethacin-treated rats. *Reproduction*, 123, 639–649.

- Gaytan M, Bellido C, Morales C, Sanchez-Criado JE and Gaytan F (2006). Effects of selective inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase pathways in follicle rupture and ovulation in the rat. *Reproduction*, 132, 4, 571-577.
- Ghosheh OA, Houdi AA, Crooks PA (1999). High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (*Nigella sativa* L.). *J Pharmaceut Biomed*, 19, 5, 757–762.
- Gökçimen A ve Malas MA (2003). Nonsteroidal anti-inflamatuvar ilaçların gebelikteki toksisiteleri ile ilgili literatürlerin gözden geçirilmesi. *SDÜ Tıp Fak. Der*, 10, 3, 50 - 52.
- Gundersen HJ (1986). Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones. *J Microsc*, 143, 1, 3-45.
- Gundersen HJ (1977). Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary particles: the edge effect. *J Microsc*, 111, 219-23.
- Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B (1988a). The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*, 96, 10, 857-81.
- Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ (1988b). Some new simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*, 96, 5, 379-394.
- Gundersen HJ and Jensen EBV (1987). The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc*, 147, 3, 229–263.
- Gundersen HJ, Jensen EBV, Kieu K, Nielsen J (1999). The efficiency of systematic sampling in stereology – reconsidered. *J Microsc*, 193,1, 199-211.
- Güven D, Altunkaynak BZ, Ayranci E, Kaplan S, Bildircin D, 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*, 33, 258–263.
- Gruijters MJ, Visser JA, Durlinge AL, Themmen AP (2003) Anti-mullerian hormone and its role in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol*, 211, 1-2, 85–90.
- Halawani E (2009). Antibacterial activity of thymoquinone and thymohydroquinone of *Nigella sativa* l. and their interaction with some antibiotics. *Adv Bio Res*, 3, 5-6, 148-152.
- Hajhashemi V, Ghannadi A, Hajilooa M (2010). Analgesic and anti-inflammatory effects of rosa damascena hydroalcoholic extract and its essential oil in animal models. *Iran J Pharm Res*, 9, 2, 163–168.

Hosseini SM, Taghiabadi E, Abnous K, Hariri AT, Pourbakhsh H, Hosseinzadeh H (2017). Protective effect of thymoquinone, the active constituent of *Nigella sativa* fixed oil, against ethanol toxicity in rats. *Iran J Basic Med Sci*, 20, 8, 927-939.

Howard CV, Reed MG (1998). Unbiased stereology: Three-dimensional measurement in microscopy, 1st Ed. United Kingdom: Bios Scientific Publishers.

İlhan N, Seçkin D (2005). Protective effect of *Nigella sativa* seeds on cc 14-induced hepatotoxicity. *FÜ Sağlık Bil Derg*, 19, 3, 175-179.

Johnson NP, Bagrie EM, Coomarasamy A, Bhattacharya S, Shelling AN, Jessop S, Farquhar C, Khan KS (2006). Ovarian reserve tests for predicting fertility outcomes for assisted reproductive technology: the International Systematic Collaboration of Ovarian Reserve Evaluation protocol for a systematic review of ovarian reserve test accuracy. *BJOG*. 113,12, 1472-80.

Junqueira LC, Carneiro J (2009). Temel Histoloji. Editör, S Solakoğlu, Bölüm 22, Nobel Tıp Kitabevleri, 449,479.

Kanter M (2008). *Nigella sativa* and derived thymoquinone prevents hippocampal neurodegeneration after chronic toluene exposure in rats. *Neurochem Res*, 33: 579-588.

Kanter M, Demir H, Karakaya C, Özbek H (2005). Gastroprotective activity of *Nigella sativa* L oil and its constituent, thymoquinone against acute alcohol-induced gastric mucosal injury in rat. *World J Gastroenterol*, 11, 42, 6662-6666.

Kanter M, Coskun Ö, Korkmaz A, Oter Ş (2004). Effects of *Nigella sativa* on oxidative stress and -cell damage in streptozotocin-Induced diabetic rats. *The Anatomical Record Part A*, 27, 685–691.

Kaseb AO, Chinnakannu K, Chen D, Sivanandam A, Tejwani S, Menon M, Dou QP, Reddy GP (2007) Androgen receptor and E2F-1 targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res*, 67, 16, 7782-8.

Khattab MM ve Nagi NM (2007). Thymoquinone supplementation attenuates hypertension and renal damage in nitric oxide deficient hypertensive rats. *Phytother Res*, 21, 410–414.

Kennedy TG (1977). Evidence for a role for prostaglandins in the initiation of blastocyst implantation in the rat. *Biol Reprod*, 16, 286-291.

Kevenaar ME, Meerasahib MF, Kramer P, van de Lang-Born BM, de Jong FH, Groome NP, Themmen AP, Visser JA (2006). Serum anti-müllerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. *Endocrinology*, 147, 7, 3228-34.

Khattab MM ve Nagi NM (2007). Thymoquinone supplementation attenuates hypertension and renal damage in nitric oxide deficient hypertensive rats. *Phytother Res*. 21, 410–414.

Kierszenbaum AL (2006). Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Editör. R Demir. Palme Yayınları. Bölüm 23, 830,894.

Koç H (2002). Bitkilerle Sağlıklı Yaşama. 1. Baskı, T.C. Kültür Bakanlığı yayınları 2883.

Köylü H (2014). Klinik Anlatımlı Tıbbi Fizyoloji. Nobel Tıp Kitapevleri, Bölüm 17, 475, 494.

Kwee J, Schats R, McDonnell J, Themmen A, de Jong F, Lambalk C (2007). Evaluation of anti-Müllerian hormone as a test for the prediction of ovarian reserve. *Fertil Steril*, 90(3), 737-43.

La Marca A ve Volpe A (2006). Anti-mullerian hormone (AMH) in female reproduction: Is measurement of circulating AMH a useful tool? *Clin Endocrinol*, 64, 6, 603–610.

Latiff LA, Parhizkar S, Dollah MA, Syed Hassan ST (2014). Alternative supplement for enhancement of reproductive health and metabolic profile among perimenopausal women: a novel role of *Nigella sativa*. *Iran J Basic Med Sci*, 17, 980-985.

Laven JS, Mulders AG, Visser JA, Themmen AP, De Jong FH, Fauser BC (2004). Anti-mullerian hormone serum concentrations in normoovulatory and anovulatory women of reproductive age. *J Clin Endocrinol Metab*, 89, 1, 318–323.

Lie Fong S, Visser JA, Welt CK, de Rijke YB, Eijkemans MJ, Broekmans FJ, Roes EM, Peters WH, Hokken-Koelega AC, Fauser BC, Themmen AP, de Jong FH, Schipper I, Laven JS (2012). Serum anti-mullerian hormone levels in healthy females: A nomogram ranging from infancy to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab*, 97, 12, 4650-5.

Li DK, Liu L, Odouli R (2003). Exposure to non-steroidal anti-inflammatory drugs during pregnancy and risk of miscarriage: Population based cohort study. *BMJ*, 327, 368.

Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, Dey S. (1997). Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*, 91, 2, 197-208.

Leung PCK, and Adashi EY (2004). The Ovary, 2nd Edition section 1, 2017 Elsevier B.V. or its licensors or contributors. *ISBN*, 978-0-12-444562-8.

Maeda KI, Ohkura S, Tsukamura H (2000). Physiology of reproduction. In: Krinke GJ, editor. The Laboratory Rat, New York, 145–176.

Maheshwari A, Gibreel A, Bhattacharya S (2009). Screening for early ovarian ageing. In: Bewley S, Ledger W, Nikolaou D, editors. Reproductive ageing, London, RCOG Press, 201–210.

Mansour MA, Gınawı OT, El-Hadiyah T, El-Khatib AS, Alshabanah OA, Al-Sawaf HA (2001). Effects of volatile oil constituents of *Nigella sativa* on carbon tetrachloride-

induced hepatotoxicity in mice: evidence for antioxidant effects of thymoquinone. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 110, 239–251

Mansour M, Tornhamre S (2004). Inhibition of 5-lipoxygenase and leukotriene C4 synthase in human blood cells by thymoquinone. *J Enzyme Med Chem*, 19, 5, 431-6.

Matsumoto H, Ma W, Smalley W, Trzaskos J, Breyer RM, Dey SK (2001). Diversification of Cyclooxygenase-2-Derived Prostaglandins in Ovulation and Implantation. *Biol Reprod*, 64, 1557–1565.

Mayhew TM, Gundersen HJ (1996). If you assume, you can make an ass out of u and me: A decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. *J Anat*, 188, 1, 1-15.

Mayers M, Britt KL, Wreford NGM, Ebling FJP, Kerr JB (2004). Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction*, 127, 569–580.

Mehranjani MS, Mansoori T (2016). Stereological study on the effect of vitamin C in preventing the adverse effects of bisphenol A on rat ovary. *Int J Reprod Bio Med*, 14, 6, 403-410.

Mehranjani MS, Noorafshan A, Hamta A, Momeni HR, Abnosi MH, Mahmoodi M, Anvari M, Hazaveh M (2010). Effects of vitamin E on ovarian tissue of rats following treatment with p-nonylphenol: A stereological study. *Iran J Reprod Med*, 8, 1, 1-9.

Mescher AL (2015). Junqueira's Temel Histoloji Atlas Kitabı. Editörü, S Solakoğlu, Nobel Tıp Kitapevleri.

Mohamed A, Waris HM, Ramadan H, Quereshi M, Kalra J (2009). Amelioration of chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (cr-eae) using thymoquinone. *Biomed Sci Instrum*, 45, 274-9.

Montenegro MA, Palomino H (1990). Induction of cleft plate in mice by inhibitors of prostaglandin synthesis. *J Craniofac Genet Dev Biol*, 10, 1, 83-94.

Moore KL (2009). Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. Editörler, H Dalçık, M Yıldırım, Nobel Tıp Kitapevleri.

Mouton PR (2002). Principles and practices of unbiased stereology. 6nd Ed, John Hopkins University.

Mukhallad AM, Mohamad MJM, Daradka HM (2009). Effects of black seeds (*Nigella sativa*) on spermatogenesis and fertility of male albino rats. *Res J Medicine & Med Sci*, 4, 386-390.

Nagi MN, Almakki HA (2009). Thymoquinone Supplementation Induces Quinone Reductase and Glutathione Transferase in Mice Liver: Possible Role in Protection against Chemical Carcinogenesis and Toxicity phytotherapy research. *Phytother Res*, 23, 9, 1295–1298.

- Nagi MN, Mansour AM (2000). Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: a possible mechanism of protection. *Pharmacol Res*, 41, 3, 283-289.
- Nickavar B, Mojab F, Javidnia K, Amoli MA (2003). Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran. *Z Naturforsch*, 58, 9-10, 629-3.
- Noorafshan A, Ahmadi M, Mesbah SF, Karbalay-Doust S (2013). Stereological study of the effects of letrozole and estradiol valerate treatment on the ovary of rats. *Clin Exp Reprod Med*, 40, 3, 115-121.
- Norsharina I, Maznah I, Aied al-A, Ghanya al-N (2011). Thymoquinone rich fraction from *Nigella sativa* and thymoquinone are cytotoxic towards colon and leukemic carcinoma cell lines. *J Med Plant Res*, 5, 15, 3359-3366.
- Novartis ilaç sektörü İstanbul Türkiye. www.novartis.com.tr – Novartis.
- Ofori B, Oraichi D, Blais L, Rey E, Berard A (2006). Risk of congenital anomalies in pregnant users of non-steroidal anti-inflammatory drugs: A nested case-control study. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 77, 4, 268-79.
- Ostensen ME, Skomsvoll JF (2004). Anti-inflammatory pharmacotherapy during pregnancy. *Expert Opin. Pharmacother*, 5, 3, 571-580.
- Ovale WK, Nahirney PC (2009). Netter Temel Histoloji. Editörler, S Müftüoğlu, F Kymaz, P Atilla Güneş, Tıp Kitapevleri.
- Ozan H (2014). Preniyum Ozan Anatomi. 3. Baskı, Klinisyen Kitabevi.
- Özalp Dural EA (2002). Farmakoloji. 4. Baskı, Nobel Tıp Yayınevi.
- Parandin R, Yousofvand N, Ghorbani R (2012). The enhancing effects of alcoholic extract of *Nigella sativa* seed on fertility potential, plasma gonadotropins and testosterone in male rats. *Iran J Reprod Med*, 10, 4, 355-362.
- Parhizkar S, Latiff AL, Rahman SA, Dollah AM (2011). Preventive effect of *Nigella sativa* on metabolic syndrome in menopause induced rats. *J Med Plant Res*, 5, 8, 1478-1484.
- Pari L, Sankaranarayanan C (2009). Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin–nicotinamide induced diabetic rat. *Life Sci*, 85, 23-26, 830–834.
- Park HJ, Lee GH, Gong DS, Yoon TK, Lee WS (2016). The meaning of anti-mullerian hormone levels in patients at a high risk of poor ovarian response. *Clin Exp Reprod Med*, 43, 3, 139–145.
- Pedersen T, Peters H (1968). Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J Reprod Fertil*, 17 555–557.

- Peng L, Liu A, Shen Y, Xu HZ, Yang SZ, Ying XZ, Liao W, Liu HX, Lin ZQ, Chen QY, Cheng SW, Shen WD (2012). Antitumor and anti-angiogenesis effects of thymoquinone on osteosarcoma through the NF- κ B pathway. *Oncol Rep*, 29, 2, 571-8.
- Pigny P, Merlen E, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Jonard S, Dewailly D (2003). Elevated serum level of anti-mullerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: Relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 12, 5957-5962.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2012). Testing and interpreting measures of ovarian reserve: A committee opinion. *Fertil Steril*, 98, 6, 1407-15.
- Randhawa MA, Al-Ghamdi MS (2002). A review of the pharmaco-therapeutic effects of *Nigella sativa*. *Pakistan J Med Res*, 41, 2, 77-83.
- Rezaee N, Nematollahi Z, Shekarfroush S, Hoseini E (2015). Effect of sodium metabisulfite on rat ovary and lipid peroxidation. *Iran J Toxicol*, 10, 2, 23-28.
- Ross MH ve Palwina W (2014). Histoloji Konu Anlatımlı ve Atlas. Editör, B Baykal Palme Yayıncılık.
- Salem ML (2005). Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *Int Immunopharmacol*, 5, 13-14, 1749-1770.
- Sherif B, Al-Zohyri AM, Shihab SS (2014). Effects of some non-steroidal anti-inflammatory drugs on ovulation in women with mild musculoskeletal pain. *IOSR-JPBS*, 9, 4, 43-49.
- Scheffer GJ, Broekmans FJ, Dorland M, Habbema JD, Looman CW, Velde ER (1999). Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. *Fertil Steril*, 72, 5, 845-51.
- Stanton SJ and Schultheiss OC (2009). The hormonal correlates of implicit power motivation. *J Res Pers*, 1; 43-45.
- Shoieb AM, Elgayyar M, Dudrick PS, Bell JL, Tithof PK (2003). In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. *Int J Oncol*, 22, 1, 107-13.
- Simon LS (1996). Actions and toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Curr Opin Rheumatol*, 7, 3, 159-66.
- Siu SS, Yeung JH, Lau TK (2002). A study on placental transfer of diclofenac in first trimester of human pregnancy. *Hum Reprod*, 15, 11, 2423-2425.
- Stika CS, Frederiksen MC (2001). Drug Therapy in Pregnant and Nursing Women. In: Atkinson A.J., Daniels C.E., Dedrick R.L., Grudzinskas C.V., Markey S.P. (eds) Principles of Clinical Pharmacology. Academic Press: London, 278-292.

Sunita M and Meenakshi S (2013). Chemical composition and antidermatophytic activity of *Nigella sativa* essential oil. *Academic Journal*, 7, 20, 1286-1292.

Sterio DC (1984). The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Mic*, 134, 2, 127-136.

Simmons DL, Levy DB, Yannoni Y, Erikson RL (1989). Identification of a phorbol ester-repressible v-src-inducible gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 4, 1178-82.

Tal R ve Seifer DB (2017). Ovarian reserve testing: a user's guide. *Am J Obstet Gynecol*, 217 (2), 129-140.

Türköz Y ve Çelik N (2011). Erkek ve dişi cinsiyet hormonları, bölüm 1, içinde “Yardımcı Üreme Teknikleri Temel Klinik ve Embriyoloji Uygulamaları”. Editör Ö Çelik, Adana Nobel Kitabevi.

Ünal B, Canan S, Aslan H, Şahin B, Çataloluk O, Kaplan S (2002). Doku örneklerindeki objelerin sayılarının hesaplanmasında tarafsız stereolojik metodlar: Fiziksel disektör. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 22, 1, 15-24.

Üstün C, Kökçü A, Çokşenim Ş, Kandemir B (1993). Sıçanlarda, prostoglandin sentez inhibitörü Diklofenak Sodyum'un ovarian follikulogenezis üzerine etkisi. *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst*, 3, 1, 70-2.

Van Disseldorp J, Lambalk CB, Kwee J, Looman CWN, Eijkemans MJC, Fauser BC, and Broekmans FJ (2010). Comparison of inter- and intra-cycle variability of anti-mullerian hormone and antral follicle counts. *Hum Reprod*, 25, 1, 221–227.

Van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH, Themmen AP. (2002). Serum anti-mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod*, 12, 3065-71.

Van Overmeire B, Chemtob S (2005). The pharmacologic closure of the patent ductus arteriosus, Semin. *Fetal Neonatal med*, 10, 2, 177-184.

Vane JR (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*, 231, 25, 232–235.

Vermillion ST, Newman RB (1999). Recent indomethacin tocolysis is not associated with neonatal complications in preterm infants. *Am J Obstet Gynecol*, 181, 5-1, 1083-1086.

Visser JA, de Jong FH, Laven JS, Themmen AP. (2006). Anti-mullerian hormone: A new marker for ovarian function. *Reproduction*, 131, 1, 1-9.

Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BC, Themmen AP (2004). Anti-mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod*, 10, 2, 77-83.

West MJ (1993). New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol Aging*, 14, 4, 275-85.

Willke Topcu A, Söyletir G, Doğanay M (2017). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Sistemlere Göre İnfeksiyonlar. 4.Baskı, Nobel Tıp Kitabevi.

Yadav S ve Agarwal M (2011). Effect of *Nigella sativa* on the estrous cycle and ovarian activity in albino rats. *Pharmacologyonline*, 3, 997-1006.

Yokota H, Eguchi S, Hasegawa S, Okada K, Yamamoto F, Sunagawa A, Tanaka M, Yamamoto R, Nakano E (2016). assessment of in vitro antioviulatory activities of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and comparison with in vivo reproductive toxicities of medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Toxicol*, 31, 12, 1710-1719.

Zaoui A1, Cherrah Y, Lacaille-Dubois MA, Settaf A, Amarouch H, Hassar M (2000). Diuretic and hypotensive effects of *Nigella sativa* in the spontaneously hypertensive rat. *Therapie*, 55(3), 379-382.

Zhang S, Lin H, Kong S, Wang S, Wang H, Wang H, Armant R (2013). Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Mol Aspects Med*, 34 939–980.

Zarek SM, Mitchell EM, Sjaarda LA, Mumford SL, Silver RM, Stanford JB, Galai N, White MV, Schliep KC, DeCherney AH, Schisterman EF (2015). Is anti-mullerian hormone associated with fecundability? Findings from the EAGeR trial. *J Clin Endocrinol Metab*, 100, 11, 4215-21.

ÖZGEÇMİŞ

Ayfer KÖRKOCA 1968 yılında Elazığ'da doğdu. Orta öğrenimini Elazığ'da ve lise öğrenimini Adıyaman'da tamamladı. 1992 yılında girdiği Van Yüzüncü Yıl Üniversitesinde Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 1996'da mezun oldu. Aynı üniversitede 1999 yılında Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisansını tamamladı. 2011 Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Doktora eğitimine başladı ve 2018'de mezun oldu. Evli üç çocuk annesidir.

EKLER

EK 1. Tez orijinallik raporu

YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU	
Tarih:04/01/2018	
Tez Başlığı / Konusu: Gebelikte Uygulanan Diklofenak Sodyum ve Timokinonu Postnatal 4 ve 10 Haftalık Siçan Ovaryum Preantral Follikül Sayısına Etkilerinin Stereolojik Yöntemle Araştırılması Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam ...73..... sayfalık kısmına ilişkin. ...04.../...01.../.....2018.. tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitinintihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % ...10..... (...on.....) dır. Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir: - Kabul ve onay sayfası hariç. - Teşekkür hariç. - İçindekiler hariç. - Simge ve kısaltmalar hariç. - Gereç ve yöntemler hariç. - Kaynakça hariç. - Alıntılar hariç. - Tezden çıkan yayınlar hariç. - 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words) Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim. Gereğini bilgilerinize arz ederim. Ayfer KÖRKOCA 04.01.2018 Tarih ve İmza	
Adı Soyadı: Ayfer KÖRKOCA..... Öğrenci No: 1193270008..... Anabilim Dalı: Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji..... Programı: Tıp..... Statüsü: Y.Lisans ☐ Doktora ☒ X	
DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR  Prof. Dr. Murat Çetin RAGBETLİ (Unvan. Ad Soyad. İmza)	ENSTİTÜ ONAYI UYGUNDUR  (Unvan. Ad Soyad. İmza)

EK 2. Etik Kurul Kesin Sonuç Onay Belgesi



T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
ARAŞTIRMA KESİN SONUÇ ONAY BELGESİ

YUZUNCUYILUNIVERSITY (TURKEY)
ANIMAL RESEARCHES LOCAL ETHIC COMMITTEE
RESEARCH FINAL REPORT APPROVAL CERTIFICATE

Araştırmanın Adı <i>Title of the Research</i>	Gebelikte Uygulanan Diklofenak Sodyum Ve Timokinonun Postnatal 4 Ve 10 Haftalık Sıçan Ovaryum Preantral Folikül Sayısına Etkilerinin Stereolojik Yöntemle Araştırılması A To Investigate The Effects Of Diclofenac Sodium And Thymoquinone Postnatal 4 And 10 Weeks On Precentral Follicle Number In Rat Ovary By Stereological Method	
Araştırmacı(lar) <i>Investigator(s)</i>	Yürütücü / <i>Chief investigator</i> : Prof. Dr. Murat Çetin RAĞBETLİ Yardımcı Araştırmacı(lar) / <i>Co-investigator(s)</i> : Ayfer KÖRKÖCA	
Araştırmanın Başlama Tarihi / <i>Research Starting Date</i> : 02.06.2016		
Araştırmanın Bitiş Tarihi / <i>Research Completion Date</i> : 18.12.2017		
Proje Süresi / <i>Total Time of Project</i> : 18 Ay		
Proje No / <i>Project Number</i> : TDK-2016-5304		
Araştırmayı Destekleyen Kuruluş (varsa) / <i>Funding institution(s) (if available)</i> :		
Destek Şekli ve Miktarı / <i>Type and amount of funding</i> :		
Karar: Yukarıda bilgileri verilen araştırma projesinin kesin sonuç raporu Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 25/01/2018 tarih ve 2018/01 sayılı kararı ile kabul edilmiştir. Decision: Final report of the research project detailed above was approved by Yuzuncu Yil University Animal Researches Local Ethic Committee in the session held on 25/01/2018 (decision number 2018/01).		
	BAŞKAN V. Doç. Dr. Yıldırım BAŞBUĞAN	
ÜYE	ÜYE Prof. Dr. Sıddık KESKİN	ÜYE
Prof. Dr. N. Tuğba BİNGÖL ÜYE	ÜYE Doç. Dr. Atila DÜRMÜŞ	Prof. Dr. Suphi DENİZ ÜYE
Prof. Dr. Nalan ÖZDAL ÜYE	ÜYE Yrd. Doç. Dr. Oruç ALLAHVERDİYEV	Yrd. Doç. Dr. Ferda KARAKUŞ ÜYE
Yrd. Doç. Dr. Hacer ŞAHİN AYDINYURT ÜYE	ÜYE Vet. Hek. İsmail Hakkı BEHÇET	Yrd. Doç. Dr. Canser Yılmaz DEMİR ÜYE
Yrd. Doç. Dr. Ertuğrul KANKAYA		Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU