

T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

NONYLPHENOL İLE OLUŞTURULAN OVARYUM
HASARI ÜZERİNE KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI
MEZENŞİMAL KÖK HÜCRE VE FOLİK ASİTİN ETKİSİ

Hazırlayan
Ayşe CEYHAN

Danışman
Prof. Dr. Arzu YAY

Doktora Tezi

OCAK 2024
KAYSERİ

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

NONYLPHENOL İLE OLUŞTURULAN OVARYUM
HASARI ÜZERİNE KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI
MEZENŞİMAL KÖK HÜCRE VE FOLİK ASİTİN ETKİSİ

Doktora Tezi

Hazırlayan
Ayşe CEYHAN

Danışman
Prof. Dr. Arzu YAY

Bu Tez Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TDK-2020-10246 kodlu proje ile desteklenmiştir.

OCAK 2024
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı- Soyadı: Ayşe CEYHAN

İmza :

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“ Nonylphenol İle Oluşturulan Ovaryum Hasarı Üzerine Kemik İliği Kaynaklı Mezenşimal Kök Hücre ve Folik Asitin Etkisi” adlı **Doktora Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi ’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Ayşe CEYHAN

Danışman
Prof. Dr. Arzu YAY

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Arzu YAY

KABUL VE ONAY

Prof. Dr. Arzu YAY danışmanlığında **Ayşe CEYHAN** tarafından hazırlanan “**Nonylphenol İle Oluşturulan Ovaryum Hasarı Üzerine Kemik İliği Kaynaklı Mezenşimal Kök Hücre ve Folik Asitin Etkisi**” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü **Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

...../...../

JÜRİ

İmza

Danışman : Prof. Dr. Arzu YAY

.....

Üye : Prof. Dr. Erdoğan UNUR

.....

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Gözde Özge ÖNDER

.....

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Halime TOZAK YILDIZ

.....

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Kübra Tuğçe KALKAN

.....

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince desteğini esirgemeyen, bilgisi ve deneyimi ile her zaman yanımda olan, bilimsel açıdan gelişimim için her daim önümü açan, tezimin hazırlanmasında bilimsel tecrübeleri ve bakış açısıyla bana yol gösteren, öğrencisi olmaktan mutluluk duyduğum Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız ve tez danışman hocam Prof. Dr. Arzu YAY'a, bu süreçte bana destek olan Histoloji Embriyoloji Anabilim dalındaki değerli hocalarım ve arkadaşlarıma,

TDK-2020-10246 proje koduyla tez projemi destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine,

Tüm eğitim hayatım boyunca desteğini esirgemeyen, varlığı güç veren, her zaman yanımda olan babam Sadık CEYHAN'a, her anımda yanımda olan bugünlere gelmemde emeği büyük, hayattaki en büyük şansım annem Merzuka CEYHAN'a, beni yüreklendiren, yaşama sevincimi canlı tutan, desteklerini her zaman hissettiğim canım kardeşlerime,

Sonsuz Teşekkürlerimi Sunuyorum.

Ayşe CEYHAN

Kayseri, Ocak 2024

NONYLPHENOL İLE OLUŞTURULAN OVARYUM HASARI ÜZERİNE KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI MEZENŞİMAL KÖK HÜCRE VE FOLİK ASİTİN ETKİSİ

Ayşe CEYHAN

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi, Ocak 2024
Danışman: Prof. Dr. Arzu YAY**

ÖZET

Nonylphenol (NP) güçlü östrojenik aktiviteye sahip, günlük hayatta pek çok alanda sıklıkla kullanılan toksik etkileri olan kimyasal bir maddedir. Ovaryum dokusunda folikülogenez sürecini değiştirerek infertiliteye neden olduğu bilinmektedir. İnfertilite tedavisinde kullanımı her geçen gün artan kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücre (Kİ-MKH)'ler ve doku onarımında bir diğer önemli faktör olan folik asit (Fa)'ın ovaryum hasarında 7 ve 14 günlük tedavi ve takip planının uygulanarak etkilerin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada, 130 adet Wistar albino türü dişi sıçan kullanıldı ve 13 gruba ayrıldı (n=10). 7 gün tedavi uygulanan ve takip edilen gruplar NP7, Fa7, Kh7, NP+Fa7, NP+Kh7, NP+Kh+Fa7 grupları olarak belirlendi. 14 gün tedavi uygulanan ve takip edilen gruplar NP14, Fa14, Kh14, NP+Fa14, NP+Kh14, NP+Fa+Kh14 gruplarıydı. NP uygulanan gruplardaki (NP7, NP+Fa7, NP+Kh7, NP+Kh+Fa7, NP14, NP+Fa14, NP+Kh14, NP+Kh+Fa14) sıçanlara 7 gün boyunca gavaj yoluyla 100 µl mısır yağında çözdürülerek 50 µl dozda NP uygulandı ve ovaryum hasarı oluşturuldu. 7 günün sonunda Kh uygulanacak gruplara (Kh7, NP+Kh7, NP+Kh+Fa7, Kh14, NP+Kh14, NP+Kh+Fa14) tek sefer $2,5 \times 10^6$ Kİ-MKH'ler kaudal ven yoluyla intravenöz (i.v) enjeksiyonla verildi. Aynı gün Fa uygulanacak gruplara (Fa7, NP+Fa7, NP+Kh+Fa7, Fa14, NP+Fa14, NP+Kh+Fa14) gavaj yolu ile 20 mg/kg/gün olacak şekilde Fa uygulamasına başlandı. 7 gün boyunca Fa uygulandı ve sonrasında 7 günlük tüm gruplar sakrifiye edildi. 14 gün Fa uygulanacak gruplara ise Fa uygulamasına devam edildi ve 14 güne tamamlandı. Sonrasında tüm 14 günlük gruplar sakrifiye edildi. Ovaryum dokuları ve kan örnekleri alındı. Ovaryum dokularından elde edilen kesitler Hematoksilen&Eozin ve Masson Trikrom boyama yöntemleri ile boyandı ve ovaryum rezervini belirlemek için folikül sayımı yapıldı. Ovaryum dokularında Anti-Müllerian Hormon (AMH), TNFα (Tümör Nekrosis Faktör Alfa), IL6 (İnterlökin 6) ve TGFβ1 (Transforming Growth Factor Beta 1) ekspresyonları belirlendi. TUNEL yöntemi ile apoptotik hücreler sayıldı. Malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) düzeylerini belirlemek için ELISA yöntemi uygulandı. Ayrıca antioksidan parametrelerden Total Antioksidan Kapasite (TAS) ve oksidan parametrelerden Total Oksidan Kapasite (TOS) düzeyleri analiz edildi.

NP'ün ovaryumda oluşturduğu hasar sonrası uygulanan Kİ-MKH'lerin 7. ve 14. günde ovaryumda varlıkları gösterildi. Histopatolojik bulgular Fa ve Kh'nin birlikte uygulandığı tedavi gruplarında fibrozisin azaldığı ve ovaryum histopatolojik bulgularının düzeldiği gözlemlendi. Folikül sayım sonuçları, NP+Fa+Kh7 ve NP+Fa+Kh14

gruplarının tek uygulama yapılan gruplara oranla primordiyal ve gelişmekte olan diğer foliküllerin sayısının kontrol grubuna daha yakın değerde olduğunu gösterdi. Foliküllerdeki AMH immünreaktivite yoğunluğu NP+Fa+Kh14 grubunda kontrole benzer değerde ölçüldü. TNF α , IL6 ve TGF β 1 immünreaktivite yoğunluğu sonuçları Fa ve Kİ-MKH'nin ve ikisinin birlikte uygulandığı grupların tedavi edici etki gösterebileceği yönündeydi. Apoptotik hücre sayımı sonuçları özellikle Kİ-MKH uygulanan tedavi gruplarının apoptotik hücre sayısını azaltmada daha etkili olduğunu gösterdi. Tedavi gruplarından MDA, SOD, CAT, TAS ve TOS ölçüm sonuçları Kh ve Fa'nin birlikte uygulandığı gruplar kontrol grubuna yakın değerler gösterdiği gözlemlendi. Fa ve Kİ-MKH'nin tedavi amaçlı birlikte kullanımının ovaryum histopatolojisi üzerine olumlu etkileri olduğunu ve Fa'nin Kİ-MKH'lerin terapötik etkilerini güçlendirdiği birlikte kullanımlarının biyokimyasal olarak ovaryum fonksiyonlarını düzenleyebileceği ve iyileştirebileceği bir klinik yaklaşım getirebilir.

Anahtar kelimeler: Folik Asit; Kİ-MKH; Nonylphenol; Ovaryum; Sıçan.

EFFECT OF BONE MARROW-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELL AND FOLIC ACID ON OVARIUM DAMAGE INDUCED BY NONYLPHENOL

Ayşe CEYHAN

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Histology and Embryology

PhD Thesis, January 2024

Supervisor: Prof. Dr. Arzu YAY

ABSTRACT

Nonylphenol (NP) is a chemical substance with strong estrogenic activity and toxic effects frequently used in many areas of daily life. It is known that it causes infertility by changing the folliculogenesis process in the ovarian tissue. It was aimed to compare the effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs), which are increasingly used in the treatment of infertility, and folic acid (Fa), another important factor in tissue repair, on ovarian damage by applying a 7 and 14- day treatment and follow-up plan.

In the study, 130 female Wistar albino rats were used and randomly divided into 13 groups (n = 10). The groups that were treated and followed for 7 days were determined as NP7, Fa7, Kh7, NP+Fa7, NP+Kh7, and NP+Kh+Fa7 groups. The groups that were treated and followed for 14 days were NP14, Fa14, Kh14, NP+Fa14, NP+Kh14, NP+Fa+Kh14 groups. Rats in the NP-administered groups (NP7, NP+Fa7, NP+Kh7, NP+Kh+Fa7, NP14, NP+Fa14, NP+Kh14, NP+Kh+Fa14) were given a dose of 50 µl by dissolving it in 100 µl corn oil via gavage for seven days. NP was applied, and ovarian damage was caused. At the end of 7 days, $2,5 \times 10^6$ BM-MSCs were given as a single intravenous (i.v) injection via the caudal vein to the groups to be administered Kh (Kh7, NP+Kh7, NP+Kh+Fa7, Kh14, NP+Kh14, NP+Kh+Fa14). On the same day, Fa administration was started via gavage at a dose of 20 mg/kg/day to the groups to be administered Fa (Fa7, NP+Fa7, NP+Kh+Fa7, Fa14, NP+Fa14, NP+Kh+Fa14). Fa was applied for 7 days and then all groups were sacrificed within 7 days. For the groups that were to receive the Fa for 14 days, the Fa application continued and was completed in 14 days. Afterward, all 14-day-old groups were sacrificed. Ovarian tissues and blood samples were taken. Sections obtained from ovarian tissues were stained with Hematoxylin & Eosin, Masson Trichrome and follicle counting was performed to determine ovarian reserve. Anti Müllerian Hormone (AMH), TNF α (Tumor Necrosis Factor Alpha), IL6 (Interleukin 6), TGF β 1 (Transforming Growth Factor Beta 1) expression was determined in ovarian tissues. Apoptotic cells were counted using the TUNEL method. ELISA method was applied to determine malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) levels. Additionally, Total Antioxidant Capacity (TAS), one of the antioxidant parameters, and Total Oxidant Capacity (TOS), one of the oxidant parameters, were analyzed.

It was shown that BM-MSCs applied after the damage caused by NP in the ovary were present in the ovary on the 7th and 14th days. Histopathological findings: It was observed that fibrosis decreased and ovarian histopathological findings improved in the

treatment groups where Fa and Kh were applied together. Follicle count results showed that the number of primordial and other developing follicles in the NP+Fa+Kh7 and NP+Fa+Kh14 groups were closer to the control group than the single-application groups. AMH immunoreactivity density in the follicles was measured in the NP+Fa+Kh14 group at a value similar to the control. TNF α , IL6 and TGF β 1 immunoreactivity intensity results showed that Fa and BM-MSCs and the groups administered together may have a therapeutic effect. Apoptotic cell count results showed that the treatment groups, especially BM-MSCs, were more effective in reducing the number of apoptotic cells. It was observed that the MDA, SOD, CAT, TAS and TOS measurement results of the treatment groups, in which Kh and Fa were applied together, showed values close to the control group.

It may be suggested that the combined use of Fa and BM-MSCs for therapeutic purposes has a positive effects on ovarian histopathology and that Fa strengthens the therapeutic effects of BM-MSCs and can bring a clinical approach in which they are combined use can biochemically regulate and improve ovarian functions.

Keywords: BM-MSCs; Folic acid; Nonylphenol; Ovary; Rat.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
KABUL VE ONAY	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER	xii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiv
TABLO LİSTESİ.....	xivi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Ovaryum Embriyolojisi.....	4
2.1.1. Ovaryumların Farklılaşması ve Oogenez.....	5
2.2. Ovaryumun Anatomik Yapısı	7
2.3. Ovaryum Histolojisi	8
2.3.1. Foliküler Gelişim (Folikülogenez)	9
2.3.1.1. Primordiyal Foliküller	9
2.3.1.1.1. Primordiyal Foliküllerin Seçilimi	9
2.3.1.2. Primer Folliküller.....	11
2.3.1.3. Preantral Foliküller	11
2.3.1.4. Sekonder Foliküller	12
2.3.1.5. Tersiyer Foliküller	13
2.3.1.6. Atretik Foliküller	14
	ix

2.5. Nonylphenol	15
2.5.1. NP'ün Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	17
2.5.2. NP'ün Çevreye Yayılması ve Biyoakümülyasyonu	17
2.5.3. NP'ün Etkileri	18
2.6. Kök Hücre	19
2.6.1. Mezenşimal Kök Hücre	21
2.6.1.1. Kemik İliğı Kaynaklı Mezenşimal Kök Hücre	23
2.7. Folik Asit	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Kemik İliğı Kaynaklı Mezenşimal Kök Hücreler	26
3.1.1. Rat Kemik İliğı Mezenşimal Kök Hücre Kültürü ve Karakterizasyonu	26
3.1.2. Hücrelerin PKH26 ile işaretlenmesi	27
3.2. Deney Hayvanları	27
3.2.1. Uygulama Yöntemi ve Kullanılan Maddeler	28
3.3. Histopatolojik Analizler	33
3.4. İmmunohistokimyasal Analizler	36
3.5. TUNEL immunofluoresan boyama yöntemi	37
3.6. Biyokimyasal analizler	38
3.6.1. Malondialdehit Düzey Tayini	38
3.6.2. Katalaz Aktivite Tayini	38
3.6.3. Süperoksitdismütaz Aktivite Tayini	39
3.6.4. Total Antioksidan Kapasite Ölçümü	39
3.6.5. Total Oksidan Kapasite Ölçümü	39
3.7. İstatistiksel Analiz	40

4. BULGULAR.....	41
4.1. Kİ-MKH Karakterizasyonu ve Genel Görünümü	41
4.2. PKH26 ile İşaretli Kİ-MKH'lerin Ovaryumda Yerleşimi.....	42
4.3. Morfolojik Bulgular	44
4.3.1. H&E Boyama Yöntemine Ait Bulgular	44
4.3.2. MT Boyama Yöntemine Ait Bulgular	55
4.4. İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemine Ait Bulgular	58
4.4.1. AMH.....	58
4.4.2. TNF α , IL6, TGF β 1	63
4.5. TUNEL Bulguları.....	73
4.6. Biyokimyasal Bulgular.....	79
4.6.1. MDA, SOD VE CAT bulgular	79
4.6.2. TAS ve TOS bulgular	80
5. TARTIŞMA	85
6. KAYNAKLAR	94
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR ve SİMGELER

AMH	: Anti Müllerian Hormon
CAT	: Katalaz
Fa	: Folik Asit
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
H&E	: Hematoksilen Eozin
HKH	: Hematopoetik Kök Hücre
IL6	: İnterlökin 6
i.v	: İntravenöz
Kİ-MKH	: Kemik İliği Kaynaklı Mezenşimal Kök Hücre
Kh	: Kök Hücre
LH	: Luteinleştirici Hormon
MDA	: Malondialdehit
MKH	: Mezenşimal Kök Hücre
MT	: Masson Trikrom
NP	: Nonylphenol
NPE	: Nonylphenol Polietoksilat
OMI	: İnhibe Eden Madde
PGH	: Primordiyal Germ Hücreleri
SOD	: Süper Oksit Dismutaz
TAS	: Total Antioksidan Kapasite
TGFβ1	: Transforming Growth Factor Beta1
TNFα	: Tümör Nekrosis Faktör Alfa
TOS	: Total Oksidan Kapasite

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1.	Deney Grupları	28
Tablo 3.2.	Doku takip protokolü	34
Tablo 3.3.	Hematoksilen&Eozin Boyama Yöntemi	35
Tablo 3.4.	Masson Trikrom Boyama Yöntemi	36
Tablo 4.1.	7 günlük deney gruplarına ait toplam folikül sayılarının istatistiksel analizi.....	49
Tablo 4.2.	14 günlük deney gruplarına ait toplam folikül sayılarının istatistiksel analizi.....	52
Tablo 4.3.	7 ve 14 günlük deney gruplarına ait primordiyal, primer, preantral, sekonder foliküllerde AMH immunreaktivite yoğunluğunun istatistiksel analizi.....	61
Tablo 4.4.	Deney gruplarına ait TNF α , IL6, TGF β 1immunreaktivite yoğunluğu istatistiksel analizi.....	71
Tablo 4.5.	7 ve 14 günlük deney gruplarına ait TUNEL istatistiksel analizi.....	78
Tablo 4.6.	7 ve 14 günlük deney gruplarına ait MDA, SOD ve CAT değerlerinin istatistiksel analizi.....	81
Tablo 4.7.	7 ve 14 günlük deney gruplarına ait TAS ve TOS değerlerinin istatistiksel analizi.....	83

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1.	Primordiyal germ hücrelerinin genital kabartıya göçü.	5
Şekil 2.2.	Ovaryumun Anatomisi.....	8
Şekil 2.3.	Ovaryum Folikülleri.	10
Şekil 2.4.	Primordiyal ve Primer Foliküller.....	11
Şekil 2.5.	Preantral Folikül	12
Şekil 2.6.	Sekonder Folikül.....	13
Şekil 2.7.	Tersiyer Folikül.....	14
Şekil 2.8.	Nonylphenol'ün Kimyasal Yapısı	17
Şekil 2.9.	FolikAsit Kimyasal Yapısı.....	24
Şekil 3.1.	Kafeslerde Barındırılan Sıçanlar.....	27
Şekil 3.2.	Nonylphenol'ün gavaj ile uygulanması	31
Şekil 3.3.	Kİ-MKH'lerin kaudal ven yoluyla intravenöz injeksiyon uygulanması	31
Şekil 3.4.	FolikAsit'in gavaj ile uygulanması.....	32
Şekil 4.1.	Kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücrelerin akım sitometri analizi.....	41
Şekil 4.2.	PKH26 ile boyalı hücrelerin görüntüsü.	42
Şekil 4.3.	PKH26 ile işaretli Kİ-MKH'lerin ovaryumda görüntüleri	43
Şekil 4.4.	7 günlük deney gruplarına ait H&E boyama yöntemi uygulanan ovaryum kesitleri	48
Şekil 4.5.	14 günlük deney gruplarına ait H&E boyama yöntemi uygulanan ovaryum kesitleri	51
Şekil 4.6.	7 ve 14 günlük deney gruplarında Primordiyal, Primer ve Preantral folikül sayılarının ikili karşılaştırılması.....	53

Şekil 4.7.	7 ve 14 günlük deney gruplarında Sekonder, Tersiyer ve Atretik folikül sayılarının ikili karşılaştırılması.....	54
Şekil 4.8.	7 günlük deney gruplarına ait MT boyama yöntemi ile boyalı ovaryum kesitleri	56
Şekil 4.9.	14 günlük deney gruplarına ait MT boyama yöntemi ile boyalı ovaryum kesitleri	57
Şekil 4.10.	7 günlük deney gruplarında AMH ekspresyonu.....	59
Şekil 4.11.	14 günlük deney gruplarında AMH ekspresyonu.....	60
Şekil 4.12.	7 ve 14 günlük deney gruplarında foliküllerde AMH ekspresyonunun ikili karşılaştırılması.....	62
Şekil 4.13.	7 günlük deney gruplarına ait TNF α ekspresyonu: TNF α immunreaktivitesi olan alanlar kahverengi reaksiyon göstermektedir.	65
Şekil 4.14.	14 günlük deney gruplarına ait TNF α ekspresyonu: TNF α immunreaktivitesi olan alanlar kahverengi reaksiyon göstermektedir.	66
Şekil 4.15.	7 günlük deney gruplarında IL-6 ekspresyonu: IL-6 immunreaktivitesi olan alanlar kahverengi reaksiyon göstermektedir.	67
Şekil 4.16.	14 günlük deney gruplarında IL-6 ekspresyonu: IL-6 immunreaktivitesi olan alanlar kahverengi reaksiyon göstermektedir.	68
Şekil 4.17.	7 günlük deney gruplarına ait TGF β 1 ekspresyonu: TGF β 1immunreaktivitesi olan alanlar kahverengi reaksiyon göstermektedir.	69
Şekil 4.18.	14 günlük deney gruplarına ait TGF β 1 ekspresyonu: TGF β 1immunreaktivitesi olan alanlar kahverengi reaksiyon göstermektedir.	70
Şekil 4.19.	7 ve 14 günlük tüm deney gruplarının TNF α , IL6 ve TGF β 1 ekspresyonlarının ikili karşılaştırılması	72
Şekil 4.20.	7 günlük deney gruplarına ait apoptotik hücreler.	75

Şekil 4.21.	14 günlük deney gruplarına ait apoptotik hücreler.	77
Şekil 4.22.	7 ve 14 günlük grupların TUNEL immunofluoresan boyama yöntem sonuçlarının ikili karşılaştırılması.....	79
Şekil 4.23.	7 ve 14 günlük gruplarda MDA, SOD ve CAT değerlerinin ikili karşılaştırılması.	82
Şekil 4.24.	7 ve 14 günlük gruplarda TAS ve TOS kapasitesi sonuçlarının ikili karşılaştırılması.....	84



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Teknoloji ve sanayileşmenin gelişmesi ile birlikte kimyasal maddelerin kullanımı hızla artmakta ve bu artış canlılığı olumsuz yönde etkilemektedir. Sanayi devriminden bugüne kadarki süreç düşünüldüğünde suda çözülmeyen birçok kimyasalın işlevini tamamladıktan sonra kanalizasyon yoluyla su ortamlarına salınması sonucu bu maddelerin çökeltilerde ve suda yaşayan canlıların vücudunda birikmesi (biyoakümülyasyonu) kaçınılmazdır. Diğer taraftan evsel ürünlerde, gıda ve içecek ambalajlarında kullanılan kimyasalların hayvan ve insan vücuduna geçmesi sağlığı tehdit eden başka bir unsurdur. Nonylphenol (NP) birçok ortamda doğrudan veya dolaylı olarak kullanılan ve en sık rastlanan kimyasal maddelerden biridir. Günlük hayatta temas halinde olduğumuz plastik eşyalar, deterjanlar, leke çıkarıcılar, boyalar, kaplama ürünleri, zirai ilaçlar ve kozmetik ürünlerde bulunmaktadır. Ayrıca endüstriyel temizleme ürünlerinde, polimerizasyon işlemlerinde, tekstil ürünlerinde, kâğıt ve köpük üretiminde, elektronik aygıtlarda, cilalama ve vernikleme işleri gibi birçok farklı alanda kullanılan ve toksik etkileri olan hidrofobik bir bileşiktir. Yaygın kullanımı nedeniyle yüzey ve yeraltı sularında, kanalizasyon çamuru eklenen topraklarda, atmosferde ve besinlerde NP varlığına yaygın olarak rastlanmaktadır (EU, 2002; Herero-Martinez ve ark., 2001; Uğuz ve ark., 2009). Genellikle tarımsal, endüstriyel ve kentsel akıntılarla NP çevreye yayılmakta ve canlılar tarafından temas, beslenme ve solunum yollarıyla vücuda geçebilmekte ve birikime neden olmaktadır. NP toksisitesi ve kontaminasyonu insan sağlığı için büyük tehlike oluşturmaktadır (Duan ve ark., 2017). Özellikle üretim ve endüstriyel alanında NP'e maruz kalan çalışan insan sayısı oldukça fazladır (EU, 2002). NP'ün etkilediği sistemler ve organlar arasında; gözler, karaciğer, beyin, cilt, tiroid, böbrek, pankreas, solunum sistemi, mesane, gastrointestinal sistem, kadın ve erkek üreme sistemleri bulunmaktadır (Aly ve ark., 2012; Ye ark., 2012). NP ve 17 β -Östradiol kimyasal yapıları açısından oldukça benzerdir, bu nedenle NP östrojen

hormonunu taklit ederek meme ve testis kanserinde artışa, erkeklerde sperm kalitesinde azalmaya, yardımcı üreme yöntemleri gerektiren doğumların artmasına (Carlsen ve ark., 1992; Safe ve ark., 1995; Toppari ve ark., 1996) ve üreme sağlığının bozulmasına neden olmaktadır (McLachlan ve ark., 2006). Ayrıca germ hücresinin apoptozuna, testis boyutunun azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (Lagos ve ark., 2012). Ovaryum dokusunda ise folikülogenez sürecini değiştirerek infertiliteye neden olduğu bilinmektedir (Hunt ve ark., 2008). NP gibi üreme sağlığını olumsuz etkileyen maddelere maruziyetin belirlenmesi, çevre canlılarında biyoakümüülasyonunun gözlenmesi, deney hayvanlarında çeşitli dozlarda deneylerin yapılması ve tedavi yöntemlerinin araştırılması önem taşımaktadır.

Folik asit, suda eriyen B grubu vitaminlerden birisidir ve biyolojik öneme sahip bir molekül olarak öne çıkmaktadır. Özellikle normal DNA ve protein sentezinde gerekli olduğu bilinmektedir. Doku onarımı ve yenilenmesinde bir diğer önemli faktör olan folik asit, hem yapı taşı moleküllerin sentezindeki rolü hem de differansiyasyon üzerine etkileri nedeniyle araştırılmakta olan bir moleküldür (Jacob ve ark., 2000).

Mezenşimal kök hücre (MKH)'lerin etkilerini farklılaşma özellikleri aracılığıyla veya dokulara ait fonksiyonları geri getiren ve bağışıklık hücrelerini düzenleyen moleküllerin salınımı aracılığıyla uygulamaktadır. In vivo uygulamalar sonrası MKH'lerin periferik toleransı indüklediği ve hasarlı hücrelere göç ettiği ve hasarlı alanda pro-enflamatuvar sitokinlerin salınmasını önlediği ve hasar görmüş hücrelerin hayatta kalmasını teşvik ettiği gösterilmiştir. MKH doku yenilenme ve iyileşme süreçlerinde hücrelere destek olur. Ayrıca differansiyasyon sürecine salgıladığı faktörler ile katkı sağlar. Yapılan çalışmada folik asitin ko kültür modelinde MKH tarafından salınan faktörlerin etkisini potansiyalize ettiği gösterildi (Pakdemirli ve ark., 2019). Kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücre (Kİ-MKH)'ler ise çok yönlü farklılaşma kapasitesine sahip olmalarına ek olarak, sitokinlerin ve beslenme faktörlerinin sentezlenmesi ve salgılanması yoluyla; doku hücre çoğalmasını, apoptozu ve immünomodülasyonu düzenlediği bilinmektedir (Matsuda ve ark., 2018; Pakdemirli ve ark., 2019; Zhou ve ark., 2017). Yapılan çalışmalar, Kİ-MKH'lerin dişi farelerde yumurtalık fonksiyonunu eski haline getirebildiğini ortaya koymaktadır (Ghadami ve ark., 2012; Lee ve ark., 2007; Selesniemi ve ark., 2009).

NP'ün oluşturduğu over hasarını tedavi etmek amacıyla Kİ-MKH ve folik asit uygulaması ve her ikisinin birlikte uygulandığu bir çalışma ise bulunmamaktadır. Çalışmamızda NP'ün ovaryum üzerinde oluşturduğu toksisiteyi tedavi etmek amacıyla Kİ-MKH'lerin intravenöz yolla verilmesi sonrası 7. ve 14. günde ovaryumda varlıkları ve dağılımı değerlendirildi. Ayrıca ovaryum hasarı sonrası tek başına Kİ-MKH ve tek başına folik asit uygulamalarının etkileri, aynı zamanda Kİ-MKH ve folik asitin birlikte uygulandığında olası tedavi edici etkilerinin histopatolojik, biyokimyasal ve immünohistokimyasal çalışmalar yapılarak sonuçların karşılaştırılması amaçlanmaktadır.



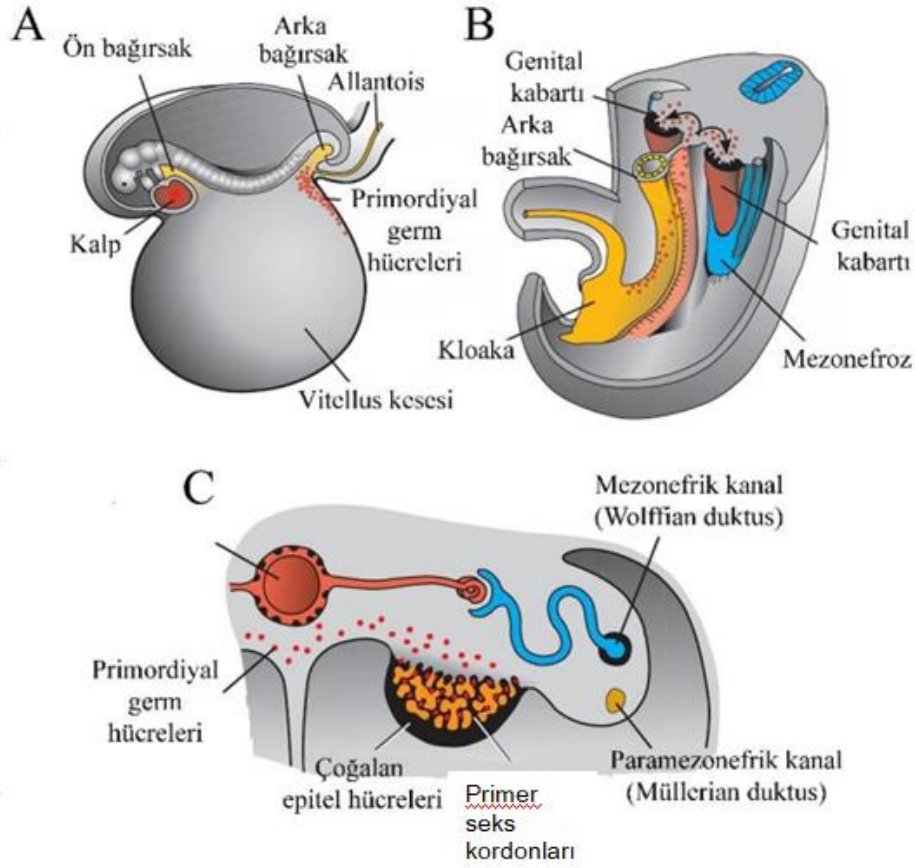
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryum Embriyolojisi

Embriyonun cinsiyeti fertilizasyon sırasında belirlenmiş olsada, testisler ve ovaryumlara ait morfolojik özellikler embriyonik dönemin yedinci haftasına kadar ayırt edilemez. Gonadlar bir çift uzunlamasına genital veya gonadal kabartı halinde ortaya çıkarlar. Epitel proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşmuşlardır. Gelişimin altıncı haftasına kadar genital kabartılar içinde germ hücreleri yoktur.

Epiblasttan köken alan primordiyal germ hücreleri (PGH), primitif çizgi boyunca göç eder ve üçüncü haftada vitellus kesesinin allantoise yakın duvarlarındaki endoderm hücrelerinin arasına yerleşirler (Şekil 2.1.A). Dördüncü haftada sonbarsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerleyerek (Şekil 2.1.A-B), beşinci haftanın başında primitif gonadlara ulaşır, altıncı haftada da genital sırtları işgal ederler. Bu hücreler genital kabartılara ulaşmazsa gonadlar gelişemez. PGH, ovaryumlar ve testisler de bulunan yetişkin gametlerin embriyonik öncülleridir ve gonadların over veya testise farklılaşmaları üzerinde indükleyici etkiye sahiptirler (Sadler, 2017).

PGH primitif gonadlara ulaşmalarından hemen önce ve ulaştıkları sırada, genital kabartıdaki epitel hücreleri çoğalarak alttaki mezenşimin içine gömülürler. Bunlar burada primitif seks kordonları olarak adlandırılan düzensiz kordonları oluştururlar (Şekil 2.1.C). Bu dönemde erkek ve dişi gonadların birbirinden ayırt edilmesi mümkün değildir. Embriyoda gonadların gelişiminin başlangıç periyoduna ‘farklılaşmamış dönem’, bu evredeki gonada ‘farklanmamış gonad’ denir (Moore, 2002; Sadler, 2017; Şeftalioğlu, 1998).



Şekil 2.1. Primordiyal germ hücrelerinin genital kabartıya göçü (Sadler, 2017). Şekil ilgili kaynaktan değiştirilerek alınmıştır. (A) PGH'ler allantoise yakın kısımda endoderm hücreleri arasında ortaya çıkarlar. (B) Daha sonra, Primordiyal germ hücrelerinin genital kabartıya doğru göç etmesi. (C) PGH'leri primer seks kordonlarına ait hücrelerle çevrelenmiştir.

2.1.1. Ovaryumların Farklılaşması ve Oogenez

Y kromozomunun yokluğunda gonadlar ovaryuma farklılık kazanır. XX cinsiyet kromozomuna sahip embriyolarda, PGH oogoniumlara farklılık kazanır. Oluşturdukları primitif seks kordonları düzensiz hücre kümelerine ayrılır. PGH'ni içeren bu yapılar daha çok ovaryumun medulla bölgesine yerleşmişlerdir. Daha sonra bu hücre kümeleri yok olur ve yerini vasküler bir stromaya (ovarian medulla) bırakırlar.

Dişi gonadın yüzey epiteli erkeklerde olduğunun aksine çoğalmaya devam eder ve yedinci haftada bu epitelden kortikal kordonlar adı verilen 2. nesil kordonlar oluşur. Gelişimin 3. ayında bu kordonlar izole hücre kümelerine ayrılırlar ve proliferasyona devam ederler. Oogoniumun etrafını foliküler hücreler denilen bir epitel hücre

tabakasıyla sararlar. Oogoniumlar I. mayoz bölünmeye girerek profaz evresinde bekler ve primer oositlere farklılaşırlar. Bir primer oosit ve çevresinde tek katlı yassı epitel hücre tabakası ile çevrili yapı primordiyal folikül adını alır.

Primer oositler I. mayoz bölünmenin profaz safhasında diploten evresinde beklerler ve I. mayoz bölünmeyi tamamlamaz, ergenliğe kadar dinlenme halinde kalırlar. Oositin olgunlaşmasını inhibe eden madde (OMI) denilen küçük bir peptid tarafından baskılanır (Sadler, 2017; Şeftalioğlu,1998). Puberte dönemiyle birlikte, her ovaryum döngüsünde değişen sayıda primordiyal folikül büyümeye başlar. Primer oositin çevresinde bulunan yassı epitel hücreleri önce kübikleşir, tek sıra kübik epitele sahip bu folikül primer folikül (unilaminar primer folikül) olarak isimlendirilir. Daha sonra epitel hücreleri çoğalarak çok katlı bir epitel tabakası oluştururlar. Folikül artık bu haliyle preantral folikül (multilaminar primer folikül) olarak isimlendirilir. Foliküllerin olgunlaşması hipofizden salınan folikül uyarıcı hormon (FSH), epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) ile kalsiyum iyonlarının etkisine bağlıdır. Folikül büyümeye devam ettikçe granüloza hücreleri arasında içi sıvı dolu boşluklar belirir. Bu boşlukların birbirleriyle birleşmesi sonucu antrum oluşur. Bu durumdaki folikül sekonder folikül adını alır (Gürsoy ve Ergin, 2007). Başlangıçta küçük hilal şeklinde olan antrum genişler. Oositin etrefindeki granüloza hücreleri antrumun yanında bozulmadan kalarak kümülüs ooforusu (cumulus oophorus) adı verilen yapıyı şekillendirirler. Her ovaryum döngüsünde çok sayıda folikül gelişmesine rağmen bunlardan ancak bir tanesi tam anlamıyla olgunlaşır ve bu folikül graaf folikülü (tersiyer folikül) olarak adlandırılır (Junqueira ve Carneiro 2006, Moore 2002; Ross ve Pawlina 2014).

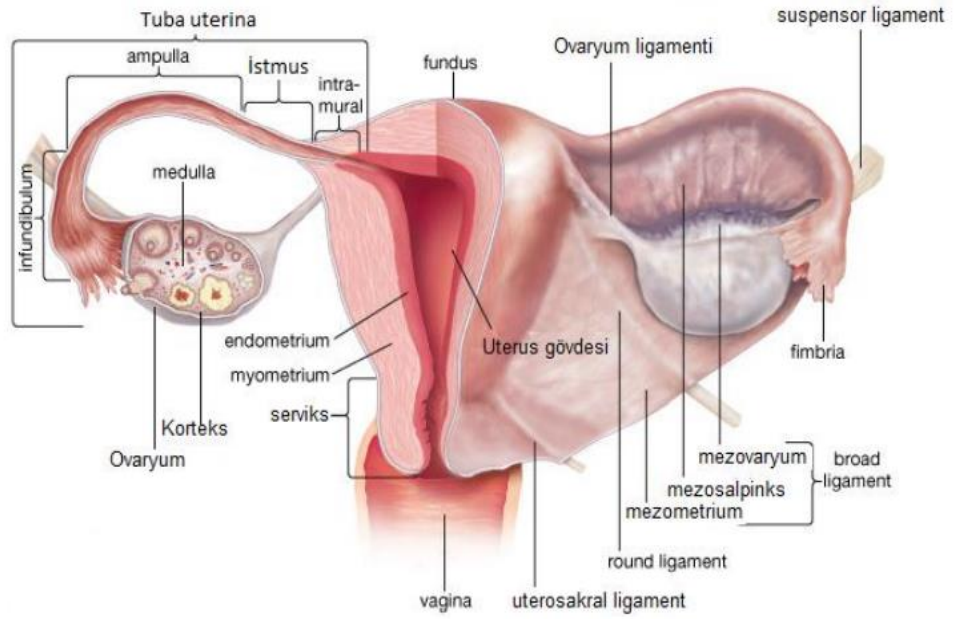
Hipofiz hormonlarının etkisiyle ovaryumda ortalama 28 gün süren ovarial siklus gerçekleşir. Her ovarial siklusa FSH etkisiyle gelişmeye başlayan çok sayıdaki foliküllerin bir tanesi tam anlamıyla olgun foliküle dönüşebilir. Folikül olgunlaşması tamamlanırken primer oosit I. mayoz bölünmesini tamamlar, büyüklükleri birbirinden farklı her biri 23 çift yapı (2nDNA) kromozom içeren 2 hücre meydana gelir. İki hücreden biri sitoplazmanın büyük bir kısmını içeren sekonder oosit diğeri ise çok az sitoplazma içeren I. kutup cisimciğidir. I. kutup cismi, perivitellin aralıkta yer alır. I. mayoz bölünme ovulasyonun hemen öncesinde tamamlanır ve sonra sekonder oosit

DNA eşleşmesi olmadan II. mayoz bölünmeye başlar. Kromozomlar ovulasyondan 3 saat önce metafaz plağında dizildiklerinde ovulasyon gerçekleşir ve oosit ovaryumdan dışarıya atılır. Sekonder oosit döllenme gerçekleşmediği takdirde, ovulasyondan 24 saat sonra dejenere olur (Moore 2002).

2.2. Ovaryumun Anatomik Yapısı

Ovaryum, dişi üreme hücresini üreten üreme organı olup, biri sağda diğeri solda olmak üzere çifttir. Embriyonal yaşamın başlangıcında intraabdominal yerleşimli olmalarına karşın ikinci aydan itibaren pelvis boşluğuna inmeye başlarlar. Sonrasında fossa ovarica adı verilen çukurcuklara yerleşmişlerdir. Ovaryumlar yaklaşık olarak 5 gr ağırlığında, 1 cm kalınlığında, 4 cm uzunluğunda, 2 cm genişliğindedirler. Ovaryumlar pembemsi gri renkte, dış yüzeyi puberte döneminden önce düzgün gözlenir. Ovaryumun facies lateralis ve facies medialis olmak üzere iki yüzü, margo liber ve margo mesovaricus olmak üzere iki kenarı ve extremitas tubaria ve extremitas uterina olmak üzere iki ucu vardır.

Ovaryumların ön kısımlarında kan damarlarının ve sinirlerin girdiği hilus bulunur. Mezovaryum, kan damarlarını ovaryumlara ileten bir periton kıvrımı olup ovaryumu uterusun yan kenarlarından uzanan ligamentum latuma bağlar. Ovaryumlar, ligamentum ovarii ile de tuba uterinanın tutunma yerine yakın bir şekilde uterusun yan duvarına bağlanırlar (Şekil 2.2) (Arıncı ve Elhan, 2006; Solomon, 2000; Unur ve ark., 2012).



Şekil 2.2. Ovaryumun Anatomisi (Britannica.com, 2023).

2.3. Ovaryum Histolojisi

Ovaryumlar, bir çift şeklinde karın boşluğunun sağ ve sol alt kadrantlarında bulunan periton içi yerleşimli endokrin organlardır. Ergenlik öncesi dönemde ovaryumun dış yüzeyi düz bir yapıda iken ergenlik dönemine girilmesiyle tekrarlayan ovulasyonlar ve gelişen foliküller nedeniyle daha düzensiz bir görünüm alır. Menopoz sonrasında ise, ovaryumlar üreme çağındaki boyutuna oranla daha küçüktür (Ross ve Pawlina, 2014).

Ovaryum dış yüzeyi tek katlı yassı epitel veya bazı yerlerde kübik epitle çevrilidir. Ovaryumu dıştan saran bu epitelyum tabakası, embriyoda birkaç kez çoğalarak primer ve sekonder seks kordonlarını yapan peritoneal mezotelyumdan geliştiğinden dolayı germinal epitel adını alır. Bu sellüler tabaka viseral peritonun mezotelyumu ile devam eder. Epitel hücrelerinin peritona bakan yüzünde az sayıda kinosilyum ve mikrovilluslar bulunur. Epitel hücre sitoplazmaları mitokondri ve pinositoz veziküllerinden zengindir (Ross ve Pawlina, 2014; Tekelioğlu 2002). Germinal epitelin altında tunika albuginea bulunur ve sıkı bağ dokusu yapısındadır (Ross ve Pawlina, 2014). Tunika albuginea'nın altında, korteks (kortikal bölge) bölümü bulunur. Korteks; oosit içeren farklı gelişim aşamalarındaki ovaryum foliküllerini, korpus albicans ve korpus luteum yapılarını

içerir. Bu yapılar bağ dokusu (stroma) içine gömülüdür. Ovaryumun orta kısmında gevşek bağ dokusu yapısında medulla (medüller bölge) bölümü bulunur. Medüller bölge; bağ dokusu, sinirler, interstisyel hücreler, kan ve lenf damarlarını içerir (Kierzenbaum, 2006). Medulla korteks tarafından çevrenir. Histolojik olarak birbirinden farklı olan korteks ve medulla kesitlerde kesin bir sınır ile birbirinden ayrılmaz (Junqueira ve Carneiro, 2003; Kierszenbaum,2006).

2.3.1. Foliküler Gelişim (Folikülogenez)

Primordiyal folikül aşamasından olgun folikül aşamasına kadar geçen süreç folikülogenez olarak adlandırılır ve ovaryumun korteks bölümünde gerçekleşir. TGF β , aktivin ve onun antagonistleri, yani follistatin veya inhibin'in kontrolü altındaki foliküler büyüme ve gelişme ile ilişkilidir. Seviyelerindeki herhangi bir değişiklik, erken yumurtalık yetmezliğine yol açan TGF β yolağını düzensiz hale getirir.

Ovaryumda gelişim evrelerine göre farklı folikül tipleri bulunur (Şekil 2.3). Bunlar;

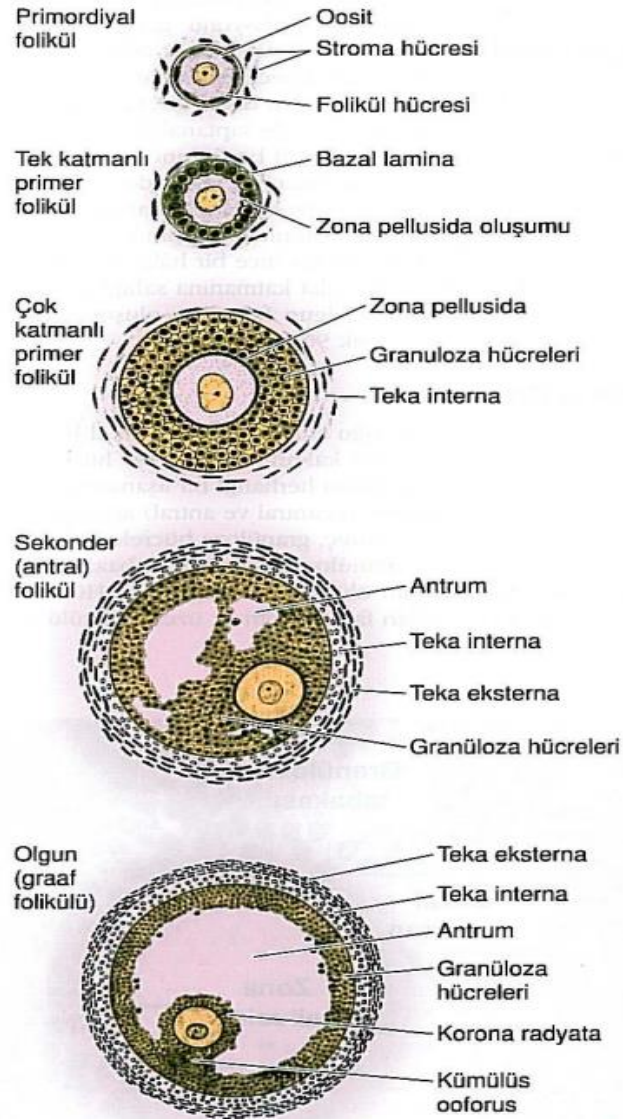
2.3.1.1. Primordiyal Foliküller

Primordiyal foliküller, folikülogenezin ilk evresi olup, fetal yaşam sırasında oluşurlar. Folikül içerisindeki primer oositi tek tabaka yassı folikül hücreleri sarmaktadır (Şekil 2.4). Folikül hücreleri bazal lamina ile çevrenmiştir ve folikülleri çevre stromadan ayırır. Ovaryumda tunika albugineanın hemen altında yerleşim gösterirler. Bu folikül içerisindeki primer oosit mayoz I'in profaz evresinde ve yaklaşık 25 μ m çapındadır. Tek bazende daha fazla nükleolus içeren, eksantrik yerleşimli nükleusa sahiptir ve sitoplazmadaki organeller nükleusa yakın olma eğilimindedir. Organellerin yoğunlaştığı sitoplazma bölümleri Balbiani cisimciği olarak adlandırılır (Junqueira ve Carneiro, 2003; Ross ve Pawlina, 2014).

2.3.1.1.1. Primordiyal Foliküllerin Seçilimi

Gelişim esnasında primordiyal folikül aşamasında duraklamış olan folikülün büyüyen foliküllerin olduğu havuza girmesi, primordiyalden primer foliküle geçiş veya primordiyal foliküllerin seçilimi olarak adlandırılmaktadır. Folikül hücrelerinin mitoz aktivitesi kazanması ve şekillerini yassıdan kübik epitele dönüştürmeleri, folikül seçiliminin histolojik bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Bunu gen aktivasyonu

ve oositin gelişimi takip eder. Oosit çapı büyür, golgi aygıtı hücre yüzeyinin altına göç eder, endoplazmik retikulum genişler. Oositteki bu gelişime bağlı olarak yassı folikül hücreleri kübik hücrelere dönüşür.



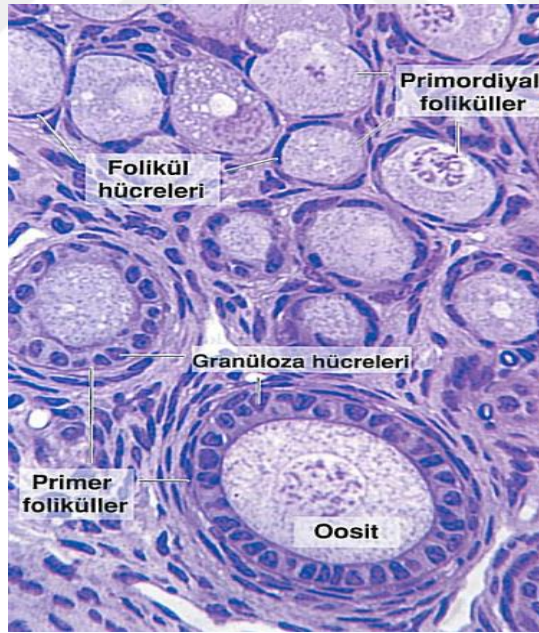
Şekil 2.3. Ovaryum Folikülleri (Junqueira ve Carneiro, 2006). Burada her bir folikül, oosit etrafındaki folikül/granuloza hücrelerinin şekli ve katman sayısına göre sınıflandırılmaktadır. Foliküllerin görece oranları bu çizimde korunmamıştır.

Granuloza hücresi kaynaklı kit-ligand, yüksek pitüiter FSH düzeyi, teka hücresi kaynaklı Bone Morphogenic Protein (BMP) gibi aktivatörler ve Mullerian Inhibition

Substance gibi inhibitörler, seçilimi negatif veya pozitif yönde kontrol eden faktörlerdir (Junqueira ve Carneiro, 2003).

2.3.1.2. Primer Foliküller

Primer oosit büyümeye devam ederken çevresinde bulunan yassı epitel hücreler kübik hücrelere dönüşür ve bu yapı primer folikül (unilaminer (tek katmanlı) primer folikül) adını alır (Junqueira ve Carneiro, 2006). Folikül hücreleri, yassıdan kübik şekle dönüşürler ve granüloza hücreleri adını alırlar. Primer folikülde, oositin çevresinde tek katlı kübik epitel ve bazal lamina bulunur (Şekil 2.4). Oosit büyüdükçe özel proteinler salgılanır ve bu proteinler bir araya gelerek ekstraselüler bir örtü olan zona pellusidayı oluştururlar. Zona pellusida, oosit ile folikül hücreleri arasında ortaya çıkar. Zona pellusida, sülfatlı üç asidik zona pellusida (ZP) glikoproteinleri sınıfından meydana gelmekte olup bunlar ZP-1, ZP-2, ZP-3 olarak isimlendirilmektedir. Bu tabaka ilk olarak, oosit tek tabakalı kübik ya da prizmatik folikül hücreleri tarafından çevrelendiğinde ve çapı 50-80µm 'ye ulaştığında görülür (Ross ve Pawlina, 2014).

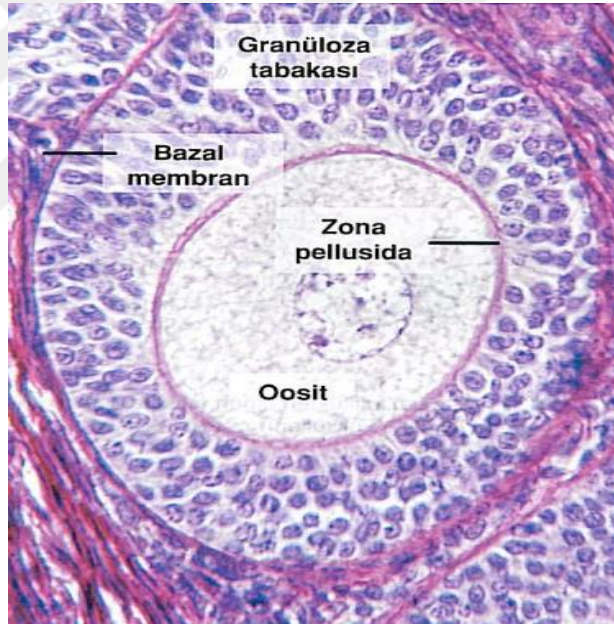


Şekil 2.4. Primordiyal ve Primer Foliküller (Junqueira ve Carneiro, 2006).

2.3.1.3. Preantral Foliküller

Primer foliküldeki granüloza hücrelerinin çoğalmasıyla iki ve daha fazla granüloza tabakası oluşmaktadır (Şekil 2.5). Bu folikül preantral folikül veya çok katmanlı primer

folikül adını alır (Junqueira ve Carneiro, 2006). Granüloza hücreleri gap junctionlarla bağlantı kurar. Sıkı bağlantıların oluşmaması kan-ovaryum bariyerinin olmadığını, oosit ve folikül yapılarının normal gelişimi için kandan besin ve makromolekül alışverişinin yapıldığını gösterir. Folikülün hemen çevresindeki stromal hücreler, bazal laminanın dışında teka folikülü adı verilen tabakaları oluştururlar. Teka folikülü iki tabakadan oluşmaktadır. Teka interna olarak adlandırılan iç tabaka ve teka eksterna olarak adlandırılan dış tabakadır. Teka interna tabakası damarca zengindir ve granüloza hücreleri ile primer oositin beslenmesi bu damarlardan difüzyon aracılığıyla gerçekleşir. Teka interna hücreleri çok sayıda luteinizan hormon (LH) reseptörlerine sahiptir. LH stimülasyonuna yanıt olarak, östrojen prekürsörleri olan androjenleri sentezlerler ve salgırlar. Teka eksterna tabakası, düz kas hücreleri ve kollajen lif demetlerini içeren bağ dokusu hücrelerinden oluşur (Ross ve Pawlina, 2014).

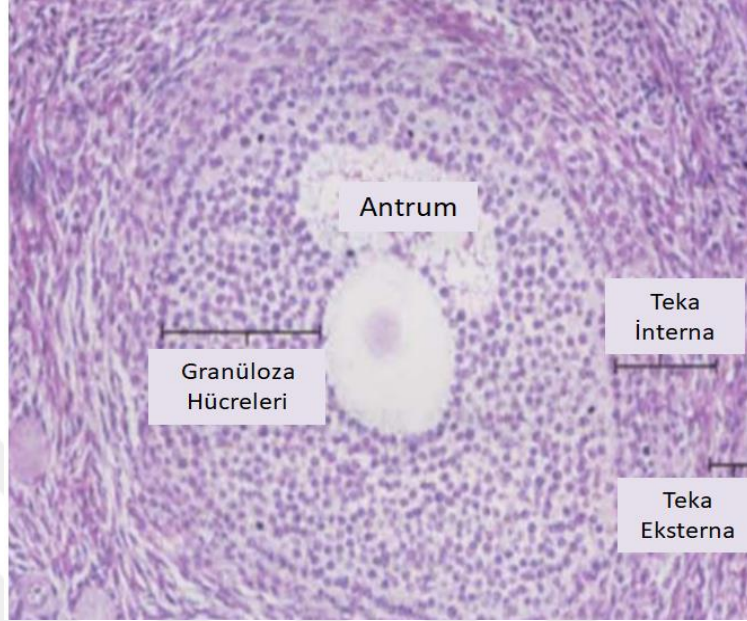


Şekil 2.5. Preantral Folikül (Junqueira ve Carneiro, 2006).

2.3.1.4. Sekonder Foliküller

Sekonder folikül, sıvı içeren antrum ile karakterizedir, gelişimi sırasında major değişiklikler gösterir. Granüloza hücre tabakası 6- 12 kata ulaştığında, bu hücreler arasında sıvı dolu boşluklar oluşmaya başlar. Granüloza hücreleri arasında likör folikülü denen ve hyaluronan bakımından zengin sıvı biritikle ufak boşluklar birleşir ve en

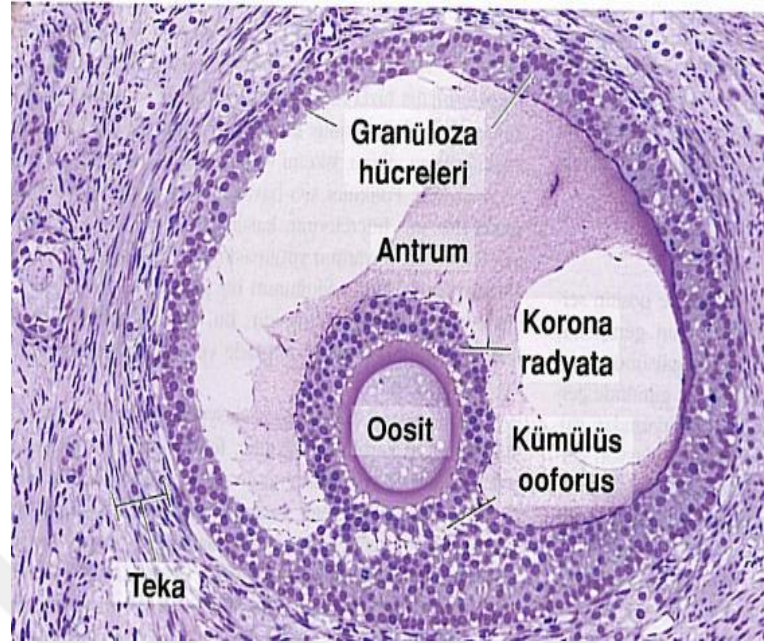
sonunda antrum adı verilen tek bir boşluk oluşur. Bu görüntüdeki folikül sekonder folikül ya da antral folikül adını alır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Sekonder Folikül (Ross ve Pawlina, 2014). Şekil ilgili kaynaktan düzenlenmiştir.

2.3.1.5. Tersiyer Foliküller

Folikulogenez süreci ilerledikçe antrum dahada genişler ve daha büyük bir boşluk halini alır. Oosit bir kutba doğru itilir ve korona radyata denilen tek sıralı granüloza hücreleri ile çevrelenir. Oositin korona radyata ile sarılı olarak yaptığı çıkıntıya kümülüs ooforus denir (Şekil 2.7). Tek büyük antrum ve eksentrik yerleşimli kümülüs oosit kompleksi (COC) içeren folikül tersiyer (olgun, graaf) folikül olarak adlandırılır. Olgun folikül korteks boyunca uzanır ve çapı son derece büyük olduğu için ovaryum yüzeyinde dışarı doğru şişkinlik yapar bu ultrasonografik incelemelerde izlenebilir (Junqueira ve Carneiro, 2006; Ross ve Pawlina, 2014; Tekelioglu, 2002).



Şekil 2.7. Tersiyer Folikül (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Folikül gelişimi sonucu baskın olan folikül son aşamaya ulaşır ve ovulasyonu gerçekleştirir. Ovulasyon olgunlaşan oositin beraberindeki yapılarla birlikte ovaryumdan karın boşluğuna atılma işlemidir. Ovulasyondan sonra folikülün duvarında kalan granüloza hücreleri ve teka internadan gelen hücreler çevre damarlardan beslenir. Teka interna ve granüloza hücreleri LH etkisiyle gerçekleşen ve luteinizasyon olarak adlandırılan bir süreçle; morfolojik ve işlevsel bir değişikliğe uğrar, teka lutein ve granüloza lutein hücrelerine farklılaşır ve luteal hücrelere dönüşürler. Bu hücrelerin oluşturduğu yapıya korpus luteum denir. Korpus luteum ovulasyon sonrası 9. günde maksimum boyutuna ulaşır döllenme gerçekleşmezse fibrotik skar dokusuna dönüşür. Bu yapı korpus albicans olarak adlandırılır (Junqueira ve Carneiro, 2006; Sadler, 2017).

2.3.1.6. Atretik Foliküller

Foliküllerde atrezi; granüloza hücrelerinin ayrılması, apoptoz, zona pellusidanın parçalanması ve oosit otolizini kapsamaktadır (Mescher, 2015). Mayoz bölünmeye başlamış primer oositlerin çoğunluğu primer folikül oluşturamayıp atrezi ile yok olurlar sonrasında makrofajlar tarafından ortadan kaldırılırlar (Junqueira ve ark., 1993; Ross ve Pawlina, 2014). Geç dönem foliküllerinde ise granüloza hücrelerinde mitoz durur sonra apoptoz başlar, oluşan apoptotik cisimcikler fagositte edilirler. Zona pellusida

parçalanarak fagosite edilir. Teka interna hücreleri hipertrofiye uğrar, folikül antrumu bağ dokusu ile dolar. Foliküler atrezi, doğum öncesi dönemden menapozun birkaç yıl sonrasına kadar devam eder (Mescher, 2015; Ross ve Pawlina, 2014).

Ovaryum rezervi

Ovaryumda kalan primordiyal ve gelişmekte olan foliküllerin miktarı ile var olan foliküllerdeki oosit kalitesidir. Overin potansiyel kapasitesini ifade eder. İlerleyen yaşla birlikte over rezervi azalır. Over rezervinin tayini özellikle ileri yaşta çocuk isteyen kadınlarda oldukça önemlidir. Oldukça zor bir süreç olan infertilite programına girmeden önce ovaryumda yeterli rezerve sahip olup olmadığının değerlendirilmesi, klinikteki başarı açısından önem taşımaktadır. Over rezervini belirlemede, yaşa bağlı değerlendirme, biyokimyasal (İnhibin B, FSH, Anti Müllerian Hormon (AMH), bazal östradiol miktarı) parametreler ve ultrason gibi yöntemler kullanılmaktadır (Faddy ve ark., 1992). Kullanılan bu yöntemler arasında AMH gelişmekte olan foliküllerin sayısının belirlenmesi, gonodotropinlerden bağımsız olması nedeniyle güvenilir bir markerdir. AMH, TGFβ ailesinin bir üyesidir. AMH, erkeklerde testiste sertoli hücrelerinde, kadınlarda ise primordiyal folikülden primer foliküle geçen büyümekte olan foliküllerin granüloza hücrelerinde sentezlenir.

Genel infertilite popülasyonunun %10'unda bozulmuş over rezervinden kaynaklandığı ve AMH'nin kullanışlı ve güvenilir bir belirteç olduğu yönünde çalışmalar kabul görmektedir. Over rezervi ile ilişkili ovarian patofizyolojilerinde AMH düzeylerinin folikül sayısını tahmin etmede siklusun üçüncü günü bakılan FSH, LH ve inhibin B'den daha güvenilir bir belirteç olduğu bilinmektedir (Demir, 2013).

2.5. Nonylphenol

İnsan hayatını önemli ölçüde kolaylaştıran alanlarda kullanılan kimyasal maddeler canlılığı olumsuz yönde etkilemektedir. Endüstride kullanılan kimyasal bileşiklerin çoğu hormon benzeri aktiviteye sahip olup “çevresel endokrin bozucular” olarak adlandırılır ve bu kimyasallar endokrin sistem fonksiyonlarını değiştirerek canlılarda birçok sağlık problemine neden olmaktadır. Dietilstilboestrol (DES), bisfenol A (BFA), dikloro-difeniltriokloroetan (DDT), polibrominat difenil eter (PBDE), poliklorinat bifenil (PCB) ve alkilfenol polietoksilat (AFEO) ailesinden Nonylphenol (NP) en yaygın bilinen endokrin bozuculardır (Nimrod ve Benson, 1996).

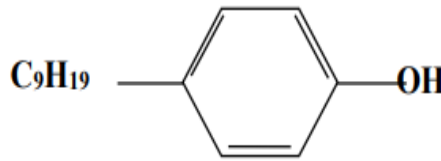
Alkilfenoletoksilat bileşikleri (AFE) birikim yapması ve sürekli maruz kalınması durumunda dokularda rezidü oluşturduğu için toksik etkili maddelerdir (Jobling ve Sumpter, 1993; Jobling ve ark., 1996). AFE'ler, bulundukları ortam ısısı 20°C'nin üzerine çıkmasıyla parçalanmaya başlarlar (Marcomini ve ark., 2000). AFE'lerin temel biyokimyasal yıkımlanması, etoksilat gruplarının hidrolitik uzaklaştırılması yolu ile gerçekleşir ve ortaya oktilfenol (OF), bütilfenol (BF) ve NP gibi ürünler çıkar (Nimrod ve Benson, 1996).

NP; diğer AFE'lere nazaran canlılarda akümüle olan ve ana bileşiklerden çok daha yıkımlayıcı etkisi olan bir kimyasaldır (Ahel ve ark., 1994a; Ahel ve ark., 1994b; Bennie, 1999; Tyler, 1998). NP; tekstil, zirai ilaç, deterjan, leke çıkarıcılarda, gıda ambalajlama, kozmetik, boya ve kaplama ürünlerinin üretiminde kullanılmaktadır. Yapay reçinelerde katalitik seyreltici olarak da kullanımı bilinmektedir. NP; tris(4-nonil-fenil) phosphite (TNPP) oluşturmak için reaksiyon elemanı olarak kullanılmaktadır. Antioksidan olarakta bilinen TNPP, plastik gıda paketlenmesinde stabilizör olarak kullanımı yaygındır. TNPP yapısında NP'ü içerir. Bu madde besinlerle temas edebilen zararsız bir madde olarak kabul edilsede, yağda çözünme özelliğinden dolayı yağlı yiyeceklerin paketlenmesinde kullanılması yolu insan vücuduna girişini sağlamaktadır (Seidel, 2004; Vazquez-Duhalt ve ark., 2006).

İlk olarak 1940 yılında sentezlenmeye başlanılan NP özellikle 1960'dan sonra hızla üretimi artan kimyasal bir maddedir (Fiege ve ark., 2000). NP'ün sucul ekosistemde toksisitesi 1980-1985 yıllarında farklı çalışmalarla ortaya konulmuş olup (Giger ve ark., 1984; McLeese ve ark., 1981) NP'lerin kanalizasyon çamurunda ve sedimentlerde 50-200 mg/g arasında değişen konsantrasyonlarda bulunduğu rapor edilmiştir (Ventura ve ark., 1989). 1990'lı yıllarda NP'ün endokrin bozucu özelliğinin olduğu ve balıklarda östrojenik etkiler gösterdiği görülmüştür (Lee ve Lee, 1996; Soto ve ark., 1991; White ve ark., 1994). Farklı çalışmalarda gıda maddelerinde de NP olduğu gösterilmiştir (Guenther ve ark., 2002; Lu ve ark., 2007). NP üretimi konusunda çeşitli önlemler alınmaya başlanmış ve buna göre NP içme sularında 28 µg/l'yi geçmesinin sorun yaratacağı belirtilsede birçok ülke örneğin Hindistan ve Çin NP üretimine yaygın bir şekilde devam etmektedir (Brooke ve Thursby, 2005).

2.5.1. NP'ün Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

NP, alkil fenollerin biyokimyasal yıkımlaması sonucu ortaya çıkan organik bir bileşiktir. NP, bir hidroksil grubuna ve yan pozisyonunda doğrusal nonil zincirine sahip fenol halkasından oluşan hidrofobik bir bileşiktir (Buitrón ve ark., 2015). NP'ün ana oluşumu Nonylphenol polietoksilatlarından (NPE) kaynaklanmaktadır. NPE'lar geniş bir kapsamda AFEO olarak adlandırılmaktadırlar (Nimrod ve Benson, 1996). NPE'lar şuan AFEO üretiminin %80-85'ini oluşturmaktadır (ICIS, 2007). NPE molekülü, hidrofobik kısım ve 1-100 kez arası tekrarlanan hidrofilik polietilen oksit zinciri olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır (Pedersen ve ark., 1999). NPE molekülünün NP bölümü suda çözünememe, diğer maddelerde ve yağlarda çözünme etkisi oluşturur. NPE'lar su ortamında kolayca anaerobik (oksijensiz) koşullarda, biyolojik parçalanmaya (biyodegradasyon) karşı dirençli olan NP'e bozunmaktadır (Hao ve ark., 2000). Yapısındaki benzen halkasından dolayı biyobirikime müsait bir kimyasal bileşiktir (Brunner ve ark., 1988). NP; lipofilik, toksik, kalıcı, suda az çözünen, diğer AFE'lere nazaran organizmalarda akümüle olan ve ana bileşiklerden daha yıkımlayıcı olan bir kimyasal maddedir (Ahel ve ark., 1994; Bennie, 1999; Tyler ve ark., 1998). Şekil 2.8'de NP'ün kimyasal yapısı verilmiştir.



Şekil 2.8. Nonylphenol'ün Kimyasal Yapısı (Buitrón ve ark., 2015).

2.5.2. NP'ün Çevreye Yayılması ve Biyoakümüasyonu

NPE'ların ve NP'ün endüstride ve evlerde günlük yaygın kullanımlarından dolayı atık sulara bol miktarda geçmektedir. Fabrikaların yakınlarındaki sularda NP düzeyi diğer alanlardaki temiz suların değerinin 100 kat yüksek olduğu saptandı (Ahel ve ark., 1994). NP konsantrasyonu İngiltere'deki Aire nehrine bırakılan kanalizasyon suyunda temiz suya oranla 330 kat fazla çıkmıştır. Söz konusu artışın, nehrin yakınındaki tekstil

fabrikasından bırakılan atık suların sebep olduğu saptandı (Blackburn ve Waldock, 1995). NP ve NPE'leri içeren bileşikler kullanan işletmeler bunları doğrudan yeryüzü sularına salmakta ve bu atık sular ile sulanmış bitkilerden, çiftlik veya otlaklardan NP çevreye yayılmaktadır (Bennie, 1999; Mann ve Body, 2000). NP suda yaşayan canlılara ve bitkilere geçebilmekte ve depolanabilmektedir. NP'ler özellikle meyve ve sebzelerde (Guenther ve ark., 2002; Yang ve Ding, 2005), pirinçte, su ve çiftlik ürünlerinde (Lu ve ark., 2007) ölçülmüştür. NP Kanada, İsveç, Amerika, İngiltere gibi ülkelerin nehir ve göllerinde rastlanmıştır (Ahel, 1994; Blackburn ve Waldock, 1995; O'Halloran ve ark., 1999). Sakarya ve Değirmendere ırmaklarında balıklar ve sediman üzerine yapılan çalışmada, NP'e rastlandı (Uğuz ve ark., 2003). Alkilfenolün en dirençli metaboliti olan NP, yüksek lipofilik yapısı sebebiyle akümüasyon eğilimindedir (Arukwe ve ark., 1999). NP nehirde yaşayan balıklara geçtikten sonra çoğunlukla böbrek ve karaciğerde depolanmaktadır (Coldham ve ark., 1998; Lewis ve Lech, 1996). NP'ün biyobirikim faktörü araştırıldığında bu kimyasalın tatlı sularda yaşayan organizmalarda ve kuşlarda biyolojik olarak birikme potansiyelinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Ahel ve ark., 1993). İnsanlar, NP gibi toksik maddelere biyolojik birikim yoluyla en çok maruz kalan canlılardır.

NP'ün atık sular yoluyla yayılması dışında plastik kaplardan besin ve içme sularında geçtiği gösterilmiştir (Loyo-Rosales ve ark., 2004; Toyo'oka ve Oshige, 2000). Saito ve ark. (2004), ev dışı ve içinde hava ve toz örneklerinde NP konsantrasyonlarını ölçmüş ve ev ortamında daha yüksek oranlarda NP bulunduğunu göstermişlerdir. Fries ve Püttmann (2004), kar ve yağın yağmur örneklerinde NP'ün bulunduğunu göstermişlerdir.

2.5.3. NP'ün Etkileri

NP, yarılanma ömrünün uzun olması ve lipofilik özelliği nedeniyle, canlıların vücudunda birikime yol açarak toksik etkiler sergilemektedir (Nimnod ve Benson, 1996; Warhurst, 1995).

Schwaiger ve ark. (2000), NP'e maruz bırakılan sazan balıklarının, hematolojik parametrelerin etkilendiğini bildirmişlerdir. NP'ün işitme fonksiyonunu olumsuz

etkilediği (Yücedağ ve ark., 2014), testis ve ovaryum kanserine (Skakkebaek ve ark., 1998) neden olduğu gösterilmiştir.

NP, güçlü bir östrojenik aktiviteye sahiptir (Tapiero ve Tew, 2002). Yapılan çalışmalar yetişkin erkek gökkuşağı alabalığında spermatogenezin inhibisyonu (Jobling ve ark., 1996), erkek yılan balığındaki sertoli hücrelerindeki sitolojik değişimler dikkat çekmektedir. NP, östrojenik etkisi ile folikülogenez sürecini değiştirerek döllenme fenotipini etkileyebilen veya elimine edilebilen çoklu üreme foliküllerinin oluşumuna yol açarak infertiliteye neden olduğu bilinmektedir (Christiansen ve ark., 1998; Hughes ve ark., 2000). Ratlarda NP uygulanan farklı bir çalışma ovaryum ve korteks hacminin, ovaryum ağırlığının, gelişmekte olan foliküllerin sayılarının azaldığı; atretik folikül sayısının ise arttığı bildirildi (Mehranjani ve ark., 2010).

NP olası dolaylı veya direkt etkilerinin histopatolojik ve moleküler düzeyde incelenmesi önem arz etmekte ve önemli araştırma konuları arasında olduğu öngörülmektedir.

2.6. Kök Hücre

“Kök hücre” terimi ilk kez botanik ile ilgili eski yazılarda bitkinin gelişmekte olan kök meristeminin ucunda, bölünme hızı çok yüksek olan hücreleri tanımlamak için kullanılmıştır. Bugün en bilinen tanımı ile kök hücreler; kendini yenileyebilen, diğer hücrelere farklılaşabilen ve klon oluşturma yeteneğine sahip özel hücrelerdir (Can, 2014). Embriyonik ve Embriyonik olmayan kök hücreler olmak üzere iki ana kök hücre kaynağı vardır (Li ve Xie, 2005). Embriyo kök hücreleri, ilkel cinsiyet hücreleri, nöral kök hücrelerinin bir kısmı ve embriyo dışı mezoderm kökenli hücreler “embriyonik kök hücre” olarak adlandırılırken bunlar dışında kalan erken embriyo gelişimini tamamlamış bir organizmada bulunan kök hücreler “somatik kök hücre” veya “yetişkin kök hücreler” olarak adlandırılır (Ersöz, 2014; Watt ve Driskell, 2010). Erişkin dokulardaki kök hücreler farklılaşmamış hücreler olup, genellikle içinde bulundukları dokuya ait olan hücre tiplerini oluştururlar (Suzergoz ve ark., 2005).

Kök hücreler kendini yenileme ve farklılaşma arasında seçim yapma yeteneğine sahiptir ve bu seçimin yönü iç sinyaller ve dış mikroçevre tarafından düzenlenir (Odorico ve ark., 2001). Kök hücrelerin kendini yenileme yeteneği sayısız hücre döngüsünü gerçekleştirebilmesidir (Hosseinkhani ve ark., 2013). Hücre kültürlerinde bu süreç

kolaylıkla gözlenir (Wilson ve Trumpp, 2006). Kültür ortamında embriyonik kök hücreler sınırsız  o alabilirken (MacArthur ve ark., 2009), yetişkinlerde homeostatik koşullar altında belirli bir organdaki doku kök hücrelerinin sayısı çoğalmasına rağmen sabit kalır, çünkü hem kendini yeniler hem de farklıla mı  bir soy oluştururlar (Morrison ve Kimble, 2006; Wilson ve Trumpp, 2006).

Kök hücreler farklılaşma yeteneklerine göre ise totipotent, pluripotent, multipotent plenipotent ve unipotent olmak üzere 5 farklı gruba ayrılabilirler.

Totipotent Kök Hücreler: Döllenme sonucu oluşan zigot ve zigotun bölünmesiyle oluşan iki hücreli erken blastomer yapı totipotent kök hücreler olarak adlandırılırlar ve yetişkin bir bireyi tek başına oluşturabilme yeteneğine sahiptirler (Weissman, 2000).

Plenipotent Kök Hücreler: Geç morula ve erken blastosit gibi 8 hücreye kadar olan yapı plenipotent kök hücre olarak isimlendirilir ve organizmanın çoğunu veya tamamını oluşturma yeteneğine sahiptirler (Weissman, 2000).

Pluripotent Kök Hücreler: Geç blastosist evresinden erken fetüs evresine kadar olan hücreler pluripotent karakterdedirler. Epiblastın tamamından veya çoğundan izole edilebilirler ve bütün bir organizmayı oluşturma yeteneğine sahip değildirler (Weissman, 2000; Yun ve ark., 2010).

Multipotent Kök Hücreler: Geç embriyonik ge i im evresinde görülen ve yetişkin organizmada varlığını sürdüren kök hücrelerdir ve  zelle mi  dokulara ve hücrelere d n  ebilirler (Yun ve ark., 2010).

Unipotent Kök Hücreler: Tek tip hücreye farklıla abilen, doku yenilenmesinde rol oynayan kök hücrelerdir (Condic, 2013; Yun ve ark., 2010).

Embriyonik kök hücreler pluripotent iken; yetişkin dokulardan elde edilen kök hücreler genellikle dokuya özgü, rejeneratif potansiyelini koruyan multipotent özelliğe sahiptir. Embriyonik olmayan kök hücrelerin farklıla abilme yeteneğinin sınırlı olması ve neoplazi olasılığının azaltılması nedeniyle rejeneratif tıp olarak adlandırılan hücresel tedavilerde kullanımı daha uygun olduğu düşünülmektedir (Ryan ve ark., 2005).

Yetişkin kök hücreler kordon kanı, kemik iliği, amniyotik sıvı, periferik kan, adipoz doku, iskelet kası, retina ve dental dokular gibi farklı dokulardan izole edilebilirler

(Weissman, 2000). Yetişkin kök hücrelerin temel rolü, bulundukları dokunun onarımı ve devamlılığını sağlamaktır (Scadden, 2006).

Mezenşimal Kök Hücre (MKH)'ler ise farklı dokulardan elde edilebilen, yetişkin multipotent kök hücrelerdir (Hammıa ve Zıanı, 2014).

2.6.1. Mezenşimal Kök Hücre

MKH'ler multipotent karaktere sahip fibroblast benzeri hücreler olup, mezodermden köken alırlar (Kolf ve ark., 2007; Kuo ve ark., 2006; Lee ve ark., 2013). MKH'lerin kemik iliği, yağ dokusu, plasenta, karaciğer, periferik kan, umbilikal kord, amniyotik sıvı, dalak, diş pulpası, trabeküler kemik, deri, timus ve periodontal ligament gibi farklı kaynaklardan elde edilebilir (Caplan, 2007; Chen ve ark., 2017; In't Anker ve ark., 2004; Pittenger ve ark., 1999; Scherjon ve ark., 2003; Zuk ve ark., 2001). MKH'lerin farklı hücre tiplerine farklılaşma potansiyelleri sayesinde doku ve organların onarımına katkıda bulunur (Alipour ve ark., 2015). Kültür ortamında çoğaltılan MKH'ler faz kontrast mikroskobu veya ışık mikroskobu ile incelendiğinde hücrelerin iğ şeklinde olduğu ve fibroblast benzeri hücre toplulukları oluşturdukları gözlenmektedir. (Can, 2014). MKH'lerin kendini yenileme kapasitesi, otolog kaynaklardan kolaylıkla elde edilebilmesi ve birçok hücre tipine indüklenebilmesi gibi avantajları nedeniyle hücre ve gen terapisi tedavilerinde tercih edilmektedir (Aggarwal ve Pittenger, 2009; Baksh ve ark., 2004). Yine de MKH biyolojisi ile ilgili pek çok önemli nokta hala belirsizdir (Nombela-Arrieta ve ark., 2012).

MKH' nin İmmunfenotiplenmesi

Günümüzde MKH'nin elde edilmesi ve tanımlanması daha çok operasyonel bir temele dayanır. Cluster of Differentiation (CD) serisi bazı belirteçlerin oranının yüksekliği, bazılarının ise azlığı ve yokluğu (negatif veya pozitif seçim). Plastik kültür yüzeylerine yapışarak büyümeleri/çoğalmaları ve in vitro olarak en az üç seriye farklılaştırılmaları standart kabul edilmektedir. MKH'ler mezoderm dokusunun öncü hücreleri oldukları için bağ ve destek dokuları, yağ dokusu ve vasküler sistemin temel hücrelerine dönüşürler (Can, 2014).

Yoğunluk gradiyenti ve/veya enzim sindirimiyle toplanan hücre karışımları üzerinde immün ayırım yapılabilirse daha saf hücre grupları elde edilir. Floresans Aktif Hücre

Ayırma (FACS) veya manyetik hücre ayırıştırıcısı kullanılarak hücrelerin taşıdığı yüzey belirteçlerine göre yapılan ayırmalarda kolondan geçen her hücre üzerinde aranan belirteçleri taşıyan hücrelerin oranı belirlenir. Bu belirteçleri taşıyan hücrelerin oranları değişkendir. Genellikle %85'in üzeri kuvvetli pozitif sinyal kabul edilir. Bu sinyaller türler arasında, alındığı dokular arasında ve halen bilmediğimiz birçok faktör altında değişkenlik gösterir. Örneğin CD29 ifadesi Kİ-MKH'de kültür ilerledikçe artarken CD146 ve CD271 ifadesi düşer. Bazen belirteçteki ani değişim hücrenin davranışındaki bir değişimin göstergesidir; örneğin, CD90'nın kaybı MKH'de neoplaziye doğru gidişin bir habercisidir (Miura ve ark., 2006; Mitchell ve ark., 2006)

Birçok çalışmada Kİ-MKH'de ve bazı dokulardan kaynak alan MKH'de CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166 pozitif, buna karşın CD14, CD34 ve CD45 negatif olarak bildirilmiştir. Yağ dokusu kaynaklı MKH'de ise CD9, CD29, CD54, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166 ve MHC sınıf I (HLA-A, HLA-B ve HLA-C) ifadeleri pozitif; CD14, CD31, CD34, CD45, CD133, CD144, Stro-1 ve MHC sınıf II (HLA-DR ve diğerleri) ifadesi negatiftir (Schafflerve Buncner 2007). Yağ dokusu ve kemik iliği kaynaklı MKH'yi akım sitometrisinden geçirdikten sonra her iki grup hücrede de CD13, CD29, CD44, CD90, CD105 (SH2), CD73 (SH3) VE CD140b (Stro-1)'nin ortak belirteçler olduğunu gösterilmiştir. Buna karşın CD49d, CD54, CD34 ve CD10' da iki hücre türü arasında fark bulunur. Yağ dokusu ve kemik iliği kaynaklı MKH arındaki CD140b ve CD34 farkının kullanılan hücre ayırıştırma yöntemlerinden ve/veya kültür ortamlarından kaynaklanabileceği öne sürülebilir. Periferik kan kökenli MKH'de ise CD44, CD54, CD105 (SH2) ve CD166 pozitif iken, CD14, CD34, CD45, CD31 negatiftir (Kassisve ark., 2006).

Tüm bu moleküler ayrımlara rağmen immünofenotiplendirme tek başına MKH'yi bunların türevlerinden ayırmada kullanılamaz. Bunun için klonojenitenin ve in vitro serilere farklılaşmanın değerlendirildiği işlev analizleri yapılmalıdır. İmmünofenotiplendirme ancak bu analizlerle birlikte uygulandığında hücrelerin tanımlanmasına katkıda bulunur (Can, 2014).

2.6.1.1. Kemik İliği Kaynaklı Mezenşimal Kök Hücre

MKH'lerin primer kaynağı kemik iliğidir. Kemik İliği Kaynaklı Mezenşimal Kök Hücre (Kİ-MKH) 1980 yılında Castro-Malaspina ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Yetişkinin yaşamı boyunca kan hücrelerinin yapımına doğrudan ve dolaylı olarak kesintisiz katkıda bulunan kemik iliği stroması hücreleri olan adipositler, retikulum hücreleri ve osteoblastlar MKH'nin in vivo türevleri olarak kabul edilmektedir (Can, 2014).

Kemik iliğinde MKH'nin ortaya çıkışı hematopoetik kök hücre (HKH) nin varlığından daha önceki embriyo dönemine karşılık gelir. Embriyoda henüz HKH kolonileri oluşmadan birçok hematopoetik dokudan MKH elde edilmesi mümkündür (Campagnoli ve ark., 2001; Mendes ve ark., 2005). MKH'nin hematopoetik organlarda HKH'nin olgunlaşması için gerekli niş ortamının yaratılmasında yaşamsal önemi olduğu, damar gelişiminin giderek artması sonucunda üretilen kan hücrelerinin dağılımına katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Bianco ve ark., 2010). Diğer açıdan ise kemik iliği sadece HKH hücreler için değil stroma hücreleri için de bir niş görevi yapmaktadır. Vücudun bu önemli dokusu “ikili niş bölgesi” olarak düşünülmelidir. Özellikle perivasküler bölgede HKH ile MKH nişi bir arada bulunmaktadır (Can, 2014).

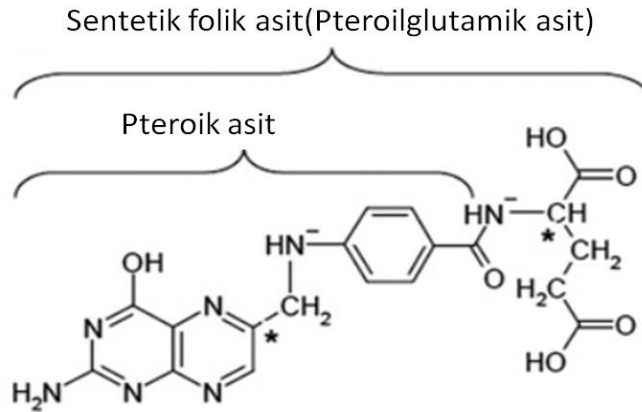
Ayrıca fare kemik iliğinde nestin işaretlemesi yapılarak MKH ile HKH'nin ve MKH ile adrenerjik sinir liflerinin arasında ikili hücresel ilişkilerin varlığı gösterilmiş, nestin barındıran MKH'nin HKH'nin gelişimi için gerekli faktörlere ait genleri ifade ettikleri, bu genlerin de osteoblast farklılaşmasını uyardığı saptanmıştır (Mendez-Ferrer ve ark., 2010).

Kİ-MKH kendini yenileme kapasitesi (Sawangmake ve ark., 2016), çok soylu farklılaşma potansiyeli (Sawangmake ve ark., 2016), çeşitli hastalıkların tedavisi için kullanılabilmesi (Kim ve Park,2017), etik sorunların yaşanmaması, kök hücrelerin birincil kaynağı olması (Kim ve Park,2017), düşük riskli bağışıklık reddi (Voga ve ark., 2020) ve mutasyonlara daha az duyarlı olması (Sun ve ark., 2014) gibi avantajları sebebiyle çok sık tercih edilen ve klinikte kullanımı yaygınlaşan bir MKH'dir.

2.7. Folik Asit

Folik asit, suda çözünen B grubu vitaminlerden birisidir. Doğada folat olarak bulunmaktadır. Folat, folik asit ve 5-metiltetrahidrofolat (5-MTHF), 5-formiltetrahidrofolat (5-FTHF veya folinik asit), 10-formil-THF, 5,10-metilen türevlerini içeren bir bileşik ailesi için genel bir terimdir. Folik asit, bu ailenin ana bileşiğidir. Yeşil yapraklı bitkilerde özellikle ıspanakta bol miktarda bulunur. Ayrıca taze inek sütü, karaciğer, tahıllar, muz, portakal suyu ve yumurta gibi gıdalarda bulunur. Mikroorganizmalarda, bitki ve hayvanlarda yaygın bulunması nedeniyle alınan besinlerde bol miktarda bulunmaktadır. Ancak pişirme ve ısıtma sırasında %50-90'ı kaybolabilmektedir (Baydar ve Şahin, 1994; Forssen ve ark., 2000; Halsted,1989; Wright ve ark.2005).

Folik asit pteroik asit ve buna bağlı pteriolglutamik asit olmak üzere iki ana birimden meydana gelir (Şekil 2.9) (Scaglione ve Panzavolta, 2014). Folik asidin kendisi bir koenzim olarak aktif değildir ve metabolik olarak aktif tetrahidrofolat (THF) formuna dönüştürülmesi için hücre içinde birkaç metabolik adımdan geçmesi gerekir (Bayşu ve Bayşu, 2008; Forssen ve ark., 2000).



Şekil 2.9. Folik Asit Kimyasal Yapısı (Scaglione ve Panzavolta, 2014).

Folat esas emilim yeri jejunumdur. Emilim için poliglutamatlar monoglutamat haline dönüştürülürler. Monoglumatlar emildikten sonra dolaşıma katılmadan önce hücre içi hidrolaz tarafından hidrolize edilirler. Poliglutamat haline çevrilip depo edilecekleri

yerlere giderek metabolize edilirler. Karaciğerdeki folatlar kana karışmak için tekrar monoglutamatlara çevrilirler. Folatlar organizmadan dışkı ve idrar ile atılırlar (Kalaycıoğlu ve ark., 2008).

Folik asitin başlıca fonksiyonları;

1. Metiyonin sentezi.
2. Timidilat sentezi.
3. Pürin bazlarının sentezi.
4. Histidin metabolizması.
5. Serin - Glisin dönüşümü olarak sıralanabilir.

Yetişkinler için günlük diyetle alınan folat miktarı 400 µg olarak belirlenmiştir. Folik asit yetersizliğinde; yükselmiş serum homosistein düzeyi ile görülen kalp damar hastalıkları, megaloblastik (makrositik) anemi oluşmaktadır (Benoist, 1998). Folat eksikliğinin bir diğer önemli nedeni de artan ihtiyaçtır. Hamileliğin diyetle alınan folat ihtiyacını ikiye katladığı bilinmektedir. Bu nedenle çoğu ülkede günde 400 µg diyet folatı olarak belirlenirken, İngiltere ve ABD gibi bazı ülkeler bunun yerine takviye olarak günde ek 400 µg folik asit önermektedir (Yates ve ark., 1998). Annede düşük folat durumu, erken doğum, düşük doğum ağırlığı ve yavruda artmış nöral tüp defekti riski ile ilişkilendirilmiştir. Tüm nöral tüp defekti vakalarının yarısında tek başına spina bifida vardır ve diğer yarısında spina bifida ile birlikte veya spina bifida olmadan anensefali vardır. Bununla birlikte, bu anomalilerin gelişiminde hangi kesin mekanizmaların yer aldığı net değildir, ancak son yıllarda yapılan bazı çalışmalar folat takviyesinin ardından nöral tüp defekti riskinin azaldığını göstermektedir (Wald ve ark., 1991). Folik asitin kök hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşması üzerinde çok önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Wilson, 2010).

Bu araştırma kapsamında NP ile over hasarı oluşturulan sıçanlarda süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktiviteleri ile malondialdehid (MDA), total oksidan seviyesi (TOS), total antioksidan seviyesi (TAS) analiz edilerek oksidatif hasarın şiddeti belirlenerek, tek başına ve Kİ-MKH ile birlikte tedavi edici etkinliği araştırılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma için Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu Başkanlığının 08/01/2020 tarih ve 20/006 no'lu onayı alındı. Mevcut Çalışma TDK-2020-10246 nolu proje kodu ile Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklendi.

3.1. Kemik İliği Kaynaklı Mezenşimal Kök Hücreler

3.1.1. Rat Kemik İliği Mezenşimal Kök Hücre Kültürü ve Karakterizasyonu

Tez çalışması için kullanılacak olan kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücreler Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi'nden temin edildi. Hücreler 37 °C su banyosunda çözdürülerek 75cm²'lik hücre kültür kaplarına (TPP, İsviçre) ekildi. Hücreler, bazal besiyeri (Dulbecco's Modified Eagle Medium- Low Glucose, Biological Industries, ABD) içerisine %1 antibiyotik (Biological Industries, ABD), %1 stabil L- glutamin (Biological Industries, ABD) ve %10 serum (Foetal Bovine Serum, Biological Industries, ABD) eklenerek kültüre edildi. İnkübasyon 37 °C de %5 CO₂ içeren inkübatörde (Sanyo, Japonya) gerçekleşti. Hücreler, %90 yoğunluğa ulaşınca tripsin metodu ile kültür kabının tabanından kaldırılarak pasajlanarak deneyde kullanılacak hücre sayısına ulaşıldı.

Kullanılan hücrelerin karakterizasyonunda, akım sitometri yöntemi kullanıldı. Kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücrelerinin immünfenotiplemesi için CD44, CD45, CD73 ve CD90 antikorları (BD, Biosciences, San Jose, Kaliforniya) kullanıldı. Akım sitometri Navios Akım Sitometrisi cihazı (Beckman Coulter, Brea, Kaliforniya) kullanılarak gerçekleştirildi. Kaluza yazılımı (Beckman Coulter) ile veriler analiz edildi.

3.1.2. Hücrelerin PKH26 ile işaretlenmesi

İn vivo koşullarda hücrelerin hasarlı dokuya yerleşimlerini gösterebilmek için hücreler floresan özellikteki membran boyası olan PKH26 (Red Fluorescent Cell Linker Kit, Sigma, Almanya) ile üretici firma talimatları doğrultusunda boyandı. Hücrelerin boyanma oranları akım sitometri cihazında araştırıldı. Boyanan hücrelerin canlılık tespiti ve hücre sayımı ise tripan mavisi kullanılarak thoma lamında sayılarak belirlendi. Hücreler Nikon Eclipse Tİ-S marka (Nikon, Japonya) floresan mikroskobu ile görüntülendi.

3.2. Deney Hayvanları

Çalışmada Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde (DEKAM) yetiştirilen 130 adet 200-250 gr ağırlığında yetişkin dişi sıçan (Wistar albino türü) kullanılmıştır. Hayvanlar uygun koşullarda her kafesde 5 sıçan olacak şekilde, klimatize odalarda ($21\pm3^{\circ}\text{C}$) ve 12 saatlik aydınlık/karanlık ortamda, standart sıçan yemi ve musluk suyu ile beslenmişlerdir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Kafeslerde Barındırılan Sıçanlar

3.2.1. Uygulama Yöntemi ve Kullanılan Maddeler

Uygulama sırasında kullanılan tüm maddeler literatüre uygun olarak seçildi. 100 µl mısır yağında çözdürülerek hazırlanan 50 µl dozda Nonylphenol (Aldrich, Saint Louis USA) gavaj yoluyla (Alişan Suna ve ark., 2021; Göktepe ve ark., 2022) verildi (toplam 150 µl). 100 µl DPBS içinde $2,5 \times 10^6$ Kİ-MKH kaudal venden intravenöz (i.v.) yolla (Rizy ve ark., 2018) verildi. Folik asit (Sigma, Saint Louis, USA) 20mg/kg/gün dozda 150 µl distile su içerisinde çözdürülerek gavaj yoluyla uygulandı (Aydos ve Boyacıoğlu, 2019; Gules ve ark., 2018). Çalışmada kullanılan denekler rastgele 13 gruba ayrıldı, deney grupları Tablo 3.1’de gösterildi.

Tablo 3.1. Deney Grupları

Gruplar (n:10)	Uygulamalar
Kontrol grubu (Kontrol)	Herhangi bir işlem uygulanmadı
7 gün tedavi uygulanan ve takip edilen gruplar	
Nonylphenol 7 (NP7)	7 gün boyunca her gün gavaj yoluyla 100 µl mısır yağında çözdürülerek 50 µl dozda NP ile ovaryum hasarı oluşturulan ve 7 gün sonra sakrifiye edilen grup (50 µl/rat/gün)
Kök Hücre7 (Kh7)	Tek sefer kuyruk veninden $2,5 \times 10^6$ kök hücre verilen ve 7 gün sonra sakrifiye edilen grup
Folik Asit 7 (Fa7)	7 gün boyunca distile suda çözdürülerek gavaj yolu ile folik asit (20 mg/kg/gün) uygulanan ve sakrifiye edilen grup
Nonylphenol+KökHücre 7 (NP+Kh7)	7 gün boyunca 50 µl NP uygulanan ve son uygulama sonrası tek sefer $2,5 \times 10^6$ kök hücre verilen ve 7 gün sonra sakrifiye edilen grup
Nonylphenol+FolikAsit 7 (NP+Fa7)	7 gün boyunca 50 µl NP uygulanan ve son uygulama sonrası gavaj yolu ile folik asit (20 mg/kg/gün) verilen ve 7 gün folik asit uygulaması sonrası sakrifiye edilen grup
Nonylphenol+KökHücre+Folik Asit 7 (NP+Kh+Fa7)	7 gün boyunca her gün gavaj yoluyla 50 µl NP verilen son uygulama sonrası tek sefer kök hücre ($2,5 \times 10^6$) ve 30 dk sonra folik asit (20 mg/kg/gün) uygulanan ve folik asit uygulamasına 7 gün devam edilen ve 7 günün sonunda sakrifiye edilen grup

Tablo 3.1.Devam. Deney Grupları

14 gün tedavi uygulanan ve takip edilen gruplar	
<i>Nonylphenol 14</i> <i>(NP14)</i>	7 gün boyunca her gün gavaj yoluyla 100 µl mısır yağında çözdürülerek 50 µl dozda NP ile ovaryum hasarı oluşturulan ve 14 gün sonra sakrifiye edilen grup (50 µl/rat/gün)
<i>Kök Hücre 14</i> <i>(Kh14)</i>	Kuyruk veninden kök hücre ($2,5 \times 10^6$) verilen ve 14 gün sonra sakrifiye edilen grup
<i>Folik Asit 14</i> <i>(Fa14)</i>	14 gün boyunca gavaj yolu ile folik asit (20 mg/kg/gün) uygulanan ve 14 günün sonunda sakrifiye edilen grup
<i>Nonylphenol+Kök Hücre 14</i> <i>(NP+Kh14)</i>	7 gün boyunca 50 µl NP uygulanan, son uygulama sonrası kök hücre ($2,5 \times 10^6$) verilen ve 14 gün sonra sakrifiye edilen grup
<i>Nonylphenol+Folik Asit 14</i> <i>(NP+Fa14)</i>	7 gün boyunca 50 µl NP uygulanan son uygulama sonrası gavaj yolu ile folik asit (20 mg/kg/gün) verilen ve 14 gün folik asit uygulamasına devam edilen ve 14 günün sonunda sakrifiye edilen grup
<i>Nonylphenol+KökHücre+</i> <i>Folik Asit14</i> <i>(NP+Kh+Fa14)</i>	7 gün boyunca her gün gavaj yoluyla 50 µl NP verilen son uygulama sonrası kök hücre ($2,5 \times 10^6$) ve 30 dk sonra folik asit (20 mg/kg/gün) uygulanan, 14 gün folik asit uygulamasına devam edilen ve 14 günün sonunda sakrifiye edilen grup

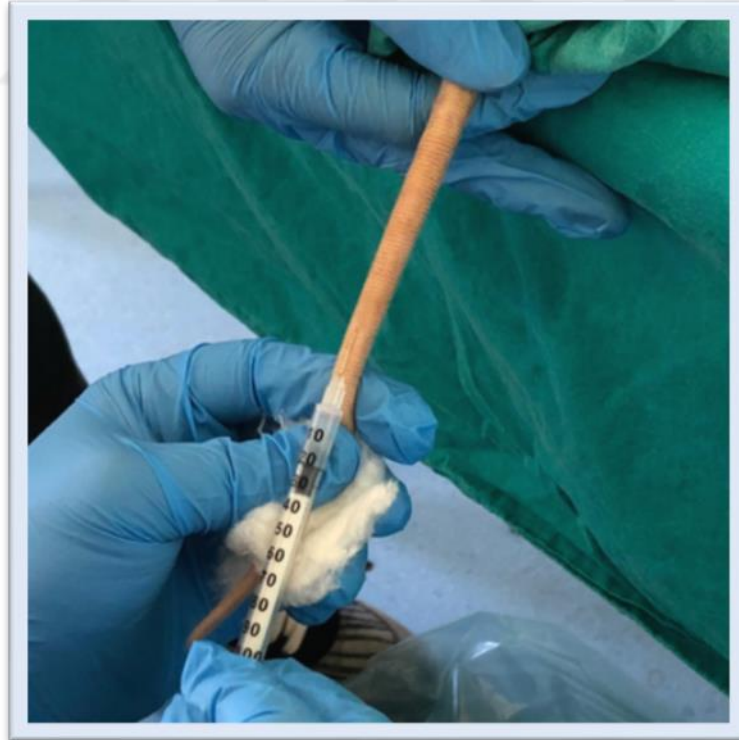
7 gün tedavi uygulanan ve takip edilen gruplar; Kontrol grubundan 5 sıçana herhangi bir uygulama yapılmadı. 7 günlük diğer grupların tedavi süresi sonrası birlikte sakrifiye edildi. NP7 grubuna ait sıçanlara gavaj yoluyla 100 µl mısır yağında çözdürülerek 50 µl dozda NP (toplam 150 µl) gavaj yoluyla verildi (Şekil 3.2) ve ovaryum hasarı oluşturuldu. Son gavaj işleminden 7 gün sonra NP7 grubuna ait sıçanlar sakrifiye edildi. Kh7 grubuna 100 µl DPBS içinde $2,5 \times 10^6$ Kİ-MKH kaudal ven yoluyla i.v. enjeksiyon ile verildi (Şekil 3. 3) ve 7 günün sonunda sıçanlar sakrifiye edildi. Fa7 grubuna distile suda çözdürülen folik asit gavaj yolu ile 20 mg/kg/gün olacak şekilde uygulandı (Şekil 3.4) ve 7 gün uygulamaya devam edildi, son uygulama sonrası sakrifikasyon işlemi gerçekleştirildi. NP+Kh7 grubuna önce 7 gün boyunca 50

$\mu\text{l/rat/gün}$ NP gavaj yolu ile verildi, son NP uygulaması sonrası tek sefer $2,5 \times 10^6$ kök hücre kaudal ven yoluyla i.v. enjeksiyon ile verildi ve 7 gün sonra sakrifiye edildi. NP+Fa7 grubuna ilk önce 7 gün boyunca $50 \mu\text{l}$ NP gavaj yoluyla verildi son uygulama sonrası distile suda çözödürölen Fa gavaj yolu ile 20 mg/kg/gün uygulandı ve 7 gün tedaviye devam edildi. NP+Kh+Fa7 grubuna önce 7 gün boyunca $50 \mu\text{l}$ NP gavaj yoluyla verildi, son uygulama sonrası DPBS içinde $2,5 \times 10^6$ Kİ-MKH kaudal ven yoluyla i.v. enjeksiyon ile verildi 30 dk sonra gavaj yolu ile 20 mg/kg/gün dozda folik asit uygulandı ve folik asit tedavisine 7 gün devam edildi. Son folik asit uygulaması sonrası sakrifikasyon işlemi gerçekleştirildi.

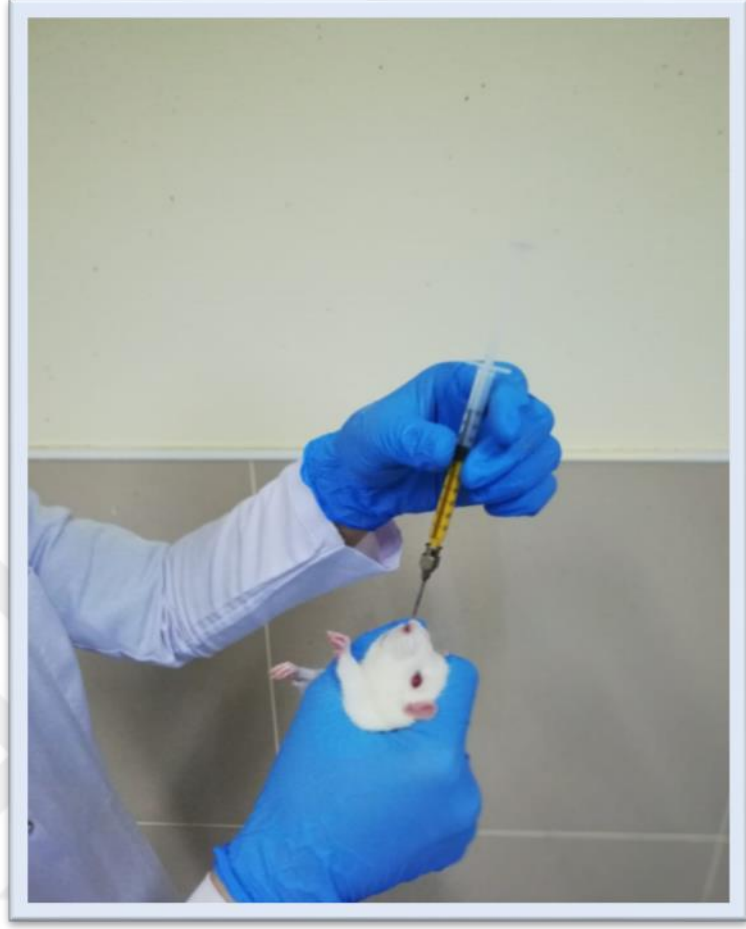
14 gün tedavi uygulanan ve takip edilen gruplar; Kontrol grubundan 5 sıçana herhangi bir uygulama yapılmadı. 14 günlük diğör grupların tedavi süresi sonrası birlikte sakrifiye edildi. NP14 grubuna ait sıçanlara 7 gün boyunca hergün gavaj yoluyla $100 \mu\text{l}$ mısır yağında çözödürölen $50 \mu\text{l}$ dozda NP gavaj yoluyla verildi. Son gavaj işleminden 14 gün sonra NP14 grubuna ait sıçanlar sakrifiye edildi. Kh14 grubuna $100 \mu\text{l}$ DPBS içinde $2,5 \times 10^6$ Kİ-MKH kaudal ven yoluyla i.v. verildi ve 14 günün sonunda sakrifiye edildi. Fa14 grubuna folik asit distile suda çözödürölen gavaj yolu ile 20 mg/kg/gün uygulandı ve 14 gün uygulamaya devam edildi, 14. günün sonunda sakrifikasyon işlemi gerçekleştirildi. NP+Kh14 grubuna önce 7 gün boyunca $50 \mu\text{l}$ NP gavaj yolu ile verildi, son uygulama sonrası tek sefer $2,5 \times 10^6$ kök hücre kaudal ven yoluyla i.v. enjeksiyon ile verildi ve 14. günün sonunda sakrifiye işlemi yapıldı. NP+Fa14 grubuna ilk önce 7 gün boyunca $50 \mu\text{l}$ NP gavaj yoluyla verildi son uygulama sonrası distile suda çözödürölen Fa gavaj yolu ile 20 mg/kg/gün uygulandı ve 14 gün tedaviye devam edildi. Son folik asit uygulaması sonrası sakrifikasyon işlemi gerçekleştirildi. NP+Kh+Fa14 grubuna 7 gün boyunca $50 \mu\text{l}$ NP gavaj yoluyla verildi, son uygulama sonrası DPBS içinde $2,5 \times 10^6$ Kİ-MKH kaudal ven yoluyla i.v. enjeksiyon ile verildi. 30 dk sonra gavaj yolu ile 20 mg/kg/gün dozda Fa uygulandı ve Fa tedavisine 14 gün devam edildi. Son folik asit uygulaması sonrası gruba ait denekler sakrifiye edildi. Deney süreleri sonunda, sıçanlara intraperitoneal (i.p.) yoldan ketamin hidroklorür (40 mg/kg) (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) ve %2 ksilazin hidroklorür (5 mg/kg) (Rompun %2, Bayer, Türkiye) uygulandı ve anestezi sağlandı.



Şekil 3.2. Nonylphenol'ün gavaj ile uygulanması.



Şekil 3.3. Kİ-MKH'lerin kaudal ven yoluyla intravenöz injeksiyon uygulaması.



Şekil 3.4. Folik Asit'in gavaj ile uygulanması.

Steril şartlarda, kardiyak kan örnekleri biyokimya tüplerine alındıktan hemen sonra deneklerin abdominal bölgeleri açılarak ovaryumları alındı. Ovaryum dokuları histopatolojik ve immünohistokimyasal çalışmalar için %10'luk formaldehit tespit solüsyonuna alındı. Biyokimyasal çalışmalar için alınan kan örnekleri 10000 rpm +4°C'de 10 dk santrifüj edildi ve örnekler çalışma gününe kadar -80°C'de saklandı.

NP+Kh7 ve NP+Kh14 gruplarından üçer sıçana 7 gün NP uygulama sonrası PKH26 ile işaretli $2,5 \times 10^6$ Kİ-MKH DPBS içerisinde kaudal venden i.v. enjeksiyon yolu ile verildi. 7 ve 14. günün sonunda ovaryumda varlıkları takip etmek amacıyla deney süreleri sonunda, sıçanlara i.p. yoldan ketamin hidroklorür (40 mg/kg) (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) ve %2 ksilazin hidroklorür (5mg/kg) (Rompun %2, Bayer, Türkiye) uygulandı ve anestezi sağlandı. Deneklerin abdominal bölgeleri açılarak ovaryumları alındı. Cryomatrix kullanılarak bloklandı. Frozen cihazında 5 µm kalınlığında kesitleri alınarak

4^I,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) ile kapatıldı ve Olympus BX51 floresan mikroskobu (Olympus, Tokyo, Japonya) ile görüntülendi.

3.3. Histopatolojik Analizler

Doku Takibi ve Bloklama

Ovaryum dokularına ışık mikroskopik incelemeler yapmak için %10'luk formaldehit solüsyonunda fikse (tespit) edildi ve rutin histolojik doku takibi prosedürü uygulandı. %10'luk formaldehit içerisinde tespit edilen dokular tespit maddesinden arındırılmak amacıyla akan musluk suyunda alındı. Daha sonra artan derecelerde etil alkol serilerinden geçirilerek suyun uzaklaştırılması sağlandı. Sonrasında ovaryum dokularını şeffaflandırmak amacıyla ksilende bekletildi ve dokular etüv içerisinde sıvı parafine alındı. Son olarak over dokuları parafine gömülerek bloklandı. Uygulanan işlemler Tablo 3.2'de verildi. Bloklardan Leica RM 2155 rotary mikrotom (Leica, Nussloch, Almanya) kullanılarak 5 µm kalınlığında seri kesitler alındı.

Kesitlere histopatolojik incelemeler için Masson trikrom (MT) boyama yöntemi ve Hematoksilen&Eozin (H&E) boyama yöntemi uygulandı. Tüm deney gruplarından elde edilen ovaryum kesitlerinde immünohistokimyasal analizler için Anti-Müllerian hormon (AMH), Tümör Nekrosis Faktör Alfa (TNFα), İnterlökin 6 (IL6), Transforming Growth Factor Beta 1 (TGFβ1) immünohistokimyasal boyama yöntemi ve dokudaki apoptotik hücreleri belirlemek amacıyla da terminal deoxynucleotide-transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) immunofluoresan boyama yöntemi uygulandı. DP 70 dijital kamera ile donatılmış Olympus BX51 ışık mikroskobu (Olympus, Tokyo, Japonya) yardımıyla incelenerek değerlendirildi ve grupları temsil eden görüntüler elde edildi.

Tablo 3.2: Doku takip protokolü

Sıra	Solüsyon/Ajan	Süre	Sıra	Solüsyon/Ajan	Süre
1	%10 Formaldehit	72 saat	8	Absolü Alkol	1 saat
2	Musluk suyu	2 saat	9	Absolü Alkol	1 saat
3	%50 Alkol	1 saat	10	Ksilen	20 dk
4	%70 Alkol	1 saat	11	Ksilen	20 dk
5	%80 Alkol	1 saat	12	Ksilen	20 dk
6	%96 Alkol	1 saat	13	Sıvı parafin(60°C)	3 saat
7	Absolü Alkol	1 saat	14	Bloklama	

H&E Boyama Yöntemi: Herbir deneğe ait ovaryum dokusundan alınan seri kesitlerden her 12 kesitte bir tanesi alınarak 2 saat 60°C'lik etüvde bekletildi ve H&E boyama yöntemi uygulandı (Tablo 3.3).

Foliküllerin Morfolojik Sınıflandırması ve Sayımı

H&E boyama sonucunda folikül rezervinin belirlenmesi için ışık mikroskobu altında folikül sayımları yapıldı. Ovaryum korteksinde çekirdeği belirgin olarak ayırt edilebilen *primordiyal, primer, preantral, sekonder ve tersiyer foliküller* H&E boyama yöntemi uygulanmış kesitlerde ayrı ayrı sayıldı. Foliküller değerlendirilirken granüloza hücre şekli ve hücre katman sayısı göz önüne alındı. Bozulmuş granüloza hücreleri ve oosit içeriyorsa *atretik folikül* olarak değerlendirildi ve foliküller sınıflandırmaya uygun olarak sayımı gerçekleştirildi.

Tablo 3.3. Hematoksilen&Eozin Boyama Yöntemi

Sıra	Solüsyon/Ajan	Süre	Sıra	Solüsyon/Ajan	Süre
1	Ksilen-I	20 dk	12	Akarsu	5 dk
2	Ksilen-II	20 dk	13	%50 Alkol	1dk
3	Absolü Alkol	5 dk	14	%70 Alkol	1 dk
4	%96 Alkol	5 dk	15	%80 Alkol	1 dk
5	%80 Alkol	5 dk	16	%96 Alkol	1 dk
6	%70 Alkol	5 dk	17	Absolü Alkol	1 dk
7	%50 Alkol	5 dk	18	Absolü Alkol	1 dk
8	Akarsu	10 dk	19	Ksilen-I	15 dk
9	Hematoksilen	3-8 dk	20	Ksilen-II	15 dk
10	Akarsu	5 dk	21	Ksilen-II	15 dk
11	Eozin	3-5 dk	22	Kapatma	

MT Boyama Yöntemi: Parafin bloklardan alınan kesitler 60⁰C’lik etüvde 2 saat bekletilerek parafinin erimesi sağlandı. Sonrasında lamalar 3 ayrı kapta bulunan ksilenlerin her birinde 10 dk bekletildi. Azalan etil alkol serilerinin her birinde 5 dk bekletildi. Akan suya alınarak deparafinizasyon işlemi tamamlandı ve Masson trikrom boyama metodu uygulandı (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. Masson Trikrom Boyama Yöntemi

Sıra	İşlem	Süre	Sıra	İşlem	Süre
1	Hematoksilen	3-8 dk	11	Distile Su	5 dk
2	Akan Musluk Suyu	5 dk	12	%50 Alkol	1dk
3	Asit alkol	30 sn	13	%70 Alkol	1dk
4	Akan Musluk Suyu	5 dk	14	%96 Alkol	1dk
5	Asit fuksin	1-2 dk	15	Absolu Alkol I	1dk
6	Distile Su	5 dk	16	Absolu Alkol II	1dk
7	Fosfomolibdik asit	5 dk	17	Ksilen I	20 dk
8	Anilin blue solüsyonu	2-5 dk	18	Ksilen II	20 dk
9	Distile Su	5 dk	19	Ksilen III	20 dk
10	%1'lik asetik asit	2 dk	20	Kapatma	

3.4. İmmunohistokimyasal Analizler

Deney gruplarına ait over kesitlerinde, ovaryum follikülogenezisi ve atrezisinde önemli rol oynayan TGF β 1'in ekspresyonunu göstermek için TGF β 1 (Transforming growth factor antibody- Santa Cruz Biotechnology, Oregon, ABD, -sc-146), ovaryum rezervini değerlendirmek amacıyla AMH (AMH Antibody- Santa Cruz Biotechnology, Oregon, ABD -sc 1667529), inflamatuvar cevabın aktivasyonunda rol oynayan TNF α (Tümör Nekrosis Faktör Alfa Antibody Abcam, Massachusetts, USA, cat no: bs-6434R) ve inflamatuvar olaylarda sitokin kaskadını harekete geçirmede rol oynayan IL6 ekspresyonunu değerlendirmek amacıyla IL6 (İnterlökin 6 Antibody, Bioss, Massachusetts, USA, bs-0782R) primer antikörleri kullanıldı. İmalatçı firmaların talimatlarına uyularak kesitlerin dilüsyon oranları belirlendi. Avidin-Biotin yöntemi için streptavidin-biotin kiti (Thermo Ultravision Detection System, Fremont, USA, TP-125-HL) kullanıldı ve protokol uygulandı.

Parafin bloklardan elde edilen kesitler 60°C'lik etüvde bekletildikten sonra deparafinizasyonu tamamlamak için 3 kez 5'er dk ksilende bırakıldı. Sonra azalan alkol serilerinden 3'er dk geçirilerek, 2 kez 2'şer dk distile suda bekletildi. Endojen peroksidaz aktivitesi bloke etmek için 12 dk süreyle %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) uygulandı ve PBS (Phosphate Buffer Saline) (pH: 7.4) ile yıkandı. Doku içerisindeki reseptör bölgelerinin açığa çıkarılmasını sağlamak amacıyla mikrodalga fırında sitrat tamponuna etkin bırakıldı. Oda sıcaklığında soğutulduktan sonra thermo ultravision detection system boyama kiti kullanılarak sırasıyla talimatlar takip edildi. Lamlar PBS ile yıkandıktan sonra özgün olmayan bağlanmaların engellemek amacıyla 5 dk Ultra V Block ile muamele edildi. Bloklama aşamasının ardından kesitler yıkanmadan TGFβ1 (1:200), AMH (1:150), IL6 (1:200) ve TNFα (1:150) primer antikoru ve negatif kontrol için primer antikor yerine PBS damlatıldı. Lamlar 1 gece +4°C de bekletildi ardından 1 saat oda sıcaklığında bekletilerek PBS ile yıkandı ve sonra 10 dk biyotinli sekonder antikorda bekletildi. Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra dokular 10 dk streptavidin peroksidaz enzim kompleksinde bekletildi. Yıkama sonrası immunreaktiviteyi görünür hale getirmek için 3,3' diaminobenzidin (DAB) (DAB Plus substrate system, Thermo Scientific, Fremont, USA) ile 1-5 dk kadar muamele edildi. Sonrasında distile su ile yıkandı. Gill hematoxilen ile zıt boyama yapıldı ve preparatlar ışık mikroskopunda incelendi. Her bir deneğe ait immünohistokimya boyama metodu uygulanan kesitlerden 40X büyütmede rastgele 10 farklı bölgeden alınan görüntüler ölçüme dâhil edildi ve tüm gruplar için IL6, TNFα ve TGFβ1 immunoreaktivite yoğunlukları Image J software programı kullanılarak değerlendirildi ve sonuçlar kaydedildi. AMH primer antikoru ile gerçekleştirilen immünohistokimya boyama metodu uygulanan kesitlerde ise primer folikül, preantral folikül ve sekonder foliküllerde AMH immunoreaktivite yoğunlukları ölçüldü ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.5. TUNEL immunofluoresan boyama yöntemi

Her bir deney grubuna ait sıçanların over kesitlerinde apoptotik hücreleri belirleyebilmek amacıyla TUNEL yöntemi uygulandı. Over dokusu bulunan lamlar deparafinizasyon işlemi sonrası azalan alkol serilerinden geçirildikten sonra ApopTag® Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit (EMD Millipore, Darmstad, Almanya) prosedürü uygulandı. TUNEL reaksiyon karışımı ile 37°C'de nem kamerası içinde 1

saat inkübe edildi. Negatif kontrol için belirlenen doku üzerine PBS damlatıldı, diğer bütün işlemler aynı şekilde uygulandı. Sonrasında dokular 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) ile muamele edildi. Floresan mikroskop (Olympus BX51, Tokyo, Japan) kullanılarak TUNEL pozitif apoptotik hücre sayısını değerlendirebilmek için her dokudan 40X objektifte 10 farklı alandan fotoğraf alındı. Boyama prosedürü sonrası elde edilen dokularda TUNEL pozitif boyanan apoptotik hücreler Image J software programı kullanılarak sayıldı. Veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.6. Biyokimyasal analizler

Deneklere ait kandan elde edilen serumlardan MDA, SOD, CAT, TAS ve TOS düzeyleri belirlendi.

3.6.1. Malondialdehit Düzey Tayini

Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay (ELISA) metodu kullanılarak MDA değerine bakıldı. Bioassay Technology Laboratory marka ticari kiti kullanılarak çalışıldı (MDA ELISA Kit katalog no: E0156Ra). Kit içerisinde çıkan 96'lık plate içindeki her bir kuyucuğa 50 µl standart ve 40 µl örnekler yüklendi. Standartlar hariç bütün örneklerin üzerine 10 µl anti-MDA Ab eklendi. Daha sonra 50 µl streptavidin- HRP eklenerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plate alınarak otomatik yıkama cihazında yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı ve aspire edildi. Bütün örneklerin üzerine 50 µl Substrate Solution A ve sonrasında 50 µl Substrate Solution B eklendi. Tekrar 37°C'de 10 dk inkübe edildi. Son olarak 50 µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon sonlandırıldı ve Thermo scientific (ABD) marka Microplate okuyucu ile 450 nm'de okutuldu.

3.6.2. Katalaz Aktivite Tayini

ELISA metodu kullanılarak CAT değerine bakıldı. Bioassay Technology Laboratory marka ticari kiti kullanılarak çalışıldı (CAT ELISA Kit katalog no: E0869Ra). Her bir kuyucuğa 50 µl standart ve örnek kuyucuklarına 40 µl serum numuneleri yüklendi, örneklerin üzerine 10 µl CAT-antibody yüklendi. Ardından standartlarda dâhil her bir kuyucuğa 50 µl streptavidin- HRP eklenerek 37 °C'de 60 dk inkübe edildi. Daha sonra plate alınarak otomatik yıkama cihazında aspire edildi ve yıkama solüsyonu ile 5 kez

yıkandı. Kuyucuklara 50 µl Kromojen A ve sonrasında 50 µl Kromojen B eklendi, ardından 37 °C 10 dk inkübe edildi. Son olarak 50 µl sonlandırma solüsyonu eklendi ve Microplate okuyucu ile 450 nm’de okutuldu.

3.6.3. Süperoksitdismütaz Aktivite Tayini

ELISA metodu kullanılarak SOD değerine bakıldı. Bioassay Technology Laboratory marka kiti kullanılarak çalışıldı (SOD ELİSA Kit katalog no: E2269Ra). Standart kuyucuklarına 50 µl standart yüklendi. Örnek kuyucuklarına 40 µl numuneler yüklendi. Ardından örnek kuyucuklarına 10 µl anti-SOD eklendi ve her bir kuyucuğa 50 µl streptavidin-HRP eklenerek 37 °C’de 60 dk inkübe edildi. Daha sonra plate alınarak otomatik yıkama cihazında aspire edildi ve yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Ardından 50 µl Substrate solüsyon A ve sonrasında 50 µl Substrate solüsyon B eklenerek 37 °C’de 10 dk inkübe edildi. Daha sonra 50 µl sonlandırma solüsyonu eklendi ve Microplate okuyucu ile 450 nm’de okutuldu.

3.6.4. Total Antioksidan Kapasite Ölçümü

Serum TAS ölçümleri, Rel Assay Diagnostics (Gaziantep, Türkiye) marka kit ile çalışma gerçekleştirildi. Ölçümün prensibi, serum örneklerinde bulunan antioksidanlar tarafından, koyu mavi-yeşil renkli 2,2’-azinobis 3-etil benzotiazolin-6-sülfonat radikalının renksiz ABTS formuna redüklenmesi esasına dayanır (Ames ve ark.,1993). Antioksidanların miktarlarına ve kapasitelerine bağlı olan ABTS redüksiyonunun derecesi, spektrofotometrede 660 nm dalga boyunda renk farkından kaynaklanan absorbans değişikliği ile tayin edilir. Yöntem, “Trolox ekivalanı” olarak adlandırılan ve vitamin E analogu olan stabil bir antioksidan standart çözelti ile kalibre edilir. Ölçüm sonuçları mmol Trolox ekivalent/L olarak ifade edilir (Erel, 2004).

3.6.5. Total Oksidan Kapasite Ölçümü

Serum TOS düzeyleri Rel Assay Total Oksidan Status Test Kiti (Gaziantep, Türkiye) kullanılarak ölçüldü. Prensip Örnekte bulunan oksidanlar, Fe²⁺-o-dianisidine kompleksini Fe³⁺ iyonuna okside eder. Oksidasyon reaksiyonu reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan gliserol molekülleri ile arttırılır. Fe³⁺ iyonu asidik ortamda ksilenol oranj ile renkli bir kompleks yapar. Renk şiddeti, örnekte bulunan oksidan moleküllerin

miktarı ile orantılıdır ve spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Ölçüm hidrojen peroksit ile kalibre edilir ve sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ekivalent/L olarak ifade edilir (Erel, 2005).

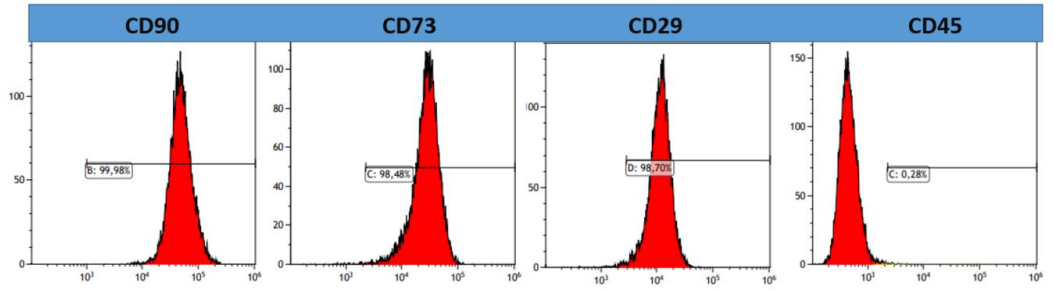
3.7. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi için Prism™ yazılım sürümü 8.0'ı (GraphPadInc., San Diego, CA) kullanıldı. Veriler, analiz türüne göre ortalama $\pm$ SEM (ortalamanın standart hatası) ve Median (quarter 1-quarter 3) olarak yazıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk ve Kolmogrov Smirnov testleri ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren verilerin karşılaştırılması, Bonferroni analizi ile tek yönlü ANOVA kullanılarak gerçekleştirildi. Normal dağılım göstermeyen ikiden fazla grup arasında karşılaştırmaları için Kruskalwallis testleri kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalar için Dunn testi uygulandı. İstatistiksel analiz, $p < 0.05$ ise anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

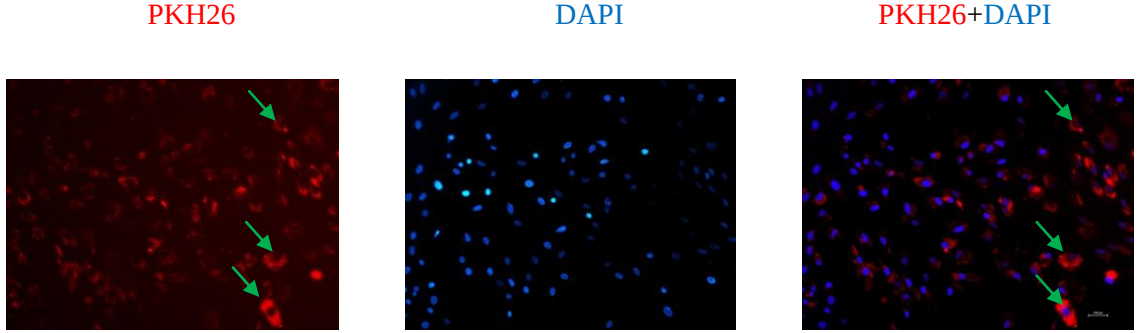
4.1. Kİ-MKH Karakterizasyonu ve Genel Görünümü

Kİ-MKH'lerin akım sitometri analizi sonrasında CD90 %99,98, CD73 %98,48, CD29 %98,70 pozitif eksprese olduğu CD45'in %0.28 ekspresyonla negatif olarak belirlendi (Şekil 4.1). Kök hücrelerin kültürde özelliklerini koruduğu doğrulandı.



Şekil 4.1. Kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücrelerin akım sitometri analizi.

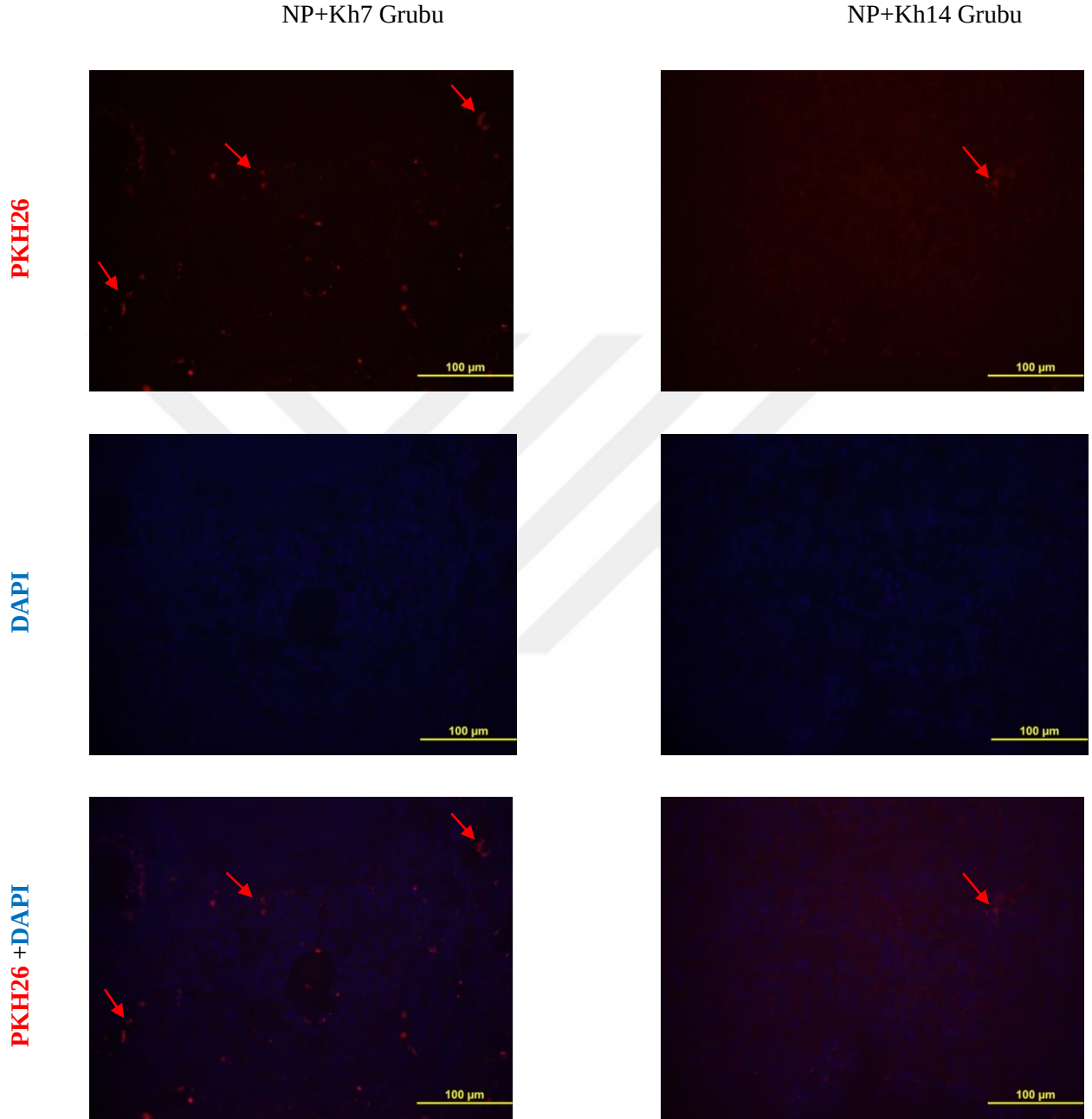
PKH26 ile boyalı hücrelerin floresan mikroskopunda görüntüleri alınarak genel morfolojileri gösterildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. PKH26 ile boyalı hücrelerin görüntüsü. Kırmızı floresan yansımalar pozitif hücreleri ifade etmektedir. DAPI boyaması ile çekirdek belirgin hale getirilmiştir.

4.2. PKH26 ile İşaretli Kİ-MKH'lerin Ovaryumda Yerleşimi

PKH26 ile işaretli Kİ-MKH'lerin NP hasarı sonrası ovaryuma göç ettiğini gösterebilmek amacıyla NP+Kh7 ve NP+Kh14 gruplarına ait ovaryumlardan floresan mikroskobunda görüntüler elde edildi. Kİ-MKH'lerin injeksiyon sonrası 7. ve 14. günde ovaryumda varlıkları ve yerleşimleri gösterildi (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. PKH 26 ile işaretli Kİ-MKH'lerin ovaryumda görüntüleri,  işareti PKH 26 ile işaretli Kİ-MKH hücreleri göstermektedir (X40).

4.3. Morfolojik Bulgular

Bütün gruplara ait ovaryum dokularında H&E ile boyanan kesitlerde, folikül sayımı ve genel histolojik değerlendirme yapıldı. Bağ dokusu alanlarının değerlendirilmesi ise MT boyama yöntemi ile belirlendi.

4.3.1. H&E Boyama Yöntemine Ait Bulgular

Kontrol grubuna ait preparatlarda over dokularının yüzeyi tek katlı yassı epitel ile sarılıydı. Germinal epitelin altında, sıkı bağ dokusu tabakası olan tunika albuginea gözlendi. Tunika albuginea'nın altında zengin bir şekilde selüler bağ dokusu içerisine gömülü ovaryum foliküllerini ve korpus luteumu içeren korteks tabakası vardı. Ovaryumun merkezinde ise gevşek bağ dokusu yapısında; kan damarları, sinirler ve lenf damarları içeren medulla yer almaktaydı. Ovaryumun korteks tabakasından farklı sayı ve tiplerden foliküller gözlendi. Primordiyal foliküller, merkezi yerleşim gösteren bir oosit ve tek sıra yassı granüloza hücreleri ile çevrili olması ile ayırt edildi. Primer foliküller daha büyük çapa sahip ve oositin etrafı tek sıra kübik epitel hücreleri ile sarılıydı. Farklı büyüklüklerdeki preantral foliküller merkezde bulunan primer oosit ve bunu çevreleyen çok katlı granüloza hücre tabakası mevcuttu ve granüloza hücreleri arasında herhangi bir antrum mevcut değildi. Oosit ile granüloza hücreleri arasında, zona pellusida belirgindi. Sekonder foliküllerde ise çapı genişlemiş ve çok katlı granüloza hücreleri arasında düzensiz antrumlar mevcuttu. Sekonder foliküllerde folikülün granüloza hücrelerine komşu teka interna yapısı ve bunun dışında daha yoğun bağ dokusu ve damarlardan zengin teka eksterna ayırt edildi. Tersiyer folikül ise kümülüs ooforusun antruma doğru yaptığı çıkıntı içerisinde bulunan oosit ve zona pellusida çevresindeki kübik hücre tabakasının korona radyatayı oluşturdukları görüldü. Ayrıca ovulasyondan sonra gelişen korpus luteumda granüloza lutein hücreleri, teka lutein hücrelerinden daha iri, poligonal şekilli, veziküler nükleuslu ve daha soluk boyalı sitoplazmalı hücreler olarak izlendi. Teka tabakası ise, korpus luteumun hemen dış kısmında belirgin olarak gözlemlendi. Ovaryumun iç kısmında bulunan medulla bölgesinde folikül yapıları bulunmadığı için bağ dokusu lifleri ve kas demetleri daha net ayırt edildi ve kortekse göre az sayıda hücre bulunmasına karşın damarlanmanın fazla olduğu görüldü. Hücreleri bazofilik boyanmış olup, çekirdekleri merkezi yerleşimli olarak izlendi. NP grubuna ait kesitlerde normal histolojik yapının bozulduğu, vasküler konjesyon ve foliküler dejenerasyon gibi patolojik bulgulara rastlandı. Kan

damarlarında genişleme ve bazı alanlarda hemoraji bulgularına rastlandı. Kortekste zona pellusidası tam olarak belirgin olmayan dejenere oosit ve genel olarak düzensiz şekilleri ile ayırt edilen oldukça fazla sayıda atretik folikül izlendi. Fa7, Fa14, Kh7 ve Kh14 gruplarına ait görüntülerde ovaryum normal histolojik yapısına uygundu. Ovaryumda atrezi, fizyolojik bir süreç olduğundan bu grubuplara ait kesitlerde de az sayıda atretik foliküller gözlemlendi. NP+Fa7 ve NP+Fa14 gruplarına ait ışık mikroskopik incelemelerde özellikle medulla bölgesinde genişleme yapmış damarlar dikkat çekiciydi ve NP7 ve NP14 grupları ile kıyaslandığında patolojik bulgularda iyileşme gözlenmedi. Ancak ovaryum korteksinde atretik foliküllere daha az rastlandı. NP+Kh7 ve NP+Kh14 gruplarında atretik foliküller, sekonder ve primer foliküller gözlemlendi. NP+Kh+Fa7 grubuna ait kesitlerde atretik ve sekonder foliküller, medulla bölgesi ise NP gruplarına oranla daha düzenli olmasına rağmen, NP+Kh+Fa14 grubu hem medullar bölge hemde korteks bölgesi kontrol grubuna benzerdi (Şekil 4.4, Şekil 4.5).

Folikül Sayımı

Tüm deney gruplarına ait deneklerden alınan seri kesitlerden 12 kesitte biri alınarak H&E ile boyanan preparatlar üzerinden sayım gerçekleştirildi. Buna göre, ovaryum yüzeyindeki foliküller, sağlıklı ve atretik olmak üzere iki gruba ayrıldı. Farklı gelişim aşamalarındaki sağlıklı folikül yapılarından sadece çekirdek ve çekirdekçikleri belirgin oosit içeren foliküller değerlendirmeye alındı. Ovaryum korteksinde bulunan primordiyal, primer, preantral, sekonder, tersiyer ve atretik foliküller morfolojik sınıflandırmalarına göre tek tek sayılarak kaydedildi. Sonuç olarak her bir deneğin ovaryumunda bulunan folikül sayıları belirlendi ve böylece deney gruplarına ait ovaryum rezervindeki değişimler karşılaştırıldı.

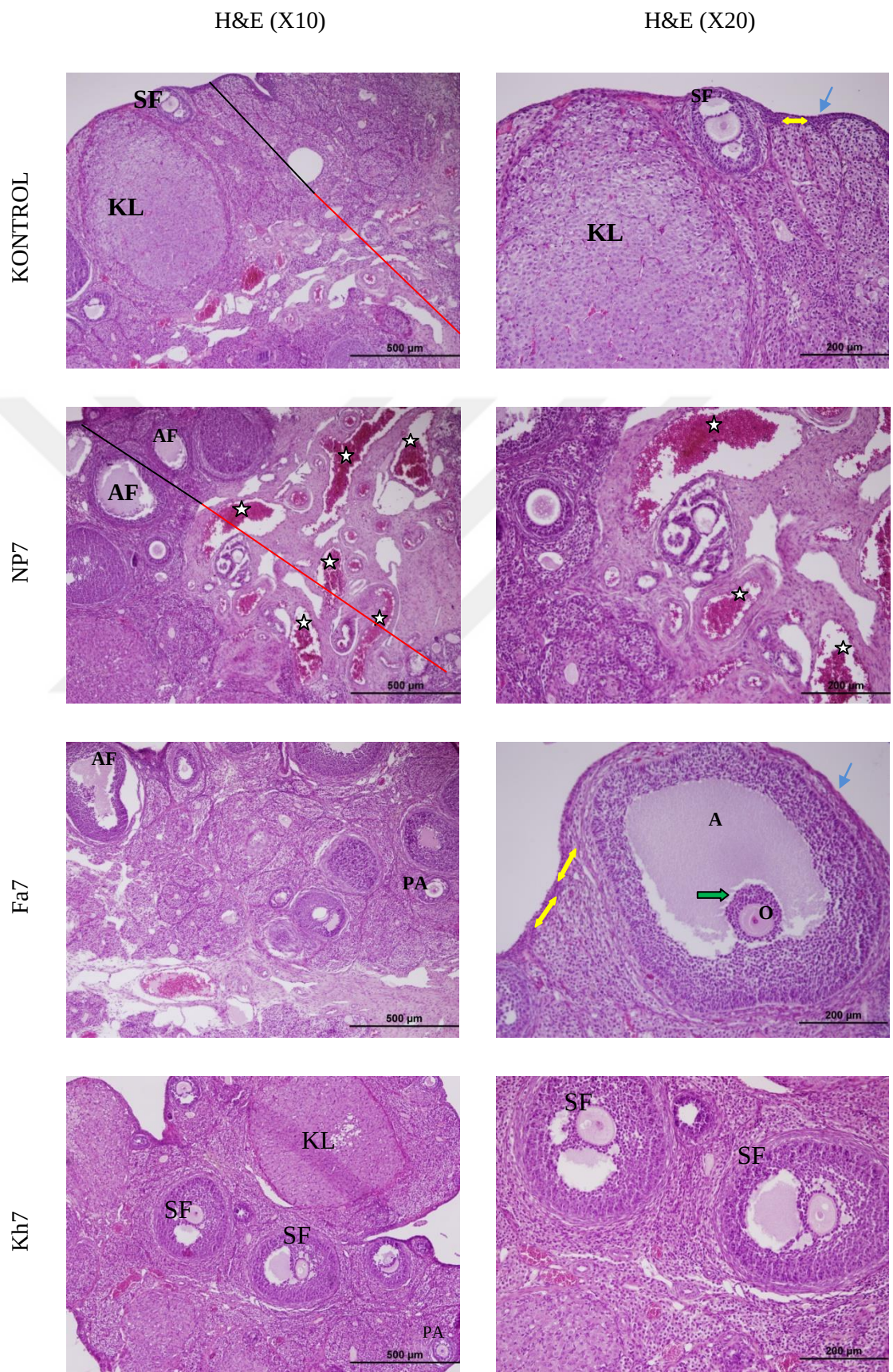
7 gün tedavi ve takip edilen grublardan Kontrol grubunda primordiyal folikül sayısı tüm deney grupları ile karşılaştırıldığında en yüksek iken en düşük primordiyal folikül sayısı NP7 grubuna aitti ve Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derece düşük bulundu ($p<0.05$). NP+Kh+Fa7 primer, preantral, sekonder ve tersiyer folikül sayıları kontrol grubuna en yakın olan tedavi grubuydu. NP uygulaması tüm gruplarda primordiyal, primer, preantral, sekonder ve tersiyer folikül sayılarında azalmaya neden oldu. Atretik folikül sayısı ise NP7 grubunda diğer gruplardan anlamlı derece yüksek bulundu ($p<0.05$) (Tablo 4. 1).

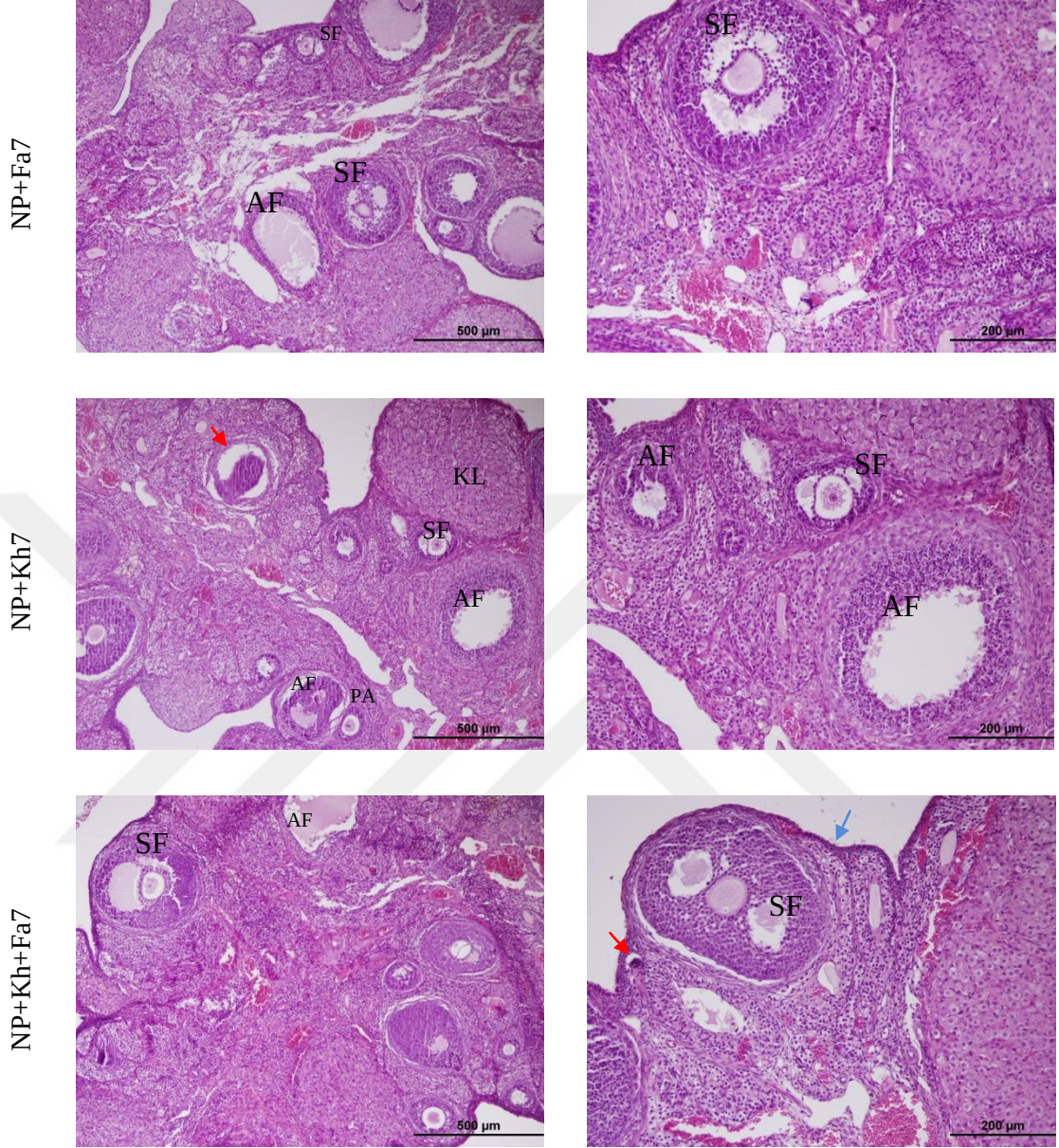
14 gün tedavi ve takip edilen gruplardan NP14 grubu primordiyal folikül sayısı Kontrol grubundan anlamlı derece düşük bulundu ($p<0.05$). NP+Kh+Fa14 grubu primordiyal, primer, preantral, sekonder ve tersiyer folikül sayıları kontrol grubuna en yakın olan tedavi grubuydu. Atretik folikül sayısı ise NP14 grubunda en yüksekti, kontrol grubunda en düşük sayıldı. NP14 grubu atretik folikül sayısı diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı derece yüksekti ($p<0.05$). Atretik folikül sayısının kontrol grubuna en yakın değerde olan NP+Kh+Fa14 tedavi grubuydu (Tablo 4. 2).

Primordiyal, primer, preantral, sekonder ve tersiyer folikül sayıları açısından 7 ve 14 günlük grupların folikül sayım sonuçlarının karşılaştırıldığı grafiklerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7.).

Atretik folikül sayılarının 7 ve 14 günlük gruplarda karşılaştırılması Şekil 4.7.'de gösterildi. NP+Kh7 grubu atretik folikül sayısı NP+Kh14 grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. NP+Kh+Fa7 grubu atretik folikül sayısı NP+Kh+Fa14 grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.05$).

Çalışmamızda tüm denekler toplam folikül sayısı açısından değerlendirildiğinde, sonuçlar Fa ve Kh'nin birlikte uygulandığı gruplarda folikül rezervi açısından sadece Fa ve sadece Kh uygulanan gruplardan daha iyi tedavi edici etkiye sahip olduğunu gösterdi.



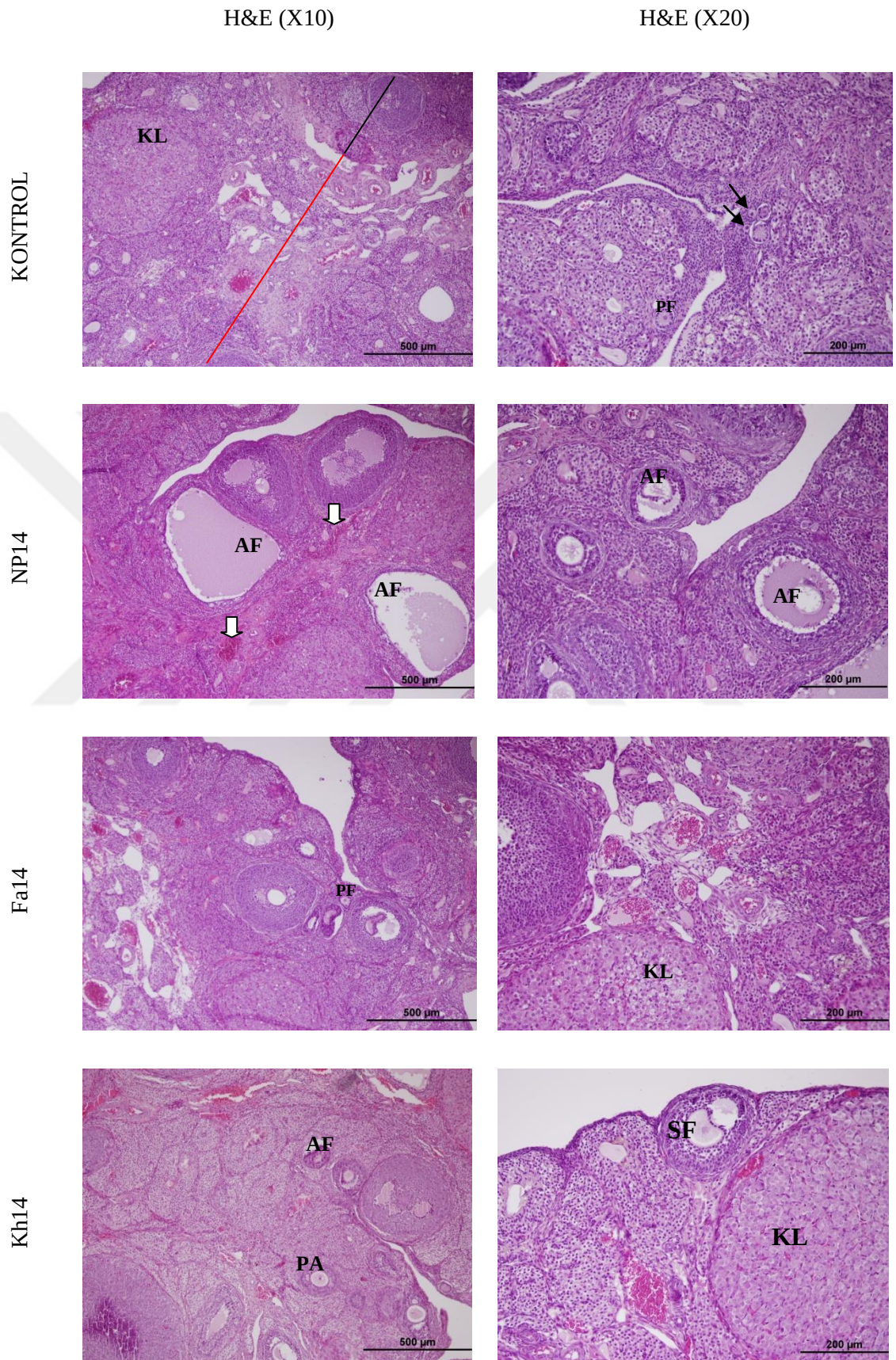


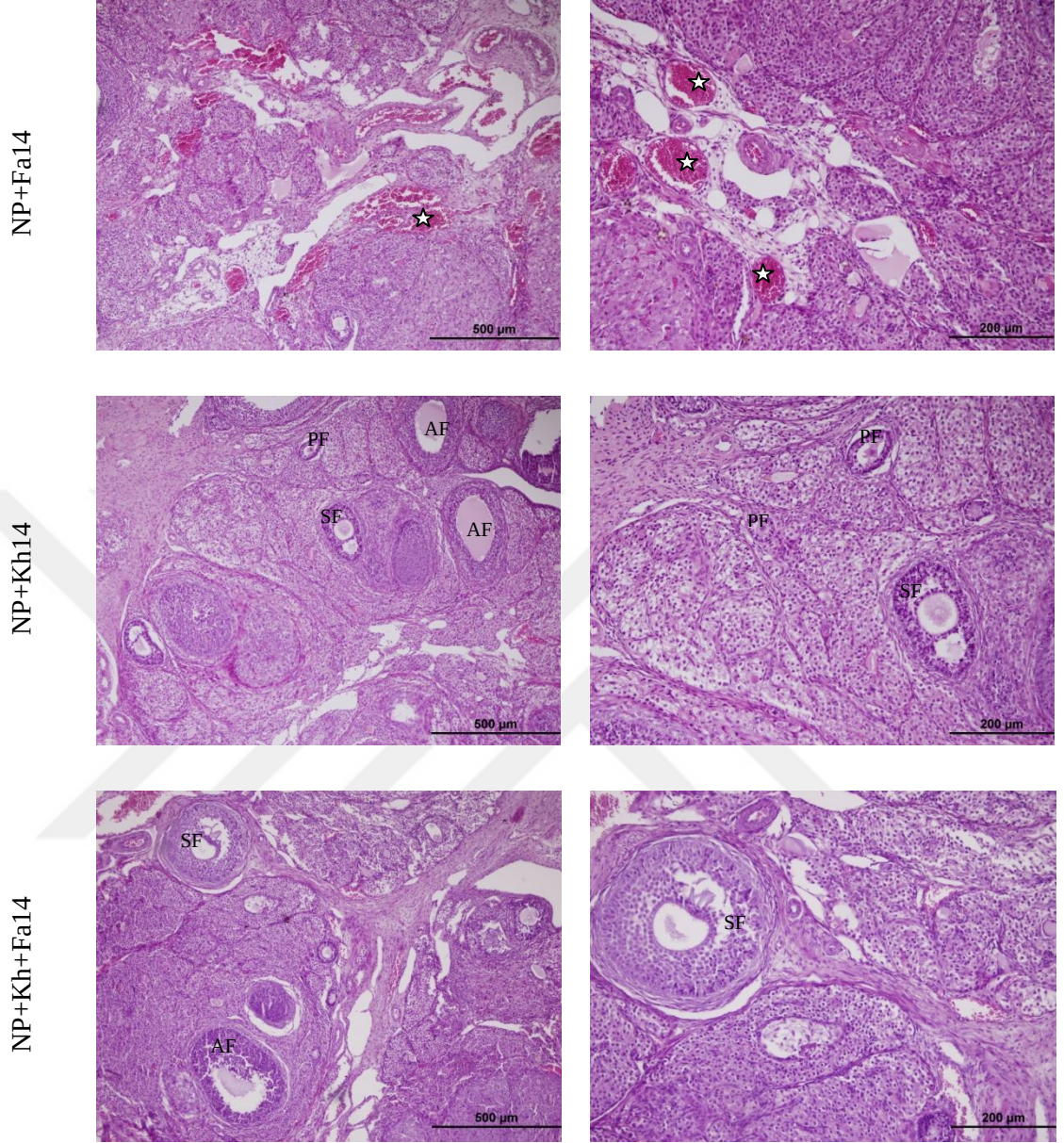
Şekil 4.4. 7 günlük deney gruplarına ait H&E boyama yöntemi uygulanan ovaryum kesitleri (X10 ve X20). Görüntülerde Siyah çizgi korteks, Kırmızı çizgi medulla, Kırmızı ok başı foliküler dejenerasyon, Çift taraflı sarı ok Tunika albuginea, Mavi ok Germinal epitelyum, Yeşil kalın ok Korona radyata, PF primer folikül, PA preantral folikül, SF sekonder folikül, TF tersiyer folikül, AF atretik folikül, KL Korpus luteum, beyaz yıldızlar vasküler konjesyon, A antrum, O oosit göstermektedir.

Tablo 4.1. 7 günlük deney gruplarına ait toplam folikül sayılarının istatistiksel analizi

	Kontrol	NP7	Fa7	Kh7	NP+Fa7	NP+Kh7	NP+Kh+Fa7	p
Primordiyal	(83,60±13,46)a	(45,60±5,94)b	(78,00±16,90)ab	(77,40±13,45)ab	(68,60±28,43)ab	(72,40±10,26)ab	(78,40±20,70)ab	0,7895
Primer	(31,60±7,34)a	(21,00±5,79)a	(30,00±4,36)a	(29,60±3,85)a	(22,60±8,14)a	(24,20±4,66)a	(26,00±4,47)a	0,0448
Preantral	(26,00±7,28)a	(15,20±7,46)a	(20,40±9,02)a	(25,20±9,04)a	(17,00±4,18)a	(19,40±5,18)a	(20,60±6,47)a	0,2047
Sekonder	(20,20±5,50)a	(8,80±2,39)a	(19,40±8,99)a	(19,00±8,34)a	(15,20±6,42)a	(17,00±4,53)a	(18,20±4,09)a	0,0960
Tersiyer	(5,60±1,14)a	(3,80±2,78)a	(5,40±2,70)a	(4,40±2,79)a	(4,20±2,59)a	(6,20±3,03)a	(6,40±3,85)a	0,6808
Atretik	(48,80±18,73)a	(103,2±11,14)b	(68,40±7,77)ac	(67,00±16,76)ac	(83,60±5,03)bc	(81,60±7,27)bc	(72,80±6,87)ac	<0,0001

Veriler ortalama± standart sapma olarak ifade edildi. Aynı satırda yer alan aynı harfler deney grupları arasındaki benzerliği, farklı harfler ise gruplar arasındaki farklılığı ifade etmektedir.



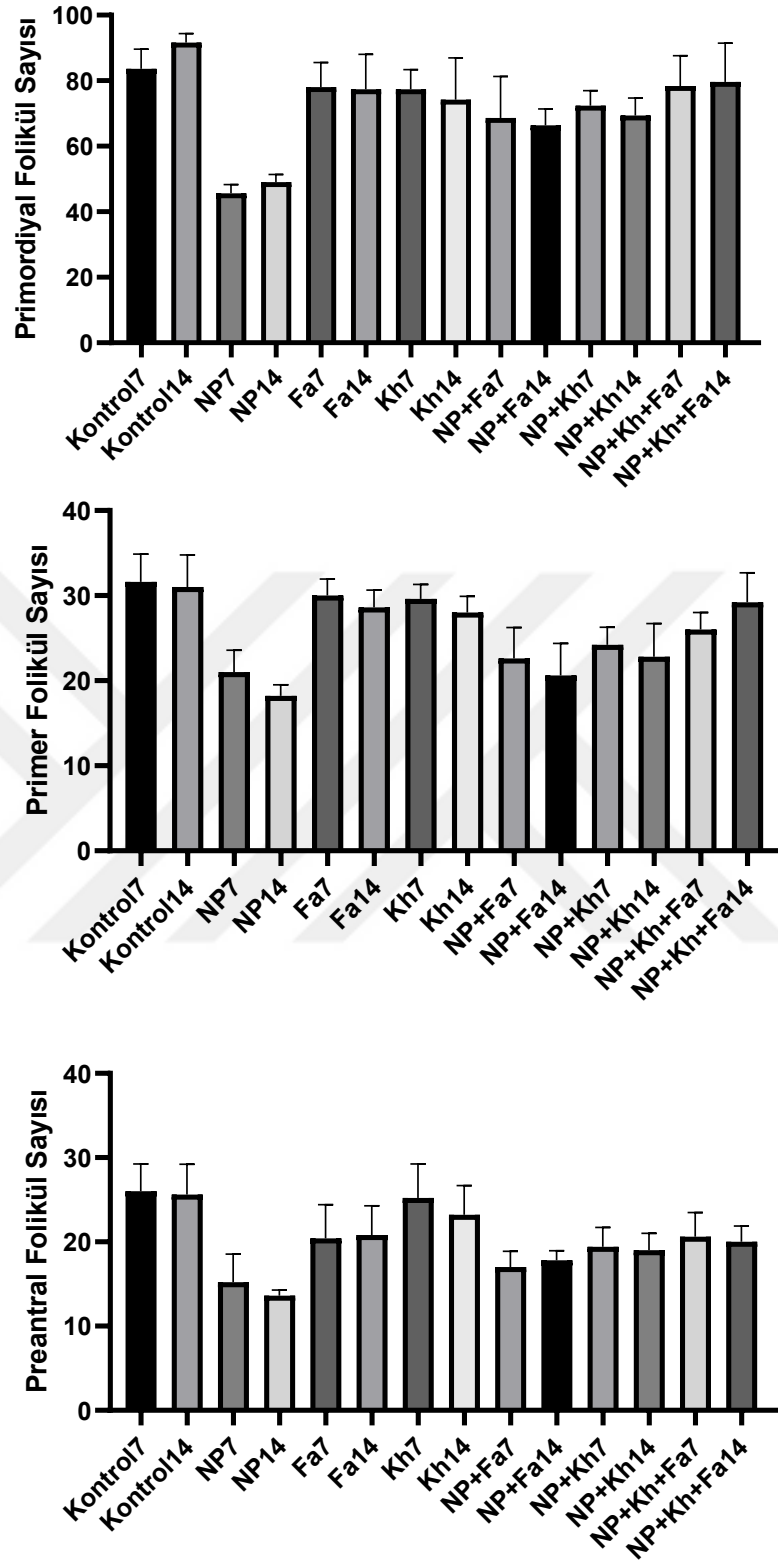


Şekil 4.5. 14 günlük deney gruplarına ait H&E boyama yöntemi uygulanan ovaryum kesitleri (X10 ve X20). Görüntülerde Siyah çizgi korteks, Kırmızı çizgi medulla, Siyah ok primordiyal folikül, PF primer folikül, PA preantral folikül, SF sekonder folikül, AF atretik folikül, KL Korpus luteum, Beyaz yıldızlar vasküler konjesyon, Beyaz kalın ok hemorajik alanlar göstermektedir.

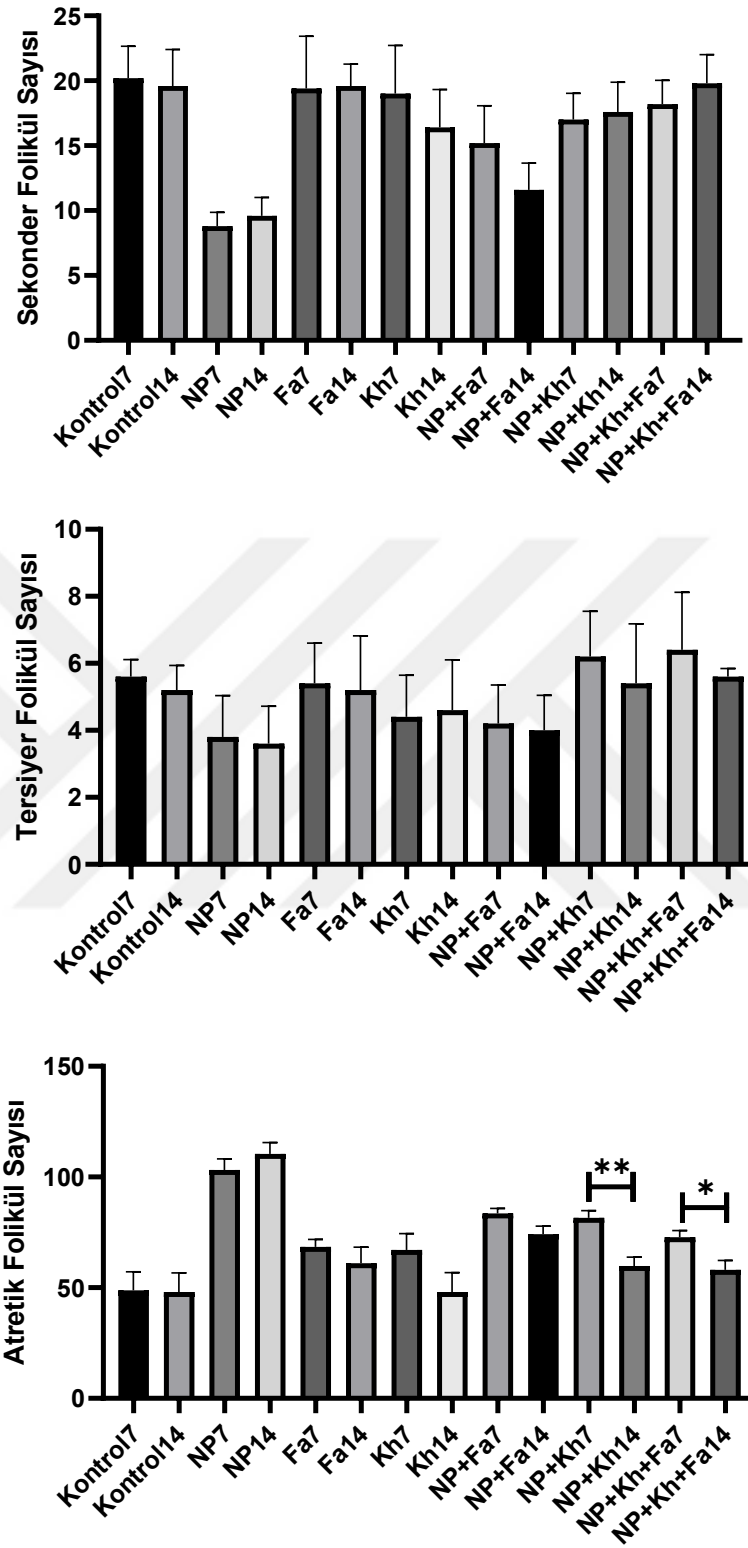
Tablo 4.2. 14 günlük deney gruplarına ait toplam folikül sayılarının istatistiksel analizi

	Kontrol	NP14	Fa14	Kh14	NP+Fa14	NP+Kh14	NP+Kh+Fa14	p
Primordiyal	(91,60±6,27)a	(49,00±5,34)b	(77,40±23,71)ab	(74,20±28,53)ab	(66,40±11,06)ab	(69,40±11,78)ab	(79,60±26,60)ab	0,0447
Primer	(31,00±8,46)a	(18,20±2,95)a	(28,60±4,62)a	(28,00±4,30)a	(20,60±8,44)a	(22,80±8,79)a	(29,20±7,79)a	0,0421
Preantral	(25,60±8,05)a	(13,60±1,52)a	(20,80±7,79)a	(23,20±7,76)a	(17,80±2,59)a	(19,00±4,47)a	(20,00±4,18)a	0,0689
Sekonder	(19,60±6,27)a	(9,60±3,13)a	(19,60±3,78)a	(16,40±6,54)a	(11,60±4,62)a	(17,60±5,13)a	(19,80±4,92)a	0,0126
Tersiyer	(5,20±1,64)a	(3,60±2,51)a	(5,20±3,63)a	(4,60±3,36)a	(4,00±2,35)a	(5,40±3,98)a	(5,60±0,55)a	0,8953
Atretik	(48,00±19,35)a	(110,40±11,4)b	(61,00±16,9)a	(48,00±19,63)a	(74,20±8,20)a	(59,80±9,01)a	(58,00±9,62)a	<0,0001

Veriler ortalama± standart sapma olarak ifade edildi. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler ise gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.



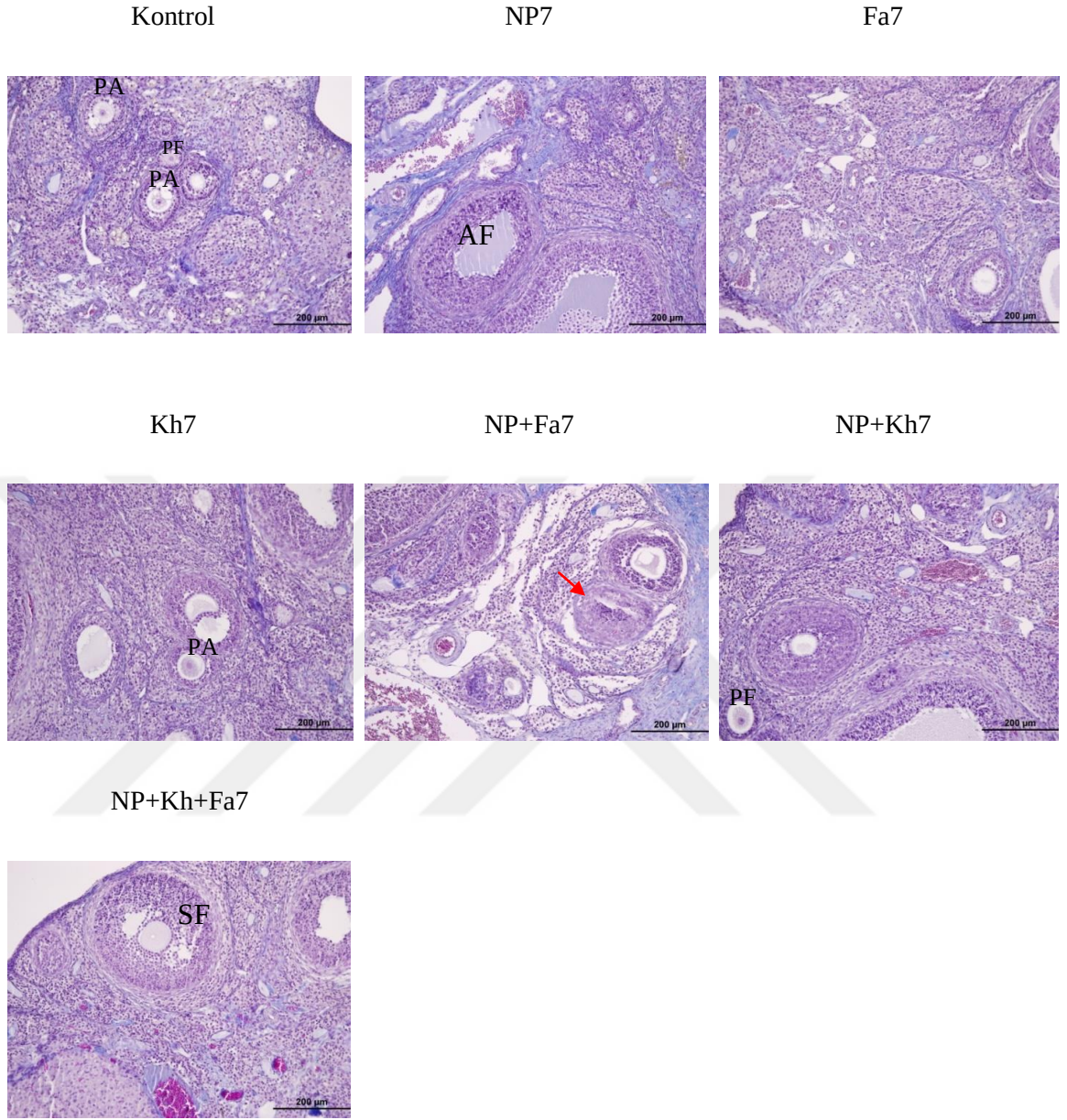
Şekil 4.6. 7 ve 14 günlük deney gruplarında Primordiyal, Primer ve Preantral folikül sayılarının ikili karşılaştırılması.



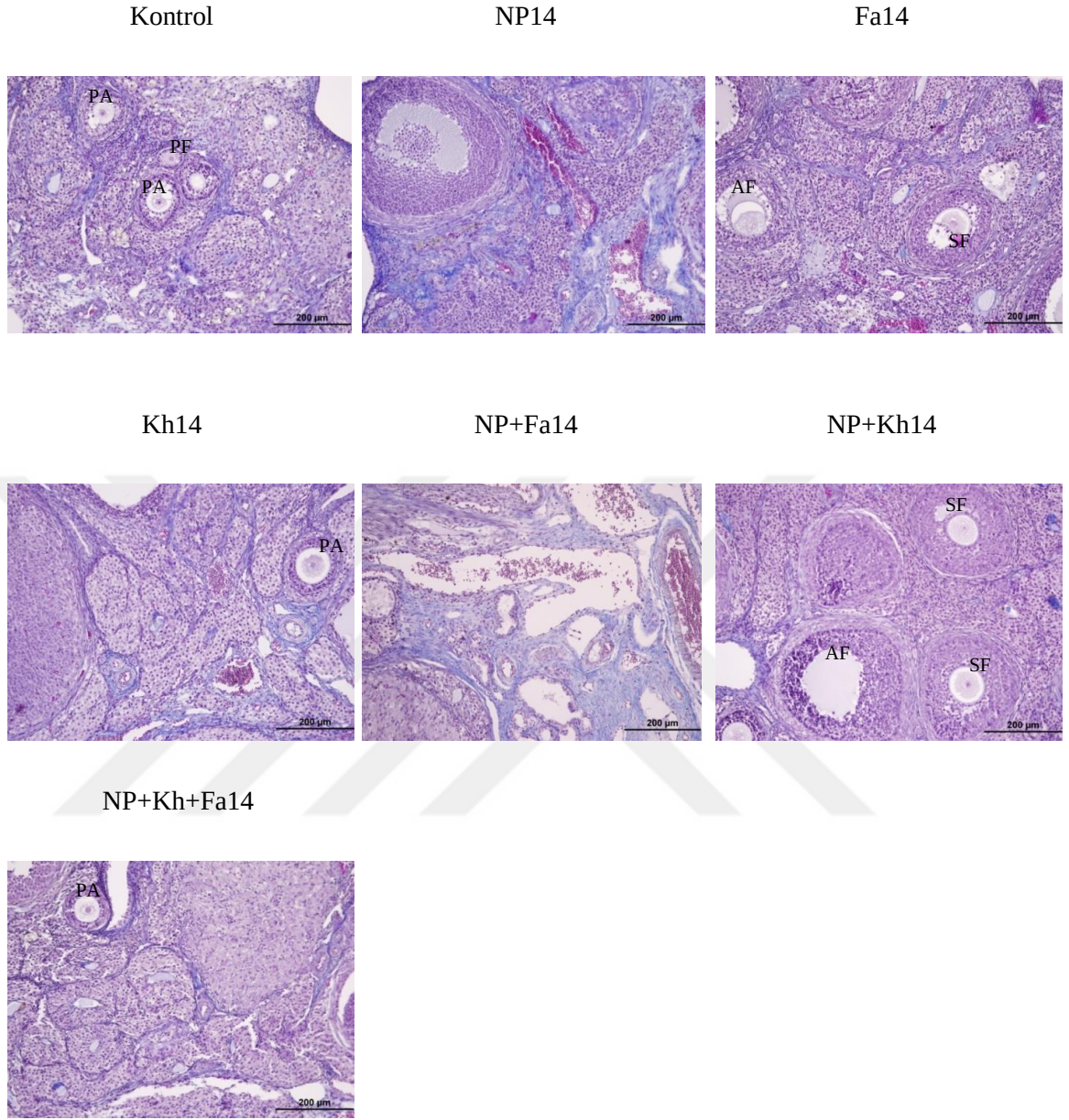
Şekil 4.7. 7 ve 14 günlük deney gruplarında Sekonder, Tersiyer ve Atretik folikül sayılarının ikili karşılaştırılması. İstatistiksel olarak * P < 0,05; **P < 0,01 ifade eder.

4.3.2. MT Boyama Yöntemine Ait Bulgular

Bağ dokusunun genel dağılımını ve kollajen lif oranını belirlemek amacıyla MT boyama metodu uygulandı. MT boyama yöntemi uygulanan kesitlerde kollajen lifler belirgin olup mavi renkli görüntülendi. Kontrol grubuna ait ovaryum stroması ve germinal epitel altında yer alan tunika albuginea yapılarındaki bağ dokusu bileşenleri normal bir mimari sergiledi. NP7 ve NP14 deney gruplarına ait ovaryum örneklerinde diğer tüm deney grupları ile karşılaştırıldığında stromada artan kollajen lif dağılım alanları ve bu alanların düzensiz görüntüsü dikkati çekti. Fa7, Kh7, Fa14, Kh14 gruplarındaki kollajen lif oranı kontrol grubu ile benzerdi. NP+Fa7 ve NP+Fa14 kollajen lif oranları NP7 ve NP14 gruplarına benzerdi. NP+Kh7 ve NP+Kh14 gruplarında ve NP+Kh+Fa7 ve NP+Kh+Fa14 grublarında kollajen lif oranı kontrol grubuna benzerdi (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9).



Şekil 4.8. 7 günlük deney gruplarına ait MT boyama yöntemi ile boyalı ovaryum kesitleri (X20). Görüntülerde mavi boyalı alanlar bağ dokusuna ait alanları göstermektedir. PF primer folikül, PA preantral folikül, SF sekonder folikül, AF atretik folikül, Kırmızı ok foliküler dejenerasyonu ifade eder.



Şekil 4.9. 14 günlük deney gruplarına ait MT boyama yöntemi ile boyalı ovaryum kesitleri (X20). Görüntülerde mavi boyalı alanlar bağ dokusuna ait alanları göstermektedir. PF primer folikül, PA preantral folikül, SF sekonder folikül, AF atretik folikül ifade eder.

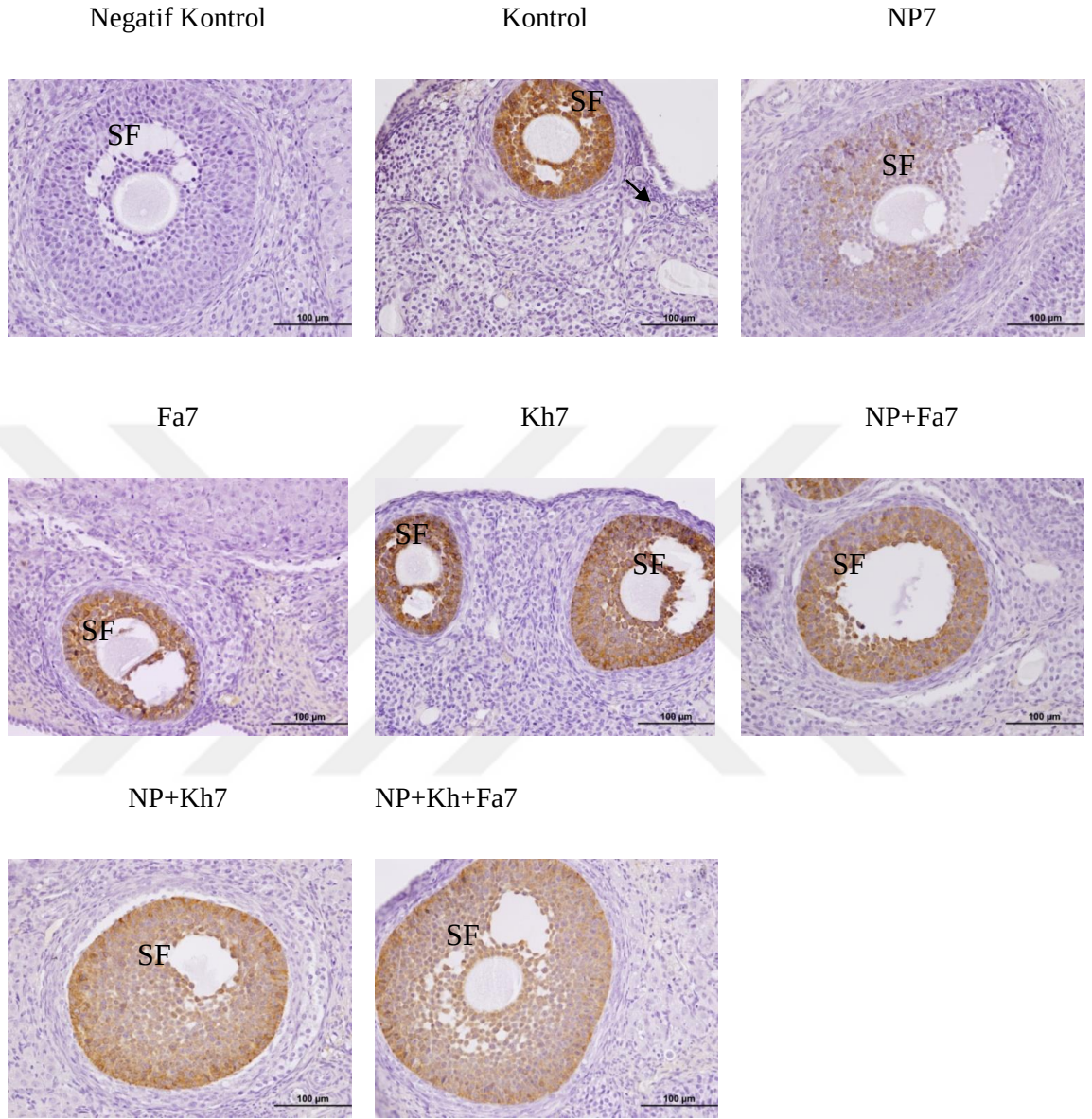
4.4. İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemine Ait Bulgular

4.4.1. AMH

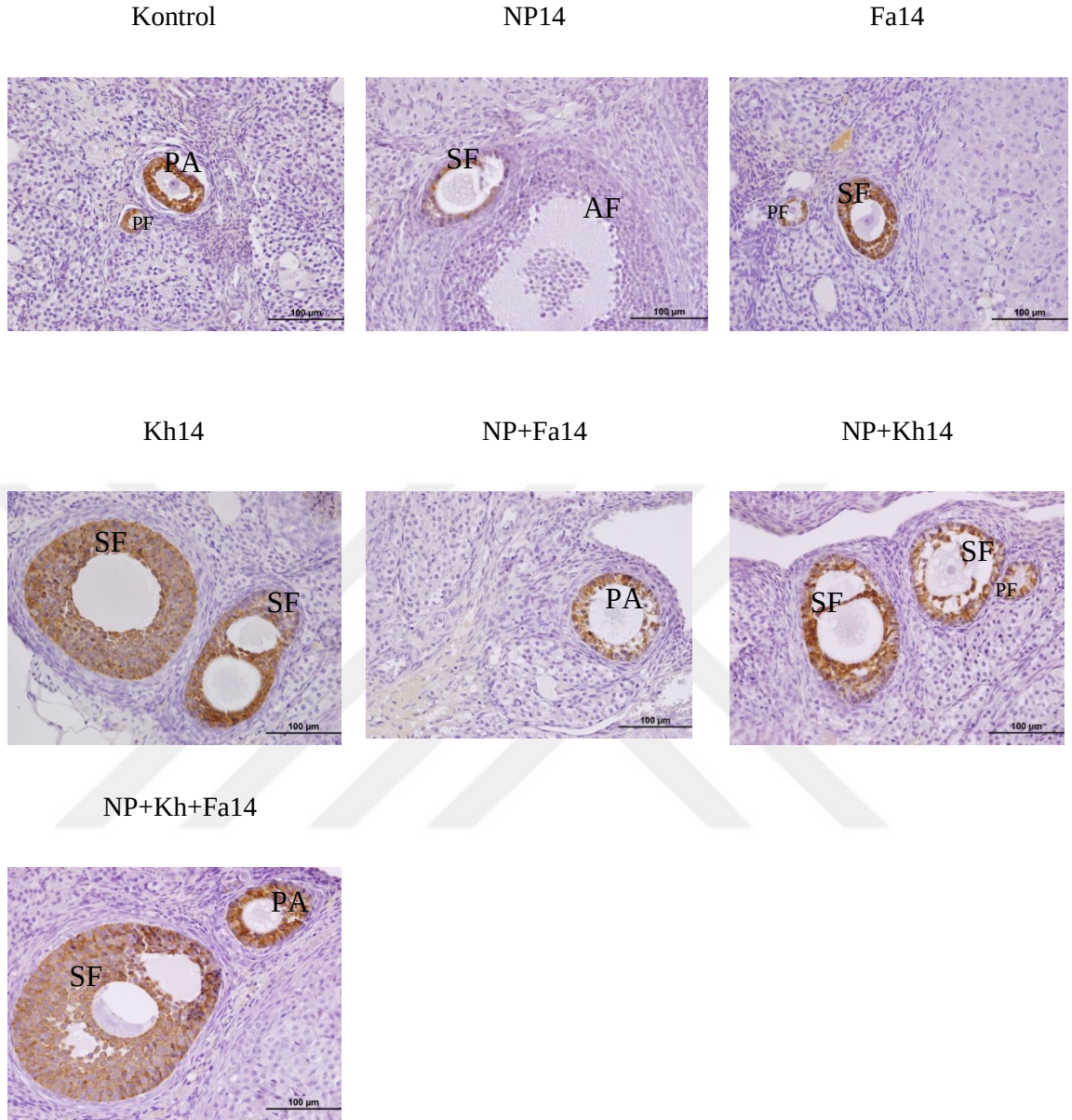
İmmunohistokimyasal yöntem kullanılarak uygulanan DAB kromojeni sonrası ovaryum dokusunda kahverengi reaksiyon veren alanlar AMH varlığını gösteren bulgulardı. Tüm deney gruplarında AMH ekspresyonu granüloza hücrelerinin sitoplazmalarında izlendi, çekirdekler ise negatifti. Kontrol grubuna ait kesitlerde en fazla AMH reaksiyonu primer folikül, preantral folikül ve erken sekonder foliküllerde izlendi. Çapı geniş olan geç sekonder foliküllerde ekspresyon daha azdı. Atretik foliküllerde ise AMH immunreaktivitesi gözlenmedi. Primordiyal foliküllerde de AMH ekspresyonuna rastlanmadı. Negatif kontrol kesitlerinde ovaryuma ait folikül yapıları ve diğer alanlarda herhangi bir AMH immunreaktivitesine rastlanmadı (Şekil 4.10, Şekil 4.11).

7 günlük gruplardan NP7 grubu AMH ekspresyon yoğunluğu primer, preantral ve sekonder foliküllerde en düşük ölçüldü ve diğer gruplara göre anlamlı derecede düşüktü ($p<0,05$). NP+Kh7 ve NP+Kh+Fa7 grupları primer ve sekonder foliküllerde ölçülen AMH ekspresyonu birbirine benzerdi ve NP7 grubuna oranla daha yüksekti (Tablo 4.3.).

14 günlük gruplardan NP14 grupları AMH ekspresyon yoğunluğu primer, preantral ve sekonder foliküllerde en düşük ölçüldü ve bu değer diğer gruplara göre anlamlı derecede düşüktü ($p<0,05$) (Tablo 4.3.). NP+Kh14 ve NP+Kh+Fa14 grupları primer foliküllerinde ölçülen AMH ekspresyonu kontrol grubu ile benzerdi ve NP14 grubuna oranla yüksekti ve NP14 grubundan bu değerler istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi ($p<0,05$). NP+Kh14 ve NP+Kh+Fa14 gruplarında sekonder foliküllerde ölçülen AMH ekspresyon yoğunluğunda ise kontrol grubu ile benzerdi ve NP14 grubundan istatistiksel olarak anlamlı derece yüksek bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4.3.). 7 ve 14 günlük tedavi grupları ikili karşılaştırıldığında ise AMH ekspresyonlarında farklılık izlenmedi (Şekil 4.12).



Şekil 4.10. 7 günlük deney gruplarında AMH ekspresyonu: Negatif kontrol grubunda sekonder folikül (SF), Kontrol grubunda sekonder folikül (SF)- primordiyal folikül (ok), NP7 grubunda sekonder folikül (SF), Fa7 grubunda sekonder folikül (SF), Kh7 grubunda sekonder folikül (SF), NP+Fa7 grubunda sekonder folikül (SF), NP+Kh7 grubunda sekonder folikül (SF), NP+Kh+Fa7 grubunda sekonder foliküllerde (SF) AMH ekspresyonu.



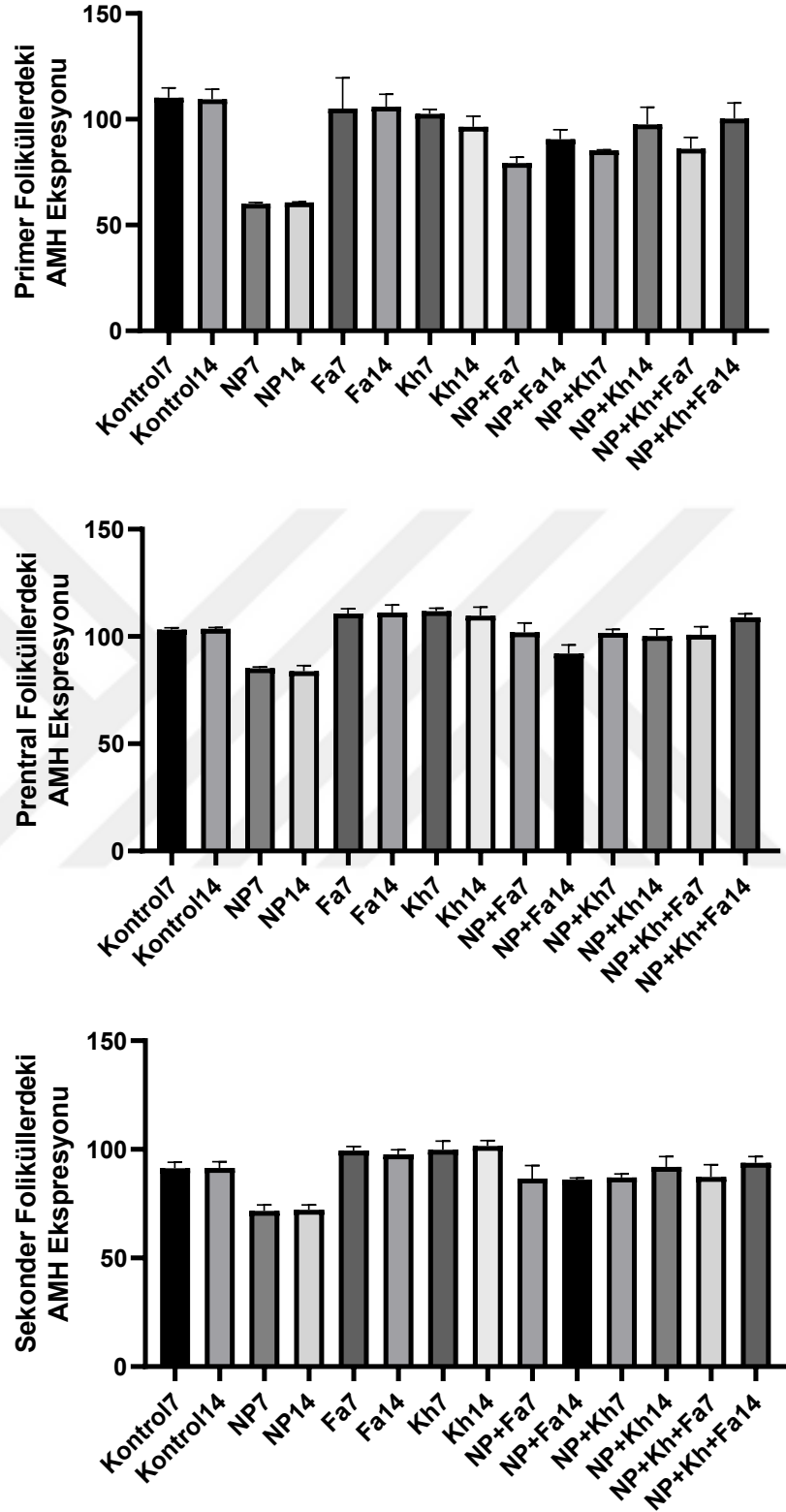
Şekil 4.11. 14 günlük deney gruplarında AMH ekspresyonu: Kontrol grubunda primer folikül (PF)- preantral folikül (PA), NP14 grubunda sekonder folikül (SF)- atretik folikül (AF), Fa14 grubunda primer folikül (PF)- sekonder folikül (SF), Kh14 grubunda sekonder folikül (SF), NP+Fa14 grubunda preantral folikül (PA), NP+Kh14 grubunda primer folikül (PF)- sekonder folikül (SF), NP+Kh+Fa14 grubunda preantral folikül (PA), sekonder foliküllerde (SF) AMH ekspresyonu.

Tablo 4. 3. 7 ve 14 günlük deney gruplarına ait primordiyal, primer, preantral, sekonder foliküllerde AMH immunreaktivite yoğunluğunun istatistiksel analizi

AMH Ekspresyonu	Kontrol	NP7	Fa7	Kh7	NP+Fa7	NP+Kh7	NP+Kh+Fa7	p
Primer	(110,1±8,18)a	(60,08±0,97)b	(105,0±25,29)a	(102,5±3,66)ac	(79,33±5,51)bc	(85,32±0,43)ab	(86,12±11,86)ab	0,0002
Preantral	(103,2±1,86)a	(85,14±1,46)b	(110,7±7,37)a	(111,8±3,34)a	(102,0±9,87)a	(101,7±3,48)a	(100,8±8,42)a	<0,0001
Sekonder	(91,27±7,33)a	(71,64±6,82)b	(99,48±6,32)a	(99,83±12,06)a	(86,56±13,42)ab	(87,00±4,20)ab	(87,33±14,86)ab	<0,0001

AMH Ekspresyonu	Kontrol	NP14	Fa14	Kh14	NP+Fa14	NP+Kh14	NP+Kh+Fa14	p
Primer	(109,5±8,19)a	(60,70±0,51)b	(105,9±13,38)a	(96,47±11,11)a	(90,51±9,15)ab	(97,61±13,97)a	(100,3±16,49)a	0,0012
Preantral	(103,5±1,53)ac	(83,85±4,59)b	(111,1±7,93)c	(109,6±11,49)c	(92,08±8,95)ab	(100,1±8,43)abc	(109,0±3,98)c	0,0001
Sekonder	(91,41±7,67)ac	(72,23±4,89)b	(97,70±6,43)ac	(101,6±7,64)a	(86,08±1,95)bc	(91,95±15,03)ac	(93,76±5,84)ac	<0,0001

Veriler ortalama± standart sapma olarak ifade edildi. Aynı satırda yer alan aynı harfler deney grupları arasındaki benzerliği, farklı harfler ise gruplar arasındaki farklılığı ifade etmektedir.



Şekil 4.12. 7 ve 14 günlük deney gruplarında foliküllerde AMH ekspresyonunun ikili karşılaştırılması.

4.4.2. TNF α , IL6, TGF β 1

İmmün pozitif alanlar immünohistokimyasal boyama prosedüründe DAB kromojeni kullanıldığından dolayı kahverengi olarak izlendi.

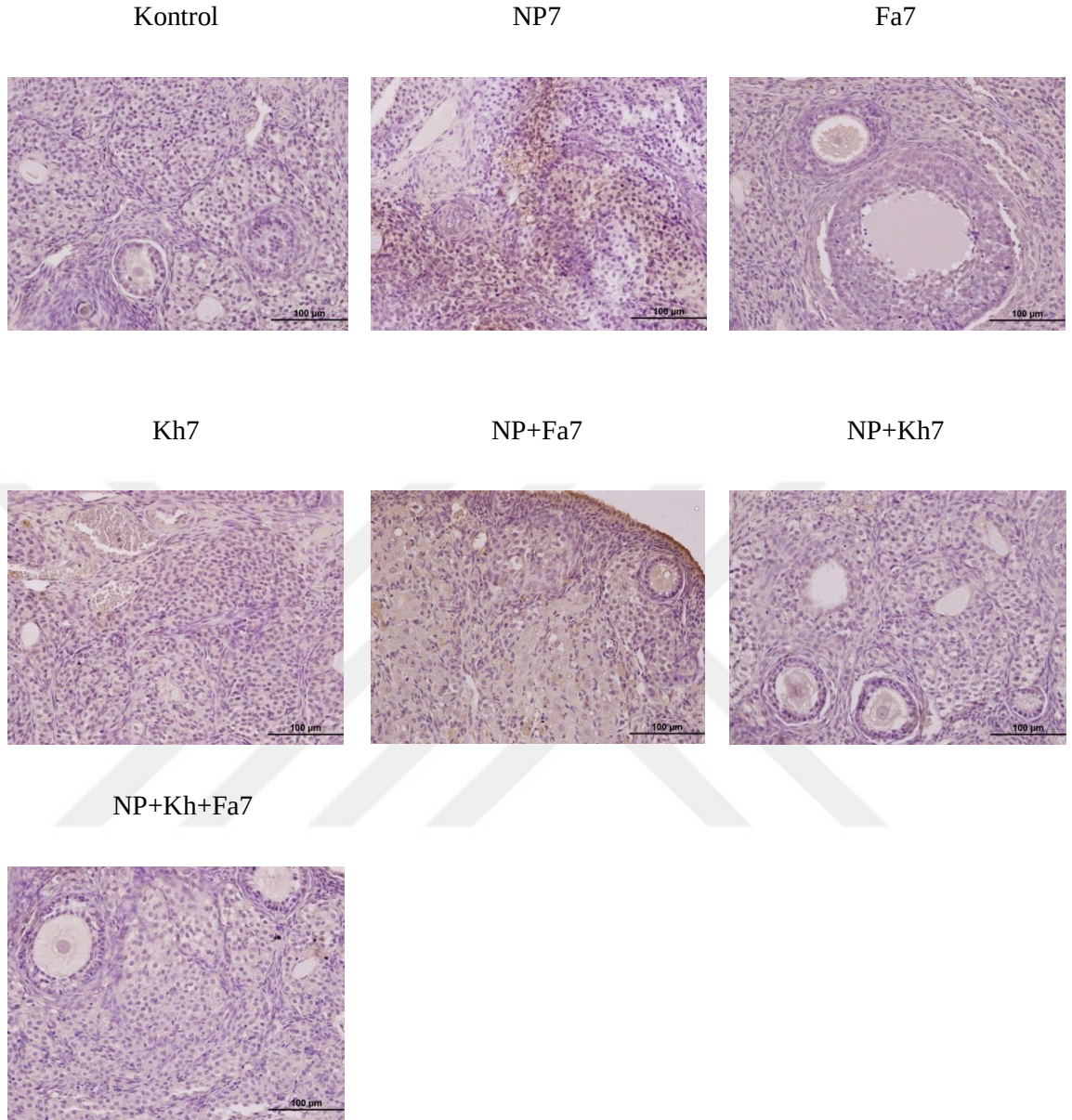
TNF α Ekspresyonu, NP7 ve NP14 gruplarına ait kesitlerde oldukça fazla ve diğer tüm deney gruplarına göre oldukça yoğundu. Özellikle stromal hücrelerde ve granüloza hücrelerinde, foliküler sıvılarda ve germinal epitel tabakasında daha yoğun ekspresyona rastlandı. Kontrol grubu TNF α immünreaktivitesi diğer gruplara oranla oldukça azdı (Şekil 4.13, Şekil 4.14). Fa7, Kh7, NP+Kh7 ve NP+Kh+Fa7 grupları ekspresyon oranları birbirine ve kontrol grubuna benzerdi. NP+Fa7 grubu ekspresyon oranındaki yoğunluk NP7 grubu ile benzerlik gösterdi. NP7 grubu ekspresyon oranı NP+Fa7 grubu dışında diğer tüm gruplardan anlamlı derecede farklıydı ve istatistiksel olarak bu değer anlamlı oranda yüksekti ($p<0.05$) (Tablo 4.4). 14 günlük gruplardan kontrol grubu TNF α immünreaktivitesi NP14 grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktü ($p<0.05$). Fa14, Kh14, NP+Fa14, NP+Kh14 ve NP+Kh+Fa14 grupları ekspresyon değeri birbirine benzerdi ve kontrol grubuna en yakın değer NP+Kh+Fa14 grubuna aitti (Tablo 4.4). 7 ve 14 günlük grupların karşılaştırılması Şekil 4.19'da verilmiştir. Tedavi gruplarının ikili karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi.

IL6 Ekspresyonu, genel olarak hücreler arası ortamda ve korpus luteumu oluşturan hücrelerde yoğun ekspresyon gözlemlendi (Şekil 4.15, Şekil 4.16). 7 günlük gruplardan NP7 grubu IL6 ekspresyonu tüm deney gruplarından yüksekti ve bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

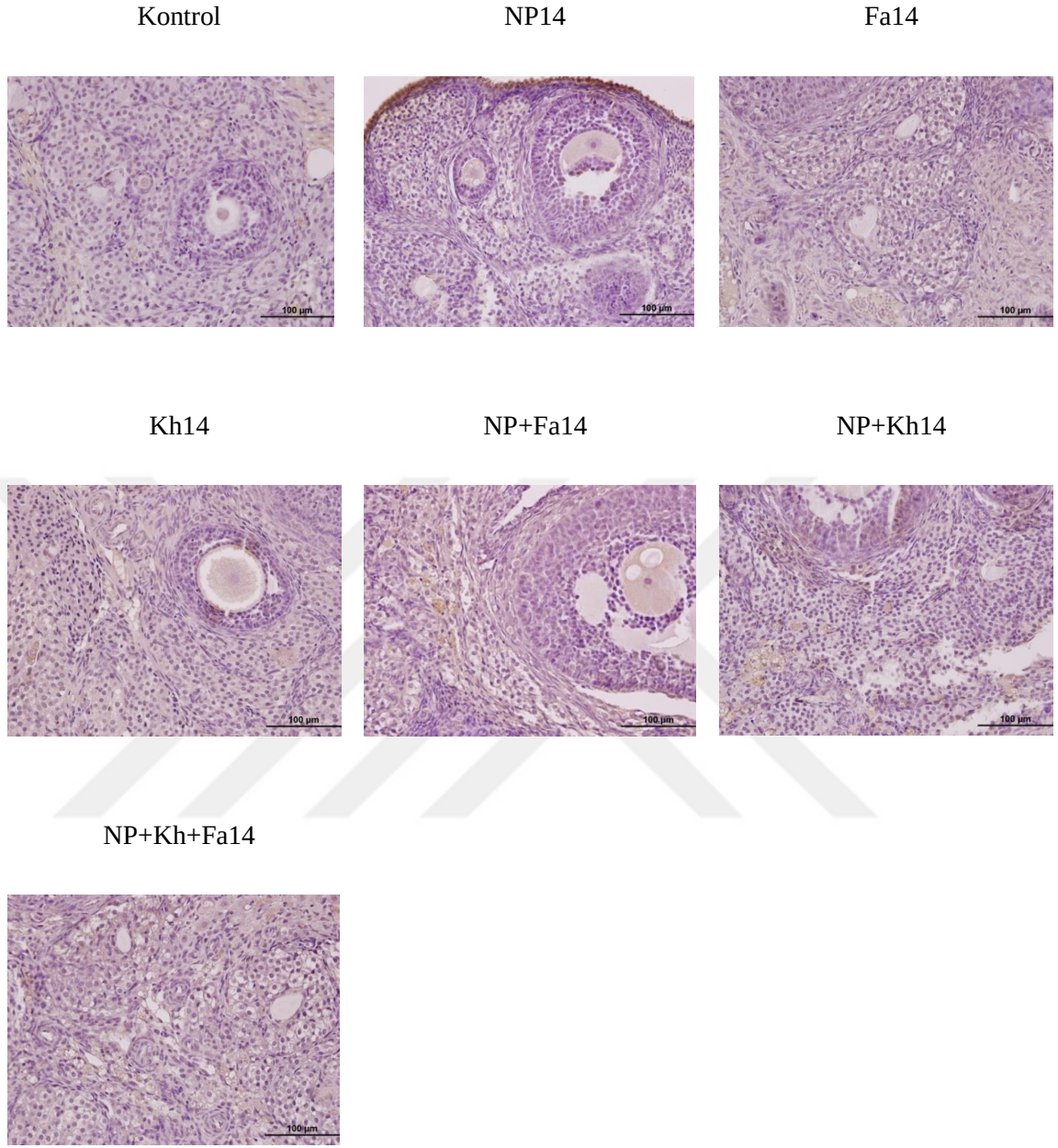
14 günlük gruplardan kontrol, Fa14, Kh14 grupları ekspresyon değeri birbirine benzerdi. NP14 grubu ekspresyon değeri bu gruplardan oldukça yüksekti ve bu değer istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). NP+Fa14 grubu ekspresyon değeri NP14 grubuna yakındı (Tablo 4.4). Kök Hücre uygulanan tedavi grupları (NP+Kh14 ve NP+Kh+Fa14) IL6 ekspresyon değeri, NP+Fa14 grubundan daha düşük olduğu izlendi.

NP+Kh+Fa7, NP+Kh14 ve NP+Kh+Fa14 grupları IL6 ekspresyon değeri kontrol grubuna yakındı (Tablo 4.4). Tedavi gruplarının ikili karşılaştırılmasında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı (Şekil 4.19).

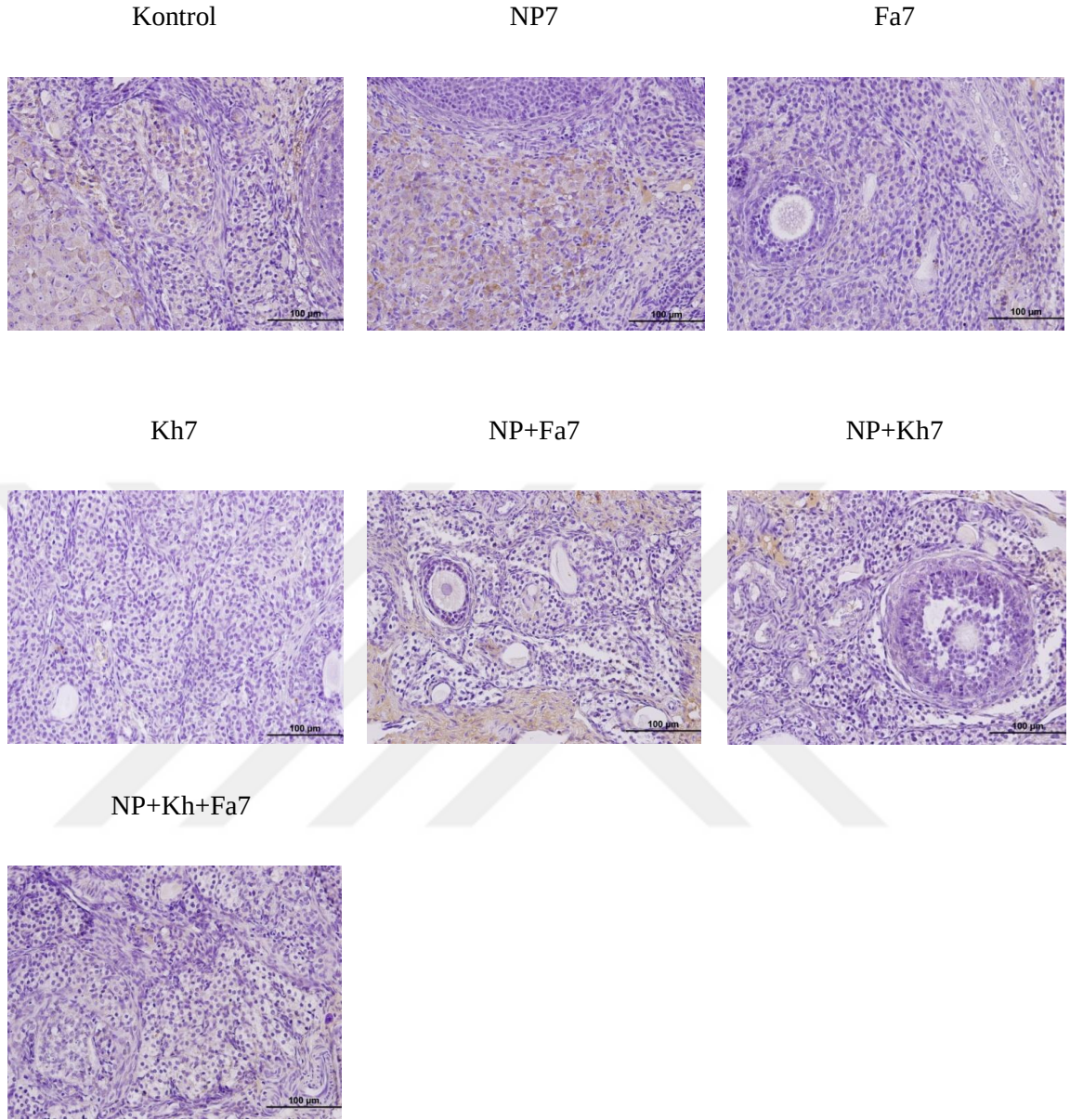
TGFβ1 Ekspresyonu, NP7 ve NP14 gruplarında granüloza hücrelerinde oldukça yoğundu. NP7, NP14, NP+Kh7, NP+Kh+Fa7, NP+Kh14 gruplarına ait kesitlerde stromal alanlarda da ekspresyon gözlendi (Şekil 4.17, Şekil 4.18). Kontrol, Fa7, Kh7, Fa14 Kh14 grupları TGFβ1 ekspresyonu NP7 ve NP14 gruplarına kıyasla oldukça düşüktü. Tüm tedavi grupları arasında NP+Kh+Fa7 ve NP+Kh+Fa14 grupları immünreaktivite yoğunlukları kontrol grubuna daha yakın değerdeydi (Tablo 4.4). NP+Fa7 ve NP+Fa14 grupları ekspresyon değerleri NP+Fa14 grubunda daha yüksekti ve bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlıydı. NP+Kh7 ve NP+Kh14 grupların TGFβ1 ekspresyonu NP+Kh14 grubunda daha düşüktü ve bu düşüş istatistiksel olarak anlamlıydı. NP+Kh+Fa7 ve NP+Kh+Fa14 grupları arasında ise 14 günlük grupta TGFβ1 ekspresyonu daha yüksek bulundu ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı (Şekil 4.19).



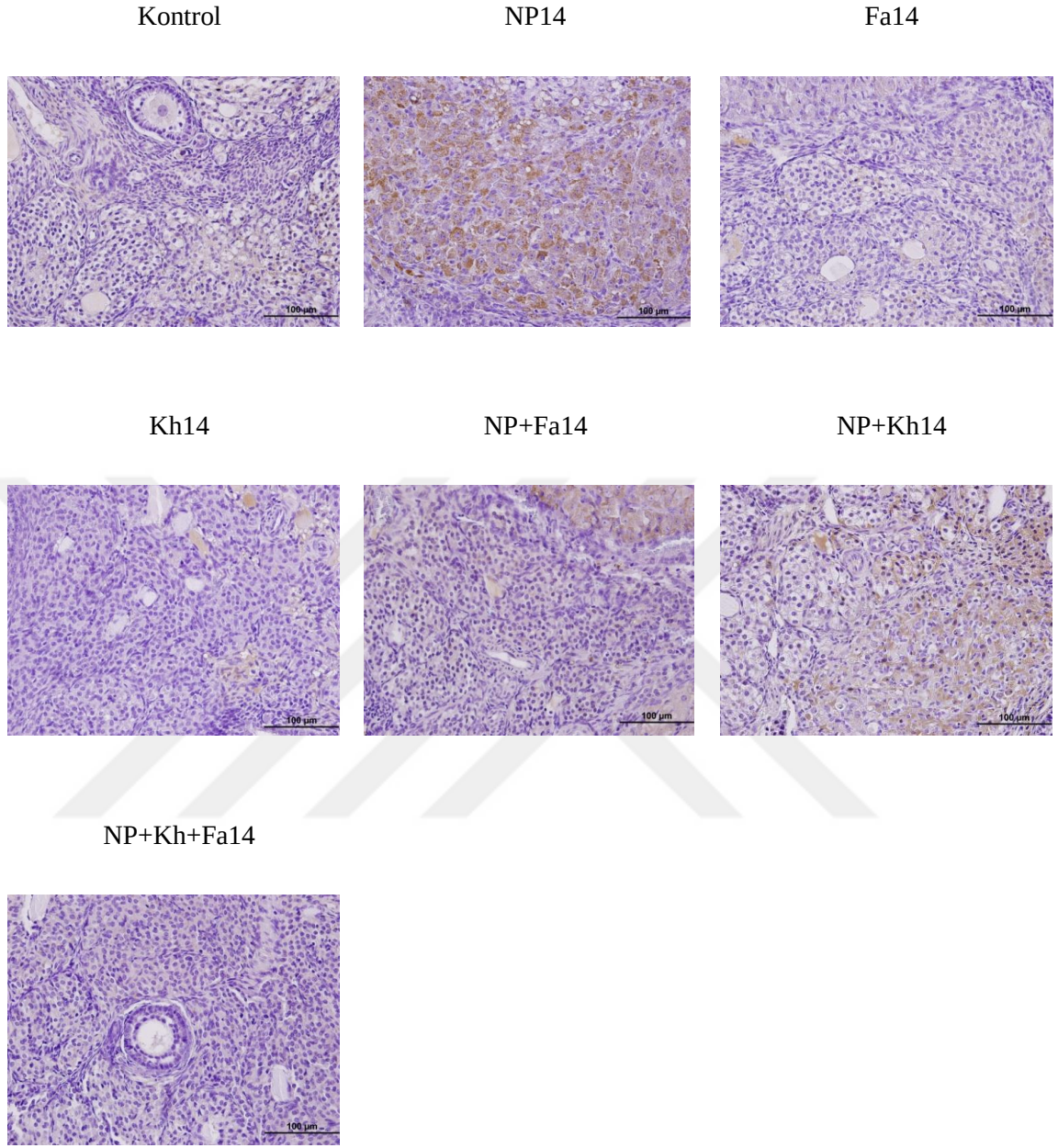
Şekil 4.13. 7 günlük deney gruplarına ait TNF α ekspresyonu: TNF α immunreaktivitesi olan alanlar kahverengi reaksiyon göstermektedir (X40).



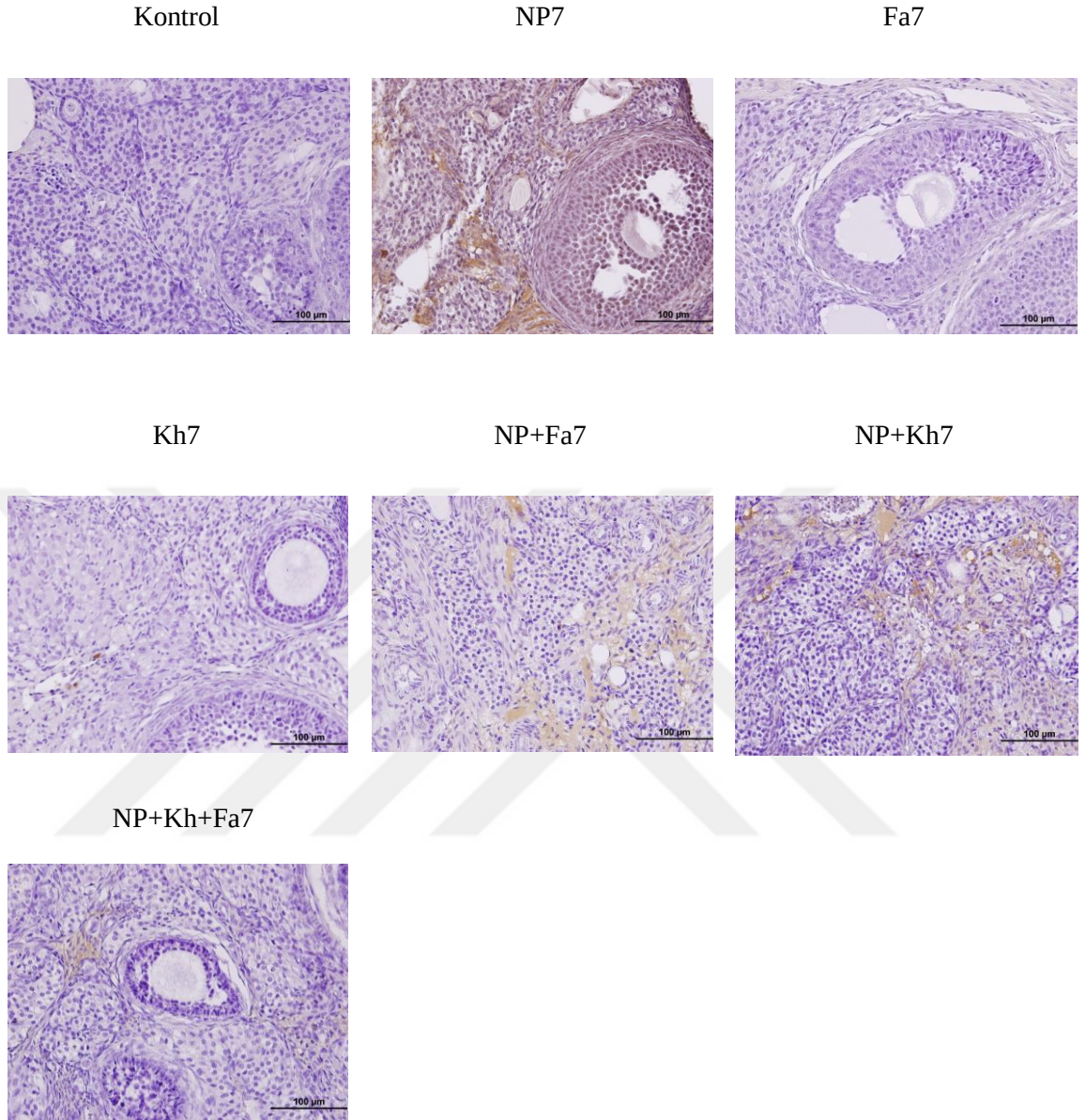
Şekil 4.14. 14 günlük deney gruplarına ait TNF α ekspresyonu: TNF α immunreaktivitesi olan alanlar kahverengi reaksiyon göstermektedir (X40).



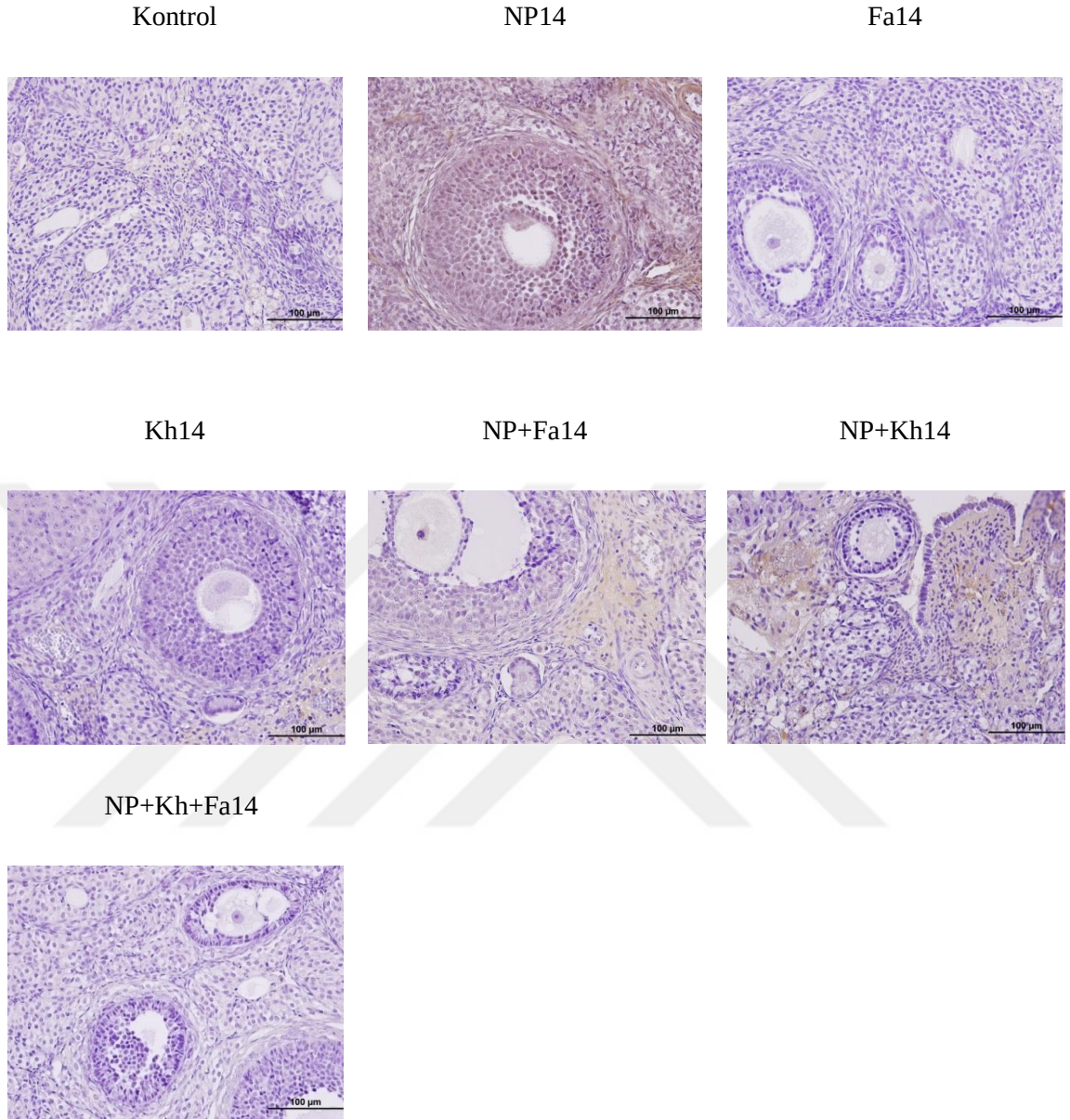
Şekil 4.15. 7 günlük deney gruplarında IL6 ekspresyonu: IL6 immunreaktivitesi olan alanlar kahverengi reaksiyon göstermektedir (X40).



Şekil 4.16. 14 günlük deney gruplarında IL6 ekspresyonu: IL6 immunreaktivitesi olan alanlar kahverengi reaksiyon göstermektedir (X40).



Şekil 4.17. 7 günlük deney gruplarına ait TGF β 1 ekspresyonu: TGF β 1 immunreaktivitesi olan alanlar kahverengi reaksiyon göstermektedir (X40).



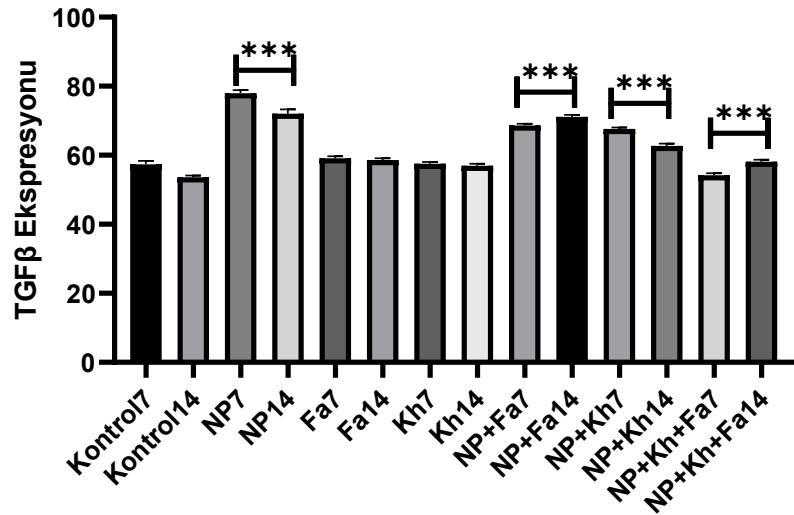
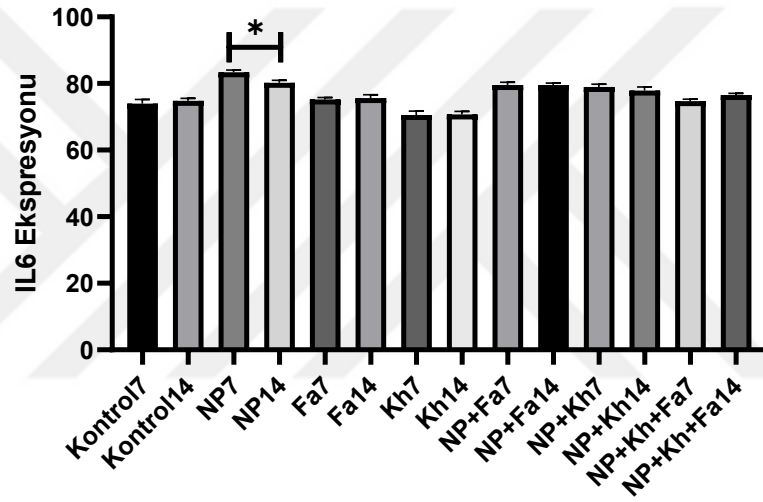
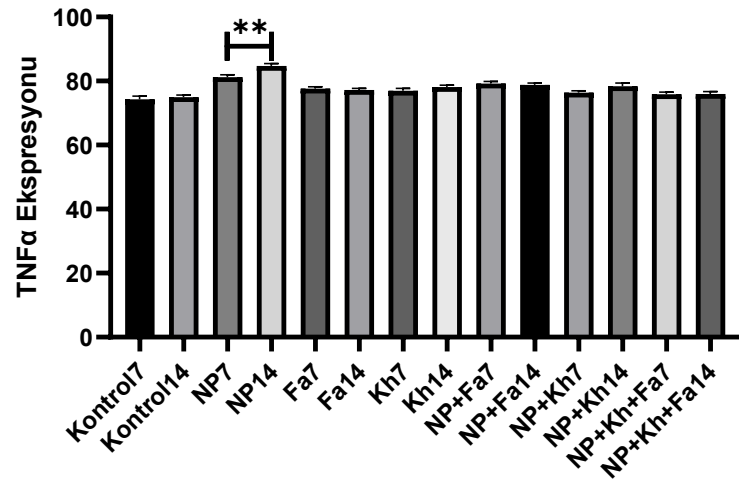
Şekil 4.18. 14 günlük deney gruplarına ait TGFβ1 ekspresyonu: TGFβ1immunreaktivitesi olan alanlar kahverengi reaksiyon göstermektedir (X40).

Tablo 4.4. Deney gruplarına ait TNF α , IL6, TGF β 1immunreaktivite yoğunluğu istatistiksel analizi

	Kontrol	NP7	Fa7	Kh7	NP+Fa7	NP+Kh7	NP+Kh+Fa7	P
TNFα	75,32 (71,34-79,19)a	80,73 (76,73-84,85)b	77,25 (74,30-80,69)ac	77,34 (73,76-79,92)ac	79,21 (75,53-81,46)bc	76,44 (72,36-80,31)ac	75,49 (73,37-79,33)ac	<0,0001
IL6	76,05 (71,07-78,24)a	81,29 (79,06-87,39)b	76,49 (73,68-78,12)ad	75,16 (61,04-77,48)a	78,58 (74,76-83,77)c	78,52 (74,02-84,46)cd	75,24 (72,44-77,83)a	<0,0001
TGFβ1	58,42 (55,13-60,96)ad	75,48 (72,72-84,04)b	58,39 (56,29-62,25)a	56,69 (54,82-60,23)ad	69,33 (66,18-71,35)c	67,38 (65,65-69,72)c	54,08 (49,81-57,35)d	<0,0001

	Kontrol	NP14	Fa14	Kh14	NP+Fa14	NP+Kh14	NP+Kh+Fa14	P
TNFα	75,03 (71,32-79,15)a	82,38 (80,79-88,31)b	77,44 (74,76-80,32)ac	79,12 (77,23-80,28)ac	78,66 (75,48-81,99)c	78,32 (73,59-82,49)ac	75,72 (72,08-79,34)ac	<0,0001
IL6	76,01 (70,73-78,18)ac	81,44 (75,38-84,85)b	72,37 (69,65-83,25)ac	71,94 (63,73-77,18)a	78,32 (75,92-83,29)bd	76,74 (71,06-83,77)bc	76,52 (73,42-79,48)cd	<0,0001
TGFβ1	53,24 (51,98-55,19)a	68,89 (66,77-72,18)b	58,56 (55,04-62,33)cd	58,28 (53,68-60,33)c	71,98 (67,75-73,90)b	61,35 (58,58-66,01)d	58,42 (55,13-60,96)c	<0,0001

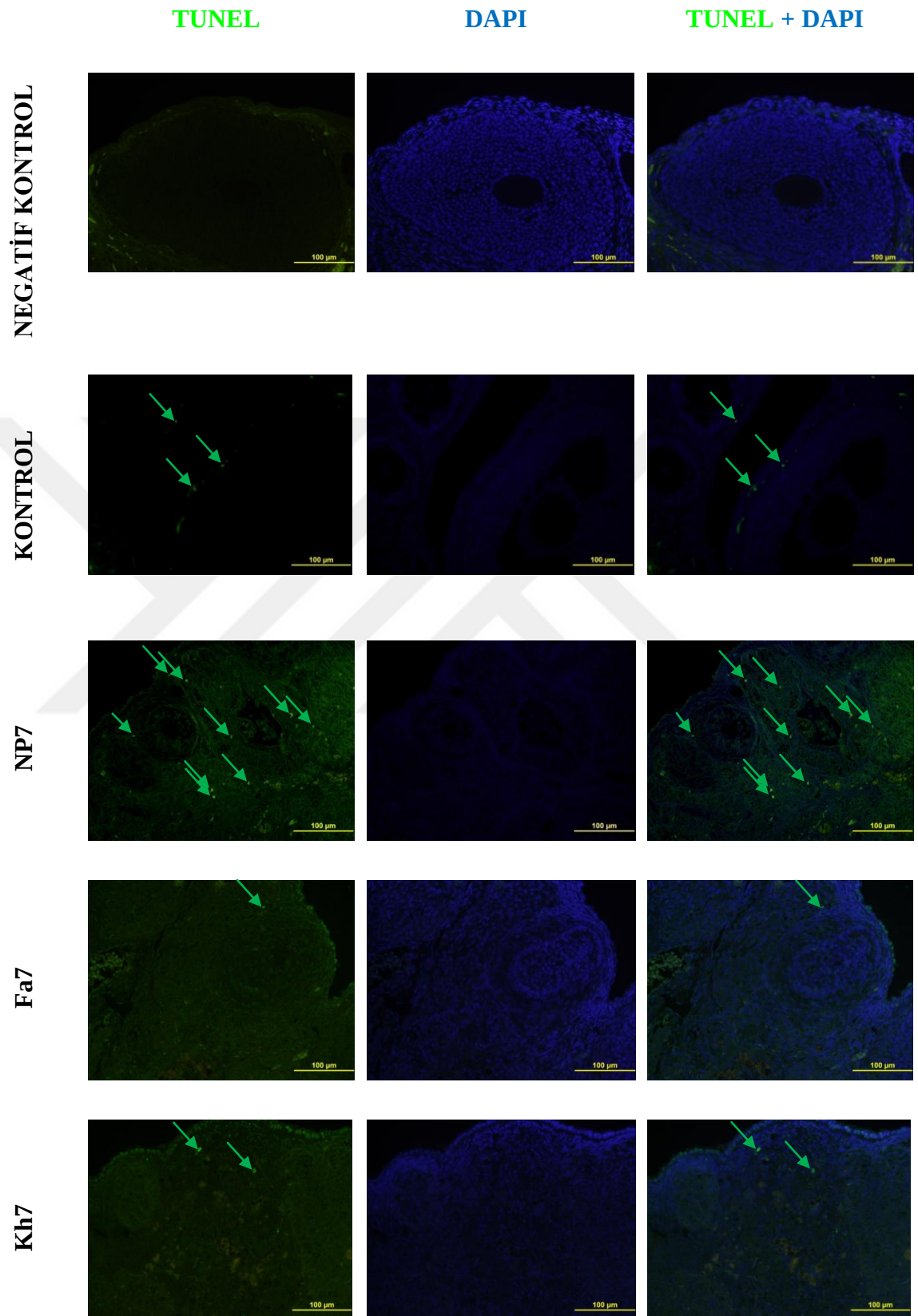
Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. Aynı satırda yer alan aynı harfler deney grupları arasındaki benzerliği, farklı harfler ise gruplar arasındaki farklılığı ifade etmektedir.

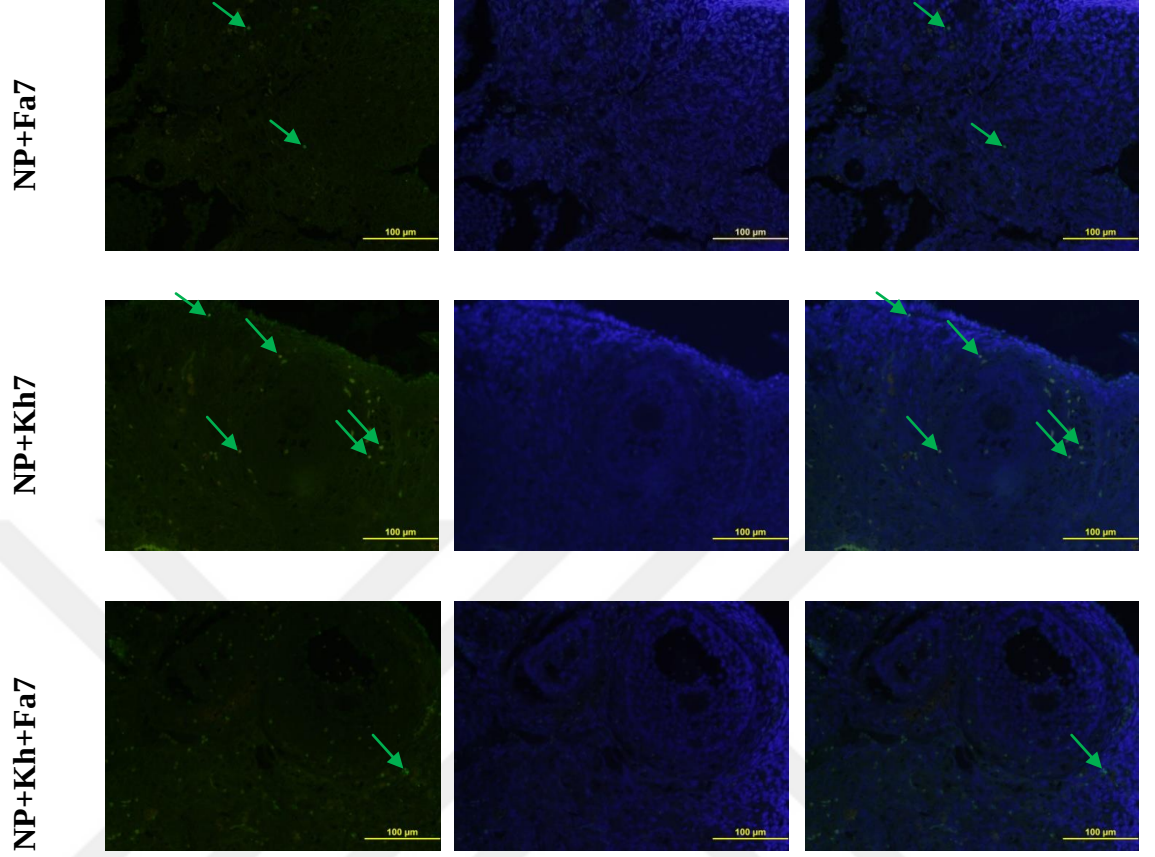


Şekil 4.19. 7 ve 14 günlük tüm deney gruplarının TNFα, IL6 ve TGFβ1 ekspresyonlarının ikili karşılaştırılması. İstatistiksel olarak * P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001 ifade eder.

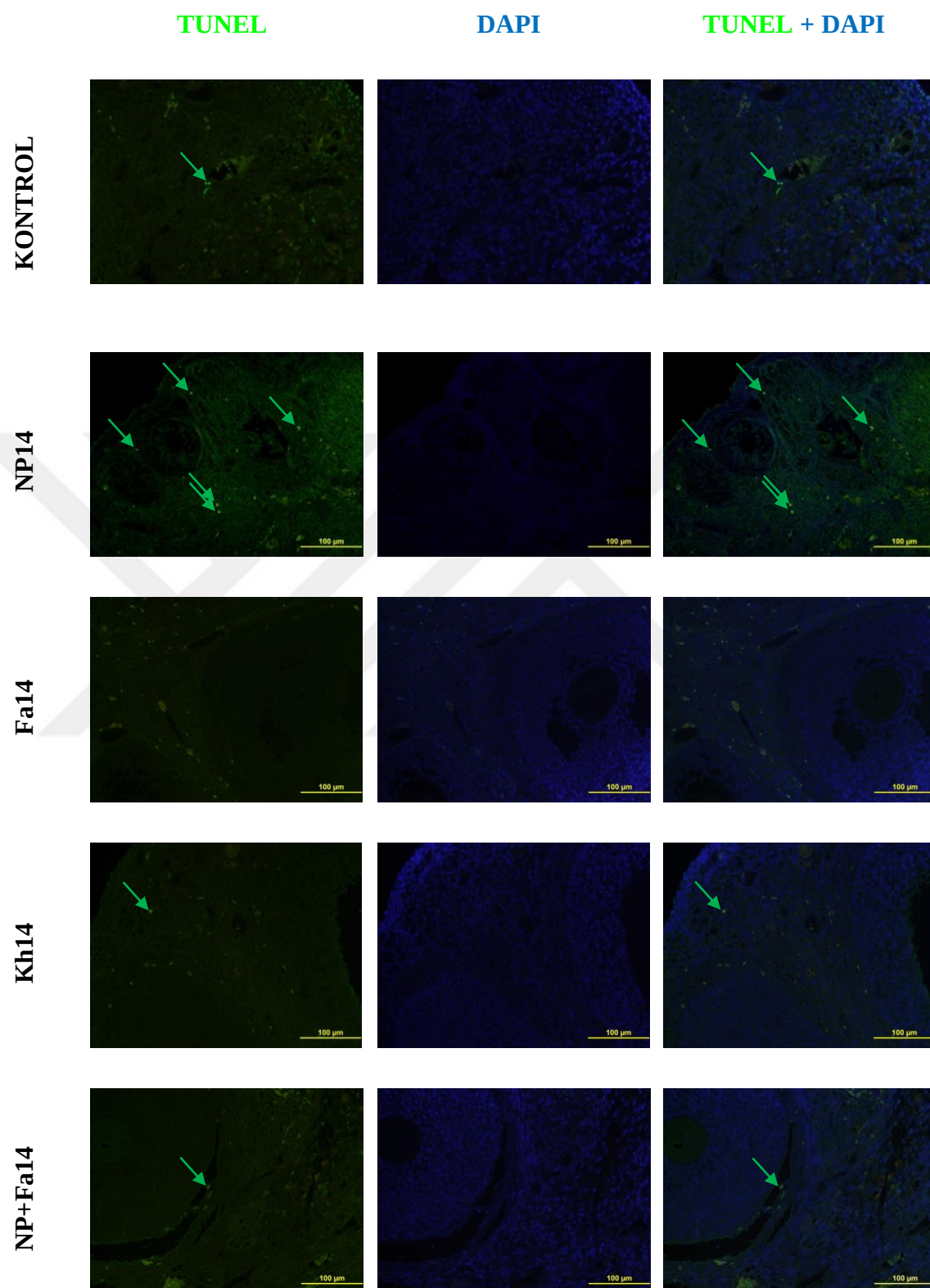
4.5. TUNEL Bulguları

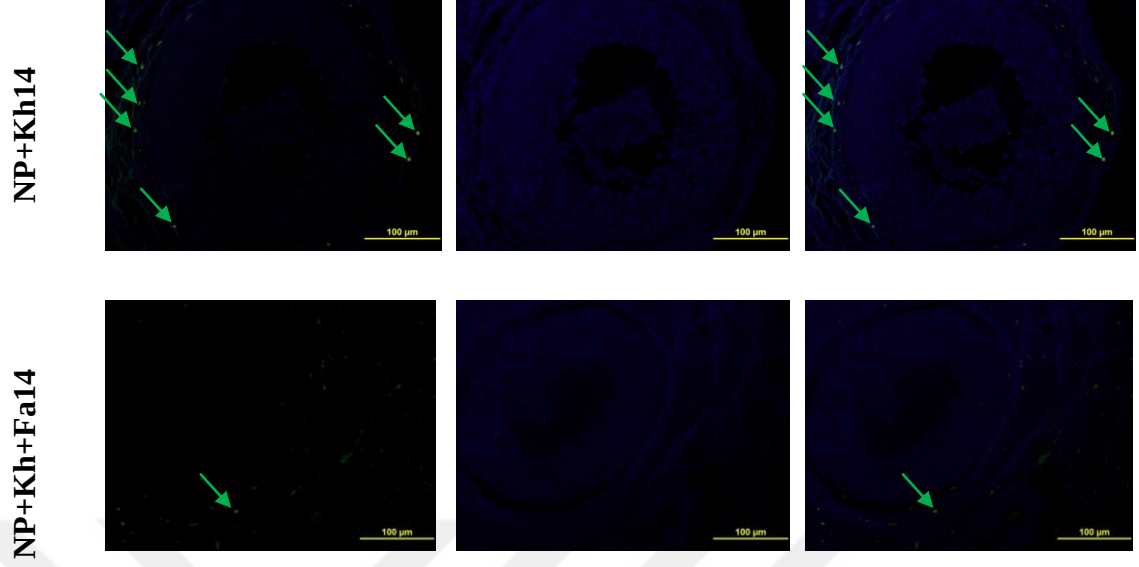
TUNEL immunofluoresan boyama yöntemini DNA dizi kırıkları, değişime uğramış nukleotidlerin serbest 3'-OH uçlarının enzimatik (TdT enzimi: terminal deoxynucleotidyl transferase) olarak işaretlenmesiyle tespit edilir. In situ apoptoz tespit kiti apoptotik hücrelerde kromatin yoğunlaşması ve DNA parçalanmasını özgün olarak tespit ettiğinden nekrozdan apoptozu ayırmaktadır. Çalışmada kullandığımız NP toksik bir bileşik olup apoptotik hücre sayısını artırdı. Ovaryumun hem korteks hem de medulla tabakalarında apoptoz gözlemlendi. Apoptotik hücreler sadece foliküllerde değil, atretik foliküllerde, ovaryum stroması ve germinal epitelde de gözlemlendi (Şekil 4.20, Şekil 4.21). KI-MKH verilen gruplarda apoptotik hücre sayısı azaldı (NP+Kh7, NP+Kh+Fa7, NP+Kh14 ve NP+Kh+Fa14). NP ile ovaryum hasarı oluşturulan ve folik asitle tedavi edilen NP+Fa7 ve NP+Fa14 grupları ise apoptotik hücre sayısı NP gruplarına kıyasla azaldı (Tablo 4.5). Tedavi grupları arasında 7 ve 14 günlük grupların karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi (Şekil 4.22).





Şekil 4.20. 7 günlük deney gruplarına ait apoptotik hücreler → işareti ile gösterildi.



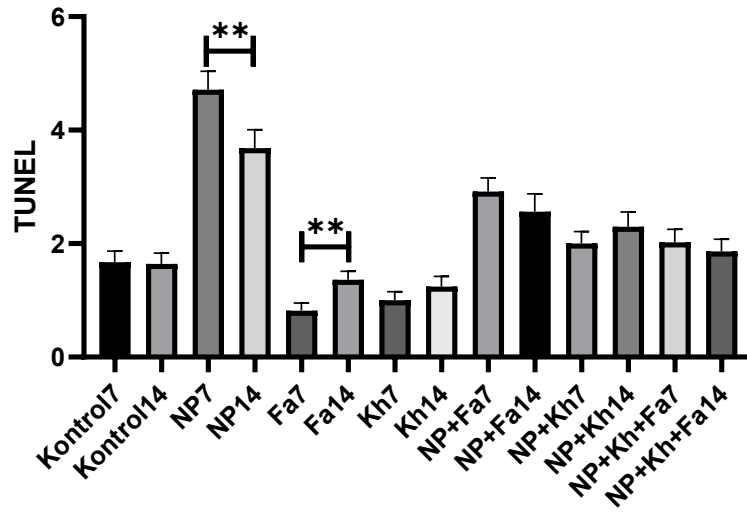


Şekil 4.21. 14 günlük deney gruplarına ait apoptotik hücreler → işareti ile gösterildi.

Tablo 4. 5. 7 ve 14 günlük deney gruplarına ait TUNEL istatistiksel analizi

	Kontrol	NP7	Fa7	Kh7	NP+Fa7	NP+Kh7	NP+Kh+Fa7	P
TUNEL	2,00 (1,00-3,00)ac	5,00 (3,00-6,00)b	1,00 (0,00-1,50)a	1,00 (0,00-2,00)a	3,00 (2,00-4,00)b	2,00 (1,00-3,00)cd	1,00 (1,00-3,00)acd	<0,0001
	Kontrol	NP14	Fa14	Kh14	NP+Fa14	NP+Kh14	NP+Kh+Fa14	p
TUNEL	1,50 (0,75-3,00)ac	3,00 (2,00-5,25)b	1,00 (0,75-2,00)ac	1,00 (0,00-2,00)c	2,00 (0,75-4,25)ab	2,00 (1,00-3,00)a	2,00 (1,00-3,00)ac	<0,0001

Veriler medyan (1.çeyrek-3.çeyrek) olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.



Şekil 4.22: 7 ve 14 günlük grupların TUNEL immunofluoresan boyama yöntem sonuçlarının ikili karşılaştırılması. İstatistiksel olarak $**P < 0,01$ ifade eder.

4.6. Biyokimyasal Bulgular

4.6.1. MDA, SOD VE CAT bulgular

ELİSA metodu kullanılarak, deney hayvanlarından alınan ovaryum dokularında MDA, SOD ve CAT değerleri belirlendi. Tüm deney gruplarına ait plazma MDA düzeyleri değerlendirildiğinde, 7 günlük gruplarda en yüksek MDA değeri NP7 grubuna aitti. NP7 grubu MDA düzeyi diğer tüm gruplardan anlamlı derece yüksekti ($p < 0.05$) (Tablo 4.6). NP+Kh+Fa7 grubu MDA düzeyi diğer tedavi grupları ile kıyaslandığında kontrol grubuna daha yakındı. 14 günlük gruplarda en yüksek değer NP14 grubunda ölçüldü ve bu değer diğer tüm gruplardan anlamlı derecede farklıydı ($p < 0.05$) (Tablo 4.6). Tedavi gruplarından NP+Kh+Fa14 grubu MDA düzeyi kontrol grubuna daha yakındı.

Tüm deney gruplarına ait plazma SOD düzeyleri değerlendirildiğinde, 7 günlük gruplarda en düşük SOD değeri NP7 grubuna aitti. NP7 grubu SOD düzeyi kontrol ve NP+Kh+Fa7 grubundan anlamlı derecede farklıydı ($p < 0.05$) (Tablo 4.6.). Diğer grupların SOD düzeyi kendi arasında benzerdi. 14 günlük gruplarda en düşük SOD düzeyi NP14 grubuna aitti. Bu değer kontrol grubu ile NP+Kh+Fa14 gruplarından anlamlı derecede düşüktü ($p < 0.05$) (Tablo 4.6).

Tüm deney gruplarına ait CAT düzeyleri değerlendirildiğinde, 7 günlük gruplardan NP7 grubu CAT düzeyi diğer tüm gruplardan daha düşüktü ve bu değer istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$) (Tablo 4.6). 14 günlük gruplardan NP14 grubunun CAT düzeyi

diğer tüm gruplardan düşüktü ve bu değer istatistiksel olarak anlamlı düzeydeydi ($p<0.05$). Kontrol grubuna en yakın değer ise NP+Kh+Fa14 grubuna aitti (Tablo 4.6.).

İkili karşılaştırma grupları SOD değerinde Kh verilen tüm gruplarda 14. günde SOD değeri daha yüksekti ve bu yükseklik istatistiksel olarak 7 ve 14 günlük gruplar arasında anlamlı farklılık gösterdi ($p<0.05$) (Şekil 4.23).

4.6.2. TAS ve TOS bulgular

TAS düzeyleri; 7 günlük gruplardan kontrol, Kh7, NP+Kh7 ve NP+Kh+Fa7 gruplarında birbirine yakındı ve istatistiksel olarak diğer gruplardan farklıydı ($p<0.05$) (Tablo 4.7). NP7 grubu TAS düzeyi ise tüm gruplardan daha düşüktü.

14 günlük gruplardan NP14 grubu TAS düzeyi tüm gruplardan düşüktü. NP+Fa14 grubu TAS düzeyi NP14 grubu ile benzerdi. NP+Kh+Fa14 grubu ise kontrol grubuna en yakın değerdı (Tablo 4.7.). TAS düzeylerinde 7 ve 14 günlük grupların ikili karşılaştırılması sonucu anlamlı bir farklılık bulunmadı (Şekil 4.24).

TOS düzeyleri; 7 günlük gruplardan NP7 grubunda en yüksek düzeydeydi ve bu sonuç diğer tüm gruplardan anlamlı derecede farklıydı ($p<0.05$) (Tablo 4.7).

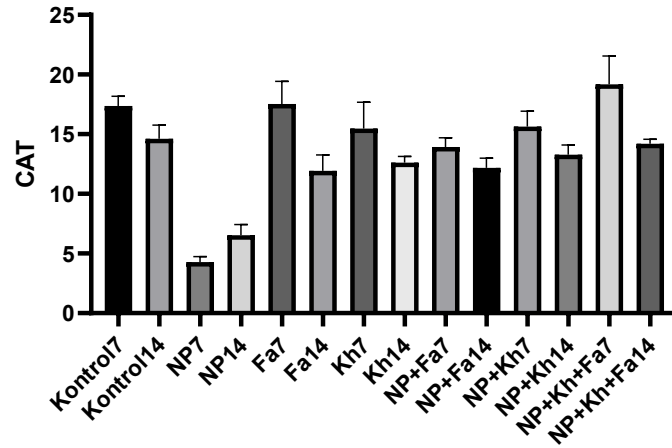
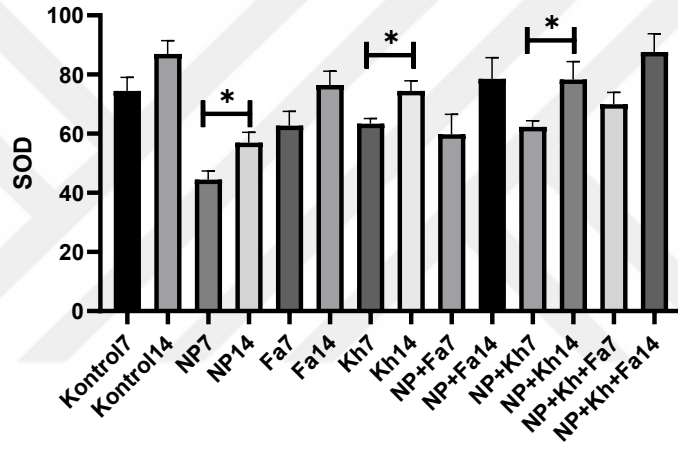
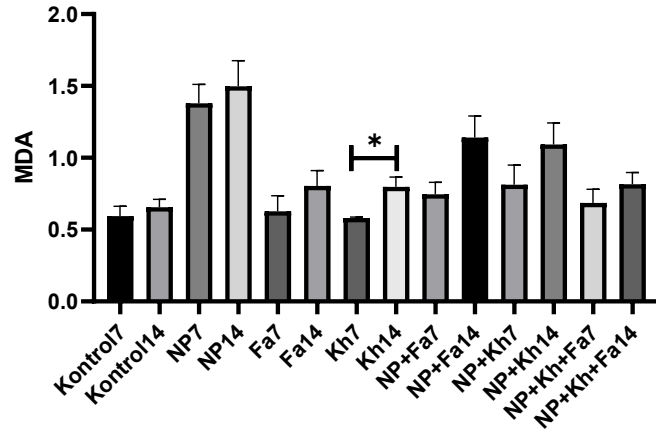
14 günlük gruplarda da en yüksek TOS düzeyi NP14 grubuna aitti. Diğer gruplardan anlamlı derecede farklıydı ($p<0.05$) (Tablo 4.7.). TOS düzeylerinde 7 ve 14 günlük grupların ikili karşılaştırılması sonucu anlamlı bir farklılık bulunmadı (Şekil 4.24).

Tablo 4. 6. 7 ve 14 günlük deney gruplarına ait MDA, SOD ve CAT değerlerinin istatistiksel analizi.

	Kontrol	NP7	Fa7	Kh7	NP+Fa7	NP+Kh7	NP+Kh+Fa7	p
MDA	(0,59±0,14)a	(1,38±0,26)b	(0,63±0,22)a	(0,58±0,01)a	(0,75±0,17)a	(0,81±0,27)a	(0,69±0,19)a	0,0067
SOD	(74,47±9,20)a	(44,47±5,73)b	(62,75±9,58)ab	(63,37±3,44)ab	(59,78±13,55)ab	(62,33±4,15)ab	(69,94±8,11)a	0,0023
CAT	(17,36±1,63)a	(4,28±0,90)b	(17,52±3,79)a	(15,46±4,42)a	(13,93±1,55)a	(15,64±2,59)a	(19,19±4,73)a	<0,001

	Kontrol	NP14	Fa14	Kh14	NP+Fa14	NP+Kh14	NP+Kh+Fa14	p
MDA	(0,66±0,11)a	(1,50±0,36)b	(0,80±0,22)a	(0,80±0,14)a	(1,14±0,30)ab	(1,09±0,30)ab	(0,82±0,16)a	0,0012
SOD	(86,97±8,99)a	(56,97±7,03)b	(76,48±9,26)ab	(74,49±6,75)ab	(78,53±14,29)ab	(78,28±12,17)ab	(87,64±12,24)a	0,0100
CAT	(14,61±2,32)a	(6,54±1,77)b	(11,93±2,67)a	(12,62±1,02)a	(12,18±1,62)a	(13,28±1,64)a	(14,19±0,78)a	<0,0001

Veriler ortalama± standart sapma olarak ifade edildi. Aynı satırda yer alan aynı harfler deney grupları arasındaki benzerliği, farklı harfler ise gruplar arasındaki farklılığı ifade etmektedir.



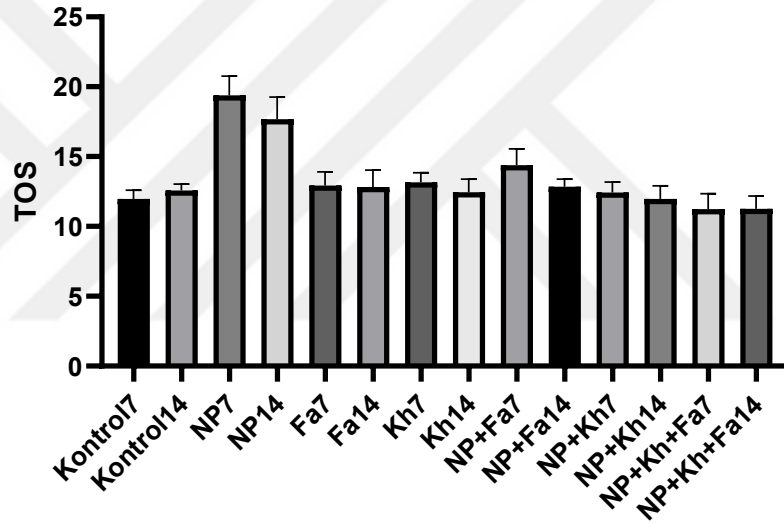
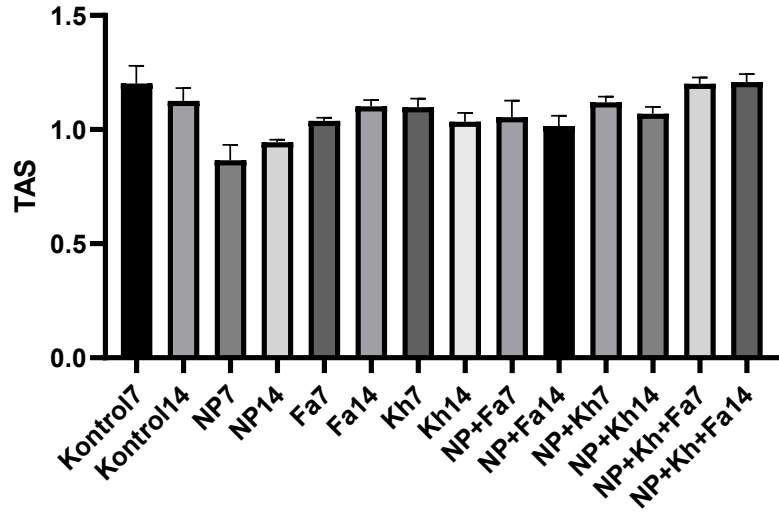
Şekil 4.23. 7 ve 14 günlük gruplarda MDA, SOD ve CAT değerlerinin ikili karşılaştırılması. İstatistiksel olarak * P <0,05 ifade eder.

Tablo 4.7. 7 ve 14 günlük deney gruplarına ait TAS ve TOS değerlerinin istatistiksel analizi.

	Kontrol	NP7	Fa7	Kh7	NP+Fa7	NP+Kh7	NP+Kh+Fa7	p
TAS	(1,15±0,13)a	(0,87±0,15)b	(1,04±0,03)ab	(1,10±0,09)a	(1,05±0,16)ab	(1,12±0,06)a	(1,20±0,06)a	0,0016
TOS	(11,98±1,38)a	(19,39±3,07)b	(12,93±2,18)a	(13,15±1,56)a	(14,39±2,61)a	(12,43±1,69)a	(11,24±2,48)a	<0,0001

	Kontrol	NP14	Fa14	Kh14	NP+Fa14	NP+Kh14	NP+Kh+Fa14	p
TAS	(1,13±0,13)ac	(0,94±0,03)b	(1,10±0,06)abc	(1,03±0,09)abc	(1,02±0,10)ab	(1,07±0,07)abc	(1,21±0,08)c	0,0010
TOS	(12,58±1,02)a	(17,67±3,53)b	(12,83±2,67)a	(12,44±2,10)a	(12,84±1,21)a	(11,96±2,10)a	(11,26±2,04)a	0,0030

Veriler ortalama± standart sapma olarak ifade edildi. Aynı satırda yer alan aynı harfler deney grupları arasındaki benzerliği, farklı harfler ise gruplar arasındaki farklılığı ifade etmektedir.



Şekil 4.24: 7 ve 14 günlük gruplarda TAS ve TOS kapasitesi sonuçlarının ikili karşılaştırılması.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

NP, doğrudan veya dolaylı olarak birçok ortamda kullanılan ve infertiliteye neden olduğu bilinen kimyasal bir ajandır. NP gibi toksik maddelerin çevrede varlıklarının gösterilmesi, canlılara verdikleri zararın belirlenebilmesi için bu maddelerle ilgili deneylerin yapılması ve tedavi yöntemlerinin araştırılması önem taşımaktadır. Mevcut çalışmada, NP'ün ovaryumda oluşturabileceği hasara karşı Kİ-MKH, Fa ve her ikisinin birlikte uygulanmasının olası tedavi edici etkilerini histopatolojik, biyokimyasal ve immunohistokimyasal analizler ile araştırdık. Ayrıca, zamana göre etkideki değişimi görebilmek için 7 ve 14 günlük gruplar oluşturuldu.

NP, lipofilik özelliği ve yarılanma ömrünün uzun olması nedeniyle, canlılarda önemli düzeyde birikime yol açarak toksik etki yaratmaktadır (Nimnod ve Benson, 1996; Warhurst, 1995). Suda yaşayan omurgasız hayvanlar, bitkiler ve balıklar bu kategorideki kimyasallara oldukça duyarlıdırlar ve değişen oranlarda toksisite sergilemektedirler. NP'ye maruz kalan sazan balıklarının hematolojik parametrelerinin etkilendiği ve anemiye neden olduğu gösterilmiştir (Schwaiger ve ark., 2000). NP'nin işitme fonksiyonu üzerinde olumsuz etkiler gösterdiği (Yücedağ ve ark., 2014), testis ve ovaryum kanserine (Skakkebaek ve ark., 1998) neden olduğu bildirilmiştir. Yapılan araştırmalar, NP'ün farklı hücrelerin düzenleyici sistemlerine müdahale edebildiğini ortaya koymaktadır. NP mitokondrinin zar geçirgenliğini değiştirerek hücrelerdeki solunum toksisitesini tetiklemektedir. Farelerde sinir kök hücrelerinin büyümesini ve farklılaşmasını inhibe ettiği tespit edilmiştir (Soares ve ark., 2008). NP'ün kemik gelişimi üzerine toksik etkilerinin incelendiği bir çalışmada, NP'ün kemik metabolizmasını olumsuz yönde etkileri olduğu kemik yapım-yıkım aşamalarını geciktirdiği bildirilmiştir (Alişan Suna ve ark., 2021). Jubendradass ve ark. (2012), sıçanlarda yaptıkları çalışmada NP'ün hem mitokondriye bağlı olarak, hem de Fas ve

Fas-I yoluyla karaciğerde toksik etkiler göstererek apoptoza neden olduğunu bildirmişlerdir.

NP'nin üreme sağlığını olumsuz etkilediğini ortaya koyan çalışmalarda mevcuttur. NP, erkek ratlarda spermatogenez ve epididimal sperm üzerinde toksik etki göstermektedir (Aly ve ark., 2012). Göktepe ve ark.'nın (2022), NP'ün farklı dozlarının testis dokusu, kan-testis bariyer bütünlüğü ve DNA hasarı üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında NP, 25 µl, 50 µl ve 75 µl olmak üzere 3 farklı dozda sıçanlara gavaj yoluyla uygulanmıştır. Üç ayrı dozda da sıçanların testislerinde seminifer tübüllerde önemli ölçüde hücre kaybına neden olduğu bildirilmiştir. Yapılan farklı bir çalışmada, NP'ün erkek üreme sisteminde; germ hücresinin apoptozuna, testis boyutunun küçülmesine ve spermatozoa üretiminin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (Urriola-Muñoz ve ark., 2014). Bununla birlikte NP'nin, güçlü bir östrojenik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Christiansen ve ark., 1998; Tapiero ve Tew, 2002). Doğal ve insan yapımı çevresel östrojenlerin folikülogenez sürecini değiştirerek döllenme fenotipini etkileyebildiği veya elimine ederek infertiliteye neden olduğu bilinmektedir (Hughes ve ark., 2000). Önder ve ark. (2023), çalışmalarında 50 µl NP'un gavaj yoluyla verilmesi sonucunda ovaryumda foliküllerin dejenere olduğunu, fibrozisin arttığını ve kan damarlarının genişlediği veya tıkanmış şeklinde histopatolojik bulguların olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda, 50 µl dozda NP, mısır yağında çözündürülerek gavaj yoluyla uygulandı. NP uygulanan gruplarda özellikle primordiyal foliküller olmak üzere gelişmekte olan foliküllerin sayılarında azalma, atretik folikül sayılarında artma ile ovaryum rezervinin olumsuz etkilendiği gözlemlendi. Bununla birlikte ovaryumda kan damarlarında genişleme, hemorajik alanların varlığı, bağ dokusunda artan kollajen lif miktarı ve dejenere foliküllerin artışı gözlenen histopatolojik bulgular arasındaydı. Sonuçlarımız NP'ün ovaryum üzerindeki hasarını kanıtlar nitelikte olup diğer çalışmalarla uyumluydu.

Primordiyal foliküllerin azalması ve folikülogenez sürecinin olumsuz etkilenmesine bağlı olarak gelişen infertilite sonrası, ovaryum hasarını tedavi etmek için olgun oositlerin, embriyoların ve over dokusunun dondurulularak saklanması, kök hücre tedavisi, hormon tedavisi ve antioksidanların uygulaması dahil olmak üzere pek çok farklı tedavi yöntemleri uygulanmaktadır. Kök hücre tedavisi diğer birçok hastalıkta

olduğu gibi infertilite için de umut verici bir tedavi yöntemi olup diğer tedavi yöntemlerine göre pek çok avantajı bulunmaktadır. Özellikle Kİ-MKH'ler MKH'lerin ana kaynağı olup kendini yenileme kapasitesi, düşük riskli bağışıklık reddi, kolay elde edilebilmesi, çok soylu farklılaşma potansiyeli, çeşitli hastalıkların tedavisi için kullanılabilmesi, mutasyonlara daha az duyarlı olması ve etik sorunların yaşanmaması gibi avantajları nedeniyle en fazla tercih edilen ve klinikte kullanımı yaygınlaşan bir MKH'dir (Kim ve Park, 2017, Sawangmake ve ark., 2016, Sun ve ark., 2014, Voga ve ark., 2020). Liu ve ark. (2014), Kİ-MKH'lerin hücre yüzey belirteçlerinden CD90 ve CD29'u ifade ettiği, ancak CD45 ve CD34'ü ifade etmediğini belirtmişlerdir. Kİ-MKH'lerin ovaryum hasarına etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada yüzey belirteçlerinden CD90, CD44 ve CD29'u ifade ettiği, CD34 ve CD45'i ifade etmediği gösterildi (Zarbakhsh ve ark., 2019). Bunlardan yola çıkarak çalışmamızda kemik iliğinden elde edilen, CD90, CD73 ve CD29 yüzey belirteçlerini ifade eden, ancak CD45'i ifade etmeyen hücreler kullanıldı.

Kİ-MKH'lerinin hasarlı doku bölgelerine migrasyon yetenekleri ve salgılama fonksiyonu, Kİ-MKH'lerin onarıcı etkilerini göstermelerine olanak tanımaktadır. MKH'lerin, granüloza hücrelerinde AMH ekspresyon miktarını artırması ile granüloza hücre apoptozunun ve foliküler atrezinin inhibisyonu yoluyla ovaryum fonksiyonunun iyileşmesini destekleyebileceği gösterilmiştir (He ve ark., 2018). Kİ-MKH'leri ovaryuma ve diğer organlara direk uygulanabildiği gibi damar yolu ile de verilebilmektedir. Çalışmada tercih ettiğimiz i.v. enjeksiyon basit, hızlı ve daha az invaziv bir stratejidir. Daha da önemlisi i.v. enjeksiyon, çeşitli organları etkileyen toksik maddeler için spesifik olarak daha faydalıdır. Bununla birlikte, i.v. enjeksiyon sonrası hücrelerin organlara ulaştığını gösterebilmek önemlidir. Kİ-MKH'lerin ovaryumlara yönlendirilmesi ve varlıklarının değerlendirildiği çalışmalar bulunmaktadır. Liu ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada kemoteropötik ajan olan Cisplatin ile oluşturulan ovaryum hasarı sonrası i.v. yolla etiketli 4×10^6 Kİ-MKH uygulanması sonrası kök hücrelerin 15. ve 30. günde ovaryumdaki varlıkları gösterildi. 15. günde ovaryumun hilusu ve medullasındaki Kİ-MKH'lerin sayısı, ovaryum korteksinden daha fazlaydı. 30. günde ise kök hücrelerin sayısının oldukça azaldığı ancak ovaryumda canlı kalabildikleri bildirildi. Ayrıca Kİ-MKH'lerin ovaryumda kemoterapötik ajanla oluşan

hasarı düzeltebileceği, foliküllerin sayısını artırabileceği ve apoptozu engelleyerek restoratif etkiler gösterebileceği belirtildi. Başka bir çalışma, Kİ-MKH'lerinin uygulama sonrasında hasarlı ovaryumda lokalize olduğu ve hayatta kaldığı sonuç olarakta ovaryumun histolojik yapısını iyileştirdiği ve endokrin fonksiyonlarını düzenlediği belirtilmiştir (Gabr ve ark., 2016). Liu ve ark. (2019), yaptığı çalışmada primer over yetmezlik modeli oluşturulan farelerde over fonksiyonunu düzenleyebilmek amacıyla amniyotik mezenşimal kök hücre (hAMKH)'lerin etkinliğini araştırmışlardır. hAMKH'ler PKH26 ile etiketlendiğinden 7 ve 14. günde ovaryumda varlıkları gösterilmiştir. Uygulama sonrası 7. günde foliküllerde hAMKH'lere rastlanmadığı, özellikle ovaryumun foliküllerin dışındaki alanlarda hücrelerin bulundukları gösterilmiştir. 14. günde ise sayılarının oldukça azaldığı belirtilmiştir. Rizk ve ark. (2018), diyabet olan sıçanlara i.v. uygulama ile 2.5×10^6 Kİ-MKH vererek tedavi edici etkilerini inceledikleri çalışmalarının sonucunda Kİ-MKH'lerinin kan glukoz seviyesini düşürdüğü ve oksidatif stres parametrelerini azalttığını belirtmişlerdir.

Kİ-MKH'lerin hedeflenmesi verimsiz olduğundan ve birçok Kİ-MKH sistemik uygulama sonrası akciğerde sıkışıp kaldığından, enjekte edilen hücrelerin ovaryuma ulaşip ulaşmadıklarını izlenmesi önemliydi. Bu nedenle çalışmamızda hücreleri etiketlemede PKH26 kullanıldı ve her bir sıçan için $2,5 \times 10^6$ Kİ-MKH i.v. olarak kuyruk veninden uygulandı. Kök hücrelerin farklı sürelerde ovaryumdaki etkilerini incelemek için 7. ve 14. günler baz alınarak farklı gruplar oluşturuldu. Kİ-MKH'lerin uygulama sonrası ovaryumda 7.günde ve 14. günde varlıkları gösterildi. 7. günde özellikle foliküllere yakın alanlarda ve granüloza hücrelerinin bulunduğu alanlarda daha fazla Kİ-MKH gözlemlendi. Yapılan diğer çalışmalarda özellikle medulla, hilus ve foliküllerin dışındaki alanlarda kök hücreler gösterilirken bizim çalışmamızda foliküllerde de Kİ-MKH'lere rastlandı. 14. günde ise sayıları azalmasına rağmen hala ovaryumda Kİ-MKH mevcuttu ve granüloza hücrelerinin bulunduğu alanlarda gözlemlendi.

Folik asit doku onarımında önemli bir faktör olan B grubu bir vitamindir. Özellikle differansiyasyon ve folikülogenez üzerine olumlu etkileri nedeniyle ovaryum ile ilgili yapılan çalışmalarda tercih edilmektedir. Ovaryuma zarar veren pek çok kimyasala karşı koruyucu ve tedavi edici amaçlı kullanımı araştırılan bir ajandır. Fa'in damar endotel hücrelerinin proliferasyonuna ve yara iyilişmesine olan etkisinin araştırıldığı bir

çalışmada Fa'in etkisini artırmak için MKH'lerle birlikte uygulandığında, MKH'lerin in vitro olarak folik asitin etkisini artırdığı gözlenmiştir (Pakdemirli ve ark.,2019). Çalışmamızda Fa 20 mg/kg gavaj yolu ile uygulandı. NP'ün ovaryum dokusunda oluşturduğu hasara Kİ-MKH ve Fa'in ve her iki ajanın birlikte uygulandığında 7 ve 14 günlük oluşturulan gruplarda histopatolojik değerlendirmeler sonrası Fa7, Fa14, Kh7 ve Kh14 grupları histolojik yapının korunduğu tedavi gruplarında ise hemoraji ve kollojen lif miktarında ve atretik folikül sayısında azalma olduğu belirlendi. Çalışmamızda tüm denekler toplam folikül sayısı açısından değerlendirildiğinde, sonuçlar Fa ve Kh'nin birlikte uygulandığı NP+Kh+Fa7 ve Np+Kh+Fa14 gruplarında folikül rezervi açısından sadece Fa ve sadece Kh uygulanan gruplardan daha iyi tedavi edici etkiye sahip olduğunu gösterdi. Bu iki grubun folikül sayısı kontrol grubuna daha yakınken, primordiyal ve atretik folikül sayıları NP7 ve NP14 gruplarından anlamlı farklılık gösterdi.

Çalışmamızda, kontrol grubuna ait ovaryum dokularında AMH salınımının primer, preantral ve sekonder foliküllerinin granüloza hücrelerinden salgılandığı ayrıca primordiyal folikül ve atretik foliküllerde AMH ekspresyonu gözlenmemiştir. Bu da AMH salınımının sadece gelişen folikül hücrelerinden salgılandığını desteklemektedir. NP7 grubunda ise AMH ekspresyonunda azalma gözlenirken NP+Kh7, NP+Fa7 ve NP+Kh+Fa7 grupları AMH ekspresyonu kontrole yakın şekilde artırdığı gözlemlendi. NP14 grubunda AMH ekspresyonunda azalma gözlenirken NP+Kh14, NP+Fa14 ve NP+Kh+Fa14 grupları AMH ekspresyonu kontrole yakın şekilde artırdığı ve kontrole en yakın AMH ekspresyonunun NP+Kh+Fa14 grubuna ait olduğu gözlenmiştir ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

MKH'lerin göçünü teşvik eden TNF α , hepatosit büyüme faktörü ve temel fibroblast büyüme faktörleri gibi faktörler vardır (Sohni ve Verfaillie, 2013). IL6 ve TNF α en önemli iki inflamatuvar aracıdır ve IL6, akut faz reaksiyonunda yer alan bir sitokindir (Scorei ve ark., 2010). Çalışmamızda NP grubunda proinflamatuvar sitokinler olan IL6 ve TNF α 'da bir artışa neden olduğu belirlendi ve bu diğer çalışmalar ile uyumluydu (Önder ve ark., 2023). NP uygulaması sonrası dokularda TNF α ekspresyonundaki artışın kök hücrelerin ovaryuma göçünü teşvik ettiğini sonucuna ulaşılabilir. Kİ-MKH'ler sitokinler tarafından hasarlı dokuya göç eder ve ovaryumun tedavi

edilebilmesi için antiapoptoz ve antifibröz etki için gerekli sitokinleri salgırlar. Ayrıca inflamatuvar yanıtı inhiye ederek oksidatif stresi azaltarak ovaryum fonksiyonlarını korurlar. Bağışıklık sistemini IL6 gibi belirli sitokinler aracılığıyla düzenlerler (Liu ve ark., 2014).

Ovaryum follikülogenez sürecinde önemli rol oynayan TGFβ1, Metotreksat ile indüklenen ovaryum hasarı sonrası plazma TGFβ1 düzeyi değeriendirildiğı çalışmada, hasar grubunda kontrole kıyasla artış meydana geldiğı belirtildi (Lee ve ark. 2017). Çalışmamızda NP hasarı sonrası ovaryumda kontrol dokularına kıyasla ovaryumda TGFβ1 ekspresyonu arttı. Tedavi gruplarında ise bu değeri kontrol grubuna yakın ölçüldü. NP+Fa+Kh7 ve NP+Fa+Kh14 grupları TGFβ1 ekspresyon değeri kontrol grubuna en yakın değerdeydi.

Litaratürde NP'ün farklı dokularda apoptotik hücre sayısını artırdığı bildirildi (Guo ve ark., 2013; Jubendradass ve ark., 2012, Urriola-Muñoz ve ark., 2014). Özellikle Kİ-MKH'lerin ise hücre apoptozunu azalttığı ve antiapoptotik etkiler gösterdiği bildirildi (He ve ark., 2018; Guove ark., 2013). Çalışmada apoptotik hücre sayısı en az olan tedavi grupları Kh uygulanan gruplara aitti.

SOD ve CAT gibi endojen antioksidan enzimler organizmada oksidan-antioksidan dengesini korumasında etkilidirler (Gutteridge, 1995; Jialal ve Fuller 1993). Okai ve ark.'na göre (2004), NP maruziyeti, insanlarda nötrofillerde serbest oksijen türlerini artırmakta, serbest radikalleri baskılayan enzimlerden CAT, SOD, α-tokoferol ve β-karoten gibi antioksidan ajanlar, NP'ün yol açtığı serbest radikalleri ve etkilerini baskılayıcı özelliklere sahiptirler. Bisfenol A'nın toksik etkisine Fa'in koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada Fa 20 mg/kg gavaj yolu ile uygulandığında Bisfenol A kimyasalının dokulara verdiği oksidatif hasarı azalttığı, SOD ve CAT aktivitelerini yükselttiğı belirtilmiştir (Aydos ve Boyacıoğlu, 2019). Yapılan farklı çalışmalarda folik asitin serbest radikallere ve reaktif oksijen türlerine karşı etkili olduğu gösterilmiştir (Shalaby ve ark, 2010; Singh ve ark, 2011; Mohammadi ve ark, 2012). Kİ-MKH'lerin farklı hastalıklarda oksidatif stres üzerine olumlu etkileri üzerine çalışmalar olmasına rağmen ovaryum hasarı üzerine etkilerine dair çalışmalar kısıtlıdır. Mevcut çalışmada NP'ün ovaryum üzerinde oluşturduğu oksidatif stres ayrı ayrı folik

asit ve Kİ-MKH'lerin azaltılabileceği gösterildi. MKH'lerin iskemi reperfüzyon hasarı sonrası etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada MKH'lerin hasar sonrası dokuda antioksidan kapasitesini artırdığı, SOD ve CAT etkilerinin yanı sıra MDA seviyesini düşürerek ve azaltılmış oksidatif stres yoluyla reperfüzyonlu dokuya kök hücrelerin göçünü teşvik ettiği ve antioksidan kapasitesini artırarak hasarlı doku üzerinde tedavi edici etki gösterebildiği belirtilmiştir (İnan ve ark., 2017). Ayrıca antioksidan parametrelerden TAS ve oksidan parametrelerden TOS kapasiteleri analiz edilerek antioksidan ve oksidan dengesi belirlenebilir (Akoglu ve ark., 2013). Biyokimyasal bulgularımız NP'ün lipid peroksidasyonu indüklemesi sonucu NP7 ve NP14 gruplarında MDA değeri artırdığı, SOD ve CAT aktivitesini ve TAS kapasitesini azalttığı ve TOS kapasitesini yükselttiği belirlendi. NP+Kh+Fa7 grubunda biyokimyasal değerler NP7 grubundan farklıydı. Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı. Aynı şekilde NP+Kh+Fa14 grubunda da biyokimyasal değerler NP14 grubunda farklıydı ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı. Tedavi gruplarından MDA, SOD, CAT, TAS ve TOS sonuçları kontrol grubuna en yakın gruplarda Kh ve Fa'in birlikte uygulandığı gruplardı.

Çalışmamızda NP'ün ovaryum dokusunda oluşturduğu hasara Kİ-MKH ve Fa'in ve her iki ajanın birlikte uygulandığında olası tedavi edici etkilerini histolojik, histokimyasal, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemler kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak çalışmamızda, NP'ün over üzerinde oluşturduğu toksik etki sonrası Kİ-MKH'lerin ovaryumda 7. ve 14. günde varlıkları gösterildi.

NP uygulanan gruplarda ovaryum dokuları, kontrol grubuyla kıyaslandığında dejeneratif değişiklikler izlendi. H&E ile boyanan over kesitlerinde, tüm diğer deney gruplarına göre NP uygulanan gruba ait over dokularında normal histolojik yapının bozulduğu foliküler dejenerasyon, tıkalı damarlar ve hemoraji gibi patolojik bulguların varlığı izlendi. Bu sonuçlar NP'ün ovaryum toksisitesini gösteren bulgulardan olması açısından değerliydi. NP+Fa7, NP+Kh7, NP+Fa+Kh7, NP+Fa14, NP+Kh14 ve NP+Fa+Kh14 gruplarına ait ovaryum örnekleri NP7 ve NP14 grupları ile karşılaştırıldığında patolojik bulguların azaldığı gözlemlendi. Fa ve Kh'nin birlikte verildiği gruplarda (NP+Fa+Kh7, NP+Fa+Kh14) patolojik bulgular azaldı, ancak NP+Fa+Kh14 grubunda ovaryum mimarisi kontrol grubuna daha yakındı.

NP uygulaması sonrası 7. ve 14. günde sakrifiye edilen iki grup arasında histopatolojik bulgular ve folikül sayım sonuçları açısından herhangi bir fark izlenmedi. Her iki hasar grubunda artmış atretik folikül sayısı ve azalan primordiyal foliküller dikkat çekiciydi. Bu sonuçlar NP'ün ovaryum rezervini azalttığını gösteren bulguları desteklemektedir. NP+Fa+Kh7 ve NP+Fa+Kh14 grupları tek uygulama yapılan gruplara oranla primordiyal ve gelişmekte olan diğer foliküllerin sayısı kontrol grubuna daha yakın değere yükseldi.

MT ile boyanan ovaryum kesitlerinde NP7 ve NP14 gruplarında bağ dokusunda artan kollojen lif miktarı gözlemlendi. Özellikle Kh ve Fa'in birlikte uygulandığı gruplarda fibrozisin azaldığı izlendi.

İmmunohistokimyasal boyamalar sonrası elde edilen TNF α , IL6 ve TGF β 1 ekspresyon sonuçları NP uygulamasının ekspresyon oranını artırdığını gösterdi. Tedavi gruplarından NP+Fa+Kh7 ve NP+Fa+Kh14 grupları ekspresyon oranı kontrol grubu ile yakın değerdeydi. Kh ve Fa birlikte uygulamasının NP uygulaması sonrası artan TNF α , IL6 ve TGF β 1 ekspresyonlarını düşürebileceği gösterildi.

NP uygulaması sonrası artan apoptotik hücre sayısı tüm tedavi gruplarında azaldı. Fa'in apoptotik hücre sayısını azalttığı ancak Kh uygulamasının artan apoptotik hücre sayısı üzerine daha etkili olduğu gösterildi. 7 ve 14 günlük tedavi gruplarında herhangi bir farklılık gözlenmedi. Kİ-MKH'lerin ovaryuma göç etmelerinin ardından komşu hücreleri etkileyerek parakrin etki yarattığı ve bu parakrin etkinin antiapoptoz ve antifibroz da oldukça önem arz etmekte olup hasarlı dokunun iyileşmesini desteklemek için mikro çevreyi iyileştirdiği yönünde değerlendirme yapılabilir.

Biyokimyasal bulgular NP'ün lipid peroksidasyonunu indükleyerek MDA konsantrasyonunu artırdığı ve toplam antioksidan kapasiteyi ve antioksidan enzimleri azaltarak oksidatif stresi indüklediği, Kh ve Fa birlikte uygulandığı gruplarda ise MDA konsantrasyonunda azalma, SOD ve CAT antioksidan enzimlerin konsantrasyonunu artırarak oksidatif stresi azalttığı belirlendi. Çalışmamızda, Kİ-MKH'lerin ovaryum hasarını tedavi edebilmek için oksidatif stres parametrelerini düzenlediği gösterildi. Çalışmadan elde edilen bulgular ile Fa ve Kİ-MKH'nin tedavi amaçlı birlikte kullanımının ovaryum patolojisi üzerine olumlu etkileri olduğunu ve Fa'in Kİ-MKH'lerin terapötik etkilerini güçlendirdiği ve birlikte kullanımlarının biyokimyasal

olarak ovaryum fonksiyonlarını düzenleyebileceği ve iyileştirebileceği sonucuna varıldı. Bu sonuçların kliniğe yansıtılması için multidisipliner bir yaklaşım gerekmektedir. Multidisipliner planlanan daha sonraki çalışmalarda, Fa uygulamasına devam edilerek Kİ-MKH'lerin ilerleyen günlerde ovaryumdaki etkileri ve varlıkları incelenebilir ve klinikte infertilite tanısı alan hastalarda, bu iki ajanın birlikte uygulanması değerlendirilebilir.



6. KAYNAKLAR

- Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Transplantation*, 2009; 105 (4):1815-1822.
- Ahel M, Giger W, Koch M. Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment. 1. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Res*, 1994; 28,1131- 1142.a
- Ahel M, Giger W, Schaffner C. Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactant in the aquatic environment. 2. Occurrence and transformation in rivers *Water Res*, 1994; 28,1143-1152.b
- Ahel M, Mcevoy J, Giger W. Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in fresh-water organisms. *Environ Pollut*, 1993; 79: 243-248.
- Alipour F, Parham A, Mehrjerdi HK, Dehghani H. Equine adipose-derived mesenchymal stem cells: Phenotype and growth characteristics, gene expression profile and differentiation potentials. *Cell J*, 2015; 16 (4):456-465.
- Alişan Suna P, Cengiz Ö, Ceyhan A, Atay E, Ertekin T, Nisari M, Yay A. The protective role of curcumin against toxic effect of nonylphenol on bone development. *Human & Experimental Toxicology*, 2021;40(12): 63-76.
- Aly HA, Domènech Ò, Banjar ZM. Effect of nonylphenol on male reproduction: Analysis of rat epididymal biochemical markers and antioxidant defense enzymes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2012; 261:134-141.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993;90(17):7915-7922.
- Arıncı K, Elhan A. *Anatomi*. (4. Baskı). Güneş Kitabevi, İstanbul; 2006; s.: 196-225.

- Arukwe A, Thibaut IK, Celius T, Goksoy A, Cravedi JP. In vivo and in vitro metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicol*,1999; 49,289-304.
- Aydos Z, Boyacıoğlu M. Ratlarda Deneysel Bisfenol A Toksikasyonunda Folik Asitin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması. *Animal Health Prod and Hyg*, 2019; 8(2) : 642-646.
- Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*, 2004; 8 (3):301-316.
- Baydar T, Şahin G. Folat düzeylerini etkileyen faktörler. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 1994; 14(1):48-61.
- Bayşu SN, Bayşu N. *Biyokimya. Güneş Tıp Kitapevleri*, Ankara, 2008.
- Bennie DT. Environmental occurrence of AP's and APE's. *Water Quality Research Journal of Canada*, 1999; 34 (1),79-122.
- Benoist B. Impact of folate deficiency on health. *World Health Organization (Facsimile)* 1998.
- Blackburn MA, Waldock MJ. Concentration of alkylphenol in rivers and estuaries in England and Wales. *Water Research*,1995; 29: 1623-1629.
- Britannica. <https://www.britannica.com/science/ovary-animal-and-human>. Erişim tarihi:1 Temmuz 2023.
- Brooke L, Thursby G. Ambient aquatic life water quality criteria for nonylphenol. Washington D.C. USA: Office of Water, Office of Science and Technology, 2005.
- Brunner PH, Caplı S, Marcomini A, Giger W. Occurrence and behavior of linear alkylbenzene sulphonates, nonylphenol, nonylphenol mono- and nonylphenol diethoxylates in sewage and sewage sludge treatment. *Water Res*,1988; 22: 1465-1472.

- Buitrón G, Torres-Bojorges AX, Barcia GC. Removal of p-Nonylphenol Isomers Using Nitrifying Sludge in a Membrane Sequencing Batch Reactor, 2015.
- Can A. Kök Hücre. Ankara: Akademisyen Tıp Kitabevi; 2014.
- Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *Journal of cellular physiology*, 2007; 213(2):341-347.
- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ*, 1992; 305: 609-613.
- Chen B, Li Q, Zhao B, Wang Y. Stem cell-derived extracellular vesicles as a novel potential therapeutic tool for tissue repair. *Stem cells translational medicine*, 2017; 6(9), 1753-1758.
- Christiansen T, Korsgaard B, Jørgensen A. Effects of nonylphenol and 17 β estradiol on vitellogenin synthesis, testicular structure and cytology in male eel *Zoarces viviparus*. *J Exp Biol*, 1998;201:179-182.
- Coldham NG, Sivapathasundaram S, Dave M, Ashfield LA, Pottinger TG, Goodall C. Biotransformation, tissue distribution, and persistence of 4-nonylphenol residues in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Drug Metab Dispos*, 1998; 26: 347-354.
- Condic ML. Totipotency: what it is and what it is not. *Stem cells and development*, 2013; 23(8):796-812.
- Dalçık H. Nobel Matbaacılık, İstanbul 2002; 560.
- Demir R. İnsanın Gelişimi ve İmplantasyon Biyolojisi, Palme yayıncılık, Ankara, 1995: 92-115.
- Duan P, Hu C, Butler HJ, Quan C, Chen W, Huang W, Tang S, Zhou W, Yuan M, Shi Y, Martin FL, Yang K. 4-Nonylphenol induces disruption of spermatogenesis associated with oxidative stress-related apoptosis by targeting p53-Bcl-2/Bax-Fas/FasL signaling. *Environ Toxicol*, 2017; 32(3):739-753.
- Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*, 2005;38(12):1103-1111.

- Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clin Biochem, 2004;37(4):277-285.
- Ersöz M. Kordon Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerinin Hepatosit Hücrelerine Farklılaştırılmasının Optimizasyonu. Yıldız Teknik Üniversitesi. Doktora Tezi. İstanbul 2014; s1-228.
- EU. European Union Risk Assessment Report. 4-Nonylphenol (Branched) and Nonylphenol, 2002; 2nd Priority List Volume: 10.
- Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. Hum Reprod, 1992; 7: 1342-1346.
- Forssen KM, Jagerstad MI, Wigertz K, Witthoft CM. Folate and dairy products: a critical update. J Am Coll Nutr, 2013; 19:100-110.
- Fries E, Püttmann W. Occurrence of 4-Nonylphenol in rain and snow. Atmospheric Environment, 2004; 38: 2013-2016.
- Gabr H, Abdelhakiim Rateb M, El Sissy MH, Seddiek HA, Gouda SAA. The effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on chemotherapy induced ovarian failure in albino rats. Microsc Res Tech, 2016;79(10):938-947.
- Ghadami M, El-Demerdash E, Zhang D, Salama SA, Binhazim AA, Archibong AE, Chen X, Ballard BR, Sairam MR, Al-Hendy A. Bone marrow transplantation restores follicular maturation and steroid hormones production in a mouse model for primary ovarian failure. PLoS One, 2012; 7, e32462.
- Giger W, Brunner PH, Schaffner C. 4-Nonylphenol in sewage-sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. Science, 1984; 225: 623-625.
- Göktepe Ö, Önder GÖ, Çetindag E, Bitgen N, Cengiz Mat Ö, Alisan Suna P, Tufan E, Yalçın B, Baran M, Öz Gergin Ö, Yay A. The effect of different doses of nonylphenol on the blood-testicular barrier integrity, hormone level, and DNA damage in the testes of rats. Food and Chemical Toxicology, 2023; 177.

- Guenther K, Heinke V, Thiele B, Kleist E, Prast H, Raecker T. Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food. *Environ Sci Technol*, 2002; 36: 1676-1680.
- Guo J-Q, Gao X, Lin Z, Wu W, Huang L, Dong H, Chen J, Lu J, Fu Y, Wang J, Ma Y, Chen X, Wu Z, HE F, Yang S, Liao L, Zheng F, Tan J. BMSCs reduce rat granulosa cell optosis induced by cisplatin and perimenopause. *BMC Cell Biol*, 2013;14(1):1-9.
- Gutteridge J.M. Lipit peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*, 1995; 41 (12),1819-1828.
- Halsted CH. The intestinal absorption of dietary folates in health and disease. *J Am Coll Nutr*, 1989; 8:650-658.
- Hammia R, Ziani W. Extraction et culture des cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux de dromadaire. Yüksek Lisans tezi. Bioloji Bilimleri Fakültesi. Université KASDI MERBAH Ouargla-Algerie, 2014; s 9.
- Hao C, Croley TC, March RE, Koenig BG, Metcalfe CD. Mass spectrometric study of persistent acid metabolites of nonylphenol ethoxylate surfactants. *J Mass Spectrum*, 2000; 35(7),818-830.
- He Y, Chen D, Yang L, Hou Q, Ma H, Xu X. The therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells in premature ovarian failure. *Stem Cell Research & Therapy*, 2018; 9:263.
- Herrero-Martinez JM, Marti-Fernandez M, Simo-Alfonso E, Ramis-Ramos G. Determination of alkylphenol ethoxylates by micellar electrokinetic chromatography with bile salts. *Electrophoresis*, 2001; 22: 526-534.
- Hosseinkhani M, Shirazi R, Rajaei F, Mahmoudi M, Mohammadi N, Abbasi M. Engineering of the embryonic and adult stem cell niches. *Iran Red Crescent Med J*, 2013;15 (2):83-92.

- Hughes PJ, Mcellan H, Lowes DA, Khan SZ, Bilmem JG, Tovey SC, Godfrey RE, Michell RH, Kirk CJ, Michelangeli F. Estrogenic alkylphenols induce cell death by inhibiting testis endoplasmic reticulum Ca pumps. *Biochem.Biophy.Res.Comm*, 2000;277:568-574.
- Hunt PA, Hassold TJ. Human female meiosis: what makes a good egg go bad? *Trends Genet*, 2008; 24(2):86-93.
- ICIS.Nonylphenol.<http://www.icis.com/Articles/2007/06/25/4503346/nonylphenol.html>. 2007.
- Inan M, Bakar E, Cerkezayabekir A, Sanal F, Ulucam E, Subaşı C, Karaöz E. Mesenchymal stem cells increase antioxidant capacity in intestinal ischemia/reperfusion damage. *Journal of Pediatric Surgery*, 2017; 1196-1206.
- In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GMJS, Claas FHJ, Fibbe WE, Kanhai HHH. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem cells*, 2004; 22(7):1338-1345.
- Jacob AR. Folate, DNA methylation, and gene expression: factors of nature and nurture. *Am J Clin Nutr*, 2000; 72:903-904
- Jialal I, Fuller CJ. Oxidized LDL and antioxidants. *Clin Cardiol*, 1993; 16,16-19.
- Jobling S, Sheahan D, Osborne JA, Matthissen P, Sumpter JP. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ Toxicol Chem*, 1996; 152,194-202.
- Jobling S, Sumpter JP. Detergent components in sewage are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicol*, 1993; 27,361-372.
- Jubendradass R, D'cruz S. C, Ran, S. J. A, Mathur P. P. Nonylphenol induces apoptosis via mitochondria- and Fas-L-mediated pathways in the liver of adult male rat. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2012; 62: 405-411.
- Junqueira LC, Carneiro J. *Temel histoloji*. Nobel Tıp Kitabevi, 2006; 449-455.

- Kalaycıoğlu L, Serpek B, Nizamoğlu M, Bozpınar N, Tiftik AM. Biyokimya. Nobel Yayın Dağıtım, Konya, 1998.
- Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş. (Ramazan Demir, Çev. Ed.). Ankara: Palme Yayıncılık, 2006.
- Kim HJ, Park JS. Usage of human mesenchymal stem cells in cell-based therapy: advantages and disadvantages. *Dev Reprod*, 2017;21:1-10.
- Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: Regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research Therapy*, 2007; 9(1):204.
- Kuo CK, Li WJ, Mauck RL, Tuan RS. Cartilage tissue engineering: Its potential and uses. *Current Opinion Rheumatology*, 2006; 18(1):64-73.
- Lagos-Cabre R, Moreno RD. Contribution of environmental pollutants to male infertility: a working model of germ cell apoptosis induced by plasticizers. *Biological research*, 2012; 45(1), 5-14.
- Lee HJ, Selesniemi K, Niikura Y, Niikura T, Klein R, Dombkowski DM, Tilly JL. Bone marrow transplantation generates immature oocytes and rescues long-term fertility in a preclinical mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. *J. Clin. Oncol*, 2007; 25, 3198-3204.
- Lee PC, Lee W. In vivo estrogenic action of nonylphenol in immature female rats. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1996; 57: 341-348.
- Lee YS, Lee JE, Park HY, Lim YS, Lee JC, Wang SG, Lee BJ. Isolation of mesenchymal stromal cells (MSCs) from human adenoid tissue. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2013; 31(4-5):513-524.
- Lewis SK, Lech JJ. Uptake, disposition, and persistence of nonylphenol from water in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica*, 1996; 26: 813-819.
- Li L, Xie T. Stem cell niche: Structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005;21 (1):605-31.

- Liu J, Zhang H, Zhang Y, Li N, Wen Y, Cao F, Ai H, Xue X. Homing and restorative effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on cisplatin injured ovaries in rats. *Molecules and Cells*, 2014;37(12):865-72.
- Liu M, Ikehara S. Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells for Organ Repair. *Stem Cells International*, 2013; 8.
- Liu R, Zhang X, Fan Z, Wang Y, Yao G, Wan X, Liu Z, Yang B, Yu L. Human amniotic mesenchymal stem cells improve the follicular microenvironment to recover ovarian function in premature ovarian failure mice. *Stem Cell Research & Therapy*, 2019; 10: 299.
- Loyo Rosales JE, Rosales Rivera GC, Lynch AM, Rice CP, Torrents A. Migration of Nonylphenol from Plastic Containers to Water and a Milk Surrogate. *J Agric Food Chem*, 2004; 52: 2016-2020.
- Lu YY, Chen ML, Sung FC, Paulus SGW, Mao IF. Daily intake of 4-nonylphenol in Taiwanese. *Environ Int*, 2007; 33: 903-910.
- MacArthur BD, Ma'ayan A, Lemischka IR. Systems biology of stem cell fate and cellular reprogramming. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009;10:1-10.
- Mann MR, Body MR. Biodegradation of a nonylphenol ethoxylate by the autochthonous microflora in lake water with observations on the influence of light. *Chemosphere*, 2000; 41(9),1361-1369.
- Marcomini A, Pojana G, Sfriso A, Quiroga A. Behavior of anionic surfactants and their persistent metabolites in the Venice Lagoon, Italy. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2000; 19(8), 2000-2007.
- Matsuda Y, Sasaki M, Kataoka-Sasaki Y, Takayanagi A, Kobayashi K, Oka S, Nakazaki M, Masumori N, Kocsis JD, Honmou O. Intravenous infusion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduces erectile dysfunction following cavernous nerve injury in rats. *Sex Med*, 2017; 6 (1) 49-57.
- McLachlan JA, Simpson E, Martin M. Endocrine disrupters and female reproductive health. *Best Practice Res Clin Endocrinol Metab*, 2006; 20: 46-63.

- Mcleese DW, Zitko V, Sergeant DB, Burrige L, Metcalfe CD. Lethality and accumulation of alkylphenols in aquatic fauna. *Chemosphere*, 1981; 10: 723-730.
- Mehranjani M.S, Noorafshan A, Hamta A, Momeni H.R, Abnosi M.H, Mahmoodi M, Anvari M, Hazaveh M. Effects of vitamin E on ovarian tissue of rats following treatment with p-nonylphenol: A stereological study. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 2010;8: 1-9.
- Mescher AL. *Temel Histoloji*, Solakoğlu S (Edt), Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2015: 449-458.
- Mohammadi A, Omrani L, Omrani LR, Kiani F, Eshraghian A, Azizi Z, Omrani GR. Protective effect of folic acid on cyclosporine-induced bone loss in rats, *Transplant International* 2012, 25(1), 127-133.
- Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. *Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi*. Çeviri: Dakçık H. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2016.
- Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 2006;441(7097):1068-1074.
- Nimrod AC, Benson WH. Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. *Crit Rev Toxicol*, 1996; 26(3): 335-364.
- Nombela-Arrieta C, Ritz C, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012;12 (2):126-131.
- O'Halloran SL, Liber K, Gangl JA, Knuth ML. Effects of repeated exposure on the zooplankton community in littoral enclosures. *Environ Toxic Chem*, 1999; 18, 386-393.
- Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*, 2001;19 (3):193-204.
- Okai Y, Sato E F, Higashi-Okai K, Inoue M. Enhancing effect of the endocrine disruptor para-nonylphenol on the generation of reactive oxygen species in human blood neutrophils. *Environmental Health Perspectives*, 2004; 112, 553-556.

- Önder GÖ, Göktepe Ö, Karaman E, Karakaş E, Cengiz Mat Ö, Bolat D, Okur E, Canturk Tan F, Balçioğlu E, Baran M, Ermiş M, Yay A. Nonylphenol Exposure-Induced Oocyte Quality Deterioration Could be Reversed by Boric Acid Supplementation in Rats. *Biological Trace Element Research*, 2023; 201:4518-4529.
- Pakdemirli A, Toksöz F, Karadağ A, Mısırlıoğlu HK, Başbınar Y, Ellidokuz H, Açıkgöz O. Role of mesenchymal stem cell-derived soluble factors and folic acid in wound healing. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 2019; 49(3): 914-921.
- Pedersen SN, Christiansen KL, Pedersen B, Korsgaard B. In vivo estrogenic activity of branched and linear alkylphenols in rainbow trout (*onchoryncus mykiss*). *The Science Of The Total Environment*, 1999; 233,89-96.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999; 284(5411):143-147.
- Reilly PM, Schiller IJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 1991; 161,488-503.
- Rizk H, Tohamy AF, Sayed WM, Prince A. Ameliorative effects of bone marrow derived pancreatic progenitor cells on hyperglycemia and oxidative stress in diabetic rats. *Acta Histochemica*, 2018; 120(5):412-419.
- Ross HM, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas*. Lippincot Williams & Wilkins, Palme Yayıncılık 6. baskı (çeviri ed. Baykal B.) Ankara 2014; 830-875.
- Rudel RA, Camann DE, Spengler JD, Korn LR, Brody JG. Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust. *Environ Sci Technol*, 2003; 37: 4543-4553.
- Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond)*, 2005; 2: 1-8.

- Sadler TW. Langman Medikal Embriyolojisi (13th ed). Çeviri: Başaklar AC. Palme Yayıncılık, Ankara 2017; s.: 261-264.
- Safe SH. Environmental and dietary estrogens in human health: is there a problem? Environ Health Perspect, 1995; 103: 346-351.
- Saito I, Onuki A, Seto H. Indoor air pollution by alkylphenols in Tokyo. Indoor Air, 2004; 14(5): 325-332.
- Sawangmake C, Nantavisai S, Osathanon T, Pavasant P. Osteogenic differentiation potential of canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells under different β -glycerophosphate concentrations in vitro. Wetchasan Sattawaphaet, 2016;46: 617-625.
- Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. Nature, 2006;441:1075–9.
- Scaglione F, Panzavolta G. Folate, folic acid and 5-methyltetrahydrofolate are not the same thing. Xenobiotica, 2014; 44(5): 480-488.
- Scherjon SA, In't Anker PS, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FHJ, Willemze R, Fibbe WE, Kanhai HHH. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. Blood, 2003; 102(4): 1548-1549.
- Schwaiger J, Spieser OH, Bauer C, Ferling H, Mallow U, Kalbfus W, Negele RD. Chronic toxicity on nonylphenol and ethinylestradiol: Haematological and histopathological effects in juvenile common carp (cyprinus carpio). Aquatic Toxicology, 2000; 51,69-78.
- Scorei RI, Ciofrangeanu C, Ion R, Cimpean A, Galateanu B, Mitran V, Iordachescu D. In vitro effects of calcium fructoborate upon production of inflammatory mediators by LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Biol Trace Elem Res 2010; 135(1–3): 334-344.
- Seidel A. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. Wiley Interscience, 2004; 2: 225.

- Selesniemi K, Lee HJ, Niikura T, Tilly JL. Young adult donor bone marrow infusions into female mice postpone age-related reproductive failure and improve offspring survival. *Aging*, 2009; 1, 49-57.
- Shalaby MA, El Zorba HY, Ziada RM. Reproductive toxicity of methomyl insecticide in male rats and protective effect of folic acid, *Food and Chemical Toxicology* 2010; 48(11), 3221-3226.
- Singh S, Li SSL. Bisphenol A and phthalates exhibit similar toxicogenomics and health effects, *Gene* 2012; 494(1), 85-91.
- Skakkebaek NE, Meyts ERD, Jorgensen N, Carlsen E, Petersen PM, Giwercman A, Andersen AG, Jensen TK, Andersson AM, Muller J. Germ cell cancer and disorders of spermatogenesis: an environmental connection. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica (APMIS)*, 1998; 106: 3-11.
- Soares A, Guieysse B, Jefferson B, Cartmell E, Lester JN. Nonylphenol in The Environment: A Critical Review on Occurrence, Fate, Toxicity and Treatment in Wastewaters. *Environment International*, 2008; 34, 1033-1049.
- Sohni A, Verfaillie CM. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. *Stem Cells Int.* 2013; 130763.
- Solomon EP. İnsan Anatomisi ve Fizyolojisi Giriş. Süzen LB. (Edt), Birol Basın Yayın Dağıtım, İstanbul 2000; 274.
- Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C. P-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from “modified” polystyrene. *Environ. Health Perspect*, 1991; 92: 167-173.
- Sun Q, Zhang Z, Sun Z. The potential and challenges of using stem cells for cardiovascular repair and regeneration. *Genes Dis.* 2014;1(1):113-119.
- Suzergoz F, Erdem DAP, Sepet E, Bektas M, Yalman N, Gurol AO. A pilot study on the isolation of dental pulp stem cells, potential of forming colonies and defining the content of stem cells. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 2009; 29:128-133.

- Şeftalioğlu A. Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi. Tıp&Teknik Yayıncılık, Ankara 1998; 650.
- Tapiero H, Tew KD. Estrogens and environmental estrogens. Biomed Pharmacother, 2002; 56: 36-44.
- Tekelioğlu M. Özel Histoloji ince Yapı ve Geliştirme. Antıp A.Ş Yayınları, Ankara 2002.
- Topparı J, Larsen JC, Christiansen P. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. Environ Health Persp, 1996; 104: 741-803.
- Toyo'oka T, Oshige Y. Determination of Alkylphenols in Mineral Water Contained in PET Bottles by Liquid Chromatography with Coulometric Detection. Anal Sci, 2000; 16: 1071-1076.
- Tyler CR, Jobling S, Sumpter JP. Endocrine disruption in wildlife: A critical review of the evidence. Crit Rev Toxicol, 1998; 28, 319-361.
- Uguz C, Togan I, Eroglu Y, Tabak I, Zengin M, Iscan M. Alkylphenol concentrations in two rivers of Turkey. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2003; 14,87-88.
- Uğuz C, İşca M, Togan G. Alkylphenols in the environment and their adverse effects on living organisms. Kocatepe Veterinary Journal, 2009; 2 (1): 49-58.
- Unur E, Ülger H, Ekinçi N. Anatomi. Kıvılcım Kitabevi 4. baskı, Kayseri; 2012.
- Urriola-Muñoz P, Lagos-Cabré R, Moreno RD. A mechanism of male germ cell apoptosis induced by bisphenol-A and nonylphenol involving ADAM17 and p38 MAPK activation. PLoS One, 2014; 9(12):e113793.
- Urriola-Muñoz P, Li X, Maretzky T, McIlwain DR, Mak TW, Reyes JG, Blobel CP, Moreno D. The Xenoestrogens Biphenol-A and Nonylphenol differentially regulate metalloprotease-mediated shedding of EGFR ligands. J Cell Physiol, 2018; 233(3), 2247-2256.

- Vazquez-Duhalt R, Marquez-Rocha F, Ponce E, Licea AF, Viana MT. Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant-scientific review. *Appl Ecol Environ Res*, 2006; 4: 1-25.
- Ventura F, Caixach J, Figueras A, Espalder I, Fraisse D, Rivera J. Identification of Surfactants in Water by Fab Mass-Spectrometry. *Water Res*, 1989; 23,1191-1203.
- Voga M, Adamic N, Vengust M, Majdic G. Stem Cells in Veterinary Medicine- Current State and Treatment Options. *Front Vet Sci*. 2020;7:278.
- Wald N, Sneddon J, Densem J, Frost C, Stone R. MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin study. *The Lancet*, 1991; 338: 131-137.
- Warhurst AM. An environmental assessment of alkylphenol ethoxylates and alkylphenols. *Ph D Friends Earth*, 1995; 1-15.
- Watt FM, Driskel RR. The therapeutic potential of stem cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2010; 365(1537):155-163.
- Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, 2000; 100(1): 157-168.
- White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP, Parker MG. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology*, 1994; 135: 175-182.
- Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*, 2006; 6 (2): 93-106.
- Wilson J. Folic Acid supplementation stimulates notch signaling and cell proliferation in embryonic neural stem cells. *J Clin Biochem Nutr*, 2010; 47: 174-180.
- Wright AJ, Finglas PM, Dainty JR, Wolfe JA, Hart DA, Wright DM, Gregory JF. Differential kinetic behavior and distribution for pteroylglutamic acid and reduced folates: a revised hypothesis of the primary site of PteGlu metabolism in humans. *J Nutr*, 2005; 135: 619-623.

- Yang DK, Ding WH. Determination of alkylphenolic residues in fresh fruits and vegetables by extractive steam distillation and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2005; 1088: 200-204.
- Yates AA, Schlicker SA, Suitor CW. Dietary reference intakes: the new basis for recommendations for calcium and related nutrients, B vitamins, and choline. *J Am Diet Assoc*, 1998; 98, 699-702.
- Ye XF, Yao YF, Wang LZ. Study on reproductive toxicity in male embryo rats with the pregnancy SD rates exposed by nonylphenol. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*, 2012; 30(11):856-858.
- Yun YR, Won JE, Jeon E, Lee S, Kang W, Jo H, Jang JH, Shin US, Kim HW. Fibroblast growth factors: Biology, function, and application for tissue regeneration. *Journal of Tissue Engineering*, 2010; 1(1):218142.
- Yücedağ F, Okur E, Uğuz C, Zemheri F, Kuzu S, Ayçiçek A, Kahveci OK. The effects of nonylphenol on hearing in rats. *Int Adv Otol*, 2014; 10(1), 76-79.
- Zarbakhsh S, Safar R, Sameni HR, Yousefi B, Safari M, Khanmohammad N, Hayat P. Effects of co-administration of bone marrow stromal cells and l-carnitine on the recovery of damaged ovaries by performing chemotherapy model in rat. *Int J Fertil Steril*. 2019; 13(3): 196-202.
- Zhou L, Lin Q, Wang P, Yao L, Leong K, Tan Z, Huang Z. Enhanced neuroprotective efficacy of bone marrow mesenchymal stem cells co-overexpressing BDNF and VEGF in a rat model of cardiac arrest-induced global cerebral ischemia, *Cell Death Disease* 2017; 8 (5) e2774.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*, 2001; 7(2): 211-228.

EKLER



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(EÜHADYEK)



Tarih: 08.01.2020

Toplantı Sayısı: 01

Karar No:20/006

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 08.01.2020 tarihinde Prof. Dr. Gültekin ATALAN 'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi
Vehbi GÜNEŞ	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Fusun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Yusuf KONCA	Prof. Dr.	Ziraat Fakültesi
Ahmet ÖZTÜRK	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
M. Betül AYCAN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Ayşe EKEN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Zühal HAMURCU	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi
Sezer DEMİRBUĞA	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi
İbrahim KARAMAN	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi
Zeynep CAFEROĞLU	Dr.Öğr.Üyesi	Sağlık Bilimleri Fakültesi
Eray AKTUĞ	Arş. Gör. Dr.	Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi ER
Umut ALPMAN	Arş. Gör.	Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK)
Gencay EKİNCİ	Arş. Gör.	Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrk
Ali KOÇ	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	Sivil Üye
Mehmet TAV	Dernek Üyesi (Avukat)	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji A.D.'dan Doç. Dr. Gültekin ATALAN tarafından sunulan "Nonylphenol ile Oluşturulan Ovaryum Hasarı Üzerine Mezenşimal Kök Hücre ve Folik Asitin Etkisi" başlıklı proje incelenmiş ve uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verilmiştir.

Tarih : 08.01.2020

Etik Kurul Başkanı : Prof. Dr. Gültekin ATALAN

NONYLPHENOL İLE OLUŞTURULAN OVARYUM HASARI ÜZERİNE KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI MEZENŞİMAL KÖK HÜCRE VE FOLİK ASİTİN ETKİSİ

ORJİNALLİK RAPORU

%**24**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**24**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**2**

YAYINLAR

%

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

%**17**

2

hdl.handle.net

İnternet Kaynağı

%**1**

3

acikerisim.aku.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

%**1**

4

pdffox.com

İnternet Kaynağı

%**1**

5

docplayer.biz.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

6

www.researchgate.net

İnternet Kaynağı

<%**1**

7

**fc5df1b7-ace4-4336-87e5-
47fe13907584.filesusr.com**

İnternet Kaynağı

<%**1**

8

openaccess.ogu.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

<%**1**

ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı : Ayşe CEYHAN

e-mail :

EĞİTİM

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2018-Halen
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2014-2018
Lisans	Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2008-2012

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2019- Halen	Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi	Öğretim Görevlisi

YABANCI DİL

İngilizce

ULUSLARARASI HAKEMLİ DERGİLERDE YAYIMLANAN MAKALELER

1. Göktepe Özge, Balcıoğlu Esra, Baran Münevver, Cengiz Mat Özge, Ceyhan Ayşe, Alişan Suna Pınar, Bolat Demet, Yalçın Betül, Yay Arzu Hanım (2023). Protective effects of melatonin on female rat ovary treated with nonylphenol. Biotechnic&Histochemistry, 98 (1), 13-19., Doi: 10.1080/10520295.2022.2075566
2. Alisan Suna Pınar, Cengiz Özge, Ceyhan Ayşe, Atay Emre, Ertekin Tolga, Nisari Mehtap, Yay Arzu Hanım (2021). The protective role of curcumin against toxic effect of nonylphenol on bone development. Human & Experimental Toxicology, Doi: 10.1177/09603271211030548

3. Önder Gözde Özge, Balcıoğlu Esra, Baran Münevver, Ceyhan Ayşe, Cengiz Özge, Alişan Suna Pınar, Yıldız Oğuz Galip, Yay Arzu Hanım (2021). The different doses of radiation therapyinduced damage to the ovarian environment in rats. International Journal of Radiation Biology, 97, Doi: 10.1080/09553002.2021.1864497
4. Yay Arzu Hanım, Önses Mustafa Serdar, Şahmetlioğlu Ertuğrul, Ceyhan Ayşe, Pekdemir Sami, Önder Gözde Özge, Sezer Gülay, Soyer Sarıca Zeynep, Aydın Funda (2020). Raman spectroscopy: A novel experimental approach to evaluating cisplatin induced tissue damage. Talanta, 207, 120343, Doi: 10.1016/j.talanta.2019.120343
5. İnık Özkan, Ceyhan Ayşe, Balcıoğlu Esra, Ülker Erkan (2019). A new method for automatic counting of ovarian follicles on whole slide histological images based on convolutional neural network. Computers In Biology And Medicine, 112(103350), Doi: 10.1016/j.compbimed.2019.103350
6. İnık Özkan, Balcıoğlu Esra, Ceyhan Ayşe, Ülker Erkan (2019). Using Convolution Neural Network for Classification of Different Tissue Images in Histological Sections.. Annals Of Faculty Engineering Hunedoara– International Journal Of Engineering, 17(1), 101-104
7. Bahadır Anzel, Ceyhan Ayşe, Öz Gergin Özlem, Yalçın Betül (2018). Protective effects of curcumin and beta-carotene on cisplatin-induced cardiotoxicity: An experimental rat model. AnatolJCardiol

ULUSAL HAKEMLİ DERGİLERDE YAYIMLANAN MAKALELER

1. Ceyhan Ayşe, Baran Münevver, Suna Pınar, Cengiz Mat Özge, Yay Arzu Hanım (2023). Comparison of effects of curcumin and beta-carotene on ovarian damage caused by cisplatin. Cukurova Medical Journal, 48, Doi: 10.17826/cumj.1344952
2. Balcıoğlu Esra, Bilgici Pınar, Yalçın Betül, Yay Arzu Hanım, Bolat Demet, Ceyhan Ayşe, Somdaş Mehmet Akif (2021). Histological examination of structural changes in the cochlear canal. KBB Uygulamaları, 9(1), 12-17., Doi: 10.5606/kbbu.2021.57060

YAZILAN ULUSAL KİTAPLAR VEYA KİTAPLARDAKİ BÖLÜMLER

1. **ÖZEL HİSTOLOJİ**, Bölüm adı:(Karaciğer, Safra Kesesi ve Pankreas Histolojisi) (2021)., CEYHAN AYŞE, Akademisyen Kitabevi, Editör:Özge Göktepe, Basım sayısı:1, Sayfa Sayısı 205, ISBN:978- 625-7496-74-2, Türkçe(Ders Kitabı)
2. **TEMEL HİSTOLOJİ**, Bölüm adı:(Histolojiye Giriş) (2020)., CEYHAN AYŞE, Pegem Akademi Yayıncılık, Editör: Birkan Yakan, Arzu Yay, Esra Balcıoğlu, Basım sayısı:1, Türkçe (Ders Kitabı)

SERTİFİKALAR

1.Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, ERCİYES ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, 16.02.2015 -23.05.2015 (Ulusal)

2.Pedagojik Formasyon Programı Sertifikası, EGİTİM BİLİMLERİ, ERCİYES ÜNİVERSİTESİ,13.09.2010 -22.06.2012 (Ulusal)

