

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KEMOTERAPİYE MARUZ KALMIŞ DIŞI
SIÇANLARDA ROSİGLİTAZONE' UN
OVARYUMA ETKİSİ**

HANDE TOPEL

HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2011

TEZ KODU:DEU.HSI.Msc-2008970019

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KEMOTERAPİYE MARUZ KALMIŞ DIŞI
SIÇANLARDA ROSİGLİTAZONE' UN
OVARYUMA ETKİSİ**

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HANDE TOPEL

Danışman Öğretim Üyeleri:

1. Doç. Dr. H. Alper BAĞRIYANIK
2. Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL

Bu proje DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2010.KB.SAG.021 sayı ile desteklenmiştir.

TEZ KODU:DEU.HSI.Msc-2008970019

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek lisans programı öğrencisi Hande TOPEL'in KEMOTERAPİYE MARUZ KALMIŞ DİŞİ SIÇANLARDA ROSİGLİTAZONE'UN OVARYUMA ETKİSİ Konulu yüksek lisans tezi 26 Mayıs 2011 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı/başarısız bulunmuştur.

Doç. Dr. H. Alper BAĞRIYANIK
BAŞKAN

Doç. Dr. Güven ERBİL
ÜYE

Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL
ÜYE

Doç. Dr. Esra ERDAL
ÜYE

Doç. Dr. Kazım TUĞYAN
ÜYE

Doç. Dr. Çağnur ULUKUŞ
YEDEK ÜYE

Doç. Dr. Bekir Uğur ERGÜR
YEDEK ÜYE

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
ŞEKİL LİSTESİ:	iv
TABLolar:	vi
KISALTMALAR:	vii
TEŞEKKÜR	ix
ÖZET	1
ABSTRACT	5
1. GİRİŞ VE AMAÇ	8
2. GENEL BİLGİLER	10
2.1. Ovaryum	10
2.1.1. Ovaryumun Embriyolojisi	10
2.1.2. Ovaryumun Anatomisi	12
2.1.3. Ovaryumun Histolojisi	13
2.1.3.1. Oogenez	16
2.1.3.1.1. Doğum Öncesi Olgunlaşma (Prenatal Maturasyon)	16
2.1.3.1.2. Doğum Sonrası Olgunlaşma (Postnatal Maturasyon)	17
2.1.3.2. Folikül Gelişimi	17
2.2. Apoptoz	25
2.2.1. Apoptoz'un Tanımı Ve Tarihçesi	25
2.2.2. Apoptoz Ve Nekroz Arasındaki Farklar	25
2.2.3. Apoptozun Görüldüğü Olaylar	28
2.2.4. Morfolojik Ve Biyokimyasal Değişiklikler	29
2.2.4.1. Morfolojik Değişiklikler	29

2.2.4.2. Biyokimyasal Değişiklikler	29
2.2.5. Apoptoz Mekanizması.....	30
2.2.5.1. Ekstresek / Reseptör Aracılı Yol.....	30
2.2.5.2. İntrensek / Mitokondrial Yol.....	31
2.2.6. Apoptoz Regülatörleri.....	32
2.2.7. Apoptoz Ve Ovaryum	35
2.3. Siklofosfamid.....	38
2.4. Rosiglitazone	42
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	47
3.1. Araştırmanın Tipi	49
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	50
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örnekleme/Çalışma Grupları	51
3.4. Çalışma Materyali	52
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	53
3.6. Veri Toplama Araçları.....	54
3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler	54
3.6.2. Araştırmada Kullanılan Yöntemler	54
3.6.2.1. Kemoterapi Modelinin Oluşturulması	54
3.6.2.1.1. Siklofosfamid'in Hazırlanışı	54
3.6.2.2. Rosiglitazone' un Hazırlanışı.....	54
3.6.2.3. Doku Örneklerinin Hazırlanması	54
3.6.2.4. Rutin Doku Takibi Protokolü	55
3.6.2.5. Işık Mikroskopik Boya Takibi	55
3.6.2.5.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Prosedürü	55
3.6.2.5.2. Masson's Trikrom Boyama Prosedürü	56

3.6.2.6. İmmunohistokimyasal İnceleme.....	57
3.6.2.6.1. DNA Fragmantasyonu Saptama Protokolü.....	57
3.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi.....	59
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	60
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	61
3.10. Etik Kurul Onayı.....	62
4. BULGULAR	63
4.1. Işık Mikroskopik Bulgular.....	63
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular	75
4.3. Folikül Sayılarının Değerlendirilmesi	80
5. TARTIŞMA	86
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	91
7. KAYNAKLAR	93
8. EKLER.....	99

ŞEKİL LİSTESİ:

Şekil 1: Y kromozomunun kısa kolunda "testis belirleyici faktör" SRY geni	10
Şekil 2: Dişi genital sistem (Ross ve Pawlina)	13
Şekil 3: Ovaryumun histolojik görünümü (Ross ve Pawlina).....	14
Şekil 4: Primordial folikül (Ross ve Pawlina)	18
Şekil 5: Primer foliküller (erken ve geç primer folikül) (Ross ve Pawlina)	18
Şekil 6: Sekonder folikül (Ross ve Pawlina)	19
Şekil 7: Olgun Graaf folikülü (Ross ve Pawlina).....	20
Şekil 8: Östrojen biyosentezi (11Ni).....	22
Şekil 9: Apoptoz ve nekroz (KUMAR, ABBAS ve FAUSTO)	26
Şekil 10: İntrensek/Ekstrensek apoptoz yolağı (KUMAR, ABBAS ve FAUSTO)	32
Şekil 11: Poly-ADP Riboz' un kaspaz-3 tarafından kesilmesi (Bank)	35
Şekil 12: Siklofosamid'in kimyasal formülü (Zhang, Tian ve Zhou)	38
Şekil 13: Siklofosamid'in metabolizması (Zhang, Tian ve Zhou)	40
Şekil 14: Rosiglitazone' un moleküler formülü (Tack ve Smits).....	42
Şekil 15: Ovaryumda PPAR γ ekspresyonu (Minge, Bennett ve Norman RJ)	44
Şekil 16: Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti, H&E (Sarı ok: primer folikül, K: Korteks, M: Medulla, yıldız: Korpus luteum).....	64
Şekil 17: Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti, H&E. (Yeşil ok: sekonder folikül, Mavi oklar: primordial foliküller).	64
Şekil 18: Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti, Masson's Trikrom (sarı ok: primer folikül, yeşil ok: sekonder folikül).....	65
Şekil 19: Grup 1: Kemoterapi grubuna ait ovaryum kesiti, H&E (turuncu ok: granuloza hücre tabakasında apoptoz ve vakuolizasyon, kırmızı ok: atretik folikülde granuloza hücre debris).	66
Şekil 20: Grup 1: Kemoterapi grubuna ait ovaryum kesiti, H&E (mavi ok: eozinofili artışı gözlenen primordail foliküller, kırmızı ok: granuloza hücre debris, turuncu ok: granuloza hücre katmanında vakuolizasyon ve apoptoz).	66

Şekil 21: Grup 1: Kemoterapi grubuna ait ovaryum kesiti, H&E (sarı oklar: atretik foliküller).	67
Şekil 22: Grup 1: Kemoterapi grubuna ait ovaryum kesitinde apoptotik cisimler(siyah ok), H&E.....	68
Şekil 23: Grup 1: Kemoterapi grubuna ait ovaryum kesiti, Masson's Trikrom (sarı ok: atretik folikül, yeşil ok: granuloza hücre bakasında ve teka interna bazal laminasında kollajen artışı).	69
Şekil 24: Grup 2: Rosiglitazone deney grubu, H&E(sarı oklar: primer foliküller, mavi oklar: primordial foliküller, yıldız: korpus luteum).	70
Şekil 25: Grup 2: Rosiglitazone deney grubu ovaryum kesiti, H&E (yeşil oklar: primer foliküller, sarı ok: sekonder folikül, mavi ok: primordial folikül).	70
Şekil 26: Grup 2: Rosiglitazone deney grubuna ait ovaryum kesiti, Masson's Trikrom (sarı ok: sekonder folikül).	71
Şekil 27: Grup 3: Kemoterapi+NaCl grubu ovaryum kesiti, H&E (kırmızı ok: apoptoz ve vakuolizasyon, yeşil ok: sekonder folikül, sarı ok: atretik folikül).	72
Şekil 28: Grup 3: Kemoterapi+NaCl deney grubu ovaryum kesiti, H&E (kırmızı ok: granuloza hücre tabakasında vakuolizasyon ve apoptoz)	73
Şekil 29: Grup 3: Kemoterapi+NaCl deney grubu ovaryum kesiti, Masson's Trikrom (sarı ok: kortikal fibrosis, mavi ok folikül çevresinde kollajen artışı).	74
Şekil 30: Kontrol grubuna ait ovaryum dokusunda TUNEL pozitif hücreler (kırmızı oklar).	75
Şekil 31: Grup 1: Kemoterapi grubuna ait ovaryum dokusunda TUNEL pozitif hücreler (kırmızı oklar).....	76
Şekil 32: Grup 3: Kemoterapi + NaCl grubuna ait ovaryum dokusunda TUNEL pozitif hücreler (kırmızı oklar).....	77
Şekil 33: TUNEL pozitif boyanan hücrelerin gruplara göre yüzdesel dağılımı (*= Grup 2'ye göre istatistiksel anlamlılık gösterir).	78
Şekil 34: TUNEL pozitif hücre sayısının gruplara göre dağılımına ait boxplot grafiği.	79
Şekil 35: Gruplara göre folikül sayıları dağılımı.....	85

TABLolar:

Tablo 1: Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar (Ulukaya).	27
Tablo 2: Apoptozisi baskılayan ve indükleyen genler (Öktem, Özlem ve Özdol).	32
Tablo 3: Rutin doku takibi prosedürü	55
Tablo 4: Hematoksilen-Eozin boyama prosedürü	56
Tablo 5: TUNEL analizine göre gruplara ait tanımlayıcı istatistiksel bilgiler.	77
Tablo 6: TUNEL pozitif boyanan hücre verilerinin gruplar arası istatistiksel farklılıkları (P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş ve koyu karakterlerle vurgulanmıştır.).....	78
Tablo 7: Folikül sayısı değerlendirme tablosu.....	80
Tablo 8: Grupların primordial folikül sayısı ortalamaları ve gruplar arasında istatistiksel farklar (P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş ve koyu karakterlerle vurgulanmıştır.)	82
Tablo 9: Primordial folikül sayılarına ait tanımlayıcı istatistik bilgileri.....	82
Tablo 10: Grupların preantral folikül sayısı ortalamaları ve gruplar arasında istatistiksel farklar (P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş ve koyu karakterlerle vurgulanmıştır.)	83
Tablo 11: Grupların antral folikül sayısı ortalamaları ve gruplar arasında istatistiksel farklar (P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş ve koyu karakterlerle vurgulanmıştır.).....	84

KISALTMALAR:

a : arteriol

bFGF: Temel Fibroblast Büyüme Faktörü

cAMP: Siklik Adenozin Mono Fosfat

CL: Korpus Luteum

Eff : Efferent

EM : Elektron Mikroskobu

FSH: Folikül Stimule Edici Hormon

GnRH: Gonadotropin Salgılayıcı Faktör

H&E: Hematoksilen-Eozin

hCG: İnsan Karyonik Gonadotropini (Human Corionic Gonadotropin)

LH: Luteinleştirici Hormon

m : musculus

NaCl: Sodyum Klorür Solüsyonu

OMI: Oosit Olgunlaştırıcı Faktör (Oosit Maturing Factor)

PARP: Poli ADP-Riboz Polimeraz

PF: Primer Folikül

PMF: Primordial Folikül

PPARG: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- Gamma

TDF: Testis Belirleyici Faktör (Testis Determining Factor)

TUNEL: (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Deoxyuridine Triphosphate DNA Nick-End Labelling)

TZD: Tiazolidinedion

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimimde en büyük emeğe sahip sayın danışmanlarım Doç. Dr. Alper BAĞRIYANIK ve Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL' a; Histoloji-Embriyoloji öğrenimim süresince bilgi ve tecrübelerini benden sakınmayan sevgili Histoloji-Embriyoloji kürsüsü öğretim üyelerine, deney sürecinde karşıma çıkan engelleri aşmamda yardımcı olan sayın Doç.Dr. Esra ERDAL'a ve tüm hayatım boyunca daima içimde bana verdikleri desteğin gücünü ve sırtımda sıcacık ellerini hissettiğim aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hande TOPEL

KEMOTERAPİYE MARUZ KALMIŞ DIŞI SIÇANLARDA ROSİGLİTAZONE' UN OVARYUMA ETKİSİ

Hande TOPEL

**Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji
Anabilim Dalı.**

ÖZET

Amaç:

Çalışmamızda kemoterapötik bir etken madde olan ve ovaryum üzerindeki etkileri geri dönüşümsüz olan siklofosfamidin yarattığı ovarial hasarda; PPAR γ reseptörlerine bağlanarak etkin hale gelen antienflamatuar, anjiyogenik ve immün hücre aktivasyonu üzerindeki baskılayıcı etkileri bilinen Rosiglitazone' un etkilerini araştırmayı amaçladık.

Yöntem:

Deney gruplarımız aşağıdaki gibi tasarlandı.

Kontrol grubu: Hiçbir uygulamaya maruz kalmayan deney grubudur. (n=7)

I. Grup Kemoterapi grubu: 100mg/kg siklofosfamid uygulanan deney grubu. Enjeksiyon veya oral herhangi bir tedaviye yönelik ilaç uygulanmadı, deney grubu diğer gruplarla aynı sürede sakrifiye edildi. (n=7)

II. Grup Rosiglitazone deney grubu: 100mg/kg siklofosfamid uygulamasından 3 gün önce ve 15 gün sonra olmak üzere toplamda 18 gün 3mg/kg dozunda rosiglitazone %0.9'luk NaCl' de çözünerek oral gavaj yöntemiyle verildi. Son doz uygulamasından 24 saat sonra deney grubu sakrifiye edildi. (n=7)

III. Grup Kemoterapi+NaCl deney grubu: 100mg/kg siklofosfamid uygulamasından 3 gün önce ve 15 gün sonra olmak üzere toplamda 18 gün deney grubuna rosiglitazone eklenmemiş %0.9'lu NaCl solüsyonu oral gavaj yöntemiyle verildi. Son uygulamadan 24 saat sonra deney grubu sakrifiye edildi. (n=7)

Deney sonrasında kurifiye edilen deneklerden alınan ovaryum dokularından alınan kesitler H&E ve Masson's Trikrom boyanarak incelendi. İmmünohistokimyasal olarak TUNEL boyaması gerçekleştirilen kesitlerde TUNEL pozitif boyanan hücrelerin sayılmasıyla DNA fragmantasyonu değerlendirildi.

Ovaryum dokularından alınan 4 kesitte folikül sayıları değerlendirildi. Folikül sayıları primordial, preantral ve antral olarak sınıflandırılarak istatistiksel değerlendirmeye alındı.

Bulgular:

Kontrol grubunun histolojik incelemesinde ovaryum dokusu normal gözlenirken kortekste çok sayıda primordial, primer, sekonder ve olgun foliküller, birkaç korpora lutea ve ovarial siklusa bağlı olarak az sayıda atretik folikül gözlemlendi. Medullada kan damarları ve gevşek bağ doku normal görünümdeydi.

Grup 1: Kemoterapi grubunda kortekste yer alan özellikle gelişmekte olan (primer, sekonder) foliküllerde ve olgun foliküllerde yaygın apoptoz, vakuolizasyon görüldü. Kortekste olgun ve sekonder foliküller, ayrıca korpora lutea çevresinde bağ doku artışı göze çarparken kortikal fibrosis geliştiği alanlar gözlemlendi.

Grup 2: Rosiglitazone deney grubunda yine kemoterapiye bağlı atretik foliküller ve gelişmekte olan foliküllerde apoptoz birinci ve üçüncü gruba göre daha az oranda görüldü. Kortikal fibrosise bu grupta rastlanmazken foliküller çevresinde de kollajen artışı görülmedi.

Grup 3: Kemoterapi + NaCl grubunda birinci gruba benzer şekilde apoptoz ve vakuolizasyon yaygındı. Yine kortekste fibrotik alanlar göze çarparken korpora lutea çevresinde kollajen artışı görüldü.

TUNEL boyamasında DNA fragmantasyonu değerlendirildiğinde kontrol grubu da dahil olmak üzere apoptoz görüldü. Kontrol grubundaki apoptoz ovarial siklusun normal süreci olarak kabul edildi. Grup 1 ve Grup 3'te kontrol grubuna göre TUNEL pozitif hücre sayısı fazla iken bu artış istatistiksel olarak bir anlamlılık ifade etmedi. TUNEL pozitif hücre sayısı Grup 2'de kontrol grubuna oranla daha az iken yine bu

fark istatistiksel olarak anlamlı bir fark değildi. Grup 2 Grup 1 ve Grup 3'e oranla daha az sayıda TUNEL pozitif hücre içerirken, bu fark sadece Grup 1 ile istatistiksel anlamlılık gösterdi.

Kontrol grubu primordial folikül sayısı Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'ten istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fazla bulundu. Grup 2'ye ait primordial folikül sayısı Grup 1 ve Grup 2'den istatistiksel olarak daha fazlaydı. Grup 1 ile Grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi.

Kontrol grubu preantral folikül sayısı Grup 1 ve Grup 3'ten istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fazla bulundu. Kontrol grubu ile Grup 2 preantral folikül sayısı arasında istatistiksel bir farklılık görülmedi. Grup 1 ile Grup 2 ve Grup 3 arasında preantral folikül sayısı açısından bir farklılık bulunmadı. Grup 2 preantral folikül sayısı Grup 3'ten istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde fazlaydı.

Kontrol grubu antral folikül sayısı Grup 1 ve Grup 3'ten istatistiksel olarak anlamlı şekilde fazla bulundu. Kontrol grubu ile Grup 2 antral folikül sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi. Grup 1 ile Grup 2 ve Grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken; Grup 2 antral folikül sayısı Grup 3'ten istatistiksel olarak anlamlı şekilde fazla bulundu.

Korpora lutea sayıları arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi.

Sonuç:

Çalışmamızda siklofosfamidin ovaryum üzerindeki apoptotik etkisi hem histolojik hem immünohistokimyasal hem de moleküler tekniklerle, fibrotik etkisi ise ışık mikroskopik olarak gösterilmiştir. Rosiglitazone'un çalışmada kullanılan dozuyla siklofosfamidin ovaryum üzerindeki apoptotik etkisini azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca siklofosfamidin neden olduğu ovarial folikül rezervindeki azalmaya, preantral ve antral foliküllerdeki dejenerasyona karşı Rosiglitazone'un koruyucu bir etkisi olduğu ilk kez ortaya koyulmuştur. Ancak Rosiglitazone'un siklofosfamid toksisitesinden koruyucu etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için gelecek çalışmalarda daha farklı doz

alışmalarının denenmesi ve foliküller üzerindeki koruyucu etkisinin mekanizmalarının araştırılması gerekmektedir.

Anahtar Sözcükler:

Rosiglitazone, Siklofosamid, Ovaryum, Apoptoz, Primordial Folikül.

ABSTRACT

Purpose:

We aimed to show the effects of Rosiglitazone (which has anti-inflamator, angiogenic and immunosuppressive effects) on the irreversible ovarian tissue damage of cyclophosphamide.

Material and Method:

Animal groups were designed as showed below:

Control Group: No application was performed to this animals. (n=7)

- I. Group Chemotherapy Group: 100 mg/kg cyclophosphamide was applied by intraperitoneal injection. (n=7)
- II. Group Rosiglitazone Group: 100 mg/kg cyclophosphamide was applied by intraperitoneal injection. Three days before the chemotherapy; 3 mg/kg Rosiglitazone application begun and continued fifteen consecutive days. Rosiglitazone was applied by orogastric sonda. (n=7)
- III. Group Chemotherapy + NaCl Group: 100 mg/kg cyclophosphamide was applied by intraperitoneal injection. Three days before the chemotherapy; 1 ml %0.9 NaCl solution application begun and continued fifteen consecutive days. Rosiglitazone was applied by orogastric sonda. (n=7)

At the end of the experiment, animals were sacrificed under ether anesthesia. Ovary tissue slides were stained with Hematoxyline&Eosine (H&E) and Masson Trichrome for light microscopy. Immunohistochemical TUNEL stain (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labeling) was performed to determine apoptosis. The ovary tissues which were collected from the animals.

RESULT:

In control group; ovary tissue was normal. There were many primordial, primer, seconder, mature follicules and corpora lutea in the ovary cortex. And there was a

small number of atretic follicles because of the normal ovarian cycle. Blood vessels and medulla was normal.

In Group 1: Chemotherapy group, especially in growing follicles (primer and seconder) and mature follicles there were a widespread apoptosis and vacuolisation. There was cortical fibrosis in cortex and an increase in connective tissue around corpora lutea and mature follicles. There was an increase in atretic follicle numbers.

In Group 2: Rosiglitazone group, there were many atretic follicles and apoptosis in growing follicles because of chemotherapy. But the incidences of apoptosis and atretic follicles were lower than Group 1 and 3. Cortical fibrosis and an increase of connective tissue was not seen in this group.

In Group 3: Chemotherapy + NaCl group, the findings were similar with Group 1. There were many atretic follicles, widespread apoptosis in growing follicles, cortical fibrosis and increase of connective tissue around the mature follicles and corpora lutea.

In TUNEL assay tissues showed widespread TUNEL positive cells even in control group. TUNEL positive cell numbers in control group was evaluated as the normal process of ovarian cycle. There was an increase of TUNEL positive cell counts in Group 1 and Group 3 but this increase was not statistically significant. The rate of TUNEL positive cell numbers was lower in Group 2 than control group but the difference was not statistically significant. The differences between the Group 2 and Group 3 was found statistically significant.

Primordial follicle number of control group was found significantly higher than Group 1, Group 2 and Group 3. Number of primordial follicles in Group 2 was found statistically higher than Group 1 and Group 3. There was no significant statistical difference between Group 1 and Group 3.

Preantral follicle number of control group was found significantly higher than Group 1 and Group 3. There was no significant difference between Group 2 and

Control. The difference between Group 1, Group 2 and Group 3 was not significant statistically. Preantral follicle number of Group 2 was significantly higher than Group 3.

Antral follicle number of control group was significantly higher than Group 1 and Group 3. There was no significant difference between control and Group 2. There was not a statistically significance between Group 1, Group 2 and Group 3. But antral follicle number of Group 2 was significantly higher than Group 3.

There was no statistical significance between corpora lutea numbers of the groups.

CONCLUSION:

In our study, we showed the fibrotic and apoptotic effect of cyclophosphamide by histologic and immunohistochemical techniques. According to our results; we consider that Rosiglitazone has a diminishing effect on apoptosis caused by cyclophosphamide. Also Rosiglitazone has a diminishing effect on primordial, preantral and antral follicle number reducing effect of cyclophosphamide. In our opinion, more studies are needed to understand the mechanism of Rosiglitazone in chemotherapy damage and if Rosiglitazone has a ability to protect primordial follicle reserve of ovary in chemotherapy.

Keywords:

Rosiglitazone, cyclophosphamide, apoptosis, ovary, primordial follicle.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Siklofosfamid gibi kemoterapötik ajanlar ovarial bozukluğa neden olan büyük risk faktörleridir (Meirow). Kanser tedavilerindeki gelişmeler ve artan sağ kalım oranları; yaşam kalitesinde iyileşmeye yol açmakta ve fertilitenin korunması giderek daha büyük önem kazanmaktadır. Kemoterapi, ilaca ve doza bağlı olarak primordial folikül havuzunda azalmaya neden olmaktadır (Sonmezer ve Oktay). Kemoterapinin yumurtalıklar üzerine etkileri ilerleyici ve dönüşümsüzdür.

Siklofosfamid, nonspesifik hücre-siklus alkalasyon ajanı, nitrojen-mustard analogu bir antineoplastiktir. Kanser ilaçları; kaspaz aktivasyonuna bağlı intrinsik ya da mitokondrial apoptozu indükleyerek ovaryumda folikül kaybına neden olur (Lopez ve Luderer).

PPAR'lar (peroxisome-proliferation-activated reseptor); steroid reseptör süperfamilyasına ait nuklear hormon reseptörleridir. Üç adet PPAR üyesi bulunur. Bunlar: PPAR α , PPAR β , PPAR γ 'dır. PPAR'ların ovaryum fizyolojisine direkt etki eden birçok hücresel fonksiyonda yeri olduğu bilinmektedir. PPAR'lar östrojen-response elementlerine bağlanabilir ve onları inaktif tutarak endoplazmik retikuluma ulaşmasını engeller. Ayrıca PPAR'lar östrojen biyosentezinde görevli aromataz enziminin ekspresyonu ve aktivitesini regule eder. İnsan yağ dokuda ve granuloza-lutein hücrelerinde aromataz aktivitesi PPAR γ aktivasyonu ile inhibe edilir. (Willis, White ve Brosens) PPAR'lar ovarial foliküler gelişim, ovulasyon ve luteal formasyon boyunca doku remodellenmesini ve anjiyogenezini etkileyen proteolitik enzimlerin ekspresyonunu ve aktivitesini modüle eder.

Her üç PPAR izoformu sıçan ovaryumunda tanımlanmıştır. PPAR γ mRNA'sı sıçır ve insan ovaryumunda bulunmuştur. PPAR γ gelişen foliküllerde primer olarak granuloza hücrelerinde eksprese edilir. (Carolyn, Braissant ve Wahli)

Ovarial fonksiyonlar üzerine etkili olan endotelin-1, nitrik oksit sentezi ve cyclooxygenase-2(COX-2) gibi faktörler PPAR'lar tarafından regule edilmektedir. PPAR γ endotelial hücrelerden endotelin-1 salgısını azaltır, makrofajlarda ve vasküler düz kas hücrelerindeki nitrik oksit-sentaz ekspresyonunu engeller. Sonuç olarak

PPAR'lar birçok yoldan ovaryum fonksiyonunu regule eder (Carolyn, Braissant ve Wahli) (Demirturk).

Bu ön bilgiler ışığında, çalışmamızda kanser tedavisinde kullanılan kemoteröpatik ajan siklofosfamidin neden olduğu ovarial hasara karşı Rosiglitazone'un olası koruyucu etkisini histolojik olarak incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

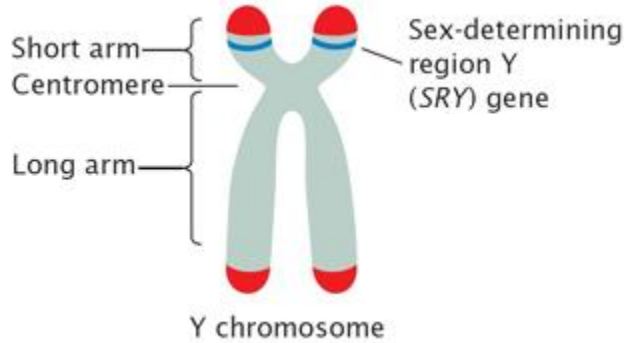
2.1. Ovaryum

2.1.1. Ovaryumun Embriyolojisi

Cinsiyetin farklanması bir kısmı otozomal olan bir çok geni içine alan kompleks bir süreçtir (Sadler).

Her ne kadar embriyonun genetik ve kromozomal cinsiyeti, ovumu döleyen sperm çeşidi ile fertilizasyon sırasında belirleniyorsa da; erkek ve dişi morfolojik karakteristikleri embriyonik 7. haftaya kadar gelişime başlamaz. Genital sistem gelişirken dönemde her iki cinste de birbirine benzer (Moore ve Persaud).

Cinsiyetin ikiye ayrılmasındaki anahtar, kısa kolunda "testis belirleyici faktör" (TDF) genini taşıyan Y kromozomudur. Bu faktörün varlığı veya yokluğu gonadal farklanmayı doğrudan etkiler ve Y kromozomunda yerleşmiş olan birçok genin rudimenter cinsiyet organlarının kaderini tayin etmek için harekete geçmesini sağlar (Sadler) (Şekil 1).



Şekil 1: Y kromozomunun kısa kolunda "testis belirleyici faktör" SRY geni

Gonadal gelişimin ilk safhaları 5. haftada ortaya çıkar. Mezonefrozun medialinde, mezotelde bir kalınlaşma oluşur ve epitelin ve altındaki mezenseşimin proliferasyonu sonucu mezonefrozun medialinde bir kabarıklık meydana gelir. Bu kabarıklık "gonadal kabartı (şişkinlik)" adını alır. Parmak şeklindeki epitelial kordonlar (primer seks kordonları) altındaki mezenseşim içerisine doğru kısa sürede büyürler. Bu durumda farklanmamış gonad dışta yer alan bir korteks ve içte yer alan bir medulladan oluşur. Eğer embriyo XX kromozomuna sahip ise farklanmamış gonadın korteksi overe farklanır ve medullası geriler. Embriyo XY kromozom kompleksine

sahip ise medulla testise farklanır ve korteks bir takım kalıntılar bırakarak gerileyerek dejenere olur (Moore ve Persaud).

Primitif seks hücreleri 4. Hafta başında yolk kesesi duvarında, allantoisin başlangıç yerine yakın endodermal hücreler arasında ortaya çıkarlar. Embriyonun katlanması sırasında amibik hareketlerle son bağırsak mezenterinin dorsali boyunca ilerler; 5. haftanın başında primitif gonadlara ulaşır ve 6. haftada gonadal kabartıları işgal ederler (Sadler).

Erkek fenotipinin gelişimi için bir Y kromozomu gereklidir fakat bu kromozomun sadece kısa ucu seks tayini için son derece önemlidir. Testis belirleyici faktör (TDF), testiküler farklılaşmayı sağlamaktadır. Bu organizatörün etkisi altında primer seks kordonları seminifer tübüllere farklılaşırlar. Y kromozomunun yokluğu over gelişimine neden olur. Mevcut gonadın tipi daha sonra oluşacak genital kanallara ve dış genitalere de yön verir. Fötal testislerde üretilen testosteron erkekliği belirlerken dışide primer seksüel farklılaşma hormonlardan bağımsızdır (Moore ve Persaud).

10. haftaya dek overler histolojik olarak ayırt edilemezler. Primer seks kordonları belirgin değildir, medulla içerisine sokularak rudimenter bir yapı olan "rete ovarii" yi meydana getirirler. Normalde rete ovarii ve ilkel seks kordonları dejenere olarak ortadan kalkarlar ve yerlerini ovaryum medullasını oluşturan damarlı stromaya bırakırlar (Moore ve Persaud).

Dişi gonadın yüzey epiteli erkeklerdekinin aksine çoğalmaya devam eder ve yedinci haftada altta mezenseimin içine girmiş halde ancak yüzeye yakın kortikal kordonlar denilen ikinci nesil kordonları oluşturur. Dördüncü ayda bu kordonlar her biri bir ya da daha çok sayıdaki primitif germ hücrelerini çevreleyen izole hücre topluluklarına dönüşür. Germ hücreleri zamanla oogoniyalara dönüşürken yüzey epitelinden aşağı göçen ve germ hücrelerini çevreleyen bu epitel hücreleri foliküler hücreleri meydana getirir. XX cinsiyet kromozomuna sahip bir embriyoda gonadın medullar kordonları gerileyip kortikal kordonları sekonder generasyon oluşturur. XY cinsiyet kromozomu taşıyan embriyoda ise medullar kordonlar testis kordonlarına dönüşür ve sekonder kortikal kordonlar gelişemez (Sadler).

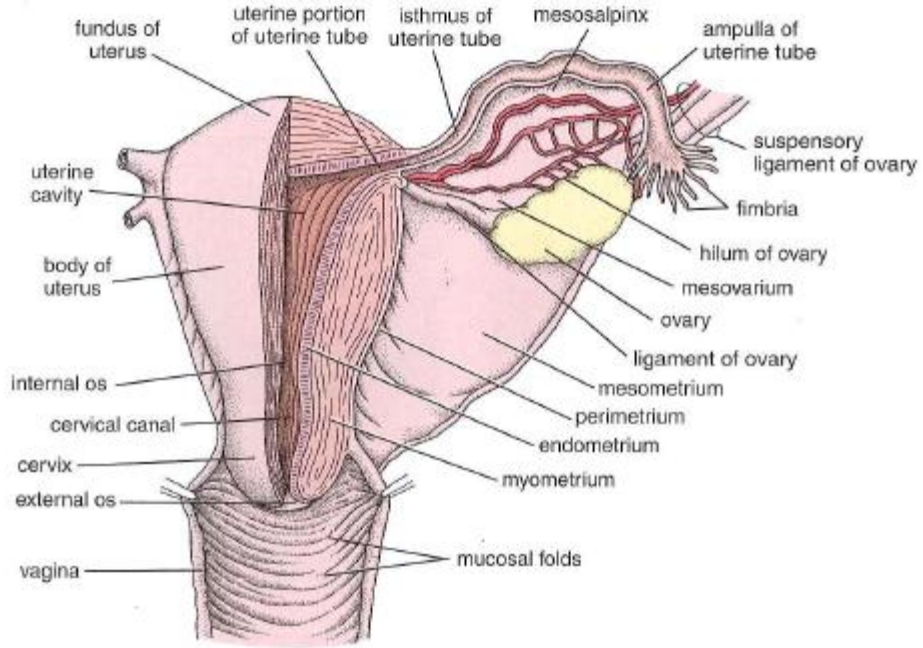
Fötal yaşam sırasında overlerde, oogoniumlardan oluşan aktif mitoz sonucu binlerce primordial folikül meydana gelir. Postnatal dönemde ise oogonium meydana gelmez. Her ne kadar doğumdan önce pek çoğu dejenere olsa da doğumdan sonra iki milyon civarında primer oosit kalmaktadır. Doğumdan sonra overin yüzey epiteli düzleşir ve tek tabakalı hale geçen hücreler, over hilumunda, periton mezoteli ile devamlılık kazanırlar. Overin yüzey epiteli korteksteki foliküllerden tunika albuginea adı verilen ince fibröz bir kapsülle ayrılır. Overler gerileyen mezonefrozdaki ayrıldıktan sonra, mezenteri olan mezovarium ile bağlanırlar (Moore ve Persaud).

2.1.2. Ovaryumun Anatomisi

Ovaryumlar kadında temel üreme organları olup pelvisin dış yan duvarlarındaki fossa ovarica' lara otururlar. Sağ ve sol olmak üzere bir çifttirler. Erkek üreme organı testisin homologudurlar. Ovaryumlar seksüel yönden olgun bir dişide, dişi üreme hücrelerini ve dişi seks hormonlarını üretirler.

Her ovaryum grimsi pembe renkte, badem şeklinde, solid, nodüler yüzeyli 3x2x1 cm boyutlarında ve 3-5 g ağırlığındadırlar.

Ovaryum bir periton plikası olan mesovaryum aracılığı ile ligatum uteri' nin arka yüzüne, ligatum ovarii proprium aracılığı ile tuba uterina' nın tutunma yerine yakın olarak uterus yan duvarına bağlanır. Mesovaryumun iki yaprağı arasında hilum ovarii' ye ulaşan arter, ven ve lenfatikler ile sinirler bulunur. Ovaryum pelvik duvara ligatum suspensorium ovarii ile bağlanır (Yıldırım) (Şekil 2).



Şekil 2: Dişi genital sistem (Ross ve Pawlina)

2.1.3. Ovaryumun Histolojisi

Ovaryumlar pelvis boşluğunun yan duvarına dayalı; erişkinlerde 3 cm uzunlukta, 2 cm genişlikte ve 1,5 cm kalınlıkta solid, pembe ve badem biçimli bezlerdir (Şekil 3). Boyutları ve histolojik görünümleri menstrual siklus, gebelik ve postmenapozal dönemlerde değişiklik gösterir. (Ovalle ve Nahirney) Ovaryumlar birbiri ile ilişkili iki fonksiyona sahiptir: gamet üretimi (gametogenez) ve steroid hormonların üretimi (steroidogenez). Dişilerde gamet üretimi oogenez adını alır. Gelişmekte olan gametler oosit, olgun gametler ise ova adını alır.

Ovaryum iki ana steroid hormon salgılar: östrojenler ve progesteronlar.

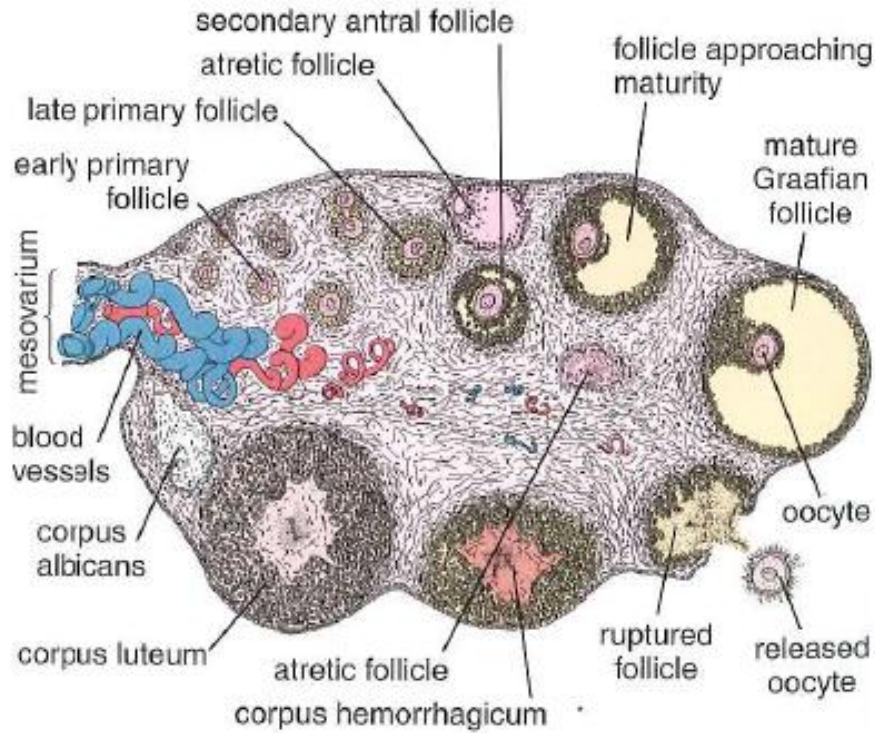
Östrojenler: İnternal ve external cinsiyet organlarının gelişimi ve olgunlaşmasını sağlar. Ayrıca pubertede gelişen dişi seks karakterlerinin oluşmasını sağlar. Ayrıca duktal ve stromal büyümeyi, yağ birikimini stimüle ederek meme bezinin gelişimini sağlar.

Progesteronlar: Endometriumda sekretuar değişikliklere neden olarak başta uterus olmak üzere internal üreme organlarını gebelik için hazırlar. Ayrıca meme bezini lobüler proliferasyon ile laktasyona hazırlar.

Her iki hormon da uterusu implantasyona hazırlayarak menstrual siklusa önemli rol oynar. İmplantasyon gerçekleşmezse fonksiyonel endometrium tabakası dejenere olur ve menstruasyon ile atılır (Ross ve Pawlina).

Ovaryumların bir yanları mezovarium denilen mezentere sahiptir. Bu yapı ovaryumun hilumundaki geniş ligamente bağlanır.

Puberte öncesi ovaryum yüzeyi düzenlidir ancak puberte sonrası (reproduktif çağ boyunca) ardı ardına ovulasyon sonucunda düzensiz bir yapı kazanır. Postmenapozal dişi ovaryumu reproduktif dönemdeki büyüklüğünün dörtte biri kadardır.



Şekil 3: Ovaryumun histolojik görünümü (Ross ve Pawlina)

Histolojik kesitlerde ovaryumun içte medulla, dışta korteksten oluştuğu görünür(Şekil 3).

Medulla: Ovaryumun santral kısmında bulunur. Gevşek bağ doku içine gömülü büyük kan damarları, lenfatik damarlar ve sinirlerden oluşur. (Ross ve Pawlina)

Medulla stroması fibroblastlardan, elastik liflerden ve düz kas hücrelerinden oluşmuştur. Ovaryum stromasına dağılmış interstisyel hücreler bulunur. Yaşamın birinci yılında, atretik foliküllerin fazla olduğu dönemde bu hücreler sayıca fazladır. İnterstisyel hücreler, menstruasyonun başladığı pubertede azalır. Erginde bu hücreler ovarium stromasında az sayıda dağılmış halde bulunur. Ovaryum hilusunda ve mesovaryuma yakın bölgede büyük epitelooid hücre grupları gözlenir. Bunlar kan damarları ve miyelinsiz sinir fibrilleriyle sıkı ilişkidir ve hilus hücreleri ya da sempatikotropik hilus bezi olarak adlandırılırlar. Gebelik ve menapoz dönemlerinde sayıca fazladır (Şeftalioğlu).

- **Korteks:** Medullayı çevreleyen periferal bölgede bulunur. Korteks hücreden zengin bağ doku içine gömülü ovarial foliküller içerir. Stromada çizgili düz kas hücreleri foliküllerin çevresinde yer almaktadır. Medulla ve korteks arasındaki sınır çok belirgin değildir. (Ross ve Pawlina) Korteks hilusta sona erer ve mesovarium medulla ile devam eder. Korteks stroması iç biçimli fibroblast benzeri hücreleri ve retiküler lif ağlarını içerir (Şeftalioğlu)

Ovaryum yüzeyi germinal epitel olarak bilinen tek katlı kübik epitelyum ile kaplıdır. Germinal epitelyum mesovaryumu kaplayan mezotel ile devam eder. Germinal epitel adı önceden gelen ve bu epitelin germ hücrelerinden oluştuğunu savunan yanlış bir sanı ile verilmiştir. Tunika albuginea adı verilen sıkı bağ doku katmanı germinal epitel ve korteks arasında uzanır (Ross ve Pawlina).

Korteks helezonik paternde düzenlenmiş hücreden zengin bağ doku yapısındadır. Bu bölgede maturasyonun ve dejenerasyonun farklı evrelerinde, oosit içeren, farklı boyutlardaki ovaryum folikülleri bulunur. Çocukluk çağındaki ovaryum korteksinde primordial foliküller çok sayıdadır; seksüel olgunluğa erişmiş kadınlardaki ovaryum korteksinde ise rüptüre foliküllerin yerini alan korpus luteum' lar çoktur (Ovalle ve Nahirney).

Ovarial foliküller farklı boyutlardadır ve folikülün boyutu oositin gelişimsel durumunu yansıtır. Oogenezin erken basamakları mitotik aktivite ile oogonia sayısının arttığı fetal yaşamda gerçekleşir. Doğumda kortekste bulunan oositler gelişimin birinci

mayoz bölünmesindedirler. Puberte boyunca küçük folikül grupları siklik olarak büyüme ve gelişim gösterirler. (Ross ve Pawlina) Doğumda ovaryumlarda oogoniumlardan gelişen yaklaşık dört yüz bin primer oosit olduğu tahmin edilir. Puberte ile birlikte dejenerasyon ve atrezilerle birlikte bu sayı yaklaşık kırk bin oosite düşer. Kadınlarda ortalama 28 günde bir gerçekleşen ovulasyon ile bir oosit atılır. Oositin atılımı ovaryumun ekzokrin fonksiyonudur. Reprodüktif yaşam boyunca bir ovaryum yaklaşık 400 kadar olgun oosit üretir. Doğumda ovaryumda bulunan primer oositlerin bir çoğu maturasyonunu tamamlayamaz ve immatur oositlerin atrezisi, spontan ölümü ve takip eden rezorpsiyon sonucu kaybedilir. Bu işlem fetal yaşamın beşinci ayında başlar ve oositi çevreleyen hücrelerin apoptozuyla karakterizedir. Atrezi yaşam boyunca ovaryumdaki primer oosit sayısını logaritmik olarak düşürür (Ross ve Pawlina).

2.1.3.1. Oogenez

İlkel dişi üreme hücrelerinin gelişip olgunlaşmasına oogenez denir. Doğum öncesi ve doğum sonrası olarak ikiye ayrılabilir.

2.1.3.1.1. Doğum Öncesi Olgunlaşma (Prenatal Maturasyon)

İlkel dişi üreme hücreleri genetik olarak dişi gonadlara gelince oogoniumlara farklılaşırlar. Bir dizi mitoz bölünme ile sayılarını arttıırırlar. Üçüncü ayın sonunda tek katlı epitel ile sarılırlar. Büyük bir kısmı mitozla devam ederken bir kısmı ise büyüyerek primer oositlere farklılaşırlar. DNA'ları replike olur ve birinci mayoz bölünmenin profaz safhasına girerler. Sonraki aylarda oogoniumlar mitoz ile artmaya devam ederler ve gelişmenin beşinci haftasında ovaryumda gelişen üreme hücrelerinin sayısı 7-8 milyonu bulur. Bu dönemde hem primer oositlerde hem de oogoniumlarda gerileme görülür. Sekizinci ayda oogoniumların hemen hemen hepsi dejenere olur. Sağlam kalan primer oositlerin tümü, birinci mayoz bölünmeye girerler ve tek katlı epitel ile sarılarak primordial folikülleri meydana getirirler. Birinci mayoz bölünmeye giren oositler profazın diploten evresinde duraklar oosit 1 (primer oosit) adını alır (Junqueira ve Carneiro) (Şeftalioğlu).

2.1.3.1.2. Doğum Sonrası Olgunlaşma (Postnatal Maturasyon)

Doğuma yakın tüm primer oositler birinci mayoz bölünmenin profaz safhasında diploten evresinde duraklamışlardır. Primer oositler bu safhada uzun süre kalırlar. Birinci mayoz bölünmeyi pubertede ovulasyondan az önce bitirirler. Primordial foliküllerdeki folikül hücreleri oosit olgunlaşmasını baskılayıcı (oocyte maturation inhibitor – OMI) salgılayarak primer oositlerin birinci mayozu puberteden önce bitirmesini engellerler. Primer oositlerdeki bu gecikme ileri yaşlara kadar sürebilir. Böyle durumlarda mayoz bölünme hatalarına ve yaş ile artan kromozom çiftlerinin ayrılmaması durumuna rastlanır.

Doğumda primer oositlerin sayıları bireyler arasında 7 ile 2 milyon arasında değişiklik gösterebilir. Doğumdan sonra artık primer oosit meydana gelmez. Çocukluk döneminde oositlerin çoğu atreziye uğrar ve puberteye gelindiğinde kırk bin civarındadır.

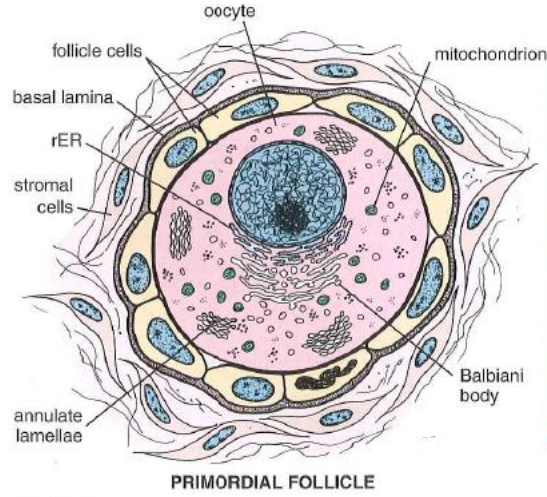
Pubertenin başlamasıyla hipotalamustan salgılanan gonadotropin salgılayıcı faktör (GnRH), hipofiz portal sistem yolu ile hipofiz bezinin ön lobuna taşınarak, folikül stimule edici hormon (FSH) ve luteinleştirici hormon (LH) gibi gonadotropik hormonların ön lob hücrelerinden salgılanmasını stimule eder. Bu gonadotropinler, her 28 günde bir tekrarlanan foliküllerin gelişip olgunlaşması, ovulasyon ve korpus luteum oluşmasını içine alan ovarial siklusunu ve ovaryum siklusu ile eş zamanlı gerçekleşen uterus, uterus tüpleri, vagina ve meme bezlerinde bir dizi değişikliğe neden olan endometrial siklusu hazırlarlar.

Her siklusta FSH etkisi ile 5-15 adet primordial folikül gelişip büyür. Ancak bunlardan bir tanesi, özellikle LH etkisiyle olgun folikül olur. Oluşan olgun folikül ovaryum yüzeyinin yırtılmasıyla içindeki oositi dışarı atar. Geriye kalan 4-14 adet folikül farklı gelişme safhalarından yavaş yavaş geriler, dejenere olur ve hiçbir zaman olgunlaşmazlar. Bu dejenere foliküllere atretik folikül denir (Şeftalioğlu).

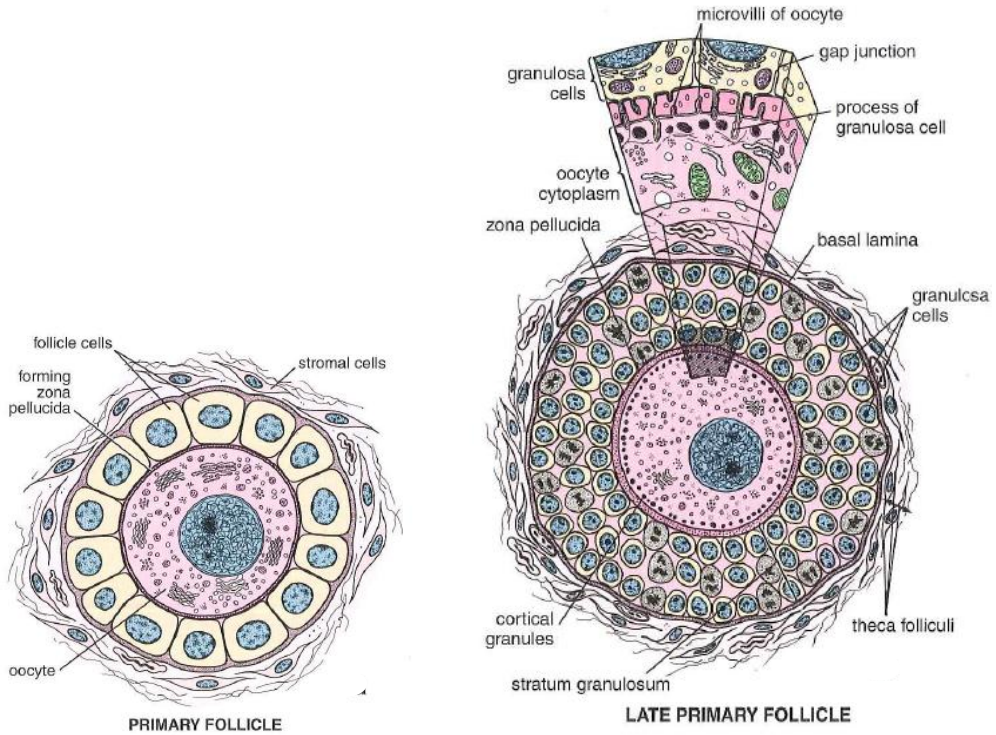
2.1.3.2 Folikül Gelişimi

Histolojik olarak folikül gelişiminde üç ana basamak vardır:

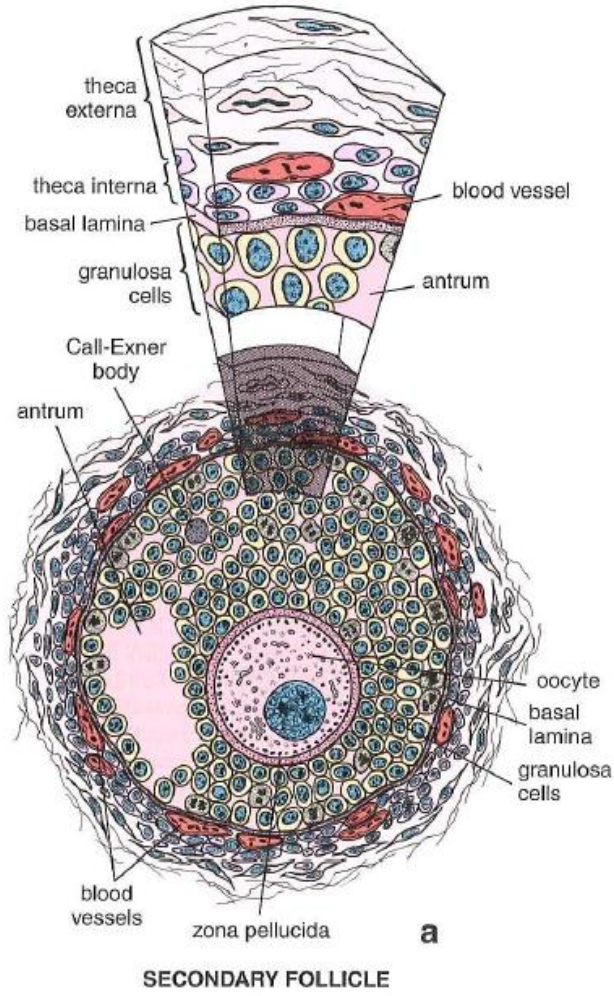
- Primordial foliküller (Şekil 4)
- Büyüyen follüküller (Şekil 5, Şekil 6)
- Olgun veya Graaf folikülleri (Şekil 7)



Şekil 4: Primordial folikül (Ross ve Pawlina)



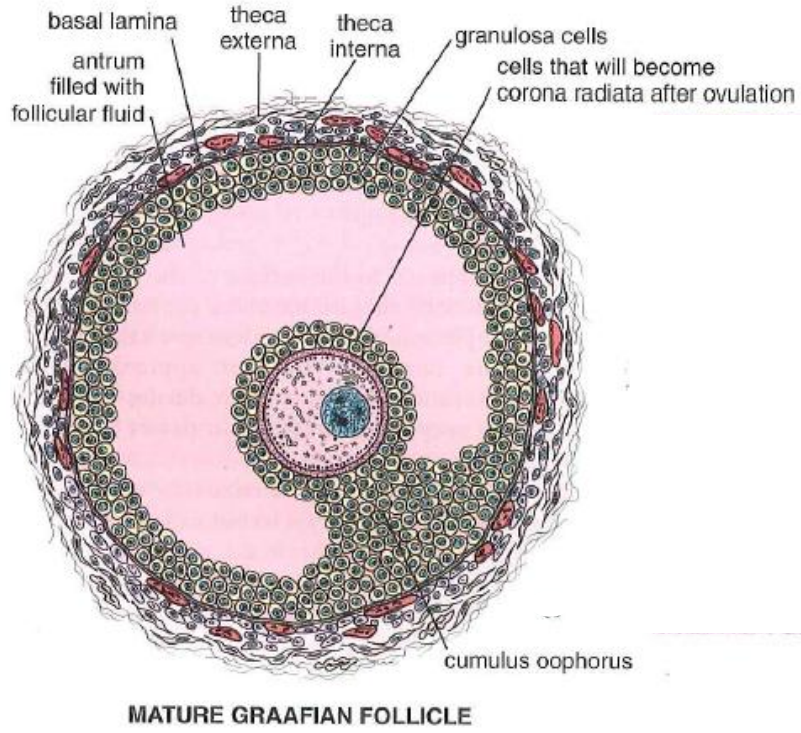
Şekil 5: Primer folüküller (erken ve geç primer folikül) (Ross ve Pawlina)



Şekil 6: Sekonder folikül (Ross ve Pawlina)

Büyüyen foliküller kendi içinde primer, sekonder (antral) foliküller olarak ayrılır. Siklus gösteren ovaryumda her basamaktan folikül bulunur ancak primordial foliküller sayıca hakimdir.

Primordial foliküller fetal gelişiminin üçüncü ayında ovaryumlarda belirirler. Primordial foliküllerin erken gelişimi gonadotropin stimülasyonundan bağımsızdır. Olgun ovaryumda primordial foliküller tunika albuginea altında korteks stromasına gömülü halde bulunurlar.



Şekil 7: Olgun Graaf folikülü (Ross ve Pawlina)

Oositi ince bir tabaka halinde yassı folikül hücreleri sarmaktadır. Folikül hücreleri dışta bazal lamina ile çevrilidir. Bu evrede folikül hücreleri ve oosit birbirlerine oldukça yakın ve yapışık konumdadır. Folikül içindeki oosit 30 µm çapındadır ve kromatini düzenli dağılmış eksantrik konumlu bir çekirdeğe, belirgin büyük bir nukleolusa sahiptir. Oosit sitoplazması, diğer adıyla ooplazma, Balbiani cisimciği içerir. Ultrastrüktürel düzeyde Balbiani cisimciğinin Golgi membran ve veziküllerinin, endoplazmik retikulum ve çok sayıda mitokondri ve lizozomun yığılmasıyla oluşturduğu gözlenmiştir. İnsan oositleri annulate lameller ve küçük sferik mitokondriler çevresinde toplanmış çok sayıda küçük veziküller içerir. Annulate lameller nuklear zar yığınlarına benzer ve her yığın morfolojik olarak nuklear porlara benzer porlar içerir (Ross ve Pawlina).

Ovarial siklus üç evreden oluşur; foliküler evre, ovulatuvar evre ve luteal evre. Foliküler evrede primordial folikülden olgun folikül ya da Graaf folikülü gelişir.

Primordial foliküller fetal ovaryumda geliştikten sonra dinlenme evresine girerler ve bu evrede beklerler. Bekleme evresinden çıkan foliküllere primer foliküller denir. Primer foliküller ikiye ayrılır:

1. Tek tabakalı primer foliküller (Unilaminar): Oositin etrafında tek sıralı kübik foliküler hücreler bulunur.
2. Çok tabakalı primer foliküller (Multilaminar): çok katlı ve çoğalan kübik hücrelerle çevrilidir.

Primer folikül evresinde, primer oosit zona pellusida denilen glikoprotein yapıda bir kılıf sentezlemeye başlar. Zona pellusida, folikül hücreleri oositin ayırır. Foliküler hücrelerin ince sitoplazmik uzantıları zona pellusidayı deler ve oositin mikrovilluslarıyla temas eder. Temas noktalarında oluklu bağlantılar bulunur ve alışveriş sağlanır.

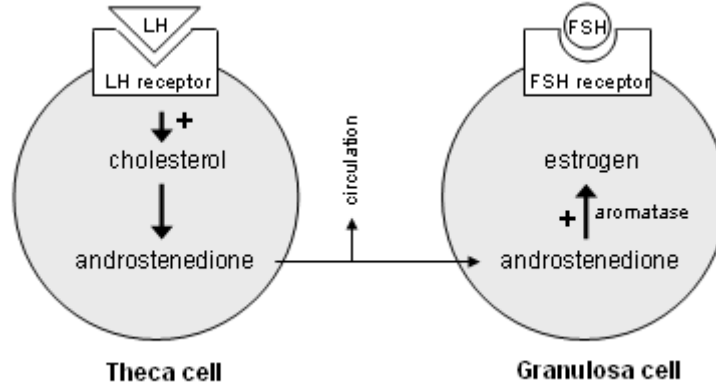
Sonraki evre, sürekli bölünen folikül hücreleri, kalınlaşan zona pellusida ve folikül sıvısı içeren antrum ile karakterize sekonder foliküldür. Folikülü çevreleyen stromal hücreler, teka (kılıf) denilen hücresel bir kapsül oluşturacak şekilde düzenlenir. Teka daha sonra iki tabakaya ayrılır: teka interna ve teka eksterna.

Gelişmekte olan folikülün bazal laminasına komşu, iyi damarlanmış teka interna tabakası bir androjen prekürsörü olan androstenediyonu salgılar. Androstenediyon, testesteron üretimi için folikül hücrelerine taşınır. Daha sonra testosteron aromataz tarafından estrodiole çevrilir. Foliküler hücreler, östrojenlerin doğrudan üretimi için gerekli olan enzimlere sahip değildir. Bu nedenle foliküler hücreler folikülogenez sırasında steroid prekürsörlerini üretemezler (Şekil 8).

Teka eksterna, kapsül benzeri bağ dokusu tabakasıdır ve ovaryum stromasıyla devam eder.

Foliküler hücreler arasında foliküler sıvı ile dolu küçük hücreler arası boşluklar oluşur ve daha sonra birleşerek antrumu oluştururlar. Antrumun oluşumuyla foliküler hücreler oosite göre yeniden düzenlenir. Oositin folikül duvarıyla arasında kalan boşluğu dolduran, ve oosite yastık şeklinde destek olup folikül duvarına bağlayan

foliküler hücre kümesine kümülüs ooforus adı verilir. Oositin çevresini saran bir sıra foliküler hücre korona radiata adını alırken folikül duvarını döşeyen foliküler hücre sırası stratum granulosum adını alır.



Şekil 8: Östrojen biyosentezi (11Ni)

En büyük folikül olgun foliküldür (Graaf folikülü ya da Preovulatuvar folikül de denir). Ovulasyondan hemen önce primer oosit folikül içinde eksentrik bir konum alır, foliküler hüceler kumulus ooforus, korona radiata düzenlenmesini gösterir.

Olgun folikül ya da Graaf folikülü foliküler sıvı içeren büyük bir antrum, korona radiata ile çevrelenmiş zona pellusida, ve folikül içinde serbest yüzen oosit-zona pellusida-korona radiata kompleksi ile karakterizedir. Ovulasyondan birkaç saat önce birinci mayoz tamamlanır. Bunun sonucunda sekonder oosit ve birinci kutup cismi oluşur. Birinci kutup cismi perivitellin aralık denilen zona pelusida ile oosit arasında kalan aralığa yerleşir. Foliküler hücreler sahip oldukları FSH reseptörleri yanında LH reseptörleri de kazanır. Bu olay korpus luteumun luteinizasyonu ya da gelişmesi için kritiktir.

Çok sayıda primer folikül olgunlaşma sürecine başlar ancak bir tanesi tamamlar, diğerleri atrezi ile dejenere olur. Atretik foliküller camsı membran denilen kalın, kıvrılmış membranöz materyal, çok değişikliğe uğramamış zona pellusida, dejenere olmuş oosit ve folikül hücrelerinin kalıntıları ve istila eden makrofajlar ile ayırt edilir.

Ovulasyon evresi ovulasyonun olduğu evredir. Olgun folikül ovaryumun yüzeyinden dışarı doğru stigma adı verilen bir çıkıntı yapar. LH düzeyinin artması sonucu uyarılan teka eksterna ve tunika albuginea içindeki proteolitik etkinlik, olgun Graaf folikülünün yırtılmasını kolaylaştırır. Dışarıya atılan gamet, ovaryuma çok yaklaşmış olan uterus tüplerine girer. Ovulasyondan birkaç saat önce foliküler hücre tabakası ve teka interna, korpus luteuma dönüşmeye başlar.

Ovulasyondan sonra geride kalan foliküler hücre tabakaları büzüşür ve hormon salgılayan majör bir bez olan korpus luteumun bir parçası olur. Bu dönüşüm aşağıdaki evreleri içerir:

1. Folikülün bazal membranı yıkılır.
2. Başlangıçta damarsız olan foliküler hücre kümesi içine kan damarları girer. Antrum boşluğuna kan dolar ve pıhtılaşır böylece geçici bir yapı olan korpus hemorajikum oluşur. Daha sonra yeni oluşmuş kan damarları fibroblastlar ve kollajen lifler fibrin pıhtı içine girer.
3. Foliküler hücreler ve teka interna hücreleri değişime uğrar. Foliküler hücreler foliküler lutein hücrelerine dönüşür ve steroit salgılayan hücre özellikleri kazanır. FSH ve LH uyarısına yanıt olarak progesteron ve östrojen salgırlar. Teka interna, teka lutein hücrelerine dönüşür ve LH uyarısına yanıt olarak androstenedion ve östrojen salgılar.

Korpus luteum büyümeye devam eder ve fertilizasyon olmamışsa, ovulasyondan yaklaşık 14 gün sonra gerileme evresine girer. Fertilizasyon olmuşsa büyümeye devam eder ve progesteron ve östrojen üretimini sürdürür. Korpus luteumun devamlılığını sağlayan insan karyonik gonadotropini'nin (hCG) uyarıcı etkisidir.

Pregosteron ve östrojen gebeliğin yaklaşık 9. ve 10. haftalarına kadar endometriumun beslenmesi için gereklidir.

Korpus luteumun gerilemesi (luteoliz) sonucunda, korpus albicans oluşur. Bu süreçte, korpus luteumun dejeneren olan luteal hücre kümelerinin yerini stromal bağ dokusu alır. Korpus albicans ovaryumda kalır; küçülür ama hiçbir zaman yok olmaz.

Korpus luteumun gerilemesinden sonra, stromada serbest kalan luteal hücreler, salgılama etkinliklerini yeniden kazanabilir ve bu durumda interstisyel bezler adını alır. Bu tip interstisyel bez hücrelerine insan ovaryumunda sık rastlanmaz. (Kierszenbaum)

2.2. Apoptoz

2.2.1. Apoptoz'un Tanımı Ve Tarihçesi

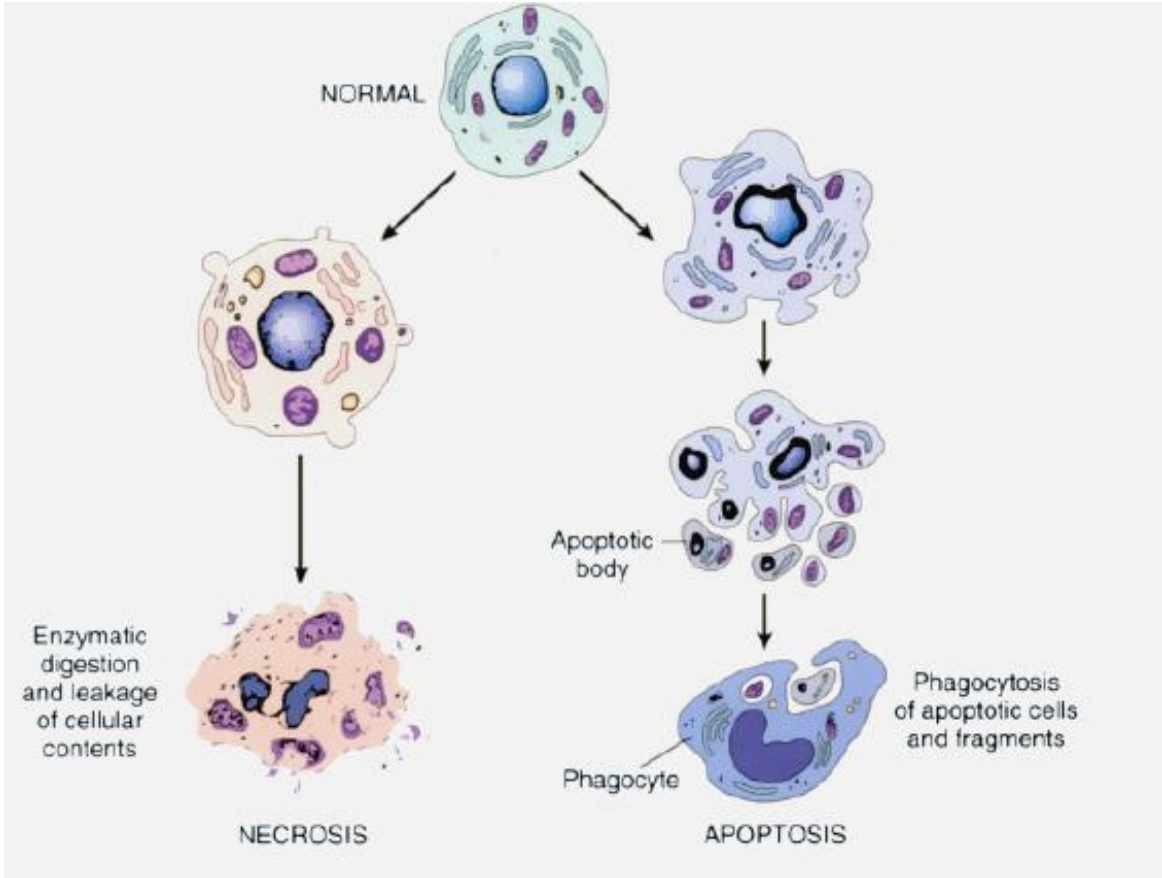
Organizma yeni hücreler sentezlerken, var olan hücrelerin bir kısmını hücre ölümü ile ortadan kaldırarak kendi dengesini korumaktadır. Hücre ölümü iki farklı mekanizma ile gerçekleşir: apoptoz ve nekroz. Apoptozda ve nekrozda düzenli olarak birbirini izleyen biyokimyasal ve morfolojik olaylar sonucunda hücre ölümü gerçekleşir (Kiess ve Gallaher). Apoptoz programlı, aktif RNA ve protein sentezi ile gerçekleşen; enerji gerektiren bir ölümdür. Genetik ve biyokimyasal olaylar dizisidir (Majno ve Joris) (Thompson) (Ameisen).

Hücrelerin normal gelişimleri sürecinde meydana gelen ölüm ilk olarak 1842 yılında Vogt tarafından tanımlanmıştır. Programlanmış hücre ölümü terimi ilk olarak 1965 yılında kullanılmıştır. Apoptoz terimi ise ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Yunanca bir kelime olan apoptoz; apo (ayrılan) ve ptosis (düşen) kelimelerinin birleşiminden oluşur ve "ağaçtan düşen yapraklar " olarak tarif edilmiştir. Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçaları gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu gözlemleyerek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır. 1983 yılında Duke ve arkadaşları, jel elektroforezi ile apoptoz endonükleazların aktive olarak merdiven basamağı denen karakteristik DNA kırıklarına neden olduğunu göstermiştir. Böylece apoptotik hücre ölümünün ilk biyokimyasal kanıtı elde edilmiş ve apoptozisin genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla regule olan bir ölüm olduğu ortaya konulmuştur (Kerr, Wyllie ve Currie).

2.2.2. Apoptoz Ve Nekroz Arasındaki Farklar

Nekroz patolojik bir ölüm şekli iken apoptoz hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda meydana gelebilir. Nekrozda hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken apoptotik hücre küçülür. Nekrozda kromatin normal hücre görüntüsü sergilerken apoptotik hücre kromatini nükleus membranının çevresinde yoğunlaşır. Nekrotik hücre membranı bütünlüğünü kaybettiği için hücre içinden hücre dışına madde çıkışı olur. Hücre içeriğinin dış ortama çıkması inflamasyona neden olur.

Apoptotik hücre membranı sağlamdır ve üzerinde küçük cepçikler oluşur (Brouckaert, Kalai ve Krysko) (Willingham) (Şekil 9) (Tablo 1).



Şekil 9: Apoptoz ve nekroz (KUMAR, ABBAS ve FAUSTO)

Nekrotik hücre lizise uğrarken apoptotik hücre küçük cisimciklere parçalanır. Apoptotik cisimcikler membranla çevrilidir, nükleus ve diğer organellerini ve parçalarını içerir. Apoptotik cisimcikler inflamasyona neden olmazken fagosititik hücreler tarafından sindirilirler (Barisic, Petrik ve Rumora).

Tablo 1: Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar (Ulukaya).

ÖZELLİK	NEKROZİS	APOPTOZİS
Yol açan nedenler	İskemi Hipertermi Hipoksi Litik viral enfeksiyon Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları Şiddetli oksidatif stress	Büyüme faktörü eksikliği Hücre yaşlanması "Senescence" HIV Kanser ilaçları Radyasyon Yüksek doz glukokortikoid Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu Sitotoksik T lenfositler Çok şiddetli olmayan oksidatif stress
Morfolojik özellikler	Hücre membranı bütünlüğünün kaybı Kromatin "flocculation"u Hücre şişmesi Organellerin disintegrasyonu Endoplazmik retikulumun dilatasyonu Büyük vakuollerin oluşumu Hücre lizisi	İntakt hücre membranı fakat membranda "bleb"lerin oluşumu Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması Hücre küçülmesi Organellerde disintegrasyon yok Hücresinin intact mitokondri, ribozom, nucleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotic cisimciklere parçalanması
Biyokimyasal özellikler	Bozulmuş iyon homeostazisi ATP gerekmez (pasif süreç) +4 °C'de gerçekleşebilir DNA rastgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde "smear" görüntüsü) Postlitik DNA fragmentasyonu(=ölümün geç safhasında)	İyi kontrollu, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması ATP gereklidir (aktif süreç) +4 °C'de gerçekleşmez) DNA internukleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonukleozomlara ayrılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven patterni=apoptozisin en önemli belirteci) Prelitik DNA fragmentasyonu (=erken evrede gerçekleşir)
Diğer özellikler	Hücreler gruplar halinde ölür Fizyolojik olmayan (patolojik) etkiler sonucu gerçekleşir Lizozomal enzimler salınır İnflamasyona neden olur	Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler İnflamasyon görülmez

Apoptozda DNA internukleozomal bölgelerden parçalanır. Jel elektroforezinde merdiven görüntüsü çıkmasına neden olan bu durumdur. DNA Ca/Mg bağımlı

endonükleaz ile parçalanır. DNaz I ve DNaz II de DNA parçalanmasından sorumludur (Walker, Leblanc ve Sikorska).

Apoptozun erken safhasında hücrelerin birbirleriyle olan hücre-hücre bağlantıları kesintiye uğrar ve özelleşmiş yüzey yapılarını kaybederler. Hücre büzülür. Hücreler hacimlerinin 1/3'ünü kaybederler. Hücresel büzülme Na, K, Cl transport sisteminin çalışmaması ve hücre içi- hücre dışı sıvı transportunun gerçekleşmemesidir (Wijsman, Jonker ve Keijzer) (Tomatır).

2.2.3. Apoptozun Görüldüğü Olaylar

Apoptotik hücreler organizmanın bazı dokularında sürekli olarak oluşmaktadır ve bu yaşam boyunca devamlıdır. Böylece ölüm (apoptoz) ve yeniden yapım (mitoz) bu dokularda doku homeostazisini oluşturan dinamik bir denge halindedir. Günde yaklaşık bir milyon hücre apoptoza uğrarken yerine yeni hücrelerin yapımı devam etmektedir.

Apoptoz fizyolojik ve patolojik olaylar sonucunda gözlenir.

Fizyolojik Olaylar

- Embriyogenez ve metamorfozda (Müller ve Wolf kanallarının involüsyonu, kalp gibi içi boşluklu organların lümen oluşumu)
- Vertebraların nöron gelişimi sırasında (barsak kriptaları gibi sürekli proliferen olan hücre gruplarının hücre sayısının dengelenmesinde)
- Uterusta endometriumun dökülmesinde (menapozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin gerilemesi gibi olaylarda)
- T lenfositlerin kontrolünde (T lenfositlerde doğru antijen kazanımı sağlayamayan hücrelerin ortadan kaldırılması)
- Epiderminin en üst tabakası olan stratum korneumun sürekli dökülüp yenilenmesinde görülür.

Patolojik Olaylar

- Her türlü neoplazide (sitotoksik ilaçlar, iyonize radyasyon, hafif travma, hipoksi gibi fiziksel ve toksik uyarılara maruz kalan dokularda)
- Hormon bağımlı dokuların patolojik atrofisinde, otoimmün hastalıklarda sitotoksik T hücreleri ile oluşturulan hücre ölümünde

- Pankreasta ve böbrekte duktus tıkanması sonrası görülen patolojik atrofide apoptoz görülmektedir. (Ulukaya) (Elmore)

2.2.4. Morfolojik Ve Biyokimyasal Değişiklikler

2.2.4.1. Morfolojik Değişiklikler

Yüzey Organellerinin Kaybı

Apoptotik hücre komşu hücrelerle bağlantısını koparır, yüzey farklılaşmaları (mikrovillüs gibi) yok olur ve hücre yüzeyi yuvarlaklaşır (Balakumran, Champbell ve Maslen) (Cohen).

Kromatin Yoğunlaşması

Çekirdek apoptozda odak noktadır. Hücreden hücreye değişiklik göstermekle birlikte apoptozda çekirdek genellikle büzülür. Kromatin yoğunlaşır ve parçalar halinde bir araya toplanır. Çekirdek porlarını kaybeder, şekil olarak düzensizleşir ve ileri evrede küçük çekirdek parçalarına bölünür. Çekirdekçik genişler, granülleri kaba hal alır ve dağılır (Cohen) (Wyllie).

Sitoplazmik Baloncuklar ve Apoptotik Cisimlerin Oluşması

Hücre önce dışa doğru tomurcuklanır. Bu tomurcuklar sitoplazma parçacıkları içeren, sıkı paketli organeller içeren zarla sarılı apoptotik cisimciklere dönüşür (Balakumran, Champbell ve Maslen) (Cohen).

Tüm bu morfolojik değişimler gerçekleşirken açığa fosfatidilserin çıkar. Sağlıklı hücrelerinin plazma membranında bulunan fosfatidilserin, apoptotik hücrelerde plazma membranının dış yüzünde bulunur ve fagositik hücreler için sinyal oluşturur (Lu, Ashwell ve Ken).

2.2.4.2. Biyokimyasal Değişiklikler

DNA Fragmantasyonu

Hedef proteinlerden olan DNA, endonükleaz ile çapraz bağ yapan bir proteindir. Kaspazlar bu proteini yıkarak endonükleazı serbestleştirir. Çekirdek içine

giren Ca^{+2} Mg^{+2} bağımlı endonükleaz, DNA kırıkları oluşturur. 180 baz çifti ve katları şeklinde kırıklar oluşur ve merdiven basamağı adıyla karakterizedir.

Hücre İskeletinin Yıkılması

Kaspazlar aktini yıkan bir proteini aktifleştirerek hücrenin normal şeklini kaybetmesine neden olur. (Sheikh ve Fornace)

Membran Değişiklikleri

Kaspazların etkisiyle yıkılan aktin proteinleri hücrenin şeklini bozar. Yine kaspazların etkisiyle hücre zarı asimetrisi bozulur, hücre membranının iç yüzündeki fosfatidilserin yer değiştirerek zarın dışına yerleşir. Ayrıca bazı apoptotik hücreler hücre zarlarında thrombospondin adlı adhezif bir glioprotein ve bazı hücrelerin adhezyon moleküllerini (ICAM 3) içerirler. Bu membran değişiklikleri apoptotik hücrelerin çevre fagositler tarafından fark edilip fagositoz edilmesini sağlarken, transglutaminaz aktivasyonu ile membran proteinlerinde oluşan çapraz bağlanmalar membranların parçalanıp apoptotik cisimleri oluşturmasını sağlar. Hücreler özelleşmiş yapılarını ve diğer hücrelerle olan temas yüzeylerini kaybederler. Su kaybederek küçülürler ve büzüşürler. Sitoplazmanın yoğunlaştığı ve organellerin birbirine yaklaştığı gözlenir. (Mountz ve Zhou)

Fagositoz

Apoptotik cisimler çevredeki parankima hücreleri ve fagositler tarafından fagositte edilerek dokulardan uzaklaştırılır. (Mountz ve Zhou)

2.2.5. Apoptoz Mekanizması

Apoptoz ekstrensek yolla hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınmasıyla, genlerin DNA hasarına intrinsek yanıtıyla veya proteolitik enzimlerin doğrudan hücreye girişiyle (Perforin- Granzim) ile gelişebilir.

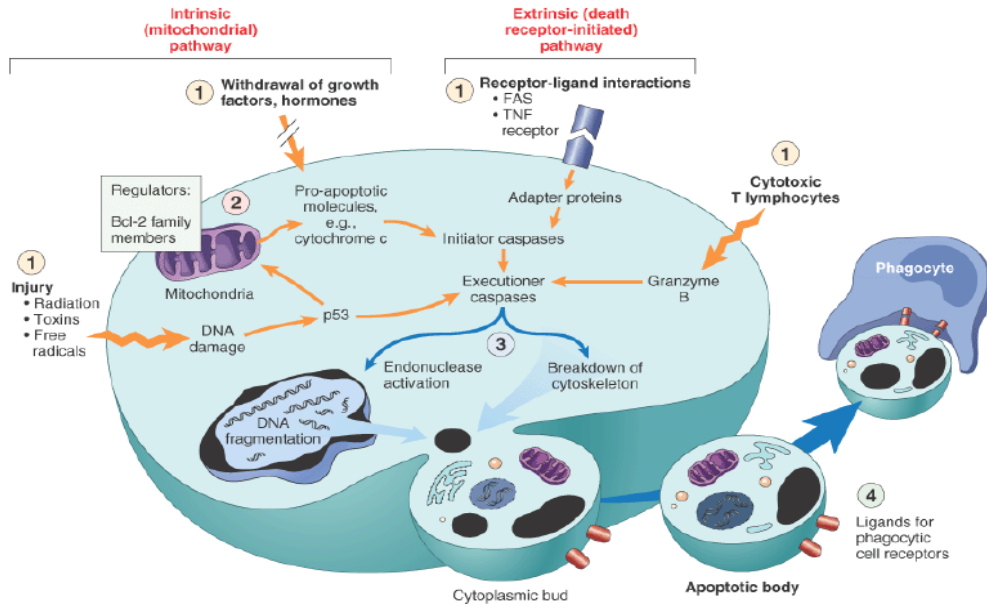
2.2.5.1. Ekstrensek / Reseptör Aracılı Yol

Hücre dışından kaynaklanan ve hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (APO-1 ve CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1) uyarılması ile düzenlenen apoptozdur (Ulukaya) (Şekil 10).

TNF- α , TNF ile ilişkili apoptozis uyarıcı ligantlar (TRAIL) ve Fas ligantları, bazı malign ve normal hücrelerde kendilerine özgü reseptörlerle birleşerek ölüme neden olurlar. Bu proteinlerin hücre dışı kısımları ligant bağlanması için önemlidir. Sitoplazmik kısımlarında kısmen korunmuş bir ölüm bölgesi (DD- Death Domain) bulunur. Bu bölgeler sitoplazmik sinyal proteinlerine bağlanarak apoptozu başlatır. TNFR-1 ile ilişkili ölüm bölgeleri TRADD, Fas ile ilişkili ölüm bölgelerine FADD denir. Bu ölüm bölgeleri ile prokaspaz 8'i aktiveleştirerek kaspazların kaskat şeklinde gelişen aktivasyonlarını başlatır (Elmore).

2.2.5.2. İntrensek / Mitokondrial Yol

Apoptozun yaygın yolu olan intrinsek yol hücrenin kendi içinden, sitotoksik ilaçlar gibi hasar yapıcı ajanlarla başlar. İç sinyallerle oluşan apoptozda mitokondri önemli rol oynar. Apoptozu başlatan yolların kavşak noktasının mitokondri olduğu görülmüştür. Dış zar geçirgenliğindeki artış sonucunda mitokondri zar potansiyelinin bozulması dış zarda hızla bir şişmeyle izlenir ve iki zar arasında bulunan çeşitli proteinlerin hücre sitoplazmasına çıkmasına neden olur. Temel olarak mitokondride solunum zincirinde yer alan bir enzim olan sitokrom c, apoptoz indükleyici faktör (AIF), SMAC ve ENDO G adlı DNAz enzim sitoplâzmaya salınır. Sitokrom c' nin mitokondriden sitoplazmaya salınması geri dönüşümsüz bir noktadır. Sitokrom c'nin salınmasında en önemli faktör Bcl-2 ailesidir. Hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyeleri olan bu ailenin mitokondri üzerindeki etkileriyle hem sitokrom c' nin sitoplazmaya salınması gerçekleşir hem de bu salınım baskılanır. Sitokrom c, sitoplazmada inaktif monomerler halinde bulunan Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive eden faktör) molekülüne bağlanarak apoptozom adı verilen yapının oluşumunu sağlar. Apoptozom kaspaz 9'u aktiveleştirmek üzere keser, kaspaz 9 diğer kaspazların proteolitik bir zincir halinde aktiveleşerek apoptozun gerçekleşmesini sağlar (Ulukaya) (Ow, Green ve Hao) (Şekil 10).



Şekil 10: İntrensek/Ekstrensek apoptoz yolağı (KUMAR, ABBAS ve FAUSTO)

2.2.6. Apoptoz Regülatörleri

Apoptoz çok sayıda genler (c-myc), moleküller (seramid), iyonlar (kalsiyum), proteinler (p53) ve hatta organeller gibi mediatörlerle düzenlenir. Apoptozisi düzenleyen genler cmyc, p53 ve Bcl-2 'dir ve ürettikleri proteinler aynı adı alır. P53, Bcl-2 ailesi, inhibitör apoptoz proteinleri (IAP), kaspazlar gibi protein aileleri apoptoz regülatörleridir (Ulukaya) (Öktem, Özlem ve Özdoğru) (Tablo 2).

Tablo 2: Apoptozisi baskılayan ve indükleyen genler (Öktem, Özlem ve Özdoğru).

Apoptozisi baskılayan genler:	Apoptozisi indükleyen genler:
Bcl-2 grubundan BHRL-1, bcl-xl, bcl-w, bfl-1, brag-1, mcl-1, A1	Bcl-2 grubundan Bad, Bax Bak, Bcl-xS, bad, bik, Hrk 1
c-abl geni	c-myc
Ras onkogeni	P53, p21
Çözünebilir fas	Fas (CD95/APO1) FADD/MORT, RIP, FAST
P35	İnterlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler (İCE)
A20	LOH (MTS1/CDK41)

Bcl-2 Ailesi

Mitokondride dış zar potansiyelinin değişmesinden Bcl-2 ailesi adı verilen protein grubu sorumludur.

Antiapoptotik aile üyeleri olan Bcl-2, Bcl-XL yine aynı aileden Bad, Bim, Bmf, Bid ve BH-3 only adı verilen proapoptotik proteinler tarafından baskılanır. Proapoptotik üyeler normal şartlarda inaktiftir bu nedenle mitokondrial zar geçirgenliği Bcl-2 ve Bcl-x sayesinde değişmeden kalır. Ancak çeşitli uyarılar (büyüme faktörünün uzaklaştırılması Bad'ın, kalsiyum artışı Bim'in, UV ışın Bmf'nin) proapoptotik grubun aktifleşmesine yol açarlar, sonuçta Bcl-2, proapoptotik aile üyeleri tarafından baskılanır, Bcl-2 tarafından inaktif durumda tutulan ve yine aynı aileden olan Bak ve Bax proteinleri etkinleşerek mitokondri dış zarında permeability transition porlarının oluşumuna, zar potansiyelinin değişimine yol açar. Bu da uygulamacı kaspazların aktivasyonu ve apoptozla sonuçlanır. Kaspazlar inhibitör apoptoz proteinleri (İAP) denen bir grup protein tarafından baskılanır.

P53 Geni

p53, DNA gardiyanı da denen ve bu güne dek üzerinde en çok çalışılan tümör süpresör proteinlerden biridir. P53 sitoplâzma bulunan ve DNA'nın ya da hücrenin ağır biçimde hasar görmesi durumunda, DNA da belli genlerin aktivasyonuna, böylece yapımlarının artmasına (Bax, Apaf-1, Fas) belli genlerin de baskılanmasına (Bcl-2, Bcl-X) yol açarak apoptozu tetikleyen bir transkripsiyon faktörüdür. DNA hasarı, hipoksi ya da onkogenlerin aktivasyonu, sürekli yapılan ama ubiquitinleyici bir protein (mdm2) tarafından belli bir hızda yıkılan p53 ün fosforillenmesine, fosforillenme ubiquitinlenmenin bozulmasına yol açar. Miktarı artan p53 çekirdeğe geçerek ilgili genlerin ifade edilmelerini değiştirerek hücreyi apoptoza sokar. (Solakoğlu)

IAP Ailesi Proteinleri

IAP'lar; antiapoptotik etkilerinin direkt kaspazlara bağlanarak, kaspaz inhibisyonu ile gösteren proteinlerdir. Apoptozun negatif düzenleyicileridir. Kaspazları ölüm reseptörleri ve mitokondrial yol ile inhibe ederler. (Donoghue, Baden ve Lauder)

Kaspazlar

Kaspazlar sistein aspartatik asit proteazlar olarak bilinir ve birbirleriyle homolog büyük bir protein ailesidir. Kaspazlar proteolitik yarıklanmayla aktifleşen negatif granüller olarak üretilir. Bu güne dek yaklaşık 100 kaspaz substratı rapor edilmiştir.

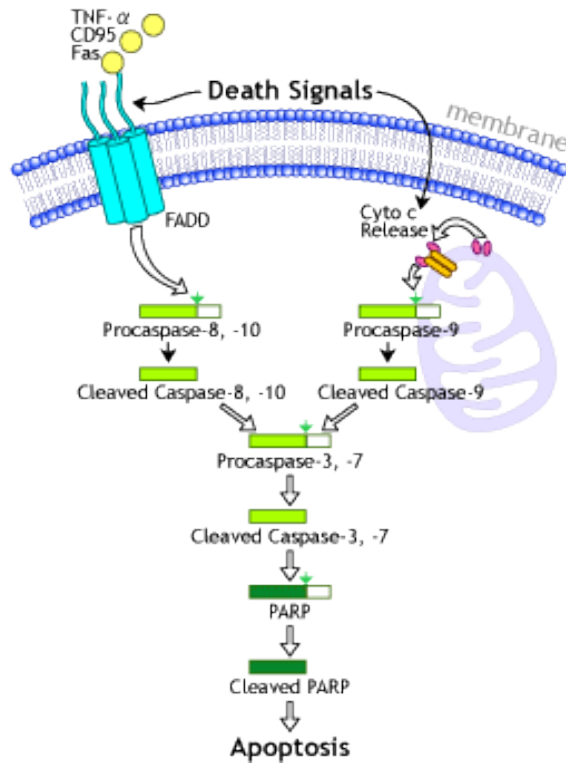
İnsanda yapı ve fonksiyonlarına göre on bir değişik kaspaz tarif edilmiştir:

- Başlıca lenfokin yapımında bulunan Kaspazlar: Kaspaz-1 (ICE), -4, -5, -11,-12, -13, -14
- Sonuçlandırıcı (effektör) Kaspazlar: Kaspaz-3 (CPP32/Yama), -6,-7
- Başlatıcı (initiator) Kaspazlar: Kaspaz-2, -8 (FLICE/MACH),-9,-10 (Donepudi ve Grutter) (Hengartner)

Ölüm reseptörleri hücre zarı içine tutunmuş, bir ucu hücre dışına, bir ucu hücre içine bakan, hücre içi tarafında prokaspaz 8 in aktiflenmesini sağlayan bir ölüm bölgesi (death domain) bulunan reseptörlerdir. Hücre zarında bulunan kendileri için özgün reseptörlere bağlanan ligandlar reseptörün trimerik (üç bileşenden oluşan) bir yapıya dönüşmesine yol açarlar ve hücre içinde adaptör moleküller adı verilen bir dizi moleküle etkileşerek prokaspaz 8 i iki farklı büyüklükte parçaya böler. Başlatıcı kaspaz denen aktif kaspaz 8, inaktif durumdaki proenzimler olan kaspaz 3, kaspaz 6 ve kaspaz 7 nin bir zincir biçiminde aktiflenmesine yol açar. Aktiflenen tüm kaspazlar hücre makromoleküllerini parçalayarak tipik apoptoz morfolojisinin oluşumuna yol açarlar. Aktif kaspaz 8, Bcl-2 ailesi proteinlerinden biri olan Bid'in de proteolitik olarak aktifleşmesine yol açar. Bid, mitokondriden sitokrom c, bazı başka proteinlerin (SMAC) ve kalsiyumun serbestlemesine yol açar. Böylece ölüm reseptörleri yolu mitokondriyal yolu da aktiflemiş olur. Hücreye sitotoksik T reseptörleri yoluyla ulaşan Fas ligandı, ya da TNF alfa, hücre yüzeyinde bulunan kendine özgü reseptörlerine bağlanarak apoptozu uyarabilir. Fas reseptörünün ligandı aktiflenmiş T lenfositlerde ayrıca dalak, testis, karaciğer ve böbrek hücrelerinin yüzeyinde ifade edilir. Çeşitli virüslerle enfekte hücrelerde ya da p53 ün aktiflenmesi sonucu Fas reseptörünün ifadesi, o hücrenin sitotoksik T lenfositler tarafından öldürülmesini sağlar. FAS ve TNF alfa dışında TRAIL ve TRAIL reseptörleri de hücre içinde benzer yollarla ölümü yaratabilir. TRAIL reseptörlerinin FAS reseptöründen farklı olarak karaciğer, nöronlar, miyositler, kolon, bronş epitel, Leydig hücreleri gibi dokularda yapısal biçimde ifade

edildiği ve TRAIL'in de bu dokularda bulunduğu gösterilmiştir. Hücre dışından gelen sinyallerin hücre içinde apoptotik makinayı çalıştırmasına aracılık eden yollardan biri de sfingolipid yoludur. Sfingomiyelin, hücre zarının yapıtaşlarından biridir. Radyasyon ve kemoterapinin yanı sıra ölüm reseptörleri aracılığıyla da aktiflenebilen bir enzim olan sfingomiyelinaz tarafından seramid'e dönüştürülür. Seramid, ayrıca serin palmitol transferaz tarafından da sentezlenebilir. Seramidaz enzimiyle seramidden oluşturulan sfingozin, Bid yapımını değişik yollarla artırarak mitokondriyal yol üzerinden apoptozu tetikler (Solakoğlu).

Kaspazlar için substrat olan poly ADP-Riboz polimeraz DNA zincir kırıklarına bağlanıp nuklear proteinleri modifiye etme görevini üstlenir. PARP molekülünün DNA'yı onarması kaspaz-3 ile parçalanmasını takiben önlenir (Solakoğlu) (Şekil 11).



Şekil 11: Poly-ADP Riboz' un kaspaz-3 tarafından kesilmesi (Bank)

2.2.7. Apoptoz Ve Ovaryum

Ovaryumda apoptoz ilk kez 1885 yılında Flemming tarafından tavşan ovarymunun antral foliküllerindeki granuloza hücrelerinde gözlenmiş ve kromatolizis olarak adlandırılmıştır (Tilly, Apoptosis and ovarian function.).

Apoptoz ovaryumda hücrel dejenarasyon prenatal dönemdeki germ hücrelerinde, postnatal dönemde ise foliküler atrezide görülür.

Prenatal dönemdeki primordial germ hücrelerinin hareketi, proliferasyonu ve canlılığını koruması bazı faktörlere bağlıdır. Bu faktörler kök hücre büyüme faktörü (SCGF) ve temel fibroblast büyüme faktörüdür (bFGF). Bu faktörlerdeki yetersizlik germ hücrelerinin apoptozuna neden olur. Bcl-2 geni delesyona uğramış transgenik farelerde yüksek miktarda germ hücre kaybı olduğu gözlemlenmiştir (Kaipia ve Aaron).

Folikülogenezin erken safhalarında apoptotik hücreler nadir görülür. Sadece sekonder hücrelerde nadiren apoptoza rastlanırken, primer ve primordial foliküllerde apoptoza rastlanmamaktadır (Vaskivuo).

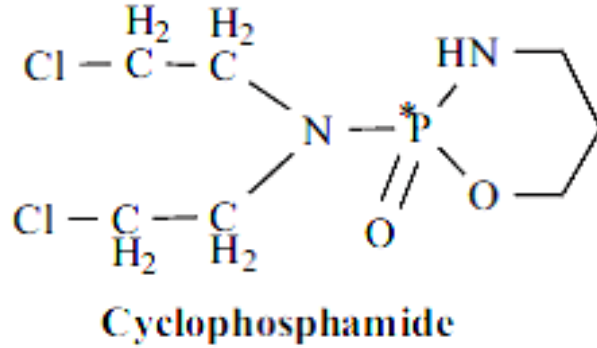
Foliküllerin büyümesi ve gelişimi için gonadotropinler gereklidir. Preovulatuvar safhada gonadotropinlerin bloke edilmesi veya hipofizektomiden sonra serumdaki gonadotropinlerin seviyesinin düşmesi foliküllerin atreziye gitmesini sağlar. Granüloza ve luteal hücrelerindeki apoptotik DNA fragmentasyonundan, Ca^{+2}/Mg^{+2} bağımlı endonükleaz aktivitesi sorumludur.

Gonadotropinlerin granüloza hücrelerinin membranındaki reseptörlere bağlanması, adenilat siklazın aktive olması, cAMP'nin birikimi ve protein kinaz A yolağının aktivasyonu ile sonuçlanır. Hipofizden salgılanan büyüme hormonu (GH) gonadotropinlerin etkilerini artırarak dolaylı yoldan foliküllerin büyümesine ve farklılaşmasına yol açar. İnsülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I)' nün de folikülogenezde önemli role sahip olduğu ve granüloza hücrelerinin bu faktöre karşı yüzey reseptörleri eksprese ettiği bilinmektedir. Aynı zamanda gonadotropinlere benzer şekilde IGF-I' in de foliküler apoptozu baskıladığı bilinmektedir. İmmün sistemin sitokinlerinden biri olan interlökin-1 β (IL-1 β)' nın da ovaryum fonksiyonları üzerine etkisi vardır. Çoğu hücre tipinde IL-1 β nitrik oksit (NO) sentezini arttırmaktadır. Preovulatuvar folikül kültürünün yapıldığı bir çalışmada IL-1 β uygulanmış, NO üretiminin arttığı ve apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir (Kaipia ve Aaron) (Chun, Eisenhauer ve Kubo).

Östrojenler foliküllerin büyümesi ve gelişimi için çok önemlidirler. Östrojen muamelesi granüloza hücrelerinin bölünmesini ve ovaryumun ağırlığını arttırmaktadır (Kaipia ve Aaron).

2.3. Siklofosfamid

Kanser tedavisinde en fazla kullanılan ilaçlardan birisi olan siklofosfamid bir oksazofosforindir (Şekil 12). Bağışıklık baskılayıcı ve bir anti tümör ajan olan siklofosfamidin onkosidal etki gösterebilmesi için metabolik olarak aktive edilmesi gerekir. Hem humoral hem de hücrel bağışıklığın siklofosfamid ile baskılandığı bildirilmektedir. Siklofosfamidin kanserostatik aktivitesi fosforamid mustard (FAM) oluşumunu veren 'hepatik mikrozomal karma fonksiyon oksidaz' sistemi ile metabolizmasına bağlıdır



Şekil 12: Siklofosfamid'in kimyasal formülü (Zhang, Tian ve Zhou)

Siklofosfamid tarafından oluşturulan bağışıklık baskılayıcılık ana ilaçtan ziyade onun metabolitlerinden kaynaklanmaktadır. P-450 monooksijenaz sisteminin etkisi altında siklofosfamid, 4-hidroksi siklofosfamide metabolize olur. Bu metabolit enzimatik olmayan bir yolla aldofosfamide yeniden düzenlenir (Şekil 13). Bu da FAM ve akroleine ayrılır. FAM' in DNA' ya bağlanarak hücre bölünmesini baskıladığı, siklofosfamidin bağışıklık baskılayıcı ve antitümör etkilerine aracı olduğu düşünülmektedir. Öte yandan akrolein' in önemli makromoleküllerinin sulfidril gruplarıyla çabucak reaksiyona girdiği böylece bağışıklığın baskılanmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Oluşan ara ürünler veya son metabolitlerin; kanser seçiciliği, sistemik toksisite, mutajenite, teratojenite, genotoksisite ve kanserojenite gibi farklı etkileri olabileceği ileri sürülmektedir (Ayhancı).

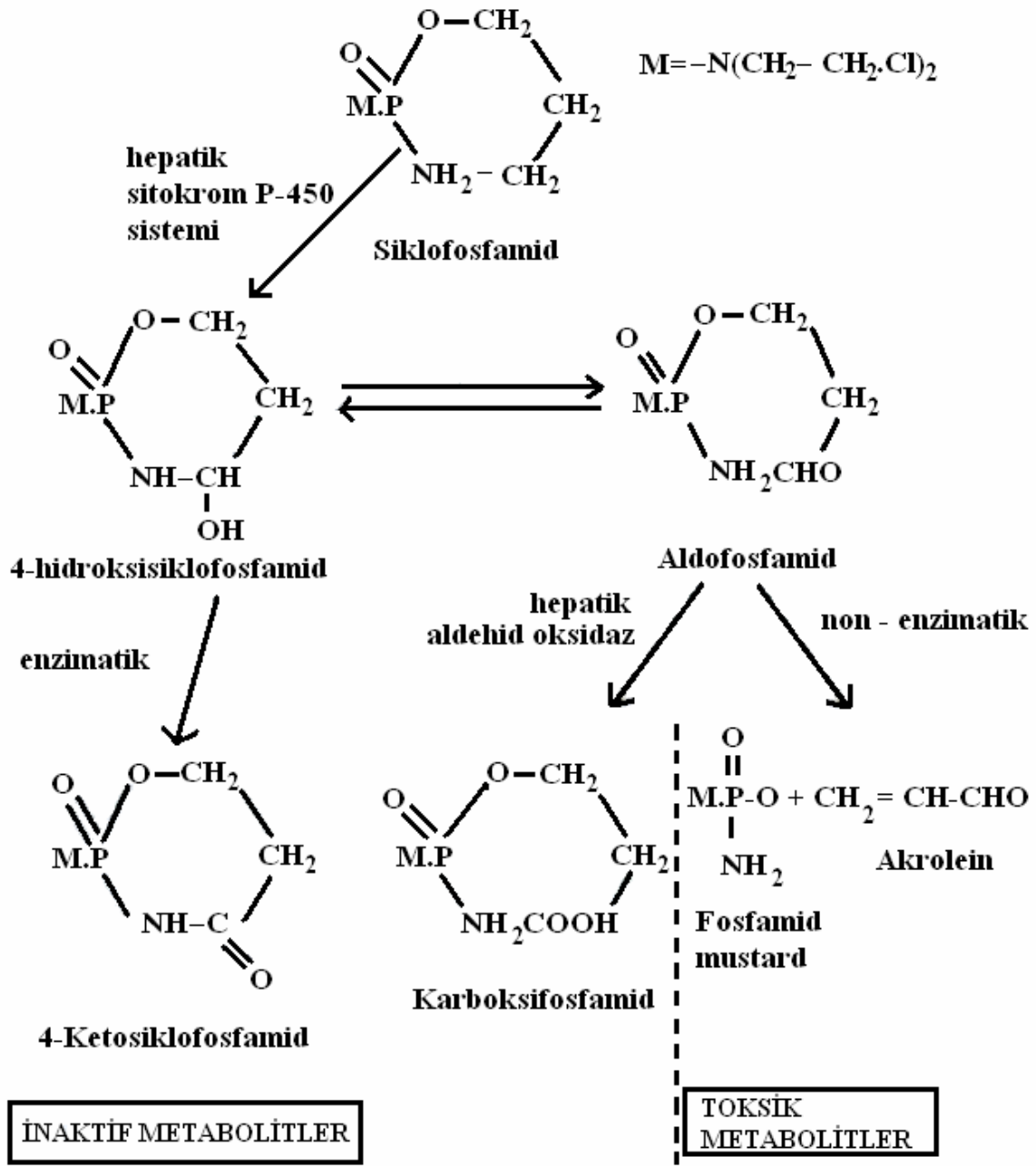
Hem oral hem de parenteral olarak kullanılan siklofosfamid, hem hematolojik hem de solid tümörlerin tedavisinde başarılı bulunmuştur. Siklofosfamidin plazmada yarılanma ömrü 6,5 saattir. Parenteral verilişte aktif metabolitlerin plazma

konsantrasyon pikine ulaşması 2–3 saat sürer. Siklofosfamidin kullanım alanları şunlardır;

- _ Hodgkin dışı lenfomalar
- _ Çocukların akut lenfositik lösemisi
- _ Küçük hücreli olan veya olmayan akciğer kanseri
- _ Hodgkin hücreleri
- _ Pediatrik solid tümörler

Ayrıca güçlü bağışıklık baskılayıcı etki göstermesi nedeni ile Romatoid artrit, çocukların Nefrotik sendromu, Behçet hastalığı ve diğer bazı otoimmün hastalıklarda da kullanılmaktadır.

Çeşitli deneysel ve klinik çalışmalarda siklofosfamidin gonadal yetmezlik, renal yetmezlik ve özellikle hemorajik sistit oluşturduğu rapor edilmiştir. Siklofosfamid terapisi gören meme kanserli hastalarda çoğu zaman amenore oluşmaktadır. Erkeklerde sık sık azospermi gelişmektedir. Siklofosfamid, ovaryum foliküllerinde epitel doku için toksiktir. Zira dişi sıçanlara 40 mg/100 gr siklofosfamid verildiğinde ovaryum foliküllerinin normal gelişiminin inhibe olduğu gözlenmiştir. Siklofosfamid spermatojenik epitelyumda da toksisite oluşturmaktadır. Bir siklofosfamid metaboliti olan akrolein de 3 – 10 mg/L arasındaki konsantrasyonlarının 12 günlük fare embriyosunda anormal gelişmelere neden olduğu gözlenmiştir.



Şekil 13: Siklofosfamid'in metabolizması (Zhang, Tian ve Zhou)

Siklofosfamid, emziren kadınlarda süte geçerek bebekte immunosupresyon, gelişme geriliği ve karsinogenezis gibi toksik etkiler yapmaktadır. Ayrıca fizyolojik olarak uygun olmayan antidiüretik hormon salgısını artırarak hipernatremiye yol açar. Bu durum ise hemorojik olarak sistit riskini artırır. Siklofosfamid metabolitleri, özellikle akrolein, mesane mukozası için toksiktir. Erkek Swiss farelerde yapılan

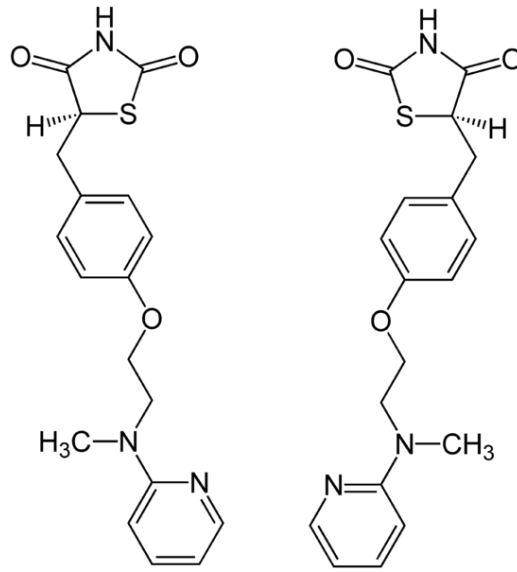
deneysel çalışmalarda 200 mg/kg siklofosfamidin hemorajik sistit oluşturduğu rapor edilmiştir. Siklofosfamidin insanlarda ve deney hayvanlarında mesane kanseri yaptığı yönünde raporlarda bulunmaktadırdır. Siklofosfamidin kemik iliği mutajenitesi konusunda yapılan çalışmalar, bu maddenin insanlarda ve sıçanlarda hematopoietik sistemde kanserojen olduğunu göstermiştir. Farelerde yapılan bir deneysel çalışmada 100 mg/kg intraperitoneal siklofosfamid uygulamasının hematopoietik sistemde tümör gelişimini uyardığı gözlenmiştir. Sıçanlarda yapılan diğer bir deneysel çalışmada 20 ve 40 mg/kg intraperitoneal siklofosamid uygulamasının dalakta ve kemik iliğinde mutajen olduğu gösterilmiştir. Hodgkin lenfomalı hastalara siklofosfamid verildiğinde, hastalarda üreterik tümörlerin geliştiği rapor edilmiştir (Ayhancı).

Deneysel çalışmalarda siklofosfamidin farelerde primer olarak primordial folikülleri hedef aldığı, sıçanlarda ise primordial foliküllerden daha fazla antral ve gelişmekte olan folikülleri etkilediği gösterilmiştir.

Siklofosfamid toksisitesi kadınlarda primer folikül kaybına, prematur menapoza ve gelişmekte olan foliküllerin kaybına bağlı geçici infertiliteye neden olur (Desmeules ve Devine).

2.4. Rosiglitazone

Tiazolidinedion (TZD) grubu ilaçların ilk üyesi olan 'ciglitazon' ilk olarak 1982 yılında tanımlanmış, ancak etkisi yeterli bulunmadığı ve çeşitli yan etkileri olduğu için klinik kullanıma geçmemiştir. Klinik olarak kullanıma giren ilk TZD ise 'troglitazon' dur. Ancak bu da şiddetli hepatotoksisite yan etkisi nedeniyle 2000 yılında kullanımdan çekilmiştir. Rosiglitazone, pioglitazon ile birlikte bu gün için kullanımda olan iki TZD' dan birisidir (Tack ve Smits) (Şekil 14).



Şekil 14: Rosiglitazone' un moleküler formülü (Tack ve Smits)

Rosiglitazone günümüzde tip 2 diyabet tedavisi için kullanımı onaylanmış, insülin duyarlılaştırıcı özelliği olan bir oral antidiyabetik ilaçtır. Oral alımını takiben biyoyararlanımı oldukça yüksektir ve absorbe edildikten sonra %99' un üzerinde plazma proteinlerine bağlanmaktadır. Başlıca CYP2C8 ve kısmen CYP2C9 enzim sistemi tarafından metabolize edilmektedir. Karaciğer fonksiyonları normal ise, eliminasyon yarı ömrü 3-4 saattir (Tack ve Smits).

Etki mekanizması PPAR- γ reseptörlerine bağlanması üzerine kuruludur. PPAR- γ reseptörleri nuklear transkripsiyon faktörleri grubundandır. Nuklear transkripsiyon faktörleri hücre fonksiyonlarını düzenleyen çeşitli genlerin ekspresyonlarını etkilemektedir. PPAR- γ reseptörleri başlıca yağ hücrelerinde eksprese edilmektedir ve

bu yüzden yağ hücreleri PPAR- γ ligandlarının başlıca etki yerleridir. Diğer çoğu ilaçtan farklı olarak Rosiglitazone' un bağlandığı reseptörler hücre membranında değil çekirdektedir. PPAR- γ reseptör aktivasyonuna yanıt olarak hedef hücrede yüzlerce genin ekspresyonu gerçekleşmektedir.

PPAR- γ ilk olarak adipogenez ve immün hücre aktivasyonunu regülatörü olarak tanımlanmıştır. Ancak güncel çalışmalar PPAR- γ ' nın dişi memelilerin ovarian dokusundaki oositin atılması da dahil siklik değişikliklerde oldukça etkili olduğunu ortaya koymuştur. Ovarian PPAR- γ 'nın ekspresyonu ve fonksiyonu yanında adipositler ve makrofajlar üzerindeki direkt ve indirekt etkisi de ovarian fonksiyonu ve dişi fertilitesi etkiler. Thiazolidinedionlar ile aktive edilen PPAR- γ lipid metabolizmasını regüle eder ve kendi regülasyonunu, PPAR- γ transkripsiyon mekanizmasını ve adipogenez artışını stimüle eder. Birey tarafından taşınan adipoz doku fertilitesi etkiler ve lipid metabolizmasında etkili genler ovarian hücreler için oldukça önemlidir.

PPARG, oosit içeren foliküllerde hücresel yapıyı ve fizyolojiyi etkiler. İnsülin hassasiyeti, normal ovarian fonksiyon için yaşamsal önem taşıyan glikoz alınımları PPARG tarafından düzenlenir. Sonuç olarak PPARG dişi fertilitesi için büyük önem taşır.

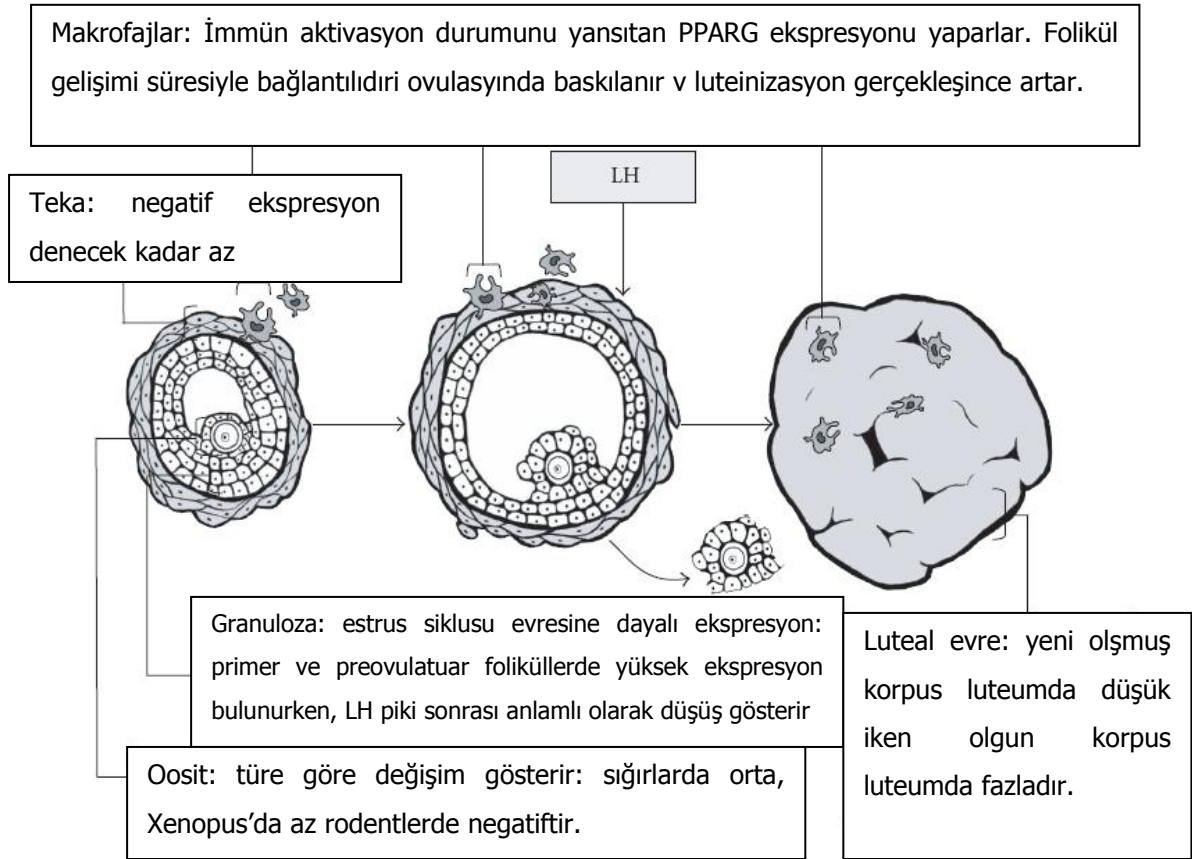
PPARG'nın makrofaj fonksiyonunu düzenlediği in vitro koşullarda da ispatlanmıştır. Makrofaj fonksiyonu her siklusta ovulasyona, luteinizasyona ve lutealize bağlı doku remodellenmesinde oldukça önemlidir. Adipoz dokudaki ve dolaşımdaki makrofajlar tarafından salgılanan inflamatuvar mediatörler ovaryum üzerinde etki sağlar. Bunun yanında ovaryum dokusu içinde salgılanmaları da otokrin olarak yine ovaryumu etkiler.

PPARG tarafından düzenlenen mekanizmalar ovaryum fonksiyonları açısından oldukça önemlidir (Şekil 15).

Steroidogenez, doku remodellenmesi, anjiyogenez, lipid metabolizması, immün hücre aktivasyonu ve proinflamatuvar mediatörlerin üretimi nuklear PPAR varlığı ve aktivasyonu tarafından kontrol edilir. Her üç PPAR isotopu da bir çok türün ovaryumunda tanımlanmıştır. Bu türler sıçan, fare, domuz, koyun, sığır ve insandır. İsoptopların lokalizasyonu ise in situ hibridizasyon ve immünohistokimya yöntemleri

tarafından gösterilmiştir. PPARA (PPAR alpha) immün hücrelerde, teka ve stroma hücrelerinde; PPARD (PPAR delta) tüm ovaryum komponentlerinde gösterilmiştir.

PPARA ve PPARD ekspresyonu ovulatuvar siklus boyunca stabildir. Bu durum bu iki isotopun bazal ovaryan fonksiyonların düzenlenmesinde görevli olduğunu düşündürür. PPARG ise rodentler ve ruminantlarda başlıca güçlü olarak granuloza hücreleri tarafından (östrodiol salgısı ve foliküler sıvı içeriğinin düzenlenmesine cevap olarak), daha hafif şiddette teka hücrelerinde (granuloza östrodiol sentezi için gerekli olan androjen prekürsörlerinin oluşturulduğu alanda) ve luteal hücrelerde (ovulasyon sonrası progesteron üretimine bağlı olarak) eksprese edilir. PPARG ekspresyonu folikülogenezin erken evrelerinde başlar ve dinamik olarak büyük folikül evrelerine dek eksprese edilirken LH pikine cevap olarak azalma gösterir.



Şekil 15: Ovaryumda PPARG ekspresyonu (Minge, Bennett ve Norman RJ)

Oositte PPARG ekspresyonu türe özgü değişiklik gösterir. Ruminantlarda orta derecede, Xenopus oositlerinde eser miktarda eksprese edilirken rodentlerdeki

ekspresyonu henüz saptanamamıştır. İnsan oositlerindeki durum henüz açıklığa kavuşmamıştır.

Memelilerde en çok PPARG ekspresyonu yap dokudadır ve PPARG aktivasyonu adipogenez için gereklidir. Yağlılık (adipozite) dişi fertilitesinde anahtar bir role sahiptir. Esterlenmemiş serbest yağ asitleri gibi ovaryan hedefler üzerinde geniş etkileri olan adiposit kaynaklı birçok faktör PPARG kontrolündedir. Sonuç olarak yağ dokudaki PPARG aktivasyonu adiposit ve adipokin aktivitesini etkileyeceği için üreme potansiyelini de etkileyecektir (Minge, Robker ve Norman).

Ovaryum dokusu ve yağ dokusu başlıca makrofajlar olmak üzere önemli oranda immün hücre içerir. Doku içinde yer alan makrofajlar lokal ve sistemik fonksiyonu olan bir çok inflamatuvar mediatör için kaynak oluşturur. TZD tedavisinin yağ doku kaynaklı makrofajları etkilediği, proinflamatuvar sitokin üreten hücrelerin sayısını azaltarak apoptoz oranını düşürdüğü çalışmalarda gösterilmiştir.

TZD tedavisi gören polikistik over sendromu tanısı koyulmuş hastalarda üreme fonksiyonu olumlu yönde etkilenmiştir. TZD tedavisi bu hastalarda hem insülin mekanizmasını düzenlemiş, dolaşımdaki lipit düzeylerini azaltmış hem de üreme kabiliyetini geri kazandırmıştır. Dolaşımdaki cinsiyet hormonu düzeylerini düzenlerken ovulasyonu da düzene sokmuştur.

TZD tedavisi ile sağlanan PPARG aktivasyonu aşağıdaki hormonlar üzerinde etkili olmuştur.

1. Androjen: TZD'ler saflaştırılmış domuz tekal hücrelerinde ve karışık insan ovaryum dokusu hücrelerinde LH ve insülin uyarılı androjen biyosentezini inhibe eder. Ayrıca polikistik over sendromu tanısı koyulmuş hastalarda plazma testosteron düzeyini düşürür.
2. Östrojen: TZD uygulamasının östrojen sentezini etkilediği kabul edilse de bu etkinin türe, yaşa ve endokrin duruma göre değişim gösterdiği çalışmalarda gösterilmiştir.
3. Progesteron: PPARG aktivasyonua bağlı progesteron cevabı türe ve folikülogenezib evresine göre değişim gösterir. Bir çok çalışma in vitro koşulda PPARG uygulamasının ardından progesteron salgısının arttığını rapor etmiştir. Ancak aksini iddia eden çalışmaların da varlığı

bu konuda bir görüş birliği sağlanamamasına neden olmuştur (Minge, Robker ve Norman).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada Wistar cinsi dişi sıçanlar (180-220g) kullanılmıştır. Toplam 28 adet sıçan kullanılmıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, Wistar suşunun bulunması ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle bu tür ve cins seçilmiştir. Tüm hayvanlar deney sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarlarında 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık, 20–22 °C oda sıcaklığında barındırıldı. Hayvanlar dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile beslendi. Bu çalışmada kullanılacak sıçanların anestezisi eter ile yapıldı. Deney sonunda eter anestezisi uygulanarak hayvanlar sakrifiye edildi. Herhangi bir sebeple deneyi devam ettiremeyecek olan (enfeksiyon, ilaç reaksiyonu, genel durum bozukluğu vs.) ya da deneyler bitmeden yaşamı sonlanan hayvanlar deney ve istatistik kapsamından çıkarıldı.

Kontrol grubu: Hiçbir uygulamaya maruz kalmayan deney grubudur. (n=7)

I. Grup Kemoterapi grubu: 100mg/kg siklofosfamid uygulanan deney grubu. Enjeksiyon veya oral herhangi bir tedaviye yönelik ilaç uygulanmadı, deney grubu diğer gruplarla aynı sürede sakrifiye edildi. (n=7)

II. Grup Rosiglitazone deney grubu: 100mg/kg siklofosfamid uygulamasından 3 gün önce ve 15 gün sonra olmak üzere toplamda 18 gün 3mg/kg dozunda rosiglitazone %0.9'luk NaCl' de çözünerek oral gavaj yöntemiyle verildi. Son doz uygulamasından 24 saat sonra deney grubu sakrifiye edildi. (n=7)

III. Grup Kemoterapi+NaCl deney grubu: 100mg/kg siklofosfamid uygulamasından 3 gün önce ve 15 gün sonra olmak üzere toplamda 18 gün deney grubuna rosiglitazone eklenmemiş %0.9'lu NaCl solüsyonu oral gavaj yöntemiyle verildi. (n=7)

Siklofosfamid ve Rosiglitazone ticari olarak satın alındı. Siklofosfamid %0.9 NaCl' de çözündürülerek intraperitoneal enjeksiyon yöntemiyle deneğe uygulandı.

Rosiglitazone ticari olarak satın alındı ve deneğe göre ayarlanan doz 1 ml %0.9 NaCl' de çözündürülerek orogastrik sonda ile deneklere uygulandı.

Süre içinde deneye devam edemeyecek duruma gelen denekler sakrifiye edildi, deneyi tamamlayamayan denekler deneyden çıkarıldı ve istatistik kapsamına alınmadı. Deneyin sonunda deneklerin anestezisi eter ile yapıldı ve eter anestezisi altında denekler sakrifiye edildi. Deneklerin batını açıldığında sol ovaryumları çıkarılıp ikiye bölündü. Sol ovaryumun yarısı western blotting analizi için -80°C' de saklandı. Diğer yarısı ise %2.5' luk gluteraldehit içerisinde saklandı.

Sol ovaryum dokuları alındıktan sonra deneklere %10luk formaldehit ile kardiyak perfüzyon uygulandı. Sağ ovaryum dokuları kardiyak perfüzyon sonrası %10' luk formaldehite alındı. Kırk sekiz saat formaldehitte fiske edildikten sonra doku takibine alındı.

3.1 Araştırmanın Tipi

Araştırma deneysel bir araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırmanın deneysel ayağı Dokuz Eylöl Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir. Araştırmanın histoloji ve immünohistokimyasal değerlendirmeleri ise Dokuz Eylöl Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir. Araştırma 14 Ocak 2010 tarihinde başlamış ve 19 Mayıs 2011 tarihinde sonlanmıştır.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Kontrol grubu: Hiçbir uygulamaya maruz kalmayan deney grubudur. (n=7)

I. Grup Kemoterapi grubu: 100mg/kg siklofosfamid uygulanan deney grubu. Enjeksiyon veya oral herhangi bir tedaviye yönelik ilaç uygulanmadı, deney grubu diğer gruplarla aynı sürede sakrifiye edildi. (n=7)

II. Grup Rosiglitazone deney grubu: 100mg/kg siklofosfamid uygulamasından 3 gün önce ve 15 gün sonra olmak üzere toplamda 18 gün 3mg/kg dozunda rosiglitazone %0.9' luk NaCl' de çözünerek oral gavaj yöntemiyle verildi. Son doz uygulamasından 24 saat sonra deney grubu sakrifiye edildi. (n=7)

III. Grup Kemoterapi+NaCl deney grubu: 100mg/kg siklofosfamid uygulamasından 3 gün önce ve 15 gün sonra olmak üzere toplamda 18 gün deney grubuna rosiglitazone eklenmemiş %0.9'lu NaCl solüsyonu oral gavaj yöntemiyle verildi. Son uygulamadan 24 saat sonra deney grubu sakrifiye edildi. (n=7)

3.4. Çalışma Materyali

Bu çalışmada Wistar cinsi dişi sıçanlar (180-220g) kullanıldı. Toplam 28 adet sıçan kullanıldı. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, Wistar suşunun bulunması ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle bu tür ve cins seçildi. Tüm hayvanlar deney sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarlarında 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık, 20–22 °C oda sıcaklığında barındırıldı. Hayvanlar dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile beslendi.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmada kontrol grubuna herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Deney grupları olan Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'e aynı kemoterapi dozu uygulanmıştır. Grup 2 diğer gruplardan bağımsız olarak on beş gün süresince orogastrik sonda ile Rosiglitazone (3 mg/kg/gün) alırken Grup 3 orogastrik sonda ile %0.9'luk NaCl almıştır. Grup 1 kemoterapi uygulaması dışında bir uygulamaya maruz kalmamıştır.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler

Araştırmada deneklerin ağırlıklarını ölçmek için hassas terazi; deneklerden elde edilen dokuların doku takibinde etüv, incelenmesinde kesit almak için mikrotom, boyamalarda kullanılan distile su gereksinimi için distile su cihazı, immünohistokimyasal incelemeler için nemli çember ve otomatik mikropipetler kullanılmıştır.

3.6.2. Araştırmada Kullanılan Yöntemler

Araştırmada öncelikle kontrol grubu dışındaki gruplara kemoterapi uygulanmıştır. Grup 2: Rosiglitazone grubu ise Rosiglitazone uygulaması almıştır.

Deney sonunda elde edilen doku örnekleri rutin doku takip prosedürüne maruz kalmış, histolojik inceleme için takibi yapılan dokuların ince kesitleri alınmış ve çeşitli histolojik ve immünohistokimyasal boyamalara tabi tutulmuştur.

Araştırmada histolojik değişiklikler Mayer's Hematoksilen&Eozin, Masson's Trikrom boyası, immünohistokimyasal olarak DNA fragmentasyonunun gösterilmesi TUNEL ile yapılmıştır.

3.6.2.1. Kemoterapi Modelinin Oluşturulması

3.6.2.1.1. Siklofosfamid'in Hazırlanışı

Ticari olarak satılan alınan 1g siklofosfamid 500 ml %0.9 NaCl 'de çözdürüldü. 100 mg/kg dozunda intraperitoneal yolla enjekte edildi.

3.6.2.2. Rosiglitazone' un Hazırlanışı

Ticari olarak satın alınan rosiglitazone malatae tablet dövülerek toz hale getirildi. Toz rosiglitazone 3mg/kg dozunda %0.9 NaCl'de süspansiyon haline getirilerek orogastrik sonda yardımıyla verildi.

3.6.2.3. Doku Örneklerinin Hazırlanması

Deney süresi biten sıçanların ağırlıkları sakrifiye edilmeden önce hassas terazi ile tartıldı. Sakrifikasyon öncesi tokluk kan şekerleri glukometre ile ölçüldü. Eter

anestezisi altında sakrifiye edilen sıçanların sol ovaryumları perfüzyon öncesi çıkarıldı, ikiye bölünerek yarısı elektron mikroskobik takip için %2,5'luk gluteraldehite alınırken diğer yarısı eppendorf tüplere alınarak western blot analizi için -80°C' ye kaldırıldı. Kardiyak perfüzyon sonrasında sağ ovaryum dokuları rutin doku takibi için %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonuna alındı. İki gün %10'luk tamponlu formaldehitte bekleyen ovaryum dokuları rutin histolojik doku takibi prosedürüne göre takip edildi.

3.6.2.4. Rutin Doku Takibi Protokolü

Rutin doku takibindeki tüm işlemler 60°C etüvde gerçekleştirildi (Tablo 3).

Tablo 3: Rutin doku takibi prosedürü

%70 alkol	20 dakika
%80 alkol	20 dakika
%96 alkol	20 dakika
Aseton I	20 dakika
Aseton II	20 dakika
Aseton III	20 dakika
Aseton IV	20 dakika
Ksilol I	30 dakika
Ksilol II	30 dakika
Parafin I (yumuşak parafin)	1 saat
Parafin II (yumuşak parafin)	1 saat
Parafine gömme (sert parafin)	

Her ovaryum ortadan ikiye bölünerek parafine gömüldü. Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığı ile 5µ" luk parafin kesitler alındı.

3.6.2.5. Işık Mikroskobik Boya Takibi

3.6.2.5.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Prosedürü

Kesitler 1 gece boyunca 60 °C' lik etüvde bekletildi. Ertesi gün aşağıdaki prosedüre tabi tutuldu(Tablo 4).

Tablo 4: Hematoksilen-Eozin boyama prosedürü

Ksilol I (etüvde)	30 dakika
Ksilol II	20 dakika
Ksilol III	20 dakika
Absolü alkol (hidratasyon)	Çalkalama
%96 alkol (hidratasyon)	Çalkalama
%80 alkol (hidratasyon)	Çalkalama
%70 alkol (hidratasyon)	Çalkalama
Distile su	Çalkalama
Hematoksilen I	10 dakika
Hematoksilen II	5 dakika
Akar su	15 dakika
Eosin	1 dakika 10 saniye
%70 alkol (dehidratasyon)	Çalkalama
%80 alkol (dehidratasyon)	Çalkalama
%96 alkol (dehidratasyon)	Çalkalama
Absolü alkol (dehidratasyon)	Çalkalama
Ksilol I (şeffaflandırma)	20 dakika
Ksilol II (şeffaflandırma)	20 dakika
Ksilol III (şeffaflandırma)	20 dakika
Entellan ile kapama	

3.6.2.5.2. Masson's Trikrom Boyama Prosedürü

Masson's Trikrom boyaması ticari olarak hazır bir şekilde satılan kit yardımı ile boyandı (2049 GBL, İstanbul, Türkiye). Kesitler 1 gece boyunca 60 °C' lik etüvde bekletildi. Ardından ilki 30 dakika (etüvde) diğer ikisi 20' şer dakikalık üç farklı ksilende tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 2 değişim absolü alkol ve %96' dan %70'e azalan alkol serilerinden geçirdi. Ve akarsuda 5 dakika bekletildikten sonra Masson Trikrom boyama seti içerisinde dokular üzerine 5 damla A solüsyonu (Weigert hematoksilen) boyası ile 5 damla B solüsyonu (ferrik klorür

çözeltisi) damlatıldı ve 10 dakika bekletildi. Preperat yıkanmadan kurutuldu. Doku kesitine 10 damla C solüsyonu (pikrik asit alkolik çözeltisi) damlatıldı ve 4 dakika bekletildi. Solusyon lam silkelenerek uzaklaştırıldı ve kesitler distile su ile yıkandı. Doku kesitine 10 damla D solüsyonu (gelincik kızılı fuksin çözeltisi) damlatıldı ve 4 dakika bekletildi. Distile su ile yıkama yapıldı. Doku kesitine 10 damla E solüsyonu (fosfomolibdik asit çözeltisi) damlatıldı ve 10 dakika bekletildi. Preperat yıkanmadan solusyon uzaklaştırıldı ve preperat 5 dakika kurutuldu. Doku kesitine 10 damla F solüsyonu (anilin mavisi çözeltisi) damlatıldı ve 5 dakika bekletildi. Distile su ile yıkama yapıldı. Boyamanın ardından akarsu altında yıkanan kesitler artan alkol serilerinden geçirildi. Ksilen ile şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan ile kapatıldı.

3.6.2.6. İmmunohistokimyasal İnceleme

İmmunohistokimyasal analizler, hücre ve dokularda var olan makromoleküllerin işaretlenmesi esasına dayanmaktadır. Aşağıda belirtilen üç temel adım ile işaretleme gerçekleşir.

1. Primer antikor özel antijene bağlanır,
2. Antikor-antijen kompleksi bir konjugasyon enzimi yardımıyla ikinci bir antikorla bağlanır,
3. Substrat ve kromojen varlığında bu enzim antikor-antijen bağlanma bölgesinde renkli bir depozite dönüşür. Görünüm ışık mikroskopunda histopatolojik olarak değerlendirilir.

3.6.2.6.1. DNA Fragmentasyonu Saptama Protokolü

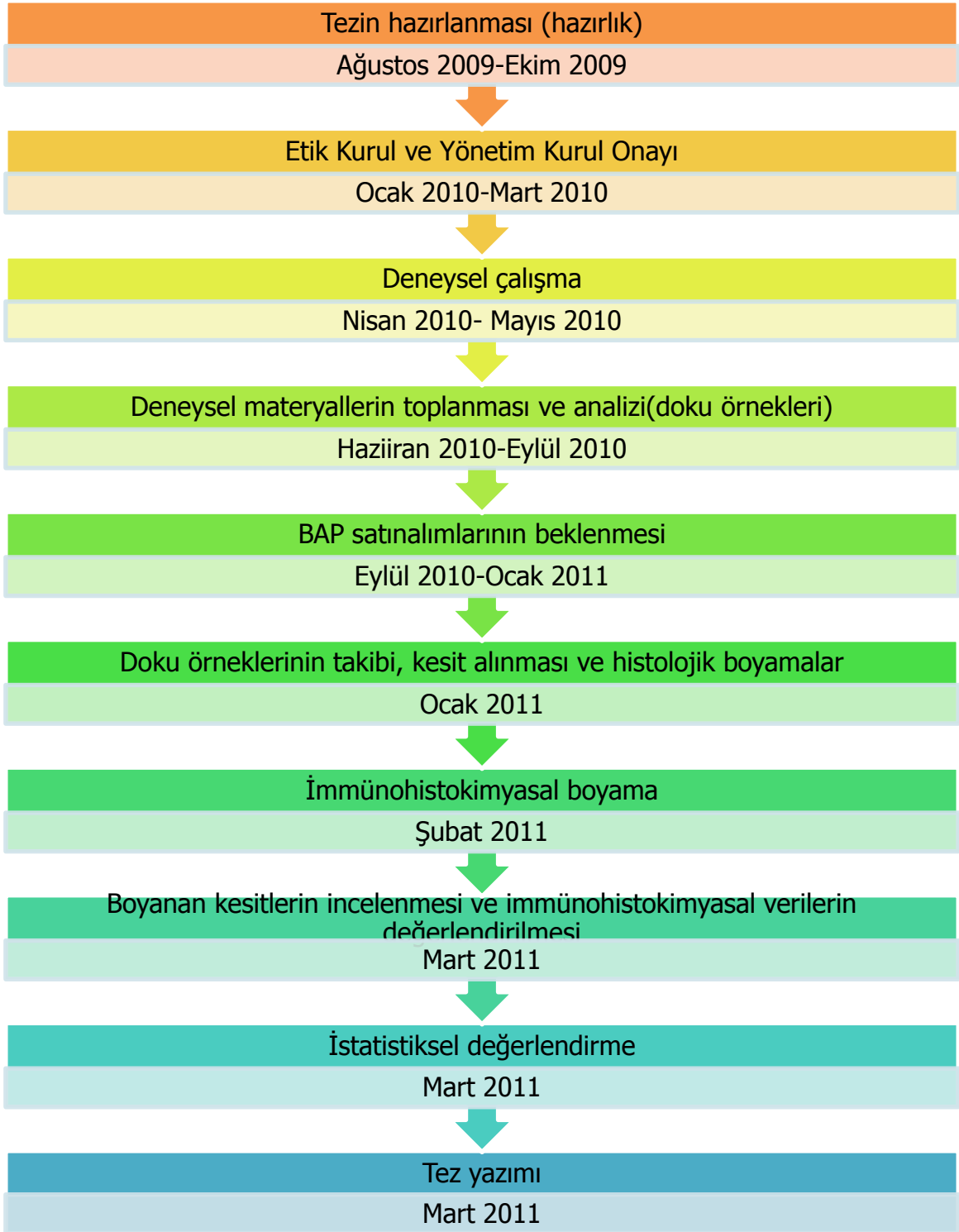
Tez çalışmasında hücre içi DNA fragmentasyonunu saptamak amacıyla Chemicon Millipore Apoptag kiti kullanıldı.

Her deneğin ovaryum dokusundan alınan 5 µm'lik seri kesitlerden 27. Preperat bu prosedürle boyanmış ve analiz edildi.

Alınan kesitler öncelikle 60 °C'lik etüvde 1 gece bekletilmiş daha sonra da rutin ışık mikroskopik deparafinizasyon sürecinden geçirildi. Şeffaflaştırma amacıyla 15'er dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Sırasıyla %96, %80, %70 azalan alkol serilerinden geçirilip hidrasyon sağlanarak 5' er dakika iki değişim distile suda

bekletildi. Distile su aşamasına getirilen kesitler öncelikle nemli çembere yerleştirilmiş ve fosfat tamponlu solüsyon (PBS) ile beş dakika muamele edildi. Boyanacak alanın etrafı PapPen ile çizilerek alan kısıtlandı. Kurutma kağıdı ile üzerindeki PBS emdirilen dokulara Proteinaz K solüsyonu ile 15 dakika oda ısısında muamele edildi. Daha sonra dokular 2 kez PBS ile yıkandı. Taze hazırlanmış %3'lük H₂O₂ (hidrojen peroksit) ile 5 dakika oda ısısında bekletilen dokuda endojen peroksidaz aktivitesi inhibe edildi ve tekrar PBS ile 2 defa yıkandı. Kesitlerdeki su kurutma kağıdı ile emdirildi ve dokular kitin içerisinde mevcut kullanıma hazır bulunan dengeleme solüsyonu (Equilibration buffer) ile 10 dakika muamele edildi. Doku üzerindeki fazla sıvı kurutma kağıdı ile emdirildi ve kit içerisinde reaksiyon solüsyonu ve TdT enzim solüsyonu şeklinde ayrı ayrı bulunup kullanımdan önce ikisinin karıştırılmasıyla taze bir şekilde hazırlanan TdT enzim karışımı (%70 reaksiyon solüsyonu + %30 TdT enzim solüsyonu) ile muamele edilen kesitler 37 °C' de 1 saat nemli çemberde inkübe edildi. Etüvden çıkarılan kesitler 1 ml Reaksiyonu durdurma ve yıkama solüsyonunun 34 ml distile su içerisinde dilüe edilmesiyle hazırlanan solüsyonla 10 dakika oda ısısında inkübe edildi. Bu işlemin ardından 3 kez PBS ile yıkama yapıldı. Kesitler Anti-Digoxigenin solüsyonu ile otuz dakika oda ısısında inkübe edildi. PBS ile 2 kez yıkama yapıldıktan sonra reaksiyonun görünürlüğünü sağlamak amacıyla diaminobenzidine (DAB) kromojeniyle muamele edilen kesitler distile su ile iyice çalkalandı. Mayer's hematoksilen ile art alan boyaması yapıldı ve 3 değişim ksilol ile şeffaflaştırılan kesitler entellan ile kapatıldıktan sonra mikroskopta görüntülendi.

3.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi



3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Histolojik kesitler boyandıktan sonra ışık mikroskop altında değerlendirilmiştir. İmmünohistokimyasal boyama ardından ışık mikroskopta seçilen DNA fragmantasyonundan yoğun alanlarda 1000 hücre sayılmış ve TUNEL pozitif olan hücre sayıları not edilmiştir. Her grup için elde edilen veriler Minitab 16.0 istatistik programında Kruskal-Wallis testi ile değerlendirilmiş ve $p < 0.01$ 'den küçük bulunmuştur. Gruplar arası istatistiksel farklılık ise Mann-Whitney-U testi ile değerlendirilmiş ve $p < 0.01$ anlamlı kabul edilmiştir.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırma planlanan doğrultuda ilerlemiş, malzeme satın alımlarındaki aksaklıklar dışında herhangi bir aksaklıkla karşılaşılmamıştır.

Araştırmada herhangi bir sınırlılık durumu ortaya çıkmamıştır.

3.10. Etik Kurul Onayı

Araştırma Dokuz Eylöl Üniversitesi Tıp Faköltesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 09/01/2010 toplantı no, 08 Ocak 2010 toplantı tarihinde 01/2010 Protokol no ile etik ağıdan uygun bulunmuştur.

Etik kurul onayı Ek-1 olarak teze eklenmiştir.

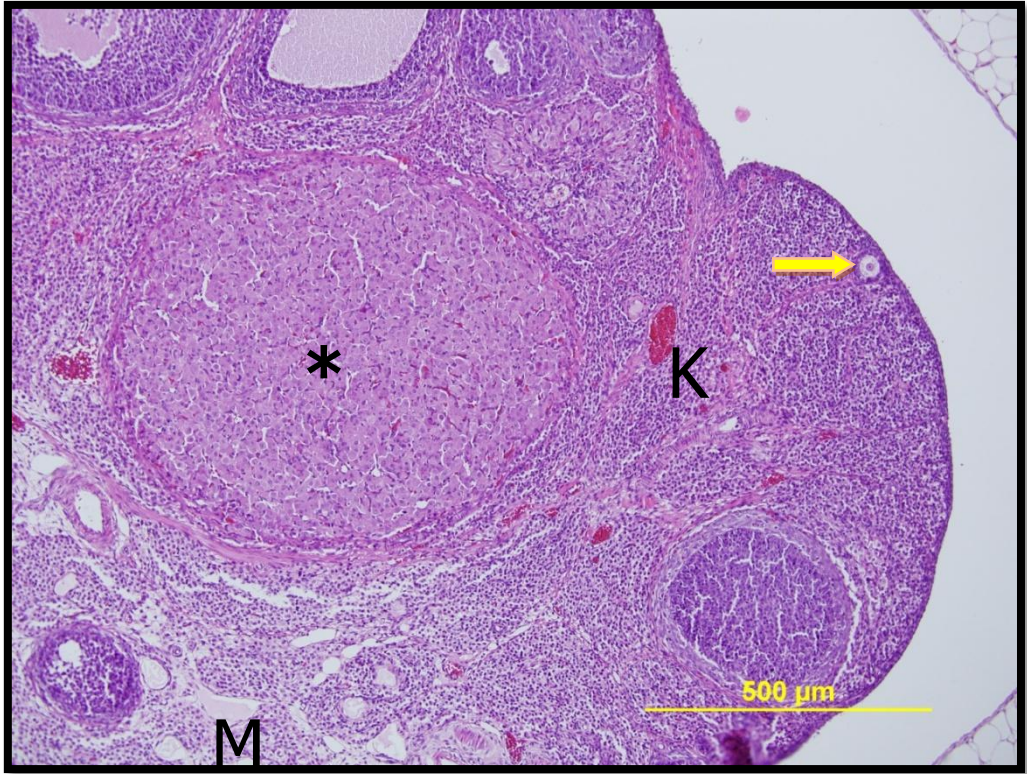
4. BULGULAR

4.1. Işık Mikroskopik Bulgular

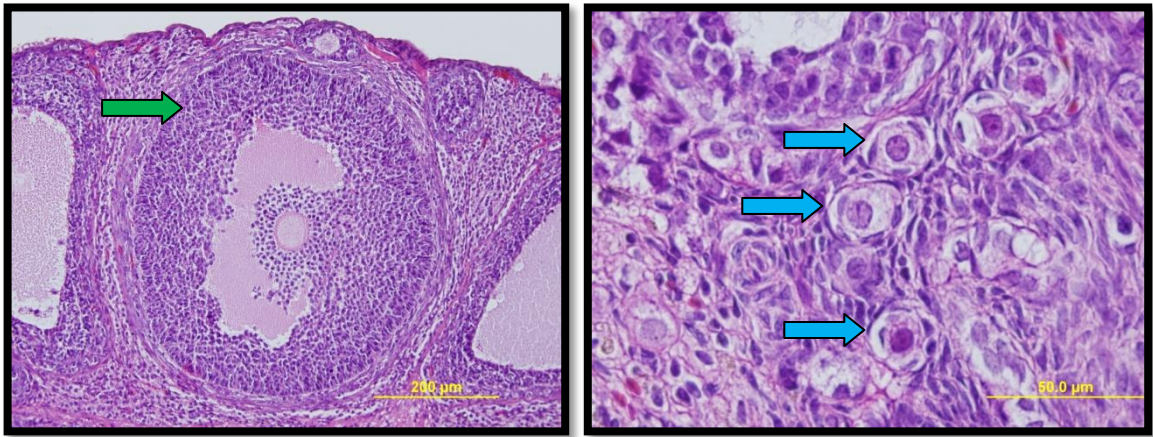
Kontrol grubunda ovaryum ince fibröz bağ dokudan oluşan bir kapsül ile çevrelenmişti. Dış kısmında germinal epitel kübik şekilli hücrelerden oluşmaktaydı. Germinal epitelin bazal membranı düzgün ve düzenli olarak gözlemlendi. Kapsülden parankima içine uzanan ince bağ dokusu bantları düzgün olarak izlendi. Kortekste ovaryum dokusu içerisinde primordial folliküller, çeşitli çaplarda primer, sekonder ve tersiyer folliküller ile birlikte farklı miktarda korpus luteum yer almaktaydı. Folliküllerde bulunan oosit ve ona ait zona pellusida düzenli ve normal görünümdeydi.

Folliküllerin etrafında bulunan granüloza hücreleri poligonal, eozinofilik sitoplâzmalı olup çekirdekleri kromatinden zengin ve yuvarlak biçimliydi. Vasküler yapılar normal bir görünüme sahipti (Şekil 16, Şekil 17).

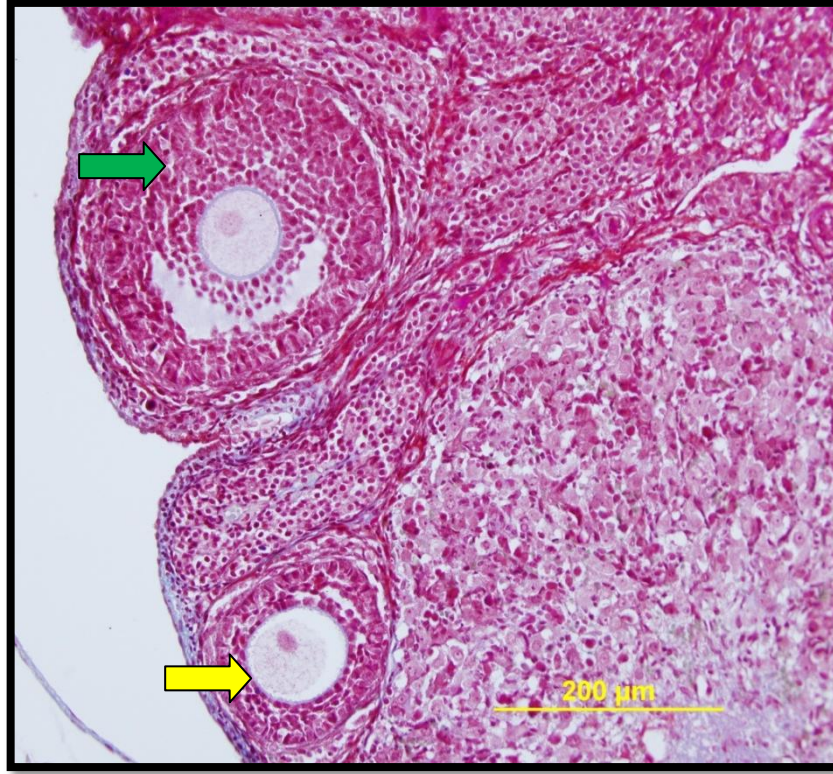
Kontrol grubuna ait Masson's Trikrom boyanan kesitlerde ovaryum normal görünümdeydi (Şekil 18).



Şekil 16: Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti, H&E (Sarı ok: primer folikül, K: Korteks, M: Medulla, yıldız: Korpus luteum).



Şekil 17: Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti, H&E. (Yeşil ok: sekonder folikül, Mavi oklar: primordial foliküller).



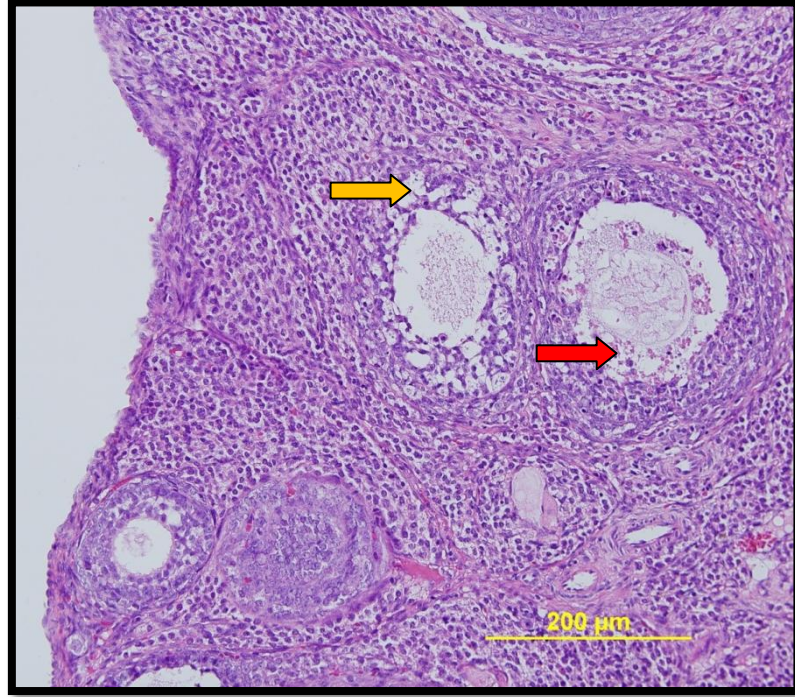
Şekil 18: Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti, Masson's Trikrom (sarı ok: primer folikül, yeşil ok: sekonder folikül).

Grup 1: Kemoterapi grubunda ovaryumdan alınan seri kesitler incelendiğinde ovaryum ince fibröz bağ dokudan oluşan bir kapsül ile çevrelenmişti. Dış kısmında germinal epitel kübik şekilli hücrelerden oluşmaktaydı. Germinal epitelin bazal membranı düzgün ve düzenli olarak gözlemlendi. Kortekste ovaryum dokusu içerisinde primordial folliküller, çeşitli çaplarda primer, sekonder ve tersiyer folliküller ile birlikte farklı miktarda korpus luteum yer almaktaydı özellikle primer ve sekonder foliküllerde granuloza hücre tabakasında yoğun apoptoz ve buna eşlik eden vakuolizasyon görüldü. Gelişen foliküllerde folikül merkezinde granuloza hücre debrisisi görüldü (Şekil 19, Şekil 22).

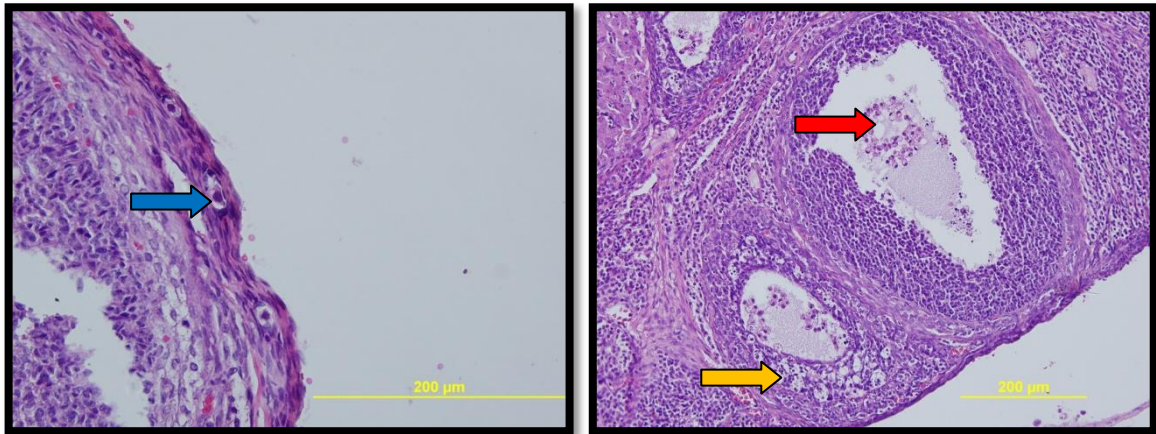
Primordial folikül oositlerinde eozinofili artışı ve nuklear kromatinde kondensasyon görüldü (Şekil 20).

Atretik folikül oranı kontrol grubuna göre daha yoğun görülmekteydi (Şekil 21).

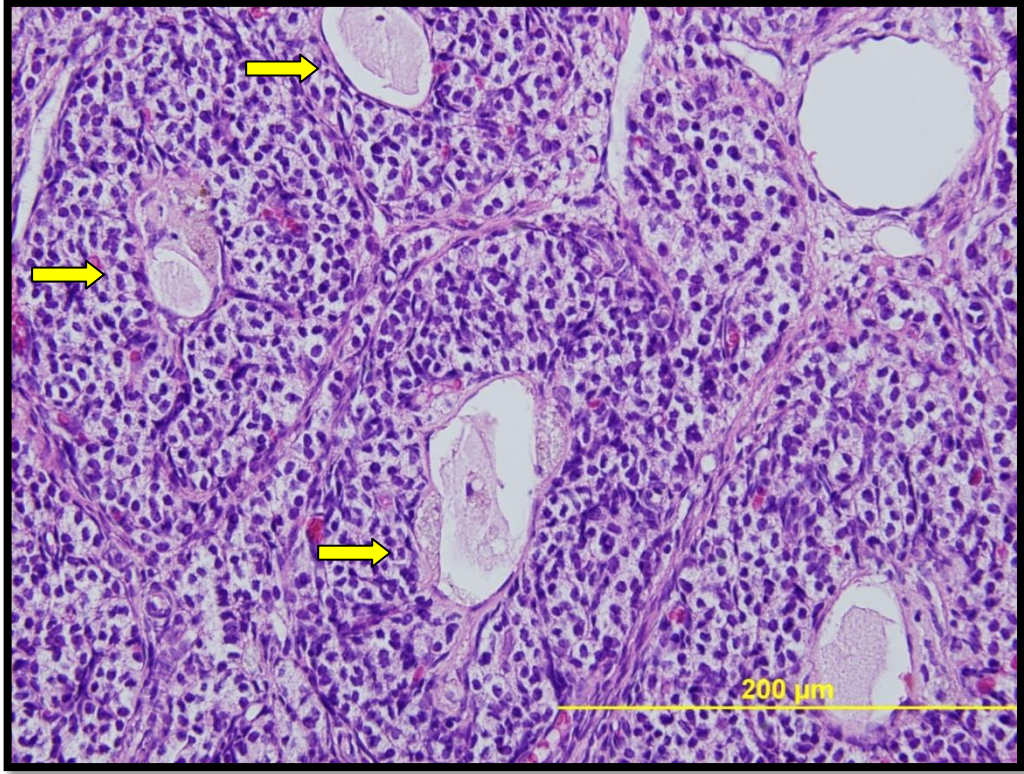
Masson's Trikrom histolojik boyamalarında kortekste kortikal fibrosis görüldü. Özellikle gelişen foliküllerde (sekonder ve Graaf) granuloza hücre tabakası ve teka interna çevresinde kollajen artışı görüldü (Şekil 23).



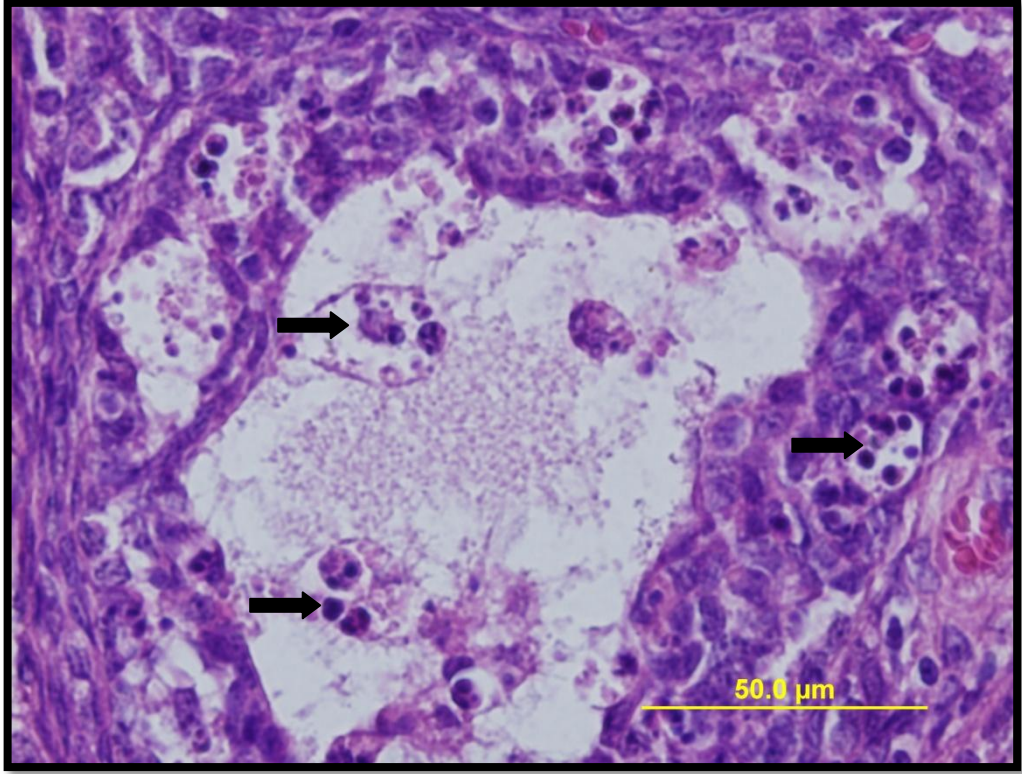
Şekil 19: Grup 1: Kemoterapi grubuna ait ovaryum kesiti, H&E (turuncu ok: granuloza hücre tabakasında apoptoz ve vakuolizasyon, kırmızı ok: atretik folikülde granuloza hücre debris).



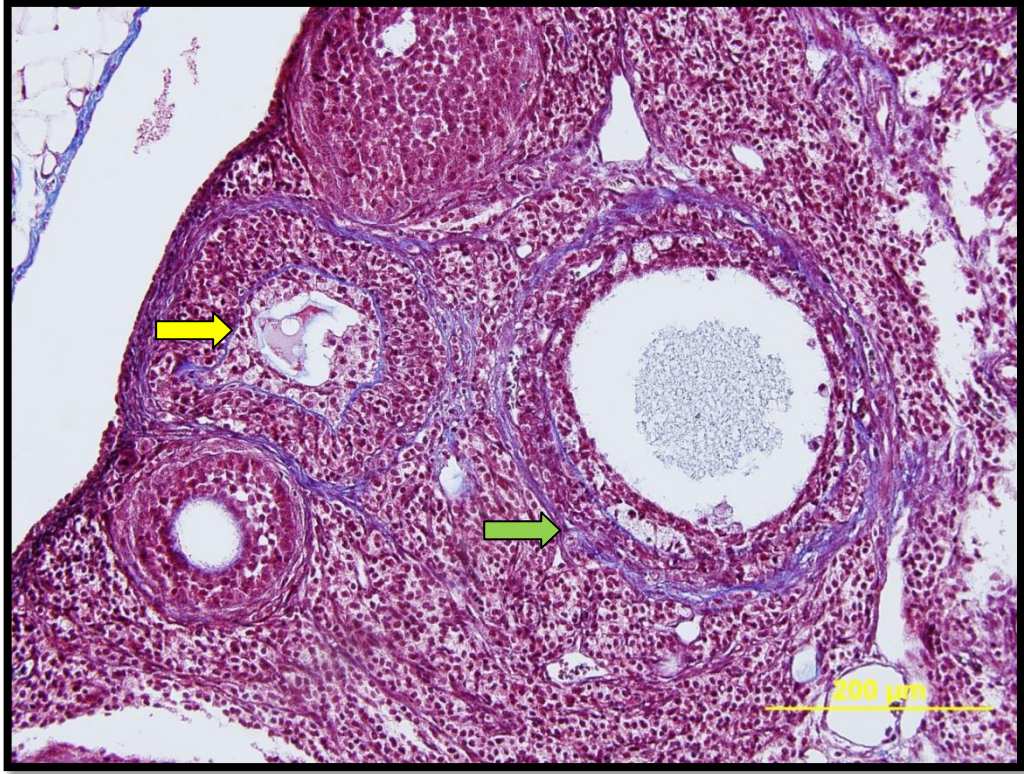
Şekil 20: Grup 1: Kemoterapi grubuna ait ovaryum kesiti, H&E (mavi ok: eozinofili artışı gözlenen primordail foliküller, kırmızı ok: granuloza hücre debris, turuncu ok: granuloza hücre katmanında vakuolizasyon ve apoptoz).



Şekil 21: Grup 1: Kemoterapi grubuna ait ovaryum kesiti, H&E (sarı oklar: atretik foliküller).



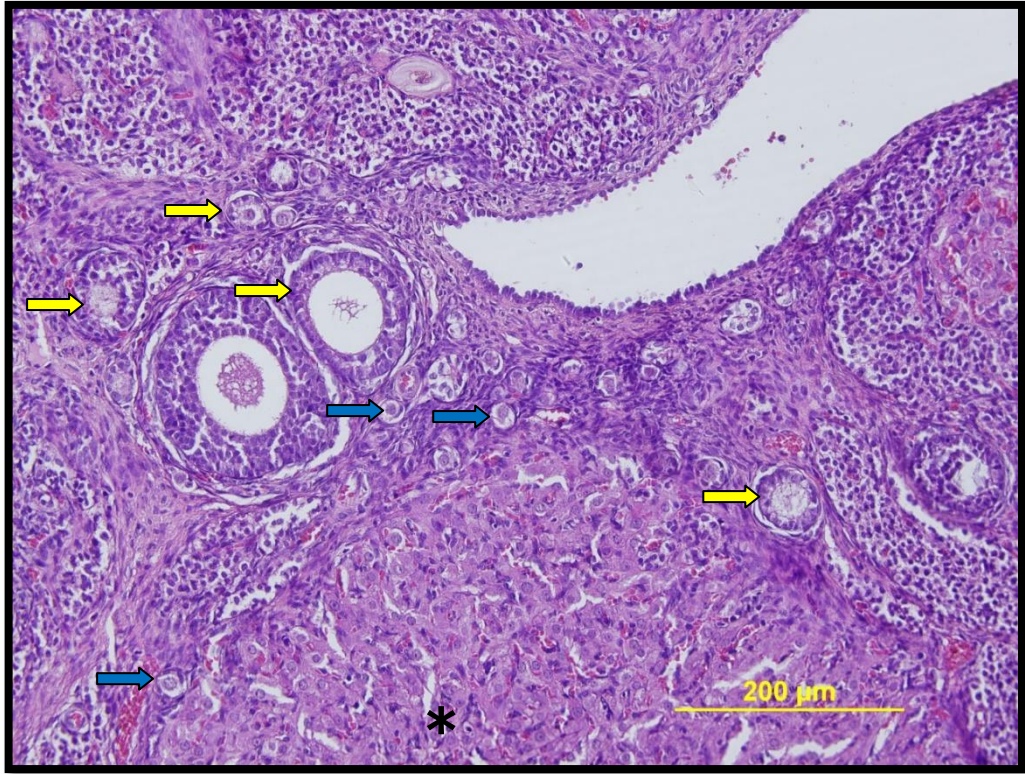
Şekil 22: Grup 1: Kemoterapi grubuna ait ovaryum kesitinde apoptotik cisimler(siyah ok), H&E.



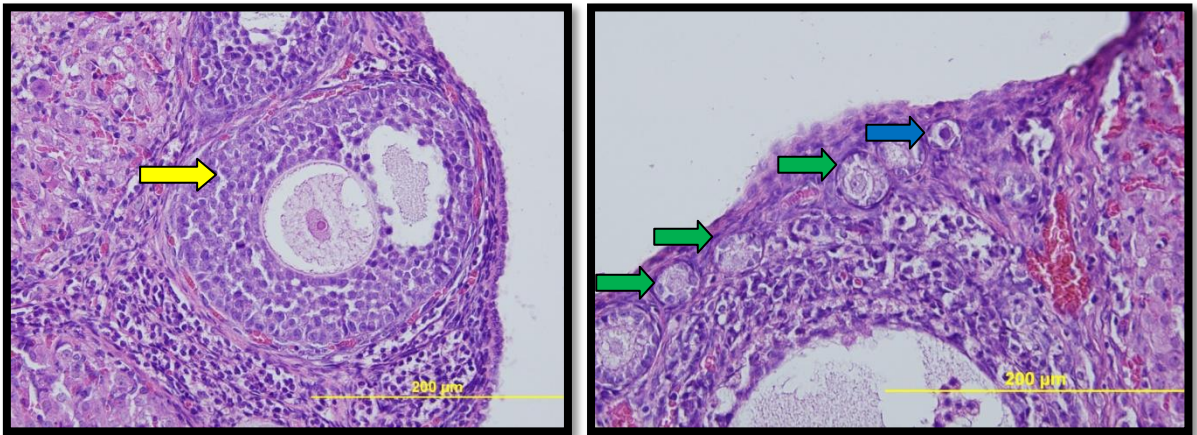
Şekil 23: Grup 1: Kemoterapi grubuna ait ovaryum kesiti, Masson's Trikrom (sarı ok: atretik folikül, yeşil ok: granuloza hücre bakasında ve teka interna bazal laminasında kollajen artışı).

Grup 2: Rosiglitazone deney grubu incelendiğinde ovaryum ince fibröz bağ dokudan oluşan bir kapsül ile çevrelenmişti. Dış kısmında germinal epitel kübik şekilli hücrelerden oluşmaktaydı. Germinal epitelin bazal membranı düzgün ve düzenli olarak gözlemlendi. Kapsülden parankima içine uzanan ince bağ dokusu bantları düzgün olarak izlendi. Kortekste ovaryum dokusu içerisinde primordial folliküller, çeşitli çaplarda primer, sekonder ve tersiyer folliküller ile birlikte farklı miktarda korpus luteum yer almaktaydı (Şekil 24, Şekil 25). Ovaryum kontrol grubuna benzer bir görünüme sahipti. Bazı gelişmekte olan foliküllerde Grup 1: Kemoterapi grubuna ve Grup 3: Kemoterapi+ NaCl deney grubuna benzer ancak daha az oranda granuloza hücre tabakasında apoptoz ve vakuolizasyon gözlemlendi.

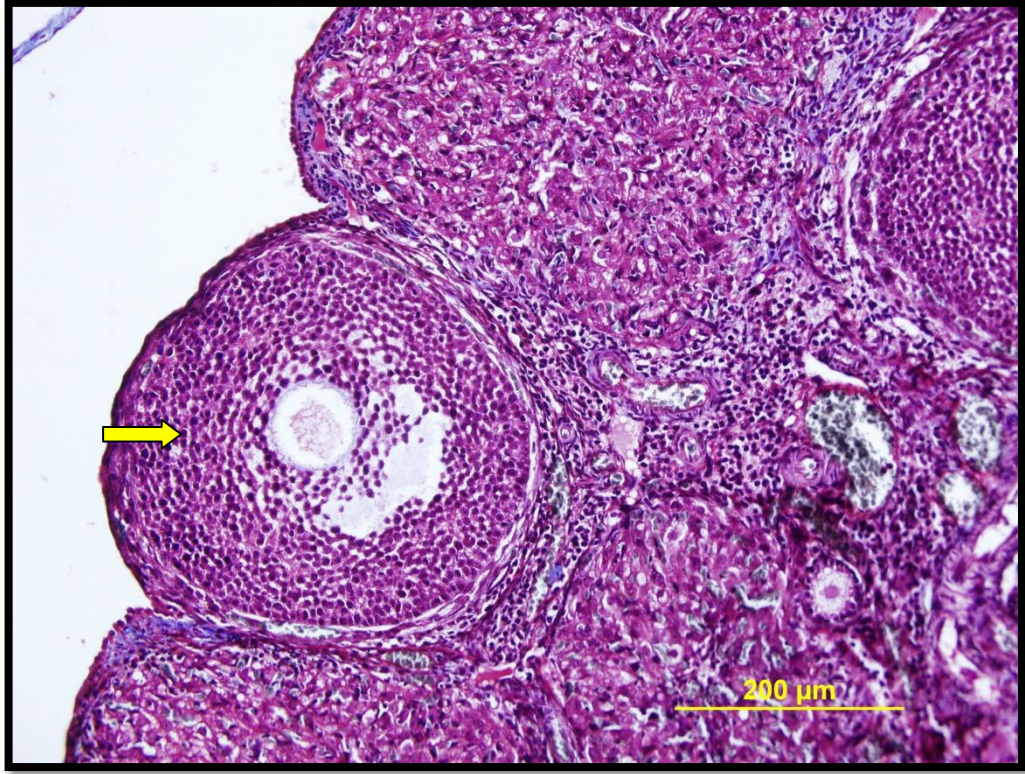
Masson's Trikrom boyaması yapıldığında bu gruba ait ovaryum kesitleri kontrol grubuna benzerlik gösterdi. Grup 1 ve 3'te görülen kortikal fibrosis Rosiglitazone grubunda yoktu (Şekil 26).



Şekil 24: Grup 2: Rosiglitazone deney grubu, H&E(sarı oklar: primer foliküller, mavi oklar: primordial foliküller, yıldız: korpus luteum).



Şekil 25: Grup 2: Rosiglitazone deney grubu ovarium kesiti, H&E (yeşil oklar: primer foliküller, sarı ok: sekonder folikül, mavi ok: primordial folikül).



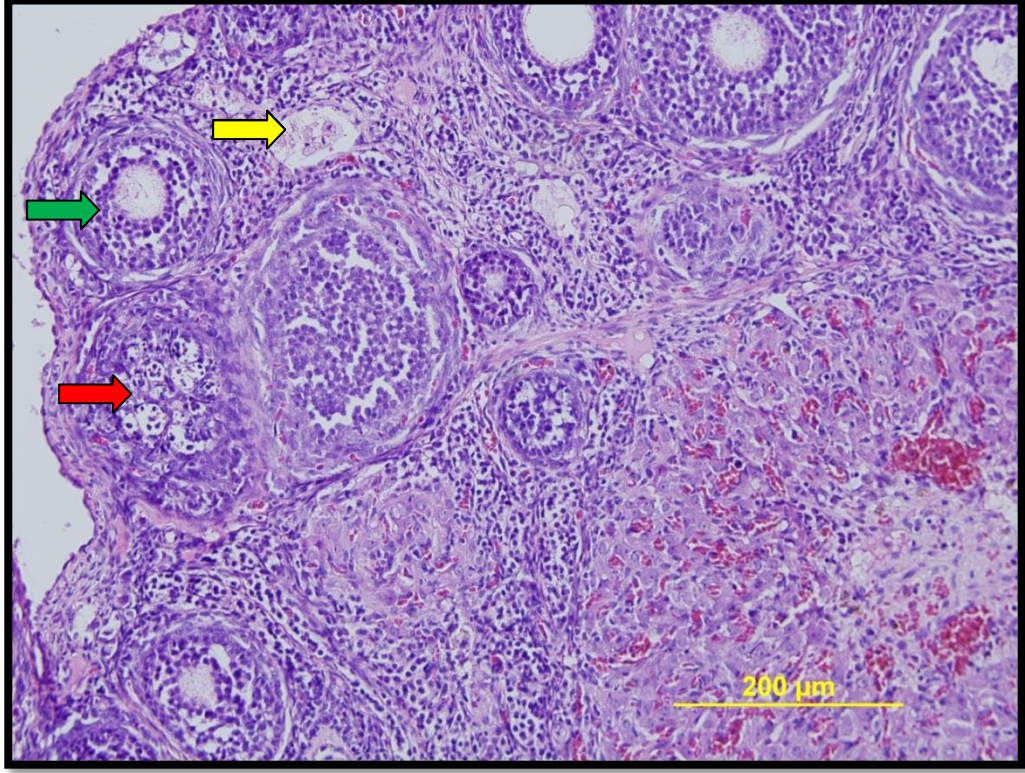
Şekil 26: Grup 2: Rosiglitazone deney grubuna ait ovaryum kesiti, Masson's Trikróm (sarı ok: sekonder folikül).

Grup 3: Kemoterapi+NaCl deney grubu ovaryum dokuları incelendiğinde ovaryum ince fibröz bağ dokudan oluşan bir kapsül ile çevrelenmişti. Dış kısmında germinal epitel kübik şekilli hücrelerden oluşmaktaydı. Germinal epitelin bazal membranı düzgün ve düzenli olarak gözlemlendi. Kortekste ovaryum dokusu içerisinde primordial folliküller, çeşitli çaplarda primer, sekonder ve tersiyer folliküller ile birlikte farklı miktarda korpus luteum yer almaktaydı (Şekil 27).

Grup 1: Kemoterapi grubuna benzer şekilde çoğu folikülde granuloza hücre tabakasında vakuolizasyona eşlik eden apoptoz görüldü. Gelişen foliküllerde folikül merkezinde granuloza hücre debrisisi görüldü (Şekil 27, Şekil 28).

Primordial folikül oositlerinde eozinofili artışı ve nuklear kromatinde kondensasyon görüldü. Atretik folikül oranı kontrol grubuna göre daha yoğun görülmekteydi.

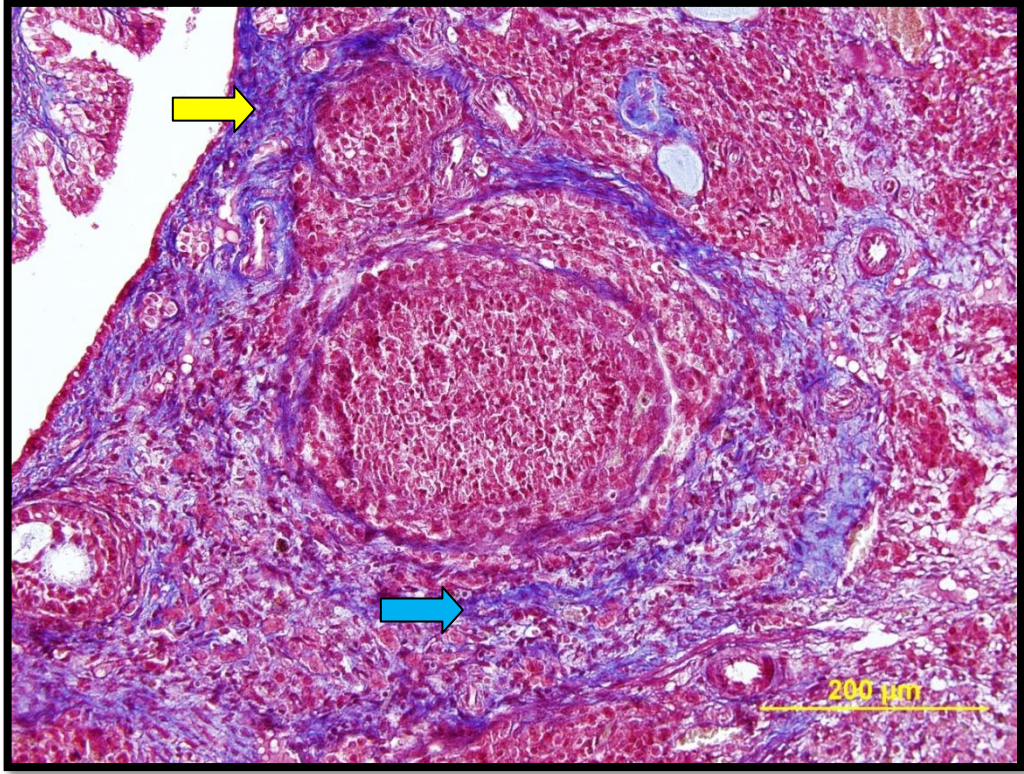
Masson' s Trikrom boyamalarında gelişen ve antral foliküller çevresinde kollajen fibrillerde artış, ovaryum korteksinde kortikal fibrosis görüldü (Şekil 29).



Şekil 27: Grup 3: Kemoterapi+NaCl grubu ovaryum kesiti, H&E (kırmızı ok: apoptoz ve vakuolizasyon, yeşil ok: sekonder folikül, sarı ok: atretik folikül).



Şekil 28: Grup 3: Kemoterapi+NaCl deney grubu ovaryum kesiti, H&E (kırmızı ok: granuloza hücre tabakasında vakuolizasyon ve apoptoz)



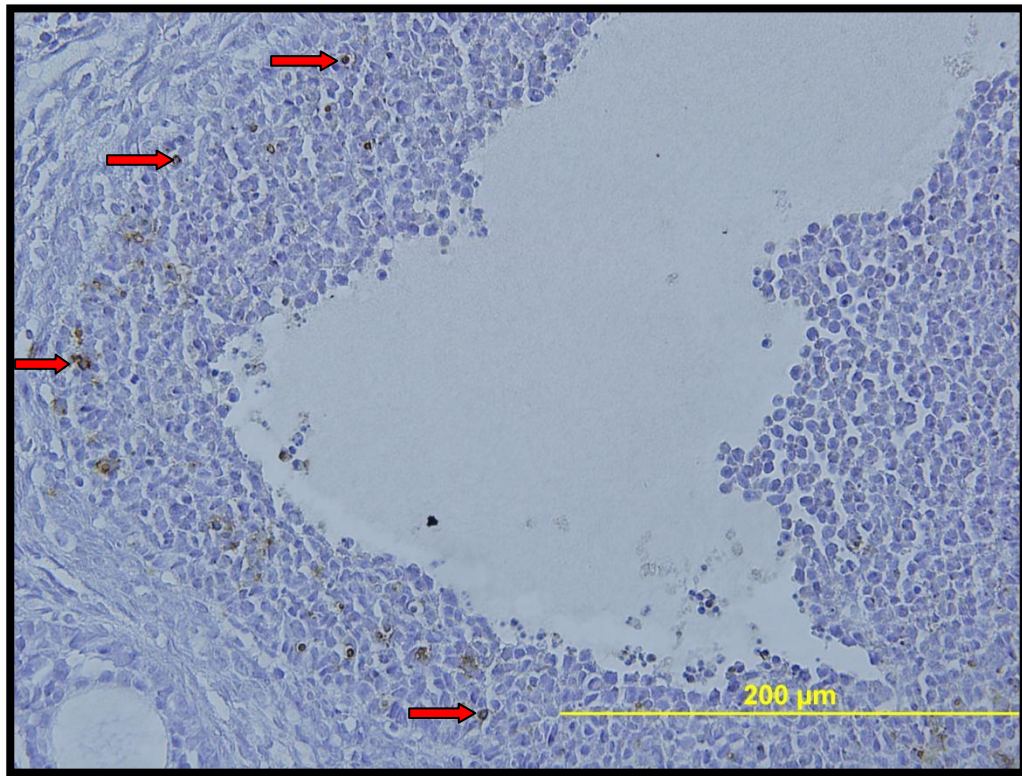
Şekil 29: Grup 3: Kemoterapi+NaCl deney grubu ovaryum kesiti, Masson's Trikrom (sarı ok: kortikal fibrosis, mavi ok folikül çevresinde kollajen artışı).

4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

Her deneğin ovaryum dokusundan alınan 5 µm'lik seri kesitlerden yirmi yedinci preparat bu prosedürle boyandı ve analiz edildi.

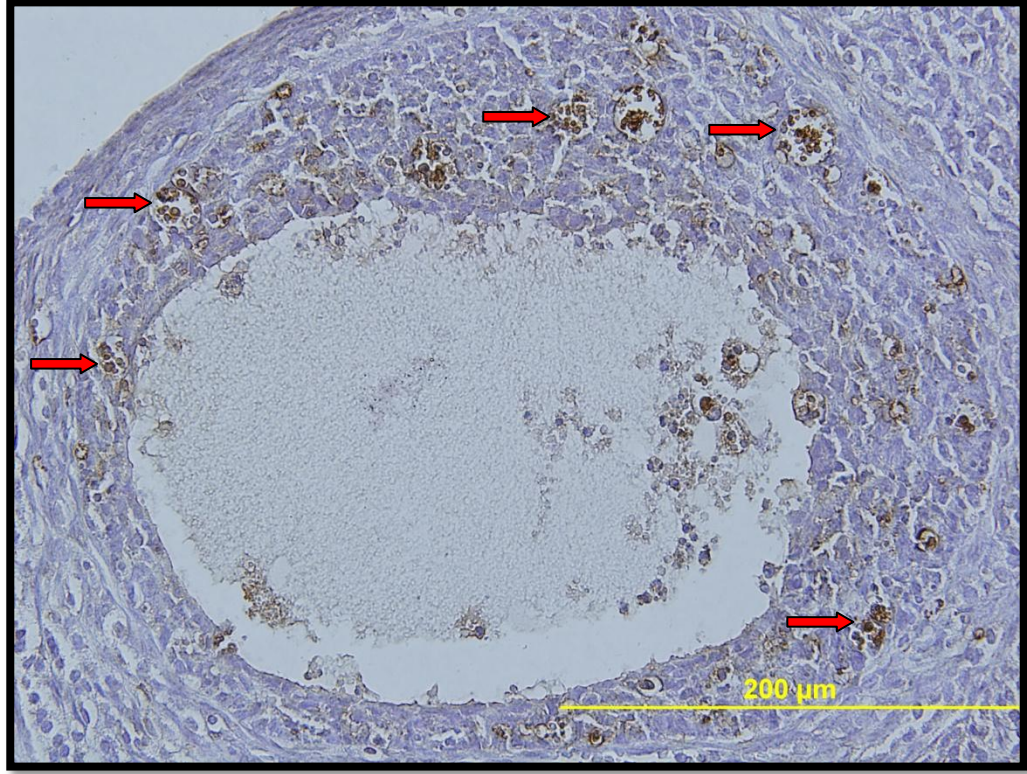
Her deneğe ait yirmi yedinci preparatta 40X büyütmede "hot spot" olarak tayin edilen, pozitif boyanmanın en yoğun olduğu alanlarda 1000 granuloza hücresi sayıldı ve pozitif hücre sayısı kaydedildi. Daha sonra bu veriler istatistiksel olarak değerlendirildi (Tablo 5, Tablo 6) (Şekil 33 Şekil 34). Veriler non-parametrik Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. Test sonucunda anlamlılık elde edildi ve gruplar arası farklılık non-parametrik Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi (P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş ve tablolarda koyu karakterlerle vurgulanmıştır).

Kontrol grubunda ovaryumun normal döngüsüne uygun şekilde atretik foliküller ve bu foliküllerde pozitif granuloza hücreleri gözlemlendi (Şekil 30).

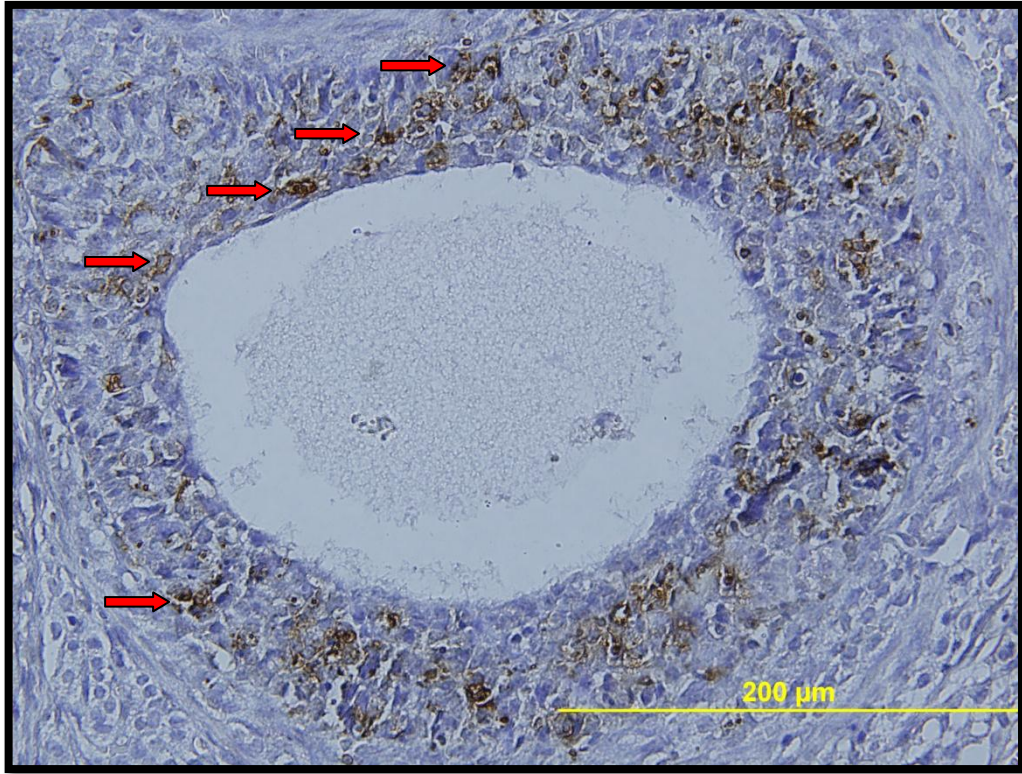


Şekil 30: Kontrol grubuna ait ovaryum dokusunda TUNEL pozitif hücreler (kırmızı oklar).

Grup 1: Kemoterapi ve Grup 3: Kemoterapi+NaCl grubunda kontrol grubuna göre daha yaygın apoptoz gözlemlendi. DNA fragmentasyonunun işaretlendiği analizde "hot spot" alanların çokluğu dikkat çekiciydi. Bu alanlarda yapılan sayımlarda kontrol grubundan daha fazla sayıda DNA fragmentasyonu olan hücre görüldü (Şekil 31, Şekil 32).



Şekil 31: Grup 1: Kemoterapi grubuna ait ovaryum dokusunda TUNEL pozitif hücreler (kırmızı oklar).

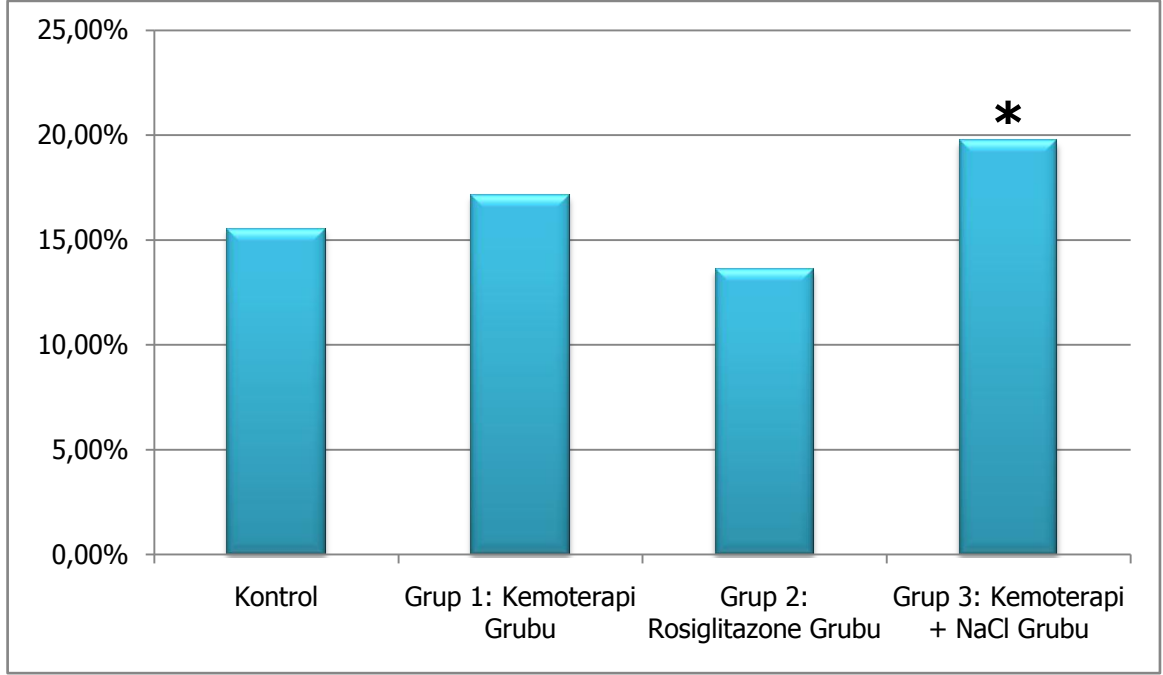


Şekil 32: Grup 3: Kemoterapi + NaCl grubuna ait ovaryum dokusunda TUNEL pozitif hücreler (kırmızı oklar).

Grup 2: Rosiglitazone grubunda kontrol grubuna benzer yoğunlukta "hot spot" alanlar görüldü. Bu alanlardaki pozitif hücre sayısının Grup 1 ve Grup 3' ten daha az olduğu gözlemlendi. (Şekil 33)

Tablo 5: TUNEL analizine göre gruplara ait tanımlayıcı istatistiksel bilgiler.

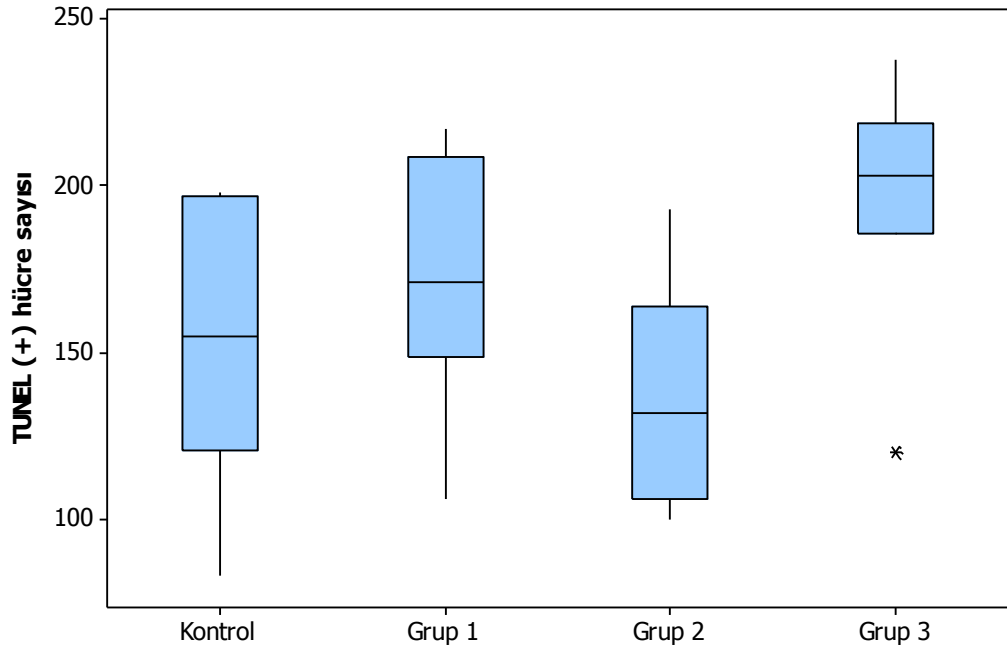
Gruplar	N	Ortalama	SE	Standart	Varyans	Minimum	Medyan	Maksimum
			Ortalama	Sapma		Değer		Değer
Kontrol	7	155,3	16,5	43,6	1902,9	83,0	155,0	198,0
G1	7	171,1	14,0	37,2	1380,8	106,0	171,0	217,0
G2	7	136,0	12,5	33,1	1096,3	100,0	132,0	193,0
G3	7	197,1	14,4	38,0	1441,8	120,0	203,0	238,0



Şekil 33: TUNEL pozitif boyanan hücrelerin gruplara göre yüzdesel dağılımı (*= Grup 2'ye göre istatistiksel anlamlılık gösterir).

Tablo 6: TUNEL pozitif boyanan hücre verilerinin gruplar arası istatistiksel farklılıkları (P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş ve koyu karakterlerle vurgulanmıştır.).

Gruplar	% TUNEL (+)	<i>P</i>
K	%15,53	
G1	%17,11	<i>>0,05</i>
K	%15,53	
G2	%13,60	<i>>0,05</i>
K	%15,53	
G3	%19,71	<i>>0,05</i>
G1	%17,11	
G2	%13,60	<i>>0,05</i>
G1	%17,11	
G3	%19,71	<i>>0,05</i>
G2	%13,60	
G3	%19,71	=0,0152



Şekil 34: TUNEL pozitif hücre sayısının gruplara göre dağılımına ait boxplot grafiği.

4.3. Folikül Sayılarının Değerlendirilmesi

Tüm foliküller için literatüre uyumlu olarak her deneğe ait seri kesitlerden sistematik bir biçimde seçilmiş 4 kesitte sayım yapıldı. Folikül sayıları önceden oluşturulmuş tabloya sayısal veriler olarak not edildi. Daha sonra bu veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. Kesitler üzerine grup isimleri yazılmadı, denekler karışık olarak numaralandırıldı. Sayımı yapan çalışmacı kesitlerin hangi gruba ait olduğunu bilmeden sayımı gerçekleştirdi (Tablo 7)

Tablo 7: Folikül sayısı değerlendirme tablosu.

Denek	Preperat			Folikül Sayısı
	11	Primordial Folikül		
		Primer Folikül	Unilaminar	
			Multilaminar	
		Sekonder Folikül		
		Tersiyer Folikül		
		Korpus Luteum		
	21	Primordial Folikül		
		Primer Folikül	Unilaminar	
			Multilaminar	
		Sekonder Folikül		
		Tersiyer Folikül		
		Korpus Luteum		
	31	Primordial Folikül		
		Primer Folikül	Unilaminar	
			Multilaminar	
		Sekonder Folikül		
		Tersiyer Folikül		
		Korpus Luteum		
	41	Primordial Folikül		
		Primer Folikül	Unilaminar	
			Multilaminar	
		Sekonder Folikül		
		Tersiyer Folikül		
		Korpus Luteum		

Foliküller literatürde sıklıkla değerlendirildiği gibi primordial, preantral ve antral olarak gruplandırıldı. Primordial foliküller oosit çevresinde tek sıra yassı foliküler hücreden oluşan foliküllerdir. Unilaminar primer ve multilaminar primer foliküller

preantral foliküller içerisinde sınıflandırıldı. Antrumu oluşmaya başlamış veya granuloza hücreleri arasında içi folikül sıvısı ile dolu boşluklar oluşturmaya başlamış foliküller; at nalı şeklinde düzenli antruma sahip sekonder foliküller ve olgun Graaf folikülleri de antral foliküller olarak sınıflandırıldı.

Primordial folikül sayıları non-parametrik Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi ($P=0,000$). Testin anlamlı çıkmasıyla gruplar arası fark Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi ($P<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş ve tablolarda koyu karakterlerle vurgulanmıştır).

Kontrol grubuyla Grup 1: Kemoterapi grubu arasında ($U=76,0$; $P=0,033$); Grup 2: Rosiglitazone grubu arasında ($U=71,0$; $P=0,02$) ve Grup 3: Kemoterapi + NaCl grubu arasında ($U=76,0$; $P=0,033$) oldukça anlamlı fark olduğu görüldü. Kemoterapi alan gruplar Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'de primordial folikül sayısı kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu. Grup 2: Rosiglitazone grubu ile Grup 1: Kemoterapi grubu arasında ($U = 71,0$; $P = 0,02$) ve Grup 3: Kemoterapi + NaCl grubu arasında ($U=73,0$; $P=0,01$) anlamlı fark bulundu. Tedavi grubu primordial folikül sayısı hasar gruplarından anlamlı oranda yüksekti. Grup 1: Kemoterapi grubu ve 3: Kemoterapi + NaCl grubu arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($U = 46,5$; $P > 0,05$) (Tablo 8, Tablo 9, Şekil 35).

Tablo 8: Grupların primordial folikül sayısı ortalamaları ve gruplar arasında istatistiksel farklar (P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş ve koyu karakterlerle vurgulanmıştır.)

Gruplar	Primordial Folikül # Ortalaması	Gruplar karşılaştırıldığında P değeri
Kontrol	89,14	
Grup 1	40,86	0,0033
Kontrol	89,14	
Grup 2	53,29	0,0212
Kontrol	89,14	
Grup 3	36,71	0,0033
Grup 1	40,86	
Grup 2	53,29	0,0210
Grup 1	40,86	
Grup 3	36,71	0,4808
Grup 2	53,29	
Grup 3	36,71	0,0103

Tablo 9: Primordial folikül sayılarına ait tanımlayıcı istatistik bilgileri.

Gruplar	N	Ortalama	SE Ortalama	Standart Sapma	Varyans	Minimum Değer	Medyan
Kontrol	7	89,1	14,0	37,1	44,0	81,0	162,0
G1	7	40,86	2,85	7,54	33,00	40,00	56,00
G2	7	53,29	4,63	12,24	41,00	50,00	71,00
G3	7	36,71	3,26	8,62	21,00	37,00	50,00

Preantral folikül sayıları non-parametrik Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi ($P=0,006$). Testin anlamlı çıkmasıyla gruplar arası farklar Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi.

Kontrol grubuna ait preantral folikül sayısı Grup 1: Kemoterapi grubuna ($U=68,5$; $P=0,0452$) ve Grup 3: Kemoterapi + NaCl grubuna ($U=75,0$; $P=0,0048$) göre anlamlı oranda yüksek görüldü. Kontrol grubu ile Grup 2: Rosiglitazone grubu preantral folikül sayısı arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($U=53,5$; $P=0,9488$). Grup 1: Kemoterapi grubu ile Grup 2: Rosiglitazone grubu ($U=42,5$; $P=0,22$) ve Grup 3: Kemoterapi + NaCl grubu ($U=66,5$; $P=0,08$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Grup 1: Kemoterapi grubunda preantral folikül sayısı Grup 2: Rosiglitazone grubuna göre daha az sayıda iken bu fark istatistiksel olarak bir anlamlılık göstermemekteydi. Grup 2: Rosiglitazone grubu; Grup 3: Kemoterapi + NaCl grubu'ndan anlamlı oranda daha fazla preantral foliküle sahipti ($U=73,0$; $P=0,01$) (Tablo 10, Şekil 35).

Tablo 10: Grupların preantral folikül sayısı ortalamaları ve gruplar arasında istatistiksel farklar ($P<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş ve koyu karakterlerle vurgulanmıştır.).

Gruplar	Preantral Folikül # Ortalaması	Gruplar karşılaştırıldığında P değeri
Kontrol	14,57	
Grup 1	10,29	0,0452
Kontrol	14,57	
Grup 2	14,43	0,9488
Kontrol	14,57	
Grup 3	7,57	0,0048
Grup 1	10,29	
Grup 2	14,43	0,2202
Grup 1	10,29	
Grup 3	7,57	0,0811
Grup 2	14,43	
Grup 3	7,57	0,0103

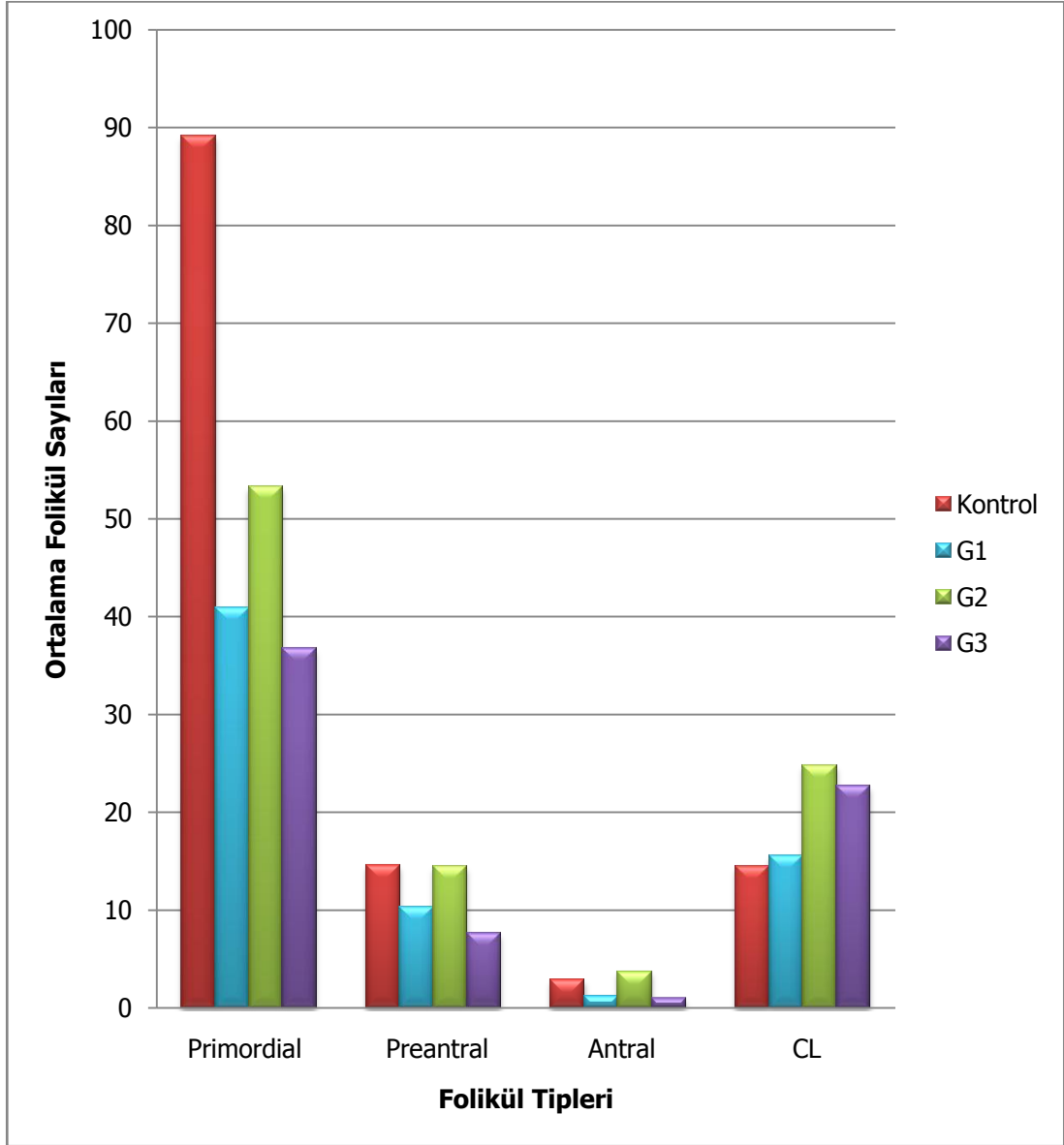
Antral folikül sayıları non-parametrik Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi ($P=0,034$). Testin anlamlı çıkması ile gruplar arası fark non-parametrik Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi.

Kontrol grubuna ait antral folikül sayısı Grup 1: Kemoterapi grubuna ($U=68,0$; $P=0,0479$) ve Grup 3: Kemoterapi + NaCl grubuna ($U=70,0$; $P=0,027$) göre anlamlı oranda yüksek görüldü. Kontrol grubu ile Grup 2: Rosiglitazone grubu antral folikül sayısı arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($U=46,0$; $P=0,4335$). Grup 1: Kemoterapi grubu ile Grup 2: Rosiglitazone grubu ($U=39,0$; $P=0,0897$) ve Grup 3: Kemoterapi + NaCl grubu ($U=56,5$; $P=0,6334$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Grup 1: Kemoterapi grubunda antral folikül sayısı Grup 2: Rosiglitazone grubuna göre daha az sayıda iken bu fark istatistiksel olarak bir anlamlılık göstermemekteydi. Grup 2: Rosiglitazone grubu; Grup 3: Kemoterapi + NaCl grubu'ndan fazla oranda antral foliküle sahipti ve bu fazlalık istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ($U=68,0$; $P=0,502$) (Tablo 11, Şekil 35).

Tablo 11: Grupların antral folikül sayısı ortalamaları ve gruplar arasında istatistiksel farklar ($P<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş ve koyu karakterlerle vurgulanmıştır.).

Gruplar	Antral Folikül # Ortalaması	Gruplar karşılaştırıldığında P değeri
Kontrol	2,86	
Grup 1	1,29	0,0479
Kontrol	2,86	
Grup 2	3,71	0,4335
Kontrol	2,86	
Grup 3	1	0,0270
Grup 1	1,29	
Grup 2	3,71	0,0897
Grup 1	1,29	
Grup 3	1	0,6334
Grup 2	3,71	
Grup 3	1	0,05

Korpora lutea sayıları non-parametrik Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi ($P=0,309$). Test sonucunda anlamlı bir sonuç elde edilemediği için gruplar arası farklılık değerlendirilmedi (Şekil 35).



Şekil 35: Gruplara göre folikül sayıları dağılımı.

5. TARTIŞMA

Genç hastalarda malign hastalıkların tedavi edilebilmesiyle yaşam süresi uzamıştır. Erişkin nüfusun yaklaşık 1/1000'ini çocukluk çağında malign hastalıklar nedeniyle tedavi alanlar oluşturmaktadır. Gelişen tedavi yöntemleri hastaların yaşam kalitelerini de arttırarak hastalıktan kurtulmalarını sağlamaktadır.

Sağ kalım oranlarının artması kanser tedavisi sonrasında fertilitenin korunması beklentisini getirmiştir (Revel ve Laufer). Kadın üreme sistemini kanser tedavilerinden korumak veya tedavi sonrası reproduktif yaşamın devam edebilmesi için deneysel veya klinik pek çok çalışma yapılmıştır.

Kemoterapötik ajanlar ve radyoterapi hücrede DNA ve protein yapılar üzerinde toksik etkiler gösterir. Kemoterapötiklerin metabolizması sonucu açığa çıkan moleküller karaciğerde antioksidan sistemlere zarar verir (Kaya, Oral ve Tahan). Antioksidanların kullanıldığı çalışmalarda antioksidan ajan kullanımının overlerdeki serbest oksijen radikali oluşumunu azalttığı, bunun da kemoterapi ve radyoterapi hasarından koruyucu olduğu gösterilmiştir. Biz de çalışmamızda benzer olarak siklofosfamidin ovaryumda DNA kırıklarına neden olduğunu ve granuloza hücrelerinde apoptozu indüklediğini gördük.

Bugüne kadar kanser tedavilerinin kadın üreme sistemi üzerine olan etkilerinin önlenmesi ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Son yıllarda radyoterapi ve kemoterapinin over üzerine olan etkisinde apoptotik mekanizmaların gösterilmesi ile dikkatler apoptoz önleyici yöntemlere çevrilmiştir.

Apoptozda pek çok genetik faktörün rol oynadığının gösterilmesi genetik düzenlemelerin apoptozu önleyebileceğini düşündürmüştür. Genetik faktörlerin değiştirilerek doğal menopozun geciktirilebilmesi ve radyoterapi ve kemoterapinin neden olduğu prematür menopozun önlenebileceği deneysel çalışmalarla gösterilmeye çalışılmıştır (Morita, Perez ve Maravei). Bax geninin artmış ekspresyonunun insan ve sıçan overinde granuloza hücrelerinde apoptozu arttırdığı gösterilmiştir (Tilly, Tilly ve Kenton) (Kugu, Ratts ve Piquette). Farelerde bax geni hasarlanmış mutantlarda spontan primordial ve primer foliküllerde hasarın önlendiği,

Bcl-2 geni eksik mutant farelerde ise follikül havuzunda daha az sayıda follikül olduğu gösterilmiştir (Knudson, Tung ve Tourtellotte) (Perez, Robles ve Knudson) (Ratts, Flaws ve Kolp). Bax geni hasarlı farelerde doxurobisinin in vivo ve in vitro ortamda neden olduğu apoptozun önlendiği gösterilmiştir (Perez, Knudson ve Leykin). Genetik değişikliklerle apoptoza karşı koruma sağlandığı in vivo ve in vitro hayvan çalışmalarında gösterilmiş olsa da insanda genetik tedaviyi sağlayacak teknoloji henüz yeterli değildir.

Over dokusunu kanser kemoterapisinin neden olduğu hasardan koruyan antioksidanlardan olan glutatyon ile yapılan çalışmada siklofosfamid ile tedavi edilen farelere glutatyon sentezini inhibe eden bütionin sülfoksimin (BSO) verildiğinde, siklofosfamidin neden olduğu apoptozisin daha fazla olduğu görülmüştür. Özellikle antral folliküllerde BSO verilmesinin apoptozu histolojik olarak arttırdığı fakat TUNEL yöntemi ile bu artışın olmadığı gösterilmiştir. Primer folliküllerde ise bu değişiklik izlenmemektedir. Siklofosfamid ile birlikte BSO kullanılan farelerde over dokusunda glutatyon düzeyleri sadece siklofosfamid verilen gruba göre azalmaktadır. Glutatyon seviyesinin azalması apoptoz oranını arttırıyor gibi görünmektedir (Lopez ve Luderer). Biz de çalışmamızda histolojik olarak yoğun ve yaygın apoptoz olduğunu gözlemledik. TUNEL analizi ise Lopez ve arkadaşlarının çalışmasına benzer bir paralellik gösterdi. TUNEL pozitif hücre yoğunluğu histolojik olarak apoptotik görüntü sergileyen hücre yoğunluğundan daha azdı.

Kaya ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Wistar suşu 100-160 g ağırlığındaki sıçanlara 100 mg/kg dozunda siklofosfamid intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Çalışmacılar TUNEL kiti ile DNA fragmantasyonunu, kaspaz-3 proteinin immunohistokimyasal olarak işaretlenmesi ile de apoptozu göstermişlerdir. Özellikle antral foliküllerde kaspaz-3 ve TUNEL pozitif hücrelerin istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığını rapor etmişlerdir. Çalışmada kullandıkları Sfingozin-1-fosfat'ın ise kemoterapisinin neden olduğu apoptozu azalttığını göstermişlerdir. (Kaya, Desdicioğlu ve Sezik) Biz de çalışmamızda TUNEL pozitif hücre sayısının Grup 2 ve 3 arasında anlamlı olarak farklı olduğunu gözlemledik. Çalışmamızda kemoterapi uygulanan grup

1 ve 3 kontrol grubuna göre TUNEL pozitif hücre sayısında artış gösterirken bu artış istatistiksel olarak bir anlamlılık taşııyordu.

Lemos ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Wistar suşu 60 günlük sıçanlara 6 mg/kg dozunda siklofosfamid intraperitoneal olarak 5 gün enjeksiyon ve 2 gün dinlenme olmak üzere 7 günlük siklus halinde 3 defa uygulanmıştır. Çalışmada siklofosfamidin üreme üzerindeki negatif etkilerini engelleyeceği düşünölen GnRH antagonisti tedavi grubuna ait deneklere siklofosfamid uygulanmadan 1 saat önce uygulanmıştır. Çalışma sonunda deneklerin ovaryumlarından seri kesitler alınmış ve 200 µm uzaklıkta 4 preperatta foliköl sayımı yapılmıştır. Çalışma sonucunda siklofosfamid uygulamasının preperat başına düşen primordial foliköl sayısını azalttığı ancak bunun istatistiksel bir anlamlılık taşımadığı gösterilmiştir (Lemos, Reis ve Pena). Biz de çalışmamızda Lemos ve arkadaşlarına paralel olarak siklofosfamidin primordial foliköl sayısını azalttığını gözlemledik. Ancak bizim çalışmamızda siklofosfamidin etkilerini azaltıcı olarak seçtiğimiz ajan Rosiglitazone sadece siklofosfamid uygulanan gruplara göre pimordial foliköl sayısını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde korumuştur.

Meirow ve arkadaşları yaptıkları çalışmada inbred Balb/c genç ergin farelere tek doz halinde intraperitoneal enjeksiyon ile 20, 50, 75 ve 100 mg/kg dozunda siklofosfamid uygulamıştır. Uygulamadan 7 gün sonra denekleri sakrifiye etmiş ve 75 mg/kg dozundaki siklofosfamidin ovarian primordial foliköl rezervini %54 oranında düşürdüğünü rapor etmişlerdir. Ancak uygulanan dozların reproduktif performansı etkilemediğini, siklofosfamidin neden olduğu ovulasyon engelleyici etkinin kısa sürede yok olduğunu ve ovulasyonun gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir. Uygulamanın gebelik, ovulasyon ve çiftleşme üzerinde anlamlı bir etkisi bulunmazken primordial foliköl rezervini azalttığı için erken menapoza neden olduğunu rapor etmiş; siklofosfamid tedavisi gören çiftlerde düzenli ovulasyonun yanıtıcı olabileceğini ve bu çiftlerin çocuk sahibi olma planlarını ertelememesi gerektiğini vurgulamışlardır (Meirow, Lewis ve Nugent). Biz de çalışmamızda ratlarda kontrol grubuna ait foliköl sayısı %100 kabul edildiği takdirde 100 mg/kg dozundaki siklofosfamidin ovarian rezervi %55 ila %59 oranında azaltabileceğini ancak Rosiglitazone'un bu oranı %41'e

düşürebileceğini gözlemledik. Çalışmamızda ayrıca Rosiglitazone'un siklofosfamidin preantral ve antral foliküller üzerindeki dejenere edici etkisini azalttığını da gözlemledik.

Tiazolidinedionların antifibrotik olarak etkilerinin olduğunu gösteren in vitro çalışmaların ardından in vivo çalışmalarla da karaciğer hasarında onarıcı etkileri gösterilmiştir. Galli ve arkadaşları, gerek CCl4 verilerek gerekse de safra kanalı bağlanarak oluşturulan deneysel hepatik fibrozis modelinde, hem rosiglitazone hem de pioglitazonun fibrotik doku birikimini ve fibrogenik hücrelerin proliferasyonunu engellediğini göstermiştir (Galli, Crabb ve Ceni). Biz de çalışmamızda ovaryum dokusunda siklofosfamide bağlı olarak kortikal fibrosis ve foliküller çevresinde bağ doku artışı geliştiğini gözlemledik. Rosiglitazone' un histolojik boyamalarla ovaryum dokusunda siklofosfamide bağlı olarak ortaya çıkan kortikal fibrosisde ve bağ doku artışında engelleyici etkisi olduğunu gördük.

Aksakal ve arkadaşları sıçan uterin boynuz adhezyonu modelinde melatonin ve rosiglitazone' un adhezyon oluşumuna karşı koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Çalışmalarında Wistar suşuna ait albino sıçanlar kullanılmıştır. Rosiglitazone sıçanlara 1 mg/kg dozunda 15 gün süresince verilmiştir. Çalışma sonucunda melatoninin adhezyon oluşumunu engelleyici bir etkisi bulunmazken 1 mg/kg dozundaki rosiglitazone' un bu hayvan modelinde adhezyonu önleyici olduğunu rapor etmişlerdir (Aksakal, Yılmaz ve Güngör). Biz de çalışmamızda kemoterapiden 3 gün önce başlayarak kemoterapinin ardından on beş gün süreyle devam eden Rosiglitazone uygulamasının ovaryum dokusunda kemoterapiye bağlı bağ doku artışını engellediğini ve apoptozu azalttığını gözlemledik.

Minge ve arkadaşları C57BL/6 fareler üzerine yaptıkları çalışmada fareleri öncelikle yüksek yağ içeren diyet ile besleyerek kilo almalarını sağlamıştır. Bu çalışmada obezitenin neden olduğu fertilité kaybı ve oosit kalitesindeki düşüş modellenmek istenmiştir. Yüksek yağ içeren diyet ile obezite ve insülin direnci yaratılan farelere çiftleşmeden 4 gün önce başlayarak çiftleşme gününe dek farklı insüline karşı duyarlaştırıcı ilaçlar uygulanmıştır. Bu ilaçlar arasında rosiglitazone da

bulunmaktadır. Çalışmada uygulanacak rosiglitazone dozu 10 mg/kg/gün olarak seçilmiştir. Çiftleşmeden sonra sıçanlardan zigotlar toplanmış ve in vitro ortamda gelişimleri analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda rosiglitazone'un istatistiksel olarak anlamlı oranda karaciğer çevresindeki yağ dokuyu azalttığı ve burada biriken yağ dokuyu kaybettirdiği için anlamlı bir şekilde kilo kaybına neden olduğu görülmüştür. Sakrifikasyon sonrası toplanan kanda lipit, glikoz ve insülin oranları analiz edilmiştir. Rosiglitazone grubunda kandaki serbest yağ asitlerinin ve kan glikozunun ve insulinin anlamlı şekilde düştüğü gözlenmiştir. Yine rosiglitazone grubunda rosiglitazone grubunun diğer gruplara göre hepatik radikal temizleyici Cd36 mRNA' nın ekspresyonunu arttırdığı, hepatik intraselüler transporter Fabp4' ün transkripsiyonunu arttırdığı görülmüştür. Rosiglitazone grubuna dahil deneklerin 4-8 hücreli, morula/kompakt morula ve gelişen blastosist embriyo sayıları diğer gruplardan anlamlı oranda yüksek olduğu ve yüksek yağ içeren diyetle beslenmeyen gruba yakın sonuçlar verdiği rapor edilmiştir (Minge, Bennett ve Norman RJ). Biz de çalışmamızda Rosiglitazone uygulanan deney grubunda kemoterapinin neden olduğu folikül atrezisindeki artışı ve apoptozu azalttığını gözlemledik.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Siklofosfamid birçok solid tümörde tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Ergenlik öncesi ve ergenlik döneminde kanser tanısı nedeniyle kemoterapi gören kadınlarda kemoterapötik ajanların ovaryumda geri dönüşümsüz etkilere neden olduğu bilinmektedir. Bu etkileri azaltabilmek ve tedavi sonrası fertilitiyi koruyabilmek için birçok çalışma yapılmaktadır. Kanser tedavisindeki gelişmeler ve sağ kalım oranı arttıkça bu çalışmaların sonuçları da oldukça önem kazanmaktadır.

Deneyimizde ilk olarak siklofosfamidin ovaryum üzerindeki olumsuz ve dejeneratif etkilerini ortaya çıkarmayı amaçladık. Bu amaçla kemoterapi uyguladığımız deneklerden alınan ovaryum dokusu Hematoksilen-Eozin, Masson's trikrom histolojik boyamalarıyla morfolojik olarak değerlendirildi. DNA fragmentasyonunun değerlendirilmesi amacıyla TUNEL işaretleme yapıldı. Değerlendirmeler sonucunda siklofosfamid ile kemoterapi uygulanan deneklerde ovaryum dokusunda özellikle gelişmekte olan ve olgun foliküllerde ve korpora luteada yoğun apoptoz; kortekste fibrosis; korpora lutea ve olgun foliküllerin çevresinde de bağ doku fibrillerinde artış görüldü.

Çalışmamızda Rosiglitazone'un siklofosfamidin ovaryum üzerindeki geri dönüşümsüz etkilerini engelleyici, ovaryum fizyolojisini, fonksiyonunu ve üretkenliğini koruyucu özelliği olup olmadığını ortaya çıkarmayı amaçladık.

Rosiglitazone uygulanan deney grubunda ovaryum dokusunda yine kemoterapiye bağlı olarak gelişen ve olgun foliküllerde, korpora luteada apoptoz görülürken bu gruptaki apoptoz oranı Rosiglitazone uygulanmayan gruptan daha az orandaydı. Rosiglitazone grubunda ovaryum dokusunda kortekste anormal bir bağ dokusu artışına ve fibrosise rastlanmadı. TUNEL analizinde; TUNEL pozitif hücre sayısı diğer gruptan daha az sayıdaydı.

Rosiglitazone'un antiinflamatuvar, immun baskılayıcı, ve antioksidan etkileri literatürde yer bulurken ilk olarak bizim çalışmamızda bu etkileri kemoterapi hasarına karşı çalışılmıştır.

Çalışmamızda Rosiglitazone'un siklofosfamidin neden olduğu foliküler hücre apoptozunu, kortikal fibrosisi ve foliküller çevresindeki bağ doku artışını azaltıcı etkisi ortaya koyulmuştur.

Bunlara ek olarak çalışmamızda siklofosfamidin ovarial primordial folikül rezervi üzerinde geri dönüşümsüz etkileri olduğunu ve primordial folikül sayısını önemli oranda düşürdüğünü ortaya koyduk. Rosiglitazone'un siklofosfamidin primordial folikül sayısını azaltıcı etkisini azalttığını ve belli ölçüde engellediğini gösterdik. Siklofosfamidin preantral ve antral folikül sayılarını azalttığını ve Rosiglitazone'un bu etkiyi istatistiksel olarak anlamlı oranda indirgediğini ortaya koyduk. Rosiglitazone'un siklofosfamidin ovarial foliküller üzerindeki bu geri dönüşümsüz ve dejeneratif etkisi karşısındaki etkinliği ilk kez bizim çalışmamızda ortaya koyulmuştur.

Gelecek çalışmalarda Siklofosfamid hasarına karşı farklı Rosiglitazone dozları denenmesi ve etkinliği en yüksek dozun belirlenmesi gerekmektedir. Bunlara ek olarak Rosiglitazone'un kemoterapi hasarından koruyucu mekanizması moleküler çalışmalarla anlaşılmalıdır. Çalışmamızın bu alanda daha sonraki çalışmalara ışık tutacağını düşünüyoruz.

7. KAYNAKLAR

<<http://herkules.oulu.fi/isbn951426844X/html/i231654.html>>,05 Nisan 2011.

Aksakal, Orhan, et al. «A randomised controlled trial on melatonin and rosiglitazone for prevention of adhesion formation in a rat uterine horn model.» Arch Gynecol Obstet (2009): 1240-8.

Ameisen, J S. «The origin of programmed cell death.» Science 272 (1996): 1278.

Ayhancı, A. «Siklofosfamid sitotoksitesinin çinko ile etkilesimi.» Doktora Tezi, Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (1997).

Balakumran, A, GA Champbell ve MT Maslen. «Calcium channel blockers induce thymic apoptosis in vivo rats.» Toxicol Appl Pharmacol 139 (1996): 122-127.

Bank, Gene Set. 10 Nisan 2011
<<http://dna.brc.riken.jp/en/GENESETBANK/index.html>>.

Barisic, K, J Petrik ve L Rumora. «Biochemistry of apoptotic cell death.» Acta Pharm. 53 (2003): 151-164.

Brouckaert, G, et al. «Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production.» Molecular Biology of the Cell 15 (2004): 1089-1100.

Carolyn, M, et al. «Expression and Localization of PPARs in the Rat Ovary During Follicular Development and the Perioovulatory Period.» Endocrinology 142 (11) (2001): 4831–4838.

Chun, SY, et al. «Interleukin-1 β supresses apoptosis in rat ovarian follicles by increasing nitric oxide production.» Endocrinology 136 (1995): 3120-3127.

Cohen, JJ. «Apoptosis.» Immunol Today 14 (1993): 126-130.

Demirturk, F. «The effect of rosiglitazone in the prevention of intra-abdominal adhesion formation in a rat uterine horn model.» Human Reproduction 21 (11) (2006): 3008–3013.

Desmeules, Patrice ve Patrick J. Devine. «Ovarian toxicity of CPA metabolites in vitro.» ToxSci Advance Access (2005).

Donepudi, M ve MG Grutter. «Structure and zymogen activation of caspases.» Biophysical Chemistry 101 (2002): 145-153.

Donoghue, S, et al. «Immunohistochemical localization of caspase-3 correlates with clinical outcome in B-cell diffuse large-cell lymphoma.» Cancer Research 59 (1999): 5386-5391.

Elmore, S. «Apoptosis: A review of programmed cell death.» Toxicol Pathol 35 (4) (2007): 495-516.

Galli, A, et al. «Antidiabetic thiazolidinediones inhibit collagen synthesis and hepatic stellate cell activation in vivo and in vitro.» Gastroenterology 122(7) (2002): 1924-40.

Hengartner, MO. «The Biochemistry of Apoptosis.» Nature (2000): 407.

Junqueira, LC ve J Carneiro. Temel Histoloji. Çev. Y Aytokinoğlu ve S Solakoğlu. 10. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2006.

Kaipia, A ve JWH Aaron. «Regulation of ovarian follicle atresia.» Annu. Rev. Physiol. 59 (1997): 349-363.

Kaya, H, et al. «The effect of melatonin application on lipid peroxidation during cyclophosphamide therapy in female rats.» (tarih yok).

Kaya, Hakan, et al. «Does Sphingosine-1-phosphate have protective effect on cyclophosphamide- and irradiation-induced ovarian damage in the rat model?» Fertility and Sterility 89 (2008): 732-5.

Kerr, JFR, AH Wyllie ve AR Currie. «Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics.» Br J Cancer 26 (1972): 239-245.

Kierszenbaum, AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş. Çev. R Demir. Ankara: Palme Yayıncılık, 2006.

Kiess, W ve B Gallaher. «Hormonal control of programmed cell death apoptosis.» Eur J Endocrine 18 (1998): 482-491.

Knudson, CM, et al. «Bax deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death.» Science 270(5233) (1995): 96-9.

Kugu, K, et al. «Analysis of apoptosis and expression of bcl-2 gene family members in the human and baboon ovary.» Cell Death Differ. 5(1) (1998): 67-76.

KUMAR, VINAY, ABUL K. ABBAS ve NELSON FAUSTO. ROBBINS AND COTRAN PATHOLOGIC BASIS OF DISEASE. 7. Baskı. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005.

Lopez, SG ve U Luderer. «Effects of cyclophosphamide and buthionine sulfoximine on ovarian glutathione and apoptosis.» Free Radic Biol Med 36 (2004): 13766-77.

Lopez, SG ve U. Luderer. «Effects of cyclophosphamide and buthionine sulfoximine on ovarian glutathione and apoptosis.» Free Radic Biol Med. 36(11) (2004): 1366-77.

Lu, J, et al. «Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis.» Spine 25 (2000): 1859-1866.

Majno, G ve I Joris. «Apoptosis, oncosis and necrosis: An overview of cell death.» Am J Pathol 146 (1995): 3-15.

Meirow, D. «Ovarian injury and modern options to preserve fertility in female cancer patients treated with high dose radiochemotherapy for hemato-oncological neoplasias and other cancers.» Leuk Lymphoma 33 (1999): 65-76.

Meirow, D, et al. «Subclinical depletion of primordial follicular reserve in mice treated with cyclophosphamide: clinical importance and proposed accurate investigative tool.» Human Reproduction 7.14 (1999): 1903-1907.

Minge, CE, BD Bennett ve Robker RL Norman RJ. «Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Agonist Rosiglitazone Reverses the Adverse Effects of Diet-Induced Obesity on Oocyte Quality.» Endocrinology 149(5) (2008): 2646-2656.

Minge, CE, RL Robker ve RJ Norman. «PPAR Gamma: Coordinating Metabolic and Immune Contributions to Female Fertility.» Hindawi Publishing Corporation PPAR Research (2008): 1-19.

Moore, K ve TVN Persaud. Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi. Çev. EMİN ÖZTAŞ ve HAKKI DALÇIK. 6. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002.

Morita, Y, et al. «Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy.» Nat.Med. 6 (2000): 1109-1114.

Morita Y, Perez GI, Maravei DV, Tilly KI, Tilly JL. «Targeted expression of Bcl-2 in mouse oocytes inhibits ovarian follicle atresia and prevents spontaneous and chemotherapy-induced oocyte apoptosis in vitro.» Mol Endocrinol. 13(6) (1999): 841-50.

Mountz, JD ve T Zhou. «Apoptosis and autoimmunity.» Kopman, WJ. A Textbook of Rheumatology: Arthritis and allied conditions. Lippincott-William&Wilkins, 2001.

Ovalle, WK ve PC Nahirney. Netter Temel Histoloji. Çev. S Noyan. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 2009.

Ow, YP, et al. «Cytochrome c: functions beyond respiration.» Nature Reviews Molecular Cell Biology Vol 9 (2008): 532-542.

Öktem, S, MH Özlem ve D Özdol. «Apoptozisin önemi.» Toraks Dergisi 2.1 (2001): 91-95.

Perez, GI, et al. «Apoptosis associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction.» Nat Med. 3(11) (1997): 1228-32.

Perez GI, Robles R, Knudson CM, Flaws JA, Korsmeyer SJ, Tilly JL. «Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax deficiency.» Nat Genet. 21(2) (1999): 200-3.

Ratts, VS, et al. «Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad.» Endocrinology. 136(8) (1995): 3665-8.

Revel, A ve N Laufer. «Protecting female fertility from cancer therapy.» Mol. and Cell. Endocr. 187 (2002): 83-91.

Ross, MH ve W Pawlina. Histology a Text and Atlas Correlated Cell and Molecular Biology. 5 Basım. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

Sadler, T.W. Langman's Medikal Embriyoloji. Çev. Can Başaklar. 6. Basım. Ankara: Palme Yayıncılık, 1993.

Sheikh, MS ve Aj-Jr Fornace. «Role of p53 family members in apoptosis.» J Cell Physiol 182 (2000): 171-181.

Solakoğlu, Z. «Apoptoz Varlığı ya da Yokluğu Bir Hastalık Nedeni.» Klinik Gelişim 22.3 (2009): 20-25.

Sonmezer, M ve K Oktay. «Fertility preservation in female patients.» Hum Reprod Update 10 (2004): 251-266.

Şeftalioğlu, A. Genel İnsan Embriyolojisi. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi, 1991.

Tack, CJ ve P Smits. «Thiazolidinedione derivatives in type 2 diabetes mellitus.» Neth J Med 64 (6) (2006): 166-74.

Thompson, C. B. «Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.» Science 267 (1995): 456-1462.

Tilly, JL. «Apoptosis and ovarian function.» Reviews of Reproduction 1 (1996): 162-172.

Tilly, JL, et al. «Expression of members of the bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-xlong messenger ribonucleic acid levels.» Endocrinology 136(1) (1995): 232-41.

Tomatır, AG. «Apoptoz; programlı hücre ölümü.» T. Klin. J. Med. Sci. 23 (2003): 499-508.

Ulukaya, E. «Apoptozis Ders Notları.» 11 4 2003. 19 8 2010
<http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf>.

Vaskivuo, T. Regulation of apoptosis in the female reproductive system. 2002. 2011
<<http://herkules.oulu.fi/isbn9514266676/html/i267988.html>>.

Walker, PR, J Leblanc ve M Sikorska. «evidence that DNA fragmentation in apoptosis is initiated and propagated by single-strand breaks.» Cell Death and Differentiation 4 (1997): 506-515.

Wijsman, JH, et al. «A new method to detect apoptosis in paraffin sections; in situ end-labeling of fragmented DNA.» The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 41 (1) (1993): 7-12.

Willingham, MC. «Cytochemical methods for the detection of apoptosis.» The Journal of Histochemistry & Cytochemistry 47 (9) (1999): 1101-1109.

Willis, DS, et al. «Effect of 15-deoxy- γ (12,14)- prostaglandin J₂ (PGJ₂) a peroxisome proliferator activating receptor γ (PPAR γ) ligand on human ovarian steroidogenesis.» Program of the 81st Annual Meeting of The Endocrine Society. San Diego, CA, 1999.

Wyllie, AH. «Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation.» Nature 284 (1980): 555-556.

Yıldırım, Mehmet. İnsan Anatomisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2004.

Zhang, Jing, Quan Tian ve Shu-Feng Zhou. «Clinical Pharmacology of Cyclophosphamide and Ifosfamide.» Current Drug Therapy 1 (2006): 55-84.

8. EKLER

Ek-1, Etik Kurul Onayı

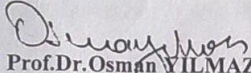
Ek-2. Özgeçmiş.

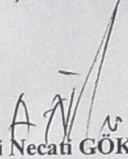
Toplantı No : 09/01/2010
Toplantı Tarihi : 08 Ocak 2010

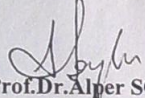
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

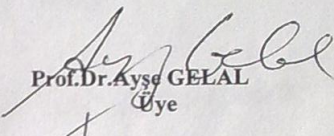
01/2010 Protokol No'lu; Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Hande TOPEL'in yürütücüsü olduğu "Kemoterapiye maruz kalmış dişi sıçanlarda rosiglitazone'un ovaryuma etkisi" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

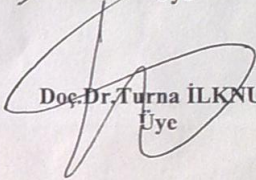

Prof. Dr. Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik
Kurul Başkanı


Prof. Dr. Ali Necati GÖKMEN
Başkan Yardımcısı

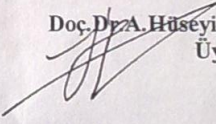

Prof. Dr. Alper SOYLU
Üye


Prof. Dr. Ayşe GELAL
Üye

Doç. Dr. Hüseyin ASTARCIOĞLU
Üye (top. katılmadı)


Doç. Dr. Turna İLKNUR
Üye

Doç. Dr. Abdullah KUMRAL
Üye
(top. katılmadı)

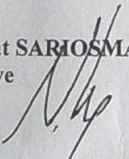

Doç. Dr. A. Hüseyin BASKIN
Üye

Doç. Dr. Tonay İNCEBOZ
Üye

Doç. Dr. H. Alper BAĞRIYANIK
Üye (Araştırmacı)

Doç. Dr. O. Nejat SARIOSMANOĞLU
Üye

Vtr. Hekim Adnan SERPEN
Üye


Ayşe Nur BALIN
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.



ÖZGEÇMİŞ HANDE TOPEL

TC Kimlik No / Pasaport No:	25021595526
Doğum Yılı:	1986
Yazışma Adresi :	370 sok. no:7 d:4 Bahçelievler/İZMİR 4 35150 İzmir/Türkiye
Telefon :	232-2283516
e-posta :	hande.topel@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Ege Üniversitesi	FEN FAKÜLTESİ	Biyoloji	Lisans	2008

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
---------------	------	-------	-------------	------------	--------------

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Overler ve Fallop Tüpleri , Testisler, Prostat ve Skrotum

DiĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı		
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı		
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı		
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı	Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans	
	Doktora	
	Uzmanlık	
Diğer Faaliyetler		

(Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)	
--	--

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
------------	------------------	------

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

--

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

--

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

--

Diğer yayınlar

--

Düzenleme Tarihi :19/04/2011