



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



SIÇAN OVARYUM DOKUSUNDA DOKSORUBİSİN İLE
İNDÜKLENMİŞ FOLLİKÜLER APOPTOTİK
AKTİVASYONDA DİALİL DİSÜLFİT'İN KORUYUCU
ETKİSİ

ESRA ŞEN

DOKTORA TEZİ

BURSA-2019

ESRA ŞEN

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA TEZİ

2019



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



**SIÇAN OVARYUM DOKUSUNDA DOKSORUBİSİN İLE
İNDÜKLENMİŞ FOLLİKÜLER APOPTOTİK
AKTİVASYONDA DİALİL DİSÜLFİT'İN KORUYUCU ETKİSİ**

Esra ŞEN

(DOKTORA TEZİ)

**DANIŞMAN:
Prof.Dr. Zeynep KAHVECİ**

BURSA-2019

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum

“Sıçan Ovaryum Dokusunda Doksorubisin ile İndüklenmiş Folliküler Apoptotik Aktivasyonda Dialil Disülfid’in Koruyucu Etkisi” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Esra ŞEN

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Esra ŞEN tarafından hazırlanan “**Sıçan Ovaryum Dokusunda Doksorubisin ile İndüklenmiş Folliküler Apoptotik Aktivasyonda Dialil Disülfit’in Koruyucu Etkisi**” konulu Doktora tezi 24/06/2019 günü, 11:00 – 13:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Prof. Dr. Zeynep KAHVECİ	
Üye	Prof. Dr. Semiha ERSOY	
Üye	Doç. Dr. Berrin AVCI	
Üye	Prof. Dr. Meltem KURUŞ	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Fatma Bahar SUNAY	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Gülşah ÇEÇENER
Enstitü Müdürü

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

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

Adı Soyadı: Esra ŞEN

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Konusu: Sıçan ovaryum dokusunda Doksorubisin ile indüklenmiş folliküler apoptotik aktivasyonda Dialil Disülfit'in koruyucu etkisi değerlendirmektir.

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN DEĞİLDİR</u>	<u>ACIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı:

Prof. Dr. Zeynep KAHVECİ

İmza:

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYANI	I
KABUL ONAY SAYFASI.....	II
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU	IV
İÇİNDEKİLER.....	IV
TÜRKÇE ÖZET	VI
İNGİLİZCE ÖZET.....	VII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Ovaryum Hakkında Genel Bilgiler	4
2.1.1. Genital Sistemin Gelişimi Hakkında Genel Bilgiler	4
2.1.2. Gonadların Gelişimi.....	4
2.1.3. Ovaryumların Gelişimi.....	5
2.1.4. Ovaryumun Anatomisi	5
2.1.5. Ovaryumun Histolojisi	6
2.1.5.1. Follikül Gelişimi	7
2.1.5.3. Büyümekte Olan Folliküller.....	8
2.1.5.3.1. Primer Folliküller.....	8
2.1.5.3.2. Sekonder Folliküller.....	10
2.1.5.3.3. Matür (Graaf) Follikül	11
2.1.5.3.4. Atretik Folliküller	12
2.1.6. Ovaryumun Kan Desteği ve Lenfatikler	13
2.1.7. Ovaryan İnnervasyon	13
2.2. Apoptoz Hakkında Genel Bilgiler	14
2.2.1. Apoptoz	14
2.2.1.1. Embriyonik Dönemde Gözlenen Apoptoz	15
2.2.1.2. Postnatal Hayatta Gözlenen Apoptoz.....	15
2.2.1.3. Patolojik Durumlarda Gözlenen Apoptoz	15
2.2.2. Apoptoz'un Aşamaları.....	15
2.2.3. Apoptoz'un Düzenlenmesi.....	16
2.2.3.1. Bcl-2 Ailesi	16
2.2.3.2. P53	16
2.2.3.3. FAS (APO-1 veya CD95)	17
2.2.3.4. Kaspazlar	17
2.2.4. Apoptoz Mekanizması	17
2.2.4.1. İnstrinsik Yol.....	18
2.2.4.2. Ekstrinsik Yol.....	18
2.2.4. Nekroz	19
2.2.4.1. Nekroz'un Aşamaları.....	19
2.2.4.2. Nekroz Mekanizması	20
2.2.5. Diğer Hücre Ölüm Tipleri.....	20
2.2.5. Granüloza Hücrelerinde Nekroz ve Apoptoz Hakkında Genel Bilgiler ...	22
2.2.5.1. Granüloza Hücre Apoptozisi.....	23
2.2.5.2. Ovaryan Follikülde Major Apoptozis Sinyal Yolakları	24
2.3. Doksorubisin Hakkında Genel Bilgiler	25
2.3.1. Doksorubisin'in Tarihçesi	25

2.3.2. Doksorubisin' in Genel Özellikleri	27
2.3.2.2. Doksorubisin' in Etki Mekanizması	27
2.3.3. Kanser Tedavisinde Doksorubisin.....	28
2.3.3.1. Doksorubisinin Farklı Organlar Üzerindeki Toksik Etkisi	28
2.3.3.2. Oogenezis ve Kadın İnfertilitesinde Toksisite	29
2.3.3.3. Kemoterapinin Gonadotoksitesitesi	32
2.3.3.4. Gebeliğe Etkisi.....	32
2.4. <i>Allium</i> Sebzeleri Hakkında Genel Bilgiler	33
2.4.1. Sarımsağın İçeriği	34
2.4.2. <i>Allium</i> Sebzelerinde Anti-Kanser Fitokimyasalları	34
2.4.2.1. Organosülfür Bileşiklerinin Anti-Kanser Etki Moleküler Mekanizmaları	
2.4.2.2. Karsinojen Metabolizmasının Modülasyonu.....	35
2.4.2.3. Hücre Siklusu İlerlemesinin İnhibisyonu	35
2.4.2.4. Apoptozis İndüksiyonu	36
2.4.3. Sarımsak Bileşenlerinin İşlevleri	37
2.4.4. Sarımsağın Yararlı Etkileri.....	38
2.4.5. Sarımsağın Etki Mekanizmaları.....	38
2.4.6. Sarımsak Preparasyon Tipleri.....	39
2.4.7. Antikanser Etkisi.....	39
2.4.9. Antioksidan Etkileri.....	41
2.4.10. İmmünmodulasyon	42
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	43
3.1. Deney Hayvanları ve Gruplandırma	43
3.2. Doku Diseksiyonu.....	44
3.3. Işık Mikroskopik İnceleme.....	44
3.4. Hematoksilen-Eozin Boyama ve Morfolojik Değerlendirme	45
3.5. TUNEL Yöntemi	46
3.6. İstatistiksel Analiz	477
4. BULGULAR	488
4.1. Vücut Ağırlıklarının Değerlendirilmesi	48
4.2. Follikül Sayılarının Değerlendirilmesi	49
4.3. Işık Mikroskopik Bulgular	566
4.4. TUNEL Bulguları.....	633
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	677
KAYNAKLAR	733
7. SİMGELER ve KISALTMALAR.....	84
8. EKLER.....	85
TEŞEKKÜR	86
ÖZGEÇMİŞ.....	87

TÜRKÇE ÖZET

“Sıçan Ovaryum Dokusunda Doksorubisin ile İndüklenmiş Folliküler Apoptotik Aktivasyonda Dialil Disülfid’in Koruyucu Etkisi”

Doksorubisin; sarkomların, meme ve akciğer kanserleri de dahil olmak üzere karsinomların, akut lenfositik lösemilerin ve lenfomaların tedavisinde önemli ve en sık kullanılan kemoterapötik ilaçlardan birisidir. Doksorubisinin de aralarında olduğu antiasiklin türevi antibiyotikler iki DNA zinciri arasına yerleşerek DNA ve RNA sentezini inhibe ederler ve topoizomeras II enzimi üzerinden de DNA zincir kırılmalarına sebep olurlar. Bu çalışmada doksorubisinin ovaryum üzerindeki toksisitesini belirlemek ve ovaryan toksisite üzerine dialil disülfidin etkinliğini değerlendirmek amaçlandı.

Çalışma kapsamında 35 adet 2,5-3 aylık Wistar albino cinsi dişi sıçan 5 gruba ayrıldı: Grup I: Kontrol-Doksorubisin Grubu, Grup II: Kontrol-Dialil disülfid Grubu, Grup III: Doksorubisin Uygulanan Grup, Grup IV: Dialil disülfid Uygulanan Grup, Grup V: Doksorubisin + Dialil disülfid Uygulanan Grup. Doksorubisin 3 mg/kg/gün (0,008 mM/7 gün, 10 mg/kg- 5 ml enjeksiyonluk su) intraperitoneal (ip) olarak enjekte edildi. Dialil disülfid 0,5 ml mısır yağı içerisinde 50 mg/kg ip enjeksiyon şeklinde uygulandı. Morfolojik değişiklikler hematoksilen eozin boyamasında ışık mikroskopik değerlendirme ve follikül sayımı ile gerçekleştirildi. Apoptotik aktivasyon TUNEL yöntemi ile değerlendirildi.

Çalışmanın sonucunda elde ettiğimiz bulgulara göre, doksorubisinin vücut ağırlığını azalttığı gözlemlendi. Follikül sayımı sonrasında gruplar arasında unilaminar primer ve multilaminar primer folliküller düzeyinde istatistiksel olarak anlamlılık görülmezken, doksorubisin grubunda primordiyal follikül sayılarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma belirlendi. Doksorubisin grubunda kontrol-doksorubisin, kontrol-dialil disülfid, dialil disülfid ve doksorubisin+disülfid gruplarına göre sekonder ve graaf follikül sayılarında azalmalar olduğu, atretik follikül sayılarında ise anlamlı derecede artış olduğu görüldü. Doksorubisin+dialil disülfid grubunda sekonder ve graaf follikül sayılarının kontrol (doksorubisin ve dialil disülfid) ve dialil disülfid grubu ile benzer olduğu, atretik follikül sayılarının doksorubisin grubuna kıyasla anlamlı derecede azaldığı saptandı.

Doksorubisin ile birlikte verilen dialil disülfidin ovaryan follikül rezervini koruduğu ve ovaryan toksisiteyi azaltabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Doksorubisin, Dialil disülfid, Apoptoz

İNGİLİZCE ÖZET

“Diallyl Disulfide Effect on Doxorubicin-Induced Follicular Apoptotic Activation in Rat Ovarian Tissue”

Doxorubicin is one of the most important and most frequently used chemotherapeutic drugs for the treatment of carcinomas, acute lymphocytic leukemias and lymphomas including sarcomas, breast and lung cancers. Anthracycline-derived antibiotics are located between two DNA strands, inhibiting DNA and RNA synthesis, and causing DNA chain breaks through topoisomerase II. The aim of this study was to determine the toxicity of doxorubicin, an anthracycline-derived antibiotic, on the ovary and to evaluate the effectiveness of diallyl disulfide on ovarian toxicity.

In this study, 2.5-3 month old 35 female Wistar albino rats were divided into 5 groups: Group I: Control-Doxorubicin Group, Group II: Control-Diallyl disulfide Group, Group III: Doxorubicin Applied Group, Group IV: Diallyl disulfide Applied Group, Group V: Doxorubicin + Diallyl disulfide Group. Doxorubicin 3 mg / kg / day (0.008 mM / 7 days) doxorubicin (10 mg / kg-5 ml water for injection) was injected intraperitoneally (ip). Diallyl disulfide was administered as 50 mg / kg ip injection in 0.5 ml corn oil. Morphological changes were performed by light microscopic evaluation and follicle counting in hematoxylin eosin staining. Apoptotic activation was evaluated by TUNEL method.

According to the results of the study, doxorubicin was found to decrease the body weight. There was no statistically significant difference between the unilaminar primary and multilaminar primary follicles in the follicle group after the follicle count, but a statistically significant decrease in the number of primordial follicles in the doxorubicin group. In the doxorubicin group, there were decreases in the number of secondary and graaf follicles according to the control-doxorubicin, control-diallyl disulfide, diallyl disulfide and doxorubicin + disulfide groups, and there was a significant increase in the number of atretic follicles. In the Doxorubicin + diallyl disulfide group, the number of secondary and graaf follicles was similar to the control (doxorubicin and diallyl disulfide) and diallyl disulfide group, and the number of atretic follicles decreased significantly compared to the doxorubicin group.

It was concluded that diallyl disulfide provided with doxorubicin could reduce this damage in the ovary and protect the ovarian follicle reserve.

Key Words: Doxorubicin, Diallyl disulfide, Apoptosis

1. GİRİŞ

Kanser, dünya genelinde giderek artan bir sağlık problemidir. Kanser terimi ilk defa Hipokrat tarafından (M.Ö. 460-377) organizmanın şifa bulmayan yeni yapılanmaları için kullanılmıştır. Vücut yüzeyinde büyüyen ve genellikle ülser olan, kırmızı, sıcak, ağrılı, diğerlerinden farklı karakterde olup yavaş büyüyen şişliklere Hipokrat, “karkinos” ya da “karkinoma”, Galen (M.S. 2. yüzyıl) ise görünümünü yengece benzetmesi nedeniyle “kanser” adını vermiştir. Diğer bir yoruma göre, kanser ağrısının yengeç ısırığı ile oluşan, merkezden çevreye doğru yayılan kemirici tarzdaki ağrıya benzerliği nedeniyle bu adlandırma yapılmıştır. Yunan tıbbında, “praeter naturam” adı verilen anormal patolojik büyüme ise tümör olarak adlandırılmıştır (Atici, 2007). Kanser, bir organizmadaki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmesi, çoğalması ve birikmesi olarak tanımlanmıştır. Tek bir organı etkileyebildiği gibi metastaz yaparak uzaktaki organlara da etkisini gösterebilmektedir. Her ne kadar bazı standartlar belirlenmiş olsa da her kanser türüne özgü farklı tedaviler uygulanmaktadır. Her insanın farklı bir DNA’ya sahip olması her kanser türüne özgü farklı yaklaşımlar uygulanmasında en büyük etmendir (Fitzmaurice ve ark., 2015; Pavlopoulou ve ark., 2015).

Kanser tedavisinde kemoterapi, radyoterapi, cerrahi yöntemler en sık kullanılan yöntemler olmakla birlikte, hormon terapisi ve biyolojik yöntemler gibi farklı yaklaşımlar da diğer yöntemlere destek olacak şekilde birlikte veya tek başına uygulanabilir. Her yöntemin kendine özgü avantaj ve dezavantajlarının bulunması, kanserin kişiye özgü bir hastalık olması ve tedavilerin kişiden kişiye farklılık gösterebilmesi nedeniyle kesin bir tedavi yönteminin varlığından bahsetmek mümkün değildir (Fitzmaurice ve ark., 2015; Pavlopoulou ve ark., 2015).

Kemoterapinin esas amacı kanser hücrelerini kemoterapötik ajanlar uygulayarak öldürmek olup, sitotoksik anti-neoplastik ajanlar bu tip tedavide önemli rol oynamaktadır. Cerrahi girişim öncesinde tümörün boyutunun küçültülmesi amacıyla kullanılan kemoterapi, radyoterapide de olduğu gibi neoadjuvan tedavi şeklinde veya tek başına uygulanabilir. Lösemi ve lenfoma gibi çeşitli kanser

türlerinde etkili bir tedavi yöntemi olduğu gösterilmiştir (Mian ve ark., 2016). Alkilleyici ajanlar, kortikosteroidler, anti metabolitler, anti tümör antibiyotikler, mitotik inhibitörler ve topoizomeraz inhibitörler kemoterapi uygulamalarında kullanılan en yaygın ilaçlardır (Yang ve ark., 2016).

Antitümör antibiyotikleri, kanserli hücrelerin DNA/RNA sentezini baskılayarak büyümesini ve bölünmesini yavaşlatan kimyasallardır. Antrasiklin grubunda tanımlanan doksorubisin (Doksorubisin, Adriamisin) *Streptomyces peucetius* tarafından üretilen ve kanser tedavisinde uygulanan bir ilaçtır. Etken madde doğrudan sitotoksik olup DNA ve RNA sentezini engellemektedir. Doksorubisin beşeri ve veteriner hekimlik alanında birçok kanser türünde (lenfoma, lösemi, solid tümörler vb.) geniş kullanım alanı olan bir antitümör antibiyotiktir. Ancak etken oksidatif stres oluşturarak kardiyotoksik etki göstermekte kemik iliği depresyonu, flebit, anafilaksi, ürtiker, generalize eritem, kusma, ishal, kolitis, anoreksi, histamin salınımında artış, renal hasar ve kilo kaybı gibi yan etkileri bulunmaktadır. Doza bağlı olarak hepatik hasar oluşturabileceği de yapılan deneysel araştırmalarda gösterilmiştir (Alshabanah ve ark., 2011).

Gonadotoksik bir tedavi; kılcal malformasyon ve kortikal fibrozis görülen ovaryum, follikül sayısındaki azalmaya ve oositlerde matürasyon yetersizliğine sebep olmaktadır. Sitotoksik ajanlar, hızla bölünen hücreleri durdurarak folliküler matürasyonun bozulması veya inaktif primordiyal folliküller üzerine doğrudan etki göstermesi veya ikisinin kombinasyonunu içeren mekanizmalar aracılığıyla gonadal toksisite oluşturmaktadır (Mackie ve ark., 1996; Watson ve ark., 1985; W. H.B. Wallace ve ark., 1989).

Serbest radikaller; kararsız yapıda olan kısa ömürlü moleküllerdir. Canlıda, en fazla oksijen kaynaklı serbest radikaller üretilmektedir. Canlıda serbest oksijen radikalleri birçok nedenle üretilse de, özellikle mitokondrial enerji üretimi esnasında oluşmaktadır. Üretilen serbest oksijen radikalleri endojen (glutasyon peroksidaz, süperoksit dismutaz vb.) veya eksojen (vitamin E, askorbik asit, selenyum vb.) antioksidanlar tarafından etkisizleştirilmekte ve bu şekilde oksidanlar ile antioksidanlar denge halinde bulunmaktadır. Dengenin; oksidanlar lehine değiştiği durumlarda radikaller lipid, karbonhidrat ve DNA gibi yapılara zarar vermektedirler.

Özellikle lipid yapısı üzerindeki etkileri sonucunda lipid peroksidasyonu gelişmektedir. Gelişen durum oksidatif hasar olarak tanımlanmaktadır.

İnsan vücudunda serbest radikaller tarafından oluşturulabilecek oksidatif stresin ortadan kaldırılmasında antioksidanlar önemli rol oynamaktadır. Antioksidanlar serbest radikalleri temizleyebilen ve hücre hasarını engelleyebilen maddelerdir. İnsan vücudunda bulunan antioksidanlar ya vücut tarafından doğal olarak üretilmekte ya da dışarıdan takviye olarak alınmaktadırlar. Endojen ve eksojen antioksidanlar, hücre metabolizmasının toksik yan ürünü olan serbest radikalleri etkisizleştirerek koruyucu etki göstermektedirler (Sen ve ark., 2010). Antioksidanlar; reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engellemek, bu maddelerin meydana getirdiği hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere vücutta görev yapan savunma sistemleridir. Antioksidanlar, serbest radikallerle reaksiyona girerek otooksidasyon/peroksidasyonun ilerlemesini önleyen maddelerdir. Bu maddeler, serbest radikallerin fazlasını etkisizleştirerek, serbest radikallerin toksik etkilerine karşı hücreleri korumakta ve hastalıkları önlemede katkı sağlamaktadır (Pham-Huy ve ark., 2008). *Alliaceae* familyasına dahil olan, hem besin maddesi hem de ilaç hammaddesi olarak kullanılan sarımsak (*Allium sativum*) ve soğan (*Allium cepa*), yapılarındaki flavonoidlerden dolayı, yüksek antioksidan aktiviteye sahiptirler. İçeriklerindeki antioksidatif aktivite gibi farklı biyoaktif özelliklere sahip olan çok sayıda fitokimyasal bileşikler sebebi ile soğan ve sarımsak türleri kanser, kalp hastalığı, obezite, diyabet, hipertansiyon ve katarakt gibi bazı hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde kullanılmaktadır. Bu bitki grubundaki fitokimyasal bileşikler, uçucu ve uçucu olmayan bileşenler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Uçucu bileşenler; sülfür grupları, uçucu olmayan bileşenler ise; flavonoidler ve fenollerdir. Son 20 yılda; *Allium* cinsi en çok çalışılan sebzeler arasında yer almışlar ve özellikle soğan ve sarımsak gibi sebzelerde bulunan fenolik maddeler iyi birer antioksidan kaynağı olarak gıda endüstrisi için büyük ilgi uyandırmıştır (Benkeblia, 2005). Çalışma kapsamında, kemoterapötik ajan toksisitesinin kadın fertilitesi üzerine oluşturduğu hasarın önlenmesi ya da bu toksisitenin etkilerinin en aza indirgenmesi için bir koruma yöntemi bulmak amaçlanmıştır. Bu amaçla önemli bir antioksidan madde olan dialil disülfidin sıçan ovaryumunda oluşturulan doksorubisin toksisitesi üzerindeki hasar önleyici etkisi incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryum Hakkında Genel Bilgiler

2.1.1. Genital Sistemin Gelişimi Hakkında Genel Bilgiler

Cinsiyet farklanması, birçok genin rol aldığı karmaşık bir süreçtir. Seksüel dimorfizmin anahtarı, kısa kolu üzerinde (Yp11) SRY genini (Y kromozomu üzerindeki cinsiyeti belirleyici bölge=sex-determining region on Y) taşıyan Y kromozomudur. Bu genin protein ürünü rudimenter durumdaki cinsiyet organlarının kaderini belirleyen genleri harekete geçiren bir transkripsiyon faktörüdür. SRY proteini Testis Belirleyici Faktördür (TBF). Fetusun cinsiyeti TBF varlığında erkek tipinde gelişirken, bu faktör yoksa kız tipinde gelişmektedir (Sadler, 2005).

2.1.2. Gonadların Gelişimi

Gonadlar (testisler ve ovaryumlar):

- Posterior abdominal duvarı döşeyen mezotel (mezodermal epitel)
- Altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu)
- Primordiyal germ hücreleri olmak üzere üç kaynaktan köken almaktadırlar (Moore, 2009).

Embriyonun cinsiyeti, genetik açıdan daha fertilizasyon aşamasında belirlenmiş olmasına rağmen, gelişimin 7. haftasına kadar gonadlar erkeğe veya dişiye ait morfolojik özellik göstermezler.

Gonadlar ortaya bir çift uzunlamasına, genital veya gonadal sırt halinde çıkarlar. Epitel proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla meydana gelmişlerdir. Gelişimin 6. haftasına kadar genital sırtlar içinde germ hücreleri bulunmaz.

Primordiyal germ hücreleri, epiblasttan köken alır, primitif çizgi boyunca göç eder ve üçüncü haftada yolk kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm hücrelerinin arasına yerleşirler. Dördüncü haftada ameboid hareketlerle sonbarsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerleyerek, 5. haftanın başında primitif gonadlara ulaşır, 6. haftada da genital sırtlara yerleşirler. Bu hücrelerin genital sırtlara ulaşamadıkları

durumda gonadlar gelişemez. Primordiyal germ hücrelerinin gonadların ovaryum ve testise farklanmaları üzerinde indükleyici etkileri bulunur.

Primordiyal germ hücrelerinin primitif gonadlara ulaşmalarından hemen önce ve ulaştıkları esnada, genital sırttaki epitel hücreleri çoğalarak altlarındaki mezenşim içine gömülürler. Bunlar burada primitif cinsiyet kordonları adı verilen düzensiz kordonları oluştururlar. Hem erkek hem de dişi embriyolarda bu kordonlar yüzey epiteline bağlıdır ve bu dönemde erkek veya dişi gonadların birbirinden ayırt edilmesi mümkün değildir. Bu evredeki gonada farklanmamış gonad denir (Sadler, 2005).

2.1.3. Ovaryumların Gelişimi

Dişi embriyolarında gonadal gelişim daha yavaş olur. 10. haftaya kadar, ovaryumlar histolojik olarak ayırımı yapılamaz. Gonadal kordonlar, belirgin değildir, medulla içerisine doğru girerler ve rudimenter bir yapı olan rete ovarii'yi oluştururlar. Rete ovarii ve gonadal kordonlar normalde dejenere olur ve kaybolurlar. Kortikal kordonlar, erken fetal dönemde, ovaryumun yüzey epitelinden köken alarak ve epitelin altında bulunan mezenşim içerisine doğru girerler. Bu epitel, mezotelden gelişmektedir. Kortikal kordonların boyutları arttığına, primordiyal germ hücreleri onların içlerine girerler. Yaklaşık 16. haftada, bu kordonlar izole hücre kümelerine (primordiyal folliküller) parçalanırlar. Folliküllerin herbiri, primordiyal germ hücrelerinden köken alan bir oogonium ve onu saran, yüzey epitelinden köken alan, tek sıralı yassılaştırmış folliküler hücrelerden oluşur. Fetal yaşam boyunca, oogoniumlarda oluşan aktif mitoz sonucu, binlerce primordiyal follikül meydana gelir.

Postnatal (doğum sonrası) dönemde oogonium oluşmaz. Her ne kadar doğumdan önce, pek çoğu dejenere olsa da, iki milyon civarında oogonium, doğum öncesi primer oosit halini alır. Doğumdan sonra, ovaryumun yüzey epiteli düzleşir ve tek tabakalı hale geçen hücreler, ovaryum hilumunda, periton mezoteli ile devamlılık kazanırlar. Yüzey epiteli, korteksteeki folliküllerden, tunika albuginea adı verilen, ince bir fibröz kapsülle ayrılır. Ovaryumlar, gerileyerek mezonefroza ayrıldıktan sonra, mezenterisi olan, mezovarium ile bağlanırlar (Moore, 2009).

2.1.4. Ovaryumun Anatomisi

Nulliparlarda (doğum yapmamış kadınlar) ovaryumlar bir çift, badem şekilli, pembemsi beyaz renkli, 3 cm boyunda, 1,5 cm eninde ve 1 cm kalınlığında organlardır. Her ovaryum, mezovaryum denen peritoneal katlantı tarafından broad ligamentin

posteriyor yüzeyine bağlanır. Ovaryumun tubal kutbu, ovaryumun sinirlerini ve damarlarını taşıyan suspensor ligament tarafından pelvis duvarına bağlanır. Ovaryumun uterin kutbu ovaryan ligament tarafından uterusu bağlanır. Bu ligament, gelişmekte olan gonadı pelvisin tabanına bağlayan embriyonik fibröz kordon olan gubernakulumun bir kalıntısıdır. Puberteden önce ovaryum yüzeyi düz bir yapıdadır. Üreme çağında ise tekrarlayan ovulasyonlar nedeniyle skarlı ve düzensiz bir hal alır. Postmenapozal dönemde ovaryumlar üreme çağındakinin dörtte biri büyüklüğündedir (Ross, 2011).

2.1.5. Ovaryumun Histolojisi

Ovaryum hem endokrin, hem de ekzokrin tipte salgı yapan bir organdır. Ekzokrin faaliyeti aktif holokrin tiptedir ve salgı ürünü I. mayozunu tamamlamış sekonder oositlerdir. Endokrin faaliyeti steroid hormon üretimidir (steroidogenez). Ovaryumdan östrojen ve progesteron salgılanmaktadır.

Östrojen: İnternal ve eksternal genital organların büyüüp olgunlaşmasını indükler. Pubertede sekonder cinsiyet karakterlerinin gelişimini sağlar. Duktal ve stromal büyümeyi, adipoz doku birikimini stimüle edip meme bezleri üzerine etki gösterir.

Progesteron: İnternal genital organları, özellikle uterusu, gebelik için hazır hale getirir. Lobüller proliferasyonu destekleyerek meme bezlerini laktasyon için hazırlar.

Östrojen ve progesteron menstrual siklusta, fertilize olmuş ovumun implantasyonu için uterusu hazırlama gibi önemli role sahiptir. İmplantasyonun gerçekleşmediği durumda uterus endometriyumunun fonksiyonel tabakası dejenere olarak menstruasyon gerçekleşir.

Ovaryum korteks ve medulla olmak üzere iki ayrı bölgeden oluşmaktadır. Ovaryumun merkezinde yer alan medullada gevşek bağ dokusu, kıvrımlı kan damarları, lenf damarları ve sinirler bulunmaktadır. Korteks medullayı çevreleyecek biçimde ovaryumun periferik bölgesinde yer almaktadır. Kortekste sellüler bağ dokusu içerisine gömülü olan ovaryum follikülleri bulunmaktadır. Folliküllerin etrafında yer alan stroma dağınık düz kas lifleri içerir. Medulla ile korteks arasındaki sınır tam olarak ayırt edilemez.

Ovaryumun yüzeyi germinal epitel adı verilen tek katlı kübik ya da yassı epitel ile döşelidir. Germinal epitel mezovaryumu çevreleyen mezotelyum ile devamlılık

gösterir. Geçmişte embriyonik gelişim sırasında germ hücrelerinin buradan köken aldığı düşünülmüştür. Fakat bugün primordiyal germ hücrelerinin ekstragonadal kökenli olup, embriyonik yolk kesesinden embriyonik gonadın korteksine göç ederek farklılaştığı bilinmektedir. Germinal epitel ile korteks arasında sıkı bağ dokusu tabakası olan ve ovaryuma beyazımsı rengini veren tunika albuginea bulunmaktadır.

Ovaryum follikülleri oosit gelişimi için mikroçevre sağlar. Farklı büyüklükte olan ovaryum follikülleri korteks stromasına dağılmış halde bulunurlar. Her biri primer oosit içerir. Follikül çapı gelişmekte olan oositin evresini gösterir. Doğumda oositler I. mayoz bölünmenin profaz safhasında arreste uğramış olarak bulunurlar. Pubertede folliküller büyür ve matürasyonu gerçekleştirir. Follikül matürasyonu ve ovulasyon bir süre sonra menstrual siklusla paralel hale gelir. Normal şartlarda her menstrual siklusta tek oosit matürasyonunu tamamlayarak ovaryumdan salıverilir. Ancak birden fazla oositin salıverildiği durumlarda çoklu zigot oluşumu meydana gelir (Ross, 2011). Kadınların doğurganlık çağı yaklaşık olarak 30-40 yıl sürmektedir (Junqueira ve Carneiro, 2009). Doğumda var olan 600.000-800.000 adet primer oositin büyük çoğunluğu matürasyonunu tamamlayamayıp atreziye uğrarlar. Bu süreç fetal hayatın 5. ayında başlar. Oositin çevresindeki hücrelerin apoptozu bu duruma eşlik eder. Primer oositlerin atreziye uğramasıyla, fetusta 5 milyon olan oosit sayısı doğumda %20 oranında kalır. Reprodüktif yaşam boyunca bir kadın yaklaşık olarak 400 sekonder oosit üretir. Menopazla birlikte geriye kalan oositler birkaç yıl içerisinde dejenere olur (Ross, 2011).

2.1.5.1. Follikül Gelişimi

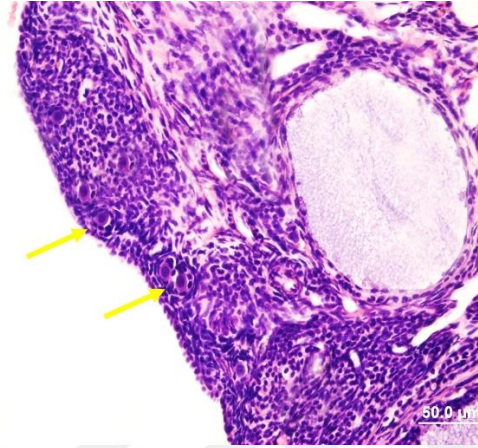
Menstrual siklus; folliküler evre, ovulatuvar evre ve luteal evre olarak 3 evreden oluşmaktadır. Folliküler evrede, primordiyal follikülden matür ya da graaf follikülü gelişir (Kierszenbaum, 2006). Histolojik olarak gelişim aşamalarına göre 3 temel ovaryum follikülü bulunmaktadır. Bunlar;

- Primordiyal folliküller,
- Büyümekte olan folliküller,
- Olgun ya da graaf folliküllerdir.

2.1.5.2. Primordiyal Follikül

Follikül gelişiminin en erken aşamasıdır. İlk olarak fetal gelişimin 3. ayında ortaya çıkarlar. Primordiyal follikül gelişiminin erken evreleri gonadotropin

stimülasyonundan bağımsız olarak gerçekleşir. Olgun bir ovaryumda primordiyal follüküller korteks stromasında tunika albugineanın altında yer alırlar (Şekil 1). Tek tabaka halindeki yassı follükül hücreleri primer oositi çevreler. Follükül hücrelerinin dış yüzü bazal lamina ile sınırlandırılmıştır. Follükül içerisindeki primer oositin çapı 30 µm olup, iyi dağılmış kromatin ve bir ya da daha fazla nukleolus içeren eksantrik bir nukleusa sahiptir. Oosit sitoplazmasında Golgi vezikülleri, endoplazmik retikulum, mitokondri ve lizozom kümelerinin oluşturduğu Balbiani cisimciği bulunmaktadır.



Şekil 1. Primordiyal follükül (sarı ok).

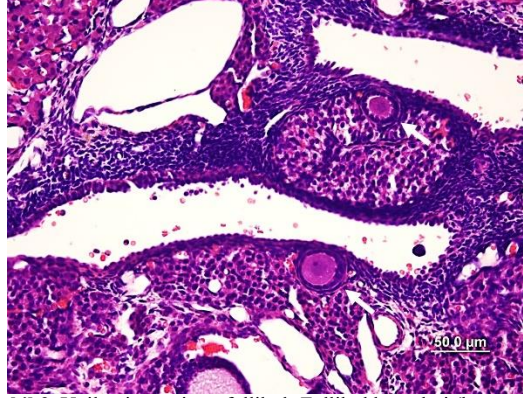
2.1.5.3. Büyümekte Olan Follüküller

2.1.5.3.1. Primer Follüküller

Bir primordiyal follükül büyümekte olan follüküle dönüşürken oositte, follükül hücrelerinde ve komşu stromada birtakım değişiklikler meydana gelir. İlk etapta oosit büyür, çevresindeki yassı follükül hücreleri proliferasyonla kübik hale gelirler. Gelişen bu follükül primer follükül olarak adlandırılır. Oositin büyümesiyle bir takım özel proteinler salgılanır ve bu proteinlerin bir araya gelmesiyle birlikte oosit ile follükül hücreleri arasında zona pellusida (ZP) oluşur. Tek katlı kübik veya prizmatik follükül hücreleri oositi çevrelediğinde ve oosit çapı 50-80 µm'e ulaştığında ZP görülebilir. ZP üç glikoproteinden oluşmuştur. ZP-1; fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir, ZP-2; sekonder spermatozoa bağlama proteini olarak işlev görür, ZP-3; spermatozoa bağlanma reseptörü ve akrozom reaksiyonunu indükler. Follükül hücrelerinin ince sitoplazmik uzantıları ZP'yi delerek oositin mikrovillusları ile temas halinde bulunur (Kierszenbaum, 2006; Ross, 2011).

İki tip primer follükül bulunmaktadır;

a. Tek tabakalı (unilaminar) primer follüküller: Primer oosit tek sıralı kübik follükül hücreleri ile çevrilidir (Şekil 2).



Şekil 2. Unilaminar primer follikül: Follikül hücreleri (beyaz ok).

b. Çok tabakalı (multilaminar) primer folliküller: Primer oosit proliferen çok katlı kübik hücrelerle çevrilidir. Bazal lamina follikül hücrelerini ovaryumun stromasından ayırır (Kierszenbaum, 2006) (Şekil 3).



Şekil 3. Multilaminar primer follikül: Granüloza hücreleri (yeşil ok), zona pellusida (beyaz ok), primer oosit (kırmızı ok).

Tek tabakalı follikül hücrelerinin hızlı bir şekilde mitoz geçişip proliferen olmasıyla membrana granüloza oluşur. Follikül hücreleri granüloza hücreleri olarak tanımlanır.

Granüloza hücrelerinin proliferen olmasıyla follikülün etrafındaki stromal hücreler teka follikülü'yi oluştururlar. Daha sonra teka follikülü farklılaşarak teka interna ve teka eksterna olmak üzere iki tabakaya ayrılır. Teka interna kübik salgı hücrelerinden oluşan iç tabaka olup, yüksek oranda vaskülarizedir. Buradaki hücreler luteinizan hormon (LH) reseptörlerine sahiptir. LH stimülasyonu ile birlikte östrojen prekürsörü olan androjenlerin sentez ve salınımı sağlanır. Teka interna sekretuar hücrelere ek olarak fibroblast, kollajen fibrilleri ve endokrin organlardaki gibi iyi gelişmiş bir damar ağına sahiptir. Teka eksterna ise dış bağ dokusu hücreleri tabakası olup, düz kas hücreleri ve kollajen lifler içerir, damardan zengin bir tabakadır.

Teka tabakaları arasındaki sınır tam olarak belirgin olmamakla birlikte granüloza tabakası ile teka interna arasında bulunan bazal lamina iki tabaka arasında

belirgin bir sınır çizer. Bu yapı avasküler olan granüloza tabakası ile teka internanın zengin kapiller yatağını birbirinden ayırır.

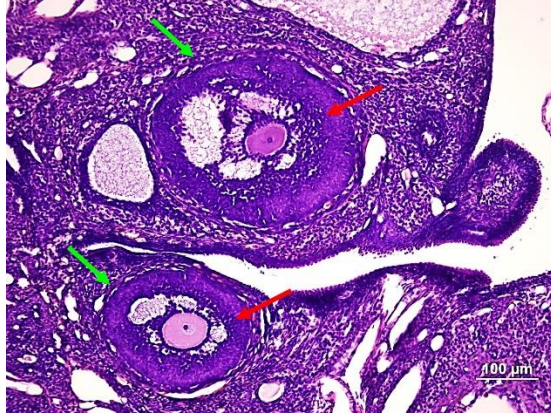
Oositin olgunlaşmasıyla beraber organel dağılımında değişiklik oluşur. Balbiani cisimciğinden köken alan Golgi'nin sitoplazmaya dağılımı gerçekleşir. Serbest ribozomların, küçük veziküllerin, multiveziküler cisimciklerin, mitokondri ve granüler endoplazmik retikulumun (gER) miktarı artar. Seyrek olarak lipid damlacıkları ile lipokrom pigmentine rastlanabilir. Memeli oositlerinde oolemmannın altında kortikal granül olarak isimlendirilen özelleşmiş sekretuar veziküller bulunmaktadır. Oositin sperm tarafından aktive edilmesiyle birlikte granüllerin içerdiği proteazlar ekzositozla serbestleştirilir. Perivitellin aralıktaki çok sayıdaki mikrovillus granüloza hücreleri arasından oosite doğru uzanır. Uzantılar plazma membranına temas ederken, hücreler arasında sitoplazmik devamlılık sağlamazlar (Ross, 2011).

2.1.5.3.2. Sekonder Folliküller

Antrumda bulunan sıvı içeriği ile karakterize edilir. Granüloza hücreleri proliferasyonu ile follikülün çapı büyür. Follikül kortikal stromanın derinlerine doğru ilerler. Bu aşamada oosit ve follikül gelişimi için birtakım faktörler gerekir;

- Follikül stimüle edici hormon (FSH),
- Büyüme faktörleri; epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin benzeri büyüme faktörü I (IGF-I),
- Kalsiyum iyonları (Ca^{2+}).

Stratum granulozum 6-12 sıralı hücre katmanına ulaştığında; granüloza hücreleri arasında sıvı dolu bir kavite oluşmaya başlar (Şekil 4). Granüloza hücreleri kaynaklı hyaluronandan zengin sıvı (likör follikülü) birikmeye devam eder. Daha sonra kaviteler birleşir, tek, yarım şekline antrum olarak isimlendirilen bir boşluğa dönüşür. Artık follikül sekonder veya antral follikül olarak isimlendirilir. Eksantrik yerleşimli olan oositin çapı yaklaşık 125 μm 'ye ulaşır ve daha fazla büyümeyebilir. Granüloza hücrelerinden antral sıvıya oosit matürasyon inhibitörü (OMI) salgılanır ve oositin büyümesi inhibe edilir. OMI konsantrasyonu ile sekonder follikülün boyutu arasında korelasyon vardır. OMI konsantrasyonu olgun folliküllerde en düşük, küçük folliküllerde en yüksek olarak bulunur.

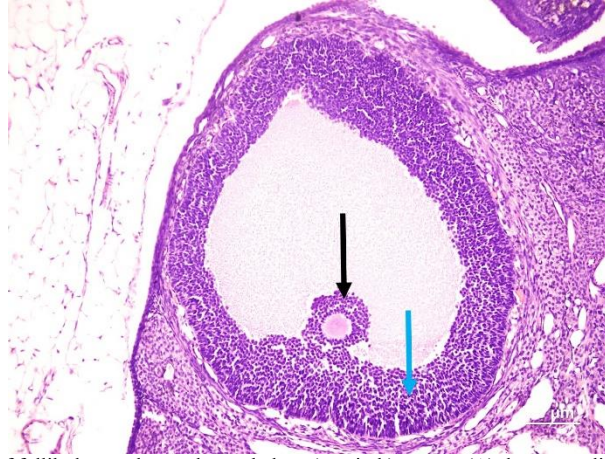


Şekil 4. Sekonder follükül: Granüloza hücreleri (kırmızı ok), antrum (A), teka tabakası (yeşil ok).

2.1.5.3.3. Matür (Graaf) Follükül

Sekonder follükülün çapının artmasıyla beraber antrumda giderek genişlemeye başlar (Şekil 5). Granüloza hücreleri oositle ilişkide olduğu bölgede antruma doğru kumulus ooforus olarak isimlendirilen tepeciği oluştururlar. Oositi çevreleyen kumulus ooforus hücreleri korona radiata olarak adlandırılır ve ovulasyon sırasında oosit ile birlikte atılırlar. Korona radiata hücrelerinin mikrovillusları gap junctionlar aracılığıyla oositle bağlantı kurarlar. Follükülün matürasyonu esnasında granüloza hücrelerinin mikrovillus sayısı artar. Bu durum antral yüzeydeki LH reseptör sayılarının artışı ile koreledir. Granüloza hücreleri arasında bulunan yoğun boyanan, PAS (+) yapılar Call-Exner cisimcikleri olarak isimlendirilir. Bu cisimcikler granüloza hücreleri tarafından salgılanmakta olup hyalüronan ve proteoglikandan zengindir.

Graaf follükül 10 mm veya daha fazla çapa sahiptir. Follükülün boyutunun büyük olması nedeniyle ovaryum korteksinin kalınlığı boyunca uzanıp ovaryum yüzeyinde şişkinlik oluşturur. Follükülün maksimum boyuta ulaşmasıyla beraber granüloza hücrelerinin mitotik aktivitesi de azalır. Stratum granülozum tabakası antrum boyutunun artmasıyla incilir. Ovulasyon hazırlığında granüloza hücreleri arasındaki boşluklar, oosit ve kumulus hücreleri ile granüloza hücreleri arasındaki bağlar gevşer. Ovulasyon sırasında oositin çevresinde yalnızca tek katlı korona radiata hücreleri bulunur.

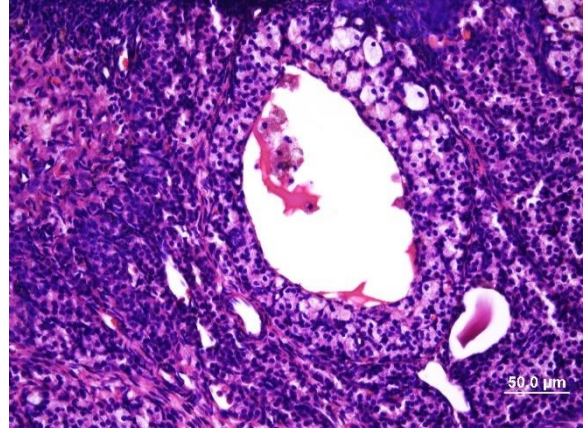


Şekil 5. Graaf follikül: mural granüloza tabakası (mavi ok), antrum(A), korona radiata (siyah ok).

Follikül matürasyonu ile birlikte teka tabakaları daha belirgin bir hal alır. Teka interna hücrelerinin sitoplazmasında lipid damlacıkları gözlenir. LH, teka interna hücrelerini androjen salgılamaları için stimüle eder. Androjenlerin bir kısmı granüloza hücrelerindeki granülsüz endoplazmik retikulumına taşınır. FSH'nın etkisiyle granüloza hücreleri androjenlerin östrojenlere dönüşümünü katalizler. Östrojen granüloza hücrelerinin proliferasyonunu sağlayarak follikül boyutunun artmasını sağlar. Adenohipofizde FSH veya LH salgılamadaki ani artışla birlikte, ovulasyon yaklaşık olarak 24 saat önce indüklenir. LH'daki ani artışlarda granüloza hücrelerindeki LH reseptörü azalır. Buna bağlı olarak granüloza hücreleri östrojen üretmezler. LH pikinden yaklaşık olarak 12-24 saat sonra primer oosit, I. mayoz bölünmesini tamamlar. Böylece sekonder oosit ve I. kutup cisimciği (polar body) oluşur. Granüloza ve teka hücrelerinin luteinize olmasıyla progesteron üretimi gerçekleşir (Ross, 2011).

2.1.5.3.4. Atretik Folliküller

Normal şartlarda her menstrual siklusta sadece bir follikül tam olarak olgunlaşır. Diğer folliküller ise atreziye uğrarlar. Atrezi sırasında önce oosit, sonra granüloza hücrelerinin dejenerasyonu gerçekleşir. Öncelikle mitoz durur ve granüloza hücrelerinin bazal laminadan ayrılmasıyla oosit dejenerasyonu gerçekleşir. Granüloza hücreleri endonükleazlarla birlikte birtakım hidrolitik enzimler üretir. Nötrofiller ve makrofajlar granüloza tabakasını istila ederler. Oluşan apoptotik cisimcikler fagositoza uğrar. Teka interna hücrelerinin hipertrofiye uğramasıyla oluşan follikül boşluğu bağ dokusu tarafından doldurulur. Bazal membran kalınlığı artar ve camı membran olarak isimlendirilen dalgali hyalinize bir bant oluşur. Makrofajlar parçalanmış zona pellusidayı fagosite eder (Şekil 6) (Junqueira ve Carneiro, 2009).



Şekil 6. Atretik follikül

2.1.6. Ovaryumun Kan Desteği ve Lenfatikler

Ovaryumun kan desteği iki farklı kaynaktan gelmektedir. Ovaryan arterler abdominal aortanın dallarıdır ve ovaryuma suspensuar ligamentler yoluyla geçmektedir. Ovaryumun ve tuba uterinaların ana arteriyal desteğini sağlamaktadırlar. Bu arterler ovaryumun ikinci kaynağı olan ve internal iliak arterlerden kaynaklanan uterin arterlerin ovaryan dalları ile anastomoz yaparlar. Anastomozun bu bölgesinden çıkan nispeten büyük damarlar mezovaryumdan geçerek ovaryumun hilusuna girerler. Bu büyük arterlere spiral arterler denmektedir; çünkü ovaryumun medullasına geçtiklerinde dallanırlar ve yüksek düzeyde sarmallaşırlar.

Venler arterlere eşlik eder ve hilustan çıktıklarında pampiniform pleksus denen bir pleksusu oluştururlar. Ovaryan ven bu pleksustan oluşur.

Ovaryumun kortikal bölgesinde teka tabakalarındaki lenfatik damar ağları, gelişmekte olan büyük follikülleri, atretik follikülleri ve korpus luteumları çevrelerler. Lenf damarları lomber bölgedeki paraaortaik lenf nodlarına doğru yükselirken ovaryan arterin seyrini takip ederler (Ross, 2011).

2.1.7. Ovaryan İnnervasyon

Ovaryumlar, otonomik ovaryan pleksus tarafından innerve edilmektedirler. Ovaryumun hem sempatik, hem de parasempatik lifleri olmasına rağmen, bunların dağılımları hakkında az bilgi bulunmaktadır. Parasempatik gangliyon hücre grupları medullaya dağılmışlardır. Sinir lifleri arterleri takip eder ve ovaryumun medullasına ve korteksine geçtiklerinde bu damarların duvarındaki düz kasları desteklerler. Folliküllerle ilgili sinir lifleri bazal laminayı penetre etmezler. Duyusal sinir sonlanmaları stromada dağılmışlardır. Duyusal lifler impulsları ovaryan pleksus

yoluyla iletilirler ve birinci lomber spinal sinirlerin dorsal kök gangliyonlarına ulaşırlar (Ross, 2011).

2.2. Apoptoz Hakkında Genel Bilgiler

Prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda yaşam, doğum, büyüme, üreme, yaşlanma ve ölüm olarak belli başlı kısımlardan meydana gelmektedir. Yaşamın bu şekilde sürdürülebilmesi için canlıyı oluşturan hücreler arasındaki denge çok önemlidir. Yeni hücreler oluşurken, varolan hücrelerin bir kısmı da hücre ölümü ile ortadan kaldırılmakta ve böylelikle denge sağlanmaktadır. Varolan bu hücreler fizyolojik, programlanmış hücre ölümü olan apoptoz ve patolojik hücre ölümü olan nekroz gibi çeşitli hücre ölüm tipleriyle ortadan kaldırılmaktadır (Bellamy ve ark., 1995; Ellis, 2002).

2.2.1. Apoptoz

Vücudumuzdaki her hücre belli bir süre yaşar, çoğalır (proliferasyon), farklılaşır (diferansiasyon) ve zamanı gelince ölür (apoptozis). Apoptozis ve hücre proliferasyonu arasında kontrollü bir denge bulunmaktadır. Programlanmış hücre ölümü olan apoptoz; Apo: ayrı, Ptosis: düşme kelimelerinin birleşmesiyle oluşmuş Yunanca ağaçtan düşen yaprak veya çiçekten ayrılan petal anlamına gelen bir kelimedir. Apoptoz, ilk kez 1972'de Avusturyalı bir patolog olan J.F.K. Kerr tarafından tanımlanmıştır (Kerr ve ark., 1972). Apoptoz; hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, genlerle düzenlenen, fizyolojik, programlı, RNA, protein sentezi ve enerjiye gereksinimi olan, organizmada homeostazı koruyan bir olaydır. Apoptoz ile ilgili araştırmalar genelde çok basit yapılı, çok hücreli olan *Caenorhabditis elegans* nematodu kullanılarak yapılmıştır. Bu nematodlarda ced-3, ced-4 ve ced-9 genleri apoptozu kontrol etmektedir. Mutasyon ile inaktive edilmiş ced-3 ve ced-4 genlerine sahip nematodlarda apoptoz görülmediği ve normalde ölmesi gereken hücrelerin yaşamaya devam ettiği bildirilmiştir. Bu nedenle ölüm genleri olarak tanımlanan ced-3 ve ced-4'ün apoptozu indükledikleri, ced-9'un ise, hücreleri ölüme karşı koruyan gen olup, apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu genlerin insan genomundaki karşılıklarının ced-3 için kaspazlar, ced-4 için Apaf-1 ve ced-9 için Bcl-2 olduğu saptanmıştır (Hengartner ve ark., 1992). Apoptoz, normal gelişimin yanı sıra organizmanın bütünlüğüne karşı tehdit oluşturan hücrelerin yıkımı için de gereklidir. Apoptoz embriyonik dönemde, postnatal hayatta ve patolojik durumlarda görülür.

2.2.1.1. Embriyonik Dönemde Gözlenen Apoptoz

Embriyonik dönemde apoptoz; el parmakları arasındaki perdelerin ortadan kalkması, fetüsün cinsel gelişimi esnasındaki duktus gerilemesi, merkezi sinir sisteminin şekillenmesi, kan damarlarının sayıca azalması, gözün lens yapısının oluşumu aşamalarında rol oynamaktadır. Ayrıca kurbağaların kuyrukları da metamorfoz esnasında apoptoz ile kaybolmakta ve erişkin forma geçmeleri gerçekleşmektedir (Vaux ve Korsmeyer, 1999; Franz ve Kidson, 1997).

2.2.1.2. Postnatal Hayatta Gözlenen Apoptoz

Kemik iliğinde kan üretiminin dengede tutulması için kan hücrelerinin ortadan kaldırılması, menstruasyon esnasında endometriyumun fonksiyonel tabakasının dökülmesi, menstruel siklus sonunda korpus luteumun involusyonu apoptoz aracılığıyla gerçekleşmektedir. İnce barsaklardaki kriptaların bazalinde yeni oluşan hücreler de, zamanla kriptaların apikal uçlarına göç ederler ve apoptoz sonrasında barsak lümenine dökülürler. Deri hücreleri de derinin bazal tabakasında oluştuktan sonra derinin en üst tabakasına doğru göç eder ve bu göç esnasında çeşitli farklılaşma özellikleri göstererek organizmayı dış etkenlere karşı koruyan tabakayı oluşturmak üzere apoptoza uğrarlar. İmmün sistem hücreleri olan T-lenfositler timusta olgunlaşırlar ve bu hücrelerin otoimmünite potansiyeline sahip olanları da kan dolaşımına katılmadan önce apoptozla ölürlar. Sütten kesilen dişilerin meme bezlerinde de apoptoz görüldüğü bildirilmiştir (Ford, 2001; Marti ve ark., 2001).

2.2.1.3. Patolojik Durumlarda Gözlenen Apoptoz

Parkinson hastalığı, diyabet, Alzheimer hastalığı, immün sistem hastalıkları, folliküler atrezi, viral enfeksiyonlar, AIDS, tümör gelişimi, aterosklerozis, miyokardial infarktüs gibi hastalıklar, organ transplantasyonları, oksidatif stres, alkolizm, X ışınları ve radyasyon gibi faktörlerin apoptoza neden olduğu belirtilmiştir (Hughes ve Gorospe, 1991; LeBlanc ve ark., 1999; Matés ve ark., 2010).

2.2.2. Apoptoz'un Aşamaları

Metabolik ve fizyolojik işlemlerle hücrenin kendisini yok etmesi apoptoz olarak tanımlanmaktadır. Apoptoz uyarısı alan hücre bulunduğu ortamdan uzaklaşarak komşu hücrelerle bağlantısını koparır, büzüşür, kromatini yoğunlaştırır ve piknotik bir görünüm alır. DNA'sı nukleozomlarından kesilir ve jel elektroforezinde tipik merdiven bant görünümünde olur. Ancak hücre organelleri yapısal bütünlüklerini

korumaktadır. Hücre zarı yapısında yer alan fosfotidil serin hücre zarının iç yüzünden dış yüzüne transloke olur. Nükleus küçülerek fragmanlara ayrılır. Hücre zarla sarılı tomurcuklar halinde kopar ve apoptotik cisimcikler oluşur. Apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir, fakat enflamasyon oluşmaz (Bellamy ve ark., 1995; Ellis, 2002).

2.2.3. Apoptoz'un Düzenlenmesi

Kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi gibi moleküller, p53, kaspazlar, sitokrom-c gibi proteinler ve mitokondri apoptozun düzenlenmesini sağlayan faktörlerdir (Şekil 7). Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli kalsiyum iyonu girişi olur ve bu iyonlar endonükleaz, proteaz ve transglutaminaz aktivasyonu, gen regülasyonu ve hücre iskeleti organizasyonunda rol alır (Gültekin ve ark., 2008).

2.2.3.1. Bcl-2 Ailesi

Bir hücrenin apoptoza eğilimli olup olmaması Bcl-2 ailesi genlerinin heterodimer ya da homodimer formuna bağlıdır. Bcl-2 ailesi birbirine zıt 2 gruptan oluşur;

- Proapoptotik üyeler
- Antiapoptotik üyeler

Hücrede proapoptotik proteinlerin fazla olduğu durumda hücre apoptoza eğilim gösterirken, antiapoptotik proteinlerin fazla olduğu durumda apoptoza eğilim azalmaktadır (Adams ve Cory, 2001).

Proapoptotik üyeler Bad, Bax, Bid, BclXs, Bak, Bim, Puma ve Noxa'dır. Bu proteinler sitozolde yer alırlar ve Sitokrom-c ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) salınımını artırarak apoptozu uyarırlar.

Antiapoptotik üyeler ise Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1'dir. Bu proteinler mitokondri dış membranında, endoplazmik retikulumda, nükleus zarında yer alırlar ve por oluşumunu sağlayarak iyon transportunu düzenlerler. Özellikle hücredeki Ca⁺⁺ oranının dengede tutulmasını sağlarlar. Ayrıca kaspazların öncü formlarıyla AIF ve Sitokrom-c salınımını bloke ederek apoptozu baskırlarlar (Adams ve Cory, 2001; Adrain ve Martin, 2001; Spierings ve ark., 2004).

2.2.3.2. p53

Hücrede DNA hasarı meydana geldiğinde hücre siklusunu G1 fazında durdurarak hücreye DNA tamirinin gerçekleşmesi için zaman veren bir transkripsiyon

faktörüdür. Oluşan hasar tamir edilemeyecek durumda ise Bax, Apaf-1 ve Fas yapımını artırıp Bcl-2 ve Bcl-xL'yi baskılar ve apoptozu uyarır (Vousden ve Lu, 2002).

2.2.3.3. FAS (APO-1 veya CD95)

TNF reseptör ailesinin 24 üyesinden en iyi tanımlanmış olanıdır. Fas proteini 43 kDa molekül ağırlığında olup hücre yüzeyinde kendi reseptörüne bağlanarak reseptör trimerizasyonunu sağlamaktadır. Fas hücre reseptörü immün sistemde apoptozu kontrol eder ve sitotoksik T hücreleri ve naturel killer hücreleri üzerinde yer alır. Aktive olan Fas hücre reseptörleri FADD reseptör molekülü ile birleşir ve prokaspazlar aktive olarak apoptoz başlar (Curtin ve Cotter, 2003; Spierings ve ark., 2004).

2.2.3.4. Kaspazlar

Hücrede inaktif olarak bulunan kaspazlar sistein proteazlardır. Proteolitik olarak birbirlerini aktive ederler ve 100 farklı hedef proteini keserek apoptozu uyarırlar.

1. Başlatıcı kaspazlar (Kaspaz 2,8,9,10),
2. Efektör kaspazlar (Kaspaz 3,6,7),
3. İnflamatuar kaspazlar (Kaspaz 1,4,5,11,12,13,14) olarak üç gruba ayrılırlar.

DNA tamiri ve replikasyonunda rol alan enzimleri inaktive ederler. Hücre iskeleti proteinlerini keserek hücre zarının tomurcuklanmasına neden olurlar (Adams ve Cory, 2001; Adrain ve Martin, 2001; Spierings ve ark., 2004). Apoptoz aktivasyonundan bir süre sonra DNA'daki tek iplikte bir çentikle başlayan geri dönüşü olmayan bir parçalanma meydana gelir.

2.2.4. Apoptoz Mekanizması

Apoptoz iki yolla gerçekleşir;

1. İnstrinsik (Mitokondriyal) yol
2. Ekstrinsik yol
 - a. Direkt mekanizma
 - b. Dolaylı mekanizma

Apoptozu tetikleyen hücre içi sinyaller; DNA hasarı, hücre içi Ca⁺⁺ düzeyi artışı, pH azalışı, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları ve hipoksidir. Hücre dışı sinyaller ise; büyüme ve üreme faktörlerinin yetersizliği, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu

(FAS – FAS ligand aracılığı ile apoptoz, TNF aracılığı ile apoptoz), sitotoksik T lenfosit ve dış etkenlerdir (İskemi, toksinler, UV, kemoterapötik ilaçlar, radyasyon). Her iki sinyal yolunda da kaspazlar rol oynamaktadır. Hücre içi sinyaller instrinsik apoptoz yolunu devreye sokarken, hücre dışı sinyaller ekstrinsik yol ile apoptozu uyarırlar (Danial ve Korsmeyer, 2004; Guido Kroemer ve ark., 2007).

2.2.4.1. İnstrinsik Yol

Hücre içi sinyallerle apoptotik uyarı alınmasından sonra proapoptotik proteinlerden Bid; bir antiapoptotik protein olan Bcl-2'yi inaktive ederken, Bax ve Bak'ı aktive eder. Aktifleşen Bax ve Bak mitokondri membranında por oluşumunu uyararak zar potansiyelini değiştirir (Spierings ve ark., 2004). Böylelikle mitokondri membranındaki porlardan, Smac (Second mitochondria-derived Activator of Caspase), sitokrom-c, Endo-G (Endonukleaz-G), AIF (Apoptoz indükleyici faktör) ve Ca⁺⁺ salınımı gerçekleşir. Oksidatif fosforilasyon için gerekli elektronu Sitokrom-C taşır. SMAC, IAF (İnhibitör apoptotik faktör)'ü baskılar ve apoptozu hızlandırır. IAF'nin ortamdaki varlığı ise kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivasyonunu engeller. AIF, nukleusa transloke olur ve parçalara ayırır. ENDO-G de DNA'yı parçalar. Mitokondriyal porlardan sitokrom-c ve Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive eden faktör) salınımı ve ATP eklenmesiyle sitozolde apoptozom adı verilen bir kompleks oluşturur (Adams ve Cory, 2001; Adrain ve Martin, 2001; Strasser ve ark., 2002). Apoptozom kaspaz-9'u keserek aktifleştirir. Kaspaz-9, prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3'e dönüştürür. Aktif kaspaz-3 de ICAD (İnaktif kaspaz aktive edici DNaz)'ı inaktifleştirerek CAD (Kaspaz aktive edici DNaz)'ı serbestleştirir. CAD ise nukleusta kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nukleozomal alt birimler halinde parçalanmasına sebep olur (Adams ve Cory, 2001).

2.2.4.2. Ekstrinsik Yol

Ölüm sinyallerinin (FasL, TNF-alfa, TRAIL) hücre yüzeyinde yer alan ölüm reseptörlerine (Fas, TNFR, DR5) bağlanmasıyla reseptörler trimerik yapı kazanır. Trimerik yapı kazanan reseptör; adaptör molekülleri ve prokaspazla birleşerek DISC (Death inducing signaling complex) adı verilen yapıyı oluşturur. DISC oluşumundan sonra inaktif durumdaki prokaspaz-8'in uzun ve kısa kolları kesilerek kaspaz-8 aktifleşir. Aktif kaspaz-8, kaspaz-3'ü ya doğrudan aktive eder ya da Bid'i keserek kaspaz-9'u aktive eder ve dolaylı olarak kaspaz-3 aktive olur. Aktive olan kaspaz-3,

CAD aktivasyonu ile DNA fragmantasyonuna yol açar (Adams ve Cory, 2001; Curtin ve Cotter, 2003; Spierings ve ark., 2004). Diğer bir ekstrinsik yol ise sfingolipid yoludur. Sfingomyelin, hücre zarı yapı taşlarından biridir. Sfingomyelinaz radyasyon, kemoterapi ve ölüm reseptörleri ile aktive olur ve sfingomyelini seramide dönüştürür. Seramid ise seramidaz ile sfingozine dönüşür ve Bid yapımını artırarak apoptozu uyarır (Ross, 2011). Granzim perforin sistemi ise patojenle enfekte hücreler ve tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında etkili bir yoldur. Granzim B ve perforinler sitotoksik T lenfositler ve Natural Killer hücrelerinin sitoplazmik salgı granülleri içinde bulunan serin proteazlardır. Perforinler, sitotoksik T lenfositlerin hedef hücreye bağlanmasıyla salınır ve hedef hücre üzerinde dairesel bir por oluştururlar. Bu perforin poru hücre içine Ca⁺⁺ girişini artırır ve vezikülden Granzim B'nin serbest bırakılmasını sağlar. Granzim B kaspaz aktivasyonu sonucu DNA fragmantasyonu yoluyla apoptoza neden olur (Ross, 2011).

2.2.4. Nekroz

Patolojik hücre ölümü olan nekroz genlerle kontrol edilemeyen ve çeşitli dış etkenlerle gerçekleşen bir olaydır. Nekrotik hücre ölümünde; enerji depolarında ani azalma ile birlikte hücre zarının geçirgenliği bozulur, hücre içerisine sodyum ve su girişine neden olur ve böylece hücre şişer. Ayrıca mitokondride de şişme görülürken, diğer organeller plazma içinde dağılır. Hücre zarı patlayarak bütünlüğünü kaybeder. Proteolitik enzimler hücreler arası boşluğa sızar ve doku çevresinde inflamasyon oluşur. Nekrozun en yaygın nedenleri arasında hipertermi, oksidatif fosforilasyon, glikolizis inhibisyonu, hipoksi ve çeşitli toksik maddeler yer almaktadır (Golstein ve Kroemer, 2007; Nicotera ve Melino, 2004).

2.2.4.1. Nekroz'un Aşamaları

Isı, yanma ve toksik madde gibi çevresel uyarılar hücrenin iyon dengesini bozar. DNA tamirinden sorumlu nuklear enzim PARP (Poli ADP-riboz polimeraz) NAD⁺'ı ikiye bölerek NAD kaybına neden olur. Bu durumda ATP azalarak iyon pompası yetersizliğine yol açar. Böylece hücreye sıvı girişi olur ve organeller şişer. Hücre zarının bütünlüğü bozulur ve osmotik basınç nedeniyle hücre patlar. Hücre ölümünü takiben hücre içeriğinin hücreler arası boşluğa salınması enflamasyona sebep olur. Makrofaj ve nötrofil hücreleri nekrotik dokuya göç eder ve nekrotik dokuyu

fagosite eder. Bu nedenle enflamasyon nekrozun karakteristik bir özelliğidir (Golstein ve Kroemer, 2007; Nicotera ve Melino, 2004).

2.2.4.2. Nekroz Mekanizması

Fas, TNF reseptörlerinin aktivasyonu veya hücrel stres RIP1 ve RIP3 (Receptor interacting proteinler) aktivasyonuna neden olur. RIP1 ve RIP3 mitokondriyi ya doğrudan aktive eder ya da NADPH oksidazın oluşturduğu ROS ile dolaylı olarak etkileyerek nekrozu uyarır (Baines, 2010; Franz ve Kidson, 1997; Zong ve Thompson, 2006). Nekrotik uyarı PARP'ı aktive eder. PARP1 de kalpain aktivasyonu, RIP kinazların aktivasyonu ya da PARP yoluyla nekroza yol açar. PARP ve kalpain, AIF salınımını sağlayarak nekrotik hücreleri uyarırlar. Kalpain, Ca⁺⁺ ile aktive olan kaspaz proteaz ailesi üyesidir ve lizozomal enzim salınımını sağlayan kathepsini aktive eder (Galluzzi ve ark., 2009; Golstein ve Kroemer, 2007). Bcl-2 ailesinin bir diğer proteini olan BNIP, mitokondriyal por oluşumunu aktive eder. Mitokondriyal porlar, aşırı ROS ve Ca⁺⁺ üretiminde açılır (Baines, 2010; Franz ve Kidson, 1997; Zong ve Thompson, 2006). Bcl-2 ailesi proteini Nix ise endoplazmik retikulumdan Ca⁺⁺ salınımını sağlar. Kalsiyum, mitokondri matriksine geçer ve mitokondriyal porların açılmasına neden olur. RIP kinazlar da elektron transport zinciri yoluyla ROS üretimine katkıda bulunur. Ca⁺⁺ ve ROS'un aşırı artışı mitokondriyal porun uzun süre açık kalmasına neden olur. Hücre oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP üretemez hale gelir ve nekroz gerçekleşir (Baines, 2010; Zong ve Thompson, 2006).

2.2.5. Diğer Hücre Ölüm Tipleri

Son yıllarda yapılan araştırmalarda klasik apoptoz ve nekroz formasyonuna uymayan morfoloji ve biyokimyasal özelliklere sahip hücre ölüm tipleri saptanmıştır. Bunlar;

- **Otofajik hücre ölümü**, bir vakuol içine alınan hücre içi makro moleküllerin ve organellerin primer lizozomlarla kaynaşip parçalanması ile gerçekleşir. Sindirilen organel komponentleri geri dönüştürülerek, hücre büyümesi ve gelişmesi için kullanılır. Sitoplazmanın bir kısmı ya da bir organel ilk önce endoplazmik retikulumun ekstrasellüler membranı ile sarılır. Primer lizozomlar bu yapıyla birleşir ve sekonder lizozom yani otofajik vakuol (otozom=otofagozom) oluşur ve hidrolitik enzimlerle parçalanır (Gozuacik ve Kimchi, 2004). Apoptozdan farklı olarak nükleus

yoğunlaşması daha geç gerçekleşir. DNA fragmentasyonu ve apoptotik cisimcik oluşumu görülmez (Gozuacik ve Kimchi, 2004).

- **Mitotik katastrof**, G1, S ve G2 kontrol noktalarında DNA hasarı gibi mitoz başarısızlıkları sonucu mikronuklei-multinuklei oluşumu gerçekleşir ancak nuklear fragmentasyon kaspazlara bağımlı olmaksızın gözlenir ve hücre metafaz esnasında ölür (Castedo ve ark., 2004; G Kroemer, 2009; Ross, 2011).

- **Anoikis**, yetersiz ya da düzensiz integrin aracılı hücre-matriks etkileşimleri ile uyarılan apoptoz olarak tanımlanır (Frisch ve Ruoslashti, 1997; G Kroemer, 2009).

- **Eksitotoksis**, merkezi sinir sisteminin ana eksitator nöromediatörü olan glutamatın anormal artışını takiben sitozolik Ca²⁺'un aşırı artışına bağlı gelişen hücre ölümüdür (G Kroemer, 2009).

- **Wallerian dejenerasyonu**, sinir sisteminde sinir ana gövdesi etkilenmeksizin, sinir liflerinde kesilme ve ezilmeye bağlı olarak meydana gelir. Etkilenen nöron yaşamını sürdürdüğü için hücre ölüm tipleri arasında sayılmayabilir (G Kroemer, 2009).

- **Paraptozis**, morfolojik olarak programlı hücre ölümüdür ancak biyokimyasal olarak apoptozdan farklıdır. Hücre ölüm mekanizması henüz tam anlamıyla aydınlatılmamış olmakla beraber, insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü I ekspresyonu ile indüklenir. Sitoplazmik vakuolizasyon ve mitokondriyal şişme dışında apoptoza benzemez, kaspaz inhibitörleri ve Bcl-2 antiapoptotik ailesinden etkilenmez (G Kroemer, 2009; Sperandio ve ark., 2002).

- **Pyroptozis**, antimikrobiyal cevap olan inflamasyon sırasında gözlenen programlı hücre ölümüdür. Apoptozdan farklı olarak kaspaz kaskadında rol almayan kaspaz-1, inflamasyon bölgesine IL-1 ve IL-2 gibi inflamatuvar sitokinlerin salınımını aktive eder (G Kroemer, 2009; Sperandio ve ark., 2002).

- **Pyronekrozis**, kaspaz-1'e verdiği cevap yönünden pyroptozisten farklıdır.

- **Entozis**, ilk kez Huntington hastalarının lenfoblastlarında hücre kanibalizm olarak tanımlanmıştır. Hücre, komşu hücre tarafından yutulmakta ve fagozom içerisinde ölmektedir (Sperandio ve ark., 2002).

- **Nekroptozis**, kaspazlardan bağımsız olarak tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR) ve Fas ligand aktivasyonu ile başlar. Programlı gerçekleşir ama morfolojik olarak nekroza benzer (Guido Kroemer ve ark., 2007; Ross, 2011).

2.2.5. Granüloza Hücrelerinde Nekroz ve Apoptoz Hakkında Genel Bilgiler

Nekroz, hücrenin organellerinde şişmeye ve bozulmaya neden olan, hücrenin zarlarının geri dönüşümsüz bir şekilde parçalanmasına sitoplazmik ve nükleer içeriğin saçılmasına yol açan bir toksine veya yıkıcı maddeye maruz kalmasından kaynaklanır (Bonfoco ve ark., 1995). Vücut tarafından belirgin bir enflamatuvar yanıtı açar. Bununla birlikte apoptoz, hücrenin büzülmesi, sitoplazmik çıkıntı oluşumu ve organellerin kompartmanlara ayrılması ile sonuçlanan çeşitli sinyal yollarından kaynaklanır (Bomsel-Helmreich ve ark., 1979; Nottola ve ark., 2006; Tilly ve ark., 1992). Karakteristik olarak ortaya çıkan bir inflamatuvar yanıt yoktur. Hücre zarları bütünlüğünü yitirse de, nekrotik granüloza hücrelerinde gözlenmeyen bir özellik olan içeriğin komşu hücreleri etkilemesini önlemek için katlanır ve kapsülленir (Van Wezel Dharmarajan ve ark., 1999). Apoptotik hücreler tipik olarak piknotik, hilal-şekilli ya da küçük kesitlerde fragmente, DNA-yoğun yuvarlak cisimciklere sahiptir.

Nekroz ve apoptoz, granüloza hücre ölümüyle sonuçlanır, DNA materyalini boyayan nükleik boyalar, hücre zarlarının canlılığını belirtmek için yaygın olarak kullanılır (Demchenko, 2013). Benzersiz bir şekilde, apoptotik granüloza hücresi mitokondriyal membranlar bozuluncaya kadar steroid hormonlarını sentezlemeye devam eder. Apoptotik granüloza hücreleri, hücre sitoplazmasının yeniden düzenlenmesi ile periferde sitoplazmik olmayan organel kabarcıkları oluşturur. Nükleusun etrafında kümelenmiş mitokondri, golgi, endoplazmik retikulum ve steroid, lipid ve protein içeren büyük sıvı dolu vakuoller birikir (Guraya, 2017; Motta, 1969). Düz endoplazmik retikulum (SER) ve mitokondri nükleus ile yakın ilişkidedir (Motta, 1969; Nottola ve ark., 2006). Mitokondri ve büyük, yuvarlak, lipid damlacıkları, SER ile yakından ilişkilidir; hepsi büyük oranda artmıştır ve steroid sentezinin etkinliğini arttırmak için nükleus etrafında kümelenmiştir (Nottola ve ark., 2006). Luteinizasyon sırasında, granüloza hücreleri düzensiz mikrovilli ve hücreler arasında sıkı bağlantılar oluşturur, oysa apoptotik bir granüloza hücresinde hücre zarı dağılır ve boşluklar oluşur (Guraya, 2017). Apoptotik granüloza hücresi, tam mitokondriyal yıkım gerçekleşene kadar büyük antral folliküllerde steroid üretmeye devam eder (Amsterdam ve ark., 2003).

2.2.5.1. Granüloza Hücre Apoptozisi

Ovaryum folliküllerinin atrezisi, her biri farklı başlangıç ve regülasyon mekanizmalarına sahip olan, ancak tümü granüloza hücre apoptozunu içeren üç fenotipe ayrılabilir (Irving-Rodgers ve ark., 2004).

Birinci fenotip “antral atrezi” olarak adlandırılan, granüloza hücrelerinin orta üretken tabakalarını etkiler ve apoptoz antruma doğru ilerler.

İkinci fenotip “bazal atrezi”, çok küçük antral folliküllerin bazal laminasına en yakın granüloza hücrelerinde meydana gelir. Hücreler prematüre olarak luteinize olur ve progesteron üretmeye başlar; ancak, daha sonra hücre ölümü ile luteinizasyonu tamamlamazlar (Irving-Rodgers ve ark., 2004).

Preovulatar folliküllerde üçüncü bir apoptoz şekli “terminal farklılaşma apoptozu” olarak adlandırılır ve deri hücrelerine benzer (Van Wezel Dharmarajan ve ark., 1999) (Van Wezel Dharmarajan ve ark., 1999; Van Wezel Krupa ve ark., 1999). Antral yüzeyden antrum sıvısına kayan granüloza hücreleri globüller oluşturur (Van Wezel Dharmarajan ve ark., 1999). Globüller ortalama 40 µm çapında olup propidium iyodür (PI) ile pozitif olarak boyanmaktadır ve hücre zarının tehlikeye girdiğini göstermektedir. Bununla birlikte, DNA fragmanı değildir, yüksek moleküler ağırlığa sahiptir ve TUNEL testi ile DNA fragmentasyonu negatif olarak gözlenmektedir.

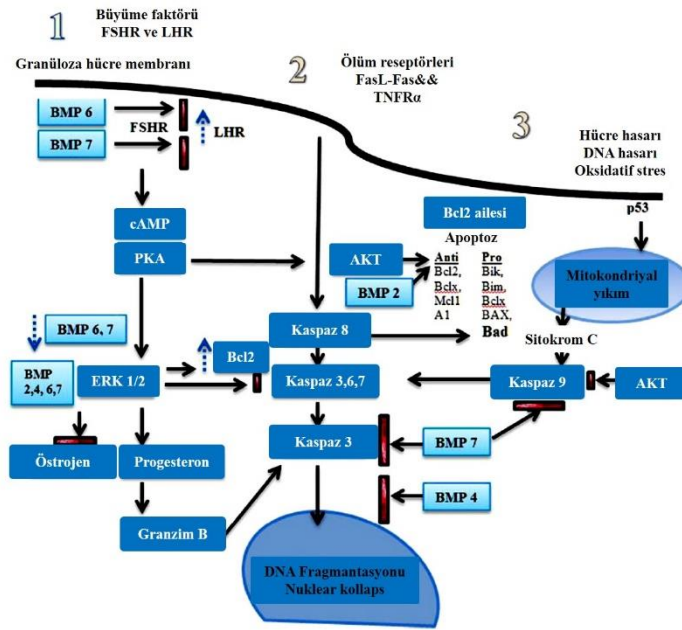
Membrana granüloza hücre ölümünün çoğunluğu “antral atrezi” aracılığıdır. Apoptotik cisimcikler ve sitoplazmik çıkıntı antral apoptozun tipik özelliği iken, membrana granülozanın orta ya da bazal kısmındaki apoptotik hücreler genellikle sağlıklı komşu granüloza hücreleri ve/veya infiltre olan makrofajlar tarafından sarılır. Büyüme faktörleri, ölüm reseptörleri ve hücre hasarı olarak üç ana apoptozis indüksiyon alanı vardır. Apoptozis follikül gelişiminin herhangi bir aşamasında ortaya çıkabilir. Küçük folliküllerde granüloza hücreleri büyük, yuvarlak nükleus ve kompakt yapıya sahiptir. Matür folliküllerde, ağırlıklı olarak östrojen üreten granüloza hücreleri, steroidojenik olarak farklılaşır, mitokondri ve SER hacmini artırır. Gelişimin bu aşamasında apoptozis de benzer şekilde nükleik içeriğin yoğunlaşmasına ve organellerin nükleus çevresinde kümelenmesine yol açmaktadır. Apoptozun geç evrelerinde, hücre membranları bozulmakta ve içerik apoptotik cisimciklere kompartmantalize olmaktadır (Regan ve ark., 2018).

2.2.5.2. Ovaryan Follikülde Major Apoptozis Sinyal Yolakları

Granüloza hücrelerinde apoptozis gelişimi için üç ana sinyal yolağı vardır (Şekil 7) (Shen ve ark., 2014);

1. Büyüme faktörü ile indüklenen granzim B aracılı yüksek cAMP seviyesi,
2. Bcl2 ailesi aktivasyonunun mitokondriyal fonksiyona etkisi,
3. Tümör nekroz faktörü alfa (TNF α) ve Fas ligand (FasL)-Fas ve diğer ölüm reseptörleri.

Bunların tümü kaspaz ile indüklenmiş DNA fragmentasyonu ile sonuçlanmaktadır. Ovaryumda, granzim B'nin; gonadotropinler ve forskolin ile uyarılarak DNA fragmentasyonu ve nükleer yıkım meydana gelse de apoptozun erken evrelerinde işlevlerini korumak amacıyla mitokondriye geçişi sağlanmaktadır (Amsterdam ve ark., 2003).



Şekil 7. Apoptoz sinyal yolağı (Amsterdam ve ark., 2003).

Apoptoz; apoptotik mekanizmaları tetiklemek için p53'e spesifik sinyal yollarını aktive eden DNA hasarı ve oksidatif stres gibi hücreye zarar verebilecek bir dizi ekstrinsik faktörle de başlatılabilir (Matsuda ve ark., 2012; Nottola ve ark., 2006; Shen ve ark., 2014).

Bunun tersine, birçok büyüme faktörü [insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF)] ve yanı sıra gonadotropinler (FSH ve LH) sağkalımı sağlayan mikroçevreyi oluşturan antiapoptotiktirler.

Östrojen ve progesteron FSH, LH, EGF, IGF, FGF, prolaktin, laminin, leptin ve glukokortikoidlerle birlikte başlıca antiapoptotik faktörlerdir. Bir follikülün steroid üretme kapasitesi, steroidojenik akut düzenleyici protein (StAR) (Miller ve Auchus, 2011) etkisiyle follikülün antral boşluğundan alınan folliküler sıvı ve serum içindeki hormon düzeylerine yansır. Teka ve granüloza hücrelerinin ürettiği steroidler follikülogenez sırasında evreye-spesifik şekilde antiapoptotik etki sağlar. Baskın follikül seçiminden sonra, teka hücre mitokondrisi, StAR'ın aracılık ettiği sitokrom P450 yan zincir klivaj enzimi ile kolesterolü pregnenolona dönüştürür. Pregnenolon, mitokondriden taşınır ve 3 β -hidroksisteroid dehidrojen ile progesterona dönüştürülür. Progesteron daha sonra androjenlere, çoğunlukla androstenedion, dehidroepiandrosteron ve testosterona dönüştürülür ve teka hücresinden östrojeni sentezlemek için kullanıldığı granüloza hücresine taşınır.

Östrojen güdümlü proliferatif follikülogenez fazı esnasında granüloza hücre apoptozu protein kinazı B (Akt/PKB), ekstraselüler sinyalle düzenlenmiş kinaz (ERK), EGF ve BMP gibi antiapoptotik sinyal yolları tarafından inhibe edilir. Akt sinyal yolu antiapoptotik aktiviteyi artırır ve östrojen ve büyüme faktörü kaynaklı cAMP-PKA aktivitesinden etkilenir. Östrojen, Akt-bağımlı yolağı (Susan M Quirk ve ark., 2006) aktive eden östrojen reseptörü *yoluyla* FasL kaynaklı apoptozu doğrudan inhibe eder. Ek olarak, BMP ligandlarının birçok çalışmada bu sinyal yollarının apoptoz sinyalinin down-regülasyonunu engellediğı gösterilmiştir (Irving-Rodgers ve ark., 2004; Shen ve ark., 2014).

Granüloza hücresinin LH dalgalanmasına bağılı farklılaşması, kolesterolü doğrudan progesterona dönüştürmeyi sağlar. Ovulasyon esnasında, LH dalgası, progesteron reseptörlerinin ekspresyonu için granüloza hücrelerini indükler. Follikül progesteron güdümlü luteinizasyona uğrar ve luteal faza girer, hücre proliferasyonu durur ve korpus luteum oluşumu sırasında yüksek progesteron seviyeleri apoptozu inhibe eder (S M Quirk ve ark., 2004).

2.3. Doksorubisin Hakkında Genel Bilgiler

2.3.1. Doksorubisin'in Tarihçesi

Doksorubisin (DOX), çeşitli kanser türlerinin tedavisi için en güçlü ve yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajanlardan biridir (Mohan ve Rapoport, 2010). Bu ilaç, daunorubisin, epirubisin, idarubisin ile birlikte antrasiklin antibiyotik ailesine

aittir. İlk kez 1969 yılında daunorubisin üreten mikroorganizma *S. Peuceitius* ile mutajenik muamelesi sonucu *Streptomyces peuceitius caesius* tarafından izole edilmiştir (Arcamone ve ark., 2000).

Daha önce, 1940 yılında Waksman ve Woodruff, antitümör aktivitesine (*Actinomyces antibioticus* tarafından üretilen bir antibakteriyel bileşik olan actinomycin) sahip ilk antibiyotiği keşfetmiştir (Di Marco ve ark., 1981). Kısa süre sonra, 1952'de, mikrobiyal kökenli başka bir madde olan, aktinomisin C hayvan türlerinde antitümör aktivite sergilemiştir. 1957'de, Farmitalia Laboratuvarları, yeni izole edilmiş *Streptomyces* veya ham izolat ve fraksiyon kültürlerinden elde edilen antitümör aktivitesine sahip yeni bir biyosentetik antibiyotik arayışıyla, farelerde katı ve asit formlarında Ehrlich karsinoma ve sarkom 180 (S180)'e karşı test etmeye başlamıştır. 1959'da araştırmacılar tanımlanamayan bir *Streptomyces* türü olduğunu tespit etmiş, kanser tedavisinde antrasiklinlerin potansiyelini gösteren, çok düşük dozlarda (0.05-0.5 mg / kg) dikkat çekici antitümör özelliklerine sahip, bir rhodomisin benzeri antrasiklin kompleksi üretmiştir. Mikroorganizma daha sonra İtalya, Apulia'da elde edilen bir toprak numunesinden izole edilmiş ve *S. peuceitius* olarak adlandırılmıştır. Birkaç fraksiyonlama çalışmasından sonra, esasen miselyumda bulunduğu gözlemlenen ana aktif bileşik daunorubisin izole edilmiştir. Neredeyse aynı zamanda, Fransa'daki Rhône-Poulenc Laboratuvarlarındaki bir başka araştırma grubu, aynı maddeyi *Streptomyces coeruleorubidus*' tan bağımsız olarak izole etmiş ve rubidomisin olarak adlandırmıştır, ancak İtalyanlar tarafından verilen isim, çift kökenli olduğu için o isimlendirme seçilmiştir (Di Marco ve ark., 1981). Birkaç yıl sonra klinik denemeler başlamış ve ölümcül kardiyak toksisite ana yan etkilerden biri olarak tanımlansa da, Daunorubicin' in akut lösemi ve lenfoma tedavisinde başarılı bir şekilde uygulandığı kanıtlanmıştır (Tan ve ark., 1967). Arcamone ve ark., yeni antineoplastik ajanların bulunması amacıyla *S.peuceitius* kültürünü N-nitroso N-metil uretan ile muamele sonrasında *S.peuceitius caesius*' un yaşayan kolonilerinin Daunorubisin-ilişkili bileşik olan Adrimisini biriktirdiğini keşfetmişlerdir (Arcamone ve ark., 2000).

Günümüzde ticari olarak önemli miktarlarda DOX elde etmek için genetik mühendisliği bu sitostatik ilacı esas olarak *S. peuceitius* ATCC 27952' den izole etmektedir.

DOX řu anda akut lenfoblastik ve akut miyeloblastik lösemi, Wilms tümörü, nöroblastom, yumuşak doku ve kemik sarkomları, meme, ovaryum, mesane, tiroid ve gastrik karsinom, Hodgkin lenfoma, malign lenfoma ve bronkojenik karsinom gibi neoplastik hastalıklarda FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Birimi) tarafından tedavi yöntemi olarak belirtilmiştir. DOX, primer meme kanserinin rezeksiyonuna sekonder aksiller lenf nodu tutulumu kanıtı olan kadınlarda adjuvan tedavinin bir bileşeni olarak da belirtilmektedir (Cagel ve ark., 2017).

2.3.2. Doksorubisin' in Genel Özellikleri

DOX, *S.peuceitius caesius*' dan üretilen antitümör aktivitesine sahip bir antrasiklin antibiyotiktir (Abraham ve ark., 2005). Antrasiklinler, bir şekere glikozidik bağ ile bağlanmış bir tetrasenequinon halka yapısı içeren polilipitlerdir. DOX'un çözüdür formu, sulu çözeltileri asidik pH' ta sarı-turuncu, nötr pH'da turuncu-kırmızı, pH>9.0' da mavi-mor olan kristalimsi, ince, iğne benzeri bir toz olan hidroklorür tuzudur (DOX HCl). Bu renk kayması, molekül içindeki bir dihidroksiaprakinon kromoforunun varlığından kaynaklanmaktadır. Kromofor gruplarındaki herhangi bir değişiklik absorpsiyon spektrumunda bir değişikliğe yol açabilir. Bu nedenle pH, bağlayıcı iyonlar ve bunların konsantrasyonları, iyonik kuvvetleri, çözücü tipleri ve ilaç konsantrasyonları gibi birkaç faktöre bağlıdır (Fiallo ve ark., 1999; Link, 2010).

2.3.2.2. Doksorubisin' in Etki Mekanizması

Kemoterapötik bir ilacın malign bir hücre üzerindeki etkisini gösterebildiği tüm farklı yollar arasında, DOX' in hücrelerin nükleik asitleri üzerine;

- i. DNA iplikçiklerinin baz çiftleri arasındaki birleşme, böylece replikasyon ve transkripsiyon süreçlerini bloke ederek hızla büyüyen hücrelerde DNA ve RNA sentezini inhibe etme (Thorn ve ark., 2011)
- ii. Hücre membranlarında, proteinlerde ve DNA'da oksidatif hasara neden olan demir aracılı serbest radikallerin üretilmesi üzerine iki ana mekanizma ile etki ettiği bildirilmektedir.

Bunun nedeni, DOX' un kuinon yapısının bir elektron alıcısı olarak redoks reaksiyonlarına katılması, sarkoplazmik retikulum ve mitokondride bulunan mitokondriyal NADH dehidrogenazlar; sitozolik NAD(P)H dehidrogenaz; ksantin oksidaz; ve endotelial nitrik oksit sentaz gibi birkaç enzim aracılığıyla semiquinon serbest radikaline dönüşmesidir (La Ferla ve ark., 2011; Thorn ve ark., 2011). Bu

kararsız metabolit, DNA'nın kendi başına yaralanmasına neden olabilir ya da süperoksit, hidroksil radikalleri veya peroksit gibi reaktif oksijen türleri (ROS) üreten quinon formuna dönüştürebilir (Gewirtz, 1999). Aynı zamanda, ROS oksidatif strese, lipid peroksidasyonuna, membran ve DNA hasarına neden olabilir ve apoptozu tetikleyebilir (Doroshov, 2006). Bunun yanı sıra, DOX ayrıca enzim topoizomerez II'yi (TOP2A) inhibe eder, DNA replikasyonu, transkripsiyonu ve aşırı sarılmış DNA'nın gevşemesi engellendiğinde DNA onarımını büyük ölçüde önlemektedir (Tewey ve ark., 1984).

2.3.3. Kanser Tedavisinde Doksorubisin

Doksorubisin en sık mesane, meme, mide, akciğer, ovaryum, tiroid, yumuşak doku sarkomu, multiple miyelom ve Hodgkin lenfoma kanserlerini tedavi etmek için kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan doksorubisin içeren Adriamisin, Siklofosfamid (AC), Taxotere, AC, Bleomisin, Vinblastin, Dakarbazin, Etoposid, Vinkristin, Prokarbazin, Prednison ve 5-fluorourasil, Doksil preparatları temel olarak, platin bazlı kemoterapi sonrasında ovaryum kanserinin ilerleme ya da tekrar etmesi durumunda veya AIDS ile ilişkili Kaposi sarkomunun tedavisi için kullanılmaktadır (Rivankar, 2015).

2.3.3.1. Doksorubisinin Farklı Organlar Üzerindeki Toksik Etkisi

Antrasiklinler kalpte kronik toksisiteye neden olabilen bir kemoterapötik ilaç sınıfıdır. Bu etki, en bilinen antrasiklin olan doxorubisini kullanan hastalarda daha sık görülmektedir (Altieri ve ark., 2016). Doksorubisin önerilen maksimum kümülatif dozu 500 veya 450 mg/m² olan çeşitli hematolojik ve katı tümör maligniteleri durumunda kırk yıldan fazla bir süredir anti-kanser ilaç olarak kullanılmaktadır. Doksorubisinin kümülatif kardiyotoksik dozu 550 mg/m² olarak ayarlanmaktadır (Warpe ve ark., 2015). Antikanser ilaç olarak standardize edilmiş olmasına rağmen, potansiyel kardiyotoksisite, kardiyomiyopati ve konjestif kalp yetmezliği gibi yaşamı tehdit eden ciddi yan etkilerin göz önünde bulundurulması gerekmektedir (QuanJun ve ark., 2017).

Yan etkiler göz önüne alındığında, doksorubisinin en olası toksisite mekanizması oksidatif streste bir artış yaratmaktır. Serbest reaktif oksijen türleri (ROS) ve oksidatif stres, kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda rol oynamaktadır. Çoklu organ toksisitesi anti-kanser ajanların aktivitesi ile ROS,

oksidatif stres ve hücrel değişimlerin sonucu olarak meydana gelmektedir (Barrera, 2012; Bendale ve ark., 2017; Vallejo ve ark., 2017).

İnsan hepatoselüler karsinomu (Hep G2/C3A), kardiyomiyositlere farklılaştırılmış insan pluripotent kök hücresi, insan iskelet miyofibrilleri, insan motor nöronları ve kortikal nöron benzeri hücelere farklılaştırılmış insan kaynaklı pluripotent kök hücelere 14 gün boyunca serum olmayan medyumda *in situ* ve *ex situ* olarak doksorubisin uygulanarak 4 organda (karaciğer, kardiyak, nöronal, kas) toksisite değerlendirilmiştir. Yan etki olarak hepatotoksisite gözlenmiştir. Üre ve albümin seviyelerine etkisi görülmemiştir. Kas hücrelerinin %60'ında kontraktilite azalmıştır. Nöronal sistemin sağlıklı ve fonksiyonel kaldığı görülmüştür (Oleaga ve ark., 2016).

Doksorubisinin (20 mg / kg, ip) olumsuz etkilerin en yaygın nedeni olan intestinal epitelin bozulması, C57BL/ 6N farelerinde, artan TLR4 sinyaline yol açan bağırsak mikropları ile ilişkili sistemik inflamasyon ve çoklu organ hasarına neden olan immünotoksisiteye yol açan endotoksin salınımına neden olmaktadır (Wang ve ark., 2016). 200-250 g ağırlığındaki *Wistar Kyoto* erkek sıçanlarına 2 mg/kg, intraperitoneal enjeksiyonu sonucu kalp, karaciğer, böbrek ve testiste belirgin tıkanıklık ve dejeneratif değişiklikler ile sonuçlanmıştır (Shivakumar ve ark., 2012). Başka bir çalışmada, 250-300 g ağırlığındaki 50 erkek Sprague Dawley sıçanlarına 20 mg/kg intraperitoneal doksorubisin enjeksiyonu sonucu alanin transaminaz, aspartat aminotransferaz, total kolesterol ve kan üre azotu gibi biyokimyasal parametrelerde değişiklikler gözlemlenmiştir (Othman ve ark., 2014). Yapılan çalışmalarda doksorubisinin çoklu organ toksisitesini desteklediği bildirilmiştir.

2.3.3.2. Oogenezis ve Kadın İnfertilitesinde Toksisite

Bir kadının spontan gebe kalabilmesi yeterli ovaryan fonksiyon, hipotalamik-hipofizer-ovaryan aksa, uterusu ve ayrıca organların geri kalanının gebe bedene uyum sağlayabilmesine bağlıdır. Kanser ve tedavileri, yukarıdaki faktörlerin herhangi birini bozabilir. Yaşamlarının dördüncü dekadında kanser tedavisi gören kadınların yaklaşık yarısı menstrüel sikluslarında durma yaşar (Goodwin ve ark., 1999). Bununla birlikte, normal menstrüel sikluslarının devam etmesi gebe kalma yeteneğini garanti etmez. Antikanser tedavisinden sonra normal menstrüel siklusu başlayan 35 yaşındaki kadınların yaklaşık % 40'ının infertil olduğu görülmüştür (Letourneau ve ark., 2012).

Kemoterapinin gonadal etkileri uzun sürmektedir (Louis ve ark., 1956). Gonadotoksik ilaçlar folliküler büyümeyi inhibe edebilir; özellikle alkilleyici ajanlar, küçük folliküllerde lethal lezyonları indüklemektedir (Falcone ve ark., 2004, Hawkins ve Steven, 1996). Gonadotoksik bir tedaviden sonra gözlenebilecek değişiklikler; matürasyon yetersizliği, kılcal malformasyon, kortikal fibrozis görülen ovaryum ve follikül sayısındaki azalmadır. Gonadal toksisite üzerine sitotoksik ajanların mekanizmaları, hızla bölünen hücreleri durdurarak folliküler maturasyonun bozulmasını veya durgun primordiyal folliküller üzerindeki doğrudan toksik etki veya ikisinin kombinasyonunu içermektedir (Mackie ve ark., 1996; Watson ve ark., 1985; W. H.B. Wallace ve ark., 1989). Follikül sayısındaki azalma, 41 yaşından önce menopoz olarak tanımlanan prematür ovaryan yetmezliğe yol açabilir ve östrojen üretimini azaltır. Ek olarak, amenore yokluğunda bile, oosit rezervinin azalması gebe kalma şansını azaltabilir. Bu noktada, ovaryan fonksiyon kalan oosit sayısına bağlıdır (Chiarelli ve ark., 2012).

Hasarın derecesi ilacın tipine, kümülatif dozlara, yaş ve hastaların tedavi öncesi gonadal durumuna bağlıdır (Mackie ve ark., 1996; Watson ve ark., 1985; W. H.B. Wallace ve ark., 1989). Folliküler rezerv yaşla birlikte hızla azaldıkça kemoterapötik ilaçlar daha ileri yaşlarda daha kolay menstrüel siklus anomalilerini indükler, düşük östradiol içeren amenore ve plazmada saptanan yüksek gonadotropinler ile sonuçlanır ve böylece gonadal toksisite kadınlarda yaş ile birlikte daha zararlı hale gelir. Bu nedenle, yaşlı kadınlar daha fazla kalıcı ovaryum yetmezliği riski altındadır.

Her ne kadar yeni ajanların ve hedeflenen tedavilerin fertilité üzerindeki etkisi hakkında bilgi yetersiz bulunsa da, anti-anjiyojenik ajan olan bevacizumab içeren kemoterapi rejimleri alan kolorektal kanserli kadın hastaların % 34'ünde ovaryan yetmezliğe neden olurken, bevacizumab içermeyen aynı rejimi alan hastalarda % 2'ye varan ovaryan yetmezliğe neden olabileceği bildirilmiştir. Ek olarak, tirozin kinaz inhibitörlerinin hayvan modellerinde teratojenik olduğu gösterilmiştir ve bu nedenle bu ajanları alan kadın hastalara tedavi sırasında gebelikten kaçınmaları şiddetle tavsiye edilir (Apperley, 2009).

Radyoterapinin ovaryum üzerindeki etkisi doz ve yaşa bağlıdır (Howell ve Shalet, 1998). Radyasyon terapisi hızla bölünen hücreleri olgunlaşan follikülleri ve primordiyal follikülleri etkilemektedir (D. Meirrow ve Nugent, 2001).

Meme ve servikal kanserler üreme çağındaki kadınlarda en sık görülen tümörlerdir. İnfertilite, cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi gibi terapötik müdahalelerin bir kombinasyonundan dolayı ovaryum yetersizliği amenore sonucu olabilir. Ayrıca, kalıtsal tümörlere sahip hastalarda fertilitate tehlikeye girebilir. Özellikle BRCA1 mutasyon taşıyıcılarının ovaryan rezervinin daha düşük olduğu belirtilmiştir (Titus ve ark., 2013).

Kanser prevalansındaki genel artış ve uzun süreli sağkalımdaki belirgin artış nedeni ile gonadotoksik kemoterapi ve radyoterapiye maruz kalan genç kadınlarda fertilitenin korunmasına dünya çapında ilgi gösterilmiştir. Geçtiğimiz 2 yılda, genç kadınları etkileyen malignitelerin birçoğu için hayatta kalma oranları önemli ölçüde iyileşmiştir. Bu malignitelerin çoğu için hayatta kalma oranları % 80-90'ı aşmaktadır (Zeev Blumenfeld, 2012). Bu nedenle kanser tedavisinin uzun süreli etkileri dünya genelinde ilgi çekmiştir ve kemoterapinin neden olduğu iyatrojenik infertiliteye karşı korunma yüksek önceliğe sahiptir. Kanser tedavisinin geç etkileri üreme endokrinologları, hematologlar, onkologlar, jinekologlar, endokrinologlar, romatologlar, pratisyen hekimler ve tüm sağlık hizmeti sağlayıcıları (W. Hamish B. Wallace ve ark., 2005) için dikkat çekicidir ve kemoterapinin neden olduğu iyatrojenik infertiliteye karşı korunma, yüksek önceliğe sahiptir.

Kemoterapi, radyoterapi veya her ikisi birden, reproduktif fonksiyonları kalıcı olarak bozabilir (Madsen ve ark., 1995). Folliküler hasarın bir sonucu olan yüksek oranda prematür ovaryan yetmezlik (POF) meydana gelir ve kadın fertilitate koruyuculuğu önem kazanmaktadır (Familiari ve ark., 1993). 25 yaşındaki kadınların %50' si ve 25 yaş altındaki kadınların %20' sinde mekloroetamin, vinkristin, prokarbazin ve prednizon (MOPP) ile tedavi sonrası POF gelişebilir (Schilsky ve ark., 1981).

Her ne kadar sitotoksik kaynaklı hasar, hızla bölünen hücrelere sahip diğer dokularda (yani kemik iliği, gastrointestinal sistem ve timus) geri dönüşümlü olabilse de, fetal yaşam boyunca sabit olan germ hücre sayısının genellikle ovaryumda geri dönüşümsüz olduğuna inanılmaktadır (Zeev Blumenfeld, 2012).

İnfertilite, genç kadınlarda lenfoma, lösemi ve diğer maligniteler için verilen kombine kemoterapisinin uzun vadeli sonuçlarından biridir (Zeev Blumenfeld, 2012).

2.3.3.3. Kemoterapinin Gonadotoksitesisi

Çeşitli kemoterapötik ajanların gonadotoksik etkisi farklıdır, patofizyolojik mekanizmalar içerebilir ve kesin olarak anlaşılamamıştır. Kadının yaşına, kemoterapötik rejimine ve mevcut primer follikül sayısına (ovaryum rezervi) bağlıdır. Gonadotoksik etki, temel hücresel işlemlere ara verilmesi ve hücre proliferasyonunun engellenmesiyle oluşabilir (Fleischer ve ark., 2011). Alkilleyici ajanlar, deoksiribonükleik asit (DNA) iplikçikleri arasında kovalent bağlar oluşturabilir, DNA replikasyonu sırasında etki ederek hücre bölünmesinde bozukluk meydana getirebilir. Kemik iliği, gastrointestinal sistem ve büyüyen ovaryum follikülleri gibi çoğalan hücrelere rağmen, alkilleyici ajanların toksik etkisine karşı daha savunmasızdır, bu ajanlar, hücre döngüsüne spesifik olmadıkları için dinlenme evresindeki hücrelerde sitotoksik olabilir (Dann ve ark., 2005; Fleischer ve ark., 2011; Maltaris ve ark., 2007; Von Wolf ve ark., 2011; Z Blumenfeld, 2002). Alkilleyici ajanların ve siklofosamid tedavisinin doza bağımlı olarak doğrudan oosit yıkımına ve folliküler tükenmeye neden olduğu gösterilmiştir (Fleischer ve ark., 2011; Sudman ve ark., 1992; Von Wolff ve ark., 2011; Yucebilgin ve ark., 2004). Alkilleyici ajanlar folliküler tükenmeye ek olarak, kortikal fibroz ve kan damarı hasarına neden olabilir (D. Meirov ve Nugent, 2001; Fleischer ve ark., 2011).

Diğer kemoterapötik ajanlar, antrasiklinler gibi antibiyotikleri içerir. Doksorubisin bu grupta en bilinen ve en yaygın kullanılanıdır. Platin ajanlar (yani karboplatin, platinol, paklitaksel ve sisplatin) kadınlara özgü mutajenlerdir (Dror Meirov, 1999; D. Meirov ve Nugent, 2001; Fleischer ve ark., 2011). Bu ajanlar, delesyon, halka oluşumları ve DNA yeniden düzenlenimi gibi diskarriozise yol açan kromozomal aberasyonlara neden olabilir, embriyotoksitesite ve embriyonik ölüme yol açabilir (Fleischer ve ark., 2011; Sudman ve ark., 1992). Kemoterapi kombinasyonları, özellikle alkilleyici ajanlar içerenler kortikal fibrozise, ovaryum atrofisine ve kan damarlarının hasar görmesine bağlı olarak folliküler tükenmeye neden olur ve böylece Prematür Ovaryan Yetmezlik (POF) görülür (Zeev Blumenfeld, 2012).

2.3.3.4. Gebeliğe Etkisi

Kemoterapi hastalarında gonadotoksik etkiden birkaç yıl sonra elde edilen gebeliklerde artmış fetal malformasyon veya gebelik kaybı yoktur. Bununla birlikte,

gebe kadınların özellikle embriyonik ve fetal organogenez sırasında ilk trimesterde kemoterapiye maruz kalmaları artan fetal anomaliler, düşük ve intrauterin fetal ölüm riski ile ilişkilidir (Dror Meiorow ve ark., 2010; Fleischer ve ark., 2011; Zeev Blumenfeld, 2008). Bu nedenle, kemoterapiden sonraki ilk 2 yılda gebe kalımının engellenmesi önerilmektedir. Folliküllerinin büyümesi insanlarda primordiyalden metafaz II aşamasına kadar 3-9 ay sürebildiği için oositler follikülogenez, büyüme ve fertilizasyon aşamalarında kemoterapiye maruz kalmış olabilirler (Alain Gougeon, 1996; A. Gougeon, 2010). Kemoterapiyi tamamladıktan sonraki ilk 2 yıldaki gebelikten kaçınmanın bir başka nedeni de nükslerin ilk 2 yıl içerisinde tespit edilmesidir. Kemoterapiden sonraki 1 yıl içinde fetal malformasyonların ve gebelik kaybının önemli ölçüde arttırılabileceğini öngören kemirgen çalışmaları mevcuttur. Bu nedenle, kemoterapi ve radyoterapinin kullanılan maddeye ve gamet matürasyon aşamasına bağlı olarak oositlerde genetik defektlere neden olabileceği sonucuna varılmıştır (Dror Meiorow ve ark., 2010; Dror Meiorow ve Schiff, 2005). Aslında, tedaviden birkaç ay sonra ortaya çıkan gebeliklerde, cenin ölümü ve malformasyon oranlarında artış bildirilmiştir (Dror Meiorow ve ark., 2010; Dror Meiorow ve Schiff, 2005). Bunun yanı sıra, gonadotoksik tedaviden 2 yıl sonra abortus ve yenidoğan konjenital anomalilerinde artış olmadığı görülmüştür (Dror Meiorow ve ark., 2010; Dror Meiorow ve Schiff, 2005).

2.4. *Allium* Sebzeleri Hakkında Genel Bilgiler

Geleneksel tıpta *Allium* sebzeleri yüzyıllardır kullanılmaktadır (R S Rivlin, 2001). Son zamanlarda yapılan bilimsel araştırmalar *Allium* sebzelerinin ve bileşenlerinin kardiyovasküler hastalık ve diyabet riskini azalttığını, bağışıklık sistemini stimüle ettiğini, enfeksiyonlara karşı koruduğunu ve anti-aging etkinin yanı sıra anti-kanser etkiye de sahip olduğunu göstermiştir (K. C. Agarwal, 1996; Milner, 2001; Rahman, 2001; R S Rivlin, 2001). *Allium* sebzelerinin anti-kanser etkileri, popülasyona dayalı vaka kontrol çalışmalarından elde edilen epidemiyolojik verilerle desteklenmektedir. Örneğin, You ve ark., 1989 564 hasta ve 1131 sağlıklı kontrol içeren popülasyon bazlı bir vaka kontrol çalışmasında *Allium* sebze alımı ile mide kanseri riski arasındaki ilişkiyi incelemiştir. *Allium* sebze alımının en yüksek çeyreğindeki denekler, en düşük çeyreğe kıyasla mide kanseri gelişme riskini önemli ölçüde düşürmüşlerdir (You ve ark., 1989). Benzer şekilde, Shanghai' da yapılan bir

başka populasyon temelli vaka kontrol çalışmasında, Çin'deki *Allium* sebze alımının prostat kanseri riski üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir (Hsing ve ark., 2002). Bu çalışmanın sonuçları, *Allium* sebze alımının prostat kanseri riski ile ters ilişkili olduğunu göstermiştir (Hsing ve ark., 2002). Bu örnekler *Allium* sebzelerinin kanser riskine karşı koruyucu etkisini göstermeye yardımcı olurken (Hsing ve ark., 2002; You ve ark., 1989), Shukla ve Kalra (Shukla ve Kalra, 2007) tarafından yoğun olarak gözden geçirilen epidemiyolojik çalışmalarda diğer bazı kanser türleri içinde benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Bu epidemiyolojik çalışmalar, son yirmi yılda yapılan ve yalnızca *Allium* sebzelerinin kanser karşıtı etkilerinden sorumlu olan fitokimyasalların tanımlanmasının yanı sıra, etki mekanizmalarının açıklanmasına yönelik yoğun araştırmaları tetiklemiştir.

2.4.1. Sarımsağın İçeriği

Taze sarımsak, çeşitli organosülfür bileşikleri, iz elementler, fenolik ve steroidal kökenli bileşiklerin yanı sıra karbonhidratlar, proteinler ve lif içerir (Lanzotti, 2006; Shukla ve Kalra, 2007). Çözünürlük temelinde, içerikler iki gruba ayrılır. Bir grup, dialil disülfid (DADS) ve diallil trisülfid (DATS) gibi lipitte çözünebilir alil sülfür bileşikleridir. SAC ve S-alilmerkaptosistein gibi diğer g-glutamil S-alilistein (SAC) grupları ise suda çözülebilen bileşiklerdir (Thomson ve Ali, 2005).

Sarımsak, yüksek organosülfür içeriği ile karakterize edilir. Kükürt esas olarak g-glutamil peptidleri ve allilsistein sülfoksitleri içerir. Kesildiğinde, doğrandığında veya sıkıldığında, alliin; ana allilsistein sülfoksit, alliinazın etkisiyle allisine metabolize edilir. Allisin kendiliğinden reaktif bir bileşendir ve kolayca polisülfidler gibi daha kararlı bileşiklere dönüştürülür (Bergès ve ark., 2004).

2.4.2. *Allium* Sebzelerinde Anti-Kanser Fitokimyasalları

Yıllar boyunca yapılan araştırmalar, *Allium* sebzelerinin kanser karşıtı etkilerinin, işlendiklerinde (kıyma, çiğneme vb.) sebzelerden salgılanan organosülfür bileşikleri (OSC) kaynaklı olabileceğini ortaya koymaktadır (Block, 2010). İntakt *Allium* sebzelerinde S-alkil(en)il-L sistein sülfoksit (alliin) hidrolize ve oksidize edilen γ -glutamil-S-alk(en)il-L-sisteinler primer sülfür bileşikleridir (Block, 2010). Alliin kokusuz OSC prekürsürüdür ve *Allium* sebzelerinin depolanması sırasında doğal olarak birikir (Block, 2010). OSC'ler allinin allicine ve *Allium* sebzelerini ezme,

çiğneme veya kesme aracılığıyla vakuollerden salınan allinaz aracılığıyla alkil alken-thiosulfınatlarla dönüşmesiyle oluşmaktadır. Allisin ve ilgili tiyosulfınatlar, oldukça dengesizdir ve anında diallil sulfıt (DAS), dialil disulfıt (DADS), dialil trisulfıt (DATS), diditinler ve ajoen (Block, 2010) dahil olmak üzere çeşitli sulfür bileşikleri elde etmek için ayrışır.

2.4.2.1. Organosulfür Bileşiklerinin Anti-Kanser Etki Moleküler Mekanizmaları

2.4.2.2. Karsinojen Metabolizmasının Modülasyonu

Karsinojenik kimyasallar; genellikle neoplastik aktiviteleri için sitokrom P450'ye bağılı monooksijenazların (faz 1 enzimleri) aracılık ettiği metabolik aktivasyonu gerektirir. Aktive edilmiş karsinojenik ara maddelerin inaktivasyonu, glutation transferazlar dahil olmak üzere faz 2 enzimleri ile gerçekleştirilir. Çalışmalar, OSC'lerin sadece faz 1 enzimlerini inhibe etmediğini, aynı zamanda faz 2 enzimlerinin ekspresyonunu da arttırdığını ortaya koymuştur (Block, 2010; Herman-Antosiewicz ve ark., 2007; Shukla ve Kalra, 2007). Örneğin, DAS ve metabolitleri dialil sulfoksit ve dialil sulfon sitokrom P-450 2E1'in aktivitesini zamana ve NADPH'ye bağılı bir şekilde inhibe etmektedir (Brady ve ark., 1991). Wattenberg ve arkadaşları, benzo [a] piren ile indüklenen ön mide ve akciğer kanseri farelerinde sarımsak OSC'leri uygulandığında hepatik ve hedef organ glutatyon transferaz aktivitesinin yükseldiğini gösterilmiştir (Sparnins ve ark., 1988). Böylelikle, OSC kimyasal olarak oluşturulmuş kanserlerin önlenmesinde sadece karsinojen aktivasyonunu inhibe ederek değil, aynı zamanda faz 2 enzimleri sayesinde aktive karsinojen ara maddelerin detoksifikasyonu arttırmaktadır (Block, 2010; Herman-Antosiewicz ve ark., 2007; Shukla ve Kalra, 2007).

2.4.2.3. Hücre Siklusu İlerlemesinin İnhibisyonu

Son yapılan çalışmalarda OSC'lerin neoplastik hücrelerde hücre döngüsü ilerlemesini durdurabildiğini gösterilmiştir. Knowles ve Milner (Knowles ve Milner, 2002), Cdk1/siklin B1 kompleksi kinaz aktivite supresyonuna izin veren siklin B1 ve siklin bağılı kinaz 1 (cdk1) arasındaki kompleks oluşumda bir artışa neden olan DADS ile muamele sonrası insan kolon kanseri hücrelerinin G2/M fazında arreste uğradığını belirten ilk araştırmacılarıdır. DADS ile indüklenmiş G2/M fazı hücre siklus arresti PC-3 prostat kanseri hücre hattı (Arunkumar ve ark., 2006), MGC80 insan mide kanseri hücre hattı (Yuan ve ark., 2004), A549 akciğer kanseri hücre hattı dahil

olmak üzere diğer hücre hatlarında da bildirilmiştir (Wu ve ark., 2005). Prostat kanseri hücrelerinde DATS aracılı G2/M fazı hücre siklusu arrestinin, reaktif oksijen türlerine bağlı hiperfosforilasyon ve hücre bölünme siklusu 25C (Cdc25) fosfataz yıkımı (Antosiewicz ve ark., 2006) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Prostat hücrelerinde DATS muamelesi sonucu ROS, c-Jun N terminal kinaz (JNK) aracılı demir depolama proteini ferritinin yıkımı ile değişen demir seviyelerinin artması nedeniyle oluşmaktadır (Dong Xiao ve ark., 2005). DATS ile muamele edilmiş hücreler genellikle kontrol noktası 1 (Chk1)-aracılı anafazı destekleyen kompleks/siklozom inaktivasyonuna bağlı olarak prometafazda arreste uğrarlar.

Kanser hücrelerinde hücre siklus arresti, suda çözünür sülfür bileşikleri de dahil olmak üzere diğer OSC'ler için de gösterilmiştir. Örneğin, S-alilmerkaptosistein (SAMC) tedavisi, SW-480 ve HT-29 insan kolon kanseri hücrelerinde ve NIH3T3 fibroblastlarında G2 ve/veya mitotik durma ile sonuçlanmıştır (Antosiewicz ve ark., 2006; Dong Xiao ve ark., 2005). Ayrıca, SAMC tedavisi interfaz hücrelerinde mikrotübül depolimerizasyonu, hücre iskeletinin yıkımı ve sentrozom fragmantasyonuna neden olmaktadır (Dong Xiao ve ark., 2005). Benzer şekilde ajoene HL60 hücrelerinde hücre iskeletinin yıkımıyla ilişkili olarak hücre iskeletinin G2/M fazında arreste neden olmuştur (Li, 2002). Allisin tedavisi insan meme kanseri hücrelerini hücre döngüsünün hem G0/G1 hem de G2/M evrelerinde durdurduğu gözlenmiştir (Hirsch ve ark., 2000). Bu çalışmalar, hücre siklusu arrestinin çeşitli OSC'lere ortak bir hücre sel cevap olduğunu göstermektedir.

2.4.2.4. Apoptozis İndüksiyonu

Çok sayıda araştırma, OSC' ler tarafından kanser hücre büyümesinin baskılanmasının, apoptoz indüksiyonu ile ilişkili olduğunu göstermektedir. OSC aracılı apoptozis ile ilgili ilk çalışmayı gerçekleştiren Milner ve arkadaşları, DADS ile tedavi edilen insan kolon kanseri hücrelerinde DNA fragmantasyonu ve apoptozu belirten diğer morfolojik değişiklikleri bildirmişlerdir (Sundaram ve Milner, 1996). Son birkaç yılda, OSC-aracılı apoptoz indüksiyon mekanizmaları yoğun araştırma konusu olmuştur. Çoğu çalışma, OSC aracılı apoptozun düzenlenmesinde Bcl-2 ailesi proteinlerinin rolünü göstermektedir. Örneğin, SH-SY5Y nöroblastom hücre hattında ve akciğer kanseri hücrelerinde DAS ve DADS aracılı apoptozun Bax/Bcl-2 oranındaki artışla korele olduğu gösterilmiştir (Hong ve ark., 2013; Karmakar ve ark.,

2007). DADS ile muamele edilmiş MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında, Bax protein seviyesindeki upregülasyonla birlikte Bcl-xL protein miktarında azalma gözlenmiştir (Nakagawa ve ark., 2001). HL-60 hücrelerinde ajoene ile indüklenmiş apoptoz kaspaz-aracılı Bcl-2 klivajıyla korele olduğu bildirilmiştir. PC-3 ve DU145 prostat kanseri hücrelerinde DADS ile muamele sonrası apoptotik indüksiyon DADS ve DADS ile karşılaştırıldığında daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (Dong Xiao ve ark., 2004). PC-3 ve DU145 hücrelerinde, DADS ile indüklenmiş apoptozis mitokondri-aracılı intrinsik kaspaz kaskadı aktivasyonu ve Bcl-2:Bax etkileşimini azaltan Bcl-2 azalması ve hiperfosforilasyonu korele olduğu belirtilmiştir (Dong Xiao ve ark., 2004). PC-3 ve DU145 hücrelerinde Bcl-2'nin DADS ile indüklenen hiperfosforilasyonu JNK ve daha küçük ölçüde ekstraselüler sinyalle düzenlenmiş kinaz 1/2 (ERK1/2) aracılığıyla olmaktadır (Dong Xiao ve ark., 2004).

2.4.3. Sarımsak Bileşenlerinin İşlevleri

Güçlü bir sarımsak bileşeni olan dialilsülfitin, testosteronun neden olduğu oksidatif stresi önlediği ve testosteron metabolizmasını hızlandırdığı bildirilmiştir. Prostat kanserinin erken evrelerinde, testosteron duyarlılığı korunduğunda, *Allium* türevlerinin baskın etkisiyle testosteron yıkımının stimüle edildiği ve daha sonraki aşamalarda sinyal transdüksiyonunu engellediği varsayılmıştır. Ayrıca sarımsak, topraktan selenyum biriktiren selenyumlu bir bitkidir. Selenyum, özellikle karsinogenezde rol alan genlerin kontrolünde birçok antikanser etkiye sahiptir. Primer olarak kanseri önlemenin yanı sıra, sarımsak kaynaklı *Allium* türevleri metastatik süreçleri de inhibe edebilir. Androjene bağımlı bir prostat kanseri fare modelinde, suda çözünür *Allium* türevi, S-allilmerkaptosistein, %90 akciğer ve adrenal bez metastazlarını inhibe ettiği bildirilmiştir (Richard S. Rivlin, 2009).

Bazı araştırmalar, sarımsağın kalıcı mantar enfeksiyonlarını inhibe etmede ve kulak enfeksiyonlarının tedavisinde özellikle etkili olduğunu göstermiştir. Sarımsaktaki allisinin, midenin doğrudan gastrointestinal kanserle ilişkili bir bakteri olan *Helicobacter pylori* proliferasyonundan korunmasına yardımcı olabileceği gösterilmiştir. Allisin ayrıca, ajoene adlı bir bileşiğe parçalanır. Ajoene, sarımsağın antikoagülan etkisine katkıda bulunmaktadır. Ateroskleroza neden olabilecek kan damarlarının tıkanmasını önleyen bileşik olabileceği düşünülmektedir (Adaki ve ark., 2016).

2.4.4. Sarımsağın Yararlı Etkileri

Sarımsak, en çok kardiyovasküler sistemi (lipid yönetimi, düşük kan basıncı, trombosit inhibisyonu ve düşük fibrinolitik aktivite), antineoplastik ve immünostimülan bir ajan olarak immün sistemi etkileyen çeşitli faydalı farmakolojik özelliklere sahiptir, ayrıca güçlü bir antioksidandır. Sarımsak, kolesterolü ve kan basıncını düşürmek, atherosklerozun ilerlemesini geciktirmek, kalp hastalığını önlemek, dolaşımı iyileştirmek, kanseri önlemek ve bölgesel tinea enfeksiyonları için kullanılmaktadır (Adaki ve ark., 2016).

Hayvan çalışmaları sarımsağın mevcut plak birikintilerinin boyutunu azaltarak tıkanmış arterleri iyileştirebileceği göstermiştir. Sarımsak ayrıca meme, kolon ve özefagus kanserinin önlenmesine de yardımcı olmaktadır. Ayrıca sarımsak takviyelerinin, kalp, karaciğer ve diğer hayati organlara, dokulara zarar verebilecek glutasyonun tükenmesini ve kemoterapiyle ilişkili serbest radikal aktivitenin artmasını önleyerek kemoterapi gören hastalara da faydalı olabileceği belirtilmiştir. Sarımsak, antibiyotik, antiviral ve antifungal, antihistaminik, antikoagülan, balgam söktürücü, antibakteriyel, anti-parazitik, diyaforetik, diüretik ve antispazmodik özelliklere sahiptir (Adaki ve ark., 2016).

2.4.5. Sarımsağın Etki Mekanizmaları

Birkaç eylem şekli önerilmiştir. Bunlar:

- İlaç metabolize edici enzimler üzerindeki etki; glutasyon transferazlar, kinin redüktaz, epoksit hidrolaz ve toksik maddeleri etkisiz hale getiren ve atılımlarını kolaylaştıran glukuronosil transferaz dahil olmak üzere faz II detoksifikasyon enzimlerinin indüklenmesi,
- Antioksidan aktivite; sarımsak preparatları, radikal temizleme aktivitesi sergiler ve tümör gelişiminin oksijen radikallerini içerebileceği gözlem ışığında ilgili olan lipit peroksidasyonunu azaltır,
- Prostat karsinomu hücreleri de dahil olmak üzere birçok karsinom hücre hattında belgelenen tümör büyüme inhibisyonu,
- Hücre döngüsünün G2/M fazında bloke edilen hücrelerin yüzdesinde bir artışla çakışan apoptoz indüksiyonu (muhtemelen p34cdc2 kinazdaki bir durgunluk yoluyla) (Izzo ve ark., 2004),

- İmmün cevabın etkili bir şekilde uyarılması; Organosülfür bileşimler (OSC), lenfositlerin ve makrofaj fagositozunun proliferasyonunu uyarır, transplant edilmiş tümörlerde makrofajların ve lenfositlerin infiltrasyonunu indükler, tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ve interferon- γ , doğal öldürücü hücreyi, öldürücü hücreyi ve lenfokinle aktive olmuş öldürücü hücre aktivitesini artırır (Izzo ve ark., 2004).

2.4.6. Sarımsak Preparasyon Tipleri

Sarımsak esansiyel yağları, sarımsak yağ maseratı, sarımsak tozu ve olgun sarımsak ekstraktı (AGE) olmak üzere dört çeşit sarımsak preparasyonu mevcuttur. Bazı ürünlerin, ürünün ne zaman yapıldığına bağlı olarak farklı miktarlarda aktif bileşen saldığı gösterilmiştir. Allisin son derece dengesizdir ve sarımsağın nasıl hazırlandığına bağlı olarak diallil sülfid (DAS), DADS, DATS, ajoenes ve trisülfürler, vinil dithiinler ve diğer kükürt bileşikleri gibi yüzlerce organosülfür bileşiğine ayrılmaktadır (Adaki ve ark., 2016).

2.4.7. Antikanser Etkisi

Hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalar, bu ayrı ayrı bileşiklerin hayvan modellerinde sadece deri, özofagus, mide, kolon, karaciğer, akciğer ve meme kanseri büyümesini baskılamadığını, aynı zamanda kolon, akciğer, lösemi, deri, meme ve prostat gibi çeşitli kanser türlerinden (PCa) *in vitro* olarak türetilen hücre hatlarının çoğalmasını doğrudan inhibe ettiğini göstermiştir (Thomson ve Ali, 2005). Örneğin, peritoneal olarak DADS ile enjekte edilen çıplak farelerde kolon kanseri ksenograftının kontrol grubuna göre büyümesi %69 oranında engellemiştir (P <0.05) (Sundaram ve Milner, 2018). Ek olarak, DATS, Bcl-2 proteininin down-regülasyonu ve ekstraselüler sinyal regüle edilmiş kinaz 1/2 (ERK) ve c-Jun N-terminal kinaz (JNK) yolaklarının aktivasyonu yoluyla apoptozun indüklenmesi PCa hücre hatlarının proliferasyonunu önleyebilmektedir (Dong Xiao ve ark., 2004). Son zamanlarda, SAMC'nin, apoptoza yol açan JNK1 ve kaspaz 3 sinyal yolaklarını tetikleyen mikrotübül yıkımı aracılığıyla kolon kanseri hücrelerinde proliferasyonu önleyici etki gösterdiği gösterilmiştir (Danhua Xiao ve ark., 2003). Bu kanıtlar, kanser önleyici etkilerine ek olarak, sarımsak türevlerinin, insan primer kanserlerinin tedavisinde etkili ajanlar olarak da kullanılabilereğini göstermektedir.

E ve C vitaminleri ile birlikte sarımsak, Çin'deki geniş bir popülasyonda kanser öncesinde mide lezyonları insidansını azaltmıştır (Blot ve ark., 1993). Sarımsak

türevlerinin, DNA katılımı, serbest radikallerin atılması, mutagenез, hücre proliferasyonu, farklılaşma ve anjiyogenez dahil karsinogenezde çok sayıda moleküler mekanizmayı etkilediği görülmüştür (Richard S. Rivlin, 2009). Kanser hücrelerinin büyüme hızı, sarımsak tarafından özellikle G2/M fazında meydana gelen hücre siklus blokajı ile azaltılmaktadır. Apoptosis sarımsak tarafından uyarılmaktadır (Dong Xiao ve Singh, 2006).

Sarımsak, mide kanseri riskinin azalmasıyla ilişkili epidemiyolojik çalışmalarda ve hayvan modellerinde, antitümör aktivitesinin sarkom, meme karsinomu, hepatom, kolon kanseri, deri ve özefagus skuamöz hücreli karsinoması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu etkilere çeşitli mekanizmaların aracılık ettiği görülmektedir. Kimyasal karsinojenlerin uygulanmasından sonra malign transformasyonun önlenmesi, sarımsağın sitokrom P450 enzimleri üzerindeki etkisi, antioksidan aktivite veya sarımsak içindeki kükürt bileşiklerine bağlanarak detoksifikasyon üzerindeki prokarsinojen aktivasyonunun inhibisyonundan kaynaklanabilir. Kanser hücre büyümesinin doku kültüründe doğrudan inhibisyonu, sarkomun yanı sıra mide, kolon, mesane ve prostat karsinomu hücre hatlarında da gösterilmiştir (Lamm ve Riggs, 2018). 1066 kontrol ve 395 özofagus kanserli hasta; 1297 kontrol ve 527 larenks kanserli hasta; 1772 kontrol ve 749 oral kanserli hasta; 2411 kontrol ve 1031 ovaryum kanseri hastası; ve 1534 kontrol ve 767 renal hücreli kanser hastası ile yapılan çalışmada yüksek oranda sarımsak kullanımının deneklerdeki kanser azalımı ile pozitif ilişkili olduğu bildirilmiştir (Ji ve Kwon, 2009).

2.4.8. Kemoprevensiyon

Birçok epidemiyolojik çalışma, sarımsağın koruyucu rolünü ve insan kanserlerinin gelişiminin *Allium* besinleriyle ilişkisini destekler. Doğal sarımsak ve selenyumla birlikte kültüre edilerek yetiştirilen sarımsakların, kanserin önlenmesinde koruyucu rolleri olduğu hayvanlarda gösterilmiştir. Bazı organoselenium bileşikleri ve bunların sülfür analogları bitkilerde tanımlanmıştır. Organoselenium bileşikleri kemopreventif etkinlik için kükürt analogları ile karşılaştırılmış, Dialilil selenoid, sıçanlarda 7, 12-dimetilbenz(a)antrasen (DMBA)-indüklü meme adenokarsinomlarına karşı korunmada DAS'dan en az 300 kat daha etkili bulunmuştur. Sarımsak ekstraktları, lipitlerin oksidatif modifikasyonunu inhibe etmekte, böylece hücreleri oksitlenmiş moleküller tarafından zarar görmekten korumaktadır. Sarımsak tedavisi

yapılan farelerde, deri karsinogenezinin indüklenmesinden önce ve sonra, sarımsağın en iyi kemopreventif etki gösterdiği görülmüştür. Sarımsak alımı, hayvanlarda deri papillomlarının oluşumunu geciktirmiş ve aynı zamanda tedavi edilen farelerin deri histolojisine de yansıyan papillomların boyutunu ve sayısını düşürmüştür (El-Bayoumy ve ark., 2018).

Sarımsak türevli ürünlerin kanser kemopreventif etkilerini açıklamak için çeşitli mekanizmalar çalışılmıştır. Bunlar, kanserojenleri aktive eden, detoksifiye eden, antioksidan ve serbest radikalleri temizleyen, hücre proliferasyonunun, apoptozun ve immün yanıtların düzenlenmesini önleyen çeşitli metabolize edici enzimlerin aktivitesinde modülasyonu içermektedir. Sarımsak kaynaklı ürünlerin, hücre sinyal yollarını modüle ettiğini, böylece kanser terapötik etkilerinin yanı sıra güçlü kanser kemopreventif etki sağladığını göstermektedir (Shukla ve Kalra, 2007).

Sarımsak bileşikleri kanser hücre proliferasyonunda, G2/M fazı arrestine, proteinlerin Bcl-2 ailesi oranı ve anti-anjiyojenik aktiviteyi değiştirerek apoptozun indüklenmesine neden olabilir. Toplu olarak, klinik öncesi araştırmalar, sarımsak ve ilgili sülfür bileşikleri aracılığıyla kanser kemoprevensiyonunu sağladığı bunun yanı sıra kullanıldığı organ bölgesinden ya da kullanılan karsinojenden bağımsız olduğu gösterilmiştir (Ray ve ark., 2009).

2.4.9. Antioksidan Etkileri

Olgun (AGE), fakat taze olmayan sarımsak antioksidan etkilere sahiptir. Sarımsak, serbest radikalleri temizleyerek, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidazı ve hücrel glutatyonu artırarak antioksidan etkiler gösterir. Sarımsağın bu etkileri, kardiyovasküler, antineoplastik ve kognitif etkiler üzerinde rol oynayabilir. AGE ile yapılan in vitro ve hayvan çalışmalarında, bronobenzen gibi çevresel maddeler tarafından oluşan karaciğer toksisitesine ve doksorubisin kaynaklı kardiyotoksisiteye karşı koruma sağladığı ve yaşa bağlı mekansal bellek açıklarını iyileştirdiği gösterilmiştir (Adaki ve ark., 2016).

Sarımsakta bulunan antioksidanlar, kansere neden olan serbest radikal kaynaklı hücre hasarına karşı koruma sağlamaktadır. Antioksidanlar, serbest radikallerin zararlı etkilerini etkisiz hale getirebilir ve zamanla ortaya çıkardıkları zararın en aza indirilmesine veya ortadan kaldırılmasına yardımcı olabilir (Adaki ve ark., 2016).

2.4.10. İmmünmodulasyon

Sarımsak ekstraktının, NK hücre hassasiyetine ve dirençli hücre hatlarına karşı insan periferal kan lenfositlerinin sitotoksitesini arttırdığı gösterilmiştir. Lau ve arkadaşları, sarımsak, makrofaj (oksidatif patlama) ve T lenfosit (blastogenez) fonksiyonlarını artırabileceğini göstermiştir (S. S. Agarwal ve Singh, 1999).

Sarımsak in vitro insan modelinde IL-6'yı azaltmaktadır. Sarımsaktaki hipokolesterolemik, antioksidan ve ACE inhibisyon aktivitesinin yanı sıra, IL-6 üzerindeki etki ve kardiyovasküler aktivite hakkında fikir verebilir. Aynı modelde, sarımsak pro-enflamatuar sitokin IL-1'i de düşürmüştür. IL-1'in pankreatik β -hücrelerinin yıkımına katıldığı ve sarımsak uygulanmış murin modellerinde hipoglisemik etki ve alloksan indüklü diyabeti iyileştirdiğini göstermektedir. IL-1 inhibisyonu bu aktiviteden kısmen sorumlu olabilir (S. S. Agarwal ve Singh, 1999). Sarımsak pro-enflamatuar sitokinleri IL-1, TNF ve IL-8'i azaltma ve IL-10 sekresyonunu (proinflamatuar sitokinlerin bir antagonisti) uyarma potansiyeline sahiptir. Hodge ve arkadaşları, sarımsağın antimikrobiyal aktivitesi ile birlikte, bu etkinin, enflamatuar barsak hastalıklarında sarımsak kullanımı için potansiyel mekanizmalar sağlayabileceği sonucuna varılmıştır. IL-10, Alzheimer hastalığı gibi beyin enflamatuar hastalıklarının immüno-patolojisinin modülasyonunu gösterir ve sitokin modülatörü olarak sarımsak için başka bir potansiyel kullanım sağlar (Spelman ve ark., 2006).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) tarafından 16/01/2018 tarihinde 2018-01/05 no'lu kararı ile onaylanmış olup, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı parafin ve immunohistokimya laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.1. Deney Hayvanları ve Gruplandırma

Çalışmada Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme Merkezi'nden temin edilen 2,5-3 aylık 200-250 g ağırlığında 35 adet Wistar Albino cinsi erişkin dişi sıçan kullanıldı. Deney hayvanları standart kafeslerde tutulup, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda barındırıldı. Hayvanların beslenmesi için standart yem ve musluk suyu verildi.

Doksorubisin toksisitesi oluşturmak amacıyla serum fizyolojikte çözülen formu (Adrimicin) kullanıldı. Doksorubisin serum fizyolojik (SF) içerisinde çözülerek intraperitoneal (i.p) (S. Xiao ve ark., 2017) enjeksiyon ile, DDS mısır yağı (Pedraza-Chaverrí ve ark., 2003) içerisinde çözülerek i.p enjeksiyon (Di ve ark.,2015) ile uygulandı.

35 adet *Wistar albino* cinsi dişi sıçan her grupta 7 adet sıçan olmak üzere 5 gruba ayrıldı. Tüm sıçanlardan ilaç uygulaması (doksorubisin ve dialil disulfit) ve ovaryum diseksiyonunun, ovaryan siklusun aynı periyodunda yapılabilmesi için, her iki uygulama öncesi vaginal smear alınarak östrus evresi belirlendi. İlaç dozlarını belirlemek için sıçanların vücut ağırlıkları belirlendi. Sıçanların gruplara göre ağırlık ortalamaları ve standart sapmaları Grup I için $200\pm 4,11$, Grup II için $208\pm 8,25$, Grup III için $214\pm 4,41$, Grup IV için $207\pm 7,18$, Grup V için $209\pm 6,74$ olarak belirlendi. Çalışma 5 gruptan oluştu.

Grup I (Kontrol-Doksorubisin Grubu): Bu gruptaki 7 adet sıçana hayvanın ağırlığına göre 7 gün boyunca i.p olarak serum fizyolojik (SF) uygulandı. SF volümü deney gruplarında ilaçları dilüe etmek amacıyla kullanılan SF miktarı dikkate alınarak belirlendi (n=7).

Grup II (Kontrol-Dialil disülfid Grubu): Bu gruptaki 7 adet sıçana 7 gün boyunca i.p olarak 0,5 ml mısır yağı uygulandı (n=7).

Grup III (Doksorubisin Uygulanan Grup): Bu gruptaki 7 adet sıçana 7 gün boyunca 3 mg/kg/gün (0,008 mM/7 gün) doksorubisin (10 mg/kg- 5 ml enjeksiyonluk su) i.p olarak uygulandı (n=7).

Grup IV (Dialil disülfid Uygulanan Grup): Bu gruptaki 7 adet sıçana 7 gün boyunca i.p olarak 0,5 ml mısır yağı içerisinde 50 mg/kg dialil disülfid uygulandı (n=7).

Grup V (Doksorubisin + Dialil disülfid Grubu): Bu gruptaki 7 adet sıçana 3 mg/kg/gün (0,08 mM/7 gün) doksorubisin (10 mg/kg- 5 ml enjeksiyonluk su) i.p uygulandıktan, 2 saat sonra 0,5 ml mısır yağı içerisinde 50 mg/kg dialil disülfid/7 gün boyunca i.p olarak uygulandı (n=7).

3.2. Doku Diseksiyonu

Sıçanlara 7 gün ilaç uygulandıktan sonra, 8. gün ovaryan sikluslarının östrus periyodunda eter anestezisi altında perfüzyon fiksasyon uygulandı. Fiksatif olarak fosfat tamponuyla hazırlanan %4'lük paraformaldehit kullanıldı. Ovaryum diseksiyonu sonrası aynı fiksatif içerisinde 48 saat boyunca sağ ve sol ovaryum dokularına immersiyon fiksasyonu uygulandı. Fiksasyon sonrası ovaryum dokuları ışık mikroskopik ve immünohistokimyasal inceleme için doku takibine alındı.

3.3. Işık Mikroskopik İnceleme

Tüm gruplardan alınan ovaryum dokuları fiksasyon sonrası doku takibi işlemine tabii tutuldu (Tablo 1).

Tablo 1. Doku takibi basamakları

Sıra	İşlem	Süresi
1	%50'lik alkol	2 saat
2	%70'lik alkol	2 saat
3	%90'lik alkol	2 saat
4	%96'lik alkol-I	2 saat
5	%96'lik alkol-II	Gece boyu
6	Ksilen-I	1,5 saat
7	Ksilen-II	1,5 saat
8	Parafin-I	1,5 saat
9	Parafin-II	1,5 saat
10	Parafin-III	1 saat
11	Parafine Gömme	

Parafin bloklardan Leica RM2245 mikrotom ile alınan 5 µm kalınlığında seri kesitler rastgele örnekleme yöntemiyle seçilerek lamlara alındı. En az 4 sekonder follükülün bulunduğu kesit başlangıç kesiti olarak kabul edilerek 10'ar kesit (50µm) atlandı ve Hematoksilen-Eozin (H&E) boyaması için 5 kesit, TUNEL boyaması için 2

kesit belirlendi. Morfolojik değerlendirme için, her bir doku bloğundan alınan 5 adet kesitte H&E boyaması yapıldı. İmmunohistokimyasal boyama için, her bir doku bloğundan alınan 3 adet kesit poly-l-lysine kaplı lamlara alındı.

3.4. Hematoksilen-Eozin Boyama ve Morfolojik Değerlendirme

H&E boyaması için alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler 60°C'lik etüvde (Isokal EN 500) gece boyunca bekletilip, ksilen ile deparafinize edildikten sonra boyama protokolü uygulandı (Tablo 2).

Tablo 2. H&E boyama protokolü

Sıra	İşlem	Süre
1	%96'lık alkol	3 dakika (dk)
2	%90'lık alkol	3 dk
3	%70'lik alkol	3 dk
4	Çeşme suyu	3 dk
5	Harris'in Hematoksileni	10 dk
6	Çeşme suyu	Suyun rengi şeffaflaşana kadar
7	Asit alkol	1-2 dips
8	Çeşme suyu	3 dk
9	Amonyaklı su	1-2 dips
10	Çeşme suyu	3 dk
11	Eozin	2-5 dk
12	Çeşme suyu	Suyun rengi şeffaflaşana kadar
13	%70'lik alkol	10 dips
14	%90'lık alkol	10 dips
15	%96'lık alkol	10 dips
16	Ksilen-I	20 dk
17	Ksilen-II	20 dk
18	Kapatma	

H&E ile boyanan rastgele seçilen 5 kesitte folliküllerin morfolojik sınıflandırılması yapıldı. Folliküller granüloza hücre şekli ve hücre katman sayısı göz önüne alınarak sınıflandırıldı (Ross, 2011). Bu sınıflandırmaya göre;

- Oositi çevreleyen yassı tek sıralı granüloza hücreleri ile çevrili follikül **primordiyal follikül (A)**
- Tek sıralı kübik granüloza hücreleri içeren follikül **unilaminar primer follikül (B)**
- Üç sıradan fazla kübik granüloza hücreleri ile çevrili ve granüloza hücreleri arasında henüz boşluk (antrum) oluşmamış olup, teka tabakası belirginleşmeye başlayan folliküller **multilaminar primer follikül (C)**
- 5 ya da daha fazla sıralı kübik granüloza hücreleri içeren ve bu hücreler arasında antral boşluklar bulunan, teka interna ve eksterna tabakaları daha belirgin olan folliküller **sekonder follikül (D)**
- Çap olarak en geniş olan ve antral boşluğun daha da iyi geliştiği, primer oositi çevreleyen kumulus ooforusun belirginleştiği follikül **graaf follikül (E)** olarak

isimlendirildi (Tablo 3).

Tablo 3. Folliküllerin morfolojik sınıflandırması

FOLLİKÜL SINIFLARI	ADLANDIRMA	TANIM
A	Primordiyal Follikül	tek katlı yassı granüloza hücre (GH) katmanı
B	Unilaminar Primer Follikül	tek katlı kübik (GH) katmanı
C	Multilaminar Primer Follikül	3≤ sıralı kübik (GH) katmanı
D	Sekonder Follikül	5≤ sıralı GH'li antral boşluklu, belirgin teka tabakalı
E	Graaf Follikül	kumulus-ooisit kompleksi, antral boşluk ve belirgin teka tabakalı

H&E ile boyanan kesitlerin histolojik değerlendirmesi Olympus BX–FLA Reflected Light Fluorescence Attachment adapte edilmiş Olympus BX50 mikroskopla 40X objektif kullanılarak dijital kamera (Olympus DP71 CCD renkli kamera, 1,5 million pixel) ile bilgisayar ekranına alınan görüntüler üzerinde gerçekleştirildi. Mikroskopik inceleme esnasında tüm preparatlarda her gruptan görüntüler alındı.

3.5. TUNEL Yöntemi

Apoptotik hücreleri belirlemek için DNA kırık uç işaretleme yöntemi ile in situ apoptozis belirleme kiti kullanıldı (Roche, In Situ Cell Death Detection Kit, POD, Ref: 11684817910, USA). Parafin kesitler 37°C' lik etüvde gece boyunca bekletildikten sonra 1 saat ksilende bekletilip deparafinizasyon işlemi tamamlandı. Doku kesitlerinin etrafı pappen kalemi ile çizildi. Kesitler sırasıyla %96, %90 ve %70 alkol serilerinde 3'er dk bekletildi. Kesitler distile suda 5 dk süreyle yıkanarak alkolden arındırıldı. Daha sonra PBS (fosfat tamponlu salin, pH: 7,4) ile 5'er dk 2 kez yıkandı. Kesitler 10 dk süreyle 20 µl proteinaz K ile inkübe edildikten sonra 2 kez 5'er dk süreyle PBS ile yıkandı. Kesitler 1:16 oranında metanolde hazırlanan hidrojen peroksit içerisinde 10 dk bekletilerek endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Ardından PBS ile 5'er dk süreyle 2 kez yıkandıktan sonra kesit üzerine 20 µl terminal deoksinükleotidil transferaz enzimi uygulanıp 37°C' lik etüvde 1 saat inkübe edildi. PBS ile 5'er dk süreyle 2 kez yıkama yapıldıktan sonra reaksiyonu durdurmak için 20 µl POD damlatılıp 30 dk bekletildi. PBS ile yıkama sonrası TUNEL pozitif hücreleri saptamak için DAB (diaminobenzidine) kromojeni ile 10 dk boyama yapıldı. Ardından kesitler PBS ile yıkandı (Tablo 4).

Boyanan kesitler sırasıyla %70, %90, %96 alkol serilerinden geçirilip, ksilene alınıp, entellan ile kapatıldıktan sonra monitorize foto mikroskopta (Olympus BX50) apoptotik hücrelerin değerlendirilmesi yapıldı.

Ovaryum kesitlerine uygulanan TUNEL boyama 2 bağımsız gözlemci tarafından değerlendirildi. Ovaryan folliküllerde TUNEL pozitif boyanma 0-2 arasında skorlandı. Bu skorlamaya göre; pozitif işaretlenen granüloza hücrelerinin oranı folliküldeki tüm granüloza hücrelerinin %5'inden az olanlar skor 0, %5-10 arasında olanlar skor 1, %10'undan fazla olanlar skor 2 olarak değerlendirildi. Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Elde edilen TUNEL skor değerleri ile gruplar arasında folliküllerin apoptotik indeksi (Aİ) belirlendi (Garrett ve Guthrie 1996). TUNEL 2 skor değerine sahip folliküller atretik follikül olarak kabul edilip, her bir dokunun atretik follikül yüzdesi hesaplandı.

$$\% \text{Atretik follikül} = \text{Atretik follikül} / \text{total follikül} \times 100$$

Tablo 4. TUNEL yöntemi protokolü

Sıra	İşlem	Süre
1	Deparafinizasyon (Ksilen)	15 dk
2	%96 alkol	3 dk
3	%90 alkol	3 dk
4	%70 alkol	3 dk
5	Distile su	5 dk
6	PBS	2x5 dk
7	Proteinaz K	20 dk
8	PBS	2x5 dk
9	1:16 oranında H ₂ O ₂ : metanol (%100'lik) karışımı	10 dk
10	PBS	2x5 dakika
11	1:1 oranında Enzim: Label uygulaması	1 saat, 37°C'de
12	PBS	2x5 dk
13	Pod solüsyonu	30 dk, 37°C'de
14	PBS	2x5 dakika
15	DAB substrat solüsyonu	10 dakika
16	PBS	2x5 dakika
17	Ksilen	20 dakika
18	Kapatma	

3.6. İstatistiksel Analiz

Gruplararası karşılaştırma ANOVA ve Kruskal Wallis testleriyle yapıldı. Gruplar arası ikili karşılaştırmalar bağımsız t test ve Mann Whitney U testi ile gerçekleştirildi. Ortalama (Ort), standart sapma (SS) ve p değerleri verildi. p<0,05 anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

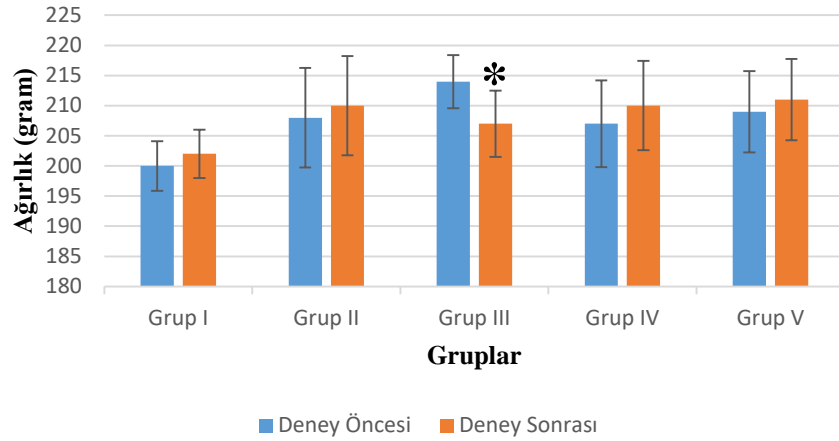
4.1. Vücut Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deney öncesi ve deney sonrası sıçanların ağırlık ortalamaları istatistiksel olarak değerlendirildi. Gruplara ait vücut ağırlıklarının ortalama (Ort), standart sapma (SS) ve p değerleri Tablo 5’de verildi. Değerlendirme sonucunda Grup III’teki ($p=0,002$) deneklerde kilo kaybı olurken, Grup I, Grup II, Grup IV ve Grup V’teki deneklerde kilo artışı saptandı. (Grafik 1).

Deneklerin deney öncesi ve deney sonrası ağırlıklarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonucu Grup I ($p=0,004$), Grup II ($p=0,001$), Grup IV ($p=0,001$) ve Grup V’te ($p=0,012$) istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi. Grup III’te bulunan deneklerin deney sonrası ağırlıklarında ise istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandı ($p=0,002$).

Tablo 5. Deney öncesi ve sonrası vücut ağırlıklarının ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum ve p değerleri

		Deney Öncesi Ağırlık	Deney Sonrası Ağırlık	p değeri
Grup I	ORT \pm SS	200 \pm 4,11	202 \pm 3,99	0,004
	ORTANCA (Min/Max)	200 (186/216)	202 (189/217)	
Grup II	ORT \pm SS	208 \pm 8,25	210 \pm 8,23	0,001
	ORTANCA (Min/Max)	200 (183/234)	201 (185/235)	
Grup III	ORT \pm SS	214 \pm 4,41	207 \pm 5,48	0,002
	ORTANCA (Min/Max)	213 (199/235)	209 (187/233)	
Grup IV	ORT \pm SS	207 \pm 7,18	210 \pm 7,41	0,001
	ORTANCA (Min/Max)	201 (186/235)	203 (187/238)	
Grup V	ORT \pm SS	209 \pm 6,74	211 \pm 6,74	0,012
	ORTANCA (Min/Max)	202 (189/230)	203 (193/233)	



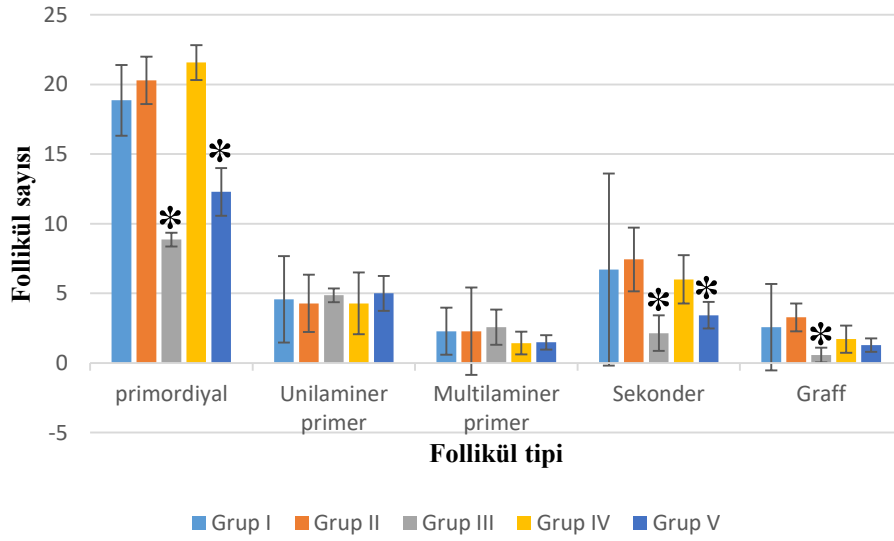
Grafik 1. Deney öncesi ve deney sonrası deneklerin vücut ağırlıkları

4.2. Follikül Sayılarının Değerlendirilmesi

Deney sonrası her gruptaki deneklerin sağ ve sol ovaryumlarından alınan ve H&E ile boyanan 5'er kesitte primordiyal, unilaminar ve multilaminar primer, sekonder, graaf, sekonder atretik ve graaf atretik folliküllerin sayımları yapıldı. Deney sonrası gruplarda sağ ve sol ovaryumlara ait normal folliküllerin sayılarının ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum ve p değerleri Tablo 6 ve Tablo 7'de verildi. Sol ve sağ ovaryumlara ait sekonder ve graaf atretik folliküllerin istatistiksel verileri Tablo 8'de verildi.

Tablo 6. H&E boyaması sonrası değerlendirilen kesitlerde, gruplara ait sol ovaryum follikül sayılarının ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum ve p değerleri

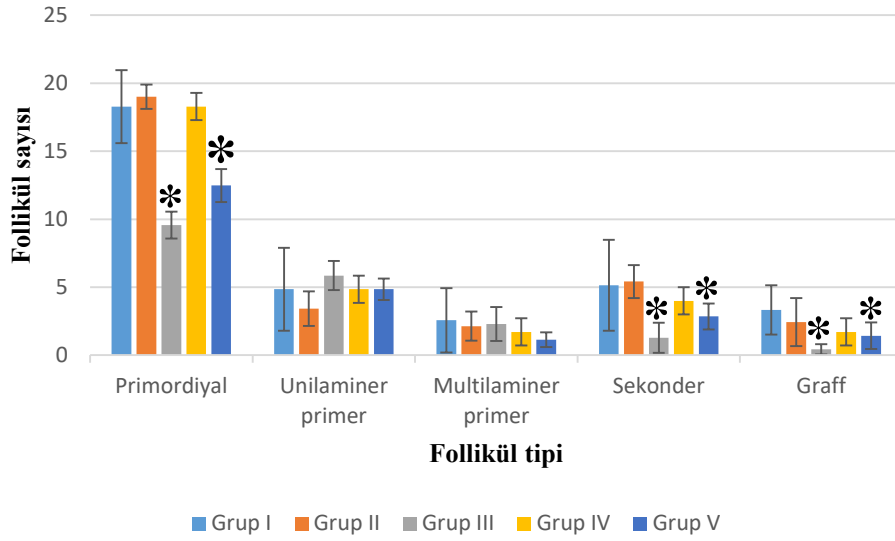
		Primordiyal Follikül	Unilaminar Primer Follikül	Multilaminar Primer Follikül	Sekonder Follikül	Graaf Follikül
Grup I Sol Ovaryum	ORT ±SS	18,86±2,54	4,57±1,71	2,28±0,49	6,71±1,25	2,57±1,71
	ORTANCA (Min/Max)	19,00 (16,00/23,00)	5,00 (1,00/6,00)	2,00 (2,00/3,00)3	7,00 (5,00/9,00)	3,00 (0,00/5,00)
Grup II Sol Ovaryum	ORT ±SS	20,29±3,10	4,28±2,06	2,28±0,49	7,43±2,22	3,28±1,25
	ORTANCA (Min/Max)	20,00 (15,00/24,00)	5,00 (0,00/6,00)	2,00 (2,00/3,00)	8,00 (4,00/10,00)	3,00 (1,00/5,00)
Grup III Sol Ovaryum	ORT ±SS	8,86±1,68	4,86±3,13	2,57±1,27	2,14±0,81	0,57±0,52
	ORTANCA (Min/Max)	8,00 (7,00/12,00)	6,00 (0,00/8,00)	2,00 (1,00/5,00)	2,00 (1,00/3,00)	1,00 (0,00/1,00)
Grup IV Sol Ovaryum	ORT ±SS	21,57±6,90	4,28±2,28	1,43±1,27	6,00±1,73	1,71±0,95
	ORTANCA (Min/Max)	20,00 (14,00/33,00)	4,00 (1,00/8,00)	1,00 (0,00/3,00)	6,00 (4,00/9,00)	1,00 (1,00/3,00)
Grup V Sol ovaryum	ORT ±SS	12,28±3,10	5,00±1,00	1,48±0,53	3,43±0,98	1,28±0,49
	ORTANCA (Min/Max)	20,00 (15,00/24,00)	5,00 (4,00/7,00)	1,00 (1,00/2,00)	3,00 (2,00/5,00)	1,00 (1,00/2,00)
p değeri		0,000	0,777	0,72	0,001	0,003



Grafik 2. Gruplara ait sol ovaryum follikül sayıları

Tablo 7. H&E boyaması sonrası değerlendirilen kesitlerde, gruplara ait sağ ovaryum follikül sayılarının ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum ve p değerleri

		Primordiyal Follikül	Unilaminer Primer Follikül	Multilaminer Primer Follikül	Sekonder Follikül	Graaf Follikül
Grup I Sağ Ovaryum	ORT ±SS	18,28 ±2,69	4,85 ±0,89	2,57 ±0,98	5,14 ±1,77	3,33±1,21
	ORTANCA (Min/Max)	18,00 15,00/23,00	5,00 4,00/6,00	3,00 1,00/4,00	5,00 3,00/8,00	3,50 (2,00/5,00)
Grup II Sağ Ovaryum	ORT ±SS	19,00 ±3,05	3,42 ±1,27	2,14 ±1,07	5,42 ±1,72	2,43±0,79
	ORTANCA (Min/Max)	19,00 14,00/23,00	3,00 2,00/5,00	2,00 1,00/4,00	5,00 3,00/8,00	3,00 1,00/3,00
Grup III Sağ Ovaryum	ORT ±SS	9,57 ±2,37	5,85 ±1,06	2,29 ±1,25	1,28 ±0,95	0,43 ±0,53
	ORTANCA (Min/Max)	0,00 5,00/12,00	6,00 5,00/8,00	2,00 1,00/4,00	1,00 ,00/3,00	0,00 ,00/1,00
Grup IV Sağ Ovaryum	ORT ±SS	18,28±3,35	4,85 ±1,21	1,71±1,11	4,00 ±2,38	1,71±0,95
	ORTANCA (Min/Max)	18,00 14,00/23,00	5,00 3,00/6,00	2,00 0,00/3,00	3,00 2,00/8,00	1,00 1,00/3,00
Grup V Sağ ovaryum	ORT ±SS	12,48 ±1,81	4,85 ±1,77	1,14 ±0,38	2,85 ±1,07	1,43 ±0,98
	ORTANCA (Min/Max)	13,00 14,00/23,00	6,00 3,00/7,00	1,00 1,00/2,00	2,00 2,00/4,00	1,00 1,00/3,00
p değeri		0,000	0,54	0,078	0,000	0,001



Grafik 3. Gruplara ait sağ ovaryum follikül sayıları

Beş grup arasında primordiyal follikül, unilaminer primer follikül, multilaminer primer follikül, sekonder follikül, graaf follikül, sekonder atretik follikül ve graaf atretik follikül sayıları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı farklılık gözlemlendi (Grafik 2 ve Grafik 3).

Sol ovaryum primordiyal follikül sayıları değerlendirildiğinde;

Grup I ile diğer gruplar arasında ikili karşılaştırmalarda; Grup II ($p=0,364$) ve Grup IV ($p=0,348$) ile arasında anlamlı farklılık görülmezken, Grup III ($p=0,000$) ve Grup V ($p=0,000$) ile arasında Grup I lehine istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu.

Grup II ile diğer gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmada; Grup III ($p=0,000$) ve Grup V ($p=0,000$) lehine anlamlı farklılık saptandı. Grup IV ile arasında anlamlı farklılık görülmedi ($p=0,661$).

Grup III ile diğer gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda; Grup IV ($p=0,000$) ve Grup V ($p=0,001$) lehine anlamlı farklılık gözlemlendi.

Grup IV ile Grup V karşılaştırıldığında; Grup IV ($p=0,004$) lehine anlamlı farklılık görüldü.

Sağ ovaryum primordiyal follikül sayıları değerlendirildiğinde;

Grup I ile diğer gruplar arasında ikili karşılaştırmalarda; Grup II ($p=0,651$) ve Grup IV ($p=0,537$) ile arasında anlamlı farklılık görülmezken, Grup III ($p=0,000$) ve

Grup V (**p=0,000**) ile arasında Grup I lehine istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu.

Grup II ile diğer gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmada; Grup III (**p=0,000**) ve Grup V (**p=0,000**) ile arasında Grup II lehine anlamlı farklılık saptandı. Grup IV ile arasında anlamlı farklılık görülmedi (**p=0,684**).

Grup III ile diğer gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda; Grup IV (**p=0,000**) ve Grup V (**p=0,026**) lehine anlamlı farklılık gözlemlendi.

Grup IV ile Grup V karşılaştırıldığında; Grup IV lehine anlamlı farklılık görüldü (**p=0,002**).

Sol ve sağ ovaryum unilaminar follikül sayıları değerlendirildiğinde;

Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi (**sol ovaryum p=0,777; sağ ovaryum p=0,054**).

Sol ve sağ ovaryum multilaminar follikül sayıları değerlendirildiğinde;

Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi (**sol ovaryum p=0,072; sağ ovaryum p=0,078**).

Sol ovaryum sekonder follikül sayıları değerlendirildiğinde;

Grup I ile diğer gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda; Grup II (**0,474**) ve Grup IV (**p=0,394**) ile arasında anlamlı farklılık görülmezken, Grup III (**p=0,000**) ve Grup V (**p=0,000**) ile arasında Grup I lehine istatistiksel olarak anlamlılık bulundu.

Grup II ile diğer gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmada; Grup III (**p=0,000**) ve Grup V (**p=0,001**) ile arasında Grup II lehine anlamlı farklılık görülürken, Grup IV ile arasında anlamlı farklılık görülmedi (**p=0,205**).

Grup III ile diğer gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda; Grup IV (**p=0,000**) ve Grup V (**p=0,025**) ile arasında Grup III lehine anlamlı farklılık görüldü. Grup IV ile Grup V karşılaştırıldığında; Grup IV lehine anlamlı farklılık görüldü (**p=0,005**).

Sağ ovaryum sekonder follikül sayıları değerlendirildiğinde;

Grup I ile diğer gruplar arasında ikili karşılaştırmalarda; Grup II (**p=0,696**) ve Grup IV (**p=0,272**) ile arasında anlamlı farklılık görülmezken, Grup III (**p=0,002**) ve Grup V (**p=0,014**) ile arasında Grup I lehine istatistiksel olarak anlamlılık bulundu.

Grup II ile diğer gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmada; Grup III (**p=0,002**) ve Grup V (**p=0,009**) ile arasında Grup II lehine istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülürken, Grup IV (**p=0,373**) ile arasında anlamlı farklılık saptanmadı.

Grup III ile diğer gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda; Grup IV (**p=0,011**) ve Grup V (**p=0,014**) lehine anlamlı farklılık gözlemlendi.

Grup IV ile Grup V karşılaştırıldığında; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (**p=0,373**).

Sol ovaryum graff follikül sayıları değerlendirildiğinde;

Grup I ile diğer gruplar arasında ikili karşılaştırmalarda; Grup II (**p=0,392**), Grup IV (**p=0,290**) ve Grup V (**p=0,108**) ile arasında anlamlı farklılık görülmezken, Grup III ile arasında Grup I lehine istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu (**p=0,024**).

Grup II ile diğer gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmada; Grup III (**p=0,003**), Grup IV (**p=0,027**) ve Grup V (**p=0,007**) ile arasında Grup II lehine anlamlı farklılık saptandı.

Grup III ile diğer gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda; Grup IV (**p=0,019**) ve Grup V (**p=0,030**) lehine anlamlı farklılık gözlemlendi.

Grup IV ile Grup V karşılaştırıldığında; gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı (**p=0,409**).

Sağ ovaryum graff follikül sayıları değerlendirildiğinde;

Grup I ile diğer gruplar arasında ikili karşılaştırmalarda; Grup II (**p=0,624**) ve Grup IV (**p=0,061**) ile arasında anlamlı farklılık görülmezken, Grup III (**p=0,001**) ve Grup V (**p=0,024**) ile arasında Grup I lehine istatistiksel olarak anlamlılık bulundu.

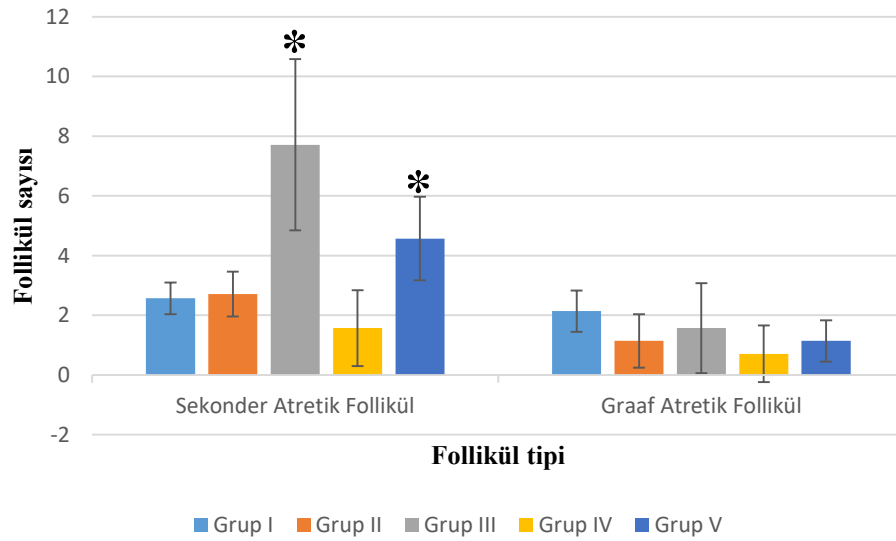
Grup II ile diğer gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmada; Grup III ile arasında Grup II lehine istatistiksel anlamlılık görülürken (**p=0,002**), Grup IV (**p=0,150**) ve Grup V (**p=0,061**) ile arasında anlamlı farklılık saptanmadı.

Grup III ile diğer gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda; Grup IV (**p=0,010**) ve Grup V (**p=0,041**) lehine anlamlı farklılık gözlemlendi.

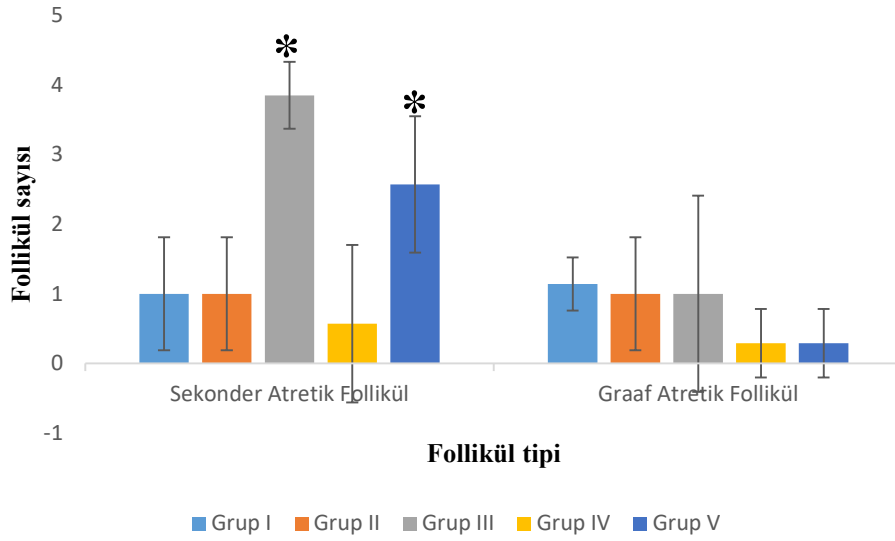
Grup IV ile Grup V karşılaştırıldığında; gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı (**p=0,630**).

Tablo 8. H&E boyaması sonrası değerlendirilen kesitlerde, gruplara ait atretik follikül sayılarının ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum ve p değerleri

		Sol ovaryum		Sağ ovaryum	
		Sekonder Atretik Follikül	Graaf Atretik Follikül	Sekonder Atretik Follikül	Graaf Atretik Follikül
Grup I	ORT ±SS	2,57±0,53	2,14±0,69	1,00±0,81	1,14±0,38
	ORTANCA (Min/Max)	3,00 (2,00/3,00)	2,00 (1,00/3,00)	1,00 0,00/2,00	1,00 1,00/2,00
Grup II	ORT ±SS	2,71±0,75	1,14±0,90	1,00±0,81	1,00±0,81
	ORTANCA (Min/Max)	3,00 (2,00/4,00)	1,00 (0,00/2,00)	1,00 0,00/2,00	1,00 0,00/2,00
Grup III	ORT ±SS	7,71±2,87	1,57±1,51	3,85±0,48	1,00±1,41
	ORTANCA (Min/Max)	6,00 (5,00/13,00)	1,00 (0,00/4,00)	4,00 3,00/5,00	1,00 0,00/4,00
Grup IV	ORT ±SS	1,57±1,27	0,71±0,95	0,57±1,13	0,29±0,49
	ORTANCA (Min/Max)	1,00 (0,00/4,00)	0,00 (0,00/2,00)	0,00 0,00/3,00	0,00 0,00/1,00
Grup V	ORT ±SS	4,57±1,40	1,14±0,69	2,57±0,98	0,29±0,49
	ORTANCA (Min/Max)	5,00 (2,00/6,00)	1,00 (0,00/2,00)	3,00 1,00/4,00	1,00 0,00/1,00
p değeri		0,001	0,108	0,00	0,128



Grafik 4. Gruplara ait sol atretik follikül sayıları



Grafik 5. Gruplara ait sağ atretik follikül sayıları

Beş gruba ait atretik follikül sayılarının karşılaştırılması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlendi (Grafik 4 ve Grafik 5).

Sol ovaryum sekonder atretik follikül sayısı değerlendirildiğinde;

Grup I ile diğer gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmada; Grup II ($p=0,775$) ve Grup IV ($p=0,054$) arasında anlamlı farklılık bulunmazken, Grup III ($p=0,001$) ve Grup V ($p=0,013$) lehine istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlendi.

Grup II ile diğer gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmada; Grup III ($p=0,002$), Grup IV ($p=0,048$) ve Grup V ($p=0,005$) lehine anlamlı farklılık saptandı.

Grup III ile diğer gruplar karşılaştırıldığında; Grup IV ($p=0,002$) ve Grup V ($p=0,015$) ile arasında Grup III lehine anlamlı farklılık saptandı.

Grup IV ile Grup V karşılaştırıldığında; Grup V lehine anlamlı farklılık gözlemlendi ($p=0,005$).

Sağ ovaryum sekonder atretik follikül sayısı değerlendirildiğinde;

Grup I ile diğer gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmada; Grup II ($p=1,000$) ve Grup IV ($p=0,213$) arasında anlamlı farklılık bulunmazken, Grup III ($p=0,001$) ve Grup V ($p=0,013$) lehine anlamlı farklılık gözlemlendi.

Grup II ile diğer gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmada; Grup IV ($p=0,213$) ile arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmezken, Grup III ($p=0,01$) ve Grup V ($p=0,013$) lehine anlamlı farklılık saptandı.

Grup III ile diğer gruplar karşılaştırıldığında; Grup IV ($p=0,002$) ve Grup V ($p=0,019$) ile arasında Grup III lehine anlamlı farklılık saptandı.

Grup IV ile Grup V karşılaştırıldığında; Grup V lehine anlamlı farklılık gözlemlendi (**p=0,010**).

Sol ve sağ ovaryum graff atretik follikül sayısı değerlendirildiğinde; Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi (**sırasıyla, p=0,108; p=0,128**).

4.3. Işık Mikroskopik Bulgular

Kontrol (Grup I ve Grup II) ve deney (Grup III, Grup IV, Grup V) gruplarına ait morfolojik değerlendirme H&E boyaması yapılmış ovaryum dokusu preparatlarında gerçekleştirildi. Grup I, Grup II ve Grup IV'teki ovaryumların yüzeyi germinatif epitel olarak adlandırılan tek katlı kübik ya da yassı epitel ile döşeliydi. Germinatif epitel ile korteks arasında sıkı bağ dokusu tabakası olan tunika albuginea yer almaktaydı. Farklı büyüklükte olan primordiyal, primer, sekonder, graff ve daha önceki siklusa ait atretik follikülleri korteks stromasına dağılmış olarak görüldü (Şekil 8a). Tunika albugineanın altında korteks stromasında yer alan, primer oositi çevreleyen tek tabaka halindeki yassı follikül hücreleri ile primer oositi çevreleyen normal morfolojili primordiyal folliküller izlendi (Şekil 8b). Tek sıralı kübik follikül hücreleri ile çevrili unilaminar primer follikül ve teka tabakasının oluşmaya başladığı çok katlı kübik hücrelerle çevrili multilaminar primer follikül yapıları ayırt edildi (Şekil 8c ve Şekil 8d). Granüloza hücrelerinin arasında kavitelerin oluştuğu ve antrum olarak isimlendirildiği teka interna ve teka eksterna ile çevrili sekonder follikül gelişimi görüldü (Şekil 8e). Granüloza hücrelerinin oositle ilişkide olduğu bölgede antruma doğru kumulus ooforus olarak isimlendirilen tepeciğin oluştuğu ve oositi çevreleyen korona radiata hücreleriyle karakterize graff folliküller izlendi (Şekil 8f).

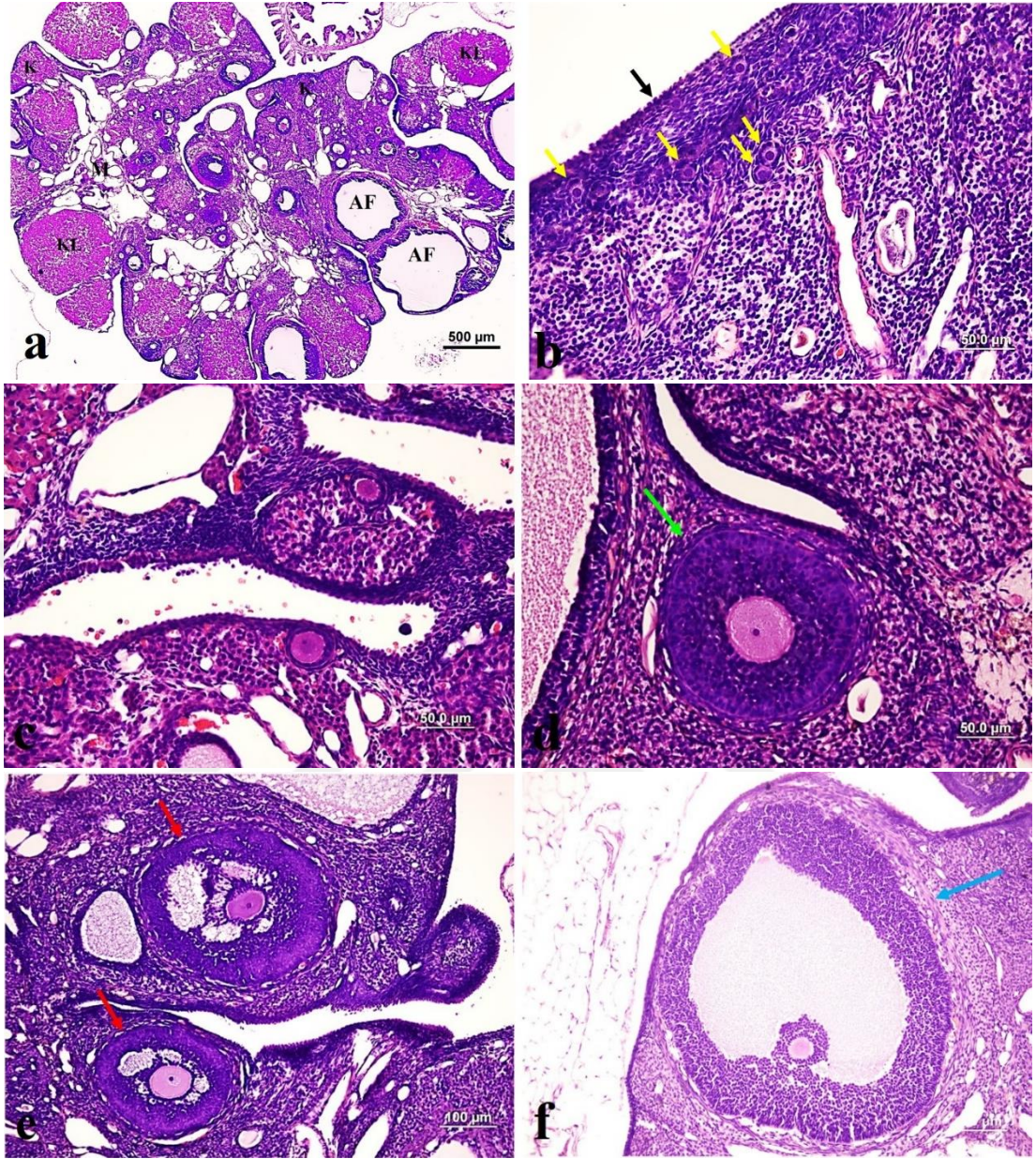
Grup III ve Grup V'de farklı matürasyon aşamalarındaki folliküllerin hepsinin sayılarında belirgin azalma görülürken, atretik follikül sayılarında artış gözlemlendi (Şekil 10, Şekil 12). Sekonder ve graaf folliküllerin antral boşluklarında ölü granüloza hücre artıkları ile debrisler görüldü (Şekil 10c ve Şekil 10e). Grup III'de farklı gelişim aşamasında olan follikül sayılarının Grup I'e göre azaldığı ve morfolojilerinin bozulduğu gözlemlendi (Şekil 10).

Grup II ve Grup IV'te Grup I'e benzer olarak follikül sayısında bir kayıp olmadığı (Şekil 9 ve Şekil 11), primordiyal follikül sayısı ve morfolojilerinin korunduğu (Şekil 9c ve Şekil 11b), unilaminar primer (Şekil 9d, Şekil 11b),

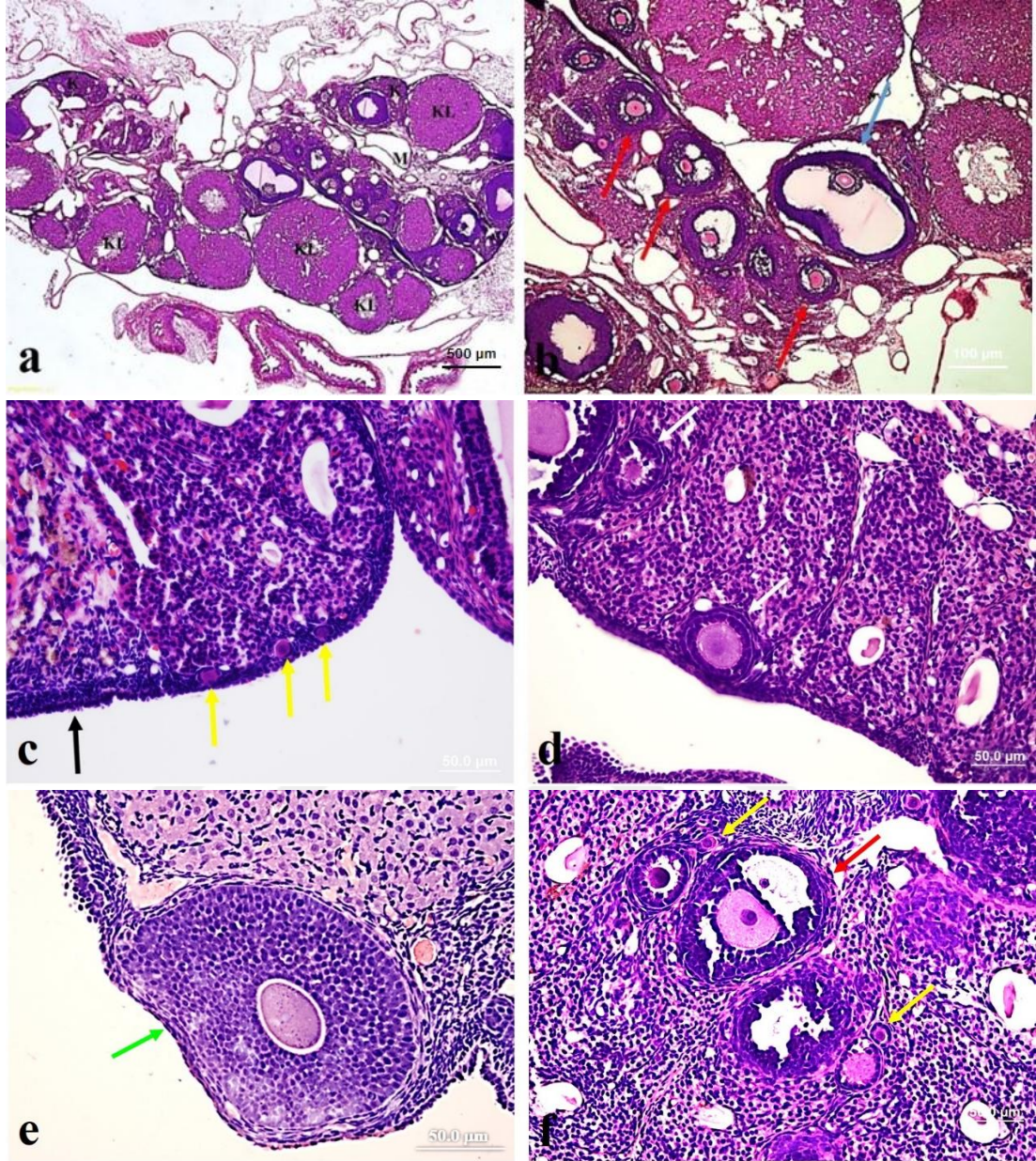
multilaminar primer (Şekil 9e ve Şekil 11d), sekonder (Şekil 9f ve Şekil 11e) ve graff folliküllerin (Şekil 9b ve Şekil 11f) normal morfolojiye sahip oldukları görüldü.

Grup V'te dialildisülfid uygulanması ile folliküllerde Grup III'e kıyasla gelişmekte olan primordiyal folliküller ile total follikül sayısında artış olduğu ve apoptotik görünümlü hücre sayısında azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 12b ve Şekil 12e).

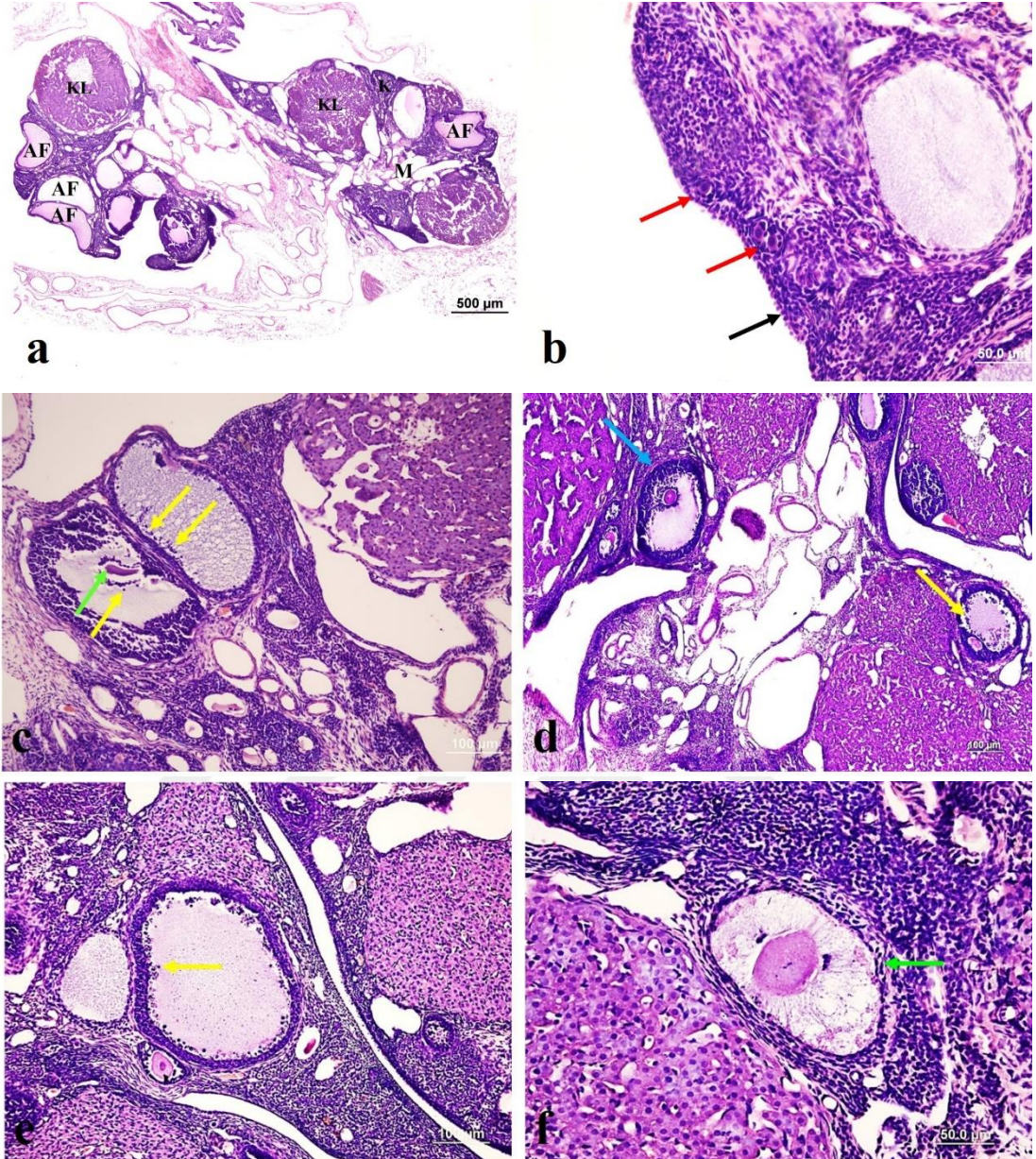




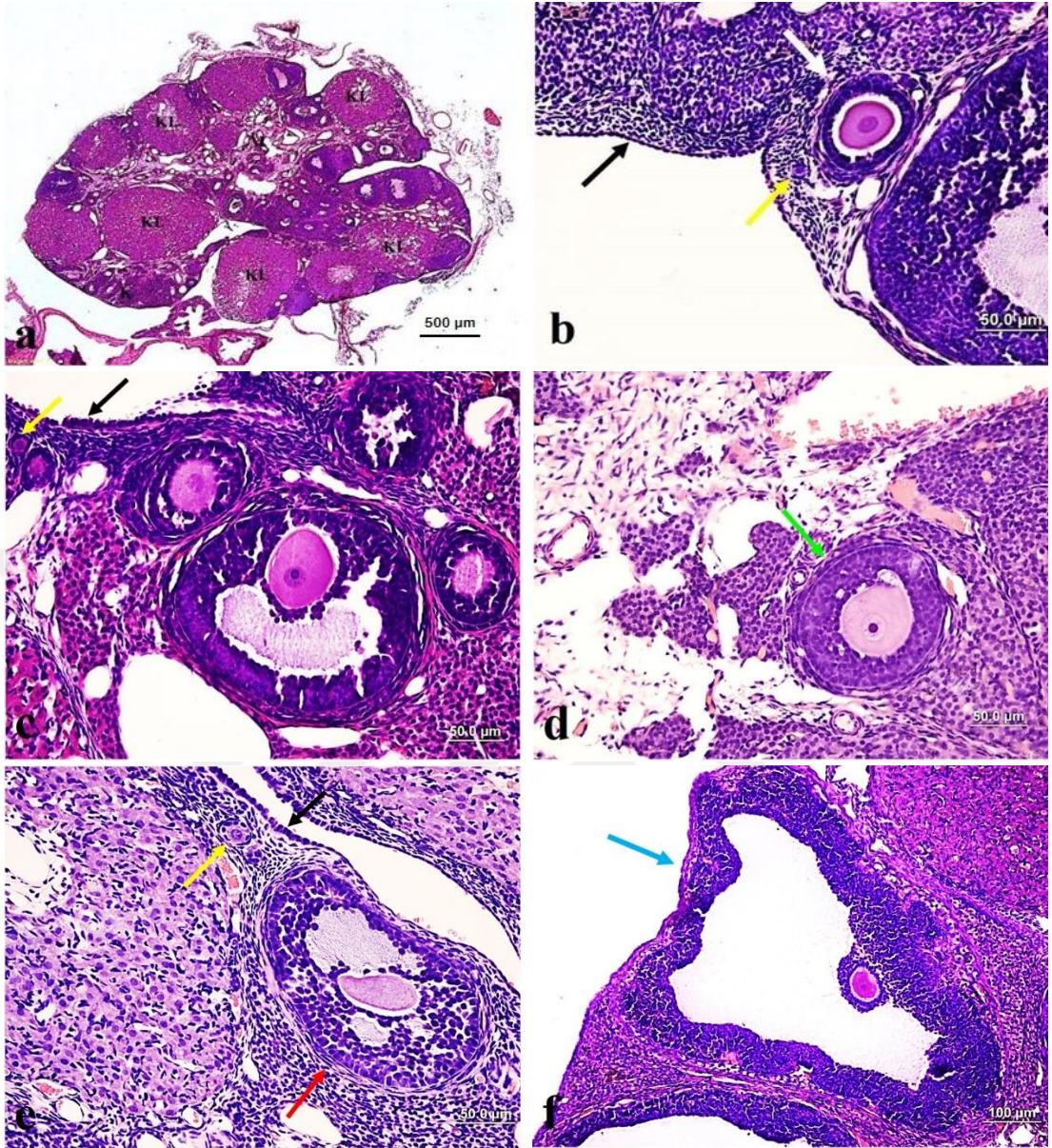
Şekil 8. Grup I (Kontrol-Doksorubisin) Korteks (K), Medulla (M), Korpus Luteum (KL), Germinal epitel (siyah ok), Primordiyal follikül (sarı ok), Unilaminar primer follikül (beyaz ok), Atretik follikül (AF), Multilaminar primer follikül (yeşil ok), Sekonder follikül (kırmızı ok), Graaf follikül (mavi ok) (H&E boyama).



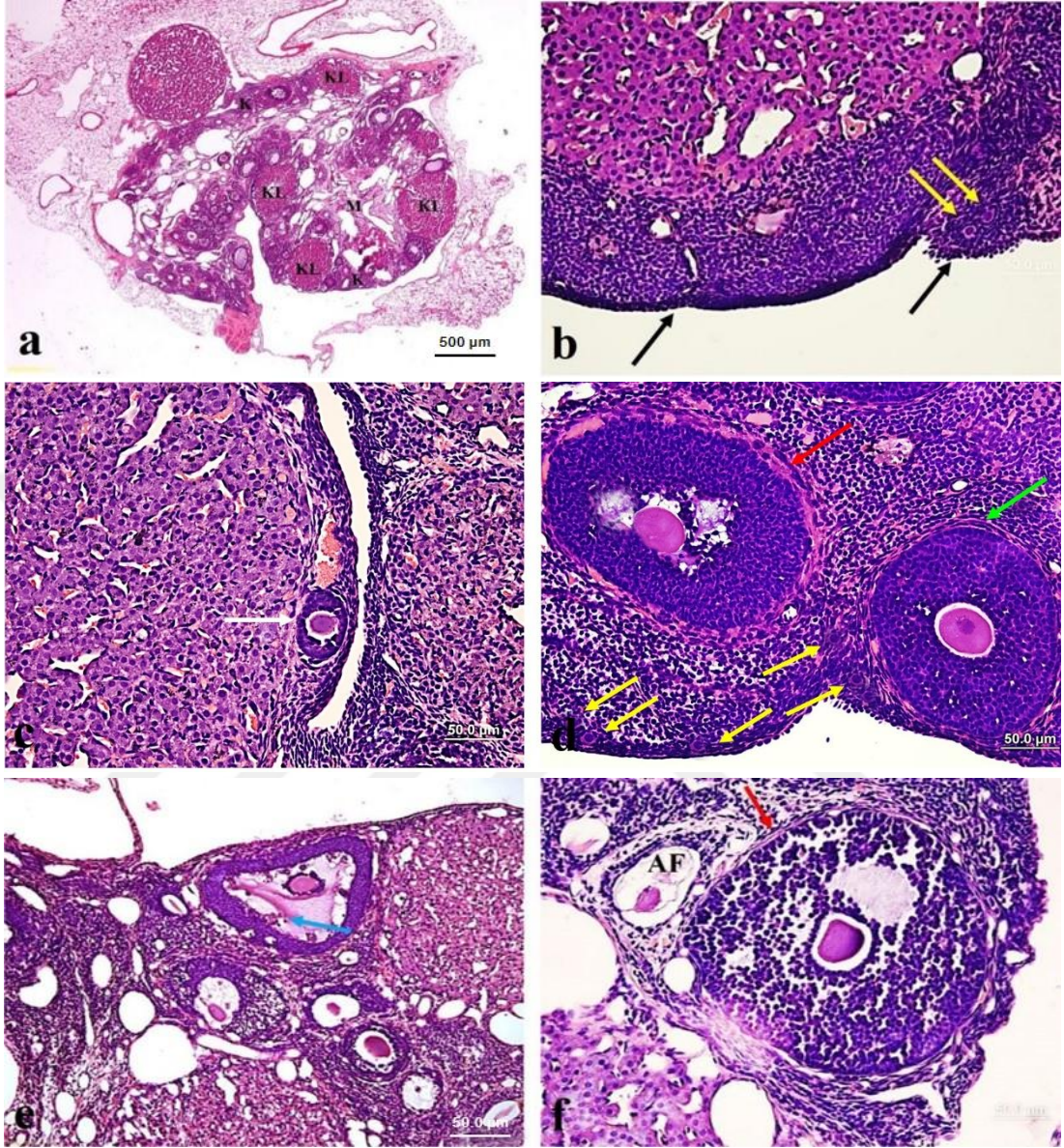
Şekil 9. Grup II (Kontrol-Dialil disülfid) Korteks (K), Medulla (M), Korpus Luteum (KL), Germinal epitel (siyah ok), Primordiyal follikül (sarı ok), Unilaminar primer follikül (beyaz ok), Atretik follikül (AF), Multilaminar primer follikül (yeşil ok), Sekonder follikül (kırmızı ok), Graaf follikül (mavi ok) (H&E boyama).



Şekil 10. Grup III (Doksorubisin) Korteks (K), Medulla (M), Korpus Luteum (KL), Germinal epitel (siyah ok), Primordiyal follikül (kırmızı ok), Atretik follikül (AF), Apoptotik hücre (sarı ok), Dejenere oosit (yeşil ok) (H&E boyama).



Şekil 11. Grup IV (Dialil disülfid) Korteks (K), Medulla (M), Korpus Luteum (KL), Germinal epitel (siyah ok), Primordiyal follikül (sarı ok), Unilaminar primer follikül (beyaz ok), Multilaminar primer follikül (yeşil ok), Sekonder follikül (kırmızı ok), Graaf follikül (mavi ok) (H&E boyama).



Şekil 12. Grup V (Doksorubisin+Disülfid) Korteks (K), Medulla (M), Korpus Luteum (KL), Germinal epitel (siyah ok), Primordiyal follükül (sarı ok), Unilaminar primer follükül (beyaz ok), Atretik follükül (AF), Multilaminar primer follükül (yeşil ok), Sekonder follükül (kırmızı ok), Graaf follükül (mavi ok) (H&E boyama).

4.4. TUNEL Bulguları

Tüm gruplara ait sol ve sağ ovaryumda TUNEL yöntemi ile değerlendirilen atretik indeks (Aİ)'e ait ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum değerleri Tablo 9' da verildi. ANOVA ve Kruskal Wallis testi ile yapılan istatistiksel karşılaştırmalarda gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu belirlendi. İkili grupların karşılaştırılması bağımsız t test ve Mann Whitney U testi ile yapıldı ve anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

Sol ovaryumdan alınan doku kesitlerinde sekonder folliküllerde Grup I ve Grup II ($p=0,081$), Grup I ve Grup IV ($p=0,718$), Grup II ve Grup IV ($p=0,125$) birbiriyle karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi. Grup I ve Grup III ($p=0,000$), Grup II ve Grup III ($p=0,000$), Grup III ve Grup IV ($p=0,002$), Grup III ve Grup V ($p=0,007$) arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda ise Grup III'ün Aİ'de anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı.

Sol ovaryumdan alınan doku kesitlerinde graff folliküllerde gruplar arası Aİ'de istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p=0,049$) (Grafik 6). Sol ovaryumdan alınan doku kesitlerinde graaf folliküllerde Grup I ve Grup II ($p=0,128$), Grup I ve Grup IV ($p=0,620$), Grup II ve Grup IV ($p=0,710$), Grup III ve Grup V ($p=0,318$) birbiriyle karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi. Grup I ve Grup III ($p=0,011$), Grup II ve Grup III ($p=0,017$), Grup III ve Grup IV ($p=0,011$) arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda ise Grup III'ün Aİ'de anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı.

Sağ ovaryumdan alınan doku kesitlerinde graff folliküllerde gruplar arası Aİ'de istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p=0,019$) (Grafik 7). Sol ovaryumdan alınan doku kesitlerinde graff folliküllerde Grup I ve Grup II ($p=0,456$), Grup I ve Grup IV ($p=0,902$), Grup II ve Grup IV ($p=0,535$), birbiriyle karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi. Grup I ve Grup III ($p=0,017$), Grup II ve Grup III ($p=0,007$), Grup III ve Grup IV ($p=0,026$), Grup III ve Grup V ($p=0,017$) arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda ise Grup III'ün Aİ'de anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı.

Sonuç olarak, doksorubisin uygulanan hayvanların ovaryum doku korteks ve medulla stromasında ve gelişmekte olan folliküllerin granüloza hücrelerinde apoptotik aktivasyona neden olduğu ve diğer gruplara göre atretik follikül sayılarında

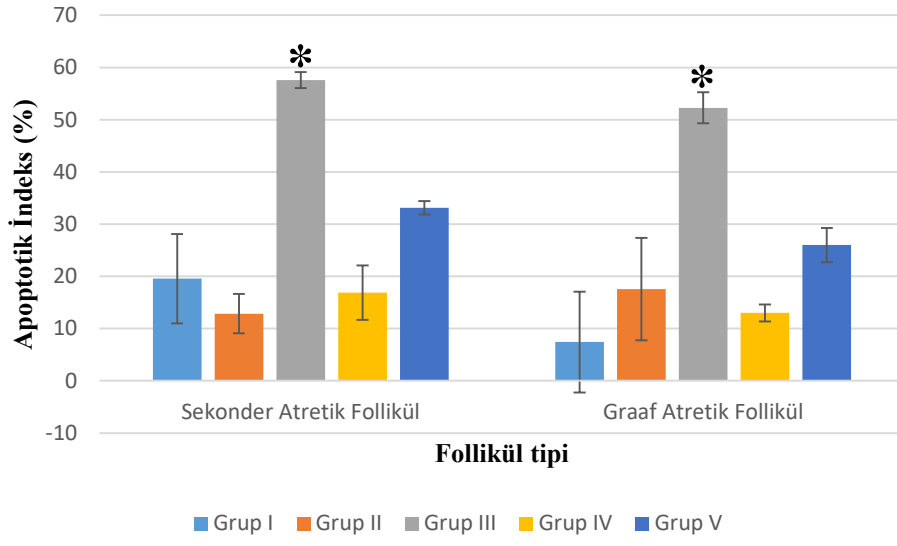
istatistiksel olarak artış olduğu görüldü. Doksorubisin sonrasında dialil disülfid uygulanan hayvanların ovaryum doku korteksinde, medulla stromasında ve gelişmekte olan folliküllerin granüloza hücrelerinde apoptotik aktivasyonun ve atretik follikül sayılarının istatistiksel olarak azaldığı gözlemlendi.

TUNEL boyama sonrası ovaryan folliküllerin apoptotik aktivasyonuna göre 0-2 arasında skorlamasına örnek olarak, sekonder follikül ve graaf follikül örneği verildi (Şekil 13).

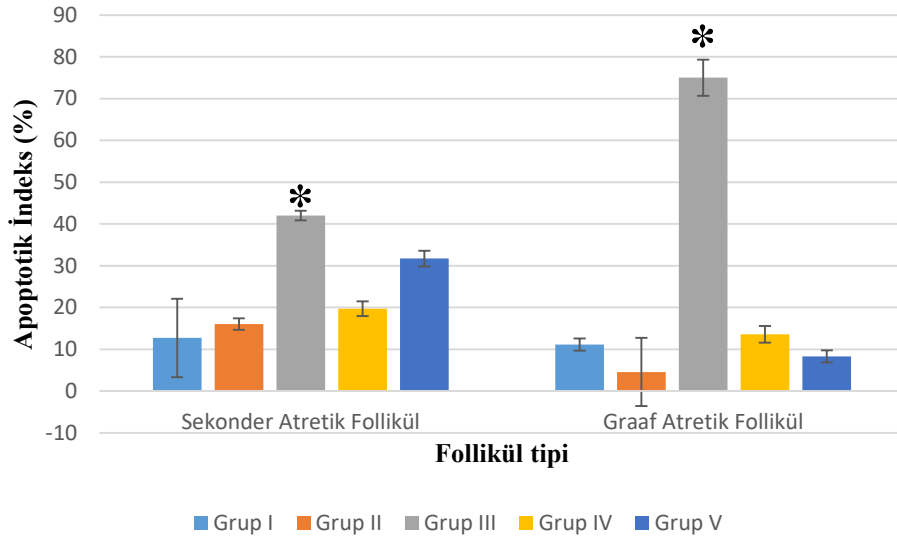
TUNEL boyaması sonrası skorlanan folliküllerde sol ve sağ ovaryumlara ait skor 2 olarak kabul edilen atretik sekonder ve graaf folliküllerin istatistiksel verileri Tablo 9'da verildi.

Tablo 9. TUNEL boyaması sonrası değerlendirilen kesitlerde, gruplara ait atretik folliküllerin ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum değerleri

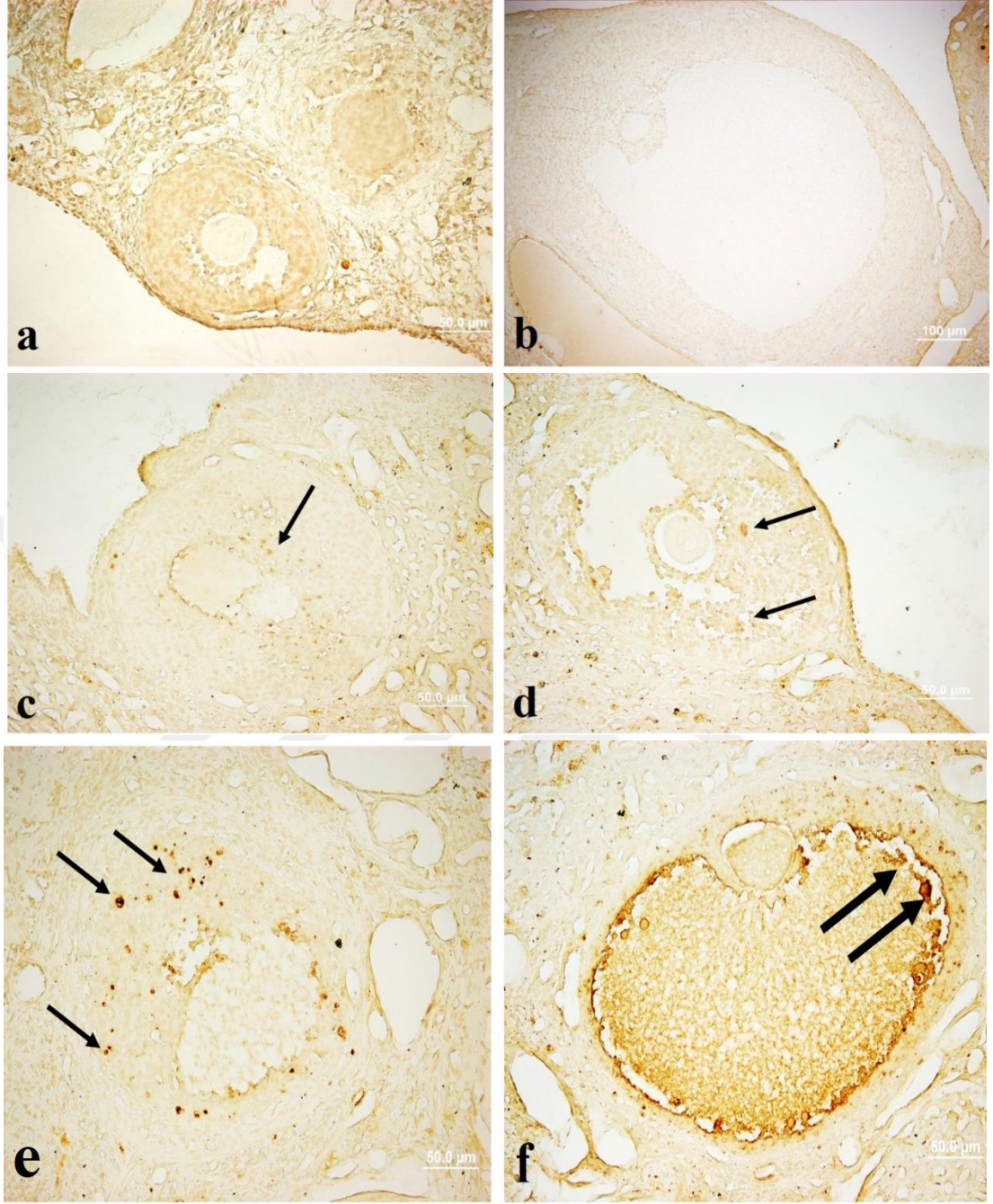
		Sol ovaryum		Sağ ovaryum	
		Sekonder Atretik Follikül	Graaf Atretik Follikül	Sekonder Atretik Follikül	Graaf Atretik Follikül
Grup I	ORT ±SS	19,57±8,54	7,42±9,64	12,71±9,39	11,14±1,44
	ORTANCA (Min/Max)	20,00 (10,00/33,00)	0,00 (0,00/20,00)	16 (0,00/22,00)	0,00 (0,00/33,00)
Grup II	ORT ±SS	12,85±3,76	17,57±9,82	16,00±1,38	4,57±8,14
	ORTANCA (Min/Max)	14 (8,00/17,00)	20,00 (0,00/33,00)	16 (0,00/40,00)	0,00 (0,00/20,00)
Grup III	ORT ±SS	57,57±1,52	52,28±2,95	42,00±1,16	75,00±4,33
	ORTANCA (Min/Max)	62,00 (30,00/72,00)	50,00 (0,00/100,00)	40 (28,00/60,00)	0,00 (0,00/100,00)
Grup IV	ORT ±SS	16,86±5,21	13,00±1,64	19,71±1,73	13,57±2,02
	ORTANCA (Min/Max)	14,00 (11,00/25,00)	0,00 (0,00/33,00)	20 (0,00/50,00)	0,00 (0,00/50,00)
Grup V	ORT ±SS	33,14±1,28	26,00±3,28	31,71±1,88	8,28±1,43
	ORTANCA (Min/Max)	37,00 (16,00/50,00)	0,00 (0,00/66,00)	40 (0,00/50,00)	0,00 (0,00-33,00)
p değeri		0,000	0,049	0,004	0,019



Grafik 6. Gruplara ait sol ovaryum Aİ grafiği



Grafik 7. Gruplara ait sağ ovaryum Aİ grafiği



Şekil 13. Ovaryum dokusu TUNEL boyama sonrası skorlama: Skor 0 sekonder follükül (a), skor 0 graaf follükül (b), skor 1 sekonder follükül (c), skor 1 graaf follükül (d), skor 2 sekonder follükül (e), skor 2 graaf follükül (f), TUNEL pozitif hücre (siyah ok).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser, mortalite oranının yüksek olması nedeniyle tüm dünyada ve ülkemizde en önemli sağlık sorunlarından biridir. Kadınlarda en sık karşılaşılan kanser türü meme kanseridir. Meme kanserinden sonra ikinci en sık görülen kadın kanseri türü tiroid kanseridir. Bu kanser türlerini sırasıyla kolorektal, uterus korpusu (endometriyum), akciğer, mide, ovaryum, Non-Hodking lenfoma, beyin-sinir sistemi ve uterus serviksi kanserleri takip etmektedir. Kemoterapötik ilaçların ve radyoterapi tedavilerinin üreme sistemi üzerine önemli olumsuz etkileri olduğu bildirilmiştir (Koyama ve ark., 1977). Tedavi sonrası karşılaşılan bu olumsuz etkinin boyutu kemoterapötik ilaçların sitotoksik potansiyeline, dozuna, süresine ve hastanın yaşına bağlı olarak değişebilmektedir (Koyama ve ark., 1977; Maltaris ve ark., 2007; Rajagopalan ve ark., 1988). Uzun süre kanser tedavisi görmüş hastalarda prematür ovaryan yetmezlik haricinde, bu hastaların gebeliklerinde komplikasyonlar ortaya çıkabilmektedir (Stankiewicz ve ark., 2002). Preterm eylem, abortus, düşük ağırlıklı bebek doğumları bu hastalarda karşılaşılabilen gebelik komplikasyonlarıdır (Stankiewicz ve ark., 2002). Primordiyal follikül sayısı ovaryan rezervin en önemli belirteçidir (Oktem ve Oktay, 2007; Oktay ve Sönmezer, 2008). Primordiyal follikülleri etkileyen herhangi bir toksik ajan infertiliteye neden olabilmektedir (Koyama ve ark., 1977; Maltaris ve ark., 2007; Rajagopalan ve ark., 1988). Amerikan Klinik Onkoloji Kurumu kanser tedavisi alacak hastalarda fertilitenin korunması hakkında bir rehber yayınlamıştır. Diğer kuruluşlar da bu konu hakkında Amerikan Klinik Onkoloji kurumunu desteklemekte ve fertilitenin korunmasını teşvik edici yayınlar yapmaktadır (Della Torre ve ark., 1999; Kim ve ark., 2005). Kemoterapötik ilaçlar ve radyoterapi tedavilerinin prematür ovaryan yetmezlik oluşumunu tetikleme oranı yüksektir. Bu ilaçlar tüm vücudu etkilediği gibi ovaryumun da apoptozis ile uyarılmasına ve gelişmekte olan oosit hücrelerinin hasarlanmasına neden olur (Oktem ve Oktay, 2007). Germ hücrelerinin prematür, toplu ve hızlı apoptozisi prematür ovaryan yetmezliğin altında yatan temel mekanizmadır (Rajagopalan ve ark., 1988). Ayrıca oositi çevreleyen, steroid üreten

granüloza ve teka hücre katmanlarında hasara sebep olan toksik etki de bu duruma neden olabilir (Injac ve ark., 2008). Yaygın follükül kaybı ve ovaryan fibrozis kemoterapi sonrası meydana gelen ovaryan hasarın en belirleyici göstergesidir. Bununla birlikte kemoterapi uygulamalarının ovaryan stromal hücrelere, özellikle teka ve granüloza hücrelerine verdiği hasar da göz ardı edilemez (Oktem ve Oktay, 2007; Oktay ve Sönmezer, 2008). Ovaryan stromal hücreler hormonal sekresyon fonksiyonuna sahiptir ve kemoterapi sonrasında meydana gelen hasarın tamirinde rol oynayabilirler (Lass, 2004; Oktay ve Sönmezer, 2008). Doksorubisin, en önemli ve en sık kullanılan kemoterapötik ajanlardan birisidir. Sarkomların, karsinomların, akut lenfositik lösemilerin ve lenfomaların tedavisinde uygulanmaktadır (Lass, 2004; Oktay ve Sönmezer, 2008). Doksorubisin, hücre tipine göre farklı etki gösteren antrasiklin grubu antibiyotikler sınıfındadır. Bu etkiler, hücre siklusunun S ve G2 evrelerinde belirgin olarak görülmektedir (Rajagopalan ve ark., 1988). Bu ilaçlar birbirine yakın baz çiftleri arasına girerek DNA ve RNA sentezini inhibe ederler, böylece apoptozis yolu ile hücre ölümünü uyarırlar.

Bu çalışma kapsamında, sıçanlarda doksorubisinin gonadotoksisiteyi uyardığı görüldü. Her iki ovaryum dokusunun follükülleri değerlendirildiğinde; primordiyal follükül sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü. Gelişmekte olan follüküller arasında, unilaminar ve multilaminar primer follüküllerde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmamasına rağmen, sekonder ve graaf follükül sayılarında anlamlı oranda azalma saptandı (Grafik 2 ve Grafik 3). Bu azalmanın nedeni apoptoziste etkili ROS yolağının sekonder ve graaf follükül hücrelerinde sayı fazlası olması nedeniyle daha etkili olduğunu düşündürdü. Işık mikroskopik olarak da *invivo* doksorubisin uygulaması ile atretik follüküllerde artış ve atretik follüküllerin morfolojik bir göstergesi olarak tanımlanan, antral sıvı içine dökülen apoptotik granüloza hücrelerinde artış görüldü (Şekil 10c ve Şekil 10e). Granüloza hücreleriyle oosit arasındaki bağlantıların bozulduğu ve follükül hücrelerinde inklüzyonların oluştuğu gözlemlendi (Şekil 10d ve Şekil 10f). Sekonder follüküllerde daha belirgin olmak üzere, tüm follüküllerde dejenerasyon bulguları saptandı (Şekil 10c ve Şekil 10f). Primordiyal, sekonder ve graaf follüküllerin morfolojilerinin bozulduğu görüldü (Şekil 10).

Ayrıca bu çalışmada, doksorubisinin gastrointestinal sistem üzerinde toksik etkisine bağlı olarak deney hayvanlarında gelişen anoreksiya (Zang ve ark, 1999) ve buna bağlı vücut ağırlığında anlamlı bir azalma saptandı (Grafik 1).

Doksorubisin benzeri kemoterapötik ajan olan siklofosamid ve siterabin içeren tedavilerin de sıklıkla folliküler hasara neden olduğu, prepubertal kadınlarda hormonal aksın nisbeten korunduğu, akut lenfosittik lösemi (ALL) nedeniyle tedavi almış hastalarda normal ya da hızlanmış puberte ortaya çıktığı gösterilmiştir. Alkilleyici ajanların erişkin kadınlarda amenoreye sebep olabileceği, mekloretamin, siklofosamid ve Hodgkin lenfoma hastalığının tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaç kombinasyonlarının farklı derecelerde infertilite ve hormon değişikliklerine yol açabildiği De Jonge ve Verweij tarafından gösterilmiştir (De Jonge ve Verweij, 2006).

Bu çalışmada olduğu gibi Maltaris ve ark., tarafından doksorubisinin ovaryum rezervi üzerine olumsuz etkileri bulunduğu, doksorubisin verilen fare grubunda, ovaryum follikül sayılarında azalma ve dejenere follikül sayılarında anlamlı artış ile gösterilmiş ve bu çalışmada olduğu gibi TUNEL yöntemi ile folliküler apoptozis belirlenmiştir (Maltaris ve ark., 2007). Doksorubisinin fare ovaryan toksisitesinin granüloza hücreleri üzerindeki etkisi immünohistokimyasal, RT-PCR analizleriyle de desteklenmiştir. Bir diğer araştırmacı grubu tarafından doksorubisinin kadının üreme ve endokrin fonksiyonlarını destekleyen üç önemli faktör olan folliküler gelişim, hormon salgılanması ve oosit matürasyonu üzerinde doza bağlı toksisiteye sebep olduğu bildirilmiştir (S. Xiao ve ark., 2017).

Bu çalışmada da, doksorubisin uygulanan sıçanların ovaryum doku korteks ve medulla stromasında ve gelişmekte olan folliküllerin granüloza hücrelerinde TUNEL pozitifliği elde edildi. Böylece doksorubisinin apoptotik aktivasyona neden olduğu ve diğer gruplarla karşılaştırıldığında atretik follikül sayılarında istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu görüldü (Grafik 4 ve Grafik 5).

Kemoterapi tedavisi sonrası ortaya çıkan prematür ovaryan yetmezliğin infertiliteye sebep olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Chiarelli ve ark., 2000; Sommezer ve Oktay, 2004). Bu hastalarda kemoradyoterapi uygulaması sonrasında sterilite olmasa bile, erken gebelik kayıpları, prematür eylem ve düşük doğum ağırlıklı bebeklerin görülebileceği bildirilmiştir (Chiarelli ve ark., 2000). Kanser tedavisi öncesinde ve sonrasında fertilitenin korunması amacıyla çeşitli

medikal ve cerrahi yöntemler kullanılmakta ve bu yöntemlerin koruyucu etkileri net olmamakla birlikte (Sommezer ve Oktay, 2004), uzun etkili gonadotropin analogları (Z. Blumenfeld, 2007), GnRH antagonistleri (Dror Meirou ve Schiff, 2005), antioksidanlar (Yeh ve ark., 2008) ovaryum rezervini korumak amaçlı kullanılmaktadır (Z. Blumenfeld, 2007).

Hücrelerin zarar görmesini önlemek için ROS düzeylerinin antioksidanlar ile dengede tutulması gerekir. Bu denge bozulduğu zaman vücut antioksidan savunma sistemini devreye sokar. ROS'un etkisizleştirilmesi için antioksidan enzimler veya enzimatik olmayan moleküller devreye girer. Bunlar doğal olarak vücutta üretilir veya takviye olarak dışarıdan alınmaktadır. Endojen antioksidan enzimler; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GRx)'dir. Bunlar ROS'un detoksifiye edilmesinde doğrudan etkilidir. Enzimatik olmayan antioksidanlar; metabolik antioksidanlar ve besinsel antioksidanlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Lipoik asit, glutatyon, L-arjinin, koenzim Q-10, melatonin, ürik asit, bilirubin, metal-bağlayıcı proteinler, transferrin başlıca enzimatik olmayan antioksidanlardır. Vitamin E, vitamin C, karotenoidler, iz elementler (selenyum, manganez, çinko), flavonoidler, omega-3 ve omega-6 yağ asitleri besinsel antioksidanlardır. Besinsel antioksidanlar vücutta üretilemedikleri için gıdalar veya takviyeler ile alınmaktadır. Antioksidanlar ROS'un neden olacağı hasarı önleyebilme ve hasarın onarılmasını sağlayabilmektedir. Böylece antioksidan kullanımı ile immün sistem güçlendirilerek kanser gibi hastalıkların önlenmesi mümkün olabilir (ÇİFTÇİ, 2017). Yıllar boyunca yapılan araştırmalar, *Allium* sebzelerinin kanser karşıtı etkilerinin, işlendiklerinde (kıyma, çiğneme vb.) sebzelerden salgılanan organosülfür bileşikleri (OSC) kaynaklı olabileceğini ortaya koymaktadır (Block, 2010). İntakt *Allium* sebzelerinde S-alkil(en)il-L sistein sülfoksit (alliin)e hidrolize ve oksidize edilen γ -glutamil-S-alk(en)il-L-sisteinler primer sülfür bileşikleridir. Alliin kokusuz OSC prekürsörüdür ve *Allium* sebzelerinin depolanması sırasında doğal olarak birikir (Block, 2010). OSC'ler alliin allicine ve *Allium* sebzelerini ezme, çiğneme veya kesme aracılığıyla vakuollerden salınan allinaz aracılığıyla alkil alken-thiosulfınatlara dönüşmesiyle oluşmaktadır. Allisin ve ilgili tiyosulfınatlar, oldukça dengesizdir ve anında dialil sülfid (DAS), dialil disülfid (DADS), dialil trisülfid (DATS), diditinler ve ajoen (Block, 2010) dahil olmak üzere çeşitli sülfür bileşikleri elde etmek için ayrıştırılır.

Karsinojenik kimyasallar; genellikle neoplastik aktiviteleri için sitokrom P450'ye bağımlı monooksijenazların (faz 1 enzimleri) aracılık ettiği metabolik aktivasyonu gerektirir. Aktive edilmiş karsinojenik ara maddelerin inaktivasyonu, glutation transferazlar dahil olmak üzere faz 2 enzimleri ile gerçekleştirilir. Çalışmalar, OSC'lerin sadece faz 1 enzimlerini inhibe etmediğini, aynı zamanda faz 2 enzimlerinin ekspresyonunu da arttırdığını ortaya koymuştur (Block, 2010; Herman-Antosiewicz ve ark., 2007; Shukla ve Kalra, 2007). Örneğin, DAS ve metabolitleri dialil sülfoksit ve dialil sülfon sitokrom P-450 2E1'in aktivitesini zamana ve NADPH'ye bağımlı bir şekilde inhibe etmektedir (Brady ve ark., 1991). Wattenberg ve arkadaşları, benzo [a] piren ile indüklenen ön mide ve akciğer kanseri farelerinde sarımsak OSC'leri uygulandığında hepatik ve hedef organ glutatyon transferaz aktivitesinin yükseldiği gösterilmiştir (Sparnins ve ark., 1988). Böylelikle, OSC kimyasal olarak oluşturulmuş kanserlerin önlenmesinde sadece karsinojen aktivasyonunu inhibe ederek değil, aynı zamanda faz 2 enzimleri sayesinde aktive karsinojen ara maddelerin detoksifikasyonu arttırmaktadır (Shukla ve Kalra, 2007).

Bu çalışmada dialil disülfid uygulandığında, doksorubisinin gonadotoksik etkisine karşı koruyucu etki sağladığı hem ışık mikroskopik hem de istatistiksel olarak görüldü. Bu etki vücut ağırlığındaki artışla birlikte (Grafik 1), primordiyal ve gelişmekte olan follikül sayısında korunma (Grafik 2 ve Grafik 3) ve atretik follikül sayısında azalma (Grafik 4 ve Grafik 5) şeklinde görülmektedir. Doksorubisin ile birlikte verilen dialil disülfidin ovaryumda oluşan bu hasarı yukarıda tanımlanan antioksidan etkisi ile azaltabileceği ve ovaryan follikül rezervini korumakta kullandığı yollardan birinin ROS/antioksidan dengesine yaptığı etki olduğu sonucuna varıldı.

Kanser hastalarında, fertilitenin korunmasında apoptozis inhibitörleri, etkili olabileceği düşünülen, ancak deneysel ve klinik bilginin henüz yeterli olmadığı bir konudur. Bu çalışmanın sonucunda elde ettiğimiz bulgulara göre follikül sayımı sonrasında gruplar arasında unilaminar primer ve multilaminar primer folliküllerin sayısında istatistiksel olarak anlamlılık görülmezken, doksorubisin grubunda primordiyal follikül sayılarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma belirlendi (Grafik 2 ve Grafik 3). Bu azalma kemoterapatik ilaçlar ile çalışma yapan diğer araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir (Koyama ve ark., 1977; Maltaris ve ark.,

2007). Bu çalışmada primordiyal follikül sayısındaki bu azalmanın nedeninin bazal atrezi nedeni ile olabileceği düşünüldü.

Doksozobisin grubunda diğer gruplara göre sekonder ve graaf follikül sayılarında azalmalar olduğu (Grafik 2 ve Grafik 3), atretik follikül sayılarında ise anlamlı derecede artış olduğu görüldü (Grafik 4 ve 5). Sekonder ve graaf folliküllerdeki sayısal azalmaların granüloza hücre apoptozisinde aktarılan yollardan antral atrezi ve terminal farklılaşma apoptozisi nedeni ile olabileceği düşünüldü.

Doksozobisin+dialil disülfid grubunda sekonder ve graaf follikül sayılarının doksozobisin grubu hariç diğerleri ile benzer olduğu (Grafik 2 ve Grafik 3), atretik follikül sayılarının doksozobisin grubuna kıyasla anlamlı derecede azaldığı (Grafik 4 ve Grafik 5) saptandı. Doksozobisin sonrası dialil disülfid uygulanan grupta atreziye giden sekonder ve graaf folliküllerin granüloza hücrelerinde daha az sayıda DNA fragmantasyonu olduğu ve sadece dialil disülfid verilen gruba arasında bir fark olmadığı görüldü (Grafik 6 ve Grafik 7). Dolayısıyla dialil disülfidin doksozobisine bağlı gonadotoksistide primordiyal follikül seviyesinde ve gelişmekte olan folliküller seviyesinde tedavi edici bir etki gösterdiği, gonadotoksik etkisi bilinen doksozobisinin meydana getirdiği ovaryum doku hasarını ve folliküler kaybı azaltmak, ovaryan rezervi korumak amacıyla dialil disülfid tedavisinin olumlu sonuçlar verdiği bu çalışma kapsamında gösterilmiştir. Dialil disülfidin bu olumlu etkisinin; doksozobisin hücre içerisinde ROS birikimi ile birlikte DNA hasarına neden olarak follikül granüloza hücrelerinde ve stromal hücrelerde oluşturduğu apoptotik aktivasyonun, dialil disülfidin hücre içerisindeki serbest oksijen radikallerini minimum düzeye indirerek normal ovaryum dokusundaki gelişmekte olan follikülleri kemoterapötik ajanların toksik etkisinden koruyabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak, bu çalışma doksozobisin kemoterapisi sonrasında oluşan ovaryan toksistide dialil disülfidin koruyucu etkisinin olduğunu gösteren ilk çalışma olup, kemoterapi sonrası uygulanacak dialil disülfid tedavisinin hem gelişmekte olan follikülleri hemde primordiyal follikül havuzunu korumada etkili olabileceği gösterilmekle birlikte, fertilitiyi korumaya yönelik yaklaşımlara alternatif bir tedavi olarak literatürde yer alması için ek çalışmalara gerek vardır.

6. KAYNAKLAR

- Abraham SA, DN Waterhouse, LD Mayer et al. (2005) The Liposomal Formulation of Doxorubicin. *Methods in Enzymology*, doi:10.1016/S0076-6879(05)91004-5.
- Adaki S, R Adaki, K Shah et al. (2016) Garlic: Review of Literature. *Indian Journal of Cancer*, doi:10.4103/0019-509x.175383.
- Adams JM, S Cory (2001) Life-or-Death Decisions by the Bcl-2 Protein Family. *Trends in Biochemical Sciences*, doi:10.1016/S0968-0004(00)01740-0.
- Adrain C, SJ Martin (2001) The Mitochondrial Apoptosome: A Killer Unleashed by the Cytochrome C. *Trends in Biochemical Sciences*, doi:10.1016/S0968-0004(01)01844-8.
- Agarwal KC (1996) Therapeutic Actions of Garlic Constituents. *Medicinal Research Reviews*, doi:10.1002/(SICI)1098-1128(199601)16:1<111::AID-MED4>3.0.CO;2-5.
- Agarwal SS, VK Singh (1999) Immunomodulators: A Review of Studies on Indian Medicinal Plants and Synthetic Peptides. *Proceedings of the Indian National Science Academy*.
- Alshabanah OA, MM Hafez, MM Al-Harbi et al. (2011) Doxorubicin Toxicity Can Be Ameliorated during Antioxidant L-Carnitine Supplementation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, doi:10.4161/oxim.3.6.14416.
- Altieri P, C Barisione, E Lazzarini et al. (2016) Testosterone Antagonizes Doxorubicin-Induced Senescence of Cardiomyocytes. *Journal of the American Heart Association*, doi:10.1161/JAHA.115.002383.
- Amsterdam A, R Sasson, I Keren-Tal et al. (2003) Alternative Pathways of Ovarian Apoptosis: Death for Life. *Biochemical Pharmacology*.
- Antosiewicz J, A Herman-Antosiewicz, SW Marynowski et al. (2006) C-Jun NH2-Terminal Kinase Signaling Axis Regulates Diallyl Trisulfide-Induced Generation of Reactive Oxygen Species and Cell Cycle Arrest in Human Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0356.
- Apperley J (2009) Issues of Imatinib and Pregnancy Outcome. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, doi:10.6004/jnccn.2009.0069.
- Arcamone F, G Cassinelli, G Fantini et al. (2000) Adriamycin, 14-Hydroxydaunomycin, a New Antitumor Antibiotic from *S. Peuceetius* Var. *Caesius*. *Biotechnology and Bioengineering*, doi:10.1002/(SICI)1097-0290(20000320)67:6<704::AID-BIT8>3.0.CO;2-L.
- Arunkumar A, MR Vijayababu, N Srinivasan et al. (2006) Garlic Compound, Allyl Disulfide Induces Cell Cycle Arrest in Prostate Cancer Cell Line PC-3. *Molecular and Cellular Biochemistry*, doi:10.1007/s11010-006-9126-6.
- Atici E (2007) Tip Tarihinde Kanser ve Lösemi. *Türk Onkoloji Dergisi*.
- Baines CP (2010) Role of the Mitochondrion in Programmed Necrosis. *Frontiers in Physiology*, doi:10.3389/fphys.2010.00156.
- Barrera G (2012) Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *ISRN Oncology*, doi:10.5402/2012/137289.
- Bellamy COC, RDG Malcomson, DJ Harrison et al. (1995) Cell Death in Health and

- Disease: The Biology and Regulation of Apoptosis. *Seminars in Cancer Biology*, doi:10.1006/scbi.1995.0002.
- Bendale Y, V Bendale, S Paul (2017) Evaluation of Cytotoxic Activity of Platinum Nanoparticles against Normal and Cancer Cells and Its Anticancer Potential through Induction of Apoptosis. *Integrative Medicine Research*, doi:10.1016/j.imr.2017.01.006.
- Benkeblia N (2005) Free-Radical Scavenging Capacity and Antioxidant Properties of Some Selected Onions (*Allium Cepa* L.) and Garlic (*Allium Sativum* L.) Extracts. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, doi:10.1590/S1516-89132005000600011.
- Bergès R, MH Siess, I Arnault et al. (2004) Comparison of the Chemopreventive Efficacies of Garlic Powders with Different Alliin Contents against Aflatoxin B1 Carcinogenicity in Rats. *Carcinogenesis*, doi:10.1093/carcin/bgh200.
- Block E (2010) The Chemistry of Garlic and Onions. *Scientific American*, doi:10.1038/scientificamerican0385-114.
- Blot WJ, JY Li, PR Taylor et al. (1993) Nutrition Intervention Trials in Linxian, China: Supplementation with Specific Vitamin/Mineral Combinations, Cancer Incidence, and Disease-Specific Mortality in the General Population. *Journal of the National Cancer Institute*, doi:10.1093/jnci/85.18.1483.
- Blumenfeld Z. (2007) How to Preserve Fertility in Young Women Exposed to Chemotherapy? The Role of GnRH Agonist Cotreatment in Addition to Cryopreservation of Embrya, Oocytes, or Ovaries. *The Oncologist*, doi:10.1634/theoncologist.12-9-1044.
- Blumenfeld Z (2002) Preservation of Fertility and Ovarian Function and Minimalization of Chemotherapy Associated Gonadotoxicity and Premature Ovarian Failure: The Role of Inhibin-A and -B as Markers. *Molecular and Cellular Endocrinology*.
- Blumenfeld Zeev (2008) GnRH-Agonists in Fertility Preservation. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, doi:10.1097/MED.0b013e32831a46e9.
- Blumenfeld Zeev (2012) Chemotherapy and Fertility. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, doi:10.1016/j.bpobgyn.2011.11.008.
- Bomsel-Helmreich O, A Gougeon, A Thebault et al. (1979) Healthy and Atretic Human Follicles in the Preovulatory Phase: Differences in Evolution of Follicular Morphology and Steroid Content of Follicular Fluid. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, doi:10.1210/jcem-48-4-686.
- Bonfoco E, D Krainc, M Ankarcona et al. (1995) Apoptosis and Necrosis: Two Distinct Events Induced, Respectively, by Mild and Intense Insults with N-Methyl-D-Aspartate or Nitric Oxide/Superoxide in Cortical Cell Cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Brady JF, H Ishizaki, JM Fukuto et al. (1991) Inhibition of Cytochrome P-450 2E1 by Diallyl Sulfide and Its Metabolites. *Chemical Research in Toxicology*, doi:10.1021/tx00024a008.
- Cagel M, E Grotz, E Bernabeu et al. (2017) Doxorubicin: Nanotechnological Overviews from Bench to Bedside. *Drug Discovery Today*, doi:10.1016/j.drudis.2016.11.005.
- Castedo M, J-L Perfettini, T Roumier et al. (2004) Cell Death by Mitotic Catastrophe: A Molecular Definition. *Oncogene*, doi:10.1038/sj.onc.1207528.

- Chiarelli AM, LD Marrett, GA Darlington (2000) Pregnancy Outcomes in Females after Treatment for Childhood Cancer. *Epidemiology*, doi:10.1097/00001648-200003000-00013.
- Chiarelli AM, LD Marrett, G Darlington (2012) Early Menopause and Infertility in Females after Treatment for Childhood Cancer Diagnosed in 1964-1988 in Ontario, Canada. *American Journal of Epidemiology*, doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a009995.
- ÇİFTÇİ N (2017) Oksidatif Stresin Kanserdeki Rolü: Antioksidanlar Kansere Progresyonunun Yakıtı Olabilir Mi?. *Ahi Evran Tıp Dergisi*.
- Curtin JF, TG Cotter (2003) Live and Let Die: Regulatory Mechanisms in Fas-Mediated Apoptosis. *Cellular Signalling*, doi:10.1016/S0898-6568(03)00093-7.
- Daniel NN, SJ Korsmeyer (2004) Cell Death: Critical Control Points. *Cell*.
- Dann EJ, R Epelbaum, I Avivi et al. (2005) Fertility and Ovarian Function Are Preserved in Women Treated with an Intensified Regimen of Cyclophosphamide, Adriamycin, Vincristine and Prednisone (Mega-CHOP) for Non-Hodgkin Lymphoma. *Human Reproduction*, doi:10.1093/humrep/dei018.
- De Jonge MJA, J Verweij (2006) Renal Toxicities of Chemotherapy. *Seminars in Oncology*, doi:10.1053/j.seminoncol.2005.11.011.
- Della Torre P, G Mazué, A Podestà et al. (1999) Protection against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Weanling Rats by Dexrazoxane. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, doi:10.1007/s002800050876.
- Demchenko AP (2013) Beyond Annexin V: Fluorescence Response of Cellular Membranes to Apoptosis. *Cytotechnology*, doi:10.1007/s10616-012-9481-y.
- Di Marco A, G Cassinelli, F Arcamone (1981) The Discovery of Daunorubicin. *Cancer Treatment Reports*.
- Doroshov JH (2006) Role of Hydrogen Peroxide and Hydroxyl Radical Formation in the Killing of Ehrlich Tumor Cells by Anticancer Quinones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, doi:10.1073/pnas.83.12.4514.
- El-Bayoumy K, R Sinha, JT Pinto et al. (2018) Cancer Chemoprevention by Garlic and Garlic-Containing Sulfur and Selenium Compounds. *The Journal of Nutrition*, doi:10.1093/jn/136.3.864s.
- Ellis R (2002) Mechanisms And Functions Of Cell Death. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, doi:10.1146/annurev.cellbio.7.1.663.
- Falcone T, M Attaran, MA Bedaiwy et al. (2004) Ovarian Function Preservation in the Cancer Patient. *Fertility and Sterility*, doi:10.1016/j.fertnstert.2003.06.031.
- Familiari G, A Caggiati, SA Nottola et al. (1993) Infertility: Ultrastructure of Human Ovarian Primordial Follicles after Combination Chemotherapy for Hodgkin's Disease. *Human Reproduction*, doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a137985.
- Fiallo MML, A Garnier-Suillerot, B Matzanke et al. (1999) How Fe³⁺ Binds Anthracycline Antitumour Compounds. The Myth and the Reality of a Chemical Sphinx. *Journal of Inorganic Biochemistry*, doi:10.1016/S0162-0134(99)00040-9.
- Fitzmaurice C, D Dicker, A Pain et al. (2015) The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncology*, doi:10.1001/jamaoncol.2015.0735.
- Fleischer RT, BJ Vollenhoven, GC Weston (2011) The Effects of Chemotherapy and Radiotherapy on Fertility in Premenopausal Women. *Obstetrical and Gynecological Survey*, doi:10.1097/OGX.0b013e318224e97b.

- Ford WCL (2001) Biological Mechanisms of Male Infertility. *Lancet*, doi:10.1016/S0140-6736(00)04452-4.
- Franz TA, SH Kidson (1997) Mapping of Interdigital Apoptosis in the Chick and Duck Hindlimb. *South African Journal of Science*.
- Frisch SM, E Ruoslahti (1997) Integrins and Anoikis. *Current Opinion in Cell Biology*, doi:10.1016/S0955-0674(97)80124-X.
- Galluzzi L, SA Aaronson, J Abrams et al. (2009) Guidelines for the Use and Interpretation of Assays for Monitoring Cell Death in Higher Eukaryotes. *Cell Death and Differentiation*, doi:10.1038/cdd.2009.44.
- Gewirtz DA (1999) A Critical Evaluation of the Mechanisms of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*, doi:10.1016/S0006-2952(98)00307-4.
- Golstein P, G Kroemer (2007) Cell Death by Necrosis: Towards a Molecular Definition. *Trends in Biochemical Sciences*, doi:10.1016/j.tibs.2006.11.001.
- Goodwin PJ, M Ennis, KI Pritchard et al. (1999) Risk of Menopause during the First Year after Breast Cancer Diagnosis. *Journal of Clinical Oncology*.
- Gougeon A. (2010) Human Ovarian Follicular Development: From Activation of Resting Follicles to Preovulatory Maturation. *Annales d'Endocrinologie*, doi:10.1016/j.ando.2010.02.021.
- Gougeon Alain (1996) Regulation of Ovarian Follicular Development in Primates: Facts and Hypotheses. *Endocrine Reviews*, doi:10.1210/edrv-17-2-121.
- Gozuacik D, A Kimchi (2004) Autophagy as a Cell Death and Tumor Suppressor Mechanism. *Oncogene*, doi:10.1038/sj.onc.1207521.
- Gültekin N, K Karaoğlu, E Küçükates (2008) Hücrede Apoptoz ve Sağkalım Mekanizmalarinin Keşfedilmesi ve Yeni Potansiyel Tedavi Stratejileri. *Türk Kardiyoloji Dernegi Arsivi*.
- Guraya SS (2017) Morphology, Histochemistry, and Biochemistry of Human Ovarian Compartments and Steroid Hormone Synthesis. *Physiological Reviews*, doi:10.1152/physrev.1971.51.4.785.
- Hengartner MO, R Ellis, HR Horvitz (1992) *Caenorhabditis Elegans* Gene Ced-9 Protects Cells from Programmed Cell Death. *Nature*, doi:10.1038/356494a0.
- Herman-Antosiewicz A, AA Powolny, S V. Singh (2007) Molecular Targets of Cancer Chemoprevention by Garlic-Derived Organosulfides. *Acta Pharmacologica Sinica*, doi:10.1111/j.1745-7254.2007.00682.x.
- Hirsch K, M Danilenko, J Giat et al. (2000) Effect of Purified Allicin, the Major Ingredient of Freshly Crushed Garlic, on Cancer Cell Proliferation. *Nutrition and Cancer*, doi:10.1207/S15327914NC382_14.
- Hong Y-S, Y-A Ham, J-H Choi et al. (2013) Effects of Allyl Sulfur Compounds and Garlic Extract on the Expression of Bcl-2, Bax, and P53 in Non Small Cell Lung Cancer Cell Lines. *Experimental & Molecular Medicine*, doi:10.1038/emm.2000.22.
- Howell S, S Shalet (1998) Gonadal Damage from Chemotherapy and Radiotherapy. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*.
- Hsing AW, AP Chokkalingam, Y-T Gao et al. (2002) Allium Vegetables and Risk of Prostate Cancer: A Population-Based Study. *Journal of the National Cancer Institute*.
- Hughes FM, WC Gorospe (1991) Biochemical Identification of Apoptosis

- (Programmed Cell Death) in Granulosa Cells: Evidence for a Potential Mechanism Underlying Follicular Atresia. *Endocrinology*, doi:10.1210/endo-129-5-2415.
- Injac R, M Perse, N Obermajer et al. (2008) Potential Hepatoprotective Effects of Fullerenol C60(OH)₂₄ in Doxorubicin-Induced Hepatotoxicity in Rats with Mammary Carcinomas. *Biomaterials*, doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.048.
- Irving-Rodgers HF, M Krupa, RJ Rodgers (2004) Cholesterol Side-Chain Cleavage Cytochrome P450 and 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Expression and the Concentrations of Steroid Hormones in the Follicular Fluids of Different Phenotypes of Healthy and Atretic Bovine Ovarian Follicles1. *Biology of Reproduction*, doi:10.1095/biolreprod.103.017442.
- Izzo AA, R Capasso, F Capasso (2004) Eating Garlic and Onion: A Matter of Life or Death [2]. *British Journal of Cancer*, doi:10.1038/sj.bjc.6601918.
- Ji YK, O Kwon (2009) Garlic Intake and Cancer Risk: An Analysis Using the Food and Drug Administration's Evidence-Based Review System for the Scientific Evaluation of Health Claims. *American Journal of Clinical Nutrition*, doi:10.3945/ajcn.2008.26142.
- Karmakar S, NL Banik, SJ Patel et al. (2007) Garlic Compounds Induced Calpain and Intrinsic Caspase Cascade for Apoptosis in Human Malignant Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Apoptosis*, doi:10.1007/s10495-006-0024-x.
- Kerr JFR, AH Wyllie, AR Currie (1972) Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*, doi:10.1038/bjc.1972.33.
- Kim C, N Kim, H Joo et al. (2005) Modulation by Melatonin of the Cardiotoxic and Antitumor Activities of Adriamycin. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, doi:10.1097/01.fjc.0000171750.97822.a2.
- Knowles LM, JA Milner (2002) Diallyl Disulfide Inhibits P34 Cdc2 Kinase Activity through Changes in Complex Formation and Phosphorylation. *Carcinogenesis*, doi:10.1093/carcin/21.6.1129.
- Koyama H, T Wada, Y Nishizawa et al. (1977) Cyclophosphamide-induced Ovarian Failure and Its Therapeutic Significance in Patients with Breast Cancer. *Cancer*, doi:10.1002/1097-0142(197704)39:4<1403::AID-CNCR2820390408>3.0.CO;2-8.
- Kroemer G (2009) Classification of Cell Death. *Cell Death Differ.*, doi:10.1038/cdd.2008.150.Classification.
- Kroemer Guido, L Galluzzi, C Brenner (2007) Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiological Reviews*, doi:10.1152/physrev.00013.2006.
- La Ferla B, C Airoidi, C Zona et al. (2011) Natural Glycoconjugates with Antitumor Activity. *Natural Product Reports*, doi:10.1039/c0np00055h.
- Lamm DL, DR Riggs (2018) Enhanced Immunocompetence by Garlic: Role in Bladder Cancer and Other Malignancies. *The Journal of Nutrition*, doi:10.1093/jn/131.3.1067s.
- Lanzotti V (2006) The Analysis of Onion and Garlic. *Journal of Chromatography A*, doi:10.1016/j.chroma.2005.12.016.
- Lass A (2004) Assessment of Ovarian Reserve. Is There Still a Role for Ovarian Biopsy in the Light of New Data?. *Human Reproduction*, doi:10.1093/humrep/deh118.

- LeBlanc A, H Liu, C Goodyer et al. (1999) Caspase-6 Role in Apoptosis of Human Neurons, Amyloidogenesis, and Alzheimer's Disease. *Journal of Biological Chemistry*, doi:10.1074/jbc.274.33.23426.
- Letourneau JM, EE Ebbel, PP Katz et al. (2012) Acute Ovarian Failure Underestimates Age-Specific Reproductive Impairment for Young Women Undergoing Chemotherapy for Cancer. *Cancer*, doi:10.1002/cncr.26403.
- Li M (2002) Antitumor Activity of Z-Ajoene, a Natural Compound Purified from Garlic: Antimitotic and Microtubule-Interaction Properties. *Carcinogenesis*, doi:10.1093/carcin/23.4.573.
- Link RP (2010) The Merck Index. *Journal of Dairy Science*, doi:10.3168/jds.s0022-0302(60)90334-9.
- Louis J, LR Limarzi, WR Best (1956) Treatment of Chronic Granulocytic Leukemia with Myleran. *A.M.A Archives of Internal Medicine*, doi:10.1001/archinte.1956.00250210045003.
- Mackie EJ, M Radford, SM Shalet (1996) Gonadal Function Following Chemotherapy for Childhood Hodgkin's Disease. *Medical and Pediatric Oncology*, doi:10.1002/(SICI)1096-911X(199608)27:2<74::AID-MPO2>3.0.CO;2-Q.
- Madsen BL, L Giudice, SS Donaldson (1995) Radiation-Induced Premature Menopause: A Misconception. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, doi:10.1016/0360-3016(95)00025-T.
- Maltaris T, R Seufert, F Fischl et al. (2007) The Effect of Cancer Treatment on Female Fertility and Strategies for Preserving Fertility. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, doi:10.1016/j.ejogrb.2006.08.006.
- Marti A, PM Ritter, R Jäger et al. (2001) Mouse Mammary Gland Involution Is Associated with Cytochrome c Release and Caspase Activation. *Mechanisms of Development*, doi:10.1016/S0925-4773(01)00381-1.
- Matés JM, JA Segura, FJ Alonso et al. (2010) Oxidative Stress and Apoptosis. *Apoptosis: Modern Insights into Disease from Molecules to Man*, p. , doi:10.1201/9781439845431.
- Matsuda F, N Inoue, N Manabe et al. (2012) Follicular Growth and Atresia in Mammalian Ovaries: Regulation by Survival and Death of Granulosa Cells. *The Journal of Reproduction and Development*.
- Meirow D., D Nugent (2001) The Effects of Radiotherapy and Chemotherapy on Female Reproduction. *Human Reproduction Update*, doi:10.1093/humupd/7.6.535.
- Meirow Dror (1999) Ovarian Injury and Modern Options to Preserve Fertility in Female Cancer Patients Treated with High Dose Radio-Chemotherapy for Hemato-Oncological Neoplasias and Other Cancers. *Leukemia and Lymphoma*, doi:10.3109/10428199909093726.
- Meirow Dror, H Biederman, RA Anderson et al. (2010) Toxicity of Chemotherapy and Radiation on Female Reproduction. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, doi:10.1097/GRF.0b013e3181f96b54.
- Meirow Dror, E Schiff (2005) Appraisal of Chemotherapy Effects on Reproductive Outcome According to Animal Studies and Clinical Data. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, doi:10.1093/jncimonographs/lgi025.
- Mian M, M Tinelli, DEM E et al. (2016) Bortezomib, Thalidomide and

- Lenalidomide: Have They Really Changed the Outcome of Multiple Myeloma?. *Anticancer Res*, doi:36/3/1059 [pii].
- Miller WL, RJ Auchus (2011) The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. *Endocrine Reviews*, doi:10.1210/er.2010-0013.
- Milner JA (2001) Mechanisms by Which Garlic and Allyl Sulfur Compounds Suppress Carcinogen Bioactivation. *Garlic and Carcinogenesis. Advances in Experimental Medicine and Biology*.
- Mohan P, N Rapoport (2010) Doxorubicin as a Molecular Nanotheranostic Agent: Effect of Doxorubicin Encapsulation in Micelles or Nanoemulsions on the Ultrasound-Mediated Intracellular Delivery and Nuclear Trafficking. *Molecular Pharmaceutics*, doi:10.1021/mp100269f.
- Motta P (1969) Electron Microscope Study on the Human Lutein Cell with Special Reference to Its Secretory Activity. *Zeitschrift Für Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie*, doi:10.1007/BF00338327.
- Nakagawa H, K Tsuta, K Kiuchi et al. (2001) Growth Inhibitory Effects of Diallyl Disulfide on Human Breast Cancer Cell Lines. *Carcinogenesis*.
- Nicotera P, G Melino (2004) Regulation of the Apoptosis-Necrosis Switch. *Oncogene*, doi:10.1038/sj.onc.1207559.
- Nottola SA, R Heyn, A Camboni et al. (2006) Ultrastructural Characteristics of Human Granulosa Cells in a Coculture System for in Vitro Fertilization. *Microscopy Research and Technique*, doi:10.1002/jemt.20309.
- Oktay K, M Sönmezer (2008) Chemotherapy and Amenorrhea: Risks and Treatment Options. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, doi:10.1097/GCO.0b013e328307ebad.
- Oktem O, K Oktay (2007) A Novel Ovarian Xenografting Model to Characterize the Impact of Chemotherapy Agents on Human Primordial Follicle Reserve. *Cancer Research*, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2042.
- Oleaga C, C Bernabini, AST Smith et al. (2016) Multi-Organ Toxicity Demonstration in a Functional Human in Vitro System Composed of Four Organs. *Scientific Reports*, doi:10.1038/srep20030.
- Othman MS, G Safwat, M Aboulkhair et al. (2014) The Potential Effect of Berberine in Mercury-Induced Hepatorenal Toxicity in Albino Rats. *Food and Chemical Toxicology*, doi:10.1016/j.fct.2014.04.012.
- Pavlopoulou A, DA Spandidos, I Michalopoulos (2015) Human Cancer Databases (Review). *Oncology Reports*, doi:10.3892/or.2014.3579.
- Pedraza-Chaverrí J, AE González-Orozco, PD Maldonado et al. (2003) Diallyl Disulfide Ameliorates Gentamicin-Induced Oxidative Stress and Nephropathy in Rats. *European Journal of Pharmacology*, doi:10.1016/S0014-2999(03)01948-4.
- Pham-Huy LA, H He, C Pham-Huy (2008) Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science*.
- QuanJun Y, Y GenJin, W LiLi et al. (2017) Protective Effects of Dexrazoxane against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: A Metabolomic Study. *PLoS ONE*, doi:10.1371/journal.pone.0169567.
- Quirk S M, RG Cowan, RM Harman et al. (2004) Ovarian Follicular Growth and Atresia: The Relationship between Cell Proliferation and Survival. *Journal of Animal Science*, doi:10.2527/2004.8213_supplE40x.

- Quirk Susan M, RG Cowan, RM Harman (2006) The Susceptibility of Granulosa Cells to Apoptosis Is Influenced by Oestradiol and the Cell Cycle. *Journal of Endocrinology*, doi:10.1677/joe.1.06549.
- Rahman K (2001) Historical Perspective on Garlic and Cardiovascular Disease. *The Journal of Nutrition*, doi:10.1093/jn/131.3.977S.
- Rajagopalan S, PM Politi, BK Sinha et al. (1988) Adriamycin-Induced Free Radical Formation in the Perfused Rat Heart: Implications for Cardiotoxicity. *Cancer Research*.
- Ray A, N Murthy, S Mukherjee et al. (2009) Dietary Factors and Cancer Chemoprevention: An Overview of Obesity-Related Malignancies. *Journal of Postgraduate Medicine*, doi:10.4103/0022-3859.43549.
- Regan SLP, PG Knight, JL Yovich et al. (2018) Granulosa Cell Apoptosis in the Ovarian Follicle-A Changing View. *Frontiers in Endocrinology*, doi:10.3389/fendo.2018.00061.
- Rivankar S (2015) An Overview of Doxorubicin Formulations in Cancer Therapy. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, doi:10.4103/0973-1482.139267.
- Rivlin R S (2001) Historical Perspective on the Use of Garlic. *The Journal of Nutrition*, doi:10.1093/jn/131.3.951S.
- Rivlin Richard S. (2009) Can Garlic Reduce Risk of Cancer?. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2009, doi:10.3945/ajcn.2008.27181.
- Schilsky RL, RJ Sherins, SM Hubbard et al. (1981) Long-Term Follow-up of Ovarian Function in Women Treated with MOPP Chemotherapy for Hodgkin's Disease. *American Journal of Medicine*, doi:10.1016/0002-9343(81)90202-3.
- Sen S, R Chakraborty, C Sridhar et al. (2010) Free Radicals, Antioxidants, Diseases and Phytochemicals: Current Status and Future Prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*.
- Shen M, Z Liu, Y Teng et al. (2014) Involvement of FoxO1 in the Effects of Folliclestimulating Hormone on Inhibition of Apoptosis in Mouse Granulosa Cells. *Cell Death and Disease*, doi:10.1038/cddis.2014.400.
- Shirin H, JT Pinto, Y Kawabata et al. (2001) Antiproliferative Effects of S-Allylmercaptocysteine on Colon Cancer Cells When Tested Alone or in Combination with Sulindac Sulfide. *Cancer Research*.
- Shivakumar P, MU Rani, AG Reddy et al. (2012) A Study on the Toxic Effects of Doxorubicin on the Histology of Certain Organs. *Toxicology International*, doi:10.4103/0971-6580.103656.
- Shukla Y, N Kalra (2007) Cancer Chemoprevention with Garlic and Its Constituents. *Cancer Letters*, doi:10.1016/j.canlet.2006.05.009.
- Sommezer M, K Oktay (2004) Fertility Reservation in Female Patients. *Human Reproduction Update*, doi:10.1093/humupd/dmh021.
- Sparnins VL, G Barany, LW Wattenberg (1988) Effects of Organosulfur Compounds from Garlic and Onions on Benzo[a]Pyrene-Induced Neoplasia and Glutathione s-Transferase Activity in the Mouse. *Carcinogenesis*, doi:10.1093/carcin/9.1.131.
- Spelman K, JJ Burns, D Nichols et al. (2006) Modulation of Cytokine Expression by Traditional Medicines: A Review of Herbal Immunomodulators. *Alternative Medicine Review*.
- Sperandio S, I de Belle, DE Bredesen (2002) An Alternative, Nonapoptotic Form of Programmed Cell Death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,

- doi:10.1073/pnas.97.26.14376.
- Spierings DC, EG De Vries, E Vellenga et al. (2004) Tissue Distribution of the Death Ligand TRAIL and Its Receptors. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, doi:10.1369/jhc.3A6112.2004.
- Stankiewicz A, E Skrzydlewska, M Makiela (2002) Effects of Amifostine on Liver Oxidative Stress Caused by Cyclophosphamide Administration to Rats. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, doi:10.1515/DMDI.2002.19.2.67.
- Strasser A, L O'Connor, VM Dixit (2002) Apoptosis Signaling. *Annual Review of Biochemistry*, doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.217.
- Sudman PD, JC Rutledge, JB Bishop et al. (1992) Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, doi:10.1016/0165-1110(92)90038-B.
- Sundaram SG, JA Milner (1996) Diallyl Disulfide Induces Apoptosis of Human Colon Tumor Cells. *Carcinogenesis*, doi:10.1093/carcin/17.4.669.
- Sundaram SG, JA Milner (2018) Diallyl Disulfide Suppresses the Growth of Human Colon Tumor Cell Xenografts in Athymic Nude Mice. *The Journal of Nutrition*, doi:10.1093/jn/126.5.1355.
- Tan C, H Tasaka, K-P Yu et al. (1967) Daunomycin, an Antitumor Antibiotic, in the Treatment of Neoplastic Disease. *Cancer*, doi:10.1002/1097-0142(1967)20:3<333::aid-cncr2820200302>3.0.co;2-k.
- Tewey KM, TC Rowe, L Yang et al. (1984) Adriamycin-Induced DNA Damage Mediated by Mammalian DNA Topoisomerase II. *Science*, doi:10.1126/science.6093249.
- Thomson M, M Ali (2005) Garlic [*Allium Sativum*]: A Review of Its Potential Use as an Anti-Cancer Agent. *Current Cancer Drug Targets*, doi:10.2174/1568009033333736.
- Thorn CF, C Oshiro, S Marsh et al. (2011) Doxorubicin Pathways: Pharmacodynamics and Adverse Effects. *Pharmacogenetics and Genomics*, doi:10.1097/FPC.0b013e32833ffb56.
- Tilly JL, KI Kowalski, DW Schomberg et al. (1992) Apoptosis in Atretic Ovarian Follicles Is Associated with Selective Decreases in Messenger Ribonucleic Acid Transcripts for Gonadotropin Receptors and Cytochrome P450 Aromatase. *Endocrinology*, doi:10.1210/endo.131.4.1396312.
- Titus S, F Li, R Stobezki et al. (2013) Impairment of BRCA1-Related DNA Double-Strand Break Repair Leads to Ovarian Aging in Mice and Humans. *Science Translational Medicine*, doi:10.1126/scitranslmed.3004925.
- Vallejo MJ, L Salazar, M Grijalva (2017) Oxidative Stress Modulation and ROS-Mediated Toxicity in Cancer: A Review on In Vitro Models for Plant-Derived Compounds. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, doi:10.1155/2017/4586068.
- Van Wezel IL, AM Dharmarajan, TC Lavranos et al. (1999) Evidence for Alternative Pathways of Granulosa Cell Death in Healthy and Slightly Atretic Bovine Antral Follicles. *Endocrinology*, doi:10.1210/endo.140.6.6758.
- Van Wezel IL, M Krupa, RJ Rodgers (1999) Development of the Membrana Granulosa of Bovine Antral Follicles: Structure, Location of Mitosis and Pyknosis, and Immunolocalization of Involucrin and Vimentin. *Reproduction, Fertility and Development*, doi:10.1071/RD98069.
- Vaux DL, SJ Korsmeyer (1999) Cell Death in Development. *Cell*,

- doi:10.1016/S0092-8674(00)80564-4.
- Von Wolff M, M Montag, R Dittrich et al. (2011) Fertility Preservation in Women - A Practical Guide to Preservation Techniques and Therapeutic Strategies in Breast Cancer, Hodgkin's Lymphoma and Borderline Ovarian Tumours by the Fertility Preservation Network FertiPROTEKT. Archives of Gynecology and Obstetrics, doi:10.1007/s00404-011-1874-1.
- Vousden KH, X Lu (2002) Live or Let Die: The Cell's Response to P53. Nature Reviews Cancer, doi:10.1038/nrc864.
- Wallace W. H.B., SM Shalet, EC Crowne et al. (1989) Gonadal Dysfunction Due to Cis-platinum. Medical and Pediatric Oncology, doi:10.1002/mpo.2950170510.
- Wallace W. Hamish B., RA Anderson, DS Irvine (2005) Fertility Preservation for Young Patients with Cancer: Who Is at Risk and What Can Be Offered?. Lancet Oncology, doi:10.1016/S1470-2045(05)70092-9.
- Wang L, Q Chen, H Qi et al. (2016) Doxorubicin-Induced Systemic Inflammation Is Driven by Upregulation of Toll-like Receptor TLR4 and Endotoxin Leakage. Cancer Research, doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-3034.
- Warpe VS, VR Mali, S Arulmozhi et al. (2015) Cardioprotective Effect of Ellagic Acid on Doxorubicin Induced Cardiotoxicity in Wistar Rats. Journal of Acute Medicine, doi:10.1016/j.jacme.2015.02.003.
- Watson AR, CP Rance, J Bain (1985) Long Term Effects of Cyclophosphamide on Testicular Function. British Medical Journal (Clinical Research Ed.), doi:10.1136/bmj.291.6507.1457.
- Wu XJ, F Kassie, V Mersch-Sundermann (2005) The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) Production on Diallyl Disulfide (DADS) Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human A549 Lung Carcinoma Cells. Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.02.026.
- Xiao Danhua, JT Pinto, J-W Soh et al. (2003) Induction of Apoptosis by the Garlic-Derived Compound S-Allylmercaptocysteine (SAMC) Is Associated with Microtubule Depolymerization and c-Jun NH(2)-Terminal Kinase 1 Activation. Cancer Research.
- Xiao Dong, S Choi, DE Johnson et al. (2004) Diallyl Trisulfide-Induced Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells Involves c-Jun N-Terminal Kinase and Extracellular-Signal Regulated Kinase-Mediated Phosphorylation of Bcl-2. Oncogene, doi:10.1038/sj.onc.1207747.
- Xiao Dong, A Herman-Antosiewicz, J Antosiewicz et al. (2005) Diallyl Trisulfide-Induced G2-M Phase Cell Cycle Arrest in Human Prostate Cancer Cells Is Caused by Reactive Oxygen Species-Dependent Destruction and Hyperphosphorylation of Cdc25C. Oncogene, doi:10.1038/sj.onc.1208759.
- Xiao Dong, S V. Singh (2006) Diallyl Trisulfide, a Constituent of Processed Garlic, Inactivates Akt to Trigger Mitochondrial Translocation of BAD and Caspase-Mediated Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells. Carcinogenesis, doi:10.1093/carcin/bgi228.
- Xiao S, J Zhang, M Liu et al. (2017) Doxorubicin Has Dose-Dependent Toxicity on Mouse Ovarian Follicle Development, Hormone Secretion, and Oocyte Maturation. Toxicological Sciences, doi:10.1093/toxsci/kfx047.
- Yang IA, JG Shaw, JR Goddard et al. (2016) Use of Inhaled Corticosteroids in COPD: Improving Efficacy. Expert Review of Respiratory Medicine,

doi:10.1586/17476348.2016.1151789.

Yeh J, BS Kim, J Peresie (2008) Protection against Cisplatin-Induced Ovarian Damage by the Antioxidant Sodium 2-Mercaptoethanesulfonate (Mesna) in Female Rats. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, doi:10.1016/j.ajog.2007.12.027.

You WC, WJ Blot, YS Chang et al. (1989) Allium Vegetables and Reduced Risk of Stomach Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, doi:10.1093/jnci/81.2.162.

Yuan JP, GH Wang, H Ling et al. (2004) Diallyl Disulfide-Induced G2/M Arrest of Human Gastric Cancer MGC803 Cells Involves Activation of P38 MAP Kinase Pathways. *World Journal of Gastroenterology*, doi:10.3748/wjg.v10.i18.2731.

Yucebilgin MS, MC Terek, A Ozsaran et al. (2004) Effect of Chemotherapy on Primordial Follicular Reserve of Rat: An Animal Model of Premature Ovarian Failure and Infertility. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, doi:10.1111/j.1479-828X.2004.00143.x.

Zong WX, CB Thompson (2006) Necrotic Death as a Cell Fate. *Genes and Development*, doi:10.1101/gad.1376506.

7. SİMGELER ve KISALTMALAR

%	: Yüzde
AIF	: Apoptoz indükleyici faktör
AI	: Apoptotik indeks
bFGF	: Temel fibroblast büyüme faktörü
Ca	: Kalsiyum
cm	: santimetre
DAB	: Diaminobenzidin
dk	: dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
FSH	: Follikül stimüle edici hormon
g	: Gram
GER	: Granüler endoplazmik retikulum
H&E	: Hematoksilen-eozin
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
ip	: İntraperitoneal
kg	: kilogram
LH	: Luteinizan hormon
Mg	: Magnezyum
mg	: miligram
ml	: mililitre
mm	: milimetre
O₂	: Oksijen
OMI	: Oosit matürasyon inhibitörü
Ort	: Ortalama
PBS	: Fosfat buffer saline tampon
POF	: Prematür ovaryan yetmezlik
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SER	: Düz endoplazmik retikulum
SF	: Serum fizyolojik
SRY	: Cinsiyet belirleyici bölge Y
SS	: Standart sapma
TBF	: Testis belirleyici faktör
TNF	: Tümör nekroz faktör
TNFR	: Tümör nekroz faktör reseptörü
TRADD	: TNFR adaptör protein
ZP	: zona pellusida

8. EKLER

8.1. Şekil Listesi

- Şekil 1.** Primordiyal follükül
Şekil 2. Unilaminar primer follükül
Şekil 3. Multilaminar primer follükül
Şekil 4. Sekonder follükül
Şekil 5. Graaf follükül
Şekil 6. Atretik follükül
Şekil 7. Apoptoz sinyal yolağı
Şekil 8. Grup I (Kontrol-Doksorubisin)
Şekil 9. Grup II (Kontrol-Dialil disülfid)
Şekil 10. Grup III (Doksorubisin)
Şekil 11. Grup IV (Dialil disülfid)
Şekil 12. Grup V (Doksorubisin+Dialil disülfid)
Şekil 13. Ovaryum dokusu TUNEL boyama sonrası skorlama

8.2. Tablo Listesi

- Tablo 1.** Doku takibi basamakları
Tablo 2. H&E boyama protokolü
Tablo 3. Follüküllerin morfolojik sınıflandırması
Tablo 4. TUNEL yöntemi protokolü
Tablo 5. Deney öncesi ve sonrası vücut ağırlıklarının ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum ve p değerleri
Tablo 6. H&E boyaması sonrası değerlendirilen kesitlerde, gruplara ait sol ovaryum follükül sayılarının ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum ve p değerleri
Tablo 7. H&E boyaması sonrası değerlendirilen kesitlerde, gruplara ait sağ ovaryum follükül sayılarının ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum ve p değerleri
Tablo 8. H&E boyaması sonrası değerlendirilen kesitlerde, gruplara ait atretik follükül sayılarının ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum ve p değerleri
Tablo 9. TUNEL boyaması sonrası değerlendirilen kesitlerde, gruplara ait atretik follüküllerin ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum değerleri

8.3. Grafik Listesi

- Grafik 1.** Deney öncesi ve deney sonrası deneklerin vücut ağırlıkları
Grafik 2. Gruplara ait sol ovaryum follükül sayıları
Grafik 3. Gruplara ait sağ ovaryum follükül sayıları
Grafik 4. Gruplara ait sol atretik follükül sayıları
Grafik 5. Gruplara ait sağ atretik follükül sayıları
Grafik 6. Gruplara ait sol ovaryum Aİ grafiğı
Grafik 7. Gruplara ait sağ ovaryum Aİ grafiğı

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bana her zaman yol gsteren, gstermiŐ olduğu ozveri ve katkuların ozesinde, tezimin gercekleŐmesi szuresince uzerimden manevi ve bilimsel desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Zeynep KAHVECİ; hocalarım Prof. Dr. Semiha ERSOY ve Doç. Dr. Berrin AVCI ile bzlumldeki diğer hocalarıma; deney hayvanlarının temini ve uygulamaların yapılmasında destek sağlayan Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi ve çalıŐanlarına; doktora eğitimim boyunca her turlu bilgi ve manevi desteklerini esirgemeyen baŐta Seda SAYGI, Aysun ÖZBAY, AyŐe AKBAŐ, İlknur YAVAŞ ve diğer asistan arkadaşlarıma; tezimin dzzenlenmesinde yardımcı olan biricik kuzenlerim Özlem BULUT ve Ergün NİZAM'a ve hayatım boyunca varlıklarından gurur duyduğum her koŐulda beni destekleyen sevgili aileme çok teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

15 Haziran 1989 tarihinde Bursa'da doğdum. Dörtçelik İlköğretim Okulu'nda ilk ve orta öğrenimimi tamamladım. Bursa Cumhuriyet Lisesi'nde lise öğrenimimi tamamladıktan sonra 2008 yılında Balıkesir Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandım. 2016 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimimi tamamladım ve aynı yıl doktora programına başladım.

