



**T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RAT OVERİNDE ZnO NANOPARTİKÜLLER İLE OLUŞAN
HASARDA, L-ARJİNİN AJANININ ETKİSİNİN HİSTOLOJİK
VE
BİYOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ**

Fatima EFENDİC

Tez DanıŐmanı

Dr. Öğr. Üyesi Tansel SAPMAZ

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN/2019

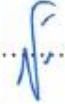
TEZ KABUL ONAYI

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü, **Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında** Fatima Efendic tarafından hazırlanan **Rat overinde ZnO nanopartiküller ile oluşturulan hasarda, L arjinin ajanının etkisinin histolojik ve biyokimyasal olarak incelenmesi** başlıklı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından ~~OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU~~ ile YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman/Başkan Dr. Öğr. Üyesi Tansel SAPMAZ

İMZA

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Histoloji ve Embriyoloji ABD

.....


Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

Üye: Prof. Dr. Aygen ÇELİK

İMZA

Maltepe Üniversitesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum

.....


Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Halime Tuba CANBAZ

İMZA

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Histoloji ve Embriyoloji ABD

.....


Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 27/06/2019

Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Doç. Dr. Meltem VURAL



BEYAN

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Mevcut tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu,
- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Mevcut tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Fatima Efendic

“Eşim ve kızım Sare Meliha’ya”



ÖZET

RAT OVERİNDE ZnO NANOPARTİKÜLLER İLE OLUŞAN HASARDA, L-ARJİNİN AJANININ ETKİSİNİN HİSTOLOJİK VE BİYOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ

Çinko oksit nanopartiküllerin (ZnO NP), insan sağlığına etkisi üzerine yapılan araştırmalarda birçok dokuda hasara neden olduğu bilinmektedir. Bu dokular arasında ovaryum da bulunmaktadır. Doku yenilenmesinin gerçekleşmesi gibi birçok sentezde ve metabolik yolda rol alan, ovaryumda kan akışının düzenlenmesinde ve foliküllerin olgunlaşmasında görevli L-arjinin (L-A), oluşan hasara karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu ileri sürülmektedir.

Çalışmanın hedefi; ZnO nanopartiküllerinin ovaryuma, foliküllere ve menstrual döngüye dokusal boyutta hangi büyüklükte hasara yol açtığı; oluşan bu hasarların iyileştirilmesinde L-arjininin herhangi bir koruyucu etkisinin olup olmadığının anlaşılması hedeflenmektedir. Moleküler düzeyde DNA zinciri üzerinde gerçekleşen hasarın tespit edilmesi amacıyla apoptoz ilgili genlerinin ekspresyon seviyesinin qRT-PCR yöntemi kullanılarak ölçülmesi amaçlanmıştır.

Çalışma için dişi ratlar 5 gruba ayrılmıştır. İlk grup, kontrol grubu olarak seçilmiştir. 2. ve 3. gruplara sırasıyla 100 mg/kg ve 200 mg/kg olmak üzere iki farklı dozda ZnO NP uygulanmıştır. 4. ve 5. gruba ise ZnO NP uygulamasına ilave olarak 1.3 gr/kg L-arjinin uygulanmıştır. Maddeler intraperitoneal (IP) 21 gün boyunca düzenli olarak verilmiştir. Uygulamadan sonra ratlar proöstrus-östrus fazındayken sakrifiye edilerek gerekli analizlerin gerçekleştirilmesi amacıyla ovaryumları çıkarılmış ve kan örnekleri progesteron seviyesi tespit etmek için alınmıştır. Histolojik incelemesinin gerçekleştirilebilmesi için ovaryumların yarısı % 10'luk formaldehit çözeltisi içerisinde aktarıldı.

Ovaryum kesitlerini incelediğimizde ZnO NP gruplarında nekrotik ve apoptotik doku fazlalığı gözlemlendi. Folikül sayısı azaldı. L-arg ile uygulanmış deney gruplarında ise atrezik folikül sayısı çinko oksit gruplarına göre oldukça düşük olduğu anlaşıldı. Hasarlı graaf folikül gözlemlendi. L-arg ile muamele edilen gruplarda, ZnO NP toksisitesine bağlı olarak meydana gelen hasarların kısmen engellendiği tespit edildi. Ayrıca, özellikle 3. grupta primordiyal foliküllerden sekonder foliküllere kadar gelişimin farklı aşamalarında oosit çekirdeklerinin küçük olduğu bazı folikülerde çekirdek bulunmadığı da tespit edildi. Granüloza hücrelerinde zayıf bir boyama gözlemlendi.

Sonuç olarak, ZnO nanopartiküllerin ovaryum üzerine morfolojik ve fizyolojik zararlı etkileri ortaya konmuş ve L-arjinin kullanımının toksisitesine ve strese bağlı hasarı engelleyerek kliniğe faydalı sağlayabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, ZnO Nanopartiküller, Folikül, L-arjinin, Ovaryum.

ABSTRACT

HISTOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHANGES OF FEMALE RATS OVARY BY ZINC OXIDE NANOPARTICLES AND POTENTIAL PROTECTIVE EFFECTS OF *L*-ARGININE

Research about zinc oxide nanoparticles (ZnO NP) shows many different damage on human tissue. One of these affected tissues is ovarium. *L*- Arginine (*L*-A) plays a key role in synthesis and metabolism of many pathways, ovarium blood fluidity regulation, ovarian maturity, follicle development and protectional effect against damages.

In this research we target to; Effect of damage of ZnO NP on ovarian tissue, follicle and menstrual cycle and what is protection level and benefit of *L*-arginine on mentioned tissue.

For this research the used 30 rats divide into 5 groups, each group contain 6 rats. First group we used as control group. 2. and 3. groups received two different doses of ZnO NP, 100 mg/kg and 200 mg/kg ZnO NP. Fourth and fifth group with doses of ZnO NP received 1.3 gr/kg of *L*-A amino acid. All substance is given on intraperitoneal (IP) way during 21 day.

After 21 day rats were sacrificed during proestrus- estrous phase. For planed analysis blood was collected into serum tube and one part of ovarium. For histological research ovarian tissue was placed into 10 % formaldehyde.

Ovarium example observation in groups with application of ZnO NP, we recognized necrotic and apoptotic cells. Level of follicle decreased. Groups obtained with *L*-A, we found that atretic follicle size were lower comparing with group obtained with ZnO. However, insightful damage induced by toxicity in ZnO groups were reduced by *L*-A.

In addition, in 3th group we found that seconder and primordial follicle generation oocytes were small. Comparing with control morphological degeneration of follicle and tissue has been reported in every group.

To conclude, in this research, detrimental influence of ZnO NP on ovary were recognized and inevitable morphological and physiological, effect of *L*-A in regeneration and blocking damage induced by stress and toxicity were noticed.

Key Words: Apoptosis, Follicle, *L*-arginine, Ovarium, ZnO Nanoparticle

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2018/095

Yüksek lisans eğitim sürecim boyunca manevi destek ve tecrübeleriyle, yürüdüğüm yolumun ışığı, hiç bir zaman umidini kaybetmeyen ve her zaman yanımda olan çok değerli danışman hocam, Dr. Öğr. Üyesi Tansel SAPMAZ'a teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans eğitimi sürecinde desteğini esirgemeyen çok değerli hocam, Dr. Öğr. Üyesi Tugba CAMBAZ, Prof. Dr. Ebru KALE Prof. Dr. Sadrettin PENÇE ve Dr. Öğr. Üyesi Halime Hatun PENÇE hocama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince laboratuvar teknikleri konusunda her zaman yanımda olan Dr. Öğr. Üyesi Ayşe KÖSE ve Dr. Öğr. Üyesi Mustafa YILMAZ hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Fikir, öneri ve ilgileriyle bana destek olan can arkadaşlarım Rukiye KARATEPE, Ezgi AYDIN, Kübra KONTBAY, Sibel KURAŞ, Fatma GÜMÜŞKAYA, Davut KÖSE ve Leyla ACAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayvan deneylerinde yardımlarını benden esirgemeyen ve her zaman gülen yüzü ile Vet. hekim Cumali DEMIRTAŞ, Ali Fuat KAPLAN ve Sami DAĞLAR hocalarıma teşekkürlerimi sunarım. İstatistik kısmında destek veren Öğr. Üyesi Kürşat BAYDILI'ya teşekkür ederim. Proje başvurusu sırasında ve her zaman beni ümitlendiren can arkadaşım Behice Nur ERDOL'a ve Hazal TOPAL'a teşekkürlerimi borçluyum. Beni her zaman idare eden ve usanmadan tüm sorularımı cevaplayan Esra ALPTEKİN'e teşekkürlerimi borçluyum.

Bu süreçte yanımda olan kahrımı çeken, maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen can yoldaşım sevgili eşim Hamza Salih ERDEN'e ve ERDEN ailesine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında olduğu gibi bu zorlu süreçte de yanımda olan, sevgileri ve ilgileriyle bana güç veren, bana inanan sevgili annem Mevlida EFENDİC'e, canım ablam Merima'ya ve Şevket'e çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR	x
SEMBOLLER	xii
ÇİZELGE LİSTESİ	xiii
ŞEKİL LİSTESİ	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	15
2. GENEL BİLGİLER	17
2.1 OVARYUM	17
2.1.1 Ovaryumun Embriyolojisi.....	18
2.1.2 Ovaryumun Histolojisi	23
2.1.3 Ovaryum Foliküllerinin Yapısı	24
2.1.4 Korpus Luteum.....	26
2.1.5 Ovaryum Medullası.....	27
2.1.6 Ovaryumda Steroid-Salgılayan Hücreler	28
2.1.7 Ovaryumdaki Steroid-Salgılayan Hücreler	28
2.2 ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜL	29
2.3 L-ARJİNİN	38
2.3.1 Arjinin Biyosentezi	39
2.3.2 Arjinin katabolizması	40
2.3.3 Arjinaz Enzimi	41
2.3.4 Nitrik Oksit (NO)	42
2.3.5 NO'nun Ovaryum Üzerine Etkisi.....	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM	46
3.1 DENEKLERİN TEMİNİ VE ÖZELLİKLERİ.....	46
3.1.1 Çalışmanın Deney Grupları.....	46
3.1.2 NP ve L-Arg Hazırlanması ve Ratlara Uygulanması	47
3.1.3 Vajinal Yayma.....	47
3.1.4 Vajinal Yayma Metodu	47
3.1.5 Sakrifikasyon.....	48
3.2 ÇALIŞMANIN DEĞERLENDİRİLMESİNDE KULLANILAN UYGULAMALAR.....	48
3.2.1 Gen Ekspresyon Seviyesinin Real-Time PCR ile Belirlenmesi.....	48
3.2.2 RNA Elüsyon	49
3.2.3 cDNA Kütüphanesinin Hazırlanması.....	49
3.2.4 Kantitatif Gen Ekspresyonu (qReal-Time PCR)	51
3.2.5 qRT-PCR Protokolü	51
3.3 HİSTOLOJİK İNCELEME	53

3.3.1 Dokuların Takibi	53
3.3.2 Masson Trikrom boyaması.....	53
3.3.3 PAS Periodic Acid Schiff Boyama	55
3.3.4 Hematoksilen Eozin Boyama.....	56
3.3.5 Biyokimyasal Analiz.....	57
3.3.6 İstatistiksel Yöntemler	59
3.3.7 Kullanılan Cihazlar	59
3.3.8 Kimyasal Malzemeler	60
4. BULGULAR	63
4.1 VAJİNAL YAYMA BULGULARI.....	63
4.1.1 Ratlardan Alınan Örneklerden Smear Preparat Yaymaları.....	63
4.2 BİYOKİMYASAL BULGULAR	63
4.2.1 Serumdan Progesteron Seviyesi (P).....	63
4.3 HİSTOLOJİK İNCELEME -IŞIK MİKROSKOP BULGULARI.....	65
4.3.1 Kontrol grubu- üçlü boyama bulguları.....	65
4.3.2 ZnO NP Grubuna Ait Işık Mikroskobik Bulgular	67
4.3.2.1 100 mg/kg ZnO NP grubunun bulguları:	67
4.3.2.2 200 mg/kg ZnO NP grubunun bulguları:	69
4.3.3 ZnO NP + L-A Grubuna Ait Işık Mikroskobik Bulgular.....	71
4.3.3.1 100 mg/kg ZnO NP + L-A grubunun bulguları:	71
4.3.3.2 200 mg/kg ZnO NP + L-A grubunun bulguları:	73
4.3.4 Follikül sayılarının değerlendirilmesi	74
4.4 RT PCR BULGULAR	76
5. TARTIŞMA	81
6. SONUÇ	87
KAYNAKLAR	89
EKLER	96
EK 1. ETİK KURUL KARARI	96
EK 2. ÖZGEÇMİŞ.....	98

KISALTMALAR

Cu⁺²	: Bakır
Ct	: Döngü Sayısı (Cycle Threshold)
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
E2	: Östradiol
ER	: Endoplazma Retikulumu
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EGF	: Epidermal Growth Factor (Epidermal Büyüme Faktörü)
Fe⁺²	: Demir
FSH	: Folikül Stimülan Hormon
F	: Folikül
GF	: Graaf Folikül
GH	: Growth Hormone (Büyüme Hormonu)
GH	: Granüloza Hücre
GnRH	: Gonadotropin Releasing Hormone (Gonadotropin Salgılatıcı Hormon)
GV	: Germinal Vezikül
H+E	: Hematoksilen ve Eozin Boyası
İp	: İntraperitoneal
L-arg	: L-arjinin
LH	: Lüteinizan Hormon
M-I	: Metafaz 1
M-II	: Metafaz 2
OD	: Absorbans Değeri
NO	: Nitrik Oksit
NADP⁺	: Nikotin amid adenin dinükleotid (Okside form)
NADPH	: Nikotin amid adenin dinükleotid (Redükte form)
P	: Progesteron
PO	: Primer Oosit
PrF	: Primordiyal Folikül
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri

SF	: Sekonder Folikül
UV	: Ultraviyole
ZP	: Zona Pelüsida
ZnO	: Çinko oksit
ZnO NP	: Çinko oksit nanopartikülleri
Zn²⁺	: Çinko iyonu



SEMBOLLER

%	: Yüzde
μL	: Mikrolitre
°C	: Santigrat derece
μg/mL	: Mikrogram/ Mililitre
nm	: Nanometre
M	: Molar
mL	: Mililitre
N	: Normalite
rpm	: Dakikada devir sayısı-Santrifüj

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Metal oksit NP'lerin ovaryum, oogenezis ve embriyo üzerinde toksik etkileri, Cong-Cong Hou and Jun-Quan Zhu (2017)'den....	31
Çizelge 3.1. Foliküllerin Sınıflandırılması	57
Çizelge 4.1. Progesteron seviyesi istatistiksel analizi	64
Çizelge 4.2. RT PCR yöntemin istatistik sonuçları	76
Çizelge 4.3. Kaspase 9 genin gruplar arasında değerlendirilmesi.....	77
Çizelge 4.4. Kaspaz 3 genin gruplar arasında değerlendirilmesi	78
Çizelge 4.5. <i>Bcl</i> genin gruplar arasında değerlendirilmesi	79
Çizelge 4.6. <i>Bax</i> genin gruplar arasında değerlendirilmesi	79

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Ovaryumun ve rahimin yapısı Ronald. W. Dudek, (2016 p.17)'den..	17
Şekil 2.2. Ovaryumun yapısı; medulla ve korteks -Ross (2003 p. 567)'den.....	18
Şekil 2.3. Primordiyal folikül – Ross ve Pawlina (2011 p.834)'den.	20
Şekil 2.4. A) Primer Folikül B) Sekonder Folikül - Ross ve Pawlina (2011 p. 834)'den.....	20
Şekil 2.5. Graaf folikülü -Ross (2011)'den	22
Şekil 2.6. Korteks Medulla histolojik yapısı, Ovaryum korteksi. H&E. Anthony L. Mescher (2015)'den.	23
Şekil 2.7. Primordiyal, primer ve fekonder folliküllerin histolojik inceleme. Anthony L. Mescher (2015)'den.	25
Şekil 2.8. Korpus luteum H&E Antony L. Mescher (2015)'den.	27
Şekil 2.9. Nanopartiküllerin hücreye etkisi. Cong-Cong Hou ve Jun-Quan Zhu (2017)'den.	34
Şekil 2.10. NPlerin ovaryumun salgılayıcı hormonlara ve hipotalamik-hipofiz-gonadal eksen üzerindeki etkisi. Cong-Cong Hou ve Jun-Quan Zhu (2017)'den.	35
Şekil 2.11. Nanopartiküllerin hücreye girişi. Stefania S. Randy P. Carney, Virgilio B. (2014)'den.....	37
Şekil 2.12. Arjinin aminoasit Alternative Medicine Review (2005)'den	39
Şekil 2.13. Arjininin yer aldığı metabolik yollar Guoyao WU ve Sidney M. MORRIS (1998)'den.	40
Şekil 2.14. Arjinin yıkımı Guoyao WU ve Sidney M. MORRIS (1998)'den.....	41
Şekil 4.1. Vajinal yayma	63
Şekil 4.2. Kontrol grubuna ait ışık mikroskop incelemeler;	66
Şekil 4.3. 100 mg/kg ZnO NP grubuna ait ışık mikroskopik bulgular;.....	68
Şekil 4.4. 200 mg/kg ZnO NP grubuna ait ışık mikroskopik bulgular	70
Şekil 4.5. 100 mg/kg ZnO NP + L-A grubuna ait ışık mikroskopik bulguları....	72
Şekil 4.6. 200 mg/kg ZnO NP + L-A grubuna ait ışık mikroskopik bulgular.....	73
Şekil 4.7. Kontrol (grup 1) ve deney gruplarındaki primordiyal, primer, sekonder ve Graaf foliküllerin sayıları.	75
Şekil 4.8. <i>Kaspaz 9</i> , <i>Kaspaz 3</i> , <i>Bcl</i> , <i>Bax</i> ve <i>B-Aktin</i> genlerin kontrol ve deney gruplarında gen ekspresyon değerlendirilmesi	77

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nanoteknoloji alanında yaşanan büyük gelişmeler, nanoteknolojik ürünlerin kullanımında artış gösterdiğini ve nanopartiküllerin çevre ile etkileşiminin de artmasına neden olmuştur (1). ZnO NP güneş kremleri, kozmetik ürünlerinde, biyogörüntüleme, plastik ürünlerinin ve gıda paketlenme için kullanılan ambalajların yapımında ve kanser ilaçlarında oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (2, 3). ZnO hücre membranının hasarı, DNA hasarı, apoptoz indüklenmesi, sitotoksik, genotoksik, oksidatif stres, mitokondrinin fonksiyon bozukluğu, inflamatuvar cevabı ve serbest radikallerin oluşumunu problemlere neden olduğu da bilinmektedir (4, 5, 6, 7).

Farklı boyutlarda ki nanopartiküller doku, hücre ve organlarda farklı etkiler göstermektedir (8, 9). Küçük boyuttaki partiküllerin nispeten daha büyük boyuttaki partiküllere oranla çok daha fazla hasara neden olduğu bilinmektedir (10). 35-50 nm boyutundaki ZnO NP kolaylıkla hücre membranını geçerek östrojen ve progesteronu inhibe etmesi, oosit hücrelerine, adenokarsinoma hücrelerine ve embriyonik hücrelere sitotoksik etkiye sebep olduğu da bilinmektedir (11, 13). NPlerin hücrelere nüfuz ederek hücrelerde ROS üretimine veya hücre içi oksidatif stresin artmasına sebebiyet verdiği böylece biyolojik yapı ve fonksiyonlarda bozukluklar meydana getirdiği gösterilmiştir (14, 15).

In vitro deneylerde ZnO NP'nin fetal yumurtalıklara nüfuz ettiği ve eşey ana hücrelerinde sito-toksisiteye neden olduğu açıklanmaktadır. Elde edilen veriler doğrultusunda da ZnO NP'nin doğum öncesi ve sonrası oogenez ile ilgili süreçleri etkileyebileceğini ve yumurtalık folikül rezervini azalttığını gösteren bulgular bulunmaktadır (16). ZnO NP'lerin granüloza hücreleri tarafından hapsedilebileceğini ve bu nedenle ovumun hormon salgılanmasında ve displazisinde değişikliklere yol açabileceği göstermiştir (17). NP'lerin hücrelere ve granül hücrelerine girebileceğini ve normal fonksiyonlarını etkileyebileceğini, özellikle de bu hücrelerden hormon salgılanmasındaki anahtar rolleriyle ilgili olduğunu gösteren iyi belgelenmiş

çalışmalar bulunmaktadır. Yumurta hücresinin salınmasından önce teka hücreleri tarafından salgılanan androjen ve androstenedionlar, granül hücrelerine yayılır ve sonrasında steroid hormonlarına dönüşür (18).

L-Arjinin (L-A); nitrik oksit (NO), protein sentezi, ornitin ve üre sentezi, glutamat sentezi, prolin sentezi, kreatin sentezi, poliaminlerin biyosentezinde kullanılan bir aminoasittir. NO'nun kanda yüksek seviyesi sağlıklı inflamasyonu artırır. Bu aminoasit çeşidi büyüme hormonunun daha fazla salgılanmasına ve kas dokusunun daha etkili bir şekilde yenilenmesine yardımcı olmaktadır (19). L-A uterus ve yumurtada kan akışını düzelterek yumurtanın verimini artırır ve fertilizasyonu, implantasyonu daha verimli hale getirir. Anterior hipofiz hormonlarının salınımları NO tarafından düzenlenir ve ovaryum fonksiyonları bu yolla kontrol edilmektedir.

NO dişi genital organların için immün sistem, kan damarların yapıyı koruması ve nöronların steroidojenik hücreleri, hem otokrin hem de parakrin, direk olarak etkisini göstermektedir. Ovaryum steroid sentezinde indirek yol ile işlem yapmaktadır. NO'in intraovaryan düzenleyici görevinin dışında NO direk olarak hipofiz gonadotropinlerinin sentez ve salınımında düzenlemede rol oynar (20, 21).

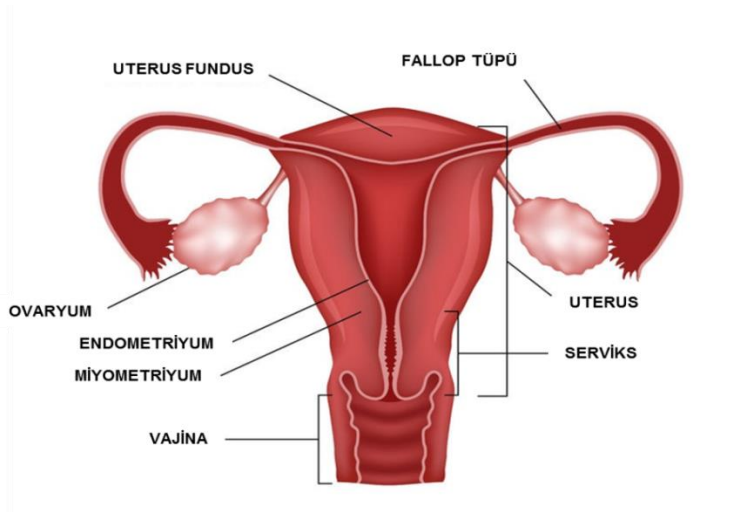
NO, granüloza hücrelerindeki steroid sentezini azaltarak gereksiz östrojen sentezini engeller. Granüloza hücrelerinin foliküller olgunlaşması için vazgeçilmez olan steroidlerin ve büyüme faktörlerinin sentezinde rol oynadığı ve bu mekanizma boyunca NO ve membran proteinlerinin önemi olduğunu görmekteyiz. Daha önce bahsedilen çalışmalara dayanarak, ZnO NP ovaryum folikülleri üzerindeki ROS ve toksisitesi kaynaklı etkilerini granüloza ve teka hücrelerinin üzerinden gerçekleştirdiğini, folikülogeneze etki ettiğini, bunlara bağlı olarak da foliküller atreziye uğradığını ve stereoid metabolizması değiştiğini belirtmekteyiz.

Bu tez çalışmasında, rat ovaryumunda ZnO ile reaktif oksidatif stres ve apoptotik hasarın mekanizmasını ve L-Arjin'inin bu hasara karşı potansiyel iyileştirici etkisini biyokimyasal analiz, ışık mikroskop düzeyinde moleküler ve histobiyokimyasal yöntemler ile inceleme yoluyla özellikle folikülogenez ve gen ekspresyonunu ön plana çıkartarak araştırmayı amaçladık. Bulgular literatür verileriyle karşılaştırmalı olarak ortaya konulmaya çalışıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 OVARYUM

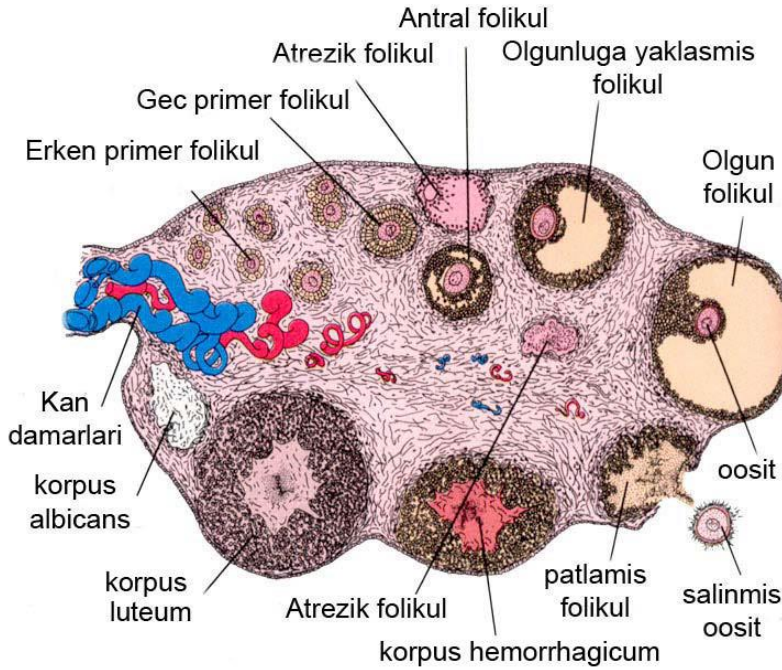
Ovaryum; sadece dişi bireylerde bulunan bir organ olup, pelvis adı verilen kalça kemiğinin oluşturduğu boşluğun yan duvarlarına dayalı bir şekilde bulunur. Çiçek şekline benzeyen ovaryum, sağ ve sol tarafta olmak üzere iki adettir. İnsanların da içinde bulunduğu birçok memeli türünde ovaryum biçim ve büyüklük olarak bademe benzetilmektedir. Ovaryumun boyutu ve şekli, dişi bireyin hayatı boyunca 2 farklı dönemde (pubertenin başında ve menepozun başında) değişmektedir (Şekil 2.1). Her iki ovaryumun da birbirleri ile bağlantılı olarak iki fonksiyonu bulunmaktadır. Bunlar; dişi eşey hücrelerini üretmesi ile bu üretilen eşey hücrelerinin işlevsel hale getirilmesi (oogenesis) ve steroid hormonlarının salgılanması (steroidogenesis) olarak bilinmektedir. Ayrıca; ovaryumların fonksiyonları yaşa bağlı olarak da değişmektedir. Ovaryum tarafından sentezlenen steroid hormonlarının; eşey hücreleri, eşey organları ve ayrıca glandula mammaria'nın olgunlaşması ve gelişmesinin kontrol edilmesi gibi birçok rolü bulunmaktadır (22). Ovaryumun en önemli görevleri olarak, ikincil eşey karakterlerinin oluşumunda kilit rol oynayan östrojen ve progesteron hormonlarının kontrollü bir şekilde salgılanmasının sağlanması ile menstural döngünün düzenlenmesinin kontrol altında tutulması ve üreme sisteminin diğer organları üzerine etkisini göstermesi sayılmaktadır(23).



Şekil 2.1. Ovaryumun ve rahimin yapısı Ronald. W. Dudek, (2016 p.17)'den.

2.1.1 Ovaryumun Embriyolojisi

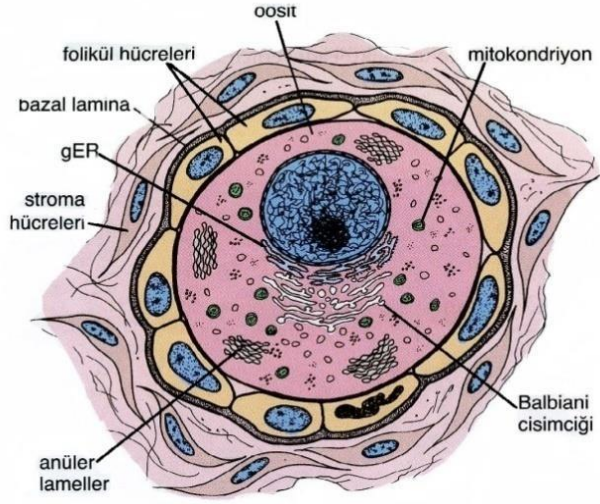
Embriyonun cinsiyeti, genetik olarak hemen döllenme sırasında belirleniyor olmasına rağmen, gonadların gelişimin 7. haftasına kadar erkek ya da dişi yapısal özelliklerine sahip olmadığı kesin olarak bilinmektedir. Öncelikle gonad, gelişiminin başlangıcında sölom epitelinin çoğalmasıyla başlar ve onun altındaki mezenş dukusunun yoğunlaşmasıyla devam eder, ayrıca bir çift uzunlamasına düzenlenmiş gonadal kabartılar bulunur (24). Genetik açıdan primordiyal germ hücreleri, dişi bir gonada ulaşır ulaşmaz oogonyumlara dönüşürler. Gelişimin dördüncü haftasında yolk kesesi duvarına, daha sonra da henüz farklılaşmasını bitirmemiş durumdaki gonadlara göç eder, beşinci haftanın bitiminde yolculuğunu tamamlamış olur ve orda sabit kalır. Arka arkaya mitotik bölünmelerle sürekli çoğalan oogonyumlar, 3. ayın bitiminde yassı epitel hücreleriyle sarılmış kümeler halinde dizilirler (Şekil 2.2). Gelişimleri tek bir hücre ile başlar ve folikül hücreleri overin yüzeyini kaplayan yassı epitel hücrelerinden köken alırlar (22, 23, 24).



Şekil 2.2. Ovaryumun yapısı; medulla ve korteks -Ross (2003 p. 567)'den.

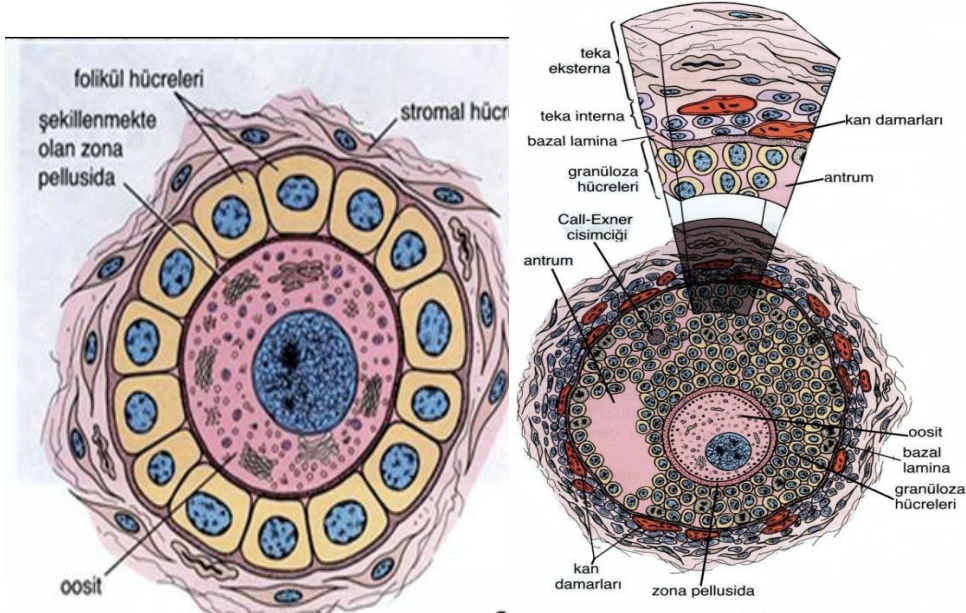
Oogonyumların büyümesi iki şekilde gerçekleşir. Birçoğu mitoz ile bölünmeyi sürdürürken, geri kalan kısmı bölünmesini, I. mayoz bölünmenin profaz aşamasında durdurarak oradan primer oosit oluşturur. Over içindeki germ hücrelerinin sayısı yaklaşık 7 milyona ulaştığında ise gelişimin beşinci ayına denk gelmektedir. Beşinci aydan sonra planlanmış hücre ölümü başlar ve çok sayıda oogonyum ve primer oosit atreziye uğrar (25).

Primer oositlerde DNA miktarı ikiye katlanır, I. mayoz bölünmenin profazının diploten safhasına girer. Bu oositler puberte dönemine ve hatta menopoz sonuna kadar o safhada bir bekleme süreci geçirir. Primer oositler diploten safhasına girince her biri yassı ovaryum epitel hücreleri ile ayrı ayrı sarılırlar, bu yapıya primordiyal folikül adı verilir (Şekil 2.3). Primordiyal foliküllerin primer oosit boyutu 25 µm çapındadır. Gevşek kromatinli, hafif eksantirik yerleşimli büyük bir nükleus ile iri bir nükleolusa sahiptir. Folikül hücreleri stroma desteğiyle bir bazal laminaya yerleşir ve apikal kısım oositlere doğru bakar. OMİ (oocyt maturation inhibitor factor) adı verilen bir faktörün etkisi altında primordiyal foliküller puberteye kadar baskılanır ve bekler. Overlerdeki primer oosit sayısının 600,000-800,000 doğuma kadar düşer (26). Puberte dönemine kadar kalan bu oositlerin çoğunluğu atreziye uğramaya devam ederek puberte dönemi başlangıcında sayısı 40,000 civarına düşer. Ancak bunlardan 500'den daha azı dişi bireyin doğurganlık periyodu içinde ovulasyonla gonadlardan dışarı atılır. Puberte dönemine girdikten sonra folikülleri barındıran bir folikül havuzu oluşur. Bu havuz, dişi gonad primordiyal foliküllerinden beslenir. Primordiyal foliküllerden bir kısmı ölmeye devam ederken, bir kısmının içinde antrum adı verilen bir boşlukta sıvı birikmeye başlar. Böylece bu yeni oluşan duruma antral veya veziküler evre denilir (25, 26).



Şekil 2.3. Primordiyal folikül – Ross ve Pawlina (2011 p.834)’den.

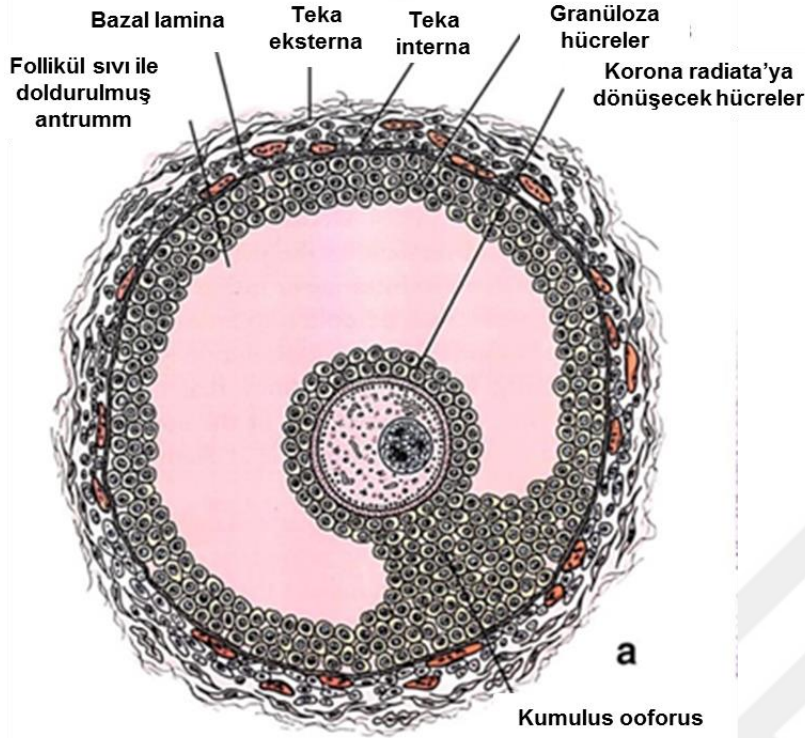
Primer oosit büyümeye başladığında, etrafındaki yassı foliküler hücreler önce kübikleşir, sonra bir kaç kat çoğalarak çok katlı bir epitel tabakasına, yani granüloza hücrelerine dönüşürler. Ortaya çıkan yeni yapıya primer folikül adı verilir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. A) Primer Folikül B) Sekonder Folikül - Ross ve Pawlina (2011 p. 834)’den.

Öne çıkan folikül, foliküler büyümenin en son evresine ulaşır ve ovulasyon için hazır hale gelir. Granüloza hücre proliferasyonu ile folikül sıvısının oluşumunun devam etmesi sonucunda çapı yaklaşık olarak 2,5 cm'ye ulaşan bu foliküle, olgun folikül ya da Graaf folikülü adı verilir (27).

Ovulasyonun gerçekleşmesinin hemen öncesinde antrum havuzunda biriken sıvının sürekli artmasıyla foliküller iyice şişmiş duruma gelir. Bu evreye kadar gelen foliküllere olgun veziküller veya (matur) graafian folikül denir (Şekil 2.5). Folikül sıvısı artınca folikül boşluğu giderek genişler ve büyür. Granüloza hücrelerinden oluşan ve oosit kümülüs ooforus adı verilen sap ile folikül duvarına bağlı konuma geçer. Granüloza hücrelerinin çevrelerindeki over'i bağ dokusundan ayıran ve teka folikülü adıyla adlandıran bir bazal membran üzerine otururlar. İlk başta oositin çevresinde ince bir tabaka halinde bulunan zona pellusida; granüloza hücreleri ve oosit tarafından salgılanan glikoproteinlerce oluşur. Daha sonra zona pellusida tabakası daha kalın ve kararlı, sıkı bir hal alır (24, 28). Bir taraftan foliküller büyümeye devam ederken diğer taraftan da foliküllerin teka hücrelerinin gelişimi, paralel olarak devam etmektedir. Teka internanın iç kısmı sekretuar hücrelerden, dış kısım teka eksterna fibroz kapsüllerden oluşur (29). Granüloza hücrelerin arasında gelişime devam ederken, içi sıvı şeklinde boşluklar belirir. Bu boşlukların birbirleriyle birleşmeleriyle antrum oluşur ve bu yapıya foliküler veziküller veya antral folikül denir. Oositin etrafındaki granüloza hücreleri şekilleri bozulmadan kümülüs ooforusu meydana getirirler. Yaşam boyunca her siklus döneminde birden fazla folikül gelişim sürecine girer. Sağlıklı ve gelişiminin tamamını bitirmiş olarak ancak bir ya da iki folikül olur (29).



Şekil 2.5. Graaf folikülü -Ross (2011)'den

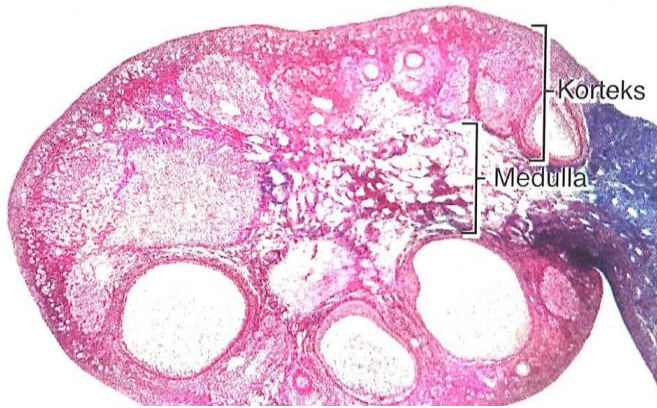
Sekonder folikülün olgunlaşması bitince, Lüteinizan hormonun (LH) etkisiyle preovulatuvar büyüme evresi başlar. I. mayoz bölünme tamamlanır ve her biri 23'er çift kromozoma sahip iki yavru hücre oluşur. Kromozomları içeren yavruardan biri sitoplazmanın tümünü alarak sekonder oosite dönüşür. Diğer yavru sitoplazma içermediği için birinci polar cisim adı verilen yapıyı oluşturur (24). Bu iki yavru hücrelerden biri sitoplazmanın tümünü alarak sekonder oosit oluşur. Diğer ise sitoplazma içermeyen 1. polar cisim haline dönüşür. Bu polar cisim, yavaş yavaş kenara kayarak, sonunda zona pellusida tabakasının iç kısmında ve sekonder oositin hücrenin perivitellin denilen boşluğuna yerleşir. Sekonder oosit II. mayoz fazına girer. Bölünme gerçekleşir ancak ovulasyon başlamadan üç saat önce metafaz fazında duraklar. II. Mayoz bölünme gerçekleştiğinde işi tamamlanır. Döllenmenin gerçekleşmediği durumda ovulasyondan bir gün sonra döllenmeyen oosit dejenere olur (25, 26).

2.1.2 Ovaryumun Histolojisi

Ovaryumların mezovaryum olarak isimlendirilen bir mezenter yapıya sahiptir. Mezovaryum ovaryumun hilumundaki oldukça geniş olan ligamente bağlanır. Visseral peritondan farklılaşan bir örtü ile ovaryumlar sarıdır. Bu yapı orijinal olarak germinal epitel adıyla bilinir, ancak daha sık kullanılan bir terim olan “ovaryum yüzey epiteli” olarak da kabul edilir (31). Ovaryuma sahip olan her organizmanın ovaryumunun iki farklı bölümü vardır. Bunlar;

- a. Dış kısım korteks
- b. İç kısım medulla olarak bilinmektedir.

Korteks ve Medulla bölümlerinin arasındaki sınır belirgin değildir ve iç içe bulunan iki bölümlerdir (Şekil 2.6). Tunika al fibroz bağ doku yapısından oluşur ve ovaryumun etrafını sarar. Korteksin diğer kısmı helezonik paternde düzenlenmiş hücrelerden zengin bağ doku yapısından oluşmaktadır. Korteks kısmında olgunlaşmanın ve dejenerasyonun farklı fazları gerçekleşir. Oositle birlikte farklı boyutlardaki ovaryum, folikülleri içerir (31). Korteks ve medulla arasında sınırlar belirgin olmadığı gibi, foliküller ve medulla arasındaki sınırlar belirgin değildir. Bunun sebebi medullanın çok fazla sinir, gevşek bağ dokusunda lenfatik yapı olması ve çok fazla kan damarları içermesidir (32).



Şekil 2.6. Korteks Medulla histolojik yapısı, Ovaryum korteksi. H&E. Anthony L. Mescher (2015)'den.

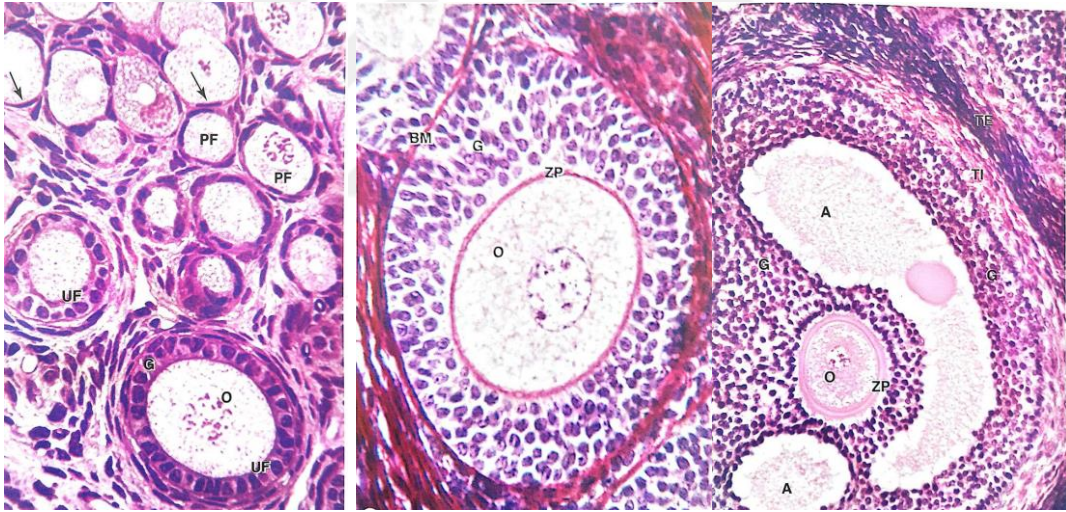
Bütün oogonyumlar, doğumla birlikte, profaz safhasına kadar ilerlemiş olan primer oositlere farklılaşırlar. Kortekste bekleme durumundaki foliküllerden olan primordiyal foliküller, primer ve sekonder foliküller olarak bilinen, olgunlaşmakta olan foliküller ve olgun (matur) Graaf foliküller gibi farklı evrelerdeki foliküller de yer alır. Tunika albuginea'nın altında primordiyal foliküller yer alır ve henüz gelişimi başlamamıştır (33). Primer oosit, nukleusu belirgin olarak görülen eksentrik bir nukleolusu içermektedir. Primer oositi yassı epitel hücrelerinin oluşturduğu folikül hücreleri çevreler. Bu hücrelerin dış yüzeyi üzerinde uzanan ince bir bazal lamina bulunur ve hücreleri çevredeki bağ dokusu tarafından stromadan ayırır. Oositlerin etrafını çevreleyen folikül hücreleri, bölünmeler geçirerek kübik form alırlar. Kübik biçimli foliküller hücrelerin sitoplazmaları granüller bir görünüm aldığından, bu evreden itibaren artık granüloza hücreleri olarak isim alırlar ve dıştan bir bazal lamina ile kaplanırlar. Stroma hücreleri diğer adıyla teka interna hücreleri olarak bilinen konsantrik bir kılıfa farklılaşırlar (24, 34).

Folikül epiteli ve çevresindeki stroma, foliküllerin olgunlaşması ile ilişkili olarak hem hiperplaziye hem hipertrofiye uğrar. Bu komponentler solid, multilaminar özellikteki sekonder folikülü oluştururlar. Granüloza hücreleri folikülde mitotik olarak aktif bulunan, çok katlı duruma gelirler ve hücrelerin sıkıca bağlandığı çok tabakalı konsantrik bir yapıyı oluştururlar. Primer oositin çapı artar ve homojen, eozinofilik ekstrasellüler bir tabaka şeklindeki zona pellusida, hücrenin plazma membranını etrafında çevreler. Proteoglikanları bolca içeren zona pellusida, oosit ve granüloza hücreleri tarafından sentezlenir. Folikül çapı büyüdükçe granüloza hücreleri 8-12 tabakaya çıkar, onların arasında küçük, düzensiz sıvı ile dolu boşluklar kalır ve bu folikül yapısı artık sekonder (veziküler veya antral) folikül yapısını oluşturur (35).

2.1.3 Ovaryum Foliküllerinin Yapısı

Hem folikül hücreleri hem de granüloza hücreleri, ovaryum foliküllerinin gelişimi boyunca yüksek bir mitotik aktiviteye sahiptir. Bu hücreler zona pellusida'nın sentezi ve devamlılığının sağlanmasından sorumludur. Hücrelerin sitoplazmaları, granüllü endoplazma retikulum (GER) ve serbest ribozomlarca

zengindir. Granüloza hücreleri arasında bağlantı kompleksleri içerir (36). Ovulasyon esasında folikülün yapısının bozulmaması gerekmektedir. Dolayısıyla, zona pellusida ve korona radiyata'nın yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünün korunmasından sorumlu dezmozomlar bulunmaktadır. Hücreler arasındaki iletişim ve etkileşim elektriksel ve iyoniktir (37). Sferik şekilde ve eksentrik yerleşimli bir çekirdeğe sahip, büyük ve yuvarlak oositterdir. Çekirdekteki kromatin düzeni dağınık ve çekirdek kılıfı düzensizdir. Çekirdek etrafındaki oosit sitoplazmasında sıkıca paketlenmiş sitoplazma filamanları, yuvarlak mitokondriler, serbest ribozomlar, endoplazmik retikulum ve çeşitli veziküller içerdiği organellerden bazılarıdır. Folikülün granüloza hücreleri, zona pellusida ve oosit ile aralarında kalın ve belirgin bir ekstrasellüler tabaka bulunur. Oosit ve granüloza hücrelerinden çıkan ince mikrovilluslar, zona pellusida içine uzanır ve onu kompakt hale getirir (36, 37) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Primordiyal, primer ve fekonder folliküllerin histolojik inceleme. Anthony L. Mescher (2015)'den.

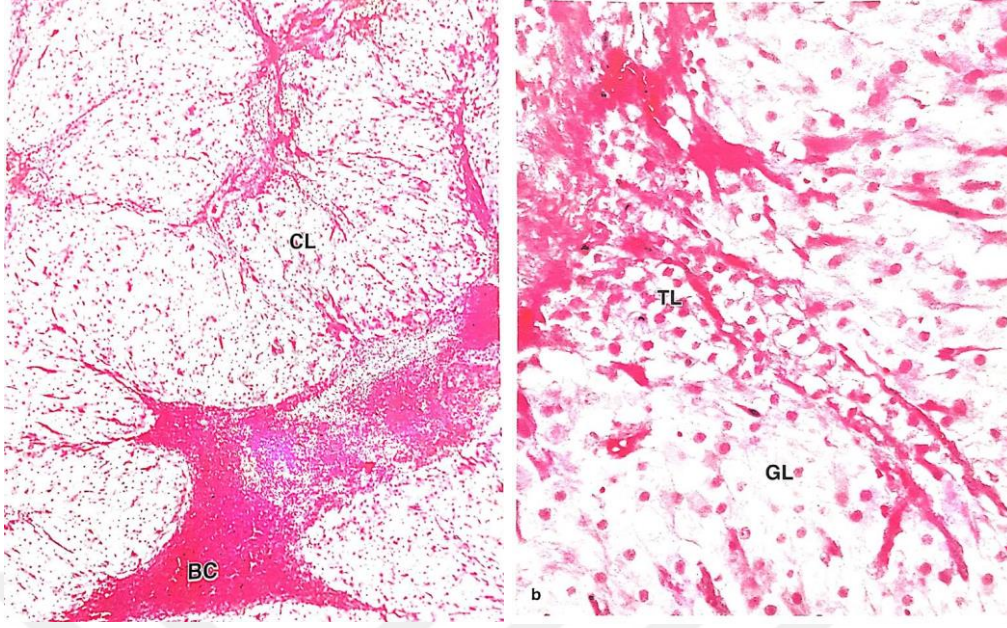
A) primordiyal folikül, Ovaryum korteksinin birçok primordiyal folikül ve yassı foliküller hücreleri (oklar) granüloza hücrelerin (G) primer oosit (O) etrafında tek katlı kübik bir tabaka, iki adet tek katmanlı unilaminar primer folikül bulunmaktadır (UF). B) Primer Folikül, granüloza hücreleri (G) birçok üst üste tabaka görünüyor. Oosit (O) ve onun tarafından üretilen zona pellusida (ZP) bulunur. Folikül çevreleyici yani granüloza etrafında stromadan ayıran bazal membranda (BM) var C) Sekonder folikül, hücrenin ürettiği foliküller sıvı ile dolu antral

boşluklar veya veziküller (A) içerir. Oosit (O) zona pellusida (ZP) ve folikülün duvarını granüloza hücreleri (G) tarafından sarmıştır. Büyüyen folikülün dışındaki fibroblastik hücreler teka interna (Tİ) ve onu donatan teka eksterna (TE) gelişimi tamamlamak üzere. PT. Anthony L. Mescher (2015).

2.1.4 Korpus Luteum

Graaf folikülü ovulasyonda rüptüre olduktan sonra sekonder oositler serbestleşir, foliküller yapının geri kalanı ise korpus luteum (sarı cisim) olarak bilinen geçici glandular olarak adlandırılan bir yapıyı oluşturur. Foliküle kollabe olur, içeriye doğru çok fazla çöküntü görünümlü boşluklar ve kıvrımlar oluşur. Lümeni fibrin içeren sıvı ve kan ile dolar. Antral boşluktaki bu çökelti pıhtıya dönüşür ve daha sonra yerini fibröz skar dokusu oluşur. Bu korpus luteum oluşuktan sonra, erken korpus albicans yapıya dönüşür. Daha sonra eski korpus albicans yapı hali alır ve kaybolur (38).

Granüloza hücreleri ve teka interna hücreleri arasında bariyer olarak görev alan bazal membran parçalanır ve önceden avasküler olan granüloza hücrelerinin vasküler invazyonu gerçekleşir. Ön hipofizden salgılanan lüteinizan hormon, hem granüloza hücrelerini, hem de teka interna hücrelerini belirgin histolojik değişiklikler oluşturacak şekilde tetikler ve bu hücreler peş peşe granüloza lutein hücreleri ve teka lutein hücreleri olarak adlandırılır (39). Böylece hücrenin sayısı ve boyutu artar. Hafif eozinofilik boyanan granüloza ve teka lutein sitoplazmalarında çok sayıda lipid damlacıkları birikir. Her iki hücre tipi de steroid-sentezleyen hücrelerle ortak özelliklere sahiptir (Şekil 2.8). Ayrıca granüloza lutein hücrelerince progesteron hormonu salgılanırken, teka lutein hücreleri ise, östrojen hormonunu salgılar (40).



Şekil 2.8. Korpus luteum H&E Antony L. Mescher (2015)'den.

Folikül ovulasyon sürecine katıldıktan sonra geriye kalan artıklar büyük endokrin sarı cisim olarak adlandırılan bir yapıdır. A) Ovulasyon sırasında ufalan teka eksterna gibi eski granülozanın tabakalar ile bütünleşen korpus luteum (CL). Ovulasyon sırasında teka interna tabakasındaki kan damarlarının hasar görmesi ile oluşan kan pıhtısı (BC) bulunur. B) Granüloza lutein hücreleri (GL) hipertrofiye uğramış. Teka lutein hücrelerinin (TL) boyutları büyümeye başlıyor, granüloza lutein hücrelerine göre daha koyu. H&E Antony L. Mescher (2015).

2.1.5 Ovaryum Medullası

Ovaryum'un merkezinde bulunan medulla gevşekçe örgü oluşturan kollajen, fibroblastlar ve elastik lifleri içeren bağ dokusundan oluşur. Bağ dokusunun yanı sıra, büyük kan ve lenf damarları ile sinir lifleri medullanın yapısında yer alır (38). Foliküller atrezi sırasında granüloza hücreleri ile oositler yıkıma uğrarken, teka interna hücreleri etkin steroid salgı yapmaya devam eder. Medullada artık yerleşmiş bu epitelooid hücrelere 'interstisyel hücreler' denir. Bu hücreler, kümeler oluşturmak amacıyla bir araya gelirler ve 'intersitisiyel bezleri' inşa ederler. İşlevlerini puberteye kadar yapmayan intersiyel hücreler puberteden başlayıp menapoz'a kadar sürdürürler ve östrojen salgırlar (39, 40). Ovaryum medullasındaki diğer epitelooid hücre tipi

hilus hücreleridir. Bu hücreler testislerdeki Leydig hücreleriyle özdeş organel içeriği ve sitoplazmik özelliğe sahiptirler. Onun dışında androjenleri salgırlar (23, 37).

2.1.6 Ovaryumda Steroid-Salgılayan Hücreler

Ovaryumdaki teka interna hücreleri, granüloza lütein ve teka lütein hücreleri steroid salgılayan hücreler olduğundan daha önce de bahsedilmiştir (36). Bu hücreler sadece dişi üreme sisteminde değil, erkek üreme sistemindeki ve steroid üreten diğer organlardaki steroid salgılayan hücrelerle ortak ince yapı özelliklere sahiptir. İçerdikleri birçok yapısal özelliklere ek olarak kolesterol tutulumunu ve kolesterolü steroid hormonlara dönüştürmeyi kolaylaştırmaya yönelik görevleri de vardır (41). Bununla ilişkili olarak hücre yüzeyi üzerindeki plazma membranlarında çok sayıda mikrovillus ile kolesterol alımında düşük-dansiteli lipoproteinler için reseptörler içeren clathrin (klatrin) -kaplı boğumlar yer alır. Mikrovillusların altında, mikrovilluslara doğru uzanan sıkıca paketlenmiş bol miktarda filamanların bulunduğu dar bir alanda ince yapıli sitoplazmik zon uzanır. Steroid sentezinden sorumlu organellerden olan düz endoplazma retikulum (DER) ile tübülveziküler kristalı çok sayıdaki mitokondriyon spesifiktir. DER; kıvrımlı dalgalı yapıyla, birbiriyle ilişkili ve interdijitasyonlar yapan sisternalardan oluşur. Kolesterolun biyosentezinde steroid hormon yapımıyla bağlantılı enzimler barındırır. Sitoplazmada ayrıca iyi gelişmiş Golgi kompleksleri de yer alır. Serbest ribozomlar ile GER elemanlarının oranları, protein sentezi aktivitesine göre kategorize edilir (41, 42). Kolesterol deposu olarak bilinen lipid damlacıkları da çok miktardadır. Hücrelerin çoğu, çok sayıda mikrovillusun bulunduğu ve bir perikapiller boşluğu sınırlayan serbest bir yüzeye sahiptir. Hücreler, perikapilleri boşlukta ince bir bazal lamina ile sınırlanırlar. Steroid sentezleyen hücreler birbirlerine çok sayıdaki bağlantı ile (gap junctionlar) bağlanmışlardır, bu bağlantılar olasılıkla hücrelerin hormonal aktivitesinin kontrolünde mekanizma bulunur. Hücrelere komşu kapillerler klasik bir fenestralı kapillerlerdir, endotel geçirgenliği yüksektir ve böylece salgı oluşturan ürününün dolaşıma hızlı ve etkin bir geçişi sağlanır (42).

2.1.7 Ovaryumdaki Steroid-Salgılayan Hücreler

Ovaryum, dişide gamet hücresinin üretilmesi ve steroid yapıdaki hormonların sentezlenip salgılanması işlemlerinin gerçekleştirildiği tek yerdir. Ovaryumda başlıca

iki önemli hormon salgılanır; bunlar östrojen ve progesterondur. Östrojen genital organların iç ve dış bölgelerinin büyümesinden sorumlu olmak ile birlikte; puberte döneminde dişilik karakterinin oluşumundan ve gelişiminden sorumludur. Progesteron ise başta uterus olmak üzere iç genital organların gebeliğe hazırlanması ve lobüler proliferasyonu uyararak da meme bezinin laktasyona hazır hale getirilmesinden sorumludur (43).

2.2 ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜL

Nanopartiküller; biyolojik, kimyasal ve fiziksel süreçler sonucunda oluşan, doğal ortamda bulunabilen ve boyutları 1 ile 100 nm arasında değişen küçük partiküller olarak tanımlanmaktadır (44). Nanopartiküllere maruz kalmanın insan vücudu ve çevre için potansiyel olarak tehlikeli olduğu bilinmekle birlikte; insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri, bireyin genetik yatkınlığı ve mevcut hastalıklarının yanı sıra maruz kalınan nanopartiküllerin sahip oldukları şekil, boyut, yapı, organik ve inorganik kaplamalar gibi birçok önemli özelliğe bağlı olduğu da bilinmektedir (45, 46). Ayrıca, nanopartiküllerin oldukça küçük parçacık büyüklüğüne ve nispeten yüksek bir yüzey alanına sahip olması sebebiyle solunmasının, yutulmasının ve hatta dermal absorpsiyon (deri emilimi) yoluyla bu partiküllere maruz kalınmasının daha da artması muhtemel görülmektedir (47, 48).

Son yıllarda gerçekleştirilen birçok çalışmada nanopartiküllerin (özellikle metal nanomalzemeler, nanometre-oksitler, karbon kaplı nanopartiküller ve kuantum noktaları) sebep olduğu toksik etkilerden sıklıkla bahsedilmiştir (49). Nanopartiküllerin hücrelere nüfuz ederek hücrelerde ROS üretimine veya hücre içi oksidatif stresin artmasına sebebiyet verdiği böylece biyolojik yapı ve fonksiyonlarda bozukluklar meydana getirdiği gösterilmiştir (45). Nanopartiküllerin neden olduğu toksik etkiler, apoptoz veya hücre ölümü ile sonuçlanan doku iltihaplanması ve hücrel redoks durumundaki dengesizlikler şeklinde tanımlanmaktadır (49-52).

Örneğin, altın ile kaplı NP'lerine (Au NP'ler) maruz kalmanın insan fetal akciğer fibroblastlarındaki 19 genin ekspresyonunu değiştirdiği bildirilmiştir (53). İn vitro deneylerde ayrıca, 10 nm nanogold partiküllerinin granüloza hücreleri

tarafından absorbe edilmesinin steroidogenez dengesizliđi ve ovum displazisi ile sonuçlanabileceđi belirtilmektedir (54).

Kullanılan bazı NP'lerin ovaryum, oosit ve embriyo üzerindeki etkileri Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Ayrıca, bazı nanopartiküller kan-testis bariyerine, plasenta bariyerine ve kan-beyin bariyerine nüfuz edebilir ve hatta farklı hücrelerde de birikebilir (55-57). Bu nedenle de nanopartiküllerin neden olduğu üreme toksisitesi gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, solunum yolu ile alınan, yutulan veya deri yolu ile emilen nanopartiküllerin dolaşım sistemi boyunca yer değiştirebileceğini ve hatta farklı üreme organlarında ve fetüste birikebileceğini göstermiştir (55, 58). Özellikle de nanopartiküllerin kadın üreme sistemindeki toksisitesi üzerine yapılan araştırmalar temel olarak şu başlıkları kapsamaktadır: Üreme kabiliyeti, embriyonik gelişim sırasında teratojenik etkiler ve perinatal dönemdeki döller üzerindeki etkisinin incelenmesi (54, 59).

Çizelge 2.1. Metal oksit NP'lerin ovaryum, oogenezis ve embriyo üzerinde toksik etkileri, Cong-Cong Hou and Jun-Quan Zhu (2017)'den.

Metal oksit NP'lerin ovaryum, oogenezis ve embriyo üzerinde toksit etkileri

NP	Boyut	Konsantrasyon	Model	Etki	Referans
TiO ₂	5 to 6 nm	10mg/kg	Fare	Premature oogenezis,ovaryumda apoptoz sebebi, gelişimdeki primer ve sekonder follikülerin atrezi oranı artırır	[19]
TiO ₂	25 nm	Unknown	Rat	Follikül büyümenin deformasyona neden olur, oositin olgunlaşmasını inhibe ediyor	[36]
TiO ₂	20±7 nm	1-5 µg/mL	CHO-K1 cell line	Genotoksitesisi ve sitotoksitesisi	[37]
TiO ₂	Unknown	2.5, 5, and 10 mg/kg of body weight	Fare	Genlerin gen ekspresyona neden oluyor	[41]
TiO ₂	Unknown	0.001–100µg/ml	<i>In vitro</i>	P4 ve E2 düzeyi etkiliyor, reprodaktif fonksiyonlar durduruyor	[51]
TiO ₂	25-75 nm	1 µg/µL	Fare		[58, 74]
TiO ₂	10 nm	100 mg/kg of body weight	Rat	PB geçiyor ve fetal merkez sinir sistemin gelişimi etkiliyor	[71, 73]
TiO ₂	<100 nm	100 mg/kg of body weight	Rat	Norotoksitesisi oluşturur, apoptoz artırır norogenezis azaltır	[72]
TiO ₂	35 nm	0.8 mg per mouse	Fare	Fetal karaciğere ve beyine yerleşiyor Plasentanin trofoblastler etkiliyor	[76]
TiO ₂	4nm	98±10 m ² /g	Ex vivo	Plasenta toksitesisine sebep	[83]
Al ₂ O ₃	28±19 nm	1-25 µg/mL	CHO-K1 cells	Genotoksitesisi ve sitotoksitesisi	[37]
CeO ₂	35 nm	100 µM	Fare	Endositoz yolu ile Follikul hucrede toplanir ve zona pelusidayi donatir	[28]
CeO ₂	35 nm	10 and 100 mg/L	Fare		[39]
Zinc oxide	<100 nm	500 mg/kg	Rat	Endositoz yolu ile Follikul hucrede Atretik follikul artırir, E2 ve P4 sentezlenmesine engeler, sinyal yolaklarin sentezlenmesini engeler,	[80]
Zinc oxide	~20nm	50 mg/kg or 100 mg/kg	Rat	İnflamasyon, oksidatif stres, ROS Ovulasyon oranı azaltir	[47]

Ayrıca, nanopartiküllerin *in vitro* çalışmalarda, farklı hayvan hücrelerinde üreme toksitesisi üzerinde; *in vivo* çalışmalarda ise hayvan modelleri üzerinde giderek daha fazla rapor edilmektedir. Metal oksit nanoparçacıklarından biri olan çinko oksit nanoparçacık (ZnO NP), kozmetik sektöründe (güneş koruyucu losyon ve kremler, ayak bakım ürünleri, merhemler ve reçetesiz yerel ürünler), pigment özelliği

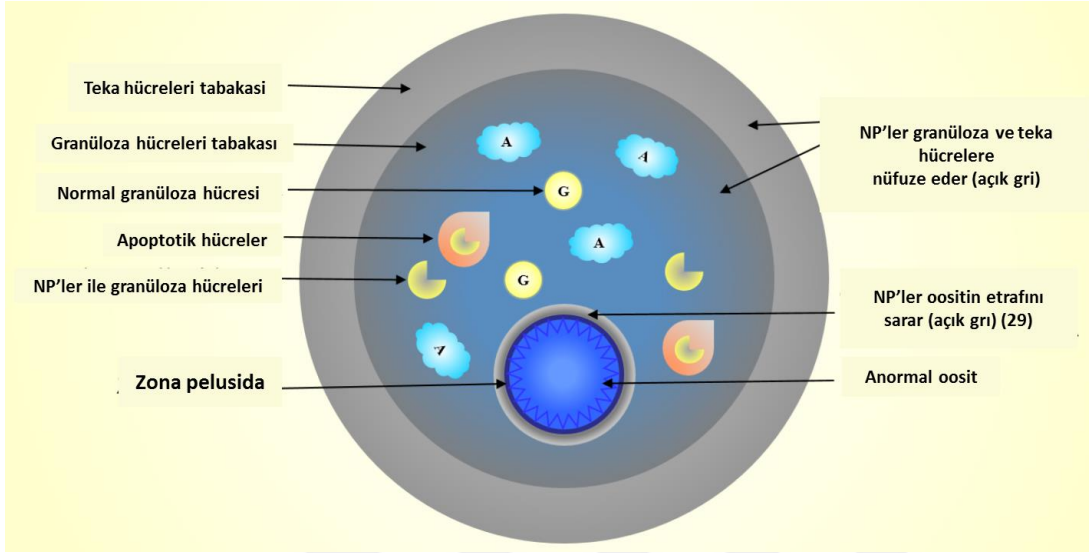
gösteren ürünlerde, kaplamalarda ultraviyole [UV] koruma, boyalarda, mantar ilaçlarında), elektronik cihazlarda ve katalizörlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (60). ZnO NP'lerin yaygın olarak kullanılıyor olmasına rağmen, insanlar için güvenilirliği hala tartışılmaktadır. Son zamanlarda yapılan bir araştırma, ZnO (ve CuO) NP'lerinin, bileşiğin yüksek çözünürlüğünden dolayı metal oksit NP'leri ailesi içinde ayrı bir grup oluşturduğunu göstermiştir. Test edilen çoğu metal oksit NP için, *in vivo* ve *in vitro* toksisite, bant aralığı enerjileri 'band-gap energy' ile tahmin edilebilirken, ZnO (ve CuO) NP toksisitesi, doku veya hücre içerisindeki çözünürlüğüyle belirlenmektedir (61).

Çeşitli metal NP'leri arasında, ZnO NP'leri, hücrenin antioksidan kapasitesi aşıldığında, oksidatif strese ve sonunda hücre ölümüne yol açan reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasıyla gelişmiş sitotoksikite göstermektedir (58). ZnO NP'lerin çeşitli kanser hücrelerinde neden olduğu sitotoksikite araştırıldığında; artan oksidatif strese bağlı olarak, hücre içi (Ca^{+2}) düzeyinde artış gözlenirken ve MPT'de düşüşün görüldüğü bildirilmiştir. ZnO NP'leri BEAS-2B bronş epitel hücrelerinde ve A549 alveoler adenokarsinom hücrelerinde interleükin (IL) -8 üretimini uyardığı (55), ve bunlar RAT264. 7 hücrelerinde MPT'yi, membran bütünlüğü kaybını ve p53 yolunun aktivitesini azalttığı bildirilmiştir (62, 63) ZnO NP'leri sadece sitotoksikitenin indüklenmesiyle kalmaz, aynı zamanda da A431 insan epidermal hücrelerinde DNA hasarı (57), ve insan SHSY5Y nöronal hücrelerinde mikronükleik üretimi, H2AX fosforilasyonu ve DNA hasarı da dahil olmak üzere çeşitli hücrelerde farklı genotoksikiteye neden de olduğu bilinmektedir (64). Ayrıca; ZnO'nun toksisitesi, hayvan modellerinde testisleri de dahil olmak üzere çeşitli organ ve doku örnekleri kullanılarak araştırılmıştır ve gerçekleştirilen bazı çalışmalarda nZnO'nun daha çok kadın üreme sistemini ve doğurganlık oranını olumsuz yönde etkileyebileceği gösterilmiştir. Bu bağlamda kullanılan civciv oositlerinin nZnO'ya maruz kalmasının civciv gelişimlerini engellediği belirtilmiştir (65).

Zhai ve ekibinin 2018 yılında fareler üzerinde gerçekleştirdiği çalışmada; *in vitro* deneylerde ZnO NP'nin fetal yumurtalıklara nüfuz ettiği ve eşey ana hücrelerinde sito-toksikiteye neden olduğu açıklanmaktadır. Ayrıca, ZnO NP'ye maruz kalmanın, temel olarak hücresel DNA hasarını indüklemiş olacağını ve bunun sonucu olarak da, fetal yumurtalıklarda apoptozla ilişkili proteinlerin

ekspresyonunun artmasıyla sonuçlanmış olabileceği belirtilmektedir. Elde edilen veriler doğrultusunda da ZnO NP'nin doğum öncesi ve sonrası oogenez ile ilgili süreçleri etkileyebileceğini ve DNA hasarını arttırdığını ve yumurtalık folikül rezervini azalttığını gösteren bulgular elde ettiği bilinmektedir. Sonuç olarak; Metal nanoparçacıkların elektronik ürünler ve tablolar-resimlerde dâhil olmak üzere pek çok alanda yaygın olarak kullanılması bu maddelere maruz kalma ihtimalini büyük ölçüde arttırmıştır (56-60). Bu nedenle de NP'lerin kullanımı ve toksik etkileri üzerine gerçekleştirilen çalışmalara büyük ölçüde önem verilmektedir. NP'lerin plasenta bariyerine nüfuz edebilmeleri ve embriyoda toksisitesiye neden olmaları nedeniyle, embriyo ya da fetusun gelişim sırasında NP'lerin maruziyetine karşı savunmasız kaldığı bilinmektedir (55). Karbon ve gümüş ile kaplanmış NP'lerin üreme ve gelişim üzerindeki toksisiteleri yakın zamanda araştırılmıştır (54). Ayrıca, hayvan modellerinde gerçekleştirilen çalışmalarda ZnO'nun toksisitesi, testisler dâhil olmak üzere çeşitli organ ve dokuları da etkilediği elde edilen bulgular arasındadır ve hatta bazı araştırmalar ZnO'nun kadın üreme sistemini ve doğurganlığını olumsuz yönde etkileyebileceğini göstermiştir (56-59,62, 65). Bununla birlikte, doğum öncesi dönemde maternal olarak ZnO'ya maruz kalmanın sonuçları ve bu maruziyetin sebep olacağı yavru döllerdeki oogenez üzerindeki etkiler hakkında henüz yeterli bilgi elde edilememiştir. Örneğin, *in vitro* çalışmalar, bazı NP'lerin granüloza hücreleri tarafından hapsedilebileceğini ve bu nedenle ovumun hormon salgılanmasında ve displazisinde değişikliklere yol açabileceğini göstermiştir (56). NP'lerin hem hücrelere hem de granül hücrelerine girebileceğini ve normal fonksiyonlarını etkileyebileceğini, özellikle de hormon salgılanmasında anahtar rolleriyle ilgili olduğunu gösteren iyi belgelenmiş çalışmalar bulunmaktadır (56). Yumurta hücresinin salınmasından önce teka hücreleri tarafından salgılanan androjen ve androstenedionlar, granül hücrelerine yayılır ve sonrasında steroid hormonlarına dönüşür. Bu süreçte, NP'ler yumurtalıklarda bu salgı hücrelerini tahrip ederek cinsiyet hormonlarının salgılanmasını doğrudan etkileyebilmektedir (66, 67). *In vivo* çalışmalar, dişi farelerde titanyum dioksit NP'lere (TiO₂-NP) maruz kalmanın uzun süre (90 gün boyunca) cinsiyet hormonlarında ve mineral element dağılımında dengesizlikle sonuçlandığını, gebelik oranının düşmesine, oksidatif stresin ve yumurtalıktaki gen ifadesinin bozulmasına neden olduğunu göstermiştir (55, 56).

Dahası, sıçanlarda yapılan *in vivo* deneyler 34.9 ± 14.8 nm büyüklüğündeki gümüş NP'lerin anneden plasenta ve anne sütü yoluyla yavrulara aktarılabilirliğini göstermiştir (68). Oogenez, yumurtalık foliküllerinde meydana gelen ve oogonia'dan olgun bir yumurta oluşumunu içeren gelişimsel bir süreçtir (69) (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Nanopartiküllerin hücreye etkisi. Cong-Cong Hou ve Jun-Quan Zhu (2017)'den.

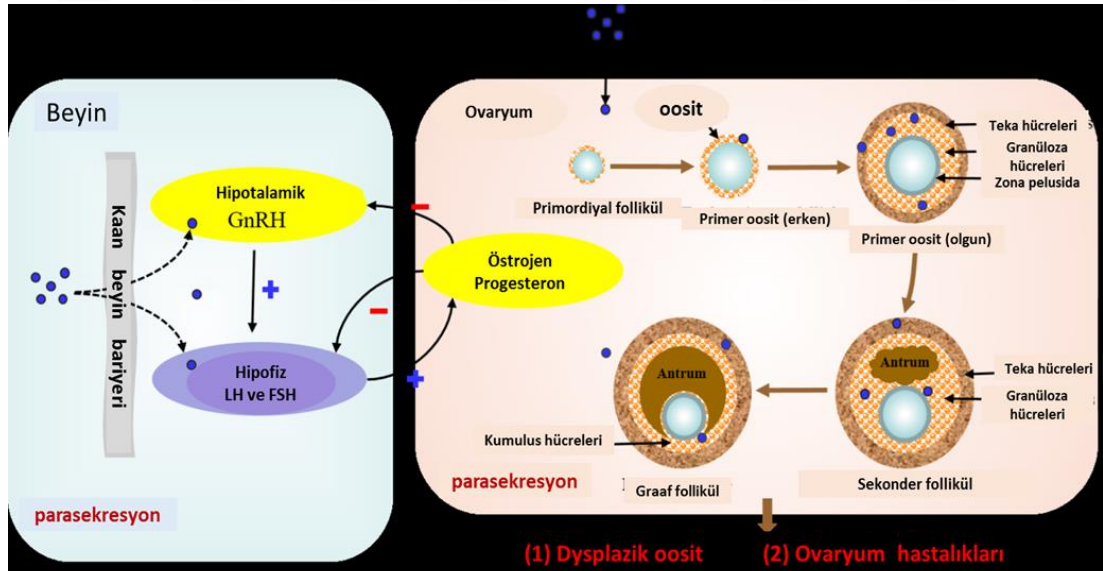
Nanopartiküller gelişen foliküllere penetre oluyor ve oositin olgunlaşmasına karışır. NP sitoplazmada, teka ve granüloza hücrelerinin nükleusunda birikir. Bu NP'nin birikimi ovaryumun hücrelerinde apoptoza neden olur. Antrumun boşluğun büyümesinin hızlandırılmasına nedeni olur. En büyük NP birikim Oositi çevreleyen kümülüs hücreleri tabakasında gerçekleşir. Daha az miktarda zona pelusida da bulunur, onun kalın ve sıkı bağlantısından dolayıdır. Cong-Cong Hou ve Jun-Quan Zhu (2017)'den.

Foliküler atrezi (Foliküllerin doğuştan tıkalı olması), memelilerde foliküllerin gelişimi, foliküllerin olgunlaşması ve yumurtlamanın gerçekleşmesi için doğal bir fizyolojik süreçtir. Folikül atrezisinin hormonal olarak düzenlenmesi östrojen, gonadotropin salgılayan hormon (GnRH), gonadotropik hormon, androjen ve büyüme hormonu tarafından gerçekleştirilir (70, 71). Tipik bir folikül, dışarıdan içe doğru incelendiğinde; teka hücre tabakası, bazal membran, granüloza hücre tabakası, zona pelusida ve oosit katmanlarından oluşmaktadır.

Son raporlar, NP'lerin tekal hücreleri ve granüloza hücreleri tarafından endositoz olabileceğini, bu da anormal hormon salgılanmasına ve *in vivo* oosit gelişiminin sona ermesine yol açabileceğini göstermiştir (72).

Başka bir deyişle, belirli bir büyüklükteki NP'ler salgı hücrelerinde birikebilir ve yumurtalıklarda hormon salgılanmasını doğrudan etkileyebilir. Bununla birlikte, NP'lerin aslında oositlere nüfuz edip içlerinde birikebileceğini gösteren hiçbir kanıt yoktur. Bunun nedeni çoklu folikül katmanlarına ve zona pellusida'nın özel yapısına bağlanabilir (73).

NP'ler kan-beyin bariyerini (BBB) geçebilir veya çevreleyebilir ve merkezi sinir sisteminde (CNS) birikir. NP'lerin sinir sistemini bu şekilde uyarmasının olası zararlı etkilerinden biri, hormon salgılanmasının bozulmasıdır. GnRH, folikül uyarıcı hormon (FSH) ve hipotalamus tarafından salgılanan luteinize edici hormon (LH) gibi nörohormonlar, oogenez sırasında pozitif ve negatif geri besleme düzenlemesinde önemli rol oynar. NP'ler dolaylı olarak bu cinsiyet hormonlarının dengesini bozarak oogenez ve yumurtalık sağlığını etkileyebilir (74) (Şekil 2.10).



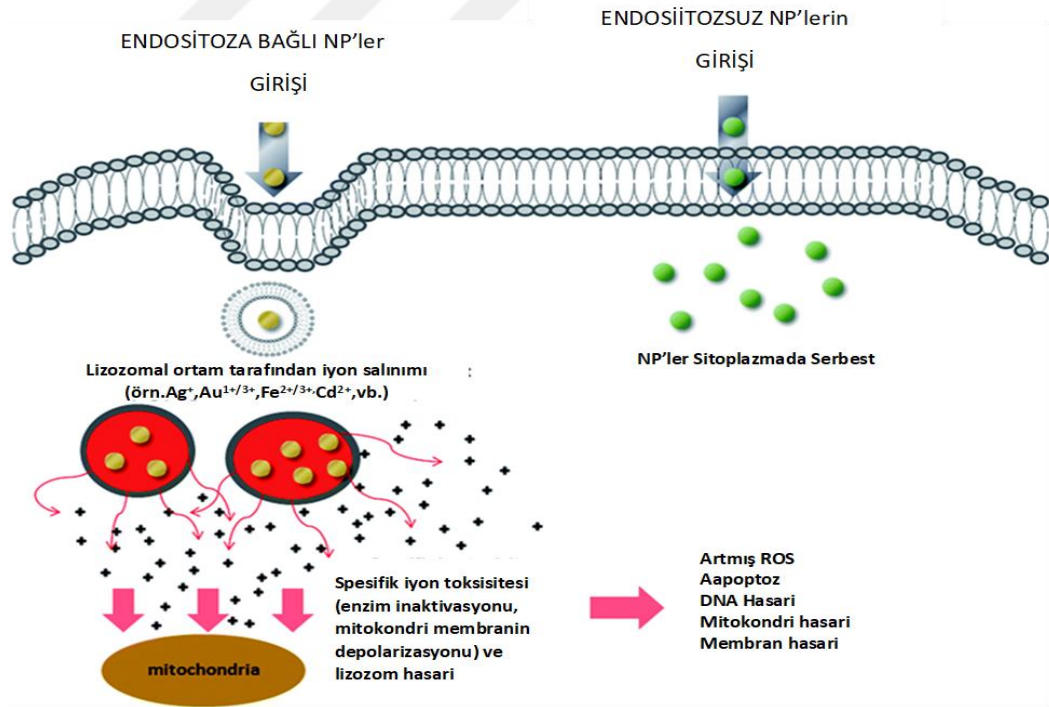
Şekil 2.10. NP'lerin ovaryumun salgılayıcı hormonlara ve hipotalamik-hipofiz-gonadal eksen üzerindeki etkisi. Cong-Cong Hou ve Jun-Quan Zhu (2017)'den.

NPLer iki şekilde hormon sekresyonunu etkileyebilir; 1. NP Kan beyin bariyerini geçerek hipotalamusa ve hipofizin salgıladığı LH, GnRH ve FSH hormonları hücrelere ulaşır. Burada NP pozitif ve negatif hipotalamik-hipofiz-gonadal eksen feedback'i inhibe eder ve ovaryumun östrojen ve progesteronun normal salgılanmasına kısmen etki eder veya tamamen durdurur. 2. NP dolaşım yolu ile yumurtaya girer, teka ve granüloza hücrelerinde birikir ve steroidogenezi etkiler. Şuana kadar yapılan araştırmalarda bu parasekresyonların ovaryum hastalıklarına ve displazik oosite nedeni olduğunu araştırmaktadır. Cong-Cong Hou ve Jun-Quan Zhu (2017)'den.

Nanoteknoloji ve nanomalzemelerin ticari kullanımları dünya genelinde artmaya devam ettikçe, işyerinde istemeden maruz kalma ya da NP'lerin uygulama riski artmakta ve gittikçe daha fazla sayıda NP, potansiyel kuşak etkileri ile embriyonik gelişimi bozabilir (61).

Reaktif oksijen türleri (ROS), proteinler, lipitler ve polinükleotitler dâhil olmak üzere hücrel makromoleküllerin oksidatif modifikasyonları bakımından oldukça aktif olan oksijen metabolitleridir. Hücrel redoks homeostazı, ROS üretimi ve hücredeki antioksidan sistem arasındaki denge ile sağlanır; ROS aşırı üretildiğinde veya endojen antioksidan kapasitesi azaldığında, ayırt edici olmayan oksidasyon zararlı etkiler yaratarak “oksidatif stres” e neden olur. Birçok çalışma, aşırı oksidatif stresin hücreye zararlı olduğunu ve ciddi sitotoksisteye neden olduğunu kanıtlamıştır (62). Mitokondri, ROS kaynağıdır. ROS seviyesi aşıldığında, mitokondriyal bütünlük ve zar yapıları zarar görür; nihayetinde redoks denge sistemi tehlikeye girer ve bu sonuçta mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna yol açar ve ayrıca hücrel makromoleküllere, özellikle de DNA'ya ciddi hasar verir (54). DNA hasarı kapsamında, hücrenin kaderi; hücre döngüsünün durdurulması, DNA'nın onarılması ve apoptotik yolların aktivasyonu ile belirlenir (63, 64). Ayrıca, DNA hasarı kromozomal kırılma ve mikronükleus oluşumuyla sonuçlanabilmektedir. Mitokondriyal membran potansiyelinin (MPT) kaybı, sitokrom c'nin intermembran boşluğuna salınmasına neden olur ve kaspazların aktivasyonundan bu sitokrom c sızıntısı sorumludur (54) (Şekil 2.11). Bu nedenle, ROS, hücre ölümüne yol açan hem apoptoz hem de otofaji için önemli ve kritik bir rol almaktadır (65).

Çeşitli metal NP'leri arasında, ZnO NP'leri, hücrenin antioksidan kapasitesi aşıldığında, oksidatif strese ve sonunda hücre ölümüne yol açan reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasıyla gelişmiş sitotoksisite göstermektedir (66). ZnO NP'lerin çeşitli kanser hücrelerinde neden olduğu sitotoksisite araştırıldığında; artan oksidatif strese bağlı olarak, hücre içi $[Ca^{2+}]$ düzeyinde artış gözlenirken ve MPT'de düşüşün görüldüğü bildirilmiştir. ZnO NP'leri BEAS-2B bronş epitel hücrelerinde ve A549 alveoler adenokarsinom hücrelerinde interlökin (IL) -8 üretimini uyardığı, (55) ve bunlar RAT264.7 hücrelerinde MPT'yi, membran bütünlüğü kaybını ve p53 yolunun aktivitesini azalttığı bildirilmiştir (66, 67). ZnO NP'leri sadece sitotoksisitenin indüklenmesiyle kalmaz, aynı zamanda da A431 insan epidermal hücrelerinde DNA hasarı (54) ve insan SHSY5Y nöronal hücrelerinde mikronükleik üretimi, H2AX fosforilasyonu ve DNA hasarı da dâhil olmak üzere çeşitli hücrelerde farklı genotoksisiteye neden de olduğu bilinmektedir (68).



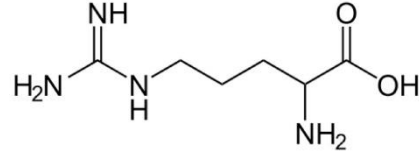
Şekil 2.11. Nanopartiküllerin hücreye girişi. Stefania S. Randy P. Carney, Virgilio B. (2014)'den.

NP hücreye iki şekilde entegre olur: 1). Endositozla, enerji harcıyarak NPlerin hücreye girişı gerçekteştikten sonra veziküller, endozomlar ve lizozomlar içerisinde hapsedilmiş şekilde sitoplazmaya entegre olur. Lizozomal pH bozarak ZnO NP toksik iyonları sitoplazmada serbest hale kalırlar. Serbest bulunan toksik iyonlar başka organellere girmeye başlar, enzimlerin inaktivasyonu ve proteinlerin denaturasyonuna neden olur. Sonuç olarak artmış ROS seviyesi, apoptoza, DNA ve membran hasarına nedeni olur.

2). Hiçbir enerji kullanmadan taşıyıcı ihtiyaç olmadan direk sitoplazmaya giren NP etkiyi direk yaratır. Stefania S. Randy P. Carney, Virgilio B. (2014)'den.

2.3 L-ARJİNİN

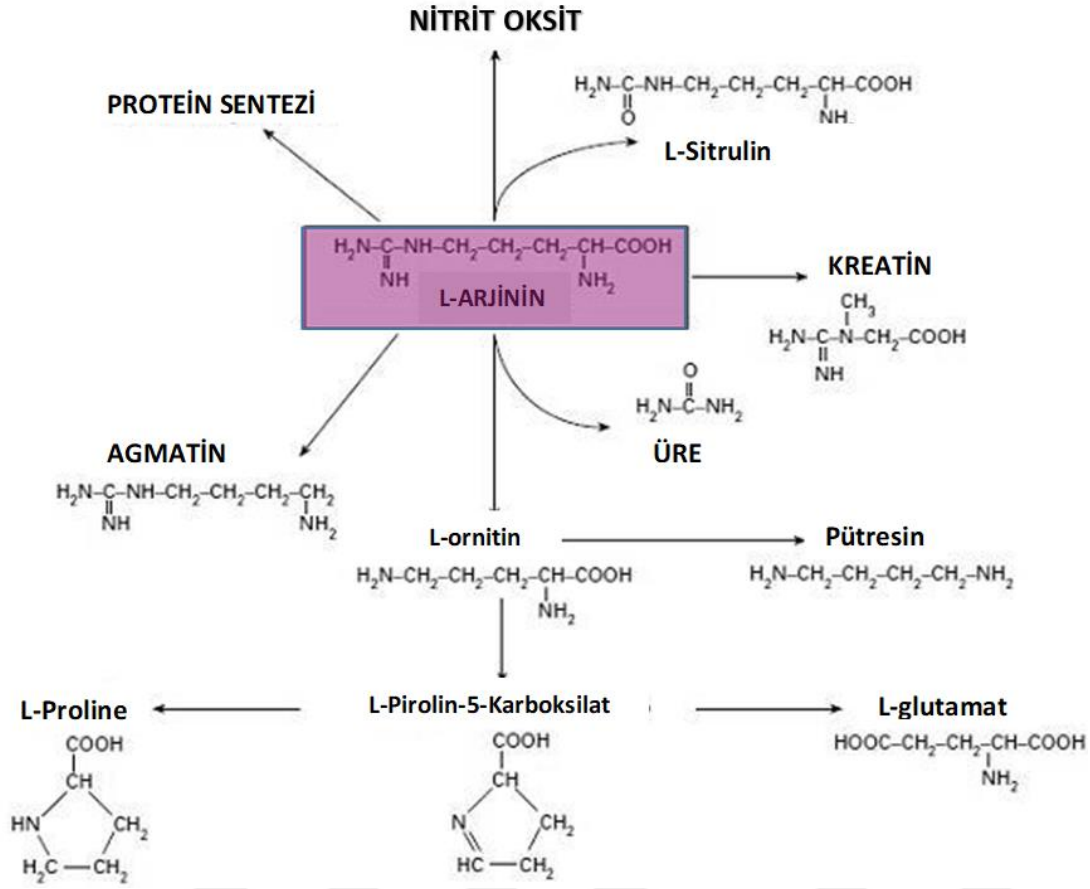
Arjinin, temel aminoasitlerden biridir ve hücresele fonksiyonlarda önemli rol oynamaktadır. Proteinlerin yapısında yer almasının dışında, poliaminler, üre, nitrik oksit (NO), kreatin ve agmatin fosfat gibi azotlu bileşiklerin sentezinde de görev almaktadır (69-74). Arjinin aminoasidinin biyosentez metabolizmasında çeşitli yollar eş zamanda çalışmaktadır (Şekil 2.12). NO üretimi aracılığı ile hücre içi sinyal sisteminde, ornitin ve poliaminlere metabolize olarak hücre proliferasyonunda yer almaktadır. Arjinin NOS (nitrik oksit sentaz) izoformlarına ek olarak iki arjinaz izoformu aracılığıyla birçok biyokimyasal reaksiyonda substrat olarak kullanılır (75, 76). Karaciğerde bulunan ve L-arjinin'i üreye ve ornitine çeviren arjinaz enzimi; üre döngüsünde son enzim olarak da yer alır. L-arjinin, çok sayıda fizyolojik süreçte yer alan katyonik, yarı esansiyel bir aminoasittir. L-ornitin, L-prolin, poliamin, agmatin, üre, kreatin, nitrik oksit (NO) ve protein sentezinde görev alan bir öncü maddedir. Ayrıca ubiquitin-proteozom yolu ile protein yıkımında da görev alır. Büyüme hormonu, prolaktin, insülin benzeri büyüme faktörü uyarımı gibi birçok biyolojik yolda önemli etkileri de vardır (75).



Şekil 2.12. Arjinin aminoasit Alternative Medicine Review (2005)'den

2.3.1 Arjinin Biyosentezi

Canlı organizmalarda arjinin aminoasidi endojen yolla (protein yıkımı ve üre döngüsü reaksiyonları yardımı) ve eksojen yolla (diyet yolu ile organizmaya dışarıdan alım) olmak üzere iki farklı şekilde elde edilir (77). Endojen yol ile elde edilen arjinin aminoasidinin seviyesi yeterli düzeye ulaştığında, artık esansiyel (alınması zorunlu) bir aminoasit değildir. Bu durum enfeksiyon, inflamasyon veya bir organın disfonksiyonu olduğunda eski hale döner, dolayısıyla arjinin, insan sağlığı için çok önemli olup, yarı esansiyel veya duruma göre esansiyel olarak tanımlanmaktadır (78). Arjinin sentezi ile elde edilen arjinin, endojen yol ile üretilen arjininin sadece %5-15'ini oluşturmaktadır. Proteinlerin yıkımı sırasında endojen kaynaklı arjinin aminoasidinin büyük bir kısmı açığa çıkmaktadır (78,79) (Şekil 2.13).



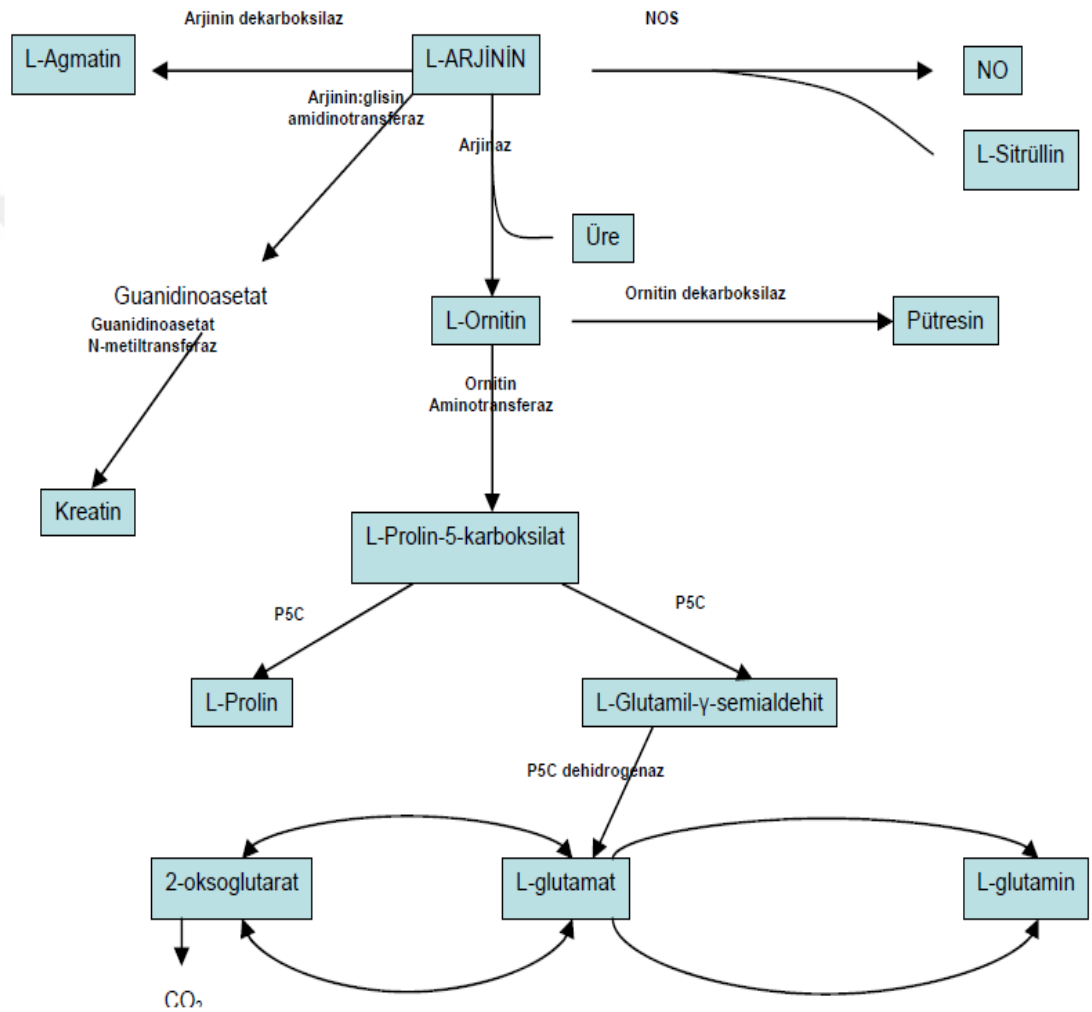
Şekil 2.13. Arjininin yer aldığı metabolik yollar Guoyao WU ve Sidney M. MORRIS (1998)'den.

Üre döngüsü yolu ile glutamat ve prolin aminoasitleri üzerinden yapılan arjinin sentezi için gerekli olan enzimler sadece intestinal mukoza ve karaciğerde bulunur. Burada oluşan sitrulin, ya arjinine dönüşür ya da dolaşıma geçerek böbrekler tarafından süzülür ve daha sonra arjinine dönüşür. Sonra da proteinlere bağlanarak diğer organlara geçer (80).

2.3.2 Arjinin katabolizması

Arjinin katabolizması (yıkım reaksiyonu) birçok metabolik yolak vasıtasıyla olduğu için bir hücre içerisinde, bu yolların aynı zamanda görev yapabilme kabiliyetleri de vardır. Dolayısıyla, karşılıklı olarak bir enzim, diğer bir enzimin ürününü ya da aktivitesini baskılayabilir (79). Örnek olarak, NOS ara ürünü olan N-hidroksiarjininin arjinazın sentezinin devam etmesini baskılar. Enzimler farklı

hücrel bölümlerde bulunabilir; sitrulin ve ornitin aminotransferaz (OAT) mitokondride ve ornitin dekarboksilaz (ODC) sitozolde sitrulin sitoplazmada bulunmaktadır (78). Arjinin aminoasidinin yıkımında sorumlu olan glisin aminotransferaz gibi enzimler yalnızca bazı organlarda bulunur. Bu organlar karaciğer, böbrek ve pankreas gibi organlardır (79) (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Arjinin yıkımı Guoyao WU ve Sidney M. MORRIS (1998)'den.

2.3.3 Arjinaz Enzimi

Nükleotid ve aminoasit metabolizmasının bitiminde açığa çıkan azotun atılması için ana sorumlu ürün ve üre döngüsünde temel enzim arjinaz enzimidir. Arjinaz enzimi arjinin aminoasidini hidrolize edebilmesi için pH:9,3 ile pH:11 arasında bazik bir ortama ihtiyaç duyar (81). Ayrıca katalitik aktivitesi için kofaktöre

(Mn⁺²) ihtiyaç duymaktadır. Üre döngüsünün metabolizması, sadece karaciğerde gerçekleştirilse de; arjinaz enzimi beyin, akciğer, dalak, böbrek, bağırsak, deri, meme ve testis gibi dokularda da bulunmaktadır (79, 82). Arjinaz enziminin dokudaki dağılımlarına, immünolojik reaktivite – aktivitesine göre ve de hücre içinde bulunduğu bölgeye göre iki farklı izoforma sahiptir. Bunlar; arjinaz I ve arjinaz II olarak isimlendirilmektedir (83). Arjinaz I enzimi, bol miktarda karaciğer hücrelerinin sitozolünde bulunur ve vücudun total arjinazı bu bölgedeki enzim tarafından oluşturulur. Arjinaz II ise az miktarda karaciğerde olmak üzere bol miktarda böbrek ve prostat dokusundaki hücrelerin mitokondrilerinde görev almaktadır (83, 84). Arjinaz I ve II enzimleri her ne kadar karaciğerde ifadelerini gösterebilirler de diğer organlarda da bulduklarından, arjinaz enzimleri NO metabolizmasının düzenlenmesinde de büyük rol alırlar. NO çok nadir olarak olsa da toksik etkiler oluşturabilir. Bu durumu önlemek amacıyla arjinaz I enzimi NOS'u baskılayarak NO'nun düzenli ve gerekli miktarlarda üretilmesini sağlar. Yaraların iyileştirilmesinde görev alan prolin ve poliaminlerin sentezi için gerekli olan ornitin, Arjinaz II enzimi tarafından üretildiği bilinmektedir (85).

Meme bezlerinde de arjinaz enzimlerinin sentezi görülmektedir. Laktasyon sırasında prolin aminoasidinin biyosentez yolağı kullanılarak glutamat aminoasidinin sentezlenmesi için gerekli olan substrat sağlanmış olur. Glutamat ve glutamin aminoasitleri hücre dışı sütte ve sıvıda oldukça yüksek miktarlarda bulunur, ancak bu iki aminoasit, laktasyonun gerçekleşebilmesi için; ornitini substrat olarak kullandığı ve süreç içerisinde veya sonrasında önemli rol aldığı anlaşılmaktadır. Prolin aminoasidi ise; ornitin tüm laktasyon süreci boyunca bütün görevlerini aktif bir şekilde yerine getirmektedir (83-86).

2.3.4 Nitrik Oksit (NO)

Nitrojen ve oksijen atomundan oluşan zayıf bir oksidan olsa da, birçok reaksiyonu etkilemektedir (87). Ayrıca hem hücre yüzey reseptörleri ile bağımsız olarak difüze olarak hem de tek başına bir sinyal molekülü olarak bilinmektedir. Bu özelliği ile çeşitli fizyolojik ve patolojik yanıtların düzenlenmesinden sorumludur. NO serbest bir radikaldir ve inorganik olarak indirgeyici bir bileşen olma özelliğine sahiptir (88). Değişen rezonans stabilitesinden dolayı (nitrojen ve oksijen atomlar

üzerinde yer değiştirebilen elektronlardan dolayı oksitlenerek hem nitrat (NO₃) hem nitrit (NO₂) oluşabilir) hücre zarından oldukça kolay geçebilen, hücre içi ve hücreler arası sinyal iletiminden sorumlu, diğer reaktif moleküllere kıyasla çok kısa ömürlü bir sinyal iletim ve hücre sel uyarım elemanıdır (89, 90).

Hücreler arasında sinyal iletiminde yer alan hormon, nörotransmitter ve büyüme faktörleri gibi moleküllerin çoğu, sıklıkla plazma membranı ile bağlantılı olan spesifik protein reseptörleri şeklinde görev yaparken, NO üretildiği hücreden dışarı diffüze olmakta ve spesifik moleküler hedeflerinin bulunduğu hedef hücrenin içine girerek etkisini göstermektedir (91). NO radikalleri endotel hücrenin dışta bulunan adezyon moleküllerinin ekspresyonunu durdurarak endotel hücre selini olası hasarlardan korur (87,92). Damar içerisindeki düz kaslarda bulunan Guanilat Siklaz (GC) enzimini aktifleştirerek sıklık guanozin monofosfat (cGMP)'ın yükseltgenmesini sağlar. Ayrıca, İntraselüler Ca⁺² düzeyini ve miyozin defosforilasyonunu tetikleyerek kasın gevşemesine yardımcı olur (93, 94). Sonuç olarak nitrik oksit; bazı ekspresyonların durdurucusu, moleküler boyutta aktifleştirici ajan ve bazı metabolik yolları inhibe ederek metabolik reaksiyonların fonksiyonunu düzenleyen bir sinyal molekülüdür. Tüm bunlara ek olarak; vasküler proliferasyonu da engellediği, vasküler düz kasının vasküler tonusunun düzenli çalışması üzerine yapılan araştırmalar sonucunda ortaya konulmuştur (95).

2.3.5 NO'nun Ovaryum Üzerine Etkisi

Ovaryum hem endokrin hem de ekzokrin bir organ olup, özellikle östrüs fazı sırasında birçok fonksiyonel ve yapısal faktörler tarafından kontrol edilmektedir (96). Anterior hipofiz hormonlarının salınımları nitrik oksit tarafından düzenlenir ve ovaryum fonksiyonları bu mekanizma sayesinde kontrol edilmektedir (97). Bunun yanı sıra, NO ajanlık görevi görmektedir. Dolayısıyla, dişi genital organların için immün sistemin düzenlenmesi, kan damarların bozulmaması ve nöronları steroidojenik hücreleri için otokrin ve parakrin şekilde etki etmektedir. Bu ovaryum steroid sentezlerinde direkt veya indirekt etkisini göstermektedir (93-95). Ayrıca, NO intraovaryan düzenleyici görevinin dışında, direkt olarak hipofiz gonadotropinlerinin sentez ve salınımlarında düzenleme rolü oynar (95). NO, granüloza hücrelerindeki steroid sentezini azaltarak gereksiz östrojen sentezini engeller. Bu

inhibisyon işlemini P-450 enzimi ve bu enzime bağımlı olarak çalışan aromataz enziminin inhibisyonu ile gerçekleştirmektedir. Bazı yapılan çalışmalarda NO'nun östrojen sentezini engellediği belirtilmektedir (96). Ancak Al-Hijji ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen deneylerde; NO sentezine östrojenin aracılık ettiği ve uyarımları bulunduğu öne sürülmüştür (98). Başka bir araştırmada ise; NO, sadece östrojeni uyarabilmekle kalmadığı, aynı zamanda da ovaryum ve atreziyi etkilediği ve ayrıca foliküllerin gelişimine de katkıda bulunduğu bildirilmektedir (99).

iNOS (inducible nitric oxide synthase-induklenebilir nitrik oksit sentezi) ile eNOS (endotelial nitric oxide synthase-endotelial nitrik oksit sentezi) tarafından üretilen NO'nun östrus siklusu sırasında, ovulasyona ve foliküllerin ovulasyona hazırlanmasına yardımcı olduğu bilinmektedir (100). NO'nun damar yapısındaki destekleyici ve damar genişletici özelliğinden dolayı ovulasyonu da bu sebeple etkiliyor olabileceği araştırılmaktadır.

Ratlar üzerinde yapılan araştırmada; LNAME (N omega-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride- N omega nitro-L-arginin metil ester hidroklorid) uygulamasından sonra rat örneklerindeki ovulasyon oranının arttığı bulunmuştur (99).

Rodent hayvan modeller üzerinde *in vitro* ve *in vivo* yapılan bir araştırmada NO inhibitörlerinin ovaryumda bulunan ve üretilen NO'yu baskılandığını ve ovulasyonun azalmasına sebep olduğu iddia etmektedir. Perioovuluar ya da folikül gelişimi fazında, NO noksanlığının oositlerin maturasyonunda hasar oluşturduğu bildirilmektedir (101).

Luteal dokuyu oluşturan hücrelerin; steroid hormonlar, büyüme faktörleri ve sitokinler gibi moleküler bileşikler ürettiği, bunun yanısıra NO'nun da korpus luteum (KL)'un fonksiyonlarını düzenleyebileceği belirtilmektedir. (96) Jaroszewski ve arkadaşları gerçekleştirdikleri çalışmalarda (97); sığır KL'sinde belirlenen NADPH-d aktivitesinin seksüel siklusun, orta ve geç luteal evrelerinde daha yüksek olduğunu bildirmektedir. Ayrıca eNOS ve iNOS immunohistokimyasal boyamalarının sığır KL'sinde geç diöstrüs evresinde daha güçlü olduğu belirtilmektedir. Bazı NOS inhibitörlerinin (L-NAME ve LNOARG) kültüre edilmiş sığır luteal hücrelerinde P4 sekresyonunu uyardığı ancak PGE2 veya PGF2 üretimini

etkilemedikleri ifade edilmektedir (102). NO'nun rat KL'sinde steroidogenezis üzerindeki negatif etkisi nedeniyle luteolitik bir rolü olduğu belirtilmektedir. Bununla birlikte, oksitosinin NO'nun luteolitik etkisine aracılık edebildiği aktarılmaktadır (103).

Östrojenin genital organlarda ve sirküle edilen kanda NO seviyesini arttırmaktan dolayı, östrojenin gebelik ve foliküler evre sırasında NO düzeyinin arttığından sorumlu olduğu da ileri sürülmektedir (104). Ovaryumları uzaklaştırılmış koyunlarda, östrojen uygulamasının uterustaki damarlarda genişlemeyi uyardığı ve bu etkinin L-NAME tarafından antagonize edildiği belirtilmektedir (105) Bu nedenle NO'nun östrojenin bu gevşetici etkisine aracılık ettiği düşünülmektedir. (101) NO sentezi üzerinde östrojenin etkisi, östrojenin miktarına ve etki süresine göre değişmektedir. Düşük seviyede seyreden östrojen, NO üretimini arttırmaktadır. Erken gebelik döneminde artan östrojen miktarına yanıt olarak NO seviyesinde de artış izlenirken gebeliğin sonuna doğru artan östrojen, NO salınımını engellemektedir (101).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

"Rat overinde ZnO nanopartiküller ile oluşturulan hasarda, L arjinin ajanının etkisinin histolojik ve biyokimyasal olarak incelenmesi" başlıklı bilimsel çalışma, SBÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 12.09.2018 tarih ve 2018-05/01 sayılı toplantısında görüşülerek, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde ve sunulan prosedüre uygun olarak karar verilmiştir.

3.1 DENEKLERİN TEMİNİ VE ÖZELLİKLERİ

Çalışmada kullanılan toplam 30 adet 7-9 haftalık, ortalama 170-230 gram ağırlığında sağlıklı Wistar türü dişi denek, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma laboratuvarından temin edilmiştir.

3.1.1 Çalışmanın Deney Grupları

Yakın biyolojik ve fizyolojik özelliklere sahip denekler, vücut ağırlıkları birbirine yakın olan ratlar aynı grupta olacak şekilde biri kontrol, dördü deney olmak üzere toplam beş grup oluşturuldu. Deney süresi boyunca tüm deneklerimiz gereken laboratuvar koşulları altında, oda sıcaklığında (12-saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünde) günlük su ile beraber % 21 oranında protein içeren standart pelet yemlerle (purina) beslendi (102). Tüm deney hayvanı prosedürleri standart etik kurallara uygun olarak gerçekleştirildi.

Çalışmada; 5-ayrı grup oluşturuldu.

Oluşturulan gruplar sırasıyla aşağıdaki gibi adlandırıldı:

1. Grup (6 hayvan): Kontrol grubu: Hayvanlara 20 gün boyunca %0,9 NaCl çözeltisi (1 mL) intraperitoneal (ip) olarak verildi

2. Grup (6 hayvan): 100 mg/kg ZnO NPs (düşük doz) ile muamele

Hayvanlara 20 gün süresince 100 mg/kg/gün ZnO Nanopartikül çözeltisi (1 mL) ve 1 mL fizyolojik serum ip olarak uygulandı. Toz halindeki ZnO NP çözmek için saf dH₂O kullanıldı (103).

3. Grup (6 hayvan): 100mg/kg ZnO NPs ve 1,3 g/kg L-Arg ile muamele.

Hayvanlara 100 mg/kg/gün ZnO NP (1 mL) ve 1.3 g/kg/gün L-arg çözeltisi 20 gün süresince ip olarak verildi. ZnO NP 1 mL dH₂O çözeltisinde, L-arg dH₂O da çözüldü.

4. Grup (6 hayvan): 200mg/kg ZnO NPs (yüksek doz) ile muamele. Hayvanlara 20 gün süresince 200 mg/kg/gün ZnO Nanopartikül çözeltisi (1 mL) ve 1 mL fizyolojik serum ip olarak uygulandı.

5. Grup (6 hayvan): 200 mg/kg ZnO NPs ve 1,3 g/kg L-Arg ile muamele

Hayvanlara 200 mg/kg/gün ZnO NP (1 mL) ve 1.3 g/kg/gün L-arg çözeltisi 20 gün süresince ip olarak verildi. ZnO NP 1 mL dH₂O çözeltisinde, L-arg dH₂O da çözüldü (104).

3.1.2 NP ve L-Arg Hazırlanması ve Ratlara Uygulanması

Sigma firmasından alınan ZnO NP (nanopowder, 30-60 nm partikülleri % 40 w.t. konsantrasyon) 100 gr uygulanacak doz oranlarına göre distile su yardımı ile sonikatör cihazıyla 25-30 dakika karıştırılarak solüsyonlar hazırlandı.

Sigma firmasından alınan L-Arjinin (%99 konsantrasyon) uygulanacak doz oranlarına göre distile su yardımı ile sonikatör cihazıyla 10-20 dakika karıştırılarak solüsyonlar hazırlandı.

3.1.3 Vajinal Yayma

Folikül ve progesteron hormon seviyesinin değerlendirilebilmesi için östrus döngüsü hakkında bilgiye sahip olunması gerekmektedir. Her bir denek östrus durumu, deneye başlamadan önceki 10 gün boyunca (yaklaşık 2-3 siklus süresi) her gün aynı saatte vajinal yayma metoduyla tespit edildi. Vajinal yayma 13:00-15:00 saatleri arasında yapıldı (105).

3.1.4 Vajinal Yayma Metodu

İnce cam pipete yaklaşık 1 mL serum fizyolojik çekildi. Yayma uygulanacak ratın ventral kısmı yukarı bakacak şekilde tutularak pipet ucu 1 cm kadar vajinaya yerleştirildi. Serum fizyolojik içeri püskürtülüp, pipetin ucu dışarı çıkarılmadan, vajinaya püskürtülen serum tekrar pipetin içine çekilerek, bu işlem iki üç kez tekrarlanır. Son olarak pipetle alınan vajinal sıvıyı, bir lamın üzerine kenarına smear

yapıldı (106). Smear preparatları kuruması ve sabitlenmesi için bekletildi. Birkaç saat sonra preparatları tamamen örtecek şekilde metilen mavisi damlatılıp 10 dakika (dk) süresince bekletildi. Preparatları boyadan uzaklaştırmak için çeşme suyunda yıkandı ve kurutuldu. Epitel hücre, lökositlerin ve mukusun varlığı tespit edilerek sıçanların östrüs fazı saptandı (107).

3.1.5 Sakrifikasyon

Her gruptaki tüm hayvanlar östrüs fazında iken Ketazol (75 mg/kg; ip) ve Rompun (10 mg/kg; ip) anestezi uygulandı. Ratların bilinci kaybolduktan sonra batınları açılarak, kalplerinden 2 mL kan sarı tüp içerisinde alınarak (kardiyak ponksiyon) sakrifiye edildi. Sağ ve sol ovaryumları alındı. Kalpten alınan kan örnekleri ile 'SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında' serum progesteron belirteçlerinin seviyeleri ELISA kit yöntemi ile belirlendi.

3.2 ÇALIŞMANIN DEĞERLENDİRİLMESİNDE KULLANILAN UYGULAMALAR

3.2.1 Gen Ekspresyon Seviyesinin Real-Time PCR ile Belirlenmesi

Rat over dokusundan cDNA kütüphanesi hazırlamak için RNA izolasyonu ABM Cat. No. G487 ultRNA Column Purification kiti protokolüne göre aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

Kit içeriği:

RNA Binding Columns/Collection Tüp	50 adet
Recovery tüp	50 adet
Lysis Buffer	45 mL
Wash Buffer (concentrate)	20 mL
DD Buffer	45 mL
RNase free H ₂ O	10 mL

1. Over dokusundan 30 mg alınarak 2, 5-mL'lik ependorf tüplerine konuldu.

2. Üzerine 700 µL Lyzis Reagent eklendi.
3. Doku, homojenizatör yardımıyla 4 dk boyunca son hızla parçalandı.

Ardından RNA izolasyon yapıldı.

3.2.2 RNA Elüsyon

1. Ependorf tüplerdeki homojen hale gelen doku 3 dk 14000 RPM de santrifüj edildi.
2. Supernatant yeni bir ependorf tüpüne aktarıldı, pelet kullanılmadı.
3. Supernatan eşit miktarda %70 etanol eklendi, 30-saniye vortex yapıldı.
*RNA örneklerini temizleme amacıyla 250 µL %96'lık etanol eklendi, 30 saniye boyunca vortekslendi.
4. RNA lizatı filtreli tüpler içine aktarıldı ve 1 dk 14000 RPM de santrifüj edildi. Sıvı kısım atıldı.
5. 700 µL DD buffer eklendi ve tekrar 1 dk boyunca 14000 RPM de santrifüj edildi. Sıvı kısım atıldı.
*RNA örneklerini temizleme amacıyla 5 basamak tekrar uygulandı.
6. 700 µL Washing Buffer eklendi ve 1 dk 14000 de santrifüj edildi. Sıvı kısım atıldı. Bu işlem tekrarlandı.
7. Sıvı kısım atıldıktan sonra filtreli tüp kuruması amacıyla 1 dk 14000 RPM de tekrar santrifüj edildi.
8. Filtreli tüpler yeni ependorf içerisinde yerleştirildi. 50 µL Rnase-free H₂O eklendi 3 dk oda sıcaklığında inkube edildi, ardından 1 dk 14000 RPM de santrifüj yapıldı.

Filtreli tüpler atıldı, nanodrop cihazıyla RNA'nın miktarı ölçüldü.

9. RNA örnekleri -80°C'de soğutmalı olarak saklandı.

3.2.3 cDNA Kütüphanesinin Hazırlanması

cDNA kütüphanesi hazırlanırken Abm OneScript Plus cDNA Synthesis Kit kullanıldı.

Kit içeriği:

Random Primers	40 µL
dNTPs	40 µL
RNaseOFF Ribonuclease Inhibitor	15 µL
5X RT Buffer	150 µL
Nuclease-free H ₂ O	1 mL

cDNA Synthesis Yöntemi:

1. Buz üstüne tüm RNA Örnekleri ve kiti yerleştirilerek steril bir mikrosantrifüj tüpüne;

Total RNA	2 µL
Random Primers	1 µL
dNTP Mix (10 mM)	1 µL 500 µM
Nuclease-free H ₂ O	10.5 µL eklendi.

2. Karışım 65°C'de 5 dk inkübe edildi, ardından buz üzerinde 1 dk bekletildi. Hafif spin yapıldı.

3. Karışıma aşağıdaki solüsyonlar sırayla eklendi;

5X RT Buffer	4 µL
RNaseOFF Ribonuclease Inhibitor	0.5 µL
OneScript® Plus RTase	1 µL
Total hacim	20 µL.

4. Random primer kullanıldığı için karışım 25°C'de 10 dk inkübe edildi.

50°C'de 15 dk inkübe edildi.

85°C'de 5 dk inkübe edildi.

6. Reaksiyon sonlandırıldı ve qRT-PCR için kullanılabilecek kadar -20°C'de soğutmalı olarak saklandı.

3.2.4 Kantitatif Gen Ekspresyonu (qReal-Time PCR)

PCR, cDNA veya DNA üzerinde spesifik bir veya birkaç bölgenin *in vitro* şartlarda çoğaltılmasını gerçekleştiren bir yöntemdir. İlk PCR, Nested PCR, Real-Time PCR Mullis ve arkadaşları tarafından 1983 yılında icat edildi. Daha sonra bu bilim adamlarına 1983 yılında kimya alanında Nobel ödülü verildi. Moleküler düzeydeki çalışmalara ve modern bilim dünyasında çığır açan bu buluşun ardından Gradientli PCR, Multipleks PCR gibi yeni PCR yöntemleri geliştirilmiştir.

Real-Time PCR olarak adlandırılan, PCR reaksiyonu esnasında çoğaltılan DNA veya cDNA'nın floresan boyalar ekleyerek gerçek zamanlı kantitatif PCR tespitidir. PCR reaksiyonu esnasında çoğaltılan ürün miktarı ve hangi döngüde ne oranda arttığı reaksiyon sırasında floresan boya ların verdiği sinyal ile doğru orantılı olarak belirlenebilmektedir. Normal klasik PCR'da bu özellik bulunmamaktadır. Floresan boya ların verdiği bu sinyali cihaz içerisinde bulunan filtrelerden belirli dalga boya larında gönderilen ışığın absorbe edilmesiyle tespit edilmektedir. Real-Time PCR'da klasik PCR'daki gibi istenilen ürünün çoğaltılıp çoğaltılmadığını jel elektroforezi yöntem belirlenmesine gerek kalmadan kontaminasyon riski de ortadan kaldırılır. Reaksiyon sırasında istenilen ürün amplifikasyonu miktar olarak izlenebilir. Ancak Real-Time PCR'da çoğaltılan ürünün kantitatif miktarı hakkında bilgi edilse de ürünün uzunluğu hakkında herhangi bir bilgi verilmemektedir (108).

Bu çalışmada belirlenen genlerin ekspresyon miktarlarını ölçmek için floresan işaretli TaqMan prob kullanıldı ve Real-Time PCR yapıldı. Analiz kontrol ve muamele gruplarına her bir cDNA için 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirildi.

3.2.5 qRT-PCR Protokolü

PCR işlemi için istenilen bölgeye spesifik primerler ve prob lar dizayn ABM good şirketine yaptırıldı. PCR karışımı aşağıdaki gibi hazırlandı:

Apoptozu indükleyen genler ve spesifik primerler:

Kaspaz-3

F: 5'-GTGGAAGTACTGACGATGATATGGC-3'

R: 5'-CGCAAAGTGACTGGATGAACC-3'

Bax

F: 5'-CGGCGAATTGGAGATGAACTGG-3'

R: 5'-CTAGCAAAGTAGAAGAGGGCAACC-3'

Bcl-2

F: 5'-TGTGGATGACTGACTACCTGAACC-3'

R: 5'-CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG-3'

Cas9

F:5'-GAATTCCAGCAATCCGCTAGCCATGGAGG-3'

R: 5'-GAATTCAACTCATGAAGTTTAAAGAACAG-3'

β -actin

F: 5'-AAGATCCTGACCGAGCGTGG-3'

R: 5'-CAGCACTGTGTTGGCATAGAGG-3'

Metod:

1. Buz üstüne tüm cDNA örnekler ve kiti yerleştirilerek steril bir mikrosantrifüj tüpüne:

BrightGreen 2X qPCR MasterMix 10 μ L

Forward Primer (10 μ M) 0.6 μ L

Reverse Primer (10 μ M) 0.6

cDNA örnek 3 μ L

Nuclease-free H₂O 5.8 μ L

Toplam 20 μ L eklendi

2. RT-PCR kit'in protokole göre reaksiyon oluşturuldu:

Enzim Aktivasyon 95°C 10 dk

Denaturasyon 95°C 15 saniye 40 döngü

Annealing/ Extension 60°C 60 saniye 40 döngü

Reaksiyon bittikten sonra melting curve spesifik kit kitapçığına göre yorumlandı.

Sentez düzeylerinin kantitasyonunda “Comparative CT (Comparative Threshold Cycles - $\Delta\Delta$ CT-Delta Delta CT)” analizi kullanıldı. Hedef genler ve housekeeping gen (B-aktin) sentez düzeylerindeki farklılıkların belirlenmesinden elde edilen $\Delta\Delta$ CT değerleri kullanılarak $2^{-\Delta\Delta$ CT hesaplanmıştır ve araştırılan genlerin sentez düzeyi belirlenmiştir.

3.3 HİSTOLOJİK İNCELEME

3.3.1 Dokuların Takibi

Ratlardan alınan ovaryumlar ışık mikroskop incelemesi için takibi uygulamak üzere fosfat tamponlu %10'luk formalin solüsyonuna konularak fikse edildi. Daha sonra artan dereceli etanol serilerinde %70 alkol ile başlayarak, %90, %96 ve %100'e kadar 24 saat tutularak dehidrate edildi.

%100 etanolde 2 kez 30 dk süreyle tutuldu ardından toluen içinde 20 dk süreyle şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi.

56°C'de 45 dk etüvde yumuşak parafin içinde dokular bekletildi.

Aynı sıcaklık derecesinde dokular 45 dk sert parafin içinde bekletildi. Ardından Leica marka doku gömme cihazı ile doku gömme yapıldı. Soğuk alan üzerinde doku blokları soğumaya bırakıldı.

Bloklar önce Lecia marka mikrotom cihazı ile 10 μ m kalınlığında tıraşlandı daha sonra boyama için 3 μ m kalınlığında kesit alındı. 40°C distile su yüzeyinde düzgün olarak yayılan doku kesitleri su havuzundan lamalar üzerine alındı. Kesitler üzerindeki parafini arındırmak amacıyla 58°C'de etüvde (Thermo fisher) 1 saat bekletildi.

Kesitler ışık mikroskobu araştırmaları için Masson Trikrom, Hematoksilen-Eosin ve PAS boyama yöntemleriyle boyandı.

3.3.2 Masson Trikrom boyaması

Masson-goldner staining kit 10048 Sigma Aldrich kullanıldı.

Kit içeriği:

Weigert demirli hematoksin-A çözeltisi: 30 mL

Weigert demirli hematoksin-B çözeltisi: 30 mL

Pikrik asit alkolik çözeltisi: 50 mL

Gelincik kızılı fuksin çözeltisi: 50 mL

Fosfomolibdik asit çözeltisi: 50 mL

Masson anilin mavisi çözeltisi: 50 mL

Masson Trikrom boyama metodu kit prosedürüne göre uygulandı:

1. Boyama başlamadan önce lamalar üzerindeki doku sınırları PAP pen kalem ile fazla boya gitmemesi amacıyla işaretlendi.
2. Doku kesitini 5 damla A- Weigert demirli hematoksin ve 5 damla B- Weigert demirli hematoksin karıştırıldı.
3. Doku üzeri boya karışımı ile kaplandı.
4. 10 dakika sonra lamı silkeleyerek preparattan ayraç uzaklaştırıldı.
5. 30-60 dakika boyunca kurumaya bırakıldı.
6. Yıkama işlemi olmadan, doku kesiti 10 damla Pikrik asit alkolik çözeltisi ile boyandı. 4 dakika sonra lamı silkeleyerek preparattan ayraç uzaklaştırıldı.
7. Distile suyla 3-4 saniye yıkandı.
8. Doku kesitine 10 damla Gelincik kızılı fuksin çözeltisi damlatıldı.
9. 4 dakika sonra lamı silkeleyerek preparattan ayraç uzaklaştırıldı
10. Distile suyla 3-4 saniye yıkama işlemi uygulandı.
11. Doku kesitine 10 damla Fosfomolibdik asit çözeltisi damlatıldı.
12. 10 dakika sonra lam silkelenerek preparattan ayraç uzaklaştırıldı
13. Yıkama uygulanmadan 10 damla Masson anilin mavisi çözeltisi damlatıldı.
14. 5 dakika sonra lamı silkeleyerek preparattan ayraç uzaklaştırıldı.
15. Distile suyla boya yıkandı.

16. Alkol serilerinden toplam 1 dakikanın altında olacak şekilde geçirilerek susuzlaştırıldı, temizlendi, kurutuldu ve otomatik lam kapama cihazı ile preparat kapatıldı.

3.3.3 PAS Periodic Acid Schiff Boyama

PAS Kit'i PAS5-100T (5 x 30 mL) Biognost

Periyodik asit % 0.8 solüsyonu 30 mL

BioSchiff solüsyonu 30 mL

Sodyum metabisülfite solüsyonu 30 mL

HCL P.A.S. reaktifi 30 mL

Hematoxylin ML 30 mL

Boyamada kullanılan diğer solüsyonların hazırlanması:

Sülfite solüsyonu 10 mL Sodium Metabisulfite solüsyonunu 10 mL HCL P.A.S reaktifi ile karıştırıldı, 200 mL çeşme suyu eklendi ve homojen hale getirildi.

PAS boyama metodu:

1. % 0,8'lik Periodic Acid solüsyonu uygulandı, (en az 2 damla) 5 - 10 dakika arasında bekletildi.
2. Çeşme suyu ile yıkandı.
3. BioSchiff reaktifi uygulandı, (en az 5 damla) 10 dakika bekletildi.
4. Sülfite solüsyonu uygulandı (en az 5 damla) 3 değişim, her biri 2 dakika yapıldı.
5. Çeşme suyunda 3 dakika yıkandı.
6. Hematoxylin ML ile (en az 5 damla) 1 - 3 dakika arası boyandı.
7. Çeşme suyu ile 3 dakika yıkandı.
8. %70 alkol ile (Histanol 70) yıkandı, bu işlem 5 kez daldırıp çıkartarak gerçekleştirildi.
9. %95 alkol ile (Histanol 95) yıkandı, 5 kez daldırıp çıkartarak işlem uygulandı.
10. Preparatlar kurutuldu ve otomatik lam kapama cihaz ile kapama yapıldı.

3.3.4 Hematoksilen Eozin Boyama

Gerekli kimyasallar;

Crystal hematoxylin

%95'lik etil alkol

Potasyum alum (veya Amonyum alum)

Merkürük oksit

Asetik asit

Eosine-Y (Yellowish)

%95'lik etil alkol

%80'lik etil alkol

Glacial acetic acid

Distile su

Hematoksilen Eozin boyama metodu:

1. Dokular hematoksilen içine daldırılıp 5-6 dk boyunca tutuldu.
2. Hematoksilenden çıkarılan dokular çeşme suyu altında yaklaşık olarak 5-10 dakika boyunca yıkandı.
3. Yıkanan dokular asit alkole daldırıldı birkaç saniye soluk mavi renk alana kadar tutuldu ve ikinci yıkama yapıldı.
4. 5-10 dakika kadar çeşme suyu altında yıkama işlemi gerçekleştirildi.
5. Yıkamaya tabi tutulan dokular eozine daldırılıp 3-4 dakika boyunca tutuldu.
6. Dokulardaki fazla eozini uzaklaştırmak için sırasıyla %70, %80, %95 ve absolüt alkolden geçirildi.
7. İlk 3 alkole dokular daldırılıp çıkarılırken absolüt alkolde 15-20 dakika tutuldu.
8. Dokular absolüt alkolden alındı.
9. Birkaç dakika dışarıda kurumaya bırakıldı ve preparatlar Xylol'e aktarıldı.
10. 10'ar dakika 3 tane Xylol'den geçirildi.

11. Preparatlar kurutuldu ve otomatik lam kapama cihazı ile kapama yapıldı.

Kapatılan kesitler Zeiss YJ-2009P ışık mikroskobu ile incelendi. Foliküllerin sayımı yapıldı. Aynı foliküllerin sayılmaması için 4 seviyede alınan kesitlerin hepsi ayrı ayrı sayıldı. Ayırım yapıldı ve toplandı. Total ovaryumdaki foliküllerin ortalama folikül sayısı hesaplandı. Bir ovaryumdaki foliküller sınıflandı (primordiyal, p. unilaminar, p. multilaminar, sekonder ve Graaf folikülü olarak gruplandırıldı). Gruplar arasında her bir folikül alt grubu için ayrı ayrı folikül sayıları ve bu foliküllerin arasında morfolojik özelliklerin değerlendirilmesi yapıldı. Atretik foliküllerin ayırımı için;

- antral kavitede granüloza hücrelerinin bulunması,
- piknotik nucleus granüloza hücrelerin tabakasında bulunması,
- granüloza hücrelerin bazal membrandan ayrılması,
- hasarlı ya da hiç olmayan oosit,
- kalınlaşmış ve dejenere olmuş zona pelusida ile atretik foliküllerin varlığı ve tespiti yapıldı (109-114).

Çizelge 3.1. Foliküllerin Sınıflandırılması

Folikül	Morfolojik Özellikleri
Primordiyal Folikül	Tek katlı yassı epitel, ovaryan korteks hücreler, granüloza progenitor hücreler, boyut ~40 µm
Primer Folikül	Zona pelusida, granüloza hücreler, oosit, bazal lamina, boyut ~100 µm
Sekonder Folikülkü I	Bazal lamina, çok katlı granüloza hücreler, zona pelusida, gelişmiş oosit, tek tabak teka hücreleri, boyut ~200 µm
Erken Tersiyer (Graaf) Folikül	Teka Eksterna Teka interna, bazal membran, antrum boşluk, steroid hücreler, zona pelusida, tamamen gelişmiş oosit, çok katlı granüloza, boyut ~400 µm
Olgun Tersiyer (Graaf) Folikül	Teka interna, teka eksterna, bazal membran, mural granüloza hücreleri, antral granüloza hücreleri, antrum, kumulus hücreleri, korona radiata, büyük oosit, teka tabakasında kan damarları, boyut ~500 µm

3.3.5 Biyokimyasal Analiz

Kardiyak ponksiyon ile alınan kan örnekleri pıhtılaşma amacıyla 10-20 dk oda sıcaklığında bekletildi. 2000-3000 RPM'de yaklaşık 20 dk santrifüj edildi ve

süpernatantlar dikkatlice toplandı. Ayrılan serum -80°C’de muhafaza edildi. Elde edilen serum örnekleri ile progesteron seviyesi tayini yapılabilmesi amacıyla ELISA yöntemi kullanılarak çalışıldılar.

Serumda progesteron seviyelerinin belirlenmesi:

Kuru tüplerde alınan periferik kan örneklerinden santrifüj ile ayrılan ve -80°C’de saklanan serum örneklerinde elisa tekniği ile progesteron konsantrasyonlarına bakıldı.

Standart solüsyonların dilüsyonu:

120 ng/mL	Standart No.5	120 µL Orijinal Standart + 120 µL Standart Dilüent
60 ng/mL	Standart No.4	120 µL Standart No.5 + 120 µL Standart Dilüent
30 ng/mL	Standart No.3	120 µL Standart No.4 + 120 µL Standart Dilüent
15 ng/mL	Standart No.2	120 µL Standart No.3 + 120 µL Standart Dilüent
7.5 ng/mL	Standart No.1	120 µL Standart No.2 + 120 µL Standart Dilüent

Örnek enjeksiyonu:

1. Birinci kuyucuk Blank kuyucuğu: örnek ve streptavidin-HRP ile işaretli anti-P antikoru eklenmez kromojen reagent A&B ve stop solüsyonu eklendi; her bir aşama aynı anda ilerletilmesine dikkat edildi.
2. Standart solüsyon kuyucuğu: 50 µL standart ve 50 µL streptomisin-HRP eklendi.
3. Test edilecek örnek kuyucukları: 40 µL örnek ve sonra 10 µL anti-PGR antikoları ardından 50 µL streptavidin-HRP eklendi iyice pipet yardımıyla pipetleme yapıldı. Seal plate membranı ile plate’in üstü kapatıldı ve 37°C’de 60 dk inkübasyona bırakıldı.

*Yıkama solüsyonlarının hazırlanması: Yıkama konsantrasyonu (20X) distile su ile dilue edildi.

4. Seal plate membran dikkatlice kaldırılıp sıvı boşaltıldı ve kalan damlalar silkelendi. Her bir kuyucuğa yıkama solüsyonu eklenip, 30 sn bekletildi ve boşaltıldı. Bu işlem 5 kez tekrarlandı.

5. Her bir kuyucuğa 50 µL kromojen reagent A eklendi
6. Daha sonra her kuyucuğa 50 µL kromojen reagent B ekleyerek hızlı bir şekilde pipetleme yapıldı.
7. Renk oluşumu için karanlık bir ortamda yeni seal plate membran ile kapatarak 37°C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı.
8. Reaksiyonu durdurmak için her bir kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklendi. Mavi renk sarı renge döndü.
9. Stop solüsyonu 10 dk eklendikten sonra, plate 450 nm dalga boyu altında absorbans ölçümü yapıldı.

Standartların konsantrasyonları ve OD değerlerine göre, standart eğrinin linear regresyon denkliği hesaplandı. Daha sonra örneklerin OD değerlerine göre örneklerin konsantrasyonları hesaplandı.

3.3.6 İstatistiksel Yöntemler

İstatistiksel analiz için 'SPSS' programı (Ver. 20.0) kullanıldı. Biyokimyasal P seviyelerinin ve histolojik folikül sayımı, proliferasyon 30 indeksi, değerlendirilmesinde ONE WAY-ANOVA ve Bonferroni testi uygulandı. Parametreler arasında yapılan korelasyon analizinde değerlendirme için 'Pearson's Correlation-two tailed' testi kullanıldı. Testler %95 güven aralığı içinde yapıldı ve $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

3.3.7 Kullanılan Cihazlar

Doku takip cihazı (Leica, Germany)

Gömme cihazı ((Leica, Germany)

Ben Mari (Leica, Germany)

Mikrotom (Leica, Germany)

pH Metre (Metle Toledo MP 2200, UK)

Manyetik Karıştırıcı (BIBBY Stuart, UK)

Işık Mikroskop (ZEEİSYJ-2009P, Japan)

Hassas Tartı (Denver, USA)

Mikrodalga Fırın (Arçelik MD 554, Türkiye)

Mikropipetler- 10ul, 20ul, 200ul ve 1000ul- (Eppendorf, USA)

+4°C Buzdolabı (Samsung, KOREA)

-20°C Buzdolabı (Samsung, KOREA)

-80°C Derin Dondurucu (Eppendorf AG, Germany)

Etüv (Thermo fisher USA)

Otoklav (Thermo fisher USA)

Soğutmalı Santrifüj (Thermo fisher USA)

Mikrosantrifüj (Bio-Rad, USA)

Homojenizatör Tissue Lyser (Qiagen, Germany)

PCR Cihazı (Bio-Rad, USA)

Spektrofotometre (Bio-Rad, USA)

RT-PCR Cihazı (Bio-Rad CFX96, USA)

ELİZA Cihazı (Bio-Rad, USA)

3.3.8 Kimyasal Malzemeler

ZnO Nanopartiküller (Sigma)

L-Arginin % 99 Sigma

Rompun (Bayer)

Ketalar (Pfizer: 150086)

Formaldehide (Merck Millipore: 103999)

Parafin (Merck Millipore: 107151)

Ethanol (Merck Millipore: 100983)

Etil Alkol % 99 (Alkomed: CAS 64-17-5)

Entellan (Merck Millipore: 107961)

Toluen (Merck Millipore: 108327)

Metanol (Sigma: 24229)

Mayer's Hematoxylin& Eosin boyama seti (Labvision: TA-125-MH)

Progesteron ELISA Kit (Bt-laboratory: YHB0673 China)

Real Time first strand Kit (ABM Cat. No. G487)

ultRNA Column Purification kiti (ABM Cat. No. G463)

OneScriptPlus cDNA Synthesis Kit (Cat. No. G236)

Masson-goldner staining kit (10048 Sigma Aldrich)

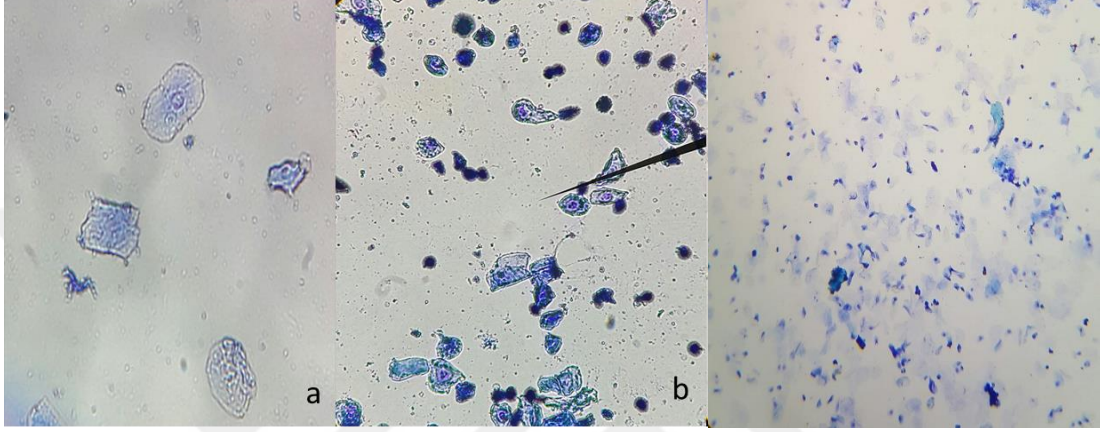
PAS Periodic Acid Schiff Boyama (PAS5-100TSigma Aldrich)



4. BULGULAR

4.1 VAJİNAL YAYMA BULGULARI

4.1.1 Ratlardan Alınan Örneklerden Smear Preparat Yaymaları



Şekil 4.1. Vajinal yayma

A) Proostrus fazında eritrosit hücreleri koloni halinde görüldü. B) Östrüs fazında lökosit görüldü, %75 çekirdekli, %25 oranında kornifiye hücre formunda gözlemlendi C) diöstrus fazında epitel hücrelerinin seyrek ve küçük boyutlarda olmasına karşılık çok sayıda serbest nötrofil bulundu.

4.2 BİYOKİMYASAL BULGULAR

4.2.1 Serumdan Progesteron Seviyesi (P)

Kontrol grubuna ait ratlar ile gerçekleştirilen deneylerde progesteron seviyesinin normal düzeyde olduğu ve elde edilen verilerin anlamlı sonuçlar gösterdiği anlaşıldı.

100 mg/kg ZnO NP uygulanan 2. Grup örnekleri, Kontrol grubu ile elde edilen veriler karşılaştırıldığında sonuçların istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gösterdiği izlendi ($p < 0,001$).

100 mg/kg ZnO NP + L-A uygulanan 3. Grup örnekleri, Kontrol grubu ile elde edilen verilerle karşılaştırıldığında ikinci gruptan çok büyük bir farklılık olamasa da yine de artış görüldü, ancak kontrol grubuna göre azalış gözlemlendi.

200 mg/kg ZnO NP uygulanan 4. grup örnekleri, Progesteron seviyesi kontrol grup ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalış gösterdi. Ancak ikinci grupta karşılaştırma yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış izlendi.

200 mg/kg ZnO NP + L-A uygulandığında (5 grup) Progesteron seviyesi 4. ve 2. grup verileri ile karşılaştırıldığında artış gözlemlendi, ancak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalış gösterdiği saptandı ($p<0,003$, $p<0,001$) (Çizelge 4.1)

Çizelge 4.1. Progesteron seviyesi istatistiksel analizi

Progesteron	$\bar{x} \pm SD$	F	P
Kontrol Grubu	29,8767 \pm 2,10948	50,131	<0,001*
2. Grup	11,8133 \pm 2,67448		
3. Grup	18,37 \pm 3,34123		
4. Grup	7,804 \pm 0,61113		
5. Grup	17,2883 \pm 3,86409		

* $P<0,05$

Veriler ortanca (25-75 persantil) olarak sunulmuştur.
 $p<0,05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.
 $p<0,001$. Kontrol ikinci ve dördüncü grubu ile kıyaslandığında.
 $p<0,001$. Kontrol ve tüm deney grupları ile kıyaslandığında.

Gruplar progesteron düzeyleri bakımından karşılaştırılmış ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu ($p<0,001$) tespit edilmiştir. Farklılığın hangi grup ya da gruplardan kaynaklandığını tespit edebilmek için gruplar Bonferroni yöntemi ile ikişerli olarak karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmalar neticesinde; 2. ve 4. gruplarda yer alan ratların en düşük progesteron değerlerine sahip oldukları, 3. ve 5. gruplardaki ratların ise kontrol grubundaki ratlardan daha düşük progesteron değerlerine sahip oldukları tespit edilmiştir.

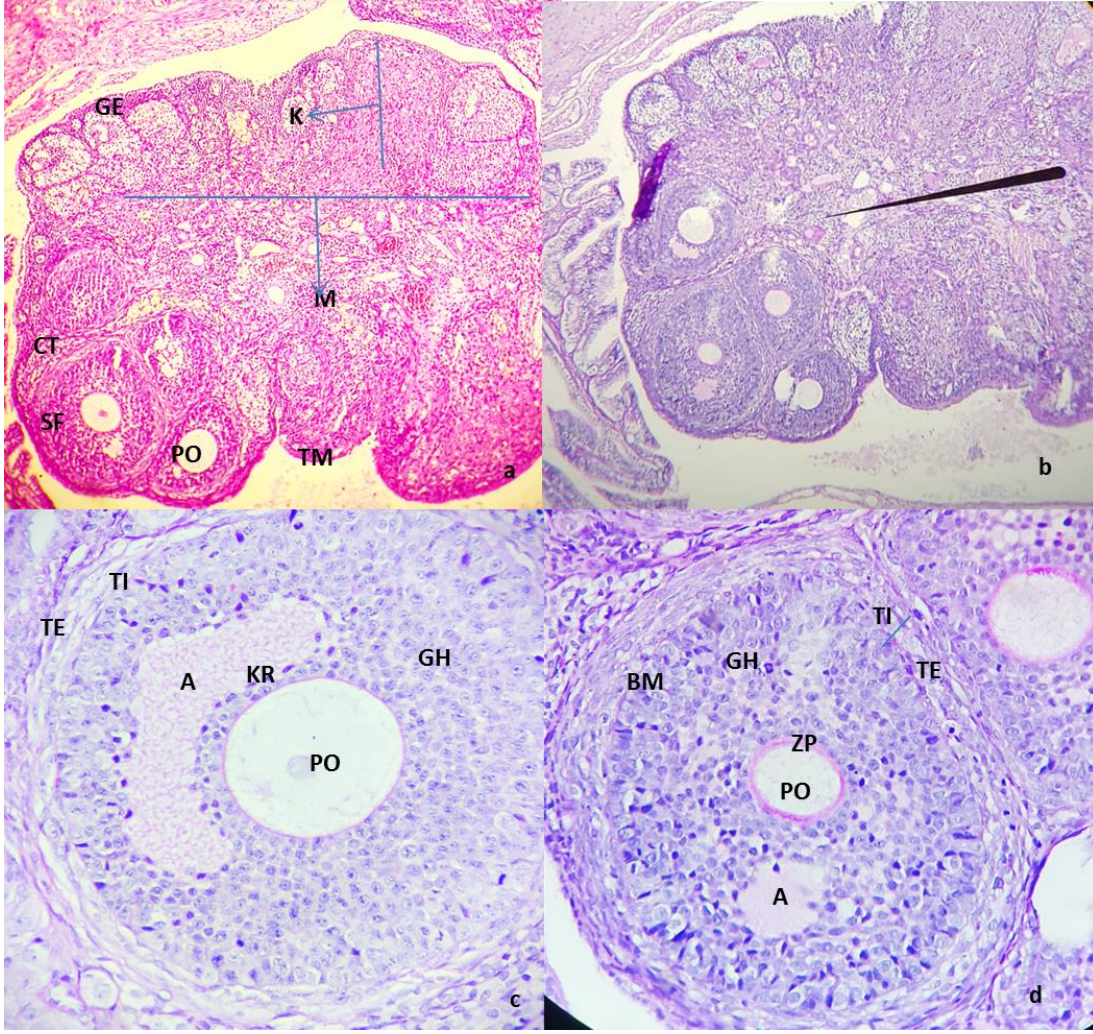
4.3 HİSTOLOJİK İNCELEME -IŞIK MİKROSKOP BULGULARI

4.3.1 Kontrol grubu- üçlü boyama bulguları

H-E, PAS-HL ve MT boyama ile gerçekleştirilen boyama verilerine göre; kontrol grubunda gelişimsel aşamalarda düzgün ve sağlıklı foliküller gözlemlendi. PAS (+) boyama ile elde edilen verilerde, ZP ve bazal membran düzgün bir şekilde ayırt edildi. Sağlıklı foliküllerin gelişimi dışında, doğal yolu ile atreziye uğrayan foliküllere rastlandı (Şekil 4.2a). Atreziye uğrayan foliküllerin granüloza hücrelerinde, belli sayıda piknotik nükleus gözlemlendi. Atretik foliküllerde piknotik hücrelerin varlığı kolay tespit edildi. Bağ dokuyu içeren stromaların çok düzgün bir biçimde foliküllerin ve korpus arasında yer aldığı gözlemlendi. Ayrıca atretik foliküllerde teka hücrelerinden interstisyel bezler MT boyama ile kolay ayırt edildi. Büyük çaplı atretik foliküllerin merkezlerinde büyük nükleus bulundu (Şekil 4.2b).

Primer oositler, zona pellusida ve onu çevreleyen korona radiata ile kolay tespit edildi. Ayrıca korona radiatanın etrafında granüloza hücreleri ve en dış tabakada bazal lamina H&E boyama ile güzel gözlemlendi. Graaf folikülün oosit etrafında kumulus ooforus izlendi. Sekonder foliküllerde büyük ve düzgün yayılmış antrum boşluğu fark edildi. ZP'siz oositlerin çevresinde tek tabakalı çoğunlukla 4-6 yaşlı granüloza progenitor hücreler bulundu (Şekil 4.2c). Bu granüloza progenitor hücreler grup halinde izlenen primordiyal foliküller etrafında bulunurlar.

Kontrol grubunun ovaryumlarda en dışta bulunan germinal epitel, tek tabaka kübik şeklinde çok kolay seçildi. Sınırları olmayan korpus luteum ve medulla yapıları izlendi. Bu yapıların arasında, daha çok korpus kısmında kortikal stroma hafif pembe renge boyandı. Primordiyal foliküllerin, folikül hücreleri yayık şekilde izlendi. Primer oositlerde ve gelişmekte olan oositlerde; teka interna ve teka eksterna'ya ait iç ve dış tabakaları ayırt etmek çok kolay oldu, bunun sebebi de kolay ve ayırt edici teka interna hücrelerinden dolayıdır (Şekil 4.2d). Ayrıca teka eksterna tabakanın dışında hemen stroma bulunuyordu. Teka tabakalarında hem kapiller hem de kan damarları izlendi.



Şekil 4.2. Kontrol grubuna ait ışık mikroskop incelemeler;

a) MT ile boyanan ovaryum korteks (K) ve medulla (M) bölgeler görünmektedir. Germinal epitel (GE), sekonder folikül (SF) ve primer oosit (PO) bulunur. b) A şeklinde bulunan aynı ovaryum PAS boyama ile boyandı. c) Graaf folikül primer oosit (PO) etrafında korona radiata (KR), onun hemen yanında antrum (A) boşluk bulunur. Henüz antruma dönüşmeyen kısımlar germinal hücreler (GH) ile döşenmiş. teka interna (TI) ve teka eksterna (TE) güzel ayırt edilebilir. PAS. d) Henüz graafian folikül oluşmayan bir sekonder folikül (SF) primer oositle (PO). zona pellusida (ZP) tabaka kalın bir çember oluşturmaktadır. Antrum (A) boşluk yavaş yavaş oluşmaya başladı. Granüloza

hücrelerin (GH) en dışta bazal membran (BM) izlenir. Teka interna (TI) ve teka eksterna(TE) kübik hücrelerle kalın bir tabaka oluşmaktadır.

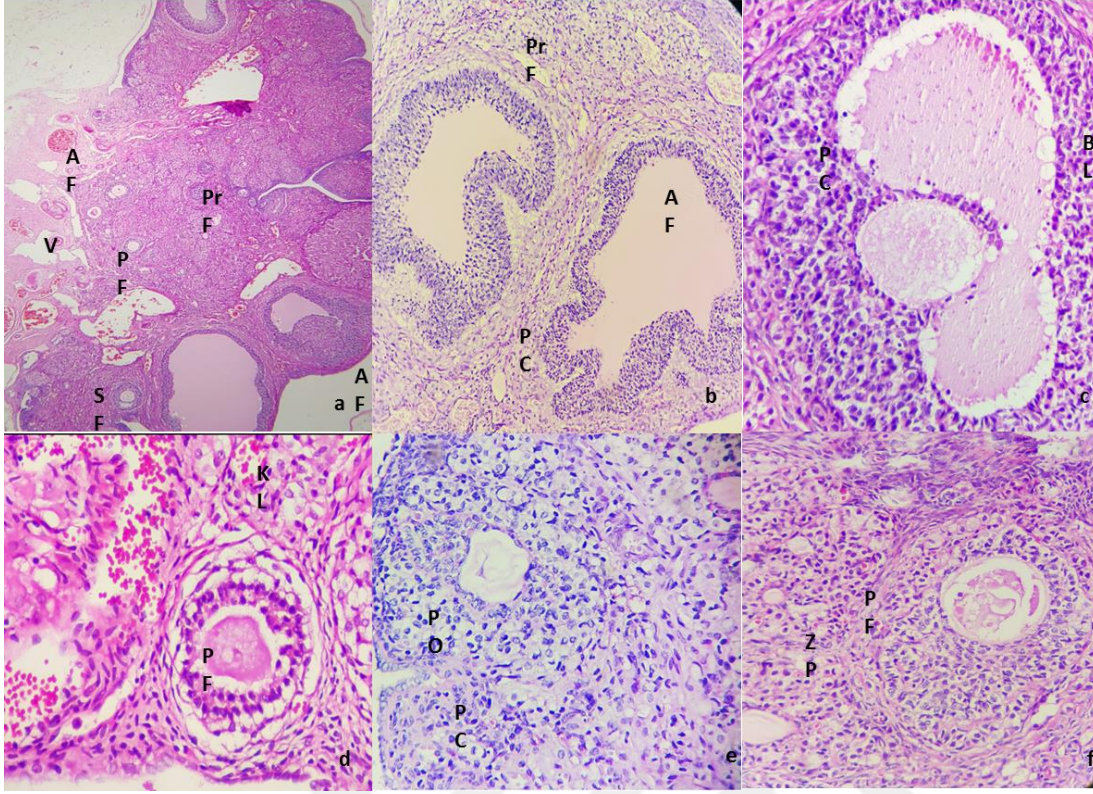
4.3.2 ZnO NP Grubuna Ait Işık Mikroskopik Bulgular

4.3.2.1 100 mg/kg ZnO NP grubunun bulguları:

21 gün boyunca 100 mg/kg ZnO NP uygulandıktan sonra sakrifiye edilen ratların ovaryumları üçlü boyama ile boyandı. İncelemesi yapılan her bir boyama preparatının ovaryumlarında aynı şekilde çok fazla atretik folikül izlendi. (Şekil 4.3a). Atretik dejenerasyon farklı şekillerde ve ovaryumun farklı bölgelerinde gözlemlendi. Korteks kısmında bulunan foliküllerin daha az hasara uğradığı gözlemlendi. Bazı bölgelerde primer ve sekonder foliküller oositsiz görüldü (Şekil 4.3b). Bu foliküllerde sadece antrum boşluğunun olduğu, zona pelusidanın bu tür foliküllerde ayırt edilemeyecek kadar şekilsiz hal aldığı anlaşıldı. Granüloza hücrelerinin arasında çok piknotik nukleusa sahip hücreler tespit edildi (Şekil 4.3c). Ovaryum dokunun en dışında bulunan germinal epitelin tek tabaka kübik hali, çoğunlukla kontrol grubu ile aynı özellikler gösterdi. Bazı bölgelerde germinal epitel deformasyon varlığı görüldü. Germinal tabakanın hemen altında bulunan korteks alanında, bazı kısımlarda neredeyse primordiyal folikül hiç gözlenmedi. Antral foliküllerde atretik değişiklikler izlendi. Graaf foliküllerinde izlenen atretik dejenerasyon granüloza ve teka interna arasındaki bazal membranın olmadığı gözlemlendi. Ayrıca granüloza tabakasındaki hücrelerin çoğunun piknotik çekirdeğe sahip olduğu anlaşıldı. (Şekil 4.3d-e).

İstatistiksel olarak kontrol grup ile karşılaştırma yapıldığında atretik foliküllerin sayısında anlamlı ölçüde artış gözlemlendi ($p < 0.001$)

Folikül sayımı yapıldığında; primer ve primordiyal foliküllerin sayısı, kontrol grubunun folikül sayısına kıyasla oldukça azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.3f).



Şekil 4.3. 100 mg/kg ZnO NP grubuna ait ışık mikroskopik bulgular;

a) MT ile boyanan ovarium preparatı birçok atretik folikül (AF) izlenir. Onun dışında primordiyal folikül (PrF), sekonder folikül (SF) ve primer folikül (PF) görünmektedir. Medulla kısmında çok sayıda vena (V) bulunur. b) Hematoksilen Eozin ile boyanan preparatta çok sayıda atretik folikül (AF) bulunur. Çok sayıda piknotik hücre (PC) izlenir. c) Dejenere olmuş bir Graafian folikül (GF) etrafında düzgün olmayan bir bazal lamina (BL) tabakası, oositte ve antrum boşlukta hava kabarcıklar ile dolmaya başladı. Piknotik hücrelerin (PC) artışı gözlemlendi. d) Deformasyona uğrayan bir Primer folikül (PF) apoptoza dönüştüren oositte bulunur. e) Çok sayıda piknotik hücreler (PC) ve dejenere olmuş bir primer oosit. f) Zona pellusida (ZP) yırtılmış halde, bazı kısımlarda tamamen yok oldu. Gelişimi devam edemeyecek bir primer folikülün (PF) oosit gözlemlendi.

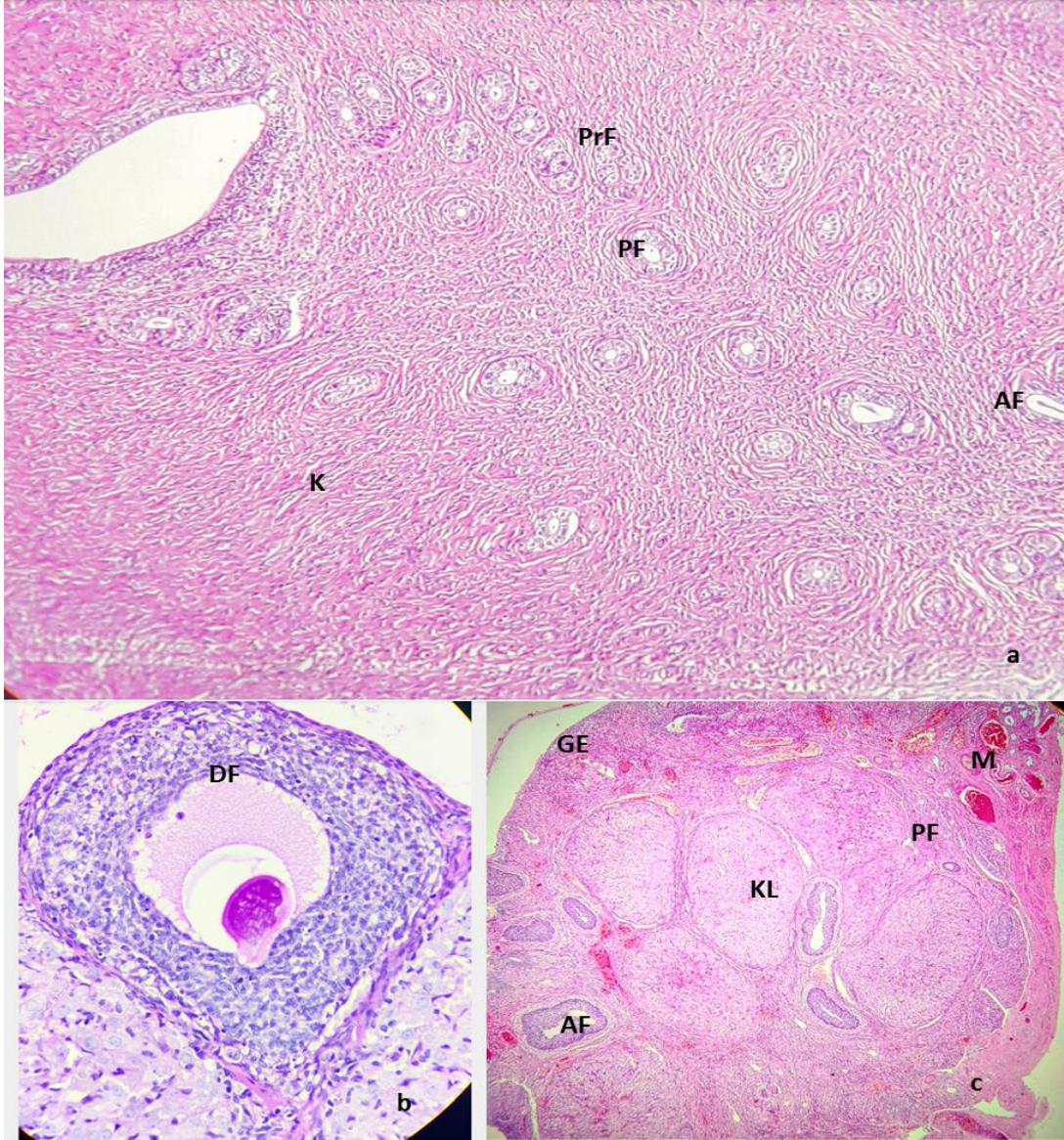
4.3.2.2 200 mg/kg ZnO NP grubunun bulguları:

Bu grupta yapılan mikroskopik incelemelerde, bazı foliküllerin boş olduğu tespit edildi. PAS-HL ile boyanan kesitler, zona pelisudanin folikül hücrelerden ayrıldığını ve aralarda düzensiz kopukluklar izlendi. ZP'nin kıvrımlı hale geldiği ve bazı bölgelerde yuvarlak boşluklar bulunduğu tespit edildi. Ancak ZP'nin bütünlüğünü kaybettiği gözlemlendi (Şekil 4.4a).

PAS-HL ile boyanmış kesitler ile gerçekleştirilen incelemede; en küçük büyütme ölçüsünde, ovaryumun ortasında bulunan hilium kısmı ve hilium'un arasında yayılan kan damarların etrafında çok fazla piknotik hücreler görüldü.

İncelemesi gerçekleştirilen bu grubun örnekleri diğer tüm gruplarla karşılaştırıldığında, foliküllerin tümüne bakıldığında istatistiksel anlamda düşüş izlendi. Korpus bölgesinde primordiyal foliküller çok az sayıda görüldü (Şekil 4.4b).

Ovaryumun en dış tabakasında bulunan germinal epitel hücreler bazı bölgelerde tamamen yok olduğu gözlemlendi. Veziküller folikülün, sekonder oositin ve zona pelusida'nın arasında boşluklar izlendi. Sekonder oositin çekirdekleri, PAS, MT ve Hematoksilen Eozin boyamalarda çok küçük ve düzgün bir morfolojik yapıya olmadığı tespit edildi. PAS boyama sonucunda Antral foliküllerde yüksek oranda atretik farklar gözlemlendi (Şekil 4.4c).



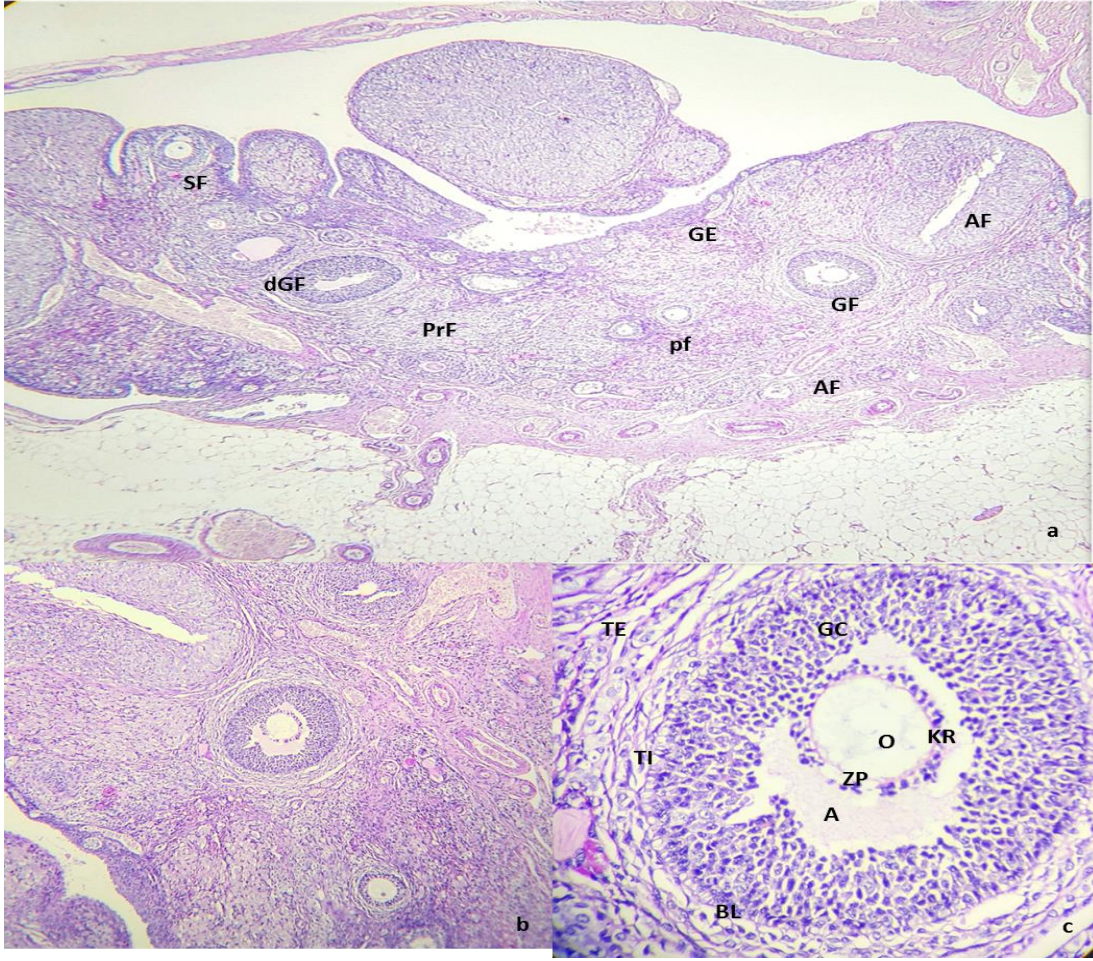
Şekil 4.4. 200 mg/kg ZnO NP grubuna ait ışık mikroskopik bulgular

a) Hematoksilen Eozin ile boyanan preparatta artmış Primordiyal (PrF) ve primer folikül (PF) bulunur. atretik folikül (AF) düzensiz korteks (K) kısımda yer alır. b) PAS boya ile boyanan preparat Son derece dejenere folikül (DF) olmuş bir Graaf folikül izlendi. c) MT ile boyanan ve 10x mikroskop büyütmede değerlendirilen ovaryum preparat germinal epitel (GE) bazı kısımlarda düzensiz, içinde medulla (M) ve ko luteum (KL), birkaç tane primer folikül (PF) ve çok sayıda atretik folikül (AF) izlenir.

4.3.3 ZnO NP + L-A Grubuna Ait Işık Mikroskopik Bulgular

4.3.3.1 100 mg/kg ZnO NP + L-A grubunun bulguları:

ZnO NP alan gruplar ve daha sonra L-A ile enjeksiyon alan ratların ovaryumları mikroskopik incelemede 3. gruba nazaran oldukça düşük iyileştirme etkisi görülse de, bu iyileştirme amacıyla yapılan tedavide istatistiksel açıdan anlamlı sonuca ulaşıldı. Foliküllerin geneline bakıldığında atrezi ve dejenerasyonun kısmen önlendiği tespit edildi (Şekil 4.5a). Ancak primordiyal foliküllerin artışının gözlenmesinin yanı sıra çoğunlukla normal yapıda ve sağlıklı oldukları elde edilen sonuçlar arasında en dikkat çekici olanıydı. Granüloza tabakasında granüloza hücrelerinde piknotik çekirdeklerde azalma fark edildi. Daha önceki gruplarda tespit edilen sekonder ve Graaf foliküllerinde zona pellusida ve oosit arasındaki boşluklar ve kopukluklar neredeyse yok denecek kadar azdı (Şekil 4.5b). Ancak atretik foliküllerin oositlerinin dejenere oldukları ve tedaviye herhangi bir etki etmediği PAS ve MT boyama ile gerçekleştirilen analizlerde net bir şekilde anlaşılmıştır. Sekonder foliküllerde antrum boşluğundan dolayı yayılan granüloza hücreleri, primer oosit ile bir kenara tekrar toplanmaya başlayan ve yeni oluşturan kümülüs ooforus, L-A alınan ratlarda düzgün bir şekilde deformasyon olmadan küme halinde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.5c).



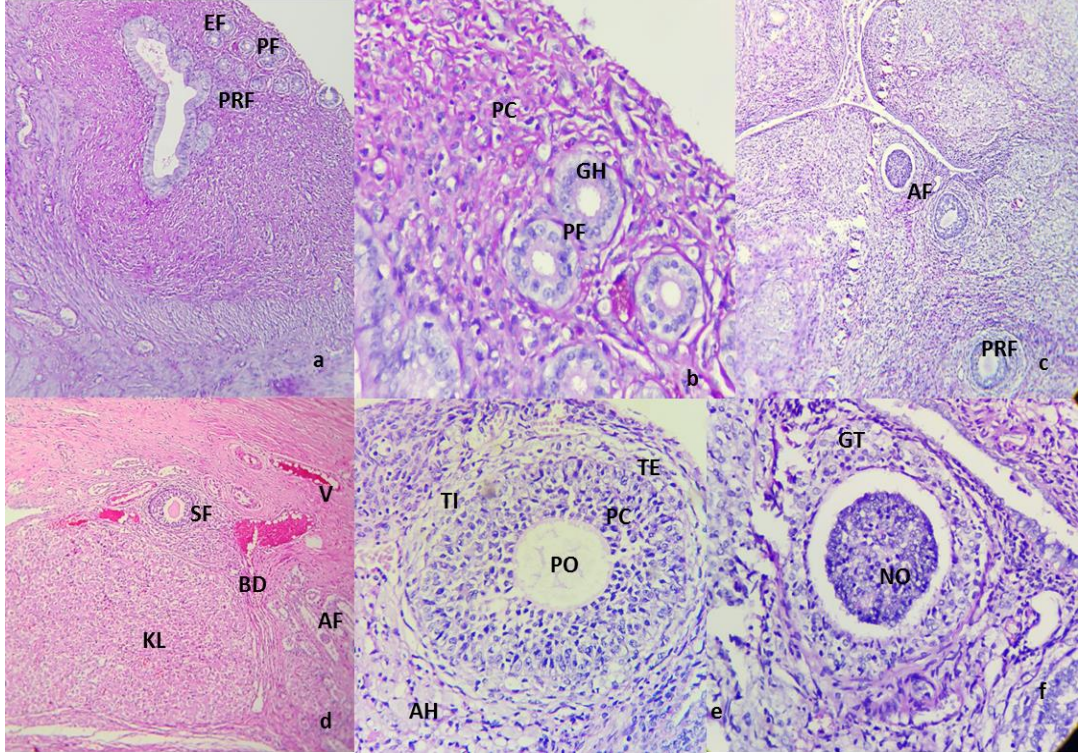
Şekil 4.5. 100 mg/kg ZnO NP + L-A grubuna ait ışık mikroskopik bulguları

a) 10X boyutta ışık mikroskopta yapılan incelemelerde germinal epitel (GE) tabakasında kübik hücreler daha düzgün izlendi. Atretik folikül (AF) ve dejeneratif Graaf folikül (dGF) sayısı azalmış olsa da hala çok fazla gözlemlendi. primordiyal folikül (PrF), graaf folikül (GF), Sekonder folikül (SF) ve primer folikül (PF) bulunmaktadır. b) 20X büyütmede atretik folikülün yanında düzgün gelişen bir graaf folikül bulunmaktadır. c) 40X büyütmede gelişmekte olan Graaf folikül (GF) bulunur. Folikülün en iç kısmında oosit (O) bulunur. Oositi saran zona pellusida (ZP) ve onu çevreleyen korona radiata (KR) yer alır. Büyümekte olan folikül sıvı ile dolmaya başlayan antrum (A) boşluğu görünmektedir. Piknotik hücreleri çok az içeren granuloza hücreler (GC) tabakası bulunmaktadır. Teka interna (TI) ve

granüloza hücre (GC) tabakasının arasında bazal lamina (BL) yer alır. Teka eksterna (TE) en dış bölgede bulunmaktadır

4.3.3.2 200 mg/kg ZnO NP + L-A grubunun bulguları:

PAS-HL boya ile boyanan kesitlerde, dördüncü grupta arasında istatistiksel anlamda bir fark olmadığı tespit edildi. Bu gruptaki mikroskopik incelemelerde, bazı oositlerin zona pellusidadan ayrıldığı görüldü (Şekil 4.6a-b). 5. grupta epitel yapısının bazı bölgelerde daha kalın olduğu tespit edildi. Genel olarak bakıldığında 4. ve 5. grup arasında istatistiksel olarak çok az düzeyde fark bulunmaktadır ($p>0,05$). Bahsi geçen iki grup arasında yapılan analizlerde, korteks bölgesinde bulunan foliküllerin çeşitleri açısından herhangi anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Teka interna ve teka eksternanın, her iki grupta da düzgün bir şekil aldığı ve MT boyama ile sınırlarının belirgin olduğu anlaşıldı. PAS boyama ile elde edilen preparatlarda ise atretik foliküllerin fragman ve vakuollerin olduğu oositler gözlemlendi. Zona granülozada ikinci ve üçüncü gruptaki çoklu piknotik çekirdekler hem 4. hem de 5. grupta seyrek halde izlendi (Şekil 4.6c, Şekil 4.6f).



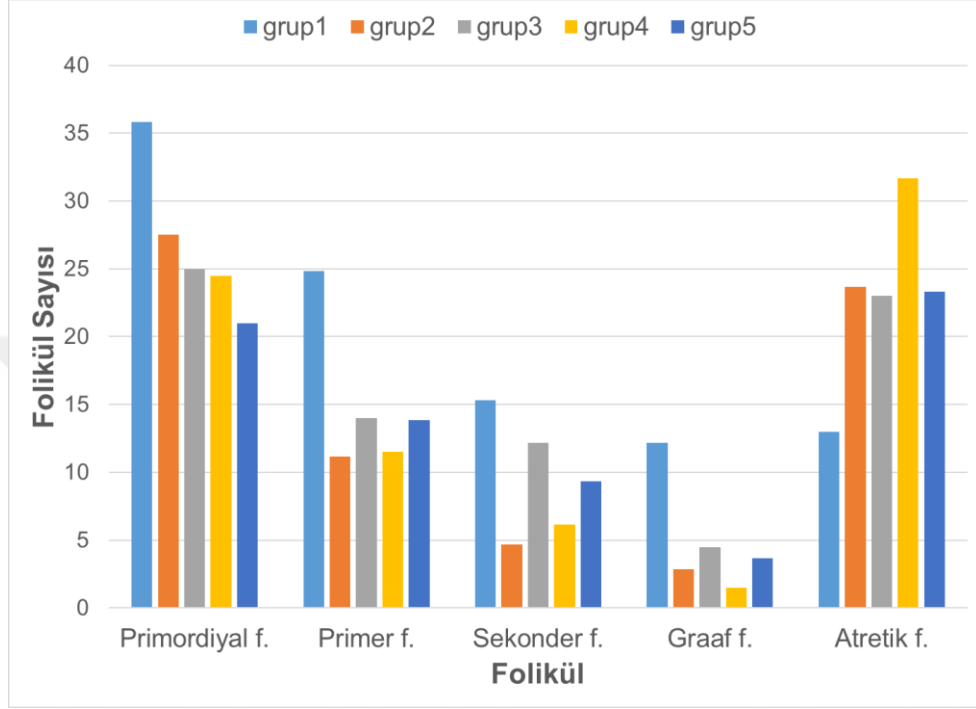
Şekil 4.6. 200 mg/kg ZnO NP + L-A grubuna ait ışık mikroskopik bulgular

a) (EF) Erken foliküllerin yanında primer foliküller (PF) ve primordiyal foliküller (PrF) bulunmaktadır. b) Primer folikül (PF) ve onu karakterize eden tek tabaka Granüloza hücreleri (GH) yer almaktadır. Piknotik hücreler (PC) çok nadir görünmektedir. c) Oositi dejenere olmuş ve etrafındaki zona pellusida tamamen kaybolmuş bir atretik folikül (AF) izlenmektedir. Hemen altında gelişimi düzgün başlayan bir primordiyal folikül (PrF) bulunmaktadır. d) MT ile boyanan vena (V) ve kan kanalları gözlemlendi. Büyük bir korpus luteumun (KL) yanında bağ doku (BD) yer almaktadır. Sekonder folikül (SF) ve çok sayıda atretik folikül (AF) bulunmaktadır. e) Primer oosit (PO) ve primer folikül (PF) her ne kadar düzgün zona pellusidaya (ZP) sahip olsa da piknotik hücreler (PH) ve apoptotik hücreler (AH) bulunmaktadır. Teka interna (TI) ve teka eksterna (TE) tabakalarının biçimleri çok düzgün olmasa da hücrelerin şekili prizmatik halindedir. f) H&E ile boyanan ve 40X boyuta incelenen preparatta nekrotik oosit (NO) izlenmekte. Oositin etrafında zona pellusida ve granüloza hücre tabakası olması gerekirken bu incelediğimiz foliküllerde boşluk oluşmuş. Oositi sarılan boşluğun dışında ince ve düzensiz bir granüloza hücreler (GH) tabakası bulunmaktadır.

4.3.4 Follikül sayılarının değerlendirilmesi

Total ovaryumdaki foliküllerin ortalama folikül sayısı hesaplandı. Bir ovaryumdaki foliküller sınıflandı primordiyal, p. unilaminar, p. multilaminar, sekonder ve Graaf folikülü olarak gruplandırıldı (Şekil 4.7). Gruplar arasında her bir folikül alt grubu için ayrı ayrı folikül sayıları ve bu foliküllerin arasında morfolojik özelliklerin değerlendirilmesi yapıldıktan sonra istatistiksel açıdan anlamlı sonuçlar elde edildi. Sayılan foliküllerin gruplar arasında ortalama alındı ve anlamlı sonuçlar elde edildi. En büyük fark ve folikül azlığı ikinci ve dördüncü gruplarında izlendi. Kontrol ve ikinci grubu ile kıyaslandığında $p<0,002$ anlamlı sonuçlar alındı. Kontrol ve üçüncü grubu ile kıyaslama yapıldığında güçlü bir fark olmadığını $p<0,21$ tespit edildi. Ancak kontrol grubu ve dördüncü grup arasındaki fark $p<0,001$ olduğunu tespit edildi. Kontrol ve beşinci gruplar istatistik sonuçlar $p<0,01$ olduğunu tespit edildi. Bu bakımda gruplar arasında en çok folikül azalışı dördüncü grupta izlendi. İstatistik açıdan $p<0,001$ anlamlı sonuçlar elde edildi. Bu grupta primer foliküllerin ve graaf foliküllerin noksanlığı yüksek oranda izlendi. Primordiyal foliküllerin azalışı

kontrol grup ile kıyaslama yapıldığında beşinci grupta en çok tespit edildi. Ancak primer sekonder ve graaf folikülerde bu azalış izlenmedi. Olgun yada graaf folikülerde en büyük azalış dördüncü grupta bulundu. İstatistiksel açıdan bu sonuçlar anlamlı olduğunu tespit edildi ($p<0,00003$).



Şekil 4.7. Kontrol (grup 1) ve deney gruplarındaki primordiyal, primer, sekonder ve Graaf foliküllerin sayıları.

Atretik folikülerde, kontrol grubu ikinci, üçüncü ve beşinci gruplar ile kıyaslama yapıldığında artış izlenmektedir. Ancak bu üç deney grup arasında çok anlamlı fark olmadığını sonuca varıldı. Kontrol grup ikinci, üçüncü ve beşinci grup karşılaştırmalar istatistiksel açıdan anlamlı olduğunu hesaplandı ve $p<0,000002$ olduğunu tespit edildi. Atretik yada hasarlı (apoptoza uğrayan) folikülerde en büyük artış dördüncü grupta olduğunu tespit edildi. Atretik folikülerin sayısı gruplar arasında karşılaştırma yaparken istatistik açıdan sonuçları bir kez daha anlamlı olduğunu tespit edildi ($p<0,00005$).

4.4 RT PCR BULGULAR

Gen ekspresyon deneyimizde kullanılan apoptozu indükleyen genler *Bax*, *Bcl*, *Kaspaz 3*, *Kaspaz 9* ve housekeeping gen *B-aktin* Bonfferi yöntem ile arasındaki fark tespit edildi. Tüm genler arasında elde edilen sonuçlar bakıldığında anlamlı olduğunu sonuca varıldı $p < 0,02$ (Çizelge 4.2). Apoptozu indükleyen genler arasında ve housekeeping gen ile karşılaştırma yapıldığında en yüksek apoptoz oranı *Bax* genden izlendi. Bu sonuçlar istatistik açıdan anlamlı olarak kabul edildi ($p < 0,00003$).

Çizelge 4.2. RT PCR yöntemin istatistik sonuçları

ÖZET

Grup	Sayı	Toplam	Ortalama	Varyans
<i>Kaspaz 9</i>	5	137,49	27,50	8,97
<i>Kaspaz 3</i>	5	144,00	28,80	5,27
<i>Bcl</i>	5	15,04	31,21	19,90
<i>Bax</i>	5	155,58	31,12	28,52
<i>B-aktin</i>	5	119,05	23,81	0,16

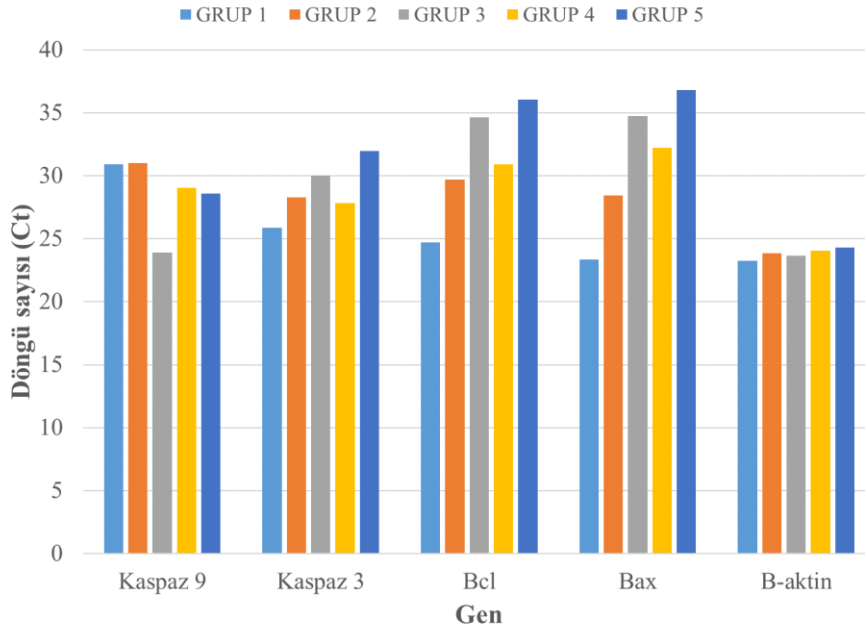
ANOVA

Kaynak	SS	df	MS	F	P-değer	F-Kritik değer
Gruplar arası	186,37	4	46,59	3,71	0,020	2,87
Grup içi	251,24	20	12,56			
Toplam	437,61	24				

Veriler ortanca (25-75 persantil) olarak sunulmuştur.
 $p < 0,05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.
 $p < 0,02$ kontrol ve diğer gruplar kıyasladığında.

RT PCR deneyinde grafik üzerinde elde ettiğimiz sonuçlarda *B-aktin* genin ve kontrol grupların uyumlu olduğunu ve çok büyük bir fark olmadığını tespit ettik (Şekil 4.8). Gen ekspresyon tüm genlerde izlendi, en yüksek oran *Bcl* ve *Bax* geninde izlendi. Gen ekspresyonda diğer yapılan analizlerin sonuçlarla bakıldığında en büyük hasar beşinci grupta izlendi. Bu sonuçlar tüm genlerde neredeyse aynı oranda saptandı. Yapılan PCR yönteminde 40 döngü yapıldı. Döngü sayısı (Ct) olarak gösterildi. Böylece gruplar arasında ve kontrol grup ile karşılaştırma yapıldığında istatistiksel açıdan anlamlı sonuçlar elde edildi ($p < 0,020$) olduğunu tespit edildi.

Doğal yolu ile oluşan apoptoz ve indükleyen apoptozu ayırt edebilmek için ovarium üzerinde etki eden *B-aktin* gen kullanıldı ve sonuçlar istatistik açıdan anlamlı olduğunu tespit edildi ($p < 0,0003$).



Şekil 4.8. *Kaspaz 9, Kaspaz 3, Bcl, Bax ve B-Aktin* genlerin kontrol ve deney gruplarında gen ekspresyon değerlendirilmesi

Gruplar *Kaspaz 9* gen ekspresyonları bakımından karşılaştırılmış ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığını ($p < 0,059$) tespit edilmiştir. Ölmüş hücrelerin en yüksek oranı dördünü grupta izlenirken en düşük ölü hücre oranı ikinci grupta bulundu (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. *Kaspase 9* genin gruplar arasında değerlendirilmesi

ÖZET

Grup	Sayı	Toplam	Ortalama	Varyans
<i>Grup 1</i>	5	154,60	30,92	21,92
<i>Grup 2</i>	5	155,15	31,03	25,76
<i>Grup 3</i>	5	119,40	23,88	5,01
<i>Grup 4</i>	5	116,26	29,07	22,42
<i>Grup 5</i>	5	142,96	28,59	3,53

ANOVA

Kaynak	SS	df	MS	F	P-değer	F-Kritik değer
Gruplar arası	168,55	4	42,14	2,74	0,05	2,90
Grup içi	292,10	19	15,37			
Toplam	460,66	23				

Veriler ortanca (persantil) olarak sunulmuştur.

$p < 0,05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

$p < 0,05$ Kontrol ve tüm gruplar ile kıyaslandığında.

Gruplar *Kaspaz 3* gen ekspresyonları bakımından karşılaştırılmış ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı ($p < 0,093$) tespit edilmiştir. Diğer genler ile kıyaslama yapıldığında en düşük apoptoz oranı bu gende izlendi. *Kaspaz 3* gen içinde ve gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında apoptoz seviyesi en düşük 4. Grupta tespit edildi. İstatistiksel sonuçlar anlamlı olarak kabul edilmedi (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. *Kaspaz 3* genin gruplar arasında değerlendirilmesi

ÖZET

Grup	Sayı	Toplam	Ortalama	Varyans
<i>Grup 1</i>	5	129,41	25,88	5,45
<i>Grup 2</i>	5	141,49	28,30	10,86
<i>Grup 3</i>	5	150,13	30,03	18,21
<i>Grup 4</i>	5	111,40	27,85	18,97
<i>Grup 5</i>	5	159,73	31,95	4,39

ANOVA

Kaynak	SS	df	MS	F	P-değer	F-Kritik değer
Gruplar arası	104,41	4	26,10	2,33	0,093	2,90
Grup içi	212,54	19	11,19			
Toplam	316,95	23				

Veriler ortanca (persantil) olarak sunulmuştur.

$p < 0,05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir.

$p < 0,093$ Kontrol ve tüm gruplar ile kıyaslandığında.

Gruplar *Bcl* gen ekspresyonları bakımından karşılaştırılmış ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu ($p < 0,033$) tespit edilmiştir. Farklılığın hangi grup ya da gruplardan kaynaklandığını tespit edebilmek için gruplar Bonferroni yöntemi ile ikişerli olarak karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmalar neticesinde; Kontrol grubu ve 2. grupta yer alan ratların daha düşük *Bcl* gen ekspresyonu değerlerine sahip oldukları tespit edilmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Bcl genin gruplar arasında değerlendirilmesi

ÖZET

Grup	Sayı	Toplam	Ortalama	Varyans
<i>Grup 1</i>	5	123,67	24,73	9,24
<i>Grup 2</i>	5	148,52	29,70	61,07
<i>Grup 3</i>	5	173,32	34,66	19,48
<i>Grup 4</i>	5	154,48	30,90	48,54
<i>Grup 5</i>	5	180,22	36,04	14,43

ANOVA

Kaynak	SS	df	MS	F	P-değer	F-Kritik değer
Gruplar arası	398,01	4	99,50	3,26	0,033	2,87
Grup içi	611,02	20	30,55			
Toplam	1009,04	24				

Veriler ortanca (persantil) olarak sunulmuştur.

$p < 0,05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

$p < 0,033$ Kontrol ve tüm gruplar ile kıyaslandığında.

Gruplar *Bax* gen ekspresyonları bakımından karşılaştırılmış ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu ($p < 0,004$) tespit edilmiştir. Farklılığın hangi grup ya da gruplardan kaynaklandığını tespit edebilmek için gruplar Bonferroni yöntemi ile ikişerli olarak karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmalar neticesinde; Kontrol grubu ve 2. grupta yer alan ratların daha düşük *Bax* gen ekspresyonu değerlerine sahip oldukları tespit edilmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Bax genin gruplar arasında değerlendirilmesi

ÖZET

Grup	Sayı	Toplam	Ortalama	Varyans
<i>Grup 1</i>	5	116,84	23,37	10,07
<i>Grup 2</i>	5	142,24	28,45	18,27
<i>Grup 3</i>	5	173,64	34,73	11,46
<i>Grup 4</i>	5	161,00	32,20	42,28
<i>Grup 5</i>	5	184,17	36,83	3,99

ANOVA

Kaynak	SS	df	MS	F	P-değer	F-Kritik değer
Gruplar arası	570,32	4	142,58	8,28	0,0041	2,87
Grup içi	344,26	20	17,21			
Toplam	914,58	24				

Veriler ortanca (persantil) olarak sunulmuştur.

$p < 0,05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

$p < 0,004$ Kontrol ve tüm gruplar ile kıyaslandığında.



5. TARTIŞMA

Granüloza hücreleri, çeşitli molekül ve sinyal iletiminde rol alan parakrin ve otokrin yol aracılığıyla foliküllerin gelişimini sağlamaktadır (115). Bu hücrelerin haberleşme ve granüloza hücrelerin folikül gelişimi üzerinde görev üstlendiği ile ilgili pek çok araştırma yapılmış olup aynı zamanda birbirleri ile çelişkili sonuçlar da ortaya koyulmuştur (116). Ovaryum üzerinde yapılan çalışmalarda çok farklı kısıtlamalar ve zorluklarla karşılaşmaktadır. Bunlardan en sık rastlananları; ovaryum dokusunun çok küçük olması ve foliküllerinin gelişiminde rol oynayan parakrin etkileşiminin *in vitro* olarak yapılamamasıdır. Ayrıca gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında, ovaryum dokusunun çalışma sırasında medyum besinindeki farklı faktörler ile yanlış etkileşimler yaptığı için güvenilir sonuçlar alınmaması ve verileri farklı yansıtmasından dolayı ovaryum ve foliküllere olan çalışmalardan kaçınılmaktadır (117). Bu engeller ve sorunlar değerlendirilerek, ovaryumda ZnO NP'nin folikülogenez üzerine etkileri ve hasarlarına karşı L-A aminoasitin potansiyel iyileştirici etkisinin araştırıldığı çalışmamızda model organizma olarak ratlar seçilerek *in vitro* deneyler yapıldı. 3 aylık Wistar Albino dişi ratların gelişimi ve modellenmesi 20-30 yaşlarındaki insanın gelişimine denk gelmektedir. Dolayısıyla hem moleküler hem de histobiyokimyasal çalışmamız için uygun yaş ve model aralığı seçilmiş olundu.

Dişi reproduktif organlar üzerine yapılan *in vivo* çalışmalarda menstrual siklusu takip etmek ve belirlemek büyük önem taşımaktadır. Hayvan deneylerinde kontrol ve deney gruplarında fazların takip edilmesi gerekmektedir (118). Bu sebeple deneklerin vajinal sitolojik yayması alınıp değerlendirilerek östrüs fazı belirlendi. Ayrıca tüm ratların folikülogenezi ile ilgili bilgiye, anlamlı değerlere ve bir önceki ovulasyon döneminden foliküllerin gelişimine sahip olabilmek için tüm ratlar präöstrus-östrus geçiş fazında sakrifiye edildi.

Dişi reproduktif dönem boyunca ovaryumlarda sadece birkaç adet folikül ovulasyona hazır hale gelir, geri kalanı ise doğal yol ile atreziye uğrar. Folikül atrezi sürecinde ilk olarak apoptoza granüloza hücreleri uğrar (119). Foliküllerin doğal dejenerasyonun dışında farklı etkenlerden dolayı atreziye nedeni olmaktadır (120).

ZnO NP nZnO'nun toksisitesi, hayvan modellerinde ovaryum da dahil olmak üzere çeşitli organ ve doku örnekleri kullanılarak araştırılmıştır ve gerçekleştirilen bazı çalışmalarda ZnO'nun daha çok kadın üreme sistemini ve doğurganlık oranını olumsuz yönde etkileyebileceği gösterilmiştir (49, 55). Bu amaçla kullanılan civciv oositlerinin ZnO'ya maruz kalmasının civciv gelişimlerini engellediği belirtilmiştir. ZnO organlara ve hücelere farklı yollarla girmektedir; solunum sistemi, deri ve kan yolu ile kan beyin bariyerini geçerek etki etmektedir (55-57).

In vitro deneylerde ZnO NP'nin fetal yumurtalıklara nüfuz ettiği ve eşey ana hücrelerinde sitotoksositeye neden olduğu açıklanmaktadır (47). Ayrıca ZnO NP'e maruz kalmanın, temel olarak hücre DNA hasarını indüklemiş olduğunu ve bunun sonucu olarak da fetal yumurtalıklarda apoptozla ilişkili proteinlerin ekspresyonunun artmasını neden olabileceği belirtilmektedir. Elde edilen veriler doğrultusunda ZnO NP'ün doğum öncesi ve sonrası oogenezi ile ilgili süreçleri etkileyebileceğini ve DNA hasarını arttırdığını ve yumurtalık folikül rezervini azalttığını gösteren bulgular da elde edilmiştir. ZnO NP'nin etkisi nanopartiküllerin boyutuna göre değişmektedir. Daha küçük moleküller hücreye daha kolay girmekte ve daha yüksek toksik etkiye neden olmaktadır. Bağlanma gücü ve dolaşım hızı daha yüksektir. Dolayısıyla biz çalışmamızda 30-50 nm arasındaki boyutlarda nanopartiküller kullandık. İntraperitoneal yol ile ZnO NP vererek emilimi ve hücreye girişinin daha kısa sürede olmasını sağlayarak istenilen sonuçların elde edilmesini amaçladık (121-126).

Çalışmamızda ZnO NP'nin ovaryumda görülen histopatolojik etkilerine karşı L-A aminoasidinin potansiyel iyileştirici özelliği histobiyokimyasal, morfolojik ve moleküler olarak incelendi.

ZnO NP uygulaması sonrasında hematoksilen eosin, mason trikrom ve periyodik asit-shift boyama ile ovaryum morfolojik açıdan incelendiğinde germinal tabakada dejenerasyon izlendi. Daha detaylı ve büyütmeli inceleme yapıldığında ise dejenere zona pellusida, piknotik hücrelerle bazal membran ve ayırt edilemeyen teka interna ve teka eksterna izlendi. Ayrıca atretik folikülün sayıca fazla olduğu ve antral kısımda apoptotik hücrelerinin arttığı görüldü. Primordiyal ve primer multilaminar foliküller seyrek halde olurken sekonder ve graaf foliküller çok nadir izlendi. ZnO NP gruplarında graaf foliküller atretik foliküllere dönüştü. Sekonder oositlerde

oositler çok gelişmeden kaybolurken, zona pellusida buruşmuş veya parçalanmış olarak gözlemlendi. ZnO NP'lerin toksisite etkisinden dolayı birçok hücre stabil olsa ve savunma mekanizmalarını kulansa da granüloza hücreleri sitoplazmadaki depozisyonla ortamı terk etmeye başlamışlardı.

ZnO NP'ler yalnızca sitotoksisiteyi indüklemekle kalmaz, aynı zamanda da A431 insan epidermal hücrelerinde DNA hasarı (122) ve insan SHSY5Y nöronal hücrelerinde mikronükleik üretimi, H2AX fosforilasyonu ve DNA hasarı da dahil olmak üzere çeşitli hücrelerde farklı genotoksisitelere neden olmaktadır (127).

ZnO NP uygulanan ratlarda, biyokimyasal incelemede elde edilen bulgularımız progesteron (p) seviyesinin azaldığını göstermektedir. Granüloza hücrelerinde gerçekleşen hasara bağlı olarak granüloza hücrelerinin sekretuar aktivitesinin azaldığı saptanmıştır. Proöstrus fazın sonunda sakrifiye edilen ratların; ZnO NP gruplarında progesteron seviyesinin normal değerlere göre yüksek düzeyde olduğu gözlemlendi. Bunun sebebi de NP'nin kan beyin bariyerini geçerek hipotalamus ve hipofiz bezinde LH, GnRH ve FSH hormonlarının salgılandığı hücrelere ulaşmasıdır. Uyarıcı hormonlara ulaştıktan ve etkiledikten sonra NP, hipotalamik-hipofiz-gonadal eksenini pozitif ve negatif feedback ile inhibe ederler ve ovaryumun östrojen ve progesteronun normal salgılanmasına kısmen etki eder ya da tamamen durdurur (128). Elde edilen veriler doğrultusunda, ZnO NP'nin doğum öncesi ve sonrası oogenezi ile ilgili süreçleri etkileyebildiği, DNA hasarını artırdığı ve yumurtalık folikül rezervini azalttığını gösteren bulgular mevcuttur. Sonuç olarak; metal nanopartiküllerin elektronik ürünler, tablolar ve resimler de dâhil olmak üzere pek çok alanda yaygın olarak kullanılması bu maddelere maruz kalma ihtimalini büyük ölçüde artırmıştır (129).

Rat siklusu 4-5 gün sürer ve dört fazdan oluşur: proöstrüs evresi yaklaşık 12 saat, östrüs evresi 9-15 saat, metöstrüs evresi 21 saat ve diöstrüs evresi yaklaşık 57 saat sürer (130). Korpus luteumun şekli ve boyutu en yüksek seviyesine diöstrüs döneminde ulaşmaktadır. Progesteron pik seviyesine proöstrüs fazının sonunda ve östrüs fazının başında ulaşmaktadır. Progesteronun seviyesi yükselirken östrojenin seviyesi bu dönemlerde düşmektedir (131). Östrüs evresine geçerken, östrojen seviyesinde hafif bir azalma gerçekleşir, progesteron seviyesi ise sabit kalmaya

devam eder. FSH seviyesinde yavaş yavaş bir artış izlenir (130). Östrüs fazında LH en düşük düzeyde olup FSH ise en yüksek değerine gelir. Östrojen hormonunun seviyesi düşmeye devam ederken progesteronun seviyesi artmaya devam eder ve östrüsün sonlarına doğru ovulasyon gerçekleşir (132). Metöstrus fazında östrojen seviyesi artmaya başlarken, Progesteron seviyesi sabit kalmaya devam eder. Metöstrus evresinde korpus luteum oluşumu gerçekleşir. Progesteron seviyesinin azalması proöstrus fazındayken gerçekleşmeye başlar (133).

L-A verilen ratların ovaryumlarının morfolojisine bakıldığında genel anlamda hasar ve apoptotik hücrelerinin sayısında azalma tespit edildi. Zona pellusida, germinal epiteli, teka interna ve teka eksterna ve bazal membranın deformasyonunda önemli değişiklikler gözlemlendi. Ayrıca, bu gruplarda granüloza hücrelerin dejenerasyonunda ve piknotik hücrelerin sayısında önemli miktarda azalma gözlemlendi.

Oosit ve folikül bakımından değerlendirildiğinde; L-A gruplarında, ZnO NP gruplarına göre daha sağlıklı ve daha az hasarlı oosit ve foliküller bulunduğu saptandı. Bu sonuçların, kontrol grubu sonuçlarına yaklaştığı olması nanopartiküller ile tetiklenen hasarlara karşı L-A aminoasit tedavisinin yeterli olabileceği anlamına gelmektedir.

200 mg/kg ZnO NP gruplarında apoptotik granüloza hücreleri en yüksek düzeyde graaf ve sekonder foliküllerde izlenirken, L-A uygulamasından sonra bu hasarın önemli miktarda azaldığı saptandı. PAS boyama ile zona pellusida her grupta düzgün boyandığı için hasar ve iyileşme çok kolay tespit edilmektedir. Dolayısıyla önceki gruplarda dejenere olan zona pellusida hücrelerinin sabit ve sık halde buldukları gözlemlendi.

200 mg/kg ZnO NP+ L-A ve 100 mg/kg ZnO NP+ L-A gruplarında tüm parametrelere bakıldığında granüloza hücrelerinde Progesteron seviyesindeki artış hasarın azaldığı anlamına gelmektedir. Bu değerlerin artması ve kontrol grubundaki değerlere yaklaşması L+A aminoasidin iyileştirme potansiyelinin yüksek olduğuna işaret etmektedir. Progesteronun metabolizmayı iyileştirmesinin yansısı, L-A grubundaki nitrik oksit (NO) ZnO NP'lerin yol açtığı hasarı ve hipofiz üzerindeki inhibisyon etkisini ortadan kaldırması da mümkündür.

Ön hipofiz hormonlarının salgılanması NO tarafından düzenlenir ve ovaryum fonksiyonları kontrol edilir (134). Ayrıca, NO'nun intraovaryan düzenleyici görevinin dışında, hipofiz gonadotropinlerinin sentez ve salgılanmasında doğrudan düzenleme rolü de vardır (135).

NO, granüloza hücrelerindeki steroid sentezini azaltarak gereksiz östrojen sentezini engellemektedir (136). Yapılan bir araştırmada, NO yalnızca östrojeni uyarmadığı, ovaryum ve atreziyi etkilediği ve ayrıca foliküllerin gelişimine de katkıda bulunduğu bildirilmiştir (135).

İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) tarafından sentezlenen NO, östrüs siklus sırasında ovulasyona ve foliküllerin ovulasyona hazır olmasına yardımcı olmaktadır.

Progesteron ve östrojen eş zamanlı ve aynı sinyal iletim molekülleri tarafından kontrol edildikleri için, bu sinyal iletim molekülleri NO tarafından düzenlenmektedir. Dolayısıyla NO tarafından progesteronun ve östrojenin seviyesi ayarlanmaktadır (136).

Oositin gelişimi granüloza hücreleri tarafından gerçekleşir. Ayrıca granüloza hücreleri oositin büyümesinin devamlılığını ve mayoz fazında duraklamasını sağlar. Granüloza oosit ilişkisi çok önemlidir. Granüloza hücreler ve teka interna ve teka eksterna hücreler arasında bağlantı, iletişim ve besin taşıma açısından çok önemlidir (137). Çalışmamızda ZnO NP alan gruplarda bu bağlantı ve etkileşimlerin zayıf olduğunu ve bunun sebebi olarak da apoptotik hücrelerin artmış olmasının olduğunu düşünmekteyiz. Bunu biyokimyasal ve moleküler incelemelerimiz ile de desteklemiş olduk. Oosit olmadan foliküllerin gelişimi gerçekleşmez. Oosit tarafından folikülün oluşumu ile ilişkili bazı sinyal molekülleri salgılanır. Oosit ayrıca granüloza hücrelerinin düzenli çoğalmasını ve steroid sentezinin düzenlenmesine katılan sinyal moleküllerini de düzenler (138).

Elde edilen tüm bulgulara göre; ZnO NP tarafından artan hasar ve toksisite primordiyal foliküllerin fazla salgılanmasına, üretilmesine, gelişmekte olan primer sekonder ve graaf foliküllerin sayısının azalmasına, foliküllerin kaybına ve bitimine neden olur. Bu nedenle ZnO NP'lerin tüketimi ve vücutta bulunması oositlerin kaybına, folikül rezervinin azalmasına, ovulasyon oranının düşmesine, erken

yaşlarda menopoza ve infertilite gibi daha büyük zararlara yol açmaktadır. Bu çalışma sonuçları değerlendirildiğinde L-A aminoasidinin indüklenmiş hasarı azaltma etkisini bir tedavi olarak ve toksik maddeye karşı dirençli bir ilaç olarak düşünmekteyiz. Her ne kadar L-A gelişme aşamasındaki folikülleri iyileştirse ve oluşan hasarı önlese de büyük ve olgun foliküllerde istenilen sonuçların alınmaması dikkat çekmektedir. İlerdeki çalışmalarda daha iyi sonuçlar alabilmesi için önerimiz L-A aminoasidinin miktarının artırılması gerekmektedir. ZnO NP, follikülogenezis ve ovulasyonu etkilemesi nedeniyle feritilizasyonu da olumsuz yönde etkileyebileceğine ihtimal verilmektedir. Bu durum olgun foliküller için geçici amenore, henüz gelişmeyen yani primordiyal foliküller için kalıcı amenore veya folikül yetmezliği ile karşı karşıya kalınabilir.

6. SONUÇ

ZnO NP uygulaması esnasında ovaryum dokusunda gözlenen ve infertiliteye neden olan hasarı önlemede, L-Arjininin etkisini morfolojik, biyokimyasal ve moleküler açıdan incelemek amacı ile planladığımız çalışmada aşağıda sıralanan sonuçlar elde edilmiştir;

A) Tüm grupların gelişimdeki foliküller sayıldı ve incelendi. İncelenen folikül sayısı özellikle ZnO nanopartikül uyguladığımız gruplarda (ikinci ve dördüncü gruplar) primordiyal folikül sayısının üç kat azaldığı gözlemlendi. Bu sonucun istatistiksel açıdan da anlamlı olduğu tespit edildi. Atretik folikül sayısı tüm gruplarda izlendi. Bu sayının dördüncü ve beşinci gruplarda daha yüksek olduğu tespit edildi, ancak istatistiksel açıdan diğer deney grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde olmadığı görüldü.

B) Gruplara histolojik açıdan bakıldığında özellikle 200 mg/kg ZnO NP uygulamasında aşırı hasarlı doku tespit edilmiştir. Sayısal verilere paralel olarak germinal dokunun bölgesinde primordiyal folikül görülmedi. Diğer deney gruplarında çok sayıda piknotik hücreler gözlemlendi.

C) Progesteron seviyesinin, serumdan ölçüm yapıldığında kontrol gruplarında beklenen seviyede olduğu tespit edildi. Diğer gruplarda bu seviye görülmedi. Özellikle 4. ve 5. gruplarda progesteron değerinin çok düşük olduğu tespit edildi ve bu sonuçların istatistiksel açıdan anlamlı olduğu sonucuna varıldı. L-Arjinin verilen gruplarda progesteron seviyesinin yükseldiği ve kontrol grubunun seviyesine yaklaştığı gözlemlendi.

D) Gen ekspresyon tespitimizde, RT-PCR yöntemiyle apoptozu indükleyen genleri kullanarak hasar düzeyi ölçüldü. *B-aktin* geni ile karşılaştırma yapıldığında *Kaspaz 9*, *Bax* ve *Bcl* gen gruplarında yüksek düzeyde apoptotik hücre tespit edildi ve istatistiksel açıdan anlamlı sonuçlar bulundu. *Kaspaz 3* geninde apoptoz oranının daha düşük olması dikkat çekmiştir.



KAYNAKLAR

1. K. Schilling, B. Bradford, D. Castelli, E. Dufour, J.F. Nash, W. Pape, S. Schulte, I. Tooley, J. van den Bosch, F. Schellauf, (2010) Human safety review of nano titanium dioxide and zinc oxide, Photochem. Photobiol. Sci. 9 495–509.
2. Appleton, J., ND. (n.d.). Arginine: (2016) Clinical Potential of a Semi-Essential Amino Acid. Retrieved from <http://www.altmedrev.com/publications/7/6/512.pdf>
3. Ma, X. & Wang, C. (2010). Fullerene Nanoparticles Affect the Fate and Uptake of Trichloroethylene in Phytoremediation Systems. Environmental Engineering Science, 27: p. 989-992
4. Xia, T., Kovochich, M., Liong, M., Madler I. Gilbert, B., Shi, H., Yeh, J., Zink, J., Nel, A. (2008). Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxidenanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. ACS Nano 2(10), 2121–2134.
5. Vanderiel, R., Jong, W. (2012). A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles. Nanotechnol. Sci. Appl. 5, 61–71.
6. Hanley C, Layne J, Punnoose A, et al. (2008) Preferential killing of cancer cells and activated human T cells using ZnO nanoparticles. Nanotechnology.19(29):295103
7. Smijs, T., Pavel, S. (2011). Titanium oxide and zinc oxide nanoparticles insunscreens: focus on their safety and effectiveness. J. Nanotechnol. Sci. Appl. 4,95–112.
8. Yang, H., Liu, C., Yang, D., Zhang, H., Xi, Z. (2009). Comparative study of cytotoxicity,oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: therole of particle size, shape and composition. J. Appl. Toxicol. 29 (1), 69–78.
9. Yuan, J., Chen, Y., Zha, H., Song, L., Li, C.Y., Li Xia, X., (2010). Determination, characterization and cytotoxicity on HELF cells of ZnO nanoparticles. ColloidsSurf. B Biointerfaces 76 (1), 145–150
10. Sharma, V., Anderson, D., Dhawan, A., (2011). Zinc oxide nanoparticles induceoxidative stress and genotoxicity in human liver cells (HepG2). J. Biomed.Nanotechnol. 7 (1), 98–99.
11. Pasupuleti, S., Alapati, S., Ganapathy, S., Anumolu, G., Pully, N., Prakhya, B. (2010). Toxicity of zinc oxide nanoparticles through oral route. Toxicol. Ind. Health 28(8), 675–686.
12. 13. Jachak, A., Lai, S., Hida, K., Suk, J., Markovic, N., Biswal, S., Breyse, P., Hanes, J.,(2012). Transport of metal oxide nanoparticles and single-walled carbonnanotubes in human mucus. Nanotoxicology 6, 614–622.
13. Li, C.H., Shen, C., Cheng, Y., Huang, S., Wu, C., Kao, C., Liao, J., Kang, J., (2012). Organdistribution, clearance and genotoxicity of oral administered zinc oxidenanoparticles in mice. Nanotoxicology 6 (7), 746–756.
14. H. Yang, C. Liu, D. Yang, H. Zhang, Z. Xi, (2009) Comparative study of cytotoxicity oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition, J. Appl. Toxicol. 29 69–78.
15. Jachak A, Lai SK, Hida K, Suk JS, Markovic N, Biswal S, Breyse PN and Hanes J. 2012 Transport of metal oxide nanoparticles and single-walled carbon nanotubes in human mucus. Nanotoxicology.; 6:614-22.
16. Li CH, Shen CC, Cheng YW, Huang SH, Wu CC, Kao CC, Liao JW and Kang JJ. 2012. Organ biodistribution, clearance, and genotoxicity of orally administered zinc oxide nanoparticles in mice. Nanotoxicology.;6:746-56.
17. Nair S, Sasidharan A, Divya Rani VV, Menon D, Manzoor K and Raina S. (2009). Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells. J Mater Sci Mater Med.; 20 Suppl 1:S235-41.
18. Kang T, Guan R, Chen X, Song Y, Jiang H and Zhao J. (2013) *In vitro* toxicity of different-sized ZnO nanoparticles in Caco-2 cells. Nanoscale Res Lett.; 8:496.
19. Albina, J. E., Caldwell, M. D., Henry, W. L., Jr., & Mills, C. D. (1989). Regulation of macrophage functions by L-arginine. Journal of experimental medicine, 169, 1021-1029.
20. Behl, C., Skutella, T., Lezoualc'h, F., Post, A., Widmann, M., Newton, C. J., et al. (1997). Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. Molecular Pharmacology, 51(4), 535-54
21. Ronald W. Dudek. (2016) Embriyoloji Birinci baskı. İstanbul Medikal Sağlık ve Yayıncılık. İstanbul

22. Prof.Dr. İ. Seçkin. A.Ş. Ertürkoğlu. M. Taşyürekli. O. Arda. F. Alkan. H. Oktar. (2008) Embriyoloji Ders Kitabı. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul
23. T. W. Sadler. (2017) Medikal Embriyoloji Onüçüncü Baskıdan Çeviri Palme Yayıncılık. Ankara
24. Gougeon, A. (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews*
25. Jarrel J, YoungLai E.V. Memahon A. (1987) Effects of ionizing radiation and pretreatment with luteinizing hormone-releasing hormone ethylamide on developing rat ovarian follicles. *Cancer Res* 47:5005-5008,
26. Gardner LP, Hiatt JL. (2000) *Color Textbook of Histology*. 3rd edition. pp 334-43, Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, USA, 334-59
27. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. (2003). *Histology a Text and Atlas*. 4th edition. pp 730-38, Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, USA, 727-742
28. Erdoğan D, Hatipoğlu MT, Görgün M, İlgaz C. (2007) *Özel Histoloji*. Hatipoğlu. 175-181,
29. Junqueira LC, Carneiro J. (2006) *Temel Histoloji* (Çev. Ed: Solakoğlu S, Aytekin Y) s. 449-458, Güneş Tıp Kitabevi, Ankara,
30. Devine PJ, Payne CM, McCuskey MK, Hoyer PB. (2000) Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. *Biol Reprod*. 65(5):1245- 52,.
31. Rodgers, R.J., Lavranos, .C., van Wezel, I.L., Irving-Rodgers, H.F., (1999). Development of the ovarian follicular epithelium. *Mol. Cell, Endocrinol*. 151(1-2), 171-179
32. Clarke, H.G., Hope, S.A., Byers, S., Rodgers, R.J., (2006) Formation of ovarian follicular fluid may be due to the osmotic potential of large glycosaminoglycans and proteoglycans. *Reproduction* 132 (1), 119-131
33. Rodgers, R.J., Irving-Rodgers, H.F., (2010) Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biol. Reprod*. 82 (6), 1021-1029
34. Şeftalioğlu A. (1998) *İnsan Embriyolojisi*. Ankara: Tıp&Teknik Yayıncılık;, 41-42, Ankara.
35. Tanyolaç A. (1999) *Özel Histoloji* Ankara. Yorum Yayıncılık;
36. Arıncı K, Elhan A. (1995) *Anatomi*. 1. Baskı, Güneş Kitabevi Ltd. Şti., Ankara
37. Ross HM, Kaye GI, Pawlina W. (2003) *Histology: A Text and Atlas*. 4. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA,; 726-757
38. Sadler T W. (2011) *Medikal Embriyoloji*. Başaklar C (Çev), 11.baskıdan çeviri.Ankara: Palme Yayıncılık; 246-247-33
39. Sadler TW. Langman (2005) *Medikal Embriyoloji*. Dokuzuncu Baskıdan Çeviri. Bölüm 1.
40. Carlson BM.(2009) *Human Embryology And Developmental Biolgy*. Fourth Edition. Chapter 2.
41. Schoenwolf C, Bleyl B, Brauer R, et al. (2009) *Larsen's Human Embryology*. Fourth Edition.. Chapter 1.
42. Eppig JJ, Wigglesworth, Pendola FL. (2002) The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *PNAS*.; 99(5): 2890- 2894.
43. Aytekin, Y. ve Solakoglu, S. (Ed). (2009). *Temel Histoloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri
44. Dalçık, H. ve Yıldırım, M. (Ed.). (2009). *Moore- Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri
45. Buzea C, Pacheco II, Robbie K. (2007) Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*.; 2: MR17-71.
46. Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. (2006) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect*. 2005; 113: 823-839.
47. Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. (2009) Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*.; 311:622-7.
48. Hoet PH, Bruske-Hohlfeld I, Salata OV. (2004). Nanoparticles - known and unknown health risks. *J Nanobiotechnology*.; 2: 12.
49. Nohynek GJ, Dufour EK. (2012) Nano-sized cosmetic formulations or solid nanoparticles in sunscreens: a risk to human health? *Arch Toxicol*.; 86: 1063-1075.
50. Weinberg H, Galyean A, Leopold M. (2011) Evaluating engineered nanoparticles in natural waters. *Trend Anal Chem*.; 30: 72-83.
51. Foldbjerg R, Olesen P, Hougaard M, Dang DA, Hoffmann HJ, Autrup H. (2009) PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicol Lett*.; 190: 156-162.

52. Ahamed M, Posgai R, Gorey TJ, Nielsen M, Hussain SM, Rowe JJ. (2010) Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Toxicol Appl Pharmacol.*; 242: 263- 269.
53. Li PW, Kuo TH, Chang JH, Yeh JM, Chan WH. (2010) Induction of cytotoxicity and apoptosis in mouse blastocysts by silver nanoparticles. *Toxicol Lett.*; 197: 82-87.
54. Lan Z, Yang WX. (2012) Nanoparticles and spermatogenesis: how do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood-testis barrier. *Nanomedicine.*; 7: 579-596.
55. Baghirov H, Karaman D, Viitala T, Duchanoy A, Lou YR, Mamaeva V, Pryazhnikov E, Khiroug L, de Lange Davies C, Sahlgren C, Rosenholm JM. (2016) Feasibility Study of the Permeability and Uptake of Mesoporous Silica Nanoparticles across the Blood-Brain Barrier. *PLoS One.*; 11: e0160705
56. Muoth C, Aengenheister L, Kucki M, Wick P, Buerki- Thurnherr T. (2016) Nanoparticle transport across the placental barrier: pushing the field forward! *Nanomedicine.*; 11: 941-957.
57. Kulvietis V, Zalgevicene V, Didziapetriene J, Rotomskis R. (2011) Transport of nanoparticles through the placental barrier. *The Tohoku journal of experimental medicine.*; 225: 225-234.
58. Li C, Taneda S, Taya K, Watanabe G, Li X, Fujitani Y, Tamie N, Suzuki AK. (2009) Effects of in utero exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on testicular function in immature male rats. *Toxicol Lett.*; 185: 1-8.
59. Li C, Li X, Suzuki AK, Zhang Y, Fujitani Y, Nagaoka K, Watanabe G, Taya K. (2013) Effects of exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on pregnancy in rats. *J Reprod Dev.*; 59: 145-150.
60. Jamnongjit M, Gill A, Hammes SR. (2005) Epidermal growth factor receptor signaling is required for normal ovarian steroidogenesis and oocyte maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*; 102: 16257-16262.
61. Jamnongjit M, Hammes SR. (2006) Ovarian steroids: the good, the bad, and the signals that raise them. *Cell Cycle.*; 5: 1178-1183.
62. Gao G, Ze Y, Li B, Zhao X, Zhang T, Sheng L, Hu R, Gui S, Sang X, Sun Q, Cheng J, Cheng Z, Wang L, et al (2012). Ovarian dysfunction and gene-expressed characteristics of female mice caused by long-term exposure to titanium dioxide nanoparticles. *J Hazard Mater.*; 243: 19-27.
63. Xu G, Lin S, Law WC, Roy I, Lin X, Mei S, Ma H, Chen S, Niu H, Wang X. (2012) The Invasion and Reproductive Toxicity of QDs-Transferrin Bioconjugates on Preantral Follicle *in vitro*. *Theranostics.*; 2: 734-745.
64. Hsueh AJ, Billig H, Tsafri A. (1994) Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev.*; 15: 707-724.
65. Wu G., Morris S., (1998), Arginine metabolism: Nitric oxide and beyond, *Biochemical Journal*, 336:1-17
66. Yoshida M, Kashiwagi K, Kawai G, Ishiama A, Igarashi K, Polyamine (2013) enhancement of the synthesis of adenylyl cyclase at the translational level and the consequential stimulation of the synthesis of the RNA polymerase sigma 28 subunit, *Journal of Biological Chemistry*, 16289-16295
67. Ema M, Okuda H, Gamo M, Honda K. (2017) A review of reproductive and developmental toxicity of silver nanoparticles in laboratory animals. *ReprodToxicol.*; 67:149–64. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.01.005>.
68. Gao G, Ze Y, Li B, Zhao X, Zhang T, Sheng L, Hu R, Gui S, Sang X, Sun Q, Cheng J, Cheng Z, Wang L, et al. (2012) Ovarian dysfunction and gene-expressed characteristics of female mice caused by long-term exposure to titanium dioxide nanoparticles. *J Hazard Mater.*; 243: 19-27
69. Bronte V., Zanovello P. (2005), Regulation of immune responses by L-arginine metabolism, *Nature Reviews of Immunology*, 5: 641-654
70. Brennan PA, Thomas GJ, Langdon JD, (2003), The role of nitric oxide in oral diseases, *Archives of Oral Biology*, 48: 93-100.
71. Bogdan, C., (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology* 2 (10): 907–916
72. Morris S., (2004), Recent advances in arginine metabolism, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 7: 45-51
73. Morris S., (2005) , Arginine metabolism in vascular biology and disease, *Vascular Medicine*, 10: S83-87

74. Singh R, Pervin S, Karimi A, Cederbaum S, Chaudhuri G, (2000), Arginase activity in human breast cancer cell lines: N-hydroxy-L-Arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA- MB48 cells, *Cancer Research*, 60: 3305-3312
75. Stuehr D.J., (2004), Enzymes of the L-Arginine to Nitric Oxide Pathway, *The Journal of Nutrition*, 134: 2748S-2751S
76. David A., (2004), Structure and Function of Arginases, *American Society for Nutritional Sciences*, 134: 2760S-2764S
77. Durante N., Johnson F., Johnson R. (2007), Arginase: A critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 34: 906-911
78. Grillo M., Colombatto S. (2004), Arginine revisited, *Amino Acids*, 26: 345-351
79. Gow A.J., Ischiropoulos H. (2001), Nitric oxide chemistry and cellular signaling. *Journal of Cellular Physiology*, 187: 277-282
80. Sengoku K, Takuma N, Horikawa M, Tsuchiya K, Komori H, Sharifa D, Tamate K, Ishikawa M (2001) Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development and trophoblast outgrowth *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, 58; 262-68.
81. Maul H, Longo M, Saade GR, Garfield RE (2003) Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. *Curr Pharma Des*, 9; 359-80.
82. Rosselli M, Dubey RK, Rosselli MA, Macas E, Fink D, Lauper U, Keller PJ, Imthurn B (1996) Identification of nitric oxide synthase in human and bovine oviduct. *Mol Hum Reprod*, 2; 607-12.
83. Norman JE, Cameron IT (1996) Nitric oxide in the human uterus. *Rev Reprod*, 1; 61-8.
84. Jaroszewski JJ, Skarzynski DJ, Okuda K (2001) Nitric oxide as a local regulator in the mammalian ovary. In: Miyamoto H., Manabe N. (Eds) *Reproductive Biotechnology: Reproductive Biotechnology Update and Its Related Physiology*. Elsevier, Tokyo.
85. Yamauchi J, Miyazaki T, Iwasaki S, Kishi I, Kuroshima M, Tei C, Yoshimura Y (1997) Effects of nitric oxide on ovulation and ovarian steroidogenesis and prostaglandin production in the rabbit. *Endocrinol*, 138, 3630-37.
86. Dong YL, Gangula PRR, Fong L, Yallampalli C (1999) Nitric oxide reverses prostaglandin-inhibition in ovarian progesterone secretion in rats. *Hum Reprod*, 14; 27-32.
87. Al-Hijji J, Larsson J, Batra S (2001) Effect of ovarian steroids on nitric oxide synthase in the rat uterus, cervix and vagina. *Life Science*, 69; 1133-42.
88. Ekerhovd E, Brännström M, Alexandersson M, Norström A (1997) Evidence for nitric oxide mediation of contractile activity in isolated strips of the human Fallopian tube. *Human Reprod*, 12; 301-05.
89. Rosselli M, Imthurn B, Macas E, Keller PJ, Dubey RK (1994) Endogenous nitric oxide modulates endothelin 1 induced contraction of bovine oviduct. *Biochem Biophysical Res Commun*, 201; 143-48.
90. Ulbrich SE, Rehfeld S, Bauersachs S, Wolf E, Rottmayer R, Hiendleder S, Vermehren M, Sinowatz F, Meyer HH, Einspanier R (2006) Region-specific expression of nitric oxide synthase in the bovine oviduct during the oestrous cycle and *in vitro*. *J Endocrinol*, 188; 205-13.
91. Gawronska B, Bodek G, Ziecik AJ (2000) Distribution of NADPH-diaphorase and nitric oxide synthase (NOS) in different regions of porcine oviduct during the estrous cycle. *J Histochem Cytochem*, 48; 867-75.
92. Lapointe J, Roy M, St-Pierre I, Kimmins S, Gauvreau D, MacLaren LA, Bilodeau JF (2006) Hormonal and Spatial Regulation of Nitric Oxide Synthases (NOS) (Neuronal NOS, Inducible NOS, and Endothelial NOS) in the Oviducts. *Endocrinol*, 147; 5600-10.
93. Cong-Cong Hou¹ and Jun-Quan Zhu¹ (2017) Nanoparticles and female reproductive system: how do nanoparticles affect oogenesis and embryonic development *Oncotarget*, , Vol. 8, (No. 65), pp: 109799-109817
94. Wenhua Song^{a,b,*}, Jinyang Zhang^b, Jing Guo^a, Jinhua Zhanga, Feng Ding^c, Liying Li^a, Zengtian Suna (2010) Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles *Toxicology Letters* 199: 389-397
95. Mahmoud Hosseini^{1*}, Masoume Pourganji², Fatimeh Khodabandehloo³, Mohammad Soukhtanloo⁴, Hoda Zabihi⁵ (2011) Protective Effect of L-Arginine against Oxidative Damage as a Possible Mechanism of its Beneficial Properties on Spatial Learning in Ovariectomized Rats <http://bcn.iuums.ac.ir/article-1-281-en.pdf>

96. Oba G, Aslan S, Kaymaz M. (2001) Gebelik ve siklus dönemlerinin belirlenmesi amacıyla ratlarda vajinal sitolojinin kullanılması. Ankara Üniv Vet Fak Derg.; 48:51- 57. 35.
97. Ramos SD, Lee JM, Peuler JD. (2001) An inexpensive meter to measure differences in electrical resistance in the rat vagina during the ovarian cycle. J. Appl. Physi-ol.; 91:667–670. 36. <http://oslovet.veths>.
98. Baker DEJ. (1979) Reproduction and breeding. In: Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH editors. The Laboratory Rat, Volume 1, New York: Academic Press;. p. 153–168
99. Gurgun, S.G., Erdoğan, D., Elmas, C., Kaplanoğlu, G.t. ve Ozer, C. (2013). Chemoprotective effect of ascorbic acid, α -tocopherol, and selenium on Cyclophosphamide-induced toxicity in the rat ovarium. Nutrition, 777-784.
100. Mirakhori, F., Zeynali, B.P. ve Shirmohammadian, A. (2013). Lithium induces follicular atresia in rat ovary through a GSK-3 β / β -catenin dependent mechanism. Molecular Reproduction and Development, 286-296.
101. Matsuda, F., Inoue, N., Mananbe, N. ve Ohkura, S. (2012). Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. Journal of Reproduction and Development, 44-50.
102. Medigović, I., Ristić, N., Trifunović, S., Manojlović-Stojanoski, M., Milošević, V., Zikić, D. ve Nestorović, N. (2012). Genistein affects ovarian folliculogenesis: A stereological study. Microscopy Research and Technique, 1691-1619
103. Quirk SM1, Cowan RG, Harman RM, Hu CL, Porter DA (2004) Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. J Anim Sci. ;82 E-Suppl:E40-52.
104. John L, Dr. Jennifer D, Dennis B, Mike S. (1995) Dynamics of follicular growth and atresia of large follicles during the ovarian cycle of the guinea pig: Fate of the degenerating follicles, a quantitative study <https://doi.org/10.1002/ar.1092430106>
105. Gougeon, A. (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. Endocrine Reviews, 121- 55.
106. Inoue, N., Matsuda, F., Goto, Y. ve Manabe, N. (2011). Role of cell-death ligand-receptor system of granulosa cells in selective follicular atresia in porcine ovary. Journal of Reproduction and Development, 169-175
107. Massimo de, F. (2010). Germ stem cells in the mammalian adult ovary: considerations by a fan of the primordial germ cells. Molecular Human Reproduction, 632-636.
108. Oba, G., Aslan, S. ve Kaymaz, M. (2001). Gebelik ve siklus dönemlerinin belirlenmesi amacıyla ratlarda vaginal sitolojinin kullanılması. Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 51-57.
109. Matsuda, F., Inoue, N., Mananbe, N. ve Ohkura, S. (2012). Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. Journal of Reproduction and Development, 44-50.
110. Sengupta, P. (2013). The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. International Journal of Preventive Medicine, 624–630.
111. Satoko, I., Hiroshi, W., Hidekazu, S., Masahiko, H. ve Akira, T. (2000). Elimination of atretic follicles from the mouse ovary: a TEM and immunohistochemical study in mice. Journal of Anatomy, 103-110.
112. Wang C, Hu X, Gao Y, Ji Y. (2015) ZnO nanoparticles treatment induces apoptosis by increasing intracellular ROS levels in LTEP-a-2 cells. Biomed Res Int.;2015:423287
113. Yu KN, Yoon TJ, Minai-Tehrani A, et al. (2013) Zinc oxide nanoparticle induced autophagic cell death and mitochondrial damage via reactiveoxygen species generation. Toxicol *In vitro*.;27(4):1187–1195.
114. Valdiglesias V, Costa C, Kiliç G, et al. (2013) Neuronal cytotoxicity and genotoxicity induced by zinc oxide nanoparticles. Environ Int.;55:92–100.
115. De Felici M, Barrios F. (2013) Seeking the origin of female germline stem cells in the mammalian ovary. Reproduction.; 146:R125–30. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0069>
116. Tilly JL. (1998) Molecular and genetic basis of normal and toxicant-induced apoptosis in female germ cells. Toxicol Lett.; 102-103:497–501. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(98\)00240-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(98)00240-9)
117. Zhao Y, Li L, Zhang PF, Shen W, Liu J, Yang FF, Liu HB, Hao ZH. (2015) Differential Regulation of Gene and Protein Expression by Zinc Oxide Nanoparticles in Hen's Ovarian Granulosa Cells: Specific Roles of Nanoparticles. PLoS One.; 10:e0140499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140499>.

118. Salvetti, N.R., Acosta, J.C., Gimeno, E.J., Muller, L.A., Mazzini, R.A., Taboada, A.F. ve ark. (2007). Estrogen receptors alpha and beta and progesterone receptors in 77 normal bovine ovarian follicles and cystic ovarian disease. *Veterinary Pathology*, 373-378
119. Alarifi S, Ali D, Alkahtani S, Verma A, Ahamed M, Ahmed M, Alhadlaq HA. (2013) Induction of oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in a malignant human skin melanoma cell line after exposure to zinc oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine.*; 8:983–93.<http://doi.org/10.2147/IJN.S42028>
120. Eray, K., Sinan, E., Yamaç, E., Rasih, Y., Yıldız, E. ve Orhan, Ö. (2000). Östradiol, östriol, östron ve progesteronun sıçan meme dokusu üzerine etkileri. *Ulusal Cerrahi Dergisi*, 335-342
121. Peluso JJ. (1992) Morphologic and physiologic features of the ovary. In: Mohr U, Dungworth DL, Capen CC, editors. *Pathobiology in the Aging Rat*, Volume 1, Washington D.C.: ILSI Press;. p. 337–349.
122. Smith MS, Freeman ME, Neili JD. (1975) The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: Prolactin, gonadotropin, and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrin.*; 96:219–226.
123. Drickamer LC. (1987) Determination of oestrous condition in female mice is dependent upon time of day. *J Reprod Fertil*; 79: 659-62.
124. Nelson SH, Steinsland OS, Wang Y, Yallampalli C, Dong YL, Sanchez JM (2000) Increased nitric oxide synthase activity and expression in the human uterine artery during pregnancy. *Circ Res*, 87; 406-11.
125. Van Buren GA, Yang D, Clark EC (1992) Estrogen-induced uterine vasodilatation is antagonized by L-nitroarginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Am J Obstet Gynecol*, 167; 828–33.
126. Dong YL, Gangula PRR, Fong L, Yallampalli C (1999) Nitric oxide reverses prostaglandin inhibition in ovarian progesterone secretion in rats. *Hum Reprod*, 14; 27-32.
127. Tajima KI, Orisaka M, Yata H, Goto K, Hosokawa K, Kotsuji F. (2006) Role of granulosa and theca cell interactions in ovarian follicular maturation. *Microsc Res Tech.* Jun; 69(6):450-8
128. Bahia Namavar J, Zahra M., and Mohamed Amin G. (2015) The potential role of granulosa cells in the maturation rate of immature human oocytes and embryo development: A co-culture study *Clin Exp Reprod Med. Sep*; 42(3): 111–117
129. Petros RA, DeSimone JM. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9:615–27. <https://doi.org/10.1038/nrd2591>.
130. Osmond MJ, McCall MJ. Zinc oxide nanoparticles in modern sunscreens: an analysis of potential exposure and hazard. *Nanotoxicology.* 2010; 4:15–41. <https://doi.org/10.3109/17435390903502028>.
131. Mitsube K, Mikuni M, Matousek M, Brannstrom M (1999) Effects of nitric oxide donor and nitric oxide synthase inhibitors on luteinizing hormone-induced ovulation in the ex-vivo perfused rat ovary. *Hum Reprod*, 14; 2537-43
132. Bonello N, McKie K, Jasper L, Ross AN, Brayborn E, Brannstrom M, Norman RJ (1996) Inhibition of nitric oxide: effects on interleukin-1 enhanced ovulation rate, steroid hormones and ovarian leukocyte distribution at ovulation in the rat. *Biol Reprod*, 54; 43645.
133. Vega M, Devoto L (1997) Autocrine/paracrine regulation of normal human corpus luteum development. *Semin Reprod Endocrinol*, 15; 353-62.
134. Jaroszewski JJ, Hansel W, Gawronska B, Okuda K, Skarzynski DJ (2000) The role of nitric oxide (NO) in the bovine corpus luteum (CL) function: *in vivo* and *in vitro* studies. *Int. Conf. on the Female Reproductive Tract*, 34, Frauenchiemsee, Germany.
135. Skarzynski DJ, Okuda K (2000) Different actions of noradrenaline and nitric oxide on the output of prostaglandins and progesterone in cultured bovine luteal cells. *Prostaglandins other Lipid Mediat*, 60; 35-47
136. Motta AB, Franchi AM, Gimeno MF (1997) Role of nitric oxide on uterine and ovarian prostaglandin synthesis during luteolysis in the rat. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 56; 265-69.
137. Calka J (2002) Nitric oxide synthase in the preoptic, supraoptic and tuberal nuclei of the porcine hypothalamus-distribution and colocalization with DBH, LHRH and estrogen receptor. *Dissertations and Monographs*, Warmia and Mazury University, Olsztyn, Poland.

138. Al-Hijji J, Larsson B, Batra S (2000) Nitric Oxide Synthase in the Rabbit Uterus and Vagina: Hormonal Regulation and Functional Significance. *Biol Reprod*, 62; 1387-92.



EKLER

EK 1. ETİK KURUL KARARI





T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



Sayı : 46418926-605.02
Konu : Etik Kurul Kararı (2018-05/01) Hk.

Dr. Öğr. Üyesi Tansel SAPMAZ
(SBÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı)

Yürütücüsü olduğunuz "*Rat overinde ZnO nanopartiküller ile oluşturulan hasarda, L arjinin ajanının etkisinin histolojik ve biyokimyasal olarak incelenmesi*" başlıklı bilimsel çalışma önerisi, SBÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 12.09.2018 tarih ve 2018-05/01 sayılı toplantısında görüşülerek, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde ve sunulan prosedürlere uygun olarak, 3 yıllık bir süre içerisinde gerçekleştirilmesinin etik açıdan "**uygun**" olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinize rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Sadrettin PENÇE
SBÜ-HADYEK Başkanı

EK 2. ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Fatima Efendic
Doğum Tarihi ve Yeri : 22.02.1991 - Srebrenica
E-posta : fatima.efendich@gmail.com
Uyruğu : Bosna Hersek
Yabancı dili : İngilizce, Boşnakca

ÖĞRENİM DURUMU:

- Lisans: Siyasi Bilimler (2010- 2013) Sarajevo Üniversitesi , Bosna Hersek
- Lisans: Moleküler Biyoloji ve Genetik (2012-2016) Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Türkiye
- Lisans: Shinshu Medical School, Matsumoto, MT, NAGANO, JAPAN (değişim programı)
- Yüksek Lisans: Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji (2017-) Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Türkiye

EĞİTİM

- Biyomühendislik ve genetik sempozyum Üsküdar Üniversitesi 2014
- Uluslararası adli tıp ve genetik sempozyum Ankara Üniversitesi, Ankara 2014
- Uluslararası Kök hücre konferansı, Gazi Üniversitesi Ankara , 2014
- DETAM İstanbul Üniversitesi: (Moleküler Tıp) 2013, 2016
- Politecnico di Torino Üniversitesi (İmmünoloji) İtalya, 2012
- Araştırma Eğitimi Embriyoloji ve Histoloji ABD Shinshu Medical University (Kök hücre araştırması) 2014-2015 Japonya
- İzmir yüksek teknoloji enstitüsü: İmmünoloji İzmir, 2015
- Kök hücre ABD, Cardiff Üniversitesi 2015
- Kanser kök hücre semineri Bologna Üniversitesi, 2016
- Stem cell educational research symposium Sapienza University of Rome, 2017