

**T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**4-VİNİLSİKLOHEKSEN DİEPOKSİD UYGULANAN  
SIÇANLARDA DEHİDROEPIANDROSTERON'UN  
OVARYUMLARDA UZUN DÖNEM ETKİLERİ**

**Dr. Mehmet Caner ÖZER**

**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**ESKİŞEHİR  
2010**

**T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**4-VİNİLSİKLOHEKSEN DİEPOKSİD UYGULANAN  
SIÇANLARDA DEHİDROEPIANDROSTERON'UN  
OVARYUMLARDA UZUN DÖNEM ETKİLERİ**

**Dr. Mehmet Caner ÖZER**

**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof.Dr.Erinç ARAL**

**ESKİŞEHİR  
2010**

## TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalında yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren sayın hocalarım Prof.Dr. Ergin AÇIKALIN'a, Prof.Dr. Cengiz BAYÇU'ya, Prof.Dr.Firdevs GÜRER'e, Prof.Dr.Erinç ARAL'a, Prof.Dr.Varol ŞAHİNTÜRK'e, Öğr.Gör.Dr. Dilek BURUKOĞLU'na, tez çalışmam konusunda bana yol gösteren ve desteğini esirgemeyen sayın hocam Hikmet HASSA'ya, bölümümüzde beraber çalıştığım arkadaşlarım Mustafa ÇELİK'e, Jale KARAASLAN'a, Huri ÇINAR'a ve Fatma YAZ'a, tezimin istatistiklerinin hazırlanmasında bana yardımcı olan Doç.Dr.Cengiz BAL'a ve tez çalışmam boyunca her zaman yanımda olan Dr.Mehmet KAYA'ya destekleri için teşekkür ederim.

## ÖZET

**Özer, M.C. 4-Vinilsikloheksen diepoksit uygulanan sıçanlarda dehidroepiandrosteron'un ovaryumlarda uzun dönem etkileri. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2010.** 4-vinilsikloheksen diepoksit (VCD) plastik sanayide, kömür ve sigara dumanında bulunur. VCD, fare ve sıçanlarda primordial ve primer foliküllerde apoptozu indükleyerek irregüler siklus, hormonal değişiklikler ve primordial ve primer folikül havuzunun tükenmesi sonrasında menopoza neden olur. Araştırmamızda VCD'nin ovotoksik etkisinin uzun dönem DHEA kullanımı ile folikül havuzu ve üreme fonksiyonlarında koruyucu olup olmadığını incelemeyi amaçladık. Çalışmamızda 28 günlük 40 adet Sprague-Dawley cinsi dişi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar, 55 gün boyunca dimetil sülfoksit (DMSO) (i.p. 200mg/100g) uygulanan kontrol grubu (n=10), 15 gün VCD (i.p. 160 mg/kg) uygulanan grup (n=10), 55 gün DHEA (i.p. 200mg/100g) uygulanan grup (n=10) ve 15 gün VCD (i.p. 160 mg/kg) ve 55 gün DHEA (i.p. 200mg/100g) uygulanan grup (n=10) olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Deney sonucunda derin anestezi altında servikal dislokasyon ile öldürülen hayvanların vücut ve organ ağırlıkları alınarak tartıldı ve intrakardiyak kan örneklerinde biyokimyasal analizleri (Östradiyol, FSH, AMH, inhibin B) yapıldı. Organlara uygun doku takip işlemleri yapılarak seri kesitleri alındı. 5 µm kalınlığında kesitlere H&E ile ve immünohistokimyasal boyalar (AMH, TUNEL, Kaspaz 3 ve AR) uygulandı. Bulgularımızda VCD'nin ovaryumlarda primordiyal ve primer folikül sayılarını azalttığı buna karşılık sıçanların siklusları henüz bozmadığı görüldü. DHEA uygulanmasının ise VCD'nin ovaryumlara verdiği hasarı apoptozu azaltarak kısmen koruduğu gözlemlendi. Ayrıca DHEA uygulanmasının ovaryum rezervinin göstergesi olan serum AMH düzeyini arttırdığı görüldü. Sonuçlarımıza göre DHEA kullanımında doz ve sürenin dikkatli ayarlanması gerektiğini düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: VCD, DHEA, ovaryum, sıçan, apoptoz

Destekleyen Kurumlar: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Fonu'nun 200811013 nolu projesi.

## ABSTRACT

**Özer M.C. Long term ovarian effects of Dehydroepiandrosterone on 4 Vinylcyclohexene diepoxide. applied rats .Eskisehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Medical Speciality Thesis in Department of Histology and Embryology, Eskisehir,2010.** 4 Vinylcyclohexene diepoxide is an industrial chemical that is found in plastic, coil and and cigarette smoke. VCD selectively destroys primordial and primary follicles of rats by apoptosis. Depletion of primordial follicles can cause hormonal changes, cycle irregularities and by the time menopause We aimed whether VCD induced depletion of follicle and hormonal changes could be reversed by using DHEA for long term. 28 days ages, 40-60 g, female Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups. Rats were injected with VCD intraperitoneally (ip) (160 mg/kg) for 15 days and DHEA ip (6 mg/100 gram body weight, dissolved in DMSO) for 55 days and VCD ip (160 mg/kg)–DHEA ip(6 mg/100 gram BW dissolved in DMSO) combination for 55 days. At the end of the study, rats were anaesthetized and sacrificed. Rats, their uterus and ovaries were weighed. Left ovarian tissue were taken and paraffin blocks were prepared with routine histological techniques. 5µm sections were taken and stained with H&E and immunohistochemical methods (TUNEL, Caspase-3 and AMH, AR).According to our findings VCD caused follicle depletion in primordial and primary follicles by apoptosis . However, rat cycles were not disturbed. DHEA can protect ovary by lowering apoptosis in these follicles. DHEA increased serum level of Anti müllerian hormone which is an ovarian reserve marker. According to our findings;we thought that DHEA should be used carefully and time and dosing, should be adjusted.

Keywords: Vinylcyclohexenediepoxide, Dehydroepiandrosterone, rat, apoptosis,

Supported by: Eskisehir Osmangazi University Scientific Research Commission,  
Project number: 200811013.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Ovaryuların Embriyolojisi	5
2.2. Ovaryumların Anatomisi	8
2.3. Ovaryumların Histolojisi	9
2.3.1. Granüloza hücreleri	11
2.3.2. Teka hücreleri	12
2.3.3. Ovaryum stroması	13
2.4. Ovaryum Foliküllerinin Gelişimi (Folikülogenezis)	13
2.4.1. Primordiyal foliküller	14
2.4.2. Primer foliküller	15
2.4.3. Sekonder foliküller	15
2.4.4. Antral foliküller	16
2.5. Foliküler Atrezi	17
2.6. Ovaryumlarda Apoptoz	18
2.6.1 Fetal Yaşamda Folikül Gelişimi ve Apoptoz	20
2.6.2. Erişkin Yaşamda Folikül Gelişimi ve Apoptoz	22
2.6.3. Ovaryum Foliküllerinde Negatif ve Pozitif Seleksiyon	23
2.7. Vinilsikloheksen Diepoksit (VCD)	23
2.8. Dehidroepiandrosteron (DHEA)	27
2.8.1. DHEA sekresyonu ve yaşlanma	27
2.8.2. DHEA Metabolizması ve Etki Mekanizması	28

2.8.3. DHEA Sentezinde rol alan enzimler	30
2.9. Antimüllerian Hormon (AMH)	31
2.9.1. AMH' nin Folikülogenezindeki Rolü	32
2.10. İnhibin	33
2.11. Androjen Reseptörü (AR)	37
2.12. Perimenopozal Dönem	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM	43
3.1 Kimyasal Maddeler ve Uygulamaları	43
3.2 Deney Grupları	43
3.3. Ovaryum ve Uterus Örneklerinin Değerlendirmeleri	44
3.4. Folikül Sayılarının Tespiti	44
3.5. Ovaryum için uygulanan doku takibi	45
3.6. Hematoksilin-Eozin yöntemi	45
3.7. TUNEL Yöntemi	46
3.7.1. Kullanılan kit	46
3.7.2. Yöntem	46
3.7.3. Apoptoz görülen hücre sayımı	48
3.8. Kaspaz-3 İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi	48
3.8.1. Kullanılan antikolar	48
3.8.2. Yöntem	48
3.9. Anti Müllerian Hormon İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi	49
3.9.1. Kullanılan antikolar	50
3.9.2. Yöntem	50
3.10. Androjen reseptör (AR) İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi	51
3.10.1. Kullanılan antikolar	51
3.10.2. Yöntem	51
3.11. ELISA	52
3.11.1. Anti-Mullerian Hormon Ölçüm Yöntemi	52
3.11.2. İnhibin-B Ölçüm Yöntemi	53
3.11.3. Östradiol Ölçümü	53
3.11.4. FSH Ölçümü	54
3.12. İstatistiksel Analiz	54

4. BULGULAR	56
4.1. Ağırlıklar	56
4.2. Folikül Sayıları ve Yüzdeleri	58
4.2.1. Folikül Sayıları	58
4.2.2. Folikül Yüzdeleri	62
4.3. Folikül Çapları	64
4.4. Tunel İmmunohistokimyasal Boyaması	65
4.5. Kaspaz 3 İmmunohistokimyasal Boyaması	66
4.6. Androjen Reseptör İmmunohistokimyasal Boyaması	71
4.7. AMH İmmunohistokimyasal Boyaması	75
4.8. Histolojik Değerlendirme	79
4.8.1. Hematoksilin ve Eozin Bulguları	79
4.9. İmmünohistokimya Bulguları	82
4.9.1. TUNEL bulguları	82
4.9.2. Kaspaz-3 Bulguları	82
4.9.3. Antimüllerian Hormon Bulguları	83
4.9.4. Androjen Reseptörü Bulguları	84
4.10. ELIZA	84
5. TARTIŞMA	112
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	142
KAYNAKLAR	147



## SİMGELER VE KISALTMALAR

AMH	Anti mülleriyan hormon
Apaf-1	Apoptosis protein aktive edici faktör-1
BAD	Bcl-2 antagonist of cell death
Bcl-2	B hücre/lenfoma ailesi 2
BMF-4	Bone morfogenez faktör 4
BMP-4	Bone morfogenez protein-4
BOD	Bcl-2 related ovariyen death agonist
BOK	Bcl-2 related ovariyen killer
CAD	Kaspaz aktive edici DNaz
CCC	Kumulus oosit kompleksi
DISC	Death inducing signaling kompleks
ERK	Ekstrasellüler sinyal regüle kinaz
FGF	Fibroblast growth faktör
FLIP	FLICE-inhibitör protein
FMP	Son menstrual periyod
FSH	Folikül stimulan hormon
GDF-9	Büyüme farklılaştırıcı faktör-9
GV	Germinal vezikül
hCG	İnsan kaynaklı gonadotropin
ICAD	Kaspaz aktive edici DNaz inhibitörü
ICE	İnterlökin-1 $\beta$ dönüştürücü enzim
JNK	c-jun N terminal kinaz
KL	Kit ligand
LIF	Lösemi inhibitör faktör
LH	Luteinize hormon
MAPK	Mitojen aktive protein kinaz
Mcl-1	induced myeloid leukemia cell differentiation protein
NAIP	Nötral apoptosis inhibitör protein
NGF	Sinir büyüme faktörü
NOBOX	Homeobox kodlayan genler

OMI	Oosit maturasyon inhibitörü
PGCs	Primordiyal germ hücreleri
PGH	Primordiyal germ hücreleri
PUMA	p53-upregulated modulator of apoptosis
SPO 11	Spondation protein homolog 11
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
TRAIL	Tümör nekroz faktör ilişkili apoptoz indükleyici ligand
XIAP	X-linked inhibitör of apoptosis
X <sup>2</sup>	Ki-kare

## ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. Ovaryumların embriyolojik gelişimi	6
2.2. Ovaryumların anatomik lokalizasyonu	9
2.3. Ovaryumun enine kesiti. Korteks ve medulla	10
2.4. Fetal ve postnatal yaşamda ovaryumlarda folikül gelişimi ve apoptoz	19
2.5. İnsan ve VCD uygulanmış farelerin üreme dönemlerindeki hormonların karşılaştırılması	27
2.6. İnsan yaşamı boyunca serum DHEAS düzeyleri	28
2.7. Postnatal fare overinde AMH' un aktivasyonu	33
2.8. Reprodüktif yaşam ve menopozal dönüşüm	40
4.1. Deneklere ait primordiyal folikül granüloza hücrelerinde kaspaz 3'ün deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	67
4.2. Deneklere ait primer folikül granüloza hücrelerinde kaspaz 3'ün deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	67
4.3. Deneklere ait sekonder folikül granüloza hücrelerinde kaspaz 3'ün deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	68
4.4. Deneklere ait sekonder folikül teka tabakası kaspaz 3'ün deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	69
4.5. Deneklere ait antral folikül granüloza tabakası kaspaz 3'ün deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	69
4.6. Deneklere ait korpus luteumlarda kaspaz 3'ün deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	70
4.7. Deneklere ait ovaryum stromasında kaspaz 3'ün deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	71
4.8. Deneklere ait primordiyal folikül AR boyanma yoğunluğunun deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	72
4.9. Deneklere ait primer folikül AR boyanma yoğunluğunun deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	73
4.10. Deneklere ait sekonder folikül AR boyanma yoğunluğunun deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	73
4.11. Deneklere ait antral folikül AR boyanma yoğunluğunun deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	74

4.12. Deneklere ait ovaryum stromasında AR boyanma yoğunluğunun deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	74
4.13. Deneklere ait korpus luteumlarda AR boyanma yoğunluğunun deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	75
4.14. Deneklere ait primordiyal folikül AMH boyanma yoğunluğunun deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	76
4.15. Deneklere ait primer folikül AMH boyanma yoğunluğunun deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	76
4.16. Deneklere ait sekonder folikül AMH boyanma yoğunluğunun deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	77
4.17. Deneklere ait antral folikül AMH boyanma yoğunluğunun deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	78
4.18. Deneklere ait korpus luteumların AMH boyanma yoğunluğunun deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	78
4.19. Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti	86
4.20. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde normal primer folikül	86
4.21. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitlerinde normal primordiyal folikül	87
4.22. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitlerinde normal sekonder folikül	87
4.23. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitlerinde normal antral folikül	88
4.24. VCD grubuna ait ovaryuma ait kesitte ovaryumun genel görünümü	88
4.25. VCD grubuna ait ovaryumuna ait kesitte dejenere primordiyal folikül	89
4.26. VCD grubuna ait ovaryumuna ait kesitte dejenere primordiyal foliküller	89
4.27. VCD grubuna ait ovaryumuna ait kesitte atreziye giden primordiyal folikül	90

4.28. VCD grubuna ait ovaryumuna ait kesitte dejenere primer foliküller	90
4.29. VCD grubuna ait ovaryum kesitinde atretik primordiyal foliküller	91
4.30. VCD grubuna ait ovaryum kesitinde dejenere primordiyal follikül ile primer folikül görülmektedir	91
4.31. DH grubuna ait ovaryum kesiti	92
4.32. DH grubuna ait ovaryum kesitinde normal primordiyal folliküller	92
4.33. DH grubuna ait ovaryum kesitinde normal primer folikül	93
4.34. DH grubuna ait ovaryum kesitinde kistik folikül	93
4.35. VDH grubuna ait ovaryum kesitinde normal primordiyal folikül ile eozinofilinin arttığı primordiyal folliküller	94
4.36. VDH grubuna ait ovaryum kesitinde normal primer folikül ve eozinofilinin arttığı primordiyal foliküller	94
4.37. VDH grubuna ait ovaryum kesitinde normal primer folikül	95
4.38. VDH grubuna ait ovaryum kesitinde normal primordiyal foliküller	95
4.39. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde normal primordiyal foliküller	96
4.40. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde TUNEL (+) hücreler	96
4.41. VCD grubuna ait ovaryum kesitinde primer folikülde TUNEL (+) hücreler	97
4.42. VCD grubuna ait ovaryum kesitinde antral folikülde TUNEL (+) hücreler	97
4.43. DH grubuna ait ovaryum kesitinde korpus luteumda TUNEL (+) hücreler	98
4.44. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde; normal sekonder folikül	98
4.45. VCD grubuna ait ovaryum kesitinde stromada kaspaz 3 (+) hücreler	99

4.46. VCD grubuna ait ovaryum kesitinde atretik folikülde kaspaz 3 (+) hücre	99
4.47. VCD grubuna ait ovaryum kesitinde antral folikülde kaspaz 3 (+) hücre	100
4.48. DH grubuna ait ovaryum kesitinde kaspaz 3 (+) hücreler	100
4.49. DH grubuna ait ovaryum kesitinde normal antral folikül	101
4.50. VDH grubuna ait ovaryum kesitinde antral folikülde kaspaz 3 (+) hücre	101
4.51. VDH grubuna ait ovaryum kesitinde stromada kaspaz 3 (+) hücre	102
4.52. VDH grubuna ait ovaryum kesitinde kistik folikülde kaspaz 3 (+) hücre	102
4.53. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde primer folikülde AMH (+) hücreler	103
4.54. VCD grubuna ait ovaryum kesitinde primer folikülde AMH (+) hücreler	103
4.55. DH grubuna ait ovaryum kesitinde antral folikülde AMH (+) hücreler	104
4.56. DH grubuna ait ovaryum kesitinde sekonder foliküllerde AMH (+) hücreler	104
4.57. VDH grubuna ait ovaryum kesitinde sekonder folikülde AMH (+) hücre	105
4.58. VDH grubuna ait ovaryum kesitinde; sekonder folikülde AMH (+) hücre	105
4.59. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde stromada AR (+) hücreler	106
4.60. VCD grubuna ait ovaryuyum kesitinde stromada, AR (+) hücreler	106
4.61. DH grubuna ait ovaryum kesitinde antral folikülde AR (+) hücreler	107
4.62. DH grubuna ait ovaryum kesitinde atretik folikülde AR (+) hücre	107

4.63. DH grubuna ait ovaryum kesitinde stromada AR (+) hücreler	108
4.64. DH grubuna ait ovaryum kesitinde kistik folikülde AR (+) hücreler	108
4.65. VDH grubuna ait ovaryum kesitinde; stromada AR (+) hücre	109
4.66. VDH grubuna ait ovaryum kesitinde kistik folikülde AR (+) hücre	109
4.67. VDH grubuna ait ovaryum kesitinde antral folikülde AR (+) hücre	110
4.68. VDH grubuna ait ovaryum kesitinde;antral folikülün AR (+) hücre	110
4.69. VDH grubuna ait ovaryum kesitinde stromada AR (+) hücre	111
4.70. VDH grubuna ait ovaryum kesitinde;stromada AR (+) hücre	111

**TABLULAR**

	Sayfa
4.1. Vücut ağırlıklarının deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	56
4.2. Deneklerin sağ ovaryum, sol ovaryum, uterus ve toplam ovaryum ağırlıklarının deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.	58
4.3. Deneklere ait toplam primordiyal folikül sayısı, normal primordiyal folikül sayısı ve atretik primordiyal folikül sayılarının deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	59
4.4. Deneklere ait toplam primer folikül sayısı, normal primer folikül sayısı ve atretik primer folikül sayılarının deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	60
4.5. Deneklere ait toplam sekonder ve toplam antral folikül ile korpus luteum ve folikül kisti sayılarının deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	62
4.6. Deneklere ait normal ve atretik primordiyal ve primer folikül yüzdelilerinin deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	64
4.7. Deneklere ait primordiyal ve primer foliküllerin çaplarının ve granüloza tabakası kalınlıklarının deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	64
4.8. Deneklere ait sekonder ve antral folikül çaplarının, teka ve granüloza tabaka kalınlığının deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	65
4.9. Deneklere ait TUNEL (+) hücre sayılarının deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	66
4.10. Deney ve kontrol gruplarına ait serumdaki FSH, E2, AMH ve İnhibin düzeylerinin karşılaştırılması	85



## 1. GİRİŞ

Vinilsikloheksen diepoksit (VCD), böcek ilacı, lastik, kauçuk ve plastik sanayisinde üretilen maddelerin 1,3-bütadian dimerizasyon formu olan 4-vinilsikloheksen (VCH)'in metabolitidir. **(116, 120, 195,196).**

VCD ve VCH ovaryumlara toksik etki yapmaktadırlar. Bu iki kimyasaldan VCH, sadece farelerin ovaryumunda, VCD ise hem fare hem de sıçanların ovaryumlarına toksiktir. VCD, primer ve primordiyal folikülleri parçalayarak yetişkin sıçanlarda prematür over yetmezliğine sebep olur. VCD direkt olarak ovaryumlara toksiktir. **(89, 114, 234, 242)**

On gün süresince VCD uygulanan sıçanlarda ışık mikroskobu düzeyinde apoptozun morfolojik kriterleri görülür. Kontrol ovaryumları ile karşılaştırıldığında VCD uygulanan sıçanlarda apoptoz işaretleri artar. Bu işaretler; primordiyal ve primer foliküllerdeki oositlerin membranlarında düzensizleşme, nükleus zarına yakın kromatin yoğunlaşması, oosit etrafındaki granüloza hücrelerinde düzensiz dağılmalar, oosit ve granüloza hücreleri arasındaki kontakt kaybıdır. Bazı granüloza hücrelerinde de nükleus zarı boyunca kromatin birikmesi olmaktadır. Preantral foliküllerin oositlerinde ve granüloza hücrelerinde büzüşme olur. **(136, 239)**

VCD sıçan ve fare primordiyal ve primer foliküllerindeki oosit sayısını selektif olarak azaltır. VCD'nin neden olduğu hücre ölümü ve folikül kaybı apoptoz yoluyla gerçekleşir **(114, 175, 239)**. Kullanılan biyokimyasal, moleküler ve morfolojik yaklaşımlar, bu yolun daha çok primordiyal ve primer foliküller üzerine etkili olduğunu düşündürmektedir. Apoptozun artması ile ilişkili olduğu bilinen olayları VCD de artırmaktadır **(13, 14, 16)**.

Dehidroepiandrosteron (DHEA) ve onun sülfat esteri DHEAS, insan adrenal korteksinden salgılanan ana hormondur. Fizyolojik rolleri henüz anlaşılamamıştır. DHEA diğer adrenal steroid hormonlardan farklı olarak yaşlanmayla beraber azalmaktadır.

İnsanlardaki bütün steroid hormonların sentezinde DHEA kullanılır. DHEA, 3 $\beta$  hidroksisteroid dehidrogenaz aktivitesiyle androstenediona, 17 $\beta$  hidroksisteroid dehidrogenaz aktivitesi ile testesterona ve aromataz aktivitesiyle östradiola çevrilir. DHEAS, DHEA'nın kanda dolaşan hidrofilik formudur. Sadece lipofilik form olan

DHEA hücre içinde androjen ve östrojenlere çevrilebilir. Pre ve postmenopoz döneminde kadınlarda sentezlenen östrojenlerin %50-100'ü periferik hedef dokularda DHEA'dan sentezlenir.

Fare ve sıçan adrenal bezinde 17 alfa hidroksilaz enzimi yoktur. Fare ve sıçanlarda seks steroidlerinin sekresyonu gonadlarda olmakta ve DHEA gonadlar tarafından üretilmektedir. Adrenal bez androjen üretimine katkıda bulunmamaktadır. **(264)**

Dışarıdan uygulanan DHEA ovaryumlarda kist ve atretik folikül gelişimine neden olur. DHEA uygulanmasının ovaryum steroidogenezisini arttırmaktadır. **(166)** DHEA uygulayarak ovaryumlarda polikistik ovaryum modeli oluşturulabilir.

DHEA uygulanan inmatür sıçanlarda overlerde kistik değişiklikler, erken ovulasyon, asiklisme ve sonrasında anovulasyon olmaktadır. **(148, 149)** Düzenli siklusları olan erişkin sıçanlara DHEA uygulanması sonrasında ovaryumlarda kistik değişiklikler gözlenir. **(275)**

Antimüllerian hormon (AMH) TGF- $\beta$  ailesinin bir üyesidir. AMH, folikülogenezde önemli role sahiptir. Primordial foliküllerin toplanması ve fertilitenin sağlanması için gereklidir. AMH, primordial folikül toplanma evresinde ve FSH bağımlı dominant folikül seçiminde inhibitör role sahiptir. AMH, ovaryumlardaki fonksiyonel rolü dışında ovaryum rezervini belirlemede de önemlidir. İnsanda primer foliküllerden küçük antral foliküllere doğru geçişte AMH eksprese edilir. Preovulatuvar büyük antral foliküllerde, AMH ekspresyonu çok kısıtlı ya da yoktur. **(72)**.

Büyüyen foliküllerde üretilen AMH parakrin etki ile primordial foliküllerin rekrutmentini ve sonrasında büyümelerini engeller. Buna ek olarak neonatal fare ovaryum kültürleri AMH'ye maruz bırakıldıklarında daha az büyüyen folikül olur. **(72)** AMH insanda büyüyen folikül havuzunun bir göstergesi olarak kullanılabilir. **(9)** AMH bu havuzun boyutunu, hem büyümeyi (rekrutment) hem de azalmasını (seleksiyon) inhibe ederek etkileyebilir.

Inhibinler (inhibin A, inhibin B), ovaryum granuloza, intertisyel, teka hücreleri, korpus luteum ve testisin Sertoli hücreleri tarafından üretilirler. Hipofiz kaynaklı gonodotropin sekresyonunu negatif feedback mekanizmayla baskırlar. Inhibinler, ovaryumlarda parakrin faktörler olarak etki gösterirler. **(283)**

Ovaryumdaki inhibitörler teka hücrelerinden androjen üretimini artırırlar. Foliküler gelişim sırasında granüloza hücrelerinde artarak üretilen ve antral sıvıda biriken inhibitör, komşu teka hücre tabakasında LH ile indüklenen androjen sentezini pozitif yönde etkileyebilir. **(214)** Perimenopozal hastalarda bazal FSH artışı ve E2 artışı olmaktadır. Bu değişikliklerin olmasından önce inhibitör B düzeylerinde düşüklük olur. **(207)**

Androjenler steroid hormonlardır. Bütün androjenler için tek bir reseptör vardır. Bu reseptör en yüksek affinite ile testesteron ve dihidrotestesterona bağlanır **(298)**. Androstenadion, östradiol ve progesteron gibi diğer androjenler ise reseptöre testesterona göre daha düşük afiniteye sahiptirler

Sıçanlarda yapılan çalışmalarda androjen reseptörü (AR) immun reaktivitesi primer, sekonder, matür foliküllerin granüloza hücrelerinin nükleuslarında gösterilmiştir. Primordial foliküller ve korpus luteumlarda gösterilememiştir. İnterstisyel hücrelerde dağılmış şekilde immunreaktivite gösterilmiştir.

Perimenopozal dönemde luteal fonksiyonların baskılanması sonrasında serum inhibitör A düzeylerinde de düşüklük olur. **(48, 158)** Menopoz sonrasında inhibitör A ve inhibitör B konsantrasyonları saptanamayacak düzeye düşer. **(213)**

Perimenopoz, menopozun başlangıcına yakın endokrinolojik, biyolojik ve klinik özellikler taşıdığından, menopozdan hemen önceki ve menopozdan sonraki ilk yıldır. Menopozal dönüşüm, menstrual düzensizliğin arttığı son menstrual periyod (FMP) dan önceki zamandır. Menstruel düzensizlik, perimenopozal geçiş olarak adlandırılan objektif olarak tanımda kullanılabilen tek belirteçtir. Menopoz ovaryum aktivitelerinin kaybını takip eden dönemde menstruasyonun tamamen kesildiği noktadır.

Menopozal dönüşüm, ovaryum primordiyal folikül sayısında azalma olduğunda meydana gelir. Dolaşımda AMH'deki major azalma bunu yansıtır. Dönüşümün başlamasının en önemli klinik özelliği siklus düzensizliğidir. İnhibitör B, FSH salınımının düzenlenmesinde anahtar rol oynar. **(33)** Oositlerin sayısında kademeli azalma ve ovaryum korteksinin incilmesi ile ovaryumdaki hilus ve medulladaki kan damarlarında sklerozis ve sonucunda oksijenasyonda azalma meydana gelir. Menopoz oluşmasıyla ovaryumlar ince, buruşuk ve çok küçük hale gelir.**(42)**

İnsan ovaryum yapısı yaşla beraber değişmektedir. Menopozla beraber ovaryumlar interstisyel hücrelerden ve stromadan zengin bir dokuya dönüşür. Dolayısıyla menopoz sonrası oluşan ovaryum dokusu androjen üretmeye devam eder **(2)**. Menopoz sonrası ovaryum volümü büyük oranda azalır. Menopozda ovaryum folikül içermez ve fibröz bir bağ doku yapısındadır. **(30)**

Kadınlarda ortalama menopoz yaşı 51 dir. Yaşamının ortalama olarak 70 yıl olduğu düşünülecek olursa; bir kadın hayatının neredeyse üçte biri menopozda geçmektedir. Bir çok kadın çeşitli kariyer kaygılarından dolayı çocuk sahibi olmayı ertelemekte, ovaryum yaşlanması sorunuyla karşı karşıya kalmaktadır. İnsan yaşamının uzaması nedeniyle menopozlu yıllarda geçirilen süre daha da önem kazanmaktadır. Kadınlar sınırlı sayıda küçük folikül havuzu ile beraber doğarlar. Bu havuzu direkt olarak etkileyecek herhangi bir etki erken menopoza neden olmaktadır.

Folikül gelişimi ve farklılaşması kompleks bir süreçtir. İlk basamakların gonadotropinlerden bağımsız olarak ilerlediğine inanılır. Daha sonraki dönemler ve folikülerin seçimi FSH'ya oldukça bağımlı olarak devam eder. Bu süreçte iki ana basamak diğerlerine göre daha önemli görülür. Bu basamaklar ilk rekrutment ve büyüyen foliküllerin atreziden kurtulduğu siklik rekrutment dönemidir. Primordial hücre rekrutmenti folikül havuzunun büyüklüğüyle uyumludur ve yaşla azalır.

Araştırmamızda sıçanlara ovotoksik olduğu bilinen yüksek doz VCD uygulayarak foliküllerdeki etki ile DHEA'nın uzun dönem uygulanmasının ovaryumlardaki folikül havuzunun korunmasındaki rolünü incelemeyi amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Ovaryumların Embriyolojisi:

Erkek ve dişi morfolojik karakteristikleri, embriyonik 7. haftaya kadar gelişime başlamazlar. Genital sistem erken dönemde her iki cinstede birbirine benzer, bu nedenle genital sistemin gelişiminin başlangıç dönemine, seksüel gelişimin farklanmamış safhası adı verilir. **(189)**

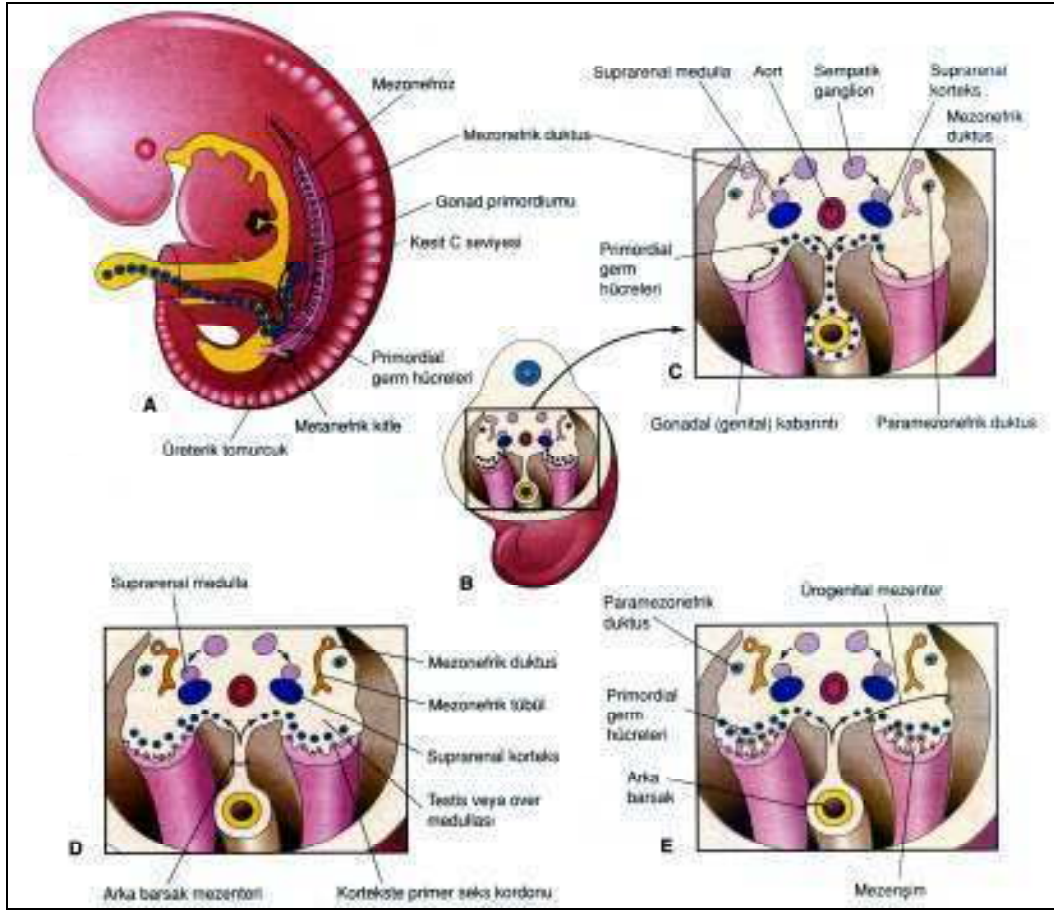
Gonadlar üç kaynaktan köken alırlar (**Şekil 2.1**)

1. Posterior abdominal duvarı döşeyen sölom epiteli (intermediyer mezodermin ürogenital plağından gelişir)
2. Altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu)
3. Primordiyal germ hücreleri (PGH)

Gonadların gelişimi 5. haftada gözlenmeye başlar. Erken dönemde mezonefrozun medialinde, mezotelde bir kalınlaşma meydana gelir. Bu epitelin ve altındaki mezenşimin proliferasyonu ile mezonefrozun medialinde bir kabarıklık - gonadal kabartı- oluşur. Kalınlaşmış mezotel primordiyal germ hücrelerini bölgeye çeken TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) ailesinden bir kemotaktik faktör salgılar ve aynı anda bu hücrelerin çoğalmasını uyarır. PGH'lerinin primitif gonadlara ulaşmasından hemen önce genital kabartının epiteli proliferer olur ve epitel hücreleri altındaki mezenşimin içine gömülür. Bu yapılar primer cinsiyet kordonları (gonadal kordonlar) adı verilen düzensiz şekilli yapıları oluşturur. Parmak şeklindeki epitel kordonlar (gonadal kordonlar) altındaki mezenşim içerisine doğru kısa sürede büyürler. Farklanmamış gonad bu aşamada dışta korteks ve içte medulladan oluşmaktadır. Eğer embriyo XX cinsiyet kromozom kompleksine sahip ise, farklanmamış gonadın korteksi ovaryuma farklılaşırken medullası ise geriler. **(189)**

PGH, testis ve ovaryumlar da bulunan yetişkin gametlerin embriyonik öncülleridir. Büyük, yuvarlak şekilli, motil ve 15-20  $\mu\text{m}$  çapında olan hücrelerdir. Nükleusları ekzantrik yerleşim gösterir ve kromatinleri belirgin haldedir, nükleoplazma eşit miktarda dağılmış olup bir veya iki adet büyük nükleolus içerir. PGH büyük mitokondrilere ve çok sayıda ribozomlara sahiptir. Golgi aygıtına ait veziküller ve endoplazmik retikulum sisternaları nadir olarak bulunur. Bunlarla birlikte glikojen partikülleri ve lipit damlacıkları insan PGH'lerin sitoplazmalarında

yaygın olarak bulunur. Glikojen partikülleri ve lipit damlacıkları PGH'lerinin göçü esnasında enerji kaynağı olarak kullanılır. PGH'leri dördüncü hafta başında vitellus kesesi duvarında, allantoisin başlangıç yerine yakın, endoderm hücreleri arasında ortaya çıkarlar. Sayıları yaklaşık 100 adettir. Embriyonun katlanmaları sırasında, vitellus kesesinin dorsal parçası embriyo içerisine dahil olur. Katlanma ile beraber primordiyal germ hücreleri, arka barsağın dorsal mezenteri boyunca gonadal kabartılara göç ederler. PGH'lerin köken aldıkları yerden gonadlara doğru göç ederken izledikleri yol hala tam olarak anlaşılamamıştır. Uzun zamandır gelişen gonadların germ hücrelerine karşı kemotaktik bir çekim gücü oluşturduğu tahmin edilir. (40, 68, 169, 192, 202, 211, 216)



Şekil 2.1. Ovaryumların embriyolojik gelişimi Moor'dan (189) alınmıştır.

PGH, göç esnasında bölünerek çoğalırlar ve ovaryuma ulaştıklarında yaklaşık olarak sayıları 1000'e ulaşır. Altıncı haftada primordiyal germ hücreleri mezenşim hücreleri arasına katılırlar ve gonadal kordonlara dahil olurlar. Primordiyal germ

hücrelerinin göçü, stella, fragilis genleri ve BMP-4 (kemik morfogenezik protein-4) tarafından düzenlenmektedir. **(36, 68, 189, 177, 202, 226, 231)**

Dişi embriyolarda gonadal gelişim daha yavaş olur. Onuncu haftaya kadar, ovaryumlar histolojik olarak ayırt edilemezler. Gonadal kordonlar, belirgin değildirler, medulla içine doğru sokulurlar ve rudimenter bir yapı olan rete ovarii'yi oluştururlar. Rete ovarii ve gonadal kordonlar normalde dejenerer ve kaybolurlar. Kortikal kordonlar erken fetal dönemde ovaryum yüzey epitelinden köken alarak altta bulunan mezenşim içerisine doğru girerler. Bu epitel mezotelden gelişmektedir. Kortikal kordonların boyutları arttığında, primordiyal germ hücreleri aralarına girer. Yaklaşık 16. haftada, bu kordonlar izole hücre kümelerine (primordiyal foliküller) parçalanırlar. Oluşan foliküllerin her biri, primordiyal germ hücrelerinden köken alan bir oogonyum ve onu saran, yüzey epitelinden köken alan, tek sıralı yassılaştırmış folikül hücrelerini içerir. Fetal yaşam sırasında oogonyumlarda oluşan aktif mitoz sonucu, binlerce primordiyal folikül meydana gelir. **(189)**

Oosit, ovaryumlarda gelişimini tamamlar ve insanda bulunan en büyük hücredir. Yuvarlak biçimli, çapı yaklaşık 120-200 µm arasında olan hareketsiz bir hücredir. Oosit, tuba uterinadan uterusu doğru lümendeki sıvı akıntısı ve epitellerdeki silyalar yardımı ile kendi eksenini etrafında veya yuvarlanmalar ile yol alır. Oositin nükleusu hücre şekline uygun olarak yuvarlak ve merkezde bulunur. Kromatin ağı nükleusun her tarafına eşit miktarda dağılmıştır ve gevşek bir yapı gösterdiğinden açık renkte boyanır. Oosit sitoplazmasına aynı zamanda ooplazma adı da verilir. En önemli özelliği paraplazma denilen besin maddelerinden zengin olmasıdır. Belli başlı besin maddeleri protein, lipid, yağ, karbonhidrat, mineraller ve vitaminlerdir. **(19, 23, 62, 135)**

Primer oosit ilk mayoz bölünmesine doğumdan önce başlar ancak profaz aşaması puberteye kadar tamamlanamaz. Bu aşamada oogonyumlar germ kordonlarının epitelial hücrelerinden meydana gelen tek katlı folikül epiteli tarafından sarılır. Primer oositi çevreleyen folikül hücrelerinin birinci mayozu profazda tutan bir faktör olan oosit maturasyon inhibitörü (OMI) adındaki bir maddeyi salgılayarak oositin mayoz bölünme sürecini durdurduğu düşünülür. Sölom epiteli ovaryumda germinal epitele ve altındaki bağ dokusu ise tunika albugineaaya farklılaşır. **(5, 18, 36, 49)**

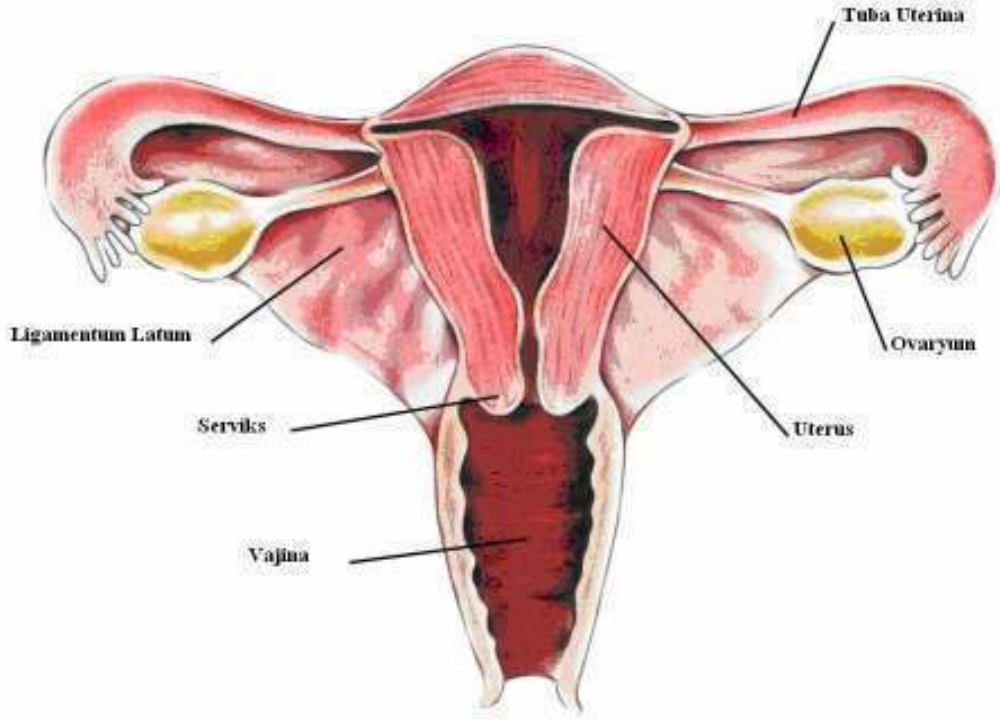
Postnatal (doğum sonrası) dönemde oogonyum meydana gelmez. Doğumdan önce büyük bir bölümü dejenere olsa da, doğumdan sonra 2 milyon civarında primer oosit kalır. Pubertede ovaryumlarda profaz aşamasında bekleyen primer oositin boyutları artar ve birinci mayoz bölünmesini tamamlar. Ancak, sitoplazma eşit olarak bölünmez ve oluşan sekonder oosit yaklaşık olarak bütün sitoplazmayı alırken I. kutup cisimciğine ise çok az miktarda sitoplazma kalır. I. kutup cisimciği kısa süre içinde dejenere olur. **(68, 104, 189, 226 231,)**

Ovulasyondan sonra sekonder oosit ikinci mayoz bölünmeye girer, ama bölünme sadece metafaza kadar ilerler ve bu aşamada spermi bekler. Eğer bir sperm sekonder oositin içine girerse, ikinci mayoz bölünme tamamlanır ve yine sitoplazmanın çoğu bir hücreye, fertilize olmuş oosite veya olgun oosite geçer. Daha az sitoplazmaya sahip olan hücre (II. kutup cisimciği) kısa sürede dejenere olur, II. kutup cisimciği atıldığında oositin olgunlaşması tamamlanır. **(68, 104, 189, 226 231,)**

## **2.2. Ovaryumların Anatomisi**

Ovaryumlar, uterusun her iki tarafında lateral pelvik duvarlara yakın konumda fossa ovarica içinde yerleşen, badem şekilli, yaklaşık olarak 3-8 gr ağırlığında, 3-5 cm uzunlukta, 1.5-3 cm genişlikte ve 1-1,5 cm kalınlıktadırlar. Ovaryumların ön kısımlarında kan damarlarının ve sinirlerin girdiği hilus adı verilen bölge bulunur. Mezovaryum (posterior), kan damarlarını ovaryumlara ileten bir periton kıvrımı olup ovaryumu uterusun yan kenarlarından uzanan ligamente (ligamentum latum) bağlar. Ovaryum superiorunda yer alan ligament (ligamentum suspensorium) ile pelvik duvara bağlıdır. Bu ligament ovaryuma ait damar ve sinirleri taşır. Ovaryum inferiorunda da ayrı bir ligament (ligamentum ovarii) ile uterusu bağlıdır. Bu ligament pelvis tabanında gelişen gonada bağlanan embriyonik fibröz kord olan gubernakulumun artığıdır. Puberteden önce ovaryum yüzeyi düzgündür. Fakat reproduktif yaşamda tekrarlayan ovulasyonlar nedeni ile düzensiz yapı ve artan skarlar oluşur. Postmenopozal dönemde, ovaryumun boyutu reproduktif dönemin dörtde birine düşer. **(5, 59, 224) (Şekil-2.2)**





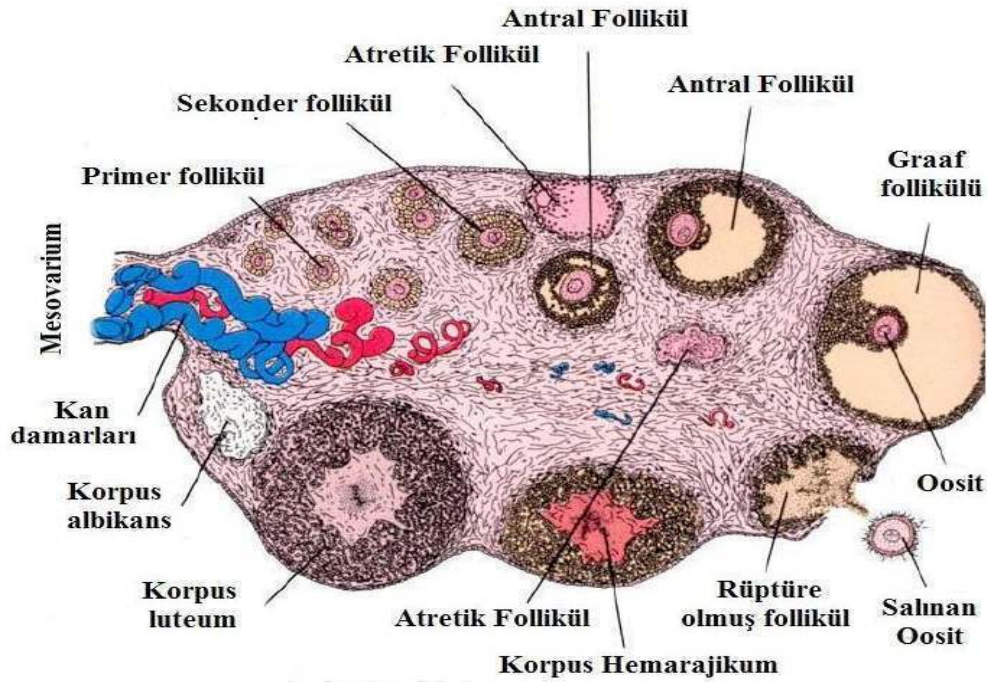
**Şekil 2.2:** Ovaryumların anatomik lokalizasyonu (301)

### 2.3. Ovaryumların Histolojisi

Ovaryum mezotelyumun devamı olan tek katlı kübik ve bazı bölümlerde yer yer yassı hücrelerden oluşan ovayum yüzey epiteli ile örtülüdür. Yüzey epitelinin altında, ovaryuma beyazımsı rengini veren ve tunika albuginea olarak adlandırılan sıkı bağ dokusu tabakası bulunur. Tunika albugineanın altında, oosit içeren foliküllerin bulunduğu korteks bölümü ile iç kısımda gevşek bağ dokusu içinde zengin bir damar yatağı içeren medulla bölümleri vardır. (134, 206, 224) Histolojik özellikleri birbirinden farklı olan bu iki bölüm arasında, keskin bir sınır bulunmaz. Genç bireylerin ovaryumlarında bu iki kısım kolayca ayrılabilirken daha ileri ki yaşlarda pek fark edilemez. (79, 81, 84, 95, 134)

Ovaryum korteksinde çeşitli gelişim aşamalarında olan foliküller bulunur. Puberteden önce kortekste sadece primordiyal foliküller, puberteden sonra primer, sekonder ve antral foliküller bulunur. Seksüel olgunluk döneminde bu foliküllerden başka korpus luteum ve atretik foliküller bulunur. Menapoz döneminde ise foliküllerin sayısı oldukça azalır. (82, 135, 235, 241) (Şekil 2.3)

Ovaryum medullası gevşek fibroelastik bağ dokusu yapısındadır. Medullada kollajen lif demetleri, elastik lif ağları, büyük kan damarları, lenf damarları, sinir demetleri ve çeşitli yönlere uzanan düz kas lifleri bulunur. Kortekse göre elastik ve kollajen liflerin sayısı fazladır. Bu yapıların yanı sıra medullada interstisyel ve hilus hücrelerine de rastlanır. Foliküllerin atrezi olmasından sonra teka interna hücreleri tek tek ya da gruplar halinde kalırlar ve interstisyel hücreler ya da bezler oluşur. İnsanda menstruasyon öncesi bazı interstisyel hücreler östrojen salgılar. Bazı türlerde ise progesteron salgılar. İlk menstruasyon siklusunda interstisyel hücrelerin çoğunluğu involusyona uğrar ve fonksiyonları azalır. Hilus hücreleri, testisin Leydig hücrelerine benzer organel yapısına sahip olup, lipitçe zengindir ve hücre içinde Reinke kristallerine benzer yapılar bulunur. Hilus hücreleri steroid hormon olarak androjen salgırlar. (Şekil 2.3) (79, 82, 84, 134, 135, 241)



Şekil 2.3. Ovaryumun enine kesiti. korteks ve medulla (224)

### 2.3.1. Granüloza hücreleri

Granüloza hücreleri, olgunlaşmakta olan ve olgunlaşmış foliküllerde 5-7 µm çaplı polihedral hücrelerdir. (1) Rete ovariden (181) mi yoksa yüzey epitelinden (98) mi geliştiği tartışmalıdır. Bazal membrana tutunan hücreler sıklıkla prizmatik şekillidir ve hücre sınırları belirsizdir. Küçük yuvarlak veya oval şekilli hiperkromatik nükleusları vardır. Granüloza hücreleri direkt kan akımına sahip değildir. Vaskülarize teka katmanından bir bazal lamina ile ayrılmışlardır. Bazal lamina relatif bir folikül bariyeri oluşturarak lökosit ve büyük molekül ağırlıklı maddelerin foliküle girmesine engel olur. Kan akımının olmaması komşu granüloza hücreleri arasında ve oositle granüloza hücreleri arası intersellüler iletişim varlığını gerekli kılar. Herhangi bir evredeki foliküllerin granüloza hücreleri arasında zonula adherensler ile neksuz ve desmozomlar vardır. Granüloza hücrelerindeki mitotik figürler genellikle matür foliküllerde çok sayıdadır. Bunların sayısı ovulasyondan önce azalır. Ovulasyondan birkaç saat önce luteinizasyon başlayana kadar sitoplazmik lipidler yoktur. Primer, sekonder ve antral foliküllerin granüloza hücrelerinin sitoplazmaları, sitokeratin, vimentin ve desmoplakin için immünreaktifdir.

Olgunlaşmakta olan folikülde granüloza hücrelerinin sitoplazmalarındaki lamellar kristal mitokondriyonlar, granüllü ER, serbest ribozomlar ve golgi cisimleri yavaş yavaş çoğalırlar.

Granüloza hücreleri buldukları yere bağlı olarak, mural granüloza hücreleri, antral granüloza hücreleri ve kumulus granüloza hücreleri olmak üzere farklı fenotipler gösterirler. Mural granüloza hücreleri, antral folikülde yüksek 3 β hidroksisteroid dehidrogenaz ve aromataz aktivitesi göstererek en büyük steroidojenik aktiviteyi gösterirler ve preovulatuvar folikülde en fazla LH reseptörüne sahiptirler. Antruma yaklaştıkça granüloza hücrelerinde steroidojenik aktivite azalırken mitotik aktivite artar. Ovulasyon esnasında oosit ile birlikte salınan kumulus hücreleri aromataz ekspres etmezler ve LH reseptör ve LH ya cevap kapasiteleri mural kompartmanlara oranla daha düşüktür. (43, 52, 77)

### 2.3.2. Teka hücreleri

Granüloza hücrelerinin tersine teka hücreleri, fetal yaşamdan menopozun sonuna değin, gelişen foliküllerin periferinde ve stromal hücrelerden devamlı olarak farklılaşırlar. Teka ve interstisyel hücreler, stromal kompartmanın mezenşimal hücrelerinden gelişirler. Primer interstisyel hücreler gebeliğin 12. haftasında fetal ovaryumun medulla bölümünde ortaya çıkar ve 20. gebelik haftasında kaybolurlar. Gonadotropinlere cevap veremezler. Kolesterol yan zincir klivaj aktiviteleri olmadığı için de novo steroidogenez yapamazlar. Fakat sirküle steroidojenik öncülleri kullanarak androjen üretebilirler. Teka tabakası, steroid hormon salgılamaya uygun endokrin bir yapı gibi zengin şekilde damarlanma gösteren teka interna ve büyük çoğunluğu fibröz bağ dokudan oluşan teka eksternadan oluşur. **(285)**

Teka internayı oluşturan hücrelerin zarlarında LH reseptörleri bulunur ve bu hücreler de steroid üreten hücrelerin ultrastrüktürel özellikleri gözlenir. Poligonal şekilli olup oval nükleuslara, sitoplazmalarında çok sayıda lipit damlalarına ve gelişmiş düz endoplazmik retikuluma sahiptirler. Mitokondriyumların kristalları tübüler tiptedir. Bu hücreler bağ dokusundan geliştiği halde epitelooid karakterdedirler. Teka interna hücreleri, granüloza hücrelerindeki erkek seks hormonu olan androstenedionu üretmektedir. Teka hücrelerinde üretilen androstenedion, aromataz enzimi yardımıyla granüloza hücrelerinde östrojene çevrilir. Granüloza hücreleri, teka internadan bir bazal lamina ile ayrılmaktadır. Teka interna hücreleri granüloza hücrelerinden farklı fakat stromal hücrelerle benzer olarak vimentin için immünreaktiftir. Sitokeratin için ise immünreaktif değildir. Mitotik görünüm olgunlaşan foliküllerin teka hücrelerinde mevcuttur. **(56, 79, 91, 123, 135, 241).**

Teka eksterna tabakası, teka internanın etrafını sarar ve çevre stroma ile sınırları belirsizdir. Teka eksternada az sayıda konsantrik yerleşimli füziform bağ dokusu hücreleri, yoğun kalın kollajen lifler ve düz kas demetleri bulunur. Her iki teka arasında ve teka eksterna ile çevre stroma arasında kesin bir sınır yoktur. **(56, 79, 91, 123, 135, 241).**

### 2.3.3. Ovaryum stroması

Kortikal ve medullar stroma benzer görünümde dirler ve sınırları belirsizdir. İğ biçimli stromal hücreler dar sitoplazmalıdır. Berrak sitoplazmik lipid damlacıkları özellikle geç reproduktif ve postmenopozal dönemde özel boyalarla gösterilebilir. İmmünohistokimyasal boyalarla sitoplazmada ayrıca vimentin, aktin ve desmin görüntülenebilir (1).

Luteinize stromal hücreler ise foliküllerden uzakta stromada bulunurlar. Tek başlarına sıklıkla medullada, küçük bir yuva içinde bulunurlar. Polihedral şekilli, eozinofilik-açık, çeşitli miktarda lipid damlacığı içeren sitoplazmaları vardır. Sentral yerleşimli yuvarlak nukleusa ve belirgin nukleolusa sahiptirler. Bu hücrelerde testosteron için sitoplazmik immünreaktivite bulunur. (1)

Ovaryum stroması ayrıca belirgin steroidojenik aktivitesi olmayan fibroblastlardan oluşur. Bu hücreler androjen reseptörü eksprese ederler ve androjenlerin etkisi ile proliferasyon olurlar. Ovaryum kaynaklı hiperandrojeneminin karakteristiği stromal yoğunlukta artış olarak görülür. Stromal hücreler ovaryumlarda çevre yapılardan folikül ve korpus luteumu ayırırlar. Büyüme faktörleri ve bağlayıcı proteinleri üretirler.

### 2.4. Ovaryum Foliküllerinin Gelişimi (Folikülogenez)

Foliküllerin primordial folikül popülasyonundan ayrılıp gelişme ve differensiasyonuna folikülogenez denir. Folikülogenez somatik hücrelerin proliferasyonu, steroidojenik kapasite elde etmesi, oositin büyümesi ve mayoz bölünme ile karakterizedir. Folikülogenezin amacı matür, kumulus kompleksi ile çevrili, üreme yolunda spermle döllenebilen oosit ve endometriumun gebeliğe hazır olmasını sağlayacak hormonları salgılayan korpus luteum elde etmektir. Bu foliküller ardışık büyüme ve differensiasyon sürecine girmeden önceki dönemde sessizdirler. Bütün foliküller ovulatuvar döneme ulaşmazlar, bir kısım folikül atrezi denilen bir süreçle kaybedilirler. Mc Gee ve arkadaşlarına göre folikülogenezde iki dönem vardır (176). Bunlardan birincisi ilk recruitment'dir. Bu dönemde primordial foliküller erken antral döneme doğru yavaş büyüme içerisinde dirler. İkincisi siklik recruitment'dir. Bu dönemde atreziden kurtulan erken antral foliküller hızlı bir büyüme içerisine girerler. Foliküller siklik recruitment sürecine girdikten sonra bir

ya da bazıları daha ileriye büyüme ve ovulasyon için seçilirler buna dominant follikül adı verilir. Diğer folliküller atreziye uğrarlar.

Folikülün gelişimi, granüloza, teka, interstisyel hücreler ile oositlerden salınan büyüme faktörlerinin otokrin ve parakrin sinyallerine bağlıdır. Bu faktörler, BMP-4, Bcl 2, K1t, FGF, NOBOX, NTS/Trkb, survivin, XIAP, GDF-9, NAIP, SCF, integrin, gonadotropin, TRAIL olmak üzere çeşitli moleküllerdir. **(101)**

#### **2.4.1.Primordiyal foliküller**

Dişi bireylerde PGH'ler 25. haftada mitozla çoğalarak yaklaşık 7 milyon oogonyum meydana getirir. Bu aşamada yassı epitelyum hücreleri oogonyumların çevresini tek tabaka halinde sararak primordiyal folikülleri oluşturur. Mayoz bölünmeye girmiş primer oositlerin büyük çoğunluğu primer folikül oluşturamayıp atreziye uğrar ve yok olurlar **(94)**. Fetal hayatın beşinci ayında başlayan atrezi foliküllerin sayısını logaritmik olarak azaltır. Atrezi başlamadan önce beş milyon civarında olan oosit sayısı doğumda 1 milyondan aza iner **(224)**. Pubertede ise bu rakam 200.000'e kadar inmiştir **(55)**. Puberteden itibaren her menstrual döngüde bir kaç adet folikül gelişirken yalnızca bir tanesi baskın folikül olup son aşamaya kadar gelişir, diğerleri ise atreziye uğrayarak yavaş yavaş yok olurlar. Bir kadının üretken dönemi süresince yaklaşık 400 oosit bu aşamaya kadar gelip ovulasyonla atılır. Menopozdan sonra geri kalan oositler birkaç yıl içinde tamamen yok olur. **(224)** Bununla beraber, son yıllarda bazı araştırmalarda fare türlerinde germ hattı kök hücrelerinden, yaşamın erken yıllarında yeniden eşey hücresi oluşturulmuştur. Bazı kurbağa türlerinde (*Xenopus laevis*) kök hücrelerinden, yaşam süresinin çoğu boyunca eşey hücresi üretildiği yönündeki kanıtlar oldukça kuvvetlidir. **(189, 129)** Primordiyal foliküllerin gelişebilmesi için NGF (nerve growth factor) ve SPO11 (spondation protein homolog 11) gibi faktörlerin etkisi bulunur. **(56, 66, 68, 96, 203, 226)** Bunun dışında bir çok büyüme faktörü burada rol alır. Kök hücre faktörü, lösemi inhibitör faktör, insulin gibi faktörler primordial hücre büyümesini arttırmakla beraber, BMF-4 (Bone morphogenik factor-4) primordial folikül yaşamını attırmakta ve primordial-primer folikül geçişinde rol almaktadır. **(199)** GDF-9 yokluğu, folikulogenezi, primer follikül sürecinde bloke eder.**(67)**

### 2.4.2.Primer foliküller

Puberteden itibaren çeşitli unsurların etkisiyle oositler ve bunlara eşlik eden folikül hücreleri bir büyüme evresine girerler. Büyümenin ilk işareti, yassı folikül epitel hücrelerinin kübik hücrelere dönüşmesidir. Bu aşamada folikül primer folikül adını alır. **(184)**

Primer foliküller, primordiyal foliküldeki primer oosit, folikül hücreleri ve bunları çevreleyen stromal dokudaki değişikliklerin sonucu olarak gelişir. Primer oositin çapı büyür. Folikül hücreleri oosit gelişmesi bağlı olarak değişikliğe uğrarlar. Yassıdan kübik şekle dönüşürler ve granüloza hücreleri adını alırlar. Primer folikülde, oositin çevresinde tek katlı kübik epitel ve bazal lamina bulunur. Primer folikülün çapı 50-80 µm kadar büyür. Ayrıca, primer foliküllerde oositin çevresinde zona pellusida oluşmaya başlar. Primordiyal foliküllerden primer foliküllerin gelişebilmesi için BMP4, BMP7 ve FGF7 gibi bazı faktörlerin etkileri vardır **(79, 134, 162, 199, 241)**

### 2.4.3.Sekonder Foliküller

Folikül epiteli ve çevresindeki stroma, foliküllerin maturasyonu ile ilişkili olarak hem hiperplaziye hem de hipertrofiye uğrar. Bu komponentler solid, multilaminar özellikteki sekonder folikülü oluştururlar. Folikülde granüloza hücreleri mitoz ile çok katlı duruma gelirler. Hücrelerin sıkıca paklendiği çok katlı konsantrik bir düzen kazanırlar. Granüloza hücrelerin oluşturdukları bu çok katlı epitele stratum granulozum adı verilir. Ayrıca bu tip foliküllere multilaminar primer folikül de denir **(91, 134, 241)**. Folikül büyürken primer oositinde çapı artar ve homojen, eozinofilik ekstrasellüler bir tabaka olan zona pellusida, hücrenin plazma membranını çevreler. **(206)**

Proteoglikanlardan zengin olan zona pellusida, hem oosit hem de granüloza hücreleri tarafından sentezlenir. Zona pellusida, folikül içindeki üreme hücrelerini, tubada ovulasyona uğramış oositi ve klivaj aşamasındaki embriyoyu korur. Ayrıca sperm ile iletişim kuran bölge olmakla birlikte polispermiden koruyucu basamağında oluşturur. Işık mikroskopunda parlak, homojen bir şekilde ve asidofilik olarak gözlenir. Ayrıca glikoprotein içeriğinden dolayı PAS pozitifdir. Yalnızca üç glikoproteinden oluşur: 200 kDa ağırlığında ve dimerik yapıda olan ZP1; 120 kDa

ağırlığında olan ZP2 ve 83 kDa ağırlığında olan ZP3. ZP2 ve ZP3 düzenli aralıklarla ZP1 dimerleri tarafından birbirlerine bağlanarak uzun filamen kompleksini oluştururlar. Sperm bağlanması sırasında, ZP3'e bağlı olan O-oligosakkaritler sperm reseptörleriyle ilişkiye girerler. (1)

ZP1 olmayan fare yapısal olarak anormal zona oluşturur ve fekunditesinde azalma görülür. ZP2 olmayan farede preovulatuvar follikülü barındıramayan ince bir zona oluşur, antral follikül sayısı azalır ve daha az yumurta ovulasyona uğrar. ZP3 eksik fare zona pelusida oluşturamaz ve dişiler sterildir. (163)

#### 2.4.4. Antral foliküller

Sekonder foliküller gelişimlerine devam ederken, granüloza hücreleri arasında boşluklar oluşur. Bu boşlukların içerisine folikül sıvısı (likör folikülü) bulunur. Granüloza hücreleri tarafından üretilen bu sıvıda glikozaminoglikan, proteoglikan, 20 kadar çeşitli enzim ve steroid-bağlayan proteinler vardır. Ayrıca, lüteinazan hormon (LH), folikül stimüle edici hormon (FSH) ve bu hormonların salınımını düzenleyen progesteron, östradiol, inhibin, folliostatin (folikülostatin) ve aktivin gibi steroid içerikli çözülmüş hormonlar bulunur. Folikül sıvısı üretimi bir yandan devam ederken bir yandan da tek tek bulunan boşluklar birleşerek sıvı dolu büyük bir boşluk (antrum folikülü) oluşturmak üzere birleşirler. Bu aşamada oositler neredeyse olgun boyutlarına (~120µm) ulaşır ve büyümesi durur. Ancak granüloza hücreleri çoğalmaya devam eder. (184) Foliküller bu aşamadan sonra antral folikül ismini alırlar. (224)

Granüloza tabakası oositi çevreleyen bölge dışında her yerde hemen hemen aynı kalınlıkta iken çevresel yerleşim gösteren oosit etrafında ise daha yoğun bir şekilde birikerek bir tepcecik oluştururlar. Kümüls ooforus adını alan granüloza hücreleri ovulasyon sonrasına kadar oosit ile birleşik halde kalırlar. Oosit ile ilişkili ve onu saran bir veya daha fazla tabakalı granüloza hücreleri artık korona radiata olarak adlandırılır ve ovulasyondan sonra da oosite eşlik ederler. Ovulasyondan sonra korona radiata ile oosit, aralarındaki neksuzlar ile sürekli temasta olduklarından dolayı birlikte kümülüs oosit bileşkesi kompleksi (COC) olarak adlandırılır. (224) Antrumu çevreleyen granüloza hücrelerine ise membrana granüloza denir. (134, 189, 224, 226)



Ovulasyona yakın dönemlerde folikül son gelişim evresine ulaşır. Bu olgun folikül, 10 mm veya daha büyük çapta olup graaf folikülü olarak isimlendirilir. Bu foliküller, çok büyük olduğundan dolayı ovaryum korteksinin kalınlığı boyunca uzanıp bir miktar da ovaryumun dışına doğru çıkıntı yapar. Yaklaşık olarak ovaryumun büyüklüğüne yakın boyuttadır. Bu esnada granüloza hücrelerinin mitotik aktiviteleri azalır. Granüloza hücrelerini teka internadan ayıran folikül bazal laminası, kalınlaşarak membrana vitrea adını alır. Bu dönemde oositin büyümesi, follikül hücrelerinin çoğalması durur. Primer oosit çekirdeğine, vezikula germinativa (GV), nukleolusuna ise makula germinativa denir. Primer oosit sitoplazmasında çok sayıda vitellin granüller bulunur. **(36, 78, 79, 135, 189, 224, 226)**

## **2.5. Foliküler Atrezi**

Ovaryumda doğum sırasında sayıları milyonlarla ifade edilen ve çeşitli gelişim evrelerinde folikül bulunur. Her menstrual siklusta birden çok folikül gelişir. Ancak olgun bir folikül, parçalandığında ve oosit kümülüs korona kompleksi atıldığında geride kalan olgunlaşmakta olan foliküller, atrezi ismi verilen bir süreç ile ortadan kaybolurlar. Atrezi granüloza hücrelerindeki apoptoz aracılığıyla meydana gelir. Fetal gelişim, erken postnatal yaşam ve pubertede çok sayıda folikül atreziye uğrar. Foliküller atreziye uğrarken ilk başta oositler daha sonra da folikül hücreleri dejenere olurlar. Atreziye uğrayan primordiyal foliküllerin yerini stroma alır. Gelişen foliküllerin atrezisi ise daha kompleks bir olaydır. Bu olayları sıralarsak; Oosit dejenere olur. Mitoz durur ve granüloza hücreleri arasında endonükleazlar ve hidrolitik enzimlerin ekspresyonu görülür. Nötrofil ve makrofajların granüloza tabakasına invazyonu gerçekleşir. Folikül antrumuna granüloza hücreleri dökülür ve vaskülarize bağ dokusu dizisi ile granüloza tabakasının invazyonu gerçekleşir. Otolitik değişikliklere dayanıklı olan zona pellusida ise makrofajlar tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılır. Teka interna hücrelerinde hipertrofi gözlenir. Folikül kollapsı olur. **(1, 79, 82, 134, 189)**

Foliküllerdeki atrezi sürecini birkaç gen düzenler. Bunlardan bir tanesi gonodotropinlerin indüklediği nöral apoptoz inhibitör protein (NAİP) dir. Bu granüloza hücrelerindeki apoptoz yönündeki değişiklikleri inhibe eder. NAIP gen ekspresyonu büyüyen foliküllerin tüm evrelerinde mevcuttur. Fakat atreziye uğramış

folikülde yoktur. Gonodotropinlerin yüksek düzeyde olması ovaryumlarda NAIP in ekspresyonunu artırır. Bu şekilde apoptozis inhibe edilir.

Oositlerde dejenerasyon ve otoliz gerçekleşir. Zona pellusida ilişkili olduğu hücrelerdeki otolitik değişikliklere karşı dirençlidir. Antrum içinde yavaşça bozulur ve katlanıp kollebe olur. Bağ dokusundaki makrofajlar, dejenere hücrelerin artıklarını ve zona pellusidayı fagosite ederler. Folikül hücreleri ile teka interna arasındaki bazal membran folikül hücrelerinden ayrılabilir ve kalınlığı artar. Camı membran adı verilen dalgalı hiyalin bir tabaka oluşturur. (1)

Teka interna hücrelerinin genişlemesi bazı atretik foliküllerde meydana gelir. Bu hücreler teka lutein hücrelerine benzerler ve bağ dokusuyla ayrılmış diziler şeklinde radial olarak düzenlenirler. Bağ dokusunda zengin kapiller ağ gelişir. Bu atretik foliküller, korpus luteuma benzemektedirler ve korpus lutea atretika ismini alırlar. (224)

Menstrual siklus başında artan FSH konsantrasyonları ile bir folikül midsiklusta artan miktarda östrojen üretimini sağlar ve maturasyona ulaşır. Feedback mekanizma ile FSH sekresyonu düşer, dolayısıyla foliküllerde apoptoz gözlenir ve atrezi gerçekleşir. (124, 121, 257) Granüloza hücrelerinde apoptoza neden olan mekanizmalar tam olarak bilinmemekle beraber; 1. Fas, kaspazlar, Par-4, p53, prohibitin, c-Myc, IFN, endotelin gibi birçok molekülü ilgilendirir. 2. Gonadotropin, IGF-1, IL-1 $\beta$ , EGF, b-FGF, Bcl-2 gibi survival faktörleri ve TGF- $\beta$ , IL-6, androjen, bax, reaktif oksijen türleri, p53, TNF ve kaspazlar gibi atretojenik faktörleri görev alır. (69, 260, 131) 3. Bu moleküller arasında denge ile ölüm ve yaşam sınırı çizilir. (124)

## 2.6. Ovaryumlarda Apoptoz

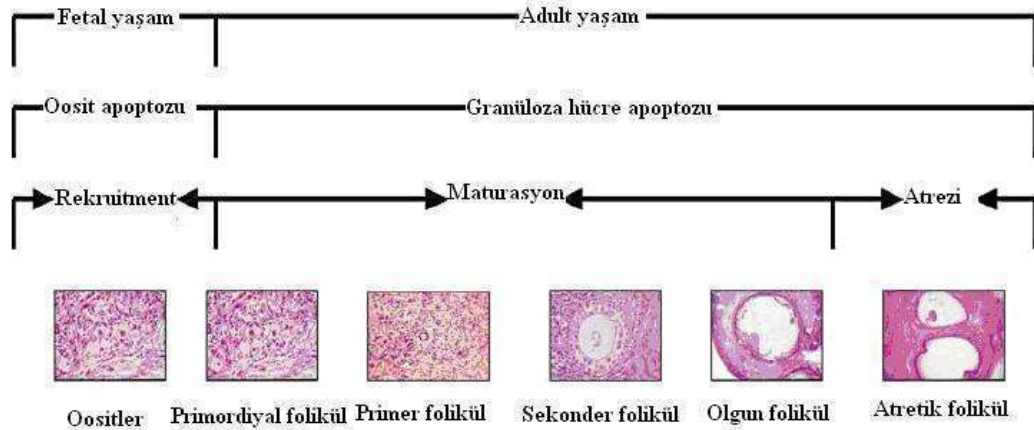
Omurgalı hayvanların ovaryumları hayat boyunca oldukça dinamik bir süreç geçirirler. Foliküllerin %99'u başlıca granüloza hücreler olmak üzere apoptoz mekanizmalarla atreziye uğrar ve çok az kısmında ovulasyon gerçekleşir.

Fizyolojik koşullar altında apoptoz, ovaryumda foliküllerde 3 hücre tipinde görülür. Granuloza hücrelerinde ve luteal hücrelerde apoptoz sıklıkla erişkin dönemde olurken oositlerde apoptoz fetal hayatta gözlenir. Oositlerde apoptoz 13. haftada başlar ve 14-20. haftalar arasında maximum seviyeye ulaşır. Bu dönemden

sonra doğuma dek gitgide azalır ve postnatal oositlerde apoptoz izlenmez. (267)  
(Şekil 2.4)

Ovaryumlarda fetal ve erişkin hayat boyunca apoptozis vardır. Fetal hayat boyunca apoptoz oositlere lokalize iken erişkin hayatta sekonder ve antral foliküllerin granuloza hücrelerinde tespit edilir. Hipotetik olarak foliküllerin ovaryum rezervinin tüketilmesi apoptoz yoluyla olmaktadır. (124)

Hücre ölümü ve yaşamı ile ilgili sinyaller arası denge folikülün kaderini belirler. Atrezi hızında anormal hızlanma fertilitiyi negatif olarak etkiler. İnsan oogenezisinde apoptozun ultrastrüktürel değişiklikleri birinci ve ikinci mayoz bölünmeleri kapsar. (53) Atretik oositlerde nükleolar parçalanma, sitoplazmik ve nükleolar kondensasyon ile apoptotik cisimcik oluşması ve nükleer membranda kromatin dizilimi olmaz. Bunun yerine atretik oositlerde erken morfolojik değişiklikler granuloza hücrelerinde retraksiyon, oosit mikrovilluslarında azalma ve mitokondriyonlarda kristaların kaybı ile kondensasyondur. Bu değişiklikler granuloza hücrelerinde apoptozun başlaması ile birlikte olur. Granuloza hücrelerin birçoğunun kaybı ile beraber daha şiddetli değişiklikler oluşur bunlar oositin segmentlere ayrılması ve sitoplazmik vakuolizasyonlardır. (61)



**Şekil 2.4.** Fetal ve postnatal (puberte) yaşamda ovaryumlarda folikül gelişimi ve apoptoz (124)

İnsanlarda ovaryum folikül rezervi fetal hayatta belirlenir. Oositlerin en az üçte ikisi fetal hayatta apoptoz ile ölmektedir. Apoptoz ovaryum fonksiyonu ve

gelişimi için gereklidir. Fetal hayatta apoptoz başlıca oositleri etkiler. Hipotetik olarak foliküllerin ovaryumdaki rezervinin tüketilmesi; 1. Mayoz anomalilerinin yok edilmesi için kalite kontrolü. 2. Komşu hücreler tarafından üretilen yaşamsal faktörlerin eksikliği 3. Kendi kendini kurban etme mekanizmaları ile gerçekleşir. **(188)**

### **2.6.1. Fetal Yaşamda Folikül Gelişimi ve Apoptoz**

Programlı hücre ölümü, primordiyal germ hücrelerinin prenatal farklılaşmasında etkilidir. Oosit oluşumu ve foliküler gelişim süreci yedi prenatal adımda gelişir ki bu adımlar şunlardır: (i) primordiyal germ hücrelerinin oluşumu (PGH), (ii) onların gelecekteki gonada göçü ve aynı anda proliferasyonu, (iii) gonadların kolonizasyonu, (iv) oogonia içerisinde PGH' nin farklılaşması, (v) oogoninin proliferasyonu, (vi) mayozun başlaması (vii) mayozun profaz 1'in diploten evresinde durması. **(153)**

c-Kit ve onun ligandının etkileşimi PGH göçü, proliferasyonu ve yaşamı için önemlidir. Tirozin kinaz reseptörü, c-kit, germ hücre yüzeyinde eksprese olur ve göç yolu boyunca somatik hücrelere bağlanır. Onun ligandı eksprese olur. **(167)** KIT ve KIT ligand da meydana gelen mutasyon fetal germ hücrelerinde dramatik azalmayla beraberdir. **(46, 153)**.

Prenatal germ hücrelerde azalma, temel olarak apoptoz yolu ile gerçekleşir. **(53, 219)**. Apoptoz ile oosit tüketimi düzenlenir. Mitoz ve sonrasında germ hücrelerinin her ikisinde, oogenezinin her bir fazında apoptoz meydana gelir. İnsan fetal hayatın 5. ayında mitozdan mayoz geçiş döneminde en yüksek germ hücre sayısı  $6,8 \times 10^6$  olarak görülür. **(12)** Oosit mayozunun pakiten evresine girince primordiyal follikül oluşumu ile birlikte germ hücre sayısı hızla düşer. **(99)** Doğumda bir milyon oosit mevcuttur. **(46)**. Dolayısıyla dişi gametlerde gözlenen bu olay intihar olarak düşünülebilir. Germ hücrelerinden oosit ve primordiyal folikül oluşumu retinoik asit tarafından kontrol edilir. **(27)**. İnsan ovaryumlarında folikül oluşumu ikinci trimesterde, fare ovaryumlarında ise doğum sonrası olur. **(122)** İnsan folikülogenezinde oluşan somatik hücreler yüzey epitelyumu ve mezonefronlardan kaynaklanır. **(277)** Prenatal dönemde oositlerde gözlenen bu süreçte hücre dışı yollar

rol almaz. Ekstrinsik ve intrinsik stresler mesela büyüme faktörünün geri çekilmesi, genotoksikanlar ve DNA hasarı apoptozu indükler. **(51, 170)**.

Prenatal germ hücre ölümünün temeli genel olarak iki hipotez ile açıklanır. **(260, 14)**. İlk hipotez, yaşamsal faktörlerin eksikliği ile meydana gelen ölümdür. Germ hücreleri, kit ligand (KL) ve lösemi inhibitör faktör (LIF) gibi belli büyüme faktörlerini kullanmaya diğer hücre tipleri gibi bağımlıdır. **(70)** Fetal oogenezis invitro olarak oluşturulduğunda yaşamsal faktörlerin yokluğu apoptoza yol açar. Ancak fetal oogenezde invivo olarak bu sonuca ulaşamamıştır. KL için mutant farelerin **(46)** infertilitesinin primordiyal germ hücrelerinin apoptozuna bağlı olması ilk hipotezi destekler. KL proapoptotik gen Bax' ın zayıf ekspresyonunu devam ettirerek germ hücrelerinin apoptozunu engelleyebilir. **(85)** Apoptoz indüksiyonunun ekstrinsik yolu fetal periyod esnasında aktif değildir **(51, 170)**. Homozigot Kit eksik farenin fenotipik görünümü, aynı anda homozigot Fas eksikliğinin varlığı ile kısmen kurtulabilir. Bu gösterir ki fetal ovaryumlarda Fas aracılı apoptotik sinyaller KIT aracılı yaşamsal sinyallerle karışır. **(187)** Diğer hipotez ise apoptoza yol açan intrinsik yol ile oositlerin bağlantısının açıklanmasını içerir. Bu yolla kromozomal olarak anormal ve defektif mitokondrial genomlu oositlerin eliminasyonu sağlanır. **(152)** Seks kromozom anoploidileri, daha çok, gonadlarda germ hücrelerinin yokluğu veya çok az varlığı ile tanımlanan gonadal disgenezis ile ilişkilidir. Oositin kalite kontrol programı fikri oldukça ilgi çekici görünmektedir. Henüz doğrulanmamış olup, Turner sendromlu (XO) hastaların ovaryumlarında oositlerin yaygın apoptozu meydana gelir veya mayoz defekti ile sonuçlanır. **(186)** XO fareler fertildir ve doğumda normal ovaryumları olmasına rağmen prematür over yetmezliği vardır. **(180)** Germ hücre apoptozunun intrasellüler düzenleyicilerine bağlı olarak, Bcl-2 ve kaspaz ailesini içeren, pro- ve antiapoptotik hassasiyeti olan genlerin farklı spektrumları prenatal oosit tükenmesi ile ilgilidir. **(260)**. Fakat, prenatal oogenezin spesifik evrelerine bağlı olarak çeşitli pro- ve antiapoptotik moleküller apoptoz sinyaline ya etkilidirler yada değildirler. Primordiyal germ hücresi ve oogonia'nın kaybına bax'ın katkısı olmakta iken mayozun profazında olan oositin apoptozuna katkısı yoktur. **(153)**

Apoptoz en fazla 14 ve 28. haftalar arasında meydana gelir ve terme doğru azalır. Mitokondriyal DNA'nın genomik DNA' dan daha çok mutasyona

uğrama hassaslığı vardır ve mitokondrilerin çoğu oositlerden kalmıştır. Mitokondrilerin niteliği oositlerin yaşam/ölüm kararında kritik rol aldığı görülmüştür. En çok oosit kaybı doğumdan sonra görülür ve pubertede ovaryumların foliküllerinin % 75' i kaybolur. **(124, 212)**

### **2.6.2. Erişkin Yaşamda Folikül Gelişimi ve Apoptoz**

Ovaryumlarda germ hücre sayısı doğumda yaklaşık 1 milyon iken pubertede azalarak yaklaşık 300 bin kadar olur. Fertil yaşam boyunca bunların yaklaşık 400 tanesi ovulasyona uğrar. **(100, 172, 221)** Puberte ve menopoz arasında yaklaşık 250 000 folikül ise atreziye uğrar. Tipik menstrual siklus boyunca siklus başına yaklaşık 1000 folikül gelişmeye başlar ve sadece bir tanesi ovulasyon gerçekleşir. Ovulasyon sonrasında dominant folikül korpus luteuma dönüşür. Bu folikül progesteron üretiminden sorumludur ve erken gebelik esnasında endometriyumun devamını sağlar. Korpus luteumun regresyonunda apoptoz gözlenir (ör; luteoliziz). **(257, 258, 259, 262, 267, 191)**

Foliküllerin postnatal dejenerasyonu, sessiz foliküller ile büyüyen foliküllerin kaybı şeklinde görülebilir. Bu durum için foliküler atrezi tanımı kullanılır. Foliküler atrezi terimi ile ovulasyonda, rüptürden önce dejeneratif değişikliklere uğramış antral foliküller tanımlanırken günümüzde daha geniş anlamda ovaryum foliküllerinin gelişimindeki dejeneratif değişiklikler olarak tanımlanır. Foliküllerin büyümesi dişi üreme yaşamı boyunca ve öncesinde başlamıştır. Ovaryum foliküllerinin gelişimi ve atrezisi, hipofiz hormonlarının (gonodotropinler) ve intraovarian düzenleyicilerin etkileşimi ile düzenlenir. Bu etkileşim proliferasyon, büyüme, diferansiyasyon ve apoptozu artırır. Foliküler atrezi granüloza hücreleri ve takiben teka hücreleri içinden başlar. **(190, 261, 115)** Granüloza tabakası içinde yaygın hücre kaybı foliküllerin ölümüne neden olur. Yalnızca primordiyal ve primer foliküllerde oosit kaybı ile foliküler dejenerasyon gerçekleşir. **(58, 177)**. Memelilerde ve kuş türlerinde foliküler atrezinin temel mekanizması apoptozdur. Bu sonuçlar atretik folikülde DNA fragmentasyonu ve sağlıklı foliküle göre atretiklerde apoptoz ile ilgili genlerin ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması gibi özelliklerin tanımlanmasıyla ortaya konur. **(58)** Programlı hücre ölümü memeli korpus luteumunun regresyonunda olduğu kadar ovulasyon esnasında da etkilidir. **(63)**

Memeli oogenezi esnasında, kumulus granüloza hücrelerinin uzantılarında yer alan neksuzlar aracılığı ile oositin metabolik ihtiyacının yaklaşık %85'i karşılanır. **(31)** Memelilerde mural ve kumulus granüloza hücreleri oosit ile birliktedir ve neksuz aracılı ağ oluştururlar. Oosit-kumulus kompleksinin iki yönlü haberleşmesinde parakrin mekanizmalar kullanılır. **(153)**

### **2.6.3. Ovaryum Foliküllerinde Negatif ve Pozitif Seleksiyon**

Folikül rekrutmanı esnasında FSH düzeylerinde artış, bazı antral foliküllerin apoptozdan kaçışını sağlamaktadır. Önde giden folikül daha fazla estrogen ve inhibin sekresyonunu sağlamakta ve FSH salınımını inhibe etmektedir. Bu olay geriye kalan folikülleri negatif yönde etkileyerek kaybına neden olmaktadır. (negatif seleksiyon) Eş zamanlı olarak lokal üretilen büyüme faktörleri dominant folikülün pozitif seleksiyonunu sağlamaktadır ve sonunda ovulasyon gerçekleşmektedir. (pozitif seleksiyon) **(176)**

### **2.7. Vinilsikloheksen Diepoksid (VCD)**

Vinilsikloheksen diepoksid (VCD)'nin kimyasal formülü  $C_8H_{12}O_2$  molekül ağırlığı 140.20 mg'dır. Böcek ilacı, lastik, kauçuk ve plastik sanayisinde üretilen maddelerin 1,3-bütadian dimerizasyon formuna 4-vinylcyclohexene (VCH) adı verilmektedir. VCD, VCH'nin metabolitidir. VCD ara madde olarak kullanılır. Diepoksid ve epoksi resinleri için aktif seyrelticidir **(116, 120, 195, 196)**

VCD ve VCH ovaryumlara toksik etki yapmaktadırlar. Bu iki kimyasallardan VCH sadece farelerin ovaryumunda, VCD ise hem fare hem de sıçanların ovaryumlarına toksiktir. VCD sıçanlarda hepatik mikrozomal enzimlerle hızla nontoksik diol metabolize olur. VCD' nin primer ve primordiyal folikülleri parçalamasıyla yetişkin sıçanlarda prematür over yetmezliğine sebep olur. Bu toksisite, hipotalomus hipofiz sistemi aracılığıyla gerçekleşmez. Çünkü immatür foliküller gonodotropin düzenlemesine bağımlı değildir. VCD direkt olarak ovaryumlara toksiktir. **(89, 114, 234, 242)** On gün süresince VCD uygulanan sıçanlarda ışık mikroskopu düzeyinde apoptozun morfolojik kriterleri vardır. Kontrol ovaryumları ile karşılaştırıldığında VCD uygulanan sıçanlarda apoptotik işaretler artar. Bu işaretler; primordial ve primer foliküllerin oositlerin membranlarında

düzensizleşme, nükleer membranda kromatin yoğunlaşması, oosit etrafındaki granuloza hücrelerinde düzensiz dağılımlar, oosit ve granuloza hücreleri arasındaki kontakt kaybıdır. Bazı granuloza hücrelerinde nükleer membran boyunca kromatin birikmesi olmaktadır. Preantral foliküllerin oositlerinde ve granuloza hücrelerinde büzüşme olur. **(136, 239)**

VCD ile toksisite oluşturmak için tekrarlayan dozlarla ve belli bir süre uygulanması gerekmektedir. Otuz günlük uygulamalarda küçük foliküllerin önemli kaybı (primordiyal, primer ve büyüyen folikül) görülür. Bununla birlikte kısa süreli çalışmalarda primordiyal ve primer folikül sayılarında azalma ilk olarak 12. günde görülür. Bu zamanda büyüyen foliküllerde değişiklik görülmez. VCD aracılı ovotoksisite ilk olarak 10. günde görülür. Bu günde kontrole göre sağlıklı foliküllerin yüzdesi artarken önemli bir folikül kaybı görülmez. VCD'nin meydana getirdiği sağlıklı foliküllerin görüntüsü kontrol grubunda atretik foliküllerin görüntüsüne benzer **(89, 136, 239)**.

Sıçanlara 15 gün süresince VCD uygulandığında, VCD nin primordial ve primer folikül sayılarında anlamlı bir azalmaya neden olurken sekonder folikül sayılarında ise herhangi bir kayıp oluşturmadığı görülür. **(243)** Fischer 344 sıçanlara VCD' nin 80 mg/kg/gün dozunda, primordial foliküllerde 10 günde, primer foliküllerde 12 günde atrezi görülür. Farelerde 80 mg/kg/gün dozunda uygulandığında, primordial foliküllerde 8. günde, primer foliküllerde 10. günde atrezi başlar. Büyüyen folikül havuzunda bu dozlarda uygulama sonrasında foliküler kayıp olmaz. **(136)**. Dolayısıyla VCH/VCD nin asıl hedefi primordial ve primer foliküller olup sekonder foliküllerdeki azalma bu havuzun tükenmesi sonucu ortaya çıkar.

VCD sıçan ve fare primordiyal ve primer oosit sayısını selektif olarak azaltır. VCD'nin neden olduğu hücre ölümü ve folikül kaybı apoptoz yoluyla gerçekleşir **(114, 175, 239)**. Kullanılan biyokimyasal, moleküler ve morfolojik yaklaşımlar, bu yolun daha çok primordiyal ve primer foliküller üzerine etkili olduğunu düşündürmektedir. Apoptozun artması ile ilişkili olduğu bilinen olayları VCD artırmaktadır **(13, 14, 16)**.

Bunlar;

**(1)** proapoptotik Bad ekspresyonu artar.



- (2) sitozoldeki mitokondriyal membranda Bax ile onun dimerizasyonundan oluşan Bcl-xl nin translokasyonu artar.
- (3) mitokondriyal membranda Bax/Bcl-xl oranı artar.
- (4) sitozolde mitokondriden sitokrom c difüzyonu artar.
- (5) kaspaz 3 ekspresyonunun aktivasyonu ve aktivitesi artar.

VCD uygulanan sıçanlardan izolasyon ile elde edilen foliküllerde, Bcl-2 ailesinin birkaç üyesi apoptoz sinyal yolağını düzenler. Bcl-2 ve onun homoloğu olan Bcl-xl ise hücre ölümlerini engeller. Bad ve Bax ise hücre ölümünü hızlandırır. Bcl-2 protein ve onun homoloğu olan Bcl-xL mitokondrilerin membranında, endoplazmik retikulum ve çekirdek zarında lokalizedir ve hücrelerin yaşamasından sorumludurlar. Eğer Bax / Bcl oranı artarsa hücre apoptoza gitmektedir. Bunla ilgili yapılan bir çalışmada bu sinyal yolunda mitokondriyal membrandaki Bax'ın artışı sitoplazma içine sitokrom c'nin sızmasını artırır ve tüm bu olaylar proteaz ve kaspaz-3 aktivasyonunun artmasına neden olur **(13, 37, 42, 47, 50)**.

VCD etkisi ile apoptoza giren hücrelerin iki intrasellüler sinyal yolunu takip ettikleri belirtilmektedir. Birinci apoptoz sinyal yolunda VCD, apoptoz mekanizmasının ana komponenti olan kaspaz adı verilen sistein proteaz ailesini etkileyerek folikül kayıplarını gerçekleştirir. Kaspazlar, inaktif prekürsör (prokaspazlar) olarak eksprese olurlar ve proteolitik yarıklanmayı aktive ederler. Kaspazlar, apoptozda başlatıcı ve yerine getiren olmak üzere iki sınıftır. Proapoptotik sinyaller kaspaz-2, -8 ve -9 gibi başlatıcı kaspazları aktive eder. Başlatıcı kaspazların aktivasyonu kendiliğindedir ve spesifik kofaktöre bağlı gelişir. Bir kez aktivasyon olduğunda başlatıcı kaspazlar, yürütücü kaspazlara yapışır ve onları aktive ederler (kaspaz-3, -6 ve -7). **(198, 253, 24, 118)**.

Apoptoz ile ilişkili bir diğer yolak MAPK dır. Üç tane önemli MAPK mevcuttur. Bunlar ekstrasellüler sinyal regule kinaz (ERK) , c Jun N terminal kinaz (JNK) ve P38 kinaz olup bunlar hücre büyümesi, differensiyasyonu ve apoptozda rol almaktadırlar. Genel olarak ERK yolu büyüme faktörleri tarafından aktive olup hücre yaşaması ve proliferasyon için kritiktir. JNK ve p38 yolağı stres cevabı, büyüme tutukluluğu ve apoptoz esnasında stimule olur. MAPK lar bir kez aktive olduktan sonra alt yolakta fosforilasyon sonrası gen ekspresyonunu artırıcı olarak hareket ederler.

VCD'nin 15 günlük uygulamasının MAPK yolağına etkilerinin araştırıldığı çalışmanın sonuçlarına bakıldığında, VCD'nin JNK ve p38 aktivitesi ve ekspresyonunda artışa, c Jun da ise fosforilasyona ve nukleer proteinlerin AP1 e bağlanmasında azalmaya neden olmuşlardır. İzole küçük foliküllerde ERK aktivitesinde herhangi bir aktivasyon gözlenmez. Bcl 2 yolağında olduğu gibi VCD sekonder follikül ve karaciğerde herhangi bir etki göstermez. **(119)** Bu bulgular VCD'nin apoptoza MAPK yolağı aktivasyonu ile neden olduğunu göstermektedir.

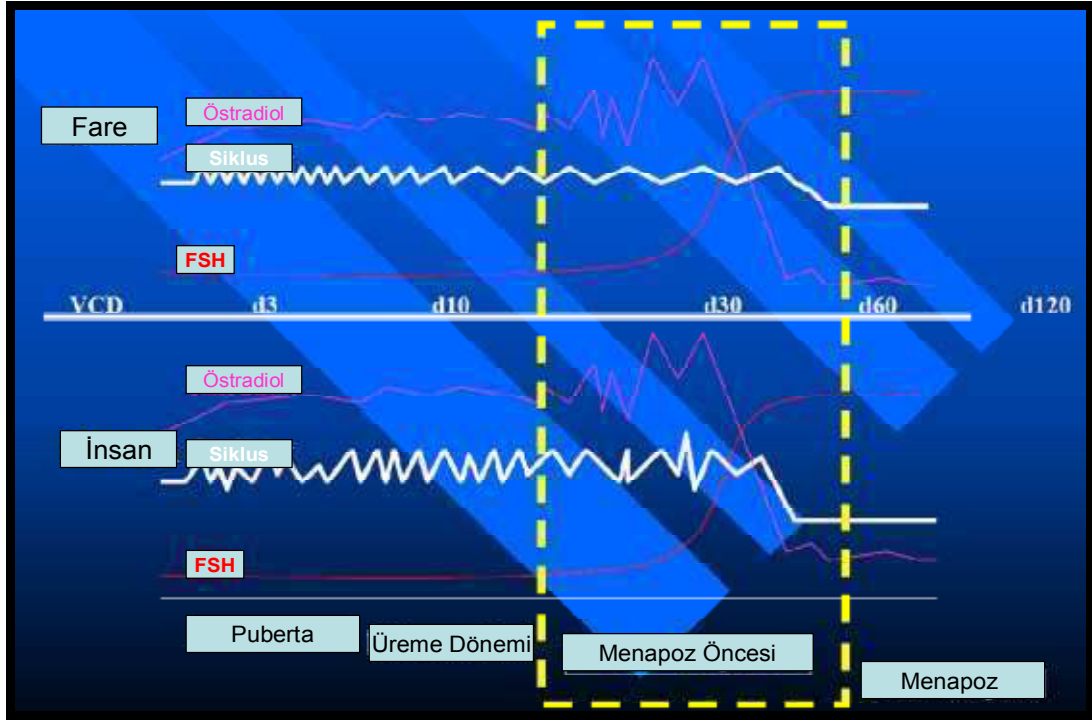
VCD primer ve primordiyal foliküllerde MAPK aracılı yolun başlamasında şu şekilde etkilidir. **(11, 15).**

- (1)** JNK ve P38 in aktivasyonunu ve ekspresyonunu artırır.
  - (2)** c-Jun'un fosforilasyonunda artışa neden olur
  - (3)** AP-1 cevap elementlerine bağlı nukleer proteinlerde azalmaya neden olur
- (14).**

VCD, on gün süre ile uygulandığında sıçanlarda, atretik ve preantral foliküllerde apoptoz granüloza hücrelerinde başlamakta ve oosit ile granüloza hücreleri birbirleriyle olan ilişkilerini kaybetmektedir. Bu olay sonrasında granüloza hücre katı neredeyse tamamen apoptoza uğrar ve sonrasında oosit dejenerasyonu, teka hücrelerinde hipertrofi, folikül çaplarında düşme meydana gelir. VCD uygulaması sonrasında daha büyük foliküllerde değişiklik olmaz. **(175)**

VCD özellikle primordial ve primer foliküllerden elde edilen oositleri etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda in vivo VCD ye maruz bırakılan hayvanlardan FSH ve HCG uygulaması ile elde edilen oositlerde bir miktar kırılabilirlik artışı olmakla beraber fertilitede bir kayıp gözlenmez. **(18) (Şekil 2.5)**

VCD oosit spesifik genlerde etki gösterir. Tirozin kinaz reseptörü ve c kit, oosit membranında eksprese olur. Granüloza hücreleri buna karşı kök hücre faktörü olan bir ligand üretirler. Kit ligandla c kit arasındaki ilişki normal follikülogenez için gereklidir. Neonatal sıçan kültür sistemi kullanılarak yapılan çalışmalarda VCD inkübasyonu c kit mRNA ekspresyonunu inhibe eder. **(87)** Kültür sistemine Kit ligand eklenmesi preantral foliküllerde atrezi engellenir. Ortama GDF9 ve BMP4 eklenmesi VCD ilişkili ovotoksisiteyi engellemez. **(88)**



**Şekil.2.5.** İnsan ve VCD uygulanmış farelerin üreme dönemlerindeki hormonların karşılaştırılması (165)

## 2.8. Dehidroepiandrosteron (DHEA)

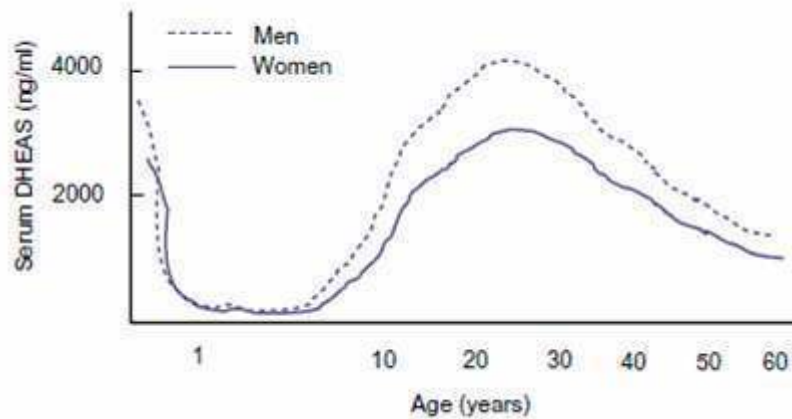
Dehidroepiandrosteron (DHEA) ve onun sülfat esteri DHEAS, insan adrenal korteksinden salgılanan ana hormondur. Fizyolojik rolleri henüz anlaşılamamıştır. DHEA diğer adrenal steroid hormonlardan farklı olarak yaşlanmayla beraber azalmaktadır. 1996 ya kadar Amerikada reçete edilen ilaçlar arasında yer alan DHEA, bu tarihten sonra FDA den herhangi bir hastalık için onay almamıştır. Günümüzde DHEA anti-aging hormon olarak pazarlanmakta ve A.B.D 'de reçetesiz olarak satılmaktadır.

### 2.8.1. DHEA sekresyonu ve yaşlanma

İnsanlarda ve bazı omurgalılarda DHEA salgılanması yaşla beraber değişiklik göstermektedir (205). DHEA fetal adrenal bezin salgıladığı ana hormondur. Doğum sonrası adrenal bezin fetal zonlarının involusyonuyla beraber DHEA kan düzeyi postnatal hayatın birinci yılının sonunda tespit edilemeyecek düzeylere kadar düşer.

Altı-yedi yaşa kadar kan DHEA düzeyi düşük kalır. Bu yaşlarda adrenal bezin zona retikularisindende salgılanmasıyla kan düzeyleri yükselmeye başlar. Bu olaya adrenarş denir. **(218)** DHEA'nın maksimum konsantrasyonlarına erişkin hayatta ulaşılır. İlerleyen yaşla beraber DHEA konsantrasyonlarında yavaş yavaş azalma olup 80'li yaşlarda %10-20'si düzeylere iner. Yaşla beraber DHEA'da gözlenen azalma kortikosteroid ve minerolokortikoidlerde gözlenmemesine rağmen bu olaya adrenopoz denir.**(205)**

Yaşla beraber DHEA sekresyonunun azalması kişisel farklılıklar göstermekte olup zona retikularis boyutunda azalma ile orantılıdır. Bunun tersine serum kortizol konsantrasyonları yaşla beraber artış gösterebilir.**(şekil 2.6)**



**Şekil 2.6.** İnsan yaşamı boyunca serum DHEAS düzeyleri

### 2.8.2. DHEA Metabolizması ve Etki Mekanizması

DHEA periferdeki hedef organlarda etkisini indirek olarak estrogen ve/veya androjenlere çevrilerek veya beyinde olduğu gibi direkt nörosteroid olarak gösterir.

İnsanlarda P450c17 enzimi, 17-alfa progesteronu, androstenediona çevirir. İnsanlardaki bütün steroid hormonların sentezinde DHEA kullanılır. DHEA, 3 $\beta$  hidroksisteroid dehidrogenaz aktivitesiyle androstenediona, 17 $\beta$  hidroksisteroid dehidrogenaz aktivitesi ile testesterona ve aromataz aktivitesiyle estradiola çevrilir. DHEAS, DHEA'nın kanda dolaşan hidrofilik formudur. Sadece lipofilik form olan DHEA hücre içinde androjen ve östrojenlere çevrilebilir. Erkeklerde sentezlenen androjenlerin %30-50'si ve pre ve postmenopozal kadınlarda sentezlenen

östrojenlerin %50-100'ü periferik hedef dokularda DHEA'dan sentezlenir. Hedef organda olan bu sentez ve etkiye intrakrinoloji denir. **(157)** DHEA, DHEAS ile sürekli bir değişim içerisinde. Dokuya spesifik DHEA sulfotransferaz ve steroid sulfataz, DHEA aktivasyonuna (steroidlere çevrilerek) ve inaktivasyonuna (sulfat esterlere çevrilip kan dolaşımına verilerek) neden olur. **(7)** Sabit infüzyon tekniği ile DHEA uygulanması sonrası DHEAS'ın DHEA'ya çevrilmesi erkeklerde 0,006 ve kadınlarda 0,004 olarak ölçülmüştür. Üretilen DHEA un büyük çoğunluğu DHEAS'dan gelir. **(21, 155)**

Farmokinetik ve biyokonversiyon çalışma verilerine göre insanlarda düşük DHEA konsantrasyonlarında, DHEA seks spesifik olarak iki şekilde konversiyona uğrar. DHEA uygulanması sonrası kadınlarda androjen, erkeklerde östrojen artışı olur. **(6, 7)** Postmenopozal hastalara perkutan olarak dehidroepiandrosteron uygulaması sonrasında kan serum androjen seviyeleri östrojen seviyelerine oranla daha fazla artar. Yaşla beraber DHEA transformasyonunda azalma olur. **(156)**

Adrenal yetmezliği, hipogonadizmi ve total androjen eksikliği olan erkeklerde DHEA uygulaması dolaşımda androjenlerde artışla sonuçlanır, fakat serum androjen konsantrasyonları istenilen düzeylerde olmaz. **(289)** Yaşla beraber DHEA sekresyonunda azalma ve gonadal fonksiyonun azalması sonrası erkeklerde oral DHEA verilmesiyle kan androjen konsantrasyonlarında artış olmamakta, fakat dolaşımda dehidrottestesteronun ana metaboliti olan 5 alfa androstane -3 alfa-17 β diol glikronid (ADG) konsantrasyonunda artışa neden olmaktadır. **(6, 97, 289)** Dolayısıyla, DHEA ana etkisini hücre içinde östrojen ve androjenlere çevrilerek gösterir.

DHEA'un östrojen ve androjenlere çevrilerek etki göstermesi dışında beyinde direk olarak nörosteroid olarak etki gösterir. Adrenektomize ve gonadektomize sıçanlarda beyin DHEAS düzeyleri değişmez. Nöronal büyüme ve gelişmede DHEA ve DHEAS direk etkiye sahiptir. **(44)** DHEA, NMDA<sub>i</sub>, GABA-A reseptör ve sigma reseptörleri aracılığıyla etki gösterir. **(57, 168)**

Periferik dokularda DHEA'un spesifik bir reseptörü yoktur. Ancak periferik dokularda DHEA direk etkisinin olabileceğini gösteren bulgular vardır. İnsan T hücrelerinde membrandaki bir reseptöre DHEA bağlanabilir. **(201)** Büyükbaş hayvanlarda aortada endotel hücre membranlarına DHEA bağlanır ve endotelial

nitrik oksit sentetaz aktive olur. (197) Benzer şekilde DHEA düz kaslarda ekstrasellüler sinyal regüle kinaz 1 fosforilasyonunu androjen ve estrogen reseptörlerinden bağımsız olarak aktive eder. (280) Bütün bu bulgulara rağmen merkezi sinir sistemi dışında DHEA etkisinin indirek olarak östrojen ve androjenlere çevrilerek oluştuğu düşünülür.

### 2.8.3. DHEA Sentezinde rol alan enzimler

Adrenal korteks, plasenta ve gonadlarda steroid hormonların sentezi oksidaz ve steroid dehidrogenaz olan sitokrom p450 enzimlerini gerektirir. Adrenal korteksin zona fasikularis ve zona retikularisinde p450 scc ve 3β-Hidroksisteroid dehidrogenaz enzim aktivitesi gözlenir. Testislerde bu üç enzim Leydig hücrelerinde bulunur. P450 scc ve 3β-Hidroksisteroid dehidrogenaz enzimleri mitokondriyonlarda, P450C17 immunreaktivitesi ise endoplazmik retikulumlarda bulunur. Ovaryumlarda steroid hormon üreten hücreler gelişmiş granüllü endoplazmik retikuluma sahiptir. Çok miktarda lipid inkluzyonları vardır. Lipid inkluzyonları teka-lutein hücrelerinde, granüloza hücrelerine göre daha fazladır. Ovaryumlarda p450 scc ve 3β-hidroksisteroid dehidrogenaz immunreaktivitesi granüloza, teka interna, korpus luteumdaki hücrelerde bulunur. İki enzimin subselüler lokalizasyonu adrenokortikal hücrelerdekine benzerdir. Ayrıca p450 c17 enzimi gelişen ve matür foliküllerin teka interna hücrelerinde bulunur. P450 scc büyük antral foliküllerin ve preovulatuvar foliküllerin granüloza ve teka hücrelerinde lokalizedir. Küçük foliküllerde daha az oranda bulunur. İnterstisyel ve korpus luteum hücrelerinde görülebilir. 3β-Hidroksisteroid dehidrogenaz immunreaktivitesi de büyüyen ve preovulatuvar foliküllerin teka ve granüloza hücrelerinde gözlenir. İnterstisyel ve luteinize hücrelerde boyanma vardı. Gonadlar ve adrenal bezlerde bu enzimler benzer hücre organellerinde lokalizedir. Steroid hormon sentezinde gerekli enzimlerin farklı dokularda benzer lokalizasyonlarda olması steroid hormonların üç dokudada benzer yollarla sentezlendiğini düşündürür. (210)

Fare ve sıçan adrenal bezinde 17 alfa hidroksilaz enzimi yoktur. Testisleri alınmış sıçanlarda plazma androstenodion ve dihidroepiandrostenodion düzeyleri tespit edilmeyecek düzeydedir. Fare ve sıçanlarda seks steroidlerinin sekresyonu gonadlarda olmakta ve DHEA gonadlar tarafından üretilmektedir. Adrenal bez

androjen üretimine katkıda bulunmaz. **(264)** Ooferektomi uygulanan farelerde kanda androstenedion konsantrasyonlarında azalma olur ancak plazma androstenedion düzeyleri henüz tespit edilemeyecek düzeylere inmez. Dolayısıyla kemiricilerde serum androjen üretimine adrenal bezin dışında başka dokularında katkıda bulunduğu düşünülür. **(174)**

Gonad steroidlerinin sülfatlanmış tiplerinin adrenal androjenlerden üretildiği ve ovaryum steroidogenezinde rol aldığı düşünülür. Sülfatlanmış androjenlerden konjuge olmayan androjen ve östrojen üretimi steroid sülfataz aktivitesine ihtiyaç gösterir. Sıçan ovaryum kültürlerinde granüloza hücrelerinde **(41)** ve insan ovaryum kültüründe luteinize granüloza hücrelerde sülfataz aktivitesi bulunur. İnsan granüloza hücre kültüründe dışarıdan insulin verilmesi sülfataz aktivitesinin artırır ve LH verilmesi ise bu aktiviteyi azaltır. Granüloza hücre kültürüne DHEAS eklenmesi progesteron üretimini etkilememekle beraber östradiol ve androstenedion miktarlarını artırır. Dolayısıyla adrenal androjen olan DHEAS ovaryumdaki steroidogenezde östradiol ve androstenedion üretiminde substrat olarak kullanılabilir. **(25)**

Dışarıdan uygulanan DHEA ovaryumlarda kist ve atretik folikül gelişimine neden olur. DHEA uygulayarak ovaryumlarda polikistik ovaryum modeli oluşturulabilir. Ovaryumlarda DHEA ile apoptoz artabilir. **(141)**

## **2.9. Antimüllerian Hormon (AMH)**

Antimüllerian hormon TGF- $\beta$  ailesinin bir üyesidir. 140 kDa ağırlığında homodimer yapıda bir glikoproteindir. AMH nun salgılanmasından sorumlu olan gen 19p13.3 üzerinde bulunur. **(105)**

Folikül gelişimi ve farklılaşması kompleks bir süreçtir. İlk basamakların gonadotropinlerden bağımsız olarak ilerlediğine inanılır. Daha sonraki dönemler ve folikülerin seçimi FSH'ya oldukça bağımlı olarak devam eder. Bu süreçte iki ana basamak diğerlerine göre daha önemli görülür. Bu basamaklar ilk rekrutment ve büyüyen foliküllerin atreziden kurtulduğu siklik rekrutment dönemidir. Primordial hücre rekrutmenti folikül havuzunun büyüklüğüyle uyumludur ve yaşla azalır. **(228)**

AMH, primordial folikül toplanma evresinde ve FSH bağımlı dominant folikül seçiminde inhibitör role sahiptir. AMH, nakavt farelerde normal primordial

folikül havuzu mevcutken, tükenmesi hızlanır. Bu farelere dışarıdan FSH eklendiğinde daha fazla sayıda ovulatuvar folikül oluşur. AMH, ovaryumlardaki fonksiyonel rolü dışında ovaryum rezervini belirlemede de önemlidir. Primordial folikül rekrutmentindeki faktörler tam olarak bilinmemektedir. AMH folikülogenezde düzenleyici bir role sahiptir.

AMH erkek seks differensiasyonunun belirlenmesinde görev alır ve testislerde Sertoli hücreleri tarafından salgılanır. Müler kanalından gelişen yapıların dejenerasyonunu sağlar. (296)

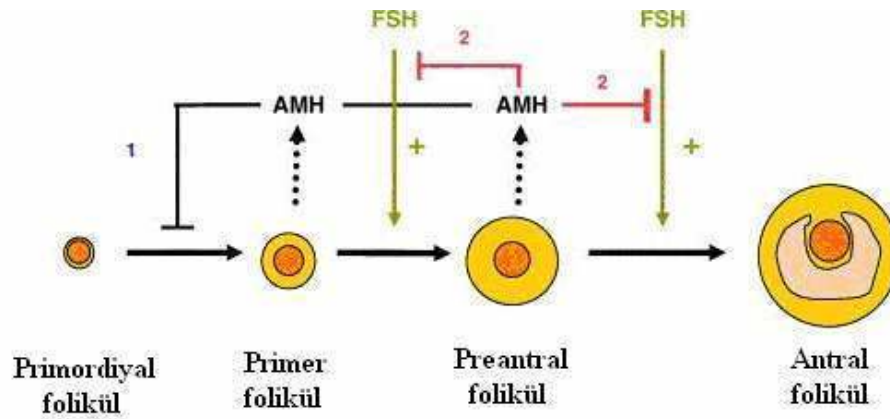
### 2.9.1. AMH' nin Folikülogenezindeki Rolü

AMH, insanda primer foliküllerden küçük antral foliküllere doğru geçişte eksprese edilirler. Preovulatuvar büyük antral foliküllerde, AMH ekspresyonu çok kısıtlı ya da yoktur. Rekrutment safhasından hemen sonra eksprese edilir ve sonrasında ovulasyon için seçilen folikülde kaybolur. Teka ve atretik foliküllerde ise gözlenmez (72, 73, 74)

AMH, folikülogenezde önemli role sahiptir. Primordial foliküllerin toplanması fertilitenin sağlanması için gereklidir. AMH, folikül toplanmasında önemli olarak gözükür. AMH, primordial folikül gelişimini başlangıçta inhibe eder. Yani erken folikülogenezi durdurur (72).

Büyüyen foliküllerde üretilen AMH parakrin etki ile primordial foliküllerin rekrutmentini ve sonrasında büyümelerini engeller. Buna ek olarak neonatal fare ovaryum kültürleri AMH'ye maruz bırakıldıklarında daha az büyüyen folikül olur. (72) AMH gonadotropinin stimule ettiği siklik foliküler rekrutmenti inhibe eder. AMH, FSH'nın stimule ettiği aromataz aktivitesini ve granuloza hücrelerde LH ekspresyonunu azaltarak FSH etkisini azaltmaktadır. (65) AMH null farelerde ortama FSH eklenmesi daha fazla folikül gelişimine neden olur. (73) AMH preantral ve antral folliküllerin FSH bağımlı büyümelerini ve seleksiyonunu inhibe etmekte olup ovaryum dokusunda fizyolojik bir frendir. Sonuç olarak insan ve farelerde primordial foliküllerin büyüyen antral folikül havuzuna geçişini önler (271). (Şekil 2.7)





**Şekil 2.7.** Postnatal fare overinde AMH' un aktivasyonu (301)

AMH insanda büyüyen folikül havuzunun bir göstergesi olarak kullanılabilir. AMH bu havuzun boyutunu, hem büyümeyi (rekrutment) hem de azalmasını (seleksiyon) inhibe ederek etkileyebilir. (9)

Kadınlarda AMH, doğum sonrası dönemde serumda görülür. Serum AMH düzeyleri puberteye kadar artış gösterir. Normal siklik kadınlarda yaşla beraber azalma gösterir ve menopozal dönemde tespit edilemeyecek düzeylere iner. (54) Serum AMH düzeyleri ırklar arasında farklılık göstermemektedir. Obez hastaların serum AMH düzeyleri obez olmayan hastalara göre daha düşüktür. (93)

## 2.10. İnhibin

İnhibinler, ovaryum granuloza, intertisyel, teka hücreleri ve korpus luteumlar ile testisin Sertoli hücreleri tarafından üretilirler. Hipofiz kaynaklı gonodotropin sekresyonunu negatif feedback mekanizmayla baskırlar. İki inhibin subunitesi (alfa ve beta) vardır. Dolaşımda inhibin A ve İnhibin B olmak üzere iki heterodimer formu vardır. Bu formlarda inhibin subuniteleri birbirlerine disülfid bağlarıyla bağlanmış heterodimer yapıdadır. (109)

İnhibin A:  $\alpha$  subunite,  $\beta$  A subunite

İnhibin B:  $\alpha$  subunite,  $\beta$  B subunite

Az sayıda organ, inhibin sentezlemekle beraber inhibinin ana kaynağı ovaryum ve testistir. Gonadektomi uygulanan sıçanlarda inhibin düzeyleri düşer. (223) İnsan inhibin A'sının kastrasyon uygulanmış develere uygulanmasından 6 saat

sonra FSH sekresyonunda düşüklük başlamakta ve infüzyonun kesilmesinden 12 saat sonrasında kadar bu etki devam etmektedir. LH düzeylerinde herhangi bir etki görülmemiştir. **(256)** Hipofiz bezindeki FSH sekresyonundaki inhibisyon, postnatal erken dönemde olmakta ve pubertede en yüksek seviyeye çıkmaktadır. **(255)** İnhibinin hipofiz bezinde yarattığı FSH salgısını inhibe edici etkisi GnRH ile baskılanamaz. İnhibin düşük GnRH koşullarında LH sekresyonunu suprese eder. **(254)**

İnhibinler, ovaryumlarda parakrin faktörler olarak etki gösterirler. **(283)** Ovaryumdaki inhibinler teka hücrelerinden androjen üretimini arttırmalar. Foliküler gelişim sırasında granüloza hücrelerinde artan miktarlarda üretilen ve antral sıvıda biriken inhibin, komşu teka hücre tabakasında LH ile indüklenen androjen sentezini pozitif yönde etkileyebilirler. Böylelikle preovulatuvar folikül için östrojen sentezinde kullanılacak androjen substratı elde edilir. **(214)**

İmmatür 10-24 günlük sıçan ovaryumlarında foliküllerde, inhibin  $\alpha$  ve  $\beta A$  subuniteleri immunohistokimyasal yöntemlerle tespit edilebilir. Oosit ve teka interna hücrelerinde inhibin  $\alpha$  ve  $\beta$  boyanması görülmez. Dolayısıyla prepubertal dönem sıçanlarda matür foliküllerin sayısı arttıkça inhibin sekresyonu olmaktadır. **(150)** Sıçanlarda yapılan çalışmalarda korpus luteum inhibin  $\alpha$  subunitelerinin ana kaynağı olduğu görülür. **(92)**

İnsan ovaryumlarında inhibin  $\alpha$ ,  $\beta A$  ve  $\beta B$  subunitelerinin immunohistokimyasal lokalizasyonları foliküler gelişim içerisinde incelendiğinde immunreaktif antisera  $\alpha$  ve  $\beta B$ ' ye karşı immun boyanma teka ya da interstisyel hücrelerde yokken granüloza hücrelerinde gözlenir. Preantral ve küçük antral foliküllerde granüloza hücreleri  $\beta A$  ve  $\beta B$  subunitelerine karşı pozitif boyanma gösterirken  $\alpha$  subunitelerine karşı negatif immun boyanma gösterir. Orta boylu foliküllerde midfoliküler faz esnasında granüloza hücrelerinde  $\alpha$  ve  $\beta B$  subunitelerine karşı pozitif immun boyanma görülür. Bunun aksine benzer boyuttaki atretik foliküllerde granüloza hücrelerinde inhibin  $\alpha$ ,  $\beta A$  ve  $\beta B$  subunitelerinde boyanma tespit edilmez. Preovulatuvar foliküllerin granuloza hücrelerinde üç inhibin subunitesi için artmış boyanma gösterilir. İnhibin subunitelerinin immunreaktivitesi menstrual siklus boyunca olmakta ve her bir inhibin subunitelerinin boyanma yoğunluğu foliküler gelişim ve maturasyon esnasında değişmektedir. **(284)**

İnhibinin B, siklus içi FSH yükselmesinden sonra erken foliküler fazda tepe noktasına ulaşır ve foliküler fazın geriye kalan kısmında düşer. Siklus pikinden sonra inhibin B konsantrasyonlarında hafif bir artış mevcuttur. Sonrasında ise luteal faz boyunca inhibin B düzeyleri düşer. İnhibin A konsantrasyonları erken foliküler fazda düşüktür. Ovulasyonda artar ve midluteal fazda tepe noktasına ulaşır. Erken foliküler fazda foliküler sıvıda, inhibin B konsantrasyonları, inhibin A konsantrasyonlarının 20-200 katı kadardır. Dolayısıyla inhibin B preovulatuvar folikülde yani gelişen foliküllerde predominanttır. İnhibin A dominant folikülde ve korpus luteumda predominanttır. **(103)**

İnhibin subunitelerinin foliküler gelişim basamakları boyunca üretimi vardır. Preantral foliküllerde  $\alpha$  subunitesi sekrete edilmeden  $\beta$ B üretimi olmaz. Bunun sonucunda üretilen aktivin B dir. Foliküler gelişim basamakları ilerledikçe FSH  $\alpha$  subunitesinin ve  $\beta$ B sekresyonunu sağlar. İnhibin B sekresyonu artar. Folikül ovulasyona doğru ilerledikçe dominant folikülde  $\beta$ A sekresyonu artışı sonucunda midsiklusta serumda inhibin A artmaktadır. Bu durum FSH düzeylerinde düşmeye neden olmakta ve bu da küçük foliküllerden  $\beta$ B sekresyonunu azaltmaktadır. LH yükselmesi bütün inhibin subunitelerinde düşüklükle beraberdir **(222)**. GnRH agonistleri ovulatuvar hastalara uygulanmasından sonra serum inhibin düzeylerinde düşme olur. FSH uygulamasında kan inhibin A konsantrasyonlarında değişiklik olmaz. FSH uygulanması bu düşüklüğü durduramaz **(107)**. Fakat hCG uygulanması inhibin A düzeylerini artırır. Dolayısıyla luteal fazda inhibin A sekresyonu FSH değil LH bağımlıdır **(179)**.

İnhibin subunitesi transkriptleri büyük foliküllerin hem granüloza hücreleri ( $\alpha$ ,  $\beta$ A) hem de teka interna ( $\alpha$ ) hücrelerinde varken, granuloza hücrelerinden yoksun olan dejenere foliküllerde yoktur. **(183)**

Sıçanların ovaryumlarında proestrusta gonadotropin yükselmesinden ve ovulasyondan sonra  $\alpha$  ve  $\beta$ A mRNA düzeyleri yüksektir. **(133)**

Perimenopozal hastalarda bazal FSH artışı ve E2 artışı olmaktadır. Bu değişikliklerin olmasından önce inhibin B düzeylerinde düşüklük olur. **(207)** Perimenopozal dönemde luteal fonksiyonların baskılanması sonrasında serum inhibin A düzeylerinde de düşüklük olur. **(48, 158)** Menopoz sonrasında inhibin A ve inhibin B konsantrasyonları saptanamayacak düzeye düşer. **(213)**

Yaşlı hastalarda inhibin B düzeylerinde düşüklük olmasına rağmen inhibin A konsantrasyonları genç hastalarla benzerdir. **(107)**

Ovulatuvar stimulus esnasında serum inhibin A ve inhibin B, toplanan oosit sayıları yaşla kontrol edildiğinde gebeliği öngörmeye kullanılabilir. İnhibin A düzeyleri embriyo sayısı ile korelasyon gösterirken, ne inhibin A ne de inhibin B yaş ve toplanan oosit sayısından daha değerli değildir. Dolayısıyla reproduktif teknoloji kullanılacak hastalarda yaş ve oosit sayısı en güçlü prediktördür. Siklusa başlamadan ölçülecek inhibin B bazal FSH kombinasyonu başarılı sonucu öngörmeye kullanılabilir. Ovulasyon esnasında yüksek konsantrasyonlarda serum inhibin A ve inhibin B düzeyleri başarılı IVF sikluslarını öngörmeye kullanılabilir ve oosit kalitesinin ve sayısının bir işareti olarak kullanılabilir **(106)**. Foliküler sıvıda artan konsantrasyonlarda inhibin A, inhibin B olan hastalarda başarılı gebelikler artmaktadır. **(200)**

Folikül kaybında FSH' da gerçek bir artış ve inhibinde ise azalma olmaktadır. Hızlanan kayıp, FSH stimülasyonundaki artışa ikincil olarak gelişmiş olabilir. FSH'daki artış yaşlanan folikülün kalite ve kapasitesindeki azalmayı yansıtmaktadır. İnhibindeki azalma ise, hipofiz bezi tarafından salgılanan FSH salınımı üzerine granüloza hücre üretimi ile olan önemli negatif feedback etkisinin değiştiğini gösterir. İnhibin A ve inhibin B' nin her ikisinin bu olayda rol alması muhtemeldir. Çünkü inhibin A' nın luteal faz seviyeleri ve inhibin B' nin foliküler faz seviyeleri yaş ile birlikte azalmakta ve FSH' da yükselme olmadan önce ortaya çıkmaktadır. Ancak Avusturalya' da yapılan bir çalışmada, FSH' daki artışın sadece inhibin B' de ki azalma ile korele olduğu ve cevap olarak estradiol konsantrasyonlarında hafif bir artışın olduğunu gösterir. **(32)**

İnhibin üretiminin azalması, ya folikül sayısının azaldığını ya da yaşlı folikülün fonksiyonel kapasitesinin azaldığını yansıtabilmektedir. Preovulatuvar foliküler sıvıdaki inhibin konsantrasyonu genç ve yaşlı adet gören kadında benzerdir. Bu da kalan folliküllerin sayısının en önemli faktör olduğunu göstermektedir. **(145)**.

İnhibin düzeyleri menopoz dönüşümüne giren kadınlarda değişir. Genç kadınlar ile karşılaştırıldığında menopozal dönüşümdeki yaşlı kadınlarda erken foliküler fazda daha düşük inhibin B düzeyleri görülür. **(297)** İnhibin A düzeyleri,

LH pikini takiben yaşlı kadında geçici, keskin ve hızlı bir düşüşten başka, iki grup arasında farklı değildir. **(278)**

İnhibin B nin negatif feedback'inin azalması erken menopozal dönüşüm esnasında FSH düzeylerinde artışa neden olur. İnhibinler TGF-beta süper ailesi üyesidirler. İnhibin B ovaryumlarda granüloza hücrelerinde üretilirler ve primer olarak hipofizden FSH salınımını inhibe ederler. Menopozal dönüşüm esnasında inhibin B düzeyleri, ovaryum fonksiyonların azalması ile düşmeye başlarlar. Perifer ile dolaşımdaki yüksek FSH düzeyleri, ovaryumlarda östrojen üretimini artırır. Buda yüksek östrojen düzeyinden sorumludur. **(290)**

### **2.11. Androjen Reseptörü (AR)**

Androjen reseptör (AR) geni, X kromozomunun uzun kolunda (q11-12) bulunan 170-180 kbp'lık bir genidir. AR proteini yapısal ve fonksiyonel olarak 4 farklı kısımdan oluşur. Proteinin sinyal iletiminden sorumlu C terminali, liganda bağlanan 60-100 amino asit içeren ligand bağlayıcı kısım, DNA'ya bağlanan kısım, 608-625 amino asitten oluşan eklem (hinge) kısmı ve proteinin transkripsiyon regülasyonundan sorumlu N-terminal kısmı **(28, 29)**.

Androjenler steroid hormonlardır. Bütün androjenler için tek bir reseptör vardır. Bu reseptör en yüksek affinite ile testesteron ve dihidrotestesterona bağlanır **(298)**. Androstenadion, östradiol ve progesteron gibi diğer androjenler ise reseptöre testosterona göre daha düşük afiniteye sahiptirler. Steroid reseptörler DNA'ya bağlanarak ve gen transkripsiyonunu düzenleyerek etki gösterirler **(60)**. Androjen reseptörleri sentezlendikten sonra fosforilasyona uğrar. Böylelikle hormon bağlayıcı kapasite kazanır. Hormon bağlandıktan sonra ikinci fosforilasyon basamağı gerçekleşir ve böylelikle AR DNA ya bağlanma kapasitesi elde eder **(138)**.

Reseptör sayısında, fosforilasyon durumunda, polimorfik varyasyonlarda farklılıklar androjenlere karşı doku cevabını belirler **(28, 29)**. Liganda bağlı olmadığı durumda androjen reseptörü sitoplazmada HSP 90, HSP 70 ve HSP 56 ya bağlıdır. Böylelikle AR ün tersiyer yapısı stabilize olur ve sürekli reseptör aktivasyonu engellenmiş olur. Ligand bağlanması reseptör yapısında konformasyonel değişikliklere neden olur ve HSP ler reseptörden ayrılır. AR-ligand nükleusa doğru hareket eder. Nükleusta DNA ya bağlanır ve transkripsiyon gerçekleşir. **(130)**

Sıçanlarda yapılan çalışmalarda AR immun reaktivitesi primer, sekonder, matür foliküllerin granüloza hücrelerinin nukleuslarında gösterilmiştir. Primordial foliküller ve korpus luteumlarda gösterilememiştir. İnterstisyel hücrelerde dağılmış şekilde immunreaktivite gösterilmiştir. Oviduktlarda stroma ve epitelyum hücre ve kas tabakası hücre nukleuslarında AR inmmunreaktivitesi gözlenmiştir. Uterusta bezlerde ve yüzey epitelinde AR immunreaktivitesi vardır. Endometriumda stromal hücrelerde ve kas hücrelerindedede AR boyanması gözlenmektedir **(209)**.

Sıçanlarda ovaryum foliküllerinde gelişme oldukça AR oranları düşmektedir. Foliküllerin FSH ve LH ile stimülasyonu sonrasında AR konsantrasyonları düşmekte ve aynı foliküllerde aromataz enzim ekspresyonu artmaktadır. Preovulatuvar folikül gelişiminde AR miktarı düşmektedir.**(302)** Androjenler tarafından azalan AR konsantrasyonu FSH uygulamasıyla düzeltilmektedir.**(303)** AR miktarları mural granüloza hücrelerinde azalmaya başlar fakat ovulasyona yakın dönemlerde oosite yakın kumulus hücrelerinde halen AR ekspresyonu vardır. Bu olay androjenlerin parakrin etkiyle ovulasyon süresindedede rol alabileceğini göstermektedir. **(245)**

Gebelikte yoğun bir foliküler atrezi süreci yaşanır. Bu süreçte androjen reseptör ekspresyonu mural granuloza hücrelerinde azalırken kumulus hücrelerde halen yoğun şekilde gözlenmektedir. Oositlerin nukleoluslarında son döneme kadar AR boyanması gözlenmektedir. **(304)**

Primordial, primer, ve bazı sekonder folliküllerde oositlerde gittikçe azalan immun boyanma vardır. Antral foliküllerden elde edilen oositler immunohistokimyasal olarak daha zayıf boyanmaktadır. Germinal veziküllerde sitoplazmadan daha az immun boyanma vardır ve bu boyanmada AR ün sitoplazmik olarak azalması ile beraber azalır. Bunun aksine, sekonder ve antral foliküllere doğru gidildikçe nukleoluslarda daha kuvvetli immun boyanma gözlenmektedir. Nukleoluslardaki AR boyanması atretik foliküllerde oosit fragmentasyonu sonrasında dahi gözlenmektedir. Bu bulgular göstermektedir ki oosit gelişimi esnasında AR oositin sitoplazmasından GV oradan da nukleolusa doğru hareket etmektedir. **(305)**

Over ve testislerde 9. Haftada her iki sekstede AR boyanması gözlenirken 10. Haftada sadece erkekelerde AR boyanması vardır. 11. Haftada fetal testislerde AR boyanması yoktur. Dolayısıyla insan fetal hayatında urogenital sinus ve seks farklılaşmasında AR lerin rolü vardır. **(306)**

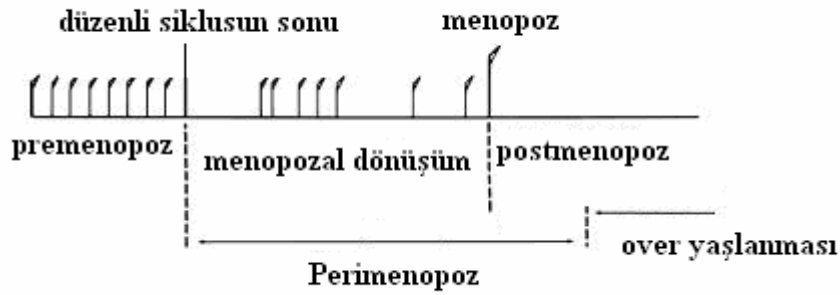
İnsan menstrual siklus süresince AR konsantrasyonları araştırılmıştır. Primordial ve primer foliküllerde AR ekspresyonu yapmamaktadır. Sekonder folliküllerin granuloza hücre ve teka hücrelerinde zayıf nükleer AR boyanması vardır. Dominan follikülün granuloza hücreleri orta derecede AR boyanması varken, boyanma şiddeti tekal hücrelerde gözlenenden fazladır. Luteal fazda AR boyanma yoğunluğu en fazla ovulasyon öncesi erken luteal fazda olmakta ve sonrasında azalmaktadır. Atretik foliküllerde teka hücrelerde gözlenen boyanmadan daha şiddetli bir nükleer boyanma vardır. Follikülleri çevreleyen stromal hücrelerde zayıf AR nükleer boyanması vardır. Menstrual siklusun her döneminde şiddeti değişmekle beraber overlerde AR ekspresyonu vardır. Dolayısıyla intraovaryan mikroçevrede androjenler ve olasılıkla aracılığı olan AR ler folliküler gelişme ve maturasyon, atrezi ve luteinizasyonda otokrin ve parakrin role sahiptir. **(307)** İnsan over yüzey epitelinde AR ler vardır. Over yüzey epiteli androjen uyarısı ile proliferer olur ve apoptos bu hücrelerde azalır. Dolayısıyla artmış karsinogenezde androjenler rol alabilir. **(308)**

## 2.12. Perimenopozal Dönem

Menopoz, menstruasyonun kalıcı olarak durması şeklinde tanımlanır ve ovaryumdaki foliküler aktivitenin kaybı ile sonuçlanır. Amenorenin 12 ay boyunca sürmesiyle tanınır. Sıklıkla son menstrual periyod (FMP) terimi kullanılır, fakat, bağımsız biyolojik markırı yoktur. **(33)**

Perimenopoz, menopozun başlangıcına yakın endokrinolojik, biyolojik ve klinik özellikler taşıdığından, menopozdan hemen önceki ve menopozdan sonraki ilk yıldır. Menopozal dönüşüm, menstrual düzensizliğin arttığı FMP den önceki zamandır. **(şekil 2.8)**

Menstrual siklus düzenindeki değişiklikler, menopozal dönüşümün karakteristiğidir ve ovaryumlarda, hipotalamo-pituiter-gonodal aksta veya uterusda yaş ilişkili değişikliklerden olabildiği düşünülmektedir. Menstruasyonu düzenli olan kadınların folikül sayılarının menstrual dönüşümdeki kadınların folikül sayılarından daha çok olduğu görülür. **(221)**



**Şekil 2.8.** Reprodüktif yaşam ve menopozal dönüşüm

Reproduktif yaşlanma için, menstrual siklus paterni ve FSH düzeylerini temel alan yedi evre ile yeni sınıflama sistemi oluşturulmuştur.(699)

Menopozal dönüşüm erken ve geç evreye bölünmüştür. Menstruel siklus değişiklikleri ve FSH düzeyinin yüksekliği tanımlanır. Erken menopozal dönüşümde menstruel siklus değişikliği yedi gün veya daha çok siklus arası uzunlukta değişme ile karakterizedir. Geç menopozal dönüşüm ise 2 veya daha çok siklus atlama ile karakterizedir. Menopozal dönüşümün sonu FMP ile dir. (8)

Menstruel düzensizlik, perimenopozal geçiş olarak adlandırılan objektif olarak tanımda kullanılabilen tek belirteçtir. Menopoz ovaryum aktivitelerinin kaybını takip eden dönemde menstruasyonun tamamen kesildiği noktadır. Menopoz yunanca kökenli kelimeleri men (ay) ve pausis (kesilme)' den türemiştir. Normal ovulatuvar siklustan mensin kesildiği dönemi içeren menopoz öncesi yıllar perimenopozal geçiş yılları olarak bilinir. Buradaki en belirgin özellik menstrual siklustaki düzensizliktir. Klimakterik, daha yaşlı, daha genel ve daha az kesinliği olan terimdir. Hayatın reproduktif durumundan perimenopozal geçiş ve menopozdan postmenopozal yıllara geçiş dönemini işaret eder. Klimakterium merdiven anlamına gelen yunanca kökenli sözcükten gelir. (143)

Menstrual siklus uzunluğuna foliküler büyüme gelişmesinin kalitesi ve hızı ile karar verilir. Menarşi takiben; ilk 5-7 yıl diğerlerine göre uzun sikluslar, daha sonra sikluslar kısalarak artan bir regülarite oluşur ve doğal reproduktif yaş şekline ulaşır. Kırk yaşlarında, sikluslar tekrar uzamaya başlar. Anovulatuvar siklusun en yüksek insidansı 20 yaş altı ve 40 yaş üstüdür.



Kırk yaşlarında kadınlarda anovulasyon daha belirgin hale gelmekte, fakat menapozdan 2-8 yıl önce yani anovulasyon öncesi siklus süresi uzamaktadır. Mensin kesildiği yaştan bağımsız olarak; uzun sikluslar menopoza doğru ilerler. Menopoz erken veya geç olabilmektedir. Foliküler faz siklus uzunluğunun ana belirleyicisidir. Menopoz öncesi bu menstrual sikluskdaki bu değişiklik FSH seviyelerinde artma, inhibin seviyesinde azalma, fakat normal LH ve hafif yükselmiş estradiol seviyeleri ile karakterizedir.

Kadında, akselerasyon gösteren foliküler azalma ve fertilitede düşme 37-38 yaşlarda başlamakta ve menopoz bunu takip eden yaklaşık 13 yıl sonra oluşmaktadır (ortalama yaş 51). Ama epidemiyolojik çalışmalar genel populusyonda yaklaşık %10 kadının 45 yaşında menapoza girdiğini göstermiştir. Muhtemelen bu kadınlar normal ovaryum folikül havuzundan daha küçük bir havuz ile doğmakta. Bu havuz erken yaşlarda fonksiyonel olarak tükenmektedir. Menopoz yaşa bakmaksızın eşik değeri olan folikül sayısı 1000'in altına düşünce olmaktadır.

Geçmiş inanışların aksine östradiol seviyeleri menopoz öncesi yıllarda dereceli olarak azalmaz, foliküler büyüme ve gelişmenin kesilmesinden yaklaşık bir yıl önceye kadar normal sınırlarda hatta hafif yükselmiş olarak kalmaktadır. Menopoz öncesi bir yıla kadar östrojen seviyelerinde major bir azalma başlamamaktadır. **(32, 159, 217)** Aslında, perimenapozal geçişi yaşayan kadın daha yüksek östrojen seviyelerine sahiptir. Bu yıllarda, artmış olan FSH salınımı, artmış ovaryum folikül cevabı oluşturur. **(230)**

Perimenopozal geçiş süresince ovaryumlarda son folikül tükeninceye kadar hızlanmış şekilde kaybolmaya başlar. İnsan ovaryumlarının çalışmasında hızlanan kayıp 37-38 yaştaki normal kadınlarda toplam folikül sayısının 25000'e ulaştığı zaman başlar. **(83)**

FSH seviyelerinin artışı ile foliküler faz kısılır ve östradiyol seviyeleri erken olarak artar. Bu yüksek FSH seviyeleri foliküler gelişimi stimüle eder. **(144)** Östradiyol seviyelerindeki erken ani artışların foliküler büyüme sonucu değil siklusun başında ilerlemiş foliküler gelişim ve dominant folikülünün erken seçiminden olduğu düşünülür. **(146, 265)**

Menopozal dönüşüm, ovaryum primordiyal folikül sayısında azalma olduğunda meydana gelir. Dolaşımdaki AMH daki major azalma bunu yansıtır.

Dönüşümün başlamasının en önemli klinik özelliği siklus düzensizliğidir. İnhibin B, FSH salınımının düzenlenmesinde anahtar rol oynar. **(33)**

Gonodotropinlerin düzeyindeki değişiklikler, menstrual siklusun foliküler ve luteal fazının her ikisinde menopozal dönüşüm esnasında meydana gelir. **(147, 278)**. Erken foliküler ve erken luteal fazda FSH düzeyleri yaşlı kadınlarda (35-46 yaş) genç kadınlardan (20-34 yaş) daha yüksektir. **(278)** Orta ve geç luteal fazda FSH düzeyleri her iki grup kadında benzerdir. **(8)**

Östrojen düzeyleri erken menopozal dönüşüm esnasında yükselir. Orta ve geç foliküler fazda östradiyol düzeyleri yaşlı kadınlarda genç kadınlardan yüksektir. Luteal fazda östradiyol düzeyleri her iki grupta da aynıdır. **(278)** Farklı yaşlarda perimenopoz dönemindeki kadınlarda östrojenin toplam ortalama menstrual siklus salınımı yaşlı kadınlarda gençlere kıyasla daha yüksektir. **(230)**

Oositlerin sayısında kademeli azalma ve ovaryum korteksinin incilmesi ile ovarian hilus ve medulladaki kan damarlarında sklerozis ve sonucunda oksijenasyonda azalma meydana gelir. Menopoz oluşmasıyla ovaryumlar ince, buruşuk ve çok küçük hale gelir. **(42)** Otuzlu yaşlardan sonra ovaryum boyutunda azalma başlar 70 li yaşlara kadar her bir dekada ovaryumun hacminde önemli azalmalar görülür. **(208)**. Ovaryum hacmi östrojen tedavisi almayanlarla karşılaştırıldığında östrojen alanlarda bile küçüktür. Eksojen hormonlar ovaryumların gonodotropin salınımını baskılayarak folikülogenezisi azaltır. **(290)**

Gelişimsel olarak, kadınlar en yüksek oosit sayısına hamileliğin 20. haftasında ulaşır. Bu sayı bundan sonra dramatik olarak azalır **(22)**. Bu azalmanın sebebi açık değildir. Fakat, büyüme farklılaştırıcı faktör-9 **(108)** gibi büyüme faktörleri ve periferik kan akımından koruyan bazal membran ile oositi çevreleyen tek tabaka granüloza hücreleri için gerekli anatomik yapı sorunları gibi durumlar sebep olarak göz önünde bulundurulur. Kadınlar, oositlerin çevresel etkilerden korunmasını sağlamalıdır. Tanımlanmış toksinlerden en bilineninden bir tanesi sigaradır. Diğer biride galaktozdur **(178, 45)**. Sigara içen kadınlar, içmeyenlere göre 1-2 yıl daha erken menopoza girerler. Sigara içenler, sigarayı bırakanlar veya hiç içmeyenler ile karşılaştırıldığında, sosyoekonomik durum, bazal metabolik indeks ve pariteden bağımsız olarak daha erken menopozal dönüşüme uğrarlar. Parite, erken menopozal dönüşüm ve menopoz riskini azaltır. **(290)**

### 3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

Araştırmamızda 28 günlük, 40-60 g ağırlığında, toplam 40 adet immatür dişi Sprague Dawley türü sıçan kullanıldı. Sıçanlar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Tıbbi Cerrahi Araştırma Merkezi (TICAM) tarafından sağlandı. Hayvanlara yapılacak uygulamalar için ESOĞÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulun' dan 25.11.2009 tarihinde 58 dosya numaralı etik kurul onayı alındı.

Sıçanlar deney süresince 12 saat aydınlık/karanlık ışıklandırması olan, ısısı  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$  ve nemi  $\%55\pm 5$  olarak ayarlanmış ortamda yaşatıldı. Hayvanlar deneye başlamadan 1 hafta önce polikarbon şeffaf kafeslere konularak ortam koşullarına adaptasyonları sağlandı. Yiyecek ve su ihtiyaçları sınırsız ve günlük olarak sağlandı ve kontrol edildi. Sağlık durumları ve besin ihtiyaçları günlük olarak temin edildi. Deneyin başında ve sonunda vücut ağırlıkları tartıldı. Deney sonunda ise vajinal smear ile siklus tayinleri ve ayrıca ovaryumların ve uterusların ağırlıkları ölçüldü.

#### 3.1. Kimyasal Maddeler ve Uygulamaları

Deney gruplarında kimyasal maddeler olarak 4-Vinylcyclohexene diepoksit (VCD) (Fluka, 1302946, 250 ml), dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA, 48H0074, 1l) ve Dehidroepiandrosteron (DHEA) (Sigma, D4000, 25 g) kullanıldı. Gruplara 15 gün boyunca DMSO da çözdürülen VCD ve DHEA 55 gün boyunca intraperitoneal (i.p.) olarak ve her hayvana eşit miktarda (0,02 ml) olacak şekilde verildi. Dozların miktarları ön çalışma ile belirlendi. Enjeksiyonlar, her bir hayvan için ayrı enjektörler kullanılarak ve her gün aynı saate yapıldı. Deneyin başlangıcından itibaren 55 gün sonunda, sakrifikasyon işlemi öncesi anestezi için ketamin 90 mg/kg (Ketalar, 50 mg/ml, flakon, Pfizer) ve ksilazin 10 mg/kg (Rompun, %2' lik injeksiyonluk solusyon, Bayer) kullanıldı.

#### 3.2. Deney Grupları

Araştırmamızdaki sıçanlar rastgele seçimle, her grupta 10 adet olmak üzere Vinilsikloheksen diepoksit (VCD), Dehidroepiandrosteron (DH), Vinilsikloheksen diepoksit + Dehidroepiandrosteron (VDH) ve kontrol grubu olarak dört gruba ayrıldı.

### 3.3. Ovaryum ve Uterus Örneklerinin Değerlendirmeleri

Deney süresi sona erdiğinde son dozdan sonra her bir sıçanın vaginal smearları alınarak siklusları tespit edildi ve 4 saat sonra ketamin ve ksilazin anestezisi uygulandı. Sıçanlar, servikal dislokasyon ile öldürüldükten sonra intrakardiyak kan örnekleri alındı ve uterus ve ovaryumları alındı ve ağırlıkları hassas terazide dikkatli bir şekilde tartıldı. Ovaryumlar tartım işleminden sonra sol ovaryum Bouin fiksatifinde 18-20 saat süre ile fikse edildi. İşlemler organların otoliz olmaması için hızlı bir şekilde yapıldı. Fiksasyon işleminden sonra alınan dokulara uygun takip işlemi yapılarak parafin blokları hazırlandı.

Alınan kan örneklerinin santrifüj ile serumları ayrıldı. ELISA yöntemi ile serum FSH, estradiol, antimüllerian hormon ve inhibin düzeyleri ölçüldü.

Parafin blokları hazırlanan dokuların her birinden 5µm kalınlığındaki seri kesitler alındı. Kesitlerde genel değerlendirme ve folikül sayısı tespiti için H&E boyama, apoptozu incelemek için terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick and labelling (TUNEL) ve kaspaz-3, anti müllerian hormon (AMH) ve androjen reseptörlerinin (AR) yoğunluğunu belirlemek için immünohistokimyasal boyama yapıldı.

### 3.4. Folikül Sayılarının Tespiti

Işık mikroskobu ile ovaryumlara ait kesitlerde bulunan foliküller sayıldı. Ovaryumlardan alınan her hayvana ait her 40. kesitte foliküller sayıldı. **(175)** Kesitlerde, tek katlı yassı folikül hücreleri bulunan foliküller primordiyal folikül, tek katlı kübik folikül hücreleri bulunan foliküller primer folikül, iki veya daha çok katlı follikül hücreleri bulunan ve folikül hücreleri arasında antral boşluk bulunmayan foliküller sekonder folikül, çok katlı folikül hücreleri arasında antral boşluk bulunan foliküller antral folikül olarak değerlendirildi. **(175)** Bu foliküller sağlıklı folikül olarak değerlendirildi. Granüloza hücre nükleuslarında piknozis ve kromatin kondensasyonu ve granüloza hücreleri ve oositler arası ilişkinin ve düzenin bozulmuş olduğu, oositleri eozinofilik boyalı olan foliküller atretik folikül olarak değerlendirildi. **(239)** Ayrıca ovaryumlarda bulunan korpus luteum ve folikül kistlerinin de sayımı yapıldı. Azalmış granüloza hücre tabakası ve kalın teka interna

tabakasıyla içi sıvı dolu büyük yapılar folikül kisti olarak değerlendirildi.(299)

Foliküllerin çapları oküler mikrometre yardımıyla ölçüldü.

İmmünohistokimyasal boyaların (AMH, TUNEL, Kaspaz-3, AR) değerlendirilmesi için rasgele seçilmiş 25 kesitte oküler mikrometresi yardımıyla X40 büyütme ile 50 alanda sayım yapıldı. Histopatolojik değerlendirme için kesitlere H&E boyası uygulandı. Kesitlerin fotoğrafları yüksek çözünürlükteki Olympus BH-2 marka fotomikroskop (Olympus Corp. Tokyo, Japonya)'a monte edilmiş DP 70 dijital kamera kullanılarak çekildi.

### 3.5. Ovaryum için uygulanan doku takibi

- Boin solüsyonunda fiksasyon : 18-24 saat
- 30°'lik alkol : 1 saat
- 50°'lik alkol : 1 saat
- 70°'lik alkol : 1 saat
- 80°' lik alkol : 15 dakika
- 90°' lik alkol : 15 dakika
- 96°' lik alkol I : 10 dakika
- 96°' lik alkol II : 10 dakika
- Ksilol I : 10 dakika
- Ksilol II : 15 dakika
- Parafin I : 45 dakika
- Parafin II : 1 saat
- Parafin III : 1 saat

### 3.6. Hematoksilin-Eozin yöntemi

- Ksilol I :20 dakika
- Ksilol II :20 dakika
- 96°' lik alkol I :5 dakika
- 96°' lik alkol II :5 dakika
- 90°' lik alkol :5 dakika
- 80°'lik alkol :5 dakika
- 70°'lik alkol :5 dakika

- Distile Su :5 dakika
- Hematoksinin :2 dakika
- Yıkama (akar suda) :5 dakika
- Eozin :5 dakika
- 70°'lik alkol :3 dakika
- 80°' lik alkol :3 dakika
- 90°' lik alkol :3 dakika
- 96°' lik alkol I :3 dakika
- 96°' lik alkol II :3 dakika
- Ksilol I :20 dakika
- Ksilol II :20 dakika

### 3.7. TUNEL Yöntemi

Apoptoz rutin histolojik kesitler ile gösterilebilir. Ancak daha hassas yöntemler bulunur. Bu yöntemlerin başında TUNEL gelmektedir. Apoptotik sinyaller DNA üzerinde kırıklar oluşturur. Açığa çıkan DNA parçalarının 3'-OH uçlarına terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) aracılığı ile digoxigenin işaretlenmiş ve işaretlenmemiş deoksinükleotidler eklenir. Daha sonra digoxigenin işaretlenmiş yeni nükleotidler anti-digoxigenin konjugatı ile tespit edilir. Diaminobenzidine işaretlenmiş örnek ile tepkimeye girerek DNA kırığı bölgesinde çözünemeyen substrat oluşturulur.

#### 3.7.1. Kullanılan kit

*Apoptag plus peroxidase in situ apoptosis detection kit (S7101 Chemicon international)*

#### 3.7.2. Yöntem

- Ksilol I :5 dakika
- Ksilol II :5 dakika
- Ksilol III :5 dakika
- 100°'lik alkol I :3 dakika
- 100°'lik alkol II :3 dakika

- 95°'lik alkol :3 dakika
- 70°'lik alkol :3 dakika
- Fosfat buffer solüsyonu (PBS) :5 dakika
- Proteinaz K solüsyonunda :15 dakika
- Distile su I :2 dakika
- Distile su II :2 dakika
- % 3'lük hidrojen peroksid :5 dakika
- PBS :5-10 dakika çalkalama
- Equilibration buffer :5 dakika
- TdT enzimi 37°C'de nemli ortamda :1 saat
- Working Stop/ Wash buffer I :15 saniye çalkalanır
- Working Stop/ Wash buffer II :10 dakika
- PBS I :1 dakika
- PBS II :1 dakika
- PBS III :1 dakika
- Anti-digoxigenin peroksidaz damlatılır  
üzerlerine plastik coverslip ile kapatılır  
ve nemli ortam oluşturulur :30 dakika
- PBS I :2 dakika
- PBS II :2 dakika
- PBS III :2 dakika
- PBS IV :2 dakika
- DAB solüsyonu :10 dakika
- Distile su I :1 dakika
- Distile su II :1 dakika
- Distile su III :5 dakika
- Metil green :15 dakika
- Distile su I :10 saniye
- Distile su II :10 saniye
- Distile su III :10 saniye
- Bütanol :10 saniye
- Ksilol :2 dakika

- Ksilol :2 dakika
- Ksilol :5 dakika

### 3.7.3. Apoptoz görülen hücre sayımı

Işık mikroskobu ile her hayvana ait rastgele seçilmiş 25 kesitlerde X40 objektif ile 50 alandaki tüm foliküllerde ayrı ayrı kahverengi boyanmış hücreleri sayılarak ortalama alınmıştır.

### 3.8. Kaspaz-3 İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi

Apoptoza giren hücrelerde kaspaz 3 aşaması ve geri dönüşümsüz bir noktadır. Çeşitli sebeplerle apoptoz oluştuğunda kaspaz-3 aktivasyonu ile ölüm gerçekleşir. Araştırmamızda kaspaz-3 immünohistokimyasal olarak boyanma yoğunluğu dikkate alınarak değerlendirildi. Skorlama aşağıda gösterildi (**86**).

- 0: Hiçbir boyanma yok
- 1: Çok az boyanma var
- 2: Şiddetli boyanma var

#### 3.8.1. Kullanılan antikorlar

Primer antikor olarak *Rabbit Anti-Active Caspase-3 Polyclonal Antibody (AB3623 Chemicon)* kullanıldı. Sekonder antikor olarak *HRP/AEC (Thermo Fisher Scientific Anatomical Pathology, USA)* kit kullanıldı.

#### 3.8.2. Yöntem

- Ksilol I :5 dakika
- Ksilol II :5 dakika
- 96° lik alkol I :5 dakika
- 96° lik alkol II :5 dakika
- 70° lik alkol I :5 dakika
- 70°lik alkol II :5 dakika
- PBS :1 dakika
- PBS :1 dakika
- Antijeni açığa çıkarmak için pH 6.0



- olan 10mM sodyum sitrat buffer içinde  
kaynatıldı :5 dakika
- Soğumaya bırakılır :20 dakika
  - Çeşme suyu :5 dakika
  - PBS :1 dakika
  - PBS :1 dakika
  - %3'lük Hidrojen peroksit :10 dakika
  - Distile Su :30 saniye
  - Ultra V Blok :5 dakika (nemli ortam)
  - Primer Antikor :1 gece (nemli ortam)
  - PBS :1 dakika
  - PBS :1 dakika
  - Biotinylated goat anti polyvalent :30 dakika
  - PBS :1 dakika
  - PBS :1 dakika
  - Streptavidin Peroxidase :30 dakika
  - PBS :1 dakika
  - PBS :1 dakika
  - Kromojen (30 dakika önce hazırlanmalı):5 dakika (nemli ortam)
  - Çeşme suyu :30 saniye
  - Hematoksilin :10 saniye
  - Çeşme suyu :30 saniye

### 3.9. Anti Müllerian Hormon İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi:

AMH ovaryumdaki folikül rezervlerini belirlemede önemli bir işaretleyicidir. AMH ovaryumdaki foliküllerin etrafını saran granüloza hücrelerinde ve ovaryum stromasında boyanma özelliği göstermektedir. AMH immünohistokimyasal olarak boyanma yoğunluğu dikkate alınarak değerlendirildi. Skorlama aşağıda gösterildi (224).

- 0: Hiçbir boyanma yok
- 1: Çok az boyanma var
- 2: Orta şiddetli boyanma var

3: Yoğun boyanma var.

### 3.9.1. Kullanılan antikorlar

Primer antikor olarak *MIS C-20 (sc-6886 Santa Cruz biotechnology)* kullanıldı. Sekonder antikor olarak *Histofine Simple Stain MAX PO (G) Universal Immunoperoxidase Polymer Anti-Goat (Nichirei Bioscience, Tokyo, JAPAN)* kullanıldı. Kromojen olarak ise *HRP/AEC (Thermo Fisher Scientific Anatomical Pathology, USA)* kit kullanıldı.

### 3.9.2. Yöntem

- Ksilol I :5 dakika
- Ksilol II :5 dakika
- Ksilol II I :5 dakika
- 100° lik alkol I :2 dakika
- 100° lik alkol II :2 dakika
- 96° lik alkol :2 dakika
- 96° lik alkol :2 dakika
- Çeşme suyu :30 saniye
- Distile Su :1 dakika
- Antijeni açığa çıkarmak için pH 6.0 olan 10mM sodyum sitrat buffer içinde kaynatıldı :5 dakika
- Soğumaya bırakılır :20 dakika
- %3' lük Hidrojen peroksid :10 dakika
- Distile Su :30 saniye
- Ultra V Blok :5 dakika (nemli ortam)
- Primer Antikor :2 saat ( nemli ortam)
- PBS :1 dakika
- PBS :1 dakika
- Sekonder Antikor :40 dakika
- PBS :1 dakika
- PBS :1 dakika

- Kromojen (30 dakika önce hazırlanmalı):5 dakika ( nemli ortam)
- Çeşme suyu :30 saniye
- Hematoksilin :10 saniye
- Çeşme suyu :30 saniye
- Distile Su :30 saniye

### 3.10. Androjen reseptör (AR) İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi:

Androjen reseptör (AR), ovaryumdaki foliküllerin etrafını saran granüloza hücrelerinde, teka hücrelerinde ve ovaryum stromasında nükleer boyanma özelliği göstermektedir. AR immünohistokimyasal olarak boyanma yoğunluğu dikkate alınarak değerlendirildi. Skorlama aşağıda gösterildi.

- 0: Boyanma yok
- 1: Hafif boyanma var
- 2: Orta şiddetli boyanma var
- 3: Yoğun boyanma var.

#### 3.10.1. Kullanılan antikorlar

Primer antikor olarak Androjen reseptör (*RB-9030-P0 Thermo scientific*) kullanıldı. Boyama tekniğinin diğer basamaklarda *HRP/AEC (Thermo Fisher Scientific Anatomical Pathology, USA)* kit kullanıldı.

#### 3.10.2. Yöntem

- Ksilol I :5 dakika
- Ksilol II :5 dakika
- 96° lik alkol :5 dakika
- 96°lik alkol :5 dakika
- 70° lik alkol :5 dakika
- 50° lik alkol :5 dakika
- 25° lik alkol :5 dakika
- PBS :5 dakika
- PBS :5 dakika
- Antijeni açığa çıkarmak için pH 6.0

- olan 10mM sodyum sitrat buffer  
içinde kaynatıldı :3 dakika
- Soğumaya bırakılır :20 dakika
  - Çeşme suyu :30 saniye
  - PBS :5 dakika
  - %3'lük Hidrojen peroksit :10 dakika
  - Distile Su :5 dakika
  - Ultra V Blok :5 dakika (nemli ortam)
  - Primer Antikor :30-60 dakika ( nemli ortam)
  - PBS :1 dakika
  - PBS :1 dakika
  - Sekonder Antikor :20 dakika
  - PBS :1 dakika
  - PBS :1 dakika
  - Streptavidin peroxidase :20 dakika
  - PBS :1 dakika
  - PBS :1 dakika
  - Kromojen (30 dakika önce hazırlanmalı) :10 dakika ( nemli ortam)
  - Çeşme suyu :30 saniye
  - Hematoksin :10 saniye
  - Çeşme suyu :30 saniye
  - Distile Su :30 saniye

### 3.11. ELISA

#### 3.11.1. Anti-Mullerian Hormon Ölçüm Yöntemi

ELISA yöntemiyle *Diagnostic Systems Laboratories (Texas, USA)* firmasına ait, *ACTIVE MIS/AMH ELISA DSL-10- 14400* adlı kit kullanılarak çalışıldı ve AMH düzeylerinin ölçümü yapıldı. Bu yöntem, enzimatik immunassay esasına dayanmaktadır. Anti-MIS/AMH antikorlarıyla kaplı kuyucuklarda standartlar, kontroller ve serum örnekleri inkübe edildi. Yıkama aşamasının ardından, kuyucuklar ikinci bir biotinle işaretli anti-MIS/AMH dedeksiyon antikoruna ile

muamele edildi. İkinci bir inkübasyon ve yıkama aşamasından sonra kuyucuklar *streptavidin-horseradish peroksidaz (HRP)* ile inkübe edildi. Üçüncü yıkama aşamasının ardından kuyucuklara substrat (tetrametilbenzidin) eklendi. Asidik stop solusyonunun ilavesiyle reaksiyon durduruldu ve absorbans 450 nm’de mikroplate okuyucu ile ölçüldü.

Absorbans konsantrasyon grafiği cihaz tarafından çizildi ve sonuçlar otomatik olarak hesaplandı. Kullanılan ticari ELISA kitinin sensitivitesi 0.006 ng/ml idi. Sonuçlar ng/ml cinsinden ifade edildi. 0 ile 15 ng/ml arasındaki değerler ölçüldü.

### 3.11.2. Inhibin-B Ölçüm Yöntemi

ELISA yöntemiyle *USCN LIFE SCIENCE AND COMPANY* firmasına ait Rat *Inhibin B ELISA E0838r* ticari kiti kullanılarak çalışıldı ve rat serumlarında inhibin-B düzeylerinin ölçümü yapıldı. Inhibin-B’ye spesifik antikorlarla kaplanmış kuyucuklara, standartlar ve serum örneklerinin eklenmesinin ardından, biotinle işaretlenmiş antikor ilave edildi. Daha sonra, *Avidin-horseradish peroksidaz (HRP)* ile inkübe edilen kuyucuklara, substrat olarak tetrametilbenzidin ilave edildi. Reaksiyonun meydana getirdiği renk değişimi, 450 nm’de ELISA plate okuyucu ile değerlendirildi ve absorbans konsantrasyon grafiği plate okuyucu tarafından çizilerek, sonuçlar otomatik olarak hesaplandı. Inhibin-B değerleri, pg/ml cinsinden ifade edildi. Kullanılan ELISA kitinin sensitivitesi 3.9 pg/ml idi. 0 ile 500 pg/ml arasındaki değerler ölçüldü.

### 3.11.3. Östradiol Ölçümü

ELISA yöntemiyle, *ENDOCRINE TECHNOLOGIES, INC. USA Rodent Estradiol* ticari kiti kullanılarak, serumlarda estradiol ölçümü yapıldı. Bu testi, yarışmalı bağlanma modelini baz alan solid faz enzim immunassay prensibine dayanmaktadır. Östradiol konsantrasyonu bilinmeyen serum örnekleri (işaretli olmayan antijen) ve konjuge östradiol (işaretli antijen) kuyucuklara eklenir. İşaretli ve işaretli olmayan antijenler, kuyucuk duvarlarında kaplı bulunan spesifik antikora bağlanmak için birbirleri ile yarışır. Yıkama aşaması ile bağlı olmayan serbest antijenler uzaklaştırılır. Antikora bağlanan işaretli antijenlerin miktarı, işaretli olmayan antijen konsantrasyonu (ölçülmek istenen östradiol konsantrasyonu) ile ters

orantılıdır. Bu çalışmada, oluşan renk değişimi 450 nm’de plate okuyucu ile ölçülmüştür. Çizilen standart eğrisinden, serumlardaki estradiol konsantrasyonları tespit edildi. Sonuçlar, pg/ml cinsinden ifade edildi. Kullanılan ticari kitin sensitivitesi 5 pg/ml idi. 0 ile 2762 pg/ml arasındaki değerler ölçüldü.

#### 3.11.4. FSH Ölçümü

ELISA yöntemiyle, *ENDOCRINE TECHNOLOGIES, INC. USA Rodent FSH ELISA* ticari kiti kullanılarak, serumlarda estradiol ölçümü yapıldı. Bu testi, yarışmalı bağlanma modelini baz alan solid faz enzim immünassay prensibine dayanmaktadır. FSH konsantrasyonu bilinmeyen serum örnekleri (işaretli olmayan antijen) ve konjuge FSH (işaretli antijen) kuyucuklara eklenir. İşaretli ve işaretli olmayan antijenler, kuyucuk duvarlarında kaplı bulunan spesifik antikora bağlanmak için birbirleri ile yarışır. Yıkama aşaması ile bağlı olmayan serbest antijenler uzaklaştırılır. Antikora bağlanan işaretli antijenlerin miktarı, işaretli olmayan antijen konsantrasyonu (ölçülmek istenen FSH konsantrasyonu) ile ters orantılıdır. Bu çalışmada, oluşan renk değişimi 450 nm’de plate okuyucu ile ölçülmüştür. Çizilen standart eğrisinden, serumlardaki FSH konsantrasyonları tespit edildi. Sonuçlar, ng/ml cinsinden ifade edildi. Kullanılan kitin sensitivitesi 0.5 ng/ml idi. 0 ile 15.1 ng/ml arasında değerler ölçüldü.

#### 3.12. İstatistiksel Analiz

Vücut ağırlığı, uterus, ovaryum ağırlığı ve primordiyal, primer, sekonder folikül, korpus luteum ve kist sayıları sayıları ile TUNEL ile boyanmış primordiyal, primer, sekonder folikül, korpus luteum ve kistteki apoptoz gösteren hücre sayıları Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı. Gruplar arasında çıkan farklarda hangi grupların arasında fark olduğunu anlamak içinde Mann-Whitney testi kullanıldı. Antral folikül sayıları ve antral foliküldeki TUNEL ile boyanmış apoptoz gösteren hücrelerin sayısı tek yönlü varyans analiz kullanılarak karşılaştırıldı. Gruplar arasında çıkan farklarda, hangi gruplar fark arasında olduğunu anlamak için TUKEY testi kullanıldı. AMH, kaspaz-3 ve AR yoğunluğu çapraz tablo oluşturularak ki-kare ( $\chi^2$ ) ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren verilerin özetlenmesinde ortalama±standart sapma kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen verilerin

özetlenmesinde median değerler (minimum;maksimum) kullanıldı.  $P<0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm testler ESOGÜ Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalında yapıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Ağırlıklar

Deney ve kontrol gruplarına ait deney başı ağırlık (DBA), deney sonu ağırlık (DSA) ve vücut ağırlığı farkı (VAF) bakımından karşılaştırılması **Tablo 4.1**'de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre:

Deney ve kontrol grupları arasında DBA bakımından fark yoktu ( $P>0,05$ ). Kontrol grubu ile deney grupları arasında DSA ve VAF bakımından gruplar arasında fark vardı ( $P<0,05$ ).

Deney ve kontrol grupları DSA karşılaştırıldığında; vinilsikloheksen diepoksit uygulanan (VCD) grup ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). VCD grubunda kontrol grubuna göre DSA daha azdı. VCD grubu ile dehidroepiandrosteron uygulanan grup (DH) arasında fark vardı ( $P<0,01$ ). VCD grubunda DH grubuna göre DSA daha azdı. VDH uygulanan grup ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,01$ ). VDH grubunda kontrol grubuna göre DSA daha azdı.

Deney ve kontrol grupları VAF ağırlıkları karşılaştırıldığında; VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). VCD grubunda kontrol grubuna göre VAF daha azdı. VCD grubu ile DH arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). VCD grubunda DH grubuna göre VAF daha azdı. DH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,05$ ). DH grubunda kontrol grubuna göre VAF daha azdı. VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). VDH grubunda kontrol grubuna göre VAF daha azdı.

**Tablo 4.1.** Vücut ağırlıklarının deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

Ağırlıklar(mg)	VCD	DH	VDH	Kontrol	P
DBA	51,25±7,44	53±5,869	52,77±7,546	52,5±7,168	$P>0,05$
DSA	155±5,345	169±7,378	162±10,929	177±8,232	$P<0,001$
VAF	103,75±5,175	116±6,992	109,44±5,27	124,5±5,986	$P<0,001$

(DBA: Deney başı vücut ağırlığı, DSA: Deney sonu vücut ağırlığı, VAF: Vücut ağırlığı farkı)



Deney ve kontrol gruplarına ait sağ ovaryum, sol ovaryum, uterus ve toplam ovaryum ağırlıklarının karşılaştırılması **Tablo 4.2**'de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre:

Deney ve kontrol grupları arasında sol ovaryum ağırlığı, sağ ovaryum ağırlığı, uterus ağırlıkları ve toplam ovaryum ağırlıkları bakımından gruplar arasında fark vardı ( $P<0.05$ ).

Deney ve kontrol grupları sol ovaryum ağırlıkları karşılaştırıldığında; VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). VCD grubunda kontrol grubuna göre sol ovaryum ağırlığı daha azdı. VCD grubu ile DH grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). VCD grubunda DH grubuna göre sol ovaryum ağırlığı daha azdı. VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,01$ ). VDH grubunda kontrol grubuna göre sol ovaryum ağırlığı daha azdı.

Deney ve kontrol grupları sağ ovaryum ağırlıkları karşılaştırıldığında; VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,01$ ). VCD grubunda kontrol grubuna göre sağ ovaryum ağırlığı daha azdı. VCD grubu ile DH grubu arasında fark vardı ( $P<0,05$ ). VCD grubunda DH grubuna göre sağ ovaryum ağırlığı daha azdı. VCD grubu ile VDH grubu arasında fark vardı ( $P<0,05$ ). VCD grubunda VDH grubuna göre sağ ovaryum ağırlığı daha azdı.

Deney ve kontrol grupları uterus ağırlıkları karşılaştırıldığında; VCD grubu ile DH grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). VCD grubunda DH grubuna göre uterus ağırlığı daha azdı. VCD grubu ile VDH grubu arasında fark vardı ( $P<0,01$ ). VCD grubunda VDH grubuna göre uterus ağırlığı daha azdı. DH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). DH grubunda kontrol grubuna göre uterus ağırlığı daha fazlaydı. VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). VDH grubunda kontrol grubuna göre uterus ağırlığı daha fazlaydı.

Deney ve kontrol grupları toplam ovaryum ağırlıkları bakımından birbirleriyle karşılaştırıldığında; VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). VCD grubunda kontrol grubuna göre toplam ovaryum ağırlığı daha azdı. VCD grubu ile DH grubu arasında fark vardı ( $P<0,01$ ). VCD grubunda DH grubuna göre toplam ovaryum ağırlığı daha azdı. VCD grubu ile VDH grubu arasında fark vardı ( $P<0,05$ ). VCD grubunda VDH grubuna göre toplam ovaryum ağırlığı daha azdı.

**Tablo 4.2.** Deneklerin sağ ovaryum, sol ovaryum, uterus ve toplam ovaryum ağırlıklarının deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

Ağırlıklar(mg)	VCD	DH	VDH	Kontrol	P
Sol ovaryum	0,0376±0,007	0,061±0,016	0,0518±0,014	0,074±0,015	P<0,001
Sağ ovaryum	0,0463±0,011	0,0668±0,021	0,069±0,011	0,074±0,013	P<0,05
Uterus	0,18±0,047	0,345±0,084	0,281±0,057	0,15±0,034	P<0,001
Toplam ovaryum ağırlığı	0,083±0,015	0,128±0,033	0,121±0,021	0,148±0,026	P<0,001

## 4.2. Folikül Sayıları ve Yüzdeleri

### 4.2.1. Folikül Sayıları

Deney ve kontrol gruplarına ait toplam primordiyal folikül sayısı, normal primordiyal folikül sayısı ve atretik primordiyal folikül sayısının karşılaştırılması **Tablo 4.3'**de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre:

Deney ve kontrol grupları arasında; toplam primordiyal folikül sayısı bakımından gruplar arasında fark vardı (P<0.001). Normal primordiyal folikül sayısı bakımından gruplar arasında fark vardı (P<0.001). Atretik primordiyal folikül sayısı bakımından gruplar arasında fark yoktu (P>0.05).

Deney ve kontrol grupları arasında, toplam primordiyal folikül sayıları karşılaştırıldığında; VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı (P<0,001). VCD grubunda kontrol grubuna göre toplam primordiyal folikül sayısı daha azdı. VCD grubu ile DH grubu arasında fark vardı (P<0,001). VCD grubunda DH grubuna göre toplam primordiyal folikül sayısı daha azdı. VCD grubu ile VDH grubu arasında fark vardı (P<0,05). VCD grubunda VDH grubuna göre toplam primordiyal folikül sayısı daha azdı. DH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı (P<0,05). DH grubunda toplam primordiyal folikül sayısı kontrol grubundan daha fazlaydı. DH grubu ile VDH grubu arasında fark vardı (P<0,01). DH grubunda toplam primordiyal folikül sayısı VDH grubundan daha fazlaydı.

Deney ve kontrol grupları arasında, normal primordiyal folikül sayıları karşılaştırıldığında; VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı (P<0,001). VCD grubunda kontrol grubuna göre normal primordiyal folikül sayısı daha azdı.

VCD grubu ile DH grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). VCD grubunda DH grubuna göre normal primordiyal folikül sayısı daha azdı. VCD grubu ile VDH grubu arasında fark vardı ( $P<0,05$ ). VCD grubunda VDH grubuna göre normal primordiyal folikül sayısı daha azdı. DH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,05$ ). DH grubunda normal primordiyal folikül sayısı kontrol grubundan daha fazlaydı. DH grubu ile VDH grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). DH grubunda normal primordiyal folikül sayısı VDH grubundan daha fazlaydı. VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,01$ ). VDH grubunda normal primordiyal folikül sayısı kontrol grubundan daha azdı.

**Tablo 4.3.** Deneklere ait toplam primordiyal folikül sayısı, normal primordiyal folikül sayısı ve atretik primordiyal folikül sayılarının deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

Foliküller	VCD	DH	VDH	Kontrol	P
Toplam primordial	1,75±0,70	16,85±6,71	5,5±3,98	8,66±3,46	$P<0,001$
Normal primordial	0,25±0,46	14,71±6,31	2,33±1,86	7,55±3,04	$P<0,001$
Atretik primordial	1,5±0,75	2,14±1,21	3,16±2,22	1,11±0,60	$P>0,05$

Deney ve kontrol gruplarına ait toplam primer folikül sayısı, normal primer folikül sayısı ve atretik primer folikül sayısının karşılaştırılması **Tablo 4.4'**de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre:

Deney ve kontrol grupları arasında; toplam primer folikül sayısı bakımından gruplar arasında fark yoktu ( $P>0,05$ ). Normal primer folikül sayısı bakımından gruplar arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). Atretik primer folikül sayısı bakımından gruplar arasında fark vardı ( $P<0,001$ ).

Deney ve kontrol gruplarında, normal primer folikül sayıları karşılaştırıldığında; VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). VCD grubunda normal primer folikül sayısı kontrol grubuna göre daha azdı. VCD ile DH grubu arasında fark vardı ( $P<0,01$ ). VCD grubunda normal primer folikül sayısı DH grubuna göre daha azdı. VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı

( $P<0,001$ ). VDH grubunda normal primer folikül sayısı kontrol grubuna göre daha azdı.

Deney ve kontrol gruplarında, atretik primer folikül sayıları karşılaştırıldığında; VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). VCD grubunda atretik primer folikül sayısı kontrol grubuna göre daha fazlaydı. VCD ile DH grubu arasında fark vardı ( $P<0,05$ ). VCD grubunda atretik primer folikül sayısı DH grubuna göre daha fazlaydı. DH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,05$ ). DH grubunda atretik primer folikül sayısı kontrol grubuna göre daha fazlaydı. VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,05$ ). VDH grubunda atretik primer folikül sayısı kontrol grubuna göre daha fazlaydı.

**Tablo 4.4.** Deneklere ait toplam primer folikül sayısı, normal primer folikül sayısı ve atretik primer folikül sayılarının deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

Foliküller	VCD	DH	VDH	Kontrol	P
Toplam primer	6,75±2,86	9,42±5,25	6,83±3,81	8,11±1,9	$P>0,05$
Normal primer	1,75±1,48	6,28±3,86	2,66±1,63	6,88±1,36	$P<0,001$
Atretik primer	5±1,51	3,14±1,46	4,16±2,22	1,22±0,66	$P<0,001$

Deney ve kontrol gruplarına ait toplam sekonder folikül sayısı, toplam antral folikül sayısı, korpus luteum sayıları ve folikül kisti sayılarının karşılaştırılması **Tablo 4.5'**de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre:

Deney ve kontrol grupları arasında toplam sekonder folikül sayısı, toplam antral folikül sayısı, korpus luteum sayısı ve folikül kisti sayıları bakımından gruplar arasında fark vardı ( $p<0.001$ ).

Deney ve kontrol grupları sekonder folikül sayıları bakımından birbirleriyle karşılaştırıldığında; VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). VCD grubunda sekonder folikül sayısı kontrol grubuna göre daha azdı. VCD grubu ile DH grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). VCD grubunda sekonder folikül sayısı DH grubuna göre daha azdı. VCD grubu ile VDH grubu arasında fark vardı

( $P<0,01$ ). VCD grubunda sekonder folikül sayısı VDH grubuna göre daha azdı. VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). VDH grubunda sekonder folikül sayısı kontrol grubuna göre daha azdı. VDH grubu ile DH grubu arasında fark vardı ( $P<0,05$ ). VDH grubunda sekonder folikül sayısı DH grubuna göre daha azdı.

Deney ve kontrol grupları antral folikül sayıları bakımından birbirleriyle karşılaştırıldığında; VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). VCD grubunda antral folikül sayısı kontrol grubuna göre daha azdı. VCD grubu ile DH grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). VCD grubunda antral folikül sayısı DH grubuna göre daha azdı. VCD grubu ile VDH grubu arasında fark vardı ( $P<0,01$ ). VCD grubunda antral folikül sayısı VDH grubuna göre daha azdı. VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,01$ ). VDH grubunda antral folikül sayısı kontrol grubuna göre daha azdı. DH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,05$ ). DH grubunda antral folikül sayısı DH grubuna göre daha azdı.

Deney ve kontrol grupları korpus luteum sayıları bakımından birbirleriyle karşılaştırıldığında; VCD grubu ile DH grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). VCD grubunda korpus luteum sayısı DH grubuna göre daha fazlaydı. VCD grubu ile VDH grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). VCD grubunda korpus luteum sayısı VDH grubuna göre daha fazlaydı. VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). VDH grubunda korpus luteum sayısı kontrol grubuna göre daha azdı. DH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). DH grubunda korpus luteum sayısı DH grubuna göre daha azdı.

Deney ve kontrol grupları folikül kisti sayıları bakımından birbirleriyle karşılaştırıldığında; VCD grubu ile DH grubu arasında fark vardı ( $P<0,05$ ). VCD grubunda folikül kisti sayısı DH grubuna göre daha azdı. VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,01$ ). VDH grubunda folikül kisti sayısı kontrol grubuna göre daha fazlaydı. DH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). DH grubunda folikül kisti sayısı kontrol grubuna göre daha fazlaydı.

**Tablo 4.5.** Deneklere ait toplam sekonder ve toplam antral folikül ile korpus luteum ve folikül kisti sayılarının deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

Foliküller	VCD	DH	VDH	Kontrol	P
Sekonder	1,12±0,35	8±3,82	3,33±1,36	10,66±3,35	P<0,001
Antral	0,87±1,12	5±1,82	3,83±2,4	8,33±3,87	P<0,001
Korpus luteum	4,87±2,23	1,57±0,97	1,5±0,83	4,88±1,05	P<0,001
Kist	3,37±1,99	6,42±2,87	5,16±0,98	1,66±1,41	P<0,001

#### 4.2.2. Folikül Yüzdeleri

Deney ve kontrol gruplarına ait normal primordiyal folikül, atretik primordiyal folikül, normal primer folikül ve atretik primer foliküllerin yüzdelerinin karşılaştırılması **Tablo 4.6'**da gösterilmiştir. Bu bulgulara göre:

Deney ve kontrol grupları arasında, normal primordiyal folikül, atretik primordiyal folikül, normal primer folikül ve atretik primer foliküllerin yüzdeleri bakımından gruplar arasında fark vardı (P<0.001).

Deney ve kontrol grupları normal primordiyal folikül yüzdeleri karşılaştırıldığında; VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı (P<0,001). VCD grubunda normal primordiyal folikül yüzdesi kontrol grubundan daha azdı. VCD grubu DH grubu arasında fark vardı (P<0,001). VCD grubunda normal primordiyal folikül yüzdesi DH grubundan daha azdı. VCD grubu ile VDH grupları arasında fark vardı (P<0,05). VCD grubunda normal primordiyal folikül yüzdesi VDH grubundan daha azdı. VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı (P<0,001). VDH grubunda normal primordiyal folikül yüzdesi kontrol grubundan daha azdı. VDH grubu ile DH grubu arasında fark vardı (P<0,001). VDH grubunda normal primordiyal folikül yüzdesi DH grubundan daha azdı.

Deney ve kontrol grupları atretik primordiyal folikül yüzdeleri karşılaştırıldığında; VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı (P<0,001). VCD grubunda atretik primordiyal folikül yüzdesi kontrol grubundan daha fazlaydı. VCD grubu DH grubu arasında fark vardı (P<0,001). VCD grubunda atretik primordiyal folikül yüzdesi DH grubundan daha fazlaydı. VCD grubu ile VDH grupları arasında fark vardı (P<0,05). VCD grubunda atretik primordiyal folikül

yüzdesi VDH grubundan daha fazlaydı. VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). VDH grubunda atretik primordiyal folikül yüzdesi kontrol grubundan daha fazlaydı. VDH grubu ile DH grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). VDH grubunda atretik primordiyal folikül yüzdesi DH grubundan daha fazlaydı.

Deney ve kontrol grupları normal primer folikül yüzdeleri karşılaştırıldığında; VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). VCD grubunda normal primer folikül yüzdesi kontrol grubundan daha azdı. VCD grubu DH grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). VCD grubunda normal primer folikül yüzdesi DH grubundan daha azdı. DH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,01$ ). DH grubunda normal primer folikül yüzdesi kontrol grubundan daha azdı. DH grubu ile VDH grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). DH grubunda normal primer folikül yüzdesi VDH grubundan daha fazlaydı. VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). VDH grubunda normal primer folikül yüzdesi kontrol grubundan daha azdı.

Deney ve kontrol grupları atretik primer folikül yüzdeleri karşılaştırıldığında; VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). VCD grubunda atretik primer folikül yüzdesi kontrol grubundan daha fazlaydı. VCD grubu DH grubu arasında fark vardı ( $P<0,01$ ). VCD grubunda atretik primer folikül yüzdesi DH grubundan daha fazlaydı. DH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,01$ ). DH grubunda atretik primer folikül yüzdesi kontrol grubundan daha fazlaydı. DH grubu ile VDH grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). DH grubunda atretik primer folikül yüzdesi VDH grubundan daha azdı. VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,001$ ). VDH grubunda atretik primer folikül yüzdesi kontrol grubundan daha fazlaydı.

**Tablo 4.6.** Deneklere ait normal ve atretik primordiyal ve primer folikül yüzdelерinin deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

Folikül Yüzdeleri %	VCD	DH	VDH	Kontrol	P
Normal primordiyal %	12,5±23,14	86,48±7,6	39,25±19,62	87,46±6,47	P<0,001
Atretik primordiyal %	87,5±23,14	13,52±7,6	60,75±19,62	12,54±6,47	P<0,001
Normal primer%	20,81±15,13	65,26±5,45	33,88±17,43	85,84±6,69	P<0,001
Atretik primer%	79,19±15,13	34,74±5,45	66,22±17,43	14,16±6,69	P<0,001

### 4.3. Folikül Çapları

Deney ve kontrol gruplarına ait primordiyal ve primer foliküllerin çaplarının karşılaştırılması **Tablo 4.7'**de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre:

Deney ve kontrol grupları arasında, primordiyal folikül çapları arasında fark yoktu ( $P>0,05$ ). Primer folikül çapları arasında fark yoktu ( $P>0,05$ ).

**Tablo 4.7:** Deneklere ait primordiyal ve primer foliküllerin çaplarının deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

Folikül Çapları ( $\mu\text{m}$ )	VCD	DH	VDH	Kontrol	P
Primordiyal FÇ	35,56±2,36	36,44±2,82	38,07±4,81	39,17±3,36	P>0,05
Primer FÇ	67,89±5,94	65,41±14,68	57,10±3,32	63,69±10,03	P>0,05

(FÇ: Folikül çapı)

Deney ve kontrol gruplarına ait sekonder folikül çapları, antral folikül çapı, **Tablo 4.8'**de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre:



Deney ve kontrol grupları arasında sekonder folikül çapları bakımından gruplar arasında fark yoktu ( $P>0,05$ ). Antral folikül çapları bakımından gruplar arasında fark yoktu ( $P>0,05$ ).

**Tablo 4.8.** Deneklere ait sekonder ve antral folikül çaplarının, teka ve granüloza tabaka kalınlığının deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

Folikül Çapları ( $\mu\text{m}$ )	VCD	DH	VDH	Kontrol	P
Sekonder FÇ	340,66±108,28	316,49±63,41	311,95±102,37	338,40±108,82	$P>0,05$
Antral FÇ	967,01±293,99	1013,39±179,45	1112,03±266,98	805,18±165,42	$P>0,05$

(FÇ: folikül çapı)

#### 4.4. TUNEL Bulguları

Deney ve kontrol gruplarına ait TUNEL (+) hücre sayılarının karşılaştırılması **Tablo 4.9'**da gösterilmiştir. Bu bulgulara göre:

Deney ve kontrol grupları arasında primordiyal folikül, sekonder folikül, antral folikül, korpus luteum ve folikül kistlerdeki TUNEL (+) hücre sayısı bakımından birbirleri ile karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı düzeyde bir fark yoktu ( $P>0,05$ ). Primer foliküllerde TUNEL (+) hücre sayısı bakımından fark vardı ( $P<0,05$ ).

Deney ve kontrol grupları ait primer foliküllerde TUNEL (+) hücre sayısı karşılaştırıldığında; VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,01$ ). VCD grubu primer foliküllerde TUNEL (+) hücre sayısı kontrol grubundan daha fazlaydı. VCD grubu ile DH grubu arasında fark yoktu ( $P>0,05$ ). VCD grubu ile VDH grubu arasında fark vardı ( $P<0,05$ ). VCD grubu primer foliküllerde TUNEL (+) hücre sayısı VDH grubundan daha fazlaydı. DH grubu ile kontrol grubu arasında fark yoktu ( $P>0,05$ ). DH grubu ile VDH grubu arasında fark yoktu ( $P>0,05$ ). VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark yoktu ( $P>0,05$ ).

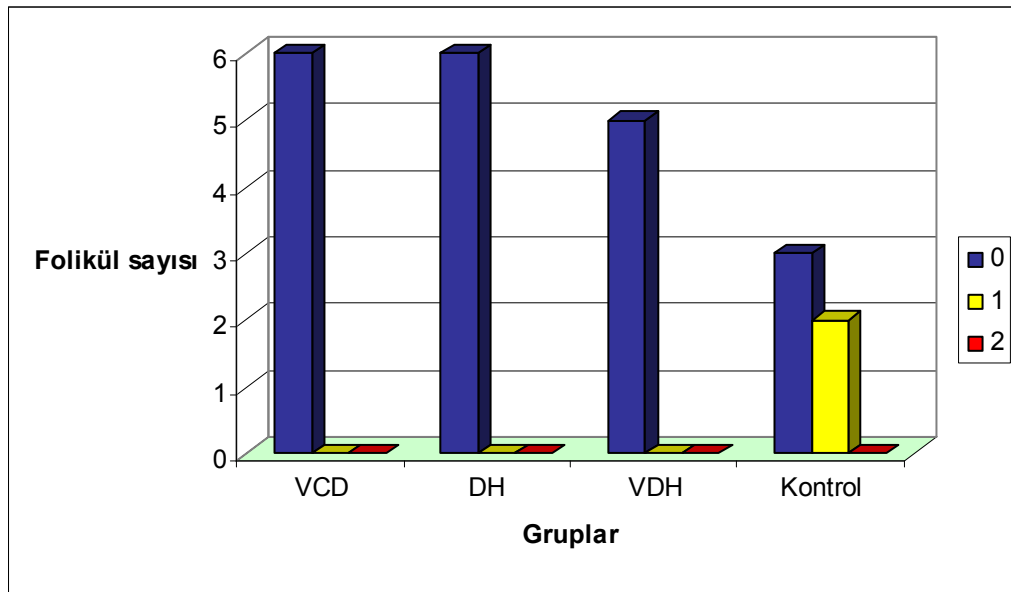
**Tablo 4.9.** Deneklere ait TUNEL (+) hücre sayılarının deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

	VCD Med(min;max)	DH Med(min;max)	VDH Med(min;max)	Kontrol Med(min;max)	P
Primordial	0 (0;10)	0 (0;0)	0 (0;3)	0 (0;2)	P>0,05
Primer	12 (2;25)	6 (0;10)	2 (0;6)	0 (0;5)	P<0,05
Sekonder	0 (0;54)	12,5 (2;27)	19 (10;64)	14,5 (2;35)	P>0,05
Antral	25 (0;94)	54 (28;152)	20,5 (0;76)	38 (5; 118)	P>0,05
Korpus	0 (0;0)	0 (0;0)	0 (0;43)	0 (0;15)	P>0,05
Kist	0 (0;1)	0 (0;0)	0 (0;10)	0 (0;5)	P>0,05

#### 4.5. Kaspaz 3 Bulguları

Primordiyal folikül, primer folikül, sekonder folikül granüloza tabakası, sekonder folikül teka tabakasında, antral folikül granüloza tabakasında, korpus luteum ve stromada kaspaz 3 yoğunluğu immünohistokimyasal olarak ortaya konmuş ve sonuçları birlikte değerlendirilmiştir. Bu bulgulara göre:

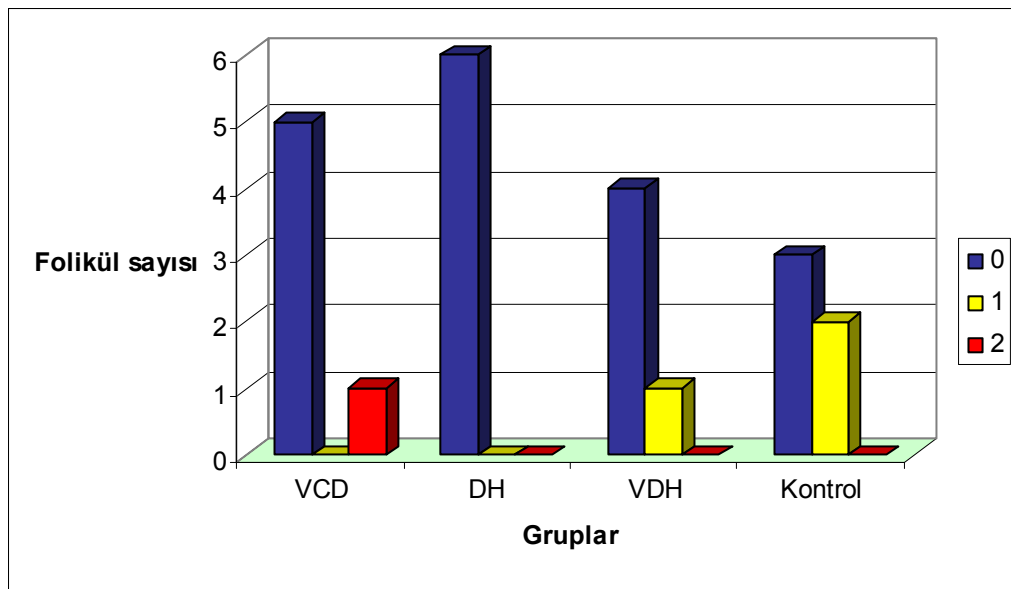
Deney ve kontrol gruplarının primordiyal folikül granüloza hücrelerinin kaspaz 3 boyanmasının karşılaştırılması **şekil 4.1'** de gösterildi. Kaspaz-3 boyanma yoğunluğu bakımından gruplar arasında fark yoktu ( $\chi^2=7,480$ ; SD=3; P>0,05)



(0=Boyanma yok, 1=Hafif boyanma, 2=Kuvvetli boyanma)

**Şekil 4.1.** Deneklere ait primordiyal folikül granüloza hücrelerinin kaspaz 3 boyanma yoğunluğunun deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

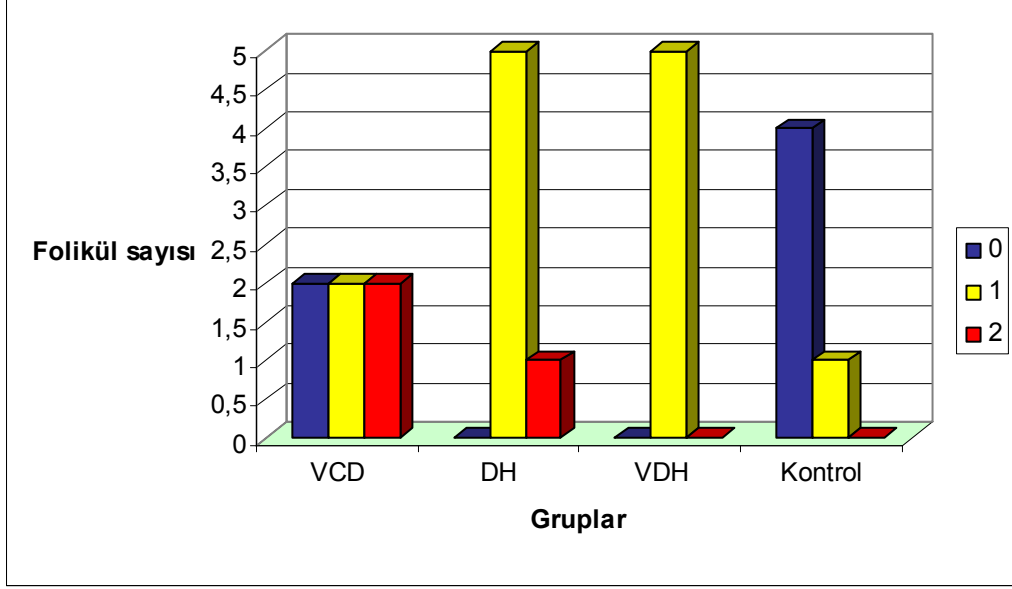
Deney ve kontrol gruplarının primer folikül granüloza hücrelerinin kaspaz-3 boyanma yoğunluğunun karşılaştırılması **şekil 4.2'** de gösterildi. Kaspaz-3 boyanma yoğunluğu bakımından gruplar arasında fark yoktu ( $\chi^2=7,537$ ; SD=6; P>0,05).



(0=Boyanma yok, 1=Hafif boyanma, 2=Kuvvetli boyanma)

**Şekil 4.2.** Deneklere ait primer folikül granüloza hücrelerinin kaspaz 3 boyanma yoğunluğunun deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

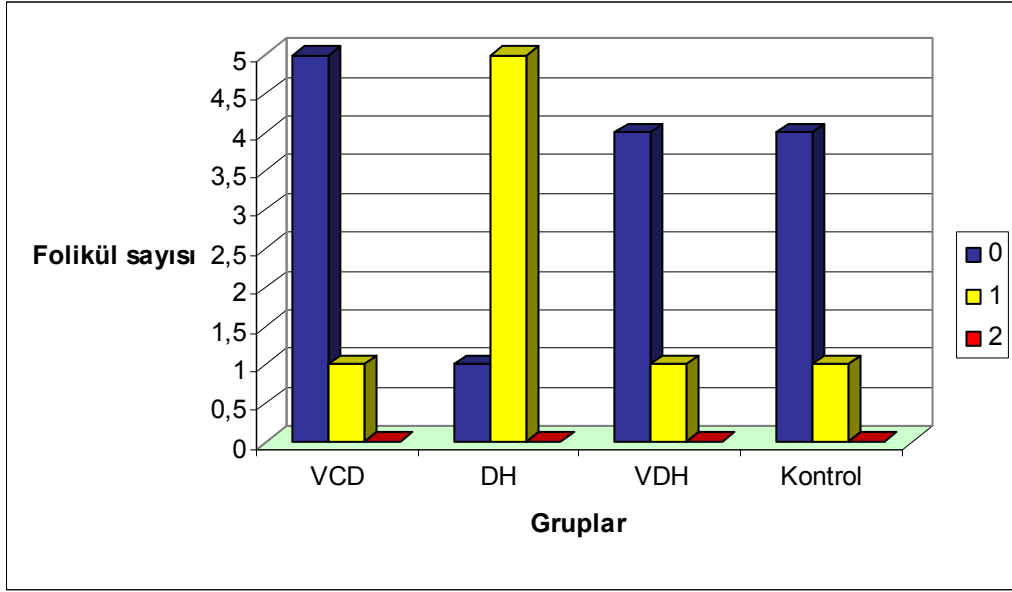
Deney ve kontrol gruplarının sekonder folikül granüloza hücrelerinde kaspaz-3 boyanmasının karşılaştırılması **şekil 4.3**'de gösterilmiştir. Kaspaz-3 boyanma yoğunluğu bakımından gruplar arasında fark vardı ( $\chi^2=15,268$ ; SD=6; P<0,05).



(0=Boyanma yok, 1=Hafif boyanma, 2=Kuvvetli boyanma)

**Şekil 4.3.** Deneklere ait sekonder folikül granüloza hücrelerinin kaspaz 3 boyanma yoğunluğunun çalışma ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

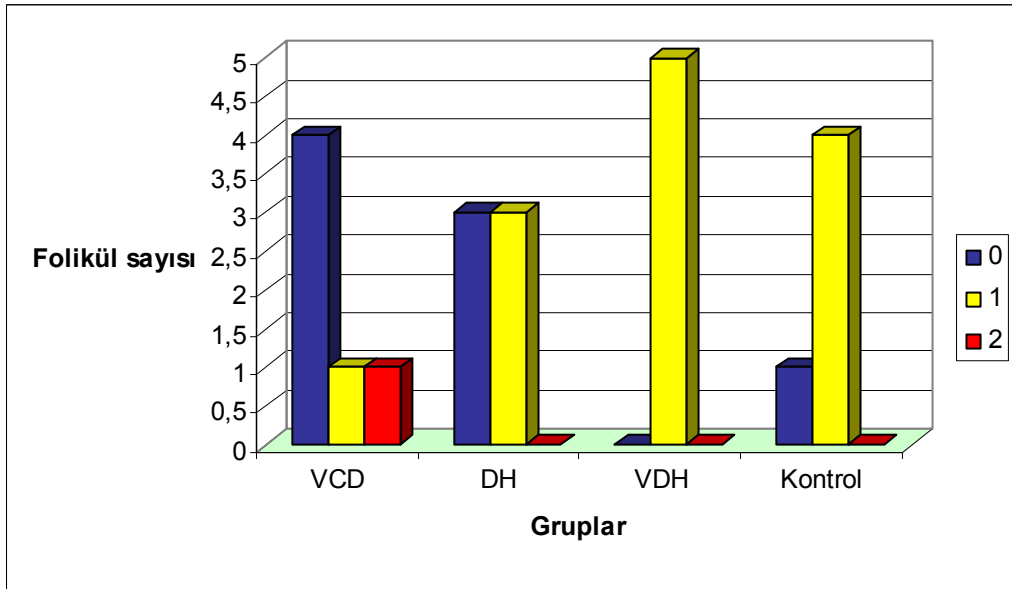
Deney ve kontrol gruplarının sekonder folikül teka tabakasında kaspaz-3 boyanma yoğunluğunun karşılaştırılması **şekil 4.4**'de gösterildi. Kaspaz-3 boyanma yoğunluğu bakımından gruplar arasında fark vardı ( $\chi^2=7,883$ ; SD=3; P<0,05).



(0=Boyanma yok, 1=Hafif boyanma, 2=Kuvvetli boyanma)

**Şekil 4.4.** Deneklere ait sekonder folikül teka tabakası kaspa 3 boyanma yoğunluğunun çalışma ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

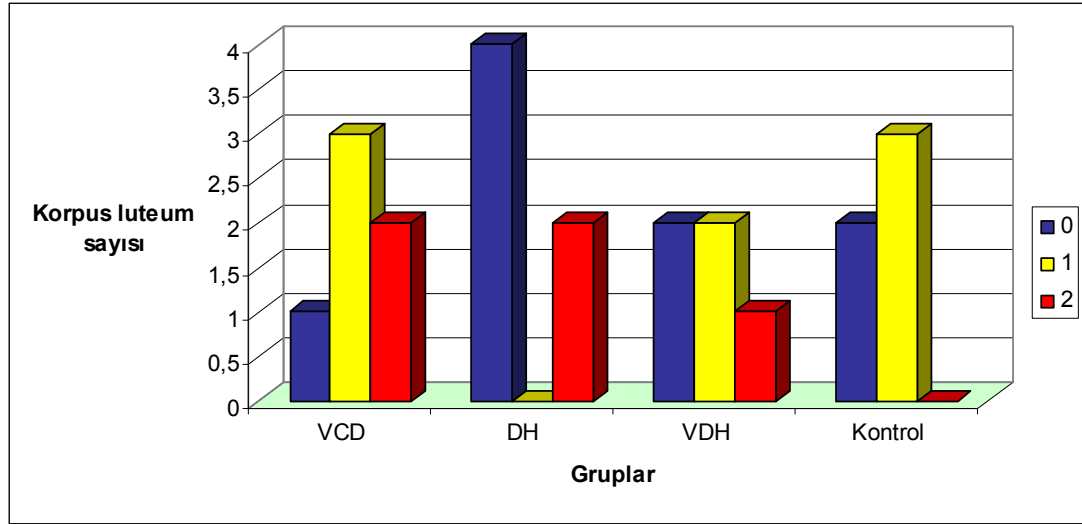
Deney ve kontrol gruplarının antral folikül granüloza hücrelerinde kaspa-3 boyanmasının karşılaştırılması **şekil 4.5'**de gösterildi. Kaspa-3 boyanma yoğunluğu bakımından gruplar arasında fark yoktu ( $\chi^2=10,372$ ; SD=6; P>0,05).



(0=Boyanma yok, 1=Hafif boyanma, 2=Kuvvetli boyanma)

**Şekil 4.5.** Deneklere ait antral folikül granüloza tabakası kaspa 3 boyanma yoğunluğunun deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

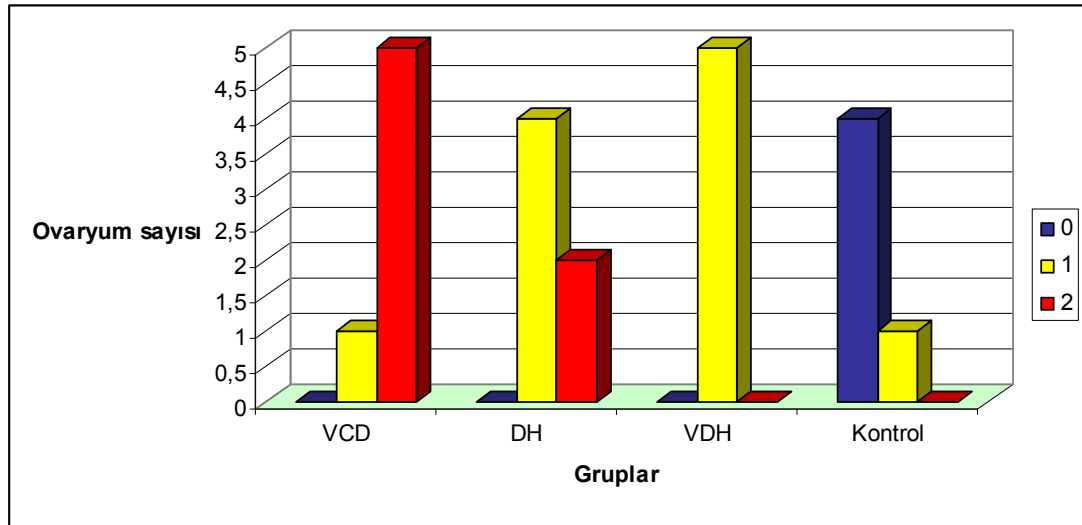
Deney ve kontrol gruplarının korpus luteumlarında kaspaz-3 boyanmasının karşılaştırılması **şekil 4.6**'da gösterildi. Kaspaz-3 boyanma yoğunluğu bakımından gruplar arasında fark yoktu ( $\chi^2=6,859$ ; SD=6;  $P>0,05$ ).



(0=Boyanma yok, 1=Hafif boyanma, 2=Kuvvetli boyanma)

**Şekil 4.6.** Deneklere ait korpus luteumlarda kaspaz 3 boyanma yoğunluğunun deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

Deney ve kontrol grupları ovaryum stromasında kaspaz-3 boyanmasının karşılaştırılması **Şekil 4.7**'de gösterilmiştir. Kaspaz-3 boyanma yoğunluğu bakımından gruplar arasında fark vardı ( $\chi^2=26,857$ ; SD=6;  $P<0,001$ ).



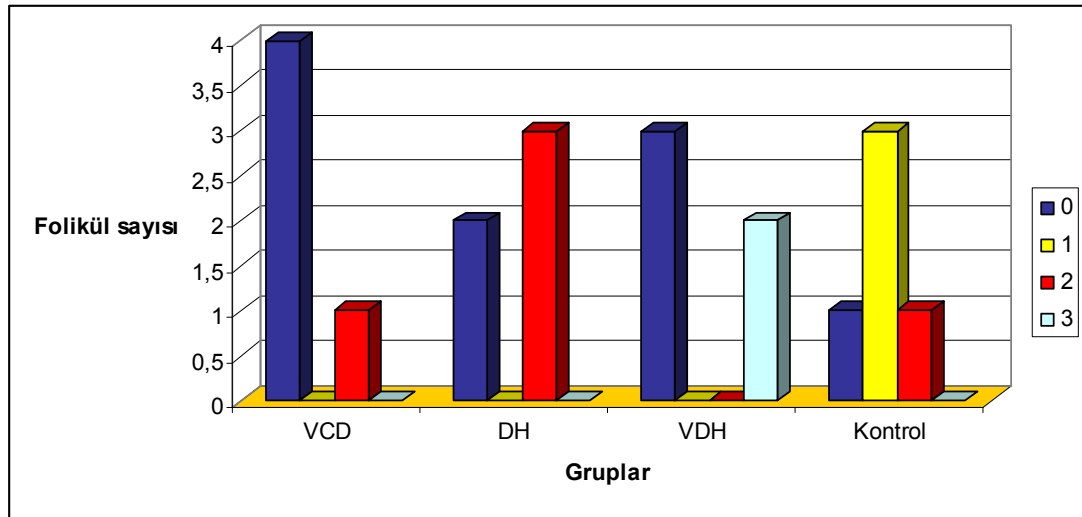
(0=Boyanma yok, 1=Hafif boyanma, 2=Kuvvetli boyanma)

**Şekil 4.7.** Deneklere ait ovaryum stromasında kaspaz 3 boyanma yoğunluğunun deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

#### 4.6. Androjen Reseptör Bulguları

Primordiyal, primer, sekonder, antral, kistik foliküller ve korpus luteum ile stromada androjen reseptörü (AR) yoğunluğu immünohistokimyasal olarak ortaya konmuş ve sonuçları birlikte değerlendirilmiştir. Bu bulgulara göre:

Deney ve kontrol grupları primordiyal folikül AR boyanmasının karşılaştırılması **şekil 4.8'**de gösterildi. AR boyanma yoğunluğu bakımından gruplar arasında fark vardı ( $\chi^2=20,800$ ; SD=9; P<0,01).

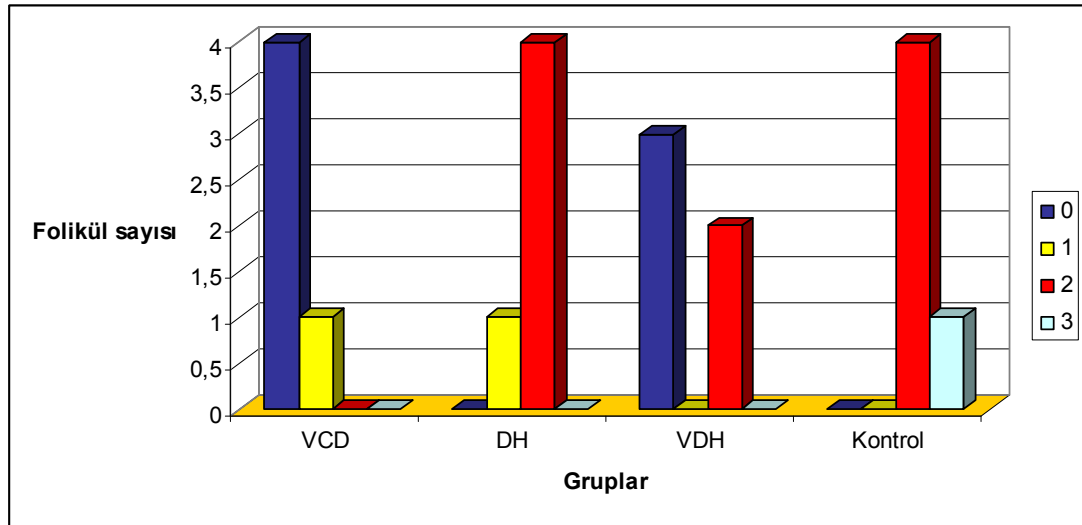


(0=Boyanma yok, 1=Hafif boyanma, 2=Orta boyanma, 3=Kuvvetli boyanma)

**Şekil 4.8.** Deneklere ait primordiyal folikül AR boyanma yoğunluğunun deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

Deney ve kontrol grupları primer folikül AR boyanmasının karşılaştırılması **şekil 4.9**'da gösterildi. AR boyanma yoğunluğu bakımından gruplar arasında fark vardı ( $X^2=16,686$ ;  $SD=9$ ;  $P<0,05$ ).

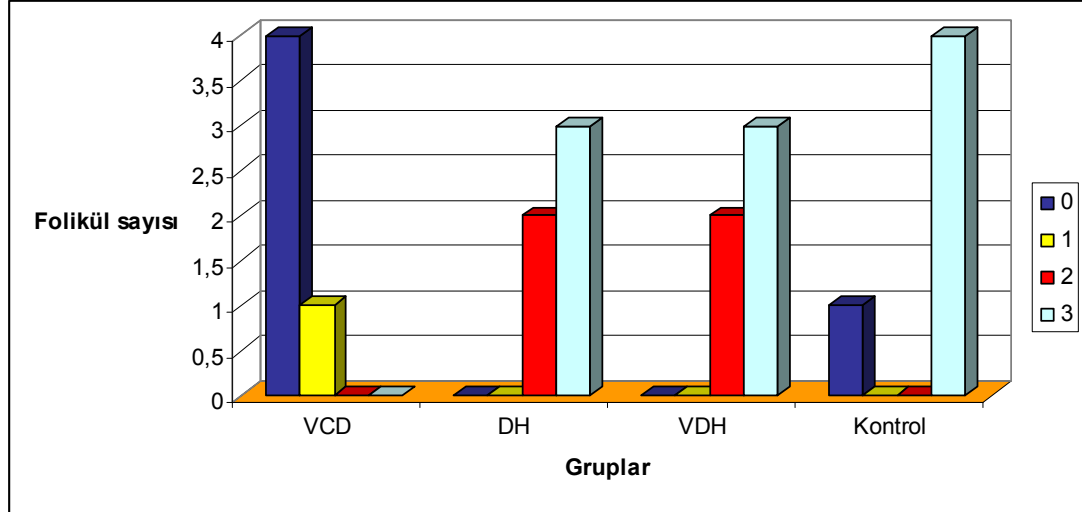




(0=Boyanma yok, 1=Hafif boyanma, 2=Orta boyanma, 3=Kuvvetli boyanma)

**Şekil 4.9.** Deneklere ait primer folikül AR boyanma yoğunluğunun deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

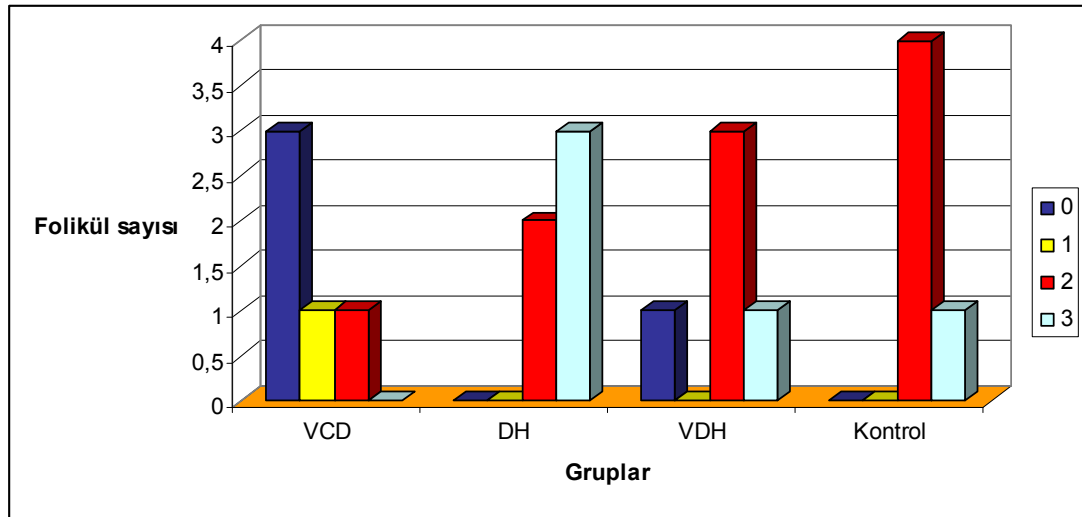
Deney ve kontrol gruplarının sekonder folikül AR boyanmasının karşılaştırılması **şekil 4.10**'da gösterilmiştir. AR boyanma yoğunluğu bakımından gruplar arasında fark vardı ( $\chi^2=19,200$ ; SD=9;  $P<0,01$ ).



(0=Boyanma yok, 1=Hafif boyanma, 2=Orta boyanma, 3=Kuvvetli boyanma)

**Şekil 4.10.** Deneklere ait sekonder folikül AR boyanma yoğunluğunun deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

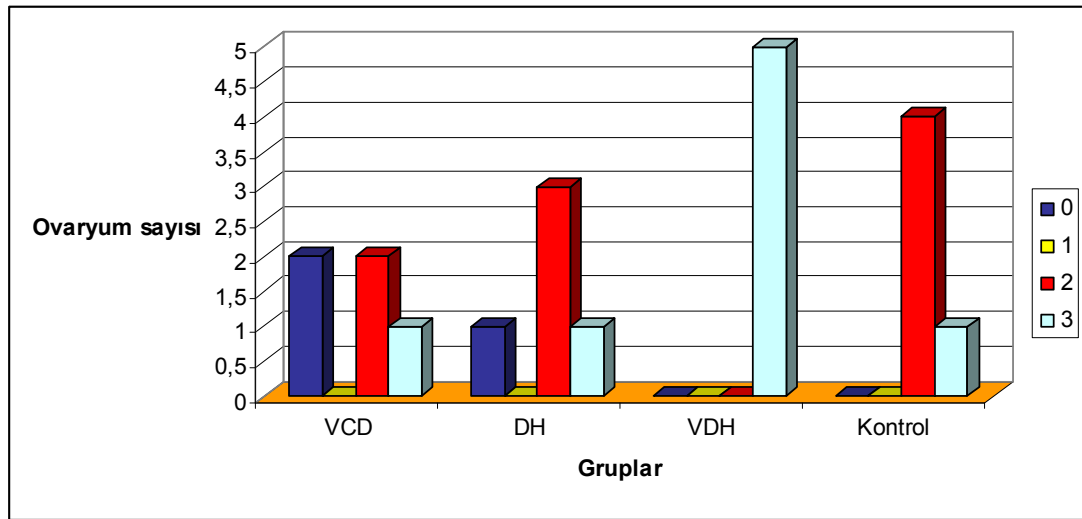
Deney ve kontrol gruplarında antral folikül AR boyanmasının karşılaştırılması **şekil 4.11**'de gösterilmiştir. AR boyanma yoğunluğu bakımından gruplar arasında fark yoktu ( $\chi^2=14,800$ ; SD=9;  $P>0,05$ ).



(0=Boyanma yok, 1=Hafif boyanma, 2=Orta boyanma, 3=Kuvvetli boyanma)

**Şekil 4.11.** Deneklere ait antral folikül AR boyanma yoğunluğunun deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

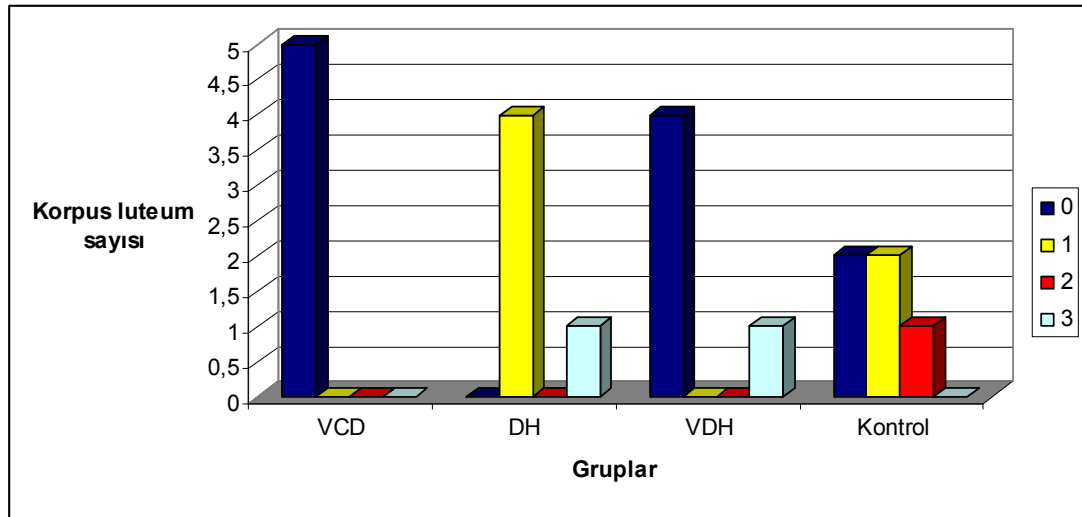
Deney ve kontrol gruplarının ovaryum stromasında AR boyanmasının birbirleri ile karşılaştırılması **şekil 4.12'** de gösterilmiştir. AR boyanma yoğunluğu bakımından gruplar arasında fark vardı ( $\chi^2=13,556$ ; SD=6; P<0,05).



(0=Boyanma yok, 1=Hafif boyanma, 2=Orta boyanma, 3=Kuvvetli boyanma)

**Şekil 4.12.** Deneklere ait ovaryum stromasında AR boyanma yoğunluğunun deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

Deney ve kontrol grupları arasında korpus luteumların AR boyanmasının birbirleri ile karşılaştırılması **şekil 4.13'**de gösterildi. AR boyanma yoğunluğu bakımından gruplar arasında fark vardı ( $\chi^2=17,697$ ; SD=9; P<0,05).



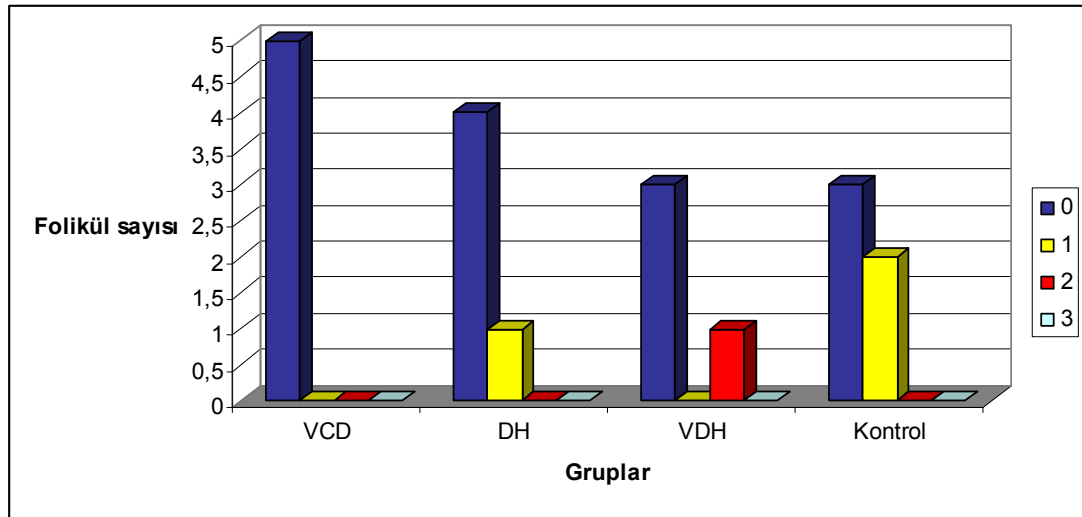
(0=Boyanma yok, 1=Hafif boyanma, 2=Orta boyanma, 3=Kuvvetli boyanma)

**Şekil 4.13.** Deneklere ait korpus luteumlarda AR boyanma yoğunluğunun deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

#### 4.7. Antimüllerian Hormon Bulguları

Sıçan ovaryumlarındaki primordiyal, primer, sekonder ve antral foliküller ile korpus luteum ve stromal hücrelerinden salgılanan AMH miktarı immünohistokimyasal olarak ortaya konmuş ve sonuçları birlikte değerlendirilmiştir.

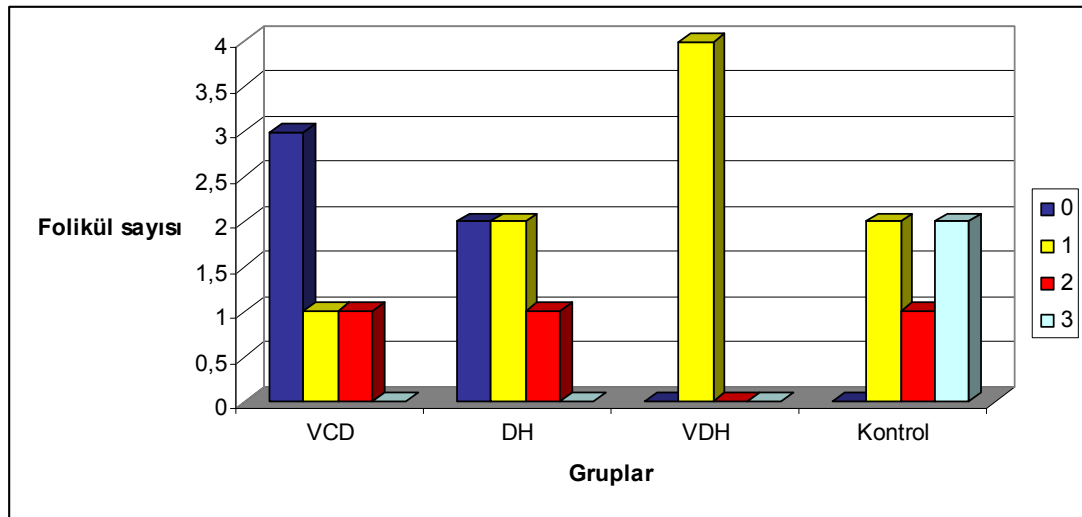
Deney ve kontrol gruplarının primordiyal foliküllerindeki AMH boyanmasının karşılaştırılması **şekil 4.14'**de gösterildi. AMH boyanma yoğunluğu bakımından gruplar arasında fark yoktu. ( $\chi^2=7,600$  SD=6 P>0,05)



(0=Boyanma yok, 1=Hafif boyanma, 2=Orta boyanma, 3=Kuvvetli boyanma)

**Şekil 4.14.** Deneklere ait primordiyal folikül AMH boyanma yoğunluğunun deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

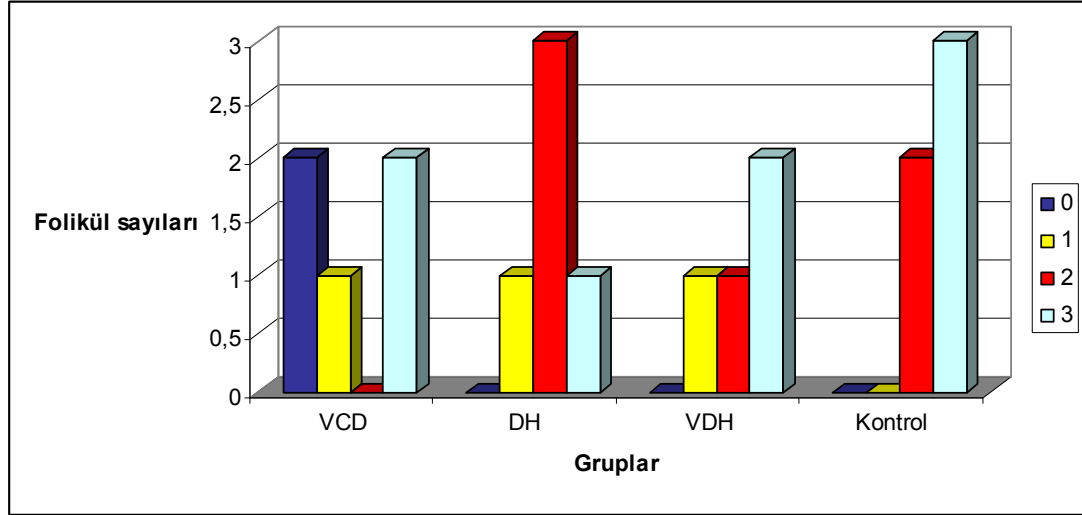
Deney ve kontrol gruplarının primer foliküllerindeki AMH boyanmasının karşılaştırılması **şekil 4.15**'de gösterildi. AMH boyanma yoğunluğu bakımından gruplar arasında fark yoktu ( $X^2=14,524$  SD=9 P>0,05).



(0=Boyanma yok, 1=Hafif boyanma, 2=Orta boyanma, 3=Kuvvetli boyanma)

**Şekil 4.15.** Deneklere ait primer folikül AMH boyanma yoğunluğunun deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

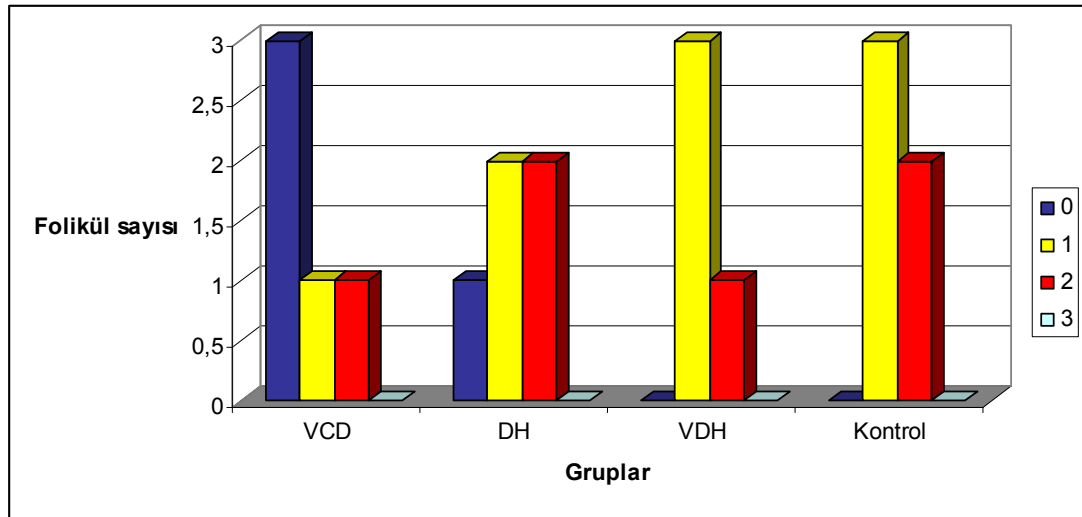
Deney ve kontrol gruplarının sekonder foliküllerindeki AMH boyanmasının karşılaştırılması **şekil 4.16**'da gösterildi. AMH boyanma yoğunluğu bakımından gruplar arasında fark yoktu ( $\chi^2=10,767$  SD=9 P>0,05).



(0=Boyanma yok, 1=Hafif boyanma, 2=Orta boyanma, 3=Kuvvetli boyanma)

**Şekil 4.16.** Deneklere ait sekonder folikül AMH boyanma yoğunluğunun deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

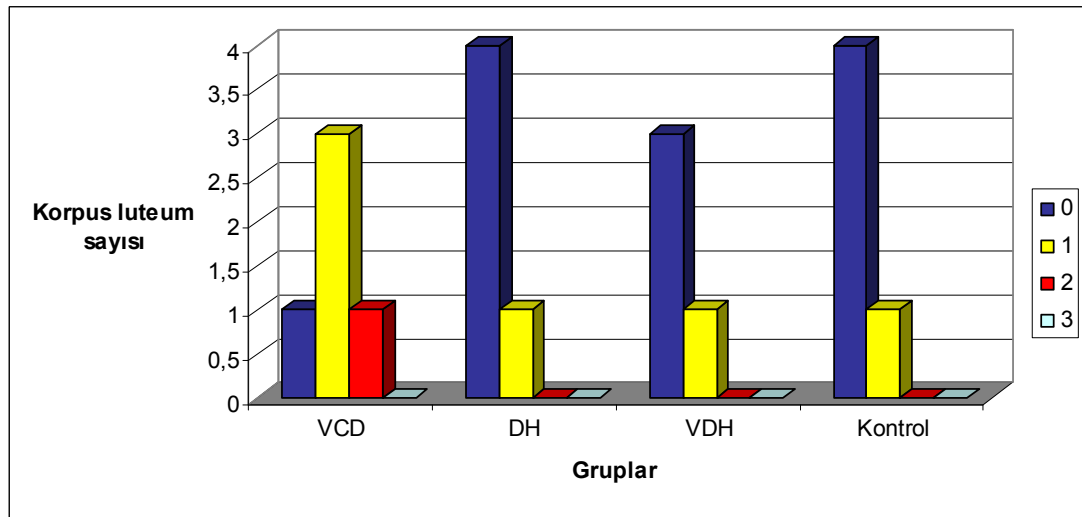
Deney ve kontrol gruplarının antral foliküllerindeki AMH boyanmasının karşılaştırılması **şekil 4.17**'de gösterildi. AMH boyanma yoğunluğu bakımından gruplar arasında fark yoktu ( $\chi^2=7,653$  SD=6 P>0,05)



(0=Boyanma yok, 1=Hafif boyanma, 2=Orta boyanma, 3=Kuvvetli boyanma)

**Şekil 4.17.** Deneklere ait antral folikül AMH boyanma yoğunluğunun deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

Deney ve kontrol gruplarında korpus luteumların AMH boyanmasının karşılaştırılması **şekil 4.18**'de gösterildi. AMH boyanma yoğunluğu bakımından gruplar arasında fark yoktu ( $\chi^2=6,571$  SD=6 P>0,05).



(0=Boyanma yok, 1=Hafif boyanma, 2=Orta boyanma, 3=Kuvvetli boyanma)

**Şekil 4.18.** Deneklere ait korpus luteumların AMH boyanma yoğunluğunun deney ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

## 4.8. Histolojik Değerlendirme

### 4.8.1. Hemotoksin ve Eozin Bulguları

Araştırmamızın kontrol gruplarına ait ovaryumdan elde edilen ve H&E ile boyanmış kesitleri incelediğimizde, organların yüzeyinin tek katlı kübik epitel özelliğindeki germinal epitel ile kaplı olduğu, epitelin altında ise fibröz bağ dokusu lifleri ve hücrelerinden oluşan kalın tunika albuginea tabakası olduğu görüldü. Tunika albuginea altında ise çeşitli sayı ve tipte foliküllerin (primordiyal, primer, sekonder antral) olduğu korteks ile kan damarından zengin medulla gözlemlendi. Foliküllerin arasında stromada yer alan hücreler oval şekilli, büyük nükleuslu ve sitoplazmaları bazofilik olup gruplar halinde idi. Foliküllerin etrafında ayrıca düz kas demetleri ve bağ dokusu lifleri görüldü. Kortekste damar kesitlerine az sayıda rastlandı (**Şekil 4.19**).

Ovaryum korteksinde foliküllerin çevresinde hücreden zengin bağ dokusu yapısında stroma gözlemlendi. Korteksin tunika albugineaya yakın bölümünde ayrıca çok sayıda primordiyal foliküller dikkati çekti. Primordiyal foliküllerde içte oosit ve oositin çevresinde tek katlı yassı granüloza hücreleri yer almıştı. (**şekil 4.21**) Oosit büyük ökromatik bir nükleusa sahip olup nükleolusu belirgindi. Primordiyal foliküller yanı sıra, bir oosit ve çevresinde tek katlı kübik şekilli granüloza hücreleri bulunan foliküller de bu bölgede gözlemlendi. Primer foliküller primordiyal foliküllerden çap olarak biraz daha büyüktü. Oosit ile granüloza hücreleri arasında zona pellusida oluşmaya başlamıştı. (**şekil 4.20**)

Sekonder foliküllerde oositin etrafında çok katlı epitel görünümündeki granüloza hücreleri ile oosit ve granüloza hücreleri arasında zona pellusida belirgin olarak gözlemlendi. Sekonder foliküllerde granüloza hücreleri dışında teka follikülü oluşmaya başlamıştı. (**şekil 4.22**)

Antral foliküllerde çok tabakalı granüloza hücreleri arasında düzensiz boşluklar vardı. Bazı antral foliküllerde boşluklar birleşerek tek bir boşluk (antrum) oluşturmuştu. Ayrıca antrumun iç kısımlarına doğru oosit ve granüloza hücreleri birlikte kümülüs ooforusu şekillendirmişti. Bu folliküllerde zona pellusida oldukça belirgindi. Folikülü dıştan saran teka folikülü iki tabakalı olarak gözlemlendi. (**şekil**

**4.23)** Teka internada fibroblastlar, küçük kas demetleri ve kan damarları görüldü. Teka eksternada ise düz kas demetleri ile birlikte kollajen liflerde gözlemlendi.

Ovaryumun medullasında kortekse göre daha az sayıda hücre olmasına karşın damarlanmanın fazla olduğu görüldü. Medulladaki hücrelerin nükleusları merkezde olup sitoplazmaları ise bazofilik boyanmıştı. Ayrıca bağ dokusu hücreleri de görüldü. Bununla birlikte medulladaki lif ve kas demetleri de kortekse göre daha belirgin olarak gözlemlendi.

VCD uygulanan grupta, ovaryumu dıştan saran epitelin tek katlı kübik ve yassı hücrelerden oluştuğu belirlendi. Germinal epitelin altında tunika albuginea yer almaktaydı.

Kortekste, primordiyal foliküllerin sayıca azaldığı ve bazı kesitlerde hiç kalmadığı gözlemlendi. Bir kaç adet görülen primordiyal foliküllerin büyük çoğunluğunun dejenere olduğu gözlemlendi. Dejenere folikülde yer alan oositte kromatinin nükleus zarına yakın yoğunlaştığı ve oosit ile granüloza hücreleri arasında ilişkinin bozulduğu gözlemlendi. Ayrıca oositin çevresini saran granüloza hücrelerinde, hücre içeriği dağılmış olarak ve yan yüzeylerde yoğun ayrılmalar ile folikülün bütünlüğünün tamamen bozulduğu gözlemlendi. Normal primordiyal foliküller ise hiç gözlenmedi. **(şekil 4.24)**

Primer foliküller kortekste çok az sayıda gözlemlendi. Atretik foliküllerde, fragmente olmuş oosit ve granüloza hücrelerinde apoptoza giren hücre sayılarının arttığı gözlemlendi. Ayrıca granüloza hücrelerinin yan yüz bağlantılarının bozulduğu belirlendi. **(şekil 4.25)**

Sekonder ve antral foliküllerin sayısı kontrol grubuna göre daha az sayıda olduğu görüldü. Bu foliküllerdeki oosit yapısı normal olarak görülmekle birlikte granüloza ve teka tabakalarındaki hücreler arasında apoptoza giren hücreler vardı. Bu hücrelerin bazılarında kromatin nükleus zarına yakın yoğunlaşmıştı. Ayrıca hücre içeriği dağılmış halde ve komşu hücreler ile yan yüz bağlantılarının bozulduğu gözlemlendi. **(şekil 4.25-30)**

Korpus luteumda ise nadir olarak şekilleri ve sınırları düzensiz olan dejenere hücreler gözlemlendi. Korteksteki stromal hücreler kontrol grubuna benzerdi.



Ovaryum medullasında kortekse göre büyük kan damarları ve yoğun lifler görüldü. Medullada bulunan stromal hücrelerde herhangi bir dejenerasyon gözlenmedi.

Dihidroepiandrosteron uygulanmış sıçanlardan elde edilen H&E boyası uygulanan ovaryum kesitlerinin yapısal özellikler kontrol grubu ile benzerlik gösterdi. Ovaryumun dışında tek katlı kübik germinal epitel ve altında tunika albuginea yer almaktaydı. Ancak yüzey epiteli yer yer yassı hücrelerden oluştuğu görüldü ve epitel altında tunika albuginea içerisinde ve kortekste folikül kistleri vardı.**(şekil 4.31)**

Ovaryum korteksinde bulunan primordiyal, primer, sekonder ve antral foliküllerin histolojik yapısı kontrol grubuyla benzerdi. Sekonder foliküller ve özellikle antral foliküllerde oositinin etrafını saran granüloza hücrelerinde apoptoz görüldü. Ayrıca teka tabakasında ise kalınlaşmalar göze çarptı.**(şekil 4.32-34)**

DHEA uygulanan grubun ovaryum kesitlerinde korpus luteumun histolojik yapısı kontrol grubuna benzerdi. Ovaryum medullasında kortekse göre daha büyük kan damarları ve lif yapıları görüldü. Medullada bulunan stromal hücrelerde herhangi bir dejenerasyon gözlenmedi.

VCD ile DHEA' nın birlikte uygulandığı sıçanlardan elde edilen ovaryumların H&E ile boyanmış kesitleri incelendiğinde, organı dıştan tek katlı kübik ve yer yer tek katlı yassı germinal epitelin sardığı ve altında tunika albugineanın yer aldığı gözlemlendi. Kortekste çok az sayıda normal primordiyal foliküller gözlemlendi. Primer foliküllerin ise çok sayıda olduğu gözlemlendi. Sekonder ve antral foliküllerin sayısında kontrol grubuna yakın olduğu belirlendi. Sağlıklı foliküller normal yapıdaydı. Bazı sekonder ve antral foliküllerin granüloza hücrelerinde apoptoz görüldü. Korteksde ve tunika albugineada az sayıda folikül kistleri vardı. **(şekil 4.35-38)**

## 4.9. İmmünohistokimya Bulguları

### 4.9.1. TUNEL Bulguları

TUNEL metodu ile boyanmış ovaryum kesitlerinin kontrol gruplarında primordiyal ve primer foliküllerde TUNEL (+) boyanan hücre görülmedi. Sekonder ve antral foliküllerde ise az sayıda TUNEL (+) boyanan hücre belirlendi. Stromada ve teka tabakasında ve korpus luteumlarda boyanma görülmedi.(**şekil 4.39-40**)

VCD grubunda ise az sayıdaki primordiyal ve primer foliküllerde TUNEL (+) boyanmış hücreler görüldü. Sekonder ve antral foliküllerin granüloza hücrelerinde kontrole göre artmış TUNEL (+) boyanma görüldü. Korteks stroması ve teka tabakalarında TUNEL (+) hücelere rastlanmadı. (**şekil 4.41-42**)

DHEA grubunda, primordiyal ve primer foliküllerde TUNEL (+) boyanmış hücre görülmedi. Sekonder ve antral foliküllerin granüloza hücrelerinde kontrol grubuna benzer şekilde çok az sayıda TUNEL (+) boyanma vardı. Stromada ve teka tabakalarında boyanma görülmedi. (**şekil 4.43**)

VDH grubunda ise primordiyal foliküllerde TUNEL (+) boyanmış hücre görülmemekle birlikte bazı primer foliküllerde az sayıda boyanma gözlemlendi. Sekonder ve antral foliküllerde TUNEL (+) boyanmış hücre VCD grubuna göre daha az olarak görüldü. Stromada ve teka tabakalarında boyanma görülmedi. Fakat bazı korpus luteumlarda TUNEL (+) boyanmış hücreler gözlemlendi.

### 4.9.2. Kaspaz-3 Bulguları

Kaspaz-3 antikoruna ile boyanmış ovaryum kesitlerinde, kontrol gruplarında primordiyal ve primer foliküllerde boyanma görülmedi. Sekonder ve antral foliküllerin granüloza hücrelerinde ise az miktarda boyanma göze çarptı. Stroma hücreleri ve teka tabakasında kaspaz 3 antikoruna ile boyanma görülmedi. Ayrıca bu gruptaki korpus luteumlarda da herhangi bir boyanma gözlenmedi. Bu gruptaki foliküllerde yer alan oositlerde herhangi bir boyanma gözlenmedi. (**şekil 4.44**)

VCD grubunda, az sayıdaki primordiyal ve primer foliküllerde yer yer hafif boyanma gözlemlendi. Sekonder ve antral foliküllerin granüloza hücrelerinde orta yoğunlukta boyanma gözlemlendi. Bu grubun korpus luteumunda ve teka tabakasında

diğer gruplara göre biraz daha yoğun boyanma görüldü. Bu gruptaki foliküllerde yer alan oositlerde herhangi bir boyanma gözlenmedi. **(şekil 4.45-47)**

DHEA grubunda, kontrol grubuna benzer şekilde, primordiyal ve primer foliküller boyanma görülmeydi. Sekonder ve antral foliküllerin granüloza hücrelerinde orta yoğunlukta, teka tabakası ve stromada ise daha yoğun olarak boyanma görüldü. Korpus luteumda ise boyanma görülmeydi. Bu gruptaki foliküllerde yer alan oositlerde herhangi bir boyanma gözlenmedi. **(şekil 4.48-49)**

VDH grubunda ise primordiyal ve primer foliküllerde boyanma yoktu. Sekonder ve antral foliküllerin granüloza hücrelerinde az yoğunlukta boyanma görüldü. Bu grubun stroması ve teka hücrelerinde boyanma yoğunluğunda artış olduğu göze çarptı. Korpus luteumda ise az yoğunlukta boyanma görüldü. Bu gruptaki foliküllerde yer alan oositlerde herhangi bir boyanma gözlenmedi. **(şekil 4.50-52)**

#### **4.9.3. Antimüllerian Hormon Bulguları**

AMH antikoruyla boyanmış kontrol gruplarına ait ovaryum kesitlerinde, primer, sekonder ve küçük çaplı antral foliküllerin granüloza hücrelerinde yoğun boyanma gözlendi. Bu grupların hepsinde benzer olarak primordiyal foliküllerde ve büyük çaptaki antral foliküllerde boyanma görülmeydi. Kesitlerin, stroma, teka tabakası ve korpus luteumlarında boyanma gözlenmedi. Ayrıca folliküllerin oositlerinde de boyanma görülmeydi. **(şekil 4.53)**

VCD grubunda, primer, sekonder ve küçük çaplı antral foliküllerde genel olarak AMH (+)' liği zayıftı. Primordiyal foliküllerde hiç boyanma görülmeydi. Ovaryumların stromasında foliküllerin teka tabakasında ve oositlerinde boyanma gözlenmedi. **(şekil 4.54)**

DHEA grubunda, primer, sekonder ve küçük çaplı antral foliküllerde genel olarak AMH ile boyanma görüldü. Sekonder ve antral foliküllerin granüloza hücrelerinde kontrol grubuna göre boyanma yoğunluğunda azalma dikkat çekti. Bu grupta da primordiyal foliküllerde hiç boyanma görülmeydi. Kontrol grubuna benzer şekilde ovaryum kesitlerinin stroması, foliküllerin teka tabakası ve oositlerde boyanma görülmeydi. **(şekil 4.55-56)**

VDH grubunda, kontrol grubuna benzer şekilde, AMH (+) hücreler, primer, sekonder ve küçük çaplı antral foliküllerin granüloza hücrelerinde gözlemlendi. Bu grupta primordiyal foliküllerde boyanma görülmedi. Ayrıca ovaryumların stromasında foliküllerin teka tabakasında ve oositlerinde boyanma görülmedi. (**şekil 4.57-58**)

#### 4.9.4. Androjen Reseptörü Bulguları

AR antikoruyla boyanmış ovaryum kesitlerinde, kontrol gruplarında, bazı sekonder ve antral foliküllerin granüloza hücrelerinde yoğun boyanma görüldü. Teka hücrelerinde ve stromada orta yoğunlukta boyanma görüldü. Primordiyal ve primer foliküllerde ise boyanma görülmedi. Folliküllerin oositlerinde de boyanma gözlemlenmedi. (**şekil 4.59**)

VCD grubunda primordiyal ve primer foliküllerde boyanma görülmedi. Bazı sekonder ve antral foliküllerde orta derecede boyanma dikkat çekti. Stroma ve teka tabakasında orta yoğunlukta boyanma vardı. (**şekil 4.60**)

DHEA grubunda primordiyal ve primer foliküllerde boyanma yoktu ancak teka tabakası ve stromada yoğun boyanma gözlemlendi. AR antikoruyla boyanma sekonder ve antral foliküllerde zayıf, atretik foliküllerde kuvvetli olarak belirlendi. (**şekil 4.61-64**)

VDH grubunda ise oldukça kuvvetli boyanmış hücreler stroma ve teka tabakasında dikkat çekiciydi. Primordiyal ve primer foliküllerde ise boyanma yoktu. Ancak sekonder ve antral foliküllerin granüloza hücrelerinde orta yoğunlukta boyanma belirlendi. (**şekil 4.65-70**)

#### 4.10. ELISA

Deney ve kontrol gruplarına ait serum FSH, E2, AMH ve inhibin düzeylerinin karşılaştırılması **Tablo 4.10'**da gösterilmiştir. Bu bulgulara göre;

Deney ve kontrol grupları arasında serum FSH düzeyleri birbirleri ile karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı düzeyde fark yoktu ( $P>0,05$ ). Serum FSH seviyelerine baktığımızda da tüm gruplar birbirlerine yakın değerlerde olduğu görüldü.

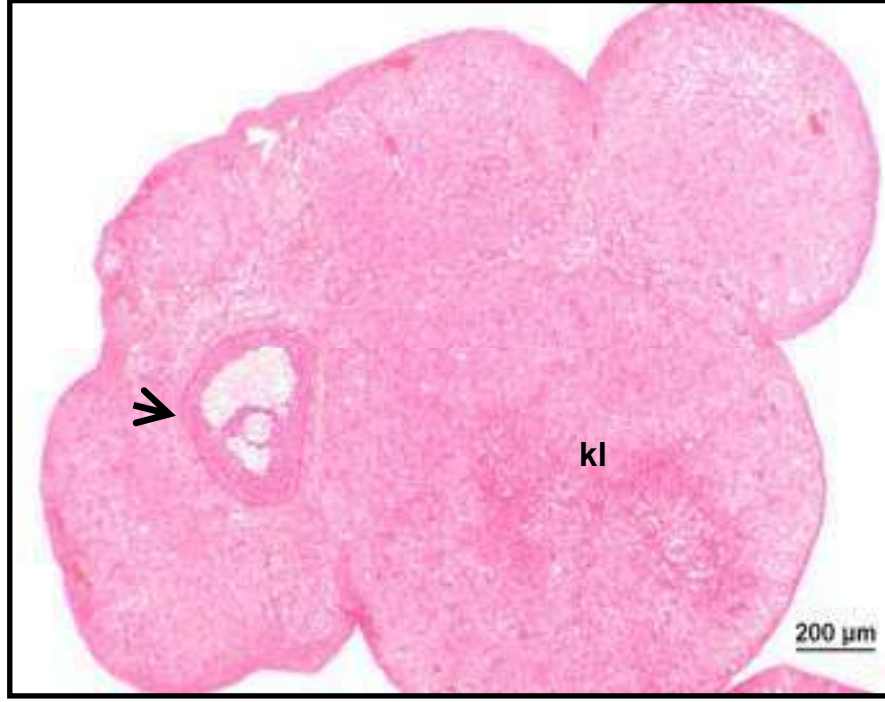
Deney ve kontrol grupları arasında serum E2 düzeyleri birbirleri ile karşılaştırıldığında gruplar arasında fark yoktu ( $P>0,05$ ). Serum E2 seviyeleri yönünden VCD grubunda istatistiksel olarak fark olmamasına karşın diğer gruplara göre daha yüksek miktarda görüldü.

Deney ve kontrol grupları arasında serum AMH düzeyleri birbirleri ile karşılaştırıldığında gruplar arasında fark vardı ( $P<0,01$ ). VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,01$ ). VCD grubunda serum AMH düzeyleri kontrol grubundan daha azdı. VCD grubu ile DH grubu arasında fark yoktu ( $P>0,05$ ). VCD grubu ile VDH grubu arasında fark yoktu ( $P>0,05$ ). DH grubu ile kontrol grubu arasında fark yoktu ( $P>0,05$ ). DH grubu ile VDH grubu arasında fark yoktu ( $P>0,05$ ). VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,05$ ). VDH grubunda serum AMH düzeyleri kontrol grubundan daha azdı.

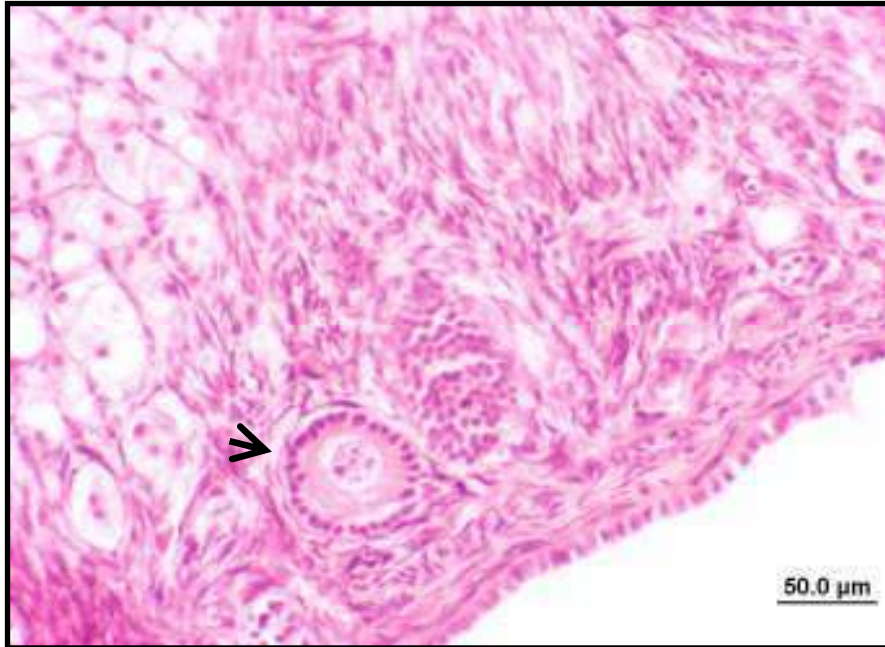
Deney ve kontrol grupları arasında serum inhibin düzeyleri birbirleri ile karşılaştırıldığında gruplar arasında fark vardı ( $P<0,05$ ). VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardı ( $P<0,01$ ). VCD grubunda serum inhibin düzeyleri kontrol grubundan daha azdı. VCD grubu ile DH grubu arasında fark vardı ( $P<0,05$ ). VCD grubunda serum inhibin düzeyleri DH grubundan daha azdı. VCD grubu ile VDH grubu arasında fark vardı ( $P<0,05$ ). VCD grubunda serum inhibin düzeyleri VDH grubundan daha azdı. DH grubu ile kontrol grubu arasında fark yoktu ( $P>0,05$ ). DH grubu ile VDH grubu arasında fark yoktu ( $P>0,05$ ). VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark yoktu ( $P>0,05$ ).

**Tablo 4.10.** Deney ve kontrol gruplarına ait serumdaki FSH, E2, AMH ve İnhibin düzeylerinin karşılaştırılması

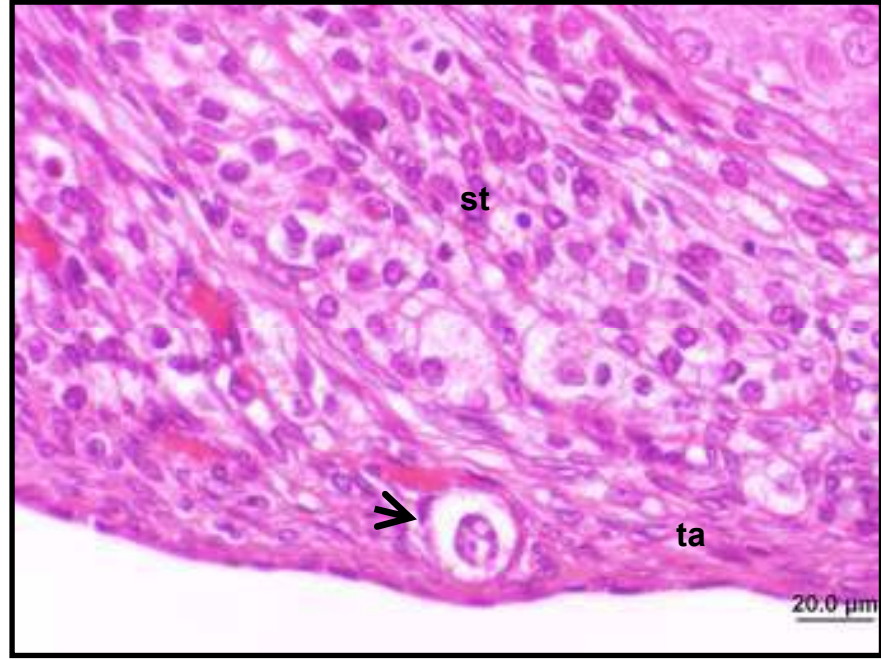
n=10	VCD Med(min;max)	DH Med(min;max)	VDH Med(min;max)	Kontrol Med(min;max)	P
FSH	0,33(0,16;0,84)	0,53(0,11;1,42)	0,33(0,18;0,58)	0,26(0,19;15,1)	$P>0,05$
E2	2581,6(1,62;2762,2)	861(223;1518)	661(269;1790)	749,5(193;2150)	$P>0,05$
AMH	0,04 (0;1,02)	0,75(0,36;1,38)	0,3(0;0,87)	1,14(0,48;1,98)	$P<0,01$
İNHİBİN	15,6(9,64; 51,4)	30,7(26,3;53)	28,7(26,8;37,8)	36(22,7;41,8)	$P<0,05$



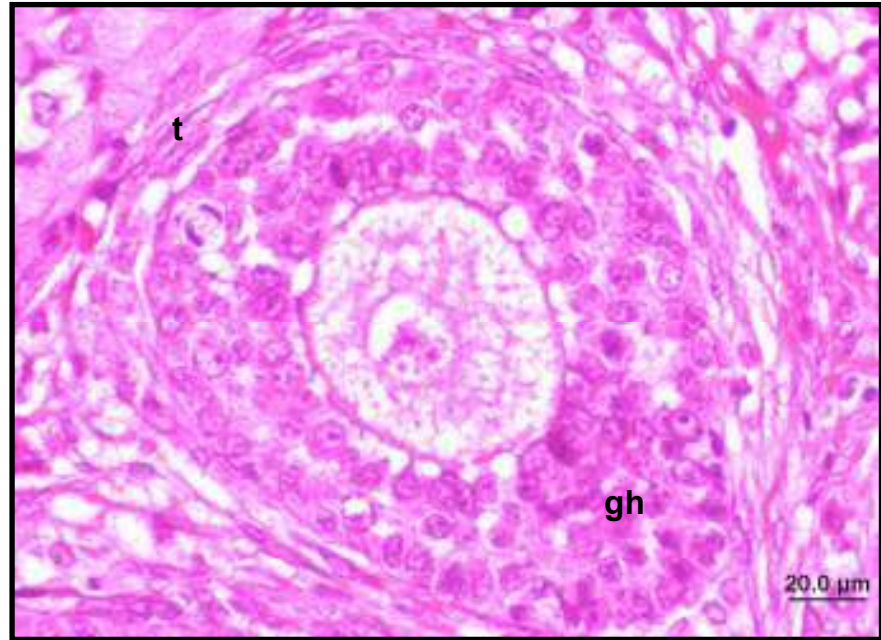
**Şekil 4.19.** Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti. Gelişen foliküller gözlenmektedir. (↘) antral folikül, (kl) korpus luteum H&E, Bar µm



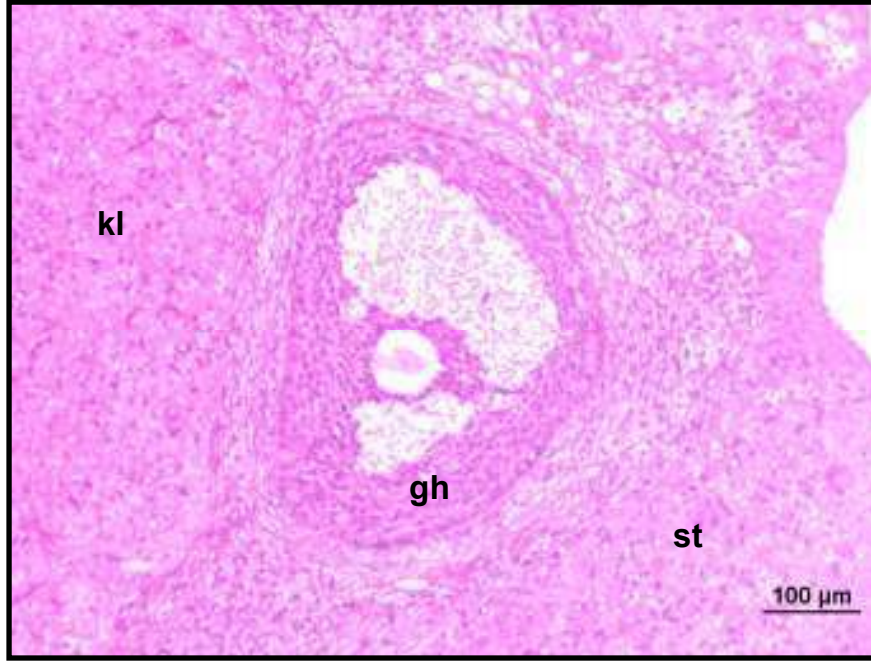
**Şekil 4.20.** Kontrol grubuna ait ovaryum kesitlerinde (↘) normal primer folikül görülmektedir. H&E, Bar 50 µm.



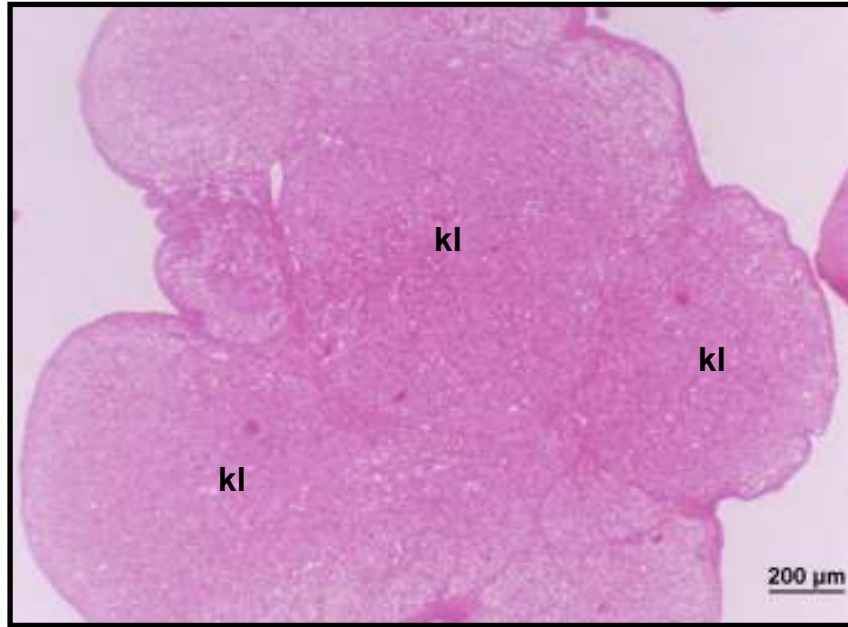
**Şekil 4.21.** Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde germinal epitel ve altında (**ta**) tunika albuginea (↓) normal primordiyal folikül ve (**st**) stroma görülmektedir. H&E, Bar 20 μm



**Şekil 4.22.** Kontrol grubuna ait ovaryum kesitlerinde normal sekonder folikül. Oosit, (**gh**) granuloza hücreleri ile etrafında oluşmaya başlayan (**t**) teka tabakası gözlenmektedir. H&E, Bar 20 μm

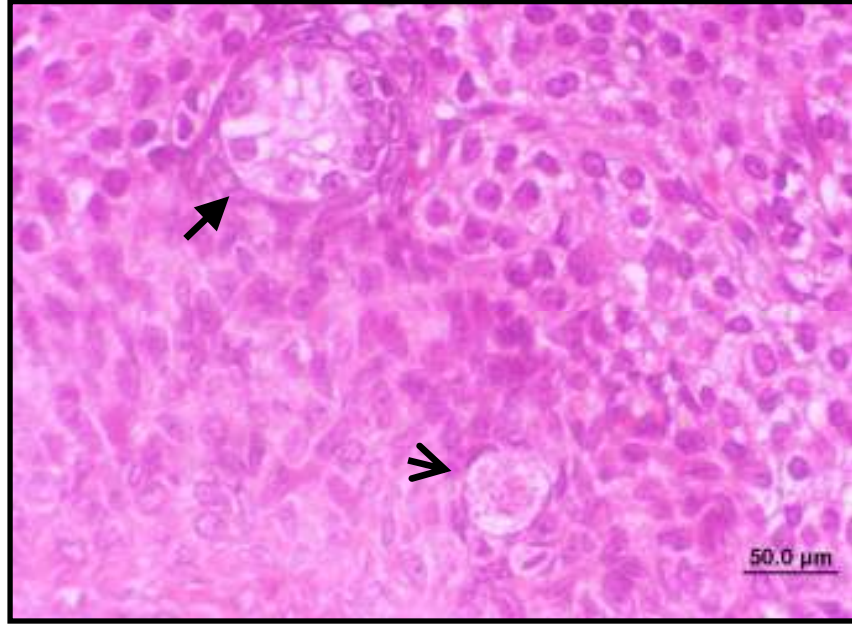


**Şekil 4.23.** Kontrol grubuna ait ovaryum kesitlerinde normal antral folikül (**gh**) granüloza hücreleri ile (**kl**) korpus luteum görülmektedir. H&E, Bar 100  $\mu$ m

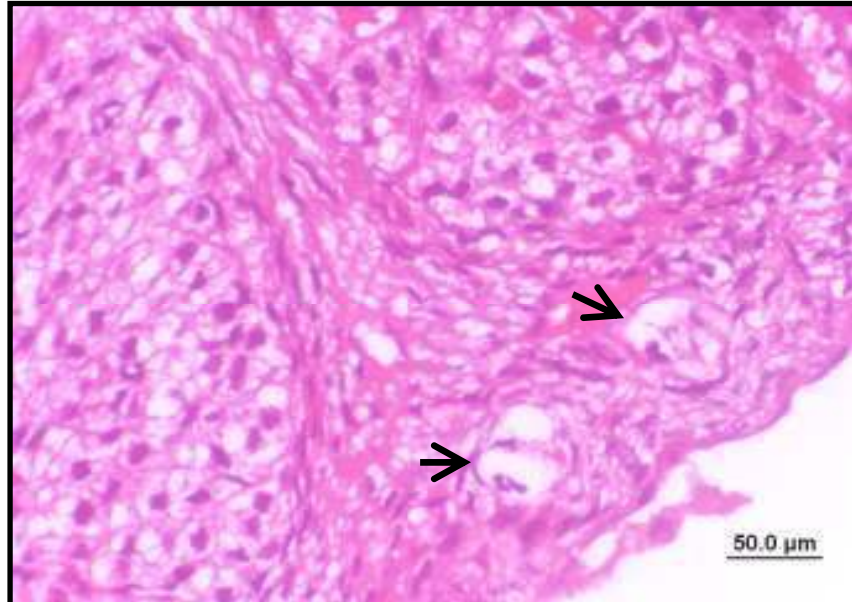


**Şekil.4.24.** VCD grubuna ait sıçanların ovaryumuna ait kesitte genel görünüm. (**kl**) korpus luteumlar. H&E, Bar 200  $\mu$ m.

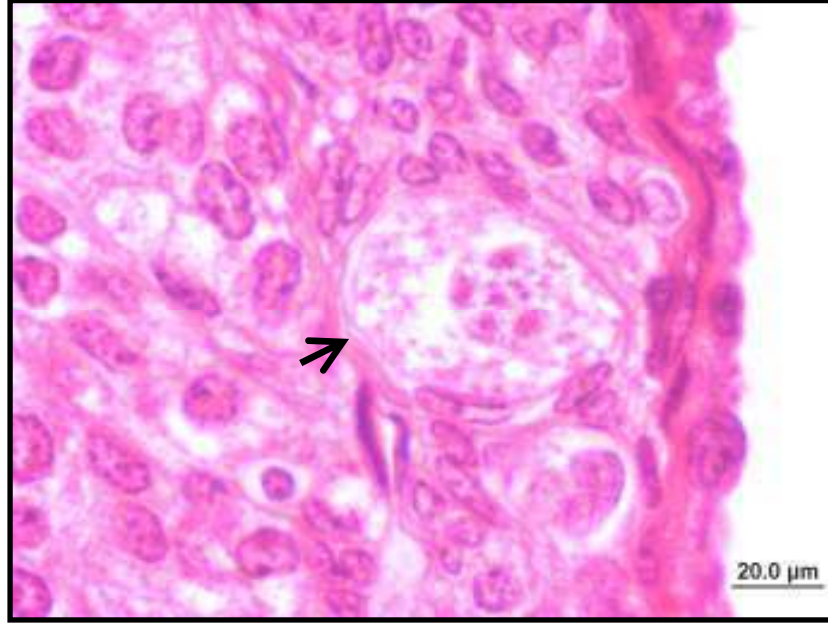




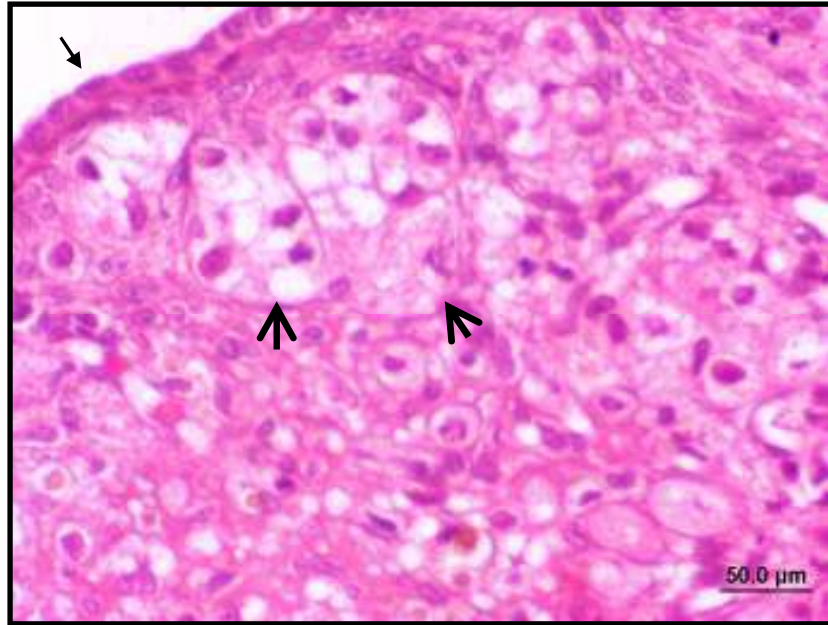
**Şekil 4.25.** VCD grubuna ait ovaryum kesitinde (↓) dejenere olmuş primordiyal folikül ile hücre sınırları düzensizleşmiş granüloza hücreleri ve (→) dejenere oosit içeren primer folikül H&E, Bar 50μm



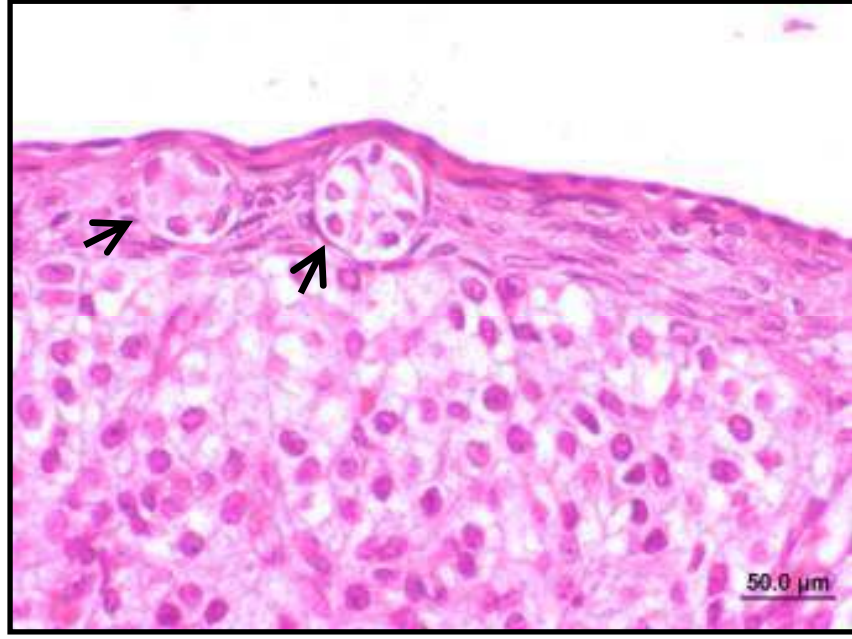
**Şekil 4.26.** VCD grubuna ait ovaryum kesitinde kortekste (↓) dejenere primordiyal foliküller görülmektedir. H&E, Bar 50μm



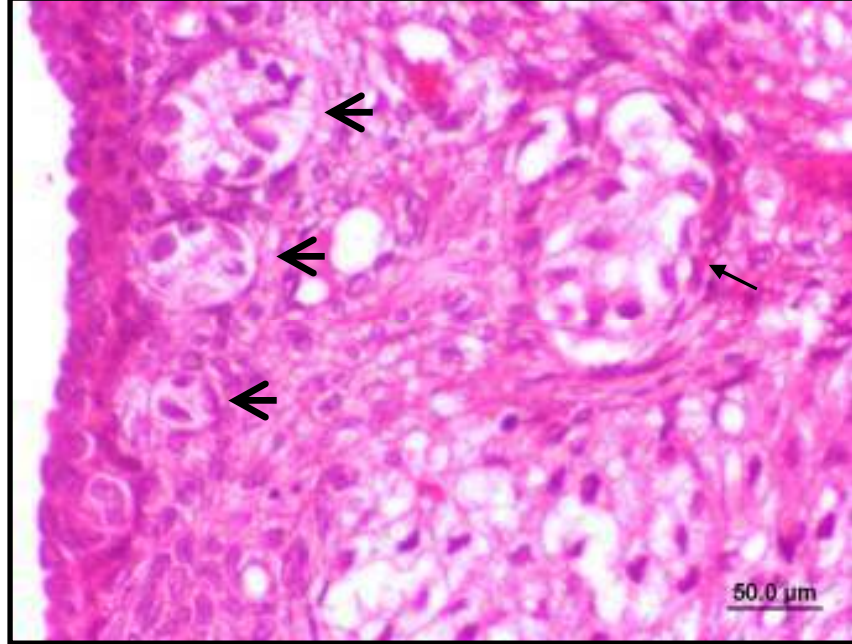
**Şekil 4.27.** VCD grubuna ait ovaryum kesitinde (↓) atreziye giden primordiyal folikül görülmektedir. Primordiyal folikülde oositin nukleusundaki kromatinin nukleus zarına yakın bölgelerde yoğunlaştığı dikkat çekmektedir. H&E, Bar 20μm



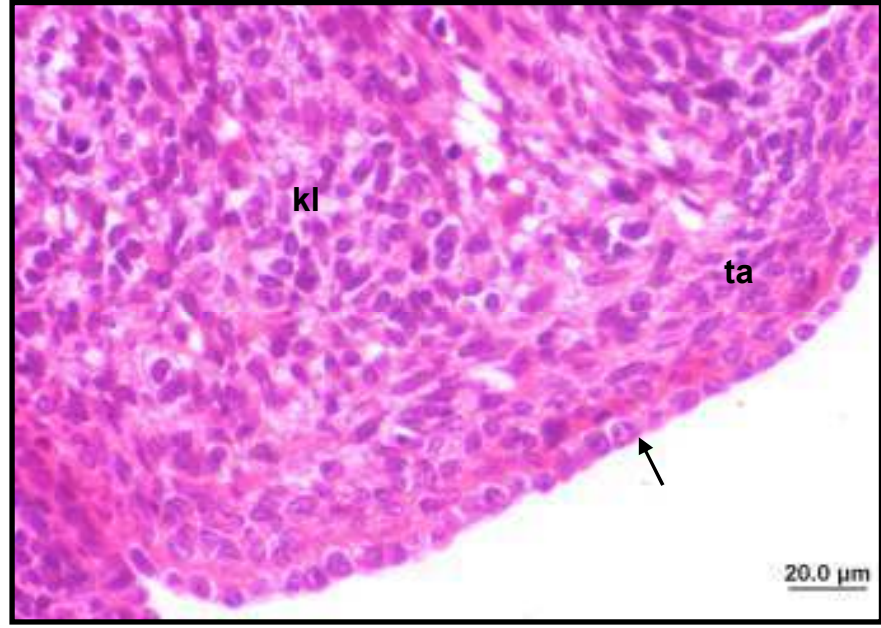
**Şekil 4.28.** VCD grubuna ait ovaryum kesitinde (→) germinal epitel altında oosit granüloza ilişkisinin kaybolduğu, granüloza hücrelerinin düzeninin bozulduğu (↓) dejenere primer folliküller gözlenmektedir. H&E, Bar 50μm



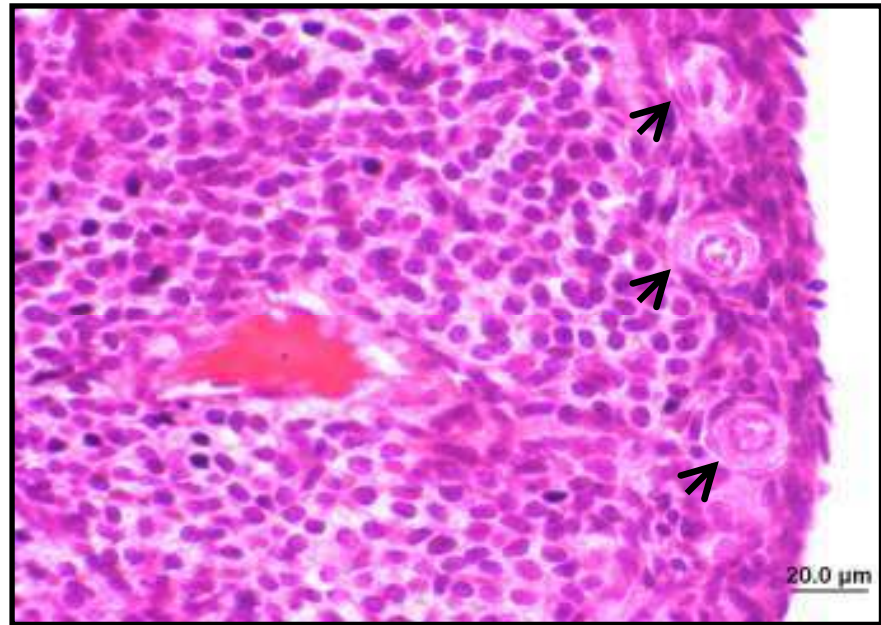
**Şekil 4.29.** VCD grubuna ait ovaryum kesitinde (↓) atretik primordiyal foliküller görülmektedir. H&E, Bar 50μm



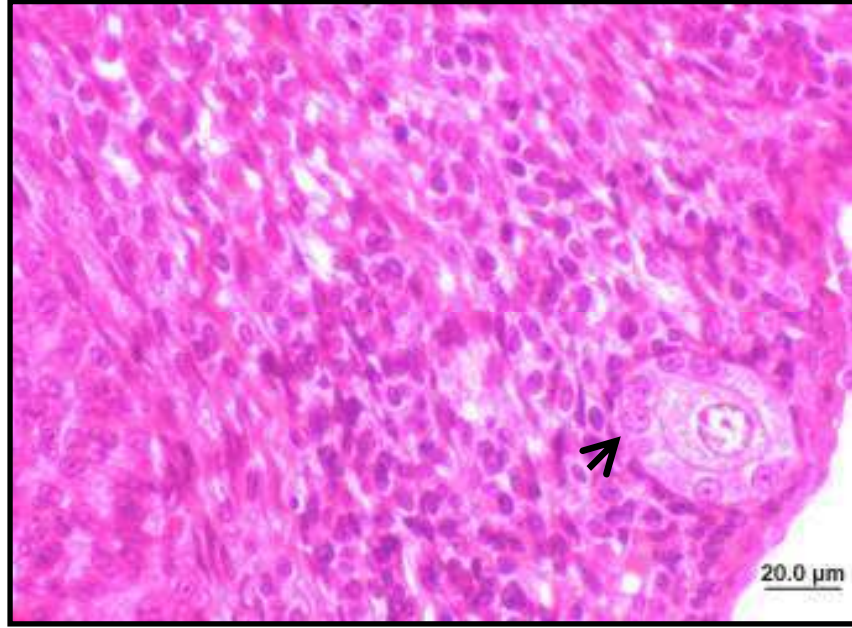
**Şekil 4.30.** VCD grubuna ait ovaryum kesitinde epitel altında oositleri dejenere (↓) primordiyal follükül ile oosit ve granüloza hücreleri ilişkisi tamamen bozulmuş (→) primer folikül görülmektedir. H&E, Bar 50μm



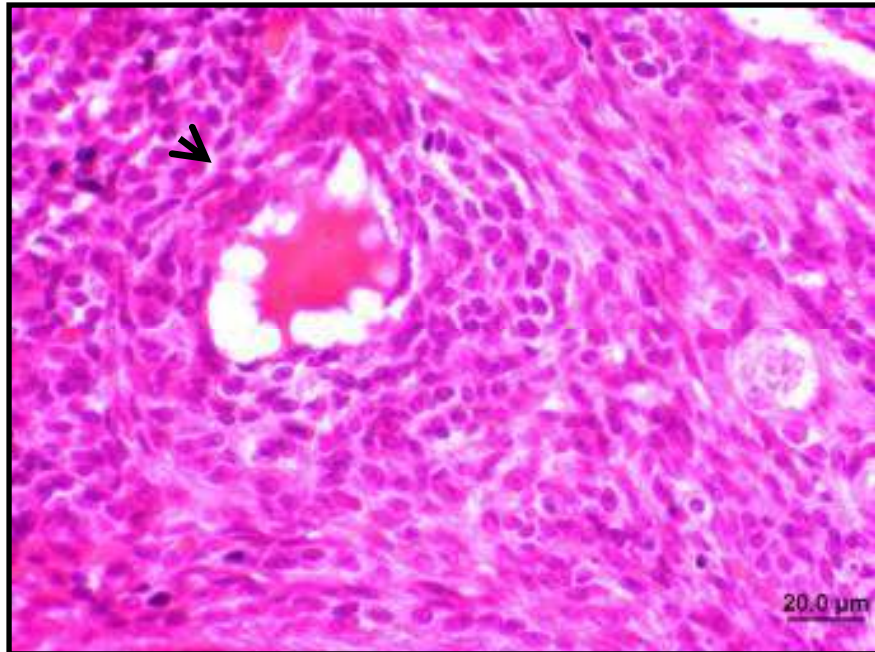
**Şekil 4.31.**DHEA grubuna ait ovaryum kesitinde, kontrol grubuna benzer şekilde (→) germinal epitel ve altında (ta) tunika albuginea ile (kl) korpus luteum görülmektedir. H&E, Bar 20 μm



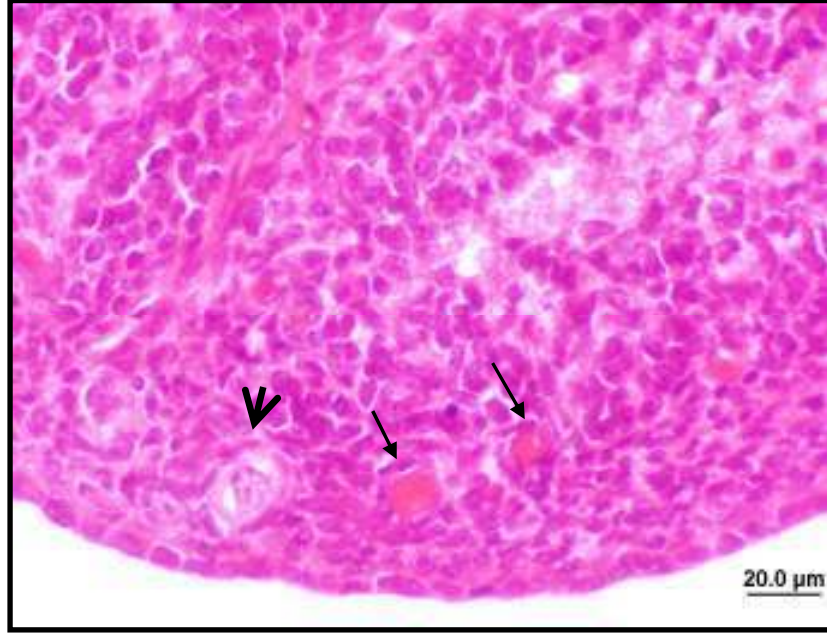
**Şekil 4.32.** DHEA grubuna ait ovaryum kesitinde kortekste normal (↓) primordiyal foliküller görülmektedir. H&E, Bar 20 μm



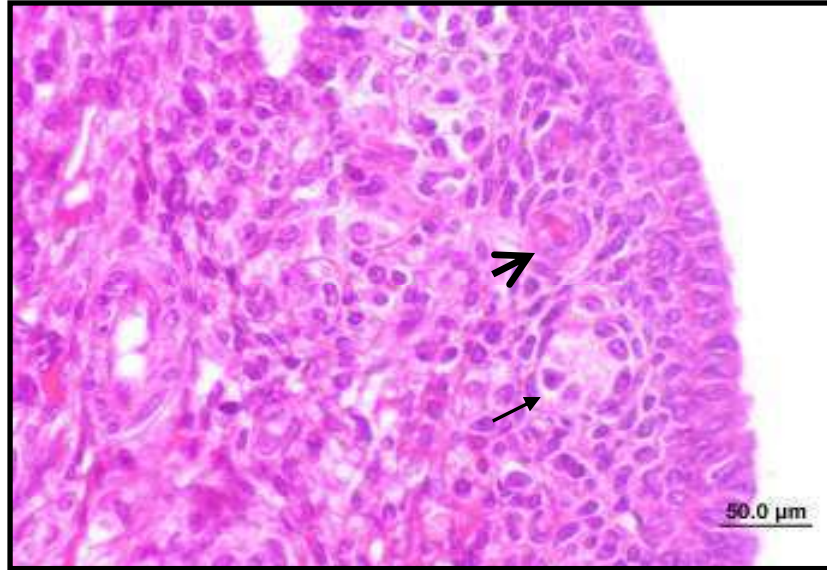
Şekil 4.33. DHEA grubuna ait ovaryum kesitinde (↓) normal primer folikül. H&E, Bar 20µm



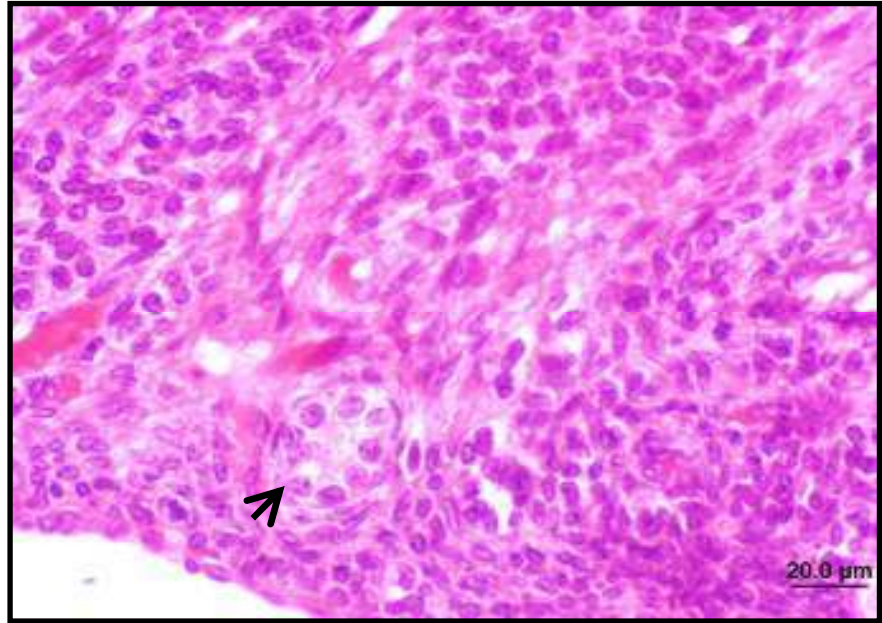
Şekil 4.34. DHEA grubuna ait ovaryum kesitinde kortekste (↓) kistik folikül H&E, Bar 50µm



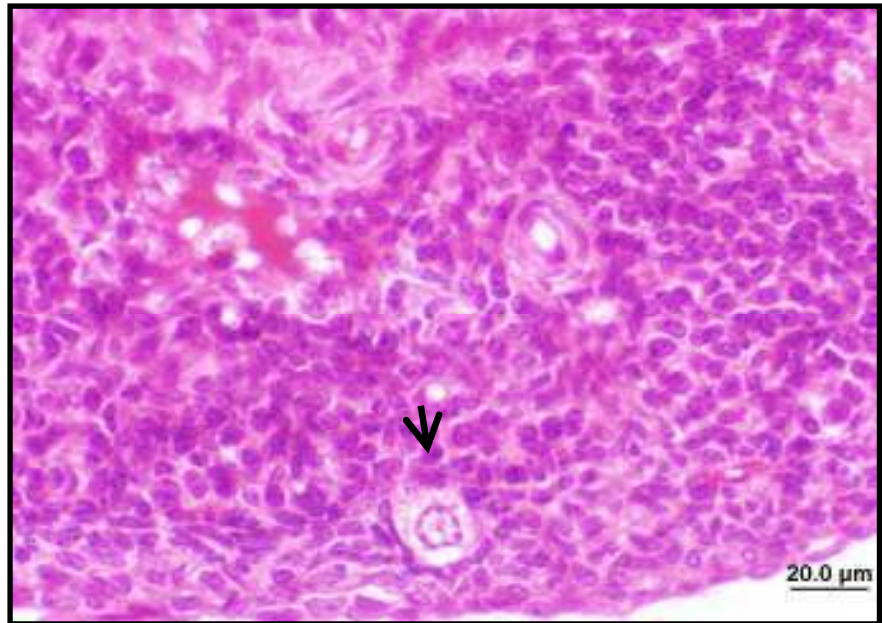
Şekil 4.35.VDH grubuna ait ovaryum kesitinde (↘) normal primordiyal folikül ile oosit sitoplazmasında eozinofilinin arttığı dikkat çeken ve dejenerasyona giden (→) primordiyal foliküller birarada görülmektedir. H&E, Bar 20μm



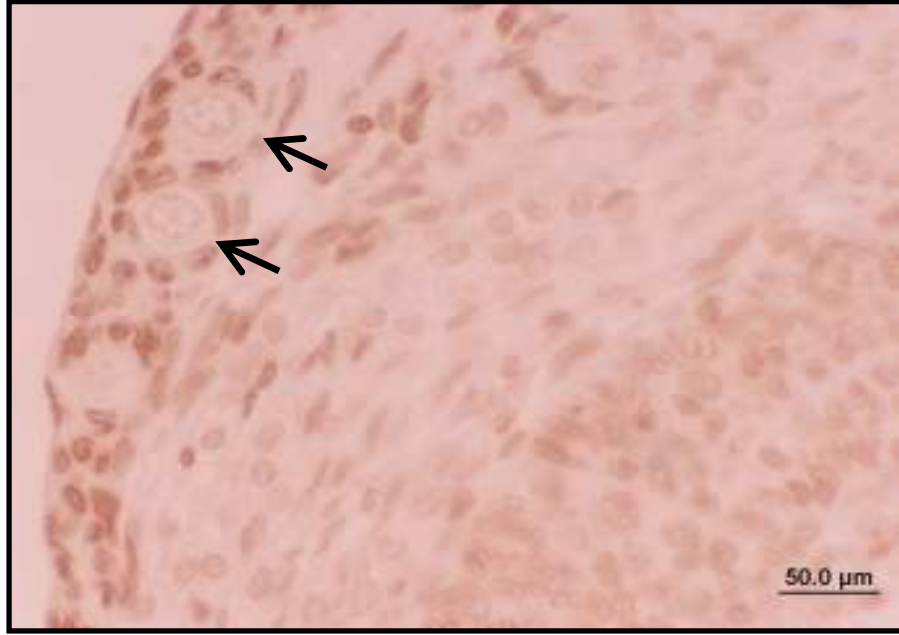
Şekil 4.36. VDH grubuna ait ovaryum kesitinde (→) normal primer folikül ve oosit sitoplazmasında eozinofilinin artmış olduğu (↘) primordiyal folikül görülmektedir. H&E, Bar 50μm



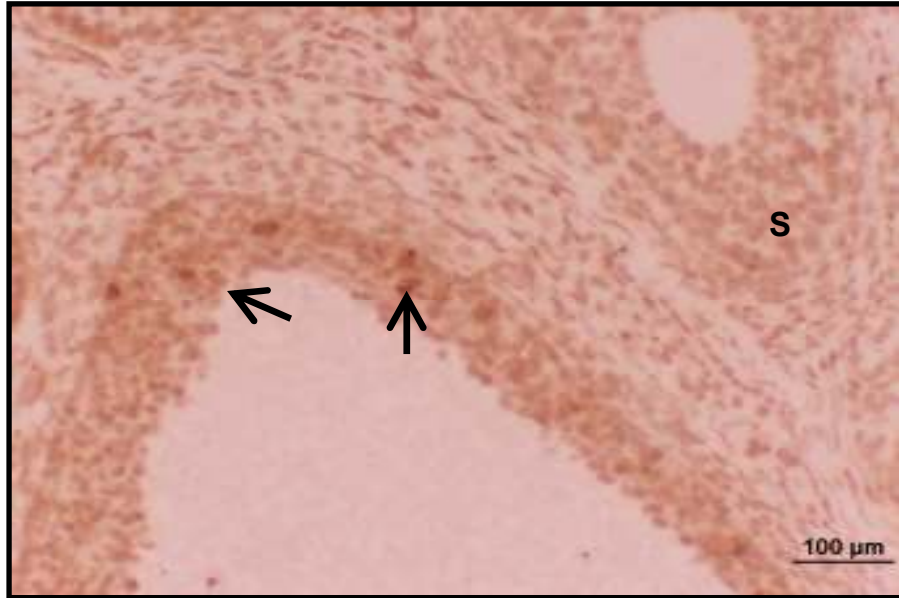
Şekil 4.37. VDH grubuna ait ovaryum kesitinde (↙) normal primer folikül. H&E, Bar 20µm



Şekil 4.38. VDH grubuna ait ovaryum kesitinde (↘) normal primordiyal foliküller H&E, Bar 20µm.



Şekil 4.39. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde epitel altında (↓) normal primordiyal foliküller, TUNEL, Bar 50μm

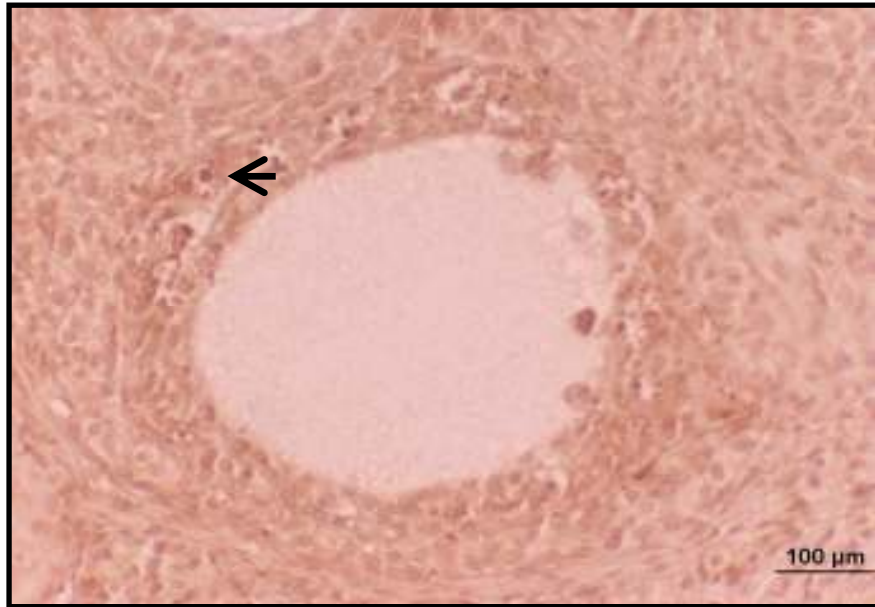


Şekil 4.40. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde antral folikülde az sayıda TUNEL (+) olan (↓) apoptoza giren hücreler ve normal (s) sekonder folikül, TUNEL, Bar 100μm

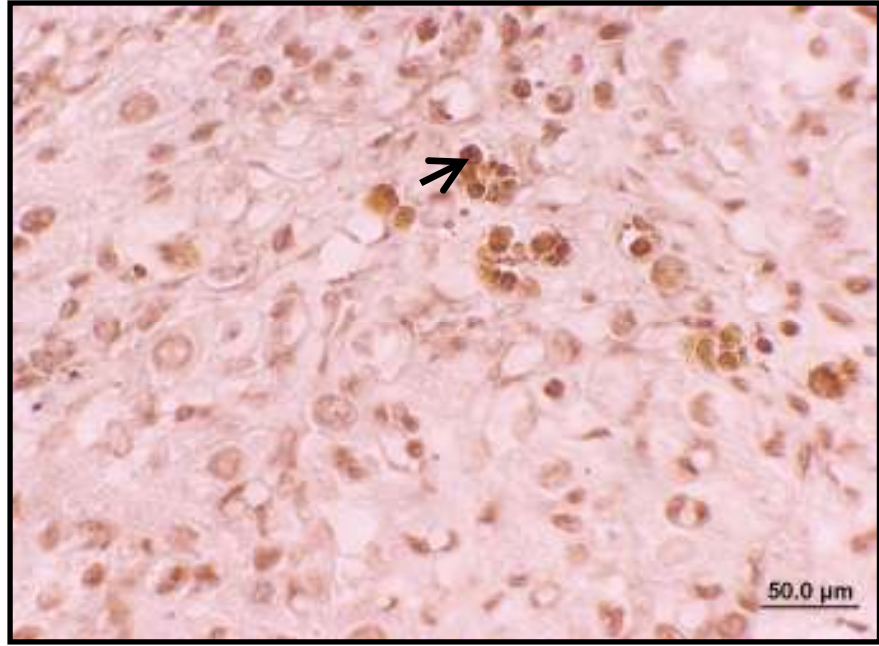




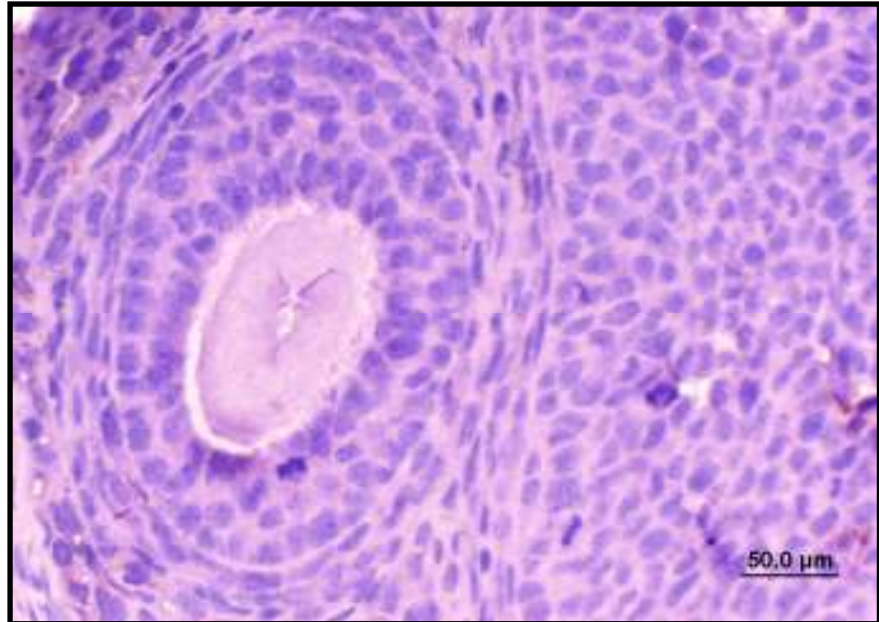
**Şekil 4.41.** VCD grubuna ait ovaryum kesitinde normal primer folikülün granüloza hücrelerinde az sayıda (↙) TUNEL (+) olan apoptoza giren hücreler görülmekte TUNEL, Bar 50µm



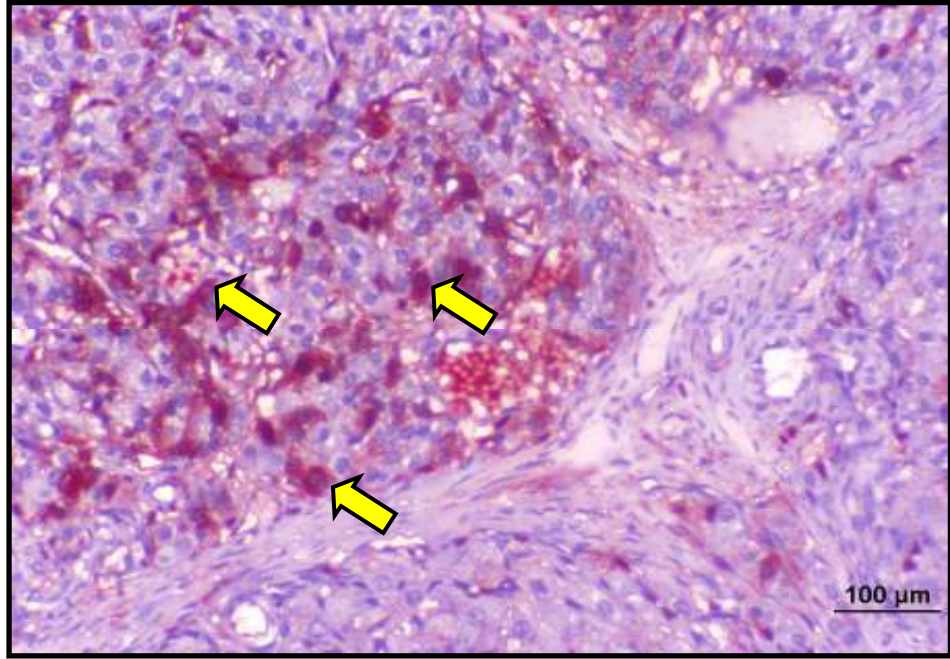
**Şekil 4.42.** VCD grubuna ait ovaryum kesitinde antral folikülde (↙) TUNEL (+) olan hücreler TUNEL, Bar 100µm



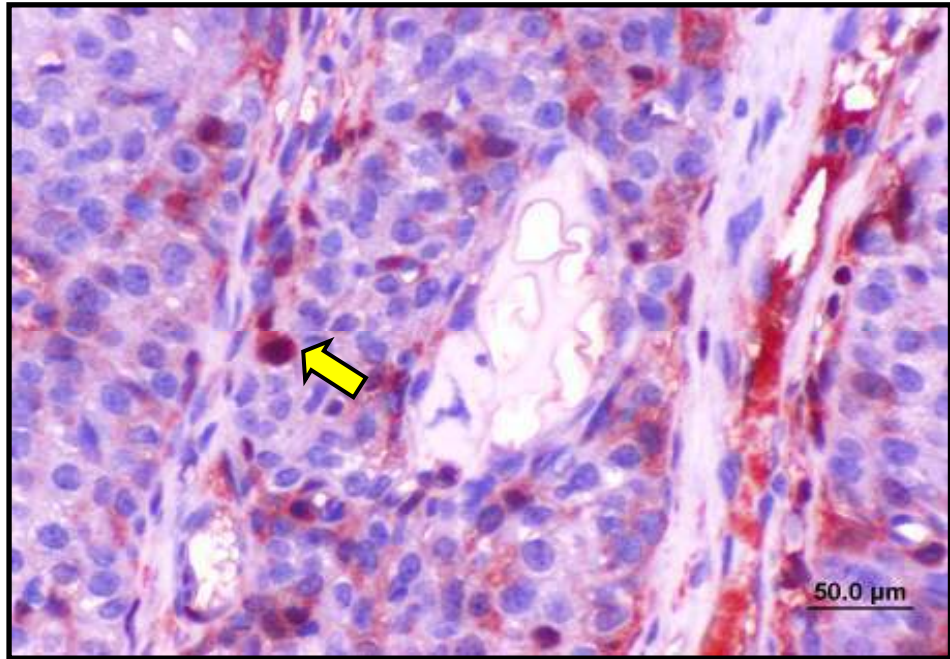
Şekil 4.43. DHEA grubuna ait ovaryum kesitinde korpus luteumda az sayıda (↓) TUNEL (+) olan hücreler. TUNEL, Bar 50μm



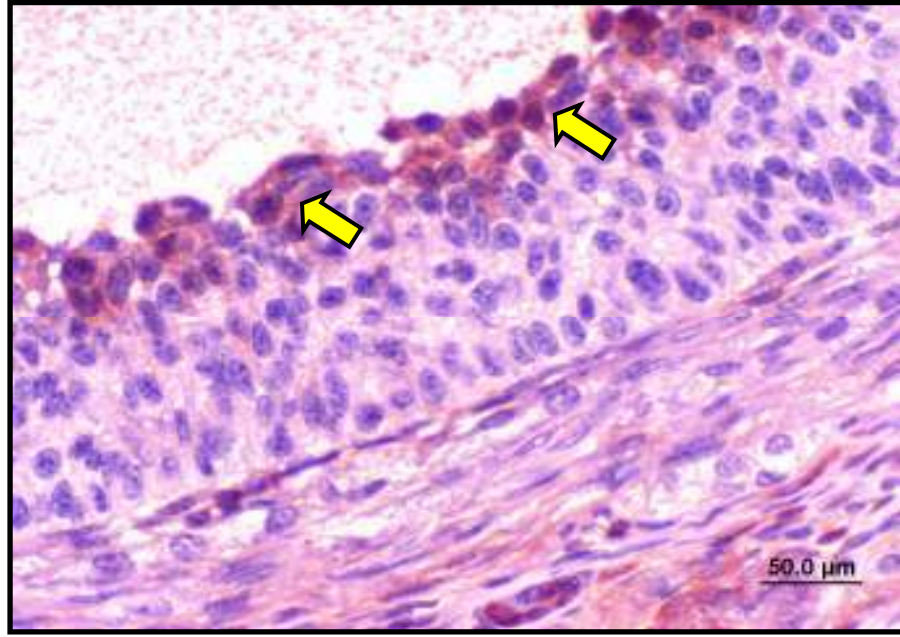
Şekil 4.44. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde normal sekonder folikül KASPAZ 3, Bar 50μm.



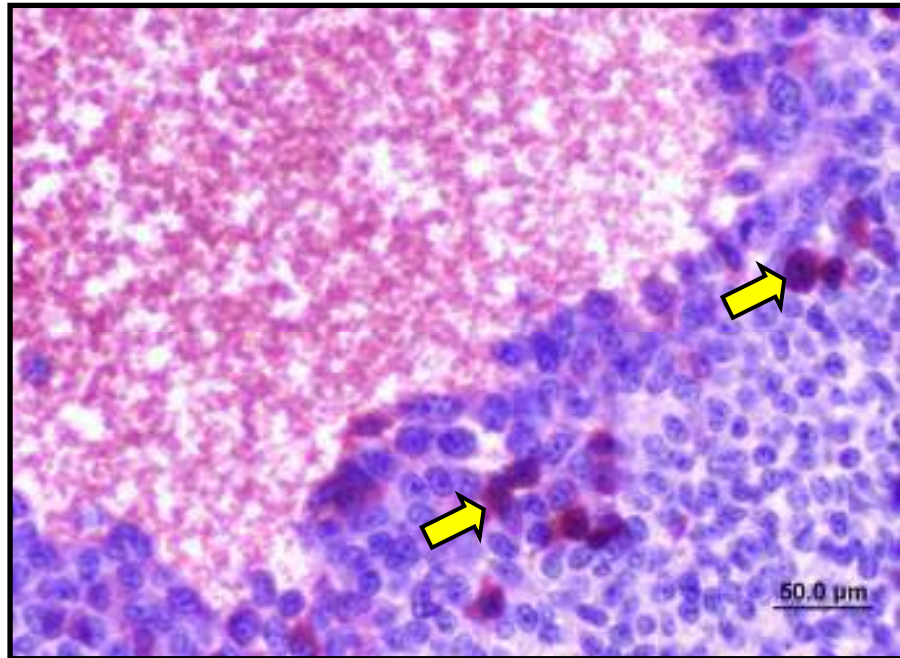
Şekil 4.45. VCD grubuna ait ovaryum kesitinde stromada çok yoğun (oklar) kaspaz 3 (+) hücreler KASPAZ 3, Bar 50µm



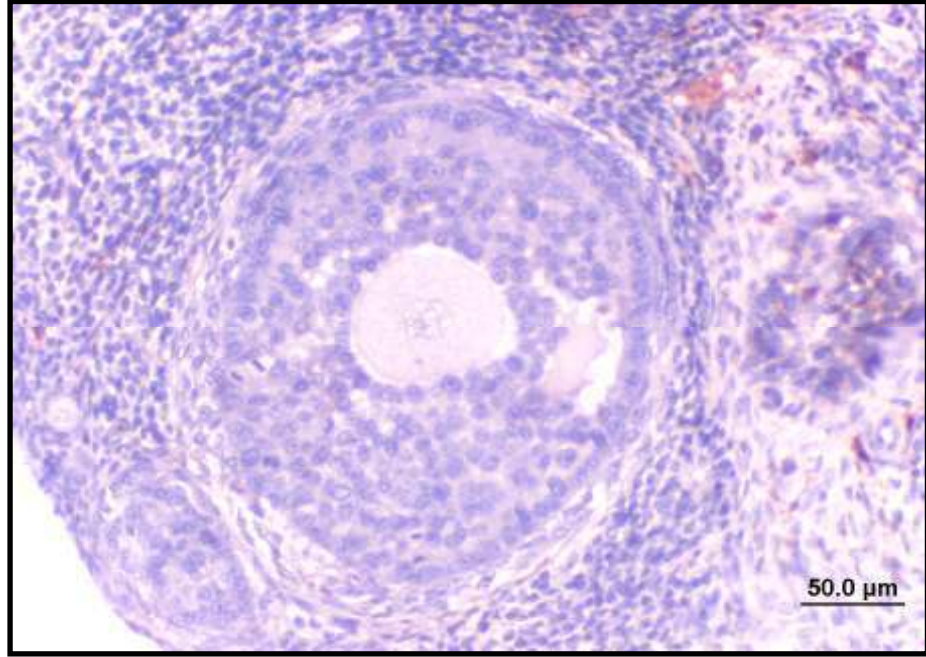
Şekil 4.46.VCD grubuna ait ovaryum kesitinde; atretik folikülde (oklar) kaspaz 3 (+) hücre KASPAZ 3, Bar 50µm.



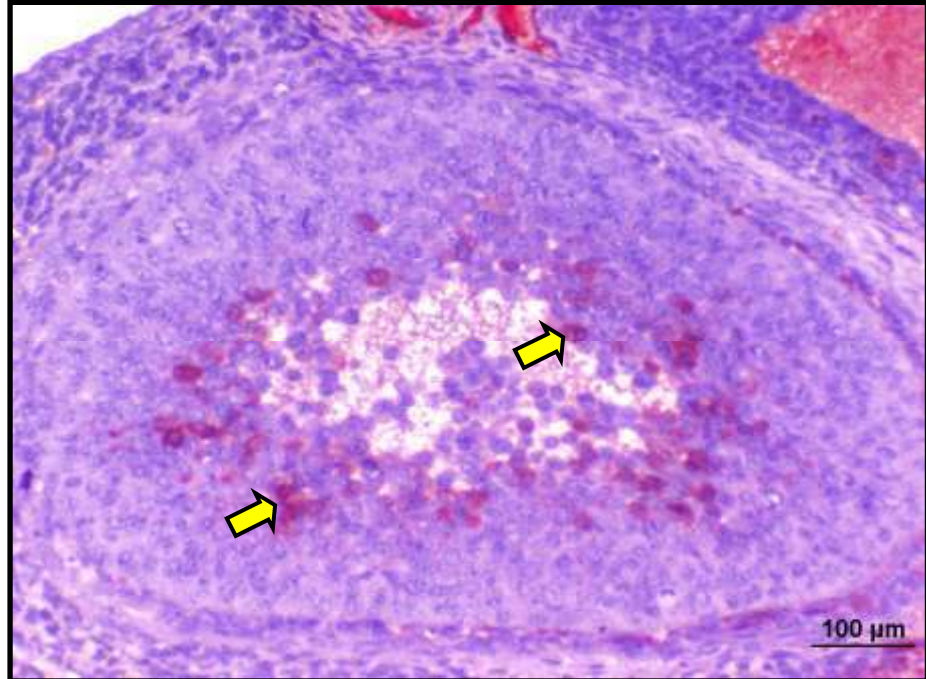
**Şekil 4.47.** VCD grubuna ait ovaryum kesitinde antral folikülde antruma yakın taraftaki granüloza hücrelerinde yoğun ( oklar) kaspaz 3 (+) hücreler. KASPAZ 3, Bar 50μm



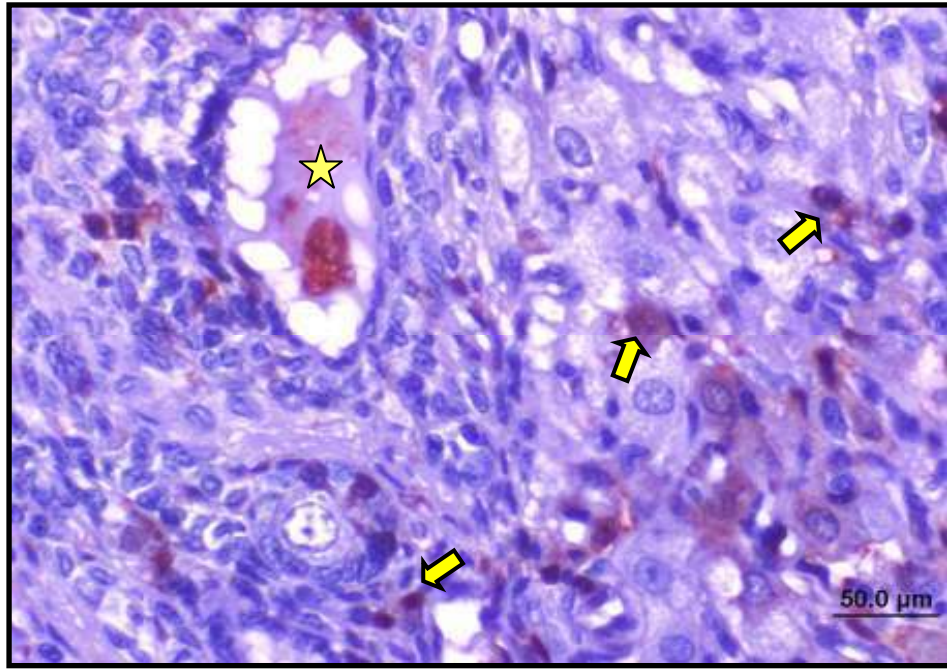
**Şekil 4.48.**DHEA grubuna ait ovaryum kesitinde; antral folikülün granüloza hücrelerinde az yoğunlukta (oklar) kaspaz 3 (+) hücreler KASPAZ 3, Bar 50μm



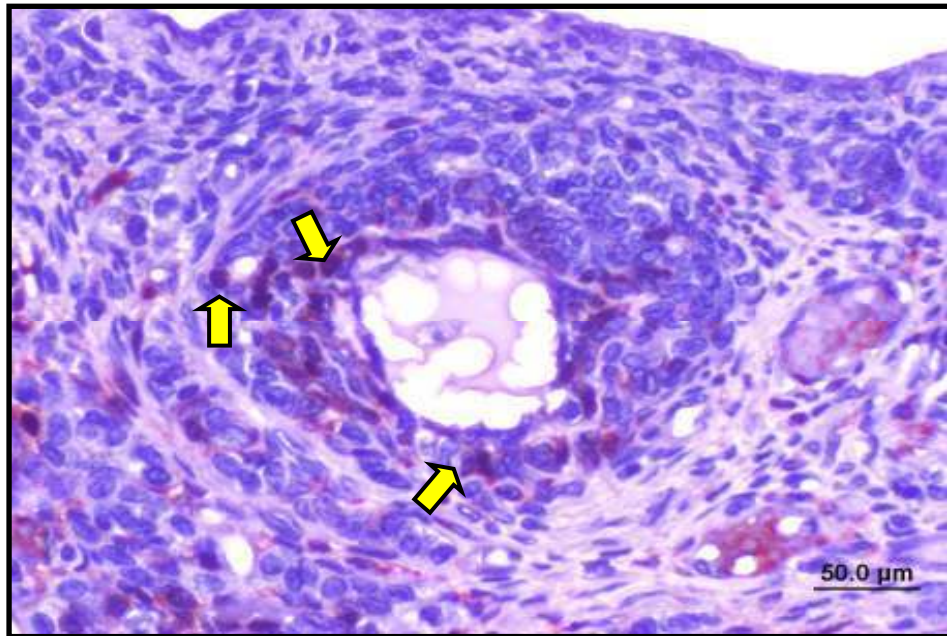
**Şekil 4.49.** DHEA grubuna ait over kesitinde normal antral follikül KASPAZ 3, Bar 50 $\mu$ m.



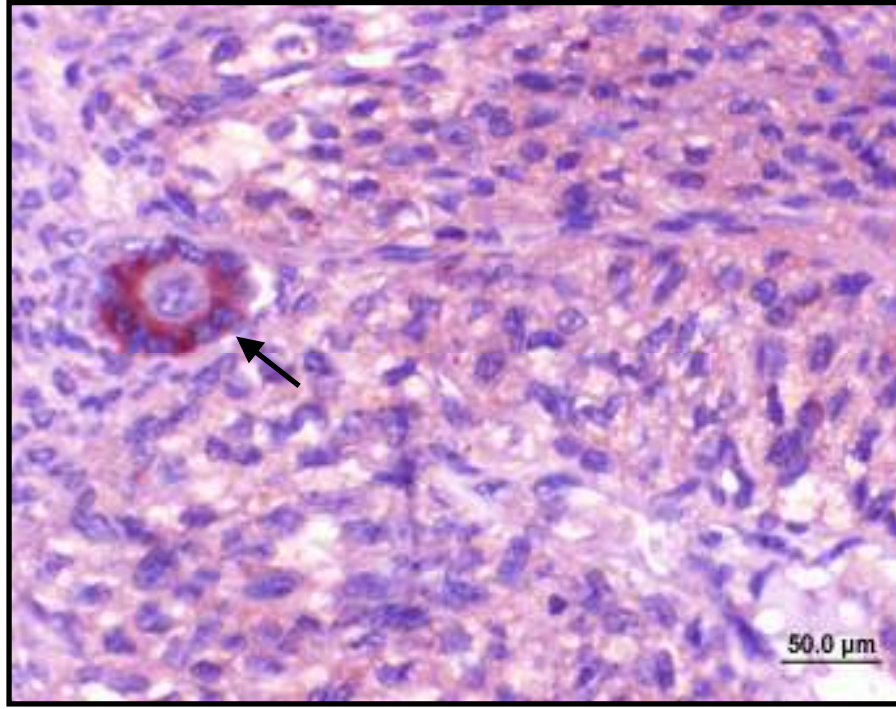
**Şekil 4.50.**VDH grubuna ait ovaryum kesitinde antral folikülde yoğun (oklar) kaspaz 3 (+) hücreler KASPAZ 3, Bar 100 $\mu$ m



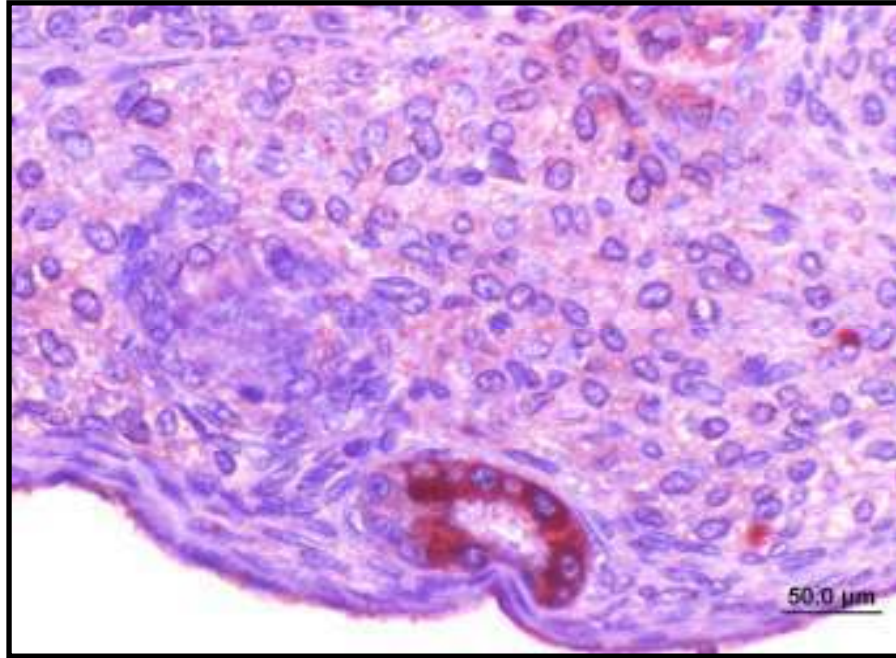
**Şekil 4.51.** VDH grubuna ait ovaryum kesitinde stromada ve primer folikülde az sayıda (ok) kaspaz 3 (+) hücreler, ve (yıldız) kistik folikül görülmektedir KASPAZ 3, Bar 50μm



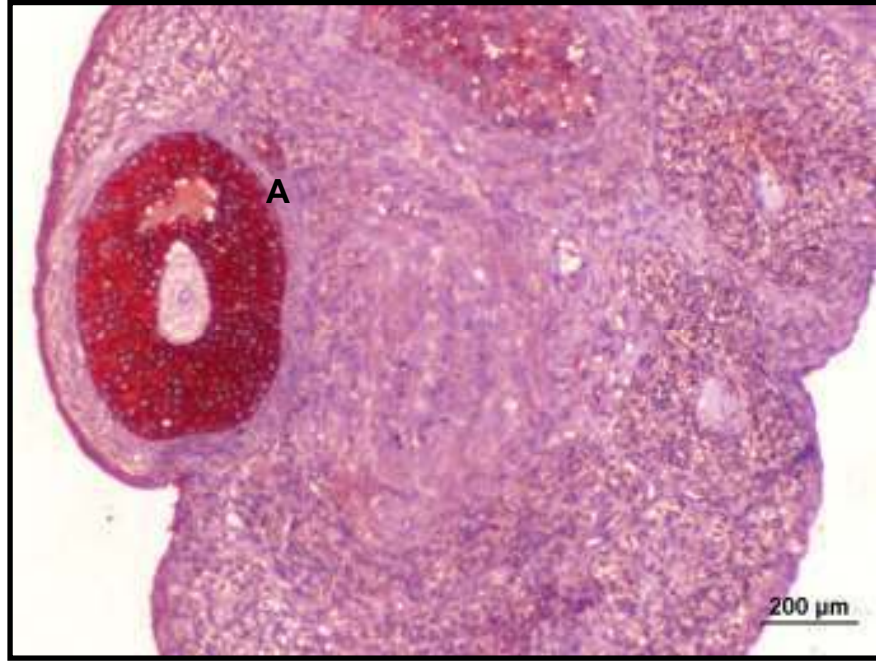
**Şekil 4.52.** VDH grubuna ait ovaryum kesitinde kistik folikülde yoğun (ok) kaspaz 3 (+) hücreler KASPAZ 3, Bar 50μm



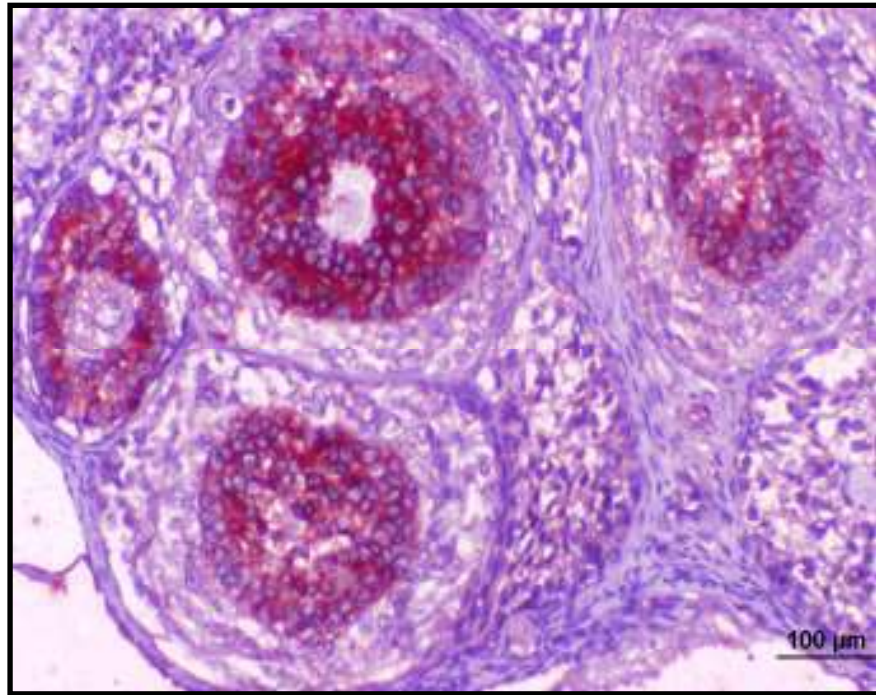
**Şekil 4.53.** Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde çok yoğun AMH (+) hücre içeren primer follikül görülmektedir. AMH, Bar 50μm.



**Şekil 4.54.**VCD grubuna ait ovaryum kesitinde VCD'nin etkisinden kurtulan yoğun AMH (+) hücreler içeren primer follikül görülmektedir. AMH, Bar 50μm

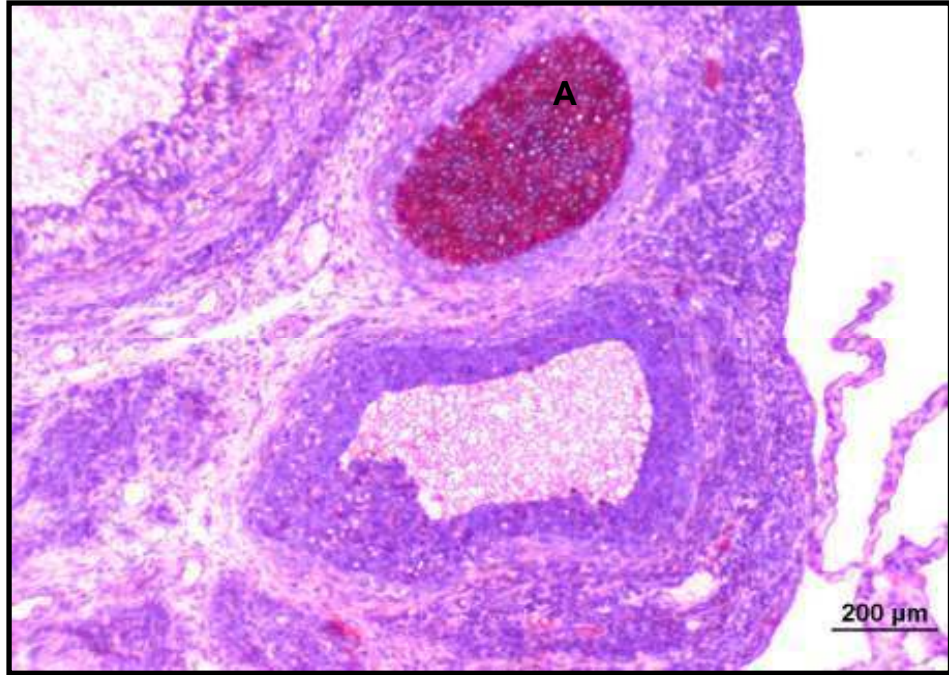


Şekil 4.55. DHEA grubuna ait ovaryum kesitinde (A) antral folikülde çok yoğun AMH (+) hücreler görülmektedir. AMH, Bar 200µm

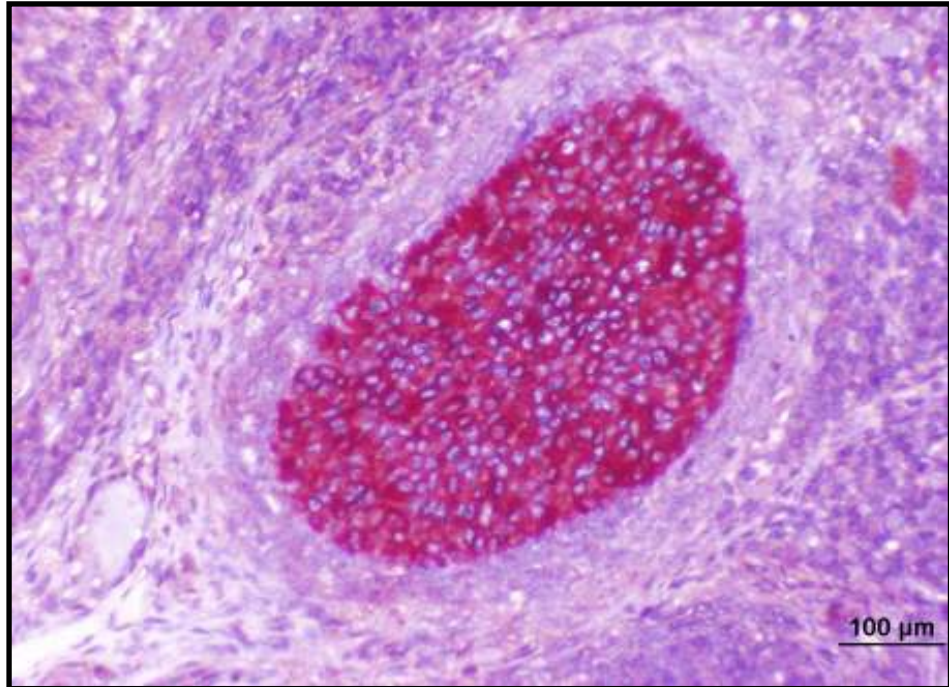


Şekil 4.56. DHEA grubuna ait ovaryum kesitinde yoğun AMH (+) hücreler içeren sekonder foliküller görülmektedir. AMH, Bar 100µm

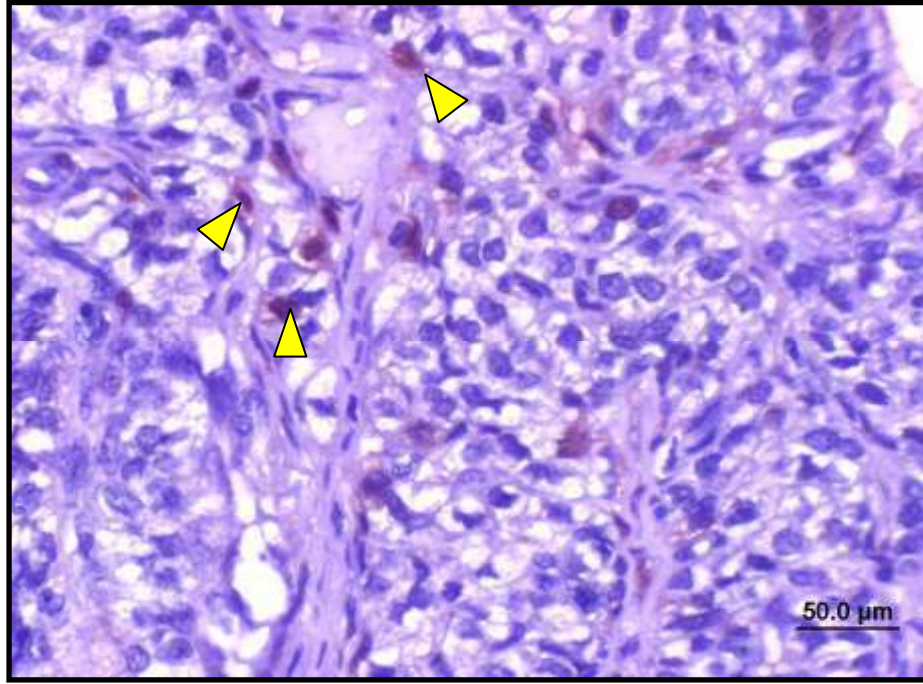




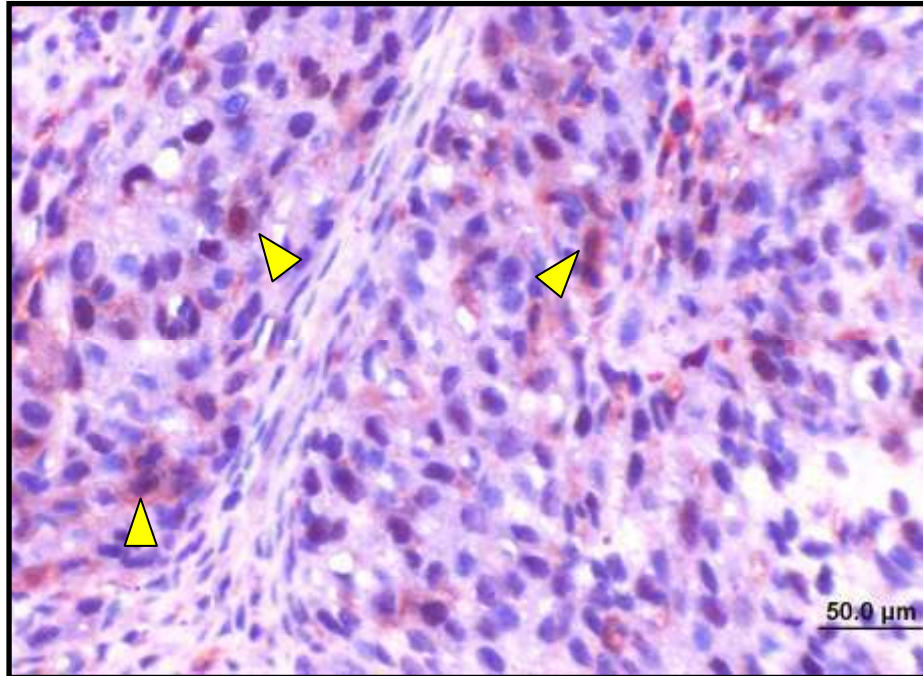
**Şekil 4.57.** VDH grubuna ait over kesitinde (A) büyük antral folikülde AMH boyanması görülmezken (s) sekonder folikülde çok yoğun AMH (+) hücreler görülmektedir. AMH, Bar 200μm



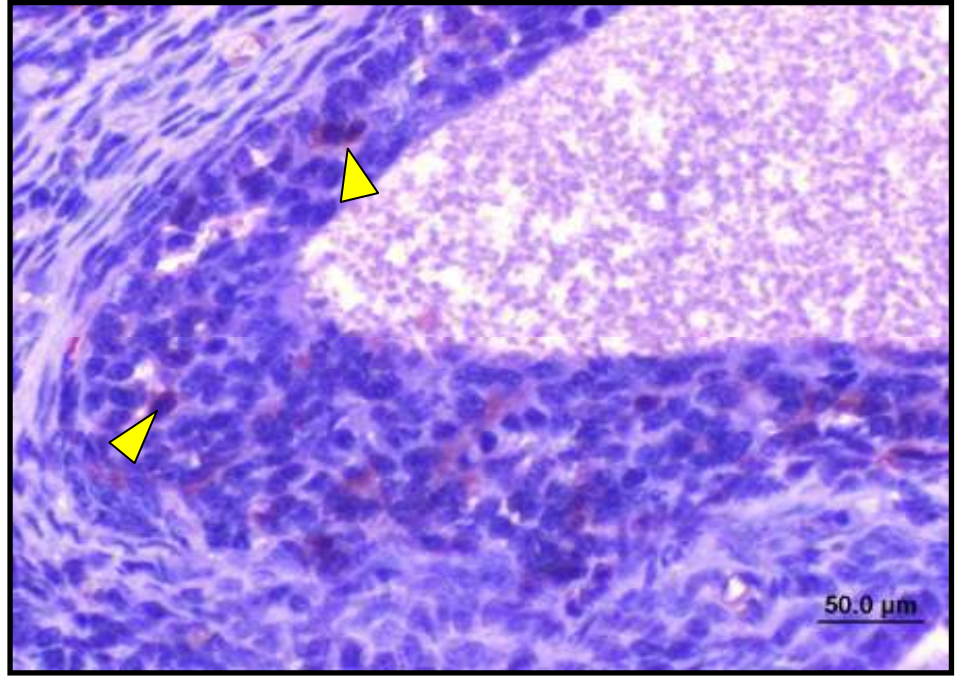
**Şekil 4.58.** VDH grubuna ait ovaryum kesitinde; sekonder folikülde çok yoğun AMH (+) hücreler görülmektedir. AMH, Bar 100μm



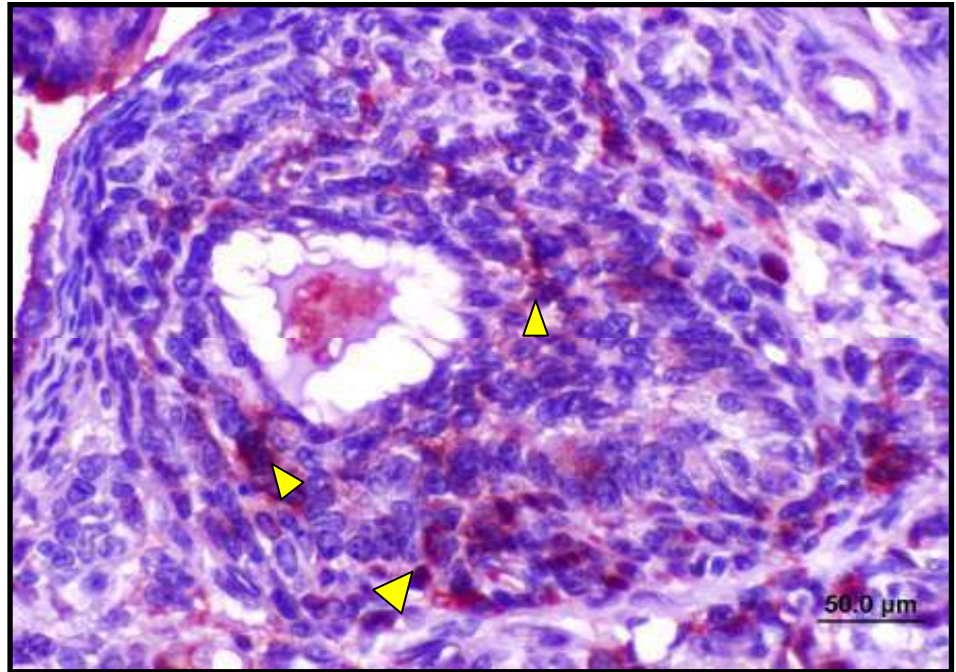
Şekil 4.59. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde stromada az yoğunlukta (ok başları)AR (+) hücreler görülmektedir. AR, Bar 50µm



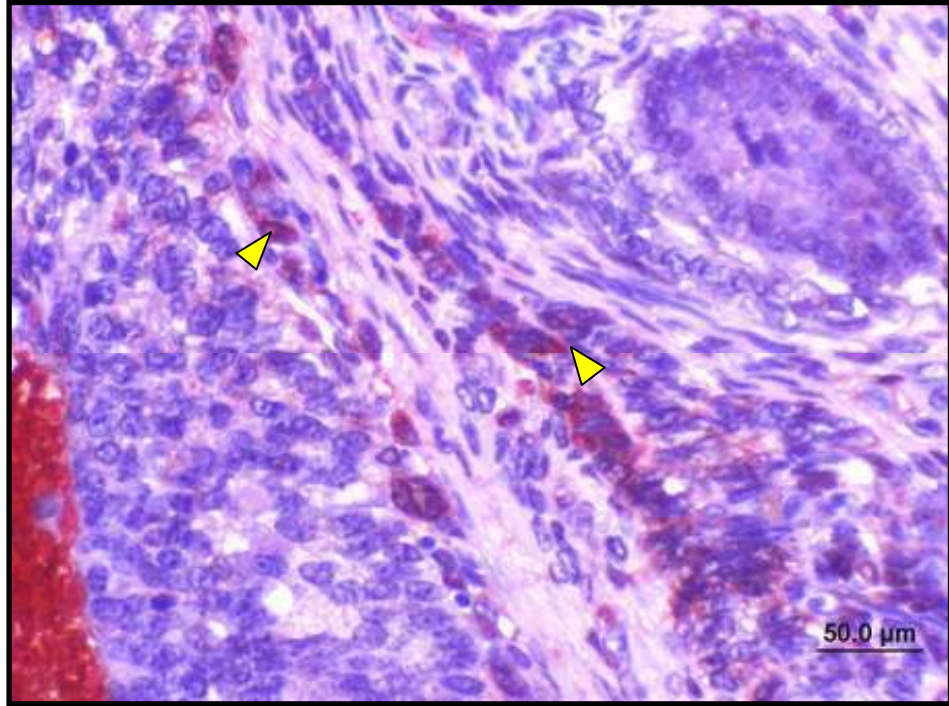
Şekil 4.60.VCD grubuna ait ovaryum kesitinde stromada çok yoğun (ok başları) AR (+) hücreler AR, Bar 50µm.



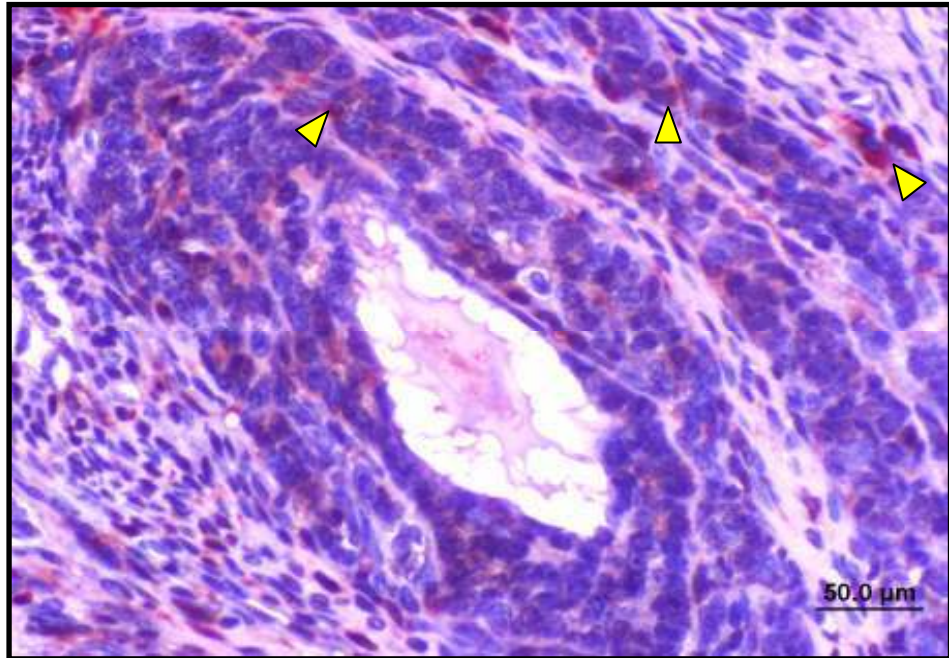
**Şekil 4.61.** DHEA grubuna ait ovaryum kesitinde; antral folikülde az yoğunlukta (ok başları) AR (+) hücreler görülmektedir. AR, Bar 50µm



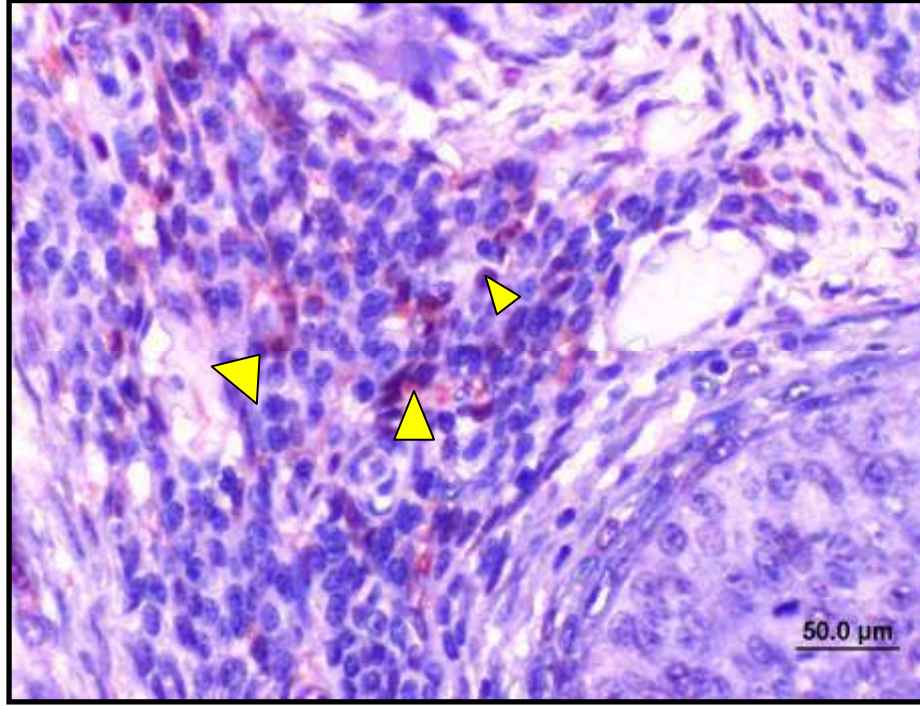
**Şekil 4.62.** DHEA grubuna ait ovaryum kesitinde kistik folikülde çok yoğun (ok başları) AR (+) hücreler AR, Bar 50µm.



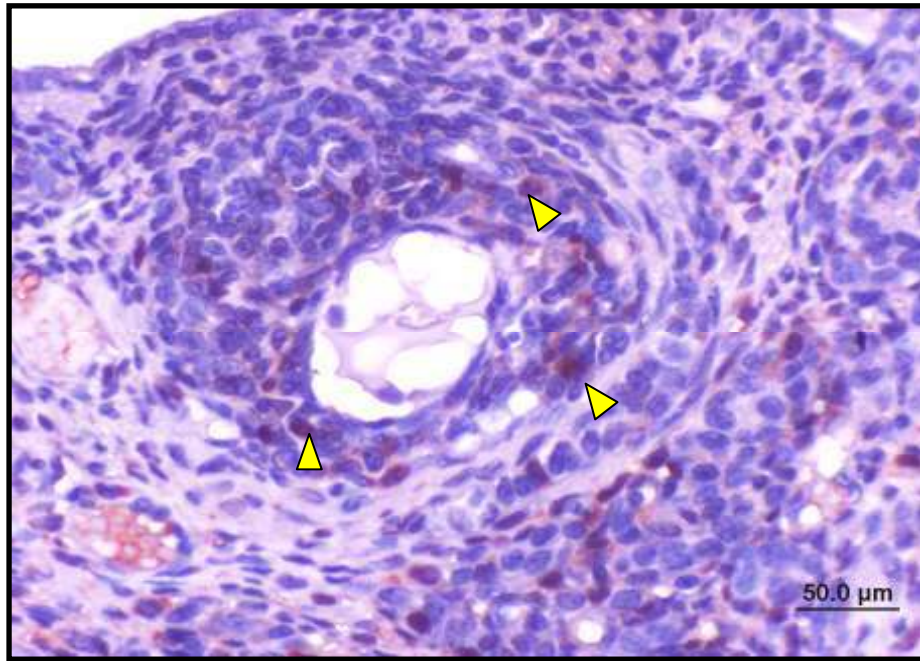
Şekil 4.63. DHEA grubuna ait ovaryum kesitinde stromada yoğun (ok başları) AR (+) hücreler AR, Bar 50μm



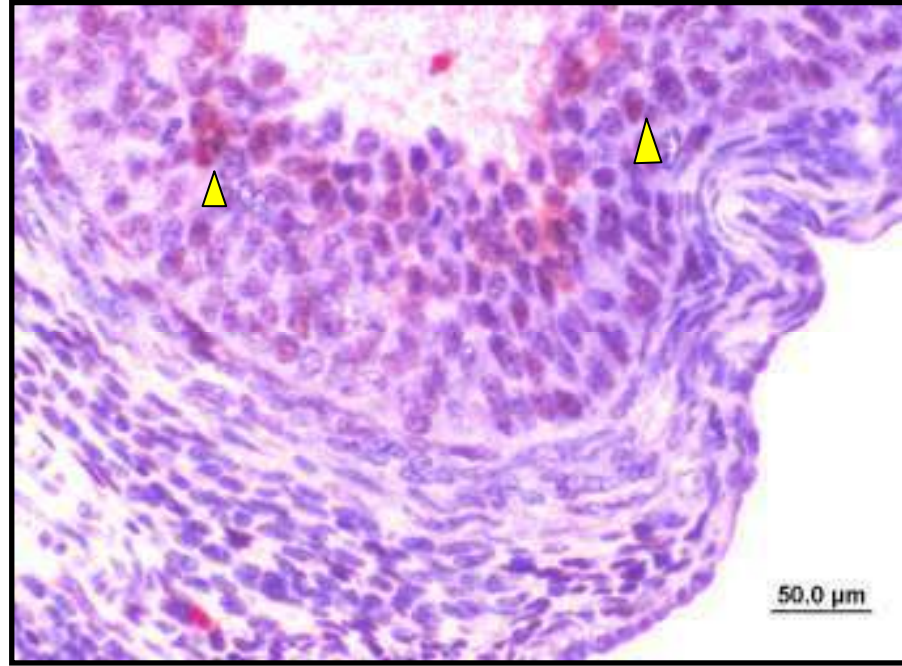
Şekil 4.64. DHEA grubuna ait ovaryum kesitinde kistik folikül ve stromada yoğun (ok başları) AR (+) hücreler. AR, Bar 100μm



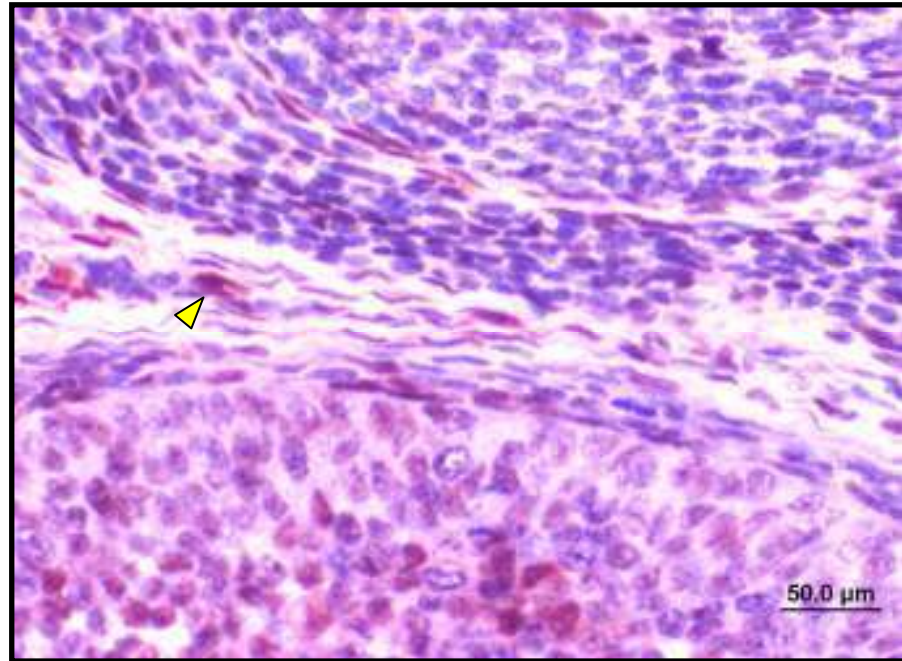
**Şekil 4.65.** VDH grubuna ait ovaryum kesitinde stromada ve kistik folikülde yoğun (ok başları) AR (+) hücreler görülmektedir. AR, Bar 50µm



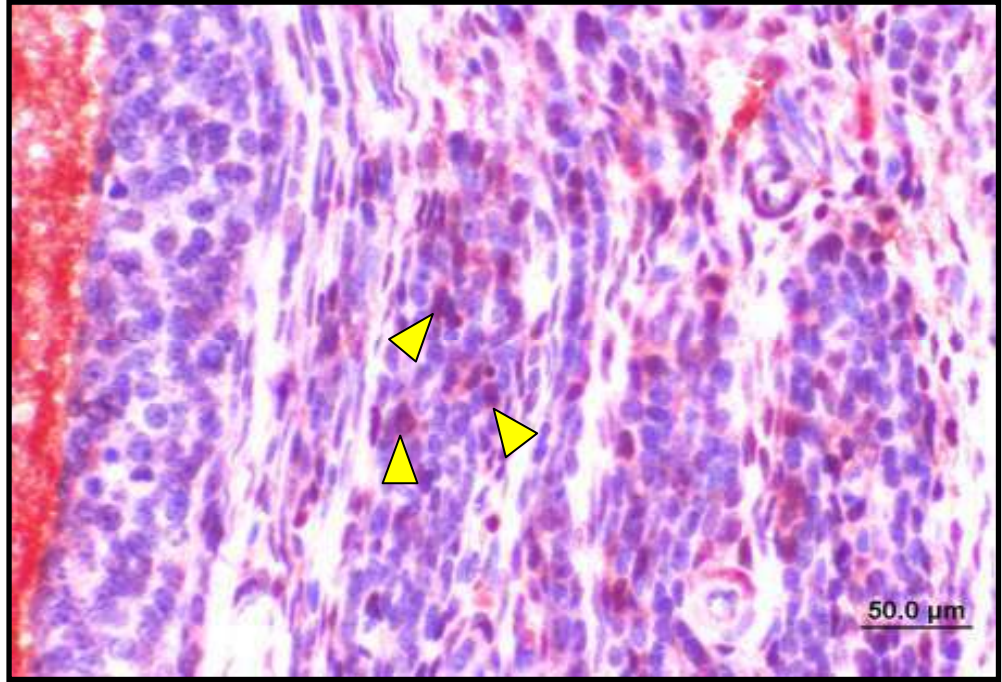
**Şekil 4.66.** VDH grubuna ait ovaryum kesitinde; stromada ve kistik folikülde yoğun (ok başları) AR (+) hücreler görülmektedir. AR, Bar 50µm.



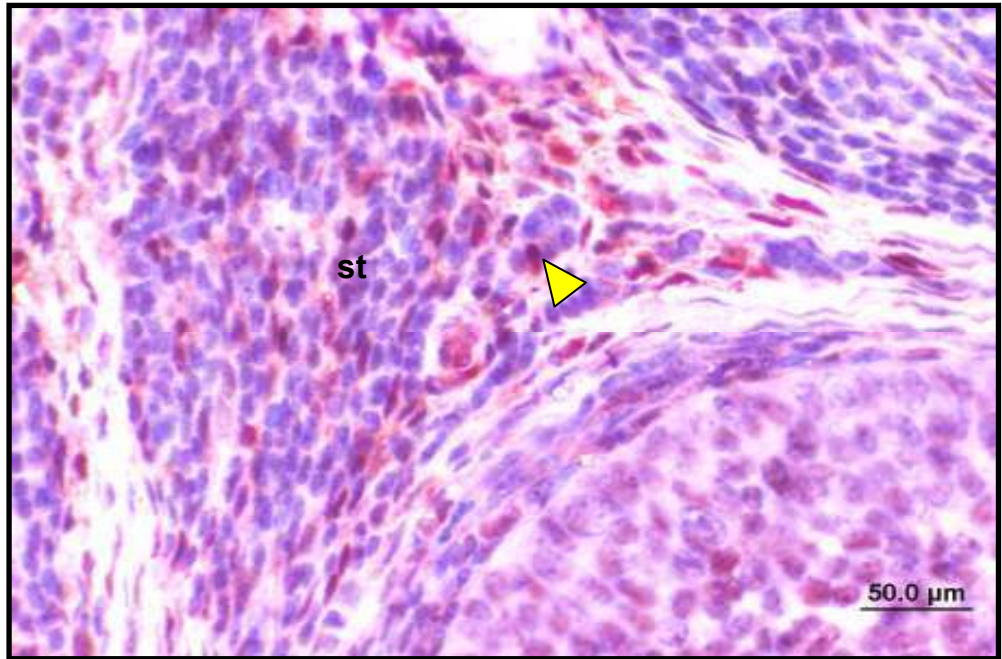
Şekil 4.67. VDH grubuna ait ovaryum kesitinde antral folikülde az yoğun AR (+) hücreler görülmektedir. AR, Bar 50µm



Şekil 4.68. VDH grubuna ait ovaryum kesitinde antral folikülde granuloza hücreleri ve teka tabakasında az yoğun (ok başı) AR (+) hücreler. AR, Bar 50µm



Şekil 4.69. VDH grubuna ait ovaryum kesitinde;stromada çok yoğun (ok başları) AR (+) hücreler. AR, Bar 50µm



Şekil 4.70. VDH grubuna ait bir başka ovaryum kesitinde;stromada çok yoğun (ok başı) AR (+) hücreler. AR, Bar 50µm

## 5. TARTIŞMA

İnsanda ovaryum yapısı yaşla beraber değişmektedir. Reprodüktif hayat boyunca insan ovaryumu, gelişim halinde foliküller içeren korteks ve elastik lifler, kan ve lenfatik damarlar ile sinir hücreleri içeren gevşek bağ doku yapısındaki medulladan oluşur. Menopozla beraber ovaryumlar intertisiyel hücrelerden ve stromadan zengin bir dokuya dönüşür. Menopoz sonrası oluşan ovaryum dokusu androjen üretmeye devam eder **(2)**. Bu süreç ovaryumun homeostazına katkıda bulunur ve uygunsuz fonksiyon göstermesine engel olur. Menopoz sonrası ovaryum volümü büyük oranda azalır. Menopozda ovaryum folikül içermez ve fibröz bir bağ doku yapısındadır. **(30)**

Kadınlarda ortalama menopoz yaşı 51 dir. Yaşamın ortalama olarak 70 yıl olduğu düşünülecek olursa; bir kadın hayatının neredeyse üçte biri menopozda geçmektedir. Bir çok kadın çeşitli kariyer kaygılarından dolayı çocuk sahibi olmayı ertelemekte, ovaryum yaşlanması sorunuyla karşı karşıya kalmaktadır. İnsan yaşamının uzaması nedeniyle menopozlu yıllarda geçirilen süre daha da önem kazanmaktadır. Kadınlar sınırlı sayıda küçük folikül havuzu ile beraber doğarlar ve bu havuzu direkt olarak etkileyecek herhangi bir etki erken menopoza neden olmaktadır.

Menopozdan önce hipotalamus ve santral sinir sisteminde yaşa bağımlı değişiklikler oluşmaktadır. Kemirici modellerinden elde edilen bilgilere göre, yaşlanma esnasında hipotalamusta ve hipofizde oluşan değişiklikler yaşla azalan fertiliteye katkıda bulunmaktadır. **(81)** Orta yaştaki kemiricilerde insanlara benzer şekilde artmış FSH, LH sekresyonunda dalgalanmalar (artmış süre, azalmış salınım frekansı) ve siklus günlerinde uzama görülmüştür. **(82)** Bu dönemde dolaşımda FSH artışı ile ovaryumlarda azalan sağlıklı folikül popülasyonunun yansıması olan granüloza hücre ürünü olan inhibin B sekresyonunda azalma birlikte bulunmuştur. **(249)**

Ovaryumdaki foliküllerin gelişimi ve üreme fonksiyonu, dişilerin çevresel toksinlerle karşılaşması sonrasında etkilenebilir. Bu maddelerin üreme fonksiyonu üzerine etkisi foliküllerin etkilendiği döneme bağlı olarak değişir. Büyüyen ve preovulatuvar folikülleri etkileyen maddeler üremede geçici bir duraklamaya neden



olurlar. Çünkü zarar gören foliküllerin yerine, ovaryum havuzundaki primordial ve primer foliküller tarafından hızla yeni foliküller gelişir. Bunun aksine primordial ve primer foliküllerde bir hasar oluşacak olursa, fertilité gelişen ve ovulasyon gerçekleşecek foliküllerin ortamda olması nedeniyle geçici bir süre etkilenmez, sikluslar normal düzeninde devam eder. Bu durum haftalar, aylar veya yıllar sürebilir. Ancak bu foliküller bittiği zaman replismanı sağlayacak olan primordial folikül havuzu olmayacağı için üreme fonksiyonu biter. **(132)**

VCH ve epoksid metaboliti olan VCD plastik sanayide, kömür ve sigara dumanında bulunur. **(151)** VCH/VCD fare ve sıçanlarda primordial ve primer foliküllerde apoptozu indükleyerek irregüler siklus, hormonal değişiklikler ve primordial ve primer folikül havuzunun tükenmesi sonrasında menopoza neden olur. **(165, 113)**

Deneyimizde; 28 günlük Sprague Dawley türü sıçanlar kullanarak 15 gün süresince DMSO içerisinde çözülmüş VCD'yi 160 mg/kg uygulanmıştır ve ilk dozdan itibaren 55. günde sıçanlar sakrifiye edilmiştir. Yapılan çalışmalarda 160mg/kg VCD ve on beş gün boyunca uygulanması büyük folikülleri ve diğer dokuları etkilemeden uygulanabilecek optimal doz olarak gösterilmiştir **(173)**.

Araştırmalarda VCD'nin kısa dönemde vücut ağırlığı üzerine bir etkisi olmadığı belirtilmiştir. Örneğin; Mayer ve arkadaşları farelere 10 gün süresince VCD uygulamışlar ve 127. günde vücut ağırlığında değişiklik bulamamışlardır. **(173)** Buna karşın oral yolla 13 hafta VCD uygulanan sıçanlarda ve farelerde vücut ağırlığında düşme saptanmıştır. **(39)** Berger ve arkadaşları sıçanlara 2 hafta süresince içme suyunda % 0.04 VCD vermişler ve sonrasında oosit fertilitésini araştırmışlardır. Bu dozlarda ve sürede sıçanlarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında deney süresince alınan kilo ve son kilo açısından farklılık saptamamışlardır. **(18)** Mayer ve arkadaşları bir başka çalışmada sıçanlara 30 gün süresince 80 mg/kg/gün VCD uygulamışlar ve 360. günde primordial ve primer foliküllerde tam kayıp oluştuğunu ve vücut ağırlığının kontrol grubuna göre azaldığını bulmuşlardır. **(175)** Bu çalışmalarda erken dönem bulguları verilmemiştir. Keck ve arkadaşları ise farelere 15 gün VCD uygulaması sonrası bu farelerin kontrol gruplarına göre daha fazla kilo aldığını bildirmişlerdir. **(137)**

VCD'nin vücut ağırlığı üzerine etkisinin uzun dönemde ve genelde farelerde ortaya çıktığı görülmüştür. Deneyimizde, VCD uyguladığımız gruplarda deney sonu ağırlıkları kontrol grubuna göre azalmıştır. VCD'ye bağlı kilo kaybının araştırmalarla uyumlu olarak VCD'nin hayvanların iştahını azaltmış olabileceğinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Atsushi ve arkadaşlarının yaptıkları araştırmada 28 günlük Spraque Dawley sıçanlara 2 ve 4 hafta süresince DMSO içinde çözülmüş VCD uygulamışlardır. Bu süre içerisinde ovaryum ve uterus ağırlıklarında değişiklik saptamamışlardır. **(128)**

Mayer ve arkadaşları ayrıca 160 mg/kg/gün VCD uygulamasının arkasından 120. günde ovaryum ağırlığının kontrol overlere göre %20 oranında ve uterus ağırlığının ise %50 oranında azaldığını bulunmuşlardır. **(173)**

Ito ve ark. **(128)** kırk iki günlük Spraque Dawley sıçanlara iki ve dört hafta süresince 5, 20, 80mg/kg/gün VCD uyguladıklarında over ve uterus ağırlıklarında fark gözlememişlerdir.

Flaws ve ark.**(89)** matür Fischer 344 türü sıçanlara otuz gün süresince VCD uyguladıklarında over ağırlığının kontrol grubu ile benzer olduğunu, uterus ağırlığının ise kontrol grubundan %25 düşük olduğunu bildirmişlerdir. İmmatür sıçanlarda uterus ve over ağırlıkları kontrol grubuyla benzer olarak bulunmuştur.

Araştırmamızda, VCD uyguladığımız grupta sağ ve sol ovaryum ağırlıkları ve toplam ovaryum ağırlıkları kontrol grubuna göre azalmış olarak bulunmuştur. VCD'nin ovaryumlarda primordial ve primer folikül havuzunun kaybına neden olması sonrasında ovaryum ağırlıklarının azalmış olduğunu düşünmekteyiz. VCD grubunda uterus ağırlıkları önceki çalışmalara benzer olarak kontrol grubuyla benzer bulunmuştur.

Araştırmamızda VCD grubunda toplam primordiyal ve normal primordiyal folikül sayıları kontrol grundan daha az olarak bulunmuştur. Normal primer folikül sayısı kontrol grubundan az, atretik primer folikül sayısı ise fazla bulunmuştur.

Araştırmamızda VCD grubunun ovaryumlarında primordial ve primer foliküllerde apoptoz bulguları gözlenmiştir. Primordial, primer ve büyüyen folikül sayılarında azalma gerçekleşmiştir. Büyüyen folikül havuzunun azalmasını bu havuzu oluşturan primordial ve primer foliküllerin VCD'nin temel hedef aldığı foliküller olması nedeniyle oluştuğunu düşünmekteyiz.

VCD'nin büyüyen folikül havuzuna etkisi 12 güne kadar gözlenmemiştir. **(244)** Fakat 30 günlük doz alan gruplarda büyüyen folikül havuzu %46 oranında azalmıştır. Bu etkinin büyüyen folikül havuzunun primordial foliküllerin rekrutmenti sonrası oluşması nedeniyle olduğu ve primordial folikül sayısının azalması sonrasında olduğu düşünülmüştür. **(90)**

Flaws ve arkadaşları sıçanlarda yaptıkları araştırmada 30 gün süresince 80 mg/kg/gün VCD uygulamasının arkasından primordial foliküllerde %81, primer foliküllerin ise %55 oranında kayıp oluştuğunu bildirmişlerdir. **(253)** Springer ve arkadaşları 15 gün VCD uygulaması sonrasında primordiyal folikül kaybının %40 oranında olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada 10. günde primordial folikül kaybı %25 oranında iken 12. günde %35'tir. Ayrıca primer foliküllerde hasar 12 günden önce oluşmamıştır. 15. günde primer foliküllerde oluşan hasar %63 olarak belirlenmiştir. **(239)**

Araştırmamızda, VCD'nin ovaryumda primordiyal foliküllerde % 87,5 ve primer foliküllerde %79 oranında kayba yol açtığını gördük. Sıçanlara 15 gün süre ile VCD verilmesi, bu grupta önemli derecede primordiyal ve primer folikül kayıplarına neden olmuştur. Bu bulgulara göre VCD'nin toksisitesine primer foliküllerin primordial foliküllere göre kısmen daha dirençli olduğunu düşünmekteyiz.

Araştırmamızda VCD uygulanan grupta sekonder ve antral folikül sayıları kontrol grubuna göre azalmış olarak bulunmuştur. Korpus luteum ve folikül kisti sayıları ise kontrol grubuna benzerdir.

Mayer ve arkadaşları yaptıkları araştırmada VCD'nin 80 mg/kg/gün dozunda, 30 günde sekonder ve antral folikül sayılarında ve korpus luteum sayılarında azalma başlamış ve 120 günde bu sayılarda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemişlerdir. **(175)**

Lohff ve arkadaşları, immatür farelere 10 gün 160 mg/kg/gün VCD uyguladıklarında sekonder ve antral folikül sayılarında değişiklik olmadığını, 20 gün VCD uyguladıklarında ise sekonder ve antral folikül sayılarında azalma tesbit etmişlerdir. **(165)**

Bulgularımıza göre gelişen foliküllerdeki azalmanın primordial ve primer folikül havuzunun tükenmesi sonrasında geliştiğini düşünmekteyiz. 15 gün VCD

uygulanmasından sonra 55. günde sekonder ve antral folikül sayılarında meydana gelen azalma kaynaklarda gözlenen etkiden önce gerçekleşmiştir. Bu etkinin kullandığımız doz ve sıçan türü ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz. Folikül sayılarında oluşan bu azalmanın ileriki dönemlerde folikül havuzunu tamamen tüketerek menopoz oluşturabileceği ve bu doz ve sıçan türünde bu çalışmalarda kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Araştırmamızda korpus luteum sayısında 55. günde azalma olmaması VCD'nin kalan foliküllerdeki gelişime direkt etkisi olmaması ve ovulasyonu engellememesi nedeniyle olduğunu düşünmekteyiz. Mayer ve ark. Fischer 344 tür sıçanlarda korpus luteum sayılarında azalmayı yüz yirminci günde bildirmişlerdir (110). Korpus luteum sayılarındaki azalmanın gözlendiği araştırmalarda folikül sayılarındaki azalmaya bağlı olarak geliştiği düşünülmüştür.

Araştırmamızda, ovaryum foliküllerinin çapları ölçülmüş ve deney grupları ile kontrol grubu arasında fark gözlenmemiştir. Springer ve ark. 10 gün VCD uyguladıkları gruplarda primordial folikül ve primer folikül çaplarında farklılık bulmamışlardır. Ancak bu çalışmada folikül çapları sayısal değerlerle belirtilmemiştir (234, 238).

Araştırmamızda primordial folikül çaplarında istatistiksel olarak anlamlı olmasada, azalma görülmüştür. Bu azalmanın VCD'nin bazı granüloza hücreleri üzerine toksik etkisine bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Bu bulgumuz küçük foliküllerdeki granüloza hücrelerinin VCD'ye daha duyarlı olduğunu belirten araştırmalarla uyumludur. (90) Araştırmamızda ayrıca VCD uygulanan gruplarda sağlıklı primordiyal foliküllerin küçük foliküler olduğu gözlenmiştir. VCD uygulanan gruplarda sağlıklı foliküllerin oldukça küçük çapta olması bize VCD'nin toksik etkisinin folikül belirli bir büyüklüğe eriştikten sonra meydana geldiğini düşündürmektedir. Aynı şekilde, sekonder ve antral foliküller gibi belli çapın üzerindeki foliküllerin VCD'ye daha dirençli olduğu belirlenmiştir.

28 günlük sıçanlara 15 gün boyunca uygulanan 80-320 mg/kg arasındaki çeşitli dozların ve 160 mg/kg VCD'nin çeşitli günlerdeki etkilerini inceleyen araştırmada, foliküller in vivo ve in vitro olarak değerlendirilmiştir. Araştırmada VCD grubundaki küçük çaptaki preantral foliküllerde belirgin şekilde azalmalar görülmüştür. Ayrıca, foliküllerde kaspaz 3 aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı

oranda arttığı diğer foliküllerde ise kontrol grubu ile benzer aktivitenin olduğunu saptamışlardır. Kaspaz 3 aktivitesi özellikle primer ve primordiyal foliküllerdeki granüloza hücrelerinde ve oositlerde artmıştır **(118, 173)**.

Yapılan bir araştırmada sıçanların doğduklarında primordial foliküllerinin olmadığı görülmüştür. Yaşamlarının ilk üç gününde primordial ve primer foliküller, 5. gününde sekonder foliküller, 10. gününde ise antral foliküller oluştuğu belirlenmiştir. Yaşamlarının ilk gününe kadar erken bir dönemde granuloza hücrelerinde apoptozun başladığının işareti olan TUNEL pozitif hücreler gösterilmiştir. Fas pozitif hücreler 0-3 gün arası granüloza hücrelerinde gösterilmiştir. Granuloza hücre katmanında apoptoz arttıkça folikül çapının azaldığı gözlenmiştir. **(246)**

Springer ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada 10 gün boyunca VCD verilen sıçanların primordiyal foliküllerinin oositlerinde, kromatinin nükleus zarına yakın yoğunlaştığı ve oosit ile granüloza hücreleri arasında ilişkinin bozulduğu gözlenmiştir. **(239)**.

Mayer ve arkadaşları 10 gün VCD uyguladıkları sıçanlarda atretik folikülleri incelemişler ve atretik büyük antral ve antral foliküllerde apoptozun granüloza hücrelerinde başladığını, oosit ve granüloza hücrelerinin ilişkilerini kaybettiklerini göstermişlerdir. Bu olay sonrasında granüloza hücre katı neredeyse tamamen apoptoza uğramış ve sonrasında oosit dejenerasyonu, tekal hipertrofi, folikül çapında azalma meydana gelmiştir. **(175)**

Springer ve arkadaşları yaptıkları araştırmada sıçanlara 80 mg/kg/gün dozunda VCD'yi 6, 8, 10, 12 ve 14 gün boyunca uygulamışlar ve son dozun uygulanmasını takiben 1 ve 4. saatte ovaryum foliküllerini değerlendirmişlerdir. VCD' nin 10, 12 ve 14 günlük dozlarında DNA degradasyonunda artış olduğu, 6 ve 8 günlük dozlarda ise DNA degradasyonunda değişiklik olmadığını göstermişlerdir. Son dozun uygulanmasını takiben 24 saat sonra toplanan örneklerde ise DNA degradasyon ürünlerinde artış gösterilememiştir. Işık mikroskopunda primordial ve primer foliküller foliküler hasar yönünden de değerlendirilmiş, irregüler şekilli foliküllerin 10 günden sonra ortaya çıktığı görülmüştür. On günün sonunda granüloza hücrelerinin düzensizleştiği ve oositle aralarındaki ilişkinin kaybolduğu görülmüştür. Bazı granüloza hücrelerinde apoptozun karakteristik bulgusu olan

kromatinin nükleer membran boyunca dağılımı gözlenmiştir. Nekroz bulgusu olan makrofaj infiltrasyonu (inflamasyon bulgusu), membran hasarı ve hücrelerde hipertrofi gözlenmemiştir. **(239)**

Araştırmamızda da bu bulgulara benzer şekilde, VCD uygulanan gruplarda, primordiyal foliküllerin sayıca azalmış olduğu ve büyük çoğunluğunda dejenere olduğu gözlenmiştir. Dejenere folikülde yer alan oositte, apoptoz bulguları olan, kromatinin nükleus zarına yakın yoğunlaştığı ve oosit ile granüloza hücreleri arasında ilişkinin bozulduğu gözlenmiştir. Ayrıca oositin çevresini saran granüloza hücrelerinde hücre içeriği dağılmış olarak ve yan yüzeylerde ayrılmalar gözlenmiştir. Normal primordiyal foliküller sıçan ovaryumlarında gözlenmemiştir.

Apoptoz, morfolojik değişikliklerin yanında spesifik genlerin ekspresyonu ile de beraberdir. Bu genlerden bir tanesi Bcl 2 protoonkogen ailesidir. Bcl-2 ekspresyonunda azalma ya da Bax geninde artışın o hücrede apoptoza neden olduğu gözlenmiştir. **(204)** Springer ve ark. ise 10 gün süresince VCD uygulanan sıçanlarda küçük foliküllerde Bax geninin arttığını göstermişlerdir. **(240)**

Borman ve ark. yaptıkları araştırmada VCD etkisi ile primordial ve primer foliküllerde normal atrezi sürecinin başladığını ve bunun özellikle primer foliküllerde olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca tek doz 80 mg/kg VCD uygulandığında Bax ekspresyonunun azaldığını ve tek doz VCD uygulamasının ovaryumlarda primordial ve primer folikülleri koruyucu etkisi olduğunu göstermişlerdir. **(26)**

Xiamung Hu ve ark. yaptıkları araştırmada VCD bağlantılı ovotoksisitede Bcl 2 gen ailesinin rolünü ortaya koymuşlardır. **(233)** Bcl-2 nin aracılık ettiği apoptotik sinyal kaskadı granüloza hücrelerinde ve oosite komşu granüloza hücrelerinde artmıştır. **(117)**

Araştırmamızda antral foliküllerin granüloza hücrelerinde özellikle antruma yakın hücrelerde yoğun olarak apoptoz gözlenmiştir. Antruma yakın yerleşimli olan granüloza hücreleri oosit beslenmesi için önemli role sahip olduğu için bu hücrelerle oosit arasındaki ilişkinin bozulması sonrasında oosit beslenmesi bozulacağı için oosit ölümünün kaçınılmaz olacağını, VCD' nin antruma yakın olan granüloza hücrelerini hedef aldığını ve apoptoz mekanizmalarını harekete geçirdiğini düşünmekteyiz.

VCD'nin primer foliküllerde kaspaz 3, 8, 9 ve MAPK yolağında aktive ederek apoptozu indüklediği belirlenmiştir. **(62, 119)**. Yasuishi ve arkadaşları Bax

yoksun farelerde VCD'nin neden olduğu primordial ve primer folikül deplesyonunun normal farelere göre daha az olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada kaspaz 2 ve kaspaz 3 den yoksun farelerde primer folikül deplesyonu normal farelere göre daha az gerçekleşirken primordial folikül deplesyonu kontrol farelerine benzer bulunmuştur. Dolayısıyla VCD'nin neden olduğu ovotoksisitede Bax ve kaspaz sistemi önemli rol oynadığı saptanmıştır. **(248)**

Hu ve arkadaşlarının yaptığı bir araştırmada 28 günlük sıçanlara 80 mg/kg VCD 1, 10 ve 15 gün uygulanmış ve foliküller izole edilmiştir. Elde edilen primer ve primordiyal foliküllerde VCD'nin MAPK aracılı yolun başlamasında görev alan JNK ve p38'in aktivasyonunu ve ekspresyonunu arttırdığı, ayrıca c-Jun'un fosforilasyonunda artışa ve AP-1 cevap elementlerine bağlı nükleer proteinlerde azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Küçük foliküllerde tek doz VCD uygulanmasının JNK aktivitesini azalttığı ERK ve p38 kinaz aktivitesini etkilemediğini belirlenmiştir. Buna karşın 10 ve 15 gün VCD uygulanan gruplardan elde edilen küçük foliküllerde JNK ve p38 aktivitesinin belirgin şekilde arttığı ERK aktivitesinin ise değişmediği saptanmıştır **(119)**.

Flaws ve arkadaşları, in vitro olarak VCD'nin küçük preantral foliküllerden elde ettikleri granüloza hücrelerinin viabilitesini 1, 6 ve 24 saat sonra azalttığını, büyük preantral foliküllerden elde edilen granüloza hücre viabilitesini ise 24 saat sonra azalttığını göstermiştir. Büyük preantral foliküllerden elde edilen granüloza hücreleri VCD'yi nontoksik olan tetrollere, küçük preantral foliküller ve interstisyel hücrelere göre daha fazla çevirebilmiştir. **(90)**

VCD'nin toksik etkisine karşı küçük foliküllerdeki granüloza hücreleri ve immatür sıçanların granuloza hücrelerinin matür sıçanlara göre daha duyarlı olduğu saptanmıştır. **(90)** VCD'nin granüloza hücre viabilitesine etki ederek granüloza hücreleri ile oosit arasındaki ilişkiyi bozduğu ve böylece oosit hasarına da neden olduğu gözlenmiştir. **(234, 238)** Yapılan araştırmalara göre foliküler hasar ilk önce 10. günde ortaya çıkmıştır. Işık mikroskopu bulguları ve DNA degradasyon artışı, hücre ölümünün apoptoz mekanizmalarla olduğunu göstermiştir. Yirmi dört saat sonra toplanan örneklerde DNA degradasyon ürünlerinin gösterilememesinin nedeni

olarak apoptotik cisimlerin hızla ortamdaki uzaklaştırılması olabileceği belirtilmiştir. **(34)**

Araştırmamızda VCD uyguladığımız grupta, VCD'nin hücrel hedefinin öncelikle primordiyal ve primer foliküllerin granuloza hücreleri ve oositler olduğu görülmüştür. Oositlerde, ışık mikroskopunda apoptotik işaretler görülmüştür. Bunu immünohistokimyasal olarak belirlemek için apoptozun çeşitli evrelerine spesifik antikolar kullanmasının uygun olduğunu düşünmekteyiz.

Araştırmamızda; VCD uygulanan sıçan foliküllerinde apoptoz ışık mikroskobu ile rutin ve immünohistokimyasal yöntemler kullanıldığında gözlenmiştir.

VCD grubunda primer foliküllerde TUNEL (+) hücre sayısı kontrol grubundan fazla olarak saptanmıştır. Primordial folikül hücrelerinde TUNEL pozitif hücre sayısı kontrol grubuna göre artmış olmakla beraber bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Sekonder foliküllerde TUNEL pozitif hücre sayısı VCD uygulanan guruplarda artmış olmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Devine ve ark. fare ovaryum kültürlerinde VCD etkisiyle primordial ve primer folikül granuloza hücreleri ile oositlerde TUNEL (+) liginde ve TUNEL (+) hücre sayıları ile granuloza hücre kültürlerinde kaspaz 3 pozitif hücre sayılarında artış bildirmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada kontrol ovaryumları ve VCD uygulanan ovaryumlarda sekonder folikülden büyük folikül gözlenmemiştir. Araştırmacılar bu durumu kültür ortamında gonadotropin yokluğuna bağlamışlardır. **(62)**

Araştırmamızda VCD grubunda primordiyal ve primer folikül granuloza hücrelerinde kontrolle benzer yoğunlukta kaspaz 3 boyanması görülmüştür. Oositlerde kaspaz 3 boyanması olmamıştır.

Mayer ve arkadaşları farelerde yaptıkları çalışmada, VCD uygulanması sonrası küçük preantral foliküllerde kaspaz 3 aktivitesinin arttığını göstermişlerdir. Ayrıca bu sinyal yolağında mitokondrial membranda Bax artışı olduğu ve bu artışla beraber mitokondrial sitokrom c'nin sitoplazmaya sızdığı bu da apoptozom aktivasyonunu sağladığı sonuçta proteaz ve kaspaz 3 aktive olduğu belirtilmiştir. **(173)**



VCD'nin çeşitli dozlarıyla sıçanlarda yapılan diğer çalışmalarda da VCD grubundaki küçük çaptaki preantral foliküllerde belirgin şekilde azalmalar görülmüştür. Ayrıca, foliküllerde kaspaz 3 aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı oranda arttığı diğer foliküllerde ise kontrol ile benzer aktivitenin olduğu görülmüştür. Kaspaz 3 aktivitesi özellikle primer ve primordiyal foliküllerdeki granüloza hücrelerinde ve oositlerde artmıştır **(10, 276)**.

Xiaoming Hu ve ark. sıçanlara, VCD uygulanması sonrası 4. saatte konfokal mikroskopta primordial ve küçük primer folikül granüloza hücreleri ve oositlerde sitozolik kaspaz 3 ve kaspaz 8 aktivitesi ve prokaspaz 3 protein ekspresyonunda artış olduğunu ve 1 gün VCD uygulanması sonrasında ise mitokondrial kaspaz 9 aktivitesinde ve kaspaz 3 aktivitesinde artış olduğunu göstermişlerdir. Tekrarlayan dozlarda kaspaz 3 aktivitesinde artış olmuştur. **(118)**

On beş gün boyunca 80-320 mg/kg arasındaki dozlarda VCD uygulanan diğer çalışmalarda; primordial ve primer foliküllerde granüloza hücrelerinde ve oositlerde kaspaz 3 aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı oranda arttığını daha büyük foliküllerde ise kontrol ile benzer aktivitenin olduğunu bildirilmişlerdir. **(10, 276)**.

Yasuishi ve ark. Bax yoksun farelerde VCD nin neden olduğu primordial ve primer folikül deplesyonunun normal farelere göre daha az olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada kaspaz 2 veya kaspaz 3 den yoksun farelerde primer folikül deplesyonu normal farelere göre daha az gerçekleşirken primordial folikül deplesyonu kontrol farelerine benzer olarak gerçekleşmiştir. Dolayısıyla kaspaz sistemi primer folikül apoptozunda önemlidir. **(248)** Yapılan çalışmalarda kaspaz 2 oosit apoptozunda önemli iken kaspaz 3 granuloza hücre apoptozunda önemli olduğu gösterilmiştir. **(293)**

Araştırmamızda; VCD uygulanan gruplarda ovaryum stromasında kaspaz 3 boyanma yoğunluğu artmış olarak bulunmuştur. Flaws ve ark.'nın yaptıkları çalışmada immatür sıçanlarda VCD'nin toksik olmayan tetrol ürünlerine, büyük preantral foliküllerde küçük preantral foliküllere göre 1,5 kat, interstisyel hücelere göre 4 kat fazla çevrildiğini bildirmişlerdir. Erişkin sıçanlarda ise küçük ve büyük preantral foliküllerde tetrol ürünlerine çevrilme oranı benzer bulunmuştur. Ayrıca interstisyel hücrelerin VCD etkisine duyarlı olduğu gözlenmiştir. Primordial ve primer foliküllerin büyük foliküllere göre VCD'yi tetrol ürünlerine daha az çevirdiği

saptanmıştır. **(253)** Bu bulgular bizim bulgularımızla uyumludur. VCD, stromada apoptoz sürecini oldukça hareketlendirmiştir.

Araştırmamızda, VCD grubunda primordiyal foliküllerde kaspaz 3 boyanma yoğunluğunun az olmasının az sayıda kalan foliküllerin apoptozlarının kaspaz 3 evresine ulaşmadığından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Araştırmamız bulguları, VCD'nin ovotoksik etkisine karşı sıçanların farelere göre daha dirençli olduğunu belirten araştırmalarla uyumludur. Ancak toksik etkinin uzun dönemde primordial ve primer foliküllerinin tam kaybına neden olacağını düşünmekteyiz. Dolayısıyla eğer bir menopoza modeli oluşturulacaksa seçilen deney hayvanının önemli olduğunu, araştırmamızda kullanılan 160 mg/kg dozun 55. günde sıçanlarda folikül kaybı oluşturduğu ancak menopoza oluşturmadığı için daha uzun süre beklenmesi gerektiği, farelerde ise bu sürenin yeterli olabileceği göz önüne alınması uygun olacaktır.

Kemirici ovaryumları yaşamlarının çok geç evresine kadar yaşlanmamaktadırlar. Dolayısıyla insanlarda ovaryumların yaşlanmasını taklit eden birçok çalışma yapılmıştır. Her modelin kendine göre avantajları ve dezavantajları vardır. En fazla kullanılan overektomize hayvan modelidir. Bu modelde mikroçevre hormonal yönden çok ani değişmektedir. FSH reseptör mutasyonları, GDF-9 gen mutasyonları ve TGF- $\beta$  mutasyonları ile de menopoza modelleri kullanılmaktadır. Ancak bu modellerde fetal dönemden itibaren reproduktif sistem üzerine olumsuz etkiler oluşmakta ve normal reproduktif sistem gelişimi olmamaktadır. Günümüzde menopoza çalışmaları için en uygun yöntem insan olmayan primatların kullanılması gibi görülmekle beraber bu yöntemde ekonomik olarak uygun bir yöntem olarak karşımıza çıkmamaktadır. Dolayısıyla bu modeller içerisinde VCD ile menopoza modeli oluşturmak uygun gibi görülmektedir. Bu modelde insan reproduktif hayatında olduğu gibi folikül kaybı apoptoz mekanizmaları ile olmakta ve sonrasında kalan rezidüel ovaryum dokusu insan ovaryumları gibi androjen üretimine katkıda bulunmaktadır.

VCD'nin direkt olarak ovaryumlardaki primordial ve primer foliküller üzerine toksik etkisi olduğu bilinmektedir. Folikül sayılarının azalması ile beraber siklus düzensizliği ve kan hormon düzeylerinde değişiklikler oluşur. Sıçanlara 30 gün 80mg/kg/gün VCD uygulamasının arkasından 360 gün süresince kan hormon ve

ovaryumların morfolojik takibinin yapıldığı bir araştırmada antral foliküllerdeki kaybın 120 günde anlamlı düzeylere geldiği görülmüştür. Bu çalışmada plazma FSH düzeyindeki değişiklikler VCD uygulanan grupta 120 günde meydana gelmiştir. Bu etki 240. günde ve 360. günde devam etmiştir. FSH düzeylerindeki yükselme antral folikül sayısında düşmeyle korelasyon göstermiştir. Kan östradiol düzeyleri 360. güne kadar kontrol grubuyla benzer düzeylere sahip bulunmuştu.. Ancak 360. günde, VCD grubunda kan östradiol konsantrasyonları arasında büyük bir kişisel farklılık görülmüştür. Primordial ve primer foliküllerde hasarın 10 gün gibi çok erken dönemlerde meydana gelmesine rağmen antral folikül sayısında değişikliklerin 120 günde meydana geldiği bu dönemden sonra ise serum FSH düzeylerinde yükseklik olduğu görülmüştür. **(175)** Yine aynı araştırma grubunun farelere 10 gün süresince 160 mg/kg/gün VCD uyguladıkları araştırmalarında, kan hormon düzeylerini ölçtüklerinde VCD grubunda 15. günde FSH düzeylerinde değişiklik saptamazlarken, 37. gününde kan FSH düzeylerinin kontrol grubuna göre artmış olduğunu görmüşlerdir. FSH daki yükselme 100 güne kadar devam etmiştir. Bu dönemde kontrol hayvanlarında kan östradiol konsantrasyonlarında ise bir değişiklik olmamıştır. Aynı araştırmanın folikül sayıları ve morfolojisine bakıldığında 15 günde primordial folikül ve primer folikül sayılarının kontrol grubuna göre azaldığı görülmüştür. 46. günden sonra primordial ve primer folikül kalmamıştır. Androstenedion üretimi 120. günde VCD uygulanan grupta ovaryumlarda kontrole göre tespit edilebilir düzeylerin çok altında olduğu görülmüştür. Dolayısıyla menopozdan önce ovaryumların androjen üretimine çok fazla katkıda bulunmadığı belirlenmiştir. **(173)**

Araştırmamızda VCD grubunda, FSH ve östradiol düzeyleri kontrol grubuyla benzer bulunmuştur. Buna rağmen istatistiksel olarak anlamlı olmasada serum FSH ve östradiol düzeylerinde artış olmuştur. Bu artışın ovaryumlarda azalan sağlıklı folikül popülasyonu ile ilgili olduğunu düşünmekteyiz.

Araştırmamızda VCD grubunda serum AMH ve inhibin B düzeyleri kontrol grubundan düşük bulunmuştur. VCD normal atrezi sürecini etkileyerek primordial ve primer foliküllerde atrezi sürecini hareketlendirmiştir. VCD grubundaki inhibin B düzeylerindeki düşüşün antral folikül sayılarındaki azalmaya ve FSH artışıyla eş

zamanlı olarak geliştiği, AMH düzeyindeki düşüşün ise folikül rezervinin azalmasına bağlı oluştuğunu düşünmekteyiz.

Araştırmamızda DH grubunda 28 günlük immatür Sprague Dawley sıçanlara DHEA uygulanmıştır. Bu dönemde sıçanlarda sikluslar henüz başlamamış olup, vajinal açıklıkları henüz yoktur. Bu dönem sıçanlarda puberte başlangıcıdır. literatürde birçok doz aralığında DHEA uygulanmasına rağmen immatür sıçanlarda ovaryumlarda değişikliklerin oluşmasında en uygun dozun 6 mg/100g vücut ağırlığı olduğuna karar verilmiştir. Araştırmamızda, DHEA, DMSO içerisinde çözülerek intraperitoneal olarak uygulanmıştır.

Araştırmamızda, deney sonu ağırlıkları (DSA) yönünden, DH grubu ile kontrol grubu arasında araştırmalarla uyumlu olarak fark gözlenmemiştir.

Araştırmamızda uzun dönem DHEA uygulanmış olmasına karşın vücut ağırlıklarında değişiklik saptanmamıştır. DHEA' nın vücut ağırlığını arttırdığını belirten araştırmalarla bulgularımızdaki farklılığın seçilen sıçan türünden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Sander Valeria ve arkadaşları yaptıkları araştırmada, DHEA uygulamasının ovaryumlarda PCOS benzeri bir görünüme neden olduğunu, ovaryum hacmini ve steroidogenezini artırdığını bildirmişlerdir. Deney sonu ağırlıkları ve bazal metabolik indeks (BMI)'e bakıldığında kontrol grubu ile DHEA uygulanan grup arasında fark olmadığını bulmuşlardır. **(80)** Mayrin ve arkadaşları yaptıkları araştırmada erişkin sıçanlara 7 gün süresince DHEA uygulaması sonrasında vücut ağırlığında değişiklik olmadığını bildirmişlerdir. **(182)**

Cleary ve arkadaşları 6 ay süreyle % 1'lik DHEA'lu dietle beslenen erişkin dişi sıçanlarda vücut ağırlıklarında azalma olduğunu bildirmişlerdir. **(291)** Berger ve arkadaşları ooferektomi yapıp intravajinal 1 mg/gün DHEA uygulanan gruplarda plasebo uygulanan gruplara göre vücut ağırlığında azalma belirlemişlerdir. **(17)** Krishna ve arkadaşları 31 günlük immatür sıçanlara DHEA uyguladıklarında toplam vücut ağırlığında azalma bildirmişlerdir. **(292)**

Ward ve arkadaşları yaptıkları araştırmada erişkin sıçanlara 20 gün süresince DHEA'yı değişik dozlarda uygulamışlar ve ovaryum ile uterus ağırlıklarını kontrol hayvanlara göre artmış olarak bulmuşlardır. **(275)** Ward ve arkadaşları yaptıkları bir başka araştırmada kastre edilmiş sıçanlarda DHEA uygulaması ile uterus

ağırlıklarında artış bildirmişlerdir. **(276)** Yine Wang ve arkadaşları sıçanlara 20 gün süresince DHEA 6mg/kg/gün İP enjekte ettiklerinde ovaryum ağırlığında artış bildirmişlerdir. **(274)** Berger ve arkadaşları ooferektomi uygulanmış sıçanlara intravajinal DHEA uygulanması ile uterus ağırlığında herhangi bir farklılık saptamamışlardır. **(17)** Araştırmamızda DH grubunda sağ, sol ve toplam ovaryum ağırlıkları kontrol grubu ile benzer bulunmuştur. Uterus ağırlığı ise kontrol sıçanlara göre artmış olarak bulunmuştur.

Krishna ve arkadaşları 30 gün süresince intraperitoneal DHEA uyguladıklarında sol ovaryum ağırlıklarını kontrol grubuna göre daha az bulmuşlardır. Krishna ve ark. bu durumu immatür sıçan kullanmalarına ve DHEA tedavisi sonrasında LH düzeylerinin deprese olmasına bağlı olarak ovulasyonun gerçekleşmemesi ile ilgili olabileceğini belirtmişlerdir. **(292)** Hipkin ve arkadaşları sıçanlara hipofizektomi sonrası DHEA uygulamışlar ve uterus ağırlığında artış olmadığını görmüşlerdir. **(110)**

Araştırmamızda DHEA uygulamasının uterus ağırlığını arttırdığı görülmüştür. Bu etkinin uzun süreli DHEA uygulamasının siklusları düzenli olan hayvanlarda uterus üzerine trofik etki oluşturması nedeniyle olabileceğini düşünmekteyiz

Kim HH ve arkadaşları yaptıkları araştırmada farelere 15 gün süresince DHEA enjekte etmişlerdir. Folikül çaplarını ölçmüşler ve apoptozu değerlendirmişlerdir. DHEA uygulaması sonrası foliküllerde apoptozun arttığını gözlemişler ve ovaryumlarda foliküllerin çapının arttığını tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar göstermektedir ki DHEA uygulaması ovaryumlarda apoptozun ve folikül çaplarının artışına neden olmaktadır. **(141)** Araştırmamızda, primordiyal, primer, sekonder ve antral folikül çapları DH grubunda kontrol grubuyla benzer olarak bulunmuştur.

Araştırmamızda, DHEA grubunda, kortekste çok sayıda folikül gözlenmiştir. Özellikle total primordiyal folikül sayısı ve atretik primer folikül sayısı oldukça artmıştır. Normal görünümlü primordiyal folikül sayıları da artmıştır. Sekonder folikül sayıları artmış olmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı değildir. Antral folikül sayıları kontrol grubuna göre azalmış olarak bulunmuştur. Korpus luteumların

sayısı azalırken kist sayılarında artış gözlenmiştir. DHEA uzun dönemde, primer foliküllerin atreziye gidişine ve kist oluşumuna yol açtığını düşünmekteyiz.

Araştırmamızda, korpus luteumların azalmasını anovulasyona bağlamaktayız. Dolayısıyla DHEA uygulanan gruplarda, ovaryumlarda, primordiyal foliküllerden primer folikülere geçiş aşaması kolaylaşmakta, anovulasyon nedeniyle foliküler gelişim duraksamakta ve sonrasında foliküller uzun bir süre primer ve sekonder evrede kalmakta olduğunu düşünmekteyiz. Bilindiği gibi foliküller bu evrede apoptoza daha yatkındırlar. DHEA uygulanması sonrasında primordiyal foliküllerde artış olmasının nedenini ise primordiyal germ hücrelerinin, erişkin ovaryumlarda tekrar aktive olması sonucunda gerçekleşebileceğini düşünmekteyiz.

Araştırmamızda, DHEA grubunda normal primordiyal ve primer folliküllerin yüzdesi kontrol grubuna göre artmış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Atretik primordiyal ve primer foliküllerin yüzdesi kontrol grubu ile benzer olarak bulunmuştur. Normal ve atretik primordiyal follikül yüzdeleri kontrol grubuyla benzer olduğu görülmüştür. Folikül sayıları değerlendirildiğinde; DHEA uygulanmasının, folikül havuzunda primordiyal folikülleri etkilemediği düşünülmektedir. Ancak, özellikle primer foliküllerde atrezi oranlarını arttırmıştır.

Honnma ve ark. **(112)** DHEA uygulanan sıçanlarda yedi gün DHEA uygulanan guruplarda atretik folikül yüzdesinde değişiklik olmamıştır. On beş gün DHEA uygulanan guruplarda atretik folikül yüzdesinde artış bildirmişlerdir.

Misugi ve ark. **(309)** 6 mg/100g VA DHEA uyguladıkları sıçanlarda kontrol grubuna göre artmış sayıda atretik folikül olduğunu bildirmiştir. Bu araştırmada uygulamanın ne kadar süreyle yapıldığı bildirilmemiştir.

DHEA uygulanan immatür sıçanlarda ovaryumlarda kistik değişiklikler, erken ovulasyon, asiklisme ve sonrasında anovulasyon olduğu belirlenmiştir. **(148, 149)** Düzenli siklusları olan erişkin sıçanlara DHEA uygulanması sonrasında ovaryumlarda kistik değişiklikler gözlenmiştir. **(275)**

Luchetti ve arkadaşlarının immatür sıçanlara DHEA uyguladıkları araştırmalarında ovaryumlarda kortekste atretik foliküllerin arttığını ve gelişimin herhangi bir evresinde duraksamış ovaryum foliküllerini görmüşlerdir. Ovaryumlardaki kist sayısı da artmıştır. Bu kistlerin morfolojisi incelendiğinde teka

katında incelme ve granüloza katında basıklaşma dikkati çekmiştir. Ovaryumlarda steroidogenez de artmıştır. **(166)**

Ward ve arkadaşları, düzenli siklusları olan 55 günlük erişkin sıçanlarla yaptıkları çalışmada; DHEA uygulamasından sonra ovaryumlarda kistik ve atretik foliküllerde artış görmüşlerdir. **(276)** Araştırmamızda, DH grubunda tunika albuginea içerisinde ve kortekste folikül kistleri görülmüştür. Bu kistlerin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sayısında artış gözlenmiştir. Sekonder foliküller ve özellikle antral foliküllerde oositin etrafını saran granüloza hücrelerinde apoptozda da artış görülmüştür.

Lee ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; 10 günden fazla DHEA uygulanan gruplarda %44 ünde sürekli diestrus, %56 sında ise sürekli östrus siklusu oluştuğunu gözlemişlerdir. 10 günlük DHEA uygulamasından sonra ise hayvanların %87'sinde ovaryumlarda kistler gözlenmiştir. %60 hayvanda korpus luteum yokken, %40'ında korpus luteum görülmüştür. 10 gün DHEA uygulanan gruplarda kist boyutları 0.45-2.2 mm arasında olduğu belirlenmiştir. Atretik folikül sayılarında da artış görülmüştür. Bu çalışmada tunika albugineada kalınlıklarında değişme görülmemiştir. **(161)** Araştırmamızda DHEA uygulanan gruplarda, araştırmalarla uyumlu olarak kontrol grubuna göre atretik foliküllerin ve kistlerin sayıca kısmen arttığı belirlenmiştir.

DHEA'nın ovaryumlarda ve uterusu, proinflamatuvar ve vazokonstriktör etkiye sahip PGF<sub>2α</sub> konsantrasyonlarını ve ovaryumlarda indirek olarak korpus luteumda luteolitik süreci artırdığı belirlenmiştir. Buna ek olarak uterusu artan oksidatif stres ve inflamatuvar hücre ve T lenfosit subpopulasyonu değişiklikleri sonrasında uterusu zararlı etkileri görülmüş ve implantasyon oranlarında düşmeye neden olmuştur. **(75, 76)**

Takahashi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada insan periferik lenfositlerde DHEA'nın androjen ve östrojen reseptörleri üzerine direkt etkilerinden bağımsız olarak apoptozu engellediğini göstermişlerdir. **(247)**

Shirwalkar ve arkadaşları erişkin sıçanlara 1, 2, 3 hafta süresince 2 mg/gün östrodiol valerat uygulamışlar ve ovaryumlarda suprafizyolojik dozlarda östrojen uygulandığında folikülogenezin bozulduğunu, erken maturasyonun, apoptozun ve kist oluşumlarının arttığını görmüşlerdir. **(232)**

TUNEL metodu apoptozdaki DNA kırıklarını gösterir iken kaspaz 3 apoptozun geri dönüşümsüz olan son basamağını belirler. Araştırmamızda TUNEL (+) hücrelerin varlığı apoptoz sürecine girildiğini gösterirken aynı hücrelerde kaspaz 3'ün negatif olması henüz apoptozun geri dönüşümsüz basamağına gelinmediğini açıklar. Bu nedenler dikkate alınarak Araştırmamızda DHEA gruplarında kontrol grubuyla benzer sayıda TUNEL (+) hücre sayısı görülmüştür. Kaspaz 3 boyanma yoğunluğu ise DHEA gruplarında sekonder folikül granuloza hücrelerinde ve intertisyel hücrelerde kontrol grubuna göre artmıştır. Sekonder foliküllerde artmış kaspaz 3 aktivitesi bu foliküllerde apoptoz sürecinin başladığını göstermiştir. Bu nedenle DHEA'nın foliküler maturasyonu duraklatmış ve foliküllerin apoptoza en yatkın oldukları sekonder ve antral folikül döneminde kalmış olduğunu ve apoptoz mekanizmalarını bu nedenle harekete geçtiğini, intertisyel alanda apoptoz gözlenmesinin ise androjenlerin stromada yaptıkları etkiyle benzer olduğunu çünkü benzer duruma PCO'da karşılaşıldığını düşünmekteyiz.

Ling Wang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada DHEA'nın osteoblastlarda proliferasyonu artırdığını ve AR ve ER bağımsız mekanizmayla MAPK sinyal yolağını kullanarak direkt olarak apoptozu inhibe ettiğini göstermişlerdir. **(273)** DHEA'nın antiapoptotik Bcl 2 ve Bcl-XL aktivitesini artırarak apoptozu önleyici etkisini gösterdiğini bildiren çalışmalar vardır. **(263)** Dongmin ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, DHEA'nın aortik vasküler hücrelerde apoptozu, kaspaz 3 aktivitesini azaltarak ve Bcl-2'yi artırarak önlediğini göstermişlerdir. **(164)**

Honnma ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; DHEA uygulanan sıçanların ovaryumlarında folikül kistlerinde artış olduğunu görmüşlerdir. Ayrıca antral ve preantral foliküllerin granuloza hücrelerinde TUNEL pozitif hücrelerinde de artış saptamışlardır. DHEA'nın ovaryumlarda Fas-FasL, kaspaz ve MT-1-MMP sistemlerini aktivasyona geçirerek apoptoza neden olduğunu ve sonrasında folikül kist sayısında artış olduğunu gözlemişlerdir. **(112)**

DHEA prehormon olarak etkilerinin yanında direk etkiyle ovaryumdaki steroidlerine sentezini artırarak etki gösterebileceği nitekim östradiol sekresyonunu artırdığı belirlenmiştir. **(272)**



DHEA uygulanan sıçanlarda serum androjen, östrojen, luteinizan hormon ve prolaktin konsantrasyonlarının arttığı görülmüştür. Ayrıca kistik foliküllerin fazla olduğu sıçanlarda, serum östrojen ve androjen konsantrasyonları, kist içeriği az olan sıçanlara göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. FSH konsantrasyonları kontrol grupları ile benzer düzeylerdeyken serum LH konsantrasyonlarında ise korpus luteum sayısının artışına bağlı artış görülmüştür. Dolayısıyla DHEA uygulaması ile kistlerin oluşumunun, artması ile östradiol, androjen, prolaktin ve luteinizan hormonların serumlardaki düzeylerinin arttığı düşünülmüştür. **(161)**

Luchetti ve arkadaşları yaptıkları çalışmada DHEA uygulanmasının ovaryum steroidogenezisini arttırdığını belirlemişlerdir. **(166)** Sander ve arkadaşları ise farelere 20 gün süresince DHEA uygulamışlar ve serum östradiol ve progesteron düzeylerinin arttığını görmüşlerdir. **(229)**

Ward ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada erişkin sıçanlara 20 gün değişen dozlarda DHEA uygulanmasının sonrasında, kontrol grubuna göre kan FSH ve prolaktin düzeylerinin daha yüksek, LH düzeylerinin ise daha düşük olduğunu saptamışlardır. Ayrıca ovaryumlarda kistik foliküllerde artış görmüşlerdir. **(276)**

PCOS'lu hastaların ovaryumlarından elde edilmiş aynı boyuttaki foliküllerin, normal hastalardaki foliküllere göre daha fazla östrojen sentezledikleri görülmüştür. Bu foliküllerde teka interna hücrelerinde 17 alfa hidroksilaz aktivitesinin arttığı görülmüştür. **(279)**

Araştırmamızda, DHEA grubunda, serum FSH ve östradiol değerleri kontrol grubu ile benzer bulunmuştur. AMH düzeyleri ve inhibin B kontrol grubuna göre azalmış olmakla birlikte bu veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

E.Anderson ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; DHEA uygulanan sıçanlarda erken ovulasyon olduğunu belirlemişlerdir. Serum DHEA, testesteron, androstenedion, östron ve östradiol düzeyleri kontrol gruplarından yüksek olarak bulunmuşlardır. FSH düzeylerini kontrol grupları ile benzer olarak bulunmuşlardır. **(4)**

Uzun dönem DHEA uygulanması sonrasında ovaryumdaki mikroçevrede androjenik bir ortam oluşur. Artan androjenler östrojenlere çevrilirler. Artmış östradiol seviyesi az miktarda LH salınımlarına neden olarak DHEA tarafından aktive olmuş oositlerin erken ovulasyonuna neden olurlar. Değişen hormon seviyesi

sonucunda anovulasyon oluşur. Buna bağlı olarak sikluslar düzensizleşir, ovaryumlarda atretik foliküllerde artış oluşur ve kistler çoğalır. **(3)**

Araştırmamızda DHEA'nın uzun dönem etkilerini görmek için sıçanlara 55 gün uygulanmıştır. 55 gün süreyle DHEA uygulanarak yapılmış bir başka araştırmaya rastlanmamıştır. 55 günlük DHEA uygulanması ovaryumlardaki steroidogenezi arttırmamıştır. Spraque-Dawley türü sıçanların diğer türlere oranla DHEA uygulaması sonrası steroidogenezi artırma yönünden daha dirençli olduğunu düşünmekteyiz.

Araştırmamızda yirmi sekiz günlük Spraque Dawley sıçanlara on beş gün süresince 160 mg/kg/gün VCD ip ve 55 gün süresince 6mg/100g/VA DHEA ip uygulanmıştır. Kaynaklarda Fisher 344 ve Spraque Dawley tür sıçanlara VCD, Fisher 344 tür sıçanlara VCD, östrojen, fitoöstrojen uygulamaları yapılmış olmasına rağmen, VCD ve DHEA (androjen) uygulaması yapılmamıştır.

Araştırmamızda VCD ve DHEA uyguladığımız grupta (VDH), DSA'ları kontrol grubuna göre daha az olarak bulduk. VDH grubunda VCD grubuna göre DSA'larının arttığını gördük ancak bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bulgularımıza göre DHEA, VCD nedenli oluşan kilo kaybını kısmen engellemiştir.

Araştırmamızda VDH grubunda sol over ağırlığı kontrol grubuna göre azalmış, uterus ağırlığı kontrol grubuna göre artmıştır. Sağ over ve toplam over ağırlığı kontrol grubuyla benzerdir. VDH grubunda sağ over ağırlığı, uterus ve toplam over ağırlığı VCD grundan fazla olarak bulunmuştur.

Kary Thompson ve arkadaşları yaptıkları çalışmada VCD uyguladıkları sıçanların ovaryumlarında, primordial ve primer foliküllerde %50 azalma görmüşlerdir. Sıçanlara eş zamanlı östradiol uygulandığında primordial folikül sayısı kontrol grubuna göre azalmışken, primer folikül sayısı kontrol gruplarına yaklaşmıştır. Genistein verilmesi östradiole benzer etki oluşturmuştur. ER antagonisti uygulanması ise bu folikül kaybını önleyici etkiyi bloke etmiştir. VCD kaspaz 3 aktivitesini artırırken, genistein uygulanması kaspaz 3 aktivitesini normal düzeylere getirmiştir. VCD uygulanan grupta serum östradiol konsantrasyonunda ve uterus ağırlığında değişme görülmemiştir. VCD ile beraber östradiol uygulanan grupta uterus ağırlığında olmuştur. **(252)**

Araştırmamızda VCD uyguladığımız sıçanların ovaryumlarında, toplam ve normal primordiyal folikül sayısı oldukça azalmıştır. DHEA grubunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında normal ve atretik primordiyal folikül sayısı artmıştır. DH grubunda atretik primer folikül sayısı kontrol grubuna göre artmış olmasına rağmen bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. VDH grubu DH grubu ile karşılaştırıldığında toplam ve normal folikül sayısı daha az iken atretik primordiyal ve primer folikül sayısı daha fazladır. VDH grubu ile VCD grubu karşılaştırıldığında toplam primordiyal ve primer folikül sayısı VDH grubunda daha fazladır. Normal primordiyal ve primer folikül sayılarında VDH grubunda daha fazladır. Bu sonuçlar bize 55 gün DHEA uygulanmasının VCD'nin neden olduğu folikül havuzundaki azalmanın kısmen geri çevrildiğini göstermiştir.

Araştırmamızda, VCD grubunda normal primordiyal ve primer folikül yüzdesi kontrol grubundan daha az iken atretik primordiyal ve primer folikül yüzdesi kontrol grubundan daha fazla olduğu görülmüştür. DH grubunda normal primordiyal folikül yüzdesi VCD grubundan daha fazla olup kontrol grubu ile benzerdir. Normal ve atretik primer folikül yüzdesinin ise kontrol grubundan daha fazla olduğu görülmüştür. VDH grubunda normal primer folikül yüzdesi kontrol grubuna göre daha az olmakla beraber VCD grubuna göre daha fazla, atretik primer folikül yüzdesi ise kontrol grubuna göre daha fazla olmakla beraber VCD grubuna göre daha az olarak bulunmuştur. Dolayısı ile 55 gün süresince VCD ile birlikte DHEA uygulaması ovaryumlar üzerinde folikül havuzunda düzeltici etkiye sahip olmakla beraber VCD'nin neden olduğu ovotoksik etkiyi düzeltmiştir ancak primer folikül atrezisini engellememiştir.

Araştırmamızda, VCD grubunda primordiyal ve primer foliküllerde TUNEL pozitif hücre sayısının fazla olduğu görülmüştür. VCD ile birlikte DHEA uygulanması primordiyal ve primer foliküllerde TUNEL pozitif hücre sayısını azaltmıştır. Bu bulgu bize 55 gün süre ile DHEA uygulamasının VCD'nin neden olduğu apoptozu azalttığını göstermiştir.

Araştırmamızda deney grupları arasında boyanma yoğunluğu yönünden fark olmamasına karşın VCD ve DH gruplarında intertisyel alanda kaspaz 3 aktivitesini arttırmıştır. DHEA'nin ovaryumdaki stroma hücrelerinde apoptozu arttırmış olması folikülogenezi etkileyebileceğini düşündürmüştür.

Araştırmamızda VDH grubunda serum FSH ve E2 düzeyleri kontrol grubuyla benzer bulunmuştur. AMH düzeyi kontrol grubundan azdır. İnhibin B düzeyleri istatistiksel olarak farklı olmasada kontrol grubundan daha azdır. VDH grubu VCD grubu ile karşılaştırıldığında FSH düzeylerinin benzer E2 düzeylerinin ise düşük olduğu görülmüştür. AMH düzeyi VDH grubunda VCD grubuna göre artmıştır. İnhibin B düzeyi ise istatistiksel olarak anlamlı olmasada artmıştır.

Bulgularımıza göre VCD ile birlikte DHEA uygulanması VCD grubunda artma eğilimindeki FSH düzeylerini normale çekmiştir. Artmış E2 düzeylerindeki düşürmüştür. Bu bulgular VCD nin neden olduğu azalmış sağlıklı folikül popülasyonunun DHEA tarafından kısmen düzeltildiğinin bir göstergesi olduğunu düşünmekteyiz. AMH ve inhibin B düzeyinin VCD grubuna göre artması folikül rezervinin artışının önemli bir bulgusu olduğunu düşünmekteyiz.

AMH büyüyen foliküllerin granüloza hücreleri tarafından sentez edilen inhibitör bir maddedir. Sıçanlarda yapılan mRNA in situ hibridizasyon çalışmalarında, AMH ekspresyonu erken büyüyen, preantral ve küçük antral foliküllerde sinyal aktivitesi verirken atretik olmayan büyük foliküllerde ve bütün atretik foliküllerde kaybolduğu belirlenmiştir. **(10)** Küçük antral foliküllerde, daha fazla differansiye olmuş büyük foliküllerden elde edilen folikül sıvılarına oranla AMH düzeyi yüksek bulunmuştur. **(270)** AMH tip 2 reseptörü preantral ve küçük antral foliküllerin granüloza hücreleri tarafından eksprese edildiği daha büyük ve preovulatuvar foliküllerin granüloza hücreleri tarafından eksprese edilmediği gözlenmiştir. **(10, 250)** Teka hücrelerinin AMH tip 2 reseptör ekspresyonu yaptığı ve ekspresyonun en fazla preantral ve küçük antral foliküllerde olduğu granuloza hücrelerinin aksine antral ve erken atretik foliküllerde devam ettiği ve erken folikülogenezde AMH'nin rolü olabileceği düşünülmüştür. **(127)**

AMH ovaryumlarda antral foliküllere kadar gelişen foliküllerde granüloza hücreleri tarafından sentezlenmektedir. Reseptörleri teka, granüloza hücre ve oositlerde (yani hem somatik hücre hem de germ hücrelerde) bulunmaktadır. Folikülogenezdeki etkisine bakıldığında (proliferasyon, apoptoz ve differensiasyon); primordial foliküllerde AMH foliküllerin erkenden rekrutmente girmelerini önleyici bir fren olarak çalışmakta ve bu foliküllerde FSH'nin indüklediği foliküler gelişmeyi durdurmaktadır. Dolayısıyla folikülleri en fazla korunaklı oldukları primordial

folikül havuzunda tutmaktadır. Bu etkiden kurtulan foliküller büyüyen folikül havuzuna katılmakta ve sonrasında ovulasyona giden süreç başlamaktadır. En fazla mitotik aktivitesi olan folikül hücreleri en fazla oranda AMH sentez etmekte ve mikroçevrede AMH etkisi görülmektedir. AMH, preantral foliküllerin granuloza hücrelerinde, primordial foliküllerin granuloza hücrelerindeki negatif etkisinin tersine proliferasyonu artırmakta ve folikül gelişimini artırıcı etki göstermektedir. Bu, foliküllerde teka hücrelerini daha sağlıklı görünüme sokmaktadır. (72, 73, 185)

AMH'nin preantral folikül döneminde granuloza hücre apoptozu ve folikül differensiasyonu üzerine bir etkisi yoktur. Erken antral dönem, foliküller için apoptoza en açık oldukları dönemdir. Bu dönemdeki foliküller proliferasyon ve differensiasyon süreci içerisinde bulunurlar ve ovulasyona doğru hedeflenmişlerdir. Fakat aralarından bir ya da birkaç tanesi bu süreçte başarılı olabilecektir. Seleksiyon monofoliküler gelişim için önemlidir. AMH'nin bu süreçteki rolü şöyle özetlenebilir. AMH büyük antral foliküllerde granuloza hücrelerinde proliferasyonu ve differensiasyonu azaltmakta ve aromataz aktivitesini baskılamaktadır. Yani folikülün seçilmesini engelleyici bir rol oynamaktadır. Foliküllerde aromataz aktivitesinin baskılanması mikroçevrede östrojeni azaltarak bu folikülleri apoptoza daha daha yatkın hale getirecektir. Graff foliküllerde AMH, granuloza hücrelerinde proliferasyonu ve differensiasyonu azaltmaktadır. Böylece ovaryumdaki mikroçevrede progesteron üretimi azalır. Progesteron üretiminin azalması foliküllerde ovulasyonu engelleyici bir durum ortaya çıkartır. Sağlıklı foliküler mikroçevre sağlıklı folikül gelişiminin oluşması, sağlıklı ovulasyonu beraberinde getirir. Ovulasyonun gerçekleşeceği folikülde anjiogenez iyi olmalıdır. Buda folikülün differensiye olması ve anjiogenetik faktörleri salgılaması ile sağlanır. Bu durumu bozabilecek her şey ovulasyon problemi yaratabilecektir. Sonuç olarak AMH ovaryumlarda fizyolojik bir frendir. Bizim düşüncemize göre; ovulasyonun oluşacağı folikül en fazla oranda AMH sekrete eden ve en az AMH reseptörü içerendir. AMH bu sürecin vazgeçilmez parçasıdır. (72, 73, 185, 286, 287)

Salmon ve arkadaşları preovulatuvar foliküllerin kumulus granuloza hücreleri, özellikle oosite yakın bölgelerde, mural hücrelere göre daha fazla yoğunlukta AMH ekspresyonu göstermiştir. Bu bulgu oositin granuloza hücrelerindeki AMH ekspresyonunu yönetebileceğini düşündürmüştür. (228)

Araştırmamızda, kontrol gruplarına ait ovaryum kesitlerinde primer, sekonder ve küçük çaplı antral foliküllerin granüloza hücrelerinde AMH antikoruyla yoğun boyanma gözlenmiştir. Deney gruplarında primordiyal foliküllerde boyanma görülmemiştir. Kesitlerde ayrıca stroma, teka tabakası ve korpus luteumda boyanma gözlenmemiştir. Foliküllerin oositlerinde de boyanma görülmemiştir. Bu bulgular daha önce yapılan çalışmalarla benzerdir. Bilindiği gibi AMH, primer foliküllerden itibaren sentez edilmeye başlamakta ve büyüyen foliküllerde AMH boyanma yoğunluğu giderek azalmaktadır. Ancak bazı primordiyal foliküllerde gözlenmesi gelişme yolunda ve seçilen foliküller olduğunun göstergesidir. AMH'nin esas olarak primer foliküllerden itibaren sentez ediliyor olması AMH'nin erken foliküler dönemde rolü olduğunu desteklemektedir. AMH büyüyen folikül havuzunun ürünü olduğu için kanda AMH konsantrasyonlarının belirlenmesi ise bu havuzun durumunu göstermede kullanılabilir.

Yapılan araştırmalarda AMH primordial folikülden primer foliküle geçişi inhibe ettiği ve folikül seleksiyonunda rol aldığı gösterilmiştir. AMH'nin bu foliküllerde FSH'nin etkisini nötralize ettiği belirtilmiştir. (65, 72, 73). AMH null farelerin normal primordial folikül sayısına sahip olarak doğmalarına rağmen bu farelerde primordial foliküllerin erken dönemde rekrutmente girdikleri gözlenmiştir. Genç erişkin yaşlarda bu farelerde preantral ve büyüyen foliküllerde atretik folikül oranı kontrol gruplarına göre artmıştır. Bu farelerin 13 aylıkken primordial folikülleri kalmadığı ve prematür over yetmezliği geliştiği saptanmıştır. (74) Mitozun en fazla olduğu hücrelerde AMH mRNA ekspresyonunun en fazla olduğu belirtilmiştir. (111)

Araştırmamızda da mitozun yoğun olduğu sekonder ve küçük antral foliküllerde, araştırmalarla uyumlu olarak AMH boyanmasının arttığı görülmüştür.

Mc Gee ve arkadaşları 12 günlük immatür sıçanlardan elde ettikleri preantral folikül kültüründe AMH'nin etkisini araştırmışlardır. Kültür ortamına AMH eklenmesi folikül çapında 40 µm artışa neden olmuştur. AMH preantral folikül gelişmesi ve çapını artırmıştır. FSH eklenmesi bazal gruba oranla foliküler hücre sayısını %56 oranında artırmıştır. Ortama AMH eklenmesi ise FSH'nin uyardığı hücre bölünmesini %28 oranında artırmıştır. Dolayısıyla AMH eklenmesi hem bazal hem de FSH'nin indüklediği preantral folikül gelişimini ve folikül çaplarını artırmıştır. Bu çalışmada ortama AMH eklenmesi apoptoz gözlenen hücre sayısında

bir değişikliğe neden olmamıştır. Histolojik olarak AMH eklenen kültür ortamında FSH grubuna göre teka katmanı daha kalın ve sağlıklı görülmüştür. **(300)** Araştırmamızda AMH'nin yoğun olarak boyandığı ovaryumlarda folikül çaplarının istatistiksel fark yaratmamasına karşın çaplarının arttığı gözlenmiştir. Bu artışlar AMH'nin ovaryumlarda granüloza hücrelerinde büyümeyi arttırabileceğini düşündürmüştür. Bilindiği gibi folikül gelişmesinin en önemli basamağı folikül differensiasyonudur. Foliküller differensiye oldukça, steroid hormonlar ve inhibin A salgılanacaktır.

Di Clemente ve arkadaşları büyük antral foliküllerde AMH'nin granüloza hücre proliferasyonunu azalttığını bildirmişlerdir. AMH bu foliküllerde FSH'nın uyardığı aromataz aktivitesini ve granüloza hücrelerinde LH ekspresyonunu azaltarak FSH'nın etkisini inhibe etmiştir. Dolayısıyla AMH bu foliküllerde büyümeyi ve differensiasyonu azaltmış ve sonrasında seleksiyona gidişi durdurmuştur. **(64)**

Kim ve arkadaşları AMH'nin insan Graff foliküllerinden elde edilen granüloza hücre kültüründe bazal ve epidermal büyüme faktörünün indüklediğini granüloza hücre proliferasyonunu ve progesteron üretimini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. **(142)**

Bu çalışmalar in vitro çalışmalar olup AMH'nin in vivo olarak etkilerini tam olarak yansıtamayabilir. Dolayısıyla intakt dokularda teka-granüloza-oosit arasındaki ilişkiler bu sonuçları değiştirebilir.

Bulgularımıza göre daha önce yapılan çalışmalara benzer olarak, AMH'nin erken folikülogenezde rolünün olduğunu, ayrıca erken folikülogenez ve foliküler maturasyonda negatif stimulator olarak ve büyüyen foliküllerin FSH sensitivitesini bozarak FSH'nın modüle ettiği seleksiyonu negatif olarak etkilediğini ve inhibisyon oluşturduğunu düşünmekteyiz.

İnsanlarda serum AMH ve foliküler sıvıdaki AMH düzeyleri yaşla beraber paralel bir azalma gösterdiği bilinmektedir. Farelerde **(139)** ve sıçanlarda **(287)** yapılan çalışmalarda insanlardaki çalışmalara benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Yeh ve arkadaşları dişi immatür, matür ve yaşlı sıçanlarda serum AMH düzeyini ölçmüşler ve immunohistokimyasal olarak ovaryuma AMH boyaması yapmışlardır. Üç grupta da benzer şekilde primer ve küçük antral foliküllerde yoğun

şekilde AMH boyanması olduğunu görmüşlerdir. Artan yaşla beraber AMH ile pozitif olarak boyanan folikül sayısı azalmış fakat toplam foliküllere bakıldığında AMH (+) boyanan foliküllerin yüzdesi %50-60 olarak sabit kalmıştır. **(288)**

Sukdeep ve arkadaşları farelere VCD uyguladıkları araştırmalarında ovaryumlara AMH boyaması yapmışlardır. Primer foliküllerden antral foliküllere kadar büyüyen foliküllerin granüloza hücrelerinde AMH boyanması tespit etmişlerdir. Ancak primordial ve atretik foliküllerde AMH boyanması gözlenmemiştir. En büyük folikülde de AMH boyanması gözlemişlerdir. **(227)**

Araştırmamızda deney grupları arasında AMH boyanması yönünden bir fark gözlenmemiştir. Ancak VCD grubunda AMH ile boyanan folikül sayısında azalma dikkati çekmiştir. VCD uygulanan gruplarda, primordiyal foliküllerin AMH antikoru ile boyanmadığı ancak diğer foliküllerde, kontrol gruplarına benzer şekilde antral foliküllere kadar boyanma gözlenmiştir. VCD uygulanan gruplarda AMH (+) hücre içeren folikül sayısı azalmıştır. Bu azalmanın VCD tarafından folikül havuzunun tüketilmesi sonucu ortaya çıktığını ve AMH (+) boyanan foliküllerin ise VCD'ye dirençli normal foliküller olduğunu düşünmekteyiz.

Kevenaar ve arkadaşları farelerde yaşlanma sürecinde ovaryumdaki folikülleri incelemişler ve yaşlanma ile beraber serum AMH konsantrasyonlarında azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı etki foliküllerde de gözlenmiş olup primordial folikül ve büyüyen folikül sayılarında yaşlanma ile beraber azalma gözlenmiştir. Primordial folikül sayılarında azalma ile beraber gelişen folikül sayısında azalma gözlemişlerdir. İmmunohistokimyasal analizde büyüyen foliküllerde küçük antral döneme kadar granüloza hücrelerinde AMH boyanması görülmüştür. Primer folikül granüloza hücrelerinde zayıf AMH boyanması varken, en şiddetli boyanma bir çok granüloza hücre katmanı bulunan büyük preantral foliküllerde bulunmuştur. Büyük antral foliküllerde AMH boyanması gözlenmemiştir. Serum AMH konsantrasyonu primordiyal folikül sayısı ve büyüyen folikül sayısı ile korrele bulunmuştur. Dolayısıyla serum AMH konsantrasyonlarında gözlenen azalmanın nedeni foliküllerde bireysel olarak değişen AMH konsantrasyonundan ziyade bu hormonu sentezleyen foliküllerde yaşla beraber oluşan azalma nedeniyle olduğu belirtilmiştir. **(139)**



Araştırmamız bulgularına göre VCD uygulanan gruplarda AMH (+) folikül sayısı azalmakla beraber bu azalma serum AMH konsantrasyonu değişmesine neden olmamıştır. VCD gruplarında folikül sayılarıyla hormon konsantrasyonu arasında korelasyon bulunamamıştır. Ancak primordiyal folikül sayıları ile AMH ve inhibin B arasında pozitif korelasyon, atretik primer folikül sayıları ile inhibin arasında negatif korelasyon, büyüyen folikül havuzu ile (primer, sekonder, antral follikül) AMH ve inhibin B arasında pozitif ancak zayıf korelasyon bulunmuştur.

Neonatal östrojen uygulamasının folikülogenezi inhibe ettiği ve orta ve büyük antral follikül sayılarında azalmaya neden olduğu bulunmuştur. **(126)** Östrojen uygulaması AMH sekresyonunu artırmıştır. **(125)** Yapılan bir başka çalışmada ise östrojenlerin primordiyal primer folikül geçişini inhibe ettiği gösterilmiştir. **(140)**

Araştırmamızda sıçanlara uzun süre DHEA uygulanıp ovaryumlara AMH immünohistokimyasal boyamasının yapıldığı ilk çalışmadır. DH grubunda AMH ile sekonder ve antral foliküllerin granüloza hücrelerinde boyanma yoğunluğundaki azalma istatistiklere yansımada dikkat çekmiştir. Tüm gruplarda primordiyal foliküllerde boyanma görülmemiştir. Foliküllerdeki AMH yoğunluğunun kısmen azalmasının DHEA kaynaklı folikülogenezdeki duraksama nedeniyle oluştuğunu düşünmekteyiz.

Sukdeep ve arkadaşları VCD uygulayarak oluşturdukları deneyde serum AMH ile primordiyal folikül havuzu arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. VCD uygulanan farelerde 16. günde serum AMH düzeyleri kontrol grubu ile benzer bulunmuştur. Deneyin ilerleyen günlerinde serum AMH düzeyleri VCD uygulanan grupta tespit edilemeyecek düzeylere indiği bu bulgulara göre ise VCD nedeniyle folikül havuzunu tüketmesi ile gelişecek folikülün kalmadığı ve serum AMH düzeylerinin tespit edilemeyecek düzeylerde olmasının bu nedenle oluştuğu belirlenmiştir. Dolayısıyla AMH düzeylerinin büyüyen folikül sayısı ile korele olup, serum AMH düzeyleri VCD uygulanmış farelerde folikül havuzunu değerlendirmede kullanılabileceği düşünülmüştür. **(227)**

İnsanlarda oofektomi sonrası serum AMH düzeyleri azalmıştır. Bu bulgular AMH'nin ovaryum kaynaklı olduğunu göstermiştir. **(154)** PCOS'lu hastalarda artmış antral folikül sayısı ve granüloza hücrelerinde artmış AMH sekresyonuna bağlı olarak normal hastaların iki, yada üç katı oranda daha yüksek serum AMH düzeyleri

olduğu saptanmıştır. Serum AMH oranları ovaryum volümü ile korrele bulunmuştur. **(160, 215, 35, 220).**

Araştırmamızda, VCD, DHEA ve VCD + DHEA grubunda serum AMH konsantrasyonları kontrol grubuyla benzer bulunmuştur. Ancak serum AMH konsantrasyonu DHEA grubunda VCD grubundan yüksektir. Bu etkinin DHEA gruplarında artmış büyüyen folikül sayısına ve VCD gruplarında azalmış folikül sayısına bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Sonuç olarak ovaryum rezervini belirlemede direk olarak folikülleri sayabileceğimiz yeni yöntemler geliştirilene kadar bu olgularda serum AMH ölçümlerinde kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Androjenler ovaryumlarda p450 aromataz için substrat olarak görev aldıkları ayrıca primordial foliküllerin büyüyen folikül havuzuna katılmalarını stimule ettikleri belirlenmiştir. Primer ve preantral foliküllerde yüksek düzeyde AR ekspresyonu olmakla beraber düşük düzeyde p450 aromataz aktivitesi görülmüştür. Dişi fareler androjenlerle tedavi edildiğinde androjen tedavisi primer folikül sayısında artışa neden olmuştur. Androjenlerin, AR aracılığıyla FSH'nın stimüle ettiği foliküler differensiyasyonu arttırmış olduğu ve foliküler maturasyonu inhibe ettikleri belirlenmiştir. Androjenlerin foliküler evreye bağlı olarak granüloza hücre steroidogenezini kolaylaştırdıkları ya da inhibe ettikleri belirtilmektedir. Teka hücrelerinde üretilen androstenedionun teka hücrelerinden granüloza hücrelerine diffüze olduğu sonrasında ise testesterona çevrildiği saptanmıştır. Takibinde testesteron AR'yi aktive ettiği bu da artmış IGF-1R ekspresyonuna, granüloza hücre proliferasyonuna ve FSH'nın P450 aromataz ekspresyonuna etkisinin indüksiyonuna neden olduğu gözlenmiştir. **(268, 269)**

Kadınlarda östrojenler ovaryum dokusunda androjenlerden P450 aromataz enzimi yardımıyla oluşurlar. Dolayısıyla dokudaki östrojen teka hücrelerinden salgılanan androjen üretimine ve granüloza hücrelerindeki aromataz düzeyine bağlıdır. Seks steroidleri her biri hormon bağımlı transkripsiyon faktörü olan nükleer seks hormon reseptörleri ile etkilerini gösterirler. ER  $\alpha$ , ER  $\beta$  ve AR nükleer hormon resptör süperailisine ait bir gen familyasına aittirler. **(102)**

İnsan ovaryumlarında AR protein ekspresyonu menstrual siklusun her döneminde granüloza, teka ve stromal hücrelerinde görülmüştür. AR ekspresyonunun oosit tarafından sentezlenen faktörler tarafından etkilendiği ve

folikülogenezin dönemine bağlı olarak dalgalandığı belirtilmiştir. (71) Androjenlerin folikülogenezi östrojene dönüşmek dışında AR yoluyla etkiledikleri gözlenmiştir. Fare hücrelerinin kullanıldığı bir araştırmada ovaryum kültüründe androjenler preantral folikül gelişimine ve folikül çaplarında artışa neden olduğu bulunmuştur. (193) Yapılan çalışmalarda AR tarafından upregüle edilen genler arasında granüloza FSH reseptör geni ve IGF-1 ve IGF-1 reseptör geni saptanmıştır. (269)

Araştırmamızda VCD grubunda AR (+) boyanma primordiyal ve primer foliküllerde görülmemiştir. Ancak bazı sekonder ve antral foliküllerin granüloza ve teka tabakalarında orta derecede boyanma dikkat çekmiştir. Stromada orta yoğunlukta boyanma görülmüştür. VCD grubundaki bütün folikül tiplerinde ve ovaryum stromasındaki AR boyanma yoğunluğu kontrol grubuyla benzer özellikte olduğu görülmüştür.

DH grubunda ise AR (+) boyanma kontrol grubuyla karşılaştırıldığında primordiyal foliküllerde yoğun olarak gözlenmiştir. Primer foliküllerde boyanma hafiftir. Sekonder ve antral foliküllerin teka tabakası ve stromada yoğun boyanma dikkat çekmiştir. Sekonder ve antral foliküllerde zayıf, atretik foliküllerde kuvvetli AR (+) boyanma görülmüştür. Ayrıca bulgularımıza göre araştırmalarla uyumlu olarak DH grubunda AR aracılığıyla foliküler evreye bağlı olarak aromataz aktivitesinin azalmasının gerçekleştiğini ve östrojenik çevreden uzun dönem DHEA kullanılmasıyla androjenik çevreye dönüşen ortamda daha çok sayıda foliküllerin atreziye uğradığını düşünmekteyiz.

VDH grubunda, AR ile yoğun boyanmış hücreler stromada ve teka tabakasında görülmüştür. Ancak sekonder ve antral foliküllerin granüloza hücrelerinde orta yoğunlukta boyanma belirlenmiştir. Bulgularımıza göre stroma ve teka tabakalarında yoğun AR boyanmasının nedenini bu bölgelerde androjenlerin aktif rol almasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Kontrol grubundaki sağlıklı primer foliküllerde AR ekspresyonu görülmemiştir. VCD grubunda ise primer ve primordiyal foliküllerde AR boyanmasının görülmemesini, bu grupta az sayıda folikül kalmasına bağlamaktayız. Kalan foliküllerin ise normal sağlıklı foliküller olduğunu düşünmekteyiz.

Pelletrier ve arkadaşları matür Sprague Dawley sıçanlarda AR boyanmasının primordiyal foliküllerde olmadığını ancak primer, sekonder ve matür foliküllerde granüloza hücrelerde AR immunreaktivitesi olduğunu göstermişlerdir. Korpus luteumlarda da AR boyanması gözlenmemiştir. İnterstisyel alanda ise dağınık şekilde immun pozitif boyanmış hücreler olmasına karşın germinal epitelde boyanma gözlenmemiştir. **(209)**

Szoltsky ve arkadaşları matür Wistar sıçanlarda AR ekspresyonunu araştırdıklarında bütün östrus siklusu süresince erken antral ve preantral foliküllerin granüloza hücrelerinde androjen reseptör ekspresyonu olduğunu bildirmişlerdir. Erken östrus siklusunda öncelikle erken antral foliküllerin mural granüloza hücrelerinde AR boyanma yoğunluğunun azaldığı gözlenmiştir. Bu azalma özellikle pseudostratifikasyon alanında olmuştur. Metestrus ve diestrus süresince AR boyanma yoğunluğunda azalması antruma doğru ilerlerken kumulus ooforustaki ve ona yakın bölgelerdeki granüloza hücrelerinde yoğun boyanma gözlenmiştir. Proestrusta AR ekspresyonu sadece kumulus hücrelerinde ve antrumda gözlenmiştir. Bu durum androjenlerin ovulasyon süresinde de rolü olabileceğini düşündürmüştür. **(245)**

Mo Li ve arkadaşları granüloza ve teka hücrelerinde AR yoğunluğu olmasının, fazla androjenlerin oosite girmesini engellediğini öne sürmüşlerdir. Böylece oositin aşırı androjen etkisinden kurtulduğunu ve folikülün normal gelişimine devam ettiğini belirtmişlerdir. Eğer AR eksikliği ya da fonksiyon bozukluğu gerçekleşecek olursa fazla androjenin oosite ulaşarak granüloza hücrelerinde atreziyi uyuracak süreci harekete geçirebileceğini öne sürmüşlerdir. **(295)**

Yang ve arkadaşları inek fetüslerinde ve erişkin ineklerden elde ettikleri ovaryumlarda AR ekspresyonunu araştırmışlardır. Primordial ve primer foliküllerde AR ekspresyonu gözlenmemiştir. Sekonder foliküllerin granüloza hücrelerinde zayıf AR ekspresyonu, teka hücrelerinde ise hafif AR ekspresyonu olmuştur. Antral dönemde sağlıklı foliküllerin granüloza hücrelerinde ve teka hücrelerinde kuvvetli AR ekspresyonu gözlenmiştir. Buna karşın atretik foliküllerin teka hücrelerinde orta düzeyde boyanma varken, dejenere granüloza hücrelerinde AR ekspresyonu gözlenmemiştir. **(294)**

Androjenlerin siklik rekrutment esnasında özellikle geç antral foliküllerde atreziye neden oldukları saptanmıştır. **(115)** Foliküler çevrede androjenlerin baskın olduğu dönemden östrojenin baskın olduğu döneme doğru ilerledikçe foliküllerin preantral dönemden antral ve preovulatuvar döneme doğru geçiş gösterdikleri belirlenmiştir. Dolaşımında östradiol artışının ve pozitif feedback mekanizmayla LH artışının beraber ovulasyona neden olduğu artan östradiolün ise FSH sekresyonu üzerinde baskılayıcı özellikte olduğu böylece FSH bağımlı aromataz aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir. Bu olayın gelişmiş foliküllerde aromataz aktivitesinin azalmasına ve sonrasında östrojenik çevrenin androjenik çevreye dönmesine ve folikülün atreziye uğramasına neden olduğu belirlenmiştir. **(237, 251)** Folikül maturasyona uğradıkça foliküler sıvıda östrojen artarken granüloza hücrelerinde androjen reseptör miktarı azalmıştır. Eğer foliküldeki androjen reseptör ekspresyonu yüksek kalırsa o folikülün östrojenik mikroçevreyi oluşturamadığı folikülün atreziye uğradığı anlaşılmıştır. **(251)**

ER  $\beta$  nakavt farelerde preantral ve erken antral foliküllerde AR ekspresyonunun sağlıklı farelerde olduğu gibi primer foliküllerden daha kuvvetli olduğu. Fakat sağlıklı farelerin aksine geç antral foliküllerde AR ekspresyonunda düşme olmadığı ve bu foliküllerin çoğunun atreziye uğramadığı belirlenmiştir. Hem sağlıklı farelerde hem de ER  $\beta$  farelerin teka hücrelerinde, stromal hücrelerde ve korpus luteumlarda AR ekspresyonu farklılık göstermemiştir. Bu hücrelerdeki AR ekspresyonunun kuvveti, hafif, orta düzeyde olduğu gözlenmiştir. **(38)**

Araştırmamızda da tüm gruplarda atretik foliküllerde artmış AR (+) hücreler görülmüştür. Atretik foliküllerde AR yoğunluğunun artmış olması araştırmalarla uyumludur.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Araştırmamızda 28 günlük Spraque-Dawley türü sıçanlar kullanılarak dört grup oluşturuldu. Birinci gruba 15 gün 160 mg/kg dozunda VCD uygulandı. İkinci gruba 6 mg/100g vücut ağırlığına göre DHEA 55 gün boyunca uygulandı. Üçüncü gruba 15 gün 160 mg/kg dozunda VCD ve 6 mg/100g vücut ağırlığına göre DHEA 55 gün boyunca uygulandı. Dördüncü gruba DMSO 55 gün boyunca uygulandı. İlk dozdan itibaren 55. günde sıçanların siklusları belirlenip, vücut ağırlıkları ölçülerek sakrifiye edildi. Ovaryum ve uterus ağırlıkları belirlendi. Ovaryumlar H&E ile boyanarak genel yapı özellikleri, folikül sayıları ve folikül çapları belirlendi. Ovaryumların parafin kesitlerine ayrıca TUNEL, kaspaz 3, AMH ve AR immünohistokimyasal boyalar yapıldı. Sakrifikasyondan önce intrakardiyak olarak alınan kan serumuna ayrıldı ve serumda FSH, E2, inhibin ve AMH ELISA ile ölçüldü.

VCD uyguladığımız gruplarda deney sonu ağırlıkları, sağ, sol ovaryum ağırlıkları ve toplam ovaryum ağırlığı kontrol grubuna göre azalmış olarak bulundu. VCD grubunda uterus ağırlıkları önceki çalışmalardan farklı olarak kontrol grubuyla benzer olduğunu görüldü.

VCD'nin ovaryumda primordiyal foliküllerde % 87,5 ve primer foliküllerde %79 oranında kayba yol açtığı görüldü. Ovaryumlarda, primordiyal ve primer foliküllerde apoptozun arttığı gözlemlendi. Primordiyal, primer ve büyüyen folikül sayılarında azalma tespit edildi.

VCD'nin hücresele hedefinin öncelikle primordiyal ve primer foliküllerin granüloza hücreleri ve oositler olduğu görüldü. VCD uygulanan grupta sağlıklı foliküllerin daha küçük çapta olması bize VCD'nin etkisinin folikülün belirli bir büyüklüğe eriştikten sonra meydana geldiğini düşündürdü. VCD' nin uzun dönem etkilerine bakıldığı zaman ovaryumların kist sayılarının değişmediği görüldü. Bu durum VCD' nin normal atrezi sürecini hızlandırarak ve apoptoz yolaklarını (Kaspaz ve MAPK) kullanarak folikül kayıplarını gerçekleştirdiğini düşündürdü.

VCD uygulanan gruplarda, primordiyal foliküllerin sayıca azalmış olduğu ve büyük çoğunluğunun dejenere olduğu gözlemlendi. Dejenere folikülde yer alan oositte, kromatinin nükleus zarına yakın yoğunlaştığı ve oosit ile granüloza hücreleri

arasında ilişkinin bozulduğunu gözlemlendi. Ayrıca oositin çevresini saran granüloza hücrelerinde hücre içeriği dağılmış olarak ve yan yüzeylerde ayrılmalar belirlendi. Araştırmamızda antral foliküllerin granüloza hücrelerinde özellikle antruma yakın çok sayıda hücrede apoptoz olduğu gözlemlendi. VCD uygulanan grupta sekonder ve antral folikül sayılarını da kontrol grubuna göre azalmış olarak bulundu. Korpus luteum ve folikül kisti sayıları ise kontrol grubuyla benzerdi.

15 gün VCD uygulanmasından sonra 55. günde sekonder ve antral folikül sayılarında meydana gelen azalmanın, kaynaklarda gözlenen etki süresinden önce gerçekleştiği belirlendi. Bu etkinin kullanılan doz ve sıçan türü ile ilişkili olduğu düşünüldü. Folikül sayılarında oluşan azalmanın ileriki dönemlerde de devam etmesi ile folikül havuzunu tamamen tüketilmesinin söz konusu olabileceğini ve menopozun gerçekleşebileceği düşünüldü. Eğer menopoz modeli oluşturulmak istenirse VCD'nin 160 mg/kg dozu ve sıçan türünün uygun olabileceği belirlendi.

VCD uyguladığımız grupta, ovaryumlardaki foliküllerin çaplarının kontrol grubuna göre değişmediği gözlemlendi. VCD uygulanan gruplarda primer foliküllerde TUNEL (+) hücre sayısının kontrol grubundan fazla olduğu belirlendi. Bunun yanı sıra primordial ve primer foliküllerin granüloza hücrelerinde kaspaz 3 boyanma yoğunluğu kontrol gruplarıyla benzer bulundu. Kaspaz 3 boyanması foliküllerin granüloza hücrelerinde görüldü. Stromada ise kaspaz 3 boyanma şiddetinin arttığı gözlemlendi.

VCD grubunda, FSH ve östradiol düzeyleri kontrol grubuyla benzer bulundu. Dolayısıyla 55 günlük sürenin folikül sayıları değişiklikleri için yeterli olmasına rağmen kan hormon düzeylerinde değişiklik için yeterli bir süre olmadığı görüldü. Sprague Dawley türü sıçanlarda menopozun hormonal etkilerinin görülmesi için daha uzun zamana ihtiyaç olduğunu düşünüldü.

VCD grubunda serum AMH ve inhibin B düzeyleri kontrol grubundan düşük olmakla birlikte bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü.

DHEA uyguladığımız grupta, DSA kontrol grubuna göre benzer bulundu. VCD uyguladığımız gruba göre ise arttığı gözlemlendi. Uzun dönem DHEA uygulanmasının vücut ağırlıklarında değişiklik yapmadığı belirlendi.

DHEA uyguladığımız grupta, sağ, sol ve toplam ovaryum ağırlıkları kontrol grubu ile benzer bulundu. Uterus ağırlığını ise kontrol grubuna göre artmıştı. Primordiyal, primer, sekonder ve antral folikül çapları kontrol grubuyla benzer olarak bulundu. Tunika albuginea kalınlığı ise kontrol grubuyla benzer olduğunu gözlemlendi.

DHEA uyguladığımız grupta epitel altında tunika albuginea içerisinde ve kortekste folikül kistlerinin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sayısında artış gözlemlendi. Sekonder foliküller ve özellikle antral foliküllerde oositin etrafını saran çok sayıda granüloza hücrelerinde apoptoz gözlemlendi. Ayrıca teka tabakasında kalınlaşmalar gözlemlendi.

DHEA uyguladığımız gruplarda toplam primordiyal folikül sayısı fazla olmakla beraber primer foliküllerde atrezi görüldü. Antral folikül sayılarında da ve korpus luteumlarda azalma belirlendi. DHEA'nın uzun dönemde, primer foliküllerin atreziye gidişini arttırdığını saptandı.

DHEA uyguladığımız grupta normal primordiyal ve primer foliküllerin yüzdesi kontrol grubuna göre artmış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Atretik primordiyal folikül yüzdeleri kontrol grubuyla benzer olarak bulundu. Folikül sayıları değerlendirildiğinde; DHEA uygulanmasının sadece primer foliküllerde atrezi oranlarını arttırdığı tespit edildi.

DHEA uyguladığımız grupta, kortekste özellikle toplam folikül sayısının artmış olduğu belirlendi. Özellikle toplam primordiyal folikül sayısı, atretik primer folikül sayısı ve normal primordiyal folikül sayılarında artmıştı. Sekonder folikül sayıları artmış olmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı değildi. Antral folikül sayıları kontrol grubuna göre azalmıştı.

DHEA uygulanan gruplarda, ovaryumlarda, primordiyal foliküllerin primer foliküllere geçiş aşamasının kolaylaştığı, anovulasyon nedeniyle foliküler gelişim duraksadığı ve sonrasında foliküller uzun süreyle primer ve sekonder evrede kaldığı bilinmektedir. Foliküller bu evrede apoptoza daha yatkındırlar. Sadece uzun dönem folikül sayılarını değerlendirdiğimizde, DHEA uygulanmasının atrezi sürecini harekete geçirmedeği görüldü. Uzun süreli DHEA uygulanmasının primordiyal foliküllerde artışa neden olması, primordiyal germ hücrelerinin, erişkin



ovaryumlarında tekrar aktive olabileceğini düşündürdü. Ancak bu konuda ileri çalışmalar yapılması gereklidir.

DHEA uyguladığımız grupta kontrol grubuyla benzer sayıda TUNEL (+) hücreler görüldü. Kaspaz 3 immünohistokimyasal boyanmasında, DHEA gruplarında sekonder folikül granüloza hücrelerinde ve intertisyel hücrelerde boyanma yoğunluğu kontrol grubuna göre artmıştı. DHEA grubunda foliküler maturasyonunun duraklamış olduğu ve foliküllerin apoptoza en yatkın oldukları sekonder ve antral folikül döneminde kalmış gibi bir görünümü vardı. İntertisyel alanda foliküllerde apoptoz gözlenmesi, androjenlerin stromada yaptıkları etkiyle benzerdi. Bu olayın PCOS'da gözlenen durumun benzeri olduğu düşünüldü.

DHEA uyguladığımız grupta serum FSH ve östradiyol düzeyleri kontrol grubuna göre artmış olmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı değildi. AMH ve inhibin B düzeyleri kontrol grubuna göre azalmış olmakla birlikte bu istatistiksel olarak anlamlı değildi.

VDH grubunda DSA'ları kontrol grubuna göre daha az olarak bulundu. VDH grubunda VCD grubuna göre DSA'larının arttığı gözlemlendi ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi.

VDH grubunda toplam ovaryum ağırlıkları VCD grubundan daha fazla iken sol ovaryum ağırlığı kontrol grubundan daha az , sağ ovaryum ağırlığının VCD grubundan daha fazla iken uterus ağırlığı VCD grubundan daha fazlaydı. Sonuçlarımız göre uzun dönem DHEA uygulanmasının ovaryumlardaki atrofiyi azaltmış olabileceğini düşündürdü.

VDH grubunda toplam primordiyal folikül sayıları kontrol grubundan daha azken VCD grubundan ise daha fazla olduğu belirlendi. Toplam primer folikül sayılarının ise VCD grubundan fazlaydı fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi. Atretik primer folikül sayıları kontrol grubundan fazlayken, VCD grubundan daha azdı. Bu sonuçlar uzun dönem DHEA uygulamasının folikül atrezisini kontrole göre artırdığı ancak VCD ile birlikte kullanıldığında atreziiyi kısmen azaltabileceğini düşündürdü.

VDH grubunda sekonder ve antral folikül sayılarının kontrol grubundan az, VCD grubundan fazla olduğu belirlendi. Korpus luteum sayılarının kontrol ve VCD

grubundan az, folikül kisti sayılarının kontrol grubundan ve VCD'den fazla olduğu saptandı.

VDH grubunda normal primordiyal ve primer folikül yüzdesi kontrol grubundan az VCD grubundan ise fazla olarak gözlemlendi. Atretik primordiyal ve primer folikül yüzdesi kontrol grubundan fazla VCD grubundan ise az olarak belirlendi.

VDH grubuna ait primer foliküllerin granüloza hücrelerinde hafif, sekonder folikül granüloza hücrelerinde kuvvetli AMH boyanması görüldü. Antral foliküllerde ise hafif AMH boyanması gözlemlendi.

VDH grubunda, primordiyal foliküllerde AR ile kuvvetli boyanmalar görülürken primer foliküllerde orta düzeyde sekonder foliküllerde orta ve kuvvetli, antral foliküllerde kuvvetli ve stromalarda kuvvetli boyanmalar belirlendi.

VDH grubunda, serum FSH düzeyleri kontrol grubundan fazla, VCD grubuyla ise benzerdi. Serum E2 düzeyi kontrol ve VCD grubundan daha azdı. Serum AMH ve inhibin B düzeyleri kontrol grubundan az, VCD grubundan ise daha fazlaydı. Uzun dönem DHEA uygulanmasının VCD'nin toksik etkisini azaltarak AMH düzeyini arttırdığını bununda ovaryum rezervinin arttığının bir göstergesi olduğu düşünüldü.

Deneyimizde kullandığımız VCD'nin 160mg/kg dozunun Sprague-Dawley sıçanlarda ovaryum yetmezliği oluşturması nedeniyle ileriki araştırmalarda prematür overyan yetmezliği, perimenopoz, menopoz ve postmenopoz modeli için uygun bir toksik ajan olduğunu belirledik. DHEA'nın uzun süre kullanımı ise primordiyal folikül sayılarının artmasına neden olmuştur. Bu bulgular sonucunda DHEA'nın ovaryum yetmezliğinde folikül havuzunu iyileştirici olarak kullanılabileceğini düşünmemize karşın, daha ileri araştırmalar gereklidir. VCD ile DHEA'un beraber kullanıldığı sıçanlarda VCD'nin ovotoksik etkisi DHEA tarafından kısmen önlenmiştir. Ancak DHEA uygulanmasının folikül kistlerinde artışa neden olması DHEA kullanılacağı zaman doz ve kullanım süresinin dikkatli bir şekilde ayarlanması gerektiğini önermekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Abraham L. Kierszenbaum, Histoloji ve hücre biyolojisi patolojiye giriş. Ankara: Palme yayıncılık; 2006.
2. Adashi EY. The climacteric ovary as a functional gonadotropin driven androgen producing gland. *Fertil Steril* 1994;62:20-27.
3. Anderson E, Lee GY, O'Brien K. Polycystic ovarian condition in the Dehydroepiandrosterone treated Rat model: Hyperandrogenism and resumption of meiosis are major initial events associated with cystogenesis of antral follicles. *The Anatomical Record*. 1997;249: 44-53.
4. Anderson E, Lee GY. The polycystic ovarian (PCO) condition: apoptosis and epithelialization of the ovarian antral follicles are aspects of cystogenesis in the dehydroepiandrosterone (DHEA)-treated rat model. *Tissue & Cell*. 1997;29:(2) 171-189.
5. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi I. Cilt*, Ankara: Güneş Kitapevi; 2001.s.390
6. Arlt W. Biotransformation of oral dehydroepiandrosterone in elderly men: significant increase in circulating estrogens. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 1999; 84: 2170–2176.
7. Arlt W. Oral dehydroepiandrosterone for adrenal androgen replacement: pharmacokinetics and peripheral conversion to androgens and estrogens in young healthy females after dexamethasone suppression. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 1998;83:1928–1934.
8. Arroyo A, Yeh J. Understanding the menopausal transition and managing its clinical challenges. *Sexuality, Reproduction & Menopause*. 2005;3,1:12-17.

9. Axel PN. Themmen Anti-müllerian hormone: Its role in follicular growth initiation and survival and as an ovarian reserve marker. *J Natl Cancer Inst.* 2005;34:18–21.
10. Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P, Hoogerbrugge JW, van Leeuwen EC, Themmen AP, Grootegoed JA. Anti-mullerian hormone and anti-mullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology.* 1995;136:4951-4962.
11. Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellve AR. Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol.* 1996; 10:903–918.
12. Baker TG. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1963; 158:417–433.
13. Barad DH, Gleicher N. Increased oocyte production after treatment with dehydroepiandrosterone. *Fertility and Sterility.* 2005;84-3:756.e1-756.e3
14. Baum JS, St George JP, McCall K. Programmed cell death in the germline. *Semin Cell Dev Biol.* 2005; 16:245–259.
15. Baxter RC. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am J PhysiolEndocrinol Metab.* 2000;278:E967–76.
16. Beg MA, Bergfelt DR, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biol. Reprod.* 2001;64:432–441.
17. Berger L, El-Alfy M, Labrie F. Effects of intravaginal dehydroepiandrosterone on vaginal histomorphology, sex steroid receptor expression and cell proliferation in the rat. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 2008;109:1-2,67-80

18. Berger T, Horner CM. In vivo exposure of female rats to toxicants may affect oocyte quality. *Reproductive Toxicology*. 2003; 17: 273–281
19. Berman I. *Color atlas of basic histology*. Prentice-Hall international. 1998; 356
20. Billig H, Furutas I, Aaron JW. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology*. 1993;133: 2204-2212.
21. Bird CE. Dehydroepiandrosterone sulfate: kinetics of metabolism in normal young men and women. *Clin. Invest. Med*. 1984; 7: 119–122.
22. Block EA. Quantitative morphological investigation of the follicular system in newborn female infants. *Acta Anatomica*. 1953;17: 201–206
23. Bloom W, Fawcett DW. *A text of histology*, Chapman and Hall, London. 1994;964
24. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*. 1996; 85:803–815
25. Bonser J, Walker J, Purohit A, Reed MJ, Potter BVL, Willis DS, Franks S, Mason HD. Human granulosa cells are a site of sulphatase activity and are able to utilize dehydroepiandrosterone sulphate as a precursor for oestradiol production. *Journal of Endocrinology*. 2000; 465–471.
26. Borman SM, VanDePol BJ, Kao S, Thompson KE, Sipes IG, Hoyer PB. A single dose of the ovotoxicant 4-vinylcyclohexene diepoxide is protective in rat primary ovarian follicles. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1999; 158:244–252.
27. Bowles J, Koopman P. Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. *Development*. 2007; 134:3401–3411.

28. Brinkmann AO, Blok LJ, de Ruiter PE, Doesburg P, Steketeer K, Berrevoets CA, Trapman J. Mechanisms of androgen receptor activation and function. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1999; 69: 307-313.
29. Brinkmann AO, Faber PW, van Rooij HC, Kuiper GG, Ris C, Klaassen P, van DER Korput JA, Voorhorst MM, van Laar JH, Mulder E. The human androgen receptor: domain, structure, genomic organization and regulation of expression. *J Steroid Biochem.* 1989;34(1-6):307-10.
30. Brodowska A, Laszczyńska M, Starczewski A. Apoptosis in ovarian cells in postmenopausal women. *Folia Histochemica et Cytobiologica.* 2007;45-2:99-105.
31. Buccione R, Schroeder AC, Eppig JJ. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod.* 1990; 43:543–547.
32. Burger HG, Dudley E, Marnett P, Groome N, Robertson DM. Early follicular phase serum FSH as a function of age: the roles of inhibin B, inhibin A and estradiol. *Climacteric. The journal of the International Menopause Society.* 2000;3(1):17-24.
33. Burger HG, Hale GE, Dennerstein L, Robertson DM. Cycle and hormone changes during perimenopause: the key role of ovarian function, menopause. 2008;15(4 pt 1):603-12.
34. Bursch W, Paffe S, Putz B, Barthel G, Hermann RS. Determination of the length of histological stages of apoptosis in normal liver and in altered foci of rats. *Carcinogenesis.* 1990;11: 847-853.
35. Carlsen SM, Vanky E, Fleming R. Antimüllerian hormone concentrations in androgen suppressed women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction.* 2009;24(7):1732-1738.

36. Carlson BM. Patten's foundations of embryology, McGraw-Hill companies, New York, 1996, 752
37. Casson PR, Santoro N, Elkind-Hirsch K, Carson SA, Hornsby PJ, Abraham G. Postmenopausal dehydroepiandrosterone administration increases free insulin-like growth factor-I and decreases high-density lipoprotein: a six-month trial. *Fertility and Sterility*. 1998;70:107–110. body density and anthropometric measurements.
38. Cheng G, Weihua Z, Makinen S, Makela S, Saji S, Warner M, Gustafsson JA, Hovatta O. A Role For The Androgen Receptor In Follicular Atresia Of Estrogen Receptor Beta Knockout Mouse Ovary *Biology Of Reproduction*. 2002;66:77–84.
39. Chhabra RS, Elwell MR, Peters A. Toxicity of 4 Vinyl1 cyclohexene after 13 weeks of dermal or oral exposure in rats and mice. *Fundam Appl Toxicol*. 1990;14(4):745-51.
40. Chiquoine AD. The identification, origin and migration of primordial germ cells in the mouse embryo, *The Anatomical Record*. 1954;118: 135-146
41. Clemens JW, Kabler HL, Sarap JL, Beyer AR, Li PK, Selcer KW. Steroid sulfatase activity in the rat ovary, cultured granulosa cell and a granulosa cell line. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2000;75: 245–252.
42. Clement PB. Histology of the ovary. *American Journal of Surgical Pathology*. 1987;11:277–303.
43. Colonna R, Cecconi S, Tatone C, Mangia F, Buccione R. Somatic cell-oocyte interactions in Mouse oogenesis: stage-specific regulation of mouse oocyte protein phosphorylation by granulosa cells. *Dev Biol*. 1989; 133: 305-308.

44. Compagnone NA, Mellon SH. Dehydroepiandrosterone: A potential signalling molecule for neocortical organization during development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1998;95:4678–4683.
45. Cooper GS, Hulka BS, Baird DD, Savitz DA, Hughes CL Jr, Weinberg CR. Galactose consumption, metabolism, and follicle stimulating hormone concentrations in women of late reproductive age. *Fertility and Sterility.* 1994;62:1168-1175.
46. Coulombre J, Russel E. Analysis of pleiotropism at the W-locus in the mouse: the effect of W and W<sup>v</sup> substitution upon postnatal development of germ cells. *J Exp Zool.* 1954;126:277– 296.
47. Creus M, Penarrubia J, Fabregues F, Vidal E, Carmona F, Casamitjana R, Vanrell JA, Balasch J. Day 3 serum inhibin B and FSH and age as predictors of assisted reproduction treatment outcome. *Human Reproduction.* 2000; 15 (11): 2341-2346.
48. Danforth DR, Arbogast LK, Mroueh J, Kim MH, Kennard EA, Seifer DB, Friedman CI. Dimeric inhibin: a direct marker of ovarian aging. *Fertil Steril.* 1998; 70: 119–123.
49. Davis SR. Premature ovarian failure. *Maturitas.* 1996; 23:1-8
50. Davoren JB, Hsueh AJW. Vasoactive intestinal peptide: a novel stimulator of steroidogenesis by cultured rat granulosa cells. *Biology Of Reproduction.* 1985;33:37-52.
51. De Felici M, Klinger FG, Farini D, Scaldaferrri ML, Iona S, Lobascio M. Establishment of oocyte population in the fetal ovary: primordial germ cell proliferation and oocyte programmed cell death. *Reprod Biomed Online.* 2005; 10:182–191.



52. De La Fuente R, Eppig JJ. Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. *Dev Biol* 2001; 229: 224-236.
53. De Pol A, Marzona L, Vaccina F, Negro R, Sena P, Forabosco A. Apoptosis in different stages of human oogenesis. *Anticancer Res.* 1998; 18: 3457–3461.
54. De Vet A, Laven JS, De Jong FH, Themmen AP, Fauser BC. Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril.* 2002; 77:357–62
55. Demeestere I, Centner J, Gervy C, Englert Y, Delbaere A. Impact Of Various Endocrine And Paracrine Factors On In Vitro Culture Of Preantral Follicles In Rodents. *Reproduction.* 2005; 130: 147–156.
56. Demir R. İnsanın gelişimi ve implantasyon biyolojisi, Ankara:Palme yayıncılık, 1995.
57. Demirgoren S, Majewska MD, Spivak CE, London ED. Receptor binding and electrophysiological effects of dehydroepiandrosterone sulfate, an antagonist of the GABAA receptor. *Neuroscience.* 1991; 45: 127–135.
58. Depalo R, Nappi L, Loverro G, Bettocchi S, Caruso ML, Valentini AM. Evidence of apoptosis in human primordial and primary follicles. *Hum Reprod.* 2003;18:2678–2682.
59. Dere F. Anatomi atlası ve ders kitabı. Adana:Nobel Tıp Kitapevleri. 1999.
60. Deslperre JP, Young M, Wilson JD, McPhaul MJ. Testosterone and 5 alpha dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene. *Mol Cell Endocrinol.* 1992;88:15-22.

61. Devine PJ, Payne CM, McCuskey MK, Hoyer PB. Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. *Biol Reprod.* 2000;63:1245–1252.
62. Devine PJ, Sipes IG, Skinner MK, Hoyer PB. Characterization of a rat in vitro ovarian culture system to study the ovarian toxicant 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002; 184:107–115.
63. Dharmarajan AM, Goodman SB, Atiya N, Parkinson SP, Lareu RR, Tilly KI. Role of apoptosis in functional luteolysis in the pregnant rabbit corpus luteum: evidence of a role for placental- derived factors in promoting luteal cell survival. *Apoptosis.* 2004; 9:807–814.
64. Di Clemente N, Goxe B, Remy JJ, Cate R, Josso N, Vigier B, Salesse R. Effect of AMH upon aromatase activity and LH receptors of granulosa cells of rat and porcine immature ovaries. *Endocrine.* 1994; 2: 553–558.
65. Di Clemente N, Goxe B, Remy JJ, Cate RL, Josso N, Vigier B, Salesse R. Inhibitory effect of AMH upon the expression of aromatase activity and LH receptors by cultured granulosa cells of rat and porcine immature ovaries. *Endocrine.* 1994;2:553–558.
66. Dissen GA, Romero C, Hirshfield AN, Ojeda SR. Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. *Endocrinology.* 2001;(142):2078-2086
67. Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature.* 1996; 383 : 531 – 5.
68. Drews U, (Çev.:Solakoğlu, S.), *Renkli embriyoloji atlası.* Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri. 2000, 384

69. Driancourt MA, Fair T and Reynaud K. Oocyte apoptosis: when, how, why?. *Contracept Fertil Sex.* 1998; 26:522–527.
70. Driancourt MA, Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz J. Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. *Rev Reprod.* 2000;5:143–152.
71. Drummond AE. The role of steroids in follicular growth. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2006;4, 16.
72. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Anti- Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology.* 2002;143: 1076-1084.
73. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM. Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology.* 2001;142 : 4891 – 9.
74. Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology.* 1999;140: 5789 – 96.
75. Elia E, Sander V, Luchetti CG, Solano ME, Di Girolamo G, Gonzalez C, Motta AB. The mechanisms involved in the action of metformin in regulating ovarian function in hyperandrogenized mice. *Molecular Human Reproduction.* 2006;12(8):475–481.
76. Elia E, Vighi S, Lombardi E, BeatrizMotta A. Detrimental effects of hyperandrogenism on uterine functions. *Internal Immunopharmacology.* 2008;8:1827-1834.
77. Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *PNAS.* 2002; 5: 99, 2890–2894.

78. Erbenđi T. Temel histoloji, Ankara: Güneş Kitabevi. 1990
79. Erkoçak A. Özel histoloji, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, Ankara.1982.
80. Eroschenko VP, Abuel-Atta AA, Grober MS. Neonatal exposures to technical methoxychlor alters ovaries in adult mice. *Reproductive Toxicology*. 1995; 9: 379–387.
81. Eroschenko VP. Di fiore histoloji atlası. (Çev.: Demir, R.), Ankara: Palme Yayıncılık, 2001. 366
82. Eşrefoğlu M. Genel ve özel histoloji, Ankara: Pelikan Tıp ve Teknik Kitapçılık. 2004. 356
83. Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF., Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod*. 1992;7(10):1342-6.
84. Fawcett DW. Bloom and Fawcett: concise histology, Chapman And Hall, U.S.A. 1997; 964
85. Felici MD, Carlo AD, Pesce M, Iona S, Farrace MG, Piacentini M. Bcl-2 and Bax regulation of apoptosis in germ cells during prenatal oogenesis in the mouse embryo. *Cell Death Differ* 1999;6:908–915.
86. Fenwick MA, Hurst PR. Immunohistochemical localization of active caspase-3 in the mouse ovary: growth and atresia of small follicles. *Reproduction*. 2002; 124:659–665.
87. Fernandez SM, Brooks HL, Hoyer PB. The involvement of c-Kit receptor in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovarian follicle loss using whole ovary cultures. *Biol Reprod*. 2006;300.

88. Fernandez SM, Keating AF, Christian PJ, Sen N, Hoying JB, Brooks HL, Hoyer PB. Involvement of the KIT/KITL signaling pathway in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovarian follicle loss in rats. *Biol Reprod.* 2008;79(2):318-27.
89. Flaws JA, Doerr JK, Sipes IG, Hoyer PB. Destruction of preantral follicles in adult rats by 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide. *Reproductive Toxicology.* 1994;8(6):509–514
90. Flaws JA, Salyers KL, Sipes IG, Hoyer PB. Reduced ability of rat pre-antral follicles to metabolize 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1994;126:286–294.
91. Fraschini F, Demartini G, Esposti D. Pharmacology of Silymarin. *Clin Drug Invest.* 2002;22(1):51-65
92. Fraser HM, Smith KB, Lunn SF, Cowen GM, Morris K, McNeilly AS. Immunoneutralization and immunocytochemical localization of inhibin alpha subunit during the mid-luteal phase in the stump-tailed macaque. *J Endocrinol.* 1992 ;133(3):341-7
93. Freeman EW, Gracia CR, Samuel MD, Sammel Sc.D , Lin H, Lim LCL, Strauss JF. Association of anti müllerian hormone levels with obesity in late reproductive age women. *Fertility and Sterility.* 2007;87:no:1.
94. Gandolfi F, Brevini TAL, Cillo F, Antonini S. Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 2005; 24 (1): 413-423
95. Gartner LP, Hiatt J. *Colour text book of histology.* Philadelphia:W.B. Saunders Company. 1997:458

96. Giacomo MD, Barchi M, Baudat F, Edelmann W, Keeney S, Jasin M, Distinct DNA damage dependent and independent responses drive the loss of oocytes in recombination defectice Mouse mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005;102: 737-742
97. Giagulli VA. Precursors of plasma androstenediol- and androgen-glucuronides in women. *J. Steroid Biochem.* 1989;33, 935–940.
98. Gondos B, Zamboni L. Ovarian development: the functional importance of germ cell interconnections. *Fertil Steril.* 1969;20:176–189.
99. Gondos B. Oogonia and oocytes in mammals. In: Jones RE (ed) *The vertebrate ovary.* Plenum Press, New York. 1978;83–120.
100. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev.* 1996;17:121–155
101. Gougeon A., Nilsson EE, Skinner MK Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biol Reprod.* 2003; 69:1265–1272.
102. Griffin JE. Androgen resistance—the clinical and molecular spectrum. *N. Engl. J. Med.* 1992;326: 611–618
103. Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Pai R, Rodger FE, Mather JP, McNeilly AS. Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(4):1401-5
104. Gürsoy E, Koptagel E. *Embriyoloji atlası.* 1997; 222
105. Haguenaer CO, Peard JY, Mattei MG, Serero S, Nguyen VC, de Tand MF. Mapping of the gene for Antimullerian Hormone to short arm of human chromosome 19. *Cytogenet Cell Genet.* 1987; 44: 2-6.

106. Hall JE, Welt CK, Cramer DW. Inhibin A and inhibin B reflect ovarian function in assisted reproduction but are less useful at predicting outcome. *Human Reproduction* 1999;14 (2):409–415.
107. Hansen KR, Thyer AC, Sluss PM, Bremner WJ, Soules MR, Klein NA. Reproductive ageing and ovarian function: is the early follicular phase FSH rise necessary to maintain adequate secretory function in older ovulatory women? *Human Reproduction*. 2005;20(1) 89–95
108. Hayashi M, McGee EA, Min G. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology*. 1999;140:1236–1244
109. Hayes FJ, Hall JE, Boepple PA, Crowley WF Jr. Differential control of gonadotropin secretion in the human: endocrine role of inhibin. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83:1835–1841.
110. Hipkin LJ. The effect of corticotrophin on the rat uterin weight response to human chorionic gonadotropin by various steroids. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1974; 75:141-147.
111. Hirobe S, He WW, Lee MM, Donahoe PK. Müllerian inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in granulosa and Sertoli cells coincides with their mitotic activity. *Endocrinology*. 1992; 13: 1854–1862.
112. Honnma H, Endo T, Henmi H, Nagasawa K, Baba T, Yamazaki K, Kitajima Y, Hayashi T, Manase K, Saito T. Altered expression of Fas/Fas ligand/caspase 8 and membrane type 1-matrix metalloproteinase in atretic follicles within dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovaries in rats. *Apoptosis*. 2006; 11:1525–1533.

113. Hooser SB, Douds DA, Hoyer PB, Sipes IG. Long-term ovarian and hormonal alterations due to the ovotoxin 4-vinylcyclohexene. *Reprod Toxicol.* 1994; 8:315–323.
114. Hoyer PB, Glenn IS. Development of an animal model for ovotoxicity using 4-vinylcyclohexene: a case study. *Birth Defects Research (Part B), Developmental and reproductive toxicology.* 2007;80(2):113–125
115. Hsueh AJ, Billig H, Tsafiriri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev.* 1994 ;15:707– 724.
116. <http://www.osha.gov/SLTC/healthyguidelines/vinylcyclohexenedioxiderecognition.html>.
117. Hu X, Christian P, Sipes IG, Hoyer PB. Expression and Redistribution of Cellular Bad, Bax, and Bcl-xL Protein Is Associated with VCD-Induced Ovotoxicity in Rats. *Biology of reproduction.* 2001;65: 1489–1495
118. Hu X, Christian PJ, Thompson KE, Sipes IG, Hoyer PB. Apoptosis induced in Rats by 4-Vinylcyclohexene diepoxide is associated with activation of the caspase cascades. *Biology of reproduction.* 2001;65(4): 87-93.
119. Hu X, Flaws JA, Sipes IG, Hoyer PB. Activation of mitogenactivated protein kinases and AP-1 transcription factor in ovotoxicity induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide in rats. *Biol Reprod.* 2002; 67: 718–724.
120. Huff J. Carcinogenicity bioassays of bisphenol A, 4-vinylcyclohexenediepoxide, and 4-vinylcyclohexene. *Toxicol Sci.*2001;64:282–283.
121. Hughes FM Jr, Gorospe WC. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology.* 1991;129, 2415–2422



122. Hunt PA, Hassold TJ. Human female meiosis: what makes a good egg go bad? *Trends Genet.* 2008;24:86–93
123. Hurk R, Bevers MM, Beckers JF. In vivo and in vitro development of preantral follicles, *Theriogenology.* 1997; 47: 73-82
124. Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms, *Human Reproduction Update,* 2005;11;2, 162–178.
125. Ikeda Y, Nagai A, Ikeda MA, Hayashi S. Increased expression of Mullerian-inhibiting substance correlates with inhibition of follicular growth in the developing ovary of rats treated with E2 benzoate. *Endocrinology.* 2002 ;143 :304–312.
126. Ikeda Y, Nagai A, Ikeda MA, Hayashi S. Neonatal estrogen exposure inhibits steroidogenesis in the developing rat ovary. *Developmental Dynamics.* 2001 ;221: 443–453.
127. Ingraham HA, Hirokawa Y, Roberts LM, Mellon SH, McGee E, NachtigalMW, Visser JA. Autocrine and paracrine hormone signaling in reproduction. *Recent Prog Horm Res.* 2000; 55:30–38
128. Ito A, Mafune N, Kimura T. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity two or four week repeated dose study of 4-vinylcyclohexene diepoxide in female rats. *The Journal of Toxicological Sciences.* 2009; 34(1):53-58.
129. Jamnongjit M, Hammes SR. Oocyte maturation: the coming of age of a germ cell. *Semin Reprod Med.* 2005;23: 234-41.
130. Jenster G, van der Korput HA, van Vroonhoven C, van der Kwast TH, Trapman J, Brinkmann AO, Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding transcriptional activation and subcellular localization. *Mol Endocrinol.* 1991;5: 1396-1404.

131. Jiang MR, Li YC, Yang Y, Wu JR. c-Myc degradation induced by DNA damage results in apoptosis of CHO cells. *Oncogene*. 2003; 22:3252–3259.
132. Jick H, Porter J, Morrison AS. Relation between smoking and the age of natural menopause. *Lancet*. 1977;1:1354-1355.
133. Jih MH, Lu JKH, Wan YJY, Wu TCJ. Inhibin Subunit Gene Expression and Distribution in the Ovaries of Immature, Young Adult, Middle-Aged, and Old Female Rats. 1993;132, No.1.
134. Junqueira LC, Carneiro J. *Temel histoloji*, (Çev.: Aytakin, A. ve Solakoğlu, S.), Ankara:Nobel Tıp Kitapevleri. 2003: 512
135. Kalaycı Ş. *Histoloji*, Bursa:Uludağ Üniversitesi Yayıncılık. 1986: 565
136. Kao SW, Sipes IG, Hoyer PB. Early effects of ovotoxicity induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide in rats and mice. *Reprod Toxicol*. 1999;13(1):67–75
137. Keck M, Romero-Aleshire MJ, Cai Q, Hoyer PB, Brooks HL. Hormonal status affects the progression of STZ-induced diabetes and diabetic renal damage in the VCD mouse model of menopause. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 293:193-199.
138. Kemppainen JA, Lane MV, Sar M, Wilson EM. Androgen receptor phosphorylation, turnover, nuclear transport and transcriptional activation, Specificity for steroids and antihormones. *J Biol Chem*. 1992; 267: 968-974.
139. Kevenaar ME, Meerasahib MF, Kramer P, van de Lang –Born BMN, de Jon FH, Groome NP, Themmen APN, Visser JA. Serum anti-müllerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. *Endocrinology*. 2006; 147 (7):3228-3234.

140. Kezele P, Skinner MK. Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. *Endocrinology*. 2003; 144: 3329–3337
141. Kim HH, Shaipanich M, Hasselblatt K, Yeh J. Induction of apoptosis and ovarian cyst formation in the mouse ovary by dehydroepiandrosterone. *J Med*. 2003;34(1-6):101-12
142. Kim JH, Seibel MM, MacLaughlin DT, Donahue PK, Ransil BJ, Hamwitz PA, Richards CJ. The inhibitory effects of müllerian-inhibiting substance on epidermal growth factor induced proliferation and progesterone production of human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992; 75:911–917.
143. Kızıltepe S. Uzmanlık Tezi. Hormon tedavisi alan premenapozal ve postmenapozal kadınların mammografi bulgularındaki değişiklikler. Adana. 2006: 3-19
144. Klein NA, Battaglia DE, Fujimoto VY, Davis GS, Bremner WJ, Soules MR. Reproductive aging: accelerated ovarian follicular development associated with a monotropic follicle-stimulating hormone rise in normal older women. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1996; 81:1038-1045.
145. Klein NA, Battaglia DE, Miller PB. Ovarian follicular development and the follicular fluid hormones and growth factors in normal women of advanced reproductive age. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1996;81:1946–1951
146. Klein NA, Harper AJ, Houmard BS, Sluss PM, Soules MR. Is the short follicular phase in older women secondary to advanced or accelerated dominant follicle development? *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(12):5746-50.

147. Klein NA, Illingworth PJ, Groome NP. Decreased inhibin B secretion is associated with the monotropic FSH rise in older, ovulatory women: a study of serum and follicular fluid levels of dimeric inhibin A and B in spontaneous menstrual cycles. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81:2742-5.
148. Knudsen JF, Costoff A, Mahesh VB. Dehydroepiandrosterone induced polycystic ovaries and acyclicity in the rat. *Fertil Steril.* 1975; 26:807- 817.
149. Knudsen JF, Mahesh VB. Initiation of precocious sexual maturation in the immature rat treated with dehydroepiandrosterone. *Endocrinology.* 1975; 97:458-468.
150. Kobayashi M, Yamoto M, Minami S, Imai M, Nakano R. Immunohistochemical localization of inhibin alpha- and beta A-subunits in the ovary of immature female rat. *Eur J Endocrinol.* 1995;132(1):97-102.
151. Kongtip P, Tangprakorn B, Yoosook W, Chantanakul S. Development of a sampling and analysis method for 4-Vinyl-1-cyclohexene in air. *J Occup Health.* 2008;50:122-129.
152. Krakauer DC, Mira A. Mitochondria and germ-cell death. *Nature.* 1999; 400:125–126.
153. Krysko DV, Diez-Fraile A, Criel G, Svistunov AA, D’Herde PVD, Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. *Apoptosis.* 2008;13:1065–1087.
154. La Marca A, De Leo V, Giulini S, Orvieto R, Malmusi S, Giannella L, Volpe A. Anti-Mullerian hormone in premenopausal women and after spontaneous or surgically induced menopause. *J Soc Gynecol Investig.* 2005; 12:245–248.

155. Labrie F, Bélanger A, Cusan L, Gomez JL, Candas B. Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1997;82: 2396–2402.
156. Labrie F, Cusan L, Gomez JL, Martel C, Berube R, Belanger P, Chaussade V, Deloche C, Leclaire J. Changes in serum DHEA and eleven of its metabolites during 12 month percutaneous administration of DHEA. *The journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2008;110:1-2, 1-9
157. Labrie F. *Intracrinology*. *Mol. Cell. Endocrinol*. 1991;78, C113–118.
158. Landgren BM, Collins A, Csemiczky G, Burger HG, Baksheev L, David M, Robertson DM. Menopause transition: annual changes in serum hormonal patterns over the menstrual cycle in women during a nine-year period prior to menopause. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004; 89(6):2763–2769.
159. Lasley BL, Santoro N, Randolph JF, Gold EB, Crawford S, Weiss G, McConnell DS, Sowers MF. The Relationship of Circulating Dehydroepiandrosterone, Testosterone, and Estradiol to Stages of the Menopausal Transition and Ethnicity, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002;87: 8.
160. Laven JSE, Mulders AGMGJ, Visser JA, Themmen AP, De Jong FH, Fauser BCJM. Anti-Müllerian Hormone Serum Concentrations in Normoovulatory and Anovulatory Women of Reproductive Age. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004; 89(1):318–323.
161. Lee MT, Anderson EA, Lee GY. Changes in ovarian morphology and serum hormones in the rat after treatment with dehydroepiandrosterone. *Anatomical Record*. 1991;231:185-192.

162. Lee WS, Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S. Effect of bone morphogenetic protein 7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biology of Reproduction*. 2001;65, 994-999
163. Liang L, Soyal SM, Dean J. FIG alpha a germ cell specific transcription factor involved in the coordinate expression of the zona pellucida genes. *Development*. 1997;124:4939-4947.
164. Liu D, Si H, Reynolds KA, Zhen W, Jia Z, Joseph S. Dehydroepiandrosterone protects vascular endothelial cells against apoptosis through a g alpha i protein-dependent activation of phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and regulation of antiapoptotic Bcl-2 expression. *Endocrinology*. 2007;148(7):3068–3076.
165. Lohff JC, Christian PJ, Marion SL, Arrandale A, Hoyer PB. Characterization of Cyclicity and Hormonal Profile with Impending Ovarian Failure in a Novel Chemical-Induced Mouse Model of Perimenopause. *Comparative Medicine*. 2005; 55-6:523-527
166. Luchetti CG, Solano ME, Sander V, Arcos MLB, Gonzalez C, Di Girolamo G, Chiochio S, Cremaschi G, Motta AB. Effects of dehydroepiandrosterone on ovarian cystogenesis and immune function. *Journal of Reproductive Immunology*. 2004;64:59-74
167. MacLaughlin DT, Donahoe PK. Sex determination and differentiation. *N Engl J Med*. 2004;350:367–378.
168. Majewska MD, Demirgoren S, Spivak CE, London ED. The neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate is an allosteric antagonist of the GABAA receptor. *Brain Research*. 1990; 526: 143–146
169. Makabe S, Naguro T, Motta PM. A new approach to the study of ovarian follicles by scanning electron microscopy and ODO maceration. *Arch. Histo. Cytol*. 1992;55:183-190

170. Marcinkiewicz JL, Krishna A, Cheung CM, Terranova PF. Oocytic tumor necrosis factor alpha: localization in the neonatal ovary and throughout follicular development in the adult rat. *Biol Reprod.* 1994;50:1251–1260.
171. Markstrom E, Svensson E, Shao R, Svanberg B, Billig H. Survival factors regulating ovarian apoptosis dependence on follicle differentiation. *Reproduction.* 2002; 123:23–30.
172. Matova N, Cooley L. Comparative aspects of animal oogenesis. *Dev Biol.* 2001;231:291–320.
173. Mayer LP, Devine PJ, Dyer CA, Hoyer PB. The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. *Biology of Reproduction.* 2004;71:130-138.
174. Mayer LP, Dyer CA, Eastgard RL, Hoyer PB, Banka CL. Atherosclerotic Lesion Development in a Novel Ovary-Intact Mouse Model of Perimenopause. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1910-1916.
175. Mayer LP, Pearsall NA, Christian PJ, Devine PJ, Payne CM, McCuskey MK, Marion SL, Sipes IG, Hoyer PB. Long-term effects of ovarian follicular depletion in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Reproductive Toxicology.* 2002; 16:775–781
176. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev.* 2000; 21,200–214. 151
177. McKay DG, Hertig AT, Adams EC, Danziger S. Histochemical observation on the germ cells of human embryos. *The Anatomical Record.* 1967; 117: 201-219
178. McKinlay SM, Bifano NL, McKinlay JB. Smoking and age at menopause in women. *Annals of Internal Medicine.* 1985;103: 350–356.

179. McLachlan, RI, Cohen NL, Vale WW, Rivier JE, Burger HG, Bremner WJ, Soules, MR. The importance of luteinizing hormone in the control of inhibin and progesterone secretion by the human corpus luteum. *J. Clin. Endocrinol Metab*;1989; 68, 1078–1085
180. McLaren A. Sex determination in mammals. *Oxf Rev Reprod Biol.* 1991;13:1–33
181. McNatty KP, Fidler AE, Juengel JL, Quirke LD, Smith PR, Heath DA, Lundy T, O'Connell A, Tisdall DJ. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. *Mol Cell Endocrinol.* 2000; 163:11–20.
182. Medina MC, Souza LC, Caperuto LC, Fanhe G, Amanso AM, Vicente PA, Teixeira, Bordin S, Carpinelli AR, Britto LRG, Barbieri RI, Borella MI, Carvalho CRO. Dehydroepiandrosterone increases  $\beta$ -cell mass and improves the glucose induced insulin secretion by pancreatic islets from aged rats. *FEBS Letters* 2006; 580: 285-290.
183. Meunier H, Cajander SB, Roberts VJ, Rivier C, Sawchenko PE, Hsueh AJ, Vale W. Rapid changes in the expression of inhibin alpha-, beta A-, and beta B-subunits in ovarian cell types during the rat estrous cycle. *Mol. Endocrinol.* 1988; 2: 1352–1363.
184. Miyano T. In Vitro Growth Of Mammalian Oocytes. *J Reprod Dev.* 2005;51(2):169-76.
185. Modi D, Bhartiya D, Puri C. Developmental expression and cellular distribution of Mullerian inhibiting substance in the primate ovary. *Reproduction.* 2006; 132: 443–453.
186. Modi DN, Sane S, Bhartiya D. Accelerated germ cell apoptosis in sex chromosome aneuploid fetal human gonads. *Mol Hum Reprod.* 2003; 9:219–225.



187. Moniruzzaman M, Sakamaki K, Akazawa Y, Miyano T. Oocyte growth and follicular development in KIT-deficient Fasknockout mice. *Reproduction*. 2007;133:117–125.
188. Monniaux D. Oocyte apoptosis and evolution of ovarian reserve. *Gynecol Obstet Fertil*. 2002;30:822–826.
189. Moore KL. Klinik yönleri ile insan embriyolojisi. (Çev.: Yıldırım, V., Okar, İ. ve Dalçık, H.), İstanbul: Nobel matbaacılık, 2002:560
190. Morita Y, Perez GI, Maravei DV, Tilly KI, Tilly JL. Targeted expression of Bcl-2 in mouse oocytes inhibits ovarian follicle atresia and prevents spontaneous and chemotherapyinduced oocyte apoptosis in vitro. *Mol Endocrinol*. 1999; 13:841–850.
191. Morita Y, Tilly JL. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Dev Biol*. 1999;213,1–17.
192. Motta PM, Makabe S, Nottola SA. The ultrastructure of human and mouse reproduction. 1. The natural history of the female germ cell: origin, migration, and differentiation inside the developing ovary. *Human Reproduction Update*. 1997; 3: 281-297
193. Murray AA. Effect of androgens on the development of mouse follicles growing in vitro. *J. Reprod. Fertil*. 1998;113, 27–33
194. Nakahara K, Saito H, Saito T, Ito M, Ohta N, Takahashi T. The incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa can predict prognosis of ova from patients participating in in vitro fertilization programs. *Fertil Steril*. 1997; 68:312–317.

195. Natl Toxicol Program, NTP Toxicology and carcinogenesis studies of 4-vinylcyclohexene diepoxide (CAS No. 106-87-6) in F344/N rats and B6C3F1 mice (dermal studies). Tech. Report No. TR-362. Research Triangle Park, NC: National Toxicology Program. 1989.
196. Natl Toxicol Program, NTP Toxicology and carcinogenesis studies of 4-vinylcyclohexene (CAS No. 100-40-3) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). Tech. Report No. TR-303. Research Triangle Park, NC: National Toxicology Program, 1986. 303:1-190
197. Newmeyer DD, Bossy-Wetzel E, Kluck RM, Wolf BB, Beere HM, Green DR. Bcl-xL blocks cytochrome c release from mitochondria but does not inhibit the function of Apaf-1. *Cell Death and Differentiation*. 2000;7: 402-407.
198. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*. 1999; 6:1028–1042
199. Nilsson EE, Skinner MK. Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biol Reprod*. 2003;69:1265 – 72.
200. Ocal P, Aydin S, Cepni I, Idil S, Idil M, Uzun H, Benian A. Follicular fluid concentrations of vascular endothelial growth factor, inhibin A and inhibin B in IVF cycles: are they markers for ovarian response and pregnancy outcome? *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2004;115-2:194-199.
201. Okabe, T. Up-regulation of highaffinity dehydroepiandrosterone binding activity by dehydroepiandrosterone in activated human T lymphocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 1995;80: 2993–2996.

202. Öktem Ö, Oktay K. Stem cells: a perspective on oocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008;1127: 20-26
203. Öktem Ö, Oktay K. The ovary anatomy and function throughout human life. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008;1127: 1-9
204. Oltvai AN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homologue Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993;74, 597-608
205. Orentreich N. Age and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *J. Clin. Endocrinol Metab*. 1984;59:551-555.
206. Ovalle WK, Nahirney PC. *Netter's Essential Histology*, Güneş Tıp kitabevi. 2009
207. Pavlik EJ, DePriest PD, Gallion HH, Ueland FR, Reedy MB, Kryscio RJ, Van Nagel JR. Ovarian volume related to age. *Gynecol. Oncol*. 2000; 77: 410-412.
208. Pavlik EJ, DePriest PD, Gallion HH. Ovarian volume related to age. *Gynecologic Oncology*. 2000;77: 410–412.
209. Pelletier G, Labrie C, Labrie F. Localization of oestrogen receptor alpha , oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. *Journal of Endocrinology*. 2000; 165:359–370.
210. Pelletier G, Li S, Luu-The V, Tremblay Y, Bélanger A, Labrie F. Immunoelectron microscopic localization of three key steroidogenic enzymes (cytochrome P450<sub>scc</sub>, 3-hydroxysteroid dehydrogenase and cytochrome P450<sub>c17</sub>) in rat adrenal cortex and gonads. *Journal of Endocrinology*. 2001; 171: 373–383

211. Pereda J, Zorn T, Soto-Suazo M. Migration of human and mouse primordial germ cells and colonization of the developing ovary: an ultrastructural and cytochemical study. *Microsc. Res. Tech.* 2006; 69: 386-395
212. Perez GI, Maravei DV, Trbovich AM, Cidlowski JA, Tilly JL, Hughes FM Jr. Identification of potassium-dependent and -independent components of the apoptotic machinery in mouse ovarian germ cells and granulosa cells. *Biol Reprod.* 2000;63:1358–1369.
213. Petraglia F, Hartmann B, Luisi S. Low levels of serum inhibin A and inhibin - B in women with hypergonadotrophic amenorrhea and evidence of high levels of activin A in women with hypothalamic amenorrhea. *Fertil Steril.* 1998 ; 70: 907-912
214. Pezzani I, Reis FM, Di Leonardo C. Influence of nongonadotrophic hormones on gonadal function. *Mol and CelEndocrinol.* 2000; 161: 34-42.
215. Piltonen T, Papunen LM, Koivunen R, Perheentupa A, Roukonen A, Tapanainen JS. Serum anti-müllerian hormone levels remain high until late reproductive age and decrease during metformin therapy in women with Polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction.* 2005;20:1820-1826.
216. Pinkerton JHM, McKay DG, Adams EC, Hertig AT. Development of the human ovary a study using histochemical technics. *Obstet. Gynecol.* 1961; 18: 152-181
217. Rannevik G, Jeppsson S, Johnell O, Bjerre B, Laurell-Borulf Y, Svanberg L. A longitudinal study of the perimenopausal transition: altered profiles of steroid and pituitary hormones, SHBG and bone mineral density. *Maturitas.* 1995 Feb;21(2):103-13
218. Reiter EO. Secretion of the adrenal androgen, dehydroepiandrosterone sulfate, during normal infancy, childhood, and adolescence, in sick infants, and in children with endocrinologic abnormalities. *J. Pediatr.* 1977; 90:766–770.

219. Reynaud K, Driancourt MA. Oocyte attrition. *Mol Cell Endocrinol*. 2000;163:101–108.
220. Rice S, Ojha K, Whitehead S, Mason H. Stage specific expression of androgen receptor, follicle stimulating hormone receptor and antimüllerian hormone type 2 receptor in single isolated human preantral follicle:relevance to polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:1034-1040.
221. Richardson SJ, Senikas V, Nelson JF. Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987; 65:1231–1237.
222. Roberts VJ, Barth S, El-Roeiy A, Yen SSC. Expression of inhibin/activin subunits and follistatin messenger ribonucleic acids and proteins in ovarian follicles and the corpus luteum during the human menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol Metab*. 1993; 77: 1402-1410.
223. Robertson DM, Hayward S, Irby DC, Jacobsen JV, Clarke LJ, McLachlan RI, de Kretser DM. Radioimmunoassay of rat serum inhibin: changes after PMSG-stimulation and gonadectomy. *Mol. Cell. Endocrinol*. 1998; 58: 1-8.
224. Ross HM, Kaye GI, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas*. 4. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2003; 726-757.
225. SA, Hardy K, Da Silva-Buttkus P, Stark J, Webber LJ, Flanagan AM, Themmen APN, Visser JA, Groome NP, Franks S. Anti-Müllerian hormone protein expression is reduced during the initial stages of follicle development in human polycystic ovaries. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2005;90: 5536–5543.

226. Sadler TW. Langman medikal embriyoloji. (Çev.:Başaklar AC). Ankara:Palme Yayıncılık, 2005:507
227. Sahambi SK, Visser JA, Themmen APN, Mayer LP, Devine PJ. Correlation of serum anti-müllerian hormone with accelerated follicle loss following 4-Vinylcyclohexene diepoxide-induced follicle loss in mice. *Reproductive toxicology*. 2008; 26: 116-122.
228. Salmon NA, Handyside AH, Joyce Leuan M. Oocyte regulation of antimüllerian hormone expression in granulosa cells during ovarian follicle development in mice. *Developmental Biology*. 2004;266: 201-208.
229. Sander V, Luchetti CG, Solano ME, Elia E, Girolam GD, Gonzalez C, Motta AB. Role of the N, N0-dimethylbiguanide metformin in the treatment of female prepuberal BALB/c mice hyperandrogenized with dehydroepiandrosterone. *Reproduction*. 2006;131(3):591-602.
230. Santoro N, Brown JR, Adel T, Skurnick JH, Characterization of reproductive hormonal dynamics in the perimenopause. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1996;81(4):1495-1501.
231. Şeftalioğlu A. Genel ve özel insan embriyolojisi. Ankara:Tıp&Teknik yayıncılık, 1998:650
232. Shirwalkar H, Modi DN, Maitra A. Exposure of adult rats to estradiolvalerat induces ovarian cyst with early senescence of follicles. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2007;272:22-37.
233. Sipes IG, Hoyer PB, Hu X, Christian P. Expression and redistribution of cellular Bad, Bax, and Bcl-xL protein is associated with VCD-induced ovotoxicity in rats. *Biology Of Reproduction*. 2001;65: 1489–1495.

234. Smith BJ, Mattison DR, Sipes IG. The role of epoxidation in 4-vinylcyclohexene-induced ovarian toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1990;105:372–831
235. Solomon EP. İnsan anatomisi ve fizyolojisine giriş. (Çev.: Süzen LB). İstanbul:Birol Basın Yayın Dağıtım. 2000
236. Soules MR, Sherman S, Parrott E. Executive summary: Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW). *Fertil Steril.* 2001;76: 874-8.
237. Speroff L, Glass RH, Kase N. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999: 201–246.
238. Springer LN, Flaws JA, Sipes IG, Hoyer PB. Follicular mechanisms associated with 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovotoxicity in rats. *Reprod Toxicol.* 1996;10(2):137-43.
239. Springer LN, McAsey ME, Flaws JA, Tilly JL, Sipes IG, Hoyer PB. Involvement of apoptosis in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovotoxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996; 139:394–401
240. Springer LN, Tilly JL, Sipes I, Hoyer PB. Enhanced expression of bax in small preantral follicles during 4 vinylcyclohexene diepoxide induced ovotoxicity in the rat. *Toxicology applied pharmacology.* 1996 ;139:402-410.
241. Sternberg SS. *Histology for pathologist.* Lippincott-Raven. NewYork. 1997
242. Stevens JKD, Stevens GJ, Kraner JC, Fontaine SM, Halpert JR, Sipes IG. Induction of cytochrome P-450 enzymes after repeated exposure to 4-vinylcyclohexene in B6C3F1 mice, *Drug Metab Dispos.* 1999;27:281–287

243. Suh CS, Jee BC, Choi YM, Kim JG, Lee JY, Moon SY. Prognostic implication of apoptosis in human luteinized granulosa cells during IVF-ET. *J Assist Reprod Genet.* 2002; 19:209–214.
244. SW Kao, IG Sipes, PB Hoyer - *Reproductive Toxicology*, Early effects of ovotoxicity induced by 4-Vinylcyclohexene diepoxide in rats and mice. *Reproductive Toxicology.* 1999;13(1):67-75.
245. Szoltys M, Słomczyńska M. Changes in distribution of androgen receptor during maturation of rat ovarian follicles. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2000;108(3):228-34.
246. Takagi K, Yamada T, Miki M, Umegaki T, Nishimura M, Sasaki J. Histological Observations of the development of follicles and follicular atresia in immature rat ovaries. *Med Okayama.* 2007; 61 (5):283-298.
247. Takahashi H, Nakajima A, Sekihara H. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfate (DHEAS) inhibit the apoptosis in human peripheral blood lymphocytes. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology.* 2004; 88 261–264.
248. Takai Y, Canning J, Perez GI, Pru JK, Schlezinger JJ, Sherr DH, Kolesnick RN, Flavell JYRA, Korsmeyer SJ, Tilly JL. Bax, Caspase-2, and Caspase-3 Are Required for Ovarian Follicle Loss Caused by 4-Vinylcyclohexene Diepoxide Exposure of Female Mice in Vivo. *Endocrinology.* 2003;144(1):69–74.
249. Te Verlde ER, Scheffer GJ, Dorland M, Broekmans FJ, Fauser BCJM. Development and Endocrine aspects of normal ovarian aging. *Mol Cell Endocrinol.* 1998;145: 67-73.
250. Teixeira J, He WW, Shah PC, Morikawa N, Lee MM, Catlin EA, Hudson PL, Wing J, Maclaughlin DT, Donahoe PK. Developmental expression of a candidate müllerian inhibiting substance type II receptor. *Endocrinology.* 1996; 137:160–165.



251. Tetsuka M, Hillier SG. Differential regulation of aromatase and androgen receptor in granulosa cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1997;61:233–239.
252. Thompson KE, Sipes IG, Greenstein BD, Hoyer PB. 17  $\beta$  Estradiol Affords Protection against 4-Vinylcyclohexene Diepoxide-Induced Ovarian Follicle Loss in Fischer-344 Rats. *Endocrinology.* 2002;143(3):1058-1065.
253. Thornberry NA. Caspases: a decade of death research. *Cell Death Differ.* 1999;6:1023–1027
254. Tilbrook AJ, de Kretser DM, Clarke IJ. Influence of the degree of stimulation of the pituitary by gonadotropin-releasing hormone on the action of inhibin and testosterone to suppress the secretion of the gonadotropins in rams. *Biol. Reprod.* 2001; 64: 473-481.
255. Tilbrook AJ, de Kretser DM, Clarke IJ. Changes in the suppressive effects of recombinant inhibin A on FSH secretion in ram lambs during sexual maturation: evidence for alterations in the clearance rate of inhibin. *J. Endocrinol.* 1999; 161: 219-229.
256. Tilbrook AJ, de Kretser DM, Clarke IJ. Human recombinant inhibin A suppresses plasma follicle-stimulating hormone to intact levels but has no effect on luteinizing hormone in castrated rams. *Biol. Reprod.* 1993; 49: 779-788.
257. Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh AJ. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology.* 1991; 129,2799–2801.

258. Tilly JL, Kowalski KI, Schomberg DW, Hsueh AJ. Apoptosis in atretic ovarian follicles is associated with selective decreases in Messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptors and cytochrome P450 aromatase. *Endocrinology*. 1992; 131,1670–1676.
259. Tilly JL. Apoptosis and the ovary: a fashionable trend or food for thought?. *Fertil Steril*. 1997; 67,226–228.
260. Tilly JL. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001; 2,838–848.
261. Tilly JL. Emerging technologies to control oocyte apoptosis are finally treading on fertile ground. *ScientificWorldJournal*. 2001; 1:181–183.
262. Tilly JL. The molecular basis of ovarian cell death during germ cell attrition, follicular atresia, and luteolysis. *Front Biosci*. 1996;1:d1–11.
263. Tsatsanis C, Dermitzaki E, Alexaki VI, Elias Castanas ,Andrew N. Margioris, and Achille Gravanis Dehydroepiandrosterone and allopregnanolone protect sympathoadrenal medulla cells against apoptosis via antiapoptotic Bcl-2 proteins Ioannis Charalampopoulos. *PNAS*. 2004 ;25:101- 21 8209–8214.
264. Van Werden WM, Bierings HG, van Steenbrugge GJ, de Jong FH, Schröder FH. Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens. *Life Sciences*. 1992; 50(12); 857-861.
265. Van Zonneveld P, Scheffer GJ, Broekmans FJM, Blankenstein MA, de Jong FH, Looman CWN, Habbema JDF, Te Velde ER. Do cycle disturbances explain the age-related decline of female fertility? Cycle characteristics of women aged over 40 years compared with a reference population of young women. *Human Reproduction*. 2003;18-3: 495-501.

266. Vaskivuo TE, Tapanainen JS. Apoptosis in the human ovary . *Reprod Biomed Online*, 2003; 64; 82-84.
267. Vaskivuo TE, Tapanainen JS. Apoptosis in the human ovary. *Reprod Biomed Online*. 2003; 6:24–35.
268. Vendola K, Zhou J, Wang J, Bondy CA. Androgens promote insulinlike growth factor-I and insulin-like growth factor-I receptor gene expression in the primate ovary. *Hum Reprod*. 1999;14:2328–2332.
269. Vendola K, Zhou J, Wang J, Famuyiwa OA, Bievre M, Bondy CA. Androgen promote oocyte insulin-like growth factor 1 expression and initiation of follicle development in primate ovary. *Biol Reprod*. 1999;61:353-7.
270. Vigier B, Picard JY, Tran D, Legeai L, Josso N. Production of anti-Mullerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. *Endocrinology*. 1984; 114:1315–1320.
271. Visser JA, Durlinger ALL, Peters IJJ, Van Den Heuvel ER, Rose UM, Kramer P, de Jong FH, Themmen APN. Increased Oocyte Degeneration and Follicular Atresia during the Estrous Cycle in Anti-Mullerian Hormone Null Mice. *Endocrinology*. 2007; 148: 2301–2308.
272. Wang H, Andoh K, Hagiwara H, Xiaowei L, Kikuchi N, Abe Y, Yamada K, Fatima R, Mizunuma H. Effect of Adrenal and ovarian Androgens on type 4 follicles unresponsive to FSH in immature mice. *Endocrinology*. 2001;142(11): 4930-4936
273. Wang L, Wang YD, Wang WJ, Zhu Y, Da-Jin Li. Dehydroepiandrosterone improves murine osteoblast growth and bone tissue morphometry via mitogen-activated protein kinase signaling pathway independent of either androgen receptor or estrogen receptor. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2007; 38: 467–479.

274. Wang Y, Sun Y, Qiu H. Expression of resistin mRNA in adipose tissue of rat model with polycystic ovarian syndrome and its implication. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2004;24(6):621-4.
275. Ward CW, Castoff A, Mahesh VB. The induction of polycystic ovaries in mature cycling rats by the administration of dehydroepiandrosterone (DHEA). *Biol. Reprod.* 1978;18:614-623.
276. Ward RC, Costoff A, MaheshVB. The induction of polycystic ovaries in mature cycling rats by the administration of dehydroepiandrosterone (Dha). *Biology Of Reproduction* 1978;18:614-623.
277. Wartenberg H. Development of the early human ovary and role of the mesonephros in the differentiation of the cortex. *Anat Embryol (Berl).* 1982;165:253–280.
278. Welt CK, McNicholl DJ, Taylor AE, Hall JE. Female reproductive aging is marked by decreased secretion of dimeric inhibin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:105-111.
279. Wickenheisser JK, Quinn PG, Nelson VL, Legro RS, Strauss JF, Mc Allister JM. Differential activity of the cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and steroidogenic acute regulatory protein gene promotes in normal and polycystic ovary syndrome theca cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000; 85:2304–2311.
280. Williams MR. Dehydroepiandrosterone inhibits human vascular smooth muscle cell proliferation independent of ARs and ERs. *J. Clin. En;ocrinol. Metab.* 2002; 87: 176–181.
281. Wise PM, Smith MJ, Dubal DB, Wilson ME, Krajnak KM, Rosewell KL. Neuroendocrine influences and repercussions of the menopause. *Endocr. Rev.* 1999;20: 243–248.

282. Wise PM, Smith MJ, Dubal DB, Wilson ME, Rau SW, Cashion AB, Bottner M, Rosewell KL. Neuroendocrine modulation and repercussions of female reproductive aging. *Recent Prog. Horm. Res.* 2002;57:235-256.
283. Woodruff TK, Krummen L, Mc Cray G, Mather JP. In situ ligand binding of recombinant human activin and recombinant human inhibin -A to the adult rat ovary. *Endocr Rev.* 1993; 33:2298-3006
284. Yamoto JM, Minami S, Nakano R, Kobayashi M. Immunohistochemical localization of inhibin/activin subunits in human ovarian follicles during the menstrual cycle. *Clin Endocrinol Metab.* 1992;74(5):989-93
285. Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, Prasad SV, Skinner SS, Dunbar BS, Dube JL, Celeste AJ, Matzuk MM. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol.* 2001; 15: 854-866.
286. Yeh J, Kim B, Liang YJ, Peresie J. Müllerian inhibiting substance as a novel biomarker of cisplatin-induced ovarian damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2006; 348: 337-344.
287. Yeh J, Kim B, Peresie J, Liang YJ, Arroyo A. Serum and ovarian müllerian inhibiting substance and their decline reproductive aging. *Fertility and Sterility.* 2007; 87(5):1227-1231.
288. Yeh J, Kim B. Increasing blunting of inhibin responses to dynamic ovarian challenge is associated with reproductive aging in the rat. *Reprod Sci.* 2007;14(1):10-9.
289. Young J. Panhypopituitarism as a model to study the metabolism of dehydroepiandrosterone (DHEA) in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997;82: 2578–2585.

290. Zapantis G, Santoro N, Ovarian ageing and the menopausal transition. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2002; 16-3:263-276.
291. Cleary MP, Zisk JF Anti obesity effect of two different levels of dehydroepiandrosterone in lean and obese middle aged female Zucker rats. *Int J Obes.* 1986; 10(3):193-204.
292. Amitabh Krishna, Ali Al Rifai, Bernd Hubner, Paul Rother, Katharina Spanel Borowski Increase in calcitonin gene related peptide (CGRP) and decrease in mast cells in dihydroepiandrosterone (DHEA)-induced polycystic rat ovaries. *Anat Embryol* (2001) 203;375-382.
293. Matkainean T, Perez GI, Zhen TS, Kluzak TR, Rueda BR, Flavell RA, Tilly JL. 2001; Caspase3 gene knock out defines cell lineage spesifity for programmed cell death signaling in the ovary. *Endocrinology*142;2468-2480.
294. M.Y. Yang and J.E. Fortune. Testosterone Stimulates the Primary to Secondary Follicle Transition in Bovine Follicles *In Vitro Biology Of Reproduction.* 2006; 75: 924–932
295. Mo Li, Heide Schatten, Qing Yuan Sun. Androgen receptor’s destiny in mammalian oocytes: a new hypothesis. *Molecular Human Reproduction* 200Barbeito CG, Gimeno EJ. 9; 3:149-154.
296. Seifer DB, MacLaughlin DT, Penzias AS, Behrman HR, Asmundson L, Donahoe PK, Gonadotrophin releasing hormone agonist induced differences in granulosa cell cycle kinetics are associated with alterations in follicular fluid mullerian inhibiting substance and androgen content. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;73:711-714.
297. McKinlay SM, Brambilla DJ, Posner JG. The normal menopause transition. *Maturitas.* 1992;14:103-15.

298. Ing NH, O Malley , B. W. The Steroid hormone receptor superfamily: Molecular mechanism of action. New York: Raven Press, Ltd; 1995.
299. Katryna Bogowch, Induction of Ovarian Follicular Cysts in the Pregnant Rat by Human Chorionic Gonadotropin, *Biology of Reproduction* 45, 34-42 (1991)
300. Mc Gee EA, Smith R, Spears N, Nachtigal MW, Ingraha H, Hsueh AJW. Müllerian inhibitory substance induces growth of rat preantral ovarian follicles. *Biology of Reproduction*. 2001; 64: 293-298
301. Alexandra L.L. Durlinger, Jenny A. Visser and Axel P.N. Them men, Regulation of Ovarian Function: the role of Antimüllerian hormone. *Reproduction*. 2002; 124: 601-609.
302. Tetsuka M, Whitelaw PF, Bremner WJ, Millar MR, Smyth CD, Hillier SG, Developmental regulation of androgen receptor in rat ovary. *J Endocrinol*. 1995; 145(3):535-43
303. Tetsuka M, Hillier SG. Androgen receptor gene expression in rat granulosa cells: the role of follicle-stimulating hormone and steroid hormone. *Endocrinology*. 1996;137(10):4392-7.
304. Maria Szoltys, Maria Slomczynska, Malgorzata Duda, Anna Sakiewicz, Agnieszka Otak, Distribution of androgen receptor in rat ovarian follicles undergoing atresia at the beginning of pregnancy. *Acta histochemica*. 2005; 107: 357-364
305. Szoltys M, Słomczyńska M, Tabarowski Z, Immunohistochemical localization of androgen receptor in rat oocyte, *Folia Histochem Cytobiol*. 2003;41(2):59-64

306. Y.Sajjad, S.M.Quenby, P.Nickson, D.I.Lewis-Jones, G.Vince, Expression of androgen receptors in upper human fetal reproductive tract, *Human Reproduction*. 2004; Vol.19, No.7:1659-1665.
307. Kiyoshige Horie, Kenji Takakura, Hiroshi Fujiwara, Hiroshi Suginami, Shutsung Liao, Takahide Mori, Immunohistochemical localization of androgen receptor in the human ovary throughout the menstrual cycle in relation to oestrogen and progesterone receptor expression. 1992; *Human Reproduction*, Vol. 7, No.2:184-190.
308. Edmondson RJ, Monaghan JM, Davies BR, The human ovarian surface epithelium is an androgen responsive tissue, *Br J Cancer*. 2002; 18;86(6):879-85
309. Takayu Misugi, Koji Ozaki, Khaled El Beltagy, Osamu Tokuyoma, Kenichi Honda, Osamu Ishiko. Insulin lowering Agents Inhibit synthesis of testosterone in ovaries of DHEA –induced PCOS rats. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 2006;61:208-215