

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

DENEYSEL OLARAK SIÇANLARDA
OLUŞTURULAN
PREMATÜR OVER YETMEZLİĞİ MODELİNDE
DEHİDROEPIANDROSTERON'UN ETKİSİ

Dr.Mehmet KAYA

Kadın Hastalıkları Ve Doğum Anabilim Dalı

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR

2010

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

DENEYSEL OLARAK SIÇANLARDA
OLUŞTURULAN
PREMATÜR OVER YETMEZLİĞİ MODELİNDE
DEHİDROEPIANDROSTERON'UN ETKİSİ

Dr.Mehmet KAYA

Kadın Hastalıkları Ve Doğum Anabilim Dalı

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof.Dr.Hikmet HASSA

ESKİŞEHİR

2010

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

Dr. Mehmet KAYA'ya ait "Deneysel olarak sıçanlarda oluşturulan prematür over yetmezliği modelinde dehidroepiandrosteron'un etkisi" adlı çalışma jürimiz tarafından Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda Tıpta uzmanlık Tezi olarak oy birliğiyle kabul edilmiştir.

Tarih: 18.01.2010

Jüri Başkanı	Prof. Dr. Hikmet HASSA	İmza
	Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı	
Üye	Prof. Dr. Turgay ŞENER	İmza
	Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı	
Üye	Prof. Dr. H. Mete TANIR	İmza
	Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı	

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun
...../...../..... Tarih ve/..... Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zübeyir KILIÇ

Dekan

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren sayın hocalarım Prof. Dr. Hikmet HASSA'ya, Prof. Dr. Sinan ÖZALP'e, Prof. Dr. Atilla YILDIRIM'a, Prof. Dr. Turgay ŞENER'e, Prof. Dr. A. Başar TEKİN'e, Prof. Dr. Ö. Tarık YALÇIN'a, Doç. Dr. H. Mete TANIR'a, Öğr. Gör. Dr. A. Berkiz TURP'a teşekkürlerimi sunarım. Araştırma süresince kendilerini ayırmaları gereken değerli zamanı benimle paylaşan ve değerli fikirleriyle araştırmanın her safhasında karşılıksız yardım ve desteklerini gördüğüm sayın hocalarım Prof. Dr. Hikmet HASSA ve Prof. Dr. Erineç ARAL'a ayrıca teşekkürlerimi sunarım. Araştırmanın gerçekleşmesi için bütün vakitlerini ayıran Araş. Gör. Dr. M. Caner ÖZER, Yüksek lisans öğrencileri Mustafa ÇELİK, Jale KARAARSLAN 'a, teşekkürlerimi sunarım. Araştırma verilerinin, istatistiklerinin hazırlanmasında yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Cengiz BAL'a teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Kaya M. Deneysel Olarak Sıçanlarda Oluşturulan Prematür Over Yetmezliği Modelinde Dehidroepiandrosteron'un Etkisi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2010. 4 Vinyl siklohekzen (VCD) diepoksit plastik, kauçuk ve insektisid üretimi esnasında oluşan endüstriyel atık maddedir. Tekrarlayan 4-VCD uygulaması sıçan overlerinde primordial ve primer follikülerde apoptoza neden olur. Sonrasında over yetmezliği gelişir. Dehidroepiandrosteron (DHEA) sıçan overlerinde üretilen androjen bir hormondur. DHEA bazı dokularda apoptoza neden olurken bazı dokuları apoptozdan korumaktadır. Araştırmamızda immatür sıçanlarda ovotoksik etkisi bilinen 4-VCD ile oluşturulan folikül yıkımında DHEA'nın etkisini ortaya koymayı amaçladık. Kırk adet yirmisekiz günlük, ağırlıkları 40-60 gram arasında değişen Sprague Dawley türü dişi sıçan rastgele dört guruba ayrıldı. Sıçanlara 15 gün süresince intraperitoneal yolla, DMSO (Dimetil Sülfoksit) da çözülmüş VCD (160mg/kg), DHEA (6 mg/100g VA) ya da VCD-DHEA kombinasyonu uygulandı. Çalışmanın sonunda sıçanlar anestezi ile bayıltıldılar ve servikal dislokasyonla öldürüldüler. İntrakardiyak kan örnekleri ve organları alındı. Serum östradiol ve FSH düzeyleri ELISA ile ölçüldü. Sıçanların vücut ağırlıkları ve organları tartıldı. Over dokusunda TUNEL ve kaspaz 3 immün boyama ile apoptoz araştırıldı. Foliküller, korpus luteum ve folikül kistleri sayıldı ve çapları ölçüldü. VCD primordial foliküllerde %86,67, primer foliküllerde %64,54 atreziye ve stromada apoptoz artışına neden oldu. DHEA folikülogenezde geçici bir duraklamaya, sadece sekonder foliküllerde ve stromada kısmen apoptoz artışına neden oldu. VCD-DHEA uygulaması primordial ve primer foliküllerde apoptozu azalttı. Bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak VCD'nin neden olduğu over yetmezliğin DHEA uygulaması ile geri döndürülebileceğini söyleyebiliriz. Ancak DHEA'nın sekonder folikül ve stromadaki yan etkilerini düşünmek gereklidir. Toksik maddelerin indüklediği folikül kaybı ve normal atrezinin altında yatan hücre sinyal mekanizmalarının anlaşılması kadın üreme hayatını düzenleyen faktörlere bakışımızı geliştirecektir.

Anahtar kelimeler: over yetmezliği, sıçan, VCD, DHEA

Destekleyen Kurum: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu
Proje No: 200811013

ABSTRACT

Kaya M. The Effect Of Dehydroepiandrosterone On Experimental Rat Model Of Premature Ovarian Failure. Eskisehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Medical Speciality Thesis in Department of Gynaecology and Obstetrics. Eskisehir 2010. 4 Vinyl Cyclohexene diepoxide (VCD) is an industrial agent that is produced during the production of plasticizers, rubber tires and insecticides. Repeated daily dosing of 4-VCD selectively destroys primordial and primary follicles in ovaries of rats by apoptosis and gradual ovarian failure develops. Dehydroepiandrosterone (DHEA) is an androgenic hormone that is produced by ovaries of rats. DHEA has antiapoptotic effects in some tissues while it has apoptotic effects in some others. This study aimed to determine the effect of DHEA on the immature rats' follicles destroyed by 4 VCD that is known to be an ovotoxic agent. Forty female 28 days old, weights ranging between 40-60 g Sprague-Dawley rats, were randomly divided into four groups. Rats were injected with VCD (160 mg/kg dose) and DHEA (6 mg/100) combination intraperitoneally for 15 days. At the end of the study rats were anaesthetized and sacrificed by cervical dislocation. Organs and intracardiac blood samples were taken. Serum estradiol and FSH levels measured by ELISA. Total body of rats and organs were weighted. Apoptosis was determined with TUNEL and caspase 3 immunohistochemical staining technique. Follicles, corpus luteum and cystic follicles were counted and their diameters were measured. VCD caused %86,67 atresia in primordial follicles, %64,54 atresia in primary follicles and apoptosis increase in stroma. DHEA application caused transient inhibition of folliculogenesis and apoptosis only in secondary follicles' granulosa layer and stroma. VCD –DHEA decreased apoptosis in primordial and primary follicles. Based on the results of this study; we can conclude that VCD induced ovarian failure could be reversed by DHEA. But adverse affect of DHEA on secondary follicles and stroma should be kept in mind. Understanding the general mechanisms of toxicant induced follicle loss as well as cell signaling in normal ovarian atresia can provide insight into factors that regulate the reproductive life span in women

Keywords: Ovarian failure, rat, VCD, DHEA

Supported Commission: Eskisehir Osmangazi University Scientific Research Commission, Project number: 20081311

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Overlerin Embriyolojik Gelişimi	3
2.2. Overlerin Anatomik Yapısı	5
2.3. Over Histolojisi	6
2.4. Folliküler Atrezi	16
2.5. Apoptoz	18
2.6. Apoptoz Değerlendirilmesinde Kullanılan Yöntemler	21
2.7. Prematür Over Yetmezliği	25
2.8. Vinylcyclohexene Diepoksit	29
2.9. Dehidroepiandrosteron	44
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	59
3.1. Kimyasal Maddeler ve Uygulamaları	59
3.2. Deney Grupları	59
3.3. Over ve Uterus Örneklerinin Değerlendirmeleri	60
3.4. Folikül Sayılarının Tesbiti	60
3.5. Over için Uygulanan Doku Takibi	61
3.6. Hematoksilin-Eozin Yöntemi	61
3.7. TUNEL Yöntemi	61
3.8. Kaspaz Yöntemi	62
3.9. ELISA	62
3.10. İstatistiksel Yöntem	63
4. BULGULAR	65
4.1. Ağırlıklar	65
4.2. Over Morfometrik Bulguları	69

4.3. TUNEL İmmunohistokimyasal Boyaması	80
4.4. Kaspaz 3 İmmunohistokimyasal Boyaması	81
4.5. Serum FSH, Östradiol Ölçümleri	86
4.6. Işık Mikroskopik Bulguları	87
4.7. İmmunohistokimya	90
5. TARTIŞMA	109
6. SONUÇ	160
KAYNAKLAR	167

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ADG	5 alfa androstane-3 alfa 17 β diolglucuronide
ADP	Adenozin difosfat
AhR	Aril hidrokarbon reseptörleri
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ALP	Alkaleen fosfataz
ALT	Alanin aminotransferaz
AMH	Antimülleryan Hormon
AR	Androjen Reseptörü
AS	Androstenoidon
AST	Aspartat aminotransferaz
BAD	Bcl 2 antagonist of cell death
Bcl-2	B cell lenfoma 2
BMP	Bone morphogenic factor
cAMP/PKA	Cyclic Adenosine Monophosphate / Protein Kinaz A
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
Ckit	CD 117
COC	Kumulus oosit kompleksi
COX	Cyclooxygenase
CT	Kompüterize Tomografi
CYP	Cytochrome P450
DBA	Deney başı ağırlık
DDT	Diklorodifenol trikloroethan
DH	DHEA grubu
DHEA	Dehidroepiandresteron
DHEAS	Dehidroepiandresteron sülfat
DHT	Dihidrotestosteron
DM	Diabetes mellitus
DMPA	Dimethylbenz(a)anthracene

DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNAaz	Deoksiribonükleaz
DSA	Deney sonu ağırlık
DXA	Dual energy X-ray absorptiometry
E1	Estron
E2	Estradiol
ED50	Populasyonun %50 sinde etki oluşturan efektif doz
EGF β	Epidermal growth factor beta
ER	Östrojen reseptörü
ERK	Ekstraselüler sinyal regüle kinaz
ESOGÜ	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
FASL	FAS ligand
FDA	Food and Drug Administration
FGF 7	Fibroblast growth factor 7
FSH	Folikül stimüle edici hormon
GABA	Gama Amino Butyric Acid
GDF9	Growth differentiation factor 9
GSH	Glutatyon
GV	Vezikula germinativa
h MG	Human menopozal gonadotropin
HDL	High density lipoprotein
HDL	High Density Lipoprotein
HIV	Human Immundeficiency Virus
Hmg	Human menopozal gonadotropin
HPTE	2,2-bis (p-hydroxyphenyl)-1,1,1- trichloroethane
IFN	Interferon
IGF-1	İnsülin like growth factor 1
IGFBP	İnsülin like growth factor binding protein
IL	Interlökin
IP	İntraperitoneal
IUI	Intrauterin İnseminasyon

iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit Sentataz
JNK	Jun N-terminal Kinase
Kaspaz	Cysteine-Aspartic Proteases
KL	Kit ligand
KMD	Kemik mineral dansite
LDL	Low Density Lipoprotein
LH	Lüteinizan hormon
MAPK	Mitojen aktive protein kinaz
MIS	Mullerian inhibitory substance
mRNA	Messenger ribonükleik asit
MT 1-MMP	Membrane type 1 metalloproteinase
MXC	Methoxycloz
NAIP	Nöral Apoptoz İnhibitör Protein
NGF	Nerve growth factor
NMDA	N Methyl Diaspartate
NTP	National Toksikoloji Programı
OHSS	Ovaryan Hiperstimülasyon Sendromu
OMI	Oosit matürasyon inhibitörü
PCO	Polikistik Over
PCOS	Polikistik Over Sendromu
PCOS	Polikistik over sendromu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyon
PPF2 α	Prostoglandin F2 alfa
PGE	Prostoglandin E
PGH	Primordial germ hücre
POY	Prematür over yetmezliği
PRL	Prolaktin
RA	Romatoid artrit
rFSH	Rekombinant Folikül Stimulan Hormon
SHBG	Seks hormon bağlayıcı globulin
SLE	Sistemik lupus eritamatozus
SPO 11	Spondation protein homolog 11

SSS	Santral Sinir Sistemi
T	Testosteron
TEM	Transmisyon elektron mikroskop
TGF β	Transforming growth faktör beta
TİCAM	Tıbbi cerrahi araştırma merkezi
TNF	Tümör nekroz faktör
TNFR	Tümör nekroz faktör reseptör
TRADD	TNF reseptör ilişkili ölüm bölgesi
TUNEL	Terminal dUTP Nick End Labeling
UTP	Üridin trifosfat
VAF	Vücut ağırlık farkı
VCD	Vinylcyclohexene diepoksit
VCH	Vinil siklohekzen
VCH	4-vinylcyclohexene
VCM	4 vinilsiklomonoepoke
VDD	4 vinilsiklodiepoke
VDH	VCD-DHEA grubu
ZP	Zona pellusida

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. Overlerin embriyolojik gelişimi	3
2.2. Over korteks ve medulla	7
2.3. Primer oosit oluşumu	8
2.4. Oositten salgılanan faktörler	9
2.5. Oosit-granüloza hücreleri arasındaki iki yönlü iletişim	10
2.6. Apoptoz mekanizmaları	20
2.7. Fetal ve erişkin yaşamda ovaryan folikül gelişimi ve apoptoz	21
2.8. VCH'nin metabolize olması	31
2.9. 15 günlük dozda VCD'nin mitokondrial etkisi	38
2.10.15 günlük dozda VCD'nin mitokondrial etkisi	38
2.11. İnsan ve VCD uygulanmış farelerin üreme dönemlerindeki hormonların karşılaştırılması	41
2.12. İnsan yaşamı boyunca DHEAS düzeyleri	45
2.13. DHEA'nın steroidojenik enzimlerle dönüşümleri	47
4.1. Denek ağırlıklarının kontrol ve çalışma gruplarına göre karşılaştırılması	65
4.2. Deneklerin sağ over, sol over, uterus ve toplam over ağırlıklarının kontrol ve çalışma gruplarına göre karşılaştırılması	66
4.3. Deneklere ait normalleştirilmiş sağ over, normalleştirilmiş sol over, normalleştirilmiş toplam over ağırlığı ve normalleştirilmiş uterus ağırlıklarının kontrol ve çalışma gruplarına göre karşılaştırılması	68
4.4. Deneklere ait toplam primordiyal folikül sayısı, normal primordiyal folikül sayısı ve atretik primordiyal folikül sayılarının kontrol ve çalışma gruplarına göre karşılaştırılması	70
4.5. Deneklere ait toplam primer folikül sayısı, normal primer folikül sayısı ve atretik primer folikül sayılarının kontrol ve çalışma gruplarına göre karşılaştırılması	72

4.6. Deneklere ait toplam sekonder folikül sayısı, toplam antral folikül sayısı, korpus luteum sayıları ve folikül kisti sayılarının kontrol ve çalışma gruplarına göre karşılaştırılması	74
4.7. Deneklere ait normal ve atretik primordiyal ve primer foliküllerin yüzdelerinin kontrol ve çalışma gruplarına göre karşılaştırılması	76
4.8. Deneklere ait primordiyal ve primer foliküllerin çaplarının ve granüloza tabakası kalınlıklarının kontrol ve çalışma gruplarına göre karşılaştırılması	78
4.9. Deneklere ait primordiyal folikül granüloza hücrelerinin kaspaz 3 boyanma yoğunluğunun çalışma ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	81
4.10. Deneklere ait primer folikül granüloza hücrelerinin kaspaz 3 boyanma yoğunluğunun çalışma ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	82
4.11. Deneklere ait sekonder folikül granüloza hücrelerinin kaspaz 3 boyanma yoğunluğunun çalışma ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	83
4.12. Deneklere ait sekonder folikül teka tabakası kaspaz 3 boyanma yoğunluğunun çalışma ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	83
4.13. Deneklere ait antral folikül teka tabakası kaspaz 3 boyanma yoğunluğunun çalışma ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	84
4.14. Deneklere ait korpus luteumlarda kaspaz 3 boyanma yoğunluğunun çalışma ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi	85
4.15. Deneklere ait over stromasında kaspaz 3 boyanma yoğunluğunun çalışma ve kontrol guruplarına göre değerlendirilmesi.	85
4.16. Kontrol grubuna ait over kesitinde korteksin görünümü	92
4.17. Kontrol grubuna ait over kesitinde yüzey epiteli ve korteksin görünümü	93

4.18. Kontrol grubuna ait over kesitinde antral follikül	93
4.19. VCD grubuna ait over kesitinde korteksin görünümü	94
4.20. VCD grubuna ait over kesiti	95
4.21. VCD grubuna ait over kesiti	95
4.22. DHEA grubuna ait over kesitinde korteksin görünümü	96
4.23. DHEA grubuna ait over kesiti	97
4.24. DHEA grubuna ait over kesiti	97
4.25. VCD + DHEA grubuna ait over kesitinde normal sekonder follikül	98
4.26. VCD + DHEA grubuna ait over kesitinde normal sekonder follikül	98
4.27. Kontrol grubuna ait over kesiti	99
4.28. Kontrol grubuna ait over kesiti	100
4.29. Kontrol grubuna ait over kesiti	101
4.30. VCD grubuna ait over kesiti TUNEL boyama	102
4.31. DHEA gruba ait over kesiti TUNEL boyama	103
4.32. DHEA ait over kesitinde TUNEL boyama	103
4.33. VCD + DHEA grubuna ait over kesitinde TUNEL boyama	104
4.34. Kontrol grubuna ait over kesitinde, kaspaz 3 boyama	105
4.35. Kontrol grubuna ait over kesitinde normal antral folikül	105
4.36. VCD grubuna ait over kesitinde kaspaz 3 boyama	106
4.37. VCD grubuna ait over kesitinde kaspaz 3 boyama	107
4.38. VCD grubuna ait over kesitinde kaspaz 3 boyama	107
4.39. DHEA grubunda kaspaz 3 boyama	108

TABLÖLAR

	Sayfa
3.1. Deney grupları ve sıçan sayıları	60
4.1. Denek ağırlıklarının kontrol ve çalışma gruplarına göre karşılaştırılması	65
4.2. Deneklerin sağ over, sol over, uterus ve toplam over ağırlıklarının kontrol ve çalışma gruplarına göre karşılaştırılması	67
4.3. Deneklere ait normalleştirilmiş sağ over, normalleştirilmiş sol over, normalleştirilmiş toplam over ağırlığı ve normalleştirilmiş uterus ağırlıklarının kontrol ve çalışma gruplarına göre karşılaştırılması	68
4.4. Deneklere ait toplam primordiyal folikül sayısı, normal primordiyal folikül sayısı ve atretik primordiyal folikül sayılarının kontrol ve çalışma gruplarına göre karşılaştırılması	69
4.5. Deneklere ait toplam primer folikül sayısı, normal primer folikül sayısı ve atretik primer folikül sayılarının kontrol ve çalışma gruplarına göre karşılaştırılması	71
4.6. Deneklere ait toplam sekonder folikül sayısı, toplam antral folikül sayısı, korpus luteum sayıları ve folikül kisti sayılarının kontrol ve çalışma gruplarına göre karşılaştırılması	73
4.7. Deneklere ait normal ve atretik primordiyal ve primer foliküllerin yüzdelerinin kontrol ve çalışma gruplarına göre karşılaştırılması	75
4.8. Deneklere ait primordiyal ve primer foliküllerin çaplarının ve granüloza tabakası kalınlıklarının Kontrol ve çalışma gruplarına göre karşılaştırılması	78
4.9. Deneklere ait sekonder ve antral folikül çaplarının, teka ve granüloza tabaka kalınlığının kontrol ve çalışma gruplarına göre karşılaştırılması	79

4.10.Deneklere ait TUNEL(+) hücre sayılarının kontrol ve çalışma gruplarına göre karşılaştırılması	80
4.11.Deneklere ait serum FSH, E2 düzeylerinin kontrol ve çalışma gruplarına göre karşılaştırılması	86

1. GİRİŞ

Prematür over yetmezliği (POY) 40 yaş altında overlerin fonksiyonunun kaybıdır. Kadınların %1'i POY ile karşı karşıya kalmaktadır. Kanser tedavisinde sağlanan ilerleme ve çocukluk çağı kanserlerinin başarılı tedavisi sonrası POY görülme sıklığı artmıştır. İdiopatik POY patogeneğinde artmış apoptozun rol oynadığı düşünülmektedir **(84,85,95)**.

POY hastaları üreme hayatlarının en verimli çağında infertilite problemi ve östrojen azlığının neden olduğu osteoporoz, artmış kalp ve damar hastalıkları riski ile karşılaşır. İnfertilite kliniklerinde bu hastalar için yardımcı üreme tedavisinde yüksek doz ve uzun süren pahalı gonadotropin tedavi protokolleri uygulamasına rağmen başarılı gebelik eldesi için oosit donasyonuna alternatif bir tedavi seçeneği bulunmamaktadır. Bu hastalar çocuk sahibi olamamanın neden olduğu endişe, yaşlanma korkusu, eşlerinin kendilerini seksüel olarak çekici bulmayacağı korkusu ve öz güven kaybı nedeniyle ağır psikolojik problemler yaşamaktadırlar.

POY tedavisi günümüzde yalnızca %90 olguda hormon desteği,%5-10 olgudada spontan gerileme olarak belirlenmiştir. Bu nedenle POY over fonksiyonunun tamamıyla kaybindan ziyade overin yeterli fonksiyon göstermemesi olarak düşünülmektedir **(93)**

Dehidroepiandrosteron (DHEA) insanlarda adrenal bezlerde prehormon olarak üretilir. Hücreler ihtiyaçları doğrultusunda DHEA'nu enzimatik olarak progesteron ve östrojene dönüştürerek kullanırlar. DHEA Östrojen reseptör beta'ya (ER β) agonistik etki, ER alfa (α)'ya parsiyel agonistik etki, Androjen reseptörlerine antagonistik etki göstermektedir **(336)**.

Puberteyle beraber artan DHEA kan konsantrasyonu otuzlu yaşlarda en yüksek seviyeye ulaşır. Menopozun başlaması ile DHEA kan konsantrasyonu düşmeye başlar. Seksenli yaşlarda erişkin kan konsantrasyonunun %5' ine düşer. Bu nedenle DHEA gençlik hormonu olarak adlandırılmıştır. DHEA' nın yaşlılıkta sık görülen bazı hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir **(158,159)**.

Kaynaklarda DHEA, kötü over cevaplı hastalarda over hiperstimülasyonu sonrası oosit eldesini artırmak için, postmenopozal hormon replazman tedavisinde, Alzheimer hastalığında, obezite tedavisinde kullanılmıştır **(189,204,246)**.

Vinilsiklohekzen diepoksit (VCD) endüstriyel atık bir maddedir. VCD uygulaması fare ve sıçan overlerinde primordial ve primer foliküllerde apoptozu (programlı hücre ölümü) indükler. Overler hızlandırılmış bir over yaşlanması sürecine girerler ve folikül havuzu tükenir. VCD, fare ve sıçanlarda prematür over yetmezliği oluşturmak için uygun bir maddedir **(151)**.

Deneyssel olarak VCD maddesi ile sıçanlarda oluşturulan prematür over yetmezliği modelinde DHEA 'un etkisi daha önce araştırılmamış bir konudur. Bu araştırmanın amacı VCD maddesi uygulaması ile prematür over yetmezliği modeli oluşturulan sıçanlarda DHEA uygulaması sonrası oluşabilecek olası etkileri over histolojisi ve serumda bakılacak hormon parametreleriyle belirlemektir. Bu bilgiler ışığında hayvan modeli sonuçlarının klinik pratiğe ne ölçüde yansıyor yansımadığını değerlendirmektir. Araştırma sonucu DHEA 'nın bu olgularda olabilir iyileştirici etkisi çok önemli sosyal, ekonomik kazanç getiricidir Pozitif gelişmeler elde olunur ise ömrünün yirmi beş yılını menopozda geçiren olgulara yaşam kalitesini artıracak bir yardım hem aile hem sosyal açıdan katkı sağlayacaktır.

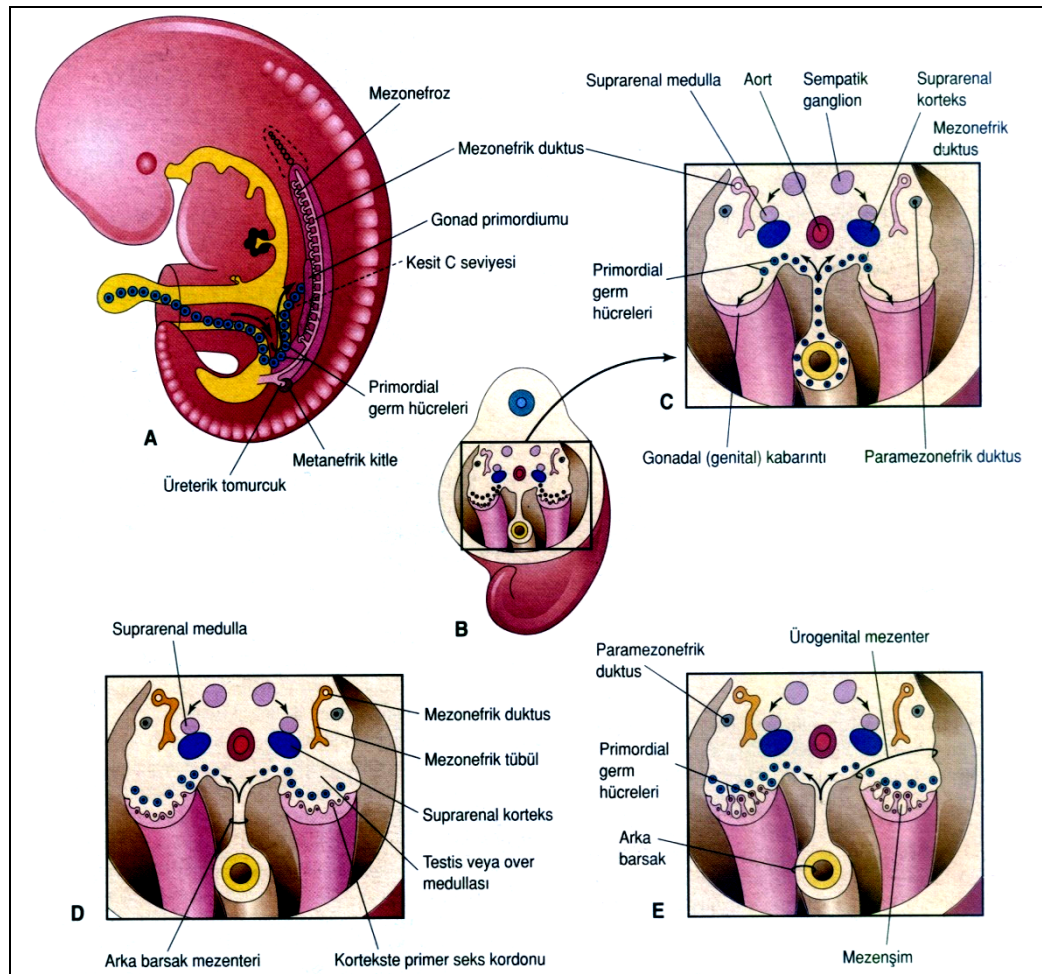
Bu araştırmanın prematür over yetmezliği üzerine yapılacak olan ilaç faz deneylerine ışık tutması amaçlanmıştır.

2.1. Overlerin Embriyolojik Gelişimi

Over, çölemik epitelin çift olarak kalınlaşmasıyla gonadal primordiyadan gelişir. Embriyonal otuz dördüncü günde pronefroz (ilk böbrek) ve metanefroz (son böbrek) arasında orta mezoderm içinde yerleşmiştir (1).

Gonadlar üç kaynaktan köken alırlar (Şekil 1).

- Posterior abdominal duvarı döşeyen mezotel (mezodermal epitel)
- Altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu)
- Primordial germ hücreleri (PGH)



Şekil 2.1. Overlerin embriyolojik gelişimi (2).

PGH'leri, testis ve overlerde bulunan yetişkin gametlerin embriyonik öncülleridir. PGH büyük mitokondrilere ve çok sayıda ribozomlara sahiptir. Golgi aygıtına ait veziküller ve endoplazmik retikulum sisternaları nadir olarak bulunur. Bunlarla birlikte glikojen partikülleri ve lipid damlacıkları insan PGH'lerin

sitoplazmalarında yaygın olarak bulunur. Glikojen partikülleri ve lipid damlacıkları PGH'lerinin göçü esnasında enerji kaynağı olarak kullanılır (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). PGH'lerin köken aldıkları yerden gonadlara doğru göç ederken izledikleri yol hala tam olarak anlaşılamamıştır. PGH göçü, Bone Morphogenic Factor (BMP-4) tarafından düzenlenmektedir (2, 4,7,10,11,12,13).

Dişi embriyolarında gonadal gelişim daha yavaş olur. X kromozomları over gelişimi için genler taşıırken organogenez'de otozomal bir genin de rol oynadığı ortaya çıkmıştır. 10. haftaya kadar, overler histolojik olarak ayırt edilemezler. Gonadal kordonlar, belirgin değildirler, medulla içine doğru sokulurlar ve rudimenter bir yapı olan rete ovarii'yi oluştururlar. Bu oluşan yapı ve gonadal kordonlar normalde dejenere olurlar ve kaybolurlar. Kortikal kordonlar erken fetal dönemde overin yüzey epitelinden köken alarak altta bulunan mezenşim içerisine doğru girerler. Bu epitel mezotelden gelişmektedir. Kortikal kordonların boyutları arttığında, PGH onların içlerine girer. Yaklaşık 16. haftada, bu kordonlar izole hücre kümelerine –primordial foliküller- parçalanırlar, oluşan foliküllerin her biri, PGH'den köken alan bir oogonyum ve onu saran, yüzey epitelinden köken alan, tek sıralı yassılaştırmış foliküler hücreleri içerir. Fetal yaşam sırasında oogonyumlarda oluşan aktif mitoz sonucu, binlerce primordial folikül meydana gelir.

Oosit, overlerde gelişimini tamamlar ve insanda bulunan en büyük hücredir. Yuvarlak biçimli, çapı yaklaşık 120-200 µm arasında olan hareketsiz bir hücredir. Oosit, tuba uterina'dan uterusu doğru lümenindeki sıvı akıntısı ve epitellerdeki silyalar yardımı ile kendi eksenini etrafında veya yuvarlanmalar ile yol alır. Oositin nükleusu hücre şekline uygun olarak yuvarlaktır 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 (14, 15, 16, 17).

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 hücreleri I. mayozu profazda tutan

bir faktör olan oosit maturasyon inhibitörü (OMI) adındaki bir maddeyi salgılayarak, oositin mayoz bölünme sürecini durdurduğu düşünülür. Çölom epiteli overde germinal epitele ve altındaki bağ dokusu ise tunika albugineaya farklılanır **(10,18, 19, 20)**.

Doğum sonrası dönemde oogonium meydana gelmez. Doğumdan önce büyük bir bölümü dejenere olsa da, doğumdan sonra iki milyon civarında primer oosit kalır. Pubertede overlerde 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 birinci kutup cisimciğine ise çok az miktarda sitoplazma kalır. Birinci kutup cisimciği kısa süre içinde dejenere olur **(2,4,12,13,21)**.

Ovulasyondan sonra sekonder oositin nükleusu ikinci mayoz bölünmeye girer, ama bölünme sadece metafaza kadar ilerlemektedir ve bu aşamada spermi beklemektedir. 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 (ikinci kutup cisimciği) kısa sürede dejenere olur, ikinci kutup cisimciği atıldığında oositin olgunlaşması tamamlanır **(2,4, 12, 13,21)**.

2.2. Overlerin Anatomik Yapısı

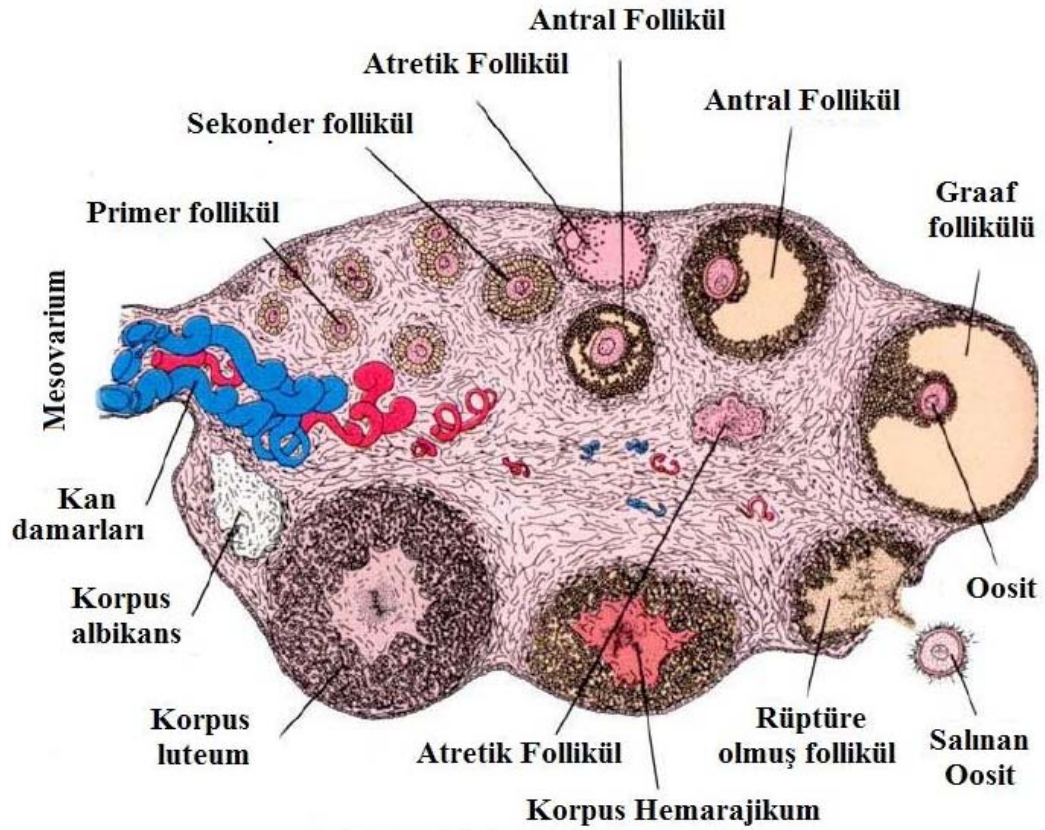
Overler, uterusun her iki tarafında lateral pelvik duvarlara yakın konumda fossa ovarika içinde yerleşen, badem şekilli, yaklaşık olarak 3-8 gr ağırlığında, 3-5 cm uzunlukta, 1.5-3 cm genişlikte ve 1-1,5 cm kalınlıktadırlar. Overlerin ön kısımlarında kan damarlarının ve sinirlerin girdiği hilus adı verilen bölge bulunur. Mezover (posterior), kan damarlarını overlere ileten bir periton kıvrımı olup overi uterusun yan kenarlarından uzanan ligamente (ligamentum latum) bağlar. Overin superior (veya tubal) tarafı suspensor ligament ile pelvik duvara bağlıdır. Bu ligament ovaryan damar ve sinirleri taşır. Inferior (veya uterin) taraf ise ovaryan ligament ile uterusu bağlıdır. Bu ligament pelvis tabanında gelişen, gonada bağlanan embriyonik fibröz kord olan gubernakulumun artığıdır. Puberteden önce over yüzeyi düzdür. Fakat reproduktif yaşamda tekrarlayan ovulasyonlar nedeni ile düzensiz yapı ve artan skarlar oluşur. Postmenopozal dönemde over boyutu, reproduktif dönemin dörtte birine düşer **(18, 22, 23)**

2.3. Over Histolojisi

Yüzeyi tek katlı kübik ve bazı bölümlerde yer yer skuamöz hücrelerden oluşur. Bu hücresel tabaka germinal epitel olarak adlandırılır ve mezotelin devamıdır. Germinal epitel yanlış bir isimlendirmedir. Çünkü bu hücreler overin kaynağı değildir. Peritoneal kaviteyi örten modifiye mezotel hücrelerdir. Over yüzey epiteli daha uygun bir terminoloji olarak germinal epitel yerine kullanılır. Overlerin, yanları mezover denilen bir mezentere sahiptir. Bu yapı overin hilusundaki geniş ligamente bağlanır. Epitelin altında overin beyazımsı rengini veren ve tunika albuginea olarak adlandırılan zayıf bir bağ dokusu katmanı bulunur. Tunika albuginea'nın altında, oosit içeren foliküllerin bulunduğu korteks bölümü ve en iç kısımda gevşek bağ dokusu içinde zengin bir damar yatağı içeren medulla bölümleri vardır **(23,24, 25)**. Histolojik özellikleri birbirinden farklı olan bu iki bölüm arasında, keskin bir sınır bulunmaz. Genç bireylerin overlerinde bu iki kısım kolayca ayrılabilirken daha ilerki yaşlarda farkedilemez **(24, 26, 27, 28, 29)**.

Over korteksinde çeşitli gelişim aşamalarında olan foliküller bulunur. Puberteden önce kortekste sadece primordiyal foliküller bulunurken puberteden sonra primer, sekonder ve antral foliküller bulunur. Seksüel olgunluk döneminde bu foliküllerden başka korpus luteum ve atretik foliküller bulunur. Menopoz döneminde ise foliküllerin sayısı oldukça azalır **(17,30,31,32)**.

Over medullası gevşek fibroelastik bağ dokusu yapısındadır. Medullada kollajen lif demetleri, elastik lif ağları, büyük kan damarları, lenf damarları, sinir demetleri ve çeşitli yönlerde 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 menstrüasyon öncesi bazı interstisyel hücreler östrojen salgılar. Bazı türlerde ise progesteron salgılar. İlk menstrüasyon siklusu sırasında interstisyel hücrelerin çoğunluğu involusyona uğrar ve fonksiyonları azalır. Hilus hücreleri, testisin Leydig hücrelerine benzer organel yapısına sahiptir. Lipidçe zengindirler ve hücre içinde Reinke kristallerine benzer yapılar bulunur. Hilus hücreleri steroid hormon olarak androjen salgırlar **(Şekil 3) (17,24,26, 28,30,32)**.



Şekil 2.2. Over korteks ve medulla (23).

2.3.1. Oogenez

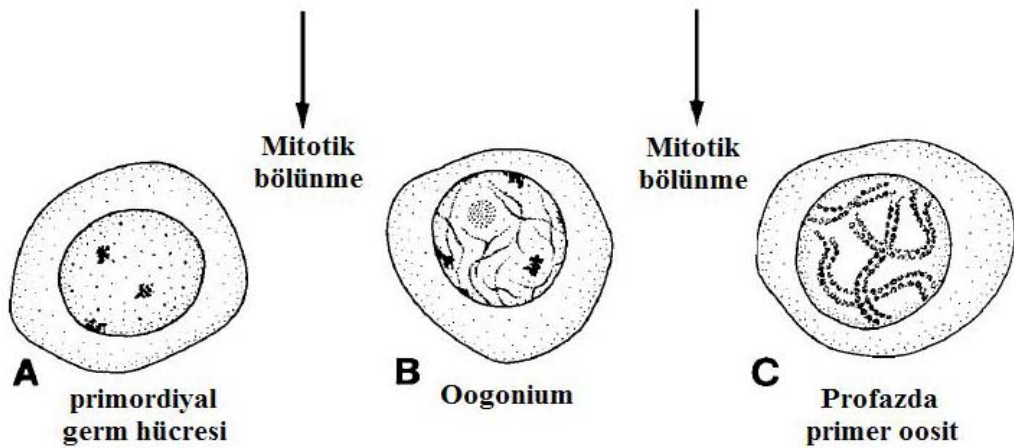
Oogenez; oogonya denilen primitif germ hücrelerinin olgun oositlere dönüşmesiyle gerçekleşen olaylar dizisidir. Hücrelerdeki bu olgunlaşma süreci doğumdan önce başlar, puberte sonrasında tamamlanır. Oogenez menopoza kadar devam eder (2).

PGH, dişi gonada ulaştınca oogoniumlara farklılıklar. Mitozla çoğalan oogoniumlar kümeler oluşturur. Bu göç ve ardından gelen çoğalm, bir tirozin kinaz reseptörü olan c-kit ile ona bağlanan kök hücre faktörü tarafından kontrol edilir. Her iki madde de göç sırasında PGH tarafından üretilir (33). Üçüncü ayın sonunda yassı epitel hücreleriyle çevrelenirler. Bir küme içerisinde yer alan oogoniumların tümü muhtemelen tek bir ilkel üreme hücresinden gelişirken, folikül hücreleri olarak bilinen oogoniumların çevresindeki yassı epitel hücreleri overin yüzey epitelinden köken alırlar (34).

Oogoniumların çoğunluğu mitoz ile bölünmeyi sürdürürken bir kısımda büyüyerek primer oositlere farklılıklar (Şekil 4). Oluşan primer oositler hemen

deoksiribo nükleik asit (DNA) larını bir kat arttırarak birinci mayoz bölünmenin profazına girerler. Bir kaç ay içinde oogoniumların sayısı hızla artar. Gelişimin beşinci ayında over içindeki üreme hücrelerinin sayısı yaklaşık yedi milyona ulaşır. Bu sırada hücre ölümü başlar ve çok sayıda oogonium ve primer oosit atrezik hale gelir. Yedinci ayda yüzeye yakın yerleşmiş olan bir kaçı dışında oogoniumların çoğunluğu dejenere olmuş olur. Primer oosit profaz aşamasında puberteye kadar bekler. Mayotik arrest olarak adlandırılan bu evre ovulasyonun hemen öncesine kadar tamamlanmaz ki bu 12–50 yıl kadar sürebilir (2,12).

Doğumdan sonra primer oosit oluşmaz. Primer oositler puberteye kadar over foliküllerinde beklerler. Folikül olgunlaştıkça primer oositin boyutları artar. Ovulasyondan hemen önce birinci mayoz bölünme tamamlanır. Sekonder oosit ve birinci polar cisimcik oluşur. Sekonder oosit hemen hemen tüm sitoplazmayı alır. Birinci polar cisimciğe ise çok az sitoplazma kalır. Polar cisimcik; küçük, işlevsel olmayan, kısa sürede dejenere olacak bir hücredir. Ovulasyonda sekonder oositin çekirdeği ikinci mayoz bölünmeye başlar. Metafaza kadar ilerler ve durur. Eğer bir sperm sekonder oositin içine girerse, ikinci mayotik bölünme tamamlanır Sitoplazmanın çoğu bir hücrede kalır. Bu hücre fertilize olmuş oositir. Diğer hücre ikinci polar cisimcik olarak adlandırılır. Bu hücre küçük işlevsiz bir hücredir ve kısa sürede dejenere olur. İkinci polar cisimcik atıldığında oositin olgunlaşması tamamlanır (2).



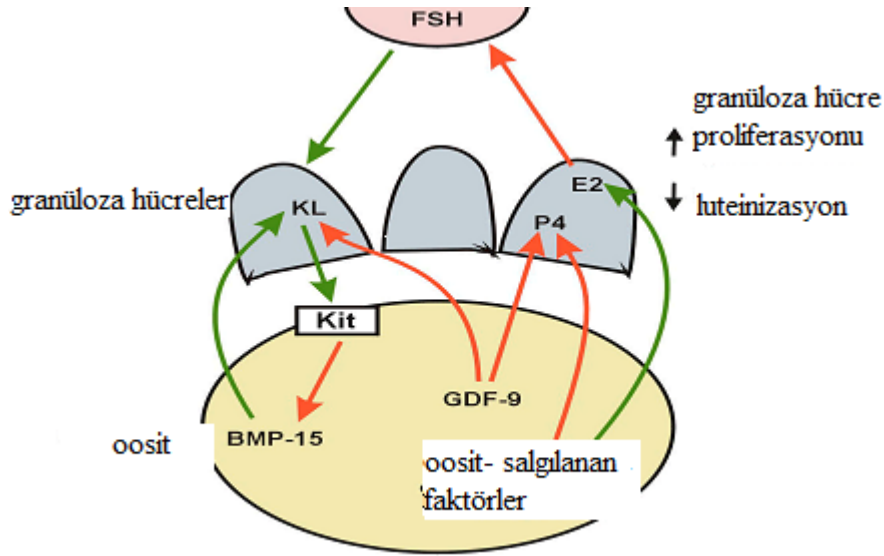
Şekil 2.3. Primer oosit oluşumu.

2.3.2. Granüloza Hücreleri

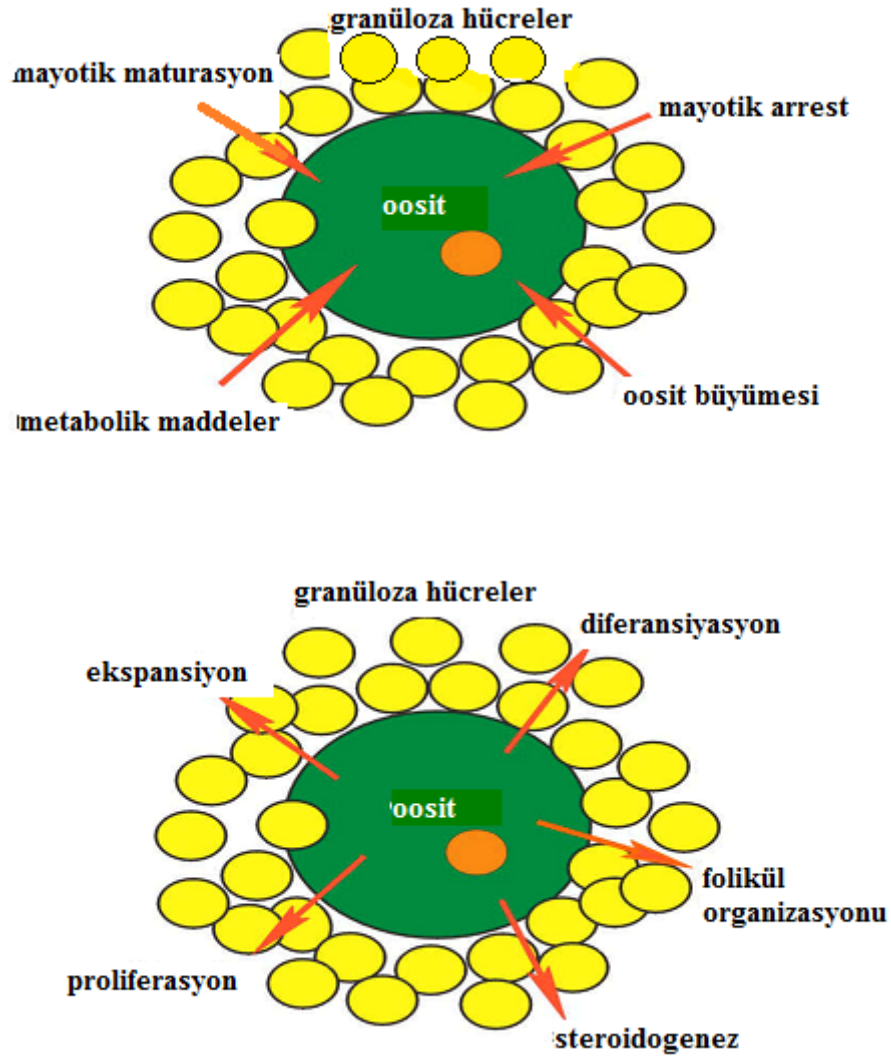
Granüloza hücreleri, olgunlaşmakta olan ve olgunlaşmış foliküllerde 5-7 μm çaplı polihedral hücrelerdir (35). Rete ovariden mi yoksa yüzey epitelinden mi geliştiği tartışmalıdır (36,37). Bazal membrana tutunan hücreler sıklıkla kolumnar şekillidir. Bu hücreler soluk, dar sitoplazmalı, hücre sınırları belirsizdir. Küçük yuvarlak veya oval şekilli hiperkromatik nükleusu vardır. Nükleer oluk yokluğu tipiktir (35)

Granüloza hücreleri buldukları yere bağlı olarak farklı fenotipler gösterirler. Bu hücreler mural granüloza hücreleri, antral granüloza hücreleri ve kumulus granüloza hücreleri olarak adlandırılır.. Mural granüloza hücreleri, antral folikülde yüksek 3 β hidroksisteroid dehidrogenaz ve aromataz aktivitesi göstererek en büyük steroidojenik aktiviteyi göstermektedir. Preovulatuvar folikül en fazla luteinizan hormon (LH) reseptörüne sahiptir. Antral kaviteye yaklaştıkça granüloza hücrelerde steroidojenik aktivite azalırken mitotik aktivite artmaktadır.

Oositten salgılanan faktörler, granüloza hücrelerinde proliferasyon, diferensiyasyon, ekstrasellüler matriks proliferasyonu ve steroid hormon üretimini etkiler. Burada iki faktör önemli rol almaktadır: gap neksuslar ve parakrin faktörler rol alır (38) (Şekil 6).



Şekil 2.4.Oositten salgılanan faktörler.



Şe

Şekil 2.5. Oosit-granüloza hücreleri arasındaki iki yönlü iletişim.

Oosit çevresindeki granüloza hücrelerinden izole edilirse gelişemez. Oositle granüloza hücreleri arasındaki ilişki iki yönlüdür. Oosit kendi gelişimini ve mayotik bölünmenin ilerlemesini sağlamak için somatik granüloza hücrelerinin desteğini almak zorundadır (38,39,40) (Şekil 7).

2.3.3. Teka Hücreleri

Teka hücreleri granüloza hücrelerinin aksine, fetal yaşamdan menopozun sonuna kadar, gelişen foliküllerin periferinde stromal hücrelerden farklılaşırlar (41). Teka ve interstisyel hücreler stromal kompartmanın mezenkimal hücrelerinden gelişirler. Primer interstisyel hücreler onikinci gebelik haftasında fetal overin meduller bölümünde ortaya çıkar ve yirminci gebelik haftasında kaybolurlar. Gonadotropinlere cevap veremezler. Kolesterol yan zincir klivaj aktiviteleri

olmadığı için de novo steroidogenez yapamazlar. Fakat dolaşan 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 (17,26,32,42,43,44).

Teka interstisyel hücreler overin ana androjen üreten hücreleridir. Bu hücreler Luteinizan hormon'a (LH) cevap verebilirler. Oositin Growth Differentiation Factor (GDF 9) üretimi teka tabakasının gelişimine bağlıdır. Teka hücreleri kit ligand (KL) reseptörü üretirler. Granüloza hücreleri ürettikleri KL ile teka ve oosit üzerinde düzenleyici etkiye sahiptirler. Teka hücreleri Kit eksprese ederler. KL erken folikülogenezde stromal hücrelerde proliferasyon ve organizasyonu sağlamaktadır. Teka ve granüloza hücreler arasındaki etkileşim folikülün hızla preantral dönemden antral döneme geçişini sağlar (45). Teka interna primer folikül aşamasında kazanılır. Teka eksterna folikül büyüdükçe oluşur. Preteka hücrelerinin folikülün dış yüzeyine doğru migrasyonu hala bilinmeyen bir sinyal gibi olsaydı da GDF-9 rol oynuyor gibi görülmektedir. Çünkü oosit kaynaklı bu faktör olmazsa teka tabakası oluşmamaktadır.

2.3.4. Over Stroması

Kortikal ve medullar stroma benzer görünümündedirler ve sınırları belirsizdir. İğ biçimli stromal hücreler dar sitoplazmalıdır. Berrak sitoplazmik lipid damlacıkları özellikle geç reproduktif ve postmenopozal dönemde özel boyalarla gösterilebilir. İmmünohistokimyasal boyalar sitoplazmik vimentin, aktin ve desmini gösterebilir (35). Menopoz sonrası over volümü büyük oranda azalır. Menopoz overi folikül içermez ve fibröz bir konnektif dokuya sahiptir (279).

2.3.5. Over Foliküllerinin Gelişimi (Folikülogenez)

Foliküllerin primordial folikül popülasyonundan ayrılıp gelişme ve diferensiasyona (değişime) uğraması olayına folikülogenez denir. Folikülogenez somatik hücrelerin proliferasyonu, steroidojenik kapasite elde etmesi, oositin büyümesi ve mayotik 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 diferensiasyon sürecine girmeden önceki dönemde sessizdirler. Bütün foliküller ovulatuvar döneme ulaşmazlar. Bir kısım folikül atrezi denilen bir süreçle kaybedilir. Mc Geeve ark. (46) folikülogenezde iki dönemden bahsetmişlerdir. Bunlardan birincisi ilk rekrutmentdir. Bu dönemde primordiyal foliküler erken antral döneme doğru yavaş büyüme içerisinde. İkincisi siklik rekrutmentdir. Bu dönemde atreziden kurtulan erken antral foliküller hızlı bir büyüme içerisine girerler. Foliküller siklik rekrutment sürecine girdikten sonra bir ya da daha fazlası, daha ileriye büyüme ve ovulasyon için seçilirler. Bu foliküllere dominan folikül adı verilir. Diğer foliküller atreziye uğrarlar.

Primordial Foliküller

Dişi bireylerde PGH'ler 25. haftada mitozla çoğalarak yaklaşık yedi milyon oogonyum meydana getirir. Bu aşamada yassı epitel hücreleri oogumyumların çevresini tek tabaka halinde sararak primordial folikülleri oluşturur. Mayoz bölünmeye girmiş primer oositlerin büyük çoğunluğu primer folikül oluşturamayıp, atreziye uğrar (47). Pubertede ise bu rakam 200.000' e kadar inmiştir (48). Ancak son yıllarda bazı araştırmalar fare türlerinde germ hattı kök hücrelerinden, yaşamın erken yıllarında yeniden eşey hücresi oluşabildiğini göstermiştir (49). Primordiyal foliküllerin gelişebilmesi için NGF (nerve growth factor) ve SPO11 (spondation protein homolog 11) gibi faktörlerin etkisi bulunur (4, 12,42,50,51,52,). Bunun dışında bir çok büyüme faktörü burada rol almaktadır. Kök hücre faktörü, lösemi inhibitör faktör, insülin gibi faktörler primordiyal hücre büyümesini arttırmaktadır. BMP-4 primordial folikül yaşamını attırmakta ve primordiyal-primer folikül geçişinde rol almaktadır (53). GDF-9 yokluğu follikulogenezini primer folikül sürecinde bloke etmektedir (54).

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 (55).

Primer foliküller, primordiyal foliküldeki primer oosit, folikül hücreleri ve bunları çevreleyen stromal dokudaki değişikliklerin sonucu olarak gelişir. Primer folikülde, oositi çevresinde tek katlı kübik epitel ve bazal lamina bulunur. Ayrıca, primer foliküllerde ileride oositin etrafını saracak olan zona pellusida oluşmaya başlar. Primordiyal foliküllerden primer foliküllerin gelişebilmesi için BMP4, BMP7 (Bone Morphogenic Factor 4,7) ve FGF7 (Fibroblast Growth Factor 7) gibi bazı faktörlerin etkileri vardır (24,26,32,53,56,57).

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 mitotik olarak aktif olan granüloza hücreleri, çok katlı duruma gelirler ve hücrelerin sıkıca paketlenmiş çok tabakalı konsantrik bir şekil kazanırlar. Granüloza hücrelerin oluşturdukları çok katlı epitele stratum granülozum adı verilir. Ayrıca bu tip foliküllere multilaminar primer folikül de denir (24,32,43). Primer oositin çapı artar ve homojen, eozinofilik ekstrasellüler bir tabaka halindeki zona pellusida, hücrenin plazma membranını çevreler (25).

Proteoglikanlardan zengin olan zona pellusida, hem oosit hem de granüloza hücreleri tarafından sentezlenir. Zona pellusida (ZP) folikül içindeki üreme hücrelerini, tubada ovulasyona uğramış yumurtayı ve klivaj aşamasındaki embriyoyu korur. Yalnızca üç glikoproteinden oluşur: Zona Pellucida 1,2,3 (ZP1, ZP2 ve ZP3) (35).

ZP1 olmayan fare yapısal olarak anormal zona oluşturur ve fekunditesinde azalma görülür. ZP2 olmayan farede preovulatuvar folikülü barındıramayan ince bir zona oluşur, antral folikül sayısı azalır ve daha az yumurta ovulasyona uğrar. ZP3 eksik fare zona pelusida oluşturamaz ve dişiler sterildir (58).

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, follistatin (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 **(55)**. Foliküller bu aşamadan sonra antral folikül ismini alırlar **(23)**.

Bu evrede granüloza hücreleri mural ve kumulus hücreler olarak değişime uğrarlar. Antral kavitedeki granüloza hücreleri mural granüloza hücreleri olarak adlandırılırlar. En fazla streoidojenik aktiviteye ve en fazla LH reseptörüne sahiptirler **(59)**.

Granüloza tabakası oositi çevreleyen bölge dışında her yerde hemen hemen aynı kalınlıktadır. Çevresel yerleşim gösteren oosit etrafında ise granüloza hücreleri daha yoğun bir şekilde birikerek bir tepelik oluştururlar. Burada kümülüs ooforus adını alan granüloza hücreleri ovulasyon sonrasına kadar oosit ile birleşik halde kalırlar. Bunlar, mural granüloza katına göre daha az LH reseptörlerine sahiptirler. Oosit ile ilişkili ve onu saran bir veya daha fazla tabakalı granüloza hücreleri artık korona radiata olarak adlandırılır ve ovulasyondan sonra da oosite eşlik eder. Ovulasyondan sonra korona radiata ile oosit, aralarındaki oluklu bağlantılar aracılığıyla sürekli temasta olduklarından dolayı birlikte kümülüs oosit bileşkesi (kompleksi) (COC) olarak adlandırılır **(23)**. Antrumu çevreleyen granüloza hücrelerine ise membrana granüloza denir **(2,12, 23,24)**.

Ovulasyona yakın dönemlerde folikülün son gelişim evresi olan olgun folikül, 10 mm veya daha büyük bir çapa ulaşan foliküllerdir. Bu foliküller Graaf folikülü olarak adlandırılır. Bu foliküller, çok büyük olduğundan dolayı over korteksinin kalınlığı boyunca uzanıp bir miktar da overin dışına doğru çıkıntı yapar. Yaklaşık olarak overin 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, folikül hücrelerinin çoğalması durur. Primer oosit çekirdeğine, veziküla germinativa (GV), nukleolusuna ise makula germinativa denir. Primer oosit sitoplazmasında çok sayıda vitellin granüller bulunur **(2,10,12, 17, 23, 26, 60)**.

Ovulasyon

Ovulasyon, sekonder oositin Graaf folikülünden atılması olayıdır. Herhangi bir menstruel siklusta ovulasyonda atılacak olan folikül, çok sayıda primer folikül arasından, siklusun daha ilk günlerinde seçilir. Ovulasyon esnasında oosit, germinal epitel de dahil tüm folikül duvarını geçer. Menstruel döngünün tam ortasında gerçekleşen sekonder oositin salınımı bir takım hormonal değişimlerin ve enzimatik olayların etkisiyle gerçekleşir. Bu olaylar şöyle sıralanabilir:

- Folikül sıvısının basınç ve volümünde artış.
- Aktive olan plazminojen aracılığıyla folikül duvarının enzimatik proteolizi.
- Oosit kumülüs kompleksi ve stratum granulozum arasında hormonal olarak kontrol edilen glikozaminoglikanların yerleşmesi.
- Prostobezinler tarafından tetiklenen teka eksternadaki düz kas liflerinin kasılması.

Ovulasyondan hemen önce folikülün çıkıntı yaptığı ovaryan yüzeyde kan akımı durur. Germinal epitelin bu bölgesine makula pellusida veya stigma adı verilir. Folikül bu bölgeden rüptüre olarak oosit, korono radiata ve kumulus ooforus hücreleri ile sarılı halde karın boşluğuna atılır (23).

Korpus Luteum

Ovulasyondan sonra, folikülün granuloza ve teka interna hücreleri, korpus luteum (sarı cisim) denilen geçici bir iç salgı bezini oluşturmak üzere yeniden düzenlenirler. Korpus luteum overin korteks bölgesinde görülür. Folikül sıvısının boşalması ile folikül duvarı kıvrımlı bir hal alır. Folikül boşluğuna bir miktar kanama olduktan sonra kan pıhtılaşır (koagülasyon) ve daha sonra yerini bağ dokusu alır. Bu bağ dokusu ile birlikte giderek ortadan kaldırılan kan pıhtısı artıkları korpus luteum'un en iç kısmını oluşturur.

Ovulasyondan sonra granuloza hücrelerinin boyutlarında bölünmelerine karşın büyük bir artış olur (20–35 µm çapında). Bunlar korpus luteum parankimasının yaklaşık %80'ini oluşturur. Bu hücreler granuloza lutein hücreleri olarak adlandırılırlar. Bu hücreler, steroid salgılayan hücrelerin genel yapısal özelliklerine sahiptirler.

2.4. Foliküler Atrezi

Overlerde doğum sırasında sayıları milyonlarla ifade edilen ve çeşitli gelişim evrelerinde olan folikül bulunur. Her menstrüal siklusta birden çok folikül gelişir. Ancak olgun bir folikül, parçalandığında ve COC atıldığında geride kalan olgunlaşmakta olan foliküller, ovaryan foliküler atrezi ismi verilen bir süreç ile ortadan kaybolurlar. Atrezi granüloza hücrelerinin apoptozu aracılığıyla meydana gelir. Fetal gelişim, erken postnatal yaşam ve pubertede çok sayıda folikül atreziye uğrar. Foliküller atreziye uğrarken ilk başta oosit kısımları daha sonra da folikül hücreleri dejenere olur. Atreziye uğrayan primordial foliküllerin yerini stromal bağ dokusu alır. Gelişen foliküllerin atrezisi ise daha kompleks bir olaydır. Bu olayları sıralarsak;

- Oosit kısmı dejenere olur.
- Mitoz durur ve granüloza hücreleri arasında endonükleazlar ve hidrolitik enzimlerin ekspresyonu görülür.
- Nötrofil ve makrofajların granüloza tabakasına invazyonu.
- Folikül antruma granüloza hücrelerinin dökülmesi.
- Vaskülarize bağ dokusu dizisi ile granüloza tabakasının invazyonu.
- Otolitik değişikliklere dayanıklı olan zona pellusida ise makrofajlar tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılır.
- Teka interna hücrelerinin hipertrofisi.
- Folikül kollapsı.
- Folikül kavitesinin içine bağ dokusunun invazyonu (2, 24, 26, 30,35).

Foliküler atrezi sürecini bir kaç gen düzenlemektedir. Bunlardan bir tanesi gonodotropinlerin indüklediği nöral apoptoz inhibitör protein (NAIP) dir. Bu protein, granüloza hücrelerinde apoptoz değişikliklerini inhibe eder. NAIP gen ekspresyonu büyüyen foliküllerin tüm evrelerinde mevcuttur. Fakat atreziye uğramış folikülde yoktur. Gonodotropinlerin yüksek düzeyi, overlerde NAIP nin ekspresyonunu arttırması ile ovaryan foliküllerde apoptozu inhibe eder.

Oositler, dejenerasyon ve otoliz ile ilişkili değişikliklere uğrar ve artık makrofajlar ile fagosite edilir. Zona pellusida ilişkili olduğu hücrelerdeki otolitik değişikliklere dirençlidir. Foliküler kavite içinde yavaşça bozulur ve katlanıp kollabe olur. Bağ dokusundaki makrofajlar, dejenere hücrelerin artıklarını ve zona

pellusidanın fagositozunu sağlar. Folikül hücreleri ile teka interna arasındaki bazal membran folikül hücrelerinden ayrılabilir ve kalınlığı artar. Camsı membran adı verilen dalgalı hiyalin tabaka oluşur.

Teka interna hücrelerinin genişlemesi bazı atretik foliküllerde meydana gelir. Bu hücreler teka lutein hücrelerine benzerler ve bağ dokusuyla ayrılmış diziler şeklinde radial olarak düzenlenen organizasyon gösterirler. Bağ dokusunda zengin kapiller ağ gelişir. Bu atretik foliküller, korpus luteuma benzemekte ve korpora lutea atretika ismi verilmektedir **(23)**.

Menstrüal siklus başında artan FSH konsantrasyonları ile bir folikül midsiklusta artan miktarda östrojen üretimini sağlar ve maturasyona ulaşır. Feedback mekanizma ile FSH sekresyonu düşmesi sonrasında foliküller apoptoza uğrar ve atrezi gerçekleşir **(61, 62, 63)**. Granüloza hücrelerinde apoptoza neden olan mekanizmalar tam olarak bilinmemekle beraber; 1. Apo1/ cd95 (Fas), kaspazlar, tümör nekroz faktör (TNF), p53, prohibitin, interferon (IFN), endothelin gibi birçok molekülü ilgilendirir. 2. Gonadotropin, insülin like growth factor (IGF-1), interleukin β (IL-1 beta), epidermal growth faktör (EGF), b fibroblast growth factor (FGF), Bcl-2 gibi yaşamsal faktörleri ve transforming growth factor (TGF-beta), IL-6, androjen, bax, reaktif oksijen türleri, p53, TNF ve kaspazlar gibi atretojenik faktörleri görev alır **(64, 65, 66)**. 3. Bu moleküller arasındaki denge ile ölüm ve yaşam sınırı çizilir **(62)**.

Luteoliz

Luteoliz veya korpus luteumun regresyonu, insanda kadın üreme siklusunun sonudur. Luteoliz hem fonksiyonel hem de morfolojik bir süreç olup progesteron üretiminde azalma ile karakterizedir. Morfolojik olarak luteoliz korpus luteumun hücresel yapısında bozulma ve over bağ dokusunda küçük bir skar oluşumu ile karakterizedir. TNF, Fas/Fas Ligand, kaspaz 3, Bax, prohibitin, BMP ligand (BMP) ve reseptörleri gibi bir çok molekül yapısal luteolizde rol alır. Bu moleküllerin olayla ilgisi iki inceleme ile desteklenir. Birincisi; apoptoz ve luteoliz arasındaki geçici ilişki. İkincisi; luteoliz ile korpus luteumda TNF ve Bcl2/Bax oranı gibi bazı moleküllerin ekspresyonunun değişmesidir **(67)**.

2.5. Apoptoz

Apoptoz terimi ilk defa Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında hücre ölümünün değişik bir şekli olarak ortaya atılmıştır **(68)**.

Apoptoz oluşan hücreler komşu hücreler ve ekstraselüler matriksten ayrılırlar. Hücresel iskelet' in aktif olarak kaspazlar tarafından parçalanmasını takiben hücrede volüm kaybı ve büzüşme gerçekleşir. Apoptoz'un en önemli özelliklerinden birisi, topoisomerez II ve Deoksiribonükleaz (DNAz I ve II) tarafından DNA'nın intranukleozomal parçacıklara ayrılmasıdır. Bu enerji bağımlı aktif bir mekanizma olup nekrozdaki parçalanma tamamen pasif bir olaydır. Olayın sonunda komşu hücreler ve fagositler, apoptotik cisimcik olarak adlandırılan cisimcikleri inflamatuvar cevap gelişmeyecek şekilde fagosite ederler **(69,70)**.

Işık mikroskopisinde, apoptozun erken basamaklarında hücre büzülmesi ve piknoz gözlenir. Hücre büzülmesi sonrasında hücrelerin sitoplazmaları yoğunlaşır ve sıkıca paketlenir. Hematoksilen ve eozin boyamasında Apoptoz oluşan hücre koyu eozinofilik sitoplazmaya sahip yoğun mor nükleer fragmanlar içeren yuvarlak ya da oval şekilli hücrelerdir.

Piknoz kromatin yoğunlaşması olup apoptozun en karakteristik özelliğidir. Plazma membranında balonlaşma sonrası karyoheksiz meydana gelir. Apoptotik cisimcikler nükleer fragmanlar içeren veya içermeyen sitoplazma paketleri olup yoğun şekilde paketlenmiş organeller içerir. Bu cisimcikler makrofajlar ya da parankim hücreleri tarafından fagosite edilir. Apoptoz oluşmasında ve ya da apoptotik cisimciklerin ortadan kaldırılmasında inflamatuvar reaksiyon olmaz. Çünkü apoptoza uğrayan hücreler içeriklerini kendilerini çevreleyen interstisyel alana salmamaktadır. Bu maddeler çevre hücreler veya makrofajlar tarafından hızla ortamdan uzaklaştırılmakta ve fagositik hücreler inflamatuvar sitokinler üretmemektedir **(71)**.

Nekroz apoptotik hücre ölümüne alternatif bir yoldur. Toksik uyarı hücreye ulaşır ve enerji gerektirmeyen bir süreç ile hücre ölümü gerçekleşir. Konvansiyonel metodlarla nekroz ve apoptoz her zaman birbirinden ayıramayabilir. Nekrotik hücre ölümü iki mekanizmayla yönetilir. Hücrenin enerji yolağının kesilmesi ve hücre membran bütünlüğünün bozulması. Nekrozda gerçekleşen morfolojik değişiklikler hücre şişmesi, sitoplazmik vakuoller ve distandü endoplazmik vakuoller oluşmasıdır.

Sitoplazmik tomurcuklar, yoğunlaşmış, şişmiş, ruptüre olmuş mitokondri ve ribozomların ayrılması, organel membran bütünlüğünün bozulması ve lizozamların ruptüre olması bu süreçte gözlenir. Hücre membran bütünlüğünün bozulması ile hücrel içerik interstisyuma dökülür. Oluşan kemotaktik sinyaller çevrede inflamatuvar bir olay oluşturur. Nekroz sürecinde hücrelerde piknozis ve karyoheksiz de gözlenebilir (71).

Apoptoz üç mekanizma ile açıklanmaya çalışılmaktadır: (Şekil 9)

- 1- Hücre yüzey reseptörlerine ölüm sinyalinin bağlanması (ölüm reseptör aracılı).
- 2- Hücre içi sinyallerden apoptoz mekanizmasının tetiklenmesi (mitokondri aracılı).
- 3- T Hücreli sitotoksosite ve perforin-granzim bağımlı hücre ölümü(kaspazlar aracılı).

Perforin granzim yolağı apoptozu granzim A ve granzim B aracılığıyla indükleyebilir. Üç yolakta zaman zaman birleşerek birbirini etkileyebilir. Üç yolakta aynı son noktada buluşur. Bu yolak kaspaz 3 aktivasyonu ile başlatılır ve deoksiribonükleik asit (DNA) kırılması, hücre iskeleti ve nükleer proteinlerin degradasyonu, proteinlerin çapraz bağlanması, apoptotik cisimciklerin oluşması ve fagositik hücrelerin ligandlarının oluşması ile sonuçlanır. Bu mekanizmaların dışında granzim A yolağı kaspaz bağımsız bir mekanizmayla tek sarmal DNA hasarı yaparak hücre ölümünü indükler.

2.5.1. Overlerde Apoptoz

Omurgalı hayvanların overleri hayat boyunca oldukça dinamik bir süreç geçirirler. Foliküllerin %99'u başlıca granüloza hücrelerde apoptoz mekanizmalarıyla atreziye uğrar ve çok az kısmı ovule olur. Walther Flemming 1885 yılında tavşan over folikülü granüloza hücrelerinde kromatoliz adı verilen bir olayın folikülü atreziye soktuğunu tespit etmiştir. Kromatoliz sonrası ölen hücreler, hücrel kırılma ile sonuçlanan hücrel ve nükleer kondansasyon geçirirler. Bu aşamalar şimdi apoptozun morfolojik karakteristikleri olarak bilinmektedir (68). Gavrieli ve ark.(72) oligonükleozomal DNA kırılmasını tanımlamışlardır. Bu olay atretik fare foliküllerinin granüloza hücrelerinde apoptoz için patognomoniktir. Bundan sonra insanında aralarında bulunduğu çeşitli türlerde araştırmalar yapılmış ve foliküler

atrezide granüloza hücrelerinin apoptozuna yardımcı rolü onaylanmıştır. Solomon Zuckerman 1951 yılında overlerin sınırlı sayıda foliküle sahip olduğunu söylemiştir. Bu hipotez yakın zamanda yapılan araştırmalarda sorgulanmaktadır (62, 73).



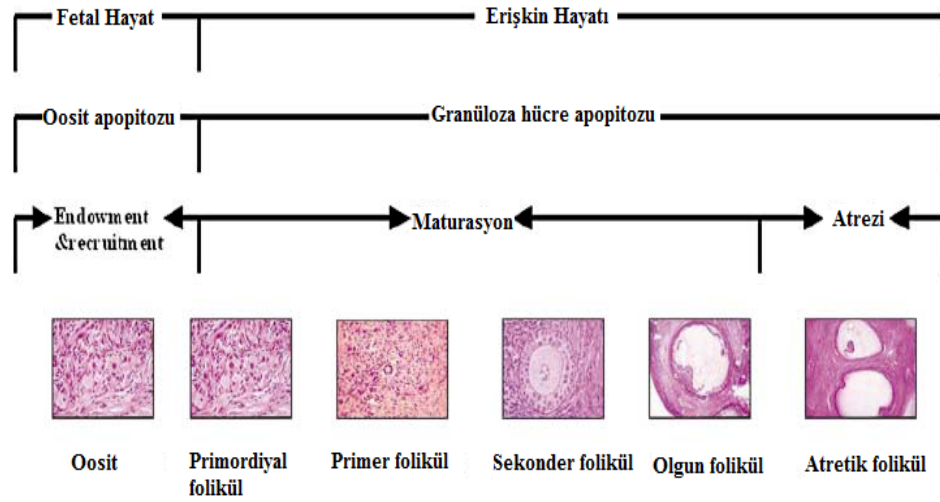
Şekil 2.6. Apoptoz mekanizmaları

Fizyolojik koşullar altında apoptoz, ovaryan folikül'de üç hücre tipinde görülür. Granüloza hücrelerinde ve luteal hücrelerde apoptoz sıklıkla erişkin dönemde olurken, oositlerde apoptoz fetal hayatta gözlenir. Oositlerde apoptoz on üçüncü haftada başlar ve on dört-yirminci haftalar arasında en üst seviyeye ulaşır. Bu dönemden sonra doğuma kadar giderek azalır. Postnatal oositlerde apoptoz izlenmemektedir (74).

Morfolojik olarak bakıldığında overlerde fetal ve erişkin hayat boyunca apoptoz vardır. Fetal hayat boyunca apoptoz oositlere lokalize iken erişkin hayatta sekonder ve antral foliküllerin granüloza hücrelerinde tespit edilebilmektedir. Hipotetik olarak foliküllerin over rezervinin tüketilmesi apoptoz yoluyla olmaktadır (62) (şekil 10).

Hücre ölümü ve yaşamı ile ilgili sinyaller arası denge folikülün kaderini belirler. Atrezi hızında anormal hızlanma fertilitiyi negatif olarak etkiler. İnsan oogeneğinde apoptoz ultrastruktürel değişiklikleri iki mayotik fazı ilgilendirmektedir. Erken olan oogonia ve oositleri ilgilendiren preleptoten fazı ve oositi ilgilendiren

pakiten fazı. (75). Atretik oositlerde nukleolar parçalanma, sitoplazmik ve nukleolar kondensasyon, apoptotik cisimcik oluşması ve nukleer membranda kromatin dizilimi olmaz. Bunun yerine atretik oositlerde erken morfolojik değişiklikler granüloza hücrelerde retraksiyon, oosit mikrovillilerinde azalma ve mitokondride kristalların kaybı ile kondensasyondur. Bu değişiklikler granüloza hücrelerde apoptoz başlaması ile birlikte olur. Granüloza hücrelerin birçoğunun kaybı ile beraber daha şiddetli değişiklikler oluşur. Bunlar oositin segmentlere ayrılması ve sitoplazmik vakulizasyondur (76).



Şekil 2.7. Fetal ve erişkin yaşamda ovaryan folikül gelişimi ve apoptoz (62).

Folikül Gelişiminin Dinamikleri

İnsanlarda over folikül rezervi fetal hayatta belirlenmektedir. Oositlerin en az üçte ikisi fetal hayatta apoptoz ile ölmektedir. Apoptoz over fonksiyonu ve gelişimi için gereklidir. Fetal hayatta apoptoz başlıca oositleri etkilemektedir. Hipotetik olarak foliküllerin over rezervinin tüketilmesi; 1. Mayotik anomalilerin yok edilmesi için kalite kontrolü. 2. Komşu hücreler tarafından üretilen yaşamsal faktörlerin eksikliği 3. Kendi kendini kurban etme mekanizmaları ile gerçekleşmektedir (77).

2.6. Apoptoz Değerlendirmesinde Kullanılan Yöntemler

Apoptoz birbiriyle bağlantılı, kompleks ve kontrollü bir süreçtir. Apoptoz ve nekroz özelliklerinin birbiriyle karışması işi daha da karmaşık hale getirmektedir. Hücre ölümünün kinetiğinin anlaşılması oldukça önemlidir. Bazı proteinler (ör: kaspazlar) geçici olarak eksprese edilirler. Apoptoz sürecinde oluşan apoptotik

hücreler hızla ortadan kaldırılmaktadır. Apoptozun başlamasından bitmesine kadar geçen süre üç saat kadar kısa olabilir. Dolayısıyla bir metod çok erken olabilirken bir metod ise oldukça geç kalabilmektedir. Bazı dokularda ise apoptoz oldukça az sıklıkta gözlenmektedir. Genel olarak hücre ölümünde detaylı bilgi alınmasında, planlanan deneyde toksin maruziyetinin süresi, test edilen maddenin konsantrasyonu ve testin son noktası oldukça önemlidir.

Apoptoz testleri beş ana kategoriye ayrılır.

- 1- Sitomorfolojik değişiklikler
- 2- DNA kırılması
- 3- Kaspazların, yıkım ürünlerinin, düzenleyici ve inhibitörlerin tespiti
- 4- Membran değişiklikleri
- 5- Mitokondrilerde apoptoz tespiti

Sitomorfolojik Değişiklikler

Hematoksilen ve eozin ile boyanmış prepratlarla ışık mikroskopide apoptoz oluşan hücreler gözlenebilir. Bu metodla tek bir apoptoza uğrayan hücre gözlenebilirken diğer metodlarla apoptoz oluşan hücrelerin gösterilmesi gereklidir. Apoptozun morfolojik olaylarının oldukça hızlı gerçekleşebilmesi ve hızla fagosite edilmesinden dolayı bazı dokularda apoptoz oldukça ilerledikten sonra belirlenebilir. Ek olarak bu metodla apoptoz oldukça geç bir safhada tespit edilebilir ve erken safhalar kaçırılabilir.

Epoksi resine gömülmüş bloklardan alınan ince kesitlere toluidin mavisi ve metilen mavisiyle boyanma yapıldığında oldukça yoğun boyanmış apoptoz olan hücreler gözlenebilir. Bu metod, apoptoz esnasında sitoplazmada ya da nükleusta gözlenen yoğunlukların gözlenmesi temeline dayanır. Fakat küçük apoptotik cisimcikler tespit edilemeyebilir veya büyük sitoplazmik granüller yanlışlıkla apoptotik cisimcikler olarak düşünülebilir. Ek olarak işlem esnasında antijenite kaybından dolayı aynı dokuda enzimatik ya da immünohistokimyasal metod kullanılamayabilir. Fakat bu doku, transmisyon elektron mikroskopide kullanılabilir.

Transmisyon elektron mikroskopi (TEM), apoptozun belirlenmesinde altın standart metod olarak kullanılmaktadır. Eğer bir doku apoptoz için belirgin özellikler gösteriyorsa bu hücrede apoptoz var denilebilir (78).

Bu özellikler;

- 1- Elektron dens nukleus
- 2- Nukleer kırılma
- 3- Disintegrasyon fazında intakt bir membran
- 4- Sitoplazmik organellerde bozulma
- 5- Büyük nukleer vakuoller
- 6- Hücre yüzeyinde tomurcuklar

Apoptoz süreci ilerledikçe bu hücreler, hücreden hücreye adezyonlarını kaybederler ve komşu hücrelerden ayrılırlar. Apoptozun son dönemlerinde hücre apoptotik cisimciklere ayrılır ve bu cisimcikler sitoplazmik organeller ve/veya nukleer kırıklar içerebilir.

Apoptotik cisimciklerin fagositozu TEM ile gösterilebilir. TEM' in dezavantajları yüksek maliyeti, zaman gerektirmesi, bir anda oldukça küçük bir alanın değerlendirilmesi, apoptoz özellikleri gösteren hücrelerin hızla ortadan kaldırılması ve apoptozun çok erken dönemlerde tespit edilememesidir.

DNA Kırılması

DNA Laddering tekniği apoptozun endonukleaz yıkım ürünlerinin gösterilmesi için kullanılır. Bu metod parçalanmış hücresel homojenatlardan DNA ekstraksiyonu sonrası jel elektrofezinden geçirilmesiyle sağlanır. Bu şekilde her biri 180 bazlık baz çiftleri içeren DNA Ladder' ler elde edilir. Bu metod apoptoz için gösterilecek az sayıda hücre varsa, uygun değildir. DNA kırılması apoptozun son basamaklarında oluşması nedeniyle bu fragmanların olmaması apoptoz olmadığını göstermez. Ayrıca nekrotik hücrelerde nukleer kırılmalar gösterebilir. İşlem esnasında nukleer kırılma oluşabilir.

TUNEL (Terminal dUTP Nick End Labeling), endonukleaz yıkım ürünlerini ve DNA kırıklarını terminal kısımlardan işaretleyerek belirler. Terminal transferaz enzimi işaretlenmiş UTP (uridin trifosfat)' yi DNA' nın 3- terminal noktasından işaretler (79). Takibinde DUTP (deoksiuridin tri fosfat) birçok propla işaretlenebilir ve böylece ışık mikroskopi ile tespit edilebilir şekle gelir. Üç saat içinde değerlendirilebilir. Bu metodun dezavantajları maliyeti ve bu metodla tespit edilebilmesi için gereken DNA kırığı sayısının tam olarak bilinmemesidir. Ayrıca nekrotik hücrelerde oluşan DNA kırıkları ve tamir ve gen transkripsiyonu esnasında

oluşan DNA kırıkları işlemde yanlış pozitifliğe neden olabilir. Bu nedenle başka metodlar ile desteklenmelidir.

Kaspazlar, Yıkım Ürünleri, Düzenleyici Ve İnhibitörlerinin Tespit Edilmesi

Şu an tetkik edilebilen on üç tane bilinen kaspaz (prokaspaz ya da sistin kaspaz) vardır. Bunlardan başka immünohistokimyasal yöntemle fosforile histonlardan işaretlemekle de belirlenebilir (80). Florasanla işaretlenmiş kaspaz inhibitörleri ile de hücre içinde aktif kaspazları tespit edebilir. Kaspaz aktivasyonu Western blot, immünpresipitasyon veya immünohistokimyasal yöntemlerle tespit edilebilir. Prokaspazlar ve aktif kaspazlar için bir çok poliklonal ya da monoklonal antikör vardır.

Hücre lizisi sonrası serbestleşen kaspazları, antikaspazlarla işaretleyerek florasan yöntemle tespit edebilen yöntem vardır.. Bu yöntem başlangıç ya da infaz edici yolaktaki kaspazları tespit edebilir. Bu metod ortamda apoptoz olduğunu gösterirken apoptozun nerede olduğunu göstermemektedir. Bir diğer dezavantajı ise kaspaz aktivasyonu daima apoptoz olacağını göstermemektedir. Ayrıca kaspaz ailesi içerisindeki üyeler arasındaki benzerlikler duyarlılığı azaltmaktadır.

PCR(polimerase chain reaction) tekniği apoptoz sürecinde rol alan 112 geni tespit eden bir yöntemdir. PCR yöntemiyle bu süreçte yer alan gen profilleri reseptörleri, intraseluler reseptörler, ligandlar tespit edilebilir.

Membran Değişiklikleri

Apoptoz hücrelerde fosfotidilserin residülerinin dış hücre membranına doğru eksternolizasyonu, anneksin V' nin doku ve kültürlerde tespit edilmesini sağlar. Apoptoz olan hücreler FITC(Fluorescein isothiocyanate) ile işaretlendikten sonra florasan mikroskopi ile gösterilebilir. Bu metodun avantajı yüksek sensitivitesidir. Dezavantajı ise nekrotik hücrelerin işaretlenebilmesidir. Dolayısıyla burada kritik nokta fosfotidilserinle işaretlenmiş hücrelerin membran bütünlüğünün devam ettiğinin gösterilmesidir. Nekrotik hücrelerde membran bütünlüğünün bozulmuş olması nekrozun patagonomik özelliği olması nedeniyle nükleuslar membran permeabilitesi artmış hücrelere girebilen tripan mavisi gibi boyalarla boyanabilir. Boyayı alan hücreler büzüşür ve koyu bir şekilde boyanır. Dolayısıyla bu boyalarla boyanmayan hücreler apoptoz olan hücrelerdir.

Mitokondrial Testler

Mitokondrial testler ve sitokrom c salınmasının gösterilmesi apoptozun intrinsik yolunun erken basamaklarının gösterilmesinde kullanılabilir. Laser scanning konfokal mikroskop oldukça ince mikroslyatlar oluşturarak zaman içerisinde intakt hücrelerde oluşan moleküler olayları anlamamıza yardımcı olur. Bu metodla mitokondrial membran transizyonu, iç mitokondrial membran depolarizasyonu, mitokondrial redoks durumu ve Ca girişi gösterilebilir. Bu metodun dezavantajı bu değişikliklerin nekrotik süreçte de oluşabilmesidir. Apoptoz esnasında dış mitokndrial membrandaki elektrokimyasal gradient kaybolur ve bu da florasana katyonik boyalarla gösterilmesine izin verir. Sağlıklı hücrelerde lipofilik boya mitokondride toplanır ve florasana yöntemle tespit edilebilir hale gelir. Apoptoz olan hücrelerde dış mitokondrial membranda elektrokimyasal gradient kaybolur ve katyonik boya sitoplazmaya akar.

Sitokrom c salınımı yaşayan ya da fikse hücrelerde florasana ya da elektron mikroskopi ile gösterilebilir. Apoptotik ya da apoptotik olmayan hücrelerde Bax, Bid, bcl2 florasana ya da konfokal mikroskopi ile gösterilebilir.

2.7. Prematür Over Yetmezlik (POY)

Menopoz ortalama olarak ellili yaşlarda başlar **(81)**. Kadınlar hayat sikluslarının üçte birini menopozda geçirmektedirler. Menopoz yaşı sigara içimi, alkol tüketimi, aile hikayesi, düşük sosyoekonomik düzeyle ilişkilidir. Sigara kullanımı miktar ve süresi ile ilişkili olarak doğal menopozun ortalama olarak 1-2 yıl daha erken görülmesine neden olmaktadır **(82)**. Menopozla beraber vajinal kuruluk, libidoda azalma nedeniyle seksüel davranışta azalma olmaktadır **(83)**. POY , 40 yaşından önce adet kanamalarının kesilmesi, hipoöstrojenizm bulgularının ortaya çıkması ve gonodotropinlerin artışıyla karakterizedir. POY prevalansı 40 yaş altı popülasyonda %1,2 otuz yaş altı popülasyonda %0,1 dir **(84)**.

POY insidansı etnik kökene göre de farklılık gösterir; Kafkas ırkında %1, Afrika ve Amerika 'da %1.4 , Hispanik %1.4, Çin %0.5 ve %0.1 Japon ırkında görülür **(85)**. Primer amenore ile başvuran olgulardaki prevalansı %10-28 iken, sekonder amenore ile başvuran olgularda prevalansı %18 olarak bildirilmiştir **(86)**.

Normal karyotipi olan POY hastalarının 1/3 ünden fazlasında pelvik ultrasonografi de over folikülleri gözlenmektedir **(87)**. Yaklaşık yarısında 50 pg/ml

düzeyinde östrojen düzeyleri mevcuttur. Normal kadınların aksine POY hastalarında folikül çapları östradiol konsantrasyonu ile uyumlu değildir. %20 POY hastası tanı aldıktan sonra normal over folikül fonksiyonuna sahip olur. Dört ay içerisinde spontan olarak ovulasyon yapabilir ve %50 si aralıklı over folikül fonksiyonları gösterir **(88)**.

Overlerdeki oositlerin çeşitli nedenlerden dolayı menopoz yaşından önce tükenmesi erken menopoz veya POY olarak adlandırılır. POF, 40 yaşından önce amenore, hipoöstrojenizm ve yüksek gonadotropin seviyesi ile seyreden bir durumdur. POY için 3 tanısal kriter mevcuttur **(89)**.

- 4 aydan uzun süren amenore,
- 40 yaşından küçük olmak
- En az bir ay ara ile iki sefer serumda belirlenen FSH seviyesi, 40mIU/ml 'den fazla olması.

POY'lu kadınların biyokimyasal olarak serumlarına bakıldığında yüksek seviyede LH ve FSH gözlenirken, düşük seviyede östrojen ve inhibin görülür. Bu hormonlardan inhibin A dominant foliküllerden ve korpus luteumdan salınırken, inhibin B ise antral foliküllerin granüloza hücrelerinden salınmaktadır **(90)**. Bununla birlikte, POY'lu kadınların overlerinde proapoptotik genler daha fazla eksprese edilirken antiapoptotik genler eksprese edilmez.

İnfertil hasta popülasyonunda POY, gün geçtikçe daha sık görülmekte ve over hiperstimülasyonuna kötü yanıtı olguların önemli bir oranını oluşturmaktadır. Bu hastalara uygulanan yüksek doz over hiperstimülasyon uygulamalarına rağmen oosit elde etmede başarı şansı oldukça düşüktür. Daha önceleri prematür over yetmezliği geri dönüşümsüz olarak düşünülmesine rağmen günümüzde kaynaklarda %5-10 hastada ovulasyon ve gebeliğin oluşabildiği görülmüştür **(91)**. Bu popülasyonda gebelik kayıp oranları normal popülasyona benzerdir. Gebelikte spesifik hastalıklara neden olmaz **(92)**.

Prematür over yetmezliği over fonksiyonunun tamamıyla kaybindan daha ziyade uygun fonksiyon göstermemesi olarak düşünülmektedir. Spontan POY olan hastalarda donor oositleriyle in vitro fertilizasyon siklusları tedavi başarı şansı yüksek olan tedavi seçeneğidir **(93)**.

Etyoloji

İatrojenik ; Radyasyon maruziyeti, kemoterapi, geçirilmiş over cerrahisi

İnfeksiyon; Ciddi PID, fetüste veya erişkinde kabakulak enfeksiyonu

Enzim eksiklikleri; Galaktoz 1 fosfat uridil transferaz eksikliği (Galaktozemi), 17 alfa hidroksilaz eksikliği, 17-20 desmolaz eksikliği

Genetik; sitogenetik; XO Turner sendromu, Mosaizm, X gen delesyonları ve inversiyonları

Genetik;gen mutasyonları: 2p FSHR gen, X geninde FRM1 geni

Otoimmün

İdiopatik; POY hastalarının %90'ında herhangi bir neden bulunamamakta ve idiyopatik olarak adlandırılmaktadır.

Folikül Azalması

Over folikülleri doğumdan önce meydana gelmektedir ve bu foliküller folikül havuzunu oluşturmaktadır. Germ hücre migrasyonu, oogonia proliferasyonu, mayozun başlamasındaki herhangi bir bozukluk bu folikül havuzunun azalması ile sonuçlanır. Ailesel 46 XX gonadal disgenezide, germ hücre migrasyonunda rol alan genlerde somatik mutasyon folikül havuzunun azalması ile sonuçlanır.

Hızlanmış Foliküler Atrezi

Doğumda overlerde yaklaşık bir milyon folikül bulunmaktadır ve bu foliküllerden yalnızca 400 tanesi ovule olmaktadır. Foliküllerin %99.9 apoptoz olarak adlandırılan programlı hücre ölümü ile atreziye uğramaktadır. Gonadotropinler, östrojen ve büyüme faktörleri bu süreçte foliküllerde apoptozu azaltırken TNF alfa, FasL ve androjenler apoptozun uyarıcıları olarak bilinmektedir. Overde programlı hücre ölümünde artış idiyopatik POY 'un altta yatan mekanizmalarından birisi olarak düşünülmektedir (94).

Genetik Faktörler

İki X kromozomu normal foliküler oluşum ve fonksiyon için gereklidir. Turner Sendromunda X kromozomu tam olarak yoktur ya da tama yakın yoktur. Bazı Turner sendromlu olgularda kromozomda mosaizm ya da delesyonlar vardır. Tam olarak X kromozomu olmayan Turner sendromlu hastalarda POY un en ciddi hali bulunurken, delesyon ya da mosaizm olan olgularda daha hafif POY gelişmektedir.

Turner sendromu olan genç kızların %10-20 sinde spontan puberte, %2-5 inde spontan menstruasyonlar bildirilmiştir.

Prematür over yetmezliğinden sorumlu tutulan genler aştırılmıştır. Xq üzerinde POY lokusu olduğu gösterilmiştir. Xq21.3-q27 ya da Xq26.1-q27 olan hastalarda 24-39 yaş arası POY gelişirken Xq13.3-q21.1 olan olgularda 16-21 yaş arası POY gelişmektedir **(95, 96)**.

Frajil X mutasyonu taşıyıcısı olan kadınlar fenotipik olarak normaldirler. Fakat erken menopoza girmektedirler. Conway ve ark. **(97)** POY populasyonunda Frajil X premutasyonlarını genel populasyona göre 10 kat daha sıklıkta bulmuşlardır. Galaktozemi, galaktoz 1 fosfat uridil transferaz enzim eksikliği sonucu gelişen metabolik bir hastalıktır. Galaktozemili olguların %81 inde prematür over yetmezliği gelişmektedir **(98)**. Altta yatan mekanizmalar için fetal hayatta germ hücre migrasyonunun biriken galaktoz tarafından bozulması sonrası oogonia sayısında azalma, doğumdan sonra artan atrezi, biyolojik olarak inaktif gonadotropin oluşumu, öne sürülmektedir.

Radyoterapi ve Kemoterapi

Neoplastik hastalıkların tedavileri ile kür sağlandıkça, bu hastalarda gelişen over toksisitesi nedeniyle POY gelişmektedir **(99)**.

Otoimmün Durumlar

POY olgularının %10-30 unda otoimmün hastalıklar bulunmaktadır. İmmün sistemle POY arasındaki ilişkiyi düşündüren bulgular: diğer otoimmün hastalıklarla beraberlik, antiover antikörlerin varlığı, ooforit histolojik işaretleri, immünoterapi sonrası geriye dönmedir. POY ile ilişkili otoimmün hastalıklar arasında Tip 1 Diabetes mellitus, Addison hastalığı, Poliendokrin Otoimmünite, Hipotiroidi, Pernisiyöz Anemi, Vitiligo, Myasthenia Gravis, Crohn Hastalığı, SLE (sistemik lupus eritomatozus), RA (romatoid artrit) dir. Poliglandüler organ yetmezliği tip 1 olan hastaların %60 ında over yetmezliği eşlik eder.

Kaynaklarda POY olan ve gebelik arzusunda olan hastalara gonadotropin tedavisi, östrojen tedavisi, klomifen tedavisi gibi birçok ilaç denenmesine rağmen tedavide oosit donasyonuna alternatif olamamıştır.

2.8. Vinylcyclohexene Diepoksit (VCD)

Vinylcyclohexene diepoksit (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-bütadien dimerizasyon formuna 4-vinylcyclohexene (VCH) adı verilmektedir. VCD, VCH'nin metabolitidir. VCD sigara ve kömür dumanında bulunur. VCD, diepoksit ve epoksi resinleri için aktif seyrelticidir **(100, 101, 102, 103)**.

VCD ve VCH overlere toksik etki yapmaktadırlar. VCH sadece farelerin overinde VCD ise hem fare hem de sıçan overlerine toksiktir. VCD sıçanlarda hepatik mikrozomal enzimlerle hızla toksik olmayan diollere metabolize olur. VCD'nin primer ve primordial folikülleri parçalamasıyla yetişkin sıçanlarda prematür over yetmezliğine sebep olur. Bu toksisite, hipotalamus-hipofiz sistem aracılığıyla gerçekleşmez. VCD direk olarak overlere toksiktir **(104, 105, 106, 107)**.

VCD ile toksisite oluşturmak için tekrarlayan dozlarda ve belli bir süre uygulanması gerekmektedir. Otuz gün uygulamalarda küçük foliküllerin önemli kaybı (primordial, primer ve büyüyen folikül) görülmüştür. Bununla birlikte kısa süreli araştırmalarda primordial ve primer folikül sayılarında azalma ilk olarak on ikinci günde görülmüştür. Bu zamanda büyüyen foliküllerde değişiklik görülmemiştir. VCD aracılı ovotoksisite ilk olarak onuncu günde görülür. Bu günde kontrol grubuna göre sağlıklı foliküllerin yüzdesi artarken önemli bir folikül kaybı görülmez. VCD'nin meydana getirdiği sağlıklı foliküllerin görüntüsü kontrol grubunda atretik foliküllerin görüntüsüne benzer **(104, 108, 109)**.

VCD sıçan ve fare primordial ve primer oosit sayısını selektif olarak azaltır. Araştırmalarda VCD'nin neden olduğu hücre ölümü ve folikül kaybının apoptoz yoluyla gerçekleştiği belirtilmektedir ve apoptoza giren hücrelerin iki hücre içi sinyal yolunu takip ettikleri belirtilmektedir **(105, 109, 110)**. Birinci apoptoz sinyal yolunda VCD apoptoz mekanizmasının ana bileşeni olan kaspaz adı verilen sistein proteaz ailesini etkileyerek folikül kayıplarını gerçekleştirir. Kaspazlar, inaktif öncül (prokaspazlar) olarak eksprese olurlar ve proteolitik yarıklanmayı aktive ederler. Proapoptotik sinyaller kaspaz-2, -8 ve -9 gibi başlatıcı kaspazları aktive eder. Bir kez aktivasyon olduğunda başlatıcı kaspazlar, yürütücü kaspazlara yapışır ve onları aktive ederler (kaspaz-3, -6 ve -7) **(111, 112, 113, 114)**.

2.8.1. VCH/VCD ve Toksikoloji Araştırmaları

NTP (National Toxicology Programme) araştırmasında dişi ve erkek sıçan ve farelere 2 yıl süresince oral yolla VCH ya da dermal yolla VCD uygulanmıştır. VCH uygulanan hayvanlarda over neoplazmlarda, malign lenfomada ve akciğerlerde bronkoalveolar kanserlerde ve klitoral kanserlerde artış saptanmıştır. VCD uygulanan hayvanlarda deride çok nadiren neoplazm (skuamöz hücreli karsinom), overlerde neoplazmda artış ve akciğerlerde bronkoalveolar adenom ve karsinom artış olmuştur. Diğer dokularda VCD nin toksik etkisine rastlanmamıştır **(102)**. Oral veya dermal VCD uygulanan sıçanlarda on üç haftada over ve uterus atrofi oluşmuştur. Araştırmanın sonunda overlerde herhangi bir folikül veya korpus luteum gözlenmemiştir. Erkek sıçanlarda germinal epitelde dejenerasyon oluşmuştur **(59)**.

Dişi Fischer 344 türsıçanlara 25 gün VCD uyguladıktan dört ay sonra overler içerisine DMPA (Dimethylbenz[a]anthracene) (sigara dumanında bulunur.) uygulandığında üç ay içerisinde %42, beş ay sonrasında %57 oranında Sertoli Leydig hücreli seks kord stromal tümör gelişimi bildirilmiştir **(267)**. şu ana kadar insanlarda VCD ilişkili kanser bildirilmemiştir.

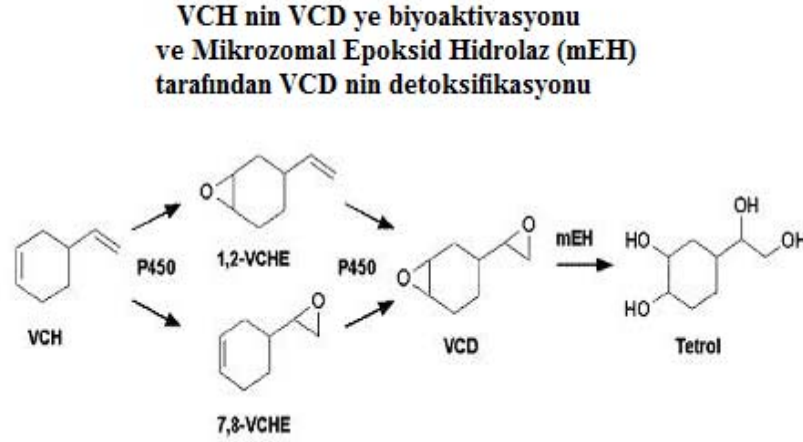
VCH maruziyetinde kalan endüstriyel işçilerde nazal irritasyon, başağrısı şikayetleri bildirilirken, VCD maruziyeti sonrasında hafif orta düzeyde dermal irritasyona bağlı şikayetler bildirilmiştir **(115)**.

VCH ve VCD Metabolizmasında Karaciğerin Rolü

4-vinilsikloheksen (VCH), hepatik CYP 2A (cytochrome P450) ve 2B ile monoepokside (VCM) ve takiben ovotoksik diepoksid metabolite (VCD) biyoaktif olur **(şekil 12)**.

VCH aracılı over toksisite, diepoksid metaboliti (VCD)' nin bioaktivasyonundan kaynaklanmaktadır **(116, 117)**. VCH, 1,2 veya 7,8-monoepoksid (VCM) in her ikisine de ve takiben sitokrom P450 (CYP 450) enzimi yoluyla VCD' ye biyoaktif olur. VCH aracılı over toksisite için VCD' ye biyoaktivasyon gereklidir.

VCH biyoaktivasyonunda CYP2A ve 2B çok önemlidir. **(118)** VCH nin overe toksik VCD ye biyoaktivasyonu karaciğerde olmaktadır. Hepatik mikrozomal CYP 2A ve CYP 2B enzim aktiviteleri VCH ve VCD maruziyetini takiben artar **(119, 120)**.



Yapılan araştırmalarda kloramfenikol- CYP 450 inhibitörü- uygulandığında kan 1-2 VCH konsantrasyonları azalmıştır (112). CYP 2A ve 2B ye antikorlarla bu enzimler inkübe edildiği zaman VCH nin epoksidasyonunun azaldığı gösterilmiştir (121). CYP2E1 eksik farelerde 1-2 VCH epokside ya da 1-2 VCH epoksidin VCH ye konversiyonu bu enzim olan farelerle benzer oranda olmaktadır. Bu bulgular karaciğerde CYP2E1 in metabolizmada gerekli olmadığını düşündürmektedir (122). VCD karaciğerde glutatyona bağlanarak vücuttan uzaklaştırılmaktadır (123).

VCH ve VCD Metabolizmasında Overlerin Rolü

VCH nin biyoaktivasyonunda rol alan birçok CYP izoformunun mRNA' sı ve protein varyantları fare overlerinde bulunmaktadır. Bu enzimler, VCH ya da VCD uygulanması ile module edilmektedir. Over, VCH' nin ovotoksitesine katkıda bulunmaktadır.

Fare overlerinde mikrozomal epoksid hidrolaz aktivitesi gösterilmiştir. Bu enzim VCD' yi diollere detoksifiye etmektedir (124). Sıçanlarda VCD' nin hedeflediği küçük preantral foliküllerde, büyük foliküllerden daha az epoksid hidrolaz aktivitesi vardır. Preantral ve antral foliküller daha az duyarlıdır. Bu dolaşımdaki epoksidlere neden küçük primer foliküllerin daha duyarlı olduğunu göstermektedir (125).

Farelerden elde edilen 25–100 µm foliküllerde, VCH veya VCD uygulanması, over CYP2A, CYP2B, CYP2E1 mRNA kodlanmasını, kontrol overlere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırdığı görülmüştür (125).

Fare over kültürlerinde VCD uygulaması ile over mikrozomal epoksite hidroksilaz aktivitesinde ve glutathion-S transferaz aktivitesinde artış tespit edilmiştir. Bu detoksifikasyon enzimlerindeki artış on günden sonra olmamaktadır ve VCD nin neden olduğu ovotoksite artmaktadır (126). Overlerde CYP2E1 ekspresyonu mikrozomal epoksite hidroksilaz ile ilişkilidir (127).

VCH ve VCD Metabolizmasının Türler Arası Farklılıkları

VCH nin indüklediği over toksisitesinde epoksidasyon önemlidir. Sıçan ve fare karaciğer ve akciğer mikrozomları 4-VCH yi 4-VCH 1-2 epoksite ve daha az oranda 7-8 epoksidlere çevirmektedir. Farelerde bu işlem daha hızlı ve fazla olmaktadır. Overler tespit edilebilir şekilde bu reaksiyonu yapmamaktadır (128). Üriner boşaltımı hızı farelerde sıçanlara göre hızlıdır. Böylece, farelerde yüksek miktarda epoksid kan konsantrasyonu oluşmakta ve hedef dokularda yüksek konsantrasyonlarda toksik madde oluşmaktadır (129).

VCD, primatlarda yırtıcılara benzer şekilde primordiyal foliküllerde apoptozu indüklemektedir (130). İnsanlarda yapılan araştırmalarda; VCH' nin epoksidasyonu sıçanlara göre daha yavaş bulunmuştur (131). İnsan araştırmaları açısından sıçan modeli fare modeline göre daha iyi bir modeldir.

Over tümör gelişiminin öncesinde folikül kaybı olması nedeniyle VCH ve epoksid metabolitinin over folikül popülasyonunda etkileri araştırılmıştır. Farelerde otuz gün intraperitoneal VCH uygulamasının sonrasında preantral foliküllerde doz bağımlı bir azalma gözlenmiştir (132). VCH sıçanlarda folikül kaybına neden olmamıştır. VCH nin epoksid metabolitlerinin uygulanmasında folikül kaybı her iki türdede gözlenmiştir (106).

VCD, diepoksiddir ve her iki türde folikül deplesyonuna monoepoksidlere göre iki-üç kat daha fazla neden olmaktadır. Sıçanlarla fareler karşılaştırıldığında folikül deplesyonu için ED50 değeri üç epokside göre farelerde 2-3 kat daha düşüktür (129,132). VCD, sıçan ve farelerde primordiyal foliküllere VCH den daha toksik etki göstermektedir. Sıçanlarda VCD için primordiyal foliküllerde %50 kayba neden olan minimum doz on beş gün uygulamada 80 mg/kg/gün (0.57 mmol/kg/gün) olarak bulunmuştur (133).

VCD/VCH ye bağlı ovotoksite inhalasyon, oral, dermal ve intraperitoneal uygulamalardan sonra oluşabilmektedir (106, 115, 134).

2.8.3. VCD/VCH ve Hipotalamohipofiz-Over Aks

Küçük preantral foliküllerin gelişiminin gonadotropinlere bağımlı değildir. VCD' nin bu aks üzerinde etkisi gösterilmemiştir. B6C3F1 farelere otuz gün süresince (yirmi sekiz-elli sekiz gün yaş arasında) VCH uygulandığı ve bir yıl süresince üreme fonksiyonlarını değerlendirildiği araştırmada; küçük preantral foliküllerin %90 ında oositlerde kayıp olmasına rağmen FSH daki yükseklik ilk defa iki yüz kırk gün sonra tespit edilmiştir (135). Over değişiklikler kan hormon değişikliklerinin öncesinde gerçekleşmiştir. Üç yüz altmışıncı günde kontrol hayvanlara göre tam over kayıp tamamlanmıştır. Bu olay artan FSH ve siklisme kaybı ile gösterilmiştir. Morfolojik olarak over folikül yapılarında tam kayıp gösterilmiştir. VCD sıçanlarda insan menopoza benzer şekilde öncelikle direk olarak over folikülleri hedeflemekte, gelişen FSH düzeylerinde yükselme, 17 beta östrodiol düzeylerinde azalma ile siklus değişiklikleri ve menopoza neden olmaktadır (110).

2.8.4. VCH/VCD nin Foliküler Hedefleri

Sıçanlara on beş gün süresince VCD uygulandığında, VCD nin primordial ve primer folikül sayılarında anlamlı bir azalmaya neden olurken sekonder folikül sayılarında herhangi bir kayıp oluşturmadığı görülmüştür. Fischer 344 türsıçanlara VCD' nin 80 mg/kg/gün dozunda uygulandığında, on günde primordial foliküllerde, on ikinci günde primer foliküllerde atrezi görülmüştür. Farelerde 80 mg/kg/gün dozunda, primordial foliküllerde sekizinci günde, primer foliküllerde onuncu günde atrezi başlamaktadır. Büyüyen folikül havuzunda bu dozlarda uygulama sonrasında foliküler kayıp olmamıştır (108). Dolayısıyla VCH/VCD nin asıl hedefi primordial ve primer foliküller olup sekonder foliküllerdeki azalma bu havuzun tükenmesi sonucu ortaya çıkmaktadır.

2.8.5. VCH/VCD Ve Hücre Ölümü

VCD, VCH' nin kimyasal olarak biyoaktif formu olup sıçan ve fare overlerinde selektif olarak oosit kapsayan primordial ve primer folikülleri parçalamaktadır. Yapılan araştırmalarda bu parçalama mekanizmasının apoptoz olduğu gösterilmiştir (108, 109)

Geriye kalan sorulardan bir tanesi şudur : Acaba VCD direk olarak oositi mi yoksa granüloza hücreyi mi hedeflemektedir. Eğer bir oosit ovule olacaksa sağlıklı

granüloza hücreler tarafından çevrenmelidir. Oositle granüloza hücre arasındaki kontak kaybolacak olursa oosit spontan olarak dejenere olacaktır.

VCH/VCD ve Kaspazlar

Yapılan bir araştırmada yirmi sekiz günlük Fisher 344 sıçanlara VCD uygulanmış ve son doz verilmesinden sonra birinci günde ve on beşinci günde sıçanlar sakrifiye edilmişlerdir. Küçük foliküllerde sitozolik kaspaz 3 klivaj aktivitesi birinci ve on beşinci günlerde artmış olarak bulunmuştur. Sitozolik Kaspaz 8 klivaj aktivitesi tek dozdan sonra küçük izole foliküllerde artmazken VCD'nin on beş gün dozundan sonra artmıştır. Kaspaz 9 aktivitesi izole küçük foliküllerde sitozolik fraksiyonlarda değişmezken mitokondrial fraksiyonlarda istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür (112).

VCD uygulanan sıçanlarda, kaspaz 3 aktivitesi, primordial ve primer foliküllerde artmış olup sekonder foliküller ve karaciğer hücrelerde etkilenme olmamıştır. VCD ye karşı ilk cevabın kaspaz 3 aktivasyonu olduğu düşünülmektedir (112).

Kaspaz 3 proteolitik olarak aktive edildikten sonra apoptotik aktiviteyi göstermesi nedeniyle Devin ve arkları sıçan over kültürü yapmışlar ve burada overlerin VCD ile inkube edildiği zaman küçük preantral foliküllerde kaspaz 3 boyanmasının granüloza hücrelerde lokalize olduğunu ve VCD ile inkubasyon sonrası kaspaz 3 de artış olduğunu göstermişlerdir (16).

Apoptotik yollarla ilişkili bir diğer protein sitokrom c dir. Yapılan araştırmalarda VCD'nin mitokondriden sitokrom c diffuzyonu yaptığı gösterilmiştir. Bu immünolojik boyama, oositlerde değil granüloza hücrelerinde lokalizedir (112).

VCD/VCH ve Protoonkojen Bcl 2 Ailesi

Hücrelerde apoptoz belirli kontrol noktalarından geçer. Bunlardan bir tanesi Bcl-2 (B cell lenfoma 2) tip onkojenleri kapsamaktadır. Bcl-2 ve onun homoloğu olan Bclx1 hücre ölümünü önlerken Bax ve Bad hücre ölümünü aktive eder. Bu sinyal yolağında mitokondrial membranda Bax artışı mitokondrial sitokrom c'nin sitoplazmaya sızmasına neden olur ve bu da apoptozom aktivasyonunu sağlar. Sonuçta; proteaz ve kaspaz 3 aktive olur. Yapılan biyokimyasal araştırmalarda VCD

uygulanan sıçanlarda primordial ve primer foliküllerde bu yolağın aktive olduğu gösterilmiştir (137).

Tekrarlayan dozlarda VCD uygulaması sonrası, sıçanlara küçük preantral foliküllerde proapoptotik bad proteinlerinin sitozol ve mitokondrilerde artmış ekspresyonu, bcl-xl proteinlerinin redistribusyonu, sitokrom c nin mitokondriden sitozole akışı ve mitokondride bax/bcl 2 gen oranında artış olmaktadır. Bcl-2 nin aracılık ettiği apoptotik sinyal şelalesi granüloza hücrelerde ve oosite komşu granüloza hücrelerde artmıştır (112,138.). Ancak Flaws ve ark.(139); Bcl-2 aşırı ekspresyonu olan farelerde, VCH daha toksik etki gösterdiğini bildirmiştir.. Bu farelerde primordial, primer ve sekonder folikül sayıları azalmaktadır. Bcl-2 aşırı ekspresyonu olan farelerin doğurduğu farelerde primordial, primer ve sekonder folikül sayıları daha azdır (Şekil 13).

Mitojen Aktive Protein Kinaz (MAPK)

Apoptoz ile ilişkili bir diğer yolak MAPK dır. Üç tane önemli MAPK mevcuttur. Ekstraselluler sinyal regule kinaz (ERK) , C Jun N terminal kinaz (JNK) ve P38 kinaz olup bunlar hücre büyümesi, farklılaşması ve apoptozda rol almaktadır. 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 on beş gün uygulamasının MAPK yolağına etkilerinin araştırıldığı araştırmanın 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 aktivasyona neden olmamıştır. Bcl 2 yolağında olduğu gibi VCD sekonder folikül ve karaciğerde herhangi bir etkiye sahip olmamıştır (140). Bu bulgular VCD nin apoptoza MAPK yolağı aktivasyonu ile neden olduğunu göstermektedir (Şekil 14).

Sonuç olarak; VCD preantral foliküllerde apoptozu indükleyerek hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu foliküller VCD için hedef populasyondur. Sekonder ve antral foliküllerde apoptoz indüklenmemektedir. Karaciğerde bu mekanizmalar çalışmamaktadır. Bu dokular hedef dışı kalmıştır.

VCH/VCD Hücresel Değişiklikler

On gün VCD uygulanan sıçanlarda elektron mikroskopisinde; apoptozun granüloza hücrelerde başladığı ve oosit ve granüloza hücrelerinin kontaklarını kaybettikleri gösterilmiştir. Granüloza hücre katı neredeyse tamamen apoptoza uğramakta ve sonrasında oosit dejenerasyonu, tekal hipertrofi, folikül çapında düşme meydana gelmektedir VCD uygulaması sonrasında büyük foliküllerde etkilenme olmamaktadır. On gün VCD uygulanan sıçanlarda primordial foliküllerde kontrol folikülleriyle benzer sayıda atrezi gözlenmiştir. Primordial foliküllerde granüloza hücreleri normal görünmektedir. Oositlerde. vakuol sayısında artış, nuklear membranda sisternalarda şişme, mitokondrilerde şişme olmaktadır. Bu değişiklikler kontrol grubunda gözlenen değişikliklere benzerdir **(110)**.

VCD özellikle primordial ve primer foliküllerden elde edilen oositleri etkilemektedir. Yapılan araştırmalarda in vivo VCD ye maruz bırakılan hayvanlardan FSH ve HCG uygulaması ile elde edilen oositlerde bir miktar kırılabilirlik artışı olmuş ancak fertilizasyonda bir kayıp gözlenmemiştir **(19)**.

VCD'nin Moleküler Hedefleri

Yapılan araştırmalarda VCD'nin oosit spesifik genlerde de etki gösterdiği bulunmuştur. Tirozin kinaz reseptörü, c kit, oosit membranında eksprese olmaktadır. Granüloza hücreleri buna karşı stem cell faktör olan bir ligand üretmektedir. Kit ligandla c kit arasındaki ilişki normal over folikülogenez için gereklidir. Neonatal sıçan kültür sistemi kullanılarak yapılan araştırmalarda VCD inkubasyonu c kit mRNA ekspresyonunu inhibe etmektedir **(141)**. Kültür sistemine Kit ligand eklenmesi preantral foliküllerde atreziyi engellemektedir. Ortama GDF9 ve BMP4 eklenmesi VCD ilişkili ovotoksisteyi engellememektedir **(142)**. Bu da oositte de bazı mekanizmaların aktif hale gelmiş olacağını düşündürmekle beraber tam olarak hangi yolak etkilenmiş gösterilememiştir **(138)**.

İn Vitro Over Kültürleri

Neonatal sıçanlardan ve postnatal 4 günlük sıçanlardan elde edilen overlerden otuz gün süresince organ kültürleri yapıldığında bu kültürde çok sayıda primer ve primordial folikülün bulunduğu görülür. Kültürün sekizinci gününde preantral folikül sayılarında azalma saptanmıştır. Kültür süresi uzadıkça folikül kaybı daha da fazla

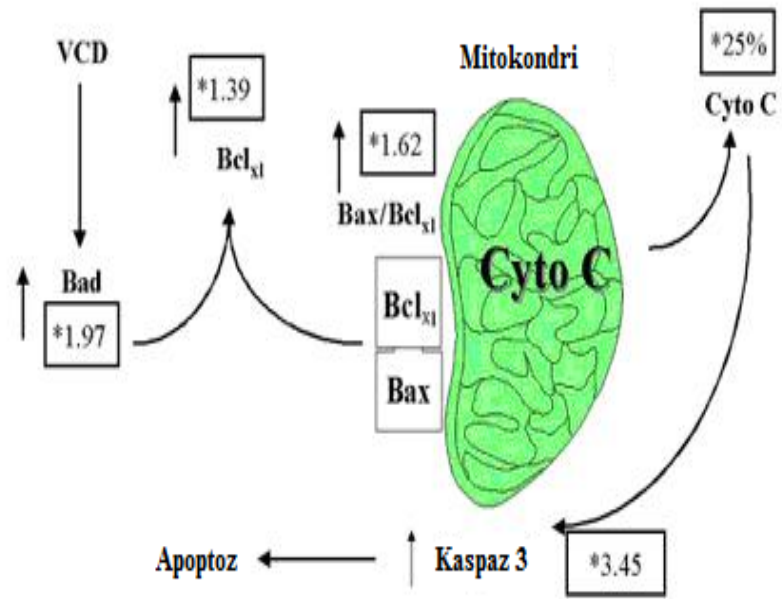
görülmüştür. Folikül kaybı özellikle primordial ve primer foliküllerde olmuştur. Kaspaz 3 ve DNA kırılmasında (TUNEL) artış gösterilmiştir **(16)**.

Devine ve ark. **(143)** postnatal Fischer 344 türsıçanlardan elde ettikleri over folikül kültüründe VCD etkisini araştırmışlardır. On beş gün VCD uygulaması doz bağımlı olarak primordial ve primer folikül sayılarında azalma saptamışlardır. Tek doz VCD uygulamasından on beş gün sonra primordial ve primer folikül sayılarında azalma saptamışlardır. 320 mg/ gün VCD uygulaması in vivo altı gün sonra ovotoksisiteye neden olmaktadır. VCD uygulaması bir süre sonra ovotoksisiteye neden olmaktadır.

Oksidatif Stress

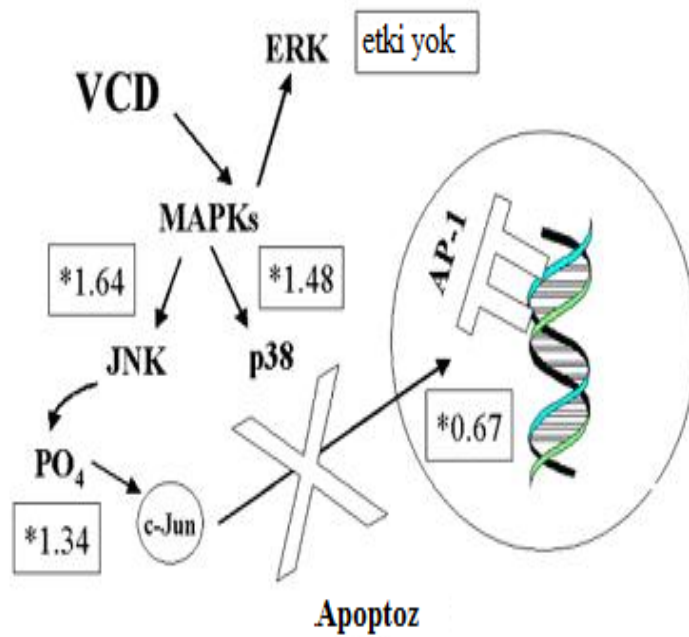
Over kültürlerinde VCD ile beraber antioksidanlar denenmiş ve on beş gün kültür sonrasında vitamin E, Vitamin C ya da glutathionun VCD' nin neden olduğu folikül kaybına engel olmadığı gösterilmiştir. Dolayısıyla VCD, foliküler oksidatif stresi artırmamakta sadece doğal bir mekanizma olan atreziyi hızlandırmaktadır **(143)**.

Devine ve ark. **(123)** dişi sıçanlara VCD uygulaması sonrasında overlerde GSH(GSGG) düzeylerinin değişmediğini göstermişlerdir. GSH karaciğerde, VCD eliminasyonunda kullanılmaktadır.



Şekil 2.9. 15 günlük dozda VCD'nin mitokondrial etkisi

VCD'nin Nükleer Etkileri 15 günlük doz- VCD



Şekil 2.10. 15 günlük dozda VCD'nin nükleer etkisi

2.8.6. VCD/VCH Over Yetmezlik Modelleri

Mayer ve ark. (144) 10 gün süresince yüz altmış mg/kg/gün i.p VCD uygulamışlardır. Farelerde siklus uzunluğu artmıştır. VCD uygulanan farelerde irregular sikluslar on beş günde %29, otuz yedi günde %50, kırk altı günde %75, elli sekiz günde %100 olmuştur. Kontrol farelerde FSH düzeylerinde değişiklik olmamasına rağmen on beş günde VCD uygulanan farelerin plazmalarında FSH da artış saptanmamıştır. Otuz yedinci günde plazma FSH düzeyleri kontrol grubuna göre artmıştır. VCD uygulanan farelerde kırk altıncı güne kadar FSH artışı devam etmiş ve ellisekizinci günde- yüzüncü gün arasında plato olmuştur.

Lohff ve ark. (151) yirmisekiz günlük immatur dişi B6C3F1 farelere 80mg/kg/gün VCD uygulamışlardır. On gün doz VCD alan farelerde final doz uygulandıktan sonra primordial foliküller, küçük primer foliküller ve büyük primer foliküllerde kontrol grubu farelere göre istatistiksel olarak anlamlı değerlerde azalma tespit etmişlerdir. Yirmi gün doz uygulanan farelerde tüm foliküllerde istatistiksel anlamlı şekilde azalma tespit etmişlerdir. On gün-doza VCD alan farelerde kırkdördüncü günde FSH değerlerinde artış ve yüz dört-yüzaltmış altıncı günde folikül kalmadığını, yirmi gün doz VCD alan farelerde otuzbeşinci günde FSH değerlerinde artış ve kırk üç-altmış üç gün de folikül kalmadığını tespit etmişlerdir.

Hooser ve ark.ları otuz gün VCD 80mg/kg/gün uygulamasının arkasından gözlenen değerlerde prematür over yetmezliğinin üç yüz altmış gün sonra oluştuğunu göstermişlerdir (135).

İnsanlara benzer şekilde FSH artışından folikülün kalmadığı güne kadar geçen süre perimenopoz dönemi olarak değerlendirilebilir. VCD uygulanan sürenin artmasıyla beraber over yetmezliğin daha erken oluşabileceğini gösterilmiştir. VCD overin vücut içerisinde kaldığı perimenopoz- menopoz modeli oluşturulmasında uygun bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır (151) (Şekil 15).

Mayer ve ark. (144) yüz yirmi yedinci günde bakılan FSH, LH, progesteron ve androstenedione düzeylerini siklik kontrollerine göre daha fazla ölçmüşlerdir. 17 β Östrodiol düzeyleri tespit edilemeyecek düzeylere inmiştir. Sonuç olarak folikül tükenmiş fare overleri endokrin fonksiyon olarak androjen üretmekte ve bu durum postmenopozal overle benzerlik göstermektedir. Bu overlerde steroidojenik enzimler eksprese olmaktadır. FSH ve LH düzeyleri artmış ve androstenedion düzeyleri

ölçülebilir düzeydedir **(145)**. Bu nedenle VCD menopoz model araştırmalarında uygun bir alternatiftir.

Mayer ve ark. **(144)** yüz yirminci günde overlerde kontrol farelere göre atrofi gözlemişlerdir. Over ağırlığı kontrol overlerin %20 si uterus ağırlığı kontrol overlerin % 50 si düzeyinde kalmıştır. Diğer organların ağırlığına bakıldığında VCD grubuyla kontrol grubu arasında fark saptamamışlardır.

VCD uygulamasıyla beraber ALT(alanin amino transferaz) ve AST (aspartat amino transferaz) düzeylerinde değişiklik saptanmamıştır **(144,146)**. Ancak erişkin sıçanlarda serum kreatinin değerlerinde artış gösterilmiştir **(146)**.

Ito ve ark. **(146)** Spraque Dawley sıçanlarda yaptıkları araştırmada, bu cins sıçanlara yirmi sekiz günlükken, iki ya da dört hafta süresince 5, 20,80 mg/gün VCD uyguladı. Dört hafta süresince VCD uygulanan sıçanlarda 20 mg ve 80 mg dozlarında ve iki hafta süresince VCD uygulanan guruplarda 80 mg dozlarında küçük foliküllerde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit etmişlerdir. Erişkin sıçanlar VCD nin iritan özelliklerine daha duyarlıdır. Bu gurup sıçanlarda daha düşük dozda VCD kullanılmalıdır.

Flaws ve ark. **(104)** Fischer 344 türelli sekiz günlük erişkin sıçanlara ve yirmi sekiz günlük inmatür sıçanlara 80mg/kg/gün otuz gün süresince VCD uygulamışlardır. VCD uygulanan erişkin sıçanlar inmatür sıçanlarda olduğu gibi primordial ve primer foliküllerde ve bu foliküllerin oositlerinde apoptoz artışı ile karakterizedir. Dolayısıyla bu mesleksel toksik ajana reproduktif hayatın herhangi zamanında maruziyet folikül sayısında azalma ile karakterize olup prematür over yetmezliği oluşturmaktadır.

Flaws ve ark. **(147)**, matür ve immatür Fischer 344 türsıçanlardan elde ettikleri overlerden folikül izolasyonu ile folikülleri elde ettiler. İnmatür sıçanlarda VCD nontoksik tetrol ürünlerine hepatositlerde ve büyük antral foliküllerde, küçük preantral foliküllere oranla 1,5 kat ve interstisyel dokuya oranla dört kat, erişkin sıçanlarda büyük antral foliküllerde küçük preantral foliküllere oranla üç, interstisyel hücrelere oranla on kat daha fazla çevrilmekteydi. İnmatür sıçanlara göre erişkin sıçanlarda VCD, nontoksik tetrol ürünlerine daha fazla çevrilmekteydi. Bu bulgular inmatür ve matür sıçanlarda, preantral foliküller ve interstisyel hücreler büyük preantral foliküller ve hepatositlere göre azalmış detoksifikasyona sahip olduğunu

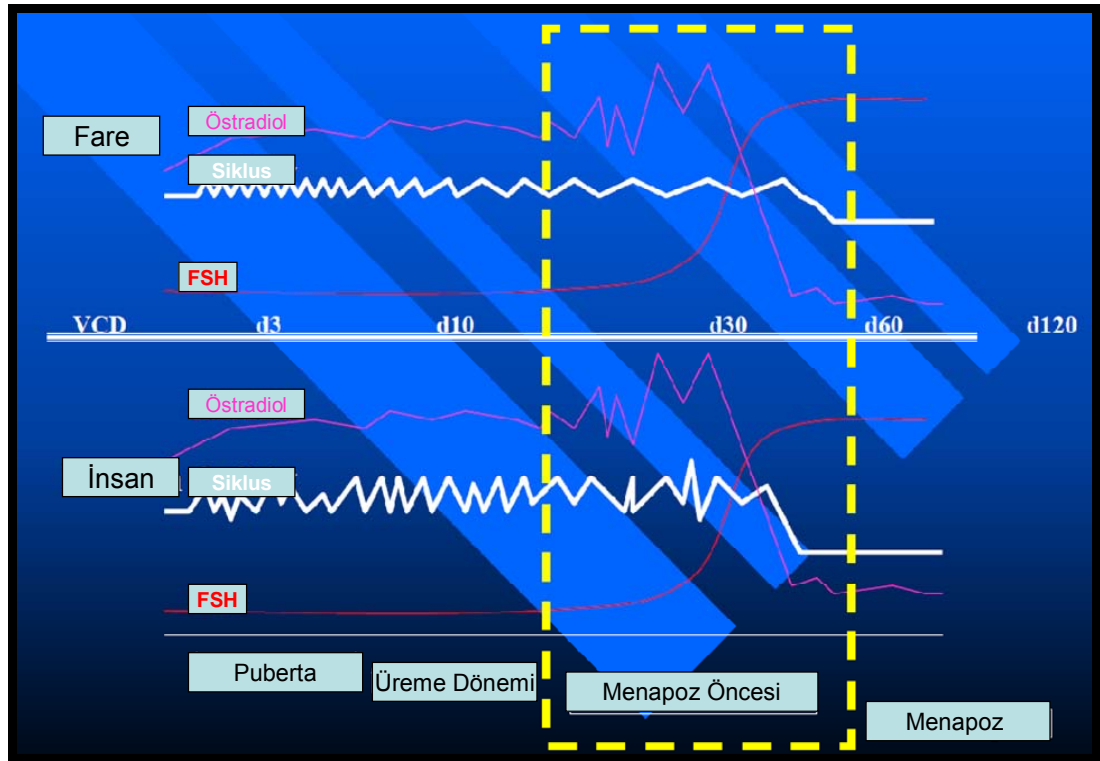
göstermiştir. VCD küçük antral folikülleri hedeflemektedir. İnmatür sıçanlar over yetmezlik modellerinde erişkin sıçanlara göre daha iyi bir model oluşturmaktadır.

VCD/VCH ve Endometrial İmplantasyon

VCD endometriumda çeşitli etkilerle implantasyon sorunlarına (implante olan embryo sayısında azalma, preimplantasyon kayıp) yol açabileceği gösterilmiştir (148). VCD uygulanan farelerde konsepsiyon daha zor olmakta, daha fazla cinsel ilişki gerekmekte ve daha fazla embryo rezorbsiyonu olmaktadır (149). Bu model perimenopozal infertilite modeli olarak kullanılabilir.

VCD ve Östrojen Tedavisi

17 β östrodiol ve östrojen reseptör (ER) agonisti olan genistein VCD'nin indüklediği folikül kaybına karşı koruyucu etki göstermektedir. Bu koruyucu etkide östrojen reseptör alfa ($ER\alpha$) ve ER Beta(β) rol aldığı düşünülmektedir. Ancak VCD ye bağlı ovotoksisitede $ER\alpha$ ve $ER\beta$ rol almamaktadır (150).



Şekil 2.11. İnsan ve VCD uygulanmış farelerin üreme dönemlerindeki hormonların karşılaştırılması (151).

VCD ve Anti mülleryan Hormon (AMH)

VCD uygulanan fare overlerinde AMH immün boyanma şekli kontrol overlere benzerdir. VCD primordial ve primer foliküllerde apoptoza neden olmakta ve granüloza hücre miktarını azaltmaktadır. Farelerde serum AMH düzeyleri büyüyen folikül sayısı ile korele olup, serum AMH düzeyleri VCD uygulanmış farelerde büyüyen folikül havuzunu değerlendirmede kullanılabilir **(152)**.

2.8.7. VCD ve Hayvan Model Araştırmaları

Yapılan araştırmalarda genç hayvanlarda gonadal hormonlar, epilepside nöbet başlamasını ve yayılmasını etkilemektedir. Çeşitli araştırmalarda gonadal steroidlerin nöbet duyarlılığına etkisi gösterilmiştir. Özellikle progesteron akut ve kronik epilepsi modelinde anti-konvulziv bir etki göstermiştir. Ek olarak östrojen nöbet eşiğini düşürmekte ve nöbeti kolaylaştırmaktadır. Östradiol nöbet eşiğini azaltmakla beraber hipokampal nöronlarda nöron koruyucu etkilere sahiptir. Schauwecker ve ark. **(153)** ooforektomi ya da VCD uygulayarak oluşturdukları sıçan menopoz modelinde subkutan kainat uygulaması ile temporal statüs epileptikus nöbeti oluşturmuşlardır. Bu modelde östrojenin nöbet süresi ve nöbet şiddeti arasında etkilerini araştırmışlardır. Kontrol gurupları ile karşılaştırıldığında şiddetli nöbet süresinde fark yokken, VCD, ooforektomi ve ooforektomi-östrojen uygulanan farelerde daha uzun süreli nöbet gözlenmiştir. VCD ya da ooforektomi uygulanan farelerde nöbetin hipokampal nöronlarda indüklediği nörotoksisite azalmakla beraber ooforektomi-östrojen uygulanan sıçanlarda daha az olarak gözlenmiştir.

Acosta ve ark. **(154)** VCD uygulayarak ya da ooforektomi uygulayarak oluşturdukları sıçan menopoz modelinde, menopozun kognitif fonksiyonlar üzerine etkisini araştırmışlardır. VCD uygulanan sıçanlarda yakın zaman şekilleri öğrenmede bozulma gerçekleşmiştir. VCD uygulanan sıçanlarda ooforektomi uygulanmasını takiben bu bozukluk düzelmiştir. VCD grubunda hafıza daha iyi olmuştur. Ooforektomi hipokampal asetilkolinesteraz aktivitesini artırmıştır. Dolayısıyla VCD grubuyla karşılaştırıldığında ooforektomi sonrası over hormonlarda ani düşme hafıza fonksiyonlarını daha fazla bozmaktadır.

Mayer ve ark. **(155)** LDL-yoksun fareleri iki gruba ayırmıştır. Birinci gruba ooforektomi, ikinci gurup hayvana VCD uygulayarak perimenopoz modeli oluşturmuştur. Farelere yavaş salınımlı 17 beta östrodiol implante etmişlerdir. Yüz

yirmi gün süresince kolesterolden zengin dietle beslemişlerdir. Yüz yirmi günün sonunda aorta ve innominat arterde lezyonları inceledi. VCD uygulanan, ooforektomi yapılan ve kontrol farelerde benzer lokalizasyonda atherosklerotik lezyonlar mevcuttur. 17 beta östrodiol uygulanması her iki arterde de atherosklerotik lezyonları azaltmıştır. Bu iyileşme en fazla VCD-uygulanan farelerin innominat arterinde gerçekleşmiştir. Dolayısıyla VCD perimenopoz-menopoz modeli hormon replazman tedavilerinin etkisi, perimenopozal dönemde kullanılabilecek ilaçların etkisini araştırmak amacıyla kullanılabilir.

Wright ve ark. (156) peripubertal C57/6 farelere on beş gün süresince 160mg/kg/gün VCD uyguladı. Altı hafta sonra over yetmezliği gelişmiştir. Eş zamanlı olarak bir başka grup hayvana ooforektomi uyguladıklarında üç ay sonra DXA (Dualenergy x ray desorptiometry ile vertebra kemik mineral dansite (KMD) ölçüldü. beş ay sonrasında hayvanlar sakrifiye edildi. Kemik yapısı mikro CT (computerine tomography) ile incelendi. Ooforektomi uygulanan grupta vertebra KMD bir ay sonrasında düşerken, VCD uygulanan grupta üç ay sonrasında normal vertebra KMD ye sahipti. VCD uygulanan grupta daha belirgin olmak üzere trabeküler kemikte bozulma gerçekleşmiştir. Femoral diafizde kortikal kemik alanı VCD uygulanan grupta kontrol grubunda benzerlik göstermektedir. Ooforektomi uygulanan grupta ise düşmüştür. Serum androstenedion düzeyleri VCD grubunda değişmezken ooforektomi grubunda düşmüştür. Dolayısıyla VCD ilişkili ovotoksisite trabekular kemikte kayıp yapar. Geriye kalan over dokusundan üretilen hormonlar nedeniyle kortikal kemik korunur. VCD menopoz modeli kemik ilişkili bozuklukların çalışılmasında kullanılabilir.

Keck ve ark.(157) farelere VCD uygulayarak perimenopoz ve menopoz modeli oluşturmuştur. Bu grup hayvanlarda Streptozosin uygulayarak diabet modeli oluşturdular ve menopozal geçişte değişen hormonal çevrede diabetin böbrek hasarını artırıp artırmadığını araştırdılar. Postmenopoz diabet hayvanlarda siklik kontrol hayvanlara göre daha yüksek kan şekeri ölçülmüştür. Perimenopozal diabet hayvanlarda kan şekeri siklik hayvanlara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde olmayacak şekilde artmıştır. Bu bulgular menopozal geçişte kan şekerinin kötüleştiğini göstermektedir. Perimenopozal dönem farelerde diabet ilişkili böbrek

hasarının arttığı dönemdir. VCD perimenopoz menopoz modeli değişen hormonal çevre ile diabet ve komplikasyonlarını araştırmada kullanılabilir.

2.9. Dehidroepiandrosteron (DHEA)

DHEA ve onun sülfat esteri DHEAS, insan adrenal korteksinden salgılanan ana hormondur. Fizyolojik rolü henüz anlaşılamamıştır. DHEA kan düzeyleri diğer adrenal steroid hormonlardan farklı olarak yaşlanmayla beraber azalmaktadır. Yaşlanan toplumlarda DHEA konsantrasyonlarında azalma olması şu soruları akla getirmektedir: Yaşlanma DHEA konsantrasyonunun azalması sonrası mı gelişmektedir? Yaşlılıkta gözlenen bazı hastalıklar DHEA eksikliğinden mi kaynaklanmaktadır? DHEA tedavisi bu süreci geri döndürebilir mi? 1996 ya kadar Amerika Birleşik Devletlerinde (A.B.D.) reçete edilen ilaçlar arasında yer alan DHEA bu tarihten sonra herhangi bir hastalık için onay almamıştır. Günümüzde DHEA anti-aging hormon olarak pazarlanmakta ve A.B.D. 'de reçetesiz olarak satılmaktadır.

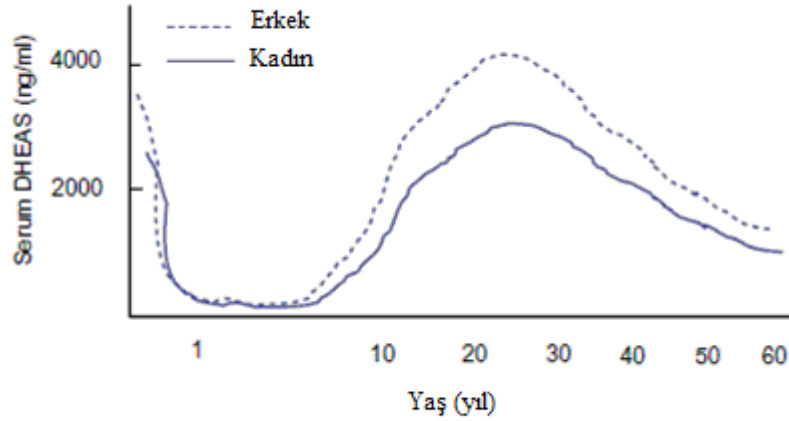
DHEA Sekresyonu Ve Yaşlanma

DHEA fetal adrenal bezin salgıladığı ana hormondur. İnsanlarda ve bazı omurgalılarda DHEA salgılanması yaşla beraber değişiklik göstermektedir (158). Doğum sonrası adrenal bezin fetal zonlarının involusyonuyla beraber DHEA kan düzeyi hayatın birinci yılının sonunda tespit edilemeyecek düzeylere kadar düşer. Altı-yedi yaşa kadar kan DHEA düzeyi düşük kalır. Bu yaşlarda adrenal zona retikularisten salgılanmasının artışıyla beraber kan düzeyleri yükselmeye başlar. Bu olaya adrenarş denir (159). Tepe DHEA konsantrasyonlarına erişkin hayatta ulaşılır erişkin hayatı süresince DHEA konsantrasyonlarında azalma olup seksen'li yaşlarda genç hayatta olan konsantrasyonların %10-20'si düzeylerine iner. Bu yaşla beraber gözlenen azalma kortikosteroid ve minerolokortikoidlerde gözlenmemesine rağmen bu olaya adrenopoz denilmektedir (158).

Yaşla beraber DHEA sekresyonunun azalması kişisel farklılıklar göstermekte olup zona retikularis boyutunda azalma ile beraberdir. Bunun tersine serum kortizol konsantrasyonları yaşla beraber artış gösterebilir (Şekil 16).

2.9.1. DHEA Metabolizması ve Etki Mekanizması

İnsanlarda P450c17, 17-alfa progesteronu, androstenediona çevirmektedir. İnsanlardaki bütün steroid hormonların sentezi DHEA'dan geçmektedir. DHEA, 3 β hidroksisteroid dehidrogenaz aktivitesiyle androstenediona , 17 β hidroksisteroid dehidrogenaz aktivitesi ile testosterona ve aromataz aktivitesiyle östradiol'e çevrilir (**Şekil 17**). DHEAS kanda dolaşan hidrofilik formu olup sadece lipofilik form olan DHEA hücre içerisinde androjen ve östrojenlere çevrilebilir. Erkeklerde sentezlenen androjenlerin %30-50'si ve pre ve postmenopozal kadınlarda sentezlenen östrojenlerin %50-100'ü periferel hedef dokularda DHEA'dan sentezlenmektedir. Hedef organda olan bu sentez ve etkiye intrakrinoloji denilmektedir (**160,161,162**). 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 olmaktadır (**163**) (**Şekil 18, 19**).



Şekil 2.12. İnsan yaşamı boyunca DHEAS düzeyleri

Düşük DHEA konsantrasyonlarında DHEA un seks spesifik olarak iki şekilde konversiyona uğradığı gösterilmiştir. Dışarıdan DHEA uygulanması sonrası kadınlarda androjen erkeklerde östrojen artışı olmaktadır (**163, 164**). Postmenopozal hastalara perkutan olarak dehidroepiandrosteron uygulaması sonrasında kan serum androjen seviyeleri östrojen seviyelerine oranla daha fazla artmaktadır. Yaşla beraber DHEA transformasyonunda azalma olmaktadır (**161,165**)

Adrenal yetmezliği ve hipogonadizmi olan total androjen eksikliği olan erkeklerde DHEA uygulaması dolaşımda androjenlerde artışla sonuçlanmaktadır.

Fakat serum androjen konsantrasyonları istenilen düzeylerde olmamaktadır (166). Yaşla beraber DHEA sekresyonunda azalma ve gonadal fonksiyonun azalması nedeniyle erkeklerde oral DHEA verilmesiyle kan androjen konsantrasyonlarında artış olmamakta, fakat dolaşımda dihidrotestosteronun ana metaboliti olan 5 alfa androstane -3alfa-17βdiolglucuronide (ADG) konsantrasyonunda artışa neden olmaktadır (164, 166,167).

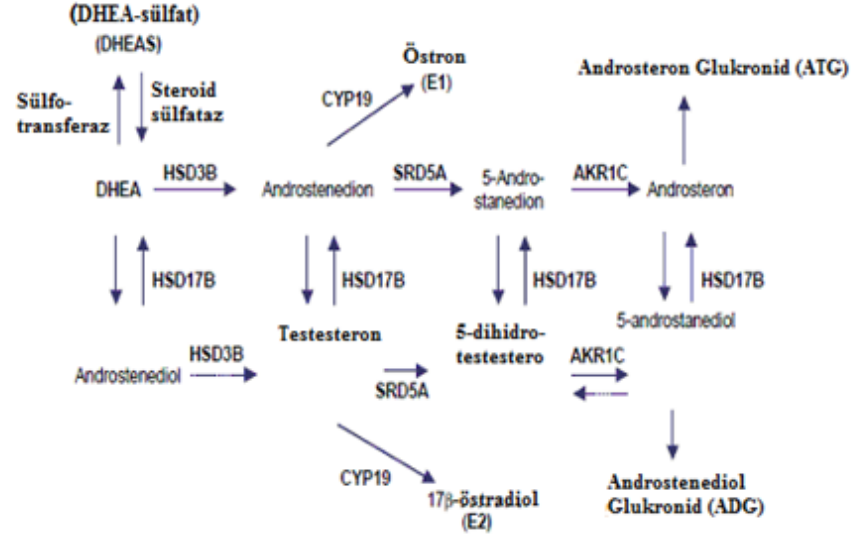
DHEA'un östrojen ve androjenlere çevrilerek etki göstermesi dışında beyinde direk olarak nörosteroid olarak etki göstermektedir. Adrenelektomize ve gonadektomize sıçanlarda beyin DHEAS düzeylerinin değişmediğini göstermişlerdir. Nöronal büyüme ve gelişmede DHEA ve DHEAS direk etkiye sahiptir ve DHEA, NMDA_i (N methyl diaspartate, GABA-A(Gamma aminobutyric acid) reseptör ve sigma reseptörleri aracılığıyla etki göstermektedir (168, 169, 170, 171).

Yapılan araştırmalarda periferik dokularda DHEA'un spesifik bir reseptörü bulunamamıştır. Ancak perifer dokularda DHEA direk etkisinin olabileceğini gösteren bulgular vardır. İnsan T hücrelerinde membrandaki bir reseptöre DHEA bağlanabilmektedir. Bu alanlara dihidrotestosteron da bağlanmaktadır (172). Büyükbaş hayvan aortik hücre plazma membranlarına DHEA bağlanabilmekte ve endotelial NO sentetaz aktive olmaktadır (173). Benzer şekilde DHEA düz kaslarda hücre dışı sinyal regule kinaz 1 fosforilasyonunu androjen ve östrojen reseptörlerinden bağımsız olarak aktive etmektedir (174). Bütün bu bulgulara rağmen santral sinir sistemi (SSS) dışında DHEA etkisinin indirek olarak östrojen ve androjenlere döndürülerek oluştuğu düşünülmektedir.

2.9.2. DHEA-Epidemiyolojik Bulgular

Erkeklerde yapılan araştırmalarda 50 yaş üstü erkeklerde serum DHEAS konsantrasyonu ile ölüm arasında ters bir ilişki bulunmuştur (175). Kadınlarda benzer ilişki bulunamamıştır (176). 622 olgunun olduğu 65 yaş üstü hastalarda iki ve dört yılda mortalite oranları erkeklerde düşük serum DHEAS düzeyleri ile korele olup kadınlarda bu ilişki saptanamamıştır. Sekiz ve on yıllık veriler de bu bulguları doğrulamaktadır (177). Altmış beş yaş ve üstü 963 erkek ve 1171 kadından oluşan bir araştırmada erkeklerde en düşük DHEAS düzeyinde olan hastalarda bütün nedenlere ve kardiyovasküler nedenlere bağlı mortalite en yüksek seviyede bulunmuştur (177). 90-106 yaş arası yaşlı erkeklerde düşük serum DHEAS düzeyleri

kötü fonksiyonel durumla ilişkili olarak bulunmuştur (178). Dolayısıyla serum DHEAS düzeyleri kötü sağlık durumunun göstergesi olan bir belirteç olarak kullanılabilir.



Şekil 2.13. DHEA'nın steroidojenik enzimlerle dönüşümleri

Sağlıklı Bireylere DHEA Uygulamaları

Yapılan araştırmalarda, 40-70 yaş arası sağlıklı erkek ve kadınlara 50 mg/gün oral DHEA tedavisi genel iyilik halinde artış sağlamamıştır (186). 70 yaş üstü hastalarda libidoda artış gösterilmiştir. DHEA, kadın seksüalitesinde düzeltici bir etkiye sahiptir. Bu DHEA nun perifer dokularda androjenlere çevrilmesinden kaynaklanmaktadır.

Adrenal Yetmezlikte DHEA Replasmanı

Adrenal yetmezliği olan hastalar DHEA'un prematür kaybıyla karakterizedirler. Bu hastalar DHEA kaybı için model oluşturmaktadırlar. Adrenal yetmezlikli hastalarda aldosteron ve kortizol replazmanı hastanın iyilik halini sağlamak için yeterli olmamaktadır. Adrenal yetmezlikli hastalarda günlük 25-50 mg DHEAS replazmanı serum DHEAS konsantrasyonunu normal genç erişkinlerdeki düzeylerine getirmektedir (183). Oral DHEA tedavisi genel iyilik halinde düzelme, anksiyete ve depresyon skorlarında düşürmektedir. Seksüel doyum ve fonksiyonunu artırmaktadır (184). Addison hastalarında DHEA tedavisi

sonrasında kendine güven ve iyi hissetme hali artmıştır **(185)**. Bu durum DHEA un beyindeki etkilerinin sonucunda gerçekleşmektedir.

Kronik Hastalıklarda DHEA Tedavisi

Yapılan araştırmalarda kadınlarda otoimmün hastalıkların çok olduğu ve SLE'li hastalarda DHEA düzeylerinin daha düşük saptanması üzerine DHEA tedavisi uygulanması planlanmıştır.

SLE, demans, meme kanseri ve romatoid artiritte serum DHEAS konsantrasyonu ile hastalık şiddeti arasında ters ilişki bulunmuştur **(179)**. Kronik hastalıklar, adrenal bezde sentezi DHEA sentezinden kortizol sentezine doğru kaydırmakadır **(180)**. Dolayısıyla düşük serum DHEAS düzeyleri mevcut hastalıkta ilerideki morbidite hatta mortaliteyi öngörmeye kullanılabilir. Sıçan DM modelinde subkutan DHEA enjeksiyonu hiperglisemi ve su tüketimini azaltmış, plazma insülinini ve beta hücre kitlesini arttırmıştır **(181)**.

Bozulmuş Ruhsal Durumu, Seksüel Fonksiyonu Olan Hastalara DHEA Tedavisi

Depresyonu veya distimisi olan hastalara ve negatif semptomlu şizofrenisi olan hastalara DHEA uygulaması sonrasında genel durumlarında düzelme bildirilmiştir **(188)**. Alzheimer hastalığı olan hastalarda genel iyilik halinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir düzelme sağlanmıştır **(189)**.

2.9.3. DHEA'nın Doku Spesifik Etkileri

Santral Sinir Sistemi

DHEA bir nörosteroid hormondur. Beyinde DHEA üreten hücreler bulunmaktadır. Gonadektomi ve adrenektomi uygulanan sıçanlarda kan DHEA düzeyleri azalmasına rağmen, beyin DHEA düzeyleri düşmemektedir. Erişkin beyin dokusunda 17-alfa hidroksilaz enzim ekspresyonu yoktur ve fare beyinde DHEA sekresyonu CYP 17 ekspresyonundan farklı bir yolla olmaktadır **(190)**.

DHEA un ansiyolitik ve antidepresif etkisi GABAerjik ve NMDA uyarıcı etkileri dolayısıyla gerçekleşmektedir **(188)**. DHEA hafıza ve kognitif fonksiyonlar üzerinde düzeltici etkiye sahiptir **(189)**.

DHEA uygulaması sonrası beyin hücrelerinde apoptoz arttığını gösteren araştırmalar ve apoptozun azaldığını gösteren araştırmalarda mevcuttur. İnsanlarda

yapılan araştırmalarda hipotalamik GnRH üreten hücrelerin artan yaşla beraber fonksiyonlarının baskılandığı ve apoptozun arttığı gösterilmiştir (191). DHEA uygulanan sıçanlarda hipokampal nöronlarda trofik faktörlerinin yokluğunda artan kaspaz 3 aktivitesi ve poly (ADP(adenozin difosfat) riboz) polimeraz aktivitesi sonrası apoptozun arttığı ve IGF-1 uygulanması sonrası DHEA'un indüklediği apoptozun azaldığını gösterilmiştir (192). DHEA(S)'ın sıçan hipokampal nöronlarını NMDA ile indüklenmiş ekzitotoksositeye karşı koruduğu ve insan nöronlarında Allopregnelon' un NMDA ile indüklenmiş ekzitotoksositeyi azalttığı, DHEA (S) , Allogpregnolon'un kromofin hücrelerini ve sempatoadrenal PC12 hücrelerini apoptoze karşı doz ve zaman orantılı şekilde koruduğunu gösterilmiştir (193).

İn vitro araştırmalarda DHEA uygulaması ile hipofiz bezde hiperplazi, prolaktin ve büyüme hormon sentezinin artışı gösterilmiştir (194).

İmmun Sistem

Genç erişkin sıçanlara subkutan DHEA uygulandığında yirmi günün sonunda timik ağırlıkta ve adrenal ağırlıkta azalma olmaktadır. Dalak ağırlığı etkilenmemektedir (195). T lenfosit kültürlerine DHEA eklenmesi T hücre proliferasyonunu azaltmakta ve oksidatif stresi artırmaktadır. Ancak T lenfosit viabilitesini bozmamaktadır (196). DHEA bir kemoterapotik ilaç olan Stausporinin neden olduğu periferel B lenfositlerde apoptozu engellediği bulunmuştur. DHEA lenfositlerde de apoptozu önleyici etki göstermektedir (197). DHEA immünprotektif olarak da kullanılabilir.

Metabolizma Ve Vücut Yapısı

Erkeklerde ve kadınlarda yapılan araştırmalarda DHEA'un vücut yapısı, fizik performans, insülin sensitivitesi ve hayat kalitesi üzerine etkisi olmadığını gösteren araştırmalar yanında, erkeklerde yağ oranlarını azalttığını ve kadınlarda vücut kitle indeksini ni arttırdığını gösteren araştırmalar mevcuttur (186, 198, 199,200).

DHEA uygulaması sonrasında Seks hormon bağlayıcı globulin (SHBG) miktarları düşmektedir (184,200).

Yaşlanma ile beraber azalan DHEA konsantrasyonları ile paralel şekilde kan glukoz konsantrasyonlarında artış arasında paralellik gösterilmiştir (201). Sıçanlara

DHEA uygulanması sonrasında kan glukoz konsantrasyonlarında düzelme ve insülin sekresyonunda artış gösterilmiştir.

Yapılan araştırmalarda, on iki aylık DHEA tedavisi sonrası, insülin duyarlılığında ve lipid profilinde ; HDL (High Density Lipoprotein) kolesterol düzeyinde artış, LDL (Low Density Lipoprotein) de düşme, Trigliseridde düşme) anlamlı bir düzelme sağlanmıştır. Bu sonuç uzun dönem DHEA tedavisi postmenopozal dönemde kardiyovasküler risk yaratabilecek bazı faktörleri düzeltebileceği ve postmenopozal hormon replasmanında kullanılabileceğini göstermektedir **(202)**.

Kemik

Fernand ve ark. **(203)** 12 ay süresince intravajinal DHEA %10 kremi 60-70 yaş postmenopozal hasta grubuna uygulamışlardır. Kalça eklemine T skorlarında artma serum alkalenfosfataz (ALP) düzeylerinde düşme ve serum osteokalsin değerlerinde artış saptamışlardır. Bu etkiler DHEA nun androjenik etkilerinden kaynaklanıyor olabilir. Yapılan deneysel araştırmalarda DHEA nun osteoblast viabilitesini artırdığı gösterilmiştir **(204)**. Ancak yapılan başka araştırmalarda uzun dönem DHEA tedavisi KMD de değişiklik yapmamıştır **(184, 185, 200)**.

Testis

Yapanoğlu ve ark. **(205)**, erkek sıçanlarda torsiyon/detorsiyon modeli oluşturmuş ve DHEA un koruyucu etkisini araştırmışlardır. DHEA uygulanan sıçanlarda torsiyon/detorsiyon grubuna göre anlamlı sayıda daha az TUNEL pozitif spermatoisit ve spermatogonya sayısı tespit etmişlerdir. DHEA testislerde torsiyon detorsiyon modelinde apoptoz önleyici etki göstermektedir.

Aksoy ve ark.**(206)** testiküler torsiyon esnasında yükselen MDA düşen katalaz ve superoksid dismutaz aktivitesinin DHEA uygulamasıyla geriye çevrilebileceğini tespit göstermişlerdir. DHEA doku düzeyinde iskemi parametrelerini düzeltmektedir ve testis torsiyonunda koruyucu olarak verilebilir.

Vajina

İnsanlarda yapılan araştırmada, Labrie ve ark. **(207)** postmenopozal hastalara on iki hafta süresince %2.5, % 0.5 ve % 1 intravajinal DHEA (prasterone) uygulandıkları araştırmada; vajinal parabazal hücrelerde azalma, süperfisial

hücrelerde artış, epitel bütünlüğünde ve renginde düzelme, vajinal ph da azalma ve atrofiye bağlı rahatsız edici semptomlarda azalma seksüel istekte, seksüel uyarılmada ve orgazmda artış saptamışlardır. Bir başka araştırmada ilişki esnasında duyulan ağrıda azalma olmuştur **(208)**. Dolayısıyla intravajinal uygulanan DHEA, lokal olarak vajinal hücrelerde androjen ve östrojenlere çevrilmekte ve sistemik etki göstermeden vajinal atrofiye bağlı değişiklikleri ve postmenopozal dönemde gözlenen seksüel disfonksiyonların tedavi edici etkiye sahiptir. İntravajinal uygulanan DHEA un yararlı etkisi vajinal epitel üzerine sınırlı kalmaktadır **(203, 209, 210)**.

DHEA Sentezinde Rol Alan Enzimler ve Gonadal Doku

Adrenal korteks, plasenta, gonadlarda steroid hormonların sentezi mikst fxn oksidaz ve steroid dehidrogenaz olan sitokrom p450 enzimlerini gerektirir. Bu üç enzim adrenal kortekste zona fasikularis ve zona retikulariste, testislerde Leydig hücrelerde, overlerde granüloza, teka interna, korpus luteum hücrelerde bulunmaktadır **(211)**.

Yırtıcılarda adrenal bezinde 17 alfa hidroksilaz enzimi yoktur. Yırtıcılarda DHEA gonadlar tarafından üretilmektedir. Adrenal bez androjen üretimine katkıda bulunmadığı düşünülmektedir **(212)**. Ancak yapılan diğer araştırmalarda, ooforektomi uygulanan farelerde kanda androstenedion konsantrasyonlarında azalma olduğu ancak plazma androstenedion düzeylerinin tespit edilemeyecek düzeylerin altına inmediği gösterilmiştir. Dolayısıyla yırtıcılarda serum androjen üretimine adrenal bez dışında başka dokularda katkıda bulunmaktadır **(155)**.

Gonadal steroidlerin sülfatlanmış adrenal androjenlerden üretilmesi alternatif olarak sunulmuş bir mekanizma olup over steroidogenezde rol aldığı düşünülmektedir. Sülfatlanmış androjenlerden unkonjuge androjen ve östrojen üretimi steroid sülfataz aktivitesine ihtiyaç göstermektedir. Yapılan araştırmalarda sıçan over kültürlerinde granüloza hücrelerinde **(213)** ve insan over kültüründe luteinize granüloza hücrelere sülfataz aktivitesi gösterilmiştir. İnsan granüloza hücre kültüründe dışarıdan insülin verilmesi sülfataz aktivitesinin artırmış ve LH verilmesi bu aktiviteyi azaltmıştır. Aynı araştırmada DHEAS ın DHEA'a çevrilme oranı %50 olarak gösterilmiştir. Granüloza hücre kültürüne DHEAS eklenmesi progesteron üretimini etkilememekle beraber östradiol ve androstenedion miktarlarında artış

gösterilmiştir. Dolayısıyla adrenal androjen olan DHEAS over steroidogenezde östradiol ve androstenedion üretiminde substrat olarak kullanılabilir (214).

Fang Chen ve ark. DHEA'nın androjen ve östrojen reseptörleri üzerine yaptığı etkiyi araştırdıkları araştırmalarında DHEA'nun prehormon olarak etkisine ek olarak östrojen ile eşit oranda ER β transkripsiyonunu aktive ettiğini, ER β 'nin direk aktivasyonuna neden olduğu, ER α 'ya parsiyel agonist etki androjen reseptörlerini antagonistli etki gösterdiğini göstermişlerdir.

DHEA ve Polikistik Over Sendromu (PCOS)

PCOS, gonadotropinlerin aşırı sekresyonu, hiperöstrojenizm, hiperandrojenizm, foliküler atrezi ve infertiliteyle beraber olan metabolik bir sendromdur. Polikistik over hastalarının çoğunluğunda, pubertede DHEA düzeylerinin artışıyla beraber semptom ve bulgular görülmeye başlar (215). Bu nedenle DHEA polikistik over modeli yaratmak için iyi bir seçenek olarak düşünülmüş ve polikistik over hayvan modeli oluşturmak amacıyla kullanılmıştır. İmmatür dişi sıçanlara DHEA uygulanması sonrası overlerde kistik değişiklikler, erken ovulasyon, asiklisme ve anovulasyon oluşmaktadır (216).

Düzenli siklusları olan matür sıçanlar DHEA uygulaması sonrası benzer kistik over değişiklikleri göstermektedirler. DHEA verilmesi bırakıldığında sıçanlar normal sikluslarına dönmektedirler (217). Neonatal dönemde dişi sıçanlarda DHEA uygulaması sonrasında siklisme kaybı olmuş ve bu sıçanlarda fertilitate problemleri gelişmiştir. Dişilerde seksüel davranışlarda bir değişiklik olmamıştır (218). Sıçanlarda ve kadınlarda yapılan araştırmalarda polikistik durumun oluşmasında, foliküler rekrutment ve küçük antral döneme kadar büyümenin normal olduğu fakat dominant folikül seçiminde bir boşluk olduğu gösterilmiştir (219). Lee ve ark. (220) sıçanlara DHEA uygulamasını takiben polikistik over görünümü ve serumda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artmış androjen, östrojen ve prolaktin konsantrasyonları tespit etmişlerdir.

DHEA'dan başka androstenedion veya testosteron vererek polikistik over modeli oluşturulmuştur. Fakat bu model için en uygun hormonun DHEA olduğu gösterilmiştir (221). DHEA uygulanıp oluşturulan polikistik over sıçan modelinde, aynı insan polikistik overinde olduğu gibi insülin resistansı vardır ve adipoz dokuda resistin düzeyleri artmıştır (222).

DHEA, PCOS ve Apoptoz

Dışarıdan uygulanan DHEA overlerde kist ve atretik folikül gelişimine neden olmaktadır. DHEA uygulayarak overlerde polikistik over modeli oluşturulabilir. DHEA uygulaması artmış over apoptoza, atretik folikül sayısında artışa ve daha büyük folikül çapına neden olmaktadır (223, 224). DHEA uygulanan sıçan overlerinde polikistik görünüm oluşmakta ve çok sayıda antral ve preantral folikül bulunmaktadır. PCOS lu overlerin atretik foliküllerinde TUNEL pozitif apoptotik granüloza hücrelerde MT-1 MMP (membran type 1 matrix metallo proteinaz), Fas L boyanması gözlenmiştir. Dolayısıyla, over dokusunda DHEA fas/fas l/kaspaz 8 (ölüm reseptör bağlantılı yolak) yolağı foliküler atrezide önemlidir ve artmış MT-1 MMP doku yenilenmesinde ve yapısal luteolizde önemli rol oynar (225). Kistogenez esnasında apoptoz kumulus granüloza hücrelerinden mural granüloza hücrelere doğru sistematik olarak ilerlemektedir. Buna zıt olarak atretik foliküllerin granüloza hücreleri rastgele şekilde apoptoza uğramaktadır. Dış granüloza hücreler arası gap neksuslar daha sıkı hal almaktadır DHEA dış mural katmanda keratin ekspresyonunu artırır, apoptoz işaretlerinde azalma yapar (226).

Kültür ortamında bulunan foliküllerde DHEA uygulanması sonrası IGF-1 aktivitesinin ve östrojen miktarlarında artış olduğu gösterilmiştir (227). Deneysel araştırmalarda, DHEA overlerde oksidatif bir durum oluşturmakta ve selektif olarak T lenfosit infiltrasyonuna neden olmaktadır. Bu oluşan kistik tabloya katkıda bulunmaktadır (224).

DHEA prohormon olarak etkisinin yanında aromataz düzeylerin arttırarak östrodiol miktarını arttırmaktadır. DHEA COX2 (cyclooxygenase 2), androjen reseptör ve östrojen reseptör beta ekspresyonunu arttırmaktadır. Bu olaylar ovulasyon esnasında gözlenen değişiklere benzerdir. Bu nedenle ovulasyonun oluşmasında DHEA'nun etkisi olduğu düşünülmektedir (228). PCO de altta yatan mekanizmalardan bir tanesi artmış lizil oksidaz aktivitesi ve azalmış MMP2 aktivitesidir. DHEA overlerde ekstrsellüler matriks oluşumunu artırıp yıkımını azaltarak ovulasyonu engellemekte ve bu durum PCO da gözlenen kist oluşumuna katkıda bulunmaktadır (229).

DHEA ve Oosit

DHEA uygulanan sıçanlarda oositlerde mayotik aktivasyon olmaktadır. Bu puberteye geçişte önemli mekanizmalardan biri olarak göze çarparken aynı zamanda polikistik overli hastalarda oluşan kistik foliküllerden sorumlu olabilir **(230)**. Shionara ve ark. **(231)** DHEA uyguladıkları sıçanlarda yaklaşık %70 oositte dejenerasyon gözlemlemişlerdir.

DHEA Ve Over Oksidatif Stres Ve İnflamasyon

DHEA uygulaması overlerde lipid peroksidasyonunu, over oksidatif stresi (iNOS(inducible nitricoxide synthase), iCOX 2(Siklooksijenaz) ve fosforile AMP bağımlı kinaz artış) artırmaktadır. Over PGE(prostoglandin E) düzeyleri artarken, glutathion düzeyleri azalmaktadır . DHEA ile beraber metformin uygulaması over İNOS ve COX 2 ekspresyonunu engellemektedir ve fosforikle AMP K-a ekspresyonunu artırmaktadır **(232)**. PCOS ta artmış oksidatif antikor varlığı bu hastalarda düşük implantasyon oranlarına neden olmaktadır **(233)**.

DHEA overlerde inflamasyonu artırmaktadır. DHEA enjekte edilen sıçanların overlerinde kistik foliküllerde ve medullada artmış MAST hücre ekspresyonu gösterilmiştir **(234)**.

Sonuç olarak DHEA overlerde bir inflamatuvar hücre yoğunluğu ve oksidatif stres yaratmaktadır. Artmış over stres, kardiyovasküler riskte artışa neden olmaktadır.

DHEA ve Uterus

Sistemik DHEA uygulanan sıçanlarda, uygulanan doza bağlı olarak üç uterus katı (myometrium, stroma ve epitel) hipertrofiye uğramaktadır. Luminal epitel kalınlığı, bez epitel kalınlığı ve total uterus yüzey alanı artmaktadır.. DHEA uygulaması sonrasında uterus bezlerinde konglomerasyon oluşmakta ve apoptoz olan hücreler artmaktadır. Buna bağlı olarak dejenere hücrelerin çevrelediği kaviteler oluşmaktadır **(235)**. Bez dōşeyici epitelde atipik hücrelerde artış ve nükleer atipide artış gözlenmektedir **(236)**. DHEA uterusu proinflamatuvar ve prooksidan bir durum meydana getirmektedir. CD4 T lenfosit infiltrasyonunu artırırken CD8 T lenfosit infiltrasyonunu azaltmaktadır **(237)**.

Metformin uygulaması, apoptoz olan hücreleri, PGF2 alfa (prostoglandin F2 α) düzeylerini, COX 2 düzeylerini ve uterin nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesini kontrol guruplarına yakın düzeylere getirmekte, uterus morfolosini düzeltmekte ve CD4 ve CD8 düzeyleri kontrol uterusta bulunan değerlere gelmektedir. Dolayısıyla; DHEA, uterus dokusunda prooksidatif ve proinflammatuvar bir süreci hareketlendirmekte ve bunun sonrasında uterus dokusunda morfolojik bozukluklar ve apoptozda artış olmaktadır. Antitümör CD8 lenfositlerde azalma meydana gelmekte, bu durum implantasyon oranlarını düşürmekte, endometrial kanser gelişimine zemin hazırlamaktadır **(236)**. Metformin uygulaması DHEA'nun uterus üzerinde meydana getirdiği inflammatuvar, immün ve oksidatif zararlı değişiklikleri geriye çevirmektedir. Dolayısıyla PCOS da metformin tedavisi over fonksiyonlarını normalize etmesi yanında uterin disfonksiyonu ve prekanseröz yapıların oluşmasını engellemektedir **(232)**.

DHEA ve Gebelik

Yüksek dozda DHEA uygulanan gebe sıçanlarda over PGE düzeyleri artarken, glutation düzeyleri azalmaktadır **(238)**. DHEA uygulanan gebe sıçanlarda uterin nitrik oksit sentetazda azalma (Uterin relaksasyonda rol alan NO sentezi için gereklidir) olmaktadır. Embryonik kayıp oranları artmaktadır **(238,239)**. Metformin uygulaması over oksidatif stresi azaltmakta ve uterin NOS aktivitesinde artışa neden olmaktadır. DHEA nun neden olduğu embryonik kaybı düzeltmektedir **(239)**.

DHEA ve Gonadotropin

Türkmen ve ark. **(182)** PCOS olguları IVF öncesi hastalardan bir gruba üriner FSH, bir grubada hMG (human menapozal gonadatropin) uygulamışlardır. Her iki gurup hastada serum androstenedion, östradiol düzeyleri artmıştır. Ancak, FSH uygulanan gurupta serum DHEAS düzeylerinde artış varken hMG uygulanan gurupta artış saptanmamıştır. Dolayısıyla hMG D5 yolağını baskılayarak over ve adrenal steroidogenezi düzenlemektedir. OHSS(over hipersitumulasyon sendromu) gelişen hastalarda serum DHEAS düzeyleri gelişmeyen olgulara göre daha yüksek bulunmuştur **(240)**.

DHEA ve Kötü Over Yanıtlı Hastalar

Androjenler over dokusunda teka hücreleri tarafından sentezlenmekte, granüloza hücreleri üzerinde parakrin yolla etki göstermektedirler. Foliküler gelişim dönemine bağlı olarak androjenler 3 yolla foliküler büyümeyi düzenlerler. Birincisi foliküler değişimi kolaylaştırarak, ikincisi östrojen sentezi için substrat olarak, üçüncüsü folikülogenezi inhibe ederek etki göstermektedir.

Adrenal ve over androjenler atretiojenik değildirler fakat r FSH (rekombinant FSH) ya karşı duyarlı olmayan folikülleri stimule ederler ve bu cevapsız foliküllerin FSH ya cevabını artırabilirler. Androjenler direk androjenik etkiyle folikül granüloza hücrelerini proliferetmekte ve FSH cevabını artırmaktadır. Bu durum puberteye geçişte adrenal androjenlerin rolünü göstermektedir (puberte FSH ya karşı duyarlılığın başlaması ile başlar) **(241)**.

Serum androjen düzeyleri IVF gebelik oranları ile koreledir. Serum testosteron düzeyleri <20 ng/dl altında olduğunda kötü IVF sonuçları öngörülebilir **(242)**. Yapılan araştırmalarda doğal sikluslarda konsepsiyon oluşan sikluslarla oluşmayan sikluslarda luteal fazda serum DHEAS konsantrasyonlarında ilişki saptanmamıştır **(243)**. Serum DHEA düzeyleri ile klinik gebelik oranları arasında korelasyon yoktur **(242)**. Artmış serum DHEAS düzeyleri olan hastalarda deksametozon supresyon tedavisi ile IVF sonuçları düzelmemiştir **(244)**. Foliküler fazda deksametozon tedavisi sonrasında klomifen sitrat dirençli olgularda tedavi sonuçlarında iyileşme gösterilmiştir **(245)**. Üçüncü gün serum DHEA düzeyi kullanılan gonadotropin düzeyi ile korele olarak gösterilmiştir **(242)**

Over rezervi azalmış hastalarda DHEA uygulaması sonrası over stimülasyonu ile elde edilen oosit sayısı ve embriyo sayısı ve kalitesi artırılabilir. Barad ve ark. **(246)** over rezervi ciddi olarak azalmış 43 yaşındaki bir olgudan kontrollü over hiperstimülasyon sonrası elde edilen oosit ve embriyo sayısının 75 mg/ gün DHEA ve eş zamanlı akapunktur tedavisi sonrası progresif şekilde istatistiksel olarak anlamlı miktarda arttığını gösteren bir vaka sunumu yapmışlardır. Kötü over yanıtlı hastalara DHEA tedavisi sonrasında maksimum östradiol miktarı artmış ve östradiol/gonadotropin ampul sayısı azalmıştır **(240)**. Barad ve ark. **(247)** kötü over yanıtlı hastalarda IVF öncesi 4 ay süresince 75 mg/gün DHEA tedavisi verdikleri grupta tedavi almayan gruba göre daha yüksek gebelik oranları bildirmişlerdir.

Maams ve ark. (248) prematür over yetmezliği olan beş hastaya DHEA uygulamışlar ve serum FSH düzeylerinde düşme ve gebelik sonuçlarını bildirmişlerdir.

DHEA'nın Yan Etkileri

DHEA'nın yan etki profili genellikle molekülün intakrinolojik etkilerine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Diğer bir deyişle molekülün çevre dokularda östrojen ve androjenik potent 5-alfa metabolitlerine dönüştürülmesine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (249). Bu yan etkiler özellikle kadınlarda ortaya çıkmaktadır ve en sık cildi etkilemektedir. Oral DHEA tedavisinin başlıca yan etkileri: androjenin deri ve saçlar üzerindeki etkilerine bağlı olarak ortaya çıkan artmış sebum üretimi, deri ve saçların yağlanmasında artış, alopesi ve hirsutizmdir (184,185, 250).

DHEA replazman tedavisi adrenal yetmezlik, AIDS(acquired immüne deficiency syndrome), SLE, osteoporoz, libido kaybı ve Alzheimer gibi kimi klinik durumların önlenmesi veya tedavisinde veya sağlıklı bireylerde yaşlılığa karşı uygulanmıştır (183, 200, 251, 252,253, 254). Bu araştırmalarda yirmidört hafta süresince 200 mg/günlük veya onaltı hafta süresince 2250 mg günlük dozlarda minimal yan etki insidansı gözlenmiştir. Bu araştırmaların ilkinde SLE olgularına yirmi dört hafta boyunca 200 mg /gün DHEA verilmiş, ve bu tedavinin saptanan tek yan etkisi akne insidansının DHEA tedavisi gören bireylerde plaseboya göre artmış olarak bulunması olmuştur (253). Diğer bir araştırma da ise; semptomatik HIV (human immün deficiency virus) pozitif bireylere en az 16 hafta boyunca 750 -2250 mg/gün olacak şekilde DHEA verilmiş ve doz sınırlayıcı bir yan etki ile karşılaşılmamıştır. (251). Bu süreler boyunca belirtilen dozlar FDA (Food and Drug Administration) tarafından da güvenli bulunmuştur.

DHEA'un bir diğer yan etkisi HDL kolesterolü azaltmasıdır. DHEA replazmanının özellikle kadınlarda HDL kolesterolü azalttığı saptanmıştır (184, 186, 255, 256, 257). DHEA'nun Lipoprotein profiline bu olumsuz etkileri, diğer araştırmalarla tutarlılık göstermemektedir. Çeşitli yayınlarda DHEA ile oral tedavinin Lipoprotein profilini etkilemediği veya olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir (184,258). Ayrıca DHEA'nın insülin duyarlılığını olumlu yönde etkilemesi, Lipoprotein profili ile oluşabilecek kardiyovasküler risk artışını dengeleyecek bir unsur olarak görünmektedir (259). Kaynaklarda DHEA replazmanının kardiyovasküler risk arttırdığına dair veri yoktur. Ayrıca endojen

DHEA ile de kardiyovasküler morbidite veya mortalite arasında ilişkiyi araştıran bir çok araştırmada; ilişkinin (eğer varsa) zayıf düzeyde olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır (260, 261,262).

Karp ve ark. (263) over cevabını artırmak için oral DHEA tedavisi alan bir hastada epileptik nöbet bildirmiştir. Hastanın özgeçmişinde 5 yıl önce kafa travması hikayesi vardır. Dolayısıyla doktorlar bu tedaviyi kullanırken dikkatli olmalı ve hastalarının nörolojik hikayesini sorgulamalıdır.

Sonuç olarak; oral DHEA tedavisini bir yılın altında, 50-2250 mg /gün kullanımında minimal ve geri dönebilen yan etkiler saptanmıştır. Ancak uzun dönem DHEA replazmanı ile ilgili veri mevcut değildir.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

Araştırmamızda yirmi sekiz günlük, 40-60 g ağırlığında, toplam 120 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 02.01.2008 tarihinde 29 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 overlerin ve uterusların ağırlıkları ölçüldü.

3.1. Kimyasal Maddeler ve Uygulamaları

Araştırma guruplarında kimyasal maddeler olarak 4-Vinylcyclohexene diepoksit (VCD) (Fluka, 1302946, 250 ml), dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA, 48H0074, 1l) ve Dihidroepiandrosteron (DHEA) (Sigma, D4000, 25 g) kullanıldı. Guruplara 15 gün boyunca DMSO da çözdürülen VCD ve DHEA intraperitoneal (i.p.) olarak ve her hayvana eşit miktarda (0,02ml) olacak şekilde verildi. Enjeksiyonlar, her bir hayvan için ayrı enjektörler kullanılarak ve her gün aynı saate yapıldı. Deneyde belirtilen süre sonunda sakrifikasyon işlemi öncesi anestezi için ketamin 90 mg/kg (Ketalar, 50 mg/ml, flakon, Pfizer) ve Xylazine 10 mg/kg (Rompun, %2' lik enjeksiyonluk solusyon, Bayer) kullanıldı.

3.2. Deney Gurupları

Araştırmamızdaki sıçanlar arasında rastgele seçimle, Vinilsikloheksen diepoksit (VCD), Dehidroepiandrosteron (DH), Vinilsikloheksen diepoksit + Dehidroepiandrosteron (VDH) ve kontrol grubu olmak üzere dört gruba ayrıldı. Her gurupda 10 adet sıçan vardı. (Tablo 3.1)

Tablo 3.1. Deneş gurupları ve sıçan sayıları

GURUPLAR	VCD	DHEA	VCD+DHEA	KONTROL	TOPLAM
15 GÜN	10	10	10	10	40

3.3. Over ve Uterus Örneklerinin Değerlendirmeleri

Deneş süresi sona erdiğinde son dozdan dört saat sonra ketamin ve ksilazin anestezisi uygulandı. Sıçanlar servikal dislokasyon ile öldürüldü. Sıçanların overleri ve uterusları alındı. Organ ağırlıkları hassas terazide dikkatli bir şekilde tartıldı. Overler tartım işleminden sonra sol over 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.

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), Kaspaz 3 için immünohistokimyasal boyama yapıldı.

Sıçanlardan anestezi sonrası intrakardiyak kan örnekleri alındı ve santrifüj ile serumları ayrıldı. ELISA yöntemi ile serum FSH, östradiol düzeyleri ölçüldü.

3.4. Folikül Sayılarının Tespiti

Işık mikroskobu ile overlere ait kesitlerde bulunan foliküller sayıldı. Overlerden her 40. kesitte (her over için 10-13 kesit) foliküller sayıldı. Kesitlerde, tek katlı yassı folikül hücreleri bulunan foliküller primordiyal folikül, tek katlı kübik folikül hücreleri bulunan foliküller primer folikül, iki veya daha çok katlı folikül 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. **(110)** Bu foliküller sağlıklı ve atretik folikül olarak değerlendirildi. Granüloza hücre nükleuslarında piknozis ve kromatin redistribisyonu, sitoplazmik kondensasyon ve granüloza hücreleri ve oositler arası ilişkinin ve düzenin bozulmuş olduğu, oositleri eozinofilik boyalı olan foliküller

atretik folikül olarak değerlendirildi.(109) Ayrıca overlerde 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.

Foliküllerin çapları ile granüloza hücrelerinin, teka hücrelerinin kalınlığı oküler mikrometre yardımıyla ölçüldü.

İmmunohistokimyasal boyaların (TUNEL ve kaspaz 3) değerlendirilmesi için rastgele seçilmiş 25 kesitte oküler mikrometre yardımıyla X40 büyütme ile 50 alanda değerlendirme yapıldı. Kesitlerin fotoğrafları yüksek çözünürlükte Olympus BH-2 marka fotomikroskop (Olympus Corp. Tokyo, Japonya)'a monte edilmiş Olympus DP 70(Olympus Corp. Tokyo, Japonya) dijital kamera kullanılarak çekildi.

3.5. Over İçin Uygulanan Doku Takibi

14-24 saat boin solüsyonunda fiksasyon yapıldı. 30°'lik alkolde 1 saat, 50°'lik alkolde 1 saat, 70°'lik alkolde 1 saat, 80°' lik alkolde 15 dakika 90°' lik alkolde 15 dakika, 2 kere 96°' lik alkolde 10 dakika, 2 kere ksilol ' de 10 dakika, parafin I'de 45 dakika, parafin II'de 1 saat Parafin III'de 1 saat tutuldu.

3.6. Hematoksilin-Eozin Yöntemi

Ksilol I'de 20 dakika, ksilol II'de 20 dakika, 2 kere 96°' lik alkolde 5'er dakika , 90°' lik alkolde 5 dakika, 80°'lik alkolde 5 dakika, 70°'lik alkolde 5 dakika, Distile Su da 5 dakika, Hematoksilinde 2 dakika, yıkama (akar suda) 5 dakika, Eozin de 5 dakika, 70°'lik alkolde 3 dakika, 80°' lik alkolde 3 dakika, 90°' lik alkolde 3 dakika, 2 kere 96°' lik alkolde 3'er dakika, ksilol I de 20 dakika, ksilol II de 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.

Apoptoz Görülen Hücre Sayımı

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

Kullanılan Kit : (Apoptag plus peroxidase in situ apoptosis detection kit S7101-Chemicon international)

3.8. Kaspaz Yöntemi

Kaspaz-3 İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi

Kaspaz-3 hücrelerde apoptoz için oldukça önemlidir. Apoptoza uğramış hücrelerdeki en son aşmadır ve geri dönüşümü yoktur. Çeşitli sebeplerden kaspaz-3 aktivasyonu gerçekleştiğinde hücrelerde apoptoz olayı gerçekleşmektedir. Kaspaz-3 immünohistokimyasal olarak boyanma yoğunluğu dikkate alınarak değerlendirildi. Skorum aşağıda gösterildi (**241**).

0: Hiçbir boyanma yok

1: Çok az boyanma var

2: Şiddetli boyanma var

Kaspaz-3'ün immünohistokimyasal olarak belirlenmesi için 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.

3.9. ELISA

Östradiol Ölçümü

ELISA yöntemiyle, Endocrine Technologies, INC. USA Rodent östradiol ELISA ticari kiti kullanılarak, serumlarda östradiol ölçümü yapıldı. Bu testi,

yarışmalı bağlanma modelini baz alan solid faz enzim immunassay prensibine dayanmaktadır. östradiol konsantrasyonu bilinmeyen serum örnekleri (işaretili olmayan antijen) ve konjuge östradiol (işaretili antijen) kuyucuklara eklenir. İşaretili ve işaretili olmayan antijenler, kuyucuk duvarlarında kaplı bulunan spesifik antikora bağlanmak için birbirleri ile yarışır. Yıkama aşaması ile bağlı olmayan serbest antijenler uzaklaştırılır. Antikora bağlanan işaretili antijenlerin miktarı, işaretili olmayan antijen konsantrasyonu (ölçülmek istenen östradiol konsantrasyonu) ile ters orantılıdır. Bu araştırmada, oluşan renk değişimi 450 nm'de plate okuyucu ile ölçülmüştür. Çizilen standart eğrisinden, serumlardaki östradiol 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.

FSH Ölçümü

ELISA yönetimiyle, Endocrine Technologies, INC. USA Rodent FSH ELISA ticari kiti kullanılarak, serumlarda östradiol ölçümü yapıldı. Bu testi, yarışmalı bağlanma modelini baz alan solid faz enzim immunassay prensibine dayanmaktadır. FSH konsantrasyonu bilinmeyen serum örnekleri (işaretili olmayan antijen) ve konjuge FSH (işaretili antijen) kuyucuklara eklenir. İşaretili ve işaretili olmayan antijenler, kuyucuk duvarlarında kaplı bulunan spesifik antikora bağlanmak için birbirleri ile yarışır. Yıkama aşaması ile bağlı olmayan serbest antijenler uzaklaştırılır. Antikora bağlanan işaretili antijenlerin miktarı, işaretili olmayan antijen konsantrasyonu (ölçülmek istenen FSH konsantrasyonu) ile ters orantılıdır. Bu araştırmada, 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.

3.10. İstatistiksel Yöntem

Vücut ağırlığı, uterus, over 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 için 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 ile karşılaştırıldı. Normal dağılım gösteren verilerin özetlenmesinde ortalama±standart sapma kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen verilerin özetlenmesinde median (minimum ; maksimum) kullanıldı. $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Tüm testler ESOGÜ Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalında yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Ağırlıklar

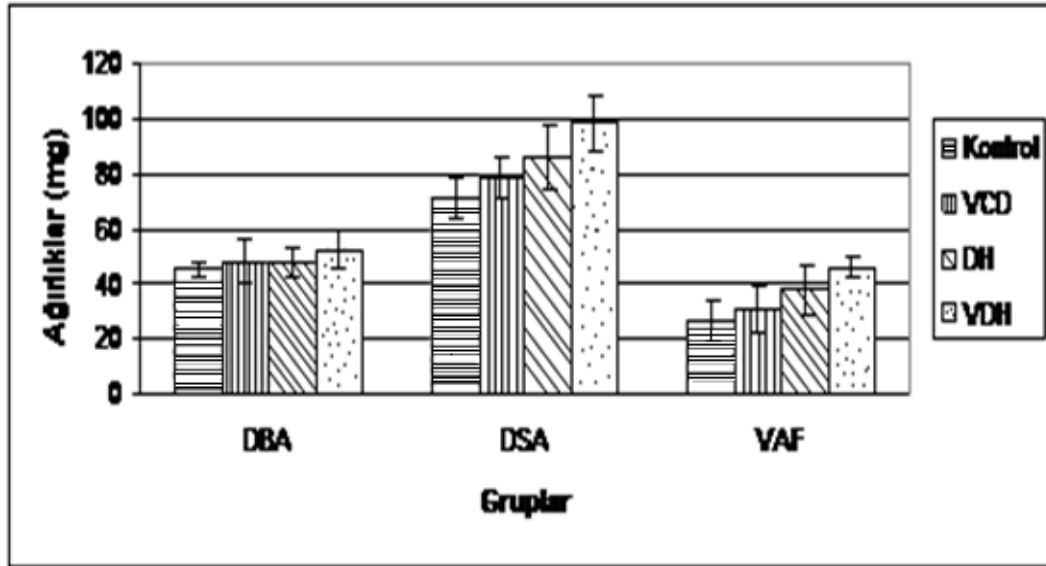
4.1.1. Vücut Ağırlıkları

Kontrol ve araştırma guruplarına ait deney başlangıç ağırlıkları (DBA), deney sonundaki vücut ağırlıkları (DSA) ve vücut ağırlık farkları (VAF) bakımından karşılaştırılması **Tablo 4.1.** de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre:

Tablo 4.1. Denek ağırlıklarının kontrol ve araştırma guruplarına göre karşılaştırılması.

Ağırlıklar(mg)	Kontrol	VCD	DH	VDH	p değeri
DBA	45±3,16	48,33±8,66	48,12±5,93	52,5±7,56	P=0,26
DSA	71,66±7,53	78,88±7,82	86,25±11,88 ^c	98,75±9,91 ^{a,b}	P<0,01
VAF	26,66±6,83	30,55±8,07	38,12±9,61	46,25±4,43 ^{d,e}	P<0,01

a; VDH grubu ile VCD grubu arasında fark vardır. (p=0,001). b; VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır (p<0,001). c; DH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır (p=0,04). d; VDH grubu ile VCD grubu arasında fark vardır (P=0,001). e; VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır (p<0,001).



Şekil 4.1. Denek ağırlıklarının kontrol ve araştırma guruplarına göre karşılaştırılması.

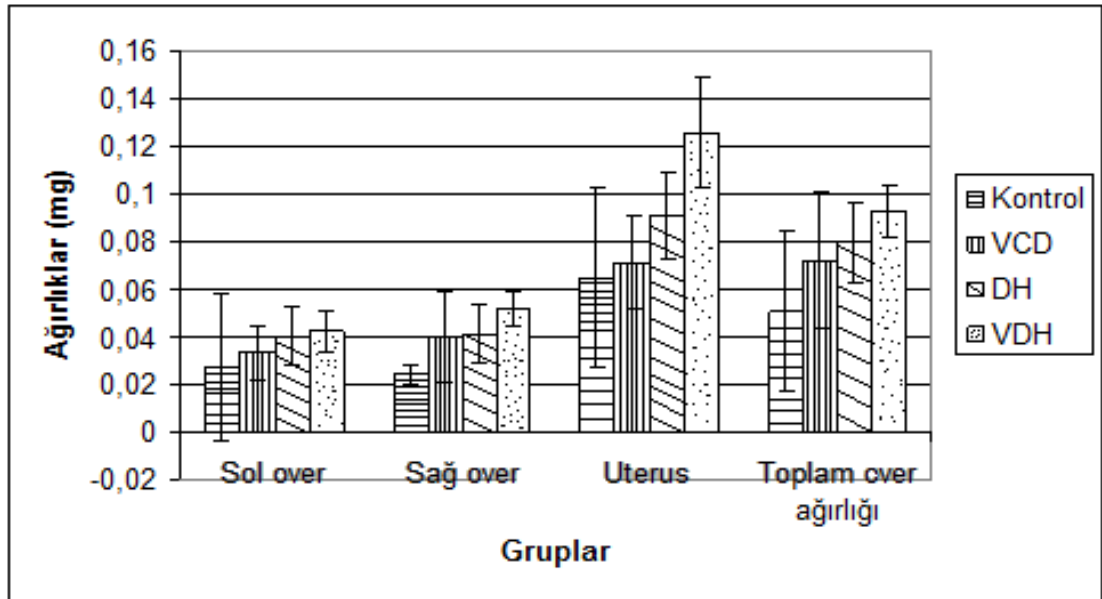
Kontrol ve araştırma gurupları arasında deney başlangıç ağırlıkları (DBA) bakımından fark yoktur ($p=0,26$). Kontrol grubu ile araştırma gurupları arasında deney sonundaki vücut ağırlıkları (DSA) ve vücut ağırlık farkları (VAF) bakımından guruplar arasında fark vardır ($p<0,01$).

Kontrol ve araştırma gurupları DSA karşılaştırıldığında; VCD + DHEA (VDH) grubu ile VCD (VCD) grubu arasında fark vardır ($P=0,001$). VDH grubunda VCD grubuna göre DSA daha fazladır. VDH ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p<0,001$). VDH grubunda kontrole göre DSA'ları daha fazladır. DHEA grubu (DH) ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p=0,04$). DH grubunda DSA kontrol grubuna göre daha fazladır.

Kontrol ve araştırma gurupları VAF ağırlıkları karşılaştırıldığında; VDH grubu ile VCD grubu arasında fark vardır ($P=0,001$). VDH grubunda, VAF, VCD grubuna göre daha fazladır. VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($P<0,001$). VDH grubunda kontrol grubuna göre VAF daha fazladır. DH grubu ile VDH grubu arasında fark yoktur ($p=0,63$). VDH grubunda DH grubuna göre VAF daha fazladır.

4.1.2. Over ve Uterus Ağırlıkları

Kontrol ve araştırma guruplarına ait deneklerin sağ over, sol over, uterus ve toplam over ağırlıklarının karşılaştırılması **Tablo 4.2. Şekil 4.2.2** de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Deneklerin sağ over, sol over, uterus ve toplam over ağırlıklarının kontrol ve araştırma guruplarına göre karşılaştırılması.

Tablo 4.2. Deneklerin sağ over, sol over, uterus ve toplam over ağırlıklarının kontrol ve araştırma guruplarına göre karşılaştırılması.

Ağırlıklar(mg)	Kontrol	VCD	DH	VDH	p değeri
Sol over	0,02±0,03	0,03±0,01	0,04±0,01	0,04±0,01	P=0,36
Sağ over	0,02±0,00	0,03±0,01	0,04±0,01	0,05±0,00 ^a	P=0,007
Uterus	0,06±0,03	0,07±0,02	0,09±0,01	0,12±0,02 ^{b,c}	P<0,001
Toplam over ağırlığı	0,05±0,03	0,07±0,02	0,08±0,01	0,09±0,01 ^d	P=0,02

a; VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır (p=0,003). b; VDH grubu ile VCD grubu arasında fark vardır (p=0,001). c; VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır (p=0,001). d; VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır (p=0,019). (TUKEY testi)

Kontrol ve araştırma gurupları arasında sol over ağırlığı bakımından fark yoktur P=0,36. Sağ over ağırlıkları bakımından guruplar arasında fark vardır P=0,007. Uterus ağırlıkları bakımından guruplar arasında fark vardır P<0,001. Total over ağırlıkları bakımından guruplar arasında fark vardır (P=0,02).

Kontrol ve araştırma gurupları sağ over ağırlıkları karşılaştırıldığında; VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır (p=0,003). VDH grubunda kontrol grubuna göre sağ over ağırlığı daha fazladır.

Kontrol ve araştırma gurupları uterus ağırlıkları karşılaştırıldığında; VDH grubu ile VCD grubu arasında fark vardır (p=0,001). VDH grubu uterus ağırlığı VCD grubundan daha fazladır. VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır (p=0,001). VDH grubunda uterus ağırlığı kontrol grubuna göre daha fazladır.

Kontrol ve araştırma gurupları toplam over ağırlıkları bakımından birbirleriyle karşılaştırıldığında; VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır (p=0,019). VDH grubunda toplam over ağırlığı, kontrol grubuna göre artmıştır.

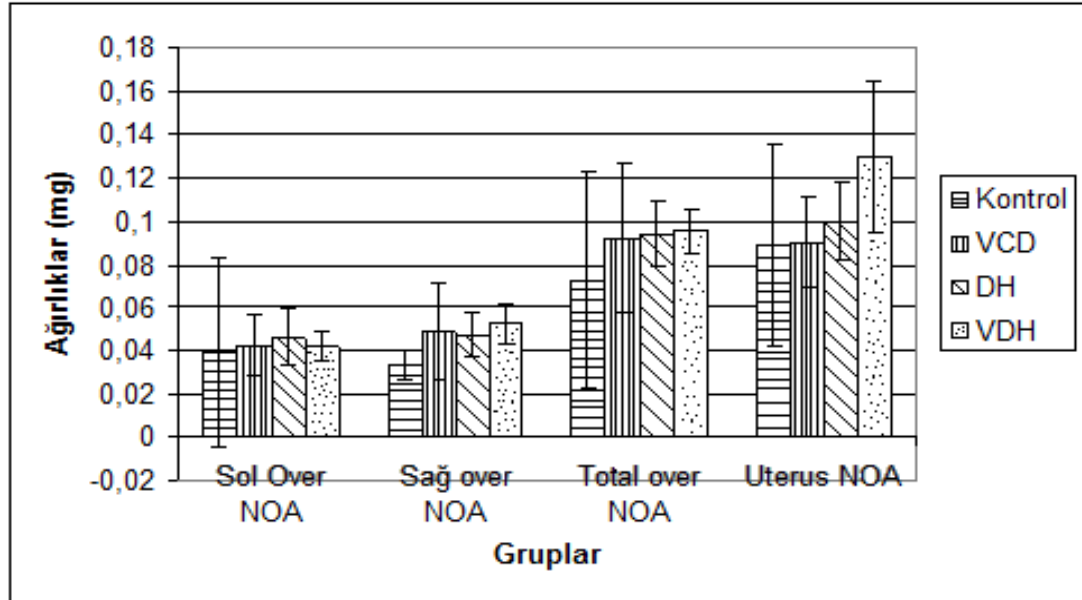
Normalleştirilmiş organ ağırlıkları deney sonunda elde edilen organ ağırlıklarının deney sonundaki hayvanların vücut ağırlıklarına bölünerek elde edilmektedir.

$$\text{Normalleştirilmiş organ ağırlıkları} = \frac{\text{Deney sonundaki organ ağırlığı}}{\text{Deney sonundaki vücut ağırlığı}}$$

Deneklere ait normalleştirilmiş sağ over, normalleştirilmiş sol over, normalleştirilmiş toplam over ağırlığı ve normalleştirilmiş uterus ağırlıklarının karşılaştırılması **Tablo 4.3.** de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre:

Tablo 4.3. Deneklere ait normalleştirilmiş sağ over, normalleştirilmiş sol over, normalleştirilmiş toplam over ağırlığı ve normalleştirilmiş uterus ağırlıklarının kontrol ve araştırma guruplarına göre karşılaştırılması.

Ağırlıklar(mg)	Kontrol	VCD	DH	VDH	p değeri
Sol Over NOA	0,03±0,04	0,04±0,01	0,04±0,01	0,04±0,00	P=0,932
Sağ over NOA	0,03±0,00	0,04±0,02	0,04±0,01	0,05±0,01	P=0,130
Total over NOA	0,07±0,05	0,09±0,03	0,09±0,01	0,09±0,01	P=0,519
Uterus NOA	0,08±0,04	0,09±0,02	0,1±0,01	0,13±0,03	P=0,057



Şekil 4.3. Deneklere ait normalleştirilmiş sağ over, normalleştirilmiş sol over, normalleştirilmiş toplam over ağırlığı ve normalleştirilmiş uterus ağırlıklarının kontrol ve araştırma guruplarına göre karşılaştırılması.

Kontrol ve araştırma gurupları arasında normalleştirilmiş sol over ağırlığı $P=0,932$, normalleştirilmiş sağ over ağırlığı $P=0,130$, normalleştirilmiş toplam over ağırlığı $P=0,519$ ve normalleştirilmiş uterus ağırlıkları $P=0,057$ bakımından fark yoktur.

4.2. Over Morfometrik Bulguları

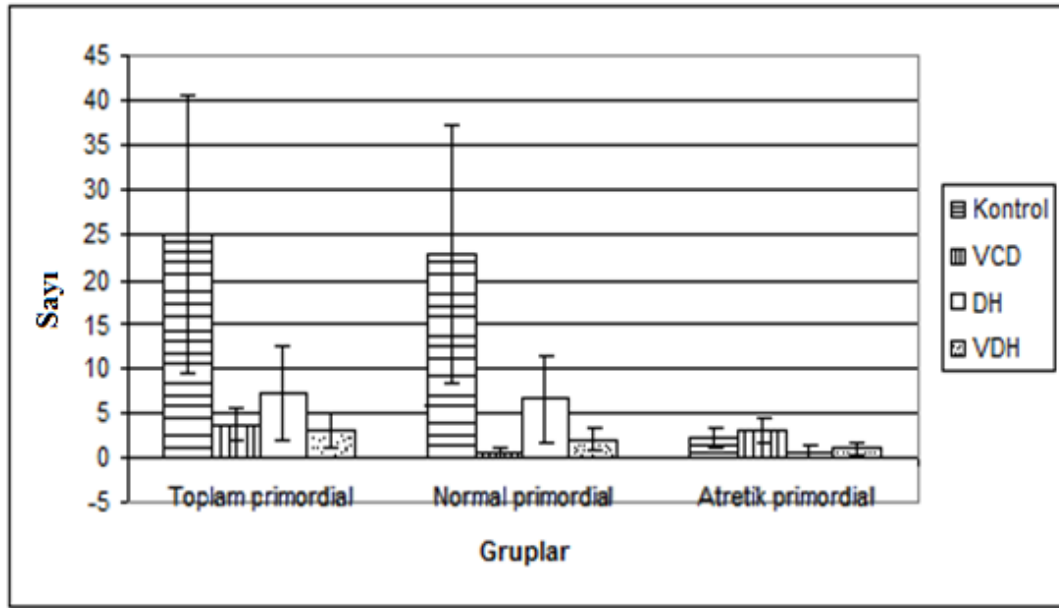
4.2.1. Folikül Sayıları

On beş gün kontrol ve araştırma guruplarına ait toplam primordiyal folikül sayısı, normal primordiyal folikül sayısı ve atretik primordiyal folikül sayısının karşılaştırılması **Tablo x** de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre:

Tablo 4.4. Deneklere ait toplam primordiyal folikül sayısı, normal primordiyal folikül sayısı ve atretik primordiyal folikül sayılarının kontrol ve araştırma guruplarına göre karşılaştırılması.

Foliküller	Kontrol	VCD	DH	VDH	p değeri
Toplam primordial	25±15,57	3,62±1,77 ^a	7,16±5,15 ^b	3±1,87 ^c	p=0,003
Normal primordial	22,8±14,6	0,62±0,52 ^{a,d,e}	6,5±4,84 ^g	2±1,22 ^{c,f}	P<0,0001
Atretik primordial	2,2±1,1	3±1,31 ^{h,i}	0,66±0,81 ^g	1±0,71	p=0,006

a: VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p<0,0001$). b: DH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p=0,017$). c: VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p=0,008$). d: VCD grubu ile DH arasında fark vardır ($P=0,001$). e: VCD grubu ile VDH gurupları arasında fark vardır ($p=0,03$). f: VDH grubu ile DH grubu arasında fark vardır ($p=0,017$). g: DH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p=0,017$). h: VCD grubu ile DH grubu arasında fark vardır ($p=0,005$). i: VCD grubu ile VDH gurupları arasında fark vardır ($p=0,011$).



Şekil 4.4. Deneklere ait toplam primordiyal folikül sayısı, normal primordiyal folikül sayısı ve atretik primordiyal folikül sayılarının kontrol ve araştırma gruplarına göre karşılaştırılması.

Kontrol ve araştırma grupları arasında, toplam primordiyal folikül sayısı bakımından +gruplar arasında fark vardır ($p=0,003$). Normal primordiyal folikül sayısı bakımından gruplar arasında fark vardır ($p<0,0001$). Atretik primordiyal folikül sayısı bakımından gruplar arasında fark vardır ($p=0,006$).

Kontrol ve araştırma grupları arasında, toplam primordiyal folikül sayıları karşılaştırıldığında; VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p<0,0001$). VCD grubunda kontrol grubuna göre toplam primordiyal folikül sayısı daha azdır. DH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p=0,017$). DH grubunda toplam primordiyal folikül sayısı kontrol grubundan daha azdır. VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p=0,008$). VDH grubunda toplam primordiyal folikül sayısı kontrol grubundan daha azdır.

Kontrol ve araştırma grupları arasında, normal primordiyal folikül sayıları karşılaştırıldığında; VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p<0,0001$). VCD grubunda normal primordiyal folikül sayısı kontrol grubuna göre daha azdır. VCD grubu ile DH arasında fark vardır ($p=0,001$). VCD grubunda normal primordiyal folikül sayısı DH grubuna göre daha azdır. VCD grubu ile VDH grupları arasında fark vardır ($p=0,03$). VCD grubunda normal primordiyal folikül

sayısı VDH grubuna göre daha azdır. VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p=0,008$). VDH grubunda normal primordiyal folikül sayısı kontrol grubuna göre daha azdır. VDH grubu ile DH grubu arasında fark vardır ($p=0,017$). VDH grubunda normal primordiyal folikül sayısı DH grubuna göre daha azdır. DH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p=0,017$). DH grubunda normal primordiyal folikül sayısı kontrol grubuna göre daha azdır.

Kontrol ve araştırma grupları atretik primordiyal folikül sayıları karşılaştırıldığında; VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p=0,021$). VCD grubunda atretik primordiyal folikül sayısı kontrol grubundan daha fazladır. VCD grubu ile DH grubu arasında fark vardır ($p=0,005$). VCD grubunda atretik primordiyal folikül sayısı DH grubundan daha fazladır. VCD grubu ile VDH grupları arasında fark vardır ($p=0,011$). VCD grubunda atretik primordiyal folikül sayısı VDH grubundan daha fazladır. DH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p=0,03$). DH grubunda atretik primordiyal folikül sayısı kontrol grubundan daha azdır.

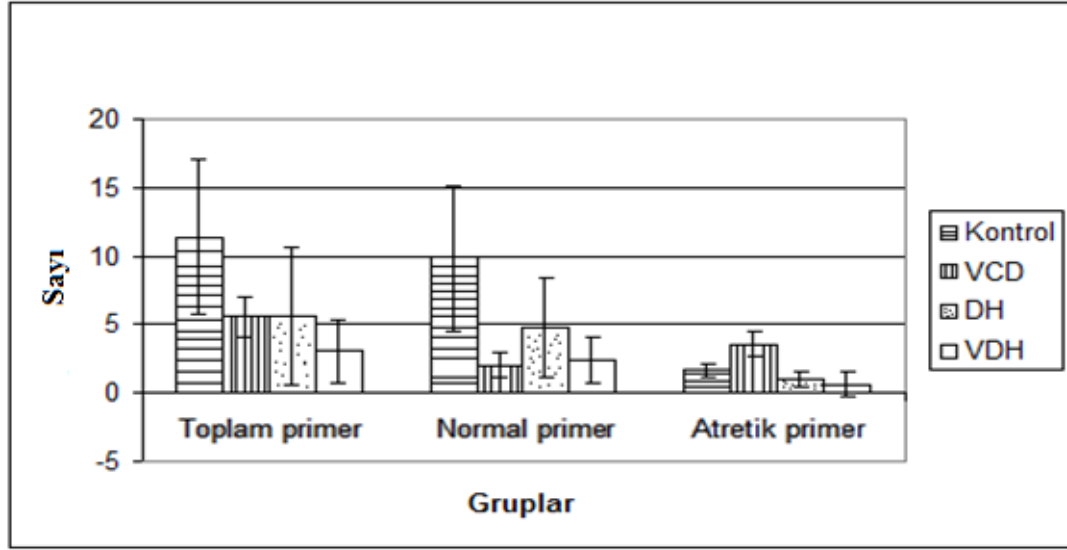
Kontrol ve araştırma gruplarına ait toplam primer folikül sayısı, normal primer folikül sayısı ve atretik primer folikül sayısının karşılaştırılması **Tablo 4.5.** de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre

Tablo 4.5. Deneklere ait toplam primer folikül sayısı, normal primer folikül sayısı ve atretik primer folikül sayılarının kontrol ve araştırma gruplarına göre karşılaştırılması.

Foliküller	Kontrol	VCD	DH	VDH	p değeri
Toplam primer	11,4±5,68	5,5±1,41 ^a	5,6±5,08 ^b	3±2,34 ^c	$p<0,0001$
Normal primer	9,8±5,35	2±0,92 ^{d,f}	4,66±3,61 ^b	2,4±1,67 ^e	$p<0,0001$
Atretik primer	1,6±0,54	3,5±0,92 ^{d,f,g}	1±0,54	0,6±0,89	$p<0,0001$

a: VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p<0,0001$).b: DH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p=0,03$).c: VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p=0,008$). d: VCD ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p<0,0001$) e: VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır

($p=0,016$). f: VCD grubu ile DH gurupları arasında fark vardır ($p=0,013$). g: VCD grubu ile VDH grubu arasında fark vardır ($p=0,002$).



Şekil 4.5. Deneklere ait toplam primer folikül sayısı, normal primer folikül sayısı ve atretik primer folikül sayılarının kontrol ve araştırma guruplarına göre karşılaştırılması.

Kontrol ve araştırma gurupları arasında, toplam primer folikül sayısı, normal primer folikül sayısı, atretik primer folikül sayısı bakımından guruplar arasında fark vardır ($p<0.0001$).

Kontrol ve araştırma guruplarında, toplam primer folikül sayıları karşılaştırıldığında; VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p<0,0001$). VCD grubunda toplam primer folikül sayısı kontrol grubundan daha azdır. DH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p=0,03$). DH grubunda toplam primer folikül sayısı kontrol grubundan daha azdır. VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p=0,008$). VDH grubunda toplam primer folikül sayısı kontrol grubundan daha azdır.

Kontrol ve araştırma guruplarında, normal primer folikül sayıları karşılaştırıldığında; VCD ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p<0,0001$). VCD grubu normal primer folikül sayısı kontrol grubuna göre daha azdır. DH ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p=0,03$). DH grubunda normal primer folikül sayısı kontrol grubuna göre daha azdır. VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p=0,016$). VDH grubunda normal primer folikül sayısı kontrol grubuna göre daha

azdır. VCD grubu ile DH gurupları arasında fark vardır ($p=0,02$). VCD grubunda normal primer folikül sayısı DH grubuna göre daha azdır.

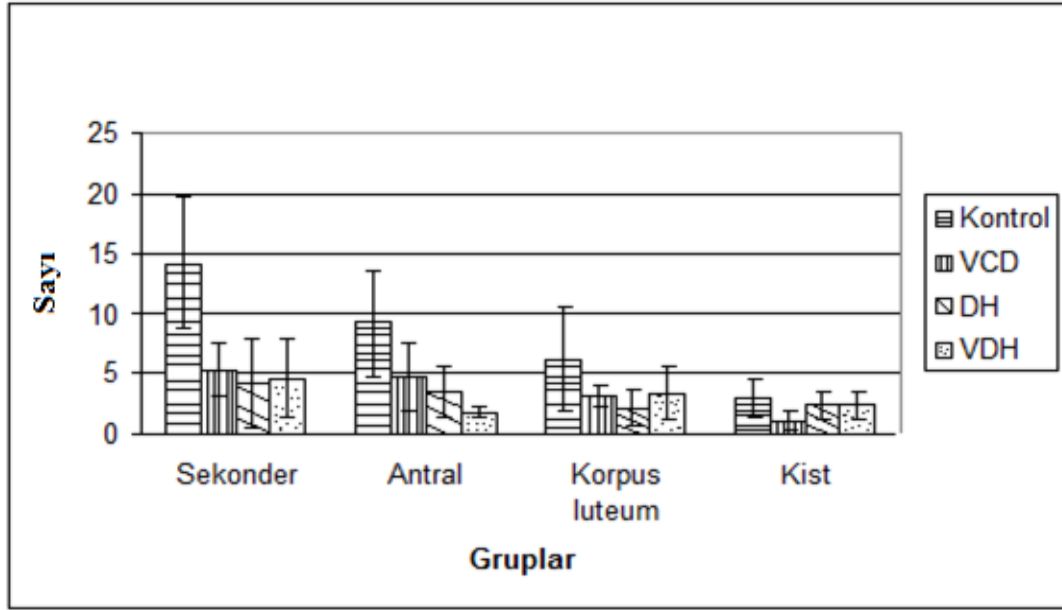
Kontrol ve araştırma gurupları atretik primer folikül sayıları karşılaştırıldığında; VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p<0,0001$), VCD grubunda atretik primer folikül sayısı kontrol grubuna göre daha fazladır. VCD grubu ile DH arasında fark vardır ($p=0,013$). VCD grubunda atretik primer folikül sayısı DH grubuna göre daha fazladır. VCD grubu ile VDH gurupları arasında fark vardır ($p=0,002$). VCD grubunda atretik primer folikül sayısı VDH grubuna göre daha fazladır.

Kontrol ve araştırma guruplarına ait toplam sekonder folikül sayısı, toplam antral folikül sayısı, korpus luteum sayıları ve folikül kisti sayılarının karşılaştırılması **Tablo 4.6.** de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre:

Tablo 4.6. Deneklere ait toplam sekonder folikül sayısı, toplam antral folikül sayısı, korpus luteum sayıları ve folikül kisti sayılarının kontrol ve araştırma guruplarına göre karşılaştırılması.

Foliküller	Kontrol	VCD	DH	VDH	p değeri
Sekonder	14,2±5,54	5,25±2,19 ^a	4,16±3,71 ^b	4,6±3,21 ^c	p=0,014
Antral	9,2±4,44	4,75±2,77 ^{d,g}	3,5±2,07 ^e	1,8±0,44 ^f	p=0,004
Korpus luteum	6,2±4,27	3,12±0,83	2,16±1,47	3,4±2,19	p=0,291
Kist	3±1,58	1,12±0,83 ^{d,h}	2,4±1,14	2,4±1,14	p=0,042

a: VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p<0,0001$) b: DH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p=0,009$). c: VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p=0,016$).d: VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p<0,0001$) e: DH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p=0,030$). f: VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p=0,008$). g: VCD grubu ile VDH grubu arasında fark vardır ($p=0,006$). h: VCD grubu ile DH grubu arasında fark vardır ($p=0,020$).



Şekil 4.6. Deneklere ait toplam sekonder folikül sayısı, toplam antral folikül sayısı, korpus luteum sayıları ve folikül kisti sayılarının kontrol ve araştırma guruplarına göre karşılaştırılması.

Kontrol ve araştırma gurupları arasında toplam sekonder folikül sayısı bakımından guruplar arasında fark vardır ($p=0,014$). Toplam antral folikül sayısı bakımından guruplar arasında fark vardır ($p=0,004$). Folikül kisti sayıları bakımından guruplar arasında fark vardır ($p=0,042$) Kontrol ve araştırma gurupları arasında korpus luteum sayıları bakımından fark yoktur ($p=0,291$).

Kontrol ve araştırma gurupları sekonder folikül sayıları bakımından birbirleriyle karşılaştırıldığında; VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p<0,0001$). VCD grubunda sekonder folikül sayısı kontrol grubuna göre daha azdır. DH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p=0,009$). DH grubunda sekonder folikül sayısı kontrol grubuna göre daha azdır. VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p=0,016$). VDH grubunda sekonder folikül sayısı kontrol grubuna göre daha azdır.

Kontrol ve araştırma gurupları antral folikül sayıları karşılaştırıldığında; VCD ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p<0,0001$). VCD grubu antral folikül sayıları kontrol grubundan daha azdır. DH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p=0,030$). DH grubu antral folikül sayıları kontrol grubundan daha azdır. VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p=0,008$). VDH grubu antral folikül

sayıları kontrol grubundan daha azdır. VCD grubu ile VDH grubu arasında fark vardır ($p=0,006$). VCD grubu antral folikül sayıları VDH grubundan daha azdır.

Kontrol ve araştırma gurupları folikül kisti sayıları karşılaştırıldığında; VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p=0,011$). VCD grubu folikül kist sayısı kontrol grubundan daha azdır. VCD grubu ile DH gurupları arasında fark vardır ($p=0,020$). VCD grubu folikül kist sayısı DH grubundan daha azdır.

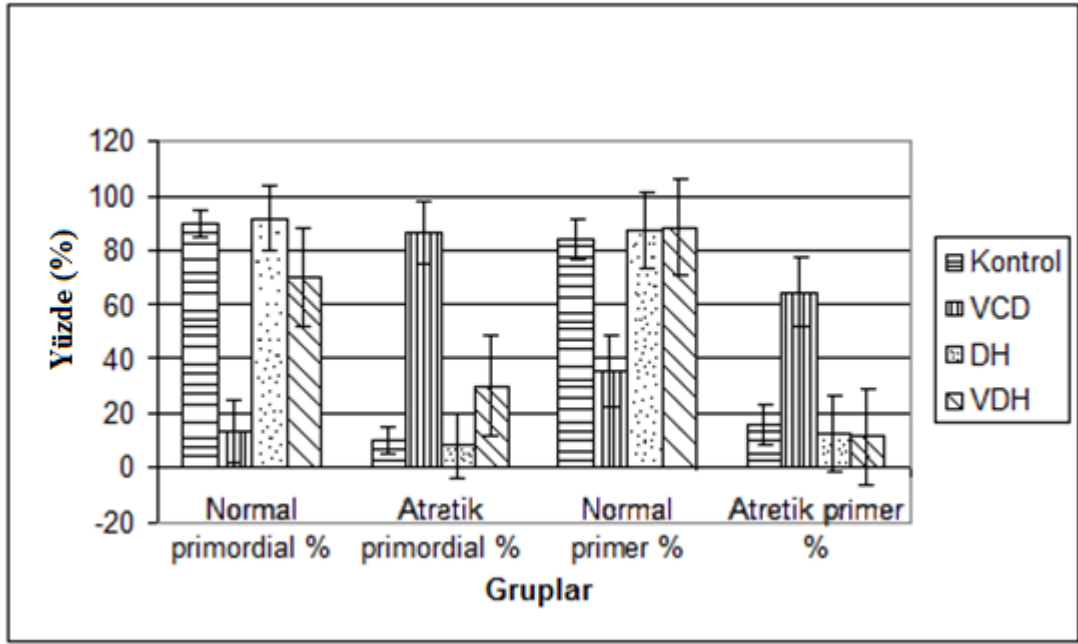
4.2.2. Folikül Yüzdeleri

Kontrol ve araştırma guruplarına ait normal primordiyal folikül, atretik primordiyal folikül, normal primer folikül ve atretik primer foliküllerin yüzdelerinin karşılaştırılması **Tablo 4.7.** de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre:

Tablo 4.7. Deneklere ait normal ve atretik primordiyal ve primer foliküllerin yüzdelerinin kontrol ve araştırma guruplarına göre karşılaştırılması.

Folikül Yüzdeleri (%)	Kontrol	VCD	DH	VDH	p değeri
Normal primordial %	90,1±4,77	13,33±11,37 ^{a,b,c}	91,87±11,48 ^d	70±18,25	P<0,0001
Atretik primordial %	9,9±4,77	86,67±11,37 ^{a,b,c}	8,13±11,48 ^d	30±18,25	P<0,0001
Normal primer%	84,15±7,48	35,46±12,78 ^{a,b,c}	87,5±13,69	88,66±17,57	P<0,0001
Atretik primer%	15,85±7,48	64,54±12,78 ^{a,b,c}	12,5±13,69	11,34±17,57	P<0,0001

a: VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p<0,0001$). b: VCD grubu ile DH grubu arasında fark vardır ($p<0,0001$).c: VCD grubu ile VDH grubu arasında fark vardır ($p<0,0001$). d: DH grubu ile VDH grubu arasında fark vardır ($p=0,036$).



Şekil 4.7. Deneklere ait normal ve atretik primordiyal ve primer foliküllerin yüzdelерinin kontrol ve araştırma guruplarına göre karşılaştırılması.

Kontrol ve araştırma gurupları arasında, normal primordiyal folikül, atretik primordiyal folikül, normal primer folikül ve atretik primer foliküllerin yüzdeleri bakımından guruplar arasında fark vardır ($p < 0,0001$).

Kontrol ve araştırma gurupları normal primordiyal folikül yüzdeleri karşılaştırıldığında; VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p < 0,0001$). VCD grubunda normal primordiyal folikül yüzdesi kontrol grubundan daha azdır. VCD grubu DH arasında fark vardır ($p < 0,0001$). VCD grubunda normal primordiyal folikül yüzdesi DH grubundan daha azdır. VCD grubu VDH gurupları arasında fark vardır ($p < 0,0001$). VCD grubunda normal primordiyal folikül yüzdesi VDH grubundan daha azdır. DH grubu ile VDH grubu arasında fark vardır ($p = 0,036$). DH grubunda normal primordiyal folikül yüzdesi VDH grubundan daha fazladır.

Kontrol ve araştırma gurupları atretik primordiyal folikül yüzdeleri bakımından karşılaştırıldığında; VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p < 0,0001$). VCD grubunda atretik primordiyal folikül yüzdeleri kontrol grubundan daha fazladır. VCD grubu ile DH grubu arasında fark vardır ($p < 0,0001$). VCD grubunda atretik primordiyal folikül yüzdeleri DH grubundan daha fazladır. VCD grubu ile VDH gurupları arasında fark vardır ($p < 0,0001$). VCD grubunda atretik

primordiyal folikül yüzdeleri VDH grubundan daha fazladır. DH grubu ile VDH grubu arasında fark vardır ($p=0,036$). DH grubunda atretik primordiyal folikül yüzdeleri VDH grubundan daha azdır.

Kontrol ve araştırma gurupları normal primer folikül yüzdeleri birbirleriyle karşılaştırıldığında; VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p<0,0001$). VCD grubunda normal primer folikül yüzdeleri kontrol grubundan daha azdır. VCD grubu ile DH grubu arasında fark vardır ($p<0,0001$). VCD grubunda normal primer folikül yüzdeleri DH grubundan daha azdır. VCD grubu ile VDH grubu arasında fark vardır ($p<0,0001$). VCD grubunda normal primer folikül yüzdeleri VDH grubundan daha azdır.

Kontrol ve araştırma gurupları atretik primer folikül yüzdeleri karşılaştırıldığında; VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p<0,0001$). VCD grubunda atretik primer folikül yüzdeleri kontrol grubundan daha fazladır. VCD grubu ile DH grubu arasında fark vardır ($p<0,0001$). VCD grubunda atretik primer folikül yüzdeleri DH grubundan daha fazladır. VCD grubu ile VDH grubu arasında fark vardır ($p<0,0001$). VCD grubunda atretik primer folikül yüzdeleri VDH grubundan daha fazladır.

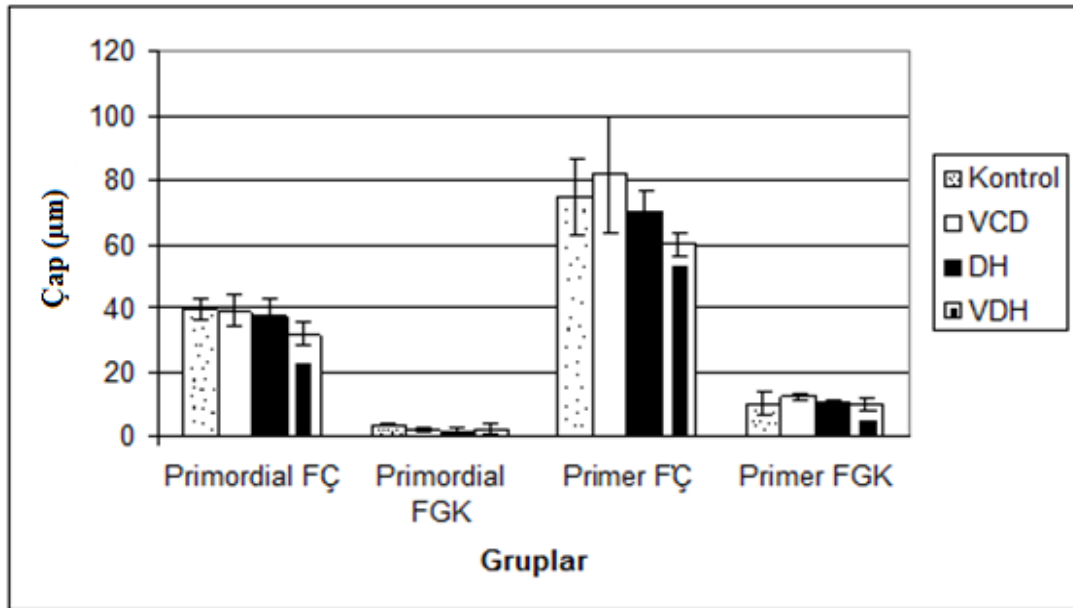
4.2.3. Folikül Çapları

Kontrol ve araştırma guruplarına ait primordiyal ve primer foliküllerin çaplarının ve granüloza tabaka kalınlığının karşılaştırılması **Tablo 4.8.** de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre:

Tablo 4.8. Deneklere ait primordiyal ve primer foliküllerin çaplarının ve granüloza tabakası kalınlıklarının Kontrol ve araştırma guruplarına göre karşılaştırılması.

Folikül Çapları (µm)	Kontrol	VCD	DH	VDH	p değeri
Primordial FÇ	39,19±3,15	38,81±5,04 ^a	37,51±4,8	31,61±4,07	p=0,042
Primordial FGK	3,43±0,45	2,04±0,75 ^b	1,51±0,9	2,23±1,71	p=0,018
Primer FÇ	74,78±11,78	81,71±17,82	70,03±6,38	60,14±3,44	p=0,113
Primer FGK	10,13±3,35	12,31±0,93	10,19±0,8	10,05±1,87	p=0,106

a: VCD grubu ile VDH grubu arasında fark vardır (p=0,047). b: VCD grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark vardır (p=0,012).



Şekil 4.8. Deneklere ait primordiyal ve primer foliküllerin çaplarının ve granüloza tabakası kalınlıklarının kontrol ve araştırma guruplarına göre karşılaştırılması.

Kontrol ve araştırma gurupları arasında, primordiyal folikül çapları bakımından fark vardır (P=0,042). Primordiyal granüloza tabakası kalınlığı bakımından fark vardır (p=0,018). Primer folikül çapı bakımından guruplar arasında

fark yoktur ($p=0,113$). Primer folikül granüloza tabakası kalınlıkları bakımından gruplar arasında fark yoktur ($p=0,106$).

Kontrol ve araştırma grupları primordiyal folikül çapları karşılaştırıldığında; VCD grubu ile VDH grubu arasında fark vardır ($p=0,047$). VCD grubu primordiyal folikül çapları VDH grubundan daha fazladır.

Kontrol ve araştırma grupları primordiyal folikül granüloza tabakası kalınlıkları karşılaştırıldığında; DH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p=0,012$). DH grubu primordiyal folikül granüloza tabakası kalınlıkları kontrol grubundan daha azdır.

Kontrol ve araştırma gruplarına ait sekonder folikül çapları, sekonder folikül teka tabakası kalınlıkları, sekonder folikül granüloza tabakası kalınlığı, antral folikül çapı, antral folikül teka kalınlığı ve antral folikül granüloza tabakası kalınlığının karşılaştırılması **Tablo 4.9.** de gösterilmiştir.

Tablo 4.9. Deneklere ait sekonder ve antral folikül çaplarının, teka ve granüloza tabaka kalınlığının kontrol ve araştırma gruplarına göre karşılaştırılması.

Folikül Çapları (μm)	Kontrol	VCD	DH	VDH	p değeri
Sekonder FÇ	306,73±53	363,89±122,66	323,61±162,79	359,05±58,85	p=0,810
Sekonder FTK	27,96±4,91	32,91±8,85	23,16±11,55	27,55±4,98	p=0,243
Sekonder FGK	74,48±13,54	98,24±40,22	82,94±42,85	101,07±14,23	p=0,545
Antral FÇ	732,64±107,56	928,04±198,23	1097,31±170,93	939,98±297,3	p=0,059
Antral FTK	50,78±9,46	59,21±12,46	53,48±7,65	55,55±11,42	p=0,571
Antral FGK	140,94±21,43	164,39±20,46	162,18±31,5	167,32±25,75	p=0,342

Kontrol ve araştırma grupları arasında sekonder folikül çaplar bakımından gruplar arasında fark yoktur. ($p=0,810$) Sekonder folikül teka tabakası kalınlıkları bakımından gruplar arasında fark yoktur. ($p=0,243$) Sekonder folikül granüloza tabakası kalınlığı bakımından gruplar arasında fark yoktur. ($p=0,545$) Antral folikül çapı bakımından gruplar arasında fark yoktur. ($p=0,059$) Antral folikül teka kalınlığı bakımından gruplar arasında fark yoktur. ($p=0,571$) Antral folikül granüloza tabakası kalınlığı bakımından gruplar arasında fark yoktur. ($p=0,342$)

4.3. TUNEL İmmunohistokimyasal Boyaması

Kontrol ve araştırma gruplarına ait TUNEL(+) hücre sayılarının karşılaştırılması **Tablo 4.10.** de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre:

Tablo 4.10. Deneklere ait TUNEL(+) hücre sayılarının kontrol ve araştırma gruplarına göre karşılaştırılması.

Foliküllerde TUNEL (+) hücre sayısı	Kontrol Med(min;max)	VCD Med(min;max)	DH Med(min;max)	VDH Med(min;max)	p değeri
Primordial	0 (0;0)	8 (0;15)	0 (0;2)	0 (0;5)	P=0,140
Primer	0 (0;0)	15 (0;30) ^a	3 (0;16)	10 (0;12) ^b	P=0,02
Sekonder	4 (3;46)	15 (8;55)	20 (7,5;24)	17 (3;32)	P=0,531
Antral	35(16;83)	64(46;155)	50(29;410)	50(0;119)	P=0,228
Korpus	0 (0;0)	0 (0;2)	0 (0;0)	0 (0;34)	P=0,136
Kist	0 (0;0)	0 (0;8)	0 (0; 4)	0 (0;5)	P=0,502

a:VCD ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p<0,01$). b:VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p<0,01$).

Kontrol ve araştırma grupları arasında primordiyal foliküllerde TUNEL (+) hücre sayısı bakımından fark yoktur ($P=0,140$). Sekonder foliküllerde TUNEL (+) hücre sayısı bakımından gruplar arasında fark yoktur ($P=0,531$). Antral foliküllerde TUNEL (+) hücre sayısı bakımından gruplar arasında fark yoktur ($P=0,228$). Korpus luteumlarda TUNEL (+) hücre sayısı bakımından gruplar arasında fark yoktur

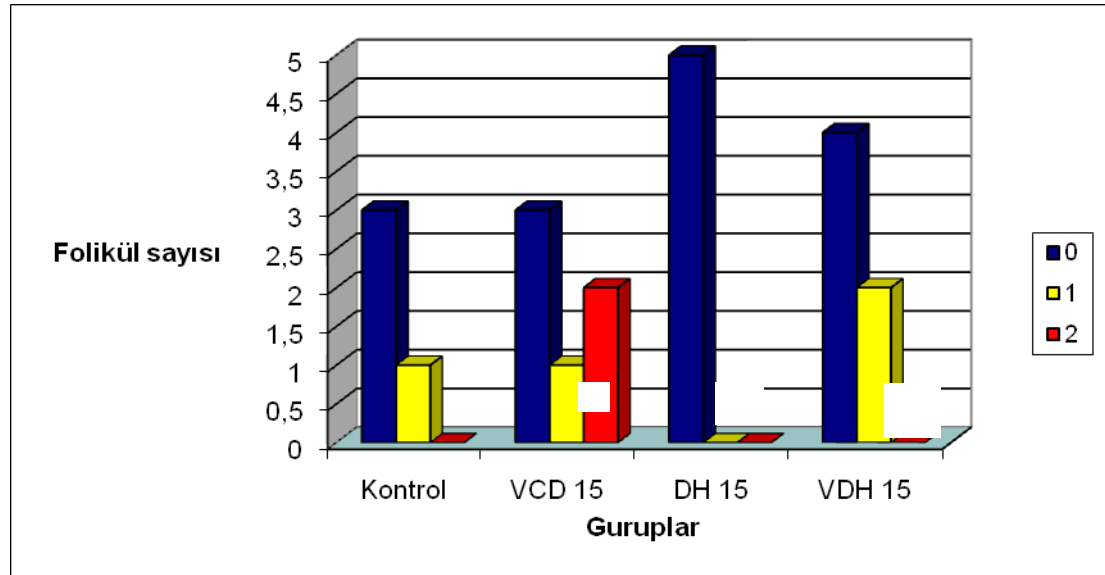
($P=0,136$) ve folikül kistlerinde TUNEL (+) hücre sayısı bakımından gruplar arasında fark yoktur ($P=0,502$). Primer foliküllerde TUNEL (+) hücre sayısı bakımından gruplar arasında fark vardır ($p=0,02$).

Kontrol ve araştırma grupları ait primer foliküllerde TUNEL (+) hücre sayısı karşılaştırıldığında; VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p=0,01$). VCD grubu primer foliküllerde TUNEL (+) hücre sayısı kontrol grubundan daha fazladır. VDH grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır ($p=0,01$). VDH grubu primer foliküllerde TUNEL (+) hücre sayısı kontrol grubundan daha fazladır.

4.4. Kaspaz 3 İmmunohistokimyasal Boyaması

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

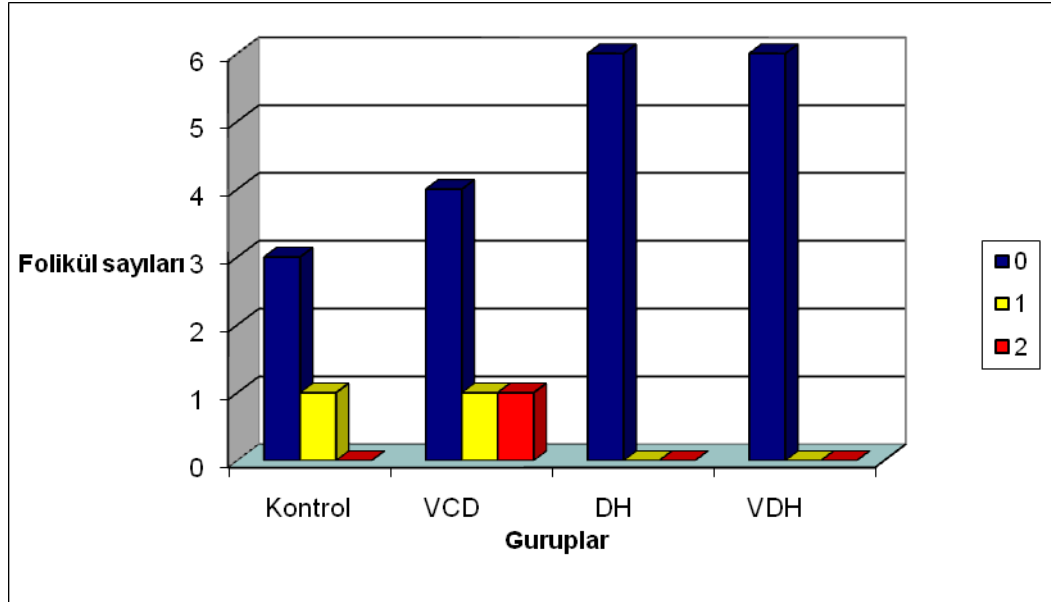
Deney ve kontrol grupları arasında primordiyal folikül kaspaz-3 boyanma yoğunluğu bakımından birbirleri ile karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı düzeyde fark yoktur. $X^2: 8,365$ $SD=6$ $p=0,237$ (Pearson Chi-square) (**Şekil 4.9**)



(0=boyanma yok, 1=hafif boyanma, 2=kuvvetli boyanma)

Şekil 4.9. Deneklere ait primordiyal folikül granüloza hücrelerinin kaspaz 3 boyanma yoğunluğunun çalışma ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

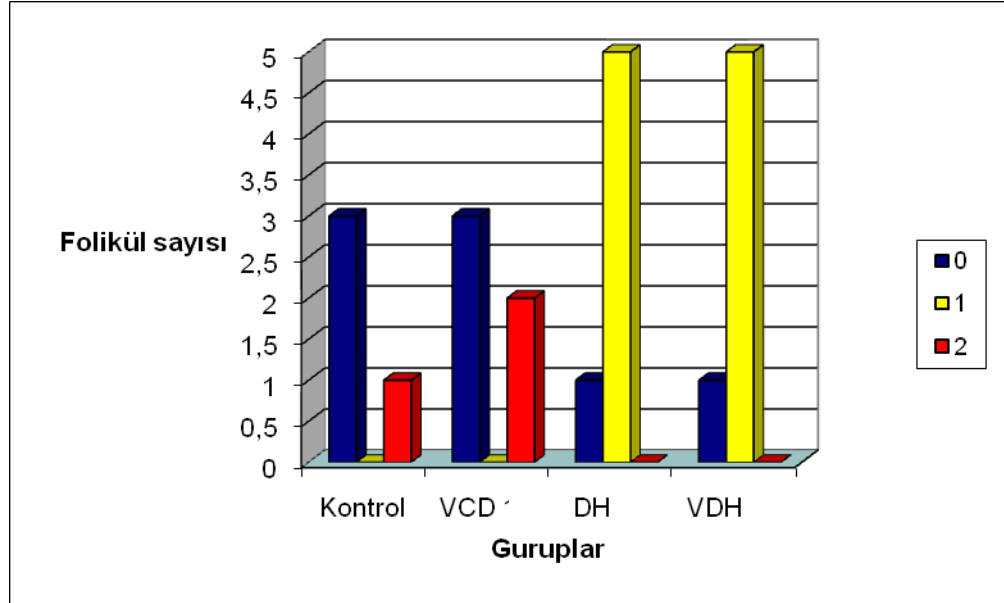
Deney ve kontrol grupları arasında primer folikül kaspaz-3 boyanma yoğunluğu bakımından birbirleri ile karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı düzeyde fark yoktur. $X^2: 5,838$ $SD=6$ $p=0,438$ (Pearson Chi-square) (**Şekil 4.10**)



(0=boyanma yok, 1=hafif boyanma, 2=kuvvetli boyanma)

Şekil 4.10. Deneklere ait primer folikül granüloza hücrelerinin kaspaz 3 boyanma yoğunluğunun çalışma ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

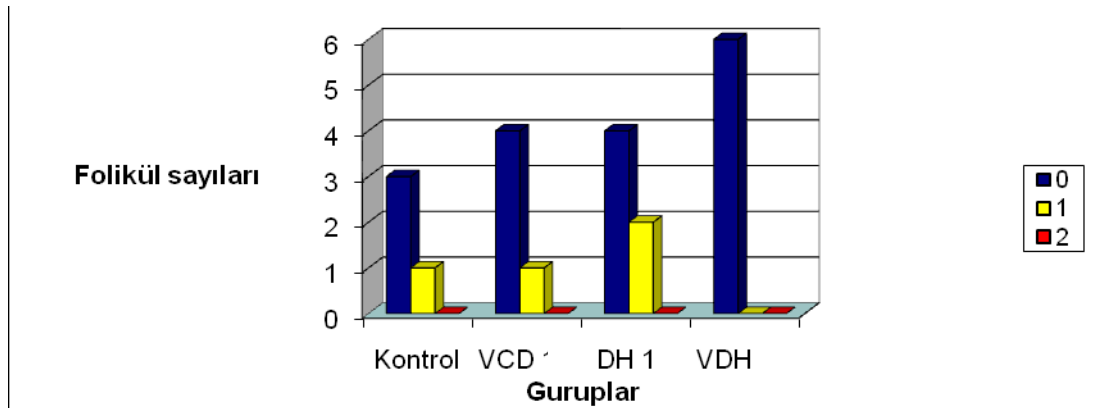
Deney ve kontrol grupları arasında sekonder folikül granüloza tabakasında kaspaz-3 boyanma yoğunluğu bakımından birbirleri ile karşılaştırıldığında gruplar arasında fark vardır ($p=0,014$). Sekonder folikülün granüloza tabakasında şiddetli düzeyde (2. derece) boyanan 3 folikülden 2 si VCD grubuna aittir. $X^2: 15,356$ $SD=6$ $p=0,014$ (Pearson Chi-square) (**Şekil 4.11**)



(0=boyanma yok, 1=hafif boyanma, 2=kuvvetli boyanma)

Şekil 4.11. Deneklere ait sekonder folikül granüloza hücrelerinin kaspaz 3 boyanma yoğunluğunun çalışma ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi

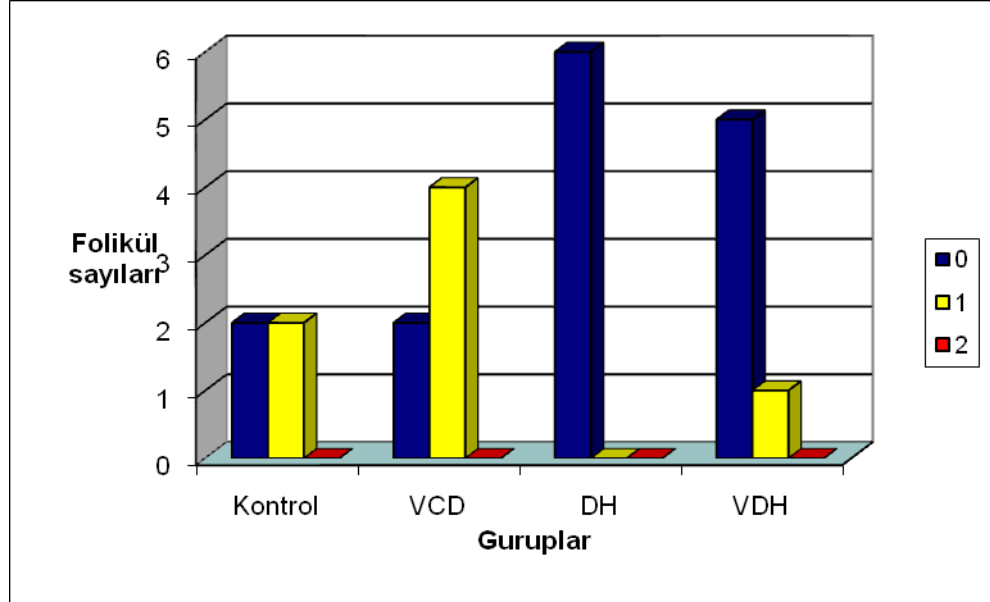
Deney ve kontrol grupları arasında sekonder folikül teka tabakası kaspaz-3 boyanma yoğunluğu bakımından birbirleri ile karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı düzeyde fark yoktur. $X^2: 2,301$ $SD=3$ $p=0,604$ (Pearson Chi-square) (**Şekil 4.12**).



(0=boyanma yok, 1=hafif boyanma, 2=kuvvetli boyanma)

Şekil 4.12. Deneklere ait sekonder folikül teka tabakası kaspaz 3 boyanma yoğunluğunun çalışma ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

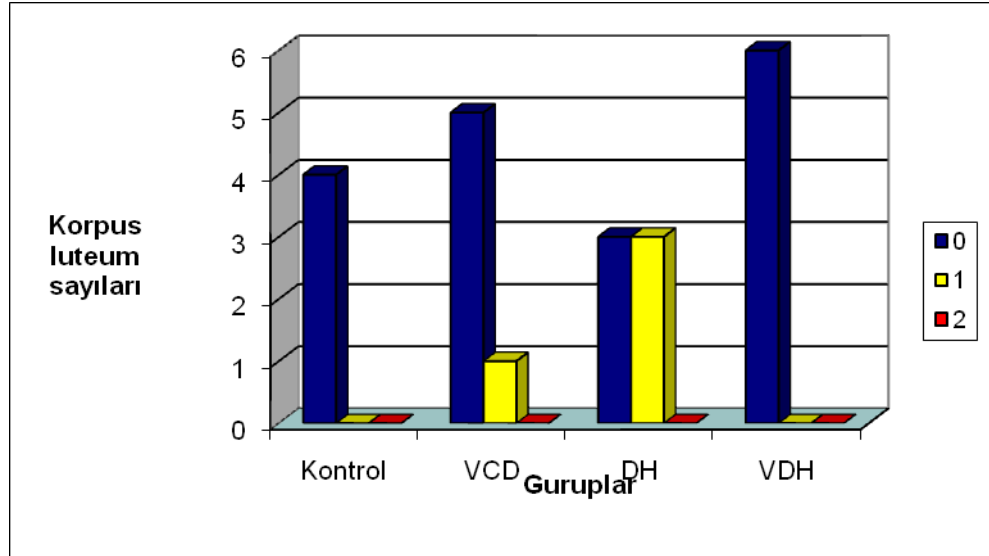
Deney ve kontrol grupları arasında antral folikül teka tabakası kaspaz-3 boyanma yoğunluğu bakımından birbirleri ile karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı düzeyde fark yoktur. $X^2: 7,403$ $SD=3$ $p=0,062$ (Pearson Chi-square)(**Şekil 4.13**).



(0=boyanma yok, 1=hafif boyanma, 2=kuvvetli boyanma)

Şekil 4.13 Deneklere ait antral folikül teka tabakası kaspaz 3 boyanma yoğunluğunun çalışma ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

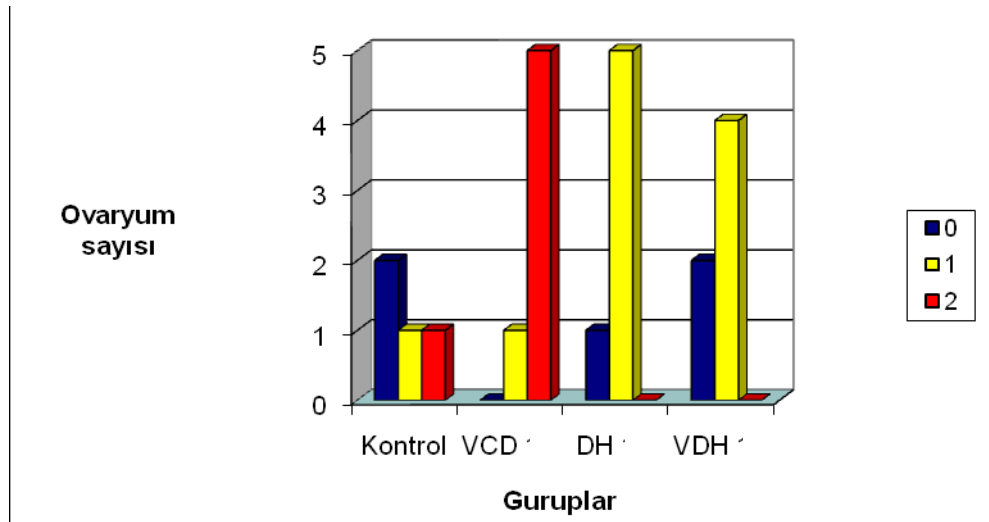
Deney ve kontrol grupları arasında korpus luteum kaspaz 3 boyanma yoğunluğu bakımından birbirleri ile karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı düzeyde fark yoktur. $X^2: 6,315$ $SD=3$ $p=0,182$ (Pearson Chi-square) (**Şekil 4.14**)



(0=boyanma yok, 1=hafif boyanma, 2=kuvvetli boyanma)

Şekil 4.14 Deneklere ait korpus luteumlarda kaspaz 3 boyanma yoğunluğunun çalışma ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi

Deney ve kontrol grupları arasında over stromasında kaspaz-3 boyanma yoğunluğu bakımından birbirleri ile karşılaştırıldığında gruplar arasında fark vardır ($p=0,008$). Over stromasında şiddetli düzeyde (2. derece) boyanan 6 overden 5'i VCD grubuna aittir. $X^2: 24,846$ $SD=6$ $p=0,008$ (Pearson Chi-square) (**Şekil 4.15**).



(0=boyanma yok, 1=hafif boyanma, 2=kuvvetli boyanma)

Şekil 4.15 Deneklere ait over stromasında kaspaz 3 boyanma yoğunluğunun çalışma ve kontrol gruplarına göre değerlendirilmesi.

4.5. Serum FSH, Östradiol Ölçümleri

Kontrol ve araştırma gruplarına ait serum FSH, E2 düzeylerinin karşılaştırılması **Tablo 4.11.** de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre:

Tablo 4.11. Deneklere ait serum FSH, E2 düzeylerinin kontrol ve araştırma gruplarına göre karşılaştırılması

	Kontrol Med(min;max)	VCD Med(min;max)	DH Med(min;max)	VDH Med(min;max)	P
FSH	15,1(15,1;15,1)	0,68(0,36;0,87) ^{a,b,c}	15,1(15,1;15,1)	15,1(15,1;15,1)	P<0,0001
E2	83(34,5;377)	999(196;2762,2) ^{d,e}	299,5(182;726)	107(79,5;775)	P=0,18

a: VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır (p=0,001). b: VCD grubu ile DH grubu arasında fark vardır (p=0,001). c: VCD grubu ile VDH grupları arasında fark vardır (p=0,003).d: VCD grubu ile kontrol grupları arasında anlamlı fark vardır (p=0,008). e: VCD grubu ile VDH grubu arasında fark vardır (p<0,048)

Kontrol ve araştırma grupları arasında serum FSH düzeyleri bakımından gruplar arasında fark vardır (P<0,0001). Serum E2 düzeyleri bakımından gruplar arasında fark vardır (P=0,18).

Serum FSH düzeyleri karşılaştırıldığında; VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark vardır (p=0,001). VCD grubu serum FSH düzeyleri kontrol grubundan daha azdır. VCD grubu ile DH grubu arasında fark vardır (p=0,001). VCD grubu serum FSH düzeyleri DH grubundan daha azdır. VCD grubu ile VDH grupları arasında fark vardır (p=0,003). VCD grubu serum FSH düzeyleri VDH grubundan daha azdır.

Serum E2 düzeyleri karşılaştırıldığında; VCD grubu ile kontrol grupları arasında fark vardır (p=0,008). VCD grubu serum E2 düzeyleri kontrol grubundan daha fazladır. VCD grubu ile VDH grubu arasında anlamlı fark vardır (p=0,048). VCD grubu serum E2 düzeyleri VDH grubundan daha fazladır.

4.6. Işık Mikroskopik Bulguları

4.6.1. Kontrol Grubu

Araştırmamızın kontrol guruplarına ait overlerden 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 görüldü. Tunika albuginea altında ise çeşitli sayı ve tipte foliküllerin (primordiyal, primer, sekonder antral) olduğu korteks ile kan damarından zengin medulla gözlendi. Foliküllerin arasında stromada yer alan hücreler oval şekilli, büyük nükleuslu ve sitoplazmaları bazofilik olup guruplar halindeydi. Foliküllerin etrafında ayrıca düz kas demetleri ve bağ dokusu lifleri görüldü. Kortekste az sayıda damar kesitlerine rastlandı (**Şekil 4.16., 4.17. , 4.18).**

Over korteksinde foliküllerin çevresinde hücreden zengin bağ dokusu yapısında stroma gözlendi. Korteksin tunika albugineaya yakın bölümünde ayrıca çok sayıda primordiyal folikül dikkati çekmekteydi. Primordiyal foliküllerde içte oosit ve oositin çevresinde tek katlı yassı granüloza hücreleri yer almıştı. 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 gözlendi. Primer foliküller primordiyal foliküllerden çap olarak biraz daha büyüktü. Oosit ile granüloza hücreleri arasında zona pellusida oluşmaya başlamıştı (**Şekil 4.16. , 4.17.).**

Sekonder foliküllerde oositin etrafında çok katlı epitel görünümündeki granüloza hücreleri ile oosit ve granüloza hücreleri arasında zona pellusida belirgin olarak gözlendi. Sekonder foliküllerde granüloza hücreleri dışında teka folikülü oluşmaya başlamıştı(**Şekil 4.16. , 4.17.).**

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 foliküllerde zona pellusida oldukça belirgindi. Folikülü dıştan saran teka folikülü iki tabakalı olarak gözlendi. Teka internada fibroblastlar, küçük kas demetleri ve kan damarları görüldü. Teka eksternada ise düz kas demetleri ile birlikte kollajen liflerde gözlendi (**Şekil 4.18).**

Overin 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.

4.6.2. Vinylcyclohexene Diepoksit (VCD) Grubu

VCD uygulanan guruplardaki sıçanlardan alınan ve H&E ile boyanan over kesitleri incelendiğinde, 15 gün gurupta overi dıştan saran germinal epitel tek katlı kübik hücrelerden oluşmaktaydı. Germinal epitelin altında tunika albuginea yer almaktaydı (**Şekil 4.19.**).

Kesitlerde over korteksi incelendiğinde primordiyal foliküllerin sayıca azalmış olduğu ve büyük çoğunluğunun da 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 ayrılmalar gözlemlendi. Normal primordiyal foliküller ise oldukça az sayıda görüldü (**Şekil 4.19.**).

Primer foliküllerin küçük çaptakilerinin VCD toksisitesinden etkilendiği, daha büyük çaptaki foliküllerin ise normal olduğu gözlemlendi. Buna rağmen atretik foliküllerin sayısının normal foliküle oranla arttığı belirlendi. Atretik foliküllerde ise fragmente olmuş oosit ve apoptoza giren granüloza hücrelerinde belirgin şekilde artış gözlemlendi. Ayrıca granüloza hücrelerinin yan yüzeylerinde ayrılmalar saptandı. Bazı oosit ve granüloza hücrelerinde hücre zarı bütünlüğünün bozulduğu gözlemlendi (**Şekil 4.19.**).

VCD grubunda sekonder ve antral foliküller kontrole göre daha az sayıda olduğu görüldü. Bu foliküllerdeki oosit yapısı normal olarak görüldü. Bununla birlikte granüloza ve teka tabakalarındaki hücrelerinde de apoptoza giren hücrelerin sayıca arttığı gözlemlendi. Bu hücrelerin bazılarında kromatin, nükleus zarına yakın yoğunlaşmıştı. Ayrıca hücre içeriği dağılmış halde ve komşu hücreler ile bağlantıların azaldığı görüldü (**Şekil 4.19.** , **4.20.** , **4.21.**).

VCD grubundaki korpus luteumda ise nadir olarak şekilleri ve sınırları düzensiz olan dejenere hücreler gözlemlendi. Korpus luteum sayısı bakımından VCD

grubu ile kontrol grubu arasında fark yoktu. Korteksteki stromal hücreler kontrol grubuna benzerdi (**Şekil 4.19.**).

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

4.6.3. DHEA Grubu

Dihidroepiandrosteron uygulanmış sıçanlardan elde edilen H&E boyası uygulanan over kesitlerinin yapısal özellikler kontrol grubu ile benzerlik gösterdi. Overun dışında tek katlı kübik germinal epitel ve altında tunika albuginea yer almaktaydı (**Şekil 4.22.**).

Over korteksinde bulunan primordiyal, primer, sekonder ve antral foliküllerin yapısı ve sayıları kontrol grubuyla benzerdi. Foliküllerin içerisinde bulunan oositte, nükleolusu belirgin büyük bir nükleus gözlemlendi. Primordiyal ve primer foliküller normal yapıdaydı ancak sekonder ve antral foliküllerin granüloza hücrelerinde apoptoz gözlemlendi (**Şekil 4.22. , 4.23. , 4.24.**).

DHEA uygulanan grubun over kesitlerinde korpus luteumun yapı ve sayısal yönden kontrol grubuna benzerdi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında over korteksinde dağılmış folikül kistlerinin sayısında artış gözlemlendi

Over medullasında kortekse göre daha büyük kan damarları ve lif yapıları görüldü. Medullada bulunan stromal hücrelerde herhangi bir dejenerasyon gözlenmedi.

4.6.4. Vinylcyclohexene Diepoksit+Dehidroepiandrosteron (VDH) Grubu

VCD ile DHEA' nın birlikte uygulandığı sıçanlardan elde edilen overların 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.

Over kesitlerinde, primordiyal foliküllerin VCD toksisitesinden korunduğu gözlemlendi. Overde bulunan primordiyal foliküllerin normal olanlarının sayısı VCD grubuna oranla artarken atretik foliküller ise azalmıştı. Primer foliküllerde VCD'nin küçük çaptaki foliküllere olan olumsuz etkisi DHEA uygulanmasıyla kısmen ortadan kalkmıştı. Sekonder ve antral foliküller bu grupta normal yapıda gözlemlendi. Bu

foliküllerin korteksdeki yoğunlukları kontrol guruplarına göre azalmakla birlikte VCD grubuna göre artmış olarak gözlendi. Oositte büyük bir nükleus vardı ve nükleolusu belirgindi. Granüloza hücreleri daha düzgün şekilli ve nükleusları ökromatikti. Granüloza hücrelerindeki dejenere olmuş hücrelerin sayısı azalmıştı (**Şekil 4.25. ,4.26).**

4.6. İmmünohistokimya

TUNEL

TUNEL methodu ile boyanmış over kesitlerinde kontrol guruplarında, primordiyal ve primer foliküllerde TUNEL (+) boyanan hücre yoktu. Sekonder ve antral foliküllerde ise az sayıda TUNEL (+) boyanan hücre görüldü. Stromada ve teka tabakasında boyanma görülmedi (**Şekil 4.27. , 4.28. , 4.29.**).

VCD grubunda primordiyal, primer, sekonder ve antral foliküllerin granüloza hücrelerinde az sayıda TUNEL (+) boyanma görüldü. Teka tabakası, stroma ve korpus luteumda apoptoz gösteren hücrelere rastlanmadı. DHEA grubunda kontrol grubuyla benzer şekilde primordiyal ve primer foliküllerde TUNEL (+) hücre yoktu. Sekonder ve antral foliküllerin granüloza hücrelerinde ise az sayıda TUNEL (+) boyanma gözlendi. Stroma ve teka tabakasında boyanma görülmedi. VDH grubunda ise primordiyal ve primer foliküllerde TUNEL (+) boyanmış hücre belirlenmedi. Sekonder ve antral foliküllerin granüloza hücrelerinde kontrol grubuna benzer şekilde çok az sayıda TUNEL (+) boyanma vardı (**Şekil 4.30. , 4.31. , 4.32.,4.33.**).

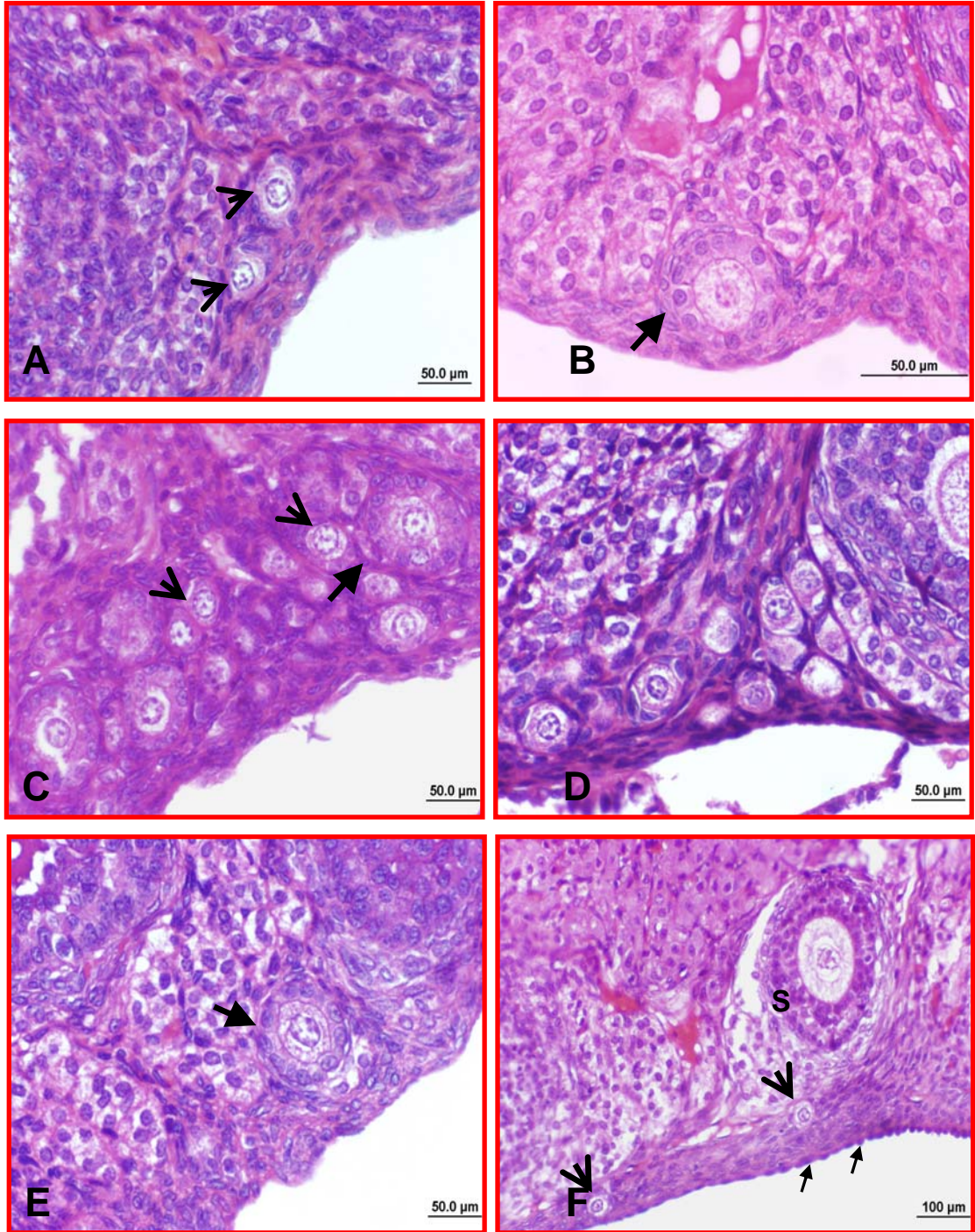
Kaspaz-3 antikoru ile boyanmış over kesitlerinde, kontrol guruplarında primordiyal ve primer foliküllerde boyanma görülmedi. Sekonder ve antral foliküllerin granüloza hücrelerinde ise az miktarda boyanma göze çarptı. Stroma hücreleri ve teka tabakasında kaspaz 3 antikoru boyanma görülmedi. Ayrıca bu guruplardaki korpus luteumlarda da herhangi bir boyanma gözlenmedi (**Şekil 4.34.,4.35.**).

VCD grubunda bazı primordiyal ve primer foliküllerde az yoğunlukta boyanma gözlendi. Sekonder foliküllerde boyanma gözlenmezken antral foliküllerin granüloza hücrelerinde özellikle antral kaviteye yakın hücrelerde yoğun olarak boyanma gözlendi. Bu grupta atretik foliküllerde yoğun bir şekilde boyanma gözlendi. Ancak stromal hücrelerin bazılarında da yoğun boyanma gözlendi. (**Şekil**

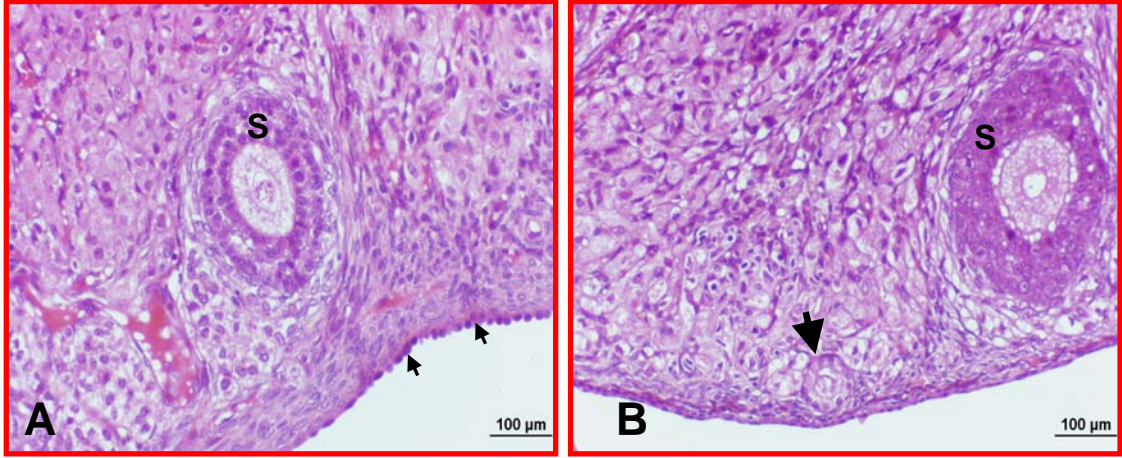
4.36 , 4.37. 4.38.) DHEA grubunda primordiyal ve primer foliküllerde kaspaz 3 antikoru ile boyanma gözlenmedi. Sekonder ve antral foliküllerin granüloza hücrelerinde kontrol guruplarıyla benzer olarak boyanma azdı. Stroma ve teka tabakasında bazı hücrelerde boyanma görüldü (**Şekil 4.39.**).

VDH grubunda primordiyal ve primer foliküllerde kaspaz 3 antikoru ile boyanma görülmedi. Sekonder ve antral foliküllerin granüloza hücrelerinde ise kontrol grubuna benzer şekilde az yoğunlukta boyanma gözlendi (**Şekil 4.39.**).

Gurupların over kesitlerinde foliküllerde yer alan oositlerde herhangi bir boyanma gözlenmedi.

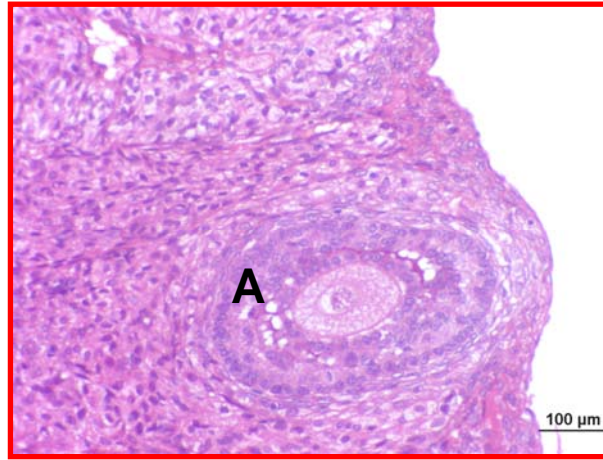


Şekil 4.16. Kontrol grubuna ait over kesitinde korteksin görünümü. **A;** oosit ve etrafında tek katlı yassı özellikte granuloza hücreleri bulunan normal primordiyal folikül (\downarrow). **B;** oosit ve etrafında tek katlı kübik özellikte granuloza hücreleri bulunan normal primer folikül (\rightarrow). **C;** kortekste primordiyal (\downarrow) ve primer foliküller (\rightarrow). **D;** kortekste çok sayıda normal primordiyal foliküller. **E;** normal primer folikül (\rightarrow) **F;** tek katlı kübik özellikte over yüzey epiteli (\rightarrow), yüzey epiteline yakın primordiyal foliküller (\downarrow) ve sekonder foliküller (**S**). H&E, Bar 50 μ m ve 100

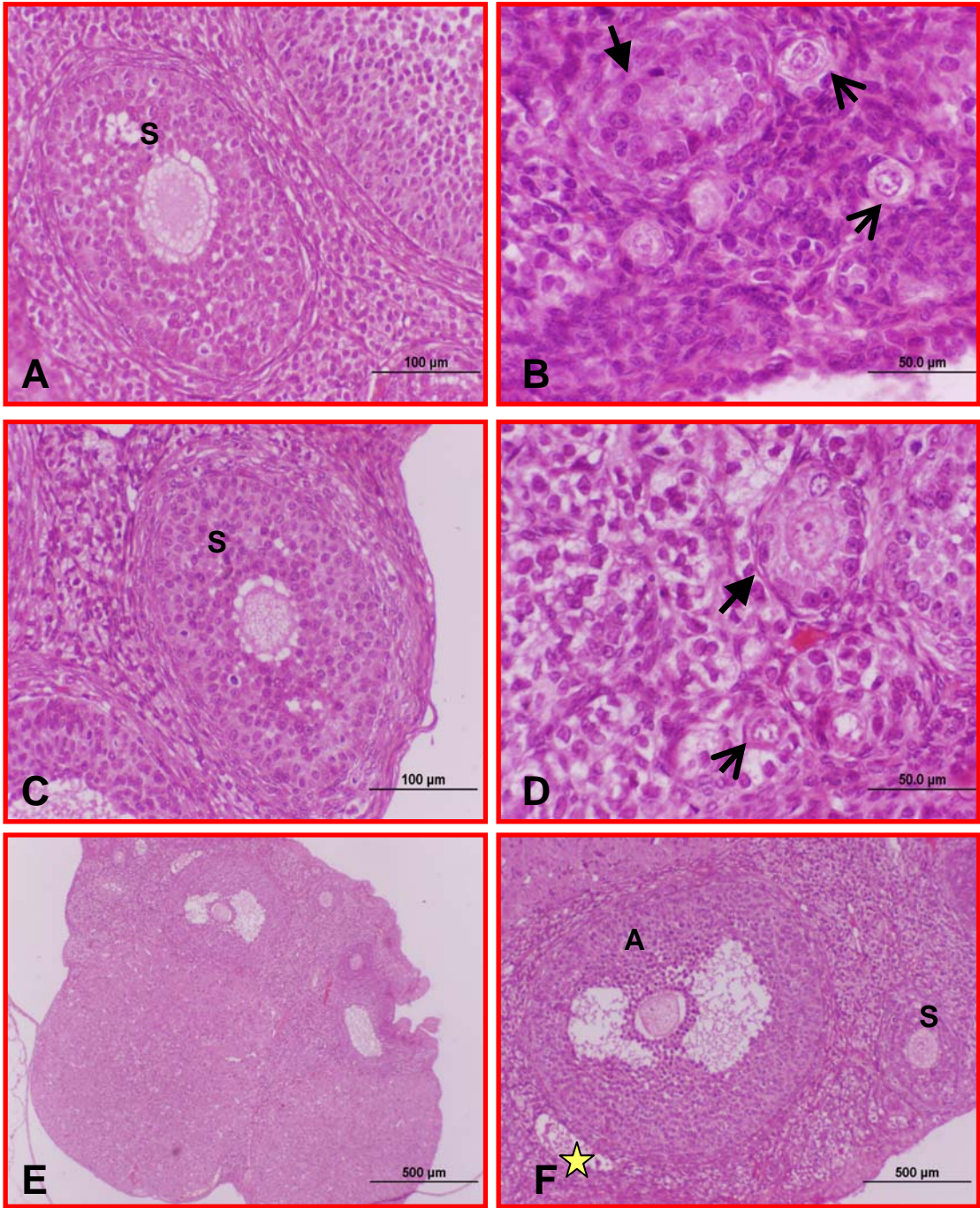


Şekil 4.17. Kontrol grubuna ait over kesitinde yüzey epiteli ve korteksin görünümü.

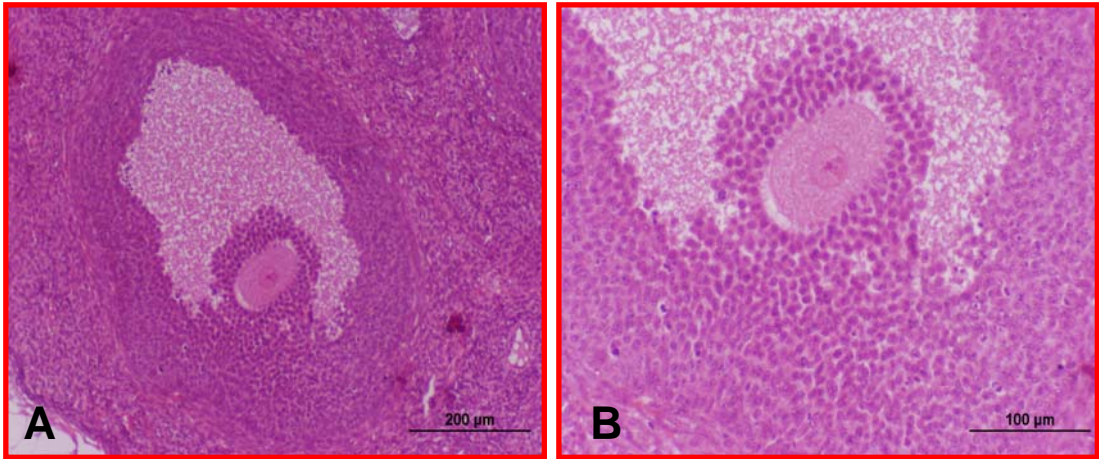
A; tek katlı kübik özellikteki over yüzey epiteli (→) ve iki katlı kübik özellikteki granüloza hücrelerinden oluşan sekonder folikül (**S**). **B**; over korteksindeki primer (→) ve sekonder folikülün (**S**) görünümü. H&E, Bar 100µm



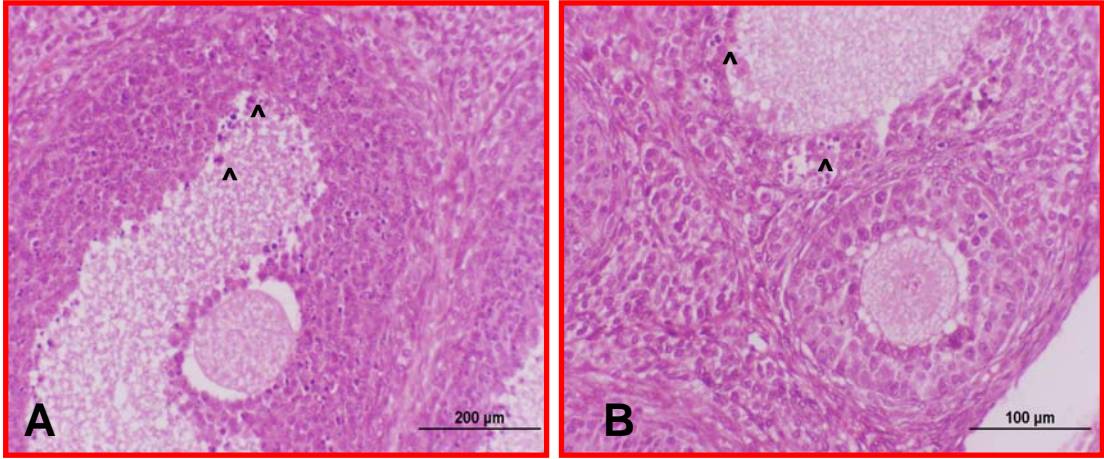
Şekil 4.18. Kontrol grubuna ait over kesitinde antral folikül (**A**) H&E, Bar 100µm



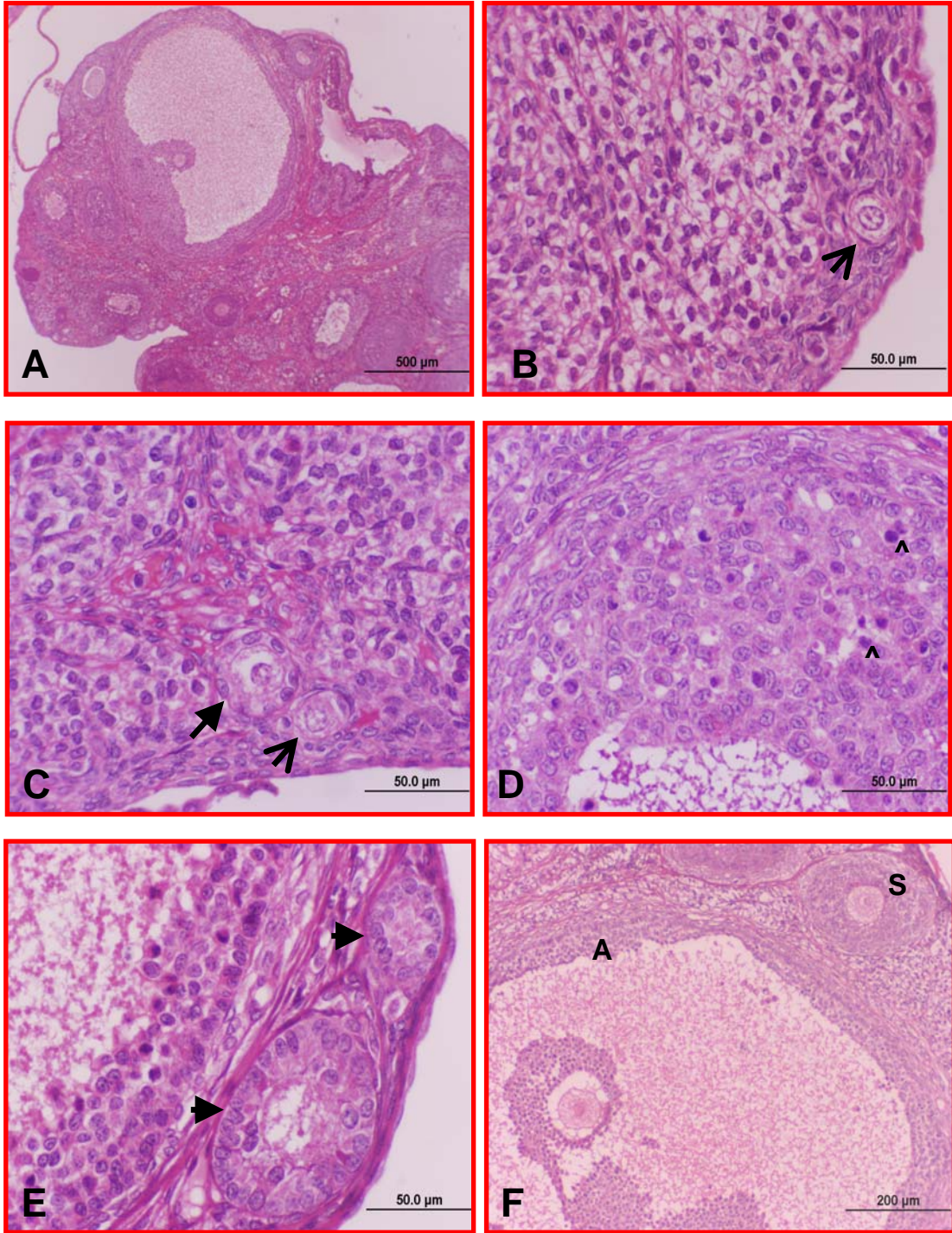
Şekil 4.19. VCD grubuna ait over kesitinde korteksin görünümü. **A** ve **C**; normal sekonder folikül (**S**), H&E, Bar 100µm **E**; over korteksindeki sekonder ve antral foliküller normal görülmekte. H&E, Bar 500 µm **B**; oositi dejenere olmuş primer folikül (→) ve primordiyal folikülde (↓), oosit kromatinin nukleus zarına yakın bölgelerde yoğunlaştığı dikkat çekmektedir. H&E, Bar 50µm **D**; primordiyal folikülde (↓), oosit sitoplazmasında eozinofilinin arttığı ve kromatinin nukleus zarına yakın bölgelerde yoğunlaştığı ve primer folikülde (→) granüloza hücrelerinin düzgün şekillerinin bozulmaya başladığı dikkat çekmektedir. H&E, Bar 500µm, **F**; normal antral (**A**) folikül, normal sekonder (**S**) folikül ve folikül kisti (yıldız) görülmektedir.



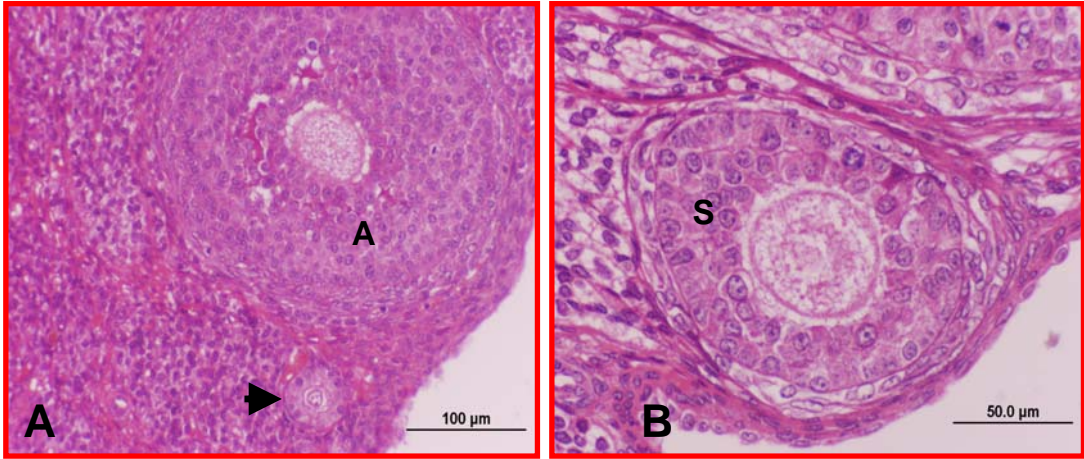
Şekil 4.20. VCD grubuna ait over kesitinde **A**; normal antral folikül H&E, Bar 200µm, **B**; normal antral folikül H&E, Bar 200µm



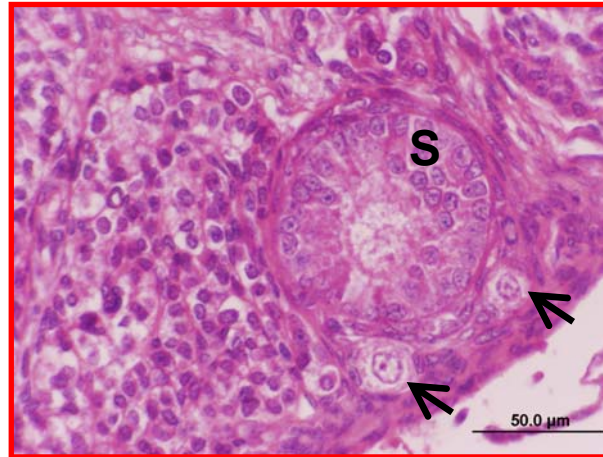
Şekil 4.21. VCD grubuna ait over kesitlerinde **A**; Antral foliküllerin antruma bakan granüloza hücrelerinde çok sayıda apoptoz (^) gösteren hücreler. H&E, Bar 200µm, **B**; Antral foliküllerin antruma bakan granüloza hücrelerinde çok sayıda apoptoz (^) gösteren hücreler ve normal sekonder folikülün görünümü. H&E, Bar 200µm



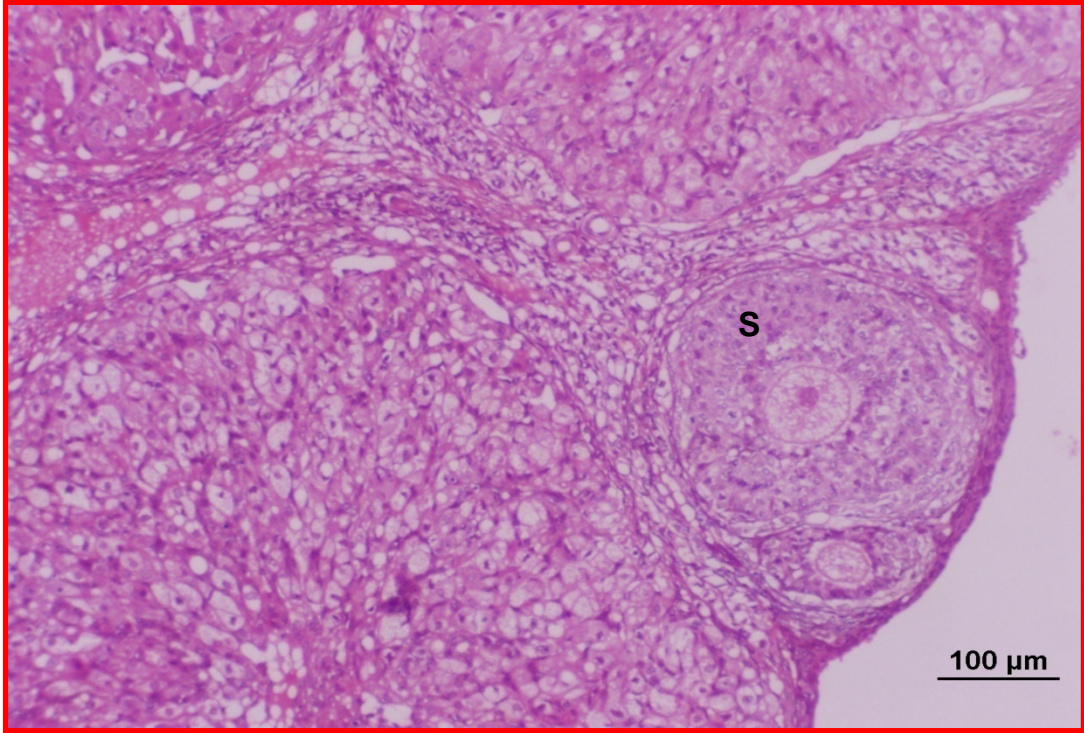
Şekil 4.22. DHEA grubuna ait over kesitinde korteksin görünümü. **A**; over korteksinin genel görünümü. Gelişimin çeşitli evrelerindeki foliküller görülmekte, H&E Bar 500µm **B**; kortekste normal primordiyal folikül (↓). H&E Bar 50µm **C**; kortekste normal primordiyal (↓) ve primer folikül (→). H&E Bar 50µm **D**; antral folikülün granuloza hücrelerinde çok sayıda apoptoz (^) gösteren hücreler. Bar 50µm **E**; kortekste normal primer (→) ve sekonder folikül (→). H&E Bar 50µm, **F**; kortekstekste normal sekonder (S) ve antral (A) folikül, Bar 200µm, H&E



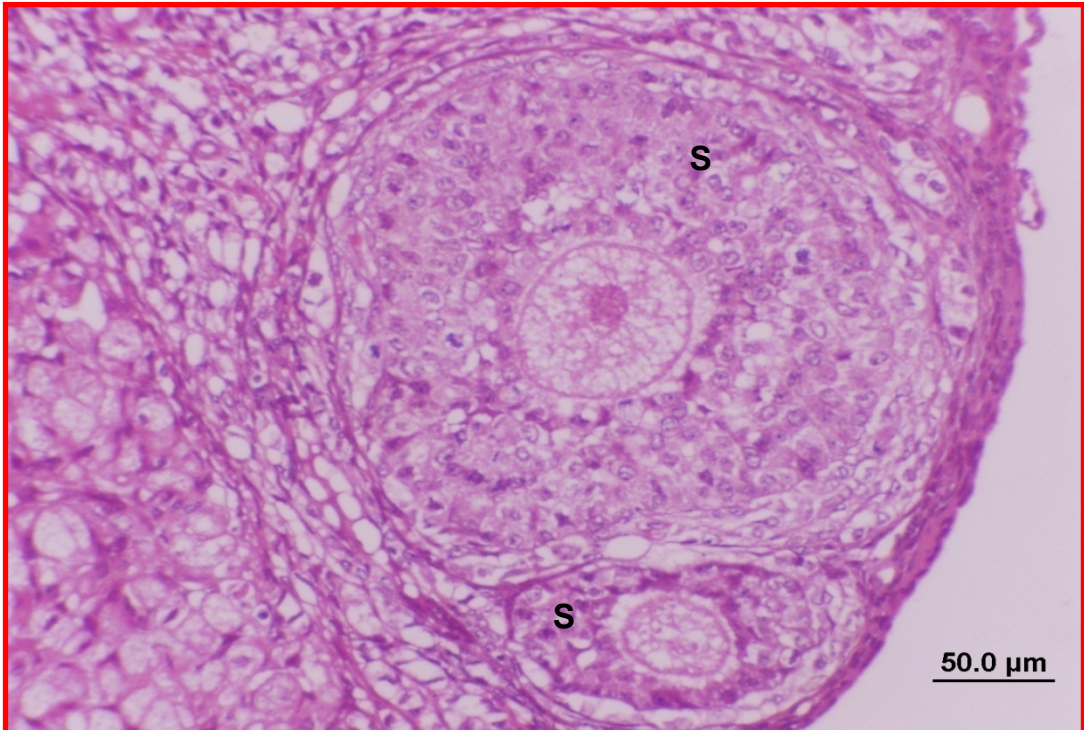
Şekil 4.23.DHEA grubuna ait over kesitinde **A**; normal primordiyal (→) ve normal antral folikül (**A**) H&E, Bar 100µm, **B**; normal sekonder folikül (**S**) H&E, Bar 50µm



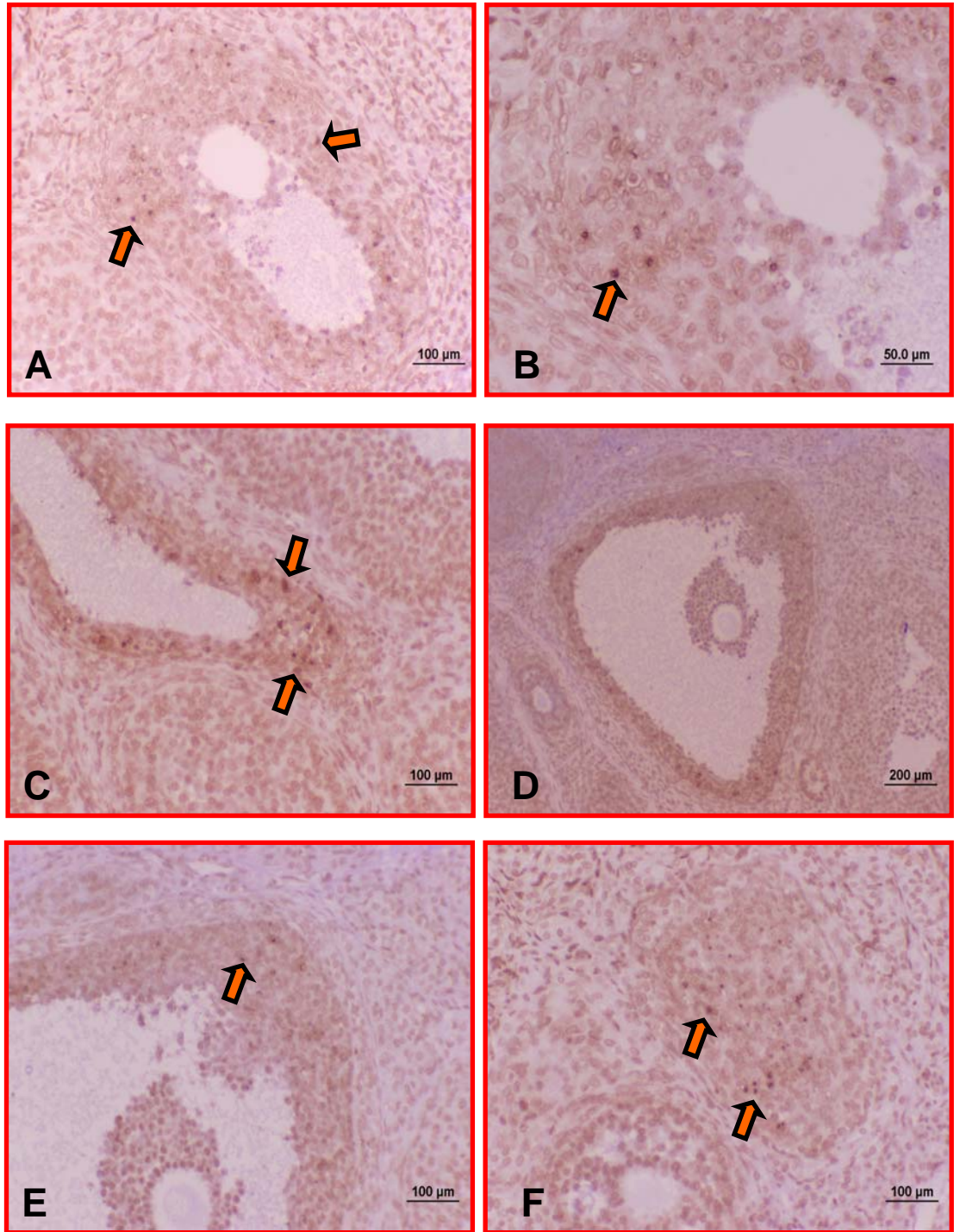
Şekil 4.24. DHEA grubuna ait over kesitinde **A**; normal primordiyal (↑) ve normal sekonder folikül (**S**) H&E, Bar 50µm



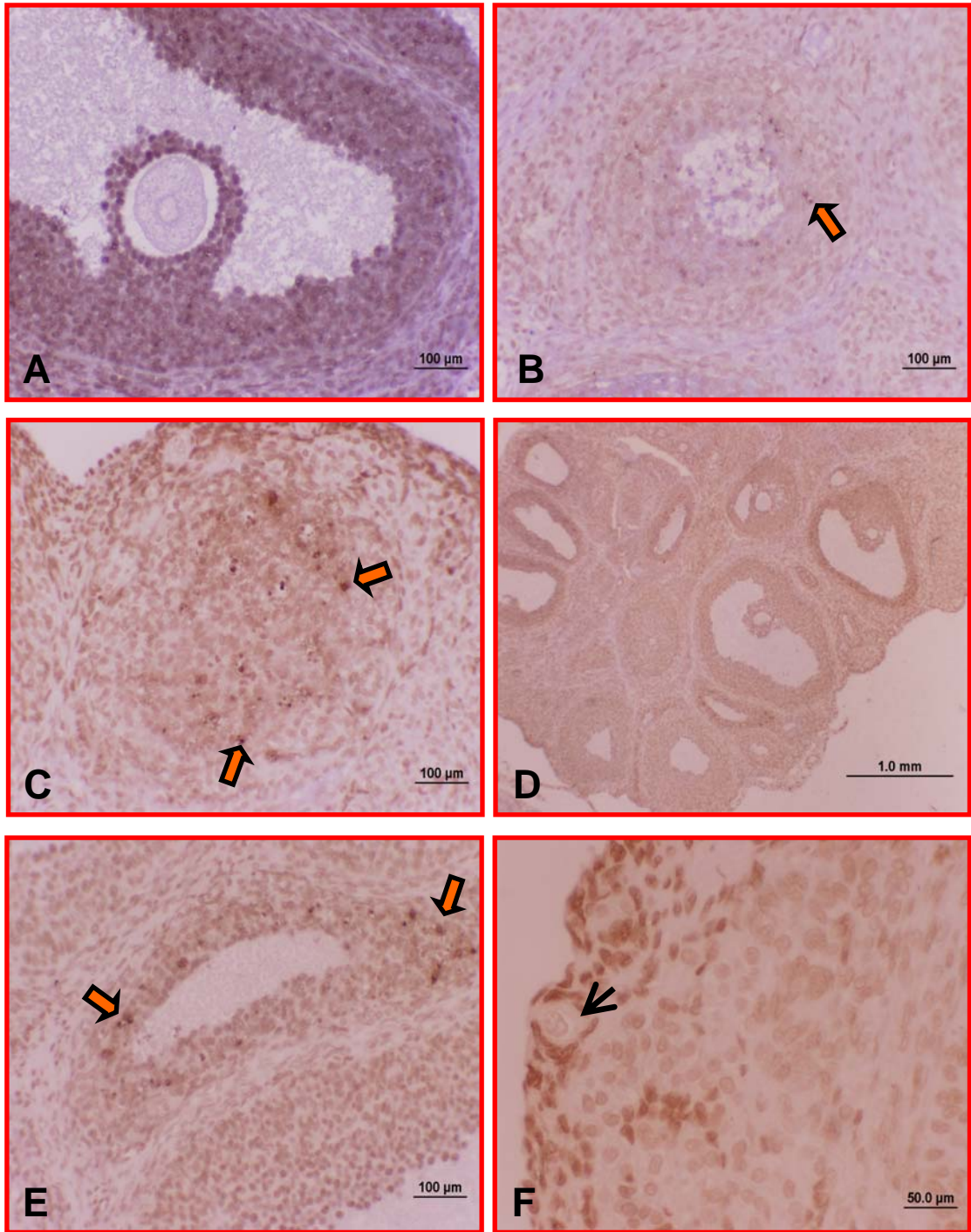
Şekil 4.25. VCD + DHEA grubuna ait over kesitinde normal sekonder folikül (S)
H&E, Bar 100μm



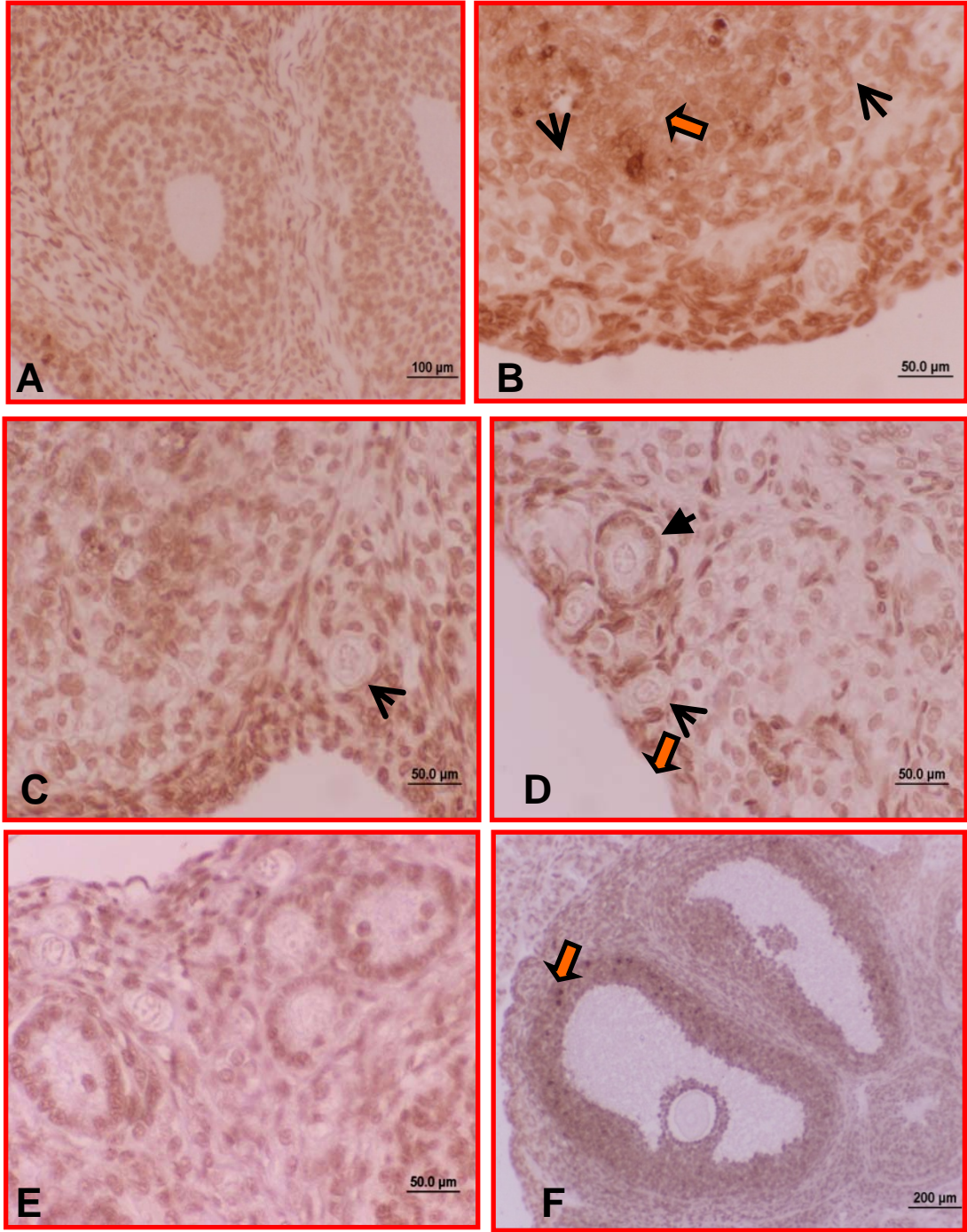
Şekil 4.26. VCD + DHEA grubuna ait over kesitinde normal sekonder folikül (S) H&E, Bar 100μm



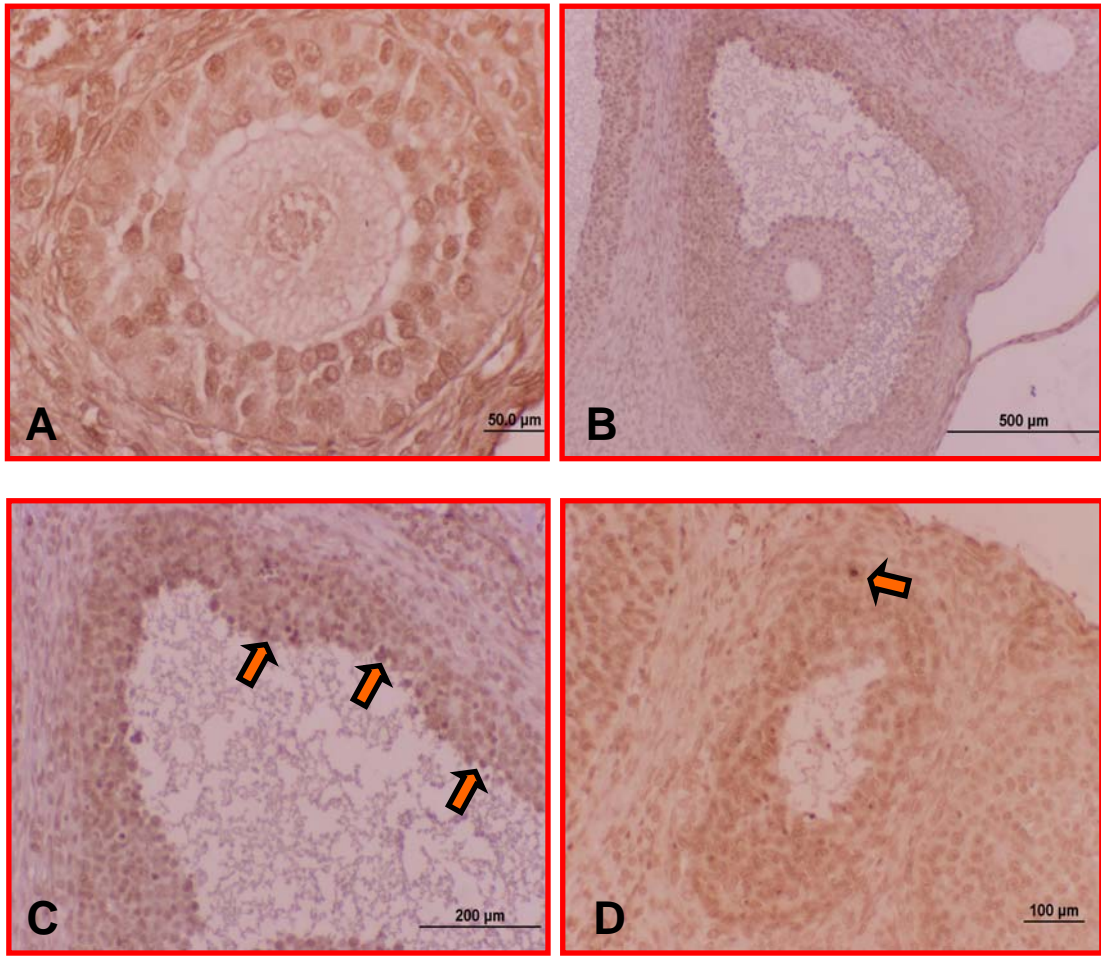
Şekil 4.27. Kontrol grubuna ait over kesitinde, **A**; antral folikülde az sayıda TUNEL (+) olan (kırmızı ok) apoptoza giren hücreler. TUNEL, Bar 100µm; **B**; antral folikülde az sayıda TUNEL (+) olan (kırmızı ok) apoptoza giren hücreler. TUNEL, Bar 50µm **C**; atretik folikülde TUNEL (+) olan (kırmızı ok) apoptoza giren hücreler. TUNEL, Bar 100µm **D**; antral folikül genel görünüm TUNEL, Bar 200µm **E**; antral folikülde az sayıda TUNEL (+) olan (kırmızı ok) apoptoza giren hücreler. TUNEL, Bar 100µm **F**; antral folikülde az sayıda TUNEL (+) olan (kırmızı ok) apoptoza giren hücreler. TUNEL, Bar 100µm



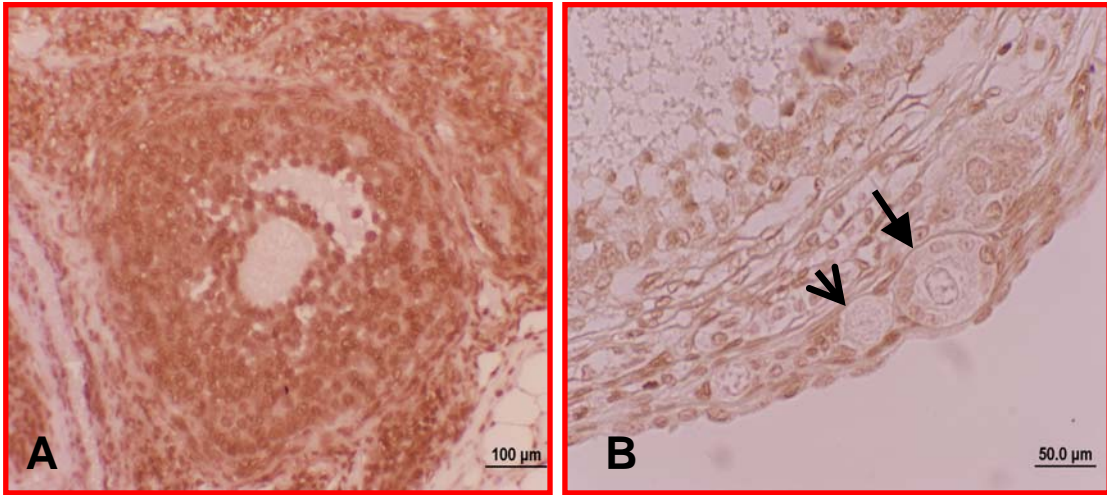
Şekil 4.28. Kontrol grubuna ait over kesitinde, **A**; normal antral folikül. TUNEL, Bar 100µm; **B**; atretik folikülde TUNEL (+) olan (kırmızı ok) apoptoza giren hücreler TUNEL, Bar 100µm **C**; korpus luteumda az sayıda TUNEL (+) olan (kırmızı ok) apoptoza giren hücreler. TUNEL, Bar 100µm **D**; over korteksi genel görünüm TUNEL, Bar 1 mm **E**; atretik folikülde TUNEL (+) olan (kırmızı ok) apoptoza giren hücreler TUNEL, Bar 100µm **F**; normal primordiyal folikül (↓). TUNEL, Bar 50µm



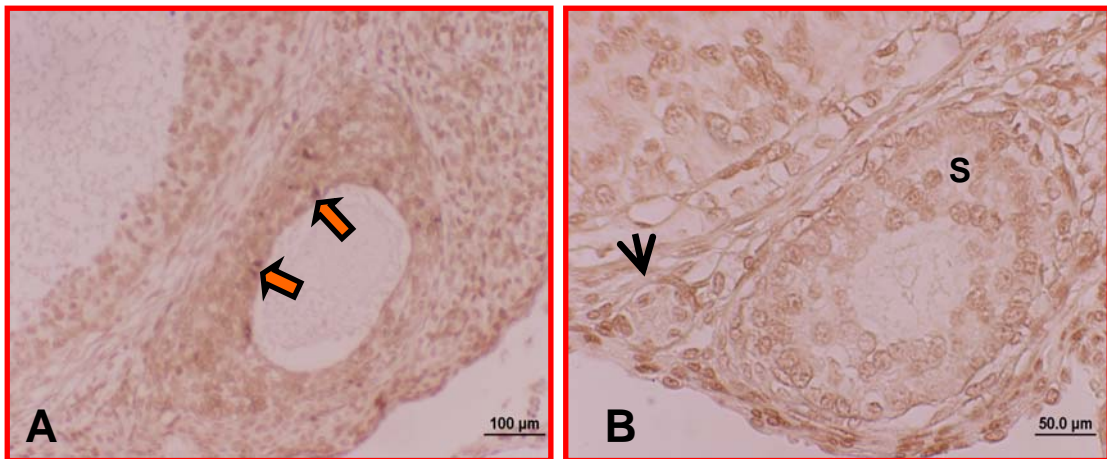
Şekil 4.29. Kontrol grubuna ait over kesitinde, **A**; normal sekonder folikül, TUNEL, Bar 100µm **B**; atretik folikülde TUNEL (+) olan (kırmızı ok) apoptoza giren hücreler ve primordiyal foliküller (↓), TUNEL, Bar 50µm **C**; normal primordiyal folikül (↓) TUNEL, Bar 50µm **D**; normal primordiyal (↓) ve primer foliküller (←), TUNEL, Bar 50µm **E**; kortekste normal primordiyal ve primer foliküller TUNEL, Bar 50µm **F**; antral foliküllerde az sayıda TUNEL (+) olan (kırmızı ok) apoptoza giren hücreler. TUNEL, Bar 200µm



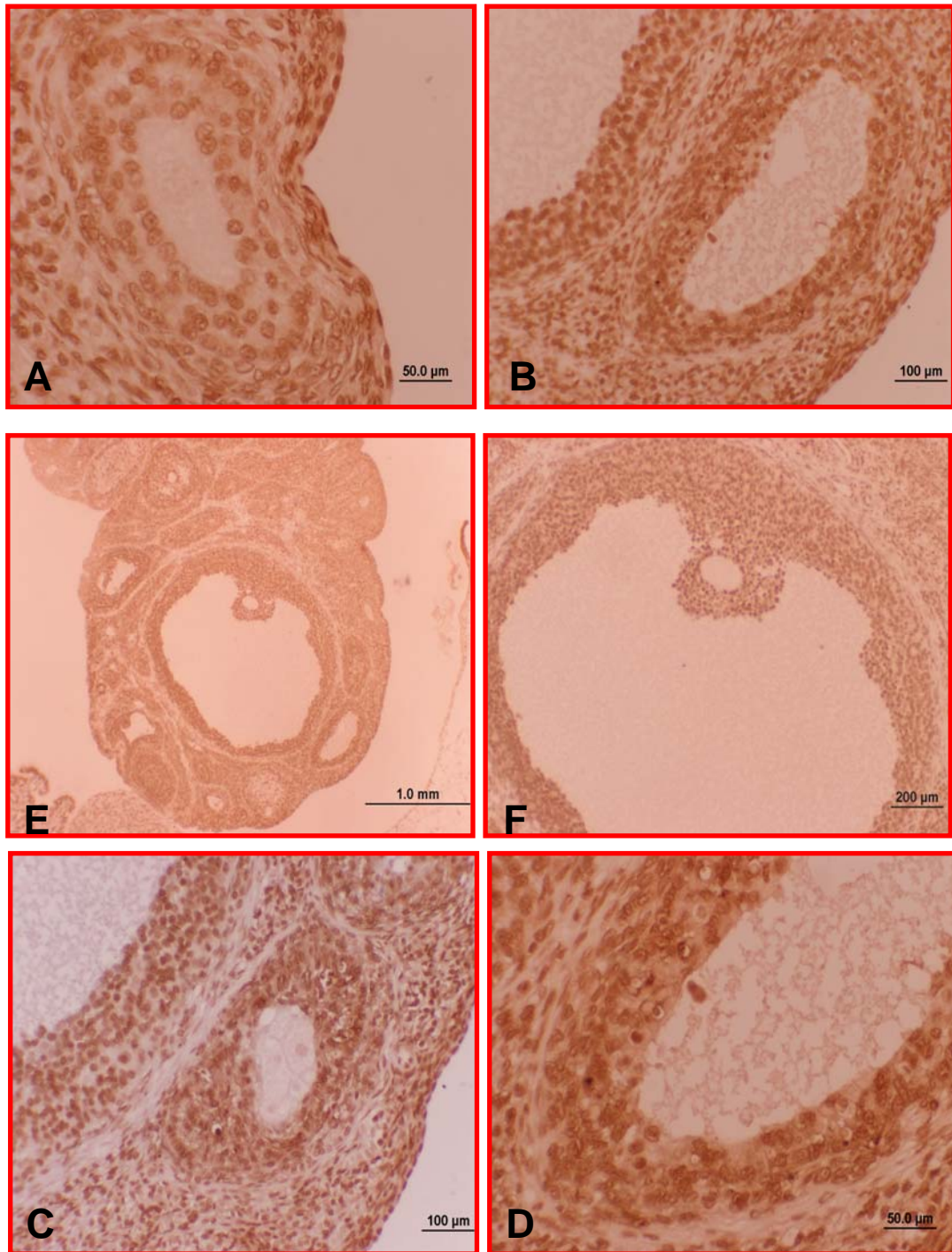
Şekil 4.30. VCD grubuna ait over kesitinde, **A**; normal sekonder folikül TUNEL, Bar 50µm **B**; normal antral folikül, TUNEL, Bar 500µm **C**; antral foliküllerde TUNEL (+) olan (kırmızı ok) apoptoza giren hücreler. TUNEL, Bar 200µm. **D**; atretik foliküllerde TUNEL (+) olan (kırmızı ok) apoptoza giren hücreler. TUNEL, Bar 100µm



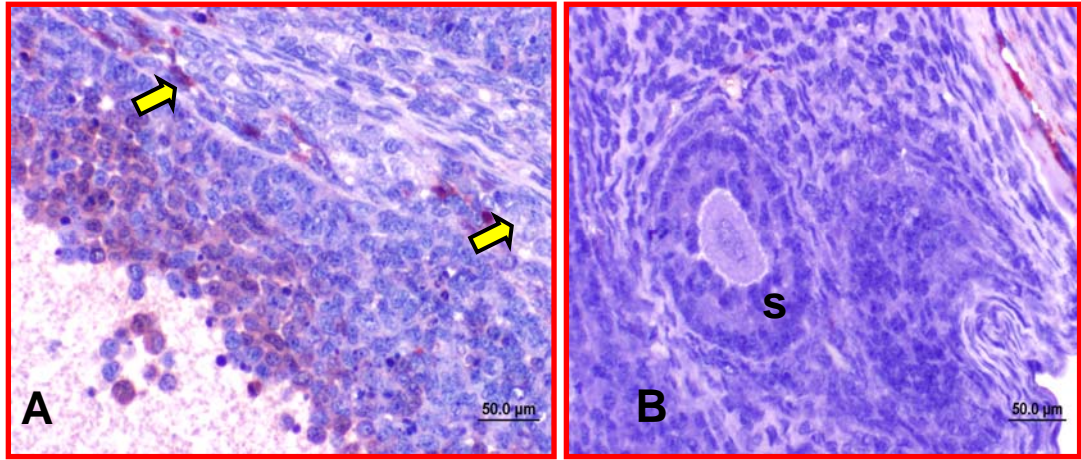
Şekil 4.31. DHEA gruba ait over kesitinde, **A**; normal antral folikül TUNEL, Bar 100µm. **B**; normal primordiyal (↓) ve primer (→) folikül, TUNEL, Bar 50µm



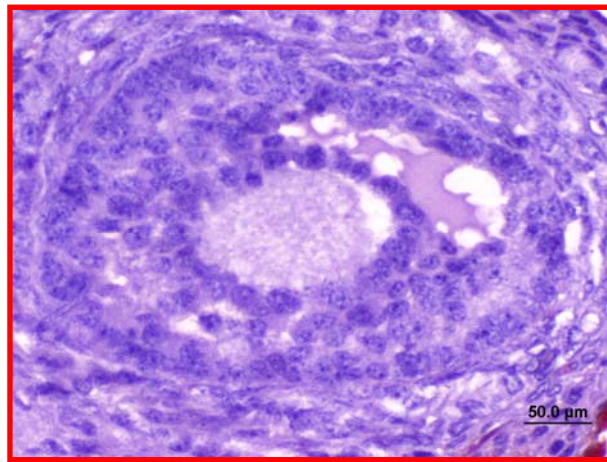
Şekil 4.32. DHEA grubuna ait over kesitinde, **A**; kistik folikülde az sayıda TUNEL (+) apoptoza giden hücreler (kırmızı ok) TUNEL, Bar 100µm. **B**; normal primordiyal (↓) ve sekonder folikül (S), TUNEL, Bar 50µm



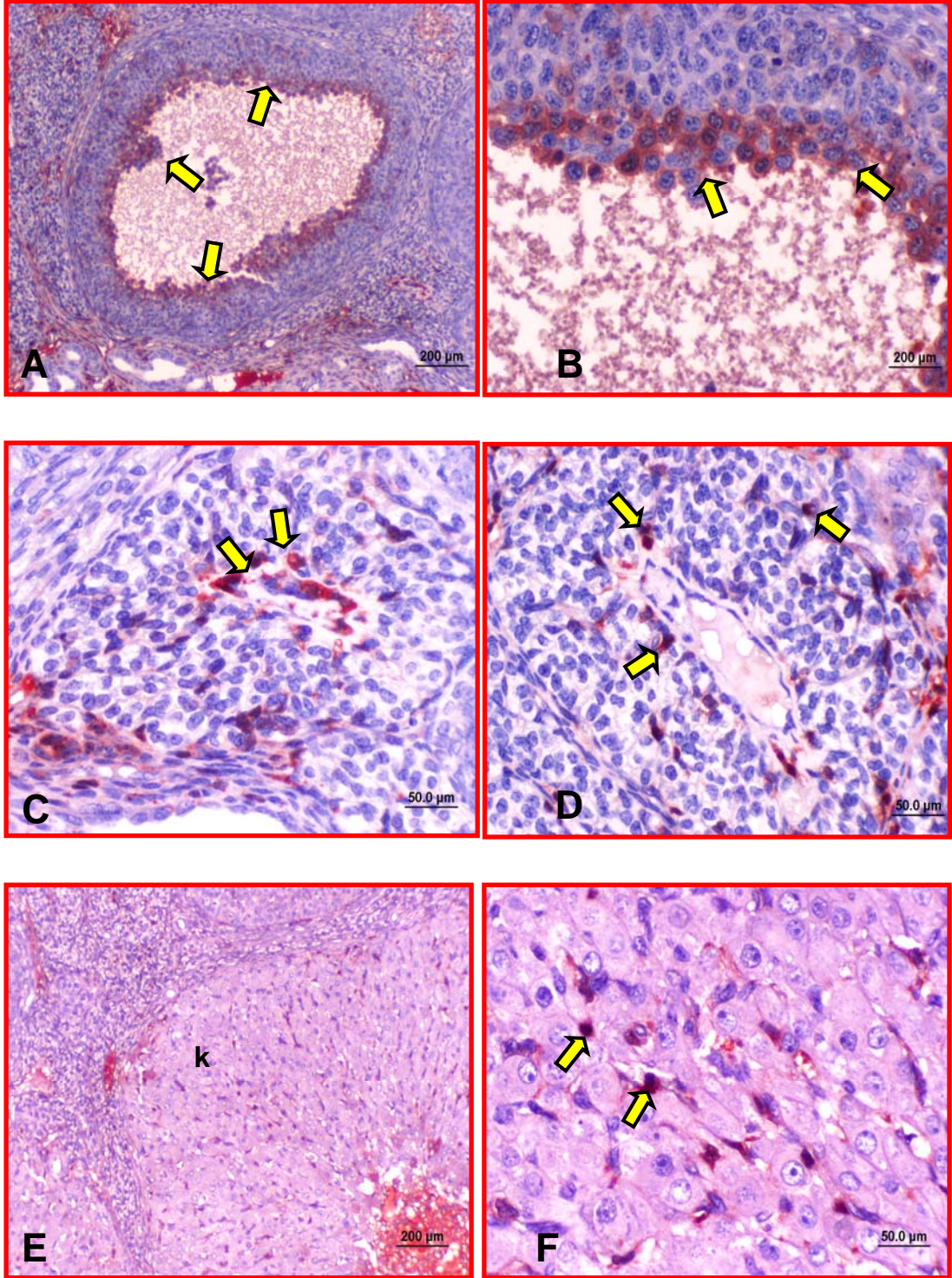
Şekil 4.33. VCD + DHEA grubuna ait over kesitinde, **A**; normal sekonder folikül TUNEL, Bar 50µm **B**; kistik folikül TUNEL, Bar 100µm **C**; atretik folikülde TUNEL (+) olan apoptoza giren hücreler. TUNEL, Bar 100µm. **D**; kistik folikülde az sayıda TUNEL (+) olan apoptoza giren hücreler. TUNEL, Bar 50µm **E**; normal ovaryan korteks genel görünümü. TUNEL, Bar 1mm **F**; normal antral folikül. TUNEL, Bar 200µm



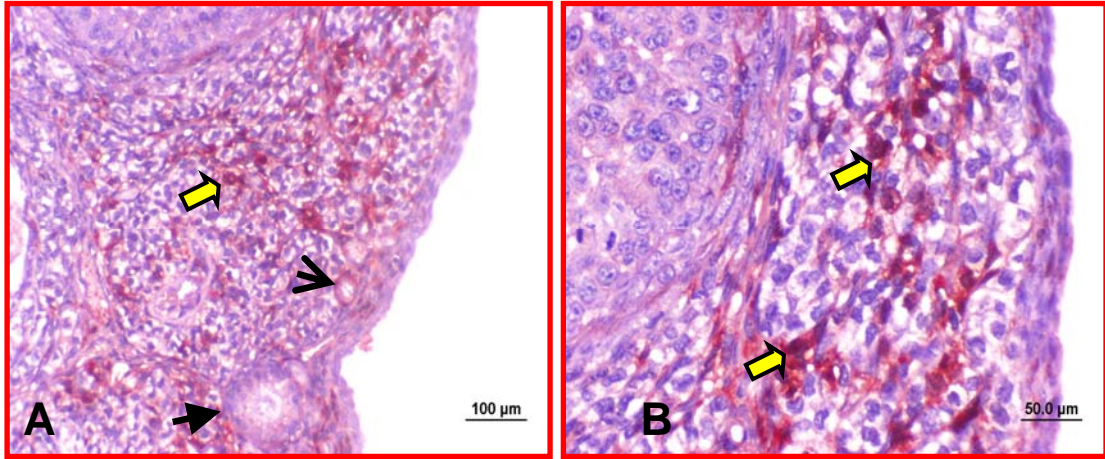
Şekil 4.34. . Kontrol grubuna ait over kesitinde, **A**; Antral folikülde kaspaz 3 (+) hücreler (sarı ok) **B**; normal sekonder folikül. KASPAZ 3, Bar 50µm



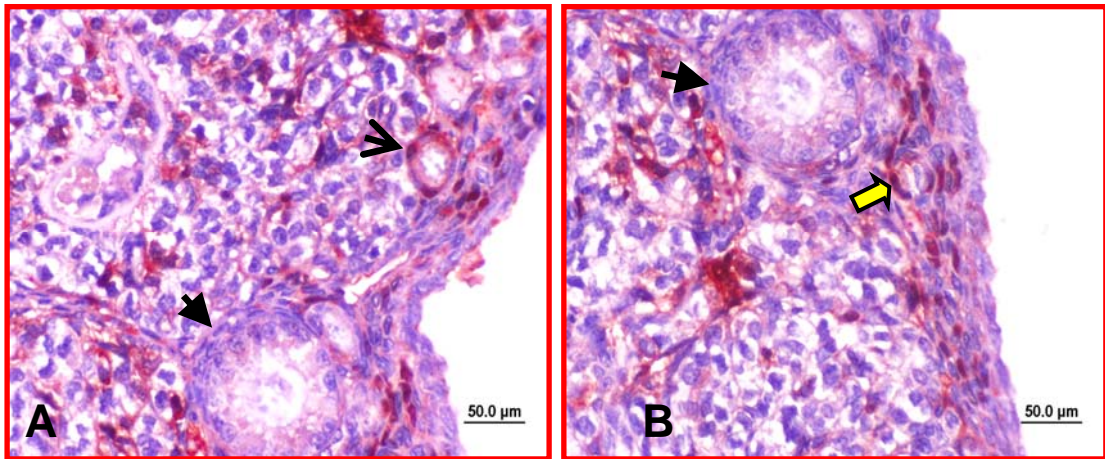
Şekil.4.35. Kontrol grubuna ait over kesitinde, normal antral folikül



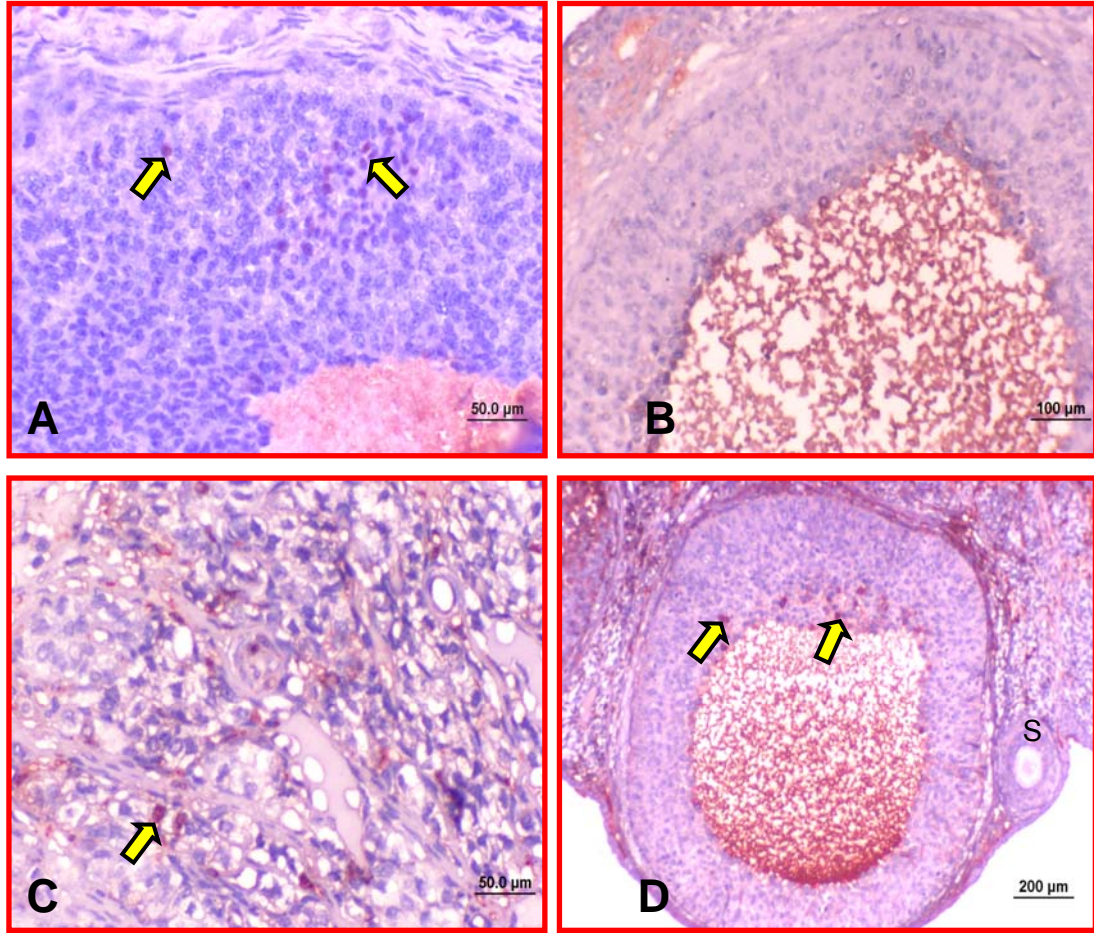
Şekil.4.36.VCD grubuna ait over kesitinde **A**; antral follükülün antruma komşu granüloza hücrelerinde kaspaz (+) hücreler (sarı oklar). KASP3, Bar 200 µm **B**; antral follükülün antruma komşu granüloza hücrelerinde kaspaz (+) hücreler (sarı oklar). KASP3, Bar 100 µm, **C** ve **D**; atretik follüküllerde kaspaz 3 (+) hücreler (sarı oklar), KASP3 Bar 50 µm **E**; korpus luteum (**k**) genel görünüm KASP3 Bar 200 µm **F**; korpus luteumda kaspaz 3 (+) hücreler. KASP3 Bar 50 µm



Şekil 4.37 . VCD grubunda, **A**; stromada kaspaz 3 (+) hücreler (sarı oklar), primordiyal follükülde (□) kaspaz 3 (+) hücreler (sarı ok) ve normal büyük primer follükül (□) KASPAZ 3, Bar 100µm **B**; stromada kaspaz 3 (+) hücreler (sarı ok) KASPAZ 3, Bar 50µm



Şekil 4.38. VCD grubunda, **A**; primordiyal follükülde (□) kaspaz 3 (+) hücreler (sarı ok) ve normal büyük primer follükül (□) **B**; primordiyal follükülde kaspaz 3 (+) hücreler (sarı ok) ve normal büyük primer follükül (□) KASPAZ 3, Bar 50µm



Şekil 4.39. DHEA grubunda, **A**; antral follükül granüloza hücrelerinde az sayıda kaspaz 3 (+) hücreler (sarı oklar) KASPAZ 3, Bar 50 μ m **B**; normal antral follükül, KASPAZ 3, Bar 100 μ m, **C**; stromada kaspaz 3 (+) hücreler (sarı oklar) KASPAZ 3, Bar 50 μ m **D**; antral follükül granüloza hücrelerinde az sayıda kaspaz 3 (+) hücreler (sarı oklar) KASPAZ 3, Bar 200 μ m **E**; antral follükül kumulus ooforus ve antruma bakan granüloza hücrelerinde az sayıda kaspaz 3 (+) hücreler (sarı oklar) KASPAZ 3, Bar 100 μ m **F**; antral follükül antruma bakan granüloza hücrelerinde ve teka tabakasında kaspaz 3 (+) hücreler (sarı oklar) KASPAZ 3, Bar 50 μ m .

5. TARTIŞMA

Sıçanlarda Prematür Over Yetmezliği

VCD Uygulaması-Doz Planlanması

Overlerde folikül gelişimi ve üreme fonksiyonu dişilerin çevresel toksinlere maruziyeti sonrasında etkilenebilir. Bu maddelerin üreme fonksiyonu üzerine etkisi foliküllerin etkilendiği döneme bağılı olarak değişir. Büyüyen ve preovulatuvar folikülleri etkileyen maddeler üremede geçici bir duraklamaya neden olurlar. Çünkü zarar gören foliküllerin yerini yeni primordial ve primer foliküller hızla alır. Bunun aksine primordial ve primer foliküllerde bir hasar oluşacak olursa, fertilité, gelişen ve ovulatuvar foliküller sağlam kaldığı için geçici bir süre etkilenmez, sikluslar normal düzeninde devam eder. Bu durum haftalar, aylar veya yıllar sürebilir. Ancak bu foliküller bittiği zaman geride replasmanı sağlayacak olan primordial folikül havuzu kalmadığı için üreme fonksiyonunun azalması kaçınılmaz olur. İnsan, fare ve sıçanlarda yapılan araştırmalarda polisiklik hidrokarbon siklofosamid ve pestisidlerin primordial ve primer foliküllere hasar verdiği gösterilmiştir (264, 265).

VCH ve epoksid metaboliti olan VCD plastik sanayide, kömür ve siğara dumanında bulunan bir maddedir (266). Yapılan araştırmalarda VCH/VCD'nin fare ve sıçanlarda primordial ve primer foliküllerde apoptozu indükleyerek folikül kaybı oluşturması sonrasında düzensiz siklusa neden olmakta ve hormonal değişiklikler yaptığı gösterilmiştir. Primordial ve primer folikül havuzunun tamamen tükenmesi sonrasında menopoz kaçınılmaz olmaktadır (135,151).

Araştırmamızda yirmi sekiz günlük Spraque Dawley türü sıçanlara on beş gün süresince DMSO içerisinde çözülmüş VCD 160mg/kg uygulandı ve son doz uygulamadan dört saat sonra sakrifiye edildiler. Deneyimizde kullandığımız VCD dozu ilk kez Spraque Dawley sıçanlara araştırmamızda uygulanmıştır. Yapılan araştırmalarda yirmi sekiz günlük sıçanlara on beş gün süresince 80-320mg/kg arasında çeşitli dozlarda VCD uygulanmıştır. 160mg/kg uygulanan grupta on beşinci günde primordial ve primer foliküller belirgin şekilde azalırken sekonder ve antral foliküllerde nadiren azalmalar bulunmuştur. Bu nedenle 160mg/kg VCD ve on beş gün boyunca uygulanması büyük folikülleri ve diğer dokuları etkilemeden

uygulanabilecek optimal doz olarak gösterilmiştir **(144)**. Bu nedenle araştırmamızda 160mg/kg/gün VCD intraperitoneal uygulandı..

VCD Uygulaması Sonrası Oluşan Vücut Ağırlığı Değişiklikleri

Araştırmamızda, tablo 4.1. de görüldüğü üzere; sıçanlar deney başı ağırlıkları (DBA) bakımından karşılaştırıldığında guruplar arasında fark yoktur. VCD uygulanan gurupta DSA kontrol grubu ile benzer olarak bulunmuştur.

VCD ile yapılan bazı araştırmalarda; VCD nin vücut ağırlığı üzerine bir etkisi olmadığı belirtilmiştir. Çelik ve ark.**(268)** araştırmamız deney protokolüne benzer standart diyetle beslenen immatür sıçanlara on beş gün süresince intraperitoneal yolla 160mg/kg/gün VCD uygulaması sonrası DSA ları kontrol grubuyla benzer bulmuşlardır. NHI kanser araştırmasında; erkek ve dişi sıçanlara oral yolla VCD uygulanması sonrasında vücut ağırlığı kontrol grubuyla benzer bulunmuştur **(269)**.

Berger ve ark. **(19)** dişi sıçanlara iki hafta süresince içme suyunda 0.04% VCD verdiklerinde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında deney süresince alınan kilo ve deney sonu ağırlıklar açısından farklılık saptamamışlardır.

Mayer ve ark. **(144)** farelere on gün süresince VCD uyguladıklarında yüz yirmi yedinci günde vücut ağırlığı ve üreme organları dışındaki organ ağırlıklarında (adrenal, böbrek, dalak) değişiklik bulmamışlardır. Mayer ve ark. **(155)** bir başka araştırmada LDL reseptörleri silinmiş kolesterolden zengin diyetle beslenen farelere 240 mg/gün/kg VCD uygulaması sonrasında kontrol gurupları, ooferektomi uygulanan ve 17 beta östradiol uygulanan guruplar arasında deney sonu vücut ağırlıkları arasında fark bulmamışlardır.

Ito ve ark. **(146)** kırk iki günlük Sprague Dawley sıçanlara iki ve dört hafta süresince DMSO içinde çözülmüş 5, 20, 80mg/kg/gün VCD uyguladıklarında vücut ağırlıklarının kontrol grubu ile benzer olduğunu bildirmişlerdir.

Bazı araştırmalarda ise VCD vücut ağırlığında değişikliğe neden olmuştur. Yapılan bir araştırmada, oral yolla on üç hafta VCD uygulanan sıçanlarda ve farelerde vucüt ağırlığında düşme saptanmıştır **(115)**. Mayer ve ark. **(110)** Fischer 344 türsıçanlara otuz gün süresince 80mg/kg/gün VCD uyguladıklarında üç yüz altmışıncı günde primordial ve primer foliküllerde tam kayıp olmuş ve menopoz olmuştur. VCD uygulanan sıçanlarda üç yüz altmışıncı günde vücut ağırlığı

kontrol grubuna göre azalmıştır. Bu araştırmalarda erken dönem bulguları verilmemiştir.

Hoyer ve ark. **(105)** Fischer 344 tursıçanlara otuz gün süresince VCD uyguladıklarında kilo kaybı olduğunu bildirmişlerdir. Haas ve ark. **(149)** immatür farelere on yedi gün boyunca 160mg/kg/gün VCD uyguladıklarında kontrol grubuna göre kilo artışının az olduğunu, yirmi sekizinci günde ise vücut ağırlığında fark olmadığını belirlemişlerdir. Yazarlar son dozdan yüz seksen gün sonra VCD uygulanan guruplarda kontrol grubuna göre kilo artışı olduğunu gözlemişlerdir.

Keck ve ark. **(157)** farelere on beş gün VCD uygulaması ile farelerin kontrol guruplarına göre daha fazla kilo aldığını bildirmişlerdir. VCD uygulanan farelerde over yetmezliği sonrası açlık glukozu yükseldiğini belirlemişlerdir.

Romero ve ark. **(270)** VCD uyguladıkları ve on iki hafta süresince yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde kan insulin düzeylerinde artış, insulin direnci, metabolik sendromun daha kolay olduğunu bildirmişlerdir. Bu farelerde özellikle karın bölgesine kilo alımı, VCD uygulanmayan ve kontrol guruplarındaki farelere göre daha fazla olmuştur. Kilo alımı VCD uygulanmayan farelere benzer olmuştur.

Bulgularımıza göre; on beş gün VCD uygulaması vücut ağırlığı üzerine etki etmemiştir. Kaynak bulgularıyla değerlendirildiğinde bazı araştırmalarda kilo kaybı gerçekleşmiş olması, VCD'nin hayvanların iştahını azaltmasına bağlı olarak ortaya çıktığı, VCD bırakıldıktan sonra bu hayvanların iştahı düzeldiği ve VCD uygulanan guruplarda kilo artışının olduğu gözlenmiştir. VCD nin kilo artışınan neden olduğu araştırmalarda over yetmezliği sonrasında yüksek yağlı diyetin etkisinin olduğu belirtilmiştir. Araştırmalarda kilo aldırıcı etki genelde farelerde olmuştur. Bu durumun, VCD nin farelerde daha kolay ve çabuk over yetmezliği oluşturması sonrası ortaya çıkan östrojen eksikliği ile oluşan hiperfajiye bağlı olabileceği belirtilmiştir. Araştırmamızda standart diyet kullanmamız, kısa süre VCD uygulamamız, farklı bir sıçan türü kullanmamız nedeniyle vücut ağırlıklarının değişmediğini düşünmekteyiz. Ayrıca araştırmamızda VCD uygulanan sıçanlarda diğer guruplardan ve kontrol grubundan daha yüksek östrojen seviyelerinin ve iştahlarının normal olduğu gözlenmiştir. Bu durumda VCD nin kilo üzerine etkilerinin daha uzun sürelerde gerçekeşebileceğini düşünmekteyiz.

VCD Uygulaması Sonrası Oluşan Over ve Uterus Ağırlığı Değişiklikleri

Araştırmamızda tablo 4.2. de görüldüğü üzere; kontrol ve araştırma guruplarına ait sağ, sol ve toplam over ağırlıkları ve uterus ağırlıkları karşılaştırıldığında VCD grubu ile kontrol grubu arasında fark gözlenmemiştir. Ayrıca araştırmamızda tablo 4.3. de görüldüğü üzere; kontrol ve araştırma guruplarına ait normalleştirilmiş sağ, normalleştirilmiş sol , toplam over ve uterus ağırlıkları karşılaştırıldığında VCD uygulanan gurup ile kontrol grubu arasında fark gözlenmemiştir.

Ito ve ark. (146) kırk iki günlük Spraque Dawley sıçanlara iki ve dört hafta süresince 5, 20, 80mg/kg/gün VCD uyguladıklarında over ve uterus ağırlıklarında fark gözlememişlerdir. Çelik ve ark. (268) immatür Spraque Dawley sıçanlara on beş gün 160mg/kg/gün VCD uyguladıklarında uterus ve over ağırlıklarında kontrol grubu ile fark olmadığını bildirmişlerdir.

Flaws ve ark.(104) matür Fischer 344 türsıçanlara 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. Yazarlar bu durumu matür sıçanlarda oluşan azalmış östradiol seviyeleri sonrasında uterotrofik etkinin azalmasına, immatür sıçanlarda ise sikluslar başlamadığı için daha önce uterusda östrojen etkisi olmamasına bağlı olabileceğini bildirmişlerdir.

Mayer ve ark. (144) on gün süresince 160mg/kg/gün VCD uyguladıklarında yüz yirminci günde over ağırlığının kontrol overlere göre %20 ve uterus ağırlığının kontrol uteruslara göre %50 daha az ölçmüşlerdir. Haas ve ark. (149) immatür sıçanlarda on yedi gün VCD 160mg/kg/gün uyguladıklarında yüz sekseninci günde uterus ağırlığında azalma saptamışlardır. Yazarlar. bu durumu azalan 17 beta östradiol seviyesine bağlı olabileceğini bildirmişlerdir.

Mayer ve ark. (110) otuz gün VCD 80mg/kg/gün VCD uyguladıklarında, üç yüz altmışıncı günde vücut ağırlığına göre normalleştirilmiş over ağırlığı VCD uygulanan gurupta kontrol grubuna göre azalmış olarak ölçmüşlerdir. Hoyer ve ark. (105) Fischer 344 türsıçanlara otuz gün süresince VCD uyguladıklarında üç ve altı ayda normalleştirilmiş over ağırlığında azalma bildirmişlerdir. Bu araştırmada erken dönem bulguları verilmemiştir.

Mayer ve ark. (155) LDL-/- farelerde VCD uygulama sonrasında yüz yirminci günde over ağırlıklarında kontrol grubuna göre azalma varken uterus ağırlığında bir değişme olmadığını bildirmişlerdir. Lohff ve ark. (151) farelere on gün süresince VCD uyguladıklarında normalleştirilmiş uterus ve over ağırlıklarını kontrol grubuna göre daha az bulmuşlardır.

Araştırmamızda VCD üreme organ ağırlıklarını etkilememiştir. Over ağırlığında değişiklik olmaması primordial, primer folikül ve oosit ağırlığının total over ağırlığında fazla yer kaplamamasına bağlı olabilir Diğer araştırmalardan farklı bir sıçan türü kullanmamız uterus ağırlığında değişiklik bulmamamıza neden olmuş olabilir. İmmatür sıçanlarda sikluslar başlamadığı için uterus ağırlığında bir etkinin olmadığı düşünülebilir.

Araştırmalarda erişkin sıçanlarda overdeki etkilere ikincil gelişen hormonal değişikliklerin bir sonucu olarak ortaya uterus ağırlığında değişiklik olduğu belirtilmiştir. Bu hayvanlarda azalan kan östradiol seviyesi ve siklitede bozulması sonrası uteruslar daha az östrojene maruz kalmakta ve uterus ağırlığı azalmaktadır. Ayrıca VCD ile yapılan bir araştırmada postmenopozal overlerin ürettiği androjenlerin uterus ağırlığı üzerine etki ettiği bildirilmiştir (144).

Sprague Dawley sıçanlarda VCD nin over ve uterus ağırlığına etkilerinin belirlenebilmesi için daha uzun süreli araştırmaların yapılması gereklidir.

VCD Uygulaması Sonrası Overlerde Oluşan Morfolojik Değişiklikler

Primordial ve Primer Folikül Sayıları

Araştırmamızda tablo 4.4. ve 4.5. te görüldüğü üzere; VCD uygulanan sıçanlarda on beş gün sonunda primordiyal foliküllerde %86 ve primer foliküllerde %64.5 atrezi gözlenmiştir.

Çelik ve ark. (268) araştırmamız protokolüne benzer uygulama yaptıkları araştırmalarında on beş gün VCD uygulanması sonrasında immatür sıçanlarda primordial foliküllerde %92, primer foliküllerde %62 oranında atretik folikül belirlemişlerdir. Yapılan bir başka araştırmada Fischer344 sıçanlara on beş gün süresince VCD 80 mg/kg/gün uygulandığında primordial ve primer foliküllerde %50 kayıp gözlenmiştir. (108) Springer ve ark. (109) on beş gün VCD uygulaması sonrası %40 kayıp bildirilmiştir. Bu araştırmada onuncu günde primordial folikül kaybı

%25, on ikinci günde %35 olarak bulunmuştur. Primer foliküllerde hasar on iki günden önce oluşmamıştır. On beş gün dozun ardından primer foliküllerde hasar %63 olarak bildirilmiştir.

Flaws ve ark. (147) Fischer 344 tür sıçanlarda yaptıkları araştırmada otuz gün süresince 80 mg/kg/gün VCD uygulamasıyla primordial foliküllerin %81, primer foliküllerde %55 kayıp bildirmişlerdir. Mayer ve ark. (110) Fischer344 tür sıçana otuz gün 80mg/kg/gün VCD uyguladıkları guruplardaki primordial foliküller kontrol grubunun %31 ve primer foliküller %48.9 düzeyinde olduğunu bildirmişlerdir. Flaws ve ark. (104) otuz gün VCD uygulanan Fischer344 türü sıçanlarda kontrol grubuna göre oosit içeren primordial folikül sayısının %19, primer folikülleri ise kontrol sıçan sayısının ise %45 ine düşürdüğünü bildirmişlerdir.

Devine ark. (143) Fischer344 türü sıçanlara tek doz 320mg/kg/gün VCD uyguladıklarında primordiyal ve küçük primer foliküllerde altıncı gün itibariyle azalma bildirmişlerdir. Bu araştırmada tek doz 40, 80 ve 160mg uygulamada primordial ve primer folikül sayılarında on iki güne kadar değişiklik olmamıştır. Tek doz 360 mg/kg/gün VCD uygulandığında otuz altı günde büyük primer foliküller hariç tüm folikül tiplerinde azalma gerçekleşmiştir.

Lohff ve ark. (151) yirmi sekiz günlük immatur dişi B6C3F1 farelere 80mg/kg/gün VCD uygulamışlardır. On gün VCD alan farelerde final doz uygulandıktan sonra primordial folikül , küçük primer foliküller ve büyük primer folikül sayılarında azalma bildirmişlerdir.

Sahambi ve ark. (152), yirmi sekiz günlük C57BL6 farelere 5 gün süresince 240 mg/kg/gün VCD uyguladıklarında on altıncı günde primordiyal ve primer folikül sayılarında %96 oranında azalma bildirmişlerdir. Haas ve ark. (149) farelere on yedi gün süresince 160mg/kg/gün VCD uyguladıklarında primordial ve primer folikül sayılarının kontrol grubuna oranla %1.9 a düştüğünü bildirmişlerdir.

Mayer ve ark. (144) immatür farelere 160 mg/kg/gün VCD uyguladıklarında, on beş günde primordial folikül ve primer folikül sayılarının kontrol grubuna göre düştüğünü ve kırk altıncı günden sonra primordial ve primer folikül kalmadığını bildirmişlerdir.

Keating ve ark. (126) postnatal dört günlük farelerden elde ettikleri folikülleri VCD ile kültür yapmışlardır. Primordial ve primer folikül sayıları sekizinci gün itibariyle azalmıştır. Bu araştırmada sağlıklı foliküllerin %90'ı kaybedilmiştir.

Devine ve ark. (143) postnatal dördüncü gün fare over kültüründe on beş gün süresince 10-30 µm VCD uygulanan guruplarda primordial, küçük primer folikül sayılarının azaldığını bildirmişlerdir. Yazarlar ilk 24 -48 saat VCD uygulanan over kültürlerinde on beşinci günde primordial ve küçük primer foliküllerde kontrol guruplarına göre azalmış olduğunu ve daha büyük foliküllerin etkilenmediğini bildirmişlerdir.

Borman ve ark. (272). tek doz 80 mg/kg/gün VCD uygulayarak yirmi dört saat sonra histolojik olarak inceledikleri preparatlarda sağlıklı primer folikül sayılarında artış saptamışlardır. Bu hayvanlara on beş gün sonra bakıldığı zaman kontrol overlerine göre daha fazla sayıda sağlıklı primer folikül saptamışlardır. Primordial folikül sayılarında bir artış olmamıştır.

Araştırmamızda sıçanlara on beş gün süre ile VCD verilmesi sonrası, overlerde kaynaklarda bildirilen oranlardan daha yüksek primordiyal ve primer folikül kayıpları belirlendi. 160 mg/gün VCD dozunun Sprague Dawley sıçanlara uygulanmasına rastlanmamıştır. Atreziye uğramış foliküllerde yüksek değerler ortaya çıkmasının bu doz ve sıçan türüne bağlı metabolizma farklılıkları nedeniyle olduğu düşünmekteyiz. Kaynaklarda bir gün doz uygulamaları atrezi hızında azalmaya neden olurken tekrarlayan dozlarda VCD uygulamasının atrezi hızını artırdığı belirtilmiştir.(112,272) Bulgularımızda primer foliküllerin VCD' nin ovotoksik etkisine primordial foliküllere göre daha dirençli olduğu gözlemlendi. Keating ve ark. (325) VCD nin primordial primer folikül aktivasyonunu artırdığını bildirmişlerdir. Bu bağlantıda mevcut sağlıklı primordial foliküller primer foliküle dönüşmüş olabilir. Bulgularımızda araştırmalarla uyumlu olarak primordial folikül sayıları primer foliküllere göre azalmıştır.

Araştırmamız, farelerle yapılan VCD uygulamaları ile karşılaştırıldığında primordial ve primer folikül kayıplarının daha az gerçekleşmiş olması sıçan foliküllerinin bu etkiye daha dayanıklı olduğunu göstermektedir. Sıçanlarla yapılacak daha uzun dönem ve tekrarlayan doz VCD uygulaması sonrasında foliküllerde tam kayıp oluşabileceğini düşünmekteyiz.

Primordial ve primer atretik/normal Folikül Yüzdeleri

Araştırmamızda tablo 4.7. de görüldüğü üzere; kontrol ve araştırma guruplarına ait normal ve atretik primordial ve primer folikül yüzdeleri karşılaştırıldığında; VCD uygulanan guruplarda normal primordial ve primer folikül sayı ve yüzdelerinde azalma görülmüştür. Atretik primordial ve primer folikül sayı ve yüzdelerinde artış bulunmuştur.

Yapmış olduğumuz kaynak taramasında, VCD araştırmalarında primordial ve primer foliküllerde atrezi artışı olduğu belirtilmekle beraber genel olarak sayı ve yüzde verilmemiştir. Ancak Kao ve ark. (273) Fischer 344 tür sıçanlarda yaptıkları araştırmada 80 mg/kg/gün VCD uyguladıklarında atretik primordial ve primer foliküllerde değişimin altı ve sekiz gün guruplarında olmadığını bildirmişlerdir. Bu araştırmada atretik primordial folikül sayısındaki artış ilk kez on günde ortaya çıkarken, atretik primer folikül sayısındaki artış ilk kez on iki günde ortaya çıkmıştır. Bu araştırmada farelerde atretik primordial foliküllerde artış sekizinci günde gerçekleşirken ,atretik primer foliküllerde artış on ikinci günde gerçekleşmiştir.

Çelik ve ark. (268) ları immatür Sprague Dawley sıçanlara on beş gün süresince VCD uyguladıklarında primordial foliküllerde daha fazla olmakla beraber primer foliküllerde atretik folikül yüzdelerinde artış bildirmiştir. Bulgularımız kaynak bulgularıyla uyumludur. Araştırmamızda gözlenen primordial ve primer folikül sayısındaki azalmanın bu foliküllerde atrezi sonucu gerçekleştiğini düşünülebilir. VCD immatür sıçan over folikül havuzunu oluşturan foliküllerde atrezi mekanizmalarını harekete geçirmiştir.

Sekonder, Antral Folikül Sayıları

Araştırmamızda tablo 4.6. da görüldüğü üzere; kontrol ve araştırma guruplarına ait sekonder folikül sayısı, antral folikül sayısı karşılaştırıldığında; VCD uygulanan gurupta kontrol grubuna göre sekonder folikül ve antral folikül sayıları kontrol grubuna göre azalmış olarak görülmektedir.

Çelik ve ark. (268) immatür sıçanlarda on beş gün VCD 160 mg/kg/gün uyguladıklarında sekonder ve antral folikül sayılarında azalma bildirmişlerdir. Mayer ve ark. (110) immatür Sprague Dawley sıçanlara otuz gün VCD 80 mg/kg/gün uyguladıklarında otuzuncu günde sekonder ve antral folikül sayılarında ve korpus

luteum sayılarında azalma başladığını ve yüz yirminci günde istatistiksel düşüş gözlemlenmiştir. Flaws ve ark. (147) otuz gün VCD uygulanan sıçanlarda sekonder ve antral folikül sayıları %46 oranında azaldığını bildirmişlerdir.

Lohff ve ark. (151) yirmi gün VCD 80 mg/gün VCD uyguladıkları farelerin tüm foliküllerinde folikül sayılarında istatistiksel anlamlı şekilde azalma tespit etmişlerdir.

Springer ve ark. (109) 80 mg/kg/gün VCD uygulanan Fischer 344 türsıçanlarda sekiz, on, on beş günde sekonder ve antral folikül sayıları kontrol grubuyla benzer olarak bildirmişlerdir. Kao ve ark. (273) 80 mg/kg/gün VCD uyguladığında on ikinci günde sekonder ve antral folikül sayıları kontrol grubuyla benzer olarak bildirmişlerdir. Devine ve ark. (16) sıçanlara postnatal dört-on dokuz günleri arasında 80 mg/kg/gün dozunda on beş gün uygulamada sekonder ve antral folikül sayılarını benzer olarak bulmuşlardır.

Flaws ve ark. (104). otuz gün VCD uygulanan matür sıçanlarda oosit içeren büyüyen folikül sayılarında değişiklik olmadığını, immatür sıçanlarda ise kontrol grubunun %54 üne düşürdüğünü bildirmişlerdir. Yazarlar immatür sıçanlarda primordial foliküllerin yıkımı sonrası sekonder folikülde azalma olduğunu, matür sıçanlarda ise sekonder ve antral foliküllerin bir kısmının oluşması nedeniyle değişme olabileceğini belirtmişlerdir.

Lohff ve ark. (151) immatür farelere on gün 160 mg/kg/gün VCD uyguladıklarında sekonder ve antral folikül sayılarında değişiklik olmadığını yirmi gün VCD uyguladıkları hayvanlarda ise azalma bildirmişlerdir.

Bulgularımız kaynak bulgularıyla değerlendirildiğinde; gelişen büyük foliküllerde azalmanın primordial ve primer folikül havuzunun tükenmesi sonrasında geliştiği düşünmekteyiz. On beş gün VCD uygulanmasında sekonder ve antral folikül sayılarında meydana gelen azalma kaynaklarda gözlenen etkiden önce gerçekleşmiştir. Bu etkinin kullandığımız 160 mg/kg/gün yüksek doz ve Sprague Dawley sıçan türü ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz. Folikül sayılarında oluşan bu azalmanın ilerki dönemlerde folikül havuzunu tüketerek prematür over yetmezliği oluşturabileceği ve bu doz ve sıçan türünde bu araştırmalarda kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Korpus Luteum Sayıları

Araştırmamızda tablo 4.6. da görüldüğü üzere; kontrol ve araştırma guruplarına ait korpus luteum sayıları karşılaştırıldığında; VCD uygulanan gurup ile kontrol grubu arasında fark saptanmamıştır. Ancak VCD uygulanan gurupta korpus luteum sayılarında azalma mevcuttur.

Mayer ve ark.Fischer 344 türsiçanlarda korpus luteum sayılarında azalmayı yüz yirminci günde bildirmişlerdir **(110)**.

Çelik ve ark. **(268)** immatür Spraque Dawley sıçanlara on beş gün süresince 60 mg/kg/gün VCD uyguladıklarında korpus luteum sayılarını kontrol grubuna göre azalmış olarak bildirmiştir. Benzer sıçan türü ve uygulama süre ve dozunda VCD kullanmamıza rağmen farklı sonuç elde etmemiz hayvanlar arası farklar nedeniyle olabilir. Aynı araştırmacıların erken dönemde primordial ve primer folikül sayılarında daha fazla oranlarda atrezi bildirmiştir. Dolayısıyla farklı sonuçlar elde etmemiz bu nedenle de oluşmuş olabilir. Araştırmamızda korpus luteum sayısında azalma olmamasını VCD nin folikülogeneze direk etkisi olmaması ve ovulasyonunu engellememesi nedeniyle olduğu düşünmekteyiz. Diğer araştırmalarda ve bizim araştırmamızda korpus luteum sayılarındaki azalmanın folikül sayılarındaki azalmaya ikincil olarak geliştiği düşünmekteyiz. Ancak korpus luteum sayılarında azalma olabilmesi için daha uzun süre geçmesi gerekmektedir. Bu bağlamda sıçanlara 160 mg/kg/gün uyguladığımız VCD nin kaynaklarda bildirilen süreden daha kısa sürede menopoz oluşturabileceği düşünmekteyiz.

Folikül Kist Sayıları

Araştırmamızda tablo 4.6.da görüldüğü üzere; kontrol ve araştırma guruplarına ait folikül kist sayısı karşılaştırıldığında; VCD uygulanan gurupta kontrol grubuna göre folikül kist sayısını azalmış olarak bulundu. Çelik ve ark. **(268)** immatür sıçanlara 15 gün VCD uyguladıklarında folikül kist sayılarını kontrol grubu ile benzer saptamışlardır. Bu bulgumuzun VCD' nin etkisini atrezik süreci hızlandırarak gerçekleştirdiğinin indirek bir bulgusu olduğu düşünmekteyiz.

Folikül apları

Araştırmamızda tablo 4.8. de görüldüğü üzere, kontrol ve araştırma guruplarına ait primordial ve primer folikül çapları karşılaştırıldığında; primordial folikülün granüloza hücre çaplarını kontrol grubuna göre daha düşük saptandı. Ancak bu düşüklük istatiksels anlamlı değildi. Kaynaklarda VCD ile yapılan araştırmalarda folikül çaplarının değerlendirildiği az sayıda araştırma mevcuttur. Bu bakımdan araştırmamız VCD uygulanan sıçanlarda folikül çaplarının nicelik olarak bu en geniş anlamda değerlendirildiği bir uygulamadır.

Springer ve ark. 10 gün VCD uyguladıkları guruplarda primordial folikül ve primer folikül çaplarında farklılık bulmamışlardır. Ancak bu araştırmada folikül çapları sayısal değerlerle belirtilmemiştir (274).

Araştırmamızda primordial folikül granuloza çaplarında azalma olmasının VCD nin granuloza hücreleri üzerine etkisine ikincil olarak çıktığı düşünülebilir. Bu bulgumuz küçük foliküllerdeki granuloza hücrelerinin VCD ye daha duyarlı olduğunu desteklemektedir (147). Araştırmamızda VCD uygulanan guruplarda sağlıklı primordial foliküllerin küçük primordial foliküller olduğunu gözlemlenmiştir. VCD uygulanan guruplarda sağlıklı foliküllerin daha küçük çapta olması nedeniyle VCD nin etkisinin folikülün belirli bir büyüklüğe eriştikten sonra meydana geldiğini düşünmekteyiz.

Araştırmamızda, tablo 4.9. de görüldüğü üzere; sıçanlar sekonder ve antral folikül çapları teka ve granuloza tabaka kalınlığı karşılaştırıldığında deney gurupları ve kontrol grubu arasında fark saptanılmadı. Bu bulgumuz kaynaklarda daha önce araştırılmamış bir konudur. Bulgumuz VCD nin küçük folikülleri etkilemesiyle uyumludur. VCD büyük foliküllerin boyutunu etkilememiştir .

Işık Mikroskopi Bulguları

Araştırmamızda sıçanları son doz VCD uygulamasından dört saat sonra sakrifiye edildi. Flaws ve ark. (147). VCD nin küçük preantral foliküllerden elde ettikleri granüloza hücrelerin viabilitesini bir, altı ve yirmi dört saat sonra azalttığını, büyük preantral foliküllerden elde edilen granüloza hücre viabilitesini yirmi dört saat sonra azalttığını bildirmişlerdir. Yaptığımız kaynak taraması sonrasında, örneklere sağlıksız folikülleri en fazla oranda gösterebilecek süre olduğu için sıçanlar son doz uygulamadan dört saat sonra öldürüldü (109).

Araştırmamızda; on beş gün sonunda VCD uygulanan grupta, ışık mikroskopunda primordiyal foliküllerin sayıca azalmış olduğu ve büyük çoğunluğunda dejenere olduğu gözlemlendi. Granüloza hücrelerinde oositlerde apoptoz işaretleri gözlemlendi. Granüloza hücrelerde şekil düzensizliği ve nükleer piknozis gözlemlendi. Ayrıca granüloza hücrelerinin yan yüzeylerinde ayrılmalar saptandı. Dejenere folikülde yer alan oositte, eozinofilik sitoplazma, kromatinin nükleus zarına yakın yoğunlaştığı ve oositin fragmente olduğu ve oosit ile granüloza hücreleri arasında ilişkinin bozulduğu gözlemlendi. Ayrıca oositin çevresini saran granüloza hücrelerinde hücre içeriği dağılmış olarak ve yan yüzeylerde ayrılmalar gözlemlendi. Normal primordiyal foliküller ise oldukça az sayıda görüldü. Nekroz bulgusu olan makrofaj infiltrasyonu (inflamasyon bulgusu), membran hasarı ve hücresel şişme gözlenmedi.

Yapılan araştırmalarda. on gün süresince VCD uyguladıkları sıçanlarda ışık mikroskopunda apoptoz işaretleri artmıştır. İrregüler şekilli primordial ve primer foliküller on günden sonra ortaya çıkmışlardır. Primordial ve primer foliküllerin oositlerinde düzensizleşme, nükleer membranda kromatin yoğunlaşması, oosit etrafındaki granüloza hücrelerde düzensiz dağılma, oosit ve granüloza hücrelerdeki kontak kaybı olmuştur. Bazı granüloza hücrelerinde nükleer membran boyunca kromatin birikmesi olmuştur. Preantral foliküllerde oositlerde ve granüloza hücrelerinde büzüşme olmuştur. Bazı granüloza hücrelerinde apoptozun karakteristik bulgusu olan kromatinin nükleer membran boyunca dağılımı gözlenmiştir **(108, 109)**.

Flaws ve ark. **(147)** 80 mg/kg/gün VCD uyguladıkları sıçanlarda primordial ve primer foliküllerde apoptoz oluşan hücreleri onuncu günde gözlemlemişlerdir. Kao ve ark. **(108)** 80 mg/kg/gün VCD uyguladıkları sıçan ve farelerde apoptotza uğrayan hücreleri on ikinci günde gözlemlemişlerdir. Bu araştırmada foliküler hasarın ilk bulguları sıçanlarda onuncu farelerde sekizinci günde tespit edilmiştir.

Mayer ve ark. **(110)** on gün 80mg/kg/gün VCD uygulanan sıçanlarda elektron mikroskopisinde atretik folikülleri incelemişlerdir. Atretik büyük antral ve antral foliküllerde apoptoz granuloza hücrelerde başlamakta ve oosit ve granüloza hücreleri kontaklarını kaybetmektedir. Bu olay sonrasında granüloza hücre katı neredeyse tamamen apoptotza uğramakta ve sonrasında oosit dejenerasyonu, tekal hipertrofi, folikül çapında düşme meydana gelmektedir VCD uygulaması sonrasında daha

büyük foliküllerde değişiklik olmamaktadır. On gün VCD uygulanan sıçanlarda primordial foliküllerde kontrol folikülleriyle benzer sayıda atrezi gözlenmiştir.

Borman ve ark. (272) tek doz 80 mg/kg/gün VCD uygulanması ile overlerde sağlıklı görülen foliküllerin sayısında artış olduğunu bildirdikleri araştırmalarında bu durumu apoptoz uyaran gen olan bax azalmasına bağlamışlardır.

Bulgularımız kaynak bulgularıyla değerlendirildiğinde VCD nin küçük foliküllerde granuloza hücre ve oositlerde apoptoz mekanizmalarıyla foliküler atreziye neden olduğunu düşünmekteyiz. VCD granuloza hücre canlılığını ve granuloza hücre oosit arasındaki ilişkiyi bozarak oosit hasarına da neden olduğu düşünmekteyiz (106,274). VCD nin ilk hedefi granuloza hücre olmakla beraber oositinde hedef alındığı düşünmekteyiz. VCD etkisinin ortaya çıkması için tekrarlayan dozlarda VCD uygulaması gereklidir. Bu durumda apoptoz işaretlerinin artacağı düşünmekteyiz.

VCD Uygulamasının Overlerde Apoptoz Üzerine Etkisi

Araştırmamızda ışık mikroskopide; VCD uygulanan sıçan foliküllerinde apoptoz işaretlerini gördükten sonra bu mekanizmanın hangi yolağı kullandığını test etmek amacıyla immunohistokimyasal boyalar kullanılmıştır.

Araştırmamızda tablo 4.10 da görüldüğü üzere; kontrol ve araştırma guruplarına ait TUNEL pozitif hücre sayıları karşılaştırıldığında; VCD uygulanan guruplarda primer foliküllerde TUNEL (+) hücre sayısı kontrol grubundan fazla saptanmıştır. Primordial folikül hücrelerde TUNEL pozitif hücre sayısı kontrol grubuna göre artmış olmakla beraber bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Antral foliküllerde TUNEL pozitif hücre sayısı VCD uygulanan guruplarda artmış olmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Kaynaklarda az sayıda araştırmada VCD araştırmada TUNEL immun boyama ile apoptoz değerlendirmesi yapılmıştır. Çelik ve ark. (268) immatür sıçanlara 160 mg/kg/gün VCD uyguladıklarında primordial foliküllerde TUNEL pozitif hücre sayısında artış bildirmiştir. Yazarlar TUNEL pozitif hücre sayısının en fazla sekonder foliküllerde olduğunu ancak bu durumun kontrol grubu ile benzer olduğunu bildirmişlerdir.

Devine ve ark. (16) postnatal dördüncü gün fare over kültürlerinde primordial ve primer folikül granuloza hücre ve oositlerde TUNEL pozitifliği artışı ve TUNEL

pozitif hücre sayılarında artış bildirmişlerdir. Bu araştırmada kontrol overleri ve VCD uygulanan overlerde sekonder folikülden büyük folikül gözlenmemiştir. Araştırmacılar bu durumu kültür ortamında gonadotropin yokluğuna bağlamışlardır.

Smith ve ark. VCD uygulamasından yirmi dört saat sonra DNA yıkım ürünlerinde değişiklik saptamadıklarını bildirmişlerdir. Bu araştırmada DNA yıkım ürünlerinde dört saat sonra artış olmuştur. Yirmi dört saat sonra toplanan örneklerde DNA yıkım ürünlerinin gösterilememesinin nedeni apoptotik cisimlerin hızla ortamdaki uzaklaştırılması sonucudur. Yapılan bir araştırmada foliküler hasar ilk önce on günde ortaya çıkmıştır. Işık mikroskopu bulguları ve DNA yıkım artışı hücre ölümünün apoptoz mekanizmalarıyla olduğunu göstermiştir. Bu dönemde henüz folikül sayıları değişmemiştir (106).

Springer ve ark. (109) 80 mg/kg/gün VCD uygulanan Fischer 344 türsıçanlarda son dozun uygulanmasını takiben bir ve dört saatte toplanan primordial ve primer foliküllerde ve küçük preantral foliküllerde on, on iki, on dört gün dozlarında DNA yıkımında artış olduğunu altı ve sekiz gün dozlarında ise DNA yıkımında değişiklik olmadığını bildirmişlerdir. Son dozun uygulanmasını takiben yirmi dört saat sonra toplanan örneklerde ise DNA yıkım ürünlerinde artış gösterilememiştir. Bu araştırmada daha büyük foliküllerde DNA ürünleri yıkımında artış olmamıştır. Yazarlar bu durumu matür granuloza hücrelerde DNA z I benzeri endonukleaz enziminin olmamasına bağlamışlardır.

Bulgularımız VCD nin overlerde primordial ve primer foliküllerde hücre ölümünü artırması ile uyumludur. Primordial foliküllerde TUNEL pozitif hücre sayılarında azalma olması on beş gün sonunda VCD ye dayanıklı primordial foliküllerin kalmasına ve primordial folikül sayılarındaki azalmaya bağlı olduğu düşünülebilir. Çelik ve ark. ve bizim araştırmamızda da sekonder ve antral foliküllerde TUNEL pozitif hücre sayılarındaki istatistiksel anlamlı olmayan artış kaynaklarında bu dönem foliküllerin atrezi sürecine en duyarlı olduğu bulgusunu desteklemektedir. VCD primordial ve primer foliküllerde atrezi sürecini harekete geçirmiştir. Ancak TUNEL immün boyaması atrezinin erken basamaklarını göstermekte olup hücre apoptoz yolağının bir basamağında kurtarılabilir.

Araştırmamızda şekil 4.9’da görüldüğü üzere; deney ve kontrol guruplarına ait primordial folikül granuloza hücre kaspaz 3 boyanma yoğunluğu karşılaştırıldığında; VCD uygulanan guruplarda kaspaz 3 boyanma yoğunluğunu hafif artmış olarak saptanılmıştır. Şekil 4.10 – Şekil 4.14’de görüldüğü üzere VCD uygulanan guruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; daha büyük foliküllerde VCD ovaryan foliküllerde kaspaz 3 boyanma yoğunluğunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmamıştır. Kaspaz 3 immun boyaması foliküllerin granuloza hücrelerinde görülmüştür. Oositlerde kaspaz 3 boyanması olmamıştır. Ovaryan stromada kaspaz 3 boyanma şiddeti artmıştır.

Çelik ve ark. (268) deney protokolümüze benzer şekilde immatür sıçanlara 160 mg/kg/gün VCD uyguladıklarında genel olarak over foliküllerinde ve stromada kaspaz 3 immun boyamasının arttığını bildirmişlerdir. Ancak sadece antral folikül ve stromada bu artışın istatistiksel anlamlı olduğunu bildirmişlerdir.

Hu ve ark. (112) sıçanlara on beş gün 80 mg/kg/gün VCD uygulanması sonrası dördüncü saatte konfokal mikroskopide primordial ve küçük primer folikül granuloza hücreleri ve oositlerde sitozolik Kaspaz 3, kaspaz 8 aktivitesi ve prokaspaz 3 protein ekspresyonunda artış olduğunu, bir gün 80 mg/kg/gün VCD uygulanması sonrasında ise mitokondrial kaspaz 9 aktivitesinde ve kaspaz 3 aktivitesinde artış olduğunu göstermişlerdir. Tekrarlayan dozlarda kaspaz 3 aktivitesinde artış olmuştur.

Mayer ve ark. (144) B6C3F1 farelere on gün 160 mg/kg dozlarında VCD uygulamasını küçük preantral foliküllerde kaspaz 3 aktivitesinin arttığını göstermişlerdir. On beş gün boyunca 80-320 mg/kg arasındaki dozlarda VCD uygulandığında primordial ve primer foliküllerdeki granuloza hücrelerinde ve oositlerde kaspaz 3 aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı oranda arttığı daha büyük foliküllerde ise kontrol ile benzer aktivitenin olduğunu bildirmiştir

Devine ve ark. (16) postnatal dördüncü gün fare over kültürlerinde kaspaz 3 pozitif hücre sayılarında artış bildirmişlerdir. Devine ve ark. VCD primer foliküllerde kaspaz 3, 8, 9 ve MAPK yolağını aktive ederek apoptozu indüklediğini göstermişlerdir (16, 329).

Takai ve ark. (137) Bax yoksun fareler de VCD nin neden olduğu primordial ve primer folikül depleasyonu normal farelere göre daha az olduğunu göstermişlerdir. Bu araştırmada kaspaz 2 veya kaspaz 3 den yoksun farelerde primer folikül

depleyyonu normal farelere göre daha az gerçekleşirken primordial folikül depleyyonu kontrol farelerine benzer olarak gerçekleşmiştir. Dolayısıyla kaspaz sistemi primer folikül apoptozunda önemlidir. Yapılan araştırmalarda kaspaz 2 oosit apoptozunda önemli iken kaspaz 3 granuloza hücre apoptozunda önemli olduğu gösterilmiştir **(330)**.

Kaspaz 3 yolağının aktive olması VCD nin neden olduğu hücre ölümünün apoptoz mekanizmalarıyla ve geri dönüşümsüz olarak gerçekleştiğini göstermektedir. VCD doğal atrezi sürecini hızlandırmıştır. Kaspaz 3 artışı primordial folikülerde gözlenmiş olması VCD nin hedefinin bu foliküller olduğu ve folikül havuzunun hedeflendiği düşündürmektedir.

Araştırmamızda Şekil 4.15’de görüldüğü üzere; deney ve kontrol guruplarına stroma kaspaz 3 boyanma yoğunluğu karşılaştırıldığında; VCD uygulanan guruplarda kaspaz 3 boyanma yoğunluğunu artmış olarak görülmüştür. VCD nin ovaryan stromal hücrelerde kaspaz 3 boyanması üzerine etkisi daha önceki araştırılmamış bir konudur. Bu bakımdan bizim araştırmamız orijinal bir araştırmadır.

Çelik ve ark. **(268)** VCD uygulanan sıçanlarda stromada kaspaz 3 aktivitesinin arttığını immunohistokimyasal yöntemlerle göstermişlerdir. Flaws ve ark. **(147)** immatür sıçanlarda VCD nin toksik olmayan tetrol ürünlerine çevrilmesinin büyük preantral foliküllerde küçük preantral foliküllere göre 1,5 kat, interstisyel hücrelere göre 4 kat fazla olduğunu bildirmişlerdir. Erişkin sıçanlarda ise küçük ve büyük preantral foliküllerde tetrol ürünlerine çevrilme oranı benzerdir. Hepatik hücrelerde interstisyel hücrelere göre 1.6 kat, adrenal hücrelerde interstisyel hücrelere göre 10 kat fazla oranda tetrol ürünlerine çevrilmektedir. Dolayısıyla interstisyel hücrelerde VCD etkisine duyarlıdır. Primordial ve primer foliküller büyük foliküllere göre VCD yi tetrol ürünlerine daha az çevirmektedir. Bu bulgular bizim bulgularımızla uyumludur. VCD stromada apoptoza neden olmuştur.

Araştırmamızda antral foliküllerin granuloza hücrelerinde özellikle antral kaviteye yakın hücrelerde yoğun olarak kaspaz 3 boyanması olduğu görülmüştür. Antral kaviteye yakın olan granuloza hücreler oosit beslenmesi için önemli role sahiptir. Bu hücrelerle oosit arasındaki ilişkinin bozulması sonrasında oosit beslenmesi bozulacağı için oosit ölümü ile sonuçlanabilir. VCD, antral kaviteye

yakın olan granüloza hücrelerini hedeflemiştir ve bu hücrelerde apoptoz mekanizmalarını harekete geçirmektedir.

Apoptoz morfolojik değişikliklerin yanında spesifik genlerin ekspresyonu ile beraber olduğu gösterilmiştir. Bcl-2 ekspresyonunda azalma ya da bax geninde artış o hücrede apoptoza neden olmaktadır (331). Tilly ve ark. (63) büyük antral foliküllerde normal atrezi sürecinde Bax ekspresyonunda artış olduğunu göstermişlerdir. Springer ve ark. (332) 10 gün süresince VCD uygulanan sıçanlarda küçük folikül fraksiyonlarında bax geninin arttığını göstermişlerdir. Borman ve ark. (272) primordial ve primer foliküllerde normal atrezi sürecinin başladığını ve bunun özellikle evre 2 primer foliküllerde olduğunu göstermişlerdir. Tek doz VCD 80 mg/kg olarak uygulandığında Bax ekspresyonunun azaldığı ve tek doz VCD uygulamasının overlerde primordial ve primer folikülleri koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Tekrarlayan dozlarda VCD uygulaması sonrası overlerde primordial ve primer foliküllerin granüloza hücre ve oositlerinin sitoplazmalarında Bax proteini artırmıştır.

Hu ve ark. (138); sıçanların küçük preantral foliküllerinde VCD nin indüklediği apoptoz de proapoptotik bad proteinlerinin artmış ekspresyonu, bcl xl proteinlerinin redistribusyonu, sitokrom c nin mitokondriden sitozole akışı ve mitokondride bax/bcl 2 gen oranında artış olmuştur. Bu durum VCD bağlantılı ovotoksisitede artmış apoptozde bcl 2 gen ailesinin rolünü ortaya koymuştur. Bcl-2 nin aracılık ettiği apoptoz sinyal kaskadı granuloza hücrelerde ve oosite komşu granuloza hücrelerde artmıştır . VCD overlerde apoptozu hareketlendirmiştir.

Kaspaz 3 immun boyama sonuçlarımız VCD nin overlerde primordial foliküllerde geri dönüşümsüz apoptozu başlattığını göstermiştir. Daha büyük foliküllerde ise kaspaz 3 boyanma yoğunluğu kontrol gurupları ile uyumludur.

VCD Uygulaması Sonrası Oluşan Hormonal Değişiklikler

Menopoz dan önce hipotalamus ve santral sinir sistemde yaşla bağımlı değişiklikler oluşmaktadır. Yırtıcı hayvan modellerinden elde edilen bilgilere göre yaşlanma esnasında hipotalamusta ve pituiterde oluşan değişiklikler yaşla azalan fertiliteye katkıda bulunmaktadır (276). Orta yaşlı yırtıcı hayvanlarda, insanlara benzer şekilde artmış FSH, LH sekresyonunda dalgalanmalar (artmış süre, azalmış pulse frekansı) ve siklus günlerinde uzama görülür (277). Dolaşımda bulunan FSH

da artış overde azalan sağlıklı folikül popülasyonunun yansması olan granüloza hücre ürünü olan inhibin B sekresyonunda azalma ile beraberdir **(278)**.VCD direk olarak overlerdeki primordial ve primer foliküller üzerine toksik etki göstermektedir. Azalan folikül havuzu sonrasında folikül gelişimi süreci bozulmaktadır. Folikül sayılarının azalması ile beraber siklus düzensizliği ve kan hormonlarında değişiklikler oluşur.

Araştırmamızda on beş gün VCD uyguladığımız sıçanlarda serum FSH, östradiol düzeylerini ölçülmüştür. Araştırmamızda tablo 4.11. de görüldüğü üzere; kontrol ve araştırma guruplarına ait serum FSH ve E2 düzeyleri karşılaştırıldığında; VCD uygulanan guruplarda serum FSH düzeyleri kontrol grubuna göre daha düşük, serum östradiol düzeyleri kontrol grubuna göre daha yüksek ölçülmüştür.

Mayer ve ark. **(110)** Fischer 344 tür sıçanlara otuz gün 80mg/kg/gün VCD uygulamışlardır. Otuzuncu günde serum FSH ve östradiol düzeylerini kontrol grubu ile benzer ölçmüşlerdir. Kan FSH düzeylerindeki yükselme yüz yirminci günde gerçekleşmiştir. Kan östradiol düzeyleri üç yüz altmışıncı güne kadar kontrol grubuyla benzer düzeylerde ölçülmüştür. Yüz yirminci günde serum FSH düzeyi antral folikül seviyesiyle ters ilişkili olarak bulunmuştur.

Mayer ve ark. **(144)** bir başka araştırmalarında B6C3F1 farelere on gün süresince 160 mg/kg/gün VCD uygulamışlardır. Kan hormon düzeyleri incelendiğinde on beşinci günde FSH düzeylerinde değişiklik saptamamışlardır. Deneyin otuz yedinci gününde VCD uygulanan hayvanların kan FSH düzeyleri kontrol grubuna göre artmıştır. FSH düzeylerindeki yükselme yüzüncü güne kadar devam etmektedir. Yüzüncü günden sonra platoya ulaşmıştır. Bu dönemde kontrol sıçanlarda kan östradiol konsantrasyonlarında bir değişiklik olmamıştır. On beş-Kırk altıncı gün arası antral folikül sayısı ile serum FSH düzeyi arasında ters bir ilişki gösterilmiştir. Yüz yirmi yedinci günde kan östradiol konsantrasyonları tespit edilemeyecek düzeylere düşmüştür. Otuz yedinci günde alınan over doku kültüründe residuel over dokusunda kontrol grubuna göre azalmış residuel ovaryan dokuda kontrol grubuna göre daha diffuz bir LHR boyanması olmuş ve HDL reseptör yoğunluğunun azaldığını gösterilmiştir. Bu durumun sonucu 17 beta östradiol sentez kapasitesinde azalma tespit etmişlerdir. Deneyin yüz yirminci gününde hayvanlardan elde edilen over hücre kültüründe VCD uygulanan gurupta kontrol grubuna göre

%20-40 daha az progesteron üretimi olmuştur. Androstenedion üretimine bakıldığında kontrol overlerde androstenedion üretimi tespit edilebilir düzeylerin çok altındadır. Dolayısıyla menopozdan önce overlerin androjen üretimine çok fazla katkıda bulunmadığı söylenebilir. VCD uygulanan guruplardan yüz yirminci günde elde edilen hücre kültür ortamına LH eklenmesi androstenedion üretimini artırmazken insulin eklenmesi sonrasında LH konsantrasyonu 1-3 ng/ml düzeylerinde olduğunda androstenedion üretimini artırdığını tespit etmişlerdir.

Lohff ve ark. (151) farelere on gün VCD uyguladıklarında kan FSH düzeylerinde oluşan yükselmenin kırk dördüncü günde başladığını yirmi gün FSH uygulanan farelerde otuz beşinci günde başladığını bildirmişlerdir. Lohff ve ark. (151) yirmi sekiz günlük immatur dişi B6C3F1 farelere VCD 80mg/kg/gün VCD uygulamışlardır. On gün süresince VCD uygulanan farelerde kırk dördüncü gün itibariyle kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değerlerde FSH değerlerinde artış olduğunu ve bu artışın yüz dört- yüz altıncı güne kadar (folikül kalmayan dönem) sürdüğünü bildirmişlerdir. Yirmi gün süresince VCD uygulanan farelerde otuz beşinci gün itibariyle kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değerlerde FSH değerlerinde artış olduğunu ve bu artışın kırk üç-altmış üçüncü güne (folikül kalmayan dönem) kadar sürdüğünü bildirmişlerdir. Araştırmacılar VCD uygulanan sürenin artmasıyla beraber over yetmezliğinin daha erken oluşabileceğini göstermişlerdir.

VCD normal atrezi sürecini etkileyerek primordial ve primer foliküllerde atrezi sürecini hareketlendirmektedir. Antral folikül sayısı düştükçe dolaşımda bulunan FSH düzeyleri artmaktadır. Kaynakların aksine araştırmamızda serum FSH düzeyleri düşük olarak gerçekleşmiştir. On beş gün VCD uygulanan guruplarda kan östradiol düzeylerindeki yükseklik olması nedeniyle serum FSH düzeylerinin düşük olarak gerçekleştiğini düşünmekteyiz. Serum östradiol seviyelerinde yükseklik olmasının VCD nin folikülogenez süreci üzerine etki etmemesine ve folikül havuzunu hedeflemesine bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca VCD nin östrojen metabolizmasında etkili olan enzimleri etkilemiş olabileceğini düşünmekteyiz.

Araştırmamızda sıçanlarda vajinal açılma zamanını kontrol guruplarıyla benzer olarak gerçekleşmiştir. Ancak araştırmamız bittiğinde On beş gün kontrol ve araştırma grubu sıçanlarda vajinal açılma olmamıştır. Dolayısıyla kırk üç gün süre

sıçan vajinal açılması için yeterli bir süre değildir. J.C.Lohff ve ark. (151) farelere on gün VCD uyguladıklarında vajinal açılma zamanı kontrol hayvanlarla benzer olarak bildirmişlerdir.

Yırtıcı overleri yaşamlarının çok geç evresine kadar yaşlanmamaktadır. Dolayısıyla insanlarda over yaşlanmasını taklit eden bir çok araştırma yapılmıştır. Her modelin kendine göre avantajları ve dezavantajları vardır. En fazla kullanılan ooferektomi uygulanan hayvan modelidir. Bu durumda oluşan hormonal mikroçevre çok ani olmakta ve geriye over dokusu kalmamaktadır. FSH reseptör mutasyonları, GDF-9 gen mutasyonları ve TGF beta mutasyonları ile menopoz modelleri oluşturulmuştur. Ancak bu modellerde fetal dönemden itibaren üreme sistemi üzerine etkiler oluşmakta ve normal üreme sistemi gelişimi olmamaktadır. Günümüzde prematür over yetmezliği araştırmaları 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 prematür over yetmezliği modeli uygun bir model olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu modelde insan reproduktif hayatında olduğu gibi folikül kaybı apoptoz mekanizmalarıyla olmakta ve sonrasında kalan over dokusu insan overleri gibi androjen üretimine katkıda bulunmaktadır. Yaptığımız araştırmayla bu modelin prematür over yetmezliği modeli olarak kullanılabilirdiği düşünülebilir.

Sıçanlarda Hiperandrojenik Over

DHEA Uygulaması- Doz Planlanması

İnsanlarda polikistik over sendromu anovulatuvar infertilitenin başlıca sebebidir. PCO hastalarının birçoğunda semptomlar pubertenin başlaması ile başlar ve prepubertal dönemde yükselen androjenlerin başında DHEAS gelmektedir (280). İnsan PCOS unda kanda artan hormonlardan bir tanesi DHEA olması nedeniyle DHEA uygulayarak PCO modeli oluşturulmuştur. Bu model bir çok açıdan insan PCO una benzemektedir. Bu hayvanlarda insan PCOS u gibi ovaryan foliküllerde maturasyonda problem ve anovulasyon sonrası kistik over görünümü, insulin direnci ve hiperandrojenizm vardır (216, 222) DHEA uygulanan immatür sıçanlarda overlerde kistik değişiklikler, erken ovulasyon, asiklisite ve sonrasında anovulasyon olmaktadır (281, 282) Düzenli siklusları olan erişkin sıçanlara DHEA uygulanması

sonrasında overlerde kistik değişiklikler gözlenmiştir (217). Dişi transeksüellere testosteron uygulanması sonrasında overlerde PCO benzeri görünüm ve serum LH/FSH oranında artış gösterilmiştir (283).

Araştırmamızda yirmi sekiz günlük immatür Spraque Dawley sıçanlar kullanılmıştır. Bu dönemde sıçanlarda sikluslar henüz başlamamış olup, vajinal açıklık yoktur. Bu dönem sıçanlarda puberte başlangıcıdır. Kaynak incelemesinde birçok doz aralığında DHEA uygulanmasına rağmen immatür sıçanlarda overlerde değişikliklerin oluşmasında en uygun dozun 6 mg/100 g VA olması nedeniyle bu doz DHEA uygulaması yapılmıştır. DMSO nun terapötik dozlarda kullanıldığı doz 200µl DMSO (yani 0,8 ml DMSO/kg) dur (284). Araştırmamızda, DHEA nu DMSO içerisinde çözerek intraperitoneal olarak uygulanmıştır.

DHEA Uygulaması Sonrası Oluşan Vücut Ağırlığı Değişiklikleri

Araştırmamızda, tablo 4.1. de görüldüğü üzere; sıçanlar deney başi ağırlıkları bakımından karşılaştırıldığında deney gurupları ve kontrol grubu arasında fark saptanılmamıştır. Deney sonu ağırlıkları DHEA uygulanan gurupta kontrol grubundan daha fazla saptanmıştır.

Medina ve ark. (181) erişkin sıçanlara yedi gün süresince 10 mg/kg vücut ağırlığı/gün ip dehidroepiandrosteron uygulaması sonrasında vücut ağırlığında değişiklik olmadığını bildirmişlerdir. Mauriege ve ark. (286) erişkin sıçanlara 27 hafta boyunca DHEA perkutan uyguladıklarında vücut ağırlığında, yağ ve kas kitlesinde değişiklik olmadığını bildirmişlerdir. Parker ve ark. (195) 10 gün süresince subkutan 6mg/100g VA DHEA uyguladıklarında vücut ağırlığının değişmediğini bildirmişlerdir.

Sander ve ark. (320) BALB/c farelere yirmi gün süresince 6mg/100 g vücut ağırlığında DHEA intraperitoneal uyguladıklarında. deney sonu ağırlıkları ve BMI (kg/uzunluk m²) bakıldığında kontrol grubu ile DHEA uygulanan gurup arasında fark olmadığını bildirmişlerdir.

Taniquichi ve ark. (287) erkek sıçanlarda yaptıkları araştırmalarında DHEA ile beslenen sıçanların daha az kilo aldıklarını bildirmiştir. Ayrıca Cleary ve ark. (288) 6 ay süreyle 1% li DHEA lu diyetle beslenen erişkin dişi sıçanlarda vücut ağırlık kaybı bildirmişlerdir.

Berger ve ark. (209) ooferektomi yapıp intravajinal 1 mg/gün DHEA uygulanan guruplarda plasebo uygulanan guruplara göre vücut ağırlığında kayıp bildirmişlerdir. Krishna ve ark. (289) Otuz bir günlük immatür sıçanlara 6 mg/100g VA DHEA uyguladıklarında toplam vücut ağırlığında azalma bildirmişlerdir.

Araştırmamızda DHEA uygulanan sıçanlarda kontrol grubuna göre deney sonu vücut ağırlığının fazla olması kaynaklarda yapılan hayvan araştırmalarındaki bulguların aksinedir. Ancak deney süresince gerçekleşen kilo farkı kontrol grubuyla benzer olarak bulunmuştur. Yapılan deneysel araştırmalarda Dehidroepiandrosteronun uzun süreli oral uygulamada açlık şekeri, açlık insulinini ve trigliserid düzeylerini azalttığı bildirilmiştir (222,286). DHEA tedavisi hiperglisemi ve su tüketimini azaltmış, plazma insulinini ve beta hücre kitlesini arttırmıştır (181). Ancak DHEA'un adipoz dokudan resistin düzeylerini artırarak insulin direncini artırdığını söyleyen yayınlarda mevcuttur (222). Araştırmamızda immatür sıçanlar kullanmamız, hayvansal farklılıklar olması ve kısa süreli intraperitoneal uygulama nedeniyle DHEA'un kilo aldırıcı etkisi görüldüğü düşünmekteyiz.

DHEA Uygulaması Sonrası Oluşan Over Ağırlığı Değişiklikleri

Araştırmamızda tablo 4.2. de görüldüğü üzere; kontrol ve araştırma guruplarına ait sağ over, sol over, toplam over ve uterus ağırlıkları karşılaştırıldığında ; DHEA uygulanan gurup ile kontrol grubu arasında fark saptanılmamıştır.

Ward ve ark. (217) elli beş günlük erişkin sıçanlara yirmi gün süresince DHEA yı değişik dozlarda (1.5,3, 4.5, 6) uyguladıkları araştırmalarında over ağırlıklarını diestrusdaki kontrol hayvanlara göre artmış olarak bulmuşlardır. Ward ve ark. (296) bir başka araştırmada erişkin sıçanlara 3 ve 6 mg/100 g VA/gün dozlarında 3,7,11,15 gün süresince DHEA uyguladıkları araştırmalarında, diestrus kontrollere göre over ağırlığında 3 mg dozlarında on bir günde 6 mg dozlarında altıncı günde artış olduğunu bildirmişlerdir.

Valeria ve ark. (298,306) farelerde yirmi gün süresince 6mg/100 g VA da DHEA uygulamasıyla artan over volümü bildirmişlerdir. Yapılan bir başka araştırmada ise DHEA uygulaması over ağırlığında artışa neden olmuştur. Wang ve

ark. (222) sıçanlara yirmi gün süresince DHEA 6mg/kg/gün ip enjekte ettiklerinde over ağırlığında artış bildirmişlerdir.

Hipofizektomili sıçanlara DES uygulaması sonrasında östradiol uygulaması over ağırlığını artırdığı, testosteron uygulaması over ağırlığını azalttığı gösterilmiştir (291). Krishna ve ark. (289) otuz gün süresince intraperitoneal DHEA uyguladıklarında sol over ağırlıklarını kontrol grubuna göre daha az bulmuşlardır. Yazarlar. bu durumu immatür sıçan kullanmalarına ve DHEA tedavisi sonrasında LH düzeylerinin deprese olmasına bağlı ovulasyon gerçekleşmemesine bağlı olabileceğini bildirmişlerdir.

Üzümcü ve ark. (292) postnatal üç-on gün arasında Methoksiklor (MXC) uygulaması sonrasında over boyutu ve ağırlığının kontrol grubuna göre %35-85 arasında azalttığını bildirmişlerdir. Bu araştırmada. bu durum azalan antral folikül sayısına ve MXC nin hipotalamopituiter aksta negatif etkisi sonrasında azalan gonadotropin düzeylerine bağlamışlardır. Bu araştırmada araştırmamızdan farklı olarak erken neonatal sıçanlar kullanılmıştır. Bu sıçanlarda henüz hipotalomopituiter ovaryan aks olgunlaşmamıştır.

Camilla ve ark (294) Wistar sıçanlara postnatal üçüncü saatte 0.35 mg östradiol benzoat enjekte ettikleri zaman on üç-on altı hafta sonrasında deney guruplarında over ağırlığında azalma olduğunu bildirmişlerdir. Yazarlar bu durumu anovulasyon sonrasında azalan korpus luteum sayılarına ve artan antral folikül alanına bağlamışlardır.

Louise ve ark. (293) yirmi bir günlük Wistar sıçanlara 12 hafta Dihidrottesteron içeren pelletleri uygulayarak oluşturdukları modelde tek over ağırlığında ve over yüzey alanında azalma bildirmişlerdir. Manneras ve ark. bu durumu azalan korpus luteum sayılarına ve artan atretik antral folikül sayılarına bağlamışlardır.

Yan ve ark. (295) anne sütüyle beslenen Sprague Dawley sıçanlara postnatal 5-10 arası soya (fitoöstrojen içerir) içeren diyet uyguladıklarında over ağırlığını kontrol grubuna göre artmış olarak bildirmişlerdir. Yan ve ark. bu araştırmayı neonatal sıçanlarda yapmışlardır. Over ağırlık artışını artan preantral folikül büyüklüğüne bağlamışlardır.

Korpus luteum sayılarında azalma, dejenere ve kistik folikülerin varlığı nedeniyle over ağırlığında azalma olması beklenen bir bulgu olabilir. Araştırmamızda, over ağırlığında değişme olmamasını on beş gün sürede korpus luteum ve kist sayılarında değişiklik olmamasına ve kistik folikülerin over ağırlığında fazla bir etkisi olmamasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

DHEA Uygulaması Sonrası Oluşan Uterus Ağırlığı Değişiklikleri

Araştırmamızda tablo 4.2 ve tablo 4.3. de görüldüğü üzere; kontrol ve araştırma guruplarına ait sağ over, sol over, toplam over ve uterus ağırlıkları ve normalleştirilmiş organ ağırlıkları karşılaştırıldığında; DHEA uygulanan gurup ile kontrol grubu arasında fark saptanılmamıştır.

Berger ve ark. (209) ooferektomi uygulanan sıçanlarda intravajinal DHEA uygulanması ile uterus ağırlığında herhangi bir farklılık saptamamışlardır. Hipkin ve ark. (297) hipofizektomili sıçanlarda DHEA uygulamasıyla uterus ağırlığında değişiklik olmadığını bildirmişlerdir. Bu araştırma DHEA un indirek etkiyle hipofiz üzerinden östrojen sentezini artırdığını göstermiştir.

Ward ve ark. (217) elli beş günlük erişkin sıçanlara yirmi gün süresince DHEA yı değişik dozlarda (1.5,3, 4.5, 6) uygulamış uterus ağırlıklarını diestrusdaki kontrol hayvanlara göre artmış olarak bulmuşlardır. Ward ve ark. (296) bir başka araştırmada erişkin sıçanlara 3 ve 6 mg/100 g VA/gün dozlarında üç,yedi,on bir,on beş gün süresince DHEA uyguladıkları araştırmalarında, diestrus kontrollere göre uterus ağırlığı her iki dozda benzer şekilde üçüncü günde kontrol guruplarından fazla olarak bildirmişlerdir. Yazarlar bu araştırmalarında kastre edilmiş sıçanlarda DHEA uygulaması ile uterus ağırlığında artış bildirmişlerdir.

Nephew ve ark. (235) yirmi sekiz gün süresince, oral 2 gr/gün DHEA uyguladıkları gurupta uterus ağırlığında artış olduğunu bildirmişlerdir. Bu guruptaki artış östradiol uygulanan gruba göre daha fazla bulunmuştur. Bu araştırmada uterus epiteline kalınlaşma ve disorganizasyonla beraber apoptoz oluşmuş hücrelerin çevrelediği atretik bezlerde artış bildirilmiştir. Diyetten DHEA kaldırıldığında bu uterotrofik etki kaybolmuştur. Daha düşük DHEA dozlarında herhangi bir uterin etki gözlenmemiştir. Dolayısıyla bu etki doz bağımlı olarak ortaya çıkmıştır.

Üzümcü ve ark. (292) postnatal 3-10 gün arasında Methoksiklor (MXC) uygulaması sonrasında uterus ağırlığının kontrol grubuna göre arttığını bildirmiştir. Yazarlar bu etkiyi MXC nin östrojenik etkisine bağlamışlardır.

DHEA prehormon olarak etkilerinin yanında direk etkiyle ovaryan steroidleri artırarak etki gösterebilmektedir. DHEA direk ovaryan steroidogenezi artırarak veya indirek olarak hipofizden gonadotropin sekresyonu artışı ile ovaryan östradiol sekresyonunu artırmaktadır. Ayrıca DHEA steroid bir hormon olup doku spesifik şekilde östrojenik ve androjenik etkilere sahiptir (241,297). Bu etkilerin uterus üzerine trofik etki yapması beklenebilir. Ancak DHEA overlerde ve uterusu, proinlammatuvar ve vazokonstriktör etkiyede sahip PGF2 alfa konsantrasyonlarında artırmaktadır. DHEA fas/fas l/kaspaz 8 (ölüm reseptör bağlantılı yolak) yolağı foliküler atrezide önemlidir. Artmış MT-1 MMP doku yenilenmesinde ve yapısal luteolizde önemli rol oynamaktadır (225). Buna ek olarak uterusu artan oksidatif stres ve inflammatuvar hücre ve T lenfosit subpopulasyonu değişiklikleri sonrasında uterusu zararlı etkilere neden olmakta, uterusu epitelinde disorganizasyon ve kistik kaviteler oluşmasına neden olmaktadır (232, 236). Bu etkilerde uterusu atrofik etkiyle sonuçlanması beklenebilir. Araştırmamızda uterus ağırlığının değişmediğini gözlemlemiş olmamızın nedeni bu sıçanların immatür olmaları ve sikluslarının henüz düzene girmemiş olması, kısa süreli DHEA uygulamasına bağlı olarak hormonal etkinin tam olarak ortaya çıkmaması olabileceğini düşünmekteyiz..

DHEA Uygulaması Sonrası Overlerde Oluşan Morfolojik Değişiklikler

Primordial ve Primer Folikül Sayıları

Araştırmamızda, tablo 4.4. ve 4.5.de görüldüğü üzere; sıçanlar normal ve atretik primordial ve primer folikül sayıları karşılaştırıldığında, DHEA uygulanan grupta, toplam primordial ve normal primordial folikül ve atretik primordial folikül sayılarını ve toplam primer ve normal primer folikül sayıları kontrol grubuna göre daha az sayılmıştır. Atretik primer folikül sayıları benzer olarak sayılmıştır.

Honnma ve ark. (225) sıçanlara yedi gün DHEA 6 mg/100g VA ip uyguladıkları gruplarda total folikül sayısının arttığını, on beş gün DHEA uygulanan gruplarda ise total folikül sayısının kontrol gruplarıyla benzer olarak bildirmişlerdir. Bu araştırmada on beş gün DHEA uygulanan gruplarda ve kontrol

guruplarında folikül sayısı yedi gün DHEA guruplarından daha az olarak bildirilmiştir. Ancak Honman ve ark. araştırmamızın aksine tek ovaryan kesitten ölçüm yapmışlardır. Yazarlar sıçanlara 7 gün süresince DHEA 6 mg/100g vücut ağırlığı uyguladıkları gurupta total folikül sayısı anlamlı şekilde arttığını bildirmişlerdir.

Vendola ve ark. (298) üç-on gün süresince aromatize edilemeyen bir androjen olan dihidrotestosteron enjekte ettikleri maymunlarda primer folikül sayılarında üçüncü günde %50, beşinci günde %75, onuncu günde %130 oranlarında artış bildirmişlerdir. Ancak bu araştırmada folikül sayımı sadece en büyük ovaryan kesitten yapılmıştır .

Yang ve ark. (299) inek fetüslerinden elde ettikleri over kortikal hücre kültüründe testosteron ve östrojen eklenmesi sağlıklı primordial, primer sayısını kontrol grublarıyla benzer olduğunu bildirmişlerdir. Testosteron eklenmesi sekonder folikül sayısında ise üç kat artış yaparken östrojen eklenmesi herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. Dolayısıyla sekonder folikül sayılarındaki artış testosteronun kendi etkisidir. Yazarlar testosteronun primer folikül sekonder folikül geçişini, hızlandırdığını bildirmiştir. Bu araştırmaların aksine insan hücre kültürüne testosteron eklenmesi sekonder döneme geçen folikül sayısında değişikliğe neden olmamıştır.

Chen ve ark. (336) DHEA nın androjen ve östrojen reseptörleri üzerine yaptığı etkiyi inceledikleri araştırmalarında DHEA nın prehormon etkisine ek olarak östrojen ile eşit oranda ER beta transkripsiyonunu aktive ettiği ve östrojen reseptör beta nın direk aktivasyonuna neden olduğunu belirlemişlerdir. Hücre kültür ortamında DHEA uygulanmasının IGF-1 aktivitesini ve östrojen miktarlarını artırdığı gözlenmiştir. (227) Neonatal dönemde östrojen tedavisinin folikülogenezi inhibe ettiği (303), in vitro ortamda östradiol uygulamasının primordial ve primer geçişini inhibe ettiği (301) gösterilmiştir. Yapılan bir başka araştırmada DHEA nın aromataz düzeylerini artırdığı ve sonrasında COX 2, AR ve ER beta ekspresyonunu artırdığı gözlenmiştir.(228) Ayrıca DHEA nun overlerde inflamasyonu artırdığı ve oksidatif stres yarattığı belirlenmiştir. (224, 234). Araştırma bulgularımız değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre küçük folikül sayılarının azalmış olduğu görüldü.

Araştırmalarla uyumlu şekilde DHEA'nın inmatür sıçanlarda östrojenik aktiviteyi artırarak folikülogenezi geçici süre durdurduğunu düşünmekteyiz.

Primordial ve Primer Atretik/Normal Folikül Yüzdeleri

Araştırmamızda, tablo 4.5. de görüldüğü üzere; sıçanlar normal ve atretik primordial ve primer folikül yüzdeleri karşılaştırdığında, DHEA uygulanan sıçanlarda atretik primordiyal ve primer foliküllerin yüzdesi kontrol grubu ile benzer olarak saptanmıştır. Bu dönemde primordial foliküllerin %8,13 ü atretik foliküldür.

Honnma ve ark. (225) 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. (311) 6 mg/100g VA DHEA uyguladıkları sıçanlarda kontrol grubuna göre artmış sayıda atretik folikül olduğunu bildirmiştir. Bu araştırmada uygulamanın ne kadar süreyle yapıldığı bildirilmemiştir.

Luschetti ve ark. (224) DHEA uygulanan sıçanlarda over korteksinde atretik folikül sayılarında artış bildirmişlerdir. Lee ve ark. (220) DHEA uyguladıkları sıçanlarda atretik folikül sayılarında artış bildirmişlerdir Ancak bu araştırmalarda sayısal değerler yerine histolojik preparatlar gösterilmiştir.

Araştırmamızda DHEA uygulanan overlerde kontrol grubu overlere göre atrezi oranlarında artış yoktu. Dolayısıyla bu süre ve dozda Dehidroepiandrosteron uygulmasının primordial ve primer foliküllerde toksik etki yapmadığı düşünmekteyiz.

Sekonder Ve Antral Folikül Sayıları

Araştırmamızda, tablo 4.6. da görüldüğü üzere; kontrol ve araştırma guruplarına ait sekonder folikül sayısı ve antral folikül sayısı karşılaştırıldığında; DHEA uygulanan gurupta sekonder ve antral folikül sayısını kontrol grubuna göre daha az sayılmıştır.

Kaynaklarda DHEA uygulaması sonrasında sekonder ve antral folikül sayımının yapıldığı az sayıda araştırma bulunmaktadır. Krishna ve ark. (289) 6 mg/100g VA DHEA uyguladıkları sıçanlarda total intak antral folikül sayılarını kontrol grubuna göre daha az bulmuşlardır. Regrese antral folikül sayılarında fark bulmamışlardır.

İkeda ve ark.(301) doğum sonrası 1 ve 5 günler arasında sentetik östrojen olan E2 benzoat (EB) 10 µg/0.02 ml ile tedavi edilen sıçanlarda. postnatal 6 günde kontrol sıçanlara göre EB ile tedavi edilen grupta anlamlı derecede daha az katlı foliküllerin oluştuğunu ve sekonder folikül sayısında azalma olduğunu bildirmişlerdir. İkeda ve ark. bu durumu artan AMH konsantrasyonuna bağlamışlardır.

Boergest ve ark. (300) 20 gün süresince 32mg/gün MXC uygulaması ile antral folikül sayısında azalma saptamışlardır. Üzümcü ve ark. (302) postnatal üç-on gün arasında MXC uygulaması sonrasında primordial, primer ve sekonder folikül ve transisyonel folikül sayıları ve total folikül sayısı kontrol grubu değişiklik olmadığını ancak preantral folikül sayısında artış olduğunu antral folikül sayısında kontrol grubuna göre azalma olduğunu bildirmişlerdir. Üzümcü ve ark. bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak folikül sayımını en büyük over kesitten yapmışlardır.

Başka bir çalışmada neonatal östrojen uygulaması folikülogenezi inhibe ettiği ve orta ve büyük antral folikül sayılarında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (303). Dolayısıyla östrojen primordial primer folikül geçişini inhibe edebileceği gibi büyüyen foliküllerdede inhibitör etkiye sahip olabilir (292,304).

Camilla ve ark. (294) Wistar sıçanlara postnatal 3 saatte 0.35 mg östradiol benzoat enjekte ettikleri zaman 13-16 hafta sonrasında atretik antral folikül sayısında artış olduğunu, sağlıklı ve total antral folikül sayılarında değişiklik olmadığını bildirmişleridir. Yazarlar bu çalışmada en büyük over kesitinde sayım yapmışlardır. Bu durumun östradiolün ovulasyonu engellemesi sonucunda ovule olmayan foliküllerin atreziye uğradığının bir göstergesi kabul edilebilir.

Louise ve ark. (293) yirmi bir günlük sıçanlara 12 hafta Dihidrotestosteron içeren pelletleri uygulayarak oluşturdukları modelde antral folikül sayılarında değişiklik olmadığını ancak atretik antral folikül sayılarında artış olduğunu bildirmişlerdir.

Vendola ve ark. (305) Rhesus maymunlara 3-10 gün arası testosteron içeren pellet uyguladıklarında, overin en büyük kesitinde makroskopik olarak bakıldığında primer folikül, erken antral folikül ve total folikül sayısında artış bildirmişlerdir. Vendola ve ark ları bu çalışmalarında testosteronun gonadotropin bağımsız folikül büyümesini artırdığı için folikül sayılarında artışa neden olabileceğini bildirmişlerdir.

Ancak Vendola ve ark bu araştırmayı maymunlarda yapmış ve tek ovaryan kesit üzerinden değerlendirmişlerdir.

Vendola ve ark. (306) yaptıkları başka bir araştırmada 6-13 yaş arası maymunlara testosteron uygulaması sonrasında bir mm çapa kadar küçük folikül guruplarında sayıca artış bildirmişlerdir. Testosteron uygulanmış overlerde küçük antral folikül sayılarında artış olurken büyük antral folikül sayılarında değişiklik olmamıştır.

Araştırmamızda DHEA uygulaması sonrasında primer, sekonder ve antral folikül sayılarında azalma olması östrojenik etkiyi taklit ettiğini düşünmekteyiz.

Korpus Luteum Sayıları

Araştırmamızda tablo 4.6. de görüldüğü üzere; kontrol ve araştırma guruplarına ait korpus luteum sayıları karşılaştırıldığında, DHEA uygulanan guruplarda korpus luteum sayıları kontrol grubu arasında fark yoktur. Ancak .DHEA uygulanan guruplarda korpus luteum sayıları kontrol gurubuna göre daha azdır.

Lee ve ark. (220). immatür sıçanlara 6 mg/100g VA DHEA uygulaması sonrasında onuncu günde %60, on beşinci günde %52, yirminci günde %55 overde korpus luteum kalmadığını bildirmişlerdir. Krishna ve ark. (289) 6 mg/100g VA DHEA uyguladıkları sıçanlarda korpus luteum sayılarını kontrol grubuna göre azalmış olarak bulmuşlardır. Ancak yazarlar. bizim araştırmamızdan farklı olarak overlerde tek kesitteki sayıyı değerlendirmişlerdir.

Knudsen ve ark. (281, 282) DHEA uygulanan immatür sıçanlarda overlerde kistik değişiklikler, erken ovulasyon, asiklisite ve sonrasında anovulasyon ve sonucunda korpus luteum sayılarında azalma bildirmişlerdir. .Honnma ve ark. (225) sıçanlara yedi gün süresince DHEA 6 mg/100g vücut ağırlığı uyguladıkları gurupta korpus luteum olmadığını bildirmişlerdir. Bu durumu DHEA nun ovulasyonu engellemesine bağlamışlardır.

Shirwalkar ve ark. (307) matür sıçanlara 2 mg östradiol valerat enjekte ettikten 3 hafta sonrasında hiperplastik lutein hücelere sahip korpus luteum sayılarında azalma bildirmişlerdir. Yazarlar bu durumu azalan LH sekresyonu sonrasında ovulasyon olmaması sonrası oluştuğunu öne sürmüşlerdir. Camilla ve ark. (294) Wistar sıçanlara postnatal 3 saatte 0.35 mg östradiol benzoat enjekte ettikleri zaman 13-16 hafta sonrasında deney guruplarında korpus luteum oluşmadığını

bildirmişlerdir. Korpus luteum sayılarında azalma olması anovulasyonun göstergesi olarak kabul edilmiştir. Yazarlar bu durumu TGF β 1 ekspresyonunda azalma sonucunda meydana gelmiş olabileceğini bildirmişlerdir.

Manneras ve ark. (293) yirmi bir günlük sıçanlara 12 hafta Dihidrotestosteron içeren pelletleri uygulayarak oluşturdukları modelde korpus luteum kalmadığını bildirmişlerdir. Yazarlar bu durumu atretik antral folikül sayılarında artış sonucunda geliştiğini bildirmişlerdir. Ayrıca yapılan araştırmalarda DHEA korpus luteumda luteolitik süreci hızlandırdığı bildirilmiştir (232, 236).

Bulgularımız korpus luteum sayılarında azalma olmadığını göstermektedir. Bu süre veya doz DHEA uygulamanın ovulasyonu engellemediğini düşünmekteyiz.

DHEA Uygulaması ve Overlerde Apoptoz

İnmatür Wistar albino sıçanlarda doğumlarında primordial foliküllerin olmadığı, yaşamlarının üçüncü gününde primordial ve primer foliküller oluştuğu gösterilmiştir. Yaşamlarının beşinci gününde sekonder foliküller, onuncu günde antral foliküller oluştuğu ve yaşamlarının ilk günü kadar erken bir dönemde granüloza hücrelerde apoptozun başladığının işareti olan TUNEL pozitif hücreler gösterilmiştir. Fas pozitif hücreler 0-3 gün arası granüloza hücrelerde gösterilmiştir (308). Folikülogenez esnasında oositler ve granüloza hücreler Fas Fas Ligand sisteminin de rol aldığı apoptoz mekanizmalarıyla yok olmuşlardır (309). Bilindiği gibi birçok folikülde atrezi preantral folikülden antral folikül dönemine geçerken oluşmaktadır. Atretik foliküllerde granüloza hücrelerinde apoptoz oluştuğunun işareti olan internukleozomal DNA kırıklarında artış gösterilmiştir (310).

Overlerde gözlenen atrezide steroid hormonlar önemli rol oynamaktadır. Hipofizektomili sıçanlarda DES uygulanmasını takiben östradiol uygulanması granüloza hücrelerde apoptozu azaltırken, testosteron preantral ve erken antral foliküllerde granüloza hücrelerde apoptozu artırdığı, teka ve interstisyel hücrelerde apoptozu etki etmediği belirlenmiştir. Progesteron ve glukokortikoidlerin overlerde apoptoz üzerine etkisi olmamıştır (291).

Araştırmamızda DHEA uygulamasının overlerde apoptoz üzerine etkilerini belirlemeyi amaçladık. Bu nedenle sıçanlarda puberte başlangıcı olarak kabul edilen yirmi sekizinci günden itibaren DHEA uygulamalarımızı yaptık.

Araştırmamızda DHEA uygulanan guruplarda TUNEL ve kaspaz 3 boyası ile overlerde apoptoz değerlendirmesi yapıldı. TUNEL metodu apoptozdaki DNA kırıklarını gösterirken kaspaz 3 apoptoz sürecinin geri dönüşümsüz olan son basamağını gösterir. Araştırmamızda, tablo 4.10 de görüldüğü üzere, kontrol ve araştırma grubuna ait TUNEL pozitif hücreler karşılaştırıldığında; DHEA guruplarında tüm foliküllerde kontrol grubuyla benzer sayıda TUNEL (+) hücre sayısı görüldü.

Araştırmamızda DHEA uygulanan sıçanlarda primordial, primer, antral folikül granuloza ve teka hücrelerinde kaspaz 3 boyanma yoğunluğu kontrol grubuyla benzer sayıda bulundu. Ancak şekil 4.11.de görüldüğü üzere sekonder foliküllerde granuloza hücrelerde ve şekil 4.15.de görüldüğü gibi interstisyel hücrelerde kaspaz 3 boyanma yoğunluğu kontrol grubuna göre artmış olarak görüldü.

Honnma ve ark. (225) DHEA uygulanan sıçanlarda preantral ve antral foliküllerde TUNEL pozitif folikül sayısını artırmış olarak bulmuşlardır.

Billig ve ark.(291) hipofizektomi uygulayıp DES uyguladıkları sıçanlarda apoptoz işareti olan DNA kırıklarında artış bildirmişlerdir. Histolojik kesitlerde DNA yıkımının preantral ve erken antral foliküllerin granuloza hücrelerine kısıtlı olduğunu bildirmişlerdir Östrojen benzoat tedavisi zaman bağımlı şekilde DNA kırıklarını önlemiştir. Over ağırlık kaybını önlemiştir. Ancak DES uygulanmış hayvanlarda testosteron uygulaması preantral ve antral foliküllerin granuloza hücrelerinde DNA kırıklarını artırmıştır. Dolayısıyla DES uygulanmış hayvanlara androjen uygulaması preantral ve antral foliküllerde apoptozu artırmıştır. DES uygulanması medikal hipofizektomi etkisi yapmakta ve gonadotropin etkisini ortadan kaldırmaktadır. Bu overlerde büyük foliküllerde androjenler apoptoza neden olmaktadır.

Kim HH ve ark. (223) farelere 15 gün süresince DHEA uyguladıklarında foliküllerde apoptoz işaretleri gözlemişlerdir. Honnma ve ark. (225) immatür sıçanlara yedi gün ve on beş gün DHEA 6 mg/100gVA uyguladıklarında TUNEL pozitif folikül sayılarında artış bildirmişlerdir. Atretik foliküllerde granuloza hücrelerde dağınık şekilde TUNEL boyanması bildirmiştir. TUNEL pozitif granuloza hücreler atretik antral ve preantral foliküllerde granuloza hücrelerde FasL ve MT-1-MMP ye karşı daha şiddetli immun boyanma göstermişlerdir. Yazarlar bu

araştırmalarında DHEA uygulanan sıçanların overlerinde prokaspaz 8 düzeylerinde düşme, kaspaz 8 düzeylerinde artış bildirmişlerdir. Araştırmacılar DHEA un ölüm reseptör aracılı yolakta aktivasyona (kaspaz 8) neden olduğunu ve MT-1 in ve Fas L in yapısal luteolizde rol aldığını öne sürmüşlerdir.

Nephew ve ark. **(235)** DHEA uygulamasının endometriumda apoptozu artırdığını göstermişlerdir Shuo-Yen ve ark. **(192)** GT1-7 hipotalamik nöronlarda DHEA nun direk olarak kaspaz 3 aktivitesinde artışa neden olduğunu ve sonrasında bu nöronlarda apoptoza neden olduğunu göstermişlerdir.

Ancak yapılan bazı araştırmalarda DHEA nın apoptozu önlediği gösterilmiştir. Yapanoğlu ve ark. **(205)** sıçan testiküler torsiyon/detorsiyon yaptıklarında TUNEL pozitif spermatogonia ve spermotosit sayısında artış olduğunu, bu guruplara Dehidroepiandrosteron uyguladıklarında ise TUNEL pozitif spermatogonya ve spermotosit sayısında azalma bildirmişlerdir.

Ling Wang ve ark. **(312)** DHEA un osteoblastlarda proliferasyonu artırdığını ve AR ve ER bağımsız mekanizmayla MAPK sinyal yolağıyla direk olarak apoptozu inhibe ettiğini göstermişlerdir. Leskiewicz ve ark. **(313)** Dehidroepiandrosterone hipokampal ve kortikal nöronlarda iskemi ve ekzitotoksik stimulusun neden olduğu nöron hasarını önlediği göstermişlerdir. Bu araştırmacılar, DHEA un apoptozu önleyici etkisini MAPK sinyal yolağıyla direk olarak apoptozu inhibe ettiğini göstermişlerdir. DHEA sempatoadrenal medulla hücrelerinde apoptozu önleyici etki göstermektedir. DHEA apoptozu önleyici etkisini ER nden bağımsız olarak bcl 2 ve Bcl-Xl aktivitesini artırarak bu etkisini göstermiştir **(314)**. Dongmin ve ark. **(315)** aortik vasküler hücrelerde apoptozu kaspaz 3 aktivitesini azaltarak ve bcl-2 yi artırarak önlediğini göstermişlerdir.

Takahashi ve ark. **(197)** yaptıkları araştırmada insan periferel lenfoid hücrelerde DHEA un AR ve ER üzerine direk etkilerinden bağımsız olarak apoptozu engellediğini göstermişlerdir. Topikal DHEA uygulaması sonrasında deri yaşlanma sürecinin önlendiği gösterilmiştir **(316)**. Yakın tarihli bir araştırmada insan immortal, non kanser keratinosit hücrelerde DHEA direk olarak membranlarda bulunan bağlanma noktalarına bağlanarak apoptozu önleyici bcl-2 ailesinde değişikliklere neden olarak apoptozu önlediğini göstermişlerdir **(317)**.

Shirwalkar ve ark. (307) tek doz östradiol valerat uygulanan erişkin sıçanlarda 1 hafta sonrasında sekonder ve antral foliküllerde kontrol grubuna göre daha fazla granüloza hücrede TUNEL pozitif hücre artışı bildirmiştir. Zaman geçtikçe sekonder ve antral foliküllerde TUNEL pozitif hücre sayısı artmış ve primer foliküllerde TUNEL pozitif hücre sayısında artış olmuştur. İlk iki haftada öncelikle granuloza hücrelerde apoptoz gözlenirken, dört hafta sonunda teka hücrelerdede apoptoz gözlendiğini bildirmişlerdir. Yazarlar dört haftada apoptozun artmasını hormonal çevrenin androjenik çevreye doğru kaymasına bağlamışlardır. Bu araştırmanın sonucu yüksek doz östrojen içeren oral kontraseptif ajanların foliküler atreziyi indüklemesi açısından da önemlidir.

DHEA immunoprotektif, vaskuloprotektif etkiye sahiptir. Yapılan araştırmalarda DHEA bazı dokularda apoptoza neden olurken bazı dokularda ise apoptozdan koruyucu etki göstermektedir. Dolayısıyla DHEA etkisi doku spesifik olarak ortaya çıkmaktadır. DHEA bazı dokularda östrojen ve androjenlere çevrilerek etki göstermekle beraber bazı dokularda ise direk etkiyle apoptozu önleyici etki göstermektedir.

Araştırmamız TUNEL ve kaspaz immun boya bulguları değerlendirildiğinde on beş gün DHEA uygulamasının sadece sekonder foliküllerde granüloza hücrelerde ve intrerstiyel hücrelerde kaspaz 3 boyanma yoğunluğunun artışına bağlı olarak bu foliküllerde apoptozun arttığını düşünmekteyiz. Ayrıca DHEA, foliküllerin apoptoza en yatkın oldukları sekonder ve antral folikül döneminde apoptoz mekanizmaları harekete geçirmiş olabilir. Bu durum PCO da gözlenen durumun benzeridir.

DHEA Uygulaması Sonrası Işık Mikroskop Bulguları ve Overlerde Folikül Kist Yüzdesi

Araştırmamızda ışık mikroskopu bulguları değerlendirildiğinde; DHEA uygulanan guruplarda, over korteksinde dağılmış folikül kistlerinin sayısında artış gözlandı. Over medullasında kortekse göre daha büyük kan damarları ve lif yapıları görüldü. Medullada bulunan stromal hücrelerde herhangi bir dejenerasyon gözlenmedi. On beş günlük gurupta primordiyal ve primer foliküler normal yapıdaydı ancak sekonder ve antral foliküllerin granüloza hücrelerinde apoptoz gözlandı. Ayrıca teka tabakasında ise kalınlaşmalar vardı. Araştırmamızda DHEA uygulanan guruplarda overlerde folikül kist yüzdesinde artış saptanmıştır.

Yapılan araştırmalarda, dzenli siklusları olan erişkin sıçanlara DHEA uygulanması sonrasında overlerde kistik değişiklikler gözlenmiştir **(217)**. Honnma ve ark. **(225)** yirmi iki gnlük Spraque Dawley sıçanlara yedi ya da on beş gün süresince 6 mg/100g VA/gün DHEA uyguladıkları araştırmalarında, overlerde folikül kistinde artış olduğunu göstermişlerdir. Yan ve ark. **(227)** yirmi gün DHEA uygulanan sıçanlarda kist sayılarında artış bildirmişlerdir.

Lee ve ark.**(220)** sıçanlara 6 mg/kg/gün DHEA on gün uyguladıkları sıçanların %80, on beş gün uygulandığında %92, yirmi gün uygulandığında %98 inde kist geliştiğini bildirmişlerdir. Luchetti ve ark. **(224)** yirmi gün süresince BALB/C farelere intraperitoneal DHEA uyguladıkları araştırmalarında, DHEA uygulanan grupta vasküler yapılardan yoksun ince teka katmanı ve sıkışmış granuloza hücrelerden oluşan kistler oluştuğunu bildirmişlerdir.

Ward ve ark. **(296)** dzenli siklusları olan elli beş gnlük erişkin sıçanlara estrus sikluslarının birinci günü itibariyle yirmi gün süresince 1,5- 6 mg/100g VA/gün dozları arasında (1.5, 3, 4.5, 6 mg/100g va/gün) DHEA uygulamıştır. DHEA uygulanan gruplarda tüm dozlarda overlerde kistik ve atretik foliküllerde artış bildirmişlerdir. Bu dönemde kontrol overlerde folikül kisti olmadığını bildirmiştir. Aynı yazarlar **(296)** erişkin sıçanlara siklus gününün farklı günlerinde başlayacak şekilde 6 mg//kg/100gVA DHEA yı on gün uyguladıklarında, overlerde kist sayılarında artış bildirmişlerdir.

Misugi ve ark. **(311)** immatür sıçanlara 6 mg/100g VA DHEA uygulaması sonrasında overlerde büyük foliküler kistler oluştuğunu bildirmişlerdir. Honnma ve ark. **(225)** sıçanlara yedi ve on beş gün süresince DHEA 6 mg/100g vücut ağırlığı uyguladıkları araştırmalarında morfolojik olarak sıçanların overleri polikistik görünümdedir.

Shirwalkar ve ark. **(307)** matür sıçanlara 2 mg Östradiol valerat enjekte ettikten iki hafta sonrasında büyük antral kavite, ince granuloza katı ve hiperplastik teka katına sahip kistik foliküllerin oluştuğunu bildirmişlerdir. Yazarlar suprafizyolojik dozlarda uygulanan östradiol valerat'ın hormonal çevre üzerindeki etkilerine bağlamışlardır.

Araştırmamızda diğer araştırmalardan farklı şekilde folikül kist sayımını çok sayıda kesitte yaptık. Bu nedenle diğer araştırmaların aksine folikül sayılarında artış

gözlemlememiş olabiliriz. Ancak DHEA uyguladığımız sıçan overlerinde artmış folikül yüzdesi nedeniyle DHEA un kistik bir süreci harekete geçirmiş olabileceğini düşünmekteyiz. Bu nedenle DHEA uzun dönemde polikistik overlere neden olabilir. Ayrıca hayvanlar arası farklılıklarda polikistik over görünümüne neden olmamış olabilir. Dolayısıyla DHEA un overlere etkisinin daha uzun süreli uygulamalarda değerlendirilmesi gereklidir.

DHEA Uygulaması Sonrası Folikül Çap Değişiklikleri

Araştırmamızda, tablo 4.8. ve 4.9. da görüldüğü üzere, primordial, primer, sekonder, antral folikül ve korpus luteum çapları karşılaştırıldığında, DHEA grubu ile kontrol grubu arasında fark saptanmamıştır.

İmmatür Wistar albino sıçanlarda yapılan araştırmada granuloza hücre katmanında apoptoz arttıkça folikül çapı azaldığı gösterilmiştir (308).

Anderson ve ark. (319) in vitro ortamda DHEA eklenmesinin granuloza hücre proliferasyonunu ve differansiasyonunu artırdığını bildirmişlerdir. Kim ve ark. (223) farelerde yaptıkları araştırmada DHEA uygulaması sonrasında folikül çaplarında artış bildirmişlerdir.

Wang ve ark. (241) on bir günlük BDF-1 farelerden elde ettikleri tip 4 foliküllerde (intak bazal lamina etrafında iki katlı sıralanmış granuloza hücre ve teka katı) androjen reseptör aracılığıyla folikül çapını artırdığını bildirmişlerdir. DHEA bu foliküllerde granuloza hücre proliferasyonunu artırmıştır. Ayrıca bu foliküllerin FSH duyarlılığını artırmıştır. Aynı yazarlar kültür ortamına DHEA, DHEAS, Testosteron (T), Dihidrotestosteron(DHT), Androstenedion(AS) eklenmesinin folikül çaplarını artırdığını sayısal değerlerle göstermişlerdir. Östron ve östradiol eklenmesi folikül çapı üzerine etkisi olmamıştır. Dolayısıyla bu etki androjenlere spesifik bir etki olarak gerçekleşmiştir. Bu araştırmada tek başına FSH uygulandığında folikül çapında bir değişiklik olmamıştır. Androjenler ve FSH kombine edildiğinde doz bağımlı şekilde folikül çapında artış gösterilmiştir. Bu araştırmada kullanılan fareler on bir günlük immatür fareler olup bu farelerin folikülleri FSH ya cevap verememektedir. Dolayısıyla androjenlerin folikül çapların üzerine olan artırıcı etkisini araştırmak için iyi bir modeldir. Androjenler fare overlerinde primat

overlerine benzer şekilde granuloza hücre proliferasyonunu artırarak folikül çaplarını artırmıştır.

Vendola ve ark. (305) testosteron maymunlarda teka kalınlığı ve teka hücre proliferasyonunu arttırmış ve granuloza hücrelerde proliferasyonu artırdığını bildirmişlerdir. Yang ve ark. (299) inek fetüslerinden elde ettikleri over kortikal kesitlerinde testosteron ve östrojen eklenmesi primordial, primer, sekonder ve antral folikül ve oosit çaplarını kontrol grubuyla benzer değerlerde sayısal olarak bildirmişlerdir. Stubbs ve ark. (318) anovulatuvar PCO lu hastalarda primordial, primer ve antral foliküllerde granuloza hücrelerde proliferasyonun arttığını bildirmişlerdir. Primordial folikül primer folikül geçişinin kolaylaştığını bildirmişlerdir.

Liu ve ark. (295) dişi Sprague Dawleyleri postnatal beş-on gün arasında soya ile beslediklerinde düşük düzeyde soya ile beslendiklerinde kontrol grubuyla benzer sayıda ve boyutta preantral foliküller oluştuğunu, yüksek dozda soya ile beslendiklerinde folikül çaplarının arttığını bildirmişlerdir. Shirwalkar ve ark. (307) matür sıçanlara 2 mg Östradiol valerat enjekte ettikten iki hafta sonrasında antral ve preovulatuvar foliküllerde teka interna katlarında kontrol grubuna göre hipertrofi ve korpus luteum çaplarında artış bildirmişlerdir. Yazarlar bu durumu östrojenik hormonal çevreye bağlamışlardır.

Louise ve ark. (293) yirmi bir günlük sıçanlara on iki hafta Dihidrotestosteron içeren pelletleri uygulayarak oluşturdukları modelde antral folikül teka interna çaplarında azalma bildirmişlerdir. Yazarlar araştırmamızdan farklı olarak en büyük antral folikül teka katını ölçerek bildirmişlerdir. Teka interna katındaki incelmeyi sempatik inervasyonda azalmaya bağlamışlardır. Teka katında incelme olması steroidogenezin azalacağıının indirek bir bulgusu olabilir.

Camilla ve ark. (294) Wistar sıçanlara postnatal üçüncü saatte 0.35 mg östradiol benzoat enjekte ettikleri zaman on üç-on altı hafta sonrasında deney grubunda antral foliküllerde teka interna çapları kontrol grubuna göre daha az bulmuşlardır.

On beş gün süresince DHEA uyguladığımız sıçan foliküllerinde folikül çapları, granuloza ve teka tabakası kalınlıkları benzerdir. DHEA uygulaması Kim ve ark. (223) farelerdeki araştırmalarının aksine folikül çapında azalmaya neden

olmamıştır. Bunun nedeni; araştırmamızda sıçan kullanmamız ve türler arasındaki folikülogenezde gözlenen farklar nedeniyle olabilir. On beş gün süre DHEA uygulaması DHEA un folikül büyümesine etkilerini ışık mikroskopu düzeyinde araştırmak için yeterli değişikliklerin oluşması için yeterli bir süre olmayabilir. Bu nedenle DHEA'un folikül proliferasyonu veya differensiasyonu üzerine etkilerini araştırmak için daha uzun süreli araştırmalara veya daha farklı immun boyalarla proliferatif hücre sayısının tesbitine ihtiyaç vardır. Ayrıca bu sürede folikül çaplarında değişiklik olmaması foliküllerin henüz sağlığını kaybetmemesinde in direk bir bulgusu olabilir.

DHEA Uygulaması ve Hormonal Değişiklikler

Ward ve ark. erişkin sıçanlara siklus gününün farklı günlerinde başlayacak şekilde 6 mg/kg/100gVA DHEA yı on gün uyguladıklarında , deney sonunda vajinal simirleri %84.2 oranında estrus siklusundaydı. Kontrol grubunda dört günlük siklusu olan sıçanlarda %25, beş günlük siklusu olan sıçanlarda 41.7% kontrolde %43.3 idi. Daha düşük DHEA uygulanan guruplarda estrus vajinal smear 58.3-92.5 % arasında değişmekteydi. **(296)**. Lee ve ark. **(220)** yaptıkları araştırmada Sprague Dawley sıçanlara 6 mg/100g VA /gün dozunda DHEA uyguladı. On günden fazla DHEA uygulanan guruplarda %44 ünde sürekli diestrus, %56 sında ise sürekli estrus siklusu oluştu.. Shirwalkar ve ark. **(307)** Altı-sekiz haftalık erişkin siklik sıçanlara tek doz 2 mg estrodiol valerat uygulamadan üç hafta sonra %90 hayvanda estrus siklisitesinin bozulduğunu bildirmiştir.

Araştırmamızda DHEA uygulaması on beş gün süresince 6mg/100g VA/gün olarak yapılmıştır. Kaynaklarda DHEA uygulaması sonrası üç gün gibi kısa bir sürede serum hormon değerlerini değiştirdiği ve PCO 'lu hastalardan elde edilen foliküllerde STAR ve 17 alfa hidroksilaz aktivite artışı nedeniyle östrojen sentezi artışı bildirilmiştir **(322)**.

Araştırmamızda, tablo 4.11. de görüldüğü üzere, kontrol ve araştırma gurupları serum FSH ve E2 düzeyleri karşılaştırıldığında; DHEA uygulanan guruplarda kontrol grubuna göre serum E2 düzeyleri artmış olmasına rağmen bu istatistiksel olarak anlamlı ölçülmemiştir. Serum FSH düzeyleri benzer değerlerde ölçülmüştür.

Ward ve ark. (296) erişkin sıçanlara yirmi gün süresince 1,5-6 mg/100g VA/gün dozlarında DHEA uygulanmasının sonrasında diestrus kontrollerine göre kan FSH, prolaktin (PRL) düzeyleri daha yüksek, LH düzeyleri kontrol grubuna göre daha düşük olarak bulmuşlardır. Yazarlar erişkin sıçanlarda on gün süresince 6mg/100g VA /gün DHEA uygulandığında kontrol diestrus guruplarına göre FSH ve PRL de yükseklik, LH da düşüklük saptamışlardır. On gün ya da yirmi gün süresince 6mg/100g VA/gün dozunda DHEA uygulanan guruplarda estrus simir görülme, gonadotropin ve PRL değişiklikleri benzer olarak bulunmuştur. Siklus gününden bağımsız DHEA uygulaması sonrasında FSH ve PRL düzeyleri daha yüksek ve LH düzeyleri daha düşük bulunmuştur. Yazarlar. bu araştırmanın başka bir kısmında erişkin sıçanlara 3 ve 6 mg/100 g VA/gün dozlarında üç,yedi,on bir,on beş gün süresince DHEA uyguladıklarında kan serum FSH, PRL de yükseklik ve LH da düşüklüğün (diestrus kontrollere göre) üçüncü gün itibariyle başladığını bildirmişlerdir. Ward ve ark. sıçanları kastre ettikten hemen sonra veya on beş gün sonrasında yirmi gün süreyle 3-6 mg/100 g/VA DHEA uyguladıkları araştırmalarında DHEA uygulanan guruplarda serum FSH, LH düzeyleri kastre edilmiş kontrol grubuna göre düşük diestrus kontrol guruplarına göre yüksek olarak bildirmişlerdir.

Luchetti ve ark. (224) Balb/c farelere yirmi gün süresince 6mg/100g VA /gün DHEA uygulanan östradiol ve progesteron düzeylerini kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Sander ve ark. (320) Balb c farelere yirmi gün süresince DHEA 6 mg/100 g VA/gün uyguladıklarında östradiol ve progesteron düzeylerini artmış olarak bildirmişlerdir.

Lee ve ark. (220) DHEA uygulanan sıçanlarda serum androjen, östrojen, luteinizan hormon ve prolaktin konsantrasyonlarında artış bildirmişlerdir. Kistik foliküllerin arttığı hayvanlarda serum östrojen ve androjen konsantrasyonları kist içeriği az olan sıçanlara göre daha fazla bulunmuştur. FSH konsantrasyonları kontrol gurupları ile benzer düzeylerdeyken serum LH konsantrasyonları ise korpus luteum sayısının artışı ile artış göstermişlerdir. Wang ve ark. (222) yirmi gün süresince 6 mg/100g VA DHEA uyguladıkları gurupta serum testosteron düzeylerini kontrol grubuna göre artmış olarak bildirmişlerdir.

Lee ve ark. (220) yirmi iki günlük immatür Spraque Dawley sıçanlara on gün süresince 6 mg/100g VA/gün DHEA enjeksiyonu sonrasında serum östradiol düzeylerinin arttığını ancak bu artışın istatistiksel anlam taşımadığını bildirmişlerdir. Sander ve ark. (238) postimplantasyon ve perimplantasyon dönemde DHEA enjekte ettikleri araştırmalarında serum östradiol düzeyi artış ve serum progesteron düzeylerinde azalma bildirmişlerdir. Dolayısıyla DHEA uygulaması gebe overlerindedeki steroidogenezi artırmaktadır.

Baltagy ve ark. (228) insan overlerinden oosit toplanması esnasında elde edilen folikülleri 20 ng/ml DHEA içeren ortamda kültür yaptıklarında kültür ortamında östron ve östradiol konsantrasyonlarında artış bildirmişlerdir.

Shirwalkar ve ark. (307) zaman bağımlı şekilde pituiter düzeyde LH sekresyonunu baskıladığını, ilk iki hafta FSH düzeylerini düşürdüğünü ancak sonraki iki haftada kontrol düzeylerine getirdiğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmada serum E2, progesteron ve Androstenedion düzeylerinde ilk iki haftada yükselme saptarken dördüncü haftada kontrol düzeylerinin altına geldiğini bildirilmiştir. Yazarlar bu hormonal çevreyi steroidojenik enzim aktivitelerindeki değişikliklere bağlamışlardır.

İnsanlarda yapılan araştırmada Casson ve ark. (321a) kötü over yanıtı hastalarda intrauterin inseminasyon programı öncesinde 80 mg/gün oral DHEA tedavisi ile gonadotropinlere over cevabının arttığını bildirmiştir. Bu araştırmada DHEA tedavisi sonrasında maksimum östradiol miktarı artmış ve östradiol/gonadotropin ampul sayısı azalmıştır.

Sander ve ark (320) BALB/c farelere yirmi gün süresince 6mg/100 g VA DHEA intraperitoneal olarak uyguladıklarında overlerde PCO benzeri bir görünüme neden olduğunu, over hacmini ve steroidogenezi artırdığını bildirmişlerdir. DHEA uygulaması sonrası sıçanlarda kan testosteron düzeylerinin artışı gösterilmiştir (311). Dolayısıyla DHEA uygulaması östrojen ve androjen seviyelerini artırmaktadır. Bu durum PCOS ta gözlenene benzerdir. On beş günlük doz uygulamasında overlerde steroidogenez artmıştır. Bu bize DHEA un overler üzerindeki erken dönem etkilerinin östradiyol artışı sonrası gerçekleşebileceğini gösterebilir. Aromatize olabilen, androjenleri fazla olan ve östrojen üretimi düşük olan foliküller ovulasyona gidecek foliküller olup folikül kohortundan seçilmektedir. On beş gün uyguladığımız

DHEA'nın serum östradiol konsantrasyonunu artırarak folikül gelişimini etkilediğini düşünmekteyiz.

Anderson ve ark. (226) yirmi iki günlük Spraque Dawley sıçanlara on gün süresince 6 mg/100g VA/gün DHEA uyguladıkları sıçanların hiçbiri puberteye girmemiştir. Deneyin dört ve dokuz. günü dışında tüm günlerde DHEA uygulanan guruplarda over foliküllerinde oosit aktivasyonu kontrol guruplarına göre daha yüksek olarak bildirmiştir. Yazarlar DHEA uygulanan guruplarda oositin erken ovulasyon için aktive olduğunu bildirmişlerdir..

Baltagy ve ark. (228) insan overlerinden oosit toplanması esnasında elde edilen preovulatuvar foliküllere ait granuloza hücrelerini 20ng/ml DHEA içeren ortamda kültür yaptıklarında kültür ortamında androstenedion ve testosteron konsantrasyonlarında değişiklik olmadığını bildirmiştir. Yazarlar. bu durumu düşük androjen konsantrasyonlarında aromataz aktivitesinin artmasına bağlamışlardır. Yazarlar DHEA uygulaması ile oluşan over morfolojik değişiklikleri bu hormonlara bağlı olabileceğini bildirmişlerdir.

Araştırmamızda serum östradiol yüksekliği DHEA'nın östradiole çevrilmesine ve granuloza hücrelerde daha fazla östrojen üretimine bağlı olabileceğini düşünülebilir. Artmış östradiol minik LH surgelerine neden olarak DHEA tarafından aktive olmuş oositlerin erken ovulasyonuna neden olabilir. Ancak uzun dönem DHEA uygulanması sonrasında ovaryan mikroçevrede androjenik bir ortam oluşacağı da düşünülebilir. Takibinde değişen hormonal mikroçevre nedeniyle anovulasyon oluşabilir (230). DHEA uygulanan guruplarda overlerde primordiyal primer foliküler geçiş aşaması kolaylaşır. Anovulasyon sonrasında foliküller uzun süreyle primer ve sekonder evrede kalacaktır. Foliküller bu evrede apoptoza daha yatkın olur. DHEA nun uzun dönemde atrezi sürecini harekete geçirmesi muhtemeldir. Bu tezin uzun dönem DHEA araştırmalarıyla desteklenmesi gerekmektedir. Serum FSH düzeyleri DHEA uygulaması sonrasında etkilenmemiş gibi görülmektedir. Ancak serum FSH düzeyleri ölçülebilir sınırların üstünde değerlerdedir.

VCD-DHEA (VDH) Uygulaması-Doz Planlanması

Over siklusu; somatik ve germ hücrelerde yoğun hücre ölümü ve geniş doku remodelizasyonu görülmesiyle karakterizedir. İnsan üreme hayatı süresince over

foliküllerinin %99'u atreziye uğrarlar. Bu atretik foliküller, hormonal olarak kontrol edilen apoptoz süreci sonrası oluşur. **(323)** Böylece foliküllerin çoğu ovulasyon öncesinde atreziye uğrarlar **(324)**. Atretik süreçte granüloza hücreleri ve oositler apoptoz adı verilen programlı hücre ölümü ile kaybolurken, teka interna hücreleri interstisyel hücrelere dönüşür. Overlerde atretik süreçte kaybolan folikül sayısı arttıkça interstisyel hücrelerde artacaktır. Bu hücreler androjen sekresyonundan sorumludur. Postmenopozal over dokusunda apoptoz devam etmektedir **(279)**.

Overlerlerdeki atrezi oranının sıçanlarda neonatal evrede daha fazla olduğu, seksüel olgunluk başladığında ise azaldığı, özellikle küçük preantral foliküllerin büyük antral foliküllere dönüşmesi esnasında atrezinin görüldüğü 17-beta östrodiolün ise preantral foliküllerde atreziyi yavaşlattığı araştırmalarla bildirilmiştir **(326)**. Araştırmamızda sıçanlara VCD uygulayarak overlerde apoptoz mekanizmalarını harekete geçirilmiştir. Bu süreçte DHEA nun etkilerini morfolojik, immunohistokimyasal olarak araştırılmıştır.

Araştırmamızda yirmi sekiz günlük Spraque Dawley sıçanlara on beş gün süresince 160 mg/kg/gün VCD ip ve 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. Bu araştırma VCD ile oluşturulan over yetmezlik modelinde DHEA uygulamasının yapıldığı ilk araştırmadır.

VDH Uygulaması ve Vücut Ağırlığı Değişiklikleri

Araştırmamızda, tablo 4.1. de görüldüğü üzere; kontrol ve araştırma gurupları arasında deney sonu ağırlıkları değerlendirildiğinde, VDH uygulanan gurupta kontrol grubuna göre , deney sonu ağırlığını artmıştır. DHEA grubunda deney sonu ağırlıklar kontrol grubundan fazla olup VDH grubuyla benzerdir. VDH gubunda DSA lar VCD gubuna göre daha fazladır.

Gloub ve ark. **(327)** erişkin APP farelere on beş gün VCD uygulaması sonrası oluşturulan modelde östrojen pelleti uygulamışlardır. Bu hayvanlarda kontrol grubuna göre daha fazla kilo alımı bildirilmiştir. Bu araştırmada içinde fitoöstrojen olmayan bir diyet uygulamışlardır.

Çelik ve ark.**(268)** araştırmamıza benzer diyetle beslenen immatür sıçanlarda tek başına silmarin (fitoöstrojen)uygulandığında deney sonu ağırlık kontrol grubuna

göre artarken on beş gün 160 mg/kg/gün VCD ve VCD ile beraber silmarin uygulanan guruplarda ise deney sonu ağırlığı kontrol grubuyla benzer olarak bildirmişlerdir. Bir fitoöstrojen olan ve östrojenik etkileri olan Silmarin tek başına uygulandığında kilo aldırmasına rağmen toksik madde olan VCD ile beraber verilmesi sonrasında bu etkisi ortadan kalkmıştır. Araştırmacılar bu araştırmada silmarinin kilo aldırıcı etkisinin VCD tarafından azaltıldığını belirtmişlerdir.

Mayer ve ark. (155) LDL reseptörleri silinmiş kolesterolden zengin diyetle beslenen farelere VCD uygulaması sonrasında kontrol gurupları, ooferektomi uygulanan, VCD uygulanan ve VCD- 17 beta östradiol uygulanan guruplarla arasında kilo farkı bulmamışlardır. Bu araştırmada VCD-östradiol uygulanan guruplarda plazma kolesterol düzeyleri kontrol grubundan daha düşük bulunmuştur. VCD grubu ile VCD-E2 grubunda ve VCD grubu ile kontrol grubunda benzer gözlenmiştir. Romero ve ark. (270) standart diyetle beslenen VCD uygulanmış immatür sıçanlara östradiol içeren pelletler taktıklarında yirmi altıncı haftada glukoz toleransının sadece VCD uygulanan guruplar ve kontrol guruplarına göre daha iyi olduğunu bildirmişlerdir.

Araştırmamızda VDH guruplarında vücut ağırlığının artmasını androjenik etkiden kaynaklandığını düşünmekteyiz. VDH guruplarında deney süresince alınan kilo diğer guruplardan daha fazla olarak gerçekleşmiştir. Bu etkinin hormonal etkinin bir sonucu olarak ortaya çıktığı ve VCD nin iştah azaltıcı etkisinin hiperandrojenik ortamda düzeldiğini düşünmekteyiz.

VDH Uygulaması ve Over ve Uterus Ağırlıkları

Araştırmamızda, tablo 4.2. de görüldüğü üzere; kontrol ve araştırma guruplarına ait sağ over, sol over ve uterus ağırlıkları karşılaştırıldığında, VDH grubunda, sağ over ve uterus ağırlığı ve toplam over ağırlığı kontrol grubuna göre artmıştır. VCD ve DHEA guruplarında ise uterus ve over ağırlıkları kontrol grubu ile benzerdir. Tablo 4.3'de görüldüğü üzere normalleştirilmiş sağ ve sol over ağırlığı ve uterus ağırlığı ve total over ağırlığı guruplar arasında benzer olarak ölçülmüştür.

Mayer ve ark. (155) LDL reseptörleri silinmiş kolesterolden zengin diyetle beslenen farelere VCD-E2 uygulanan guruplarda yüz yirminci günde over ağırlığını kontrol grubuna göre azalmış olarak bulmuşlardır. Over ağırlığı VCD –E2 uygulanan guruplarda VCD uygulanan guruplara göre daha fazla ölçülmüştür. Bu araştırmada

VCD uygulanan guruplarda over ağırlığı kontrol grubunun %34 olarak gerçeleşirken VCD-E2 uygulanan guruplarda kontrol grubunun %23'ü ölçülmüştür. Bu araştırmanın sonuçları değerdendirilecek olursa yüz yirminci günde bakıldığında VCD uygulaması sonrasında östradiol uygulaması folikül kaybını önlememekte ve over ağırlığını değıştirmemektedir.

Çelik ve ark. (268) yaptıkları araştırmada VCD , silmarin ya da VCD ile silmarin uyguladıklarında over ağırlıklarını kontrol guruplarıyla benzer olarak bildirmişlerdir. Araştırmacılar fitoöstrojenlerin östrojenik ve antiöstrojenik aktiviteleri olduğu ve aktivitelerinin ortamın endojen östrojen düzeyi ile ilişkili olduğu premenopoz gibi yüksek östrojenli ortamda antiöstrojenik etki , (postmenopoz gibi düşük östrojenli ortamda ise östrojenik etki) gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu araştırmada serum hormon parametreleri verilmemiştir. Ancak VCD uygulanan guruplarda atretik primordial ve primer folikül sayıları artmış ve tüm folikül sayılarında düşüş gözlenmiştir. Over ağırlığında bir değışiklik olmamıştır. Silmarin verilen guruplarda folikül sayılarında değışiklik olmamış korpus luteum sayılarında azalma olmuştur. Korpus luteum sayısında azalma olması over ağırlığına yansımamıştır. VCD ile silmarin uygulanan guruplarda ise VCD grubuna göre atretik primordial ve primer folikül sayılarında azalma olmuştur ve sekonder folikül sayıları kontrol grubuna yaklaşmıştır. Bu değışiklere rağmen over ağırlığında değışiklik olmamasını bu foliküllerin ağırlıkta fazla yer tutmamasına bağlamaktayız.

Araştırmamızın sonuçları incelendiğinde VDH uygulanan guruplarda over ağırlığında artış olmuş ancak normalleştirilmiş over ağırlıklarında farklılık gözlenmemiştir. Dolayısıyla bu bulgumuzun hayvanlar arası farktan kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Araştırmamızda VDH grubunda uterus ağırlığının kontrol grubuna göre arttığı görülmüştür. Araştırmamıza benzer şekilde, Kary Thompson ve ark. (150) immatür sıçanlara on beş gün süresince VCD ile beraber Östradiol uygulanan gurupta uterus ağırlığında artış olmuştur. VCD ile beraber östradiol ve tamoksifen uygulanan gurupta kontrol grubuna kıyasla uterus ağırlığında artış olmakla beraber bu istatistiksel olarak anlamlı değildir. Yazarlar bu durumu östradiolün trofik etkisi olarak yorumlamışlar ve tamoksifenin bu etkiyi geri çevirmiş olabileceğini bildirmişlerdir.

Mayer ve ark. (155) LDL reseptörleri silinmiş farelere ooferektomi uygulandığında yüz yirminci günde uterus ağırlığının azaldığını bildirmişlerdir. Bu araştırmada VCD uygulanan guruplarda yüz yirminci günde uterus ağırlığı kontrol guruplarına benzerken VCD-E2 uygulanan guruplarda ve ooferektomi-E2 uygulanan guruplarda uterus ağırlığında kontrol grubu, ooferektomi uygulanan, VCD uygulanan guruplara göre artış olmuştur. Bu araştırmanın erken dönem sonuçları verilmemiştir. Yazarlar uterus ağırlığındaki artışı östradiol etkisi olabileceğini bildirmiştir.

Gloub ve ark. (327) APP farelere on beş gün süresince VCD uygulaması arkasından östradiol uygulandığında uterus ağırlığını dört yüz altmışıncı günde kontrol grubu hayvanlarla benzer bulmuşlardır.

Kaynaklarda DHEA ve VCD nin beraber uygulandığı bir başka araştırma yoktur. Kısa dönem VDH uygulanması uterus ve sağ over ağırlığında artışa neden olmuştur. Sağ over ağırlığında artış olması tesadüfi bir bulgu olabilir. VDH grubunda artmış uterus ağırlığı DHEA un androjenik ve östrojenik etkilerine bağlı olarak gerçekleşmiş olabilir. Bu dönemde VCD uygulaması uterus ağırlığında değişikliğe neden olmamıştır. Hormonal mikroçevre değişiklikleri uterus ağırlığına yansımamıştır. Dolayısıyla DHEA etkisi görülebilmıştır. Ancak bu bulgumuzun VDH grubunda uzun dönem sonuçlarıyla doğrulanmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

VDH Uygulaması ve Folikül Sayıları

Araştırmamızda, tablo 4.4. de görüldüğü üzere on beş gün VCD uygulanan guruplarda total ve normal primordiyal folikül sayısı, kontrol grubundan daha az olarak sayılmıştır. Atretik primordiyal folikül sayısı kontrol grubundan daha fazla olmakla beraber bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildir. DHEA, grubunda normal primordiyal folikül sayısı ve atretik primordiyal folikül sayısı kontrol grubundan daha azdır. DHEA grubunda VCD grubuna göre toplam sağlıklı primordiyal folikül sayısı artmıştır. Atretik primordiyal folikül sayıları azdır VDH grubunda, VCD grubuna göre total, normal ve atretik primordiyal folikül sayısı benzer bulunmuştur. VDH grubunda normal primordiyal folikül sayısı DHEA grubundan daha az olarak bulunmuştur.

Araştırmamızda, tablo 4.5.de görüldüğü üzere on beş gün VCD uygulanan guruplarda total ve normal primer folikül sayısı, kontrol grubundan daha azdır. Atretik primer folikül sayısı kontrol grubundan daha fazladır. DHEA grubunda total

ve normal primer folikül sayıları kontrol grubundan daha azdır. Atretik primer folikül sayısı azalmakla beraber bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildir.. VDH grubunda toplam primer ve normal primer folikül sayıları kontrol grubuna göre daha azdır. Diğer guruplarla benzer olarak sayılmıştır. Atretik primer folikül sayısı ise kontrol grubu ile benzer olup VCD grubundan daha azdır.

Karyl Thompson ve ark. (150) immatür sıçanlara VCD ile östradiol uygulandığında primordial foliküllerde kayıp olurken primer folikül sayısı kontrol grubu ile aynı kaldığını bildirmiştir. Bu araştırmada tek başına östradiol uygulandığında veya ER agonisti genistein uygulandığında primer folikül sayıları artmıştır. Ancak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında genistein ve VCD uygulanan gurupta primer folikül sayılarında fark saptanmamıştır. VCD östrodiol ve ER antagonisti olan 4-hydroxytamoxifen eş zamanlı uygulandığında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında primer folikül sayılarında ciddi düşüş olmuştur. Bu araştırmada östradiol uygulaması primordial foliküllerdeki kaybı önlememekte ancak primer foliküllerdeki kaybı önlemektedir. Dolayısıyla östrojenin koruyucu etkisi primer foliküllerdedir. Bir östrojen reseptör analogu olan genistein ise folikül kaybını önlememiştir. Dolayısıyla 17 beta östradiol uygulamasının koruyucu etkisine östrojen reseptör aracılık etmemektedir. Ancak bu araştırmada sadece kontrol guruplarına östrojen reseptör boyası yapılmıştır.

Devine ve ark. (143) in vitro immatür fare over kültürüne glutathion, vitamin C veya vitamin E eklenmesinin primordial ve primer folikül sayılarında azalmayı durdurmadığını göstermişlerdir. Bu bulgu VCD nin oksidatif mekanizma üzerinden etki göstermediğini desteklemektedir.

Başka bir araştırmada sıçanlara on beş gün süresince VCD ve arilhidrokarbon reseptör antagonisti alfa naphthoflavone beraber ya da tek başına ANF verilmiştir. 15 gün VCD uygulamasını takiben primordial folikül sayılarında kontrol grubuna göre azalma olmuştur. ANF ile tedavi primordial folikül sayılarında artışa neden olmuştur. Genetik olarak AhR sayılarında eksiklik olan farelerde yapılan araştırmalarda AhR ün preantral foliküllerde atrezi hızını kontrol ettiği gösterilmiştir. AhR reseptör antagonisti verilerek bu atrezinin azalması apoptozu önleyici mekanizmada aril hidrokarbonların kullanıldığını göstermektedir (328).

Araştırmamız Sonuçları değerlendirildiğinde DHEA primordiyal foliküllerde sağlıklı primer folikül sayısını arttırmakta, atrezik primordiyal folikül sayısını azaltmaktadır. VCD primordiyal foliküllerde atrezi sürecini hızlandırmakla beraber DHEA uygulaması bu süreci azaltmakta ancak bu süre uygulamada atrezik süreci tam olarak geri döndürmemektedir.

VDH Uygulaması Sonrasında Atretik/Normal Folikül Yüzdeleri

Araştırmamızda, tablo 4.7.de görüldüğü üzere, primordiyal ve primer foliküllerin normal /atretik yüzdelerine bakıldığında on beş günlük VCD grubunda normal primordiyal ve primer folikül yüzdesi kontrol grubuna göre azalmış, atretik primordiyal folikül yüzdesi ise artmış olduğu görülmüştür. DHEA grubunda normal ve atretik primordial ve primer folikül yüzdesi kontrol grubuyla benzerdir. VDH grubunda normal primordiyal ve primer folikül yüzdesi VCD grubundan daha fazla, DHEA grubundan ise daha az olduğu görülmektedir. VDH grubunda atretik primordiyal folikül yüzdesi, VCD grubundan daha az, DHEA grubundan ise daha fazla olduğu görülmüştür. Atretik primer folikül yüzdesi VDH grubunda VCD grubuna göre daha azdır. Bu sonuçlar kaynak bulgularıyla uyumlu olduğu görülmüştür. On beş günlük guruplarda VCD primordiyal ve primer foliküllerde atretik süreci başlatmakta ve folikül havuzunu azaltmaktadır. Bu sürecin devamı over yetmezliği olacaktır. VCD-DHEA uygulaması atretik/normal folikül yüzdelerine bakıldığında primordial ve primer foliküllerde koruyucu etki göstermiştir.

Çelik ve ark. (268) ları immatür sıçanlara 160 mg/kg/gün uyguladıklarında VCD uygulanan guruplarda kontrol guruplarına göre normal / atretik primordial ve folikül oranlarının arttığını ve VCD uygulanan overlerde silmarinin (fitoöstrojen) atreziyi azalttığını bu oranın kontrol overlerindeki değerlere geldiğini bildirmiştir. Silmarin uygulaması VCD nin primordial foliküllerde neden olduğu atreziyi azaltmaktadır.

VDH Uygulaması ve Apoptoz

Araştırmamızda tablo 4.10 da görüldüğü üzere VCD ve VDH uygulanan guruplarda primer foliküllerde TUNEL pozitif hücre sayısı kontrol grubuna göre fazla olarak sayılmıştır. Bu dönemde kontrol grubu overlerde primordiyal ve primer foliküllerde TUNEL pozitif hücre gözlenmemiştir. VDH grubunda primordiyal ve primer foliküllerde VCD grubuna göre daha az sayıda TUNEL pozitif hücre

görülmüştür. DHEA uygulanan guruplarda primer ve primordiyal foliküllerde TUNEL pozitif hücre sayısı kontrol grubuyla benzerdir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde VCD primordiyal ve primer foliküllerde apoptoz mekanizmalarını harekete geçirerek atrezi sürecini başlatmakta, eş zamanlı DHEA uygulaması primer foliküllerde bu süreci azaltmaktadır.

Kaynaklarda VCD apoptoz ilişkisinin ve koruyucu ilacın apoptoz mekanizmaları üzerine etkilerinin TUNEL metoduyla araştırıldığı bir araştırmaya rastladık. Çelik ve ark.(268) immatür sıçanlara VCD uyguladıklarında primordiyal foliküllerde immunohistokimyasal yöntemle TUNEL pozitif hücre sayısında artış olduğunu bildirmiştir. Bu araştırmada araştırmamızdan farklı olarak primordiyal foliküllerde TUNEL pozitif hücre sayısı kontrol grubundan fazla olarak bulunmuştur. Bu farklılığın hayvanlar arası farklılıktan kaynaklandığını düşünmekteyiz. Bu araştırmada VCD uygulanan sıçanlara fitoöstrojen olan Silmarin uygulandığında TUNEL pozitif hücre sayısı kontrol guruplarıyla benzer olarak bulunmuştur. Dolayısıyla VCD uygulanan sıçanlarda bir fitoöstrojen olan silmarinin apoptozu başlangıç basamağında önlediği immunohistokimyasal yöntemle gösterilmiştir.

Hu ve ark. (140) yirmi sekiz günlük sıçanlara 80 mg/kg VCD bir, on ve on beş gün uyguladıkları araştırmalarında primordiyal ve primer 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 gözlenmişlerdir. Küçük foliküllerde tek doz VCD uygulanmasının JNK aktivitesini azalttığı ERK ve p38 kinaz aktivitesini etkilemediğini belirlenmiştir. Buna karşın on ve on beş gün VCD uygulanan guruplardan elde edilen sadece küçük foliküllerde JNK ve p38 aktivitesinin belirgin şekilde arttığını ERK aktivitesinin ise değişmediği saptamışlardır.

Wang ve ark. (312) DHEA un osteoblastlarda proliferasyonu arttırdığını ve AR ve ER bağımsız mekanizmayla MAPK sinyal yolağıyla direk olarak apoptozu inhibe ettiğini göstermişlerdir. Dolayısıyla VCD uygulanmış sıçanlarda DHEA uygulanması bu mekanizmayla apoptozu azaltmış olabilir. Ancak araştırmamızda MAPK yolağı değerlendirilmemiştir.

Araştırmamızda şekil 4.9-4.15 de görüldüğü üzere; deney ve kontrol guruplarına ait primordial folikül granuloza hücre kaspaz 3 boyanma yoğunluğu karşılaştırıldığında; VCD uygulanan guruplarda kaspaz 3 boyanma yoğunluğunu hafif artmış olarak görüldü. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. VCD uygulanan guruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; daha büyük foliküllerde VCD ovaryan foliküllerde kaspaz 3 boyanma yoğunluğunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. VDH uygulanan guruplarda foliküllerde ve over stromasında kaspaz 3 aktivitesinde değişiklik olmamıştır.

Kary Thompson ve ark. **(150)** VCD uyguladıklarında folikül sayısının azaldığını ve kaspaz 3 aktivitesinin arttığını ancak tek başına genistein uyguladıklarında kaspaz 3 aktivitesinde ve folikül sayısında değişiklik olmadığını bildirmişlerdir. Bu araştırmada genistein (fitoöstrojen) ve VCD beraber uygulandığında ise folikül sayısı ve kaspaz 3 aktivitesi kontrol grubu ile benzer bulunmuştur. Dolayısıyla genistein folikül sayısı ve apoptoza tek başına bir etkisi yokken, VCD nin neden olduğu folikül kaybını ve apoptozu durdurmaktadır. Bu etki VCD nin neden olduğu apoptoz artışının östrojen aracılıklı bir mekanizmayla durdurulduğunu göstermektedir.

Çelik ve ark. **(268)** immatür sıçanlara VCD uyguladıklarında primordial, primer, sekonder ve antral foliküllerde kaspaz 3 aktivitesinin arttığını ancak bu artışın sadece antral folikül ve stromada istatistiksel olarak anlamlı olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmada Silmarin uygulanan guruplarda kaspaz 3 aktivitesi kontrol grubu ile benzer olarak gerçekleşmiştir. Bu araştırmada VCD nin neden olduğu apoptozun östrojen uygulamasıyla durdurulabileceğini desteklemektedir. Araştırmacılar Silmarinin koruyucu etkisini östrojen reseptör aracılığıyla gerçekleşmiş olabileceğini bildirmişlerdir. Bu araştırmada VCD nin neden olduğu apoptozun östrojen uygulamasıyla durdurulabileceğini destekleyebilir. Fitoöstrojen olan silymarin ve silbinin ayrıca karsinogenezise karşı koruyucu etkileri olduğu, ultraviyolenin tetiklediği oksidatif stres, inflamasyon, immün cevap ve DNA hasarı gibi tehlikeli etkileri baskıladığı ve azalttığı, PGE₂, PGF₂, PGD₂ (prostoglandin metabolitlerinin) ve COX-2 (cyclooxygenase-2) ekspresyonunun inhibe ettiği, mitokondriyal apoptoz mekanizmalarını, kaspaz aktivasyonunu ve MAPK sinyallerinin modülasyonunu sağladığı bildirilmiştir **(334,335)**.

Araştırmamızda denek sayısı azlığı, kullandığımız sıçan türü farklılığı ve gözlemci değerlendirmesi nedeniyle VDH uygulanan sıçanlarda kaspaz 3 aktivitesinde bir farklılık görülmediğini düşünmekteyiz. Ancak kaspaz 3 apoptozda geri dönüşümsüz basamağı göstermektedir. Dolayısıyla VCD uygulanan sıçanlarda gözlenen foliküler koruma DHEA'un daha önceki basamaklarda bir etkisi sonucu ortaya çıkmaktadır. .

Hu ve ark. (329) 28 günlük sıçanlara 80 mg/kg VCD 1, 10 ve 15 gün uyguladıkları araştırmalarında primordiyal ve primer 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 guruplardan elde edilen sadece küçük foliküllerde JNK ve p38 aktivitesinin belirgin şekilde arttığını ERK aktivitesinin ise değişmediği saptanmıştır

Neonatal sıçan kültür sistemi kullanılarak yapılan araştırmalarda VCD inkubasyonu c kit mRNA ekspresyonunu inhibe etmektedir. Kültür sistemine Kit ligand eklenmesi preantral foliküllerde atreziyi engellemektedir. (141). Keating ve ark. VCD uygulanan neonatal sıçan over kültürüne fosfotidil inozitol 3 kinaz inhibitörü eklediklerinde primordial folikül sayılarında değişme olmadığını, küçük primer folikül sayılarında sadece VCD eklenmesine göre daha fazla azalma olduğunu bildirmişlerdir. (325) Yazarlar bu araştırmada VCD nin primordial folikül recruitmentını fosfotidil inozitol 3 kinaz yolağını kullanarak artırdığını ve asıl toksik etkinin primer foliküllerde oluştuğunu öne sürmüşlerdir.. Dolayısıyla bu mekanizmayı hareketlendirebilecek ilaçlar VCD nin neden olduğu ovotoksisiteyi azaltabilir. Liu ve ark. (315) DHEA un aortik vasküler hücrelerde doz bağımlı şekilde ve östrojen reseptörlerini kullanmadan apoptozu fosfotidil inozitol 3-kinaz yolağıyla kaspaz 3 aktivitesini azaltarak ve bcl-2 yi artırarak önlediğini bildirmişlerdir.

Wang ve ark. (333) DHEA un osteoblastlarda proliferasyonu artırdığını ve AR ve ER bağımsız mekanizmayla MAPK sinyal yolağıyla direk olarak apoptozu inhibe ettiğini göstermişlerdir. VCD uygulanmış sıçanlarda DHEA uygulanması bu

mekanizmayla apoptozu önlemiş olabileceğini düşünmekteyiz. Ancak araştırmamızda MAPK yolağı değerlendirilmemiştir. VCD uygulaması stromada apoptozu arttırmıştır. VCD uygulaması ile stromada oluşmuş apoptoz DHEA uygulamasıyla önlenememiştir.

VDH Uygulaması ve Hormon Düzeyleri

Araştırmamızda tablo 4.11. de görüldüğü üzere VDH gurubunda serum östradiol seviyeleri DH ve kontrol gurubuyla benzer olarak ölçülmüşken VCD gurubundan düşük ölçülmüştür.

Kary Thompson ve ark. (150) immatür sıçanlara östrojen reseptör analogu, genistein ya da tamoksifen ya da on beş gün 80mg/kg/gün VCD uyguladıklarında serum östradiol konsantrasyonlarını kontrol grubu ile benzer bulmuşlardır.

Mayer ve ark. (155) LDL reseptör eksik immatür farelere on beş gün süresince 160mg/kg/gün VCD uyguladıklarında plazma FSH düzeyleri elli üçüncü günde kontrol ve ooferektomi uygulanan farelere göre daha yüksek bulmuşlardır. Bu araştırmada plazma FSH düzeyleri sadece ooferektomi uygulanan guruplarda sadece VCD uygulanan guruplarla benzer bulunmuştur. VCD-E2 ve ooferektomi-E2 guruplarında plazma FSH düzeyleri düşmekle beraber siklik kontrollerden yüksek ölçülmüştür. 17 beta östradiol düzeyleri kontrol grubu, ooferektomi grubu ve VCD grubunda tespit edilebilir düzeylerin altında kalmıştır. Ooferektomi-E2 uygulanan guruplarda plazma E2 düzeyleri fizyolojik limitlerin üzerine çıkarken, VCD-E2 uygulanan guruplarda fizyolojik sınırlarda ölçmüşlerdir. Yazarlar bu durumu VCD uygulanan farelerde interstisyel dokuda bulunan östrojen sulfotransferaz aktivitesine bağlamışlardır. Bu araştırmada FSH düzeyleri VCD uygulanan farelerde ve ooferektomi uygulanan farelere yükselmiştir. Bu farelere E2 uygulanması FSH da düşmeye neden olmakta fakat bu düşme kontrol hayvanlarına yaklaşmamıştır. Dışardan östradiol uygulanması hipofiz FSH sekresyonu üzerine parsiyel etki göstermektedir. Çünkü hipofiz FSH sekresyonu over granüloza hücreleri tarafından üretilen inhibin tarafından da inhibe edilir. Dolayısıyla overlerde granüloza hücre kaybı sonrasında oluşan inhibin azlığı sonrasında östradiol verilmesi FSH düzeylerini istenilen düzeylere getirememektedir.

Mayer ve ark. (155) LDL reseptör silinmiş farelerde on beş gün süresince 160mg/kg/gün VCD uyguladıklarında serum androstenedion düzeylerini kontrol

grubuyla benzer olarak bildirmiştir. Ooferektomi uygulanan sıçanlarda ve VCD-E2 uygulanan guruplarda plazma androstenedion düzeyleri VCD ve kontrol grubuna göre düşük olarak bildirmiştir.

Mayer ve ark. (144) başka bir araştırmada immatür B6C3F1 farelere on beş gün süresince 160 mg/kg/gün VCD uyguladıklarında menopoz oluştuktan sonra geriye kalan over dokusu tarafından androstenedion üretiminin devam ettiğini göstermişlerdir.

Misugi ve ark. (311) immatür Wistar sıçanlara 6 mg/100g VA / gün DHEA uyguladıklarında DHEA uygulanan gurupta plazma testosteron konsantrasyonunda artış bildirmiştir. Lee ve ark. (220) yirmi iki günlük immatür Spraque Dawley sıçanlara on gün süresince 6 mg/100g VA/gün DHEA enjeksiyonu sonrasında serum testosteron, androstenedion ve Dehidroepiandrosteron düzeylerinde artış bildirmiştir. Wang ve ark. (222) yirmi gün süresince 6 mg/100g VA DHEA uyguladıkları gurupta serum testosteron düzeylerini kontrol grubuna göre artmış olarak bildirmiştir.

Araştırmamızda serum estradiol seviyelerinin kontrol grubuyla benzer olarak gerçekteşmesinin VCD-DHEA uygulamasının dokuda steroidojenik aktiviteyi ve östradiol metabolizmasını etkilememesi nedeniyle gerçekteştiğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR

Araştırmamızda yirmi sekiz günlük Spraque Dawley sıçanlarda on beş gün süresince 4-Vinyl cyclohexene-diepoxyde (VCD) maddesi verilerek oluşturulan prematür over yetmezliği modelinde Dehidroepiandrosteron (DHEA)'un olası etkileri araştırıldı.

- 1- VCD, DH, Kontrol guruplarında Deney başı ağırlıkları benzer ölçüldü.($P>0.05$)
- 2- VCD grubunda Deney sonu ağırlık (DSA) kontrol ve DH grubuyla benzer olarak ölçüldü. ($P>0.05$) VCD gurubunda DSA VDH grubundan düşük olarak ölçüldü. ($p=0,001$)
- 3- DH grubunda DSA VCD ve VDH grubuyla benzer olarak ölçüldü. ($P>0.05$)DH grubunda DSA kontrol grubundan fazla olarak ölçüldü. ($p=0,04$)
- 4- VDH grubunda DSA Kontrol grubuyla benzer ölçüldü. ($P>0.05$) VDH grubunda DSA VCD ve kontrol grubundan fazla ölçüldü. ($p<0.001$)
- 5- VCD grubunda deney süresince alınan kilo kontrol grubu, DH grubu ile benzer ölçüldü. ($P>0.05$) VCD grubunda deney süresince alınan kilo VDH grubundan düşük olarak ölçüldü.($p=0.001$)
- 6- DH grubunda deney süresince alınan kilo kontrol ve VCD grubu ile benzer ölçüldü. ($P>0.05$) DH grubunda deney süresince alınan kilo VDH grubundan az ölçüldü.($p<0.001$)
- 7- VDH grubunda deney süresince alınan kilo kontrol ($P<0.001$), VCD ($P<0.001$), DH gurubundan yüksek ($p<0.001$) ölçüldü.
- 8- VCD grubunda over ve uterus ağırlıkları, normalleştirilmiş organ ağırlıkları kontrol, VCD ve DH grubuyla benzer ölçüldü. ($P>0.05$)
- 9- DH grubunda over ve uterus ağırlıkları, normalleştirilmiş organ ağırlıkları VCD, DH, kontrol grubuyla benzer ölçüldü.($P>0.05$)
- 10- VDH grubunda sağ over ağırlığı ($p=0.003$)ve uterus ağırlığı kontrol grubundan daha fazla ölçüldü. ($p=0,001$) VDH grubunda uterus ağırlığı kontrol grubundan ($p=0,001$) ve VCD grubundan daha fazla ölçüldü. ($p=0,001$)
- 11- VCD grubunda toplam primordial folikül sayısı kontrol , grubundan daha az sayıldı.($p<0.0001$)

- 12- DH grubunda toplam primordial folikül sayısı kontrol grubundan daha az sayıldı.(p=0.017)
- 13- VDH grubunda toplam primordial folikül sayısı kontrol grubundan daha az sayıldı.(p=0,008)
- 14- VCD grubunda normal primordial folikül sayısı kontrol (P<0.0001), VDH (P=0.03), DH (P=0,001) grubundan daha az sayıldı.
- 15- DH grubunda normal primordial folikül sayısı kontrol grubundan daha az sayıldı.(P=0.017)
- 16- VDH grubunda normal primordial folikül sayısı kontrol (P=0,008) ve DH grubundan daha az sayıldı.(P=0.017)
- 17- VCD grubunda atretik primordial folikül sayısı DH (P=0.005) ve VDH (P=0.03) grubundan daha fazla sayıldı.
- 18- DH grubunda atretik primordial folikül sayısı kontrol grubundan daha fazla sayıldı. (P=0.017)
- 19- VDH grubunda atretik primordial folikül sayısı kontrol ve DH grubu ile benzer (P>0.05)VCD grubundan az olarak sayıldı.(P=0,011)
- 20- VCD grubunda toplam primer folikül sayısı kontrol grubundan daha az ,(P<0,0001) VDH ve DH grubu ile benzer sayıldı. (P>0.05)
- 21- DH grubunda toplam primer folikül sayısı kontrol grubundan daha az, (P=0.03) VCD (P=0,013)ve VDH grubundan daha fazla sayıldı.
- 22- VDH grubunda toplam primer folikül sayısı kontrol grubundan daha az sayıldı.(P=0,016) VDH grubunda toplam primer folikül sayısı VCD ve DH grubuyla benzer sayıldı. (P>0.05)
- 23- VCD grubunda normal primer folikül sayıları kontrol(P<0.0001) ve DH grubundan daha az sayıldı.(P=0,013) VCD grubunda normal primer folikül sayısı VDH grubu ile benzer sayıldı. (P>0.05)
- 24- DH grubunda normal primer folikül sayıları kontrol grubundan daha benzer sayıldı. DH grubunda normal primer folikül sayısı VCD grubundan daha fazla sayıldı. (p=0,013)
- 25- VDH grubunda normal primer folikül sayıları kontrol grubu ile benzer sayıldı. (P>0.05)

- 26- VCD grubunda atretik primer folikül sayıları kontrol ($p < 0,0001$) DH ($P=0.013$), VDH grubundan ($P=0.002$) fazla sayıldı.
- 27- DH grubunda atretik primer folikül sayıları VCD grubundan daha az sayıldı. ($P=0.013$)
- 28- VDH grubunda atretik primer folikül sayıları kontrol ve DH grubu ile benzer sayıldı. ($P > 0.05$) VDH grubunda atretik primer folikül sayısı VCD grubundan az olarak sayıldı. ($P=0.002$)
- 29- VCD grubunda sekonder folikül sayıları kontrol grubundan daha az sayıldı. VCD grubunda sekonder folikül sayısı VDH ve DH grubuyla benzer sayıldı. ($P > 0.05$)
- 30- DH grubunda sekonder folikül sayıları kontrol grubundan daha az sayıldı. ($P=0.009$) DH grubunda sekonder folikül sayısı VCD ($P=0.009$) ve kontrol grubundan ($P=0.009$) fazla sayıldı.
- 31- VDH grubunda sekonder folikül sayıları VCD ve DH grubu ile benzer olarak sayıldı. ($P > 0.05$) VDH grubunda sekonder folikül sayıları kontrol grubundan daha az sayıldı. ($P=0,008$)
- 32- VCD grubunda antral folikül sayıları DH grubu ile benzer sayıldı. ($P > 0.05$) Kontrol grubundan daha az sayıldı. ($P < 0.0001$) VDH grubundan daha fazla ($P=0.006$) sayıldı.
- 33- DH grubunda antral folikül sayıları VCD ve VDH grubu ile benzer sayıldı. ($P > 0.05$) DH grubunda antral folikül sayıları kontrol grubundan daha az sayıldı. ($P=0.03$)
- 34- VDH grubunda antral folikül sayıları kontrol grubundan daha az sayıldı. ($P=0.008$) VDH grubunda antral folikül sayıları VCD grubundan daha az sayıldı. ($P=0.008$)
- 35- VCD grubunda korpus luteum sayıları kontrol, VCD, VDH grubuyla benzer sayıldı. ($P > 0.05$)
- 36- DH grubunda korpus luteum sayıları kontrol, VCD, VDH grubu ile benzer sayıldı. ($P > 0.05$)
- 37- VDH grubunda korpus luteum sayıları kontrol, VCD ve DH grubu ile benzer sayıldı. ($P > 0.05$)

- 38- VCD grubunda folikül kist sayıları kontrol grubundan daha az sayıldı.($P<0.0001$)
- 39- DH grubunda folikül kist sayıları kontrol grubu ve VDH grubu ile benzer sayıldı. ($P>0.05$)
- 40- VDH grubunda folikül kist sayıları kontrol, VCD, VDH gurupları ile benzer sayıldı. ($P>0.05$)
- 41- VCD grubunda normal primordial folikül yüzdesi kontrol ($P<0.0001$), DH ($P<0.0001$), VDH guruplarından ($P<0.0001$) az sayıldı.
- 42- DH grubunda normal primordial folikül sayısı VCD ($P=0.036$) ve VDH grubundan ($P=0.036$) fazla, kontrol grubuyla benzer sayıldı. ($P>0.05$)
- 43- VDH grubunda normal primordial folikül yüzdesi VCD grubundan ($P<0.0001$) fazla, DH grubundan az ($P=0.036$), kontrol grubuyla benzer sayıldı. ($P>0.05$)
- 44- VCD grubunda atretik primordial folikül yüzdesi kontrol ($P<0.0001$) DH ($P<0.0001$), VDH grubundan ($P<0.0001$) fazla sayıldı.
- 45- DH grubunda atretik primordial folikül yüzdesi VDH, VCD grubundan az, kontrol grubuyla benzer sayıldı. ($P>0.05$)
- 46- VDH grubunda atretik primordial folikül yüzdesi VCD grubundan az ($P<0.0001$) DH grubundan fazla ($0,036$), kontrol grubuyla benzer sayıldı. ($P>0.05$)
- 47- VCD uygulanan sıçanlarda normal primer folikül yüzdesi kontrol ($P<0,0001$), DH ($P<0.0001$) ve VDH($P<0.0001$) grubundan daha az sayıldı.
- 48- DH grubunda normal primer folikül yüzdesi VCD grubundan daha az ($P<0.0001$), kontrol ve VDH grubuyla benzer sayıldı. ($P>0.05$)
- 49- VDH grubunda normal primer folikül yüzdesi VCD grubundan daha fazla ($p<0.0001$), kontrol ve DH grubuyla benzer sayıldı. ($P>0.05$)
- 50- VCD grubunda atretik primer folikül yüzdesi kontrol ($p<0.0001$), DH ($p<0.0001$) ve VDH($p<0.0001$) grubundan daha fazla sayıldı.
- 51- DH grubunda atretik primer folikül yüzdesi VCD grubundan daha az ($p<0.0001$), kontrol ve VDH grubuyla benzer sayıldı. ($P>0.05$)
- 52- VDH grubunda atretik primer folikül yüzdesi VCD grubundan daha az ($p<0.0001$) kontrol ve DH grubuyla benzer sayıldı. ($P>0.05$)

- 53- VCD grubunda primordial folikül çapı VDH grubundan daha fazla, kontrol ve DH grubuyla benzer ölçüldü. ($P>0.05$)
- 54- DH grubunda primordial folikül çapı kontrol, VCD, VDH grubuyla benzer ölçüldü ($P>0.05$)
- 55- VDH grubunda primordial folikül çapı VCD grubundan daha az, kontrol ve DH grubuyla benzer ölçüldü. ($P>0.05$)
- 56- VCD grubunda primordial folikül granuloza kalınlığı kontrol grubundan daha az, VDH ve DH grubuyla benzer ölçüldü. ($P>0.05$)
- 57- DH grubunda primordial folikül granuloza kalınlığı VCD, DH ve kontrol grubu ile benzer ölçüldü. ($P>0.05$)
- 58- VDH grubunda primordial folikül granuloza kalınlığı VCD, DH ve kontrol grubuyla benzer ölçüldü. ($P>0.05$)
- 59- VCD, DH, VDH, kontrol grubunda primer folikül çapı, primer folikül granuloza kalınlığı, sekonder folikül çapı, sekonder folikül teka kalınlığı, sekonder folikül granuloza kalınlığı antral folikül çapı, antral folikül teka kalınlığı, antral folikül granuloza kalınlığı benzer ölçüldü. ($P>0.05$)
- 60- VCD, DH, VDH, kontrol grubunda primordial, sekonder, antral, korpus luteum, folikül kistlerinde TUNEL pozitif hücre sayısı benzer sayıldı. ($P>0.05$)
- 61- VCD grubunda primer foliküllerde TUNEL pozitif hücre sayısı kontrol grubundan fazla sayıldı. ($p=0.01$) VCD grubunda TUNEL pozitif hücre sayısı DH, VDH grubuyla benzer sayıldı. ($P>0.05$)
- 62- DH grubunda primer foliküllerde TUNEL pozitif hücre sayısı kontrol grubuyla benzer sayıldı. ($P>0.05$)
- 63- VDH grubunda primer foliküllerde TUNEL pozitif hücre sayısı kontrol grubundan fazla sayıldı. ($p=0.01$)
- 64- Deney ve kontrol gurupları arasında primordiyal folikül kaspaz-3 boyanma yoğunluğu bakımından birbirleri ile karşılaştırıldığında guruplar arasında anlamlı düzeyde fark yoktur ($p>0.05$).
- 65- Deney ve kontrol gurupları arasında primer folikül kaspaz-3 boyanma yoğunluğu bakımından birbirleri ile karşılaştırıldığında guruplar arasında anlamlı düzeyde fark yoktur ($p>0.05$)

66- Deney ve kontrol gurupları arasında sekonder folikül granüloza tabakasında kaspaz-3 boyanma yoğunluğu bakımından birbirleri ile karşılaştırıldığında guruplar arasında fark vardır ($p=0,014$). Sekonder folikülün granüloza tabakasında şiddetli düzeyde (2. derece) boyanan 3 folikülden 2 si VCD grubuna aittir.

67- Deney ve kontrol gurupları arasında sekonder folikül teka tabakası kaspaz-3 boyanma yoğunluğu bakımından birbirleri ile karşılaştırıldığında guruplar arasında anlamlı düzeyde fark yoktur ($p>0.05$)

68- Deney ve kontrol gurupları arasında korpus luteum kaspaz 3 boyanma yoğunluğu bakımından birbirleri ile karşılaştırıldığında guruplar arasında anlamlı düzeyde fark yoktur ($p>0.05$)

69- Deney ve kontrol gurupları arasında over stromasında kaspaz-3 boyanma yoğunluğu bakımından birbirleri ile karşılaştırıldığında guruplar arasında fark vardır ($p=0,008$). Over stromasında şiddetli düzeyde (2. derece) boyanan 6 overden 5'i VCD grubuna aittir.

70- VCD grubunda serum FSH düzeyi VCD, DH, Kontrol grubundan az ölçülmüştür. ($p<0.0001$)

71- DH grubunda FSH düzeyi kontrol ve VDH grubuyla benzer ölçülmüştür. DH gurubunda serum FSH düzeyi .kontrol gurubundan az ölçülmüştür. ($p<0.0001$)

72- VDH grubunda FSH kontrol ve DH grubuyla benzer ölçülmüştür. DH gurubunda serum FSH düzeyi .kontrol gurubundan az ölçülmüştür. ($p<0.0001$)

73- VCD grubunda östradiol düzeyi VDH grubundan ve kontrol grubundan yüksek ölçülmüştür. VCD grubunda östradiol düzeyi kontrol grubu ile benzer ölçüldü. ($P>0.05$)

74- DH grubunda östradiol düzeyi ile kontrol grubundan daha yüksek ölçüldü. ($P>0.05$)

75- VDH grubunda östradiol düzeyi VCD grubundan daha düşük ölçüldü. ($P=0.003$) VDH grubunda östradiol düzeyi kontrol grubu ile benzer ölçüldü. ($P>0.05$)

Yukarıda detayları ile verilen araştırmamız sonuçlarının değerlendirilmesine göre

1- Araştırmamızda 15 gün süresince VCD uyguladığımız sıçanlarda atretik primordial folikül yüzdesi %86,67, atretik primer folikül yüzdesi 64,54 olarak

gerçekleşmiş olup. TUNEL immunohistokimyasal boyamada primer foliküllerde TUNEL pozitif boyanan apoptoza uğrayan hücrelerin arttığı görülmüş ve bu sürecin sonunda azalan primordial ve primer folikül sayıları ile deneysel over yetersizliği gerçekleşmiştir.

2- Işık mikroskop bulgularına göre VCD overlerde apoptozu artırarak folikül kaybına neden olmuştur. TUNEL boyasında apoptoz artışı primer foliküllerdeyken .kaspaz 3 boyasında stromada görülmüştür.

3- DHEA ışık mikroskop bulgularına göre primordial ve primer foliküllerde apoptoza neden olmamıştır. DHEA nın sadece sekonder foliküllerin granuloza hücrelerde ve stromada apoptoza neden olduğu kaspaz 3 boyası ile gösterilmiştir.

4- DHEA uygulaması immatür sıçan over foliküllerinde geçici bir şekilde duraklamaya neden olmuştur.

5- VCD-DHEA uygulaması ışık mikroskopu düzeyinde primordial ve primer foliküllerde VCD nin neden olduğu foliküler atreziyi azaltmıştır. Ancak VCD-DHEA uygulaması sekonder foliküllerin granuloza hücreleri ve stromada apoptozu önlememiştir.

KAYNAKLAR

1. Wagenen G, Simpsons ME. Embryology of the Ovary and Testis: Homo sapiens and Macacumulatta. Yale University Press. New Haven, 1965; 47-250.
2. Moore, KL. . (Çev.: Yıldırım, V., Okar, İ. ve Dalçık, H.). Klinik yönleri ile insan embriyolojisi, İstanbul: Nobel matbaacılık, 2002.
3. Chiquoine AD. The identification, origin and migration of primordial germ cells in the mouse embryo. The Anatomical Record. 1954;118: 135-146.
4. Drews,U. (Çev.:Solakoğlu, S.). Renkli embriyoloji atlası. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri; 2000.
5. 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.
6. Motta PM, Makabe S, Notttola SA. The ultrastructure of human and mouse reproduction. The natural history of the female germ cell: origin, migration, and differentiation inside the developing ovary. Human Reproduction Update. 1997; 3: 281-297.
7. Öktem Ö, Oktay K. Stem cells: a perspective on oocytes. Annals of the New York Academy of Sciences. 2008;1127: 20-26 .
8. 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.
9. Pinkerton JHM, McKay DG, Adams EC, Hertig AT. Development of the human ovary a study using histochemical technics. Obstet. Gynecol. 1961; 18: 152-181.
10. Carlson BM. Patten's foundations of embriology. Mcgraw-Hill companies, New York; 1996.
11. Mckay DG, Hertig AT, Adams EC, Danziger S. Histochemical observation on the germ cells of human embryos. The Anatomical Record. 1967; 117: 201-219.

12. Sadler TW. . (Çev.:Başaklar AC). Langman medikal embriyoloji. Ankara:Palme Yayıncılık, 2005.
13. Şeftalioğlu A. Genel ve özel insan embriyolojisi. Ankara:Tıp&Teknik yayıncılık; 1998.
14. Berman I. Color atlas of basic histology. Prentice-Hall international;1998.
15. Bloom W, Fawcett DW. A text of histology. Chapman and Hall, London. 1994
16. 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.
17. Kalaycı Ş. Histoloji, Bursa:Uludağ Üniversitesi Yayıncılık; 1986.
18. Arıncı K, Elhan A. Anatomi I. Cilt, Ankara: Güneş Kitapevi; 2001.
19. Berger T, Horner CM. In vivo exposure of female rats to toxicants may affect oocyte quality. Reproductive Toxicology. 2003; 17: 273–281.
20. Davis SR. Premature ovarian failure. Maturitas. 1996; 23:1-8.
21. Gürsoy E, Koptagel E. Embriyoloji atlası;1997
22. Dere F. Anatomi atlası ve ders kitabı. Adana:Nobel Tıp Kitapevleri. 1999.
23. Ross HM, Kaye GI, Pawlina W. Histology: A Text and Atlas. 4. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2003; 726-757.
24. Junqueira LC, Carneiro J. (Çev.: AYTEKİN, A. ve SOLAKOĞLU, S.). Temel histoloji, Ankara:Nobel Tıp Kitapevleri;2003
25. Ovalle WK, Nahirney PC. Netter's Essential Histology, Güneş Tıp kitabevi; 2009.
26. Erkoçak A. Özel histoloji, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları; 1982.
27. Eroschenko VP. (Çev.: DEMİR, R.)Di fiore histoloji atlası. Ankara: Palme Yayıncılık; 2001.
28. Fawcett DW. Bloom and Fawcett: concise histology. Chapman And Hall, U.S.A. 1997.

29. Gartner LP, Hiatt J. Colour text book of histology. Philadelphia:W.B. Saunders Company; 1997.
30. Eşrefoğlu M. Genel ve özel histoloji. Ankara: Pelikan Tıp Ve Teknik Kitapçılık; 2004.
31. Solomon EP. (Çev.: Süzen LB) İnsan anatomisi ve fizyolojisine giriş. İstanbul: Birol Basın Yayın Dağıtım; 2000.
32. Sternberg SS. Histology for pathologist. Lippincott-Raven. New York; 1997.
33. Gordon I, Lu KH. Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. Theriogenology. 1990; 33: 77-87.
34. 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.
35. Abraham L. Kierszenbaum, Histoloji ve hücre biyolojisi patolojiye giriş. Ankara: Palme yayıncılık; 2006.
36. Gondos B, Zamboni L. Ovarian development: the functional importance of germ cell interconnections. Fertil Steril. 1969; 20:176–189
37. 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.
38. Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. PNAS. 2002; 5: 99, 2890–2894
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. Demir R. İnsanın gelişimi ve implantasyon biyolojisi, Ankara:Palme yayıncılık; 1995.
43. Frascini F, Demartini G, Esposti D. Pharmacology of Silymarin. *Clin Drug Invest.* 2002;22(1):51-65.
44. Hurk R, Bevers MM, Beckers JF. In vivo and in vitro development of preantral follicles. *Theriogeneology.* 1997; 47: 73-82.
45. Gruijters MJ, Visser JA, Durlinger AL, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone and its role in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol.* 2003; 211:(1-2):85-90.
46. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev.* 2000; 21,200–214.
47. 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.
48. 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.
49. Jamnongjit M, Hammes SR. Oocyte maturation: the coming of age of a germ cell. *Semin Reprod Med.* 2005;23: 234-241.
50. Dissen GA, Romero C, Hirshfield AN, Ojeda SR. Nevre growth factor is required for early follicular development in the mamalian ovary. *Endocrinology.* 2001;(142):2078-2086.
51. 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.
52. Öktem Ö, Oktay K. The ovary anatomy and function throughout human life. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2008;1127: 1-9.

53. 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.
54. 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 : 531–535.
55. Miyano T. In Vitro Growth Of Mammalian Oocytes. *J Reprod Dev.* 2005;51(2):169-176.
56. Kezele P, Nilsson EE, Skinner MK. Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary transition. *Biology of Reproduction.* 2005;73: 967-973.
57. 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.
58. 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.
59. Lawrence TS, Dekel N, Beers WH. Binding of human chorionic gonadotropin by rat cumulus oophorus and granulosa cells: a comparative study. *Endocrinology.* 1980;106: 1114-1118
60. Erben T. Temel histoloji. Ankara: Güneş Kitabevi;1990
61. 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
62. Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms, *Human Reproduction Update.* 2005;11; 162–178
63. Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh AJ. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology.* 1991; 129:2799–2801

64. Driancourt MA, Fair T and Reynaud K. Oocyte apoptosis: when, how, why?. *Contracept Fertil Sex.* 1998; 26:522–527
65. 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
66. Tilly JL. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2:838–848
67. Sugino N, Suzuki T, Kashida S, Karube A, Takiguchi S, Kato H. Expression of Bcl-2 and Bax in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy: regulation by human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85:4379–4386
68. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; 26: 239–257
69. Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *Journal of Pathology.* 1984;142:67-77
70. Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *British Medical Bulletin.* 1997;53:451-465
71. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000;407:784–811.
72. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 1992;119:493–501.
73. 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.
74. Vaskivuo TE, Tapanainen JS. Apoptosis in the human ovary. *Reprod Biomed Online.* 2003; 6:24–35.
75. 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.

76. Devine PJ, Payne CM, McCuskey MK, Hoyer PB. Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. *Biol Reprod.* 2000;63:1245–1252.
77. Monniaux D. Oocyte apoptosis and evolution of ovarian reserve. *Gynecol Obstet Fertil.* 2002;30:822–826.
78. White MK, Cinti C. A morphologic approach to detect apoptosis based on electron microscopy. *Methods Mol Biol.* 2004;285:105–111.
79. Otsuki Y, Li Z, Shibata MA. Apoptotic detection methods—from morphology to gene. *Prog Histochem Cytochem.* 2003;38:275–339.
80. Gurtu V, Kain SR, Zhang G. Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Anal Biochem.* 1997;251:98–102.
81. Mc Kinlay S, Biagano NL, Mc Kinlay JB. Smoking and age at menopause. *Ann Intern.* 1985;103: 350.
82. Midgette AS, Baron JA. Cigarette smoking and the risk of natural menopause. *Epidemiology.* 1990;1; 474.
83. Dennerstein L, Lehert P, Burger H, Dudley E, Factors affecting sexual functioning of women in the midlife years. *Climacteric.* 1999;2(4):254-262.
84. Coulam CB, Adamson DC, Annegers JF. Incidence of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol.* 1986;67: 60.
85. Luborsky JL, Meyer P, Sowers MF, Gold EB, Santoro N. Premature menopause in a multiethnic population study of the menopause transition. *Hum Reprod.* 2002;18:199–206.
86. Anasti JN. Premature ovarian failure: an update. *Fertil Steril.* 1998;70:1–15 .
87. Shawker LM, Merriam TH. Occult follicular development in patient with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure (abstract 693). In programs and abstracts of 72nd annual meeting of Endocrine society. Atlanta. Georgia. 1990.
88. Nelson LM, Anasti JN, Kimzey LM. Development of luteinized graafian follicles in patient with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure. *J. Clin Endocrinol Metab.* 1994: 79:1470-1475

89. Lebovic DI, Naz R. Premature ovarian failure: Think autoimmune disorderf. *Sexuality, Reproduction and Menopause*. 2004; 2(4):230-233 .
90. Petraglia F, Zanin E, Faletti A. Inhibins: Paracrine and endocrine effects in female reproductive function. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 1999; 11:241-247.
91. Van Kasteren YM, Schoemaker J. Premature ovarian failure: a systematic review on therapeutic interventions to restore ovarian function and achieve pregnancy. *Hum Reprod Updat*. 1999;5:483-492.
92. Letur H, Martin-Pont B, Fe' nichel P, GEDO. Spontaneous pregnancies and premature menopause. *Gynecol Obstet Fertil*. 2004; 32:748-755
93. Franco Junior JG, Baruffi RL, Mauri AL, Peterson CG, Campos MS, Oliveira JB. Donation of oocytes as treatment for infertility in patients with premature ovarian failure. *Sao Paulo Medical Journal*. 1994; 112:510 – 516.
94. Kaipa A, Hsueh AJ. Regulation of ovarian follicle aresia. *Annual Review of Physiology*. 1997;59:349-363.
95. Krauss CM, Turksoy RN, Atkins L, McLaughlin C, Brown LG, Page DC. Familial premature ovarian failure due to an interstitial deletion of the long arm of X chromosome. *New England Journal of Medicine*. 1987; 317:125-131
96. Powell CM, Taggart RT, Drumheller TC, Wangsa D, Qian C, Nelson LM. Molecular and cytogenetic studies of an X-autosome translocation in a patient with premature ovarian failure and review of the literature. *American Journal of Medical Genetics*. 1994;52:19-26.
97. Conway GS, Hettiarachchi S, Murray A, Jacobs PA. Fragile X premutation in familial premature ovarian failure. *Lancet*. 1995;346;309-310.
98. Cooper GS, Hulka BS, Baird DD, Savitz DA, Hughes CL Jr, Weinberg CR. Galactose consumption, i metabolism, and follicle stimulating hormone concentrations in women of late reproductive age. *Fertility and Sterility*. 1994;62;1168-1175.

99. Larsen EC, Muller J, Schmiegelow K, Rechnitzer C, Andersen AN. Reduced ovarian function in long term survivors of radiation and childhood cancer *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88: 5307-5314.
100. <http://www.osha.gov/SLTC/healthyguidelines/vinylcyclohexenedioxiderecognition.html>
101. Huff J. Carcinogenicity bioassays of bisphenol A, 4-vinylcyclohexenediepoxyde, and 4-vinylcyclohexene. *Toxicol Sci.*2001;64:282–283.
102. Nat. 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.
103. Nat Toxicol Program, NTP Toxicology and carcinogenesis studies of 4-vinylcyclohexene diepoxyde (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.
104. Flaws JA, Doerr JK, Sipes IG, Hoyer PB. Destruction of preantral follicles in adult rats by 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxyde. *Reproductive Toxicology.* 1994;8(6):509–514.
105. 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.
106. Smith BJ, Mattison DR, Sipes IG. The role of epoxidation in 4-vinylcyclohexene-induced ovarian toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1990;105:372–381 .
107. 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.

108. 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.
109. 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.
110. 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.
111. 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.
112. 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;654: 87-93.
113. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 1999; 6:1028–1042.
114. Thornberry NA. Caspases: a decade of death research. *Cell Death Differ.* 1999;6:1023–1027.
115. Chhabra RS, Elwell MR, Peters A. Toxicity of 4 Vinyl cyclohexene after 13 weeks of dermal or oral exposure in rats and mice. *Fundam Appl Toxicol.* 1990;14(4):745-751.
116. Healy DL, Burger HG, Mamers P. Inhibin: a serum marker of mucinous ovarian cancers. *N Engl J.* 1993;329:1539-1542.
117. Hild-Petito S, West NB, Brenner RM, Stouffer RL. Localization of androgen receptor in the follicle and corpus luteum of the primate ovary during the menstrual cycle. *Biology of Reproduction.* 1991;44: 561-568.

118. Smith BJ, Sipes IG, Stevens JC, Halpert JR. The biochemical basis for the species difference in hepatic microsomal 4-vinylcyclohexene epoxidation between female mice and rats. *Carcinogenesis*. 1990; 11: 1951–1957
119. Hillier SG, Tetsuka M, Fraser HM. Location and developmental regulation of androgen receptor in primate ovary. *Hum Reprod*. 1997;12(1):107-111.
120. Hinshelwood MM, Demeter-Arlotto M, Means GD, Simpson ER. Expression of genes encoding steroidogenic enzymes in the ovary. Findlay JK (ed.) *Molecular Biology of female Reproductive System*. San Diego: Academic Press, Inc. 1994; 129-151.
121. Doerr-Stevens JK, 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.
122. Fontaine SM, Hoyer PB, Sipes IG. Evaluation of hepatic cytochrome P4502E1 in the species-dependent bioactivation of 4-vinylcyclohexene. *Life Sci*. 2001;69:923–934.
123. Devine PJ, Sipes IG, Hoyer PB. Effect of 4 Vinylcyclohexene diepoxide dosing in rats on GSH Levels in Liver and Ovaries. *Toxicological Sciences*. 2001;63:315-320.
124. Cannady EA, Dyer CA, Christian PJ, Sipes IG, Hoyer PB. Expression and Activity of Microsomal Epoxide Hydrolase in Follicles Isolated from Mouse Ovaries *Toxicological Sciences*. 2002;68: 24–31.
125. Cannady EA, Dyer CA, Christian PJ, Sipes IG, Hoyer PB. Expression and Activity of Cytochromes P450 2E1, 2A, and 2B in the Mouse Ovary: The Effect of 4-Vinylcyclohexene and Its Diepoxide Metabolite. *Toxicological sciences*. 2003; 73: 423–430.
126. Keating AF, Sipes IG, Hoyer PB. Expression of ovarian microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase during onset of VCD-induced ovotoxicity in B6C3F1 mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008; 230(1): 109–116.

127. Keating AF, Rajapaksa KS, Sipes IG, Hoyer PB. Effect of CYP2E1 Gene Deletion in Mice on Expression of Microsomal Epoxide Hydrolase in Response to VCD Exposure. *Toxicological Sciences*. 2008; 105(2): 351–359.
128. Keller DA, Carpenter SC, Cagen SZ, Fred A. In vitro metabolism of 4-vinylcyclohexene in rat and mouse liver, lung, and ovary. *Reitman Toxicology and Applied Pharmacology*. 1997;144: 36–44.
129. Doerr JK, Hooser SB, Smith BJ, Sipes IG. Ovarian toxicity of 4-vinylcyclohexene and related olefins in B6C3F1 mice: role of diepoxides. *Chem Res Toxicol*. 1995; 8:963–969.
130. Appt SE, Kaplan JR, Clarkson TB, Cline JM, Christian PJ, Hoyer PB. Destruction of primordial ovarian follicles in adult cynomolgus macaques after exposure to 4-vinylcyclohexene diepoxide: a nonhuman primate model of the menopausal transition. *Fertil Steril*. 2006; 86(4):1210-1216.
131. Smith BJ, Sipes IG. Epoxidation of 4-vinylcyclohexene by human hepatic microsomes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1991;109:367–371.
132. Smith BJ, Carter DE, Sipes IG. Comparison of the disposition and in vitro metabolism of 4-vinylcyclohexene in the female mouse and rat. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1990; 105:364–371.
133. Borman SM, Christian PJ, Sipes IG, Hoyer PB. Ovotoxicity in female fischer rats and B6 mice induced by low dose exposure to three Polycyclic aromatic hydrocarbons: Comparison through calculation of an ovotoxic index. *Toxicology and applied pharmacology*. 2000;167:191-198.
134. Bevan C, Stadler JC, Elliot GS, Frame SR, Baldwin JK, Leung HW, Moran E, Panepinto AS. Subchronic toxicity of 4 Vinylcyclohexene in rats and mice by inhalation exposure. *Fundam Applied Toxicol*. 1996; 32:1-10.
135. 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.

136. 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.
137. 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.
138. 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.
139. Flaws JA, Marison SL, Miller KP, Christian PJ, Babus JK, Hoyer PB. Effect of bcl-2 overexpression in mice on ovotoxicity caused by 4-vinylcyclohexene. *Toxicology and applied pharmacology.* 2006;(215):51-56.
140. 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
141. 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.
142. 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.
143. Devine PJ, Sipes IG, Hoyer PB. Initiation of delayed ovotoxicity by in vitro and in vivo exposures of rat ovaries to 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Reprod Toxicol.* 2004; 19:71–77.
144. Mayer LP, Devine PJ, Dyer CA, Hoyer PB. The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. *Biology of Reproduction.* 2004;71:130-138.

145. Rivera Z, Christian PJ, Marion SL, Brooks HL, Hoyer PB. Steroidogenic capacity of residual ovarian tissue in 4-vinylcyclohexene diepoxide-treated mice. *Biol Reprod.* 2009;80(2):328-36.
146. 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.
147. 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.
148. Terutaka Kodama, Junichi Yoshida, Tadashi Miwa, Daiki Hasewaga, Takeshi Masuyama . Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity Effects of fertility study of 4- vinylcyclohexene diepoxide in female rats. *The Journal of Toxicological Sciences* 2009; 34(1):59-63
149. Haas JR, Christian PJ, Hoyer PB. Effects of Impending Ovarian Failure Induced by 4-Vinylcyclohexene Diepoxide on Fertility in C57BL/6 Female Mice. *Comp. Med.* 2007;57(5):443-449.
150. Thompson KE, Sipes IG, Greenstein BD, Hoyer PB. 17 β Estradiol Affords Protection against 4-Vinylcyclohexene Diepoxide-Induced Ovarian Follicle Loss in Fischer-344 Rats. *Endocrinology.* 2002;143(3):1058-1065.
151. 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.
152. 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.
153. Schauwecker PE, Wood RI, Lorenzana A. Neuroprotection against excitotoxic brain injury in mice after ovarian steroid depletion. *Brain Research.* 2009;1265:37-46.

154. Acosta JI, Mayer L, Talboom JS, Tsang CW, Smith CJ, Enders CK, Bimonte-Nelson HA. Transitional versus surgical menopause in a rodent model: Etiology of ovarian hormone loss impacts memory and the acetylcholine system. *Endocrinology*. 2009; Epub ahead of print.
155. 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.
156. Wright LE, Christian PJ, Rivera Z, Van Alstine WG, Funk JL, Bouxsein ML, Hoyer PB. Comparison of skeletal effects of ovariectomy versus chemically induced ovarian failure in mice. *J Bone Miner Res*. 2008;23(8):1296-1303.
157. 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.
158. Orentreich N. Age and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *J. Clin. Endocrinol Metab*. 1984;59:551-555
159. 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
160. Bird CE. Dehydroepiandrosterone sulfate: kinetics of metabolism in normal young men and women. *Clin. Invest. Med*. 1984; 7: 119–122.
161. 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.
162. Labrie F. Intracrinology. *Mol. Cell. Endocrinol*. 1991;78:113–118.
163. 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.
164. Arlt W. Biotransformation of oral dehydroepiandrosterone in elderly men: significant increase in circulating estrogens. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999; 84: 2170–2176.
165. 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;110:112-119.
166. Young J. Panhypopituitarism as a model to study the metabolism of dehydroepiandrosterone (DHEA) in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997;82: 2578–2585.
167. Giagulli VA. Precursors of plasma androstenediol- and androgen-glucuronides in women. *J. Steroid Biochem.* 1989;33: 935–940
168. 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.
169. Bergeron R, de Montigny C , Debonnel G. Potentiation of neuronal NMDA response induced by dehydroepiandrosterone and its suppression by progesterone: effects mediated via sigma receptors. *Journal of Neuroscience.* 1996; 16: 1193–1202.
170. 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.
171. 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.
172. Okabe, T. Up-regulation of highaffinity dehydroepiandrosterone binding activity by dehydroepiandrosterone in activated human T lymphocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1995;80: 2993–2996

173. Newmeyer DD, Bossy-Wetzel E, Kluck RM, Wolf BB, Beere HM, Green DR. Bcl-xL does not inhibit the function of Apaf-1. *Cell Death Differ.* 2000;7:402–407.
174. Williams MR. Dehydroepiandrosterone inhibits human vascular smooth muscle cell proliferation independent of ARs and ERs. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87: 176–181.
175. Barrett-Connor E, Khaw KT, Yen SS. A prospective study of dehydroepiandrosterone sulfate, mortality, and cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine.* 1986; 315: 1519–1524.
176. Barrett-Connor E, Khaw KT. Absence of an inverse relation of dehydroepiandrosterone sulfate with cardiovascular mortality in postmenopausal women. *New England Journal of Medicine.* 1987; 317: 711.
177. Trivedi DP, Khaw KT. Dehydroepiandrosterone sulfate and mortality in elderly men and women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2001; 86: 4171–4177.
178. Ravaglia G, Forti P, Maioli F. The relationship of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) to endocrine-metabolic parameters and functional status in the oldest-old. Results from an Italian study on healthy free-living over-ninety-year-olds. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 1996; 81: 1173–1178.
179. Deighton CM, Watson MJ, Walker DJ. Sex hormones in postmenopausal HLA-identical rheumatoid arthritis discordant sibling pairs. *Journal of Rheumatology.* 1992;19:1663–1667.
180. Parker LN, Levin ER, Lifrak ET. Evidence for adrenocortical adaptation to severe illness. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 1985; 60: 947–952.
181. 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 β -cell mass and improves the glucose induced insulin secretion by pancreatic islets from aged rats. *FEBS Letters* 2006; 580: 285-290.

182. Turkmen S, Backstrom T, Idil M. Reduction of dehydroepiandrosterone sulfate synthesis in women with polycystic ovarian syndrome by human menopausal gonadotropin but not purified urinary follicle stimulating hormone: a comparative pilot study. *Gynecol Endocrinol*, 2004; 19(2):69-78.
183. Arlt W, Callies F, van Vlijmen JC. Dehydroepiandrosterone replacement in women with adrenal insufficiency. *New England Journal of Medicine*. 1999; 341: 1013–1020.
184. Callies F, Fassnacht M, van Vlijmen JC. Dehydroepiandrosterone replacement in women with adrenalinsufficiency: effects on body composition, serum leptin, bone turnover, and exercise capacity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2001;86:1968–1972.
185. Hunt PJ, Gurnell EM, Huppert FA. Improvement in mood and fatigue after dehydroepiandrosterone replacement in Addison's disease in a randomized, double blind trial. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2000; 85: 4650–4656.
186. Morales AJ, Nolan JJ, Nelson JC, Yen SS. Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1994; 78: 1360–1367
187. Schmidt KL, Kryger-Baggesen N, Byskov AG, Andersen CY. Anti- Mullerian hormone initiates growth of human primordial follicles in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 234:87–93.
188. Wolkowitz OM, Reus VI, Keebler A. Double-blind treatment of major depression with dehydroepiandrosterone. *American Journal of Psychiatry*. 1999; 156: 646 649.
189. Wolkowitz OM, Kramer JH, Reus VI. DHEA treatment of Alzheimer's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Neurology*. 2003; 60: 1071–1076.
190. Liu Y, Pocivavsek A, Papadopoulos V. Dehydroepiandrosterone formation is independent of cytochrome p450 17 alfa hydroxylase/17-20 lyase avctivity in

- LJ, Smith GE, Khosla S, Jensen MD. DHEA in elderly women and DHEA or testosterone in elderly men. *The New England Journal of Medicine*. 2006; 355(16): 1647-1659.
199. Sulcova J, Hill M, Hampl R, Masek Z, Novacek A, Ceska R, Starka L. Effects of transdermal application of DHEA on the levels of steroids, gonadotropins and lipids in men. *Physiol Res*. 2000; 49: 685-693
200. Morales AJ, Haubrich RH, Hwang JY, Asakura H, Yen SSC. The effect of six months treatment with a 100 mg daily dose of dehydroepiandrosterone (DHEA) on circulating sex steroids, body composition, and muscle strength in age-advanced men and women. *Clin Endocrinol*. 1998;49:421-432
201. Thomas N, Morris HA, Scopacassa F, Wishart JM, Need AG. Relationship between age, dehydroepiandrosterone sulphate and plasma glucose in healthy men. *Age and Ageing*. 1999;28:217-220
202. Lasco A, Frisina N, Morabito N, Gaudio A, Morini E, Trifiletti A, Basile G, Nicita-Mauro V, Cucinotta D. Metabolic effects of dehydroepiandrosterone replacement therapy in postmenopausal women, *European Journal of Endocrinology*. 2001; 145: 457-461.
203. Labrie F, Diamond P, Cusan L, Gomez JL, Be' Langer A, Candas B. Effect of 12-month dehydroepiandrosterone replacement therapy on bone, vagina, and endometrium in postmenopausal women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1997; 3498-3507.
204. Wang YD, Wang L, LiDJ, Wang WJ. Dehydroepiandrosterone inhibited the bone resorption through the upregulation of OPG/RANKL. *Cell Mol Immunol*. 2006;3(1):41-45.
205. Yapanoglu T, Aksoy Y, Gursan N, Ozbey I, Ziypak T, Calik M. Antiapoptotic effects of dehydroepiandrosterone on testicular torsion/detorsion in rats. *Andrologia*. 2008; 40,:38-43.
206. Aksoy H, Yapanoglu T, Aksoy Y, Özbey I, Turhan H, Gursan N. Dehydroepiandrosterone treatment attenuates reperfusion injury after testicular torsion and detorsion in rats. *J Pediatr Surg*. 2007;42:1740-1744.

207. Labrie F, Archer D, Bouchard C, Fortier M, Cusan L, Gomez JL, Girard G, Baron M, Ayotte N, Moreou M, Dube R, Cote I, Labrie C Lavoie L, Berger L, Gilbert L, Martel C, Balser J. Intravajinal dehydroepiandrosterone (prasterone), the physiological and a highly efficient treatment of vaginal atrophy. *Menopause*. 2009;16(5):907-922
208. Labrie F, Archer D, Bouchard C, Fortier M, Cusan L, Gomez JL, Girard G, Baron M, Ayotte N, Moreou M, Dube R, Cote I, Labrie C Lavoie L, Berger L, Gilbert L, Martel C, Balser J. Intravajinal dehydroepiandrosterone (prasterone). On libido and sexual dysfunction in postmenopausal women. *Menopause*. 2009;16 (5):923-931
209. 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: 67-80.
210. Sourla A, Flamand M, BeÂlanger A, Labrie FJ. Effect of Dehydroepiandrosterone on Vaginal and Uterine Histomorphology in the Rat. *Steroid Biochem. Molec. Biol*. 1998;66(3):137-149.
211. Pelletier G, Li S, Luu-The V, Tremblay Y, B elanger A, Labrie F. Immunoelectron microscopic localization of three key steroidogenic enzymes (cytochrome P450_{scc}, 3_ -hydroxysteroid dehydrogenase and cytochrome P450_{c17}) in rat adrenal cortex and gonads. *Journal of Endocrinology*. 2001; 171: 373–383.
212. Van Werden WM, Bierings HG, van Steenbrugge GJ, de Jong FH, Schr oder FH. Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens. *Life Sciences*. 1992; 50(12); 857-861
213. 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.
214. 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;167: 465–471
215. Mahesh VB, Greenblatt RB. Isolation of dehydroepiandrosterone and 17 α -hydroxy Δ 5-pregnenolone from the polycystic ovaries of the Stein Levanthal syndrome. *J Clin Endocrinol & Metab*. 1962;22:441-448.
216. Mahesh VB, Dhindra DS., Anderson E, Kalra SP. Animal models for study of polycystic ovaries and ovarian atresia. In: *Regulation of ovarian and testicular function*. Plenum. 1987;237-258.
217. 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
218. Götz F, Pfeiffer U, Rohde W, Dörner G. Influence of neonatally administered dehydroepiandrosterone on reproduction of rats. *Endocrinol Exp*. 1983;17:(1):11-15.,
219. Futterwert W. *Polycystic ovarian disease*. Springer & Verlag New York. 1984
220. 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.
221. Anderson E, Lee MT, Lee G. Cystogenesis of the ovarian antral follicle of the rat: Ultrastructural changes and hormonal profile following the administration of dehydroepiandrosterone. *Anat. Rec*. 1992; 234:359-382.
222. 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.
223. 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.
224. 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.
225. 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.
226. 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.
227. Yan Z, Lee GY, Anderson E. Influence of Dehydroepiandrosterone on the Expression of Insulin-Like Growth Factor-1 during Cystogenesis in Polycystic Rat Ovaries and in Cultured Rat Granulosa Cells. *Biology Of Reproduction*. 1997;57:1509-1516.
228. ELBeltagy K, Honda K, Ozaki K, Misugi T, Tokuyama O, Kimura M, Kira Y, Ishiko O. In vitro effect of dehydroepiandrosterone sulfate on steroid receptors, aromatase, cyclooxygenase-2 expression, and steroid hormone production in preovulatory human granulosa cells. *Fertility and Sterility*. 2007;88(2):1135-1142.
229. Henmi H, Endo T, Nagasawa K, Hayashi T, Chida M, Akutagawa N, Iwasaki M, Kitajima Y, Kiya T, Nishikawa A, Manase K, Kudo R. Lysyl oxidase and MMP-2 expression in dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovary in rats. *Biol Reprod*. 2001;64(1):157-162.
230. 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.

231. Shinohara H, Okoyama S, Akasofu K, Nishida E. Influences of dehydroepiandrosterone acetate on ovarian oocytes in mature cycling rats *Experientia*. 1980;15:1329-30.
232. 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.
233. Elia EM, Belgorosky D, Faut M, Vighi S, Pustovrh C, Luigi D, Motta AB. The effects of metformin on uterine tissue of hyperandrogenized BALB/c mice. *Molecular Human Reproduction*. 2009;15(7):421-432.
234. Parshad RK, Bath BK. Cystogenesis of antral follicles induced by dehydroepiasterone (DHEA) stimulates mast cell proliferation and maturation in the house rat (*Rattus rattus*) OVARY. *Indian J Exp Biol*. 1999;37(9):933-5.
235. Nephew KP, Osborne E, Lubet RA, Grubbs CJ, Khan SA. Effects of oral administration of Tamoxifen, Toremifene, Dehydroepiandrosterone and Vorozole on uterine histomorphology in the rat. (44493). *P.S.E.B.M* . 2000; 223;288-294.
236. Elia E, Vighi S, Lombardi E, BeatrizMotta A. Detrimental effects of hyperandrogenism on uterine functions. *Internal Immunopharmacology*. 2008;8:1827-1834
237. Mandal D, Mazumder A, Das P, Kundu M, Basu J. Fas-, caspase-8-, and caspase-3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *J Biol Chem*. 2005;280:39460–39467.
238. Sander V, Solano ME, Elia E, Luchetti CG, Di Girolamo G, Gonzalez C, Motta AB. The influence of dehydroepiandrosterone on early pregnancy in mice. *Neuroimmunomodulation*. 2005;12(5):285-292
239. Solano ME, Elia E, Luchetti CG, Sander V, DiGirolamo G, Gonzalez C, Motta AB. Metformin prevents embryonic resorption induced by

- hyperandrogenisation with dehydroepiandrosterone in mice. *Reprod Fertil Dev.* 2006;18(5):533-544.
240. Casson PR, Kristansen SB, Umstot E, Carson SA, Buster JE. Ovarian hyperstimulation augments adrenal dehydroepiandrosterone sulfate secretion. *Fertil Steril.* 1996;65(5):950-953.
241. 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. 2001 Nov;142(11):4930-6
242. Frattanelli JC, Petersen EH. Effect of androgen levels on in vitro fertilization cycles. *Fertility and Sterility.* 2004; 81(6):1713-1715.
243. Castracane VD, Stewart DR, Gimpel T. Maternal serum androgen in human pregnancy: early increases within the cycles of conception. *Hum Reprod.* 1998; 13; 460-464.
244. Rein M, Jackson K, Sable D. Dexamethasone during ovulation induction for in vitro fertilization: a pilot study. *Hum Reprod.* 1996; 11:253-255.
245. Trotty E, Plouffe L, Hansen K. Ovulation induction in clomiphene resistant anovulatory women with normal dehydroepiandrosterone sulfate levels: beneficial effects of the addition of dexamethasone during follicular phase. *Fertil Steril.* 1996; 66: 484-486.
246. Barad DH, Gleicher N. Increased oocyte production after treatment with dehydroepiandrosterone. *Fertility and Sterility.* 2005;84-3:756.-756.
247. Barad D, Brill H, Gleicher N. Update on the use of dehydroepiandrosterone supplementation among women with diminished ovarian function. *J Assist Reprod Genet.* 2007 ; 24:629-634.
248. Maams L, Mamas E. Premature ovarian failure and dehydroepiandrosterone. *Fertility and Sterility.* 2009;91(2);644-646.
249. Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Bélanger A, Simard J, Lin SX. Endocrine and intracrine sources of androgens in women: inhibition of breast cancer and other

- roles of androgens and their precursor dehydroepiandrosterone. *Endocrine Reviews*. 2003;24:152–182.
250. Acacio BD, Stanczyk FZ, Mullin P, Saadat P, Jafarian N, Sokol RZ. Pharmacokinetics of dehydroepiandrosterone and its metabolites after long-term daily oral administration to healthy young men. *Fertil Steril*. 2004;81(3):595-604.
251. Dyner TS, Lang W, Geaga J, Golub A, Stites D, Winger E, Galmarini M, Masterson J, Jacobson MA. An open-label dose-escalation trial of oral dehydroepiandrosterone tolerance and pharmacokinetics in patients with HIV disease. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1993;6(5):459-65.
252. Hartkamp A, Geenen R, Godaert GL, Bijl M, Bijlsma JW, Derksen RH. The effect of dehydroepiandrosterone on lumbar spine bone mineral density in patients with quiescent lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2004;50:3591-95.
253. Vn Vollenhoven RF, Park JL, Genovese MC, West JP, McGuire JL. A double-blind, placebo-controlled, clinical trial of dehydroepiandrosterone in severe systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 1999;8:181-187
254. Wolf OT, Neumann E, Hellhammer DH. Effects of a two-week physiological dehydroepiandrosterone substitution on cognitive performance and well-being in healthy elderly women and men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1997; 82: 2363–2367
255. 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.
256. Diamond P, Cusan L, Gomez JL, Be'langer A, Labrie F. Metabolic effect of 12-month percutaneous dehydroepiandrosterone replacement therapy in postmenopausal women. *Journal of Endocrinology*. 1996;150:43–50.
257. Mortola JF, Yen SC. The effects of oral dehydroepiandrosterone on endocrine-metabolic parameters in postmenopausal women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1990;71:696–704.

258. Abbassi A, Duthie EH Jr, Sheldahl L, Wilson C, Sasse E, Rudman I. Association of dehydroepiandrosterone sulfate, body composition, and physical fitness in independent community-dwelling older men and women. *Journal of the American Geriatric Society*. 1998;46:263–273
259. Haffner SM, Mykkaˆnen L, Valdez RA & Katz MS. Relationship of sex hormones to lipids and lipoproteins in nondiabetic men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1993; 77: 1610–1615.
260. Buffington CK, Givens JR, Kitabchi AE. Opposing actions of dehydroepiandrosterone and testosterone on insulin sensitivity. In vivo and in vitro studies of hyperandrogenic females. *Diabetes*. 1991;40 693–700.
261. Contoreggi CS, Blackman MR, Andres R, Muller DC, Lakatta EG, Fleg JL. Plasma levels of estradiol, testosterone, and DHEAS do not predict risk of coronary artery disease in men. *Journal of Andrology*. 1990;11:460–470.
262. Newcomer LM, Manson JE, Barbieri RL, Hennekens CH, Stampfer MJ. Dehydroepiandrosterone sulfate and the risk of myocardial infarction in US male physicians: a prospective study. *American Journal of Epidemiology*. 1994;140:870–875.
263. Karp G, Bentov Y, Masalha R, Ifergane G. Onset of late posttraumatic seizure after dehydroepiandrosterone treatment. *Fertil and Steril*. 2009;91(3);931.
264. Jick H, Porter J, Morrison AS. Relation between smoking and the age of natural menopause. *Lancet*. 1977;1:1354-1355
265. Sato M, Shiozawa K, Uesugi T, Hiromatsu R, Fukuda M, Kitaura K, Minami T, Matsumoto S. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity 7 Effects of 2 or 4 week repeated dose studies and fertility study of cyclophosphamide in female rats. *The Journal of Toxicological Sciences*. 2009;34 (1):83-89
266. 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
267. P.B. Hoyer, J.R. Davis , J.B. Bedrnicek , S.L. Marion , P.J. Christian , J.K. Barton , M.A.Brewer Ovarian neoplasm development by 7,12-dimethylbenz[a]

- anthracene (DMBA) in a chemically-induced rat model of ovarian failure. *Gynecologic Oncology* 112 (2009) 610–615
268. Çelik M. Sıçanlarda 4-Vinylcyclohexene Diepoxide (VCD) İle Oluşturulan Deneysel Prematür Over Yetmezliği'ne Silymarin'in Etkisi. *Histoloji ve Embryoloji Anabilin Dalı Yüksek Lisans Tezi*. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir 2009.
269. 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.
270. Melissa J Romero- Aleshire, Maggie K. Diamond-Stanic, Alyssa H. Hasty, Patricia B. Hoyer, Heddwen L. Brooks. Loss of ovarian function in VCD mouse model of menopause leads to insulin resistance and rapid progression into metabolic syndrome. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 2009; 297: 587-592
271. Guidice LC, Insulin like growth factors and ovarian follicular development. *Endocrinol Rev.* 1992;13: 641-69
272. 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.
273. 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
274. 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
275. 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.
276. 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

277. 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
278. 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
279. Brodowska A, Laszczyinka M, Starczewski A. Apoptosis in ovarian cells in postmenopausal women. *Folia Histochemica et Cytobiologica.* 2007;45(2):99-105
280. Mahesh VB, Greenblatt RB, Scholer HFL, Ellegood JO. Steroid and gonadotropin secretion in the polycystic ovary syndrome. *Recent Adv Endocrinol Excerpta Medical International Congress Series No.* 1970;238:160-167
281. Knudsen JF, Costoff A, Mahesh VB. Dehydroepiandrosterone induced polycystic ovaries and acyclicity in the rat. *Fertil Steril.* 1975; 26:807- 817
282. Knudsen JF, Mahesh VB. Initiation of precocious sexual maturation in the immature rat treated with dehydroepiandrosterone. *Endocrinology.* 1975; 97:458-468
283. Futterweit W, Weis RA, Fagerstrom RM. Endocrine evaluation of forty female to male transsexuals:increased frequency of polycystic ovarian disease in female transsexualism. *Arch Sex Behav .*1986;15(1):69-78
284. Coney P, Yoshimura Y, Hosoi Y, Bongiovanni A, Wallach E. Effect of aromatase inhibitors on the histology of the cycling rat ovary. 1987;23(3):177-83
285. Eroschenko VP, Abuel-Atta AA, Grober MS. Neonatal exposures to technical methoxychlor alters ovaries in adult mice. *Reproductive Toxicology.* 1995; 9: 379–387.
286. Maurique P, Martel C, Langin D, Lacaille M, Despres JP, Belanger A, Labrie F, Deshaies Y. Chronic effects of dehydroepiandrosterone on rat adipose tissue metabolism. *Metabolism.* 2003 52(3):264-72

287. Taniquichi S, Yanase T, Haji M, Ishibashi K, Trakayanagi R, Nawata H. The antiobesity effect of dehydroepiandrosterone in castrated or non castrated obese Zucker male rats. *Obes Res*1995;Suppl 5;639-643.
288. 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
289. 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.
290. Chapin RE, Harris MW, Davis BJ, Ward SM, Wilson RE, Mauney MA, Lockhart AC, Smialowicz RJ, Moser VC, Burka LT. The effects of perinatal/juvenile methoxychlor exposure on adult rat nervous, immune, and reproductive system function. *Fundamental and Applied Toxicology* 1997;40: 138–157.
291. Billig H, Furutas I, Aaron JW. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology*. 1993;133: 2204-2212
292. Uzumcu M, Kuhn PE, Marano JE, Armenti AME, Kuttenn LPF, Misrahi M, Touraine P. Early postnatal methoxychlor exposure inhibits folliculogenesis and stimulates anti-Mullerian hormone production in the rat ovary. *Human Reproduction*. 2007; 22(1): 117–123.
293. Louise M, Stefan C, Malin L, Elisabet SV. Acupuncture and exercise restore adipose tissue expression of sympathetic markers and improve ovarian morphology in rats with dihydrotestosterone-induced PCOS *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 296: 1124–1131.
294. Camilla. A, Elisabet SV, Joel K, Staffan N, Max Levin, Stefan C, Lars L, Malin L, Agneta H. A Single early postnatal estradiol injection affects morphology and gene expression of the ovary and parametrial adipose tissue in adult female rats. *J of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. Article in Press

295. Zhaoping L, Xiaopeng Z, Li L, Wenning Cui, Yan S, Wei W, Xudong J, Ning L, Weixing Y. Effects of lactational exposures to soy isoflavones on reproductive system in neonatal female rats. *Basic and Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2007; 102:317-324.
296. Ward RC, Costoff A, Mahesh VB. The induction of polycystic ovaries in mature cycling rats by the administration of dehydroepiandrosterone (DHA). *Biology Of Reproduction* 1978;18:614-623
297. Hipkin LJ. The effect of corticotrophin on the rat uterine weight response to human chorionic gonadotropin by various steroids. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1974; 75:141-147.
298. 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
299. 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
300. Borgeest C, Symonds D, Mayer LP, Hoyer PB, Flaws JA. Methoxychlor may cause ovarian follicular atresia and proliferation of the ovarian epithelium in the mouse. *Toxicological Sciences*. 2002;68 473–478.
301. 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
302. 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
303. Ikeda Y, Nagai A, Ikeda MA, Hayashi S. Neonatal estrogen exposure inhibits steroidogenesis in the developing rat ovary. *Developmental Dynamics*. 2001 ;221: 443–453

304. 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
305. Vendola KA, Jian Zhou, Oluyemisi O. Adesanya, Stacie J. Weil, and Carolyn A. Bondy Androgens Stimulate Early Stages of Follicular Growth in the Primate Ovary. *The Journal of Clinical Investigation* 1998;101(12): 2622–2629
306. Vendola KA, Zhou J, Adesanya OO, Weil SJ, Bondy CA. Androgens stimulate early stages of follicular growth in primate ovary. *J Clin Invest* 1998; 101:2622-2629.
307. 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
308. 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
309. Quirk SM, Cowan RG, Joshi SG. Henriks₁-on KP: Fas antigen mediated apoptosis in human ggranulosa/luteal cells. *Biol Reprod*. 1995;52;279-287.
310. Tsafiriri A, Braw RH. Experimental approaches to atresia in mammals. *Oxf Rev Reprod*. 1984;6:226-265.
311. 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 Investigatrion*. 2006;61:208-215
312. 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

313. Leskiewicz M, Jantas D, Budziszewska B, Lason W. Excitatory neurosteroids attenuate apoptotic and excitatory cell death in primary cortical neurons. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2008; 59(3):457-475.
314. 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- 121
315. Liu D, Si H, Reynolds KA, Zhen W, Jia Z, Joseph S. Dehydroepiandrosterone protects vascular endothelial cells against apoptosis through a g alfa i protein-dependent activation of phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and regulation of antiapoptotic Bcl-2 expression dillon. *Endocrinology*. 2007;148(7):3068–3076
316. Bastien NP, Baldo F, de Lacharriere O. Effects of topical DHEA on aging skin: a pilot study, *Maturitas*. 2008;59:174–181
317. Alexaki VA, Charalampopoulos I, Panayotopoulou M, Kampa M, Gravanis A, Castanas E. Dehydroepiandrosterone protects human keratinocytes against apoptosis through membrane binding sites.*Experimental cell research* 2009;315:2275-2283
318. Stubbs SA, Stark J, Dilworth SM, Franks S, Hardy K Abnormal preantral folliculogenesis in polycystic ovaries is associated with increased granulosa cell division *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92:4418-4426.
319. Anderson E, Lee GY. The effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and its metabolites on polycystic ovarian condition (PCO): cystogenic changes of rat granulosa cells in vitro. *Tissue and Cell*. 1996; 28(6):673-685
320. 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
321. Casson PR, Lidsay MS, Pisarska MD, Carson SA, Buster JE. Dehydroepiandrosterone supplementation augments ovarian stimulation in poor responders: a case series. *Human Reproduction* 2000; 15(10): 2129-2132

322. 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.
323. Hsueh AJ, Billig H, Tsafiriri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev.* 1994 ;15:707– 724
324. Vaskivuo TE, Tapanainen JS. Apoptosis in the human ovary . *Reprod Biomed Online*, 2003; 64; 82-84
325. Keating AF, Connie CM, Nivedita S, Sipes IG, Hoyer PB. Effect of phosphatidyl 3 kinase inhibition on ovotoxicity caused by 4 Vinyl cyclohexene diepoxide and 7-12 dimethyl benz(a)anthracene in neonatal rat ovaries. *Toxicol. Appl. Pharmacology Applied.* 2009;241:127-134.
326. Hoyer PB, Devine PJ, Hu X, Thompson KE, SipesIG. Ovarian toxicity of 4-vinylcyclohexene diepoxide: a mechanistic model. *Toxicol. Pathol.* 2001;29: 91–99
327. Mari S Gloub, Stacey L Germann, Mary Mercer, Marcia N. Gordon, David G Morgan, Loretta P. Mayer, Patricia B. Hoyer. Behavioral consequences of ovarian atrophy and estrogen replacement in the APPswe Mouse. *Neurobiology of Aging* 2008;29:1512-1523
328. Thompson KE, Bourguet SM, Christian PJ, Benedict JM, Flaws JA, Sipes IG, Hoyer PB. Differences between rats and mice in the role of the aryl hydrocarbon receptor in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovarian follicle loss. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005; 203:114–123
329. 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
330. Matkainean T, Perez GI, Zhen TS, Kluzak TR, Rueda BR, Flavell RA, Tilly JL.; Caspase3 gene knock out defines cell lineage spesifity for programmed cell death signaling in the ovary. *Endocrinology*2001;142;2468-2480

331. 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.
332. 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
333. 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
334. Kang, J.S., Jeon, Y.J., Park, S.K., Yang, K.H. at Kim, H.M., Protection against lipopolysaccharide-induced sepsis and inhibition of interleukin- 1 β and prostaglandin E2 synthesis by silymarin, *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 175–181.
335. Katiyar SK, Korman NJ, Mukhtar H, Agarwal R. Protective effects of silymarin against photocarcinogenesis in a mouse skin model. *J Natl Cancer Inst* 1997;89: 556–66.
336. Fang Chen, Kristin Knecht, Elizabeth Birzin, John Fisher, Hilary Wilkinson, Marina Mojena, Consuela Tudela Moreno, Azriel Schmidt, Shun-ichi Harada, Leonard P. Freedman, Alfred A. Reszka, Direct agonist/ antagonist functions of dehydroepiandrosterone, *Endocrinology* 2005 146(11):4568-4576