

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MORFOLOJİ ANABİLİM DALI  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ  
BİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Prof. Dr. Mehmet KANTER

**İYONİZAN RADYASYONUN NEDEN OLDUĞU  
OVARİAN DOKU HASARINA KARŞI CURCUMİNİN  
KORUYUCU ETKİSİNİN MORFOLOJİK OLARAK  
İNCELENMESİ**

**(Doktora Tezi)**

**Referans no: 388452**

**Cevat AKTAŞ**

EDİRNE – 2010

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MORFOLOJİ ANABİLİM DALI  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ  
BİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Prof. Dr. Mehmet KANTER

**İYONİZAN RADYASYONUN NEDEN OLDUĞU  
OVARİAN DOKU HASARINA KARŞI CURCUMİNİN  
KORUYUCU ETKİSİNİN MORFOLOJİK OLARAK  
İNCELENMESİ**

**(Doktora Tezi)**

**Cevat AKTAŞ**

**Destekleyen Kurum :**

**Tez No :**

**EDİRNE – 2010**

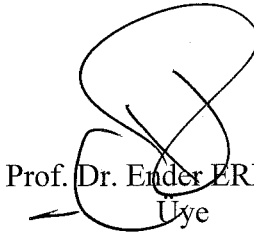
**T.C.**  
**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**  
**Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü**

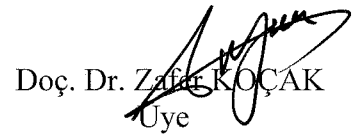
**ONAY**


Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı doktora programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Mehmet KANTER danışmanlığında doktora öğrencisi Cevat AKTAŞ tarafından tez başlığı “İyonizan Radyasyonun Neden Olduğu Ovarian Doku Hasarına Karşı Curcuminin Koruyucu Etkisinin Morfolojik Olarak İncelenmesi” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 09/12/2010 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “**Doktora Tezi**” olarak kabul edilmiştir.

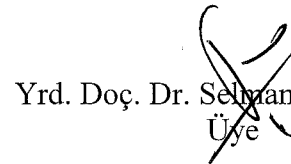


Prof. Dr. Mehmet KANTER  
JÜRİ BAŞKANI

  
Prof. Dr. Ender ERDOĞAN  
Üye

  
Doç. Dr. Zafir KOÇAK  
Üye

  
Yrd. Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ  
Üye

  
Yrd. Doç. Dr. Selçuk ÇIKMAZ  
Üye

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Levent ÖZTÜRK  
Enstitü Müdürü

## TEŐEKKÜR

Eğitimim süresince, yetiŐmemde büyük emeği olan ve benden hiçbir fedakarlığı esirgemeyen sevgili aileme minnettarım. Lisans üstü eğitimim boyunca beni yetiŐtiren, bilgi ve tecrübelerini bana aktaran, çalıŐmam sırasında bilimsel katkıları ve yardımlarını esirgemeyen, danışman hocam sayın Prof. Dr. Mehmet KANTER'e, araŐtırmam süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım sayın hocalarım Doç. Dr Zafer KOÇAK, Yrd. Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ, Yrd. Doç. Dr. Gülnur KIZILAY'a, çalıŐmam boyunca yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Yeliz BOZDEMİR DÖNMEZ, Ferhat CENGİZ, Mustafa ERBOĞA, Duygu UZUN, Uğur DİLEKÇİ ve Soner UYSAL'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa No</b>
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1-2
GENEL BİLGİLER.....	3-10
OVARYUM.....	3-4
İYONİZAN RADYASYON.....	4-7
APOPTOZİS VE FOLİKÜLER ATREZİ.....	7-8
CURCUMİN.....	8-10
PROLİFERE OLAN HÜCRE NÜKLEER ANTİJENİ (PCNA).....	10
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	11-16
İŞİK MİKSROSKOBİK İNCELEME.....	12-13
ATRETİK FOLİKÜLLERİN HİSTOLOJİK ÖZELLİKLERİ.....	13
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME.....	14
TUNEL BOYAMA.....	14-15
BULGULAR.....	17-54
KONTROL GRUBUNA AİT MORFOLOJİK BULGULAR.....	17-23
RADYASYON SONRASI 3 SAAT GRUBUNA AİT MORFOLOJİK BULGULAR.....	24-29
RADYASYON VE CURCUMİN SONRASI 3 SAAT GRUBUNA AİT MORFOLOJİK BULGULAR.....	30-35
RADYASYON SONRASI 12 SAAT GRUBUNA AİT MORFOLOJİK BULGULAR.....	36-41
RADYASYON VE CURCUMİN SONRASI 12 SAAT GRUBUNA AİT MORFOLOJİK BULGULAR.....	42-47
FOLİKÜLER ATREZİ ORANLARI.....	49-54
TARTIŞMA.....	55-60

SONUÇ.....	61
ÖZET.....	62-63
SUMMARY.....	64-65
KAYNAKLAR.....	66-72
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	73-74
ÖZGEÇMİŞ.....	75
EK 1 ETİK KURUL KARARI	

## **SEMBOL VE KISALTMALAR LİSTESİ**

**dk:** Dakika

**DMSO:** Dimetil sülfoksit

**DNA:** Deoksiribo nükleik asit

**Gy:** Gray

**H+E:** Hematoksilen+Eosin

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Hidrojen peroksit

**HO•:** Hidroksil radikali

**HOO•:** Hidroperoksil radikali

**O<sub>2</sub>•:** Süperoksit radikali

**O<sub>2</sub><sup>↑↓</sup>:** Singlet oksijen

**PAS+HL:** Periyodik asit schiff + Hemalen

**PBS :** Fosfat Buffer Solusyonu

**PCNA:** Prolifere hücre nükleer antijen (PCNA)

**ROS:** Reaktif oksijen türleri

**TdT:** Terminal deoksinükleotidil transferaz

**TUNEL:** Terminal deoxynucleotidyl transpherase-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick-end labelling

**ZP:** Zona pellusida

**µm:** Mikrometre

## GİRİŞ VE AMAÇ

İnsanlar yaşamları boyunca radyasyonla iç içe olmuşlardır. Radyasyon kaynakları var olduğu müddetçe radyasyon da olacak ve bundan kaçınmak mümkün olmayacaktır. 19. yüzyılın sonlarına doğru X ışınları ve radyoaktivitenin keşfiyle birlikte tıbbi ve endüstriyel alanlardaki kullanımının günümüze kadar giderek artan bir hızla yaygınlaşması radyasyonu yaşamımızın ayrılmaz bir parçası haline getirmiştir (1).

İyonize ışınlar, canlılarda moleküler ve hücresel düzeylerde fiziksel, kimyasal ve biyolojik çeşitli değişikliklere yol açar. Bu değişiklikler maruz kalınan iyonizan radyasyonun cinsine, miktarına ve süresine göre geçici (onarılabilen) veya kalıcı (onarılmayan) değişiklikler olabilirler (2). Radyasyona bağlı hücresel hasarların serbest radikal oluşumları aracılığıyla meydana geldiği kanıtlanmıştır. Oluşan serbest radikal unsurlarının hücrede yeni reaksiyonlar aracılığı ile daha başka serbest radikal oluşumları, lipid peroksidasyon zincir reaksiyonları ve DNA (Deoksiribo nükleik asit) zincir kırılması, mutajenik ve karsinojenik etkiler oluşturduğu saptanmıştır (3-5).

Radyasyon ovaryumda foliküler atreziye sebep olan ve bu durumu hızlandıran sebeplerden biridir (6-8). Jarrell ve ark.'na (9) göre, radyasyona cevap olarak ovaryumun morfolojik yapısında değişiklikler oluşur. Son çalışmalar, radyasyonun foliküllerde apoptozisde artışa (8), oositlerde kromozomal hasara ve ovarian işlevlerin bozulmasına (10) sebep olduğunu göstermiştir. Apoptozis foliküllerde granüloza hücrelerinin ölümüne yol açar (11). Radyasyona maruz bırakılan fare ovaryumlarında foliküler dejenerasyonun granüloza hücrelerinin apoptozisi ile gerçekleştiği gösterilmiştir (7).

Doğal bitkisel insanlık tarihi boyunca ürünler çeşitli amaçlar için kullanılmaya başlanmıştır. Modern ve eski çağlarda birçok kültürlerde bitkilerden elde edilen ilaçlar, sağlık hizmetlerinde çok önemli bir rol oynamıştır. Günümüzde üretilen ilaçların çoğunun (% 61)



kökenide doğal ürünlere dayanmaktadır (12). Tedavi edici özelliklerinden yararlanan bazı doğal ürünlerin moleküler etki mekanizmaları yirmi yıldan daha fazla bir süredir modern tıpta yapılan başarılı girişimler sonucunda, daha iyi anlaşılmıştır. İnsan sağlığının korunmasında doğal ürünlerin rolleri azımsanamaz. Gelişmekte olan ülkelerde bu ürünlerin kullanımı oldukça yaygındır (13).

Doğal bitkisel ürünlerden curcumin binlerce yıldır kullanılmaktadır (14). Zerdeçal olarak bilinen curcumin çok yıllık bir bitki olan *Curcuma longa* dan elde edilir (15). Curcumin gıda sanayinde, kozmetikte ve tıpta kullanılmaktadır (16). Geleneksel tıpta curcumin ve doğal bileşenlerinin astım, alerji, bronşiyal hiperaktivite gibi bazı solunum hastalıkları, karaciğer hastalıkları, anoreksia, romatizma, diyabetik yara ve sinüzit tedavisinde kullanıldığı gösterilmiştir (17,18). Ayrıca antioksidan (19), anti-inflamatuar (16), antikarsinojenik ve antimikrobiyal, hepatoprotektif (20), kardiyovasküler (miyokard enfarktüsüne karşı koruma) (21), hipoglisemik (22), anti-romatizmal (romatoid artrit karşı koruma) (23) etkileri de bildirilmiştir.

Literatürde curcuminin ovaryumda iyonizan radyasyona karşı koruyucu etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Bu nedenle planladığımız bu çalışmada, farelere uygulanan 8.3 Gy (Gray) tek doz tüm vücut iyonizan radyasyonun ovaryum hasarı ve foliküler atrezi oranı üzerine etkilerini göstererek, oluşacak hasarlara karşı curcuminin koruyucu etkisinin olup olmadığını, ayrıca TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick-end labelling) boyama yöntemi ile apoptotik hücrelerin ve proliferasyon hücre nükleer antijen (PCNA) immünohistokimyasal boyama yöntemiyle de radyasyondan korunan hücrelerin immünreaktivitesinin gösterilmesini amaçladık.

## **GENEL BİLGİLER**

### **OVARYUM**

#### **Ovaryum Embriyolojisi**

Gonadlar, k6l6mik epitelin proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşması ile oluşmuş bir çift uzunlamasına genital veya gonadal kabarıklıklar halinde belirirler. Yolk kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında beliren primordial germ hücreleri, ameboid hareketlerle 5. haftanın başında pirimitif gonadlara ulaşır ve 6. haftada genital kabarıklıkları işgal ederler. K6l6mik epitel proliferasyon olarak epitel hücreleri altındaki mezenşim içine girerler. Bunlar burada pirimitif cinsiyet kordonları denilen düzensiz şekilli kordonları oluştururlar. Pirimitif germ hücresi grupları içeren bu kordonlar yerlerini ovaryum medullasını oluşturan vasküler bir stromaya bırakırlar. Dişı gonadın yüzeyinde kortikal kordonlar adı verilen ikinci nesil kordonlar gelişir. Dördüncü ayda, bu kordonlar her biri bir veya daha çok sayıdaki pirimitif germ hücresini çevreleyen izole hücre topluluklarına ayrılırlar. Bu germ hücreleri zamanla oogoniya dönüşürken; yüzey epitelinden aşağıya göçen ve germ hücrelerini çevreleyen epitel hücrelerinden de foliküler hücreler meydana gelir (24).

#### **Ovaryum Histolojisi**

Ovaryum takriben 3 cm uzunluk, 1.5 cm genişlik ve 1 cm kalınlıkta, badem şeklindedir. Organ, gevşek bağ dokusu içinde damardan zengin bir yapı gösteren bir medüller bölge ile oosit içeren ovaryum foliküllerinin bol miktarda bulunduğu bir kortikal bölgeden meydana gelir. Korteks ile medulla bölgeleri arasında kesin bir sınır görülmez. Korteks bölgesinin stroması karakteristik iğsi şekilli fibroblastlardan meydana gelir. Ovaryum yüzeyi germinal epitel ismini alan tek katlı yassı ya da kübik epitel ile örtülüdür. Germinal epitel

altında, stroma, tunika albuginea denen sınırları belirsiz tıkmaz bir bağ dokusu tabakası oluşturur. Tunika albuginea ovaryumun açık renkte görünmesini sağlar. Ovaryum folikülleri korteksin stroması içinde yer alır. Bir folikül, bir ya da daha fazla tabaka oluşturmuş folikül hücreleriyle (granüloza hücreleri) çevrili bir oositten meydana gelir (25).

### **Folikül Gelişimi**

Ovaryum folikülü bir ya da daha fazla granüloza hücresi katmanıyla çevrili bir oosit içerir. Ovaryumda primordial folikül, büyümekte olan folikül ve olgun (Graaf) folikül olmak üzere üç ana tip folikül bulunur (25).

Yeni doğan bir kız çocuğun her iki ovaryumunda toplam 400.000 adet folikül bulunur. Bunlar; iri bir oosit ile bunu çevreleyen yassı folikül epitelinden yapılmış, 40 mikron çapındaki yuvarlak oluşumlardır. Bunlara **primordial foliküller** denir. Bunların sayısı artmaz, ancak büyüyüp gelişirler ve bazıları tam olgunluğa erişirler (26). Pubertenin başlamasıyla 5 ile 15 arasında değişen sayıda primordial folikül olgunlaşmaya başlar (24).

Primordial folikülü çevreleyen tek katlı yassı hücreler tek katlı kübik hücreler haline gelir ve bu foliküle **primer folikül** ismi verilir. Foliküllerin büyümesi esas olarak folikül hücrelerinin ve bununla birlikte primer oositin ve folikül çevreleyen stromanın büyümesi ile olur. Oosit büyümesinin en hızlı olduğu dönem, foliküler büyümenin birinci evresidir. Bu esnada oositin çapı 125-150 µm'ye kadar ulaşır. Nükleus büyür ve "germinal vezikül" ismini alır. Oositi çevreleyen granüloza hücre tabakası sayısı artar ve folikül **preantral** aşamaya ulaşır. Oositi çevreleyen zona pellusida (ZP), oosit ve folikül hücrelerince sentezlenir. Folikül gelişirken, stroma da farklılaşma göstererek teka folikülü oluşur. Daha sonra bu tabaka teka interna ve teka eksterna olarak farklılaşır (27).

Folikül **antral** seviyeye ulaştığında, granüloza hücreleri arasında içi sıvıyla dolu boşluklar (antrum) belirir ve genişlemeye başlar. Erken antral aşamada gözlenen küçük boşluklar, ilerleyen aşamalarda birleşir ve tek, büyük bir boşluk haline alır. Oositi çevreleyen granüloza hücreleri bozulmamış olarak kalır ve kumulus ooforusu oluştururlar. Bu aşamadaki folikül **graaf folikülü** olarak isimlendirilmektedir (24).

### **İYONİZAN RADYASYON**

Radyasyonu ortamda yol alan enerji olarak tanımlamak mümkündür. Bu tanım kapsamında doğal ya da yapay radyoaktif çekirdeklerin kararlı yapıya geçebilmek için dışarı saldıkları hızlı parçacıklar ve elektromanyetik dalga şeklinde taşınan fazla enerjileri de "radyasyon" olarak adlandırılır (28,29).

Bir atom veya molekülden bir elektronun kopmasına neden olan radyasyon tipine “iyonlaştırıcı radyasyon” adı verilir. İyonlaştırıcı radyasyonlar, X ve gamma gibi elektromagnetik radyasyonlar ve alfa, beta partikülleri, elektronlar, protonlar ve nötronlar gibi partiküler radyasyonlar olmak üzere iki gruba ayrılır (30,31). İyon meydana gelmesi yani iyonizasyon olayı herhangi bir maddede meydana gelebileceği gibi, insanlar dahil tüm canlılarda da oluşabilir (28,29).

### **İyonizan Radyasyon ve Serbest Radikaller**

Serbest radikaller radyasyon etkisi ile iyonlaşma ve eksitasyon sonucunda dış yörüngelerinde eşleşmemiş bir veya daha fazla elektron bulunduran ve genellikle elektriksel açıdan yüksüz atom veya moleküllerden meydana gelir. Serbest radikaller hemen her zaman iyon çiftlerinin oluşumu ile radyasyon etkisi sonucu ortaya çıkan son kimyasal ürünler arasındaki ara kademeyi oluştururlar. Serbest radikaller son derece reaktif olduklarından diğer atom veya moleküllerle kolayca reaksiyona girerler. Çünkü eşleşmemiş elektronların bir başka radikalın aynı durumdaki elektronu ile eşleşmek veya bir elektron transferi reaksiyonu ile eşleşerek kararlı hale gelme eğilimleri vardır. Bu nedenle serbest radikaller elektron alıcı (oksitleyici) veya verici (redükleyici) özelliğe sahiptir (30,31).

Oksidan moleküller veya reaktif oksijen türleri (ROS) da denilen serbest oksijen radikalleri, singlet oksijen ( $O_2^{\uparrow\downarrow}$ ), süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikali ( $HO^{\cdot}$ ) olup bu radikaller oksijenli solunum metabolizması esnasında oluşurlar. Bu radikallerin yarılanma ömürleri birkaç milisaniye ile saatler arasında değişmektedir (31,32).

### **İyonizan Radyasyonun Biyolojik Etkileri**

Canlılar yaklaşık %70-90 oranında su içerdiği için, ışınlandıkları radyasyonun etkisi ile su molekülleri iyonlaşırlar veya uyarılırlar. İyonlaşma ile pozitif yüklü bir iyon ve hızlı bir serbest elektron oluşur. Bu olayı izleyen çeşitli sekonder reaksiyonlar ile değişik tipte serbest radikaller meydana gelir. Serbest radikaller aynı zamanda diğer su molekülleri ile de reaksiyona girebilecekleri gibi, kendi aralarındaki reaksiyonlar sonunda ortaya çıkan ürünlerle de tekrar reaksiyona girebilirler. Sonuçta, iyonlaştırıcı radyasyonların indirekt etkisi ile oluşan serbest radikaller, hedef olan DNA molekülünde oksidatif hasara yol açarlar (30-32).

İyonlaştırıcı radyasyon bir hücre içinden geçecek olursa, bu radyasyon hücreyi meydana getiren atom ve moleküllerle etkileşerek bir takım zincirleme olayları başlatır. Radyasyonun çarptığı moleküller; DNA gibi çok önemli ve karmaşık molekül yapılarında

bileşenler olabileceği gibi, az sayıda atom ihtiva eden (su molekülleri gibi) görece basit hücre bileşenleri de olabilir. Radyasyonun biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek enerjisini doğrudan transfer etmesine doğrudan etki, radyasyon enerjisinin biyolojik moleküllere aktarılmasının radikaller aracılığıyla gerçekleşmesine ise dolaylı etki denir. Bu radikaller ikincil elektronların hücre içindeki suyu iyonize etmesi ile ortaya çıkarlar. Suyun iyonizasyonu sonucu ortaya çıkan hidroksil radikalleri ve peroksitler radyasyon hasarının %70-80'inden sorumludur. Geriye kalan %20-30 arasındaki hasar doğrudan etki ile oluşmaktadır (33).

Genetik bilgiyi taşıyarak, nesilden nesile aktarılmasını sağlayan DNA üzerinde sürekli olarak hasar oluşmaktadır (34). Genomik DNA'nın bütünlüğü, farklı DNA hasarlarına neden olan ultraviyole, X-ışınları, kimyasal bileşikler gibi çevresel maddeler ile sürekli tehdit altındadır. Hüresel metabolizmanın yan ürünü olarak üretilen serbest radikaller gibi endojen maddeler de DNA hasarına neden olmaktadır (35). Oluşan hasarlar DNA onarım sistemleri tarafından tamir edilmekle birlikte, hasarın çok fazla olduğu veya onarım sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda DNA üzerinde oluşan hasar hücre ölümüne veya mutasyona neden olur (34,36). İyonlaştırıcı radyasyonun DNA üzerine etkisi doğrudan veya dolaylı yolla olabilir (37,38). Doğrudan etki radyasyon enerjisinin doğrudan DNA ile etkileşimi sonucu oluşurken, dolaylı etki radyasyonla açığa çıkan enerji ile uyarılan moleküllerin DNA ile etkileşimi sonucu ortaya çıkar. İyonlaştırıcı radyasyonun etkisiyle, DNA'yı çevreleyen suyun O-H bağlarının hidrolitik ayrılması sonucu oluşan OH<sup>·</sup> radikali DNA ile etkileşir. Sonuçta, baz hasarı ve zincir kırıkları meydana gelir. Bu hasarlı bazların bir kısmı replikasyon sırasında eşlenmez ve transkripsiyon sırasında da çerçeve kayma mutasyonuna neden olurken, bir kısmı ise yanlış eşleşerek nokta mutasyonuna yol açar. Diğer taraftan, iyonlaştırıcı radyasyon doğrudan zincir kırıkları oluşturmak yolu ile de replikasyonu durdurabilir (34).

### **İyonizan Radyasyonun Folikül Gelişimi Üzerine Etkileri**

Memelilerde foliküllerin büyük çoğunluğu dejenere olurlar ve foliküler atrezi aracılığı ile ovaryumdan ortadan kaldırılırlar. Dejenere olan foliküllerde, piknotik nukleuslu granüloza hücrelerinde artış, teka tabakasında hipertrofi ve rüptüre veya ondüle olan bazal membran gibi kendilerine has özellikler gösterirler (6). Radyasyon foliküler atreziye sebep olan ve bu durumu hızlandıran sebeplerden biridir (7). Radyasyonu takiben normal dokularda apoptozis artmaktadır (8). Jarrell ve ark.'na (9) göre, radyasyona cevap olarak ovaryumun morfolojik yapısında değişiklikler oluşur. Son çalışmalar, radyasyonun foliküllerde apoptozisin artmasına (8), oositlerde kromozomal hasara ve ovarian fonksiyonların bozulmasına (10) sebep

olduğunu göstermiştir. Apoptozis, foliküllerde granüloza hücrelerinin ölümlerine yol açar (11). Radyasyona maruz bırakılan fare ovaryumlarında foliküler dejenerasyonun granüloza hücrelerinin apoptozisi ile gerçekleştiği gösterilmiştir (7).

## **APOPTOZİS VE FOLİKÜLER ATREZİ**

### **Apoptozis**

Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr ve ark. (42) tarafından kullanılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır. Literatürde “programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü, hücre intiharı, hücre kaybı” ifadeleri apoptozisle eş anlamlı olarak kullanılmıştır (42).

Apoptozis birçok biyolojik süreçte etkin rol oynamaktadır. Dokuların gelişmesi, yaşlanması ve kanama kontrolünün sağlanmasında olduğu gibi, normal dokulardaki hücre topluluklarının korunması sürecinde de meydana gelmektedir. Birçok fizyolojik ve patolojik durum veya faktör apoptozise neden olabilir. Fakat her hücre aynı faktöre aynı şekilde yani apoptozisle cevap vermez (43). Apoptozisi etkileyen faktörler kabaca büyüme faktörlerinin geri çekilmesi, sitokinler ile hücre içi kalsiyum miktarındaki artış, Tümör Nekroz Edici Faktör, Transforming Growth Factor  $\beta$ , Fas/FasL sisteminin aktive olması, DNA hasarı nedeniyle bir tümör supresör gen olan p53’ün aktive olması, viral-bakteriyel enfeksiyonlar ve glukokortikoidler şeklinde sıralanabilir. Ayrıca hipertermi, radyasyon, sitotoksik antikanser ilaçları ve hipoksi gibi nekroz oluşturabilen etkenler de hafif dozlarda apoptozis meydana getirebilirler (44).

### **Foliküler Atrezi**

Sağlıklı foliküllerde; granüloza, kumulus, teka interna ve teka eksterna tabakaları arasındaki hücrelerde veya oositlerde apoptotik hücreler görülmez (39).

Foliküler atrezinin erken fazında, apoptozis folikül duvarının iç yüzünde granüloza hücreleri arasında dağınık olarak görülür. Kumulus hücrelerinde, oosit veya teka interna ve teka eksterna tabakalarındaki hücrelerde apoptozis görülmez. Elektron mikroskopik incelemelerde erken safhadaki atretik foliküllerin granüloza hücrelerinde piknotik nükleus gibi apoptotik hücre özellikleri gösterdiği tespit edilmiştir. Aynı foliküllerin kumulus hücreleri veya oositlerin ise normal ultrastrüktürel yapı gösterdiği görülmüştür (40).

Foliküler atrezinin geç fazında ise granüloza hücrelerinde ki apoptozis folikül duvarının yüzeyinden iç kısımlara doğru ilerlemeye başlar. TUNEL pozitif hücreler kumulus

hücreleri arasında ve oositte görülmez. Foliküler atrezinin ilerleyen safhalarında çok sayıdaki apoptotik hücre bazal membrana bitişik olarak bulunur. Bazal membranın yapısı bozulur ve çok sayıda makrofaj folikülün antrumuna hücum ederek apoptotik hücreleri ve hücrel artıkları fagosite ederler (41).

### **TUNEL Metodu**

Apoptozisde ortaya çıkan DNA fragmentasyonunu göstermenin bir TUNEL metodudur. Bu yöntemle, DNA kırıklarının serbest 3' OH uçları modifiye nukleotidlerle enzimatik olarak işaretlenir. DNA fragmentasyonundan kökenlenen bu yeni DNA uçları, morfolojik olarak gözlenebilen nukleuslarda ve apoptotik cisimciklerde bulunurlar. Bu yöntemle kromatin kondensasyonu oluşmuş ve DNA kırıkları bulunan erken evre apoptozise özgüdür. Daha sonra nukleusda major morfolojik değişiklikler oluşmaya başlar (45,46).

TUNEL metodu, kimyasal olarak işaretlenmiş ve işaretlenmemiş nukleotidler kullanılarak serbest 3' OH uçlarının işaretlenmesi prensibine dayanır. Reaksiyon tamponuna eklenmiş olan nukleotidlerin, terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak enzimatik olarak DNA'ya bağlanması sağlanır. TdT tek sarmallı ya da çift sarmallı DNA'nın 3' OH uçlarına serbest olarak eklenen nukleotid trifosfatları katalizler. Serbest olarak bulunan nukleotidler digoksisijenin-konjugatı eklenmesiyle bir oligomer oluştururlar. Daha sonra digoksisijenin ile konjuge olan nukleotidler peroksidaz reaksiyonu verebilen anti-digoksisijenin antikoru ile bağlanması sağlanır. Böylece bağlanmış peroksidaz antikoru, immunohistokimyasal ve immunositokimya hassas görünüm sağlayan kromojenik substratlarla bağlanması sağlanır. Sonuç olarak; apoptotik cisimciklerde çok yüksek oranda bulunan 3' OH uçlarının hassas ve spesifik boyanması sağlanır (47).

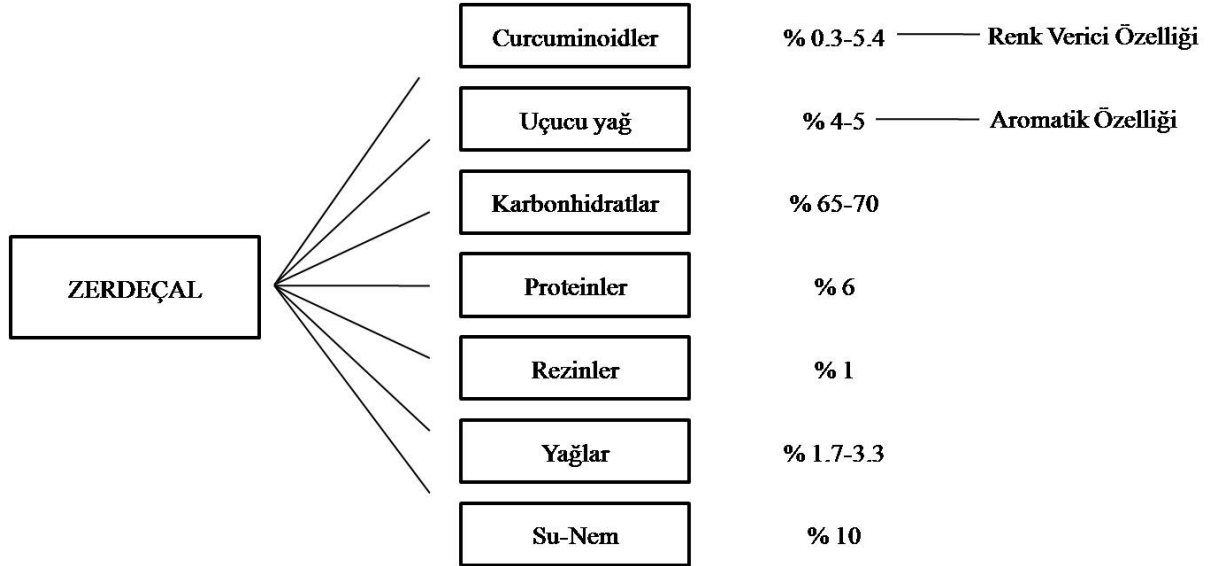
### **CURCUMİN**

Zerdeçalın ana bileşenlerinden olan curcumin, Zingiberaceae familyasına ait *Curcuma longa* bitkisinin köklerinden elde edilir. *Curcuma longa*, 1 metre yüksekliğinde kısa gövdeli çok yıllık bir bitkidir (Şekil 1). Hindistan'da ve özellikle güneydoğu Asya ülkelerinde yetişir. Geleneksel tıpta binlerce yıldır kullanılan curcumin, yemek endüstrisinde katkı maddesi (örneğin İngiltere'de acılı Hint baharatı, köri), koruyucu madde, renk ve tat verici olarak da kullanılmaktadır (48).



**Şekil 1. Curcuma longa (48).**

Zerdeçal özlerinde 3 farklı curcuminoid mevcuttur; curcumin, demethoksicurcumin, ve bis-demethoksicurcumin curcumin (diferuloylmetan) zerdeçalın en aktif bileşenidir (18). Bunun yanı sıra curcuminin ticari olarak satılan preparatlarında uçucu ve sabit yağlar, protein, mineraller, karbonhidratlar, su içerir. Şekil 2’de gösterildiği gibi curcumin zerdeçalın uçucu olmayan bileşenlerinden biridir (49).



**Şekil 2. Zerdeçal’ın bileşenleri.**

Curcuminin, Vitamin C ve E ile karşılaştırılabilir antioksidan aktivitesi mevcuttur (50). Curcumin reaktif oksijen radikallerini, reaktif nitrojen metabolitlerini ve hidroksil radikallerini etkisiz hale getirerek antioksidan özellik gösterir (51). Curcuminin direkt antioksidan etkisi yanında inflamatuvar enzimlerin aktivitelerini inhibe ederek ve önemli bir



intraseküler antioksidan olan glutatyonun sentezini artırarak dolaylı antioksidan etkisi de vardır (52).

Curcuminin, antimikrobal (53), antioksidan (54), antiinflamatuvar (55), yara iyileştirici (56), antimutajenik (57), antikarsinojenik (18), antimetastatik (58), nöroprotektif (59), radyoprotektif (60), angiogenezi düzenleyici (61) birçok özelliği ispatlanılmış olup, doz aşımında toksik özellik göstermeyen (62) doğal bir maddedir.

### **PROLİFERE HÜCRE NÜKLEER ANTİJENİ (PCNA)**

Prolifere hücre nükleer antijeni (PCNA) ya da diğer bir adıyla siklin (Cyclin) 36-kilodalton ağırlığında bir nükleus proteindir ve DNA polimeraz deltanın kofaktörü olarak görev yapar. PCNA hücre siklusu sırasında ortaya çıkan, normal proliferasyon gösteren hücreler ile tümörlerde sentez edilen, sentez hızı hücrelerin proliferasyon ve DNA sentezi hızı ile doğru orantılı olan bir proteindir (63). İstirahattaki hücreler farklı mitojenlerle uyarıldığında aynı derecede PCNA ve DNA sentezi yapıldığı gösterilmiştir (63,64). Hücre siklusu sırasında PCNA düzeyleri oynamalar göstermekte, G1 fazının sonunda, DNA sentezinden hemen önce giderek artan miktarlarda hücrelerde belirmekte, S fazı sırasında özellikle yükselmekte ve G2 fazının başında kaybolmaktadır (64). Biyolojik yarı ömrü yaklaşık 20 saattir (65). PCNA boyanması DNA sentezinin yer aldığı intranükleer alanlarda lokalize olmaktadır (64). PCNA'nın S fazı sırasında nükleustaki dağılımı DNA sentezine bağlıdır, olasılıkla G1 fazı sırasında bir araya gelen, DNA sentezine yardımcı olan ve S fazının sonunda dağılan bir replikasyon kompleksine dahildir (65,66). Hem hücre DNA sentezi ve onarımı için, hem de hücre siklusunun ilerlemesi için PCNA'nın gerekli olduğu gösterilmiştir (67).

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nde üretilen, 7-8 haftalık, ağırlıkları 20-25 g arasında değişen 38 adet dişi Balb/c türü fare kullanıldı. Deney süresi boyunca, tüm deneklerimiz, optimum laboratuvar koşulları ( $22\pm 1$  °C, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) altında, günlük içme suyu ve % 21 ham protein içeren pelet yemlerle (Purina) beslendi. Aynı biyolojik ve fizyolojik özelliklere sahip, deneklerimizden, vücut ağırlıkları birbirine yakın olanlar, aynı grupta olacak şekilde biri kontrol 4'ü deney grubu olmak üzere toplam 5 grup Tablo 1'de görüldüğü gibi oluşturuldu.

**Grup I (Kontrol grubu, n=6):** Kontrol grubu farelerine 10 gün boyunca dimetilsülfoksit (DMSO) intragastrik yoldan verildi.

**Grup II (Radyasyon grubu 3. saat (Rd-3), n=8):** Bu grupta ki farelere 8.3 Gy tek doz tüm vücut ışınlaması yapılarak, ışınlamadan 3 saat sonra ovaryumları alındı.

**Grup III (Radyasyon+Curcumin grubu 3. saat (Rd+Cur-3), n=8):** Radyasyon hasarını önleyebilmek amacı ile 8.3 Gy tek doz tüm vücut ışınlamasından 10 gün önce başlayıp, 100 mg/kg Curcumin DMSO içinde çözülerek, intragastrik yoldan verildi ve ışınlamadan 3 saat sonra ovaryumları alındı.

**Grup IV (Radyasyon grubu 12. saat (Rd-12), n=8):** Bu grupta ki farelere 8.3 Gy tek doz tüm vücut ışınlaması yapılarak, ışınlamadan 12 saat sonra ovaryumları alındı.

**Grup V (Radyasyon+Curcumin grubu 12. saat (Rd+Cur-12), n=8):** Radyasyon hasarını önleyebilmek amacı ile 8.3 Gy tek doz tüm vücut ışınlamasından 10 gün önce başlayıp, 100 mg/kg curcumin DMSO içinde çözülerek, intragastrik yoldan verildi ve ışınlamadan 12 saat sonra ovaryumları alındı.

Çalışma için Trakya Üniversitesi Etik Kurulu'ndan (Ek) 31.08.2009 tarihinde onay alındı.

**Tablo 1. Deney grupları**

	<b>Kontrol</b>	<b>Rd-3</b>	<b>Rd+Cur-3</b>	<b>Rd-12</b>	<b>Rd+Cur-12</b>
<b>Radyasyon</b>	-	8.3 Gy	8.3 Gy	8.3 Gy	8.3 Gy
<b>Curcumin</b>	-	-	100 mg/kg (İntragastrik)	-	100 mg/kg (İntragastrik)
<b>DMSO</b>	İntragastrik	-	-	-	-

Radyasyon hasarı oluşturmak amacıyla Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda, kontrol grubu hariç diğer gruplardaki her bir denek, intraperitoneal (i.p.) yoldan 50 mg/kg ketamin (Ketalar-Eczacıbaşı/Türkiye), 10 mg/kg xylazine (Rompun-Bayer/Türkiye) ile anestezi sağlandıktan sonra sırtüstü pozisyonunda sabitlendi. Mecaserto marka Simics (Fransa) model simülatör kullanılarak, simüle edilen ilk hayvanın ışın alanı görüntülenmesi için röntgen filmi çekildi (Şekil 3). Kaynak-cilt mesafesi 80 cm olmak üzere 1,5 cm derinlikte doz hesaplanarak, Kobalt-60 teleterapi cihazı (Cirus, Cis-Bio Fransa) ile tek fraksiyonda 155,64 cGy/dk doz hızında tüm vücut 8.3 Gy ışın uygulandı.

Dokuların ışık mikroskopik incelemeleri için işlemlendirilmeleri Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Dokular Bouin fiksatorüne alınarak tespit olmaları sağlandı.

### **IŞIK MİKROSKOBİK İNCELEME**

Işık mikroskopik incelemeler için ovaryum dokuları, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Işık Mikroskopi Laboratuvarı'nda işlemlendirildi. Bu amaçla ovaryum dokuları Bouin fiksatoründe 4 gün fikse edildikten sonra yıkama işlemine geçildi. Dokular 2 gün %70'lik alkolde yıkanarak, dehidratasyon işlemine geçildi. Dokular artan alkol serilerinde (%70, 90, 96, 100) 1'er saat tutuldu. Dehidratasyon aşamasından sonra saydamlaştırma basamağı için dokular 3 seri 15'er dk toluol ile muamele edildi. Gömme işleminden önce dokular yumuşak parafinde 1 gece tutuldu. Bir sonraki gün ovaryum dokuları yumuşak parafinden alınarak 1 saat sıvı sert parafinde tutularak, bloklandı. Bu bloklardan Leica RM-2245 silindirik mikrotom kullanılarak 6 µm (mikrometre) kalınlığındaki kesitler alındı. Ovaryum dokusunun genel özelliklerini ve foliküler yapılarını ortaya koyabilmek

amacıyla alınan kesitler Hematoksilen+Eozin (H+E) ve Periyodik asit schiff + Hemalen (PAS+HL) ile boyandı. Işık mikroskopunda (Olympus CX31-Japan) incelenerek, bulguların fotoğrafları çekildi.

Tüm gruplara ait ovaryum kesitlerinin ışık mikroskopik olarak incelenmesinde folikül sınıflaması Tablo 2’de belirtildiği gibi yapıldı (68).

**Tablo 2. Ovaryum kesitlerindeki foliküllerin sınıflandırılması (68)**

<b>Folikül</b>	<b>Morfolojik Özellikleri</b>
<b>Primordial Folikül</b>	ZP’sız oositler etrafında tek tabaka yassı, granüloza progenitör hücrelerine sahip folikül
<b>Primer folikül</b>	Oositler etrafında tek tabaka kübik granüloza hücreleri gözlenen folikül
<b>Preantral folikül</b>	Oositler etrafında 2 ya da daha fazla granüloza hücre tabakası bulunan ancak, granüloza hücreleri arasında boşluk gözlenmeyen folikül
<b>Antral folikül</b>	Granüloza hücreleri arasındaki boşluklarda folikül sıvısı birikimi başlamış olan folikül
<b>Graaf folikülü</b>	Tek ve büyük bir boşluğa (antrum) sahip olup, sayısı azalan granüloza hücrelerinin folikül sıvısı ile dolu bir antrumu çevrelemekte olduğu, oositin ise bazı granüloza hücreleri (kumulus hücreleri) tarafından çevrelenmiş olduğu folikül

### **ATRETİK FOLİKÜLLERİN HİSTOLOJİK ÖZELLİKLERİ**

Küçük çaplı foliküllerde (primordial ve primer) granuloza hücre nükleuslarındaki piknozis atrezinin erken dönem göstergesi, eozinofilik oosit sitoplazması ya da oosit kaybı ise ilerlemiş atrezi olarak kabul edildi (69).

Büyük çaplı foliküllerde (preantral, antral, Graaf) ise;

- Granüloza hücre sayısının 50’den fazla olduğu folikülde, 3’ten daha çok piknotik granüloza hücresi nükleusunun bulunması, sayı 50’den az ise 1 piknotik granüloza hücresi nükleusu bulunması atrezinin erken dönem göstergesi,

- Oosit etrafındaki granüloza hücrelerinin dağılmış olması, granüloza ve teka tabakaları arasındaki sınırın kaybolması ise ileri atrezi belirteci olarak kabul edildi (70).

## **İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME**

İmmünohistokimyasal inceleme için ovaryum dokusundan 6 µm kalınlığında kesitler alındı ve deparafinizasyon işlemini takiben kesitler suya indirildi. Suya indirilen kesitler antijen retrieval içinde mikrodalga fırında 20 dk kaynatıldı. Oda ısısında 20 dk soğumaya bırakıldıktan sonra kesitler Fosfat Buffer Solusyonu (PBS; pH 7.6) (PBS) ile yıkandı. Bu aşamadan sonra hidrojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi için metanolde (Riedel-de Hæn 24229) hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile 20 dk muamele edildi. Distile su içinde çalkalanarak kesitler PBS ile yıkandı. Özgül olmayan antikor bağlanmalarını bloklamak üzere kesitlere %1 preimmün rabbit serum (Ultra V Block, LabVision, TA-015-UB) uygulandı. Daha sonra kesitler nemli chamber içinde 1/100 oranında sulandırılmış primer antikor (Mouse monoclonal anti-PCNA antibody, MS-106-B, Thermo LabVision, USA) ile 1 saat süre ile inkübe edildi. Kesitler 3 kez PBS ile yıkama sonrasında 20 dk sekonder antikor solüsyonunda (Biotinylated Goat Anti-Mouse, LabVision, TM-015-BN) tutuldu. 3 kez PBS'de yıkanan kesitlere 20 dk streptavidin peroksidaz solüsyonu (Streptavidin Peroxidase, LabVision, TS-015-HR) uygulandı. Kesitlere 3 kez PBS ile yıkama sonrasında 10 dk 3-amino 9 etil karbazol kromojen solüsyonu (LabVision, TA-002-HAC) uygulaması yapıldı. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra 5 dk Mayer hematoksilen uygulanarak zıt boyama yapıldı. Akar suda 5 dk yıkanan kesitler kapatma solüsyonu (Mounting Medium, LabVision, TA-060-UG) konarak lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskobunda değerlendirmeye alındı.

## **TUNEL BOYAMA**

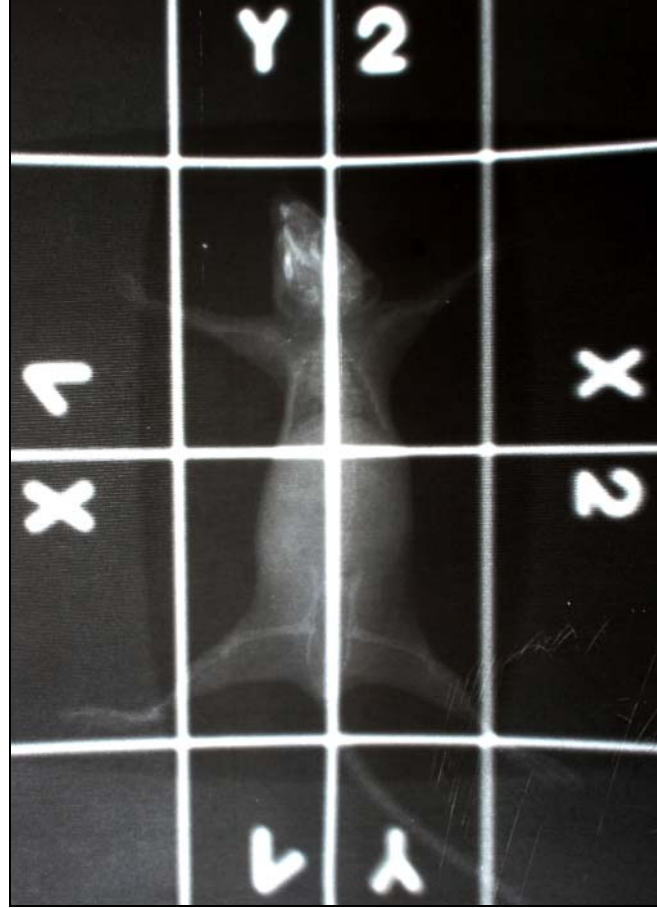
Parafin bloklardan lam üzerine alınan 6 µm'lik kesitler 1 gece 37 °C'lik etüvde tutulduktan sonra toluolde 3x5 dk bekletilerek parafinden iyice arındırılarak azalan alkol serilerinden (%100, %95, %70) 3'er dk geçirilip distile suya indirildi. 5 dk distile suda tutulan kesitlere daha sonra antijen iyileştirme amacıyla 15 dk oda ısısında proteinaz K (20 µg/ml, Chemicon, 21627) uygulandı. Distile su ile yıkanan kesitler endojen peroksidazı bloklamak için metanolde hazırlanan %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de 5 dk bekletildi. Distile su ve PBS ile çalkalandıktan sonra lam üzerinde kesitlerin etrafı hidrofobik kalem (Zymed, 00-8899) ile çizilerek havuz oluşturuldu ve kesitlere 5 dk oda ısısında dengeleme tamponu uygulandı. Daha sonra kesitler 37°C'de terminal deoksिनükleotidil transferaz enziminde 1 saat bekletildikten sonra durdurma/yıkama tamponuyla 15 saniye çalkalandı ve oda ısısında 10 dk bekletildi. 3 kez PBS'de yıkanan kesitlere antidigoksinin konjüгатı uygulandı ve oda ısısında 30 dk tutuldu. Kesitlere 3 kez PBS ile yıkama sonrasında 10 dk diamino benzidin kromojen solüsyonu (LabVision, TA-002-HAC) uygulaması yapıldı. Kesitler distile su ile

yıkandıktan sonra 10 dk Methyl green uygulanarak zıt boyama yapıldı. Distile sudan hızla geçirilen kesitler %100 N-Butanolden de hızla geçirildi. Dehidrate edilen kesitler 3x2 dk toluolde tutulduktan sonra kapatma solüsyonu konarak lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskobunda değerlendirmeye alındı.

Kontrol ve deney grupları arasındaki PCNA ve TUNEL pozitif hücre sayıları semikantitatif olarak saptandı (Tablo 3). Semikantitatif değerlendirme, aşağıdaki biçimde yapıldı; yok (-), nadir ( $\pm$ ), az(+), orta (++) , fazla (+++), çok fazla (++++).

Her bir ovaryumun tamamından 5  $\mu$ m'lik kesitler alınarak H+E boyası yapıldı. Her 5 kesitte bir normal ve atretik foliküller ışık mikroskobu yardımıyla sayıldı (71). Atretik foliküllerin tüm foliküllere (atretik folikül / toplam folikül) oranı (%) hesaplandı (Tablo 4, Şekil 4-7).

İstatistiksel analizler için S0064 Minitab Release 13 programı (Lisans No: WCP1311.00197) kullanıldı. Tüm veriler ortalama ( $\pm$ ) standart sapma (S.D.) olarak ifade edildi. Atretik folikül sonuçları Kruskal-Wallis varyans analizi ile değerlendirildi. Anlamlı fark bulunan gruplar arasındaki karşılaştırmalar için ise Mann-Whitney U testi kullanıldı.  $p<0.05$  olması durumunda fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 3. Simülasyon grafisi.

## **BULGULAR**

### **KONTROL GRUBUNA AİT MORFOLOJİK BULGULAR**

#### **Kontrol Grubuna Ait Işık Mikroskopik Bulgular**

Kontrol grubuna ait ovaryumların korteks bölgelerinde gelişiminin farklı aşamalarındaki foliküller gözlemlendi (Resim 1,2). ZP'sız oositler etrafında tek tabakalı yassı, granüloza progenitör hücrelerine sahip primordial foliküller kümeler halinde ovaryum korteksinin hemen altında gözlenmekte idi. Preantral foliküller etrafında aralarında boşluk gözlenmeyen birkaç sıra granüloza hücreleri bulunurken, oositin ZP ile çevrelendiği tespit edildi (Resim 1). Preantral ve antral foliküllerin granüloza hücreleri arasında mitotik figürlere sıklıkla rastlandı (Resim 2). Foliküllerin granüloza hücre tabakası ile ovarian stroma arasında ise teka tabakaları gözlemlendi. Antral aşamadaki foliküllerin çoğunluğu sağlıklı foliküller iken, doğal fizyolojik süreç içerisinde atreziye uğrayarak elemine edilecek foliküller de izlenmekte idi (Resim 1).

Kontrol grubuna ait PAS+HL ile yapılan mikroskopik incelemede ovaryum korteksinin hemen altında primordial, primer ve preantral foliküller izlendi. Görüntü alanındaki bir preantral folikülde PAS (+) boyanan yapıların ZP ve bazal membran olduğu gözlemlendi (Resim 3).

#### **Kontrol Grubuna Ait İmmünohistokimyasal Bulgular**

Kontrol grubuna ait ovaryumlarda yapılan incelemelerde gelişiminin farklı aşamalarındaki çeşitli foliküllerin granüloza hücrelerinde PCNA varlığı immünohistokimyasal olarak tespit edildi (Resim 4-6). Primer, preantral ve antral foliküllerin S fazındaki granüloza ve teka interna hücrelerinin immünohistokimyasal olarak işaretlendiği



görüldü. Oosit yapısı bozulan bir atretik preantral folikülde ise granüloza hücrelerinin PCNA reaksiyonu vermediği izlendi (Resim 5). Antral foliküle ait bir kesitte yapılan incelemede PCNA reaksiyonu veren granüloza hücrelerinin birçoğunda mitotik figürler görülmekte idi (Resim 6).

Kontrol grubu kesitlerinde yapılan semikantitatif değerlendirmede PCNA pozitif reaksiyon veren granüloza hücrelerinin en fazla bu grupta olduğu tespit edildi (Tablo 3).

### **Kontrol Grubuna Ait TUNEL Boyama Bulguları**

TUNEL boyası sonrasında kontrol grubuna ait foliküllerin granüloza hücrelerinde belirgin bir işaretlenme gözlenmedi. Ovaryum dokusunda bazı foliküllerin eliminasyonu fizyolojik bir süreç olan atrezi ile gerçekleştiğinden, farklı atretik dejenerasyon seviyelerindeki foliküller kontrol grubuna ait ovaryum kesitlerinde de gözlemlendi. Bu kesitlerdeki foliküllerde TUNEL boyası ile işaretli granüloza hücreleri izlenmekte idi (Resim 7).

Radyasyon verilen ovaryum dokuları ile semikantitatif olarak kıyaslandığında TUNEL pozitif reaksiyon veren granüloza hücrelerinin en az bu grupta olduğu tespit edildi (Tablo 3).



**Resim 1. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde çok sayıda primordial folikül (\*) ile birlikte, preantral (PAF) ve antral foliküller (AF) kortekse yerleşmiştir. Normal görünümlü foliküllerin yanı sıra atretik antral bir folikül (X) gözlenmektedir. H+E, X200.**



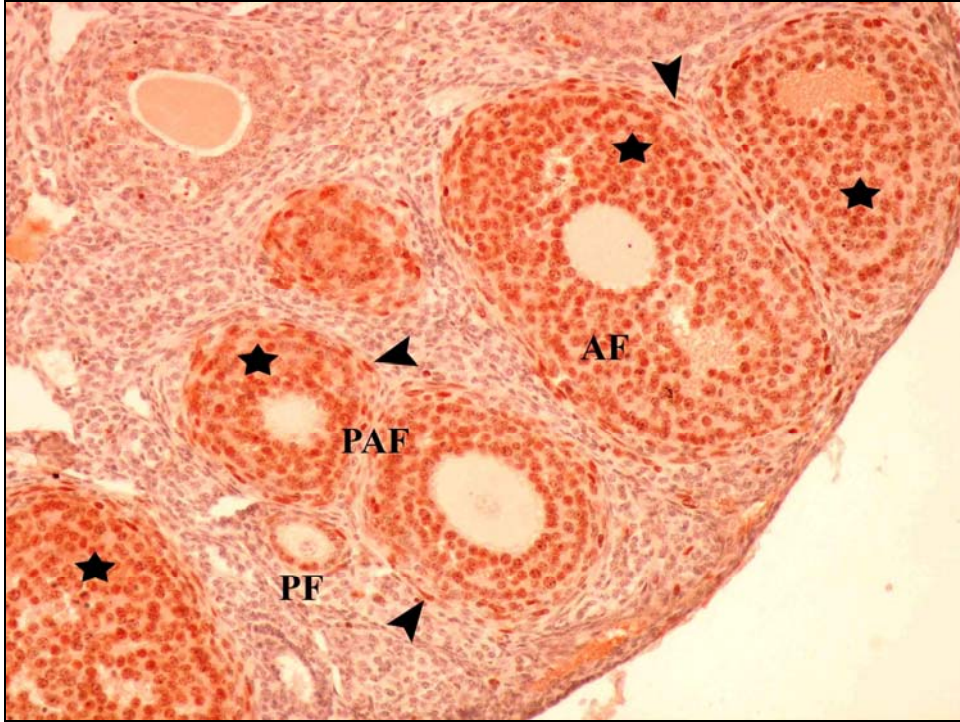
**Resim 2. Germinal epitel altında preantral (PAF) ve antral foliküller (AF) ile birlikte primordial folikül (\*) yer almaktadır. H+E, X400.**



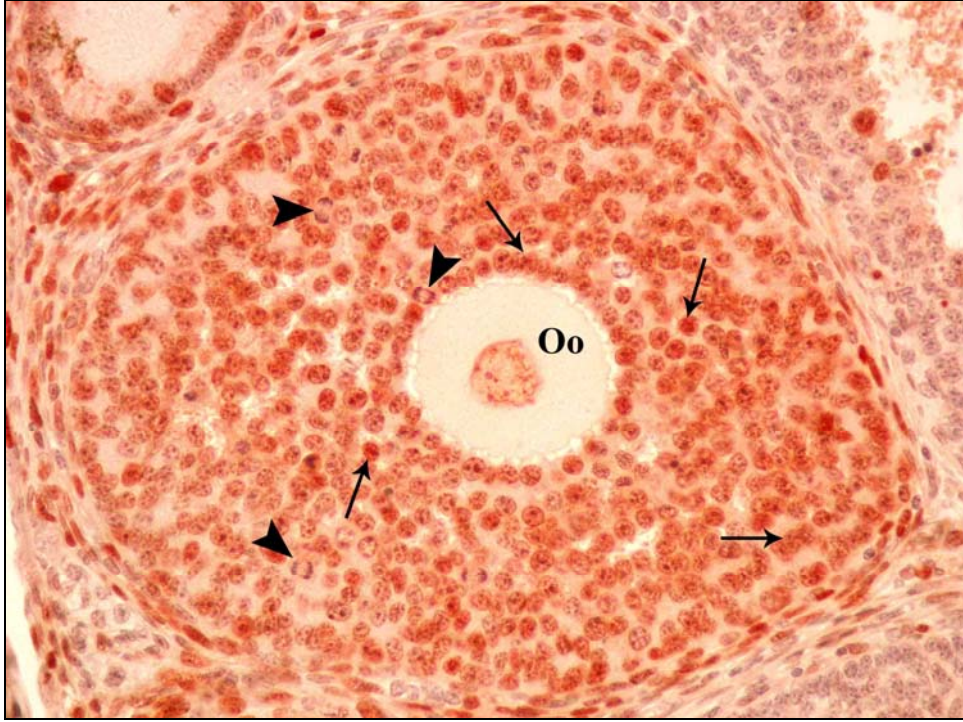
**Resim 3. Normal görümlü primordial (\*) ve primer foliküllerin (PF) yanı sıra PAS (+) boyanan normal görümlü zona pellusidası (ZP) ve bazal membranı (→) ile preantral folikül (PAF) görülmektedir. PAS+HL, X400.**



**Resim 4.** Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde immünohistokimyasal olarak PCNA ile pozitif boyanmış farklı aşamalarda ki foliküller gözlenmektedir. İmmünoperoksidaz, hematoksilin zıt boyaması, X40.



**Resim 5.** Germinal epitelin altında PCNA pozitif granuloza hücrelerini (\*) içeren normal görümlü primer (PF), preantral (PAF) ve antral foliküller (AF) izlenmektedir. Foliküllerin teka tabakasında yer alan hücrelerin de (▶) pozitif boyandıkları görülmektedir. İmmünoperoksidaz, hematoksilin zıt boyaması, X200.



**Resim 6.** Kontrol grubuna ait sağlıklı antral folikülde granüloza hücreleri (→) ile birlikte oositinde (Oo) PCNA pozitif boyandığı ayrıca granüloza tabakasında çok sayıda mitotik figürlerin (▶) olduğu da görülmektedir. İmmünoperoksidaz, hematoxilen zıt boyaması, X400.



**Resim 7. Kontrol grubuna ait normal görünümlü preantral foliküller (PAF) ile birlikte apoptotik granüloza hücreleri (→) içeren atretik bir antral folikül (X) görülmektedir. TUNEL boyası, X200.**

## **RADYASYON SONRASI 3 SAAT GRUBUNA AIT MORFOLOJİK BULGULAR**

### **Radyasyon Sonrası 3 Saat Grubuna Ait Işık Mikroskopik Bulgular**

Radyasyona maruz kalmış ovaryumlardan 3 saat sonra alınan kesitlerde dejenere olmuş foliküllerin kontrole oranla arttığı gözlemlendi. Kontrol grubu ile benzer şekilde ovaryum korteksinde yerleşik primordial, primer ve preantral foliküller izlenmekte idi. Çoğunlukla preantral foliküller sağlıklı görünümlü iken antral foliküllerin erken atrezik özelliklere sahip oldukları saptandı. Kontrole oranla bu grupta primordiyal folikül rezervinde azalma olduğu izlendi (Resim 8). Antral foliküllerin antrumunda çok sayıda piknotik nükleuslara sahip granüloza hücreleri yer almakta idi (Resim 8,9). Atretik antral foliküllerde oosit granüloza hücre bağlantılarında kopmalar, oosit bütünlüğünde bozulmalar ve antrumda çok sayıda piknotik nükleuslu granüloza hücreleri izlendi (Resim 9).

PAS+HL ile yapılan mikroskopik incelemede görüntü alanındaki bir antral folikülün granüloza hücreleri arasında PAS (+) boyanan hücreler artıklar görüldü. Granüloza hücreleri ile ZP arasında boşluklar ve bazal membran ondülasyonunun olduğu gözlemlendi (Resim 10).

### **Radyasyon Sonrası 3 Saat Grubuna Ait İmmünohistokimyasal Bulgular**

Ovaryum genel görüntüsünde gelişimin farklı aşamalarında bulunan foliküllerde PCNA pozitif granüloza hücreleri izlendi. Radyasyon maruziyetinden 3 saat sonra alınan ovaryum kesitlerinde sağlıklı foliküllere oranla atretik foliküllerde PCNA reaksiyonu veren granüloza hücrelerinde azalma olduğu tespit edildi (Resim 11). Görüntü alanında sağlıklı antral folikülün yanında atretik özellik gösteren antral foliküllerde izlendi. Sağlıklı antral foliküllerin apikal tabakasındaki granüloza hücrelerinin PCNA pozitif reaksiyon özelliği gösterdikleri bunun yanı sıra oosit nükleusunun da şiddetli reaksiyon verdiği tespit edildi. Atretik foliküllerin granüloza tabakaları arasında apoptotik cisimciklerin ve hücrelerin bulunduğu bunların zıt boyama ile boyandıkları görüldü (Resim 12).

Kontrol grubu ile bu grupta yer alan foliküller semikantitatif olarak değerlendirildiğinde PCNA pozitif reaksiyon veren hücrelerin daha az sayıda olduğu tespit edildi (Tablo 3).

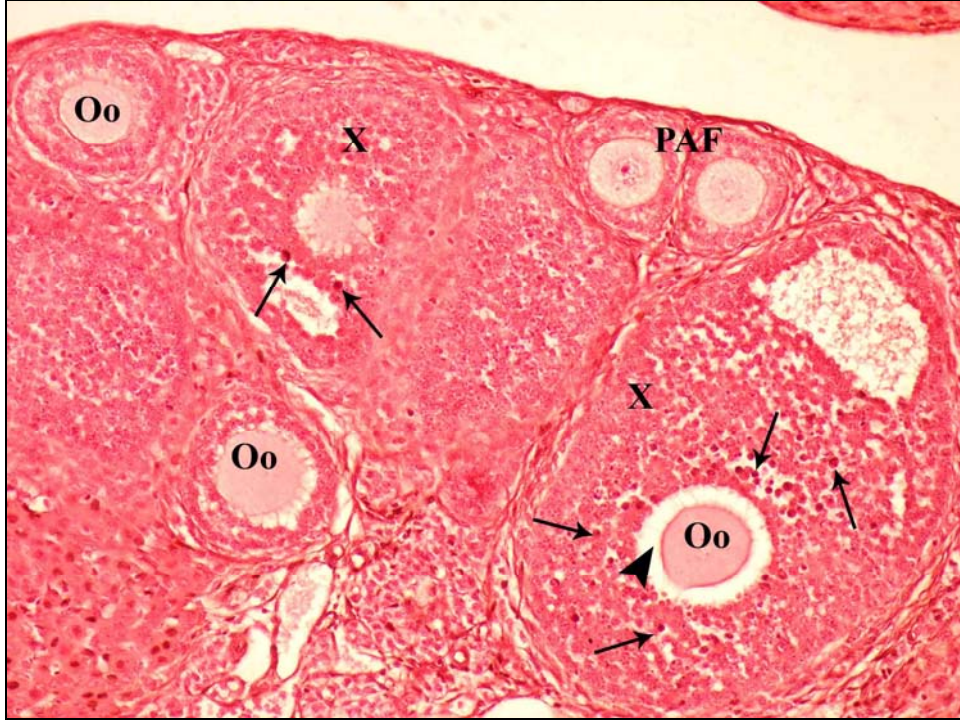
### **Radyasyon Sonrası 3 Saat Grubuna Ait TUNEL Boyama Bulguları**

Radyasyon uygulanan ve 3 saati takiben alınan ovaryum dokularında TUNEL boyası ile işaretlenen foliküllerin granüloza hücrelerinde kontrol grubuna oranla arttığı gözlemlendi. Bu

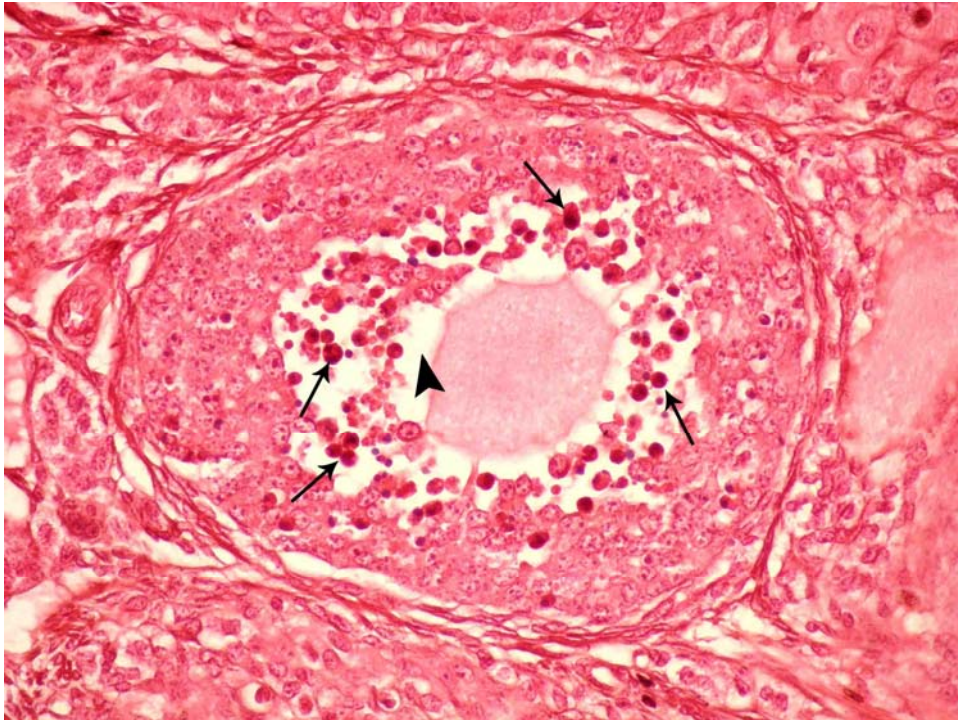
kesitlerdeki birçok atretik folikülün antrumunda ve granüloza hücre tabakaları arasında apoptotik hücreler izlendi (Resim 13). Apoptotik hücreler içeren atretik antral foliküllerin yanı sıra sağlıklı primer, preantral ve antral foliküller de görüldü (Resim 13). Atretik bir antral folikülde çok sayıda apoptotik granüloza hücrelerinin antrumda ve folikül duvarının apikalinde olduğu izlendi. Oosit granüloza hücreleri arasında bağlantıların koptuğu ve oosite yakın olan birkaç hücrenin de TUNEL pozitif oldukları görüldü (Resim 14).

Kontrol grubu ile semikantitatif olarak kıyaslandığında TUNEL pozitif reaksiyon veren granüloza hücrelerinin bu grupta arttığı tespit edildi (Tablo 3).





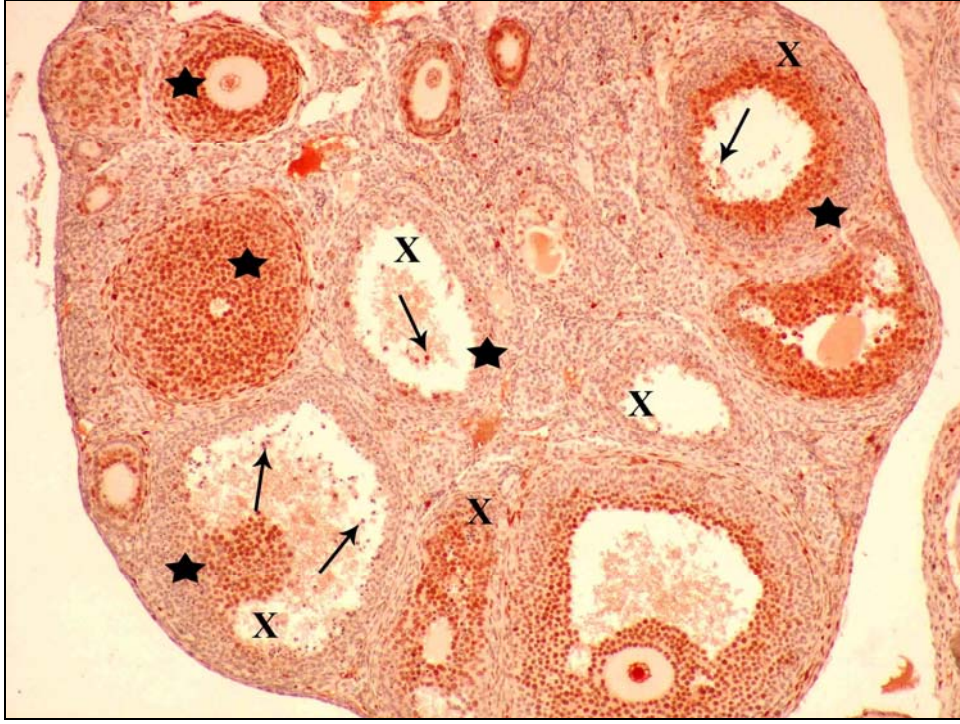
**Resim 8.** Radyasyon uygulamasından 3 saat sonra alınan ovaryum kesitinde sağlıklı preantral foliküllerin (PAF) yanı sıra atretik antral foliküller (X) görülmektedir. Atretik antral foliküllerde piknotik nükleuslu granüloza hücreleri (→) ve oosit (Oo) ile granüloza hücreleri arasında boşlukların (▶) oluştuğu izlenmektedir. H+E, X200.



**Resim 9.** Antral aşamadaki atretik folikülde oosit (Oo) ile granüloza hücreleri arasındaki bağlantının (▶) koptuğu, oosit morfolojisinin bozulduğu ve çok sayıda piknotik nükleuslu granüloza hücreleri (→) içerdiği gözlenmektedir. H+E, X400.



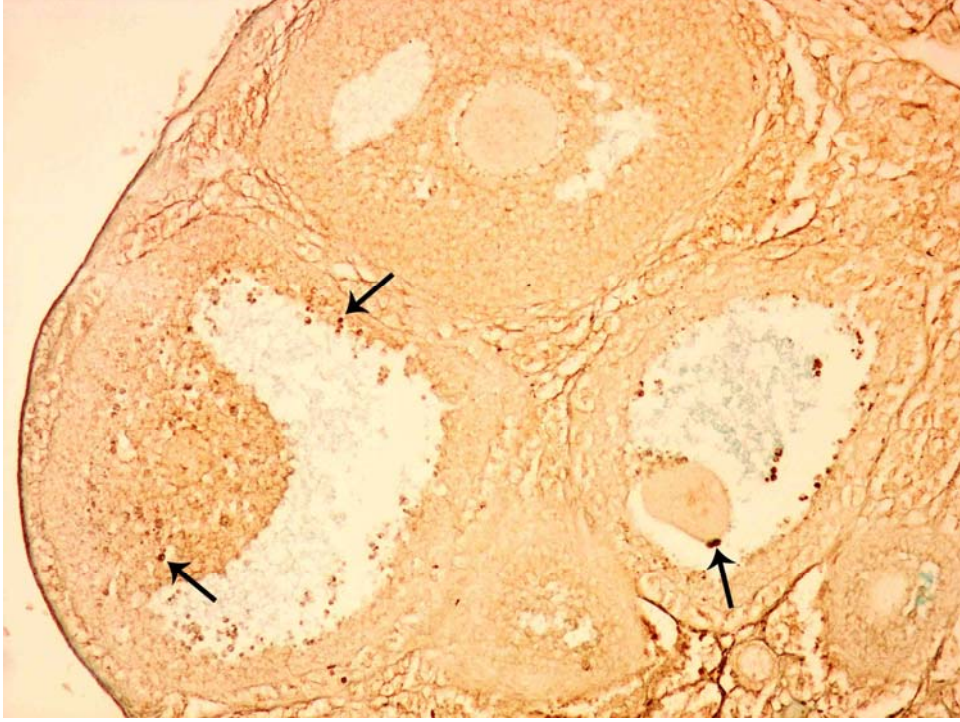
**Resim 10.** Radyasyon uygulamasını takiben 3 saat sonunda alınan ovaryum kesitinde farklı aşamalıdaki foliküller görülmektedir. Atretik foliküllerin (\*) granuloza hücreleri arasında PAS(+) boyanan hücresel atıkların yer aldığı çok sayıda apoptotik hücreler (►) dikkati çekmektedir. PAS+HL, X200.



**Resim 11.** Ovarian kortekste atretik foliküllerde (X) çok sayıda piknotik nükleuslu granüloza hücrelerinin (→) olduğu ve immün boyamanın (\*) diğer sağlıklı foliküllere kıyasla daha az olduğu dikkati çekmektedir. İmmünoperoksidaz, hematoxilen zıt boyaması, X100.



**Resim 12.** Normal görümlü antral folikülde (AF) granüloza hücreleri (\*) ile birlikte oositinde (Oo) PCNA pozitif reaksiyon verdiği, atretik folikülde (X) piknotik nükleuslu ve boyanmayan hücreler (→) olduğu dikkati çekmektedir. İmmünoperoksidaz, hematoxilen zıt boyaması, X200.



**Resim 13.** Radyasyon uygulamasından 3 saat sonra alınan ovaryum kesitinde sağlıklı bir antral folikül ile birlikte apoptotik granüloza hücreleri (→) içeren atretik antral foliküller görülmektedir. TUNEL boyası, X200.



**Resim 14.** Atretik antral bir folikülde, folikül duvarında ve antrumda TUNEL boyama ile işaretlenmiş apoptotik granüloza hücreleri (→) gözlenmektedir. TUNEL boyası, X400.

## **RADYASYON VE CURCUMİN SONRASI 3 SAAT GRUBUNA AİT MORFOLOJİK BULGULAR**

### **Radyasyon ve Curcumin Sonrası 3 Saat Grubuna Ait Işık Mikroskopik Bulgular**

Tek doz 8.3 Gy iyonizan radyasyon öncesi curcumin alan bu grup deneklerimizin ovaryum dokusu ışık mikroskobunda incelendiğinde; sadece iyonizan radyasyon alan tedavisiz grupta görülen apoptozisin, foliküler dejenerasyon ve atrezi oranının, curcumin tarafından kısmen önlenmiş olduğu gözlemlendi. Ovarian kortekste farklı aşamalıdaki foliküller izlendi. Bu foliküller içinde atretik olanların yanı sıra sağlıklı foliküller de görüldü. Germinal epitelin hemen altında bulunan primordial foliküller ile birlikte primer ve preantral foliküllerin de yer aldığı tespit edildi (Resim 15). Atretik özellik gösteren foliküllerin antrum ve folikül duvarlarında çok sayıda piknotik nükleuslu granuloza hücrelerinin olduğu görüldü. Foliküllerde oosit granuloza hücreleri arasında boşlukların oluştuğu ve oosit morfolojisinin bozulduğu dikkati çekti (Resim 15,16).

Radyasyon sonrası 3 saat grubundan alınan kesitlerde, atretik foliküllerin PAS (+) boyanan çok sayıda granuloza hücrelerine sahip olduğu görüldü. Bu foliküllerin oositlerinin morfolojisinin bozulması PAS ile boyandıkları gözlemlendi. Granuloza hücrelerinin bazal membranlarının PAS (+) boyandığı ve radyasyondan dolayı membranlarda ondülasyonların meydana geldiği tespit edildi. Atretik foliküllerin teka tabakasının hipertrofiye uğradığı görüldü. Radyasyon uygulamasından önce curcumin verilen bu grupta tedavisiz gruba kıyasla hasarın kısmen önlenmiş olduğu izlendi. Germinal epitelin altında sağlıklı primordial foliküllere de rastlandı (Resim 17).

### **Radyasyon ve Curcumin Sonrası 3 Saat Grubuna Ait İmmünohistokimyasal Bulgular**

Curcumin verilen bu grupta ovarian kesitlerde antral atretik foliküllerin yanı sıra sağlıklı foliküllerinde olduğu gözlemlendi. Atretik foliküllerin antrumunda ve duvarlarında çok sayıda piknotik nükleuslu granuloza hücreleri olduğu görüldü. Bu foliküllerde granuloza hücrelerinin büyük çoğunluğunun PCNA ile boyanmadığı bu hücrelerin PCNA sentezi yapmadığı tespit edildi. Radyasyon ile meydana gelen hasarların, ışınlamadan önce curcumin verilmesi ile kısmen önlenmiş olduğu izlendi. Sağlıklı foliküllerin granuloza hücrelerinde PCNA reaktivitesinin oldukça belirgin olduğu ve PCNA pozitif boyanan hücrelerin daha çok gelişimlerinin ilk dönemlerinde olan primer ve preantral foliküllerde olduğu dikkati çekti. Bu

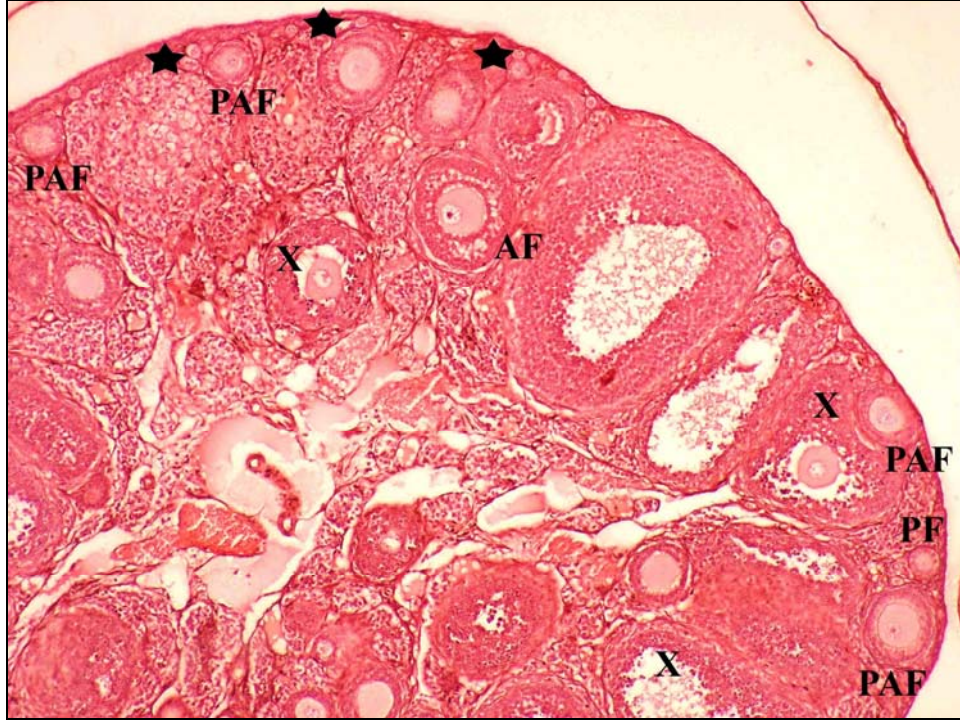
foliküllerin granüloza hücrelerinin yanı sıra oositlerinin PCNA ile pozitif boyandığı izlendi (Resim 18,19).

Radyasyon uygulamasını takiben 3 saat sonra alınan ovaryuma ait foliküller ile curcumin verilen bu grupta yer alan foliküller semikantitatif olarak değerlendirildiğinde PCNA pozitif reaksiyon veren hücrelerin kısmen arttığı tespit edildi (Tablo 3).

### **Radyasyon ve Curcumin Sonrası 3 Saat Grubuna Ait TUNEL Boyama Bulguları**

Curcumin verilen grubun ovaryumlarından alınan kesitler incelendiğinde, ışınlamadan 3 saat sonra alınan tedavisiz grubun ovaryum dokularındaki foliküllerin granüloza hücrelerinde TUNEL boyası ile işaretlenen hücrelerin kısmen azaldığı gözlemlendi (Resim 20). Atretik foliküllerde apoptotik hücrelerin TUNEL ile işaretlendiği ve bu hücrelerin antrum içinde ve folikül duvarında olduğu görüldü (Resim 20,21). Normal görünümüne primer ve preantral foliküllerde granüloza hücrelerinin TUNEL boyası ile boyanmadığı tespit edildi. Curcumin verilen bu grupta, curcuminin radyasyonun meydana getirdiği apoptozisi kısmen önlediği görüldü (Resim 20).

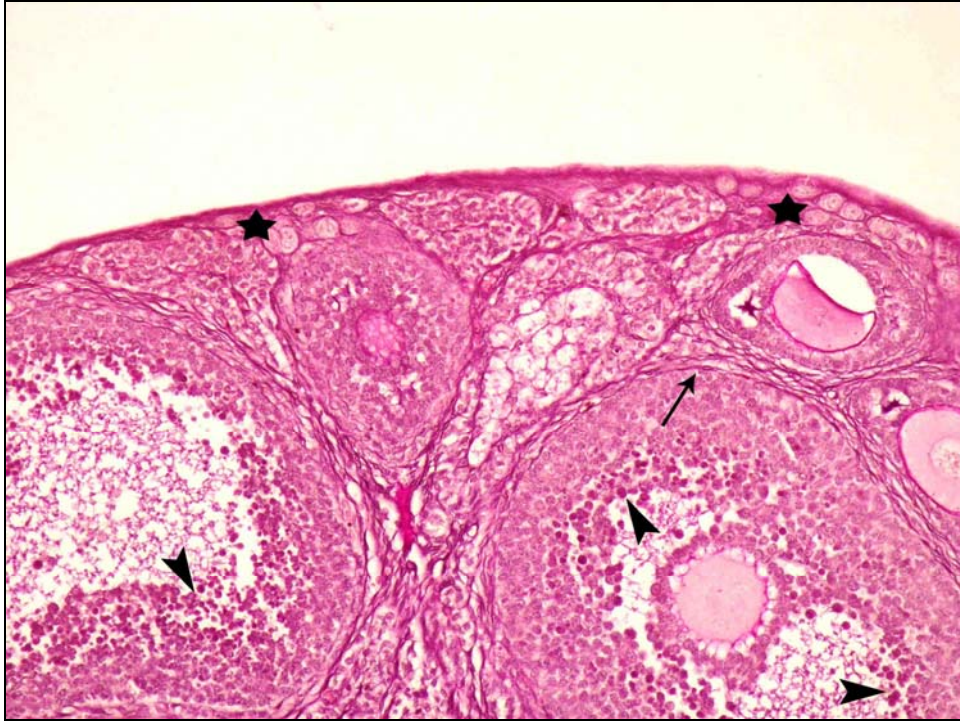
Radyasyon uygulamasını takiben 3 saat sonra alınan ovaryuma ait foliküller ile curcumin verilen bu grupta yer alan foliküller semikantitatif olarak değerlendirildiğinde TUNEL ile işaretlenen hücrelerin kısmen azaldığı tespit edildi (Tablo 3).



**Resim 15.** Ovarian kortekse yerleşmiş gelişimin farklı aşamalarındaki çok sayıda folikül görülmektedir. Atretik foliküllerin (X) yanı sıra normal görümlü primordial (\*), primer (PF), preantral foliküller (PAF) ve antral folikülerde (AF) izlenmektedir. H+E, X100.

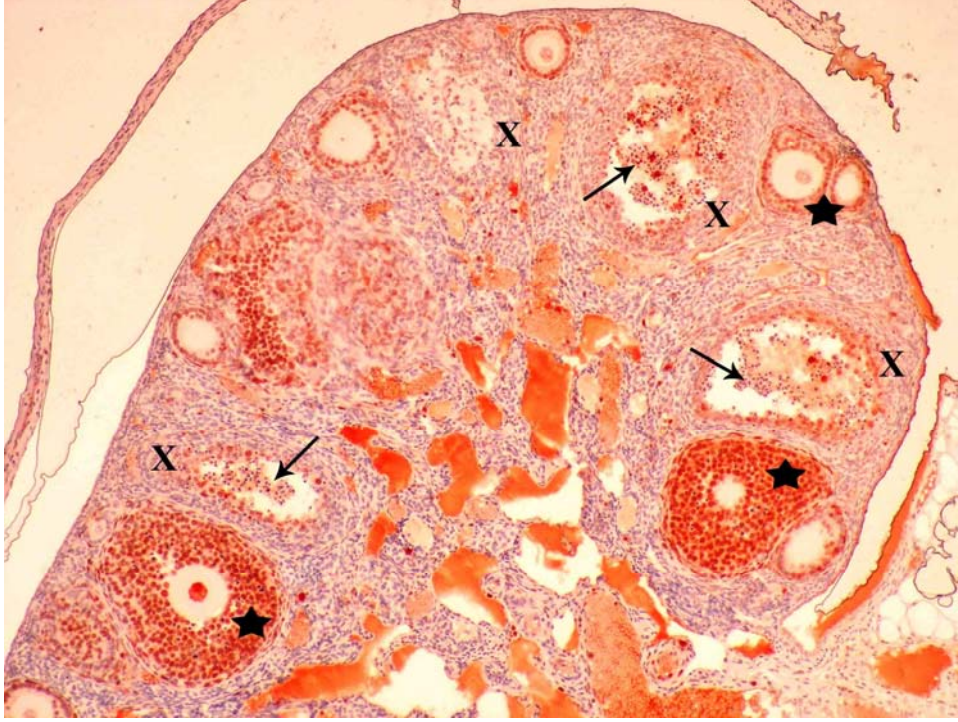


**Resim 16.** Atretik antral folikülde oosit (Oo) morfolojisinin bozulduğu ve antrumun yanı sıra folikül duvarında çok sayıda piknotik nükleuslu granuloza hücreleri (→) içerdiği görülmektedir. H+E, X400.

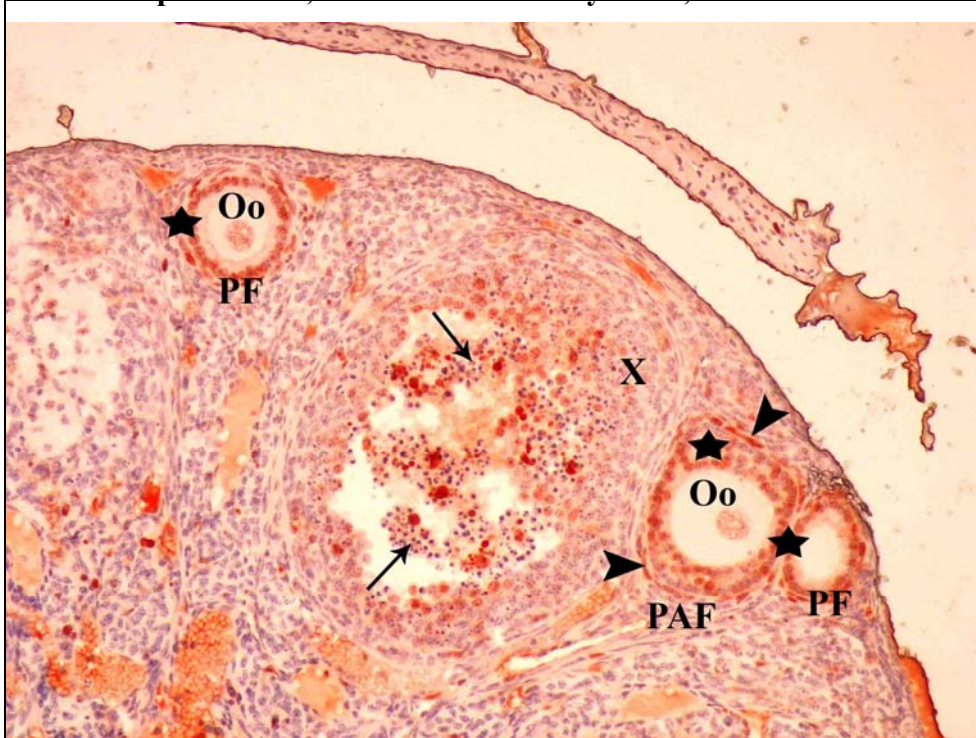


**Resim 17. Radyasyon uygulamasından 3 saat sonra alınan ve curcumin verilen grupta atretik antral foliküller bulunmasına rağmen primordial rezervin (\*) kısmen korunduğu görülmektedir. Foliküllerin bazal membranı (→) ve atretik foliküllerde apoptotik cisimciklerin (▶) PAS (+) boyandığı izlenmektedir. PAS+HL, X200.**

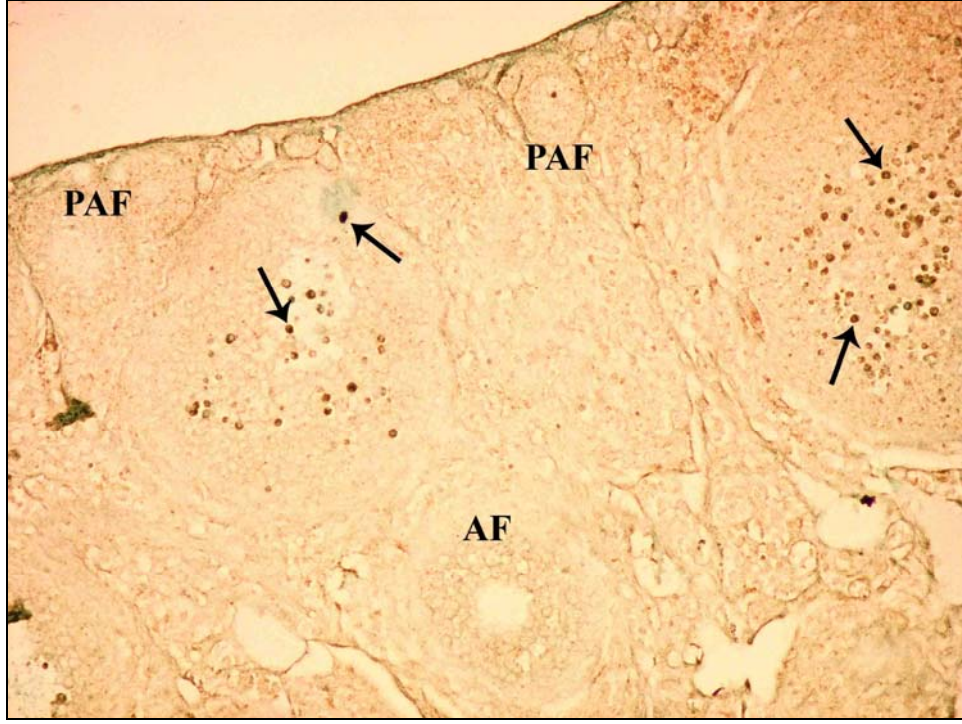




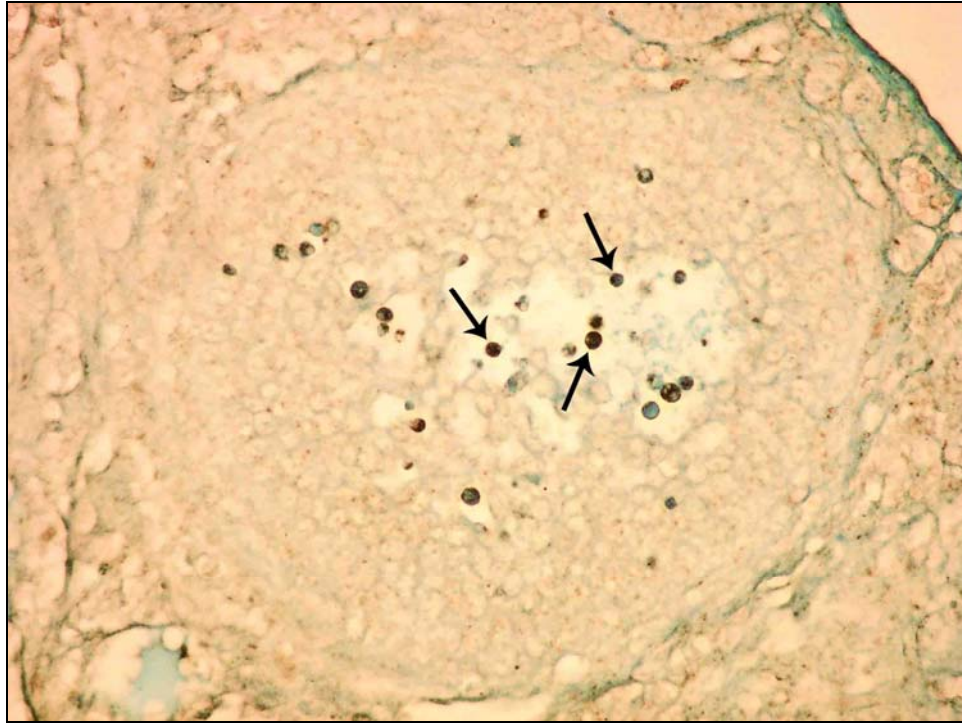
**Resim 18.** Sağlıklı foliküllerin duvarında kuvvetli PCNA immün reaksiyon veren çok sayıda granüloza hücreleri (\*), atretik foliküllerde (X) immün boyamının zayıf ve çok sayıda piknotik nükleuslu hücre (→) olduğu gözlenmektedir. İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması, X100.



**Resim 19.** Radyasyondan önce curcumin verilen grupta primer (PF) ve preantral foliküllerin (PAF) granüloza hücreleri (\*), oositleri (Oo) ve teka hücrelerinin (▶) PCNA ile pozitif reaksiyon verdikleri görülmektedir. İleri atretik aşamadaki (X) antral folikülde antrumda çok sayıda piknotik nükleuslu hücre (→) dikkati çekmektedir. İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması, X200.



**Resim 20.** Curcumin uygulanan radyasyon 3 saat grubuna ait ovaryum kesitinde apoptotik granüloza hücreleri (→) içeren antral foliküllerin yanı sıra radyasyondan korunan preantral (PAF) ve antral foliküller (AF) izlenmektedir. TUNEL boyası, X200.



**Resim 21.** Atretik aşamadaki antral folikülde antrumda ve folikül duvarında TUNEL boyama ile işaretlenmiş apoptotik granüloza hücreleri (→) görülmektedir. TUNEL boyası, X400.

## **RADYASYON SONRASI 12 SAAT GRUBUNA AIT MORFOLOJİK BULGULAR**

### **Radyasyon Sonrası 12 Saat Grubuna Ait Işık Mikroskopik Bulgular**

İyonize radyasyon verilmesinden 12 saat sonra alınan ovaryum kesitlerinde meydana gelen atretik folikül oranının radyasyondan 3 saat sonra alınan ovaryumlarla kıyaslandığında arttığı gözlemlendi. Ovaryuma küçük büyütmede bakıldığında gelişimin farklı aşamalarındaki foliküllerin hemen hemen tamamının atretik olduğu görüldü (Resim 22). Atretik foliküllerdeki değişiklikler; granüloza hücre tabakasında çok sayıda piknotik nükleus sayısında artış, granüloza hücreleri ile oosit arasında kopmaların yanı sıra, folikül lümeninde apoptotik cisimcikler, teka tabakası hipertrofisi, bazal membran hipertrofisi, oosit morfolojisinde bozulmalar olarak gözlemlendi (Resim 22,23).

PAS+HL ile boyanmış kesitlerde yapılan mikroskopik incelemede ışınlamadan 12 saat sonra alınan ovaryum kesitlerinde ileri düzeyde atretik foliküller görüldü. Bazı foliküllerde oositin ZP'dan ayrıldığı, ZP'nın kıvrımlı hale geldiği ve bazılarında ise ZP'nın bütünlüğünü kaybettiği gözlemlendi. İleri atrezi aşamasındaki foliküllerde PAS(+) boyanmış, fragmente ve büyük vakuoller içeren oositler izlendi. Görüntü alanındaki antral foliküllerin granüloza hücreleri arasında PAS (+) boyanan hücresel artıklar, granüloza hücreleri ile ZP arasında boşluklar ve bazal membran ondülasyonunun olduğu gözlemlendi (Resim 24).

### **Radyasyon Sonrası 12 Saat Grubuna Ait İmmünohistokimyasal Bulgular**

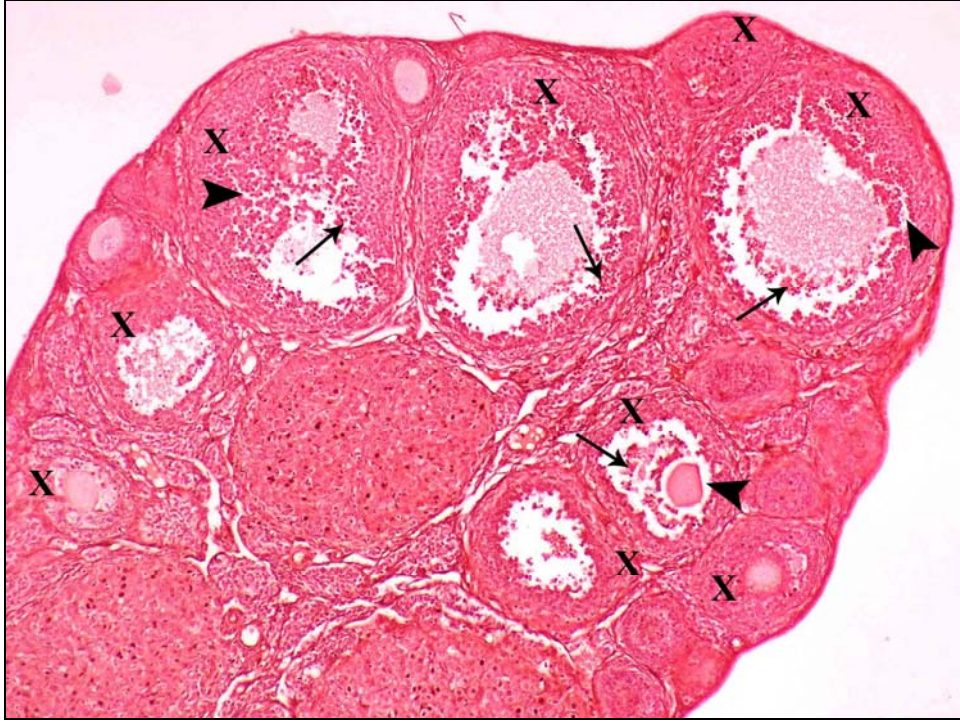
Radyasyon uygulamasını takiben 12 saat sonra alınan ovaryum kesitlerinde, immün reaksiyonun en zayıf olduğu grup olarak görüldü. Görüntü alanındaki antral foliküllerin duvarında granüloza hücrelerinin zayıf boyandığı izlendi. Korteksin hemen altında bulunan bazı primer foliküller de granüloza hücrelerinin PCNA pozitif boyandıkları gözlemlendi (Resim 25). İleri atretik antral foliküllerde immün reaksiyonunun zayıf olduğu görüldü. Foliküllerin duvarında ve lümeninde çok sayıda piknotik nükleuslu granüloza hücreleri izlendi (Resim 26).

Kontrol grubu ile deney grupları arasında yer alan foliküller semikantitatif olarak değerlendirildiğinde PCNA pozitif reaksiyon veren hücre sayısının en az bu grupta olduğu tespit edildi (Tablo 3).

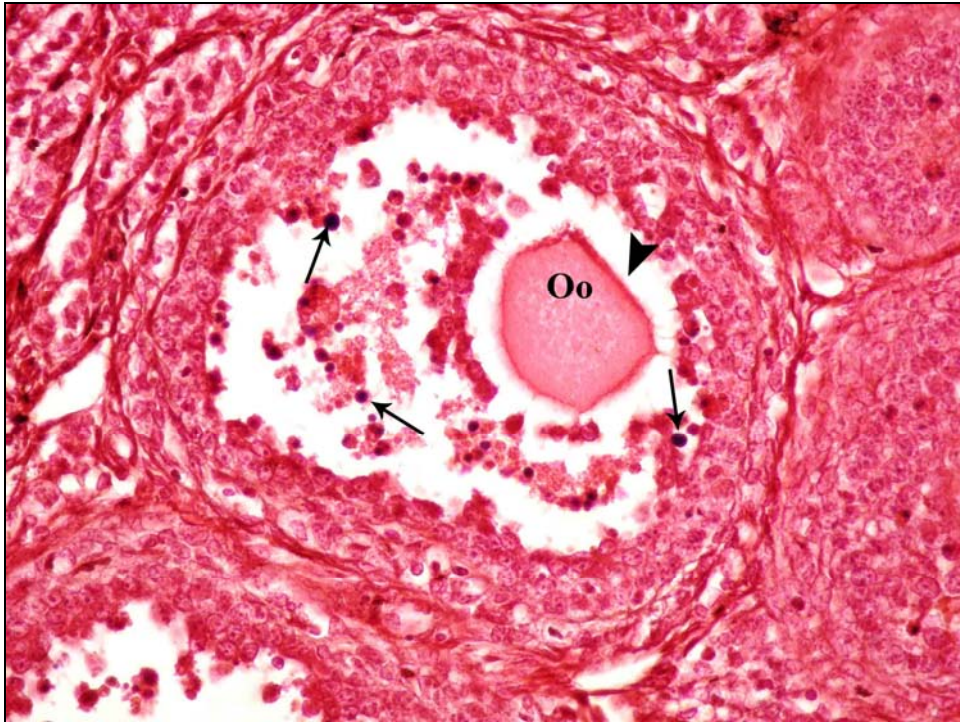
### **Radyasyon Sonrası 12 Saat Grubuna Ait TUNEL Boyama Bulguları**

Radyasyon uygulanan ve 12 saati takiben alınan ovaryum dokularında TUNEL boyası ile işaretlenen granüloza hücrelerinin tüm gruplara oranla arttığı gözlemlendi. Bu kesitlerdeki birçok atretik folikülün antrumunda ve granüloza hücre tabakaları arasında apoptotik hücreler izlendi (Resim 27,28). Atretik bir antral folikülde çok sayıda apoptotik granüloza hücreleri gözlemlendi. İleri atretik aşamadaki folikülde dejenerasyonun ilerlediği, granüloza hücrelerinin elemine edilerek az sayıda kalan hücrelerinde bazal membran sınırında ve TUNEL pozitif oldukları görüldü (Resim 28).

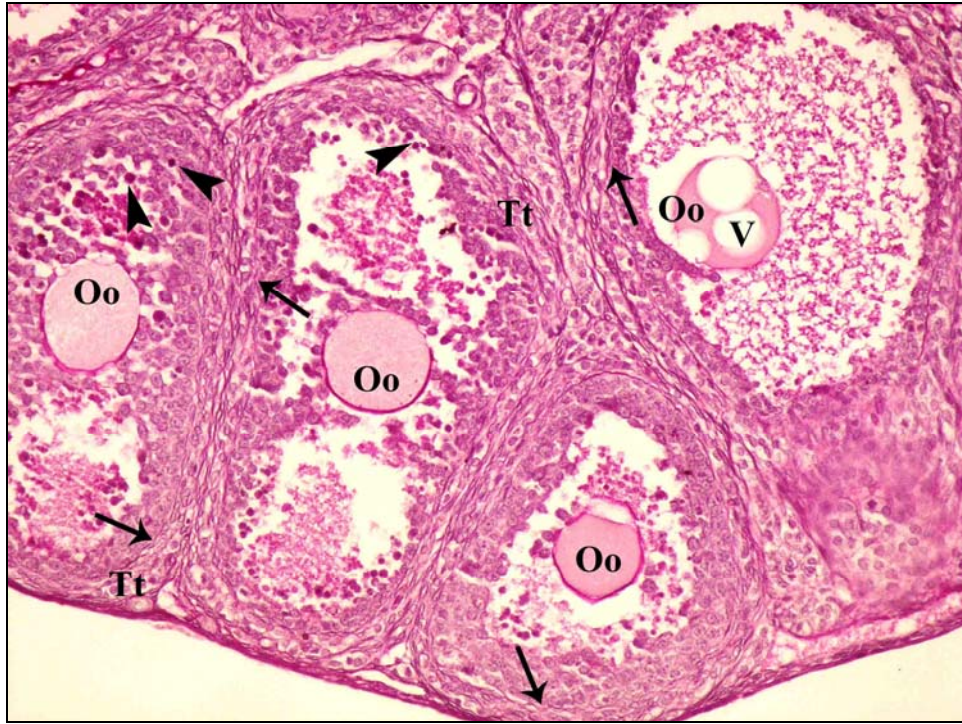
Kontrol ve deney grupları içinde semikantitatif olarak kıyaslandığında, radyasyondan 12 saat sonra alınan ovaryum dokularında TUNEL pozitif reaksiyon veren granüloza hücrelerinin bu grupta en fazla olduğu tespit edildi (Tablo 3).



**Resim 22.** Radyasyon uygulamasını takiben 12 saat sonra alınan kesitte ovaryumda hemen hemen foliküllerin tamamının atreziye (X) uğradıkları görülmektedir. Foliküllerde oosit granüloza ayrışması (▶), folikül duvarında granüloza hücrelerinde ayrışmalar (▶), antrum ve folikül duvarında çok sayıda piknotik nükleuslu (→) hücrelerin olduğu görülmektedir. H+E, X100.



**Resim 23.** İleri atretik aşamadaki antral folikülde oosit ile granüloza hücreleri arasında ayrışmalar (▶), oosit (Oo) morfolojisinde bozulmalar ve çok sayıda piknotik nükleuslu granüloza hücrelerinin (→) olduğu izlenmektedir. H+E, X400.



**Resim 24.** İleri atretik aşamadaki antral foliküllerin bazal membranlarında düzensizlikler ve ondülasyon (→), oositlerde (Oo) dejenerasyon ve vakuoller (V) içerdikleri görülmektedir. Foliküllerin çok sayıda PAS (+) boyanan apoptotik cisimcikler (►) içerdikleri ve teka tabakalarının (Tt) hipertrofiye uğradıkları gözlenmektedir. PAS+HL, X200.



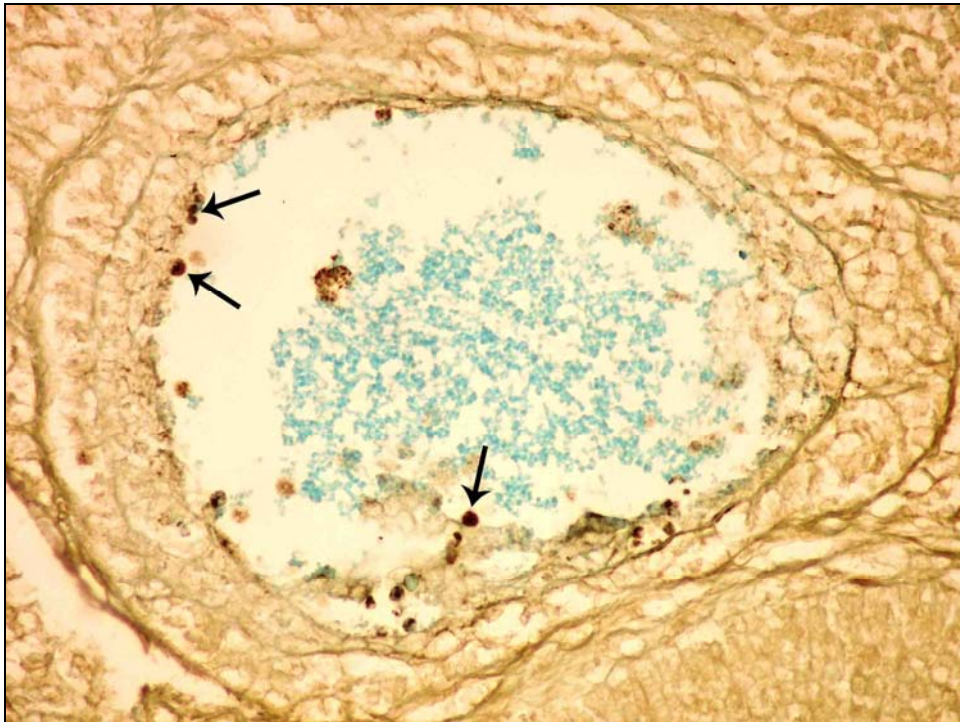
**Resim 25.** Radyasyondan 12 saat sonra atretik foliküllerin artış gösterdiği (X) ve atretik foliküllerde granüloza hücrelerinin immün reaksiyon vermedikleri (\*) görülmektedir. İmmün reaksiyon gösteren az sayıda primer (PF) ve preantral foliküller (PAF) gözlenmektedir. İmmünoperoksidaz, hematoxilen zıt boyaması, X40.



**Resim 26.** Atretik antral foliküllerde (X) immün reaksiyonunun (►) zayıf olduğu görülmektedir. Foliküllerin duvarında ve lümeninde çok sayıda piknotik nükleuslu granüloza hücreleri (→) izlenmektedir. İmmünoperoksidaz, hematoxilen zıt boyaması, X200.



**Resim 27.** Atretik aşamadaki antral folikülün lümeninde ve duvarında çok sayıda apoptotik granüloza hücreleri (→) görülmektedir. TUNEL boyası, X400.



**Resim 28.** İleri atretik aşamadaki antral folikülde granüloza hücrelerinin bazal membran sınırında az sayıda ve apoptotik (→) olarak görülmektedir. TUNEL boyası, X400.



## **RADYASYON VE CURCUMİN SONRASI 12 SAAT GRUBUNA AİT MORFOLOJİK BULGULAR**

### **Radyasyon ve Curcumin Sonrası 12 Saat Grubuna Ait Işık Mikroskopik Bulgular**

Radyasyondan 10 gün önce curcumin verilmeye başlanan ve radyasyondan 12 saat sonra alınan ovaryum kesitlerinde, curcuminin radyasyonun oluşturduğu ovarian hasarı kısmen önlediği görüldü. Ancak curcuminin, radyasyon sonrası 12. saat grubunda iyonizan radyasyonun oluşturduğu şiddetli hasarın boyutunu, radyasyon sonrası 3. saat seviyesine kadar indiremediği tespit edildi. Görüntü alanındaki preantral ve antral foliküllere bakıldığında; bu foliküllerin, çok sayıda piknotik nükleuslu granüloza hücreleri içerdiği gözlemlendi (Resim 29). Germinal epitelin hemen altında görülen birkaç preantral folikülün morfolojik yapılarının düzensizliği dikkat çekti. Bu foliküllerin duvarında da piknotik nükleuslu granüloza hücreleri görüldü (Resim 29). Bir diğer kesitte atretik antral folikülün yanında normal görünümlü primer folikülün bulunduğu dikkati çekti. Atretik antral folikülün oosit granüloza hücreleri arasında boşluklar olduğu izlendi (Resim 30).

Radyasyondan 12 saat sonra alınan kesitlerde, PAS+HL ile yapılan incelemede farklı aşamalarda atretik foliküller görüldü. Bu foliküllerin oositlerinin morfolojisinin bozulması PAS ile boyandıkları gözlemlendi. Granüloza hücrelerinin bazal membranlarının PAS (+) boyandığı ve radyasyondan dolayı membranların ondüle olduğu tespit edildi. Atretik foliküllerin teka tabakalarının hipertrofiye uğradığı görüldü. Radyasyon verilmesinden önce curcumin verilen bu grupta tedavisiz gruba kıyasla hasarın kısmen önlediği izlendi. (Resim 31).

### **Radyasyon ve Curcumin Sonrası 12 Saat Grubuna Ait İmmünohistokimyasal Bulgular**

Curcumin verilen bu grupta ovarian kesitlerde yapılan mikroskopik incelemede, iyonizan radyasyonun sebep olduğu hasarı curcuminin kısmen önlediği gözlemlendi. Radyasyon uygulamasını takiben 12 saat sonra alınan ovaryum dokuları ile kıyaslandığında immün reaksiyon veren foliküllerin kısmen arttığı görüldü. Ancak ovaryumlarda çok sayıda atretik folikül olduğu ve bunların granüloza hücrelerinin büyük bir çoğunluğunda immün reaksiyonun negatif olduğu dikkati çekti. Atretik foliküllerin antrumunda ve duvarlarında çok sayıda piknotik nükleuslu granüloza hücreleri olduğu görüldü (Resim 32). Erken atretik folikül özelliği gösteren birkaç antral folikülün granüloza hücrelerinin yanı sıra oositlerinin de

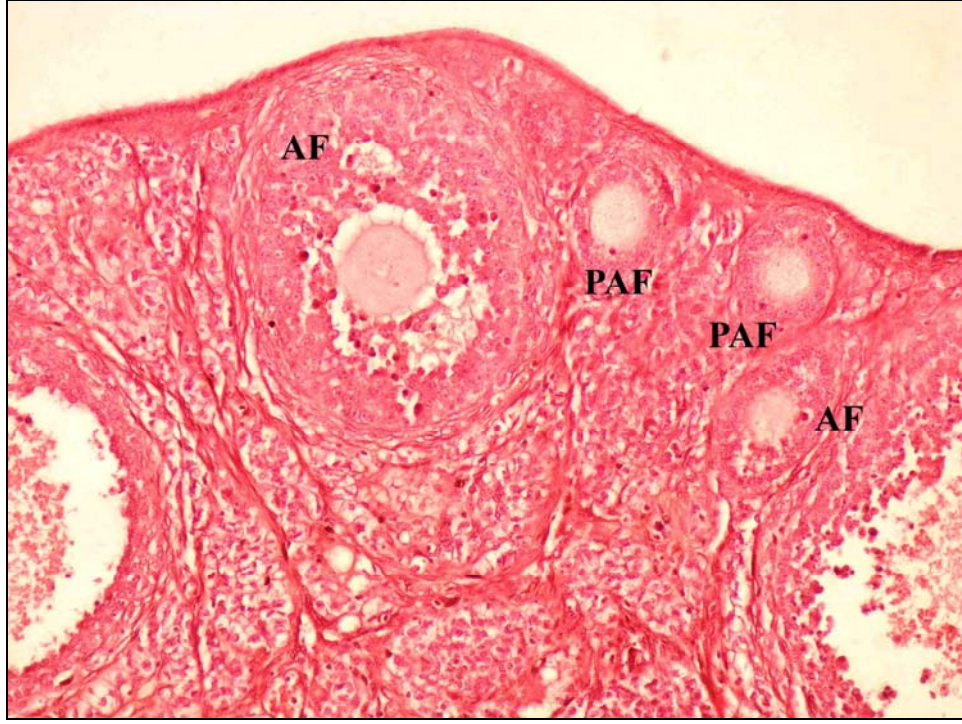
PCNA ile pozitif boyandığı gözlendi. Bu foliküllerin duvarında kuvvetli reaksiyon veren granüloza hücreleri ile birlikte çok sayıda piknotik nükleuslu granüloza hücreleri de tespit edildi. Normal görünümlü bir primer folikülde oosit ile birlikte mitotik aktivitesi yeni başlayan birkaç granüloza hücrelerinin de PCNA pozitif reaksiyon verdiği dikkati çekti (Resim 33).

Radyasyon uygulamasını takiben 12 saat sonra alınan ovaryuma ait foliküller ile curcumin verilen bu grupta yer alan foliküller semikantitatif olarak değerlendirildiğinde PCNA pozitif reaksiyon veren hücrelerin kısmen arttığı tespit edildi (Tablo 3).

### **Radyasyon ve Curcumin Sonrası 12 Saat Grubuna Ait TUNEL Boyama Bulguları**

Radyasyondan 10 gün önce curcumin verilmeye başlanan ve radyasyondan 12 saat sonra alınan ovaryum kesitlerinde, curcuminin radyasyonun oluşturduğu apoptozisi kısmen önlediği görüldü. Ovaryum dokularından alınan kesitler incelendiğinde TUNEL boyası ile işaretlenen granüloza hücrelerinin tüm gruplarda görüldüğu gözlendi. Bu kesitlerdeki birçok atretik folikülün antrumunda ve granüloza hücre tabakaları arasında apoptotik hücreler izlendi (Resim 34,35). Atretik bir antral folikülde çok sayıda apoptotik granüloza hücreleri folikülün duvarında ve lümeninde gözlendi. İleri atretik aşamadaki bu folikülde dejenerasyonun ilerlediği, oosit ile granüloza hücreleri arasında boşluklar oluşmasının yanı sıra TUNEL ile işaretlenen apoptotik granüloza hücrelerinin folikülde yaygın olarak buldukları tespit edildi (Resim 35).

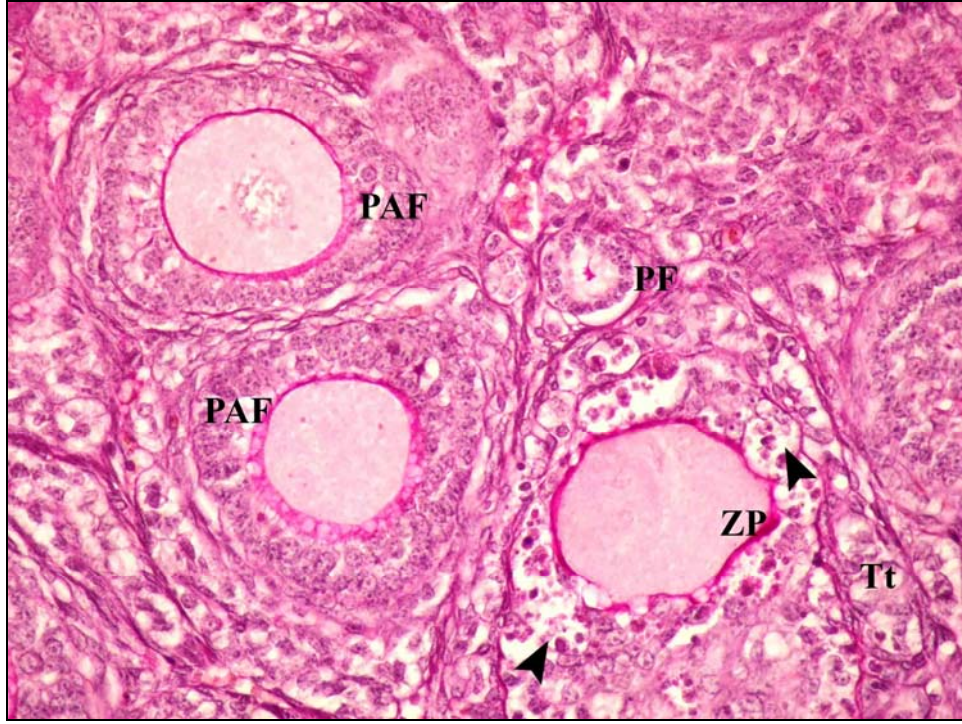
Radyasyondan 12 saat sonra alınan ovaryum kesitleri ile semikantitatif olarak kıyaslandığında curcuminin apoptozisi kısmen önlediği tespit edildi (Tablo 3).



**Resim 29.** Curcumin verilen 12. saat grubuna ait ovaryum dokusunda atretik özellik gösteren ve piknotik nükleuslu granüloza hücreleri içeren preantral (PAF) ve antral foliküller (AF) görülmektedir. H+E, X200



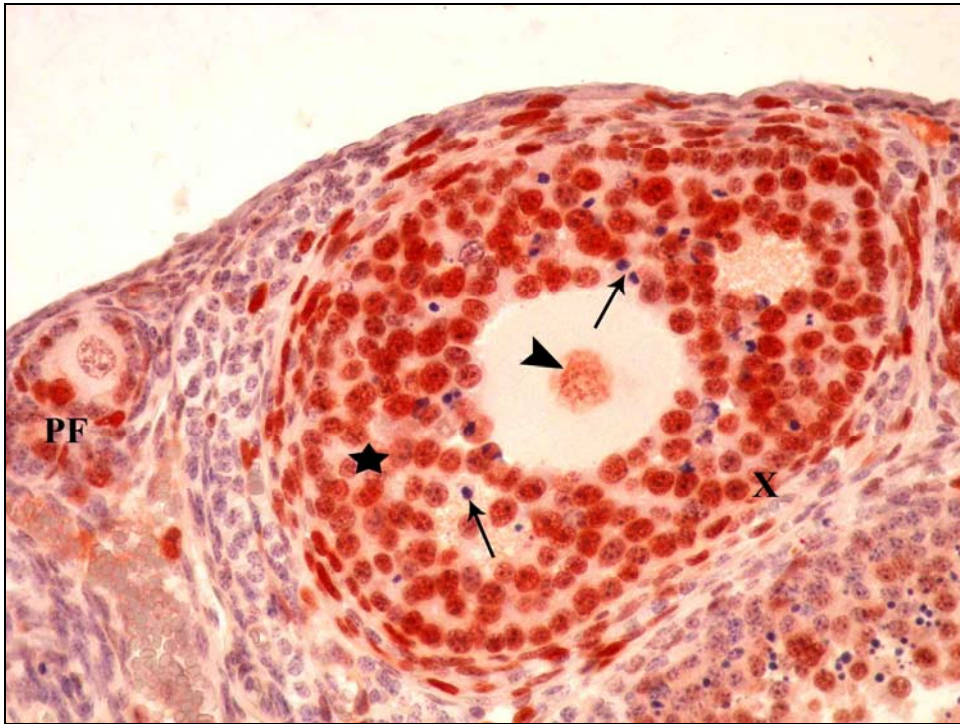
**Resim 30.** Curcumin verilen 12. saat grubuna ait kesitte sağlıklı bir primer folikül (PF) ile birlikte oosit granüloza hücreleri arasında geniş boşluklar (►) ve çok sayıda piknotik nükleuslu hücre (→) içeren bir antral folikül (AF) görülmektedir. H+E, X400.



**Resim 31.** Curcumin verilen 12. saat grubunda normal görünümlü primer (PF), preantral (PAF) ve ileri seviyede atretik bir folikül (\*) izlenmektedir. ZP'nin yapısının bozulduğu, teka tabakasının hipertrofiye olduğu, granüloza hücrelerinin (►) dejenerasyona uğradığı görülmektedir. PAS+HL, X400.



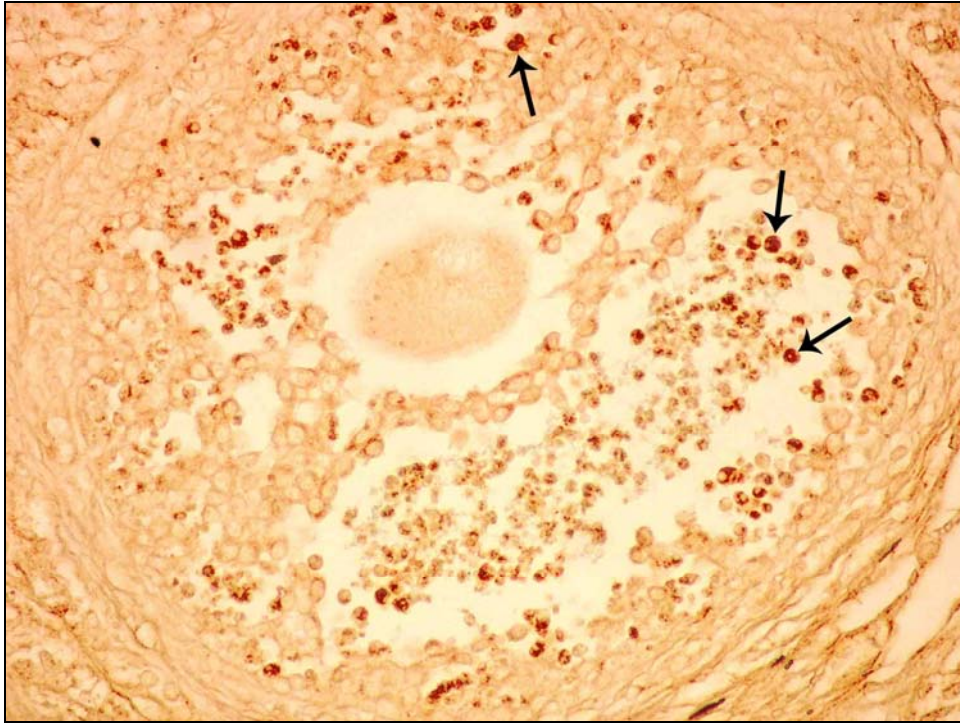
**Resim 32.** Atretik foliküllerde (X) PCNA immün reaksiyonun zayıf veya hiç olmadığı, normal görümlü foliküllerde granüloza hücreleri (\*) ile birlikte oositlerinde (▶) pozitif boyandığı izlenmektedir. İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması, X100.



**Resim 33.** Ovaryum epitelinin hemen altında normal görümlü bir primer folikül (PF) ile birlikte oosit (▶) ve granüloza hücreleri (\*) PCNA immün pozitif olan atretik bir antral folikül (X) görülmektedir. Folikülün duvarında piknotik nükleuslu hücreler (→) izlenmektedir. İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması, X400.



**Resim 34.** Curcumin verilen 12.saat grubuna ait kesitte apoptotik granüloza hücrelerine (→) sahip preantral ve antral foliküller görülmektedir. Ovaryum epitelinin hemen altında sağlıklı görünümlü bir preantral folikül izlenmektedir. TUNEL boyası, X200.



**Resim 35.** Folikül duvarında ve antrumunda çok sayıda apoptotik cisimcikler (→) içeren ileri seviyede atretik antral folikül görülmektedir. TUNEL boyası, X400.

**Tablo 3. Kontrol ve deney gruplarına ait PCNA ve TUNEL pozitif hücrelerin semikantitatif değerlendirmesi**

	Kontrol	Rd-3	Rd+Cur-3	Rd-12	Rd+Cur-12
PCNA	++++	++±	+++	+±	++
TUNEL	+±	+++	++±	++++	+++±

Hücre sayısı: yok (-), nadir (±), az(+), orta (++), fazla (+++), çok fazla (++++).

## **FOLİKÜLER ATREZİ ORANLARI**

Radyasyon verilen gruplarda atretik folikül oranlarının arttığı, artışın radyasyon uygulamasından 12 saat sonra alınan ovaryumlarda en fazla olduğu görüldü. Curcumin verilen deney gruplarında ise atretik folikül oranının curcumin verilmeyen deney gruplarına oranla daha az olduğu gözlemlendi. Tüm gruplara ait atretik primordial, primer, preantral ve antral folikül oranları Şekil 4-7’de ve Tablo 4’te gösterildi.

Radyasyon uygulamasını takip eden 3. ve 12. saatlerde atretik folikül oranlarının kontrole kıyasla arttığı tespit edildi. Bu artma Rd-3 grubunda  $p<0.01$  oranında anlamlılık taşımakta iken, Rd-12 grubunda  $p<0.00001$  oranında olduğu görüldü. Rd-3 grubu ile Rd-12 grupları karşılaştırıldığında ise aralarında  $p<0.001$  oranında anlamlılık olduğu gözlemlendi. Radyasyondan önce curcumin verilen Rd+Cur-3 grubu ile Rd-3 grubu arasında ve Rd+Cur-12 grubu ile Rd-12 grubu arasında bu anlamlılığın  $p<0.05$  oranında olduğu tespit edildi. Tedavi grupları kontrole kıyaslandığında ise Rd+Cur-3 grubu ile aralarında  $p<0.05$  oranında, Rd+Cur-12 grubu ile de  $p<0.0001$  oranında anlamlılık olduğu görüldü.



**Tablo 4. Kontrol ve deney gruplarına ait atretik primordial, primer, preantral ve antral folikül oranları**

<b>Atretik Folikül Oranları (%)</b>	Kontrol	Rd-3	Rd+Cur-3	Rd-12	Rd+Cur-12
Primordial Folikül	33±2,5	55±4,2*	44±3,6 <sup>†</sup>	87±7,6 <sup>‡</sup>	76±6,1 <sup>§</sup>
Primer Folikül	15±1,2	25±2,1*	20±1,7 <sup>†</sup>	52±3,5 <sup>‡</sup>	46±3,1 <sup>§</sup>
Preantral Folikül	25±2,2	47±3,7*	36±2,8 <sup>†</sup>	79±6,2 <sup>‡</sup>	68±5,3 <sup>§</sup>
Antral Folikül	56±4,3	77±6,2*	66±5,2 <sup>†</sup>	92±7,9 <sup>‡</sup>	84±7,4 <sup>§</sup>

\*p<0,01 kontrolle kıyaslandığında,

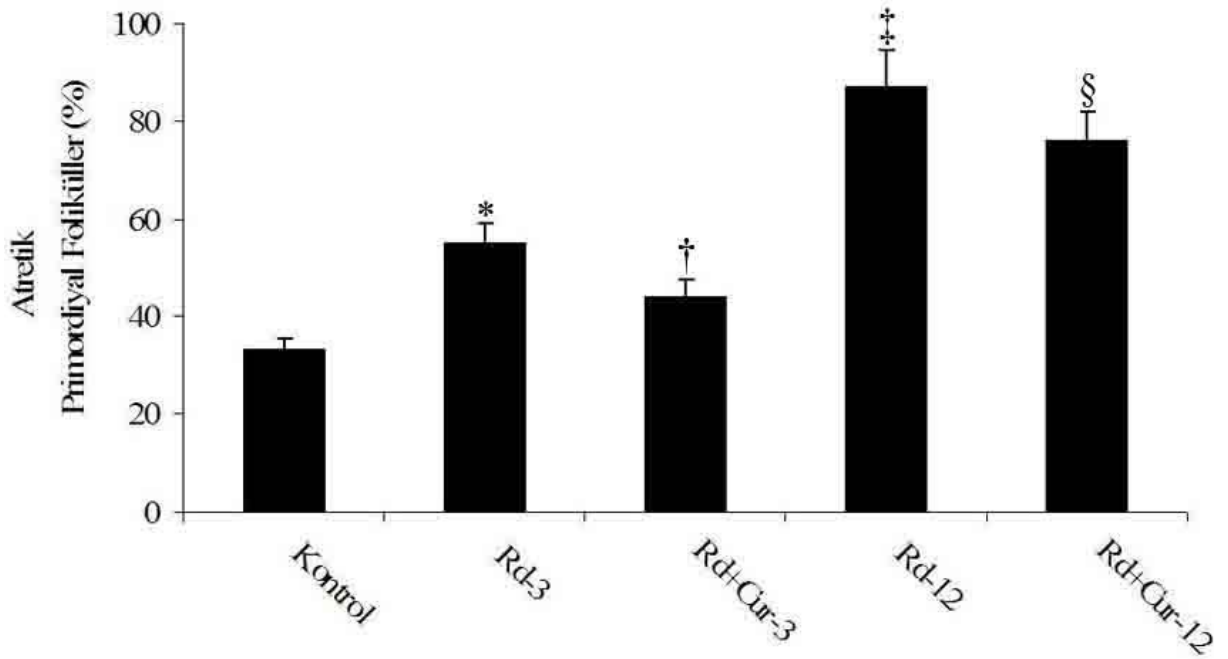
<sup>†</sup>p<0,05 Rd-3 ve kontrol grubu ile kıyaslandığında,

<sup>‡</sup>p<0,00001 kontrolle kıyaslandığında,

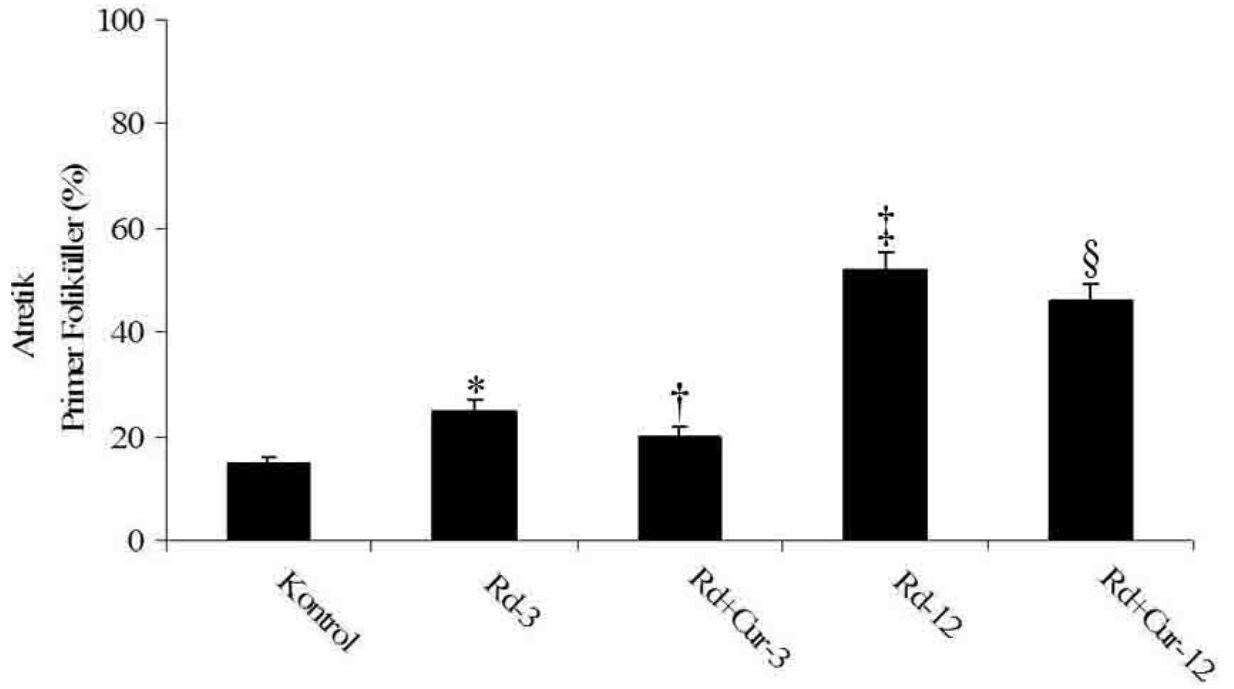
<sup>‡</sup>p<0,001 Rd-3 grubu ile kıyaslandığında,

<sup>§</sup>p<0,05 Rd-12 grubu ile kıyaslandığında,

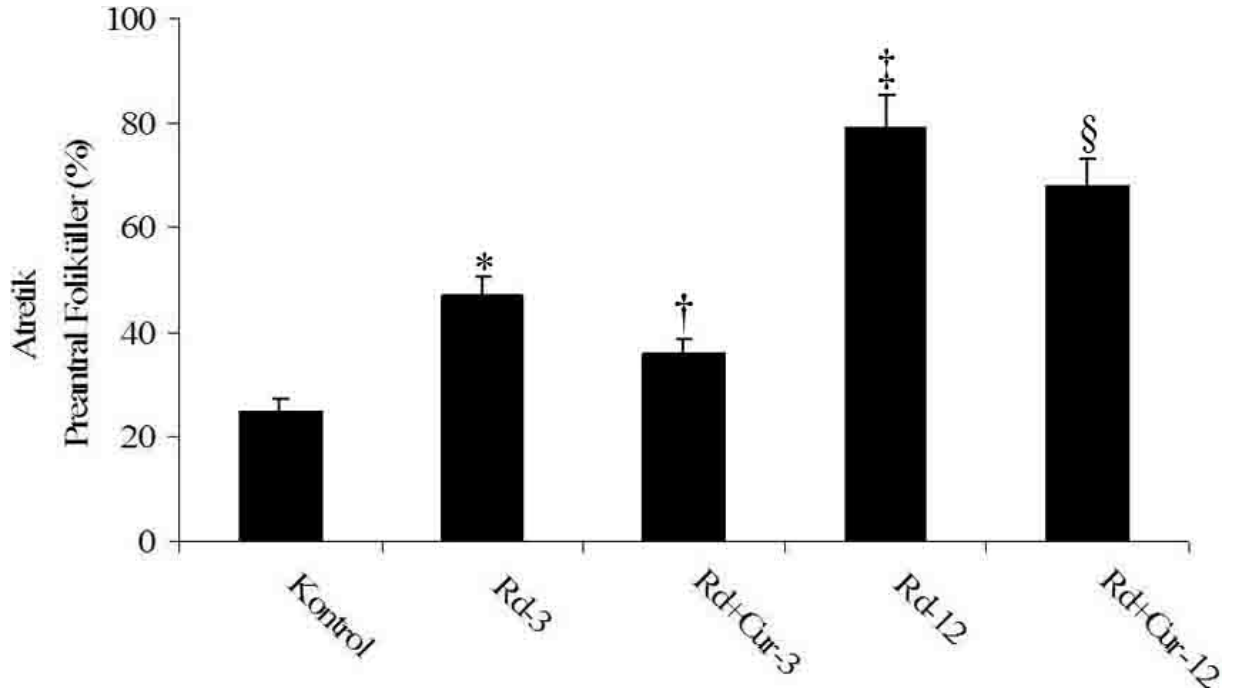
<sup>§</sup>p<0,0001 kontrol grubu ile kıyaslandığında.



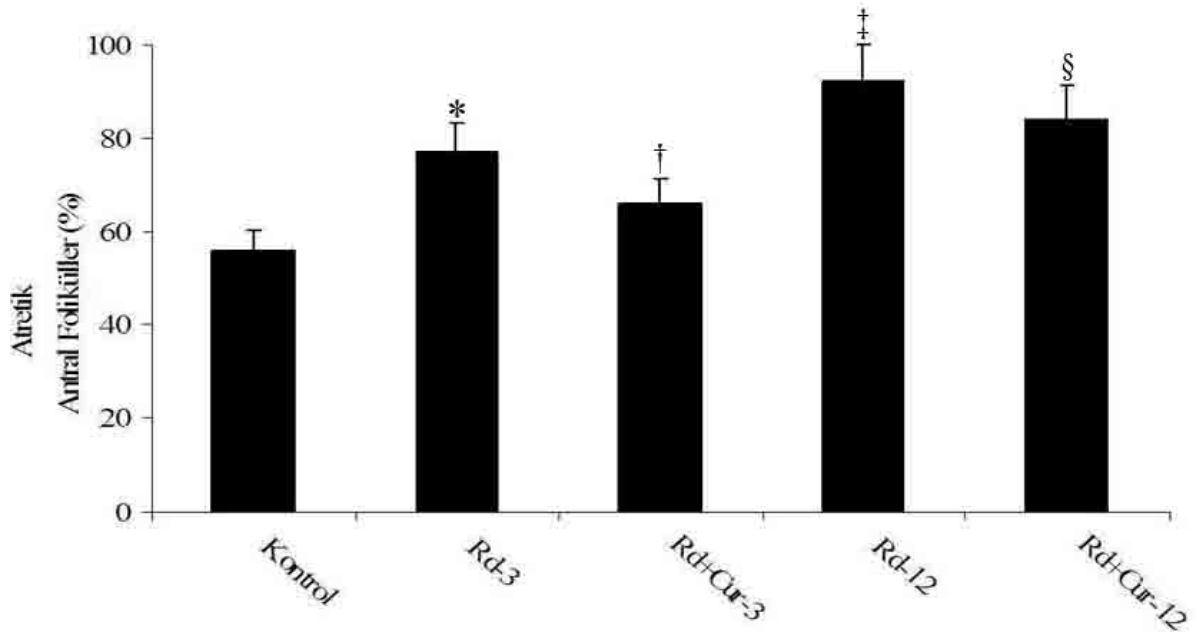
Şekil 4. Kontrol ve deney gruplarına ait atretik primordial folikül oranları. \* $p < 0,01$  kontrolle kıyaslandığında, † $p < 0,05$  Rd-3 ve kontrol grubu ile kıyaslandığında, ‡ $p < 0,00001$  kontrolle kıyaslandığında, † $p < 0,001$  Rd-3 grubu ile kıyaslandığında, § $p < 0,05$  Rd-12 grubu ile kıyaslandığında, § $p < 0,0001$  kontrol grubu ile kıyaslandığında.



Şekil 5. Kontrol ve deney gruplarına ait atretik primer folikül oranları. \* $p < 0,01$  kontrolle kıyaslandığında, † $p < 0,05$  Rd-3 ve kontrol grubu ile kıyaslandığında, ‡ $p < 0,00001$  kontrolle kıyaslandığında, † $p < 0,001$  Rd-3 grubu ile kıyaslandığında, § $p < 0,05$  Rd-12 grubu ile kıyaslandığında, § $p < 0,0001$  kontrol grubu ile kıyaslandığında.



**Şekil 6.** Kontrol ve deney gruplarına ait atretik preantral folikül oranları. \* $p < 0,01$  kontrolle kıyaslandığında, † $p < 0,05$  Rd-3 ve kontrol grubu ile kıyaslandığında, ‡ $p < 0,00001$  kontrolle kıyaslandığında, † $p < 0,001$  Rd-3 grubu ile kıyaslandığında, § $p < 0,05$  Rd-12 grubu ile kıyaslandığında, § $p < 0,0001$  kontrol grubu ile kıyaslandığında.



**Şekil 7. Kontrol ve deney gruplarına ait atretik antral folikül oranları. \* $p < 0,01$  kontrolle kıyaslandığında, † $p < 0,05$  Rd-3 ve kontrol grubu ile kıyaslandığında, ‡ $p < 0,00001$  kontrolle kıyaslandığında, § $p < 0,001$  Rd-3 grubu ile kıyaslandığında, § $p < 0,05$  Rd-12 grubu ile kıyaslandığında, § $p < 0,0001$  kontrol grubu ile kıyaslandığında.**

## TARTIŞMA

Memelilerde ovarian foliküllerin büyük çoğunluğu foliküler atrezi aracılığı ile dejenere olurlar ve elemine edilirler (6,72,73). Foliküler atreziyi tetikleyen ve hızlandıran patolojik uyaranlardan biri de radyasyondur (7). Her ne kadar radyasyonun ovarian foliküller üzerine zararlı etkileri olduğunu gösteren çalışmalar yaygın olarak bulunsa da, radyasyonun sebep olduğu foliküler atrezi ile ilgili folikül morfolojilerini yansıtan çalışmalar oldukça kısıtlıdır.

Radyasyonda hücre hasarının oluşması oksitadif stres ile birlikte ortaya çıkan serbest oksijen radikallerine bağlıdır. Radyasyona karşı korumaya yönelik A, C ve E vitamini gibi antioksidanlar önerilmiştir (74,75). İyonize radyasyonun sistemler üzerinde oluşturduğu zararlı etkilerin önlenmesine yönelik birçok çalışma yapıldığı rapor edilmiştir. Bu çalışmalarda birçok antioksidan kullanılmıştır. Bununla birlikte curcumin radyasyon hasarını önlemeye yönelik oldukça kullanışlı bir antioksidandır. Curcumin radyasyonun sebep olduğu zararlı etkilere karşı sağlıklı hücreleri korur (76).

Radyasyon maruziyetinden sonra infertilitenin önlenmesi için önleyici yöntemlerin geliştirilmesi ve kullanımı önemlidir. Hücrelerde radyasyona bağlı hasarların altında yatan en büyük neden olarak oksidatif stresin olduğu gösterildikten sonra, yapılan birçok çalışmada antioksidanların önleyici özelliklerini ortaya koyan çalışmalar yapılmıştır. Önemli antioksidanlardan biri olarak gösterilen curcumin ile ilgili yapılan birçok çalışma rapor edilmiştir. Bu çalışmalara rağmen yapılan literatür taramasında curcuminin ovaryumda iyonizan radyasyona karşı koruyucu etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Çalışmamızda 8.3 Gy iyonizan radyasyon verilen farelerin ovaryum kesitlerine bakıldığında, erken ve ileri seviyede atretik değişiklikler gözlemledik. Erken atretik değişiklikler radyasyon uygulamasını takip eden 3. saat grubunda daha fazla iken radyasyon

uygulamasını takip eden 12. saat grubunda ileri seviyede atretik foliküller olduğunu gördük. Erken atretik foliküllerde granüloza hücreleri ve oosit kumulus hücreleri arasında bağlantıların zayıfladığını, piknotik nükleuslu granüloza hücrelerinin folikül duvarının apikalinde olduğunu tespit ettik. İleri antral seviyedeki foliküllerde atretik değişiklikler, folikül duvarında, granüloza hücreleri arasında piknotik nükleuslar ve apoptotik cisimlerin varlığının yanında, granüloza hücre sayısında şiddetli azalma ve oosit morfolojilerinin bozulduğunu, teka tabakasının hipertrofiye uğradığını, bazal membran ondülasyonu ve ZP'nin yapısının bozulduğunu gözlemledik.

Foliküler atreziyi tetikleyen ve hızlandıran patolojik uyarılardan biri de radyasyondur (7). Dejenere olan foliküller; piknotik nükleuslu granüloza hücreleri, teka tabakası hipertrofisi, bazal membran ayrışması ve ondülasyonu gibi morfolojik özellikler gösterirler (6,72,73).

Jarrell ve ark.'na (9) göre radyasyona cevap olarak ovaryumun morfolojik yapısında değişiklikler oluşur. Son çalışmalar ile radyasyonun ovaryum foliküllerinde apoptozise (8), oositlerde kromozomal hasarlara ve ovarian doku hasarına sebep olduğu ortaya konulmuştur (10). Foliküllerin granüloza hücrelerinde apoptozis görülür (11). Radyasyon uygulanmış fare ovaryumlarında, foliküler dejenerasyonun granüloza hücrelerinde meydana gelen apoptozis aracılığı ile olduğu gösterilmiştir (7). Önceden yapılan çalışmalarda da yüksek doz radyasyonun primordial, primer, preantral ve antral foliküllerde dejenerasyonlara sebep olduğu gösterilmiştir (77,78).

Çalışmamızda iyonizan radyasyonun sebep olduğu apoptozisi göstermek amacı ile TUNEL boyası yaptık. İyonize radyasyonu takip eden 3 ve 12. saatlerde TUNEL boyası ile işaretlenen granüloza hücrelerinin sayıca arttığını tespit ettik. Erken ve ileri seviyede atretik foliküllerde granüloza hücrelerinde ki apoptozisin ve dejenerasyonun şiddetinin radyasyonu takip eden süre ile doğru orantılı olarak arttığını gözlemledik. Atretik özellik gösteren foliküllerin duvarında ve lümeninde çok sayıda apoptotik hücre ve cisimciklerin olduğunu gördük.

Radyasyon maruziyeti apoptozis aracılığı ile hücre ölümlerine yol açar. Apoptozis hasarlanmış hücrelerin elemine edilmelerini sağlar. Germ hücreleri genotoksik ajanlara ve DNA hasarına oldukça hassastır. Radyasyonun en büyük etkenlerinden biri mitokondriyal apoptotik yolla hücrelerde DNA zincirlerinde kırıklara yol açmasıdır (79).

Apoptozis, ovarian fonksiyon ve gelişim için en önemli etkenlerden biridir (80). Piknotik nükleuslu granüloza hücreleri apoptotik süreci başlayan hücreler olarak kabul edilirler (81). Apoptozis dokularda sadece spontan olarak gelişmez, radyasyonda apoptozisi

uyarabilir (82). Radyasyonun ovarian fonksiyonları bozduğu, atreziyi uyardığı ve foliküler dejenerasyonu hızlandırdığı bilinmektedir (7,10). Kontrolle kıyaslandığında radyasyon verilen ovaryumların folikülleri içinde ki apoptotik granüloza hücrelerinin sayısının arttığı bildirilmektedir (7). Radyasyon uygulanan ovaryumların dejenere olan foliküllerinde, hücrel debris ve apoptotik cisimciklerin arttığı, iyonizan radyasyonun foliküler hücrelerde apoptozisi ve inflamasyonu meydana getirdiği rapor edilmiştir (83).

Kaya ve ark. (84) yaptıkları bir çalışmada radyasyon uygulamasından 16 saat sonra TUNEL pozitif primordial ve antral folikül sayısında % 42 ve % 12 artış olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca atretik foliküllerin granüloza hücrelerinde kaspaz 3 ve 9 varlığı, TUNEL tekniği kullanılarak tespit edilmiştir (84,85).

Çalışmamızda kontrol ve iyonizan radyasyon uyguladığımız gruplardan alınan ovaryum kesitlerinde sağlıklı ve atretik folikülleri sayarak, atretik folikül oranını tespit ettik. Radyasyon uygulanan gruplarda atretik folikül oranının artış gösterdiğini gördük. İyonize radyasyon uygulamasını takip eden 3 ve 12. saatlerde atretik foliküllerin curcumin verilen gruplara ve kontrole oranla yüksek oranda olduğunu gözlemledik. Radyasyon uygulanan ve 12 saat sonra alınan ovaryumlarda atretik folikül oranının en yüksek bu grupta olduğunu tespit ettik.

Lee ve ark. (77) yaptıkları bir çalışmada farelere tüm vücut 8.3 Gy iyonizan radyasyon uygulamışlar ve radyasyondan sonraki 3, 6 ve 12. saatlerde ovaryum dokularını alarak primordial ve primer foliküllerdeki atrezi oranını ve morfolojik özelliklerini göstermişlerdir. Primordial ve primer foliküllerde, atretik folikül oranının radyasyondan sonra artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Kontrol grubunda sağlıklı primordial folikül oranı % 62.5 iken 3, 6 ve 12. saatlerde sırasıyla % 49, 11.1 ve 7.1 olduğunu söylemişlerdir. Primer foliküllerde ise kontrol grubunda % 81.3 iken 3, 6 ve 12. saatlerde sırasıyla % 75, 45.5 ve 33.3 olduğunu bildirmişlerdir (77).

Lee ve Yoon'un (83) yaptıkları bir diğer çalışmada farelere tüm vücut 7.2 Gy iyonizan radyasyon uygulamışlar ve radyasyondan sonraki 1, 2 ve 3. günlerde ovaryum dokularını alarak preantral ve antral foliküllerdeki atrezi oranını göstermişlerdir. Çalışma sonucunda kontrol grubunda atretik preantral ve antral foliküllerin sırası ile % 58 ve 27 olduğunu görmüşlerdir. Radyasyon sonrası 2. ve 3. günlerde bu oranın preantral foliküllerde % 94'e antral foliküllerde ise %87'ye çıktığını bildirmişlerdir (83).

Kim ve Lee'nin (78) yaptıkları bir çalışmada farelere 8.3 Gy iyonizan radyasyon uygulamışlar ve radyasyondan sonraki 2, 8 ve 14. saatlerden sonra ovaryumlarını alarak folikül oranlarını göstermişlerdir. Kontrol grubunda sağlıklı primordial folikül oranı % 61.6



iken radyasyon uygulanan gruplarda bu değerin 2, 8 ve 14. saatlerde sırasıyla % 51.6, 11.1 ve 7.1'e düştüğünü bildirmişlerdir. Primer foliküllerde bu değerler kontrol, 2, 4 ve 14. saatlerde sırasıyla % 82.5, 80, 45,5 ve 33.3, preantral ve antral foliküllerde ise % 31'i sağlıklı iken 2, 4 ve 14. saatlerde sırasıyla % 15.9, 7.5, ve 1.6'ya düştüğünü rapor etmişlerdir (78).

İyonizan radyasyon uygulanan farelerde curcuminin ovaryum dokusu üzerine radyoprotektif etkilerini incelediğimiz çalışmamızda, uyguladığımız 8.3 Gy radyasyondan sonra foliküllerde ki proliferatif aktiviteyi göstermek amacı ile immünohistokimyasal yöntemle PCNA yı boyadık. Radyasyon gruplarının tümünde meydana gelen atretik foliküller sağlıklı foliküller ile kıyaslandığında atretik folikülerde PCNA sentezinin azaldığını gördük. Radyasyon uygulanmasından 10 gün önce vermeye başladığımız 100 mg/kg curcuminin foliküllerde radyasyonun meydana getirdiğı hasarı kısmen önlediğini ve bu foliküllerde sadece radyasyon verilen gruplardaki foliküller ile kıyaslandığında PCNA sentezinin kısmen de olsa arttığını gözlemledik.

Ovaryumda foliküler gelişimin başında ve erken safhalarında PCNA'nın sentezlendiğı ratlarda (86), ineklerde (87) ve maymunlarda (88) yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada domuzların granüloza hücrelerinde PCNA sentezlenmesinin tespiti bir proliferasyon belirleyicisi olarak kullanılmıştır (89,90). PCNA' yı bir belirleyici olarak kullanan Feranil ve ark.'ları (91,92) PCNA sentezinin sağlıklı foliküllerde erken ve ileri seviyedeki atretik foliküllere oranla daha fazla sentez edildiğini bildirmişlerdir.

Tománek and Chronowska'nın (93) yaptıkları bir çalışmada atretik foliküllerde PCNA sentezinin azaldığını bildirmişlerdir. Erken atretik foliküllerde PCNA pozitif hücrelerinin azaldığını, foliküllerin antrumunda piknotik nükleuslu hücrelerin görüldüğünü rapor etmişlerdir. İleri atretik foliküllerin granüloza tabakalarında ise piknotik nükleuslu hücrelerin arttığını ve PCNA ile reaksiyon göstermeyen veya birkaç tane pozitif hücrenin bulunduğunu bildirmişlerdir. PCNA'nın immünohistokimyasal yöntemlerle tespit edilmesinin ovaryumdaki granüloza hücrelerinin proliferasyonunu göstermek için güvenilir bir araç olduğunu rapor etmişlerdir (93).

Hamm ve ark. (94) leptin yetersizliğı bulunan farelerde yaptıkları bir çalışmada atretik foliküllerin granüloza hücrelerinde PCNA sentezinin olduğunu ve PCNA'nın DNA sentezi için değil DNA hasarını tamir için sentez edildiğini rapor etmişlerdir. Chapman and Wolgemuth (95) atretik foliküllerde apoptozise giden granüloza hücrelerinin PCNA sentezlediklerini öne sürmüşlerdir. Fare ve ratlarda yapılan diğer birçok çalışmada da benzer sonuçlar rapor edilmiştir (95,96).

Çalışmamızda farelere iyonizan radyasyon uygulamasından 10 gün önce, iyonizan radyasyonun ovaryumda oluşturacağı hasarı önlemeye yönelik kuvvetli bir antioksidan madde olan curcumin verdik. Radyasyon verilen gruplarda oluşan hasarların curcumin tarafından kısmen önlendiğini gözlemledik. Atretik foliküllerde meydana gelen apoptozisi azalttığını ve atretik folikül oranlarını ise düşürdüğünü tespit ettik.

Su içeriği yüksek olan dokularda iyonizan radyasyonun etkileri özellikle su molekülleri üzerinden gelişmektedir. Su molekülünün radyolizisi,  $H_2O_2$  ve moleküler hidrojen ( $H_2$ ) gibi moleküllerin ve aynı zamanda hidrojen radikali ( $H\cdot$ ),  $OH\cdot$ , hidroperoksil radikali ( $HOO\cdot$ ) ve  $O_2\cdot$  gibi yüksek aktiviteli radikallerin oluşumuna yol açmaktadır. Serbest radikaller hücrenin genetik materyalinde de bir takım değişikliklere yol açmaktadır. Serbest radikallerin etkisiyle nükleik asitlerin yapısındaki hidrojen bağları ile baz-şeker molekülleri arasındaki bağlar kopmakta, şeker molekülleri okside olabilmekte, nükleotid zinciri kırılabilen ve terminal fosfatlar serbestleşmektedir (97).

Serbest radikallerin etkisizleştirilmesi,  $OH\cdot$ ,  $HOO\cdot$  ve  $O_2\cdot$  gibi radyasyon etkisiyle oluşan su metabolitlerinin, eksojen ya da endojen bir takım ajanları okside etmeleri neticesinde diğer hücre içi yapılarla etkileşime girme yeteneğinden yoksun kararlı yapı bileşikler oluşturulması ile sağlanmaktadır. Bu mekanizma sayesinde serbest radikallerin yaşamsal öneme sahip hücresel moleküller üzerindeki etkisi büyük ölçüde sınırlandırılmış olmaktadır (97,98). Diğer bir radyoprotektif etki mekanizması, serbest radikale hidrojen atomu bağlanmasıdır. R - H şeklinde sembolize edilen bir molekülün radyasyon etkisiyle R· (radikal R·) metabolitine dönüşmesi halinde, koruyucu etkili ajan, R· radikalinin yapısına bir hidrojen atomu ekleyerek kararlı yapıdaki R - H formunun yeniden oluşmasını sağlamaktadır (97).

Farelerde yapılan bir çalışmada, 1.15 Gy veya 0.05 Gy tüm vücut ışınlanmasından 2 saat önce veya ışınlanmanın hemen öncesinde oral yoldan verilen 5, 10 ve 20 mg/kg curcuminin polikromatik eritrositlerde mikronükleusu anlamlı bir şekilde önlediği gösterilmiştir (98).

Bir başka çalışmada 1.5-3 Gy iyonizan radyasyon uygulanan farelere oral yoldan 400 µmol curcumin verilmesi radyasyonun sebep olduğu kromozomal hasarları ve polikromatik eritrositlerdeki mikronükleusu önlediği bildirilmiştir (99).

Gebe ratlarda yapılan bir çalışmada, ratlara hamileliğin 20. gününde 1.5 veya 2.6 Gy iyonizan radyasyon uygulanmış ve sonuçta meme tümörünün geliştiği görülmüştür. Gebeliğin 11 ve 23. günleri arasında yemlerine % 1 oranında curcumin katılması,

radasyonun sebep olduğu meme tümörünün gerilemesine sebep olduğu rapor edilmiştir (100,101).

Farelere günde 2 Gy olacak şekilde uygulanan 10, 20 veya 40 Gy iyonizan radyasyon sonucunda derideki antioksidan seviyesindeki değişimlere bakılmış, sadece radyasyon verilen gruplarda süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon konsantrasyonlarında düşüş olduğu fakat radyasyondan önce 100 mg/kg curcumin verilen gruplarda ise bu değerlerin sadece radyasyon uygulanan gruplara oranla daha yüksek olduğu bildirilmiştir (102).

Curcuminin radyoprotektif özelliği birçok mekanizmaya dayanmaktadır. Radyasyonun oluşturduğu serbest radikalleri ortadan kaldırma ve hücresele antioksidanların seviyelerini artırma curcuminin en önde gelen mekanizmasını oluşturmaktadır. Curcuminin radyoprotektif etki mekanizmalarından bir diğeri katalaz, glutatyon transferaz, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve bunların mRNA'larının artırılmasıdır. Curcumin lipid peroksidasyonu azaltarak glutatyon seviyesini artırması ve sülfhidril gruplarını artırması ile radyoprotektif özelliklerini genişletir. Curcuminin serbest radikalleri ortadan kaldırdığını, antioksidan seviyelerini arttırdığını, lipid peroksidasyonu inhibe ettiğini ve glutatyon transferaz, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve sülfhidril gruplarını arttırdığını gösteren birçok çalışma rapor edilmiştir (103-107).

Curcuminin radyasyondan önce verilmesi ile radyasyonun ovaryum dokusu üzerinde oluşturduğu hasarı kısmen önlediğini gözlemledik. Uygulanan radyasyon dozuna karşı curcuminin antioksidan özelliğinden dolayı sağladığı koruyucu etkileri yapmış olduğumuz incelemelerle gösterilmiştir.

## SONUÇ

Farelere uyguladığımız tüm vücut iyonizan radyasyon 3. ve 12. saatlerde ovaryumda birçok hasara yol açmıştır. İyonizan radyasyon uygulamasından 3 saat sonra alınan ovaryum dokularında erken atretik döneme ait folikül sayısının arttığını, 12 saat sonra alınan ovaryum kesitlerinde ise hasarın boyutunun daha da arttığını ve ileri seviyede atretik foliküllerin görüldüğünü gözlemledik. İyonizan radyasyon verilen gruplarda apoptotik granüloza hücrelerinde artış olduğunu ve PCNA pozitif hücre sayısında ise azalmalar olduğunu tespit ettik.

İyonizan radyasyon uygulamasından 10 gün önce vermeye başlanan curcuminin radyasyonun oluşturduğu hasarları azalttığı, foliküllerdeki apoptozisi kısmen önlediği ve proliferasyonu gösteren PCNA sentezini kısmen attırdığını saptadık.

Sonuç olarak iyonizan radyasyon uygulamasından önce verilen curcuminin iyonizan radyasyonun meydana getirdiği hasarı önlemede etkili olduğu, curcumin kullanımının radyasyona bağlı gelişecek yan etkileri azaltmada ve bu yan etkiler sonucu gelişecek komplikasyonları önlemede etkili olabileceği kanısına varıldı.

## ÖZET

Radyasyon ovaryumda apoptozisi arttıran ve foliküler atreziye sebep olan etkenlerden biridir. Oluşan hücrel hasarların, iyonizan radyasyondan dolayı oluşan serbest radikaller aracılığıyla meydana geldiği bilinmektedir. Oksidatif strese karşı kuvvetli bir antioksidan madde olan curcuminin, radyasyon hasarına karşı yararlı etkiye sahip olduğu ileri sürülmektedir.

Bu çalışmada, iyonizan radyasyonun ovaryum hasarı ve foliküler atrezi oranı üzerine etkilerini göstererek, oluşacak hasarlara karşı curcuminin koruyucu etkisinin olup olmadığını, ayrıca TUNEL boyama yöntemi ile apoptotik hücrelerin ve proliferen hücre nükleer antijen immünohistokimyasal boyama yöntemiyle de radyasyondan korunan hücrelerin reaktivitesinin gösterilmesi amaçlandı.

Çalışma için seçilen fareler biri kontrol 4'ü deney olmak üzere toplam 5 gruba ayrıldı. Radyasyon hasarı oluşturmak amacıyla kontrol grubu dışındaki deneklere tek doz tüm vücut 8.3 gray iyonizan radyasyon uygulandı. Üçüncü ve beşinci grup deneklere; ışınlamadan 10 gün önce başlayarak günde 100 mg/kg curcumin intragastrik yoldan verildi. Işınlamadan sonraki 3. ve 12. saatlerden sonra deneklerden anestezi altında ovaryum dokuları alınarak mikroskopik incelemeler için işlemlendirildi.

Radyasyon uygulamasının ardından 3 saat sonra alınan ovaryum dokularında, folikül duvarı ve antrum içerisinde apoptotik hücrelerin olduğu erken atretik özellik gösteren foliküller sayıca fazlaydı. Radyasyon uygulamasının ardından 12 saat sonra alınan ovaryum dokularında ise ileri atrezik özellik gösteren ve 3 saat grubuna oranla daha fazla sayıda apoptotik hücreler içeren foliküllerin sayısının daha da arttığı görüldü. Tedavi gruplarında ise curcuminin radyasyona bağlı meydana gelen hasarların önlenmesinde kısmen etkili olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak; curcumin kullanımının radyasyona bağlı infertiliteyi önlemede, ovarian dokuyu koruyarak radyasyon hasarını azaltabileceği ve kliniğe fayda sağlayabileceği kanısına varıldı.

**Anahtar kelimeler:** radyasyon, ovaryum, apoptozis, PCNA, fare.

## **SUMMARY**

### **PROTECTIVE EFFECTS OF CURCUMIN AGAINST IONIZING RADIATION INDUCED OVARIAN TISSUE DAMAGE: A MORPHOLOGICAL STUDY**

Radiation is known to be one of the agents intensifying apoptosis in the ovarium as well as causing follicular atresia. The resulting cellular damage is known to be triggered by free radicals attributable to ionized radiation. Curcumin, a potent antioxidant agent against oxidative stress, is argued to have a positive impact on radiation-induced damage.

The present study aims to determine the effect of ionized radiation upon the ovarian damage as well as upon the severity of follicular atresia so that the effectiveness of curcumin upon the resulting damage could be determined. The present study also aims to determine reactivation of apoptotic cells coated with TUNEL, in addition to establishing reactivation of the cells protected from radiation coated with an immunohistochemical proliferated cell nuclear antigen.

The mice chosen for the study were divided into 5 groups, one being the control group. The whole body of the mice in the groups with the exception of those in the control group was exposed to a single dosage of ionized radiation (8.3 gray) with a view to causing radiation-induced damage. The animals in groups 3 and 5 had been fed a daily 100 mg/kg of curcumin through the intragastric tract for ten days in a row before the radiation process was launched. Ovarium tissues sample of these animals were cultivated for the purpose of microscopic examination using anaesthetics after the 3 and 12 hours respectively.

The ovarium tissues cultivated at the 3 hour of the application of ionized radiation showed that there were apoptotic cells both in the follicular wall and the antrum, and that the number of follicles showing early atresic features was significantly high. On the other hand, the ovarium tissues cultivated at the 12 hour of the application of ionized radiation showed that the number of follicles containing apoptotic cells with advanced atresic features was higher than that of the ones taken at the 3 hour. The groups given treatment were observed to have some benefit from curcumin against the damage caused by radiation.

In conclusion, we speculate that curcumin may help prevent infertility caused by radiation by protecting the ovarian tissue through decreasing damage due to radiation and thus be of benefit to clinical practice.

**Keywords:** radiation, ovarium, apoptosis, PCNA, mice



## KAYNAKLAR

- 1- Yaren H, Karayılanoğlu. Radyasyon ve insan sağlığı üzerine etkileri. TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni 2005;4(4):199-208.
- 2- Kaya A. İyonize radyasyonun biyolojik etkileri. Dicle Tıp Derg/Dicle Med J 2002;29(3):65-75.
- 3- Machlin LJ, Pendich A. Free radical tissue damage. Protective role of antioxidant nutrients. Faseb J 1987;1(6):441-5.
- 4- Weiss JF, Kumor KS, Walden TL. Advances in radioprotection through the use of combined agent regimens. Int J Radiat Biol 1990;57:709-22.
- 5- Athar M, Abdula M, Sultana S, Favier A. Free radicals and trace elements. J Trace Elem Exp Med. 1993;6:65-73.
- 6- Devine PJ, Payne CM, McCuskey MK, Hoyer PB. Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. Biol Reprod 2000;63(5):1245-52.
- 7- Kim JK, Lee CJ, Song KW, Do BR, Yoon YD. Radiation accelerates ovarian follicular atresia in immature mice. In Vivo 1999;13:21-4.
- 8- Hendry JH, West CM. Apoptosis and mitotic cell death: their relative contributions to normal-tissue and tumor radiation response. Int J Radiat Biol 1997;71:709-19.
- 9- Jarrell J, Young Lai EV, Barr R, O'Connell G, Belbeck L, McMahon A. An analysis of the effects of increasing doses of ionizing radiation to the exteriorized rat ovary of follicular development, atresia, and serum gonadotropin levels. Am J Obstet Gynecol 1986;154:306-9.
- 10- Chapman RM. Effect of cytotoxic therapy on sexuality and gonadal function. Semin Oncol 1982;9:84-94.
- 11- Chun SY, Hsueh AJ. Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis. J Reprod Immunol. 1998;39:63-75.

- 12- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* 2003;66:1022-37.
- 13- Mukherjee PK, Wahile A. Integrated approaches towards drug development from Ayurveda and other Indian system of medicines. *J Ethnopharmacol* 2006;103:25-35.
- 14- Kiuchi F, Goto Y, Sugimoto N, Akao N, Kondo K, Tsuda Y. Nematocidal activity of turmeric: synergistic action of curcuminoids. *Chem Pharm Bull* 1993;41:1640-3.
- 15- Govindarajan VS. Turmeric-chemistry, technology, and quality. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1980;12:199-301.
- 16- Ammon HP, Wahl MA. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med* 1991;57:1-7.
- 17- Araujo CC, Leon LL. Biological activities of *Curcuma longa* L. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96:723-8.
- 18- Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 2003;23:363-98.
- 19- Sreejayan MN, Rao MN. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J Pharm Pharmacol* 1997;49:105-7.
- 20- Kiso Y, Suzuki Y, Watanabe N, Oshima Y, Hikino H. Antihepatotoxic principles of *Curcuma longa* rhizomes. *Planta Med* 1983;49:185-7.
- 21- Venkatesan N. Curcumin attenuation of acute adriamycin myocardial toxicity in rats. *Br J Pharmacol* 1998;124:425-7.
- 22- Arun N, Nalini N. Efficacy of turmeric on blood sugar and polyol pathway in diabetic albino rats. *Plant Foods Hum Nutr* 2002;57:41-52.
- 23- Deodhar SD, Sethi R, Srimal RC. Preliminary study on antirheumatic activity of curcumin (diferuloyl methane). *Indian J Med Res* 1980;71:632-4.
- 24- Sadler TW (Çeviri: C. Başaklar). *Langman's Medical Embriyoloji*. Ankara: Palme Yayıncılık; 1996:274-7.
- 25- Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO (Çeviri: Y. Aytekin). *Temel Histoloji*. İstanbul: Barış Kitabevi; 1998:423.
- 26- Erdoğan D, Tahiroğlu MT, Görgün M, Ilgaz C. *Özel Histoloji*. 2. Baskı, Ankara: Hatiboğlu Yayınevi, 2007:176-9.
- 27- Aytekin Y, Solakoglu S. *Temel Histoloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2006:449-58.
- 28- Göksel S. *Radyasyonun Biyolojik Etkileri ve Korunma*. İstanbul: İTÜ Matbaası; 1973.
- 29- Güngör N. *Sağlık Fiziği*. İstanbul: İTÜ Matbaası; 1991.
- 30- Hall EJ. *Radiobiology for the radiologist*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Company, 2000.
- 31- Özalpan A. *Temel Radyobioloji*. İstanbul: Haliç Üniversitesi Yayınları; 2001.

- 32- Burçak G, Gülnur A. Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. Cerrahpasa Tıp Dergisi 2004;35:159-69.
- 33- Hanman IWF. Radyasyon Tedavisi. Klinik Onkoloji. Ankara: Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu, 1992:112-4.
- 34- Dinçer Y, Akçay T. DNA hasarı. Türk Biyokimya Dergisi. 2000;25(2):73-9.
- 35- Müftüoğlu M. DNA tamiri ve erken yaşlanma sendromları. Türk Biyokimya Dergisi 2003; 28(1):20-4.
- 36-Trosko JE, Chang CC, Upham BL, Tai MH. Low-dose ionizing radiation: induction of differential intracellular signaling possibly affecting intercellular communication. Radiat Environ Biophys 2005;44:3-9.
- 37-Miyaji CK, de Syllos Cólus IM. Cytogenetic biomonitoring of Brazilian dentists occupationally exposed to low doses of x-radiation. Pesqui Odontol Bras 2002;16(3):196-201.
- 38-Akköse A, Ömer B, Yiğitbaşı A. DNA damage and glutathione content in radiology technicians. Clin Chim Acta 2003;336:13-8.
- 39-Nakayama M, Manabe N, Nishihara S, Miyamoto H. Species specific differences in apoptotic cell localization in granulosa and theca interna cells during follicular atresia in porcine and bovine ovaries. J Reprod Dev 2000;46:147-56.
- 40-Sugimoto M, Manabe N, Kimura Y, Myomoto A, Imai Y, Ohno H, Miyamoto H. Ultrastructural changes in granulosa cells in porcine antral follicles undergoing atresia indicate apoptotic cell death. J Reprod Dev 1998;44:7-14.
- 41-Imai Y, Manabe N, Uchio K, Kinoshita A, Kimura Y, Nakayama M, Nishihara S, Wada S, Sugimoto M, Miyamoto H. Interactions of apoptosis and extracellular matrices in granulosa cells of atretic follicles in porcine ovaries. J Mamm Ova Res 1999;16:59-66.
- 42-Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972;26(4):239-57.
- 43-Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol 2007;35(4):495-516.
- 44-Tomatir AG. Apoptoz: programlı hücre ölümü. T Klin Tıp Bilimleri 2003;23:499-508.
- 45-Attanasio A, Schiffer D. Ultrastructural detection of DNA strand breaks by in situ end-labelling techniques. J Pathol 1990;176:27-35.
- 46-Chapman RS, Chresta CM, Herberg AA, Bere HM, Heer S, Whetton AD, Hickman JA, Dive C. Further characterization of the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) assay for the flow cytometric analysis of apoptosis in drug resistant and drug sensitive leukemia cells. Cytometry 1995;20:245-56.
- 47-Sgonc R, Wick G. Methods for the detection of apoptosis. Int. Arch. Allergy Immunol 1994;105:327.

- 48-Strimpakos AS, Sharma RA. Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. *Antioxid Redox Signal* 2008;10(3):511-45.
- 49-Chattopadhyay I, Biswas K, Bandyopadhyay U, Banerjee RK. Turmeric and curcumin: biological actions and medicinal applications. *Curr Sci* 2004;87:44-53.
- 50-Thiyagarajan M, Sharma SS. Neuroprotective effect of curcumin in middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats. *Life Sciences* 2004;74(8):969-85.
- 51-Sreejayan N, Rao MN. Free radical scavenging activity of curcuminoids. *Arzneimittelforschung* 1996;46(2):169-71.
- 52-Dickinson DA, Iles KE, Zhang H, Blank V, Forman HJ. Curcumin alters EpRE and AP-1 binding complexes and elevates glutamate-cysteine ligase gene expression. *Faseb J* 2003;17(3):473-75.
- 53-Negi PS, Jayaprakasha GK, Jagan Mohan Rao L, Sakariah KK. Antibacterial activity of turmeric oil: a by product from curcumin manufacture. *J Agric Food Chem* 1999;47(10):4297-300.
- 54-Shukla A, Rasik AM, Patnaik GK. Depletion of reduced glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant defense enzymes in a healing cutaneous wound. *Free Radic Res* 1997;26:93-101.
- 55-Zhang F, Altorki NK, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Curcumin inhibits cyclooxygenase-2 transcription in bile acid- and phorbol ester treated human gastrointestinal epithelial cells. *Carcinogenesis* 1999;20:445-51.
- 56-Jagetia GC. Curcumin treatment enhances the repair and regeneration of wounds in mice exposed to hemibody  $\gamma$ -Irradiation. *Plast Reconstr Surg* 2005;115:515.
- 57-Azuine MA, Bhide SV. Chemopreventive effect of turmeric against stomach and skin tumors induced by chemical carcinogens in Swiss mice. *Nutrition and Cancer* 1992;17(1): 77-83.
- 58-Swarnakar S, Ganguly K, Kundu P, Banerjee A, Maity P, Sharma AV. Curcumin regulates expression and activity of matrix metalloproteinases-9 and -2 during prevention and healing of indomethacin-induced gastric ulcer. *J Biol Chem* 2005;280(10): 9409-15.
- 59-Hong J, Bose M, Ju J, Ryu JH, Chen X, Sang S, Lee MJ, Yang CS. Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related beta-diketone derivatives: effects on cytosolic phospholipase A(2), cyclooxygenases and 5-lipoxygenase. *Carcinogenesis* 2004;25(9):1671-79.
- 60-Akpolat M, Kanter M, Uzal MC. Protective effects of curcumin against gamma radiation-induced ileal mucosal damage. *Arch Toxicol* 2009;83(6):609-17.
- 61-Gururaj AE, Belakavadi M, Venkatesh DA, Marme D, Salimath BP. Molecular mechanisms of anti-angiogenic effect of curcumin. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297:934-42.

- 62-Sharma RA, Euden SA, Platton SL, Cooke DN, Shafayat A, Hewitt HR et al. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. *Clin Cancer Res* 2004;10:6847-54.
- 63-Bravo R. Synthesis of the nuclear protein cyclin (PCNA) and its relationship with DNA replication. *Exp Cell Res* 1986;163(2):287-93.
- 64-Bravo R, Macdonald-Bravo H. Changes in the nuclear distribution of cyclin (PCNA) but not its synthesis depend on DNA replication. *EMBO J* 1985;4(3):655-61.
- 65-Bravo R, Macdonald-Bravo H. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J Cell Biol* 1987;105(4):1549-54.
- 66-Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* 1987;326(6112):515-7.
- 67-Jaskulski D, deRiel JK, Mercer WE, Calabretta B, Baserga R. Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA cyclin. *Science* 1988;240(4858):1544-6.
- 68-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(1):71-7.
- 69-Slot K, Voorendi M, de Boer-Brouwer M, van Vugt HH, Teerds KJ. Estrous cycle dependent changes in expression and distribution of Fas-Fas ligand, Bcl-2, Bax, and pro- and active caspase-3 in the rat ovary. *J Endocrinol* 2006;188:179-92.
- 70-Hirshfield AN. Size-frequency analysis of atresia in cycling rats. *Biol Reprod* 1988;38:1181-8.
- 71-Meirow D, Nugent D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Hum Reprod* 2001;7(6):535-43.
- 72- Hirshfield AN, Midgley AR. Morphometric analysis of follicular development in the rat, *Biol Reprod* 1978;19:597-605.
- 73- Braw RH, Tsafiriri A. Follicles explanted from pentobarbitone-treated rats provide a model for atresia. *J Reprod Fertil* 1980;59:259-65.
- 74- Wilson RL. Free radical repair mechanisms and the interaction of glutathione and vitamin C and E. In: O. F. Nygaard and M. G. Simic (Eds.). *Radioprotectors and Anticarcinogens*. New York; Academic Pres: 1983. pp. 1-23.
- 75- Konopacka M. Vitamines as radioprotectors of normal cells. *Postepy Hig Med Dosw* 1996;50:145-56.
- 76- Jagetia GC. Radioprotection and radiosensitization by curcumin. *Adv Exp Med Biol* 2007;595:301-20.
- 77- Lee CJ, Park HH, Do BR, Yoon YD, Kim JK. Natural and radiation-induced degeneration of primordial and primary follicles in mouse ovary. *Anim Reprod Sci* 2000;28:109-17.

- 78- Kim JK, Lee CJ. Effect of exogenous melatonin on the ovarian follicles in  $\gamma$ -irradiated mouse. *Mutat Res* 2000;449:33-39.
- 79- Prise KM, Schettino G, Folkard M, Held KD. New insights on cell death from radiation exposure. *Lancet Oncology* 2005;6:520-28.
- 80- Hussein MR. Apoptosis in the ovary molecular mechanisms. *Hum Reprod Updat* 2005;11:162-77.
- 81- Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: Facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996;17:121-55.
- 82- Hendry JH, West CM. Apoptosis and mitotic cell death: Their relative contributions to normal-tissue and tumour radiation response. *Int J Radiat Biol* 1997;71:709-19.
- 83- Lee CJ, Yoon YD. Gamma-radiation-induced follicular degeneration in the prepubertal mouse ovary. *Mutat Res* 2005;578:247-55.
- 84- Kaya H, Desdicioğlu R, Sezik M, Ulukaya E, Özkaya O, Yılmaztepe A. et.al. Does sphingosine-1-phosphate have a protective effect on cyclophosphamide- and irradiationinduced ovarian damage in the rat model? *Fertil Steril* 2008;89(3):732-5.
- 85- Hanoux V, Pairault C, Bakalska M, Habert R, Livera G. Caspase-2 involvement during ionizing radiation-induced oocyte death in the mouse ovary. *Cell Death Differ* 2007;14(4):671-81.
- 86- Oktay K, Schenken RS, Nelson JF. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. *Biol Reprod* 1995;53:295-301.
- 87- Wandji SA, Sršeò V, Voss AK, Eppig JJ, Fortune JE. Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles. *Biol Reprod* 1996;55: 942-48.
- 88- Wandji SA, Sršeò V, Nathanielsz PW, Eppig JJ, Fortune JE. Initiation of growth of baboon primordial follicles. *Hum Reprod* 1997;12:1993-2001.
- 89- Takekida S, Matsuo H, Maruo T. GnRH agonist action on granulosa cells at varying follicular stages. *Mol Cell Endocrinol* 2003;202:155-64.
- 90- Takekida S, Deguchi J, Samoto T, Matsuo N, Maruo T. Comparative analysis of the effect of gonadotropin-releasing hormone agonist on the proliferative activity, apoptosis and steroidogenesis in cultured porcine granulosa cells at varying stages of follicular growth. *Endocrine* 2000;12:61-7.
- 91- Feranil JB, Isobe N, Nakao T. Cell proliferation in the atretic follicles of buffalo and cattle ovary. *Reprod Domest Anim* 2004;39:405-9.
- 92- Feranil JB, Isobe N, Nakao T. Apoptosis in the antral follicles of swamp buffalo and cattle ovary: TUNEL and caspase-3 histochemistry. *Reprod Domest Anim* 2005;40:111-6.
- 93- Tománek M, Chronowska E. Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the pig ovary. *Folia Histochem Cytobiol* 2006;44(4):269-74.

- 94- Hamm ML, Bhat GK, Thompson WE, Mann DR. Folliculogenesis is impaired and granulosa cell apoptosis is increased in leptin-deficient mice. *Biol Reprod* 2004;7(1):66-72.
95. Chapman DL, Wolgemuth DJ. Expression of proliferating cell nuclear antigen in mouse germ line and surrounding somatic cells suggests both proliferation-dependent and independent modes of function. *Int J Dev Biol* 1994;38:491-7.
- 96- Oktay K, Schenken RS, Nelson JF. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. *Biol Reprod* 1995;53(2):295-301.
- 97- Varanda EA, Tavares DC. Radioprotection: mechanisms and radioprotective agents including honeybee venom. *J Venom Anim Toxins* 1998;4(1):5-21.
- 98- Prasad KN. Rationale for using multiple antioxidants in protecting humans against low doses of ionizing radiation. *Br J Radiol* 2005;78(930):485-92.
- 98- Abraham SK, Sarma L, Kesavan PC. Protective effects of chlorogenic acid, curcumin and beta-carotene against gamma-radiation-induced in vivo chromosomal damage. *Mutat Res* 1993;303(3):109-12.
- 99- Thresiamma KC, George J, Kuttan R. Protective effect of curcumin, ellagic acid and bixin on radiation induced genotoxicity. *J Exp Clin Cancer Res* 1998;17(4):431-4.
- 100- Inano H, Onoda M, Inafuku N, Kubota M, Kamada Y, Osawa T, Kobayashi H, Wakabayashi K. Chemoprevention by curcumin during the promotion stage of tumorigenesis of mammary gland in rats irradiated with gamma-rays. *Carcinogenesis* 1999;20(6):1011-8.
- 101- Inano H, Onoda M, Suzuki K, Kobayashi H, Wakabayashi K. Radiation-induced mammary tumors in virgin and parous rats administered contraceptive steroids, 17-alpha ethinylestradiol and norethisterone. *Carcinogenesis* 2000;21(5):1043-50.
- 102- Jagetia GC. Radioprotection and radiosensitization by curcumin. *Adv Exp Med Biol* 2007;595:301-20.
- 103- Khopde SM, Priyadarsini KI, Guha SN, Satav JG, Venkatesan P, Rao MN. Inhibition of radiation-induced lipid peroxidation by tetrahydrocurcumin: possible mechanisms by pulse radiolysis. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000;64(3):503-9.
- 104- Subramanian M, Rao MN, Devasagayam TPA, Singh BB. Diminution of singlet oxygen-induced DNA-damage by curcumin and related antioxidants. *Mutat Res* 1994;311(2):249-55.
- 105- Sreejayan N, Rao MN. Free radical scavenging activity of curcuminoids. *Arzneimittel-Forsch* 1996;46(2):169-71.
- 106- Reddy AC, Lokesh BR. Effect of curcumin and eugenol on iron induced hepatic toxicity in rats. *Toxicology* 1996;107 (1):39-45.
- 107- Biswas SK, McClure D, Jimenez LA, Megson IL, Rahman I. Curcumin induces glutathione biosynthesis and inhibits NF-kappaB activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells, mechanism of free radical scavenging activity. *Antioxid Redox Signal* 2005;7(1-2):32-41.

## ŞEKİLLER LİSTESİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Şekil 1.</b> Curcuma longa.....	9
<b>Şekil 2.</b> Zerdeçal'ın bileşenleri.....	9
<b>Şekil 3.</b> Simülasyon grafisi.....	16
<b>Şekil 4.</b> Kontrol ve deney gruplarına ait atretik primordial folikül oranları.....	51
<b>Şekil 5.</b> Kontrol ve deney gruplarına ait atretik primer folikül oranları.....	52
<b>Şekil 6.</b> Kontrol ve deney gruplarına ait atretik preantral folikül oranları.....	53
<b>Şekil 7.</b> Kontrol ve deney gruplarına ait atretik antral folikül oranları.....	54
<b><u>Resimler</u></b>	
<b>Resim 1.</b> Kontrol grubu, H+E, X200.....	19
<b>Resim 2.</b> Kontrol grubu, H+E, X400.....	19
<b>Resim 3.</b> Kontrol grubu, PAS+HL, X400.....	20
<b>Resim 4.</b> Kontrol grubu, İmmünoperoksidaz, hematoksilin zıt boyaması, X400.....	21
<b>Resim 5.</b> Kontrol grubu, İmmünoperoksidaz, hematoksilin zıt boyaması, X200.....	21
<b>Resim 6.</b> Kontrol grubu, İmmünoperoksidaz, hematoksilin zıt boyaması, X400.....	22
<b>Resim 7.</b> Kontrol grubu, TUNEL Boyası, X200.....	23
<b>Resim 8.</b> Radyasyon grubu 3. saat, H+E, X200.....	26
<b>Resim 9.</b> Radyasyon grubu 3. saat, H+E, X400.....	26
<b>Resim 10.</b> Radyasyon grubu 3. saat, PAS+HL, X200.....	27
<b>Resim 11.</b> Radyasyon grubu 3. saat, İmmünoperoksidaz,hematoksilin zıt boyaması,X100..._	28
<b>Resim 12.</b> Radyasyon grubu 3. saat, İmmünoperoksidaz,hematoksilin zıt boyaması,X200..._	28
<b>Resim 13.</b> Radyasyon grubu 3. saat, TUNEL boyası, X20.....	29
<b>Resim 14.</b> Radyasyon grubu 3. saat, TUNEL boyası, X400.....	29



<b>Resim 15.</b> Radyasyon+Curcumin grubu 3. saat, H+E, X100 .....	32
<b>Resim 16.</b> Radyasyon+Curcumin grubu 3. saat, H+E, X400 .....	32
<b>Resim 17.</b> Radyasyon+Curcumin grubu 3. saat, PAS+HL, X200 .....	33
<b>Resim 18.</b> Radyasyon+Curcumin grubu 3. saat, İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması, X100 .....	34
<b>Resim 19.</b> Radyasyon+Curcumin grubu 3. saat, İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması, X200 .....	34
<b>Resim 20.</b> Radyasyon+Curcumin grubu 3. saat, TUNEL boyası, X200 .....	35
<b>Resim 21.</b> Radyasyon+Curcumin grubu 3. saat, TUNEL boyası, X400 .....	35
<b>Resim 22.</b> Radyasyon grubu 12. saat, H+E, X100 .....	38
<b>Resim 23.</b> Radyasyon grubu 12. saat, H+E, X400 .....	38
<b>Resim 24.</b> Radyasyon grubu 12. saat, PAS+HL, X200 .....	39
<b>Resim 25.</b> Radyasyon grubu 12. saat, X40 .....	40
<b>Resim 26.</b> Radyasyon grubu 12. saat,İmmünoperoksidaz,hematoksilen zıt boyaması,X200 ..	40
<b>Resim 27.</b> Radyasyon grubu 12. saat, TUNEL boyası, X400 .....	41
<b>Resim 28.</b> Radyasyon grubu 12. saat, TUNEL boyası, X400 .....	41
<b>Resim 29.</b> Radyasyon+Curcumin grubu 12. saat, H+E, X200 .....	44
<b>Resim 30.</b> Radyasyon+Curcumin grubu 12. saat, H+E, X400 .....	44
<b>Resim 31.</b> Radyasyon+Curcumin grubu 12. saat, PAS+HL, X400 .....	45
<b>Resim 32.</b> Radyasyon+Curcumin grubu 12. saat, İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması, X100 .....	46
<b>Resim 33.</b> Radyasyon+Curcumin grubu 12. saat, İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması, X400 .....	46
<b>Resim 34.</b> Radyasyon+Curcumin grubu 12. saat, TUNEL boyası, X200 .....	47
<b>Resim 35.</b> Radyasyon+Curcumin grubu 12. saat, TUNEL boyası, X400 .....	47
<b><u>Tablolar</u></b>	
<b>Tablo 1.</b> Deney grupları .....	12
<b>Tablo 2.</b> Ovaryum kesitlerindeki foliküllerin sınıflandırılması .....	13
<b>Tablo 3.</b> Kontrol ve deney gruplarına ait PCNA ve TUNEL pozitif hücrelerin semikantitatif değerlendirmesi .....	48
<b>Tablo 4.</b> Kontrol ve deney gruplarına ait atretik primordial, primer, preantral ve antral folikül oranları .....	50

## ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Eskişehir’de doğdum. Ortaöğretimimi Eskişehir Cumhuriyet Lisesi’nde bitirdikten sonra 1996 yılında Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde lisans eğitimime başladım. 2000 yılında Biyolog ünvanını alarak mezun oldum. 2000 yılında Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı, Moleküler Biyoloji Bilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimime başladım. 2003 yılında “Benzenin Hemopoietik Dokular Üzerine Etkilerinin İn Vivo İncelenmesi” başlıklı tez çalışması ile uzman ünvanını aldım. 2003 yılında Anadolu Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü Orta Öğretim alan Öğretmenliği Bilim Dalı Biyoloji Öğretmenliği bölümünde Tezsis Yüksek Lisans Eğitimine başladım. 2004 yılında Biyoloji Öğretmeni ünvanı ile Tezsis Yüksek Lisans Eğitimimi tamamladım. 2007 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda “Skrotal Hipertermi Uygulanan Sıçanların Leydig Hücrelerinin Morfolojik Olarak İncelenmesi” başlıklı tezimi hazırlayarak Yüksek Lisans eğitimimi tamamladım ve aynı yıl doktora eğitimime başladım. 2008-2010 yılları arasında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda Uzman kadrosunda görev yaptıktan sonra 2010 yılında Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’na Öğretim Görevlisi olarak atandım ve halen Öğretim Görevlisi olarak çalışmalarımı devam ettirmekteyim.

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ


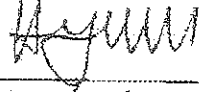

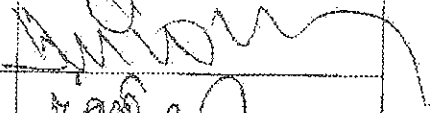
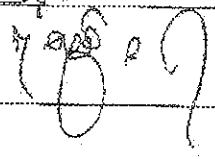
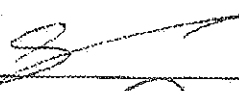


HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı:8

Karar Tarihi: 31.08.2009

KARAR NO: 2009/08.04

Yürütcülüğünü Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Mehmet Kanter'in yaptığı Uzm. Biol. Cevat Aktaş'ın doktora tezi olarak planlanan TÜHDYEK- 2009/060 protokol nolu "Iyonizan Radyasyonun Neden Olduğu Ovarian Doku Hasarına Karşı Curcuminin Koruyucu Etkisinin Morfolojik Olarak İncelenmesi." başlıklı çalışma hakkında görüşüldü; araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler dikkate alınarak incelenmesi sonucunda: Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve Radyasyon Güvenlik Komitesi olurundan sonra çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Yrd.Doç.Dr. Burhan AKSU Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Vat.Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input checked="" type="checkbox"/> hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input checked="" type="checkbox"/> hayır	
İlyas ÖZMEN Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input checked="" type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input checked="" type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. S. Arzu VARDAR Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input checked="" type="checkbox"/> hayır	
Doç. Dr. Nilda TÜROUT Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Ruşen COŞAR-ALAŞ Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	