

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

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Mehmet KANTER

**NORMAL VE SÜPEROVULE FARELERDE İYONİZAN
RADYASYONUN OVARYUM MORFOLOJİSİ,
ÖSTRUS SIKLUSU VE OVULASYON ORANI
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

(Doktora Tezi)

Melike SAPMAZ METİN

EDİRNE – 2008

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

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Mehmet KANTER

**NORMAL VE SÜPEROVULE FARELERDE İYONİZAN
RADYASYONUN OVARYUM MORFOLOJİSİ,
ÖSTRUS SIKLUSU VE OVULASYON ORANI
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

(Doktora Tezi)

Melike SAPMAZ METİN

Destekleyen Kurum: TÜBAP-816

Tez No :

EDİRNE – 2008

T.C
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

ONAY


Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı doktora programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Mehmet KANTER danışmanlığında, doktora öğrencisi Melike SAPMAZ METİN tarafından tez başlığı "Normal ve Süperovule Farelerde İyonizan Radyasyonu Ovaryum Morfolojisi, Östrus Siklusu ve Ovulasyon Oranı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 20/11/2008 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "**Doktora Tezi**" olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Mehmet KANTER
JÜRİ BAŞKANI



Prof. Dr. Mehmet YÜNCÜ
ÜYE



Doç. Dr. Cem UZAL
ÜYE



Doç. Dr. Nurettin AYDOĞDU
ÜYE



Yrd. Doç. Dr. Gülnur KIZILAY
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İsmet DÖKMECİ
Enstitü Müdürü

TEŐEKKÜR

Tez çalıőmam sűresince beni yűnlendiren, bilgi ve tecrűbelerinden yararlandıđım deđerli danıőman hocam sayın Prof. Dr. Mehmet KANTER'e, bilimsel katkıları ile desteklerini esirgemeyen sayın hocalarım Prof. Dr. Recep MESUT, Doç. Dr. Mustafa Cem UZAL, Yrd. Doç. Dr. Gűlnur KIZILAY ve Yrd. Doç. Dr. Yeőim Hűlya UZ'a saygı ve teőekkűrlerimi sunarım. Tez çalıőmamın istatistiksel deđerlendirmesini gerçekleőtiren Arő. Gűr. Dr. İmran KURT ŐMŪRLŪ'ye ve radyasyon uygulamalarını gerçekleőtiren uzman fizikçi Fadime ALKAYA'ya teőekkűr ederim. Çalıőmam esnasında yardımlarını ve desteđini esirgemeyen deđerli çalıőma arkadaőım Arő. Gűr. Dr. Bilkay SEREZ'e, Őđr. Gűr. Dr. Meryem AKPOLAT ve Anabilim Dalımız'daki tűm asistan arkadaőlarıma teőekkűrlerimi sunarım. Çalıőmamıza maddi destek sađlayarak gerekleőtmesini sađlayan Trakya Őniversitesi Araőtırma Projeleri Birimi'ne teőekkűr ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
GİRİŞ VE AMAÇ	1-3
GENEL BİLGİLER	
OOGENEZ	4-7
RODENTLERDE FOLİKÜL GELİŞİMİNİN KRONOLOJİSİ	7-8
FOLİKÜLER ATREZİNİN MORFOLOJİK DEĞERLENDİRMESİ	8-10
OVULASYONUN MOLEKÜLER MEKANİZMASI	10-12
OVARİYAN SIKLUSUN HORMONAL DÜZENLENMESİ	13-14
ÖSTRUS SIKLUSU	15-17
SÜPEROVULASYON YÖNTEMİ	18
İYONİZAN RADYASYON İNDÜKSİYONUyla GELİŞEN FOLİKÜLER ATREZİ	19-21
GEREÇ VE YÖNTEMLER	22-28
BULGULAR	
MORFOMETRİK BULGULAR	29-33
MORFOLOJİK BULGULAR	
VAJİNAL SMEAR BULGULARI	34-40
STEREO MİKROSKOPİK BULGULAR	41-52
OVARYUM DOKULARININ IŞIK MİKROSKOPİK BULGULARI	53-87
TARTIŞMA	88-99
SONUÇ	100
ÖZET	101-102
SUMMARY	103-104
KAYNAKLAR	105-115
RESİMLEMELER LİSTESİ	116-119
ÖZGEÇMİŞ	120
EK 1 ETİK KURUL KARARI	121

SEMBOL VE KISALTMALAR LİSTESİ

α : Alfa

β : Beta

γ : Gamma

COX2: Cyclooxygenase-2

D: Diöstrus

EGF: Epidermal büyüme faktörü

FSH: Folikül stimüle edici hormon

Gy: Gray

GnRH: Gonadotrophin Releasing Hormone

hCG: Human Chorionic Gonadotrophin

H+E: Hematoksilen+Eosin

IGF-I: İnsulin büyüme faktörü I

IVF: In vitro fertilizasyon

IL: İnterlökin

i.p.: İntraperitoneal

KL: Korpus luteum

LH: Luteinizan hormon

M: Metöstrus

μ : Mikron

Ö: Östrus

P: Proöstrus

PAS+HL: Periyodik Asit Schiff + Hemalen

PGS-2: Prostaglandin Endoperoxide Synthase-2

PMSG: Pregnant Mare Serum Gonadotrophin

PR: Progesteron reseptörü

RT: Radyasyon

SF: Serum fizyolojik

Süperov: Süperovulasyon

TGF α : Transforme edici büyüme faktörü alfa

ZP: Zona Pellusida

GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde yaklaşık olarak her 700 yetişkinden biri kanser tedavisi olup, hayatta kalmakta iken (1) 2010 yılında her 250 yetişkinden birinin kanser tedavisi olup hayatta kalabileceği tahmin edilmektedir. Sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl 20.000'den fazla çocuk ve genç tedavi amaçlı kemoterapi ve radyoterapi alıp, mutagenlere maruz kalmaktadır (2).

Radyoterapi sonucunda bazı kanserli ya da normal dokularda yenilenme (bağırsaklar, testis, kemik iliği vs) gözlenmektedir. Ancak, miktarı fetal hayatta belirlenen ovarian stokta, radyasyon etkisiyle yok olan germ hücrelerinin yenilenmesi mümkün değildir (3). Bugün kanser tedavisinde kullanılan yüksek doz radyoterapi, hayatta kalma oranını belirgin olarak artırmaktadır ancak, genç hastalarda ovarian yetersizlik ve sterilite gibi önemli yan etkilere sebep olmaktadır (4-6). Bazı kanser türlerinde ovaryumların radyasyon maruziyeti engellenebilirken pelvik, abdominal ve (7-9) total vücut ışınlaması (6,10,11) gerektiği durumlarda bu mümkün olamamaktadır.

Ovaryum, her siklusta farklı hormonların ve yardımcı faktörlerin etkisiyle morfolojik ve biyokimyasal değişiklikleri yaşayan dinamik bir organdır (12). Epidemiyolojik olarak, radyoterapi ardından ovarian yetersizlik oluşma riski hastanın yaşına, tedavi protokolüne (radyasyon dozu ve alanı gibi) ve malignansinin tipine bağlıdır (13). Gençlerde 5 Gray (Gy) radyasyon %50 sterilite oluştururken, 40 yaş üstü bireylerde 1,5 Gy'lik uygulamanın fertilitede %90 kayba neden olduğu bildirilmiştir (3,14).

Lenfoma ve lösemi hastası olup, total vücut ışınlaması yapılmış çocuklar tedavi sonrası takip edildiğinde puberte yaşının gecikmesi, sekonder cinsiyet karakterlerinin oluşmaması (9) ve implantasyon defektleri gözlenmiştir (15). Kemik iliği transplantasyonu

öncesinde total vücut ışınlanması yapılmış prepubertel çocuklarda, cinsiyet özelliklerinin oluşması için hormon replasmanı gerekli görülmüştür (10). Ayrıca bu hastalar düzenli menstruel siklusa sahip olsalar dahi gebeliğin erken döneminde spontan düşükler meydana gelmiştir (15).

Memelilerde oosit stoğu fetal hayatta belirlenir ve bu stoğun insanda sadece %1'i, rodentlerde ise %10'u ovulasyon aşamasına kadar olgunlaşır (16). Ovaryumlarda dışının tüm hayatı boyunca gözlenen doğal dejenerasyon süreci olan atrezi, folikül popülasyonunun sürekli azalmasına neden olmaktadır. Radyoterapi ile maruz kalınan iyonizan radyasyonların atrezinin patolojik indükleyicilerinden biri olduğu kabul edilmektedir (17).

Radyasyon etkisiyle ovaryumda, akut dönemde apoptozis ile foliküler dejenerasyon oluşurken, uzun dönemde premature ovarian yetmezlik gözlenir. Bu da dışıde, 35-40 yaştan önce menapozun gerçekleşmesi demektir (2,5,7,18,19).

Farelerle yapılan çalışmalarda radyasyon etkisiyle oositlerde DNA kırıkları olduğu (20-23) bildirilmiştir. Aynı zamanda radyasyon, ovarian foliküllerde mitoz aktivitesi yüksek granüloza hücrelerinde apoptozisi indükleyerek doğal atretik süreci hızlandırabilir (24-26). İyonizan radyasyonların etkisiyle rodent ovaryumlarında foliküler gelişimin her aşamasında kayıplar gözlenmiştir (24-28). Bununla birlikte, radyasyondan en çok etkilenen yapıların dinlenme fazındaki primordiyal foliküller olduğu bildirilmiştir (5,28,29).

Memelilerde dişilerin biyolojik ritmi döngüsel bir özellik sergilemektedir (30). İnsanda genital siklus, deney hayvanlarında ise östrus siklusu (31,32) olarak tanımlanan bu dönem, kendi içinde evrelere ayrılır. Başlıca foliküler evre, ovulasyon ve luteal evreden oluşan siklusun kontrolü hipotalamik, hipofizer ve ovarian hormonlar tarafından sağlanmaktadır (33). Vajinal smear yöntemi ise ovarian siklusun fazlarının ayırt edilmesinin yanı sıra hormonal çevre ile ilgili değişiklikleri de yansıtan pratik ve güvenilir bir yöntemdir (31,34). Bu yüzden deneysel çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır.

Günümüzde kadınlar, sosyal ve ekonomik nedenlerle, daha iyi korunma yöntemleri kullanıp, çocuk doğurmayı geciktirmektedir. Bu yüzden, kanser teşhisi konulan kadınlar fertilitelerini koruma hususunda oldukça hassastır. Kanserde yaşam kalitesi sağ kalım süresinin uzunluğu için önemlidir ve yaşam kalitesinin temel unsurlarından biri, normal bir çocuk dünyaya getirip büyütebilme yeteneğidir (2).

Pelvik, abdominal ya da tüm vücut radyoterapi uygulanmış kadınlarda, tedavi sonrası spontan gebelik oranı yaklaşık %3 olarak bildirilmiştir (35). Bu yüzden reproduktif dönemde kanser tedavisi almış kadınlar in vitro fertilizasyon (IVF) yolu ile çocuk sahibi olmayı

denemektedir. Ovaryum indüksiyonu, IVF laboratuvarlarında infertil kadınlara yaygın olarak uygulanmaktadır. Ekzojen gonadotropin uygulaması ile süperovulasyon sağlanan bu yöntemin amacı, IVF uygulamasında dölllenme şansını arttırmak için en çok sayıda, en iyi kalitede olgunlaşmış oositler elde etmektir. Elde edilen oosit sayısı ve olgunluğu ne kadar iyi ise embriyo kültürü ve implantasyon başarısının da o oranda artacağı düşünülmektedir (36).

Kanser tedavilerinde dişi gonadları radyoterapinin olumsuz etkilerinden korumaya yönelik pek çok yöntem geliştirilmektedir. Bunlar arasında embriyo ya da oosit dondurma, ovaryum dokusu dondurma, oosit donasyonu ve çeşitli gonadotropin hormonlar ile ovaryum fonksiyonlarının baskılanması en sık kullanılan yöntemlerdir (6,35). Ancak şu ana kadar pratik kullanıma tam adapte olmuş bir yöntem bulunmamaktadır (4,37). Bu da yardımcı üreme teknikleri alanında daha çok deneysel çalışma yapılmasını zorunlu kılmaktadır.

Çalışmamızda, erken üreme döneminde kanser teşhisi almış kadınlar için önemli bir sorun olan radyoterapiye bağlı infertiliteyi araştırmayı planladık. Yaptığımız kaynak taramalarında, radyasyonun ovaryum dokusu ve fonksiyonu üzerine etkilerinin araştırıldığı deneysel modellerde, gerek radyasyon gerekse koruyucu ajan uygulamalarının östrus siklusu fazları dikkate alınmadan yapılmış olduğunu gözlemledik. Ayrıca radyasyon uygulaması ardından, spontan ovulasyon ile elde edilen oositlerin morfolojik yapıları ile ilgili incelemelerin yetersiz olduğunu gördük. Oysa ki, fertilité değerlendirilirken ovarian siklusun düzenliliği ve ovulasyon yeteneği öncelikle göz önünde bulundurulmuş kriterler olarak bilinmektedir (38). Bu yüzden çalışmamızı planlarken, östrus siklusu fazlarına bağımlı olarak uygulanan gamma radyasyonun ovaryum morfolojisi üzerine olan etkilerini vajinal smear bulgularıyla desteklemeyi, bunun yanı sıra radyasyon uygulamasını takip eden ilk ve ikinci östrus sikluslarında, spontan ovulasyon ve süperovulasyon oranları ile ovaryum fonksiyonunu test ederek, radyasyonun fertilité üzerine etkilerini morfolojik ve morfometrik verilerle ortaya koymayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

OOGENEZ

Ovaryumlar, dişide gametlerin üretilmesi (gametogenesis) ve steroid yapıdaki hormonların sentezlenip salgılanmasıyla yükümlüdür. Ovaryumlardan olgun bir oositin oluşturularak atılması (ovulasyon) pubertede başlar ve menapoza kadar devam eder. İnsanda ovulasyon menstrüasyonun başlangıcından itibaren 13-14. günlerde gerçekleşir ve her 28 günde bir oositin atılmasıyla tekrarlanan bu olaylar ovarian siklus olarak bilinir. Ovarian siklus 3 fazdan oluşur;

- 1- Folikül büyüme ve gelişiminin görüldüğü foliküler faz,
- 2- Ovulasyon,
- 3- Korpus luteum (KL) oluşumuyla birlikte durağan bir sürecin gözlemlendiği luteal faz (39).

Folikülogenez

Folikülogenezin sürekliliğini sağlayan 3 mekanizma vardır; oosit büyümesi, granüloza hücre bölünmesi, tekanın gelişmesi. Folikülogenez; oositlerin, çevresini saran somatik hücre tabakası granüloza hücreleriyle birlikte gelişip büyüdüğü sürekli bir gelişim işlemidir (16,31).

İnsanda folikülogenez fetal hayatta başlar. Yirminci hafta civarlarında gelişmekte olan ovaryumlar içerisinde primordiyal germ hücreleri (oogonia) popülasyonu artmaya başlar. Bunlar, doğumdan birkaç hafta öncesine kadar mitoz ile sürekli olarak bölünürler. Bu süreden sonra, yeni oositler üretilmez. Gestasyonun ortalarında yaklaşık yedi milyon germ hücresi

vardır, ancak ileri gestasyona kadar programlı hücre ölümü nedeniyle sayıları dramatik olarak azalır. Bu durumda, insan dişisi yenilenemeyen yaklaşık 1-2 milyon oosit ile doğar. Puberteye kadar yaklaşık 400.000 oosit ovaryumda kalır (12).

Erken gestasyon döneminde, pek çok fetal oogonia mayoza girerek birinci profaza kadar ilerler ve bloke olur. Bu hücreler, oosit olarak ifade edilirler ve büyüme aşamasına başlayana kadar 50 yıla yakın süre profaz aşamasında kalabilirler. Küçük çaplı bir oosit ve pregranüloza adı verilen bazal membran üzerinde yerleşmiş tek tabaka yassı epitel hücrelerinden oluşan bu yapı primordiyal folikül olarak tanımlanır. Primordiyal folikülün büyümesini başlatan sinyal henüz bilinmemektedir (40,41). Ancak, primordiyal foliküller hücrelerden salınan kit-ligand'ın başlatıcı role sahip olabileceği düşünülmektedir. Toplam sayı yaşla birlikte azalsa da dişi ovaryumundaki en fazla folikül her zaman, primordiyal aşamaya aittir. Doğumdan önce, ileri çocukluk dönemi, puberte, gebelik ve laktasyon boyunca az sayıdaki primordiyal folikül sürekli olarak folikülogeneze katılır. Bu uzun proses yaklaşık 3 ay süren büyüme ve farklılaşma süreçlerini kapsar (16,40).

Büyümenin erken aşamasında primer folikül oluşumu gözlenir. Granüloza hücreleri kübik şekil alır ve hücre bölünmesi gözlenir. Bunun ardından, oositi çevreleyen granüloza hücre tabakası sayısı artar ve folikül preantral aşamaya ulaşır. Granüloza hücreleri oosit maturasyonu için gerekli çeşitli büyüme faktörlerini salgılamaya başlarlar. Aynı zamanda folikül çevresindeki bağ dokusu da farklılaşarak teka folikülü adını alır (30). Granüloza hücrelerine yakın olan hücresel tabaka teka interna, stroma ile kaynaşan dış tabaka ise teka eksterna olarak adlandırılır. Çapı artmakta olan oosit, granüloza hücreleri ile birlikte nonsellüler bir matriks sentezler. Zona pellusida (ZP) denilen bu yapı homojen ve mukopolisakkaritlerden zengin bir madde içerisinde, oositin ve granüloza hücrelerinin yüzeyinden çıkarak birbirine doğru uzanan mikrovillusları bulundurur. Folikül çapı arttıkça ZP kalınlaşır (33). Folikül antral seviyeye ulaştığında, oositin olgun hacmi yaklaşık 120 µm çapa kadar ulaşır. Granüloza hücre sayılarının oldukça arttığı ve oositin tam olarak geliştiği durumda, sıvı dolu boşluk (antrum) gözlenir ve genişlemeye başlar. Erken antral aşamada gözlenen küçük boşluklar, folikül preovulatuvar aşamaya ulaştığında birleşir ve tek, büyük bir boşluk halini alır. Bu aşamadaki folikül Graaf folikülü olarak isimlendirilmektedir. Granüloza hücreleri folikülün periferinde birkaç tabaka şeklinde yerleşir ve membrana granüloza tabakası olarak adlandırılırlar. Bir kısım granüloza hücreleri ise oositin etrafını sararlar ve oosite yakın olanlar korona radiata, geri kalanlar ise kümülüs hücreleri şeklinde tanımlanırlar. Folikül rüptüre olup ovulasyon gerçekleşeceği anda olgun oosit, korona ve kümülüs hücreleriyle birlikte atılır (33).

Her bir siklusun başlangıcında yükselen folikül stimüle edici hormon (FSH) etkisiyle bir grup antral folikül uyarılmakta ve Graaf folikül aşamasına doğru ilerlemesi gerçekleşmektedir. Foliküllerin kaderi endokrin ve parakrin faktörlerin kontrolündedir. Foliküller primordial, primer ve antral aşamalara kadar gelişir. Antral aşamada çoğu folikül atreziye uğrar, çok azı ise siklik gonadotropinlerin uyarımı ile (puberteden sonra) preovulatuvar aşamaya ulaşır. Bu Graaf foliküller reproduktif dönemdeki kadında ovaryan östrojenlerin ana kaynağıdır. Preovulatuvar gonadotropin salınımına cevap olarak her siklusta dominant Graaf folikülleri fertilize olabilecek matur oositi dışarı atar. Kalan teka ve granüloza hücreleri, korpus lutemu oluşturmak üzere değişikliğe uğrar (30).

Oosit Maturasyonu

Folikülogenezin en önemli amacı ovulasyon ve fertilizasyon için olgun yumurta hücresi üretmektir (31). Oosit maturasyonu hem mayotik siklus ilerlemesini hem de sitoplazmik olayların yeniden düzenlenmesini içeren kompleks bir süreçtir. İn vivo'da maturasyonun son noktası matur (MII) oositin folikülden salınmasıdır (42).

Dişi üreme hücrelerinin oluştuğu oogenezi süreci, düzenlenmesi ve sonucu bakımından spermatogenezden farklıdır. İlk dişi üreme hücresi olan oogonia yumurtalıklarda tekrarlayan mitozlarla çoğalıp primer oosite dönüşür. Primer oosit, etrafı folikül hücreleri ile çevrili olarak primordiyal folikül içinde gelişir (42). Oositin içinde bulunduğu bu ortam oositin büyüme ve gelişimi için gereken faktörleri içerir ve aynı zamanda çevresinde bulunan bağ dokusuyla olan bağlantısını da gerçekleştirir. Oositler büyüme ve gelişimlerini ovaryumlardaki bu foliküler ortamlarda tamamlayarak olgunlaşır. Olgunlaşan oositler döllenebilme ve embriyonik gelişime devam edebilme yeteneği kazanır (12).

Primordial foliküllerde bulunan oositler birinci mayoz bölünmenin profazındaki diploten aşamasında durur. Maturasyonun germinal vezikül (GV) aşamasında kabul edilen oositler ovulasyona kadar hücre siklusunun G0 olarak adlandırılan dinlenme aşamasında bekler. Bu sürede büyüme ve gelişimleri sırasında mayozun yeniden tamamlanması için nükleer lokalizasyon ve hücre siklus regülatör proteinlerinde belirgin artışlara ve bunu izleyen translasyonel ve post-translasyonel modifikasyonlara gereksinim vardır (43,44). Matürasyon olarak adlandırılan bu aşama, hücrenin nükleer ve sitoplazmik bölümlerindeki değişimlerin tümünü kapsar. Oosit ancak bu aşamaları geçtikten sonra fertilizasyona hazır hale gelebilmektedir. Oositin nükleer matürasyonu esnasında mayoz yeniden başlar ve Metafaz

II'ye geçiş olur. Bu sırada uzun süre folikül içerisinde bekleyen oositler hem mayozu yeniden başlatabilme yeteneği, hem de mayotik matürasyonu tamamlamayı sağlayacak protein ve RNA yükünü kazanırlar (45).

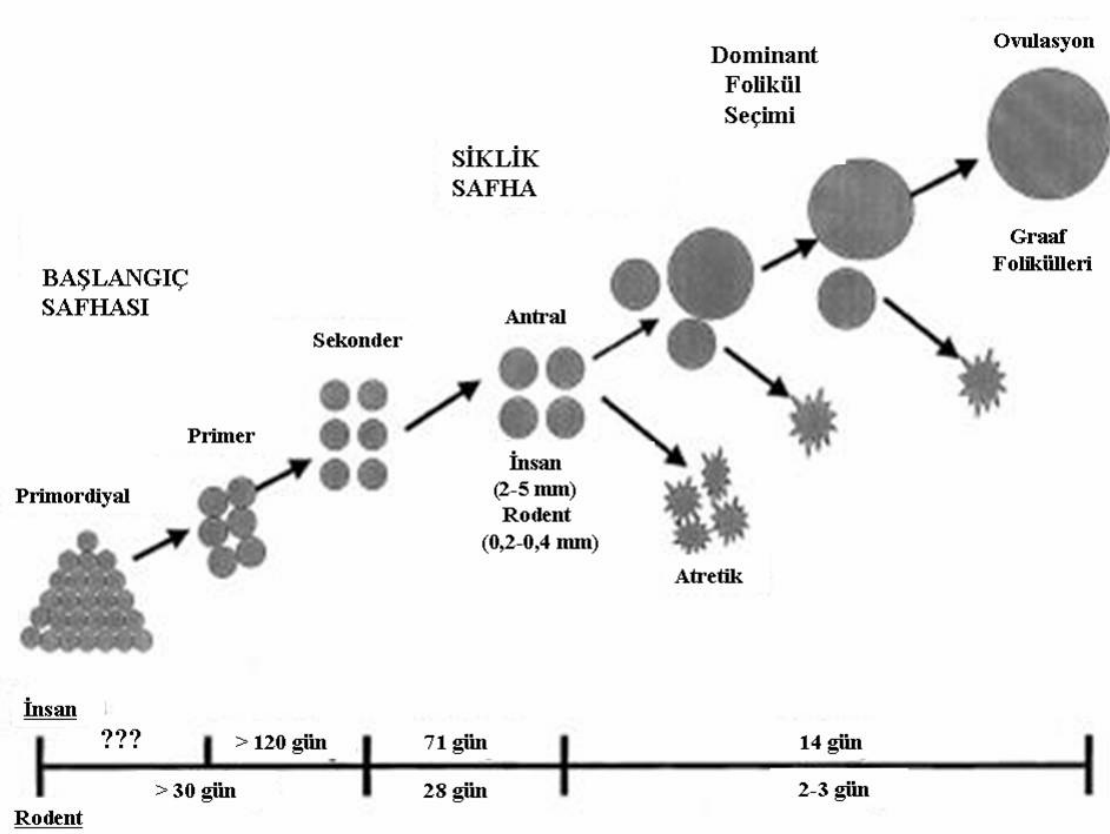
Preantral foliküllerde bekleyen oositler, mayozu yeniden başlatabilme yeteneğine sahip değildir. Ovulasyonun hemen öncesinde, henüz olgunlaşmamış oosit nükleusunun bozulması (germinal vezikülün dağılması) ile Metafaz I'i tamamlayarak Anafaza giriş yapar ve Metafaz II'ye (MII) ulaşarak, fertilizasyona kadar bu aşamada dururlar (46).

Sitoplazmik matürasyonda ise, oositin fertilizasyon ve erken embriyo gelişimi (preimplantasyon) için hazırlandığı ve mayotik ilerleme ile doğrudan ilgisi olmayan diğer matürasyon olayları gerçekleşir (47,48). Bu aşamada oositin sitoplazması ve organellerinin iç yapısında değişiklikler gerçekleşir (46). Bu şekilde inhibitör bir foliküler ortamda bekleyen oositlerde, foliküllerdeki in vivo luteinizan hormon (LH) artışına bağlı olarak bir 'pozitif sinyal' gelişir. Bu sinyal foliküler inhibisyonu ortadan kaldırarak, primer oositin sitoplazmasının asimetrik olarak bölünüp, farklı büyüklükte iki hücre oluşturmasına yol açar (49,50). Büyük olan sekonder oosit (Metafaz II), küçük olan ise kutup cisimciği (polar cisimcik) olarak adlandırılır. Bu haliyle oosit artık tam olarak fertilizasyon için hazır durumdadır. Fertilizasyonla birlikte ikinci kutup cisimciği de oluşur ve embriyo mitoz bölünmeler geçirerek hücre sayısını artırmaya devam eder (50).

RODENTLERDE FOLİKÜL GELİŞİMİNİN KRONOLOJİSİ

Rodentlerdeki ovaryan gelişim insanlardakine benzer ancak zamanlama farklıdır. Primordiyal germ hücreleri ileri embriyonik gelişimde oogonya oluşturmak üzere gonadlara göç eder. Doğumda, rat ovaryumu kordonlardan ve oogonyalardan oluşur. Primordiyal foliküller doğumdan sonra, üçüncü günün sonunda oluşurlar (51). İlk folikül dalgasının antral foliküle kadar gelişimi üç haftayı bulur (16). İyi gelişmiş sekonder foliküller yedinci günde gözlenir. Minimal ovaryan hücre apoptozisi ancak 18. günde oluşur (51,52). Bu dönemde erken antral foliküller de gözlenir. Puberte ya da ilk östrus 34. gün civarında meydana gelir. Düzenli östrus siklusu, 10-12. aylarda uzayan ve düzensiz siklusların oluşumuna kadar devam eder. 12-15. ayların sonunda hayvanlar persistent siklusa girerler ve bunu persistent diöstrus ve ardından anöstrus takip eder. Folikül gelişimi 25 µm'den (primordial folikül) 500-800 µm (preovulatuvar folikül) çapa kadar, 60 günden fazla bir sürede ulaşır (yaklaşık 15 östrus siklusu). Primordiyal folikülün sekonder foliküle gelişim aşaması 30 günden uzun olabilir. Sekonder aşamadan ovulasyona kadar olan gelişim süresi 28±2-3 gün olabilir (16). Bu

durumda erken folikül gelişimi, insanlardakine benzer şekilde rodentlerde de oldukça uzundur (Şekil1).



Şekil 1. Rodentler ve insanlarda prepuberte ve puberte aşamasında folikül gelişimi süreleri (16).

FOLİKÜLER ATREZİNİN MORFOLOJİK DEĞERLENDİRMESİ

Yenidoğan memeli ovaryumunda sınırlı sayıdaki primordiyal folikül stoğu pek çok kez ele alınmış bir konudur. Türe bağlı olarak, doğumun başlangıcında ya da kısa bir süre sonra az sayıda primordiyal folikül her gün aktive olmaya başlar. Foliküller atreziye girene kadar ya da (türe bağlı olarak) bir ya da daha fazlası maturasyonunu tamamlayıp, ovulasyon ile sonuçlanana kadar folikülojenik büyüme devam eder. Erişkin hayatta, ilerleyen yaşlara doğru folikül kaynağı azalır, çünkü primordiyal havuz tükenir (53).

Foliküler atrezi apoptozis aracılı bir prosestir (54). Apoptozis, seçici hücre azaltıcı bir işlem olarak aktif gen ekspresyonuna gerek duyar. Genellikle apoptotik hücreler doku içerisinde tek başına yer alırlar. DNA fragmantasyonu, plazma membranında şişme ve

hücrenin büzüşmesi şeklinde biyokimyasal ve morfolojik belirtiler oluşturan bir süreçtir. Pek çok hormon, sitokinler ve büyüme faktörleri genelde dokuya spesifik koruma faktörleri olarak aktivite göstererek apoptozisi önüyor olsa da pek çok hormonal faktör de apoptotik süreci indükleyici ya da hızlandırıcı etki göstermektedir (55,56).

Apoptotik uyarım almış bir hücre tipik olarak büzüşmekte ve çevre hücrelerle bağlantısını kesmektedir (56).

Primordiyal ve küçük çaplı gelişen folikülde oosit küçülür ve dejenere olur. Sonra benzer değişiklikler folikül hücrelerinde gözlenir. Hücreler sindirilip görünmez hale geldiğinde, etraftaki stromal hücreler oluşan boşluğa göç eder ve folikülden iz bırakmaz (33).

Atrezinin erken fazı; az sayıda, piknotik nükleuslu granüloza hücreleridir. Bu fazı, bazal membran düzensizliği (57) ve lökositlerin granüloza hücre tabakalarına infiltrasyonu izler (58). Bazal membran, granüloza hücrelerini teka hücrelerinden ayırır. Bu yapı dejenerasyonda granüloza hücresinden ayrılabilir ve kalınlaşarak kıvrımlı bir hyalin membran oluşturur. Bu da, primatlarda ileri atrezi seviyesindeki folikülün özelliğidir (33).

Dejenere oositteki nükleer değişiklikler kromatin kondensasyonu, piknoz ve fragmentasyon şeklinde iken, stoplazmik değişiklikler daha çok vakualizasyon ve fragmentasyon şeklindedir (58).

Preovulatar foliküllerde atrezi iki safhaya ayrılmıştır (59):

I. aşama : Dejeneratif değişiklikler sadece granüloza tabakasında görülür: Hücre büzüşmesi, piknozis ve karyoreksis. Bu aşamada folikül hala sferik ya da ovaldir.

II. aşama : Değişiklikler mayozun yeniden başladığını gösteren oositte de görülür: Pseudomaturasyon mekiğinin oluşup oluşmaması ile nükleer membranın yıkılması ve oosit fragmentasyonu. Antral folikülde granüloza hücreleri dejenere olduktan sonra oositler mayozu başlatma yeteneğindedir. Bu aşamada foliküllerin çoğu deforme edilir.

Zona Pellusida; hücrelerde gözlenen otolitik değişikliklere dirençlidir ve folikül kavitesi içinde yavaşça yıkılarak katlanır ve kollabe olur. ZP'nın kalıntı hücresel atıklarının fagositozunu bağ dokudan invaze olan makrofajlar sağlar (60).

Bazı atretik foliküllerde teka interna hücreleri genişler. Teka lutein hücrelerine benzer. Radial olarak yerleşip zincirler oluşturur ve bağ dokuya dağılır. Bağ dokuda zengin kapiler ağ meydana gelir. Bu foliküllerin dejenerasyonu devam ederken hücre yığınının ortasında hyalin çizgili bir skar gelişir ve küçük bir korpus luteum albicans izlenimi verir. Ovariyan stroma dejenere oosit alanını istila ederken, folikül kaybolur. Luteal hücre kordonları hemen yok olmaz ancak parçalanır ve stromaya dağılır. Bu hücre kordonları ovaryumda steroid hormon üreten interstisyel bezleri oluşturur (61,62).

Ovulasyondan sonra KL'un bir parçası olan teka hücrelerinin bazıları lüteinize olarak, LH uyarımı ile androjen sentezi yapımını sağlayan P450c17 enzimi etkinliğini gösterememektedir. Diğer lüteinize teka hücreleri ise bu enzim aktivitesini koruyarak östrojenlere aromatize olacak androjen yapımına devam ederler. Daha küçük foliküller tam olgunluğa ulaşamayıp atreziye gidince teka hücreleri stromal dokunun bir komponenti olarak kaynağına dönmekte ve LH'ya P450 aktivitesi ve steroid yapımı ile yanıt verebilme yeteneğini korumaktadır. Tekal dokunun ürünü androjenler olduğundan, geç foliküler fazda stromal dokunun artışı, siklusun ortasında, periferel plazmadaki androjen düzeyinin artışı ile birlikte gerçekleşmektedir. Androstendion %15, testosteron %20 artar. Bu yanıt, LH uyarımını artıran inhibinin artışıyla androjen yapımının kuvvetlenmesi sonucudur (30).

OVULASYONUN MOLEKÜLER MEKANİZMASI

Memelilerde puberte öncesi dönemde foliküller antral aşamaya kadar gelişip atreziye uğramaktadır. Puberte ile birlikte düzenli gerçekleşen sikluslarda, olgun folikül içerisindeki oosit ovaryumdan atılmaktadır. Pubertede ovulasyonu gerçekleştiren hipofizden salgılanan LH (41).

Ovulasyon, matür ovaryan foliküllerin LH artışına cevap verdiği ve fertilize olmaya hazır oositleri salgılamak için rüptüre olduğu eşsiz bir işlemdir. LH tarafından indüklenmiş bir preovulatar folikülün ovule olabilen bir foliküle dönüşümü zamanlama esaslı, karmaşık, multigen ve çok aşamalı bir süreçtir. Spesifik ovulasyon genlerinin LH-indüklemeli ekspresyonu, granüloza ve teka hücrelerini lüteinize olacak şekilde yeniden programlayan genlerin ekspresyonundan önce gerçekleşmelidir. Ovulasyon programı bozulduğu takdirde, LH tarafından düzenlenen ovulasyon ve lüteinizasyon olayları ayrılır ve oosit rüptüre olmayan bir KL içinde kapalı kalır (63).

Ovulasyon boyunca, ovaryan yüzey epitelinin yanı sıra folikül ve stroma içerisinde çeşitli ovaryan hücre tiplerinde fonksiyonel değişiklikler meydana gelir. Bu hücre tipleri; folikül için granüloza ve teka hücreleri, stroma için fibroblastlar ve endotelial hücrelerdir (64).

Gonadotropin (LH/FSH) artışı, preovulatar foliküllerin ovulasyonunu uyaran bir fizyolojik tetikleyicidir. LH, kendi reseptörü yoluyla, adenil siklaz aktivasyonunu ve ovulasyon için kritik olduğu bilinen spesifik genlerin hızlı ve kısa süreli ekspresyonunu sağlayarak, preovulatar foliküllerin granüloza hücreleri içerisinde indüklenen A-kinaz yolunu stimüle eder (64). Bu spesifik genler; progesteron reseptörünü (PR) kodlayan genler,

Prostaglandin Endoperoxide Synthase-2 (PGS-2) veya Cyclooxygenase-2 (COX2), ve CAAT Çoğaltıcı Bağlayıcı Protein Beta'dır (C/EBP β) (65).

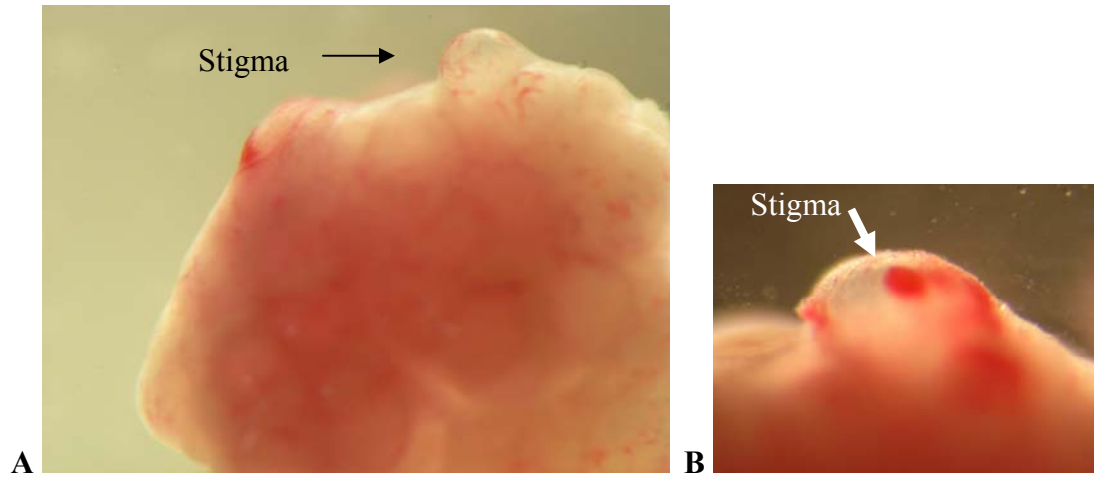
Başlangıçta, progesteron ve prostaglandinler, LH artışını izleyen sentezlerinin zamanlaması baz alınarak ve spesifik inhibitör ve antagonistlerin bunların sentezleri ve faaliyetleri üzerine olan etkileri nedeniyle ovulasyonla ilişkilendirilmişlerdir. Daha yakın zamanda, prostaglandin sentezi ve progesteron aksiyonu inhibitörleri, foliküllerin in vitro rüptüre olmasını engellemek için kullanılmıştır. Bu moleküllerin rolleriyle ilgili belirsizlik, PR ve PSG-2 ekspresyonunun LH tarafından selektif olarak preovulatuvar foliküller içerisinde indüklendiği çalışmalarla ve PR, PGS-2 ve C-EBP β eksikliği bulunan genetik olarak mutant farelerin anovulatuvar yapısı ortaya konularak giderilmiştir. Ek olarak, hücre siklus düzenleyici molekül (Cyclin D2) eksikliği bulunan farelerde de ovulasyon gözlenmemiştir (63,64).

Çeşitli hayvan deneylerinde gösterildiği gibi, oositin fiziksel atılımı folikül içindeki prostaglandin sentezinin ovulasyon öncesi ani yükselmesine bağlıdır. Prostaglandin sentezinin engellenmesi, oositin hapsedildiği bir KL oluşturur. Hem prostaglandinler hem de gonadotropinlerin siklus ortasında yükselmesinin, plazminojenin plazmine çevrilmesi gibi lokal proteazların aktivasyonunu ve konsantrasyonunu artırdığı düşünülmektedir. Hücreler arasındaki gap tipi bağlantıların bütünlüğünün kaybolması ve elastik liflerin bozulması sonucu ani antral sıvı birikimi olur ve ardından folikülü çevreleyen zayıflamış doku zarının rüptürü gerçekleşir (66).

Ovulasyonun Morfolojik Özellikleri

Memelilerde ovulasyon, ovaryum yüzeyindeki sağlıklı dokunun fiziksel disintegrasyonunu gerektiren biyolojik bir olaydır. Olgun ovaryan folikül, G protein-reseptör ikilisi ile reaksiyona giren hipofizer gonadotropinlerle uyarıldığında, ovaryum yüzeyinde dağılma başlar (G protein reseptörleri granüloza ve teka interna hücrelerinin plazma membranlarında yer alır). Gonadotropik uyarıma moleküler cevabın hızlı olduğuna dair pek çok kanıt mevcuttur (64). Bu biyokimyasal değişiklikler sadece folikül duvarında değil, folikülü tamamen çevreleyen dokuda da gözlenir. Genellikle folikülün rüptür alanı, morfolojik olarak folikülün en zayıf bölgesi olan tepe kısmıdır. Tavşanlarda ovulatuvar işlem yaklaşık 10 saat gerektirir. İlk birkaç saatin sonunda folikülün makroskopik görünümünde hiçbir değişiklik gözlenmez. Ancak dördüncü saatin sonunda folikül kızarmaya başlar. Çünkü folikül duvarındaki kapillerler dilate olur ve doku hiperemik hale gelir. Folikül duvarı tamamen parçalanmadan birkaç saat önceye kadar başka morfolojik belirti görülmez. Rüptür

zamanı yaklaşınca, olgun folikülün apeksi ovaryum yüzeyinden oldukça yüksek bir çıkıntı haline gelir ve folikül duvarı kademeli olarak inceler. Sonuçta, rüptürden birkaç dakika önce folikülün apikali büyük oranda şeffaf hale gelir ve balonlaşarak stigma yapısını (Resim 1) oluşturur. Folikül genellikle stigma oluşuktan sonra, birkaç dakika içerisinde rüptüre olur. Ovulasyon, kümülüs-oosit kompleksi genişlediğinde ya da atıldığında tamamlanır. Genellikle, folikül duvarı yırtıldıktan 1-2 saat sonra gerçekleşir. Bununla birlikte oosit salınımının pasif olduğu düşünülür. Çünkü kümülüs-oosit kompleksi tarafından üretilen matriks olan hyaluronan, yumurta salınımı için önemli bir maddedir. Kümülüs-oosit kompleksi ve onu çevreleyen matriksin mural granuloza hücreleriyle birlikte foliküler rüptüre yardımcı olduğu, bunu da matrikse bağlı proteazlarla ya da matriksin kendi molekülleriyle gerçekleştirdiği düşünülür. Bu matriks ayrıca kümülüs-oosit kompleksinin ovidukta görünür olmasına da yardımcı olur (67).



Resim 1. Ovulasyon dönemindeki bir ovaryuma ait stigma görüntüsü. A- X1, B-X22.4.

OVARIYAN SIKLUSUN HORMONAL DÜZENLENMESİ

Her menstrüel siklusta, ovaryum siklik değişikliklere uğrar ve foliküler fazdan luteal faza geçer. İki faz birbirinden ovulasyon ile ayrılır (Şekil 2). Foliküler fazın başlangıcında 10-20 adet preantral folikül FSH ve LH etkisiyle gelişmeye başlar (16,30,41). Siklusun ilk 8-10. günlerinde folikül büyümesini etkileyen başlıca hormon FSH'tır. FSH teka ve granüloza hücrelerini uyararak foliküler lümene östrojen sentezlemelerini sağlar. Yüksek seviyelerdeki FSH'nın, erken antral foliküllere ait granüloza hücrelerinin bölünme ve farklılaşmalarının tamamlamalarına izin vererek, foliküllerin hayatta kalabilmelerini sağladığı görülmektedir. Böylece, söz konusu foliküller LH'a cevap olarak lüteinize olma potansiyeli kazanırlar (33).

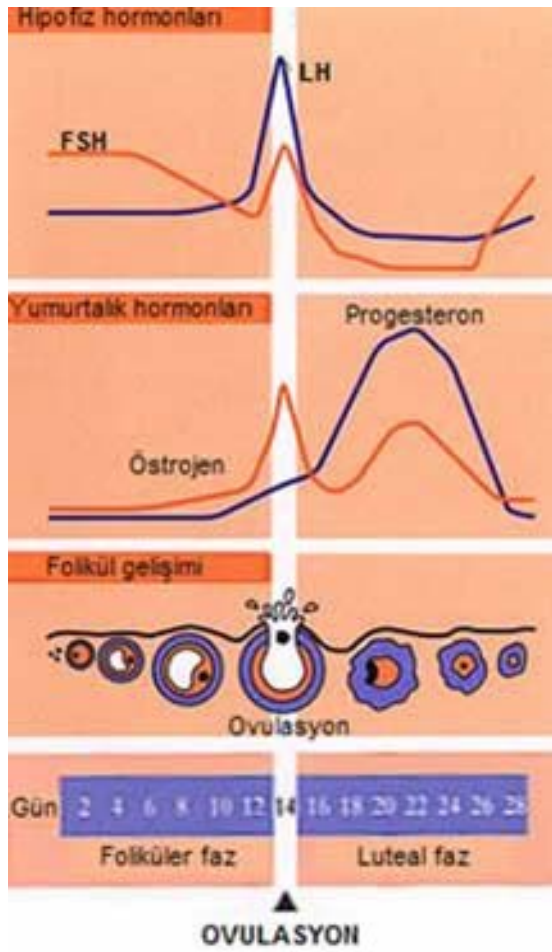
İleri foliküler fazda, ovulasyondan önce LH'nın etkisi altında progesteron artmaya başlar. Folikül lümeninde östrojen birikmeye başlar. Sonunda öyle bir değere ulaşır ki, folikül sürekli büyüme ve gelişme için FSH'dan bağımsız hale gelir. Östrojen seviyesi adenohipofizden FSH salınımını inhibe eder. FSH'dan bağımsız aşamaya ulaşamayan foliküller dejenere olur. Hormonal olarak kontrol edilen gelişim sonucunda sadece bir folikül tam olarak mature olur ve ovaryumdan salınır. LH'nin pik seviyesi ovulasyonu başlatırken, FSH daha az oranda yükselir (33).

LH, ovulasyona gidecek dominant folikülün steroidojenik fonksiyonu için menstrüel siklusun ortasında salınır. Bu, folikül tarafından östrojen üretimi için iki hücre, iki gonadotropin modeli ile açıklanır (33). Teka interna hücreleri LH reseptörleri içerir ve artan LH'ya cevap olarak androjen üretimini artırır. Bunun yanında granüloza hücreleri FSH reseptörü bulundurur ve FSH'ya cevap olarak androjen-östrojen dönüşümünü artırır. Dolaşımdaki östradiol seviyesinin artması, hipotalamik-hipofizer aks gibi hedef organlarda siklusun ortasındaki gonadotropin salınımını sağlayarak olgun folikülde periovulatuvar olaylara neden olur. Bununla birlikte, primatlarda gelişen folikülde LH'nın vital rol oynayıp oynamadığı netlik kazanmamıştır (68).

Ovulasyonun ardından luteal faz başlar ve granüloza ve tekal hücreler KL oluşturmak üzere hızlı bir morfolojik transformasyona uğrar. KL, östrojen ve büyük oranda progesteron salgılar. Bu iki hormonun etkisiyle (daha çok progesteron olmak üzere) endometrium sekretuar faza girer. Bu faz, fertilize olmuş yumurtanın implantasyonu için hazırlık fazıdır. Menstrüel siklus boyunca LH, KL'un gelişmesi ve sürekliliğinden sorumlu görülür. Fertilizasyon olmazsa, hormon seviyesi düşer ve KL birkaç gün içinde dejenere olur. Fertilizasyon olursa KL progesteron ve östrojenleri salgılamaya devam eder. hCG, fetüs

tarafından daha sonra da plasenta tarafından salgılanarak KL'ü uyarır ve gebelik boyunca sürekliliğinden sorumludur (33).

LH'nın preovulatuvar dönemdeki salınımından önce ovaryumda üretilen başlıca hormon östrojendir. LH ile birlikte teka ve granüloza hücrelerinin lüteinize olması sonucunda her iki hücreden de salınan temel hormon artık progesterondur (68).

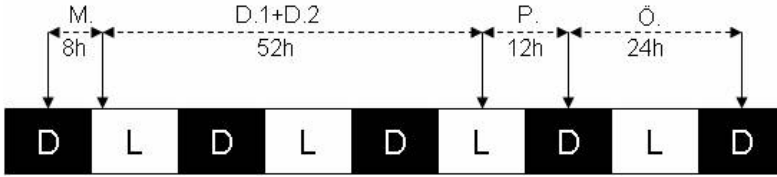


Şekil 2. Ovarian siklus boyunca ovaryumda gözlenen değişiklikler ve hormonal durum (66).

ÖSTRUS SIKLUSU

Farelerde genital siklus (östrus siklusu) post-natal 28-42. günlerde (16,51,69) vajinal açıklığın gözlenmesiyle, vajinal smear yöntemi kullanılarak takip edilebilir. Yaklaşık 4-5 gün sürer (69-71).

Fare ve ratlarda, insanlardakine benzer olarak, genital siklus çeşitli hormonlar ile kontrol edilir. Östrus siklusu, proöstrus (P), östrus (Ö), metöstrus (M) ve diöstrus (D) olmak üzere başlıca 4 fazdan oluşur. Proöstrus fazı 12 saat, östrus fazı 12-24 saat, metöstrus fazı 6-8 saat, diöstrus fazı ise 52-60 saat sürer (32,72,73). Yaklaşık iki gün süren diöstrus fazı boyunca smearde farklı hücreler gözleendiğinden, diöstrus 1 (D1) ve diöstrus 2 (D2) olmak üzere iki alt faza ayrılır. Siklusun düzenliliği, aydınlık-karanlık siklusunun kontrolü altındadır (74,75). Deney hayvanları laboratuvarlarında 12 saat aydınlık (L): 12 saat karanlık (D) uygulaması yapılır. Bu uygulamaya göre fazlar ve süreleri Şekil 3 'de gösterilmiştir.



Şekil 3. Östrus siklusu fazlarına ait süreler. L:Aydınlık siklus 12 saat (7:00-19:00), D: Karanlık siklus 12 saat (19:00-7:00). P: proöstrus, Ö: östrus, M: metöstrus, D1: diöstrus 1, D2: diöstrus 2.

Östrus siklusu boyunca cinsiyet hormonlarının siklik değişimleri vajinal epitelin histolojik görünümünde belirgin değişiklikler meydana getirir. Prolaktin, LH ve FSH proöstrus fazının akşam saatlerinde yükselmeye başlar. Östradiol seviyesi metöstrusta artmaya başlar, proöstrus fazında pik yapar ve östrus fazında tekrar bazal seviyeye ulaşır. Progesteron sekresyonu metöstrus ve diöstrus fazları süresince yüksektir, diöstrusun ardından azalır. Progesteron değeri ikinci pik seviyesine proöstrus fazının sonunda ulaşır (74,75). Bu hormonal etki ile proöstrus ve östrus fazında ovaryumda folikül gelişimi, östrus fazının ortalarında ovulasyon, metöstrus fazında KL oluşumu gerçekleşir. Diöstrus fazı ise dinlenme fazıdır (32, 76).

İlk defa 1917'de Stockard ve Papanicolou tarafından, *guinea pig*'lerde başlayan östrus siklusu çalışmalarından bugüne kadar, farklı memeli türlerinde östrus aşamalarını belirlemek için kabul edilen yöntem 'vajinal smear'dir (73). Bu yöntem, vajinal duvardan sürüntü

alınması ya da vajinal yıkama sonucu elde edilen preparatlar üzerinde, her bir faz ile ilintili hücre tiplerinin (epiteliyal hücre, kornifiye hücre, lökositler) histolojik olarak tanınması esasına dayanır. Östrus siklusu fazlarına ait hücre dağılımları ve smear yoğunluğu Tablo 1’de (70) gösterilmektedir. Bu yöntem canlı hayatta iken, tekrarlayan siklusa ait gözlemler için güvenilir bir kayıt sağlar. Ayrıca hayvanlarda ovulasyon zamanı, kızgınlık dönemi (davranışsal östrus) ve gebeliğin tespiti için de kullanılan pratik bir yöntemdir (32,74,77,78).

Laboratuvar hayvanlarından sık smear alınması ise bazı dezavantajlar doğurabilir. Kastre edilmiş ve normal ratlarda, pamuk çubuklar kullanılarak sık sık alınan smearlerde kornifiye hücrelerin ya da östrus benzeri smearlerin normalden fazla sayıda gözlendiği bildirilmiştir (79). Sık smear almak vajinal epitelde kornifikasyona neden olmaktadır. Ayrıca özellikle östrus fazında smear almak, yalancı gebeliği indükleyerek, uzun siklusların gözlenmesine de neden olabilir (32,69,72).

VAJİNA

Genital kanalın hiçbir parçası, östrus siklusu boyunca, vajina epitelinden daha fazla değişikliğe uğramaz (33).

Proöstrusta, epitel üç tabakadan oluşur (80). Dış tabaka, az ya da çok mukus içeren, piknotik nükleuslu hücrelerden oluşur. Bunun altında yer alan stratum granülozum, östrus fazının başlamasıyla birlikte stratum korneuma dönüşür. Üçüncü tabaka stratum germinativum’dur. Yaklaşık yedi hücre tabakası kalınlığındadır. Proöstrus süresince ve erken östrusta dış tabaka lümene dökülür ve karakteristik nükleuslu hücre smeari verir. İleri proöstrus ve devamında östrus hücreleri kornifiye tabakadan ayrılırlar. Metöstrusun başlaması tüm tabakanın dökülmesiyle karakterizedir. Vajinal smearde de kornifiye hücre miktarı artar. Diöstrus-1’de nükleuslu hücre miktarı artar. Bu, dökülme işleminin sonlandığını gösterir. Stratum germinativumun birkaç süperficial tabakasında ise şiddetli lokosit infiltrasyonu gözlenir. Smearde de oldukça fazla görülür. Süperficial tabakanın delaminasyonunun sonucunda diöstrustaki vajina epiteli sadece bir hücre tabakası içerir. Diöstrus 2’de stratum germinativumda aktif büyüme başlar ve proöstrus ile birlikte stratum granülozum yüzeyin altında pek çok hücre tabakası içerir ve böylece siklus tamamlanır (72,73,80).

Tablo 1. Vajinal smeardeki hücre morfolojisi ile östrus siklus safhalarının sınıflandırılması (70).

Siklus Safhası	Hücre tipi ^a			Smear Yoğunluğu
	Lökositler	Nükleuslu Epitel	Kornifiye Epitel	
Diöstrus-Proöstrus (DP)	+ / ++ (Predominant)	+ İyi gelişmiş	0 / +	İnce
Proöstrus (P)	0 / + Sık dejenere	+ / +++ İyi gelişmiş (Predominant)	0 / +	Orta
Proöstrus-Östrus (PE)	0	+ / ++	++ / +++ (Predominant)	Orta
Östrus	0	0	++ / +++ Göreceli olarak küçük hücreler (Predominant)	Ortadan şiddetliye
Metöstrus (M)	0 / ++	0	++ / +++ Östrustakinden daha geniş, daha düz ve daha kümelenmiş (öbek)	Ortadan şiddetliye
Diöstrus 1 (D1)	++ / +++ (Predominant)	++ / +++ Çoğunlukla düzensiz şekilli ve vakuollü	+ / ++	Ortadan şiddetliye
Diöstrus 2 (D2)	+ dan +++ ya (Predominant)	+ Çoğunlukla düzensiz şekilli ve vakuollü	0	İnce

^aHücre yoğunluğu: 0 = yok, + = az, ++ : orta yoğunlukta, +++ : şiddetli.

SÜPEROVULASYON YÖNTEMİ

Multifolikülasyon ve süperovulasyonun temel amacı belirlenen bir zamanda bir hayvandan elde edilen kullanılabilir oosit ya da embriyoların sayısını artırmak olarak belirtilmektedir (35). Reprodüktif biyoteknolojik uygulamalardan birçoğunun ilk aşaması hayvanların süperovulasyona sevk edilmesi ile başlar. Ovum pick up (OPU), *in vitro* embriyo üretimi (IVEP), intrauterin tohumlama (IUI), gamet intrafallopian transfer (GIFT), oosit ya da *in vitro* embriyolarının dondurulması, embriyo transferi, gamet fizyolojisinin araştırılması veya sexing çalışmaları, pronuklear DNA mikroenjeksiyonu, intra sitoplazmik sperm injection (ICSI) gibi gamet manipulasyonları için ihtiyaç duyulan çok sayıda oosit ya da embriyolar süperovulasyonun başarılmasıyla gerçekleştirilebilmektedir (81,82). Bu amaçla ekzojen gonadotropinler birçok laboratuvar hayvanı ile evcil hayvanlarda ovulasyonun uyarılmasında başarıyla kullanılmaktadır.

Multifolikülasyon ve süperovulasyonu sağlamak amacıyla hipofiz kökenli gonadotropinler FSH, LH ve HMG (Human Menopausal Gonadotrophin), plasental kökenli gonadotropinler PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin) ve hCG (Human Chorionic Gonadotrophin), pituitar extrat ve GnRH (Gonadotrophin Releasing Hormone) preparatları ile Clomiphene citrate, Difenil-ilen türevleri gibi bazı sentetik preparatlar kullanılmaktadır. Treloar ve ark. süperovulasyon uygulanmış dişilerden elde edilen embriyo sayısının bireyler arasında değişiklik gösterdiğini belirtmişlerdir (83).

Fare, üreme tıbbı, genetik ve toksikolojide iyi bilinen bir hayvan modelidir. Fare için süperovulasyon protokolü başarılı bir şekilde uygulanmaktadır ve pek çok faktör tarafından etkilendiği bilinmektedir. En önemli faktörler arasında yaş ve soy gelmektedir. Genellikle 3-6 haftalık dişilerden maksimum sayıda yumurta elde edilmektedir. Fare soyları iki kategoriye ayrılır; yüksek seviyede yanıt verenler (30-50 yumurta/fare), düşük seviyede yanıt verenler (<15 yumurta/fare). C57BL/6J, BALB/cByJ ve SJL/J soyları yüksek seviyede ovulatuvar iken, A/J, C57/L ve 129/J düşük seviyede ovulatuvar soylardır (84).

Östrus siklusu fazları dikkate alınmaksızın yapılan hormon uygulamalarının farelerde ovulasyon oranı ve kalitesi açısından farklılık yaratmadığı ispatlanmıştır (85). 5 IU PMSG ve hCG kullanılan süperovulasyon protokolü ile ovulasyon hCG uygulamasından yaklaşık 11-14 saat sonra gerçekleşir (80,81,85,86).

İYONİZAN RADYASYON İNDÜKSİYONUyla GELİŞEN FOLİKÜLER ATREZİ

İyonizan radyasyonlar, radyoizotopların parçalanması ile oluşan alfa (α), beta (β), gamma (γ) ışınlar, nötronlar ve yapay olarak oluşturulan ise X ışımıdır. Bu radyasyonlar ile iyonizasyon sonucunda hücre içinde ya da çevresinde oluşan primer lezyon pek çok organelin hasarlanması şeklinde gerçekleşir. Radyolezyonlar nükleus ya da sitoplazmada meydana gelir ve belirli bir kısmı tamir edilebilir. Ancak, radyasyon hasarının en önemli sonucu olan kromozom kırılmaları, hücre ölümü ya da genetik değişikliğe neden olmaktadır (14).

İyonize radyasyon çeşitli hücrel lezyonları artırır. Bunlar genellikle DNA ve membran hasarlarından oluşmaktadır. DNA hasarı, sinyal iletim yollarını koordine edip hücre siklusunu duraksatır. Strese cevap oluşturarak DNA tamir proseslerini başlatır (87,88).

Radyasyon, DNA çift zincir kırıkları oluşturur ve mitokondriyal apoptotik yolağı başlatıcı rol oynar (8). Ayrıca, diğer yollar da (hücrel membranda seramid oluşumu gibi) iyonize radyasyon maruziyeti sonrasında apoptozisi başlatabilir (89, 29).

Işınlama anındaki fiziksel koşullar (doz aralığı, radyasyon tipi ve kalitesi, akut ya da fraksiyonel oluşu, hormonal durum, oksijen tansiyonu, sıcaklık, vb.) hücrenin radyasyona cevabını büyük ölçüde etkiler. Bu yüzden tek başına radyosensitivite terimi anlamlı bulunmamaktadır. Etkiyi ölçecek biyokimyasal değişiklikler, morfolojik etkiler, üreme kapasitesi ve genetik etkiler gibi kriterler de önem taşımaktadır (14).

Foliküler atrezi başlangıcının en önemli belirtisi granüloza hücrelerindeki apoptozistir. Biyokimyasal olarak internükleozomal DNA fragmentasyonu, morfolojik olarak ise hücre büzüşmesi ve apoptotik cisimlerin oluşumuyla karakterize edilir. Granüloza hücre apoptozisinde rol alan apoptotik uyarım ve hücre içi sinyal iletim yolları hala araştırılmaktadır (88).

Radyasyon indüksiyonu ile mitokondrilerden sitokrom C salınımı başlar ve intrinsik apoptotik yolak harekete geçirilir. Ardından, kaspaz 3 ve 9 aktive edilir (8). Farklı apoptotik uyarılara cevap olarak pek çok bileşik mitokondriyal apoptotik yolağı aktive edebilirken, kaspaz 2 mitokondriyal aktivasyon yoluyla DNA hasarıyla indüklenen apoptozisi başlatan esas protein olarak düşünülmektedir (89).

Sitotoksik stres ile indüklenen apoptoziste kaspaz 2'ye gerek duyulmaktadır. İyonizan radyasyon gibi uyarılara maruziyetin hemen ardından aktive olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, prokaspaz 2, nükleustaki tek prokaspazdır ve mitokondriyal apoptotik yolağı

başlatabilmektedir. Bu görüş ile direkt olarak DNA çift zincir kırıklarının kaspaz 2'yi aktive ettiği düşünülebilir (89).

Tümör supresör proteini p53 iyonize radyasyon gibi DNA hasarı oluşturan çeşitli ajanlara cevap olarak aktifleşen bir nükleer fosfoproteindir. p53 ekspresyonu DNA hasarı uyarımıyla artar ve çeşitli genlerin transkripsiyonunu aktive eder. Böylece, mitokondriyal hasar oluşur ve p53 bağlantılı sinyal mekanizması harekete geçer. Ayrıca p53, hücre siklusu ilerlemesindeki önemli kontrol noktaları kadar apoptozis indüksiyonu için de gerekli görülmektedir. DNA'ya bağlanarak ve siklin bağımlı kinaz inhibitör p21'i transaktive ederek hücre siklusunun kontrolünde önemli rol oynar (91).

p53'ün başlıca atretik foliküllerden eksprese olduğu ve apoptozis baskılayıcı genlerin (bcl2) ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir (92). Radyasyon ve kemoterapiye cevap olarak p53, apoptozis ve hücre siklusunda duraksamaya aracılık eder. p21, p53'ün direkt transkripsiyonel hedefidir ve DNA hasarıyla güçlü bir şekilde uyarılır. DNA hasarı, p53 ekspresyonunu artırır ve nükleusa taşınmasını hızlandırır. Sonuçta, pek çok genin aktive olmasıyla hücre ya apoptozise uğrar ya da hücre siklusu duraksar. Genellikle iyileşme gözlenmez. p21 ekspresyonu p53 bağımlı ve bağımsız olarak transkripsiyona uğrayabilir. p21'in proapoptotik ve antiapoptotik etkileri spesifik hücresel yapıya bağımlıdır (93).

Ovaryumda FSH, kit-kit ligand etkileşimi, epidermal büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü ve siklik guanozin 3'5'-monofosfat gibi spesifik düzenleyiciler foliküllerin hayatta kalmasını ve apoptozisini kontrol etmektedir. DNA çift zincir kırıkları için tamir sistemlerinin yetersiz olması nedeniyle kromozom kırıkları sonucunda radyasyonun ardından oosit kaybı gözlenmektedir (29).

Folikül Atrezisinin Intraovaryan Hormonal Kontrolü

Değişik peptid ve steroid hormonların folikül atrezisinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadıkları açıktır. Folikül hücrelerinin temel ürünleri, ovaryan steroidler ve inhibin protein ailesi, apoptozun düzenleyicileridir. Benzer şekilde, üzerinde daha az çalışılan IL-6 ve GnRH-benzeri peptidler de intraovaryan düzenleyici roller oynayabilirler. Ayrıca, birçok ovaryan büyüme faktörleri de folikül atrezisinin önemli düzenleyicileridir. Rat preovulatar foliküllerini kullanan çalışmalar temel alınarak, folikül apoptozunun, bu büyüme faktörlerini de içeren intraovarian hormonal mekanizmalar yardımıyla düzenlenmesi için bir model önerilebilir.

Granüloza hücreleri; ratlarda apoptotik hücre ölümünün özel bölgesi (alanı) olduğundan, bu hücre türünde endokrin ve parakrin sinyaller apoptozu düzenleyecek biçimde birleşmelidirler. Bununla birlikte, kültüre edilmiş granüloza hücrelerinin kullanıldığı çalışmalar, FSH, LH/hCG ve insulin büyüme faktörü I (IGF-I) tedavilerinin kültüre edilmiş foliküller üzerindeki apoptoz baskılayıcı faaliyetlerine rağmen, spontan apoptozun önlenmesinde etkisiz kaldıklarını ortaya koymuştur. FSH reseptörleri özellikle granüloza hücrelerinde bulunduğundan, bu bulgular komşu tekal hücrelerin önemli rol oynadıklarını önermektedir (93). FSH veya LH, granüloza hücrelerinde endotelial büyüme faktörü (EGF) veya transforme edici büyüme faktörü α (TGF α) salgılanmasını artıran tekal hücre uyarıcıları olarak çalışabilirler. Daha sonra, bu büyüme faktörleri apoptozu engellemek için granüloza hücrelerine difüz olabilirler. Roy ve Greenwald (94), bir hamster folikül kültürü modeli kullandıkları çalışmalarında, mürin EGF antikorlarıyla tedavinin FSH yoluyla folikül DNA sentezi uyarımını önlediğini ortaya koymuşlardır. bFGF granüloza hücreleri tarafından üretildiğinden, TGF α mRNA'ların kültüre edilmiş rat granüloza hücrelerinde bulunduğuna dayanarak (95), bu peptidlerin de folikül apoptozunun düzenlenmesinde otokrin bir rol oynadıkları söylenebilir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamızda Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nde üretilen, 6-7 haftalık, ağırlıkları 25-30 g arasında değişen 50 adet dişi Balb/c türü fare kullanıldı. Tüm denekler, deney süresi boyunca optimum laboratuvar koşulları (22 ± 1 °C, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda (07.00/19.00)) altında, günlük içme suyu ve %21 ham protein içeren pelet yemlerle (Purina) beslendi.

Çalışma için Trakya Üniversitesi Etik Kurulu'ndan (Ek) 14.12.2006 tarihinde onay alındı.

Östrus siklusu ve ovulasyon oranı gibi parametrelerin deney hayvanlarında bireysel farklılıklar göstermesi nedeni ile tüm gruplara ait denekler rastgele seçildi.

Deney grupları; 1-Kontrol (n=6),

2-Radyasyon-Sham (n=6),

3-Radyasyon I (n=8),

4-Radyasyon II (n=8)

5-Süperovulasyon (n=6),

6-Radyasyon+Süperovulasyon I (n=8),

7-Radyasyon+Süperovulasyon II (n=8) şeklinde oluşturuldu.

İlk dört grup spontan ovulasyon grupları, son üç grup ise süperovulasyon grupları olarak ayrılıp, uygulamalar gerçekleştirildi. Östrus siklusu takibi yaparken, yalancı gebelik ve anöstrus (düzensiz) siklusları engellemek amacıyla, fareler ikişerli olarak kafeslendi (70,96,97). İki günlük adaptasyon süresinin ardından, üç siklusu tamamlayana kadar vajinal

smear takibi yapıldı. Bu sürenin sonunda 4-5 günlük östrus siklusu gösterip, fazları düzenli devam eden denekler deneye dahil edildi.

Radyasyon hasarı oluşturmak amacıyla Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda, radyasyon gruplarındaki her bir denek, diöstrus fazından-proöstrus fazına geçiş döneminde intraperitoneal (i.p.) yoldan, 50 mg/kg Ketamin HCl (10 ml Flakon, Sigma-USA), 5 mg/kg Xylazine HCl (50 ml Flakon, Sigma-USA) ile anestezi sağlandıktan sonra supin (sırtüstü) pozisyonunda sabitlendi. Kaynak-cilt mesafesi 65 cm olmak üzere 1,5 cm derinlikte doz hesaplanarak, belirlenen alana Cis-Bio marka Cirus Kobalt-60 teleterapi cihazı ile tek fraksiyonda 330.63 cGy/dk doz hızında tüm vücut 7.2 Gy ışın uygulandı.

Radyasyon-sham grubu deneklere ketamin/xylazin anestezi uygulandı ve radyasyon uygulanmaksızın ışınlama süresi boyunca sabitlenerek bekletildi.

Spontan ovulasyon dönemlerinin ve radyasyon uygulama zamanlarının tespit edilmesinde, ayrıca radyasyonun ardından oosit elde etme zamanına kadar olan sürede, östrus siklusundaki değişimleri gözleyebilmek amacıyla vajinal smear yönteminden yararlanıldı. Deney süresince her gün, sabah 9:00'da bir kez smear alınmak suretiyle, östrus fazları takip edildi. Ovulasyonun gerçekleştiği, östrus fazından metöstrus fazına geçiş döneminin belirlenmesi için; sabah smearde östrus fazı tespit edilen deneklerden akşam saat 20:00'da tekrar smear alınarak ovulasyon zamanı teyit edildi. Vajinal smear yöntemi aşağıda açıklandığı şekilde gerçekleştirildi:

Deneklerin vulva bölgesi %70 etil alkolle (Merck) silindikten sonra, steril tahta çubukların pamukla kaplanmış uç kısımları nemlendirildi. Vajina içerisinden, nazıkçe sürüntü alınıp, lam üzerine yayıldı. Oda sıcaklığında kuruyan smearlere %70 metanol (Merck) uygulanıp, yine oda sıcaklığında kurutularak fiksasyon sağlandı. %1'lik Toluidin mavisi (Sigma-USA) ile 5 dakika boyanan preparatlar distile su ile yıkanıp kurutulduktan sonra Kanada balsamı (Fluka-Almanya) ile kapatıldı (98,99). Fazlara ait fotoğrafların çekimi için, CX31 Olympus marka ışık mikroskobu ve C-5060 Olympus marka kamera kullanıldı.

OVULASYON ORANI VE MORFOLOJİK İNCELEME İÇİN OOSİTLERİN ELDE EDİLMESİ

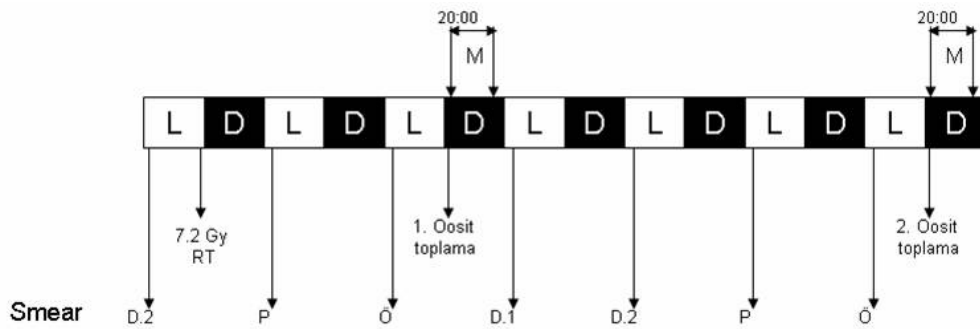
Spontan Ovulasyon Döneminde Oositlerin Elde Edilmesi

Kontrol ve sham gruplarında, sabah smearde östrus fazı gözlenen deneklerden akşam yaklaşık saat 20:00'da tekrar smear alınarak, metöstrusa geçiş döneminde ovulasyonun gerçekleştiği tespit edildi.

Metöstrusa geçiş döneminde servikal dislokasyon ile sakrifiye edilen hayvanların ovaryum-tuba uterina kompleksleri çıkarıldı ve Olympus SZX7 stereo mikroskop altında incelendikten sonra birbirinden ayrıldı. Işık mikroskopik inceleme için ovaryumlar Bouin solüsyonuna alındı.

Bu dönemde, genişleyip belirgin hale gelen tuba uterinaların ampulla bölgeleri patlatılarak, oositler elde edildi. Morfolojik inceleme ve sayım işlemleri stereo mikroskop yardımıyla gerçekleştirildi. Fotoğraflar C-5060 Olympus marka kamera ile çekildi.

Radyasyon I ve II grubu deneklerde diöstrus fazından proöstrus fazına geçiş döneminde, 50mg /kg ketamin + 5 mg/kg xylazin anestezisi altında, 7.2 Gy tek doz, tüm vücut gamma radyasyon uygulaması yapıldı. Radyasyon I grubunda, radyasyon uygulamasını takip eden ilk östrus fazında, radyasyon II grubunda ise, ikinci östrus fazında oositler elde edildi. Bu gruplara ait deney şeması Şekil 4'te gösterildi.



Şekil 4. Radyasyon I ve II gruplarına ait deney şeması. RT: Radyasyon, L:Aydınlık; sabah 7.00-akşam 19.00, D:Karanlık periyod; akşam 19.00-sabah 7.00. P: proöstrus, Ö: östrus, M: metöstrus, D1: diöstrus 1, D2: diöstrus 2. 1. oosit toplama radyasyon I grubuna ait deneklerin, 2. oosit toplama ise radyasyon II grubuna ait deneklerin sakrifikasyon zamanlarını ifade etmektedir.

xylazinin anestezisi altında, 7.2 Gy tek doz, tüm vücut gamma radyasyon ile ışınıldı. Radyasyon uygulamasını takip eden ilk proöstrus fazında radyasyon+süperovulasyon I, ikinci proöstrus fazında radyasyon+süperovulasyon II grubuna süperovulasyon protokolü uygulandı. Oositlerin eldesi için hCG'den 13 saat sonra denekler sakrifiye edildi.

Ovaryum ve tuba uterinalar, stereo mikroskohta incelendikten sonra birbirinden ayrıldı. Ovaryumlar, ışık mikroskopik inceleme için Bouin solüsyonuna alındı. Oositlerin toplanabilmesi için, tuba uterinaların ampulla bölgeleri stereo mikroskop altında patlatıldı. Oosit-kumulus kompleksleri morfolojik olarak değerlendirilip, oosit sayıları kayıt edildi.

Oositlerin olgunluğu polar cisimciğin incelenmesine göre yapıldı. Polar cisimciğin saptanması oositin Metafaz II (MII) döneminde olduğunu ortaya koydu. Polar cisimciğin olmadığı durumlarda oositin sitoplazmasındaki değişiklikler incelendi. Germinal vezikül (GV) görüldüğü durumlarda GV oosit olarak kabul edildi. GV görülmediği durumlarda ise Metafaz I (MI) oosit olarak kabul edildi.

Süperovulasyon gruplarındaki oosit-kumulus kompleksleri, in vitro fertilizasyon uygulamalarında kabul gören, Wolf ve arkadaşlarının oosit morfolojisi için inceleme sistemine (Tablo 2) göre değerlendirildi (82). Bu sisteme göre;

1. derece (A) olarak sınıflanan kumulus-oosit kompleksleri; olgunlaşmamış,
2. derece (B) olarak sınıflanan kumulus-oosit kompleksleri; olgunluğa yakın ya da olgunluk öncesi oositler,
3. derece (C) olarak sınıflanan kumulus-oosit kompleksleri; olgun,
4. derece (D) olarak sınıflanan kumulus-oosit kompleksleri; dejenere olarak kabul edildi.

Tablo 2. Wolf ve arkadaşlarının oosit-kumulus kompleksi için inceleme sistemi (82).

1. Derece (A)	Seyrek ya da bulunmayan kumulus ooforus hücreleri ve 1-3 tabaka korona radiata hücreleri.
2. Derece (B)	Yoğun kumulus ooforus hücreleri ve sıkı paketlenmiş korona radiata hücreleri.
3. Derece (C)	Genişlemiş, yumak şeklinde kumulus ooforus hücreleri ve genişlemiş korona hücreleri.
4. Derece (D)	Genişlemiş, seyrek kumulus ooforus hücreleri ve genişlemiş, genellikle kısmen yok olmuş korona radiata hücreleri.

Oosit sayısı / denek sayısı oranı ile, her gruba ait ‘ovulasyon oranları’ elde edildi.

Tüm deney süresi boyunca ağırlık takibi yapılan deneklerin, deney sonunda ovaryum ağırlıkları ölçülerek, her bir grup için ortalama ovaryum ağırlığı (mg)/100 g vücut ağırlığı hesaplandı.

Tüm deneklere ait ovaryumların, en (mm) x boy (mm) x yükseklik (mm) değerleri ölçüldü. 0,523 elipsoid hacim katsayısı (100,101) ile çarpılarak, her gruba ait ortalama ovaryum hacimleri (mm³) hesaplandı.

Dokular ışık mikroskopik inceleme için işlemlendirilmesi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı’nda gerçekleştirildi. Dokular bir gün fiksator içerisinde tutulduktan sonra aşağıda belirtilen işlemlerden geçirildi.

Doku takip çalışmaları

A) Fikasyon

Bouin solüsyonu: 75 ml Pikrik asit (Fluka-Almanya)

25 ml Formaldehit (Merck-Almanya)

5 ml asetik asit (Akkimya-Türkiye)

B) Dehidratasyon

<u>Alkol derecesi</u>	<u>Süre</u>
%70 (Merck-Almanya)	1 gece
%90 (Merck-Almanya)	1 saat
%96 (Merck-Almanya)	1 saat
%100 (Merck-Almanya)	1 saat
%100 (Merck-Almanya)	1 saat
%100 (Merck-Almanya)	1 saat

C) Şeffaflaştırma

Toluol (Merck-Almanya)	1/4 saat
Toluol (Merck-Almanya)	1/4 saat
Toluol (Merck-Almanya)	1/4 saat

D) İnküzyon

Yumusak parafin (Merck-Almanya) (60 °C etüvde)	2-3 saat
Sert parafin (Merck-Almanya) (60 °C etüvde)	4 saat
Sert parafin (Gömme)	

Hazırlanan parafin bloklardan, Leica RM-2245 silindirli mikrotom kullanılarak 5 mikron (μ) kalınlığında kesitler alındı. Kesitler, ovaryum dokusunun genel özelliklerini ortaya koyabilmek için Hematoksilen+Eozin (H+E), bağ doku yapılarını ayırt edebilmek için Masson Trichrome ve ovaryumun hasarlanmış foliküler yapılarını daha ayrıntılı gözleyebilmek amacıyla da Periyodik asit shiff + Hemalen (PAS+HL) ile boyandı. İnceleme ve bulguların fotoğraflandırılmasında, Olympus BX51 marka ışık mikroskobu ve Olympus DP20 dijital kamera kullanıldı.

İstatistiksel Değerlendirme

Morfometrik ölçümlerden elde edilen veriler, gruplar arasında ağırlık, ovulasyon oranı, radyasyon öncesi ve sonrası östrus siklusu süreleri, ovaryum ağırlıkları ve hacim bakımından anlamlı fark olup olmadığının değerlendirilmesi için Kruskal Wallis testi kullanıldı. Kruskal Wallis testinde gruplar arasında farklılık çıkması durumunda bu farklılığın hangi grup ya da gruplardan kaynaklandığını belirlemek amacıyla Dunn's çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Radyasyon sonrası östrus siklusu uzunluğu bakımından fark olup olmadığını araştırmak için Mann Whitney U testi kullanıldı. Gruplar içinde deneye başlamadan önceki ağırlık ile deney sonundaki ağırlık ve radyasyon öncesi östrus siklusu uzunluğu ile radyasyon sonrası östrus siklusu uzunluğundaki değişim, Wilcoxon T testi ile incelendi. Tanımlayıcı istatistikler, medyan (%25-%75 persantil) biçiminde verildi.

BULGULAR

MORFOMETRİK BULGULAR

Tüm gruplara ait ovulasyon oranı ve ovaryum ağırlığı (mg)/ 100 g vücut ağırlığı bulguları Tablo 3.'te gösterildi.

Radyasyon uygulamasını takip eden birinci (Radyasyon I grubu) ve ikinci (Radyasyon II grubu) östrus fazlarında oositlerin toplandığı gruplara ait ovulasyon oranlarında, kontrol ve sham gruplarına göre azalma tespit edildi. Bu azalma radyasyon I grubunda $p<0.01$ oranında anlamlılık taşımakta iken, radyasyon II grubunda anlamlı fark gözlenmedi ($p>0.05$).

Ovaryum indüksiyonu sonucunda, süperovulasyon grubu ile radyasyon+süperovulasyon I ve II gruplarına ait ovulasyon oranları kıyaslandı. Radyasyonun ardından, ovaryumun ekzojen hormonlara verdiği yanıt radyasyon+süperovulasyon I grubunda oldukça azalmıştı. Bu gruba ait ovulasyon oranı ile süperovulasyon grubu arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi ($p<0.01$). Radyasyon+süperovulasyon I ve II grupları kendi aralarında kıyaslandığında, ovulasyon oranlarının farklılık taşıdığı, ancak istatistiksel olarak bu farklılığın anlamlı olmadığı tespit edildi ($p>0.05$).

Deney süresince ağırlık takibi yapıldı ve gruplar arasında radyasyona bağlı olarak vücut ağırlıkları açısından fark gözlenmedi ($p>0.05$). Ancak ovaryum ağırlıkları bakımından, kontrol gruplarıyla radyasyon grupları kıyaslandığında, radyasyon etkisiyle hem birinci hem de ikinci siklusta elde edilen ovaryum ağırlıklarında azalma olduğu görüldü. Bu azalma istatistiksel olarak, $p<0.01$ oranında anlamlılık taşımakta idi.

Deney sonunda her deneye ait ovaryumların hacimleri hesaplanıp, radyasyon grupları ile kontrol gruplarına ait değerler kıyaslandı. Gruplar arasında ovaryum hacimleri bakımından istatistiksel fark gözlenmedi ($p>0.05$).

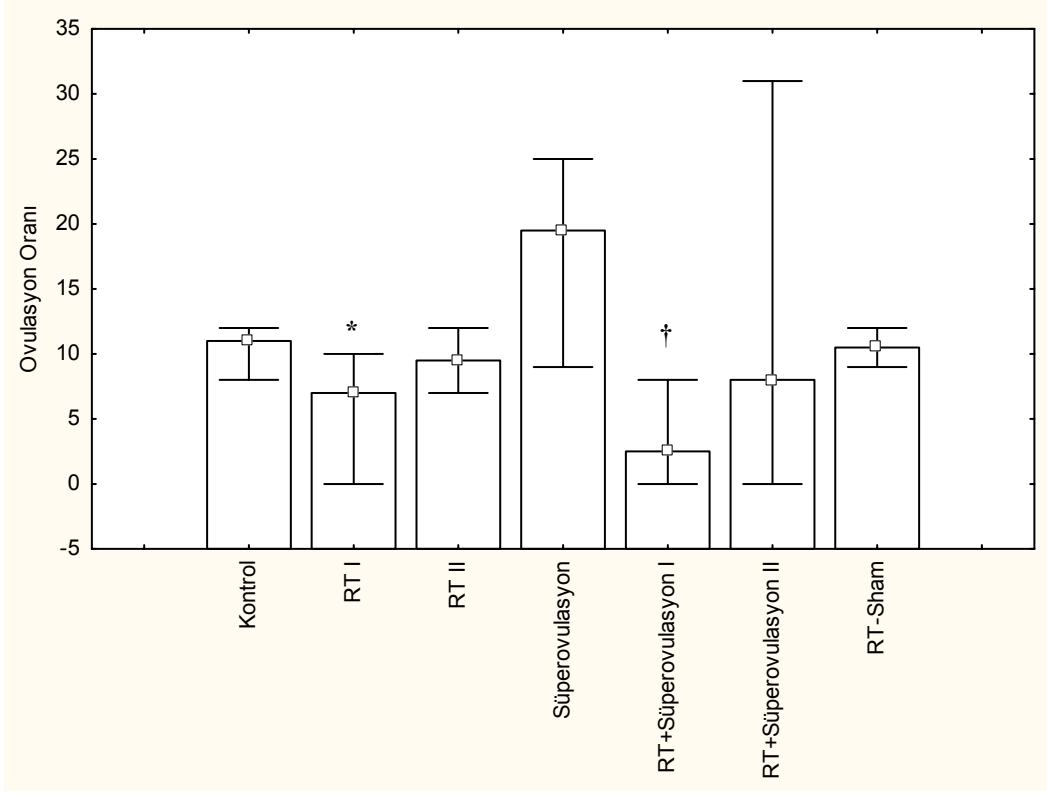
Tablo 3. Deney gruplarına ait ovulasyon oranı ve ovaryum ağırlığı (mg)/100 g vücut ağırlığı değerlerinin karşılaştırılması.

Gruplar	Ovulasyon Oranı	Ovaryum ağırlığı (mg)/100g vücut ağırlığı
Kontrol (n=6)	11 (9.5-12)	18.4 (16.9-23.7)
Radyasyon (RT)-Sham (n=6)	10.5 (9.75-12)	17.33 (16.0-19.9)
RT I (n=8)	7 (0-9)*	15.7(13.7-15.9) *
RT II (n=8)	9.5 (7.75-10.5)	15.1 (12.8-16.8) *
SÜPEROV (n=6)	19.5 (16.5-24)	36.5 (29.1-39.9)
RT+SÜPEROV I (n=8)	2.5 (0-7.25) †	28.6(27.1-32.1)
RT+SÜPEROV II (n=8)	8 (2.25-28)	30.6 (24.0-38.1)

RT:Radyasyon

$p<0,01$ *Kontrol ve RT-Sham gruplarıyla kıyaslandığında,

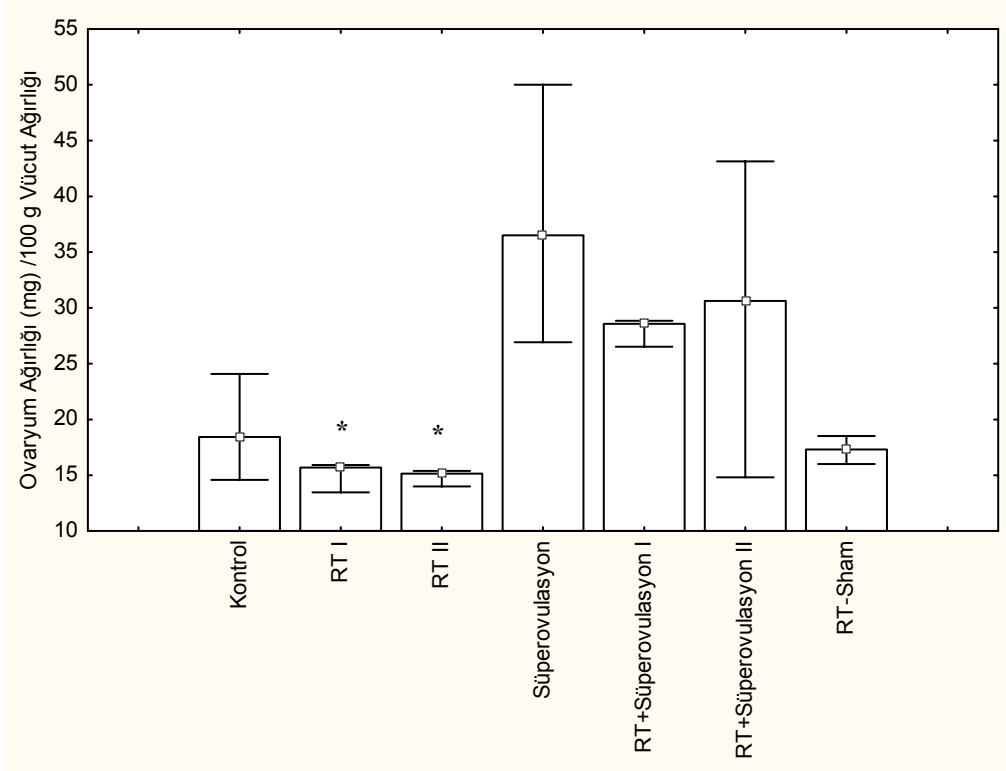
$p<0,01$ † Süperovulasyon grubuyla kıyaslandığında



Şekil 6. Deney gruplarına ait ovulasyon oranlarının dağılımı.

RT:Radyasyon

p<0,01 *Kontrol ve RT-Sham gruplarıyla kıyaslandığında,
p<0,01 † Süperovulasyon grubuyla kıyaslandığında



Şekil 7. Deney gruplarına ait ovaryum ağırlığı (mg) / 100 g vücut ağırlığı değerlerinin dağılımı.

RT:Radyasyon

p<0,01 *Kontrol ve RT-Sham gruplarıyla kıyaslandığında.

Semikantitatif Değerlendirme Bulguları

Tüm gruplara ait ovaryum kesitleri ışık mikrosbu ile incelendi. Sağlıklı ve atretik foliküllerin dağılımı Tablo 4'te gösterildi. Radyasyon uygulanmayan gruplarda sağlıklı primordiyal, preantral ve antral foliküllerin yoğunluğu, atretik foliküllerden fazla oranda gözlemlendi. Sağlıklı primordiyal ve preantral foliküller ovaryumda en çok bulunan folikül grubuydu. Radyasyon alan gruplarda ise, atretik foliküllerin oranı sağlıklı foliküllerden daha fazla idi. Radyasyon almış gruplarda, sağlıklı foliküller daha çok preantral folikül aşamasında idi. Antral foliküllerin az yoğunlukta olduğu gözlenirken, primordiyal foliküllere nadiren rastlanmakta idi.

Radyasyon uygulanmış spontan ovulasyon grupları ile radyasyon+süperovulasyon gruplarında, ovulasyon sonrası folikül yoğunluğunun dağılımı açısından benzerlik olduğu gözlemlendi. Kontrol gruplarıyla sadece süperovulasyon uygulanan grup arasında da benzer dağılım söz konusu idi.

Tablo 4. Gruplara ait sağlıklı ve atretik folikül yoğunluğunun semi-kantitatif değerlendirme sonuçları

Gruplar	Primordial folikül	Preantral folikül	Antral folikül	Atretik folikül
Kontrol	++++	++++	++++	++
RT-Sham	++++	++++	++++	++
RT I	+	+++	++	++++
RT II	+	++	+++	++++
Süperovulasyon	+++	+++	+++	++
RT + Süperov I	+	+++	++	++++
RT + Süperov II	+	++	++	+++

RT: Radyasyon. + = nadir, ++ = az, +++ : orta, ++++ : fazla

MORFOLOJİK BULGULAR

Radyasyona bağılı olarak gruplar arasında vajinal smear bulguları yönünden farklılık tespit edilmediği için, östrus siklusu fazlarına ait sonuçlar bir arada verilmiştir. Stereo mikroskopik ve ışık mikroskopik bulgular açısından ise kontrol ve sham grupları arasında fark gözlenmediğinden, bu iki gruba ait deney sonuçları birlikte sunulmuştur.

Vajinal Smear Bulguları

Deneye alınmadan önce yaklaşık üç siklus boyunca vajinal smear alınarak östrus siklusu takibi yapılan deneklerde proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus fazları düzenli olarak gözlemlendi.

Proöstrus fazına ait smear örneğinde kümeler oluşturmuş nükleuslu epitel hücreleri bulunmakta idi (Resim 2). Proöstrus fazının ilerleyen döneminde ise kornifiye hücrelerle birlikte salgı yapma özelliğine sahip, apikal yerleşimli nükleus içeren musinöz hücrelere rastlanmakta idi (Resim 2,3).

Hücre popülasyonunun %90'ını nükleussuz kornifiye hücrelerin oluşturduğu smeari veren denekler östrus fazında kabul edildi (Resim 4). Aynı deneklerden akşam saat 20:00 civarında tekrar smear alındığında, östrus fazından metöstrus fazına geçiş döneminde, kornifiye hücrelerin hacimlerinin arttığı ve büyük kümeler oluşturduğu gözlemlendi (Resim 5). Bu smearin elde edilmesi ovulasyonun belirteci kabul edilip bu dönemde denekler kurban edildi.

Metöstrus fazının erken aşamasında yığınlar oluşturan kornifiye hücrelerin arasında nötrofillerin yer aldığı dikkati çekmekte idi (Resim 6). Fazın ilerleyen dönemlerinde ise, sıkıca paketlenmiş çok sayıda nükleuslu epitel hücresi smearde gözlenirken, bu hücrelerin bir kısmında sitoplazmik vakuoller yer almaktaydı. Ayrıca smearde epitel hücreleri arasında oldukça artmış sayıdaki nötrofiller de gözlenmekteydi (Resim 7,8).

Diöstrus fazının erken aşamasında nötrofil sayısı daha da artarken nükleuslu epitel hücreleri azalmaktaydı. Fazın ileri aşamasında ise, vajina epiteli 1-2 tabakadan oluştuğundan, smearde de az sayıda küçük çaplı nükleuslu epitel hücresiyle birlikte, kornifiye hücreler ve nötrofiller gözlenebilmekteydi (Resim 9,10).

Radyasyon uygulama zamanları belirlenirken, hücre yoğunluğunun oldukça az olup, farklı büyüklükteki nükleuslu epitel hücreleri, bir kaç nötrofil ve az sayıda küçük kornifiye hücrelerin bulunduğu smear diöstrus fazından proöstrus fazına geçiş olarak kabul edildi.

(Resim 11). Radyasyon uygulaması sonucunda, ışınlamayı takip eden birinci ve ikinci siklularda, fazlara ait hücre populasyonunda ve morfolojik görünümünde radyasyon öncesi ve sonrasında bir farklılık gözlenmedi.

Deney süresince alınan vajinal smearler yardımıyla östrus siklusu süreleri de tespit edildi. Kontrol, radyasyon+sham, radyasyon I ve radyasyon+süperovulasyon I gruplarında ortalama siklus süresi 4-5 gün olarak belirlendi. Radyasyon öncesi ve sonrasında östrus siklus süresi değişiminin olup olmadığı, ışınlamadan sonra ikinci siklusa kadar takip edilen (n=16) hayvanlara ait smearlerin değerlendirilmesiyle elde edildi. Sekiz hayvanda, östrus siklusu süresinde $p<0,05$ oranında uzama meydana geldiği tespit edildi. Sonuç Tablo 5.'te gösterildi. Siklustaki bu uzamanın nedeni kornifiye hücrelerden oluşan östrus fazının 2 gün ya da daha fazla gözlenmesinden kaynaklanıyordu.

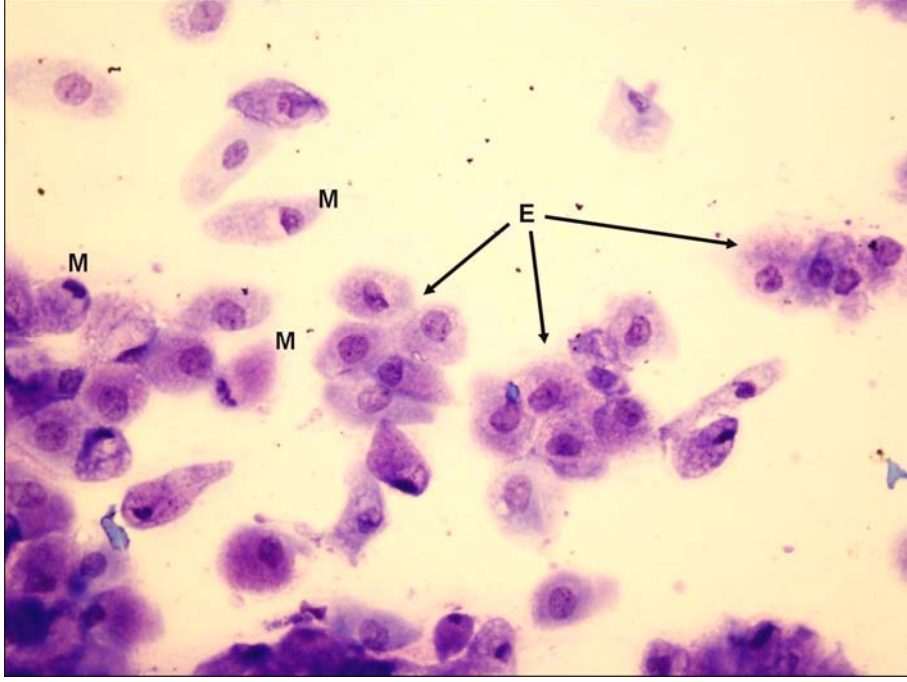
Tablo 5: Radyasyon öncesi ve sonrasında östrus siklusu sürelerinin karşılaştırılması

	RT öncesi siklus süresi	RT sonrası siklus süresi
n=8	4 (4-5)	5.5 (4.75-6.5)*

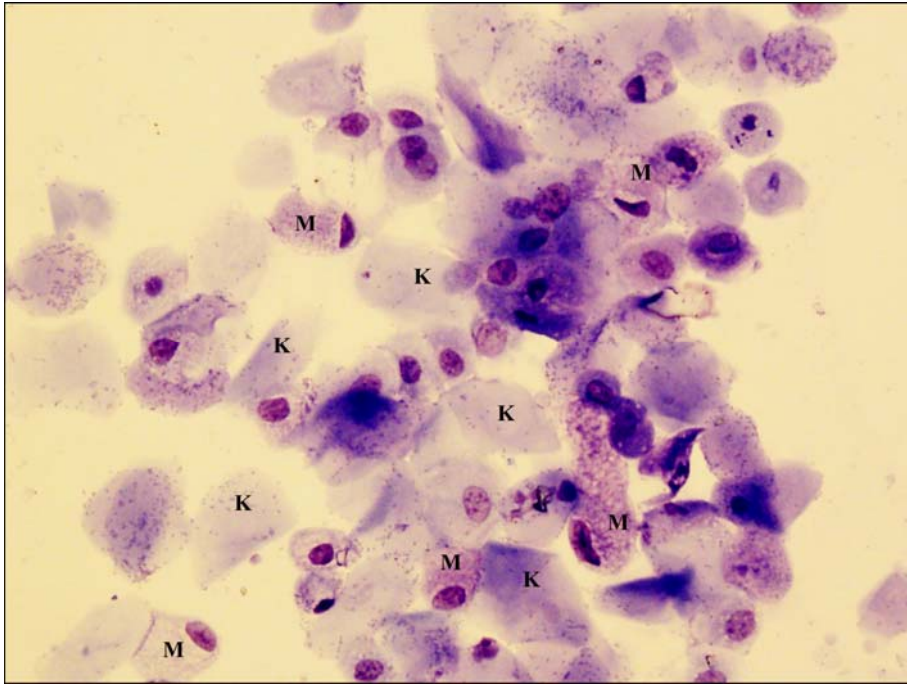
RT: Radyasyon

* $P<0.05$, RT öncesi östrus siklusu süresi ile kıyaslandığında

Proöstrus Fazına Ait Smear Fotoğrafları

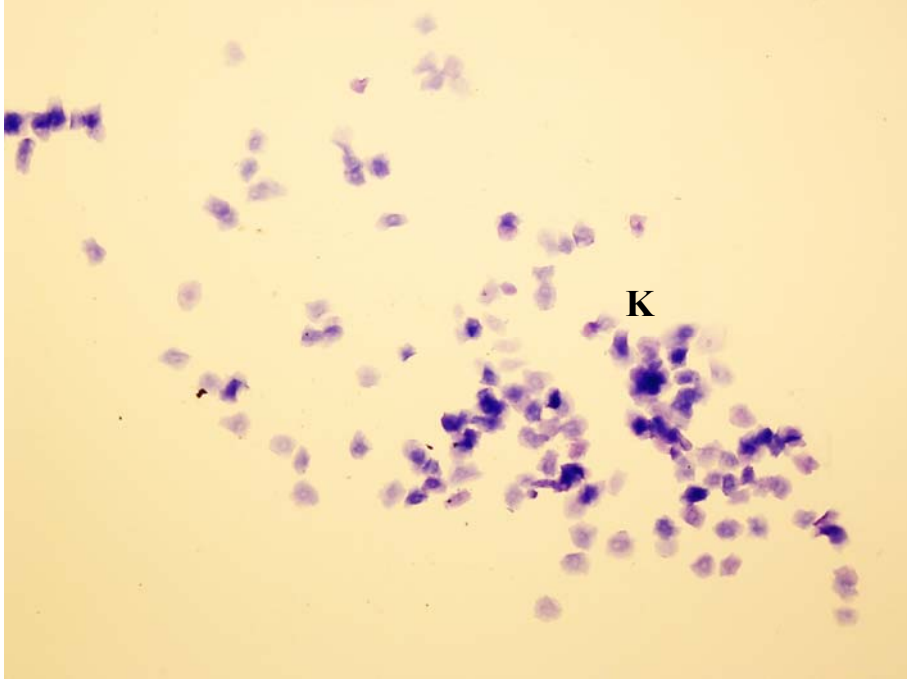


Resim 2. Proöstrus aşamasındaki smearde kümeler oluşturmuş çok sayıda nükleuslu epitel hücresiyle (E) birlikte, salgı hücresi özelliğine sahip musinöz (M) hücelere de rastlanmaktadır. Toluidin mavisi. X 400.

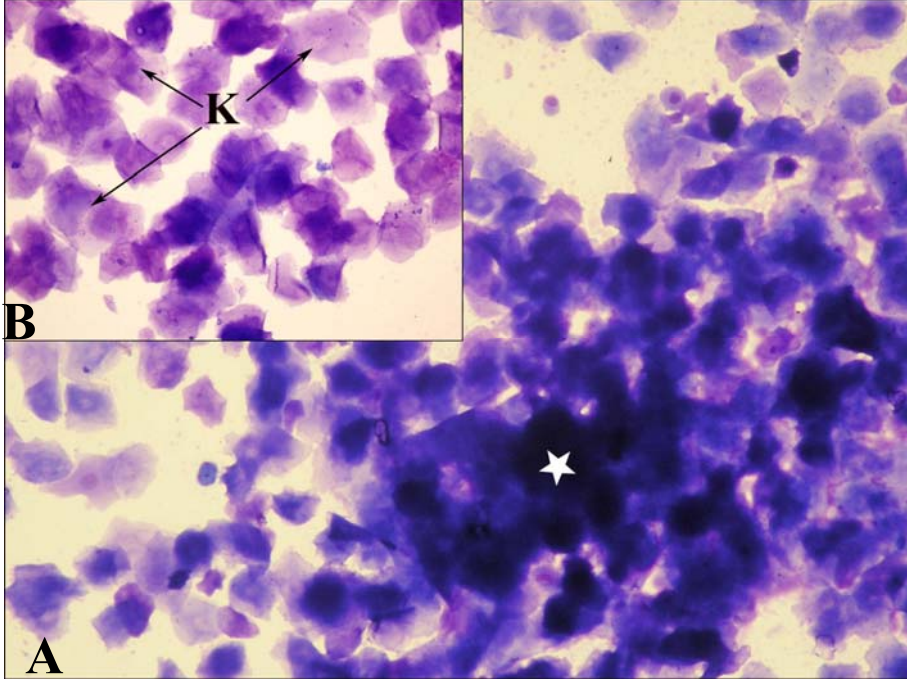


Resim 3. Proöstrus fazının ileri aşamalarına ait smearde kornifiye hücrelerin (K) ve musinöz hücrelerin (M) arttığı gözlenmektedir. Toluidin mavisi. X 400

Östrus Fazına Ait Smear Fotoğrafları

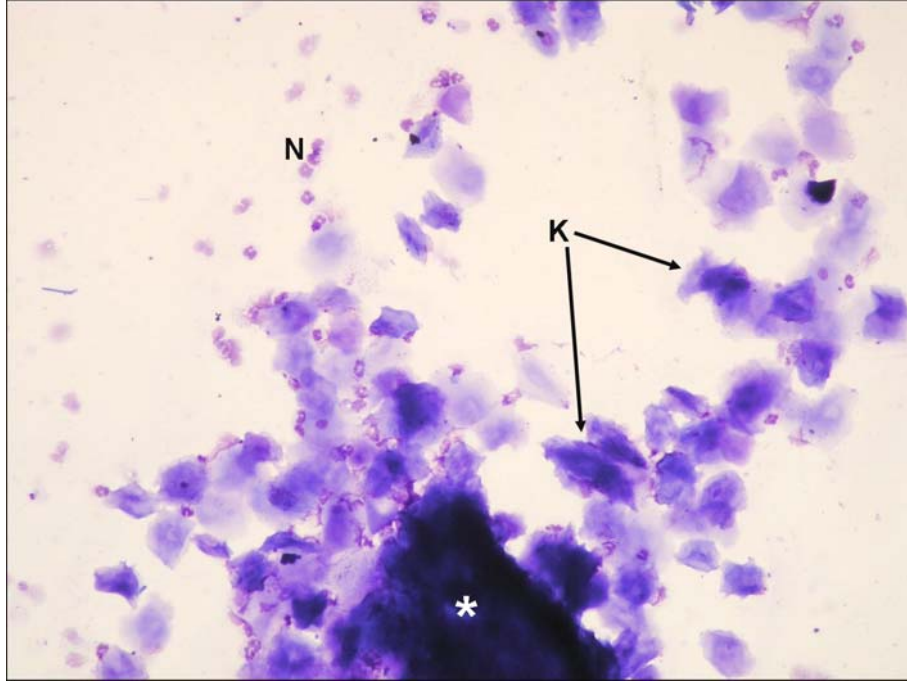


Resim 4. Östrus fazına ait smear örneğinde kornifiye hücrelerin (K) genellikle dağınık yerleştiği gözlenmektedir. Toluidin mavisi. X 100.

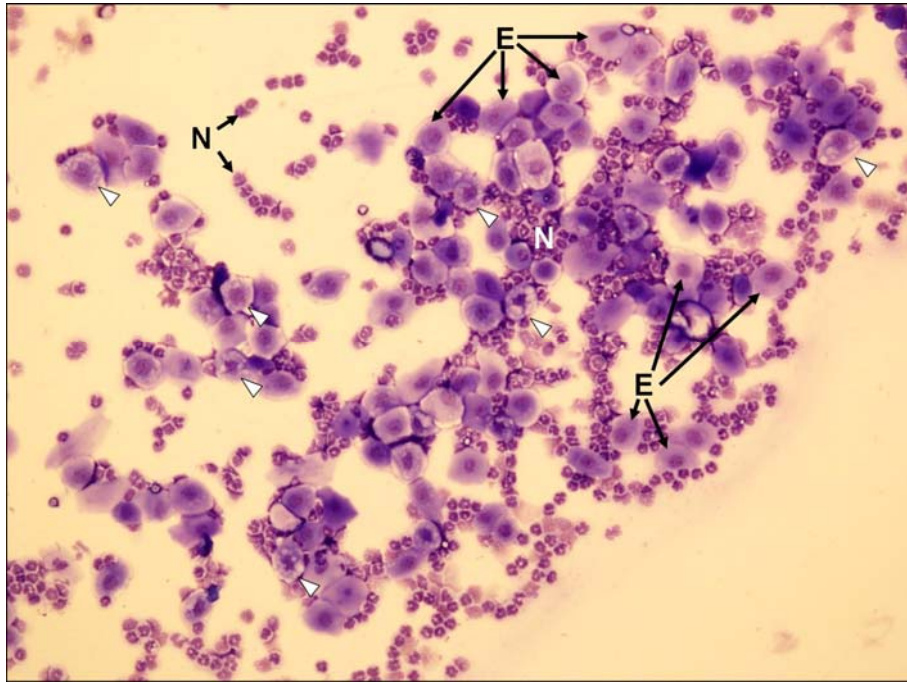


Resim 5. Spontan ovulasyon dönemindeki smear örneklerinde kornifiye hücrelerin yığınlar (*) oluşturduğu gözlenmektedir (A, X 200). Bu dönemdeki kornifiye hücreler (K) oldukça genişlemiş bir görünüm sergilemektedirler. (B, X 400). Toluidin mavisi.

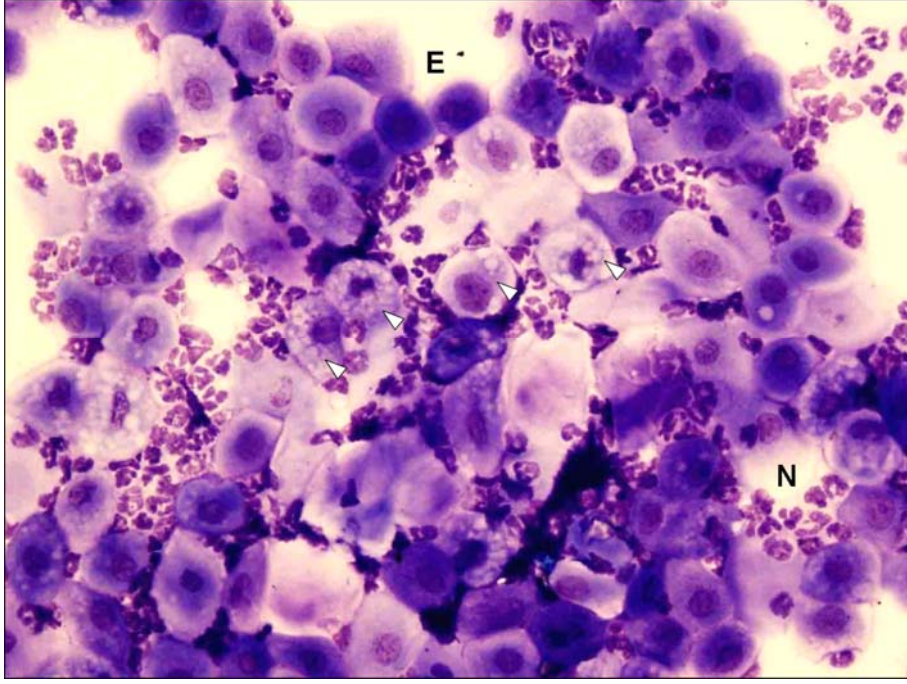
Metöstrus Fazına Ait Smear Fotoğrafları



Resim 6. Erken metöstrus döneminde kümeler (*) oluşturmuş kornifiye hücreler (K) arasında nötrofillerin (N) varlığı gözlenmektedir. Toluidin mavisi. X 200.

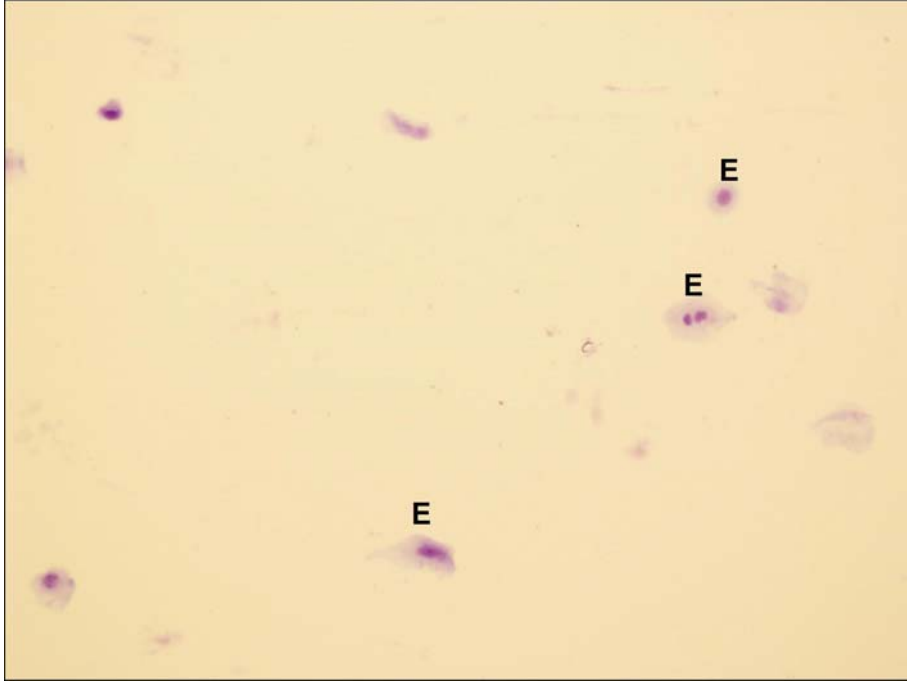


Resim 7. Fazın ilerleyen aşamalarında, nükleuslu epitel hücreleri (E) ve nötrofillerin (N) sayısının arttığı gözlenmiştir. Ayrıca, çok sayıda sitoplazmik vakuol içeren nükleuslu epitel hücrelerine de (►) sıklıkla rastlanmaktadır. Toluidin mavisi. X 200.

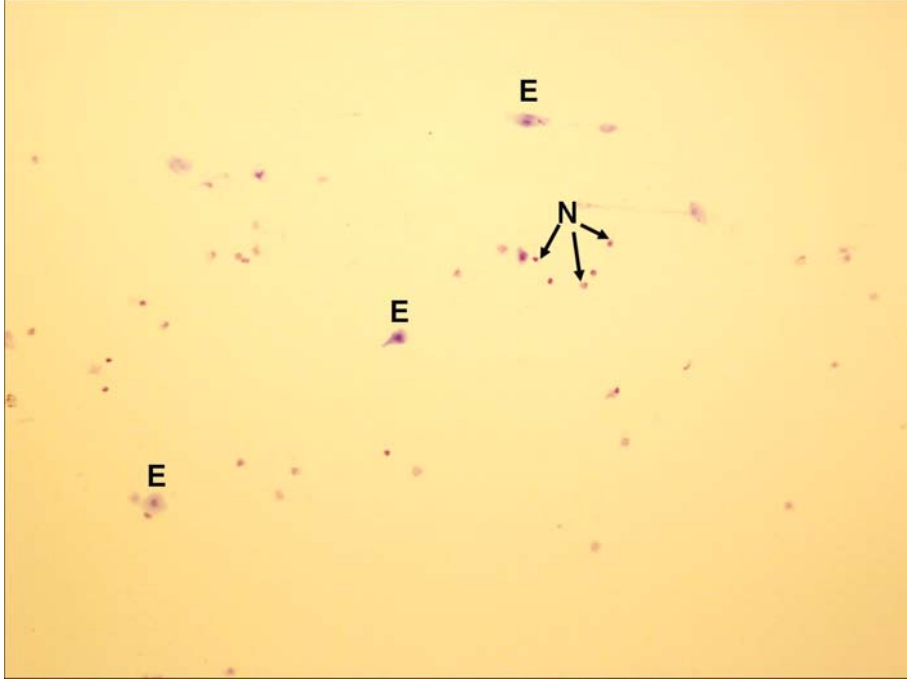


Resim 8. Metöstrus fazının ilerleyen aşamalarında sayıca artan vakuollü nükleuslu epitel hücreleri (►) gözlenmektedir. E: Nükleuslu epitel hücresi, N: Nötrofil. Toluidin mavisi. X 400.

Döstrus Fazına Ait Smear Fotoğrafları

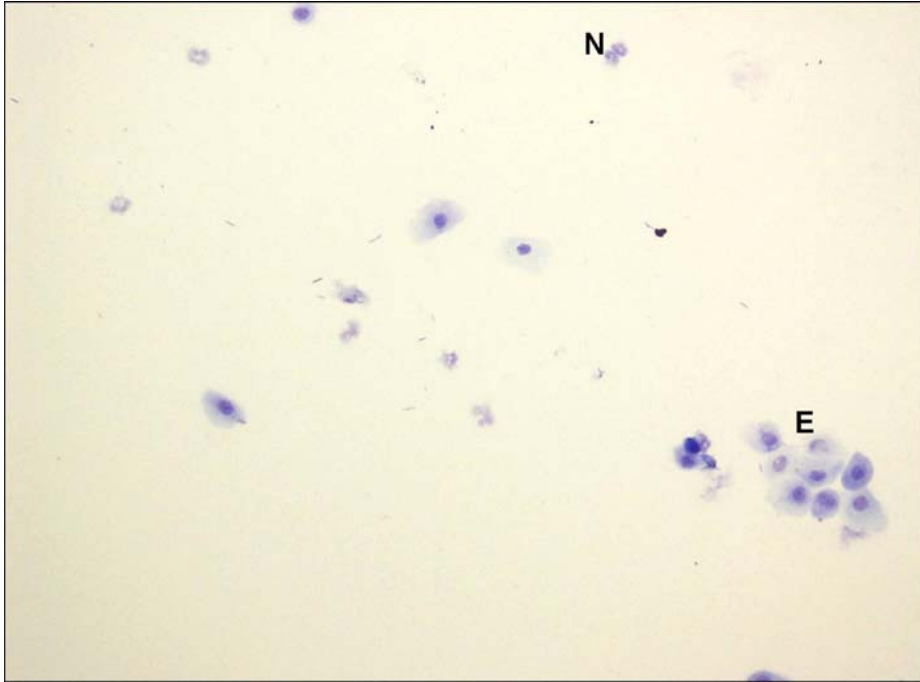


Resim 9. Vajinal epitel kalınlığının en az olduğu bu fazda, smear örneklerinde de az sayıda epitel hücresi gözlenmektedir. Toluidin mavisi. X 400.



Resim 10. Diöstrus fazının erken dönemlerinde nükleuslu küçük epitel hücrelerinin (E) yanı sıra az sayıda nötrofillerin (N) varlığı da dikkati çekmektedir. Toluidin mavisi. X 100.

Diöstrus-Proöstrus Geçiş Fazına Ait Smear Fotoğrafi



Resim 11. Küçük çaplı nükleuslu epitel hücreleri (E) ile birlikte dağınık olarak yerleşmiş az sayıda nötrofil (N) diöstrus fazından proöstrus fazına geçiş döneminde smear örneklerinde gözlenmektedir. X 400. Toluidin mavisi.

Stereo Mikroskopik Bulgular

Spontan ovulasyon bulguları:

Ovulasyonun ardından kontrol grubu ve sham gruplarına ait tüm deneklerin ovaryum-tuba uterina komplekslerinde kanlanma artışı gözlemlendi (Resim 12,13). Ovaryum yüzeyi, KL'lar ve gelişmiş folikül yapıları nedeniyle kabartılı görünüm sergilemekteydi (Resim 12). Bu dönemdeki tuba uterinaların ampulla bölgeleri, şeffaf ve şişkin bir şekilde ayırt edilmekteydi (Resim 13). Elde edilen oositlerin büyük çoğunluğu ise MII ve MI fazında idi (Resim 14). Oositlerin etrafında ZP'lar bulunmakta olup, M II aşamasında; oosit ile ZP arasındaki perivitellin aralıkta polar cisimciğin izlenmekteydi.

Radyasyon I grubu deneklerin bir kısmından oosit elde edilemedi. Bu deneklere ait ovaryumlarda kontrol gruplarına oranla ovaryum yüzeylerinin daha düz olduğu ve vaskülarizasyon artışının oluşmadığı gözlemlenmekteydi (Resim 15,16). Bu gruba ait geri kalan deneklerde ise ovulasyonun gerçekleştiği ve ampulla bölgelerinin şişkin bir şekilde ayırt edilebildiği izlendi (Resim 17). Bu grupta oositler genellikle MI (GVBD=germinal vezikül membranının yıkılması) aşamasında elde edilirken (Resim 18), bazı deneklerde perivitellin aralıkta çentikli yapıya sahip polar cisimcik gözlemlendi (Resim 19).

Radyasyon II grubuna ait tüm deneklerde ovulasyon gözlemlendi. Ovaryum yüzeyleri kabartılı görünümde olup (Resim 20), az sayıda hemorajik korpus luteum kırmızı noktalar şeklinde izlenmekte idi. Ampulla bölgeleri ise şeffaf ve şişkin bir şekilde ayırt edilebilmekte idi (Resim 21). Oositler genellikle MI aşamasında olup, M-II aşamasındaki oosit sayısı GV aşamasındaki oositlerden daha fazla idi. Oositlerin etrafında az sayıda kümülüs hücreleri yer almaktaydı. Oosit-ZP arasındaki perivitellin boşluk tüm gruplarda normal görünümde olup, M II oositlerde 1. polar cisimciği içermekteydi (Resim 22,23). Bu gruba ait deneklerin bazılarında, olgun oositlerin yanında küçük hacimli ve anormal morfolojiye sahip oositlere de rastlanmakta idi (Resim 22).

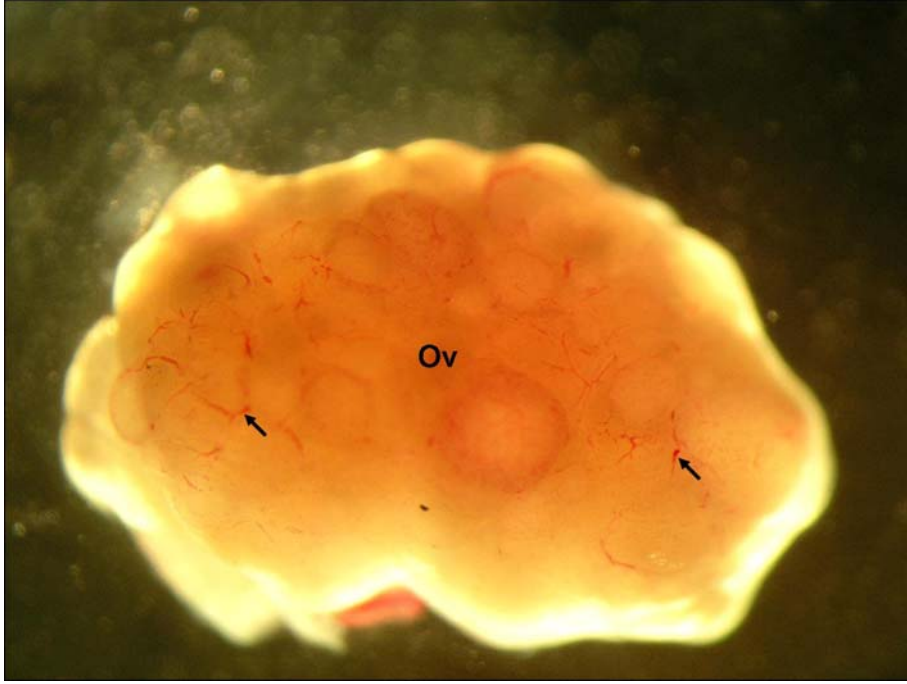
Süperovulasyon grubu bulguları:

Hormonal indüksiyon uygulanan süperovulasyon grubunda, ovaryumların neredeyse tüm yüzeyinde gelişmiş folikül yapıları ya da KL'lar nedeniyle kabarıklıklar gözlemlenmekteydi (Resim 24,25). Hemorajik korpus luteumlar koyu renkli noktalar şeklinde ovaryum yüzeyinde yer almakta idi (Resim 24). Kanlanma tüm genital kanalda oldukça artmıştı (Resim 25,26). Ampulla bölgesi oldukça belirgin olup içerisinde oosit-kümülüs komplekslerini bulundurmakta idi (Resim 26).

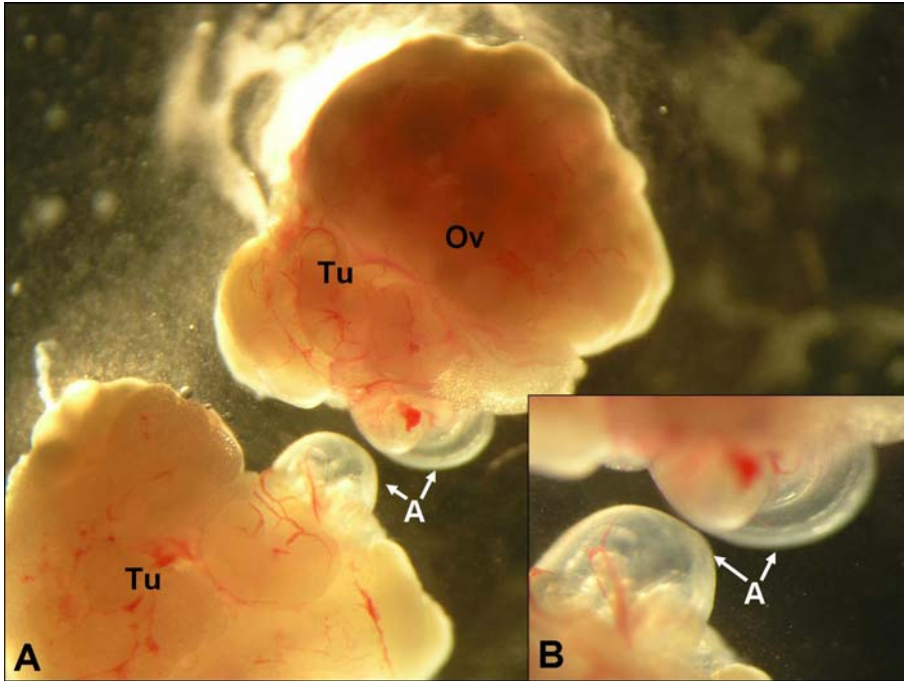
Spontan ovulasyondan farklı olarak oosit kümülüs kompleksleri mukus yoğunluğu nedeniyle daha sıkı paketlenmişti (Resim 27,28). Bu gruplarda oosit-kümülüs değerlendirmesi Wolff ve ark.'ın kriterlerine göre yapılarak, oosit olgunluğu değerlendirildi. Süperovulasyon ve radyasyon+süperovulasyon gruplarında, ovule olan oositlerin etrafında kumulus hücreleri çok sayıda olup, ışınsal olarak yerleşmekte idi. Korona hücreleri de oositin hemen yakınında bir-kaç tabaka şeklinde olup, ışınsal olarak yerleşmişti (Resim 27,28). Bu özelliklere sahip oositler, Wolff ve arkadaşlarının kriterlerine göre 3. dereceye (olgun) uygun bulundu.

Radyasyon+süperovulasyon I ve II gruplarında deneklerin büyük bir kısmından oosit elde edilemedi. Bu deneklere ait ovaryum yüzeyleri nispeten düz bir görünümde olup, ovaryum-tuba uterina komplekslerinde vaskülarizasyon artışı oluşmamıştı (Resim 29). Elde edilen oositler woff ve ark'nın oosit-kümülüs kompleksi kriterlerine göre değerlendirildi. Kümülüs hücrelerinin oositler etrafında ışınsal olarak yerleştiği tespit edildi (Resim 30,31).

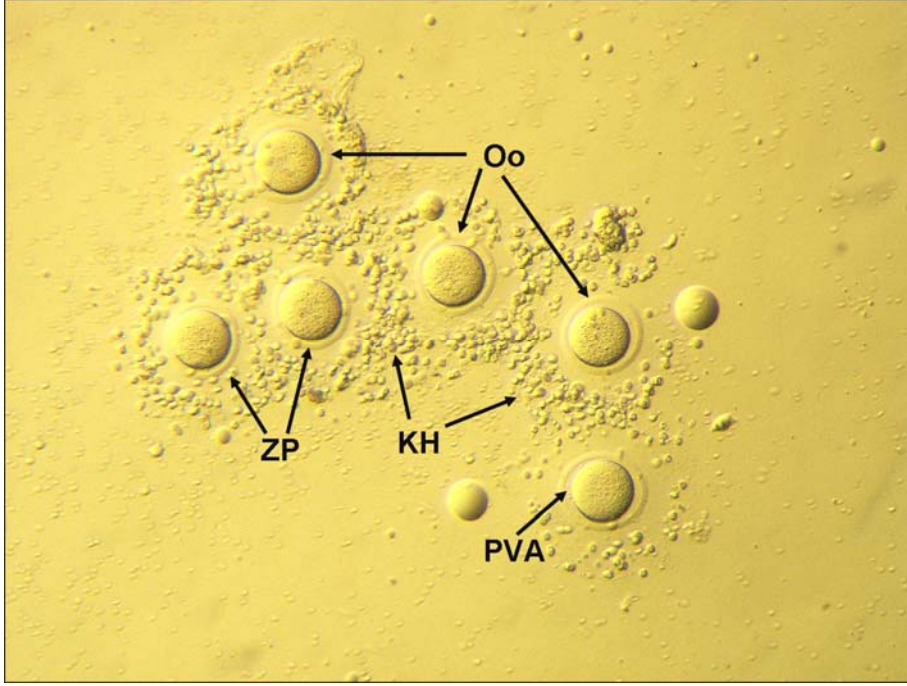
Kontrol ve Radyasyon-sham Gruplarına Ait Stereo Mikroskopik Fotoğraflar



Resim 12. Ovulasyonun ardından ovaryum (Ov) yüzeyinde kanlanmanın arttığı (—>) gözlenmektedir. X8.



Resim 13. Ovulasyonun ardından tuba uterinanın (Tu) ve ovaryumun (Ov) vaskülarizasyonunda artış (A, X6.4) dikkati çekmekte iken, oositlerin yer aldığı ampulla (A) bölgesi şeffaf ve şişkin bir görünüm sergilemektedir (B, X10).

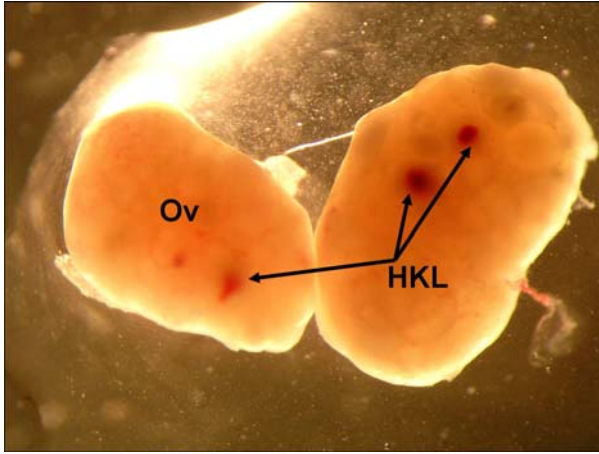


Resim 14. Ampulla bölgesinden elde edilen GVBD aşamasındaki oositlerde (Oo) morfolojik görünümlerin normal olduğu, oositlerin etrafını çevreleyen zona pellusida (ZP) ile oositler arasında kalan perivitellin aralığın (PVA) tüm oositlerde eşit olduğu ve oositlerin etrafında dağınık yerleşmiş kümülüs hücreleri (KH) gözlenmektedir. X 22.4

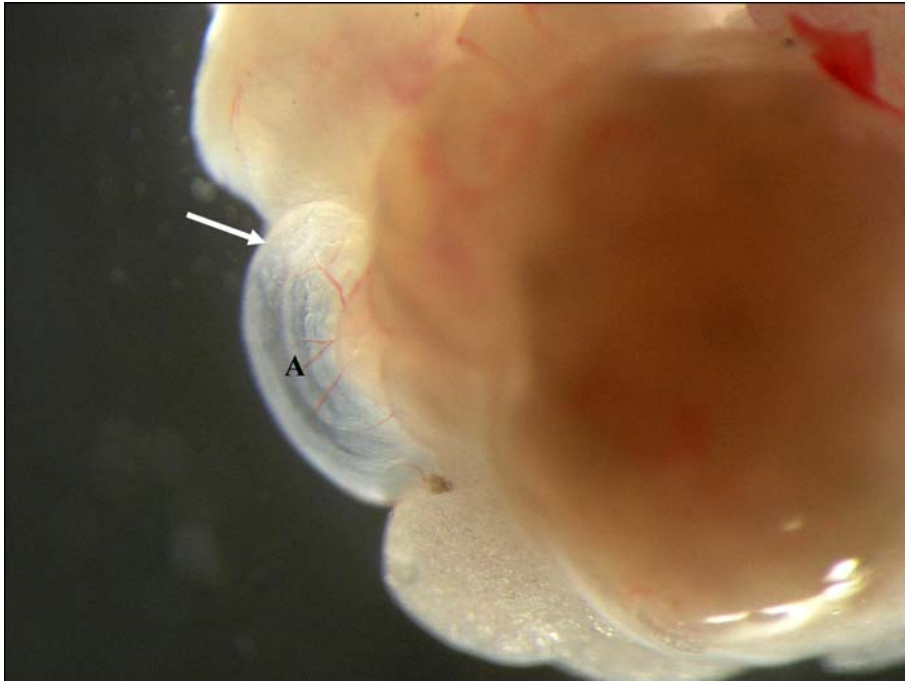
Radyasyon I Grubuna Ait Stereo Mikroskopik Fotoğraflar



Resim 15. Radyasyon uygulamasının ardından ilk ovulasyon döneminde sakrifiye edilen ancak oosit elde edilemeyen deneklere ait ovarumlarda (Ov) vaskülarizasyonda bir artış olmadığı gözlenmektedir. X 6.4



Resim 16. Az sayıda oosit toplanan ovaryum (Ov) yüzeyleri kontrol gruplarına oranla düz bir görünüm sergilemektedir. HKL: Hemorajik korpus luteum. X 8.



Resim 17. Ovulasyonun ardından ampulla (A) bölgesinde yer alan oosit-kümüülüs kompleksleri (→) gözlenmektedir. X 12.

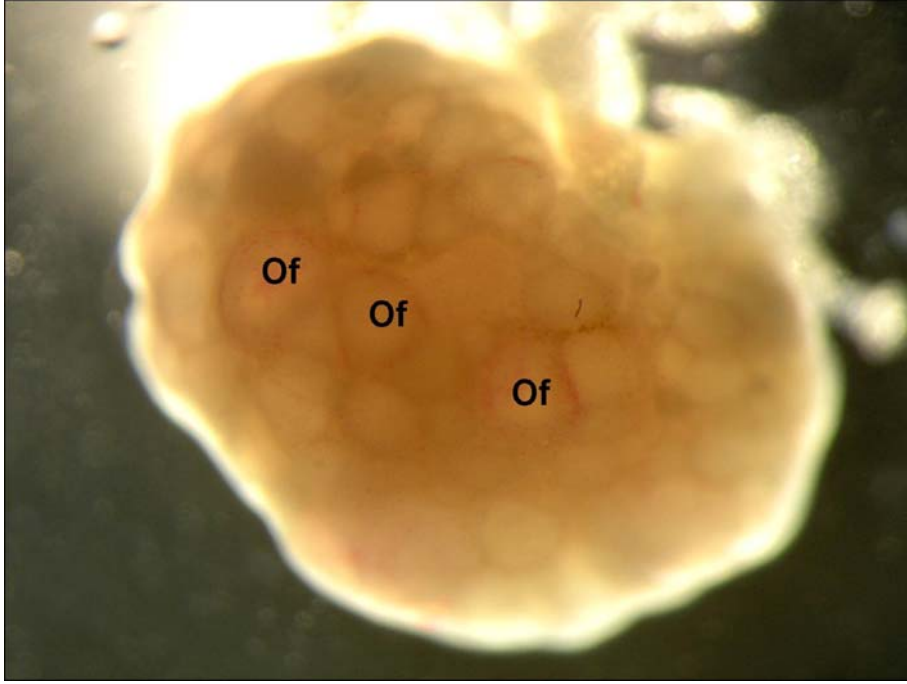


Resim 18. Radyasyon uygulamasını takip eden ilk ovulasyon döneminde GVBD aşamasındaki oositler (Oo) ve etraflarında yer alan kümülüs hücreleri (KH) gözlenmektedir. X 22.4

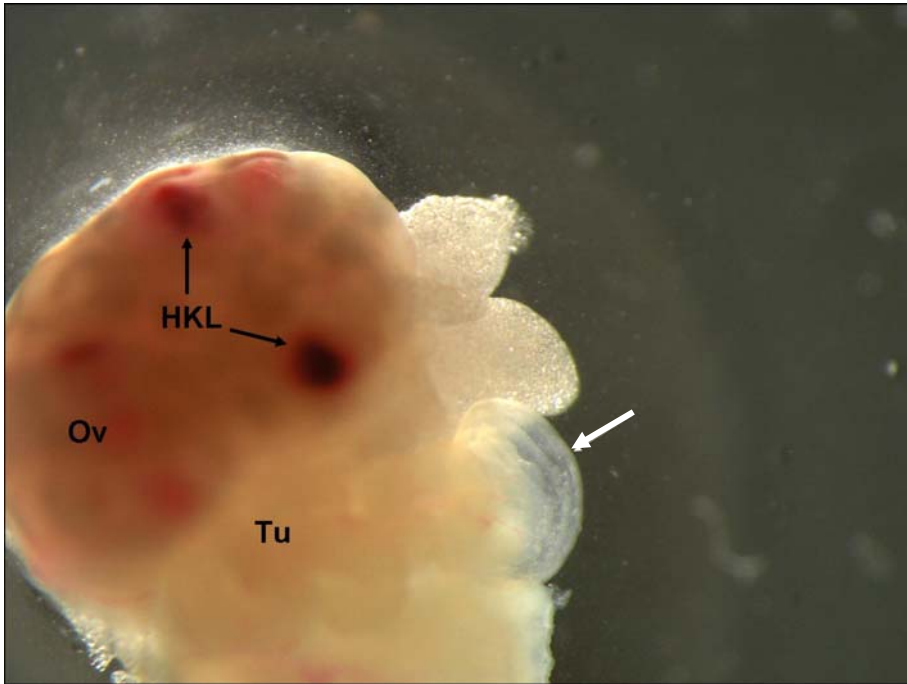


Resim 19. Bu gruba ait oositlerin bazıları M II fazında olmasına rağmen, polar cisimciklerin normal görünümde olmayıp, çentikli yapıya (→) sahip oldukları gözlenmektedir. X22.4

Radyasyon II Grubuna Ait Stereo Mikroskopik Fotoğraflar



Resim 20. Ovulasyonun ardından ovarium yüzeyinde çok sayıda geniş çaplı folikülün (Of) oluşturduğu kabartılar gözlenmektedir. X 10



Resim 21. Ovulasyonun ardından ovarium (Ov) yüzeyinde çok sayıda hemorajik korpus luteum (HKL) gözlenmekte iken, oositlerin toplandığı ampulla bölgesinin (→) belirgin hale geldiği gözlenmektedir. Tu: Tuba uterina. X 10

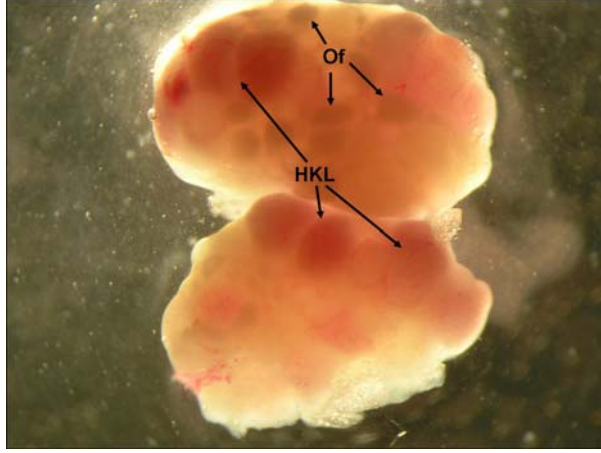


Resim 22. Radyasyonu takip eden ikinci ovulasyon döneminde, M II fazındaki normal görünümlü oositlerin (Oo) yanı sıra, zona pellusidası (ZP) belirgin olmayan ve normalden küçük boyuttaki oositler de (*) görülmektedir. —→ : Polar cisimcik. X 22.4

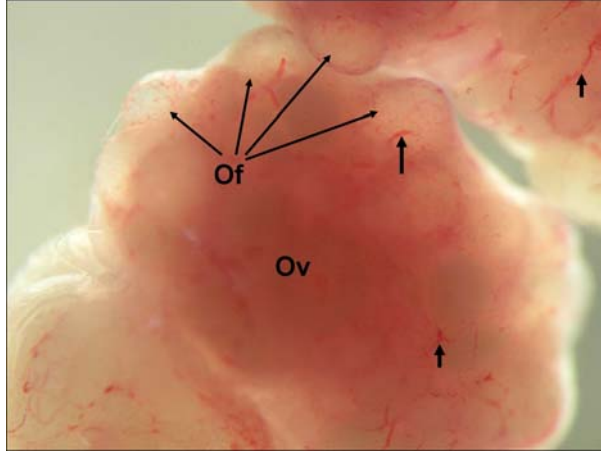


Resim 23. M II fazındaki normal görünümlü oositlerin perivitellin aralığına yerleşmiş normal görünümlü polar cisimcikler (—→) gözlenmektedir. X 22.4

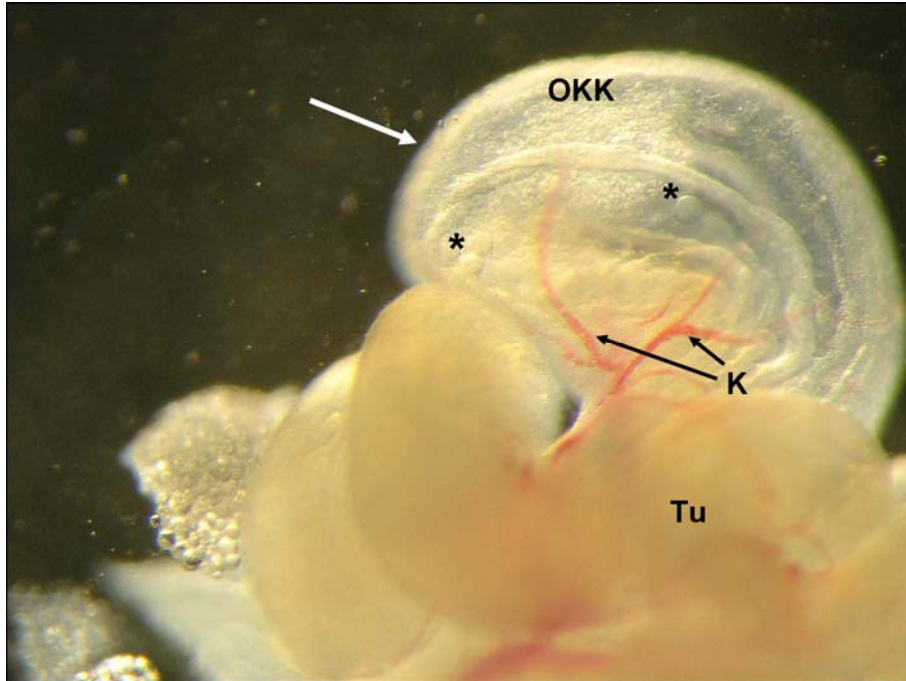
Süperovulasyon Grubuna Ait Stereo Mikroskopik Fotoğraflar



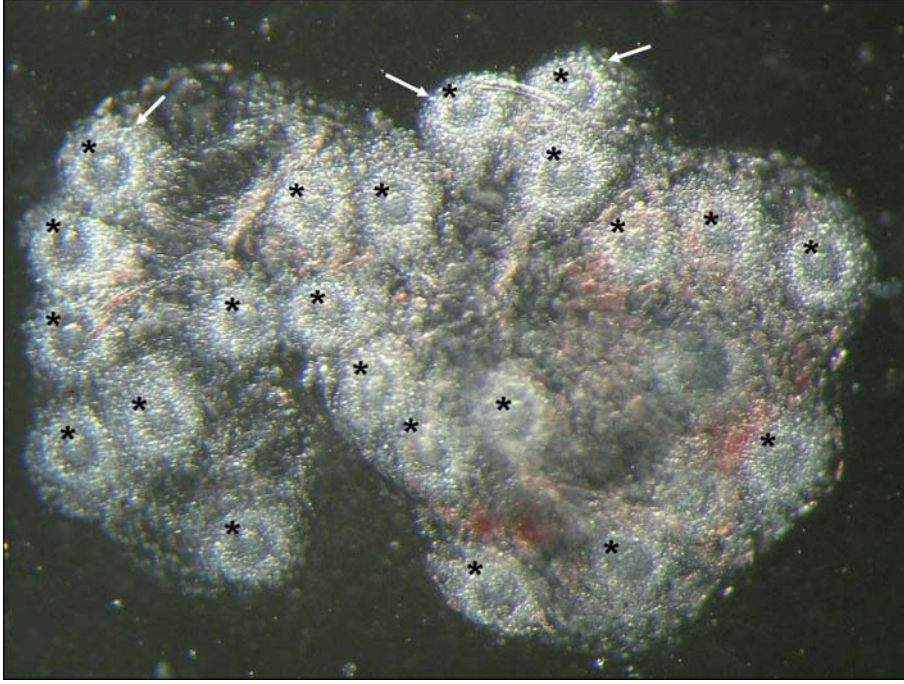
Resim 24. Ovulasyonun ardından bu gruba ait ovaryumlarda çok sayıda hemarajik korpus luteumlar (HKL) ile birlikte ovaryum yüzeyinde kabartı oluşturan foliküller (Of) gözlenmektedir. X 6.4



Resim 25. Ovaryum (Ov) yüzeyinde vaskülarizasyonun arttığı (→) ve çok sayıdaki geniş çaplı folikülün (Of) yüzeyde kabartılar oluşturduğu gözlenmektedir. X 12.



Resim 26. hCG uygulamasından yaklaşık 14 saat sonra sakrifiye edilen deneklerde belirgin hale gelen ampulla bölgesi (→) içerisindeki oosit-kümüllüs kompleksi (OKK) gözlenmektedir. *: Oosit, Tu : Tuba uterina, K : Kan damarı. X 16.

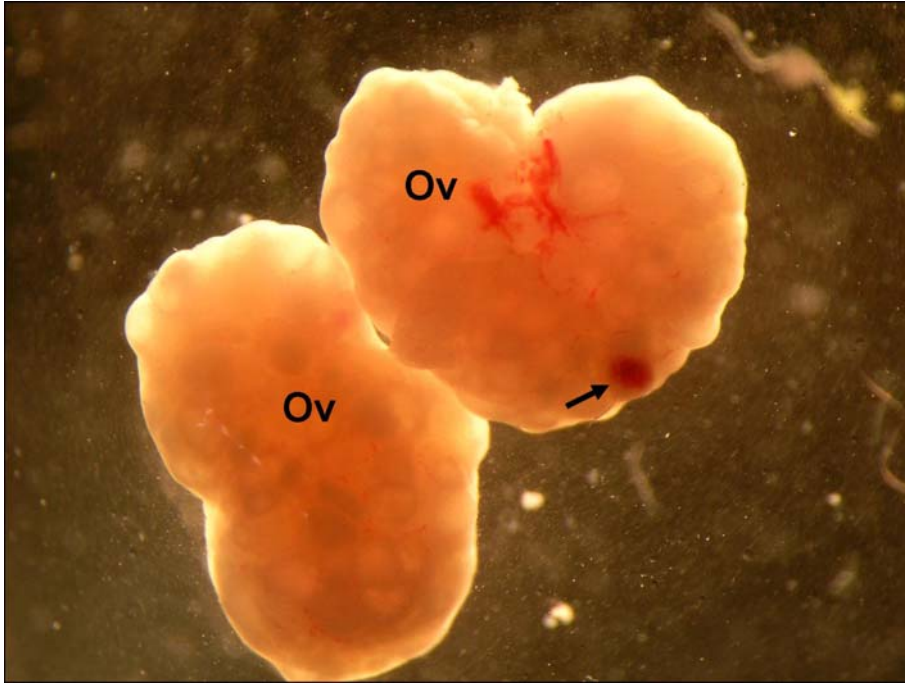


Resim 27. Ampulla bölgesinin patlatılmasıyla elde edilen oositler (*) ve etrafında ışımsal dağılmış kümülüs hücreleri (→) gözlenmektedir. X 20.

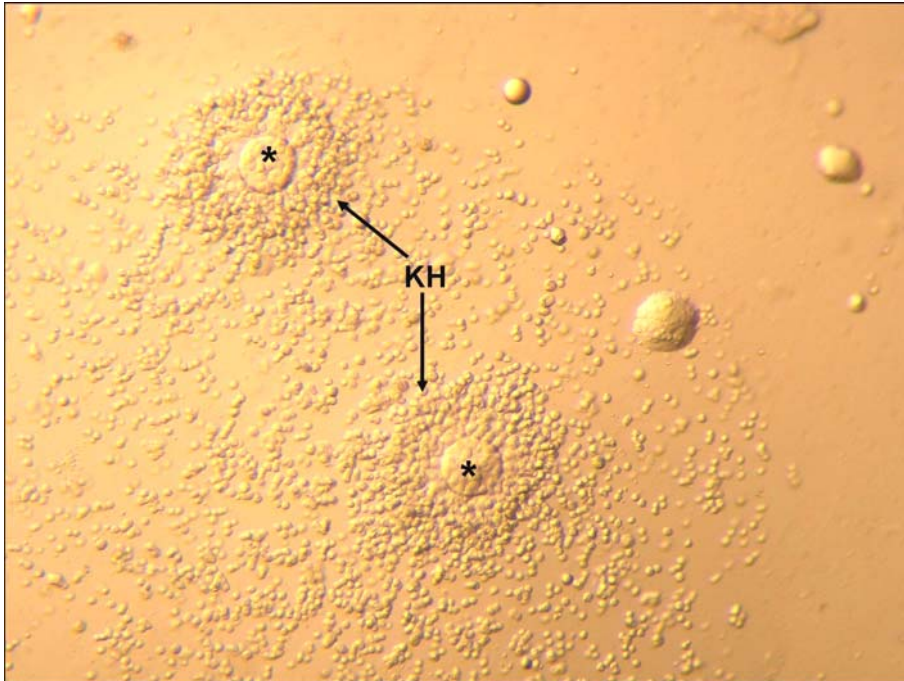


Resim 28. Merkezinde oositlerin (*) yerleştiği oosit-kümüllüs komplekslerinde, kümülüs hücrelerinin (→) ışımsal dağılması, bu oositlerin olgun seviyede olduklarını ifade etmektedir. X 22.4

Radyasyon + Süperovulasyon I Grubuna Ait Stereo Mikroskopik Fotoğraflar

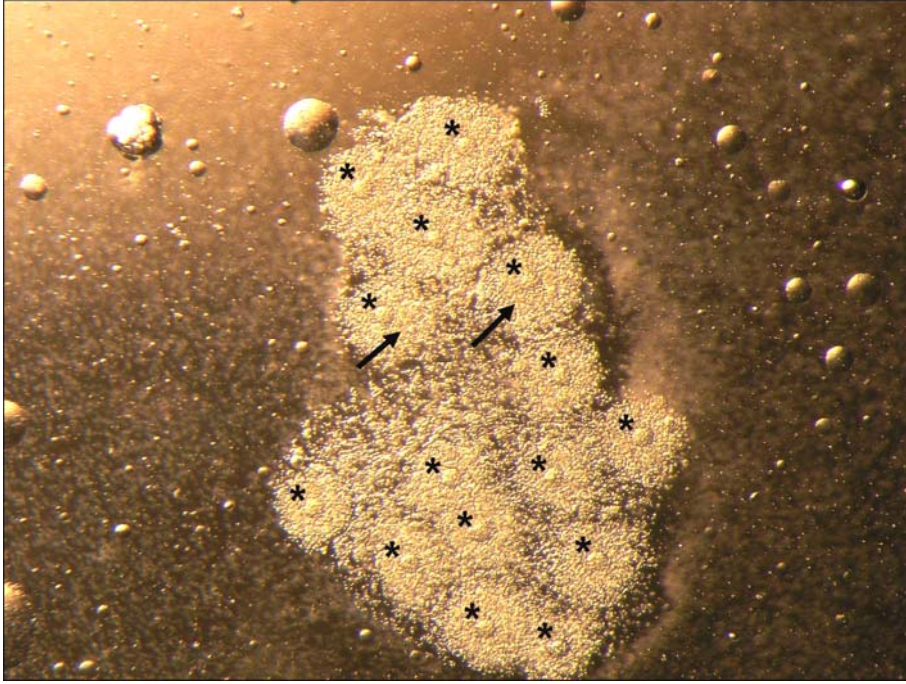


Resim 29. Radyasyon uygulamasını takip eden ilk östrus fazında süperovule edilen deneklere ait ovaryumlarda (Ov), vaskülarizasyon artışı gözlenmemekte ve ovaryum yüzeyleri süperovulasyon grubuna oranla daha düz bir görünüm sergilemektedir. → : Hemorajik korpus luteum. X 8.



Resim 30. Oositlerin (*) etrafında kümürlü hücrelerinin (KH) ışınal dağılımı oositlerin olgun seviyede olduğunu ifade etmektedir. X 22.4

Radyasyon + Süperovulasyon II Grubuna Ait Stereo Mikroskopik Fotoğraflar



Resim 31. Radyasyon uygulamasını takip eden ikinci östrus fazında süperovule edilen deneklerden elde edilen oositlerde (*), kümüls hücrelerinin (—>) ışınal olarak yerleştiği gözlenmektedir. X 20.

Ovaryum Dokularının Işık Mikroskopik Bulguları

Tüm gruplara ait ovaryum kesitlerinin ışık mikroskopik olarak incelenmesinde folikül sınıflaması aşağıda belirtilen özelliklere göre yapıldı.

Primordial folikül: ZP'sız oositler etrafında tek tabaka yassı, granüloza progenitör hücrelerine sahip folikül,

Primer folikül: Oositler etrafında tek tabaka kübik granüloza hücreleri gözlenen folikül,

Preantral folikül: Oositler etrafında 2 ya da daha fazla granüloza hücre tabakası bulunan ancak, granüloza hücreleri arasında boşluk gözlenmeyen folikül,

Antral folikül: Granüloza hücreleri arasındaki boşluklarda folikül sıvısı birikimi başlamış olan folikül,

Graaf folikülü: 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 (kümüls hücreleri) tarafından çevrelenmiş olduğu folikül.

Kontrol ve Radyasyon-Sham Grupları Işık Mikroskopi Bulguları:

Ovulasyon dönemindeki ovaryum dokusunun başlıca yapıları, farklı jenerasyondaki KL'lar ile gelişimin değişik dönemlerindeki sağlıklı ovarian foliküller idi (Resim 32).

Ovaryumu çevreleyen germinal epitel, rüptür bölgesinde tek katlı yassı epitel halinde bulunurken, geri kalan yüzey epiteli tek katlı kübik epitel (Resim 33) şeklinde gözlenmekte idi.

Kortikal bölgede germinal epitel altında yoğun bir şekilde primordiyal, primer ve preantral aşamalarındaki foliküller izlenmekte idi (Resim 33). Medulla bölgesine yakın kısımda ise daha çok antral foliküller gözlenmekte idi (Resim 32,34). Gerek preantral gerekse antral foliküllerde, granüloza hücre tabakası içerisinde çok sayıda mitotik figürlere rastlanmakta idi (Resim 33,34). Tüm foliküllerin merkezinde yuvarlak ya da oval şekilli, açık boyanmış sitoplazması ile oositler yer almaktaydı. Birinci mayoz bölünmenin profaz safhasında bulunan oosit nükleusu (germinal vezikül aşamasında) veziküler kromatin yerleşimli olup, eksentrik konumlu nükleolus içermekteydi (Resim 33,34).

Ovaryum kesitlerinde farklı jenerasyondaki KL'lar izlenebilmekte idi. Geçmiş siklusa ait olanlar asidofilik boyanmakta olup, medullaya yakın yerleşmişti. Yeni oluşmuş KL'lar ise bazofilik boyanmış ve kortekse yakın olarak gözlenmekte idi (Resim 35). Lüteinize olmuş granüloza hücreleri büyük hacimli ve merkezi yerleşimli nükleuslara, teka hücreleri ise daha küçük hacimli ve merkezi yerleşimli nükleuslara sahipti.

Ovaryum dokusunda ovarian stoğun eliminasyonunu, fizyolojik bir süreç olan atrezi gerçekleştirdiğinden, farklı atretik dejenerasyon seviyelerindeki foliküller kontrol grubuna ait ovaryum kesitlerinde de gözlemlendi. Bunlar genellikle granuloza hücrelerinde piknotik nükleusların varlığı ile tespit edilmekteydi. İleri atrezi sürecinde asidofil sitoplazma gözlenen oositin fragmantasyonu, nükleer membran kaybı, oosit- granuloza hücreleri bağlantılarında kopmalar, granuloza hücreleri tabakasında çok sayıda piknotik nükleus şeklinde antral seviyedeki foliküllerde gözlenirken, atretik graaf foliküllerinde granuloza hücre tabakasının oldukça azaldığı ve antrumda asidofilik boyanan hücresel atıklarla birlikte (Resim 36,37) teka tabakasının hipertrofiye olduğu gözlenmekte idi (Resim 37).

Gelişmekte olan foliküllerde oosit ile granuloza hücre tabakası arasında asidofilik karakterde gözlenen, asellüler yapıdaki ZP bulunmaktaydı (Resim 38,39). Granuloza hücre tabakası ile stroma arasında, bağ dokusunun farklılaşması ile oluşan “teka folikülü” yine bu tip foliküllerde oluşmuştu (Resim 38). Teka tabakasının foliküle yakın kısmı hücresel karakterde olup teka interna, dıştaki tabaka ise stromayla kaynaşmış halde bulunan teka eksterna şeklinde farklılaşmıştı. Avasküler karakterdeki folikülün beslenmesini sağlayan kan damarları teka tabakasında yer almakta idi.

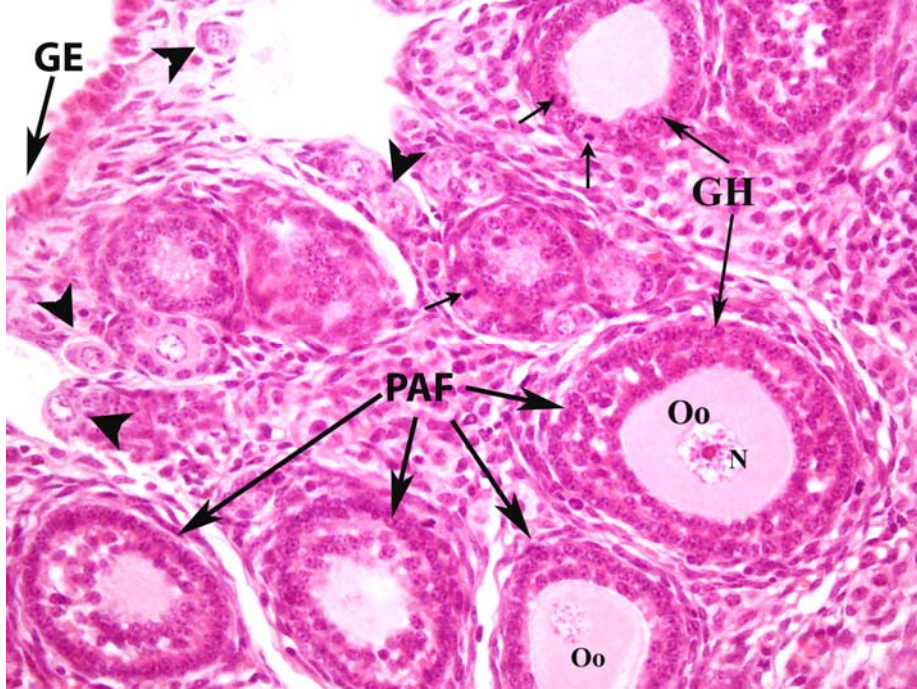
Foliküller ve KL’lar arasında bağ dokusu karakterindeki stroma yer almakta idi. Atreziye uğramış büyük çaplı foliküllerin, teka hücrelerinin farklılaşmasıyla oluşan interstisyel bezler, merkezi yerleşimli büyük nükleuslara sahip olup, polihedral şekilleri ile kolayca ayırt edilen hücrelerden oluşmakta idi (Resim 32,39).

Kontrol grubuna ait ovaryum kesitlerinde PAS(+) boyanma gösteren yapılar bazal membranlar, gelişmekte olan foliküllerde gözlenen ZP’lar ve atretik foliküle ait oositler idi (Resim 40,41). Folikül çapı ile birlikte ZP kalınlığında da artış gözlenmekteydi.

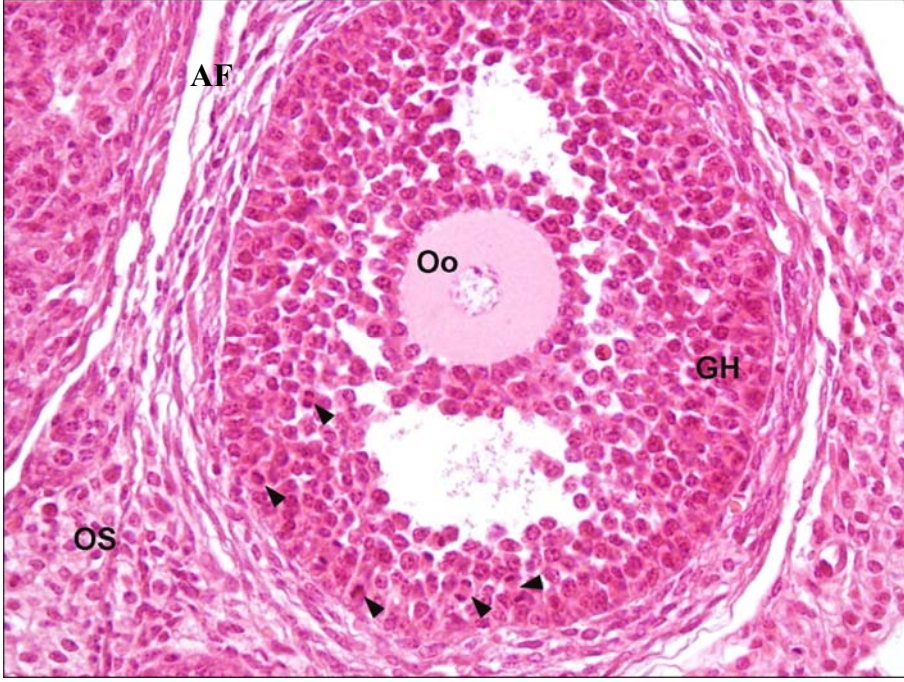
Kontrol ve Radyasyon-sham Gruplarına Ait Işık Mikroskopik Fotoğraflar:



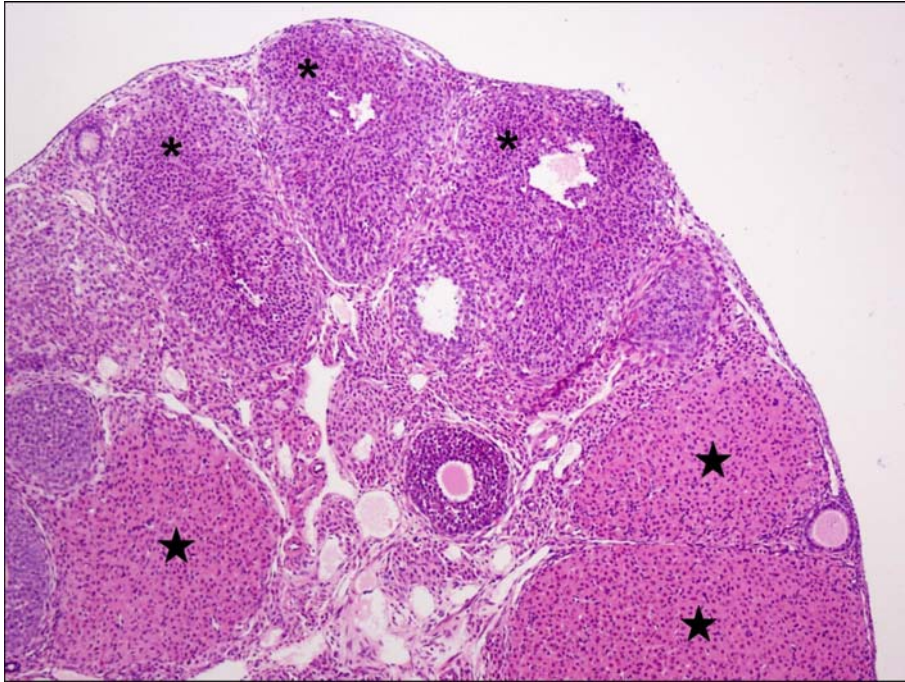
Resim 32. Ovulasyon sonrası ovaryum kesitlerinde normal görümlü antral aşamadaki foliküller (AF), dağınık yerleşmiş preantral foliküller (*), korpus luteumlar (KL) ve interstisyel bezlere (İB) rastlanmaktadır. H+E. X40.



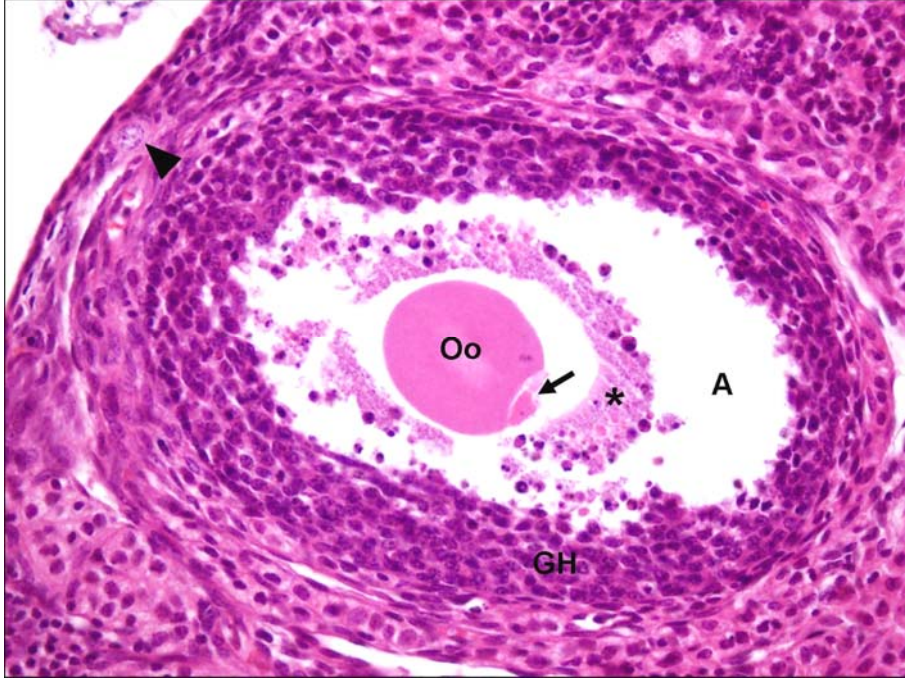
Resim 33. Germinal epitel (GE) tek katlı kübik epitel özelliğindedir ve altında yer alan ovaryum stroması içerisinde yassı folikül hücreleri ile çevrili primordiyal foliküllere (▶) sıklıkla rastlanmaktadır. Preantral foliküllerin (PAF) granuloza hücrelerinde (GH) mitoz figürler (→) gözlenmektedir. Oo: Oosit, N: Nükleus. H+E, X400.



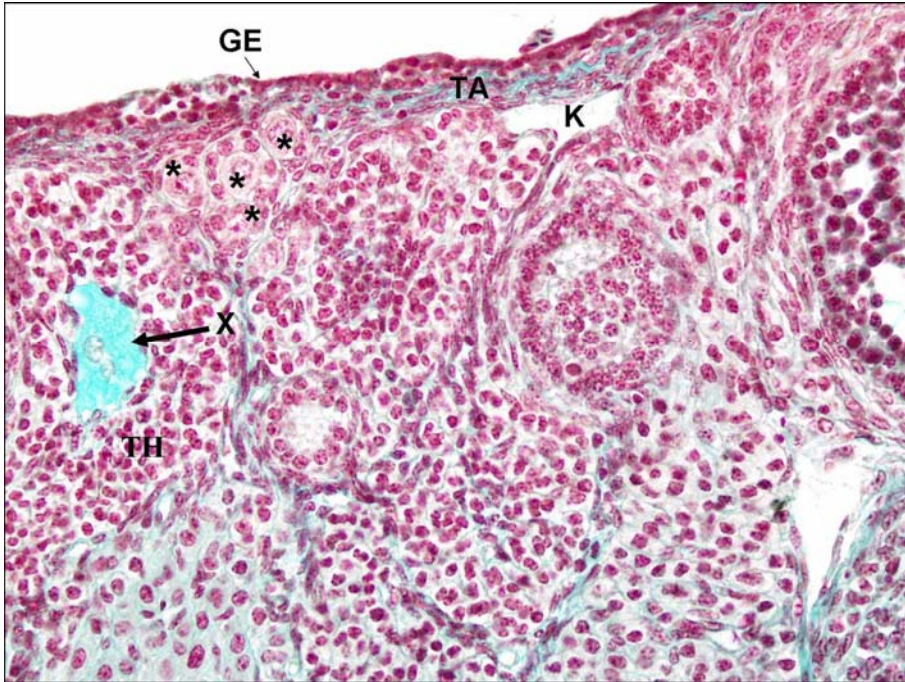
Resim 34. Ovarian stroma (OS) içerisinde yer alan, antral aşamadaki normal görümlü folikülün (AF) merkezinde, açık renkli homojen sitoplazmasıyla oosit (Oo) yer almakta, etrafını ise çok sayıda granüloza hücreleri (GH) çevrelemektedir. Bu aşamadaki folikülde granüloza hücreleri arasında çok sayıda mitotik figürlere (►) rastlanmaktadır. H+E, X 400.



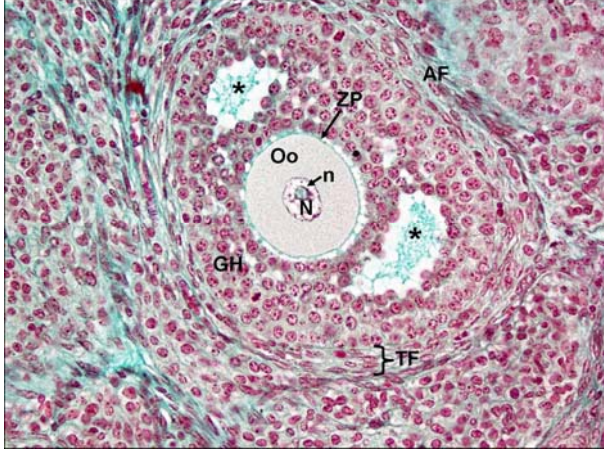
Resim 35. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde son ovulasyon döneminde meydana gelen korpus luteumlar bazofilik boyanırken (*), geçmiş döneme ait korpus luteumlar eozinofilik boyanmaktadır (★). H+E, X 200.



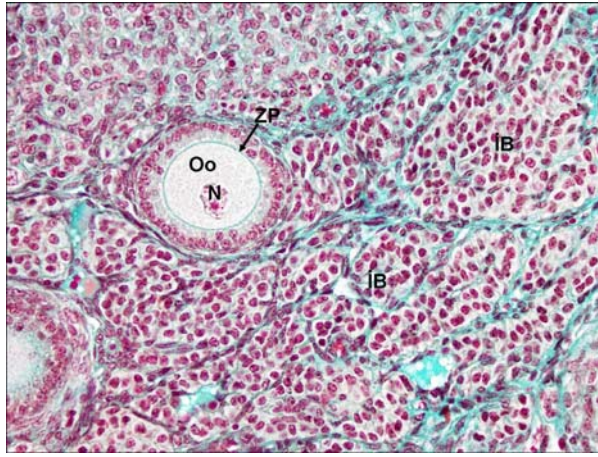
Resim 36. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde atretik graaf folikülünün antrumunda (A) çok sayıda hücresel atıklar (*) yer almakta olup, granüloza hücreleri (GH) folikülün periferine yerleşmiştir. Antrumda eozinofilik sitoplazmasıyla serbest halde bulunan oosite (Oo) ait fragmentasyonlar (→) gözlenmektedir. (▴) : Primordiyal folikül. H+E, X 400.



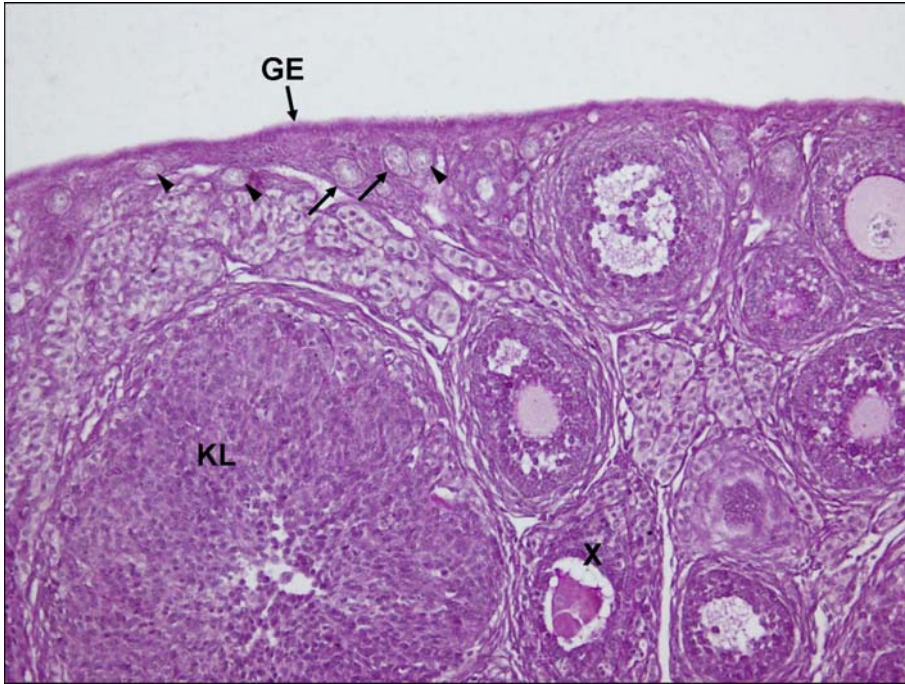
Resim 37. Tek katlı kübik epitelden oluşan germinal epitel (GE) altında, bağ doku özelliğine sahip Tunika albuginea (TA) yer almakta olup, onun da altında küçük çaplı primer foliküller (*) gözlenmektedir. İleri atrezi aşamasındaki folikülde (X), teka hücreleri (TH) hipertrofiye olurken, asidofilik boyanan lümende hücresel atıklar (→) gözlenmektedir. K: Kan kapilleri. Masson trichrome, X 400.



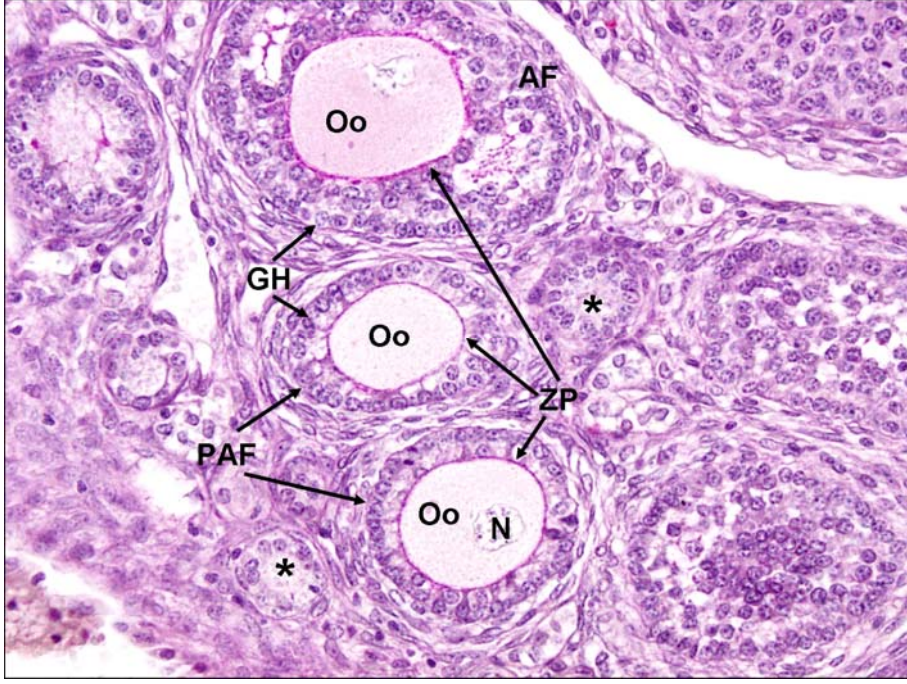
Resim 38. Antral aşamadaki folikülün (AF) merkezinde homojen sitoplazmasıyla oosit (Oo) yer almakta olup granüloza hücreleriyle (GH) oosit arasında zona pellusidanın (ZP) olduğu gözlenmektedir. Granüloza hücreleri arasında oluşan boşluklarda biriken foliküler sıvı (*) asidofilik karakterde boyanmıştır. Granüloza hücreleriyle ovarian stroma teka folikülü (TF) ile birbirinden ayrılmaktadır. N: Nükleus, n: nükleolus. Masson Trichrome, X 400.



Resim 39. Ovarian stromada yer alan normal görünümlü preantral folikül etrafında büyük hacimli hücreleriyle dikkati çeken çok sayıda interstisiyel bez (İB) gözlenmektedir. Oo: Oosit ZP: Zona pellusida, N: Nükleus. Masson Trichrome, X 400.



Resim 40. Germinal epitel (GE) altında yer alan çok sayıda primordiyal folikül (\blacktriangleright) ile farklı aşamalıdaki normal görünümlü ovarian foliküller gözlenmektedir. Atretik folikül (X) lümeninde fragmente ve PAS (+) boyanmış oosit yer almaktadır. \rightarrow : Primer folikül, KL: Korpus luteum. PAS+HL, X 200.



Resim 41. Normal görünümlü antral (AF) ve preantral foliküllerde (PAF) oositler (Oo) ile granuloza hücreleri (GH) arasında zona pellusidanın (ZP) geliştiği ve PAS (+) boyandığı gözlenmektedir. *: Primer folikül, N: Nükleus. PAS+HL, X 400.

Radyasyon Grubu Işık Mikroskopi Bulguları:

Tek doz 7.2 Gy uygulanan iyonize radyasyonun, ışınlamanın ardından gerçekleşen ilk ovulasyon ve takip eden ikinci ovulasyon döneminde ovaryum folikülleri üzerine etkileri incelendi.

Radyasyon I grubu bulguları:

Radyasyona maruz kalmış ovaryumda, kontrol grubundan farklı olarak, atretik dejenerasyonlar oldukça yaygın idi (Resim 42-51). Bunun yanı sıra, daha çok preantral foliküllerde normal morfoloji izlenmekte idi (Resim 44,45).

Kontrol grubuyla benzer şekilde, germinal epitel rüptür bölgesinde tek katlı yassı epitel halinde bulunurken, ovaryumun genelinde tek katlı kübik epitel şeklinde idi (Resim 43,47).

Germinal epitel altında yer alan tunika albuginea içerisinde, primordial folikül sayısı kontrole göre azalırken, bu foliküllere yakın yerleşmiş küçük çaplı primer foliküller çoğunlukla oositten yoksundu. Bu tip folikülde bir bazal membran üzerine yerleşmiş 4-8 adet granüloza hücreleri yer almakta idi. Bir-iki granüloza hücre tabakasına sahip preantral folikülde düzenli bazal membran yapısı ve oosit-foliküler hücre bütünlüğü nispeten korunurken (Resim 44), antral foliküllerde ileri atretik değişiklikler gözlenmekteydi.

Foliküllerdeki değişiklikler; bazal membran ondülasyonu (Resim 47,48), teka tabakası hipertrofisi (Resim 47), granüloza hücre tabakasında piknotik nükleus sayısında artış (Resim 44,48,49), granüloza hücreleri-oosit ilişkisinde kopmaların yanı sıra, granüloza hücreleri bütünlüğünde bozulma (Resim 47,50,51), hücrelerde vakuolizasyon (Resim 44,46,49), atretik antral folikül lümeninde membran ile çevrili hücrel atıklardan oluşan apoptotik cisimler (Resim 43) şeklinde idi.. Bununla birlikte az sayıda mitotik figür gözlenmekte idi.

Oosit nükleusunda nükleer membran kaybolmuş, nükleusta mayoz bölünmeye hazırlık benzeri değişiklikler (pseudomaturasyon mekiği oluşumu) yer almakta idi. Bazı foliküllerde oosit ZP'den ayrılmış, ZP kıvrımlı hale gelmiş (Resim 51), bazılarında ise oosit fragmentasyonlarını çevrelemiş olarak varlığını korumaktaydı (Resim 46,50).

Kortekste farklı gelişim dönemlerine ait foliküllerin kollabe olduğu gözlenmekteydi. Bu tip foliküllerde, granüloza hücreleri tabaka sayısı azalmış, oosit ve granüloza hücrelerinde vakuolizasyon (42,49), teka hücreleri ve granüloza hücrelerinde hipertrofi gözlenmekteydi (Resim 44,46,50).

Ovaryumun radyorezistant yapılarından olan farklı jenerasyondaki KL'lar normal görünümünü korumaktaydı (Resim 45).

Radyasyon II grubu bulguları:

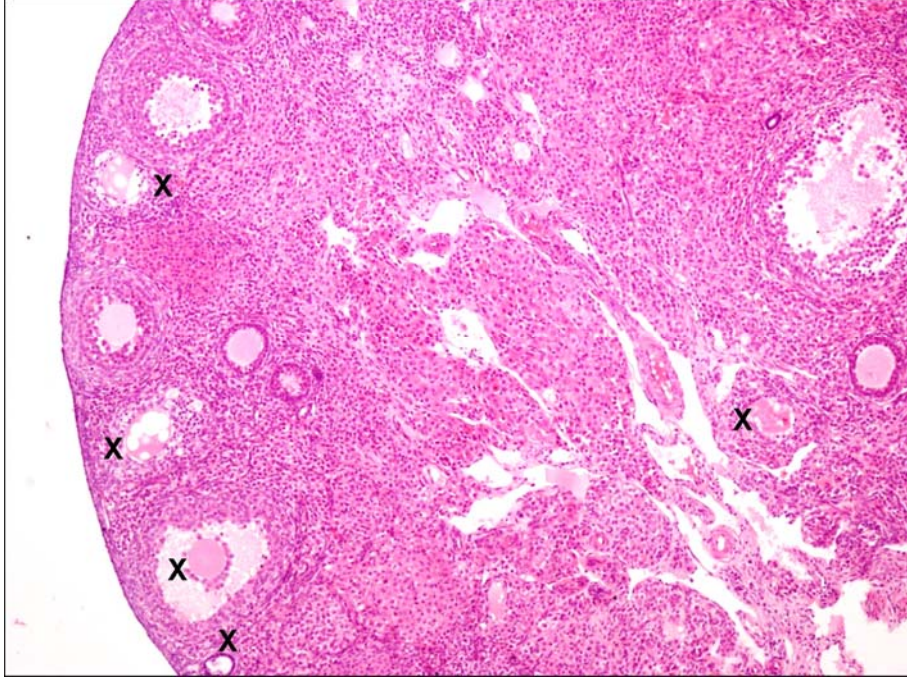
Bu grupta radyasyon I grubuyla benzer şekilde germinal epitel tek katlı kübik veya yassı epitelden oluşmakta idi (Resim 52). Altında yer alan tunika albuginea içerisinde primordiyal foliküllere nadiren rastlanmakta idi (Resim 52). Büyük çaplı foliküllerde radyasyona bağlı olarak hem oosit hem de granüloza hücrelerinde ileri atrezi seviyesinde değişiklikler gözlemlendi (Resim 53). Bunun yanı sıra gerek KL oluşumları (Resim 54,55) gerekse ileri gelişim aşamasındaki antral foliküller (Resim 56,57) normal görünüm sergilmekte idi. Oositin atılmasının ardından Graaf folikülü lümenine eritrositlerin göç ettiği ve hemorajinin olduğu gözlemlendi. Bu aşamada granüloza ve teka hücrelerinde lüteinizasyonun başladığı da dikkati çekmekte idi (Resim 54,55).

Küçük çaplı primer foliküllerin sayısı da kontrol gruplarına oranla azalmış olup, çoğunun oositten yoksun olduğu izlenmekte idi (Resim 60). Ayrıca bu grupta normal görünümlü preantral foliküller ile sağlıklı antral foliküllerin oranı birbirine yakın idi (Resim 56,57).

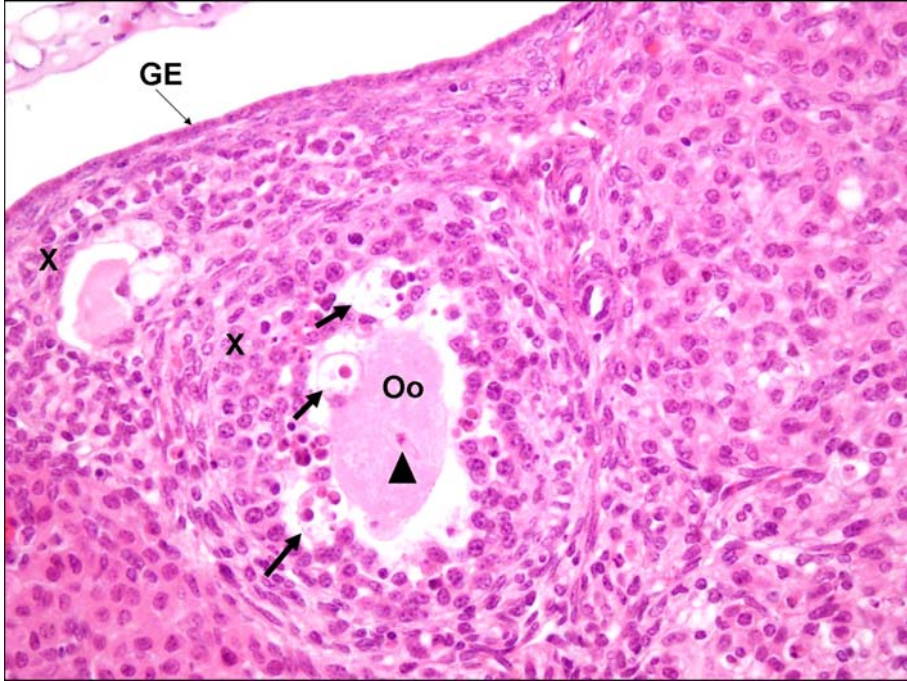
Radyasyon etkisiyle hızlanan foliküler atrezi sürecinde, erken seviyedeki değişiklikler granüloza hücreleri arasında piknotik nükleus sayısında artış, apoptotik cisimler şeklinde gözlemlendi (Resim 53,58). İleri atrezi aşamasında ise asidofil ve PAS (+) özellik taşıyan oositin (Resim 59) fragmentasyonları dikkati çekmekte idi (Resim 53). Gerek granüloza hücreleri arasında gerekse teka tabakasında hipertrofi dikkati çekmekte idi (Resim 60). Ayrıca atretik folikül lümeninde hücresel atıklar nedeniyle PAS (+) boyanma gözlenmekte idi (Resim 60). Nükleer membranın kaybolduğu oositlerde ise genellikle pseudomaturasyon mekiği oluşmuştu.

Bu grupta birinci gruptan farklı olarak, foliküler kist benzeri yapılar da gözlenmekteydi. Bu tip foliküllerde lüteinizasyon gözlenmesine rağmen, ovulasyona ulaşamamış oosit, folikülün merkezinde gömülü kalmıştı (Resim 61).

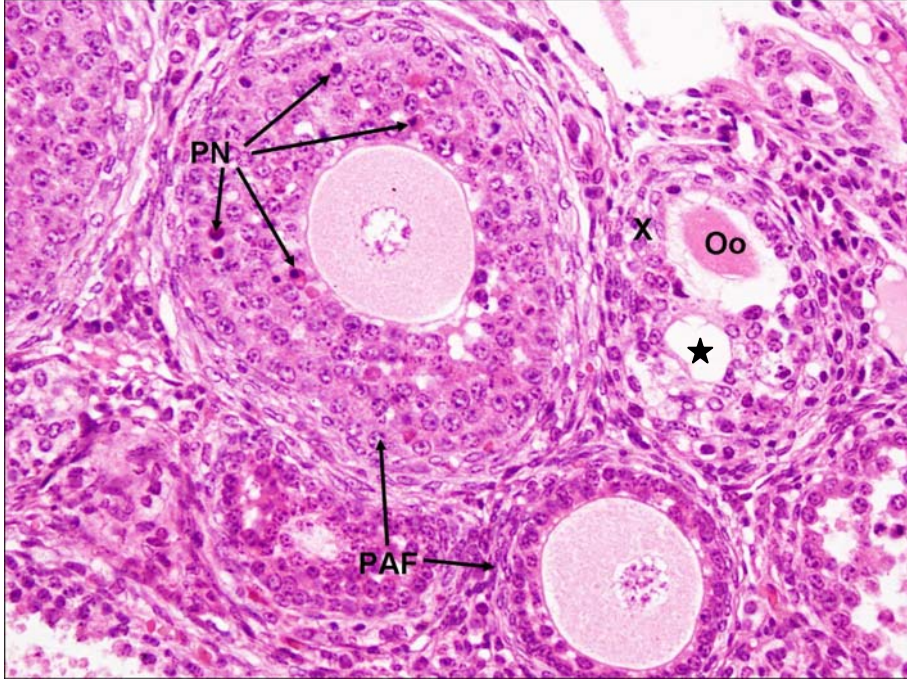
Radyasyon I Grubuna Ait Işık Mikroskopik Fotoğraflar



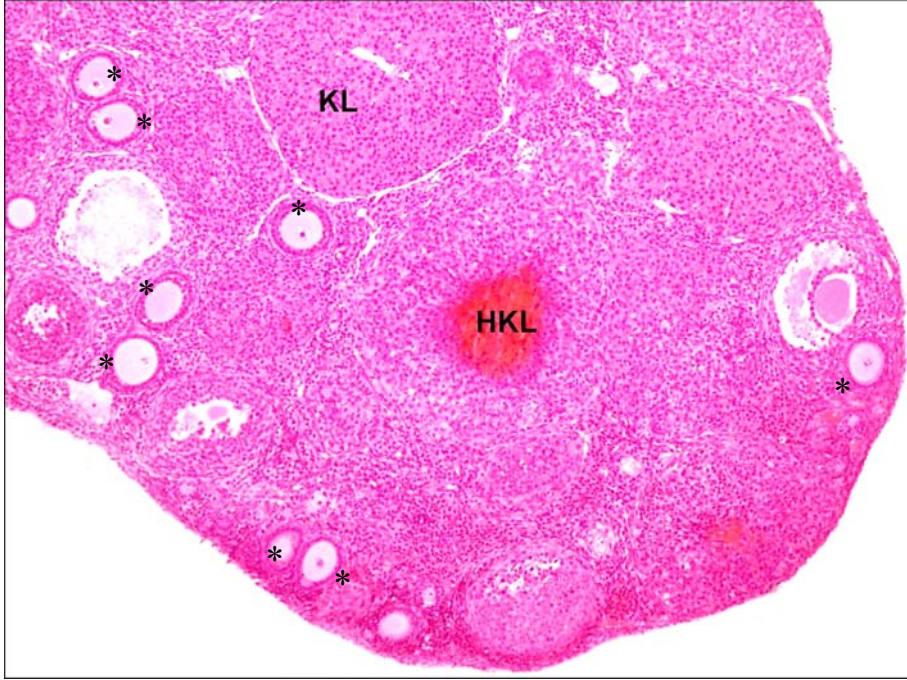
Resim 42. Radyasyon uygulamasını takip eden ilk ovulasyon döneminde elde edilen ovaryum kesitinde kortekste yer alan farklı aşamalardaki foliküllerin (X) çeşitli atretik süreçlerde olduğu gözlenmektedir. H+E, X 100.



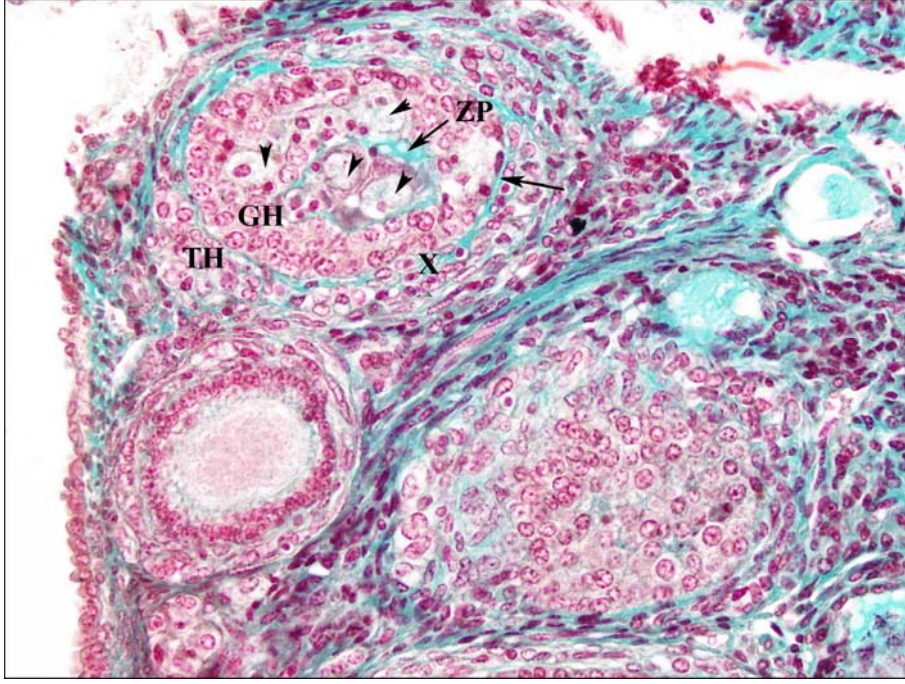
Resim 43. Merkezinde dejenere olmuş oositin (Oo) yer aldığı atretik folikülde (X) oositte fragmentasyon ile birlikte pseudomaturasyon mekiğinin (▲) oluştuğu gözlenmektedir. Granüloza hücreleri arasında membran ile çevrilmiş hücresel atıklardan oluşan apoptotik cisimler (→) yer almaktadır. GE: Germinal epitel. H+E, X 400.



Resim 44. Büyük çaplı preantral folikülün (PAF) granüloza hücreleri arasında çok sayıda piknotik nükleuslara (PN) rastlanmasına rağmen, folikül normal görünümünü korumaktadır. İleri aşamadaki atretik folikül (X) içerisinde oosit (Oo) dejenerasyonu ile birlikte granüloza hücreleri arasındaki vakuoller (★) gözlenmektedir. H+E, X 400.



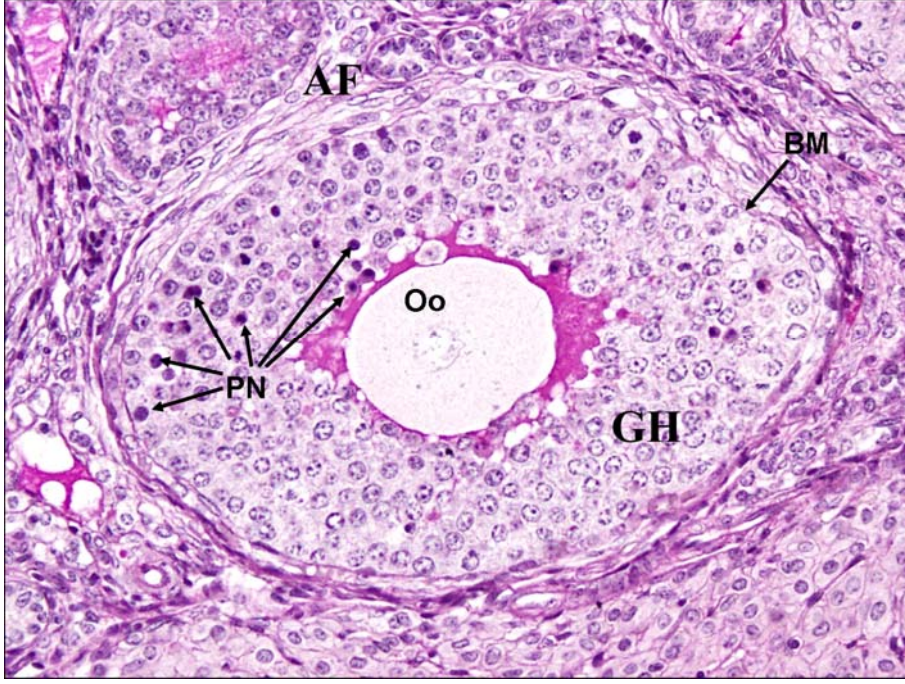
Resim 45. Oositin olgun folikülden atılmasının hemen ardından lümeninde oluşmuş hemoraji ile birlikte bir hemorajik korpus luteum (HKL) gözlenmektedir. Geçmiş sıkluslara ait korpus luteum (KL) ise asidofil boyanma sergilemektedir. *: Preantral folikül. H+E, X 100.



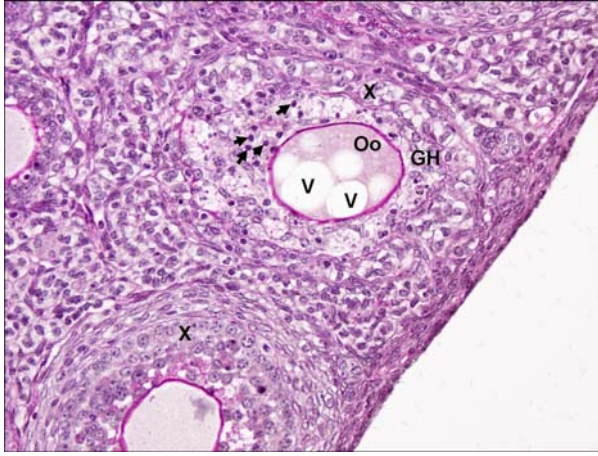
Resim 46. Radyasyon uygulamasını takip eden ilk ovulasyon döneminde, ovarian kortekste ileri atretik değişikliklerin gözleendiği folikülde (X), oositin tamamen dejenere olduğu, granüloza hücrelerinin (GH) azalıp, büyük vakuollere (►) sahip olduğu, radyorezistant karakterli, asidofil boyanana zona pellusidanın (ZP) ise katlantı oluşturduğu gözlenmektedir. TH: Teka hücreleri, (—►): Bazal membran. Masson trichrome. X400.



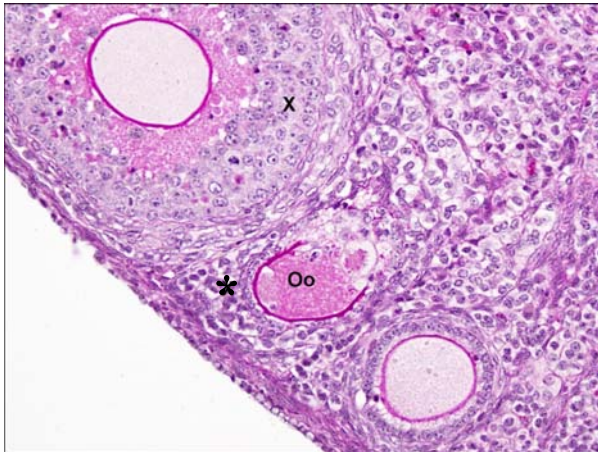
Resim 47. Germinal epitel (GE) altında yer alan antral folikülde (AF) granüloza hücreleri (GH) birbirinden uzaklaşmış, oosit (Oo) ile granüloza hücreleri arasında boşluklar (*) meydana gelmiştir. Granüloza hücrelerini teka folikülünden (TF) ayıran bazal membranda (BM) ondülasyon gözlenmektedir. PAS+HL, X 400.



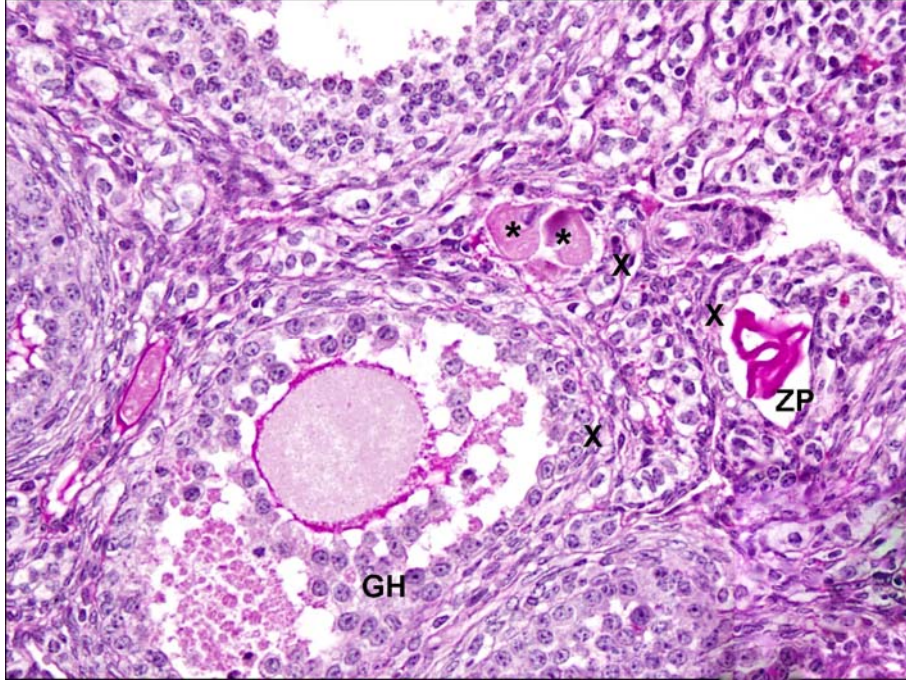
Resim 48. Büyük çaplı antral folikülde (AF) erken aşamadaki atretik değişiklikler piknotik nükleus (PN) sayısında artış şeklinde kendini göstermekte olup, PAS (+) boyanan granüloza hücrelerinin (GH) bazal membranında (BM) ondülasyon gözlenmektedir. PAS+HL, X 400.



Resim 49. Merkezinde sitoplazmik vakuollere (V) sahip oositin (Oo) gözlendiği ileri atrezi aşamasındaki folikülde (X) granüloza hücreleri (GH) arasında çok sayıda piknotik nükleus (→) dikkati çekmektedir. PAS+HL, X 400.



Resim 50. Erken atrezi aşamasındaki folikülde (X) granüloza hücreleri arasında PAS(+) boyanan hücresel atıklar gözlenmekte olup, ileri atrezi aşamasındaki diğer bir folikülde (*) granüloza hücreleri sayısında şiddetli azalmayla birlikte oositin (Oo) PAS (+) boyandığı ve dejeneratif değişiklikler gösterdiği gözlenmektedir. PAS+HL, X 400.

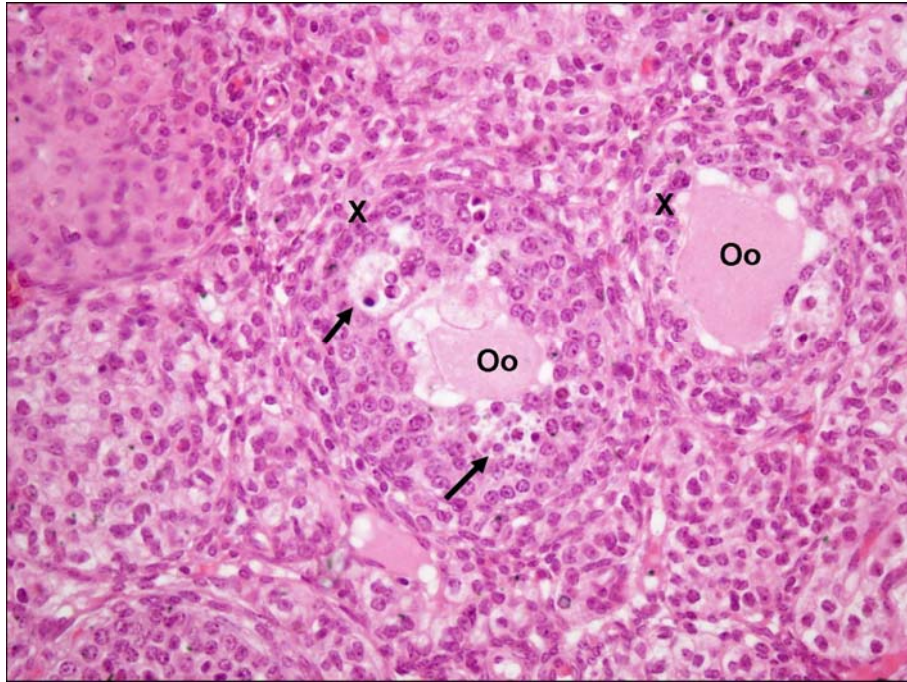


Resim 51. Antral aşamadaki atretik folikülde (AF) granüloza hücreleri (GH) ile oosit bağlantısı birbirinden kopmuş olup, granüloza hücre sayısının azaldığı dikkati çekmektedir. Dejenere oositte (Oo) hafif PAS(+) boyanma gözlenmektedir. İleri atrezi aşamasındaki folikülde (X) PAS(+) boyanmış ve fragmente olmuş oosit (*) dikkati çekmektedir. İleri atrezi aşamasındaki diğer bir folikülde ise tüm foliküler yapılar kaybolurken radyorezistant özellikteki PAS(+) boyanmış zona pellusida (ZP) lümen içerisinde kıvrım yapmış biçimde gözlenmektedir. PAS+HL, X 400.

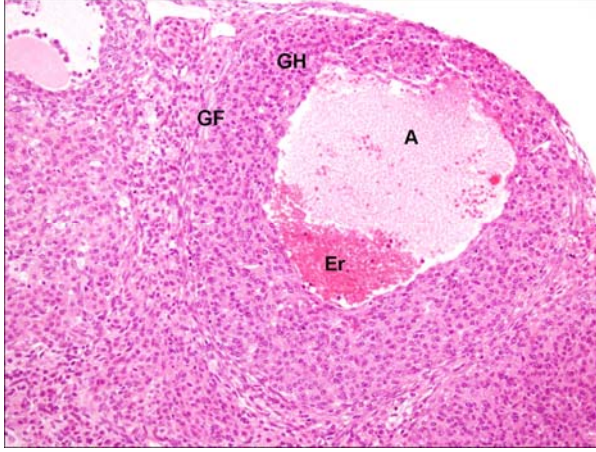
Radyasyon II Grubuna Ait Işık Mikroskopik Fotoğraflar



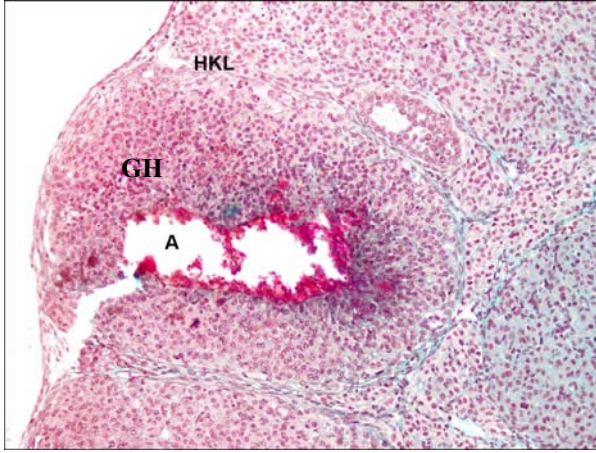
Resim 52. Radyasyon uygulamasını takip eden ikinci ovulasyon dönemindeki ovaryum kesitinde germinal epitel (GE) tek katlı kübik epitelden oluşmaktayken, altında yer alan tunika albuginea (TA) içerisinde primordiyal foliküllerin ve küçük çaplı primer foliküllerin nadir olarak bulunduğu dikkati çekmektedir. PAF: Preantral folikül, PF: Primer folikül. H+E, X 400.



Resim 53. Radyasyon I grubuyla benzer biçimde, atretik foliküllerde (X) oosit (Oo) morfolojisindeki değişiklikler ve granüloza hücreleri arasında apoptotik cisimler (→) radyasyon uygulamasını takip eden ikinci ovulasyon döneminde de ovaryumlarda gözlenmektedir. H+E, X 400.



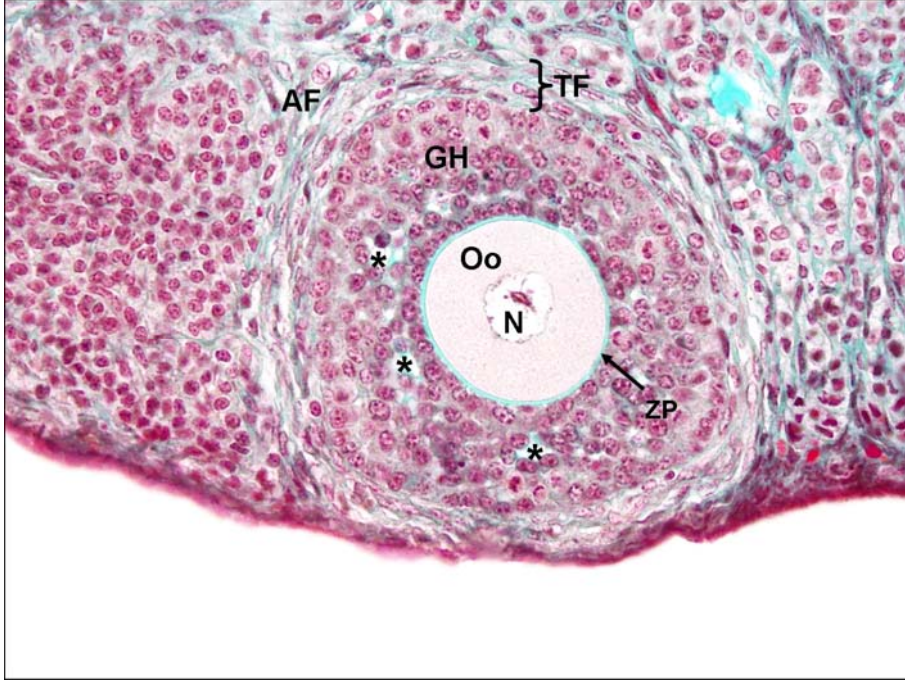
Resim 54. Oositin Graaf folikülünden (GF) atılmasının ardından, antrumda (A) eritrositlerin (Er) kümелendiđi ve folikülün hemorajik korpus luteum haline dönüştüğü gözlenmektedir. GH : Granüloza hücreleri. H+E, X 200.



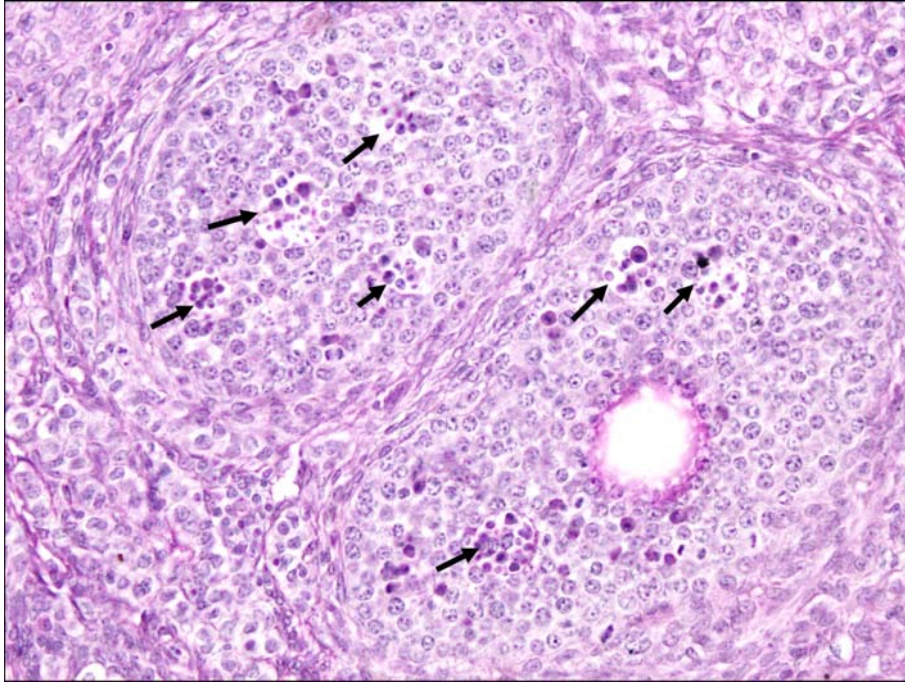
Resim 55. Oositin folikülden atılmasının ardından, granüloza hücrelerinin (GH) hipertrofiye olduğu ve folikülün hemorajik korpus luteum (HKL) haline dönüştüğü gözlenmektedir. A: Antrum. Masson Trichrome, X 200.



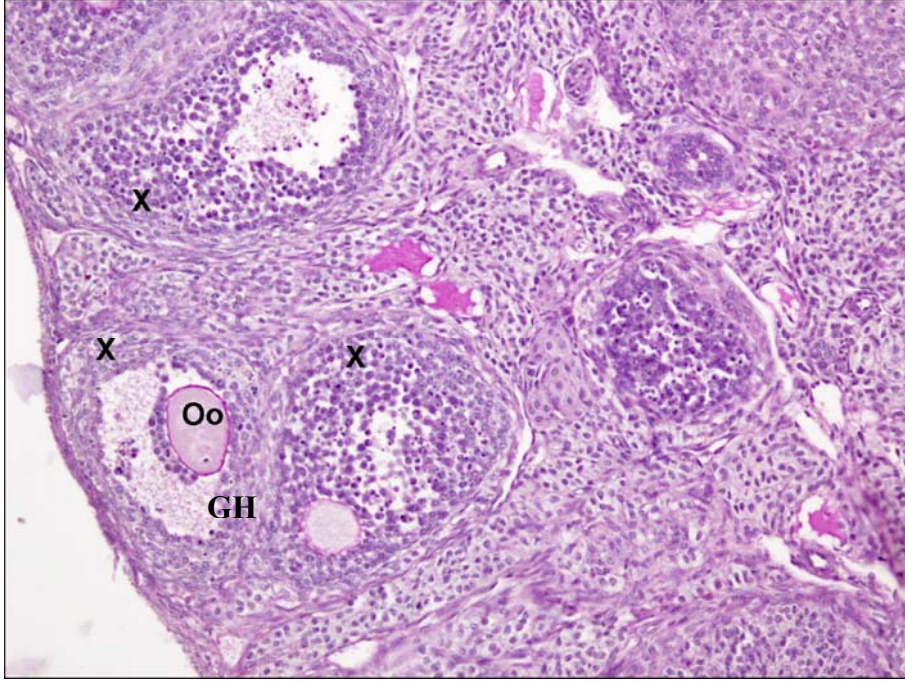
Resim 56. Radyasyon II grubuna ait ovaryum kesitinde merkezinde normal görünümlü oositin (Oo) yer aldığı antral folikül (AF) içerisinde granüloza hücreleri (GH) arasında foliküler sıvı bulunduran boşlukların (*) meydana geldiği ve granüloza hücreleri ile oosit arasındaki bağlantının korunmuş olduğu görülmektedir. N : Nükleus.. Masson Trichrome, X 400.



Resim 57. Erken antral aşamadaki folikülde (AF), granüloza hücreleri (GH) arasında küçük boşlukların (*) oluşmaya başladığı, folikülün merkezinde normal görünüme sahip oositin (Oo) etrafını çevreleyen asidofilik karakterli zona pellusidanın (ZP) yer aldığı gözlenmektedir. Folikül ile ovarian stroma arasında teka folikülünün (TF) geliştiği dikkati çekmektedir. Masson Trichrome, X 400.



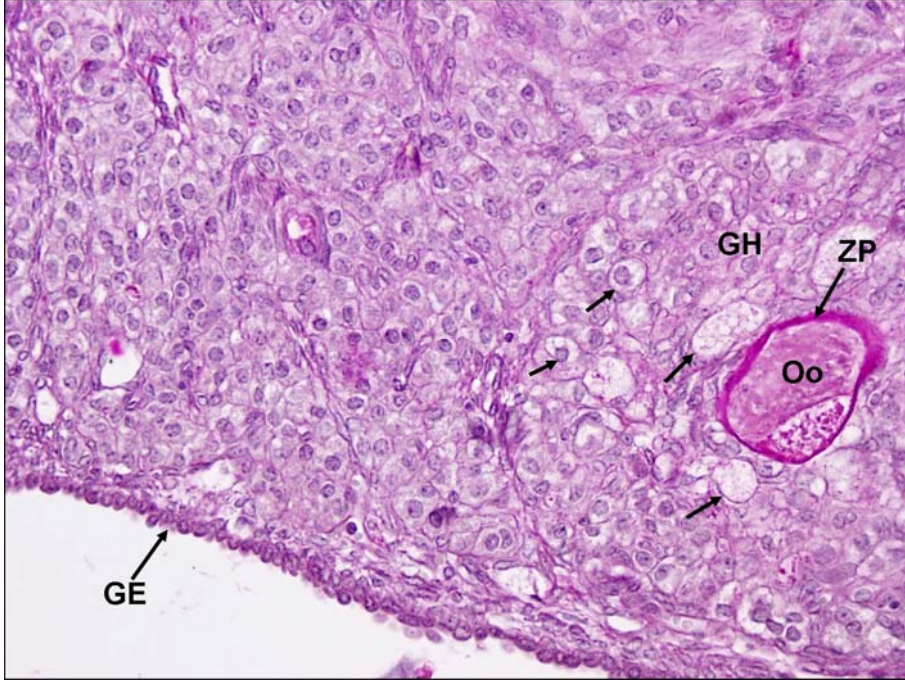
Resim 58. Büyük çaplı foliküllerin granüloza hücreleri (GH) arasında PAS(+) boyanan hücresel atıkların yer aldığı çok sayıda apoptotik cisimler (→) dikkati çekmektedir. PAS+HL, X 400.



Resim 59. Germinal epitel altında çok sayıda atretik folikül (X) gözlenmekte olup, oositin (Oo) hacimce küçüldüğü, hafif PAS(+) boyandığı ve granüloza hücreleri (GH) ile bağlantısının nispeten kaybolduğu gözlenmektedir. PAS+HL, X 200.



Resim 60. Ovariyan stroma içerisinde büyük çaplı atretik foliküllerin (▶) lümeninde PAS(+) boyanan yapıların (*) yanı sıra, granüloza hücrelerinin (GH) ve teka folikülünün (TF) hipertrofiye olduğu gözlenmektedir. Primer foliküllerin (X) merkezinde ise oositin yer almamaktadır. PAS+HL, X 400.



Resim 61. Radyasyon uygulamasının ardından ikinci ovulasyon döneminde ovaryumda hipertrofiye olmuş granüloza hücreleri (GH) arasında sıkışmış halde bulunan ve PAS(+) boyanmış dejenere oosit (Oo) gözlenmektedir. Hipertrofiye granüloza hücrelerinde oluşmuş sitoplazmik boşluklar (→) dikkati çekmektedir. GE: Germinal epitel, ZP: Zona pellusida. PAS+HL, X 400.

Süperovulasyon Grubu Işık Mikroskopisi Bulguları

Ekzojen gonadotropinler yardımıyla ovaryum indüksiyonu yapılan bu grupta, çok sayıda folikülün ovulasyon aşamasına kadar ulaşması nedeniyle, kesitlerde ovaryumun tamamına yakın kısmı KL'lar ile kaplı idi.

Ovarian stroma hipertrofiye olmuş hücrelerden dolayı ödemli bir görünüm sergilemekte idi. Ayrıca kortikal bölgede ve KL'lar içerisindeki kapillerlerde dilatasyon dikkat çekici idi. Kortikal ve medüller venüllerde eritrosit yoğunluğu oldukça fazla gözlenmekte idi. Hormonal uyarım nedeniyle gerek stromal hücreler gerekse interstisyel bezler normalden daha hacimli hale gelmişti.

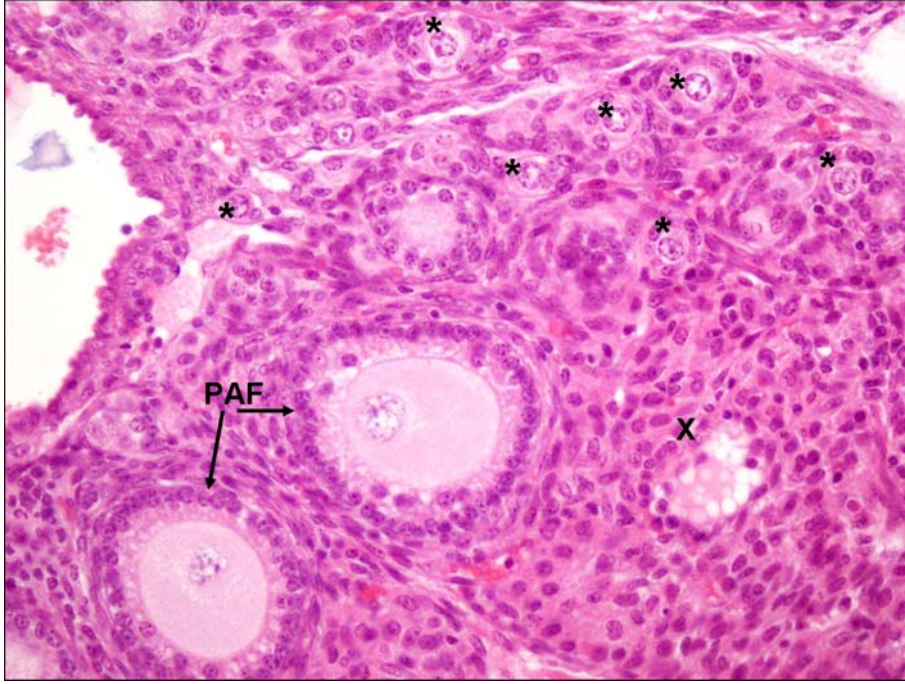
Farklı gelişim dönemlerindeki foliküller genellikle korteks bölgesinde lokalize olmuştu (Resim 62). Kontrol grubuyla benzer şekilde, folikül popülasyonunun büyük çoğunluğunu sağlıklı foliküller oluşturmakta idi (Resim 62-66). Preantral ve antral aşamadaki foliküllerde, granüloza hücre tabakasında mitoz figürlere sıklıkla rastlanmakta idi. Bu foliküllerde teka tabakaları da oluşmuş olup, normal görünüm sergilemekte idi (Resim 62,65,66).

Germinal epitel yer yer tek katlı yassı ve tek katlı kübik epitel yapısında idi (Resim 64). Tunika albuginea, kontrol ve radyasyon gruplarına oranla genişlemiş olup, içerisinde normal morfolojiye sahip, primordial ve küçük çaplı primer folikülleri barındırmakta idi (Resim 65,66).

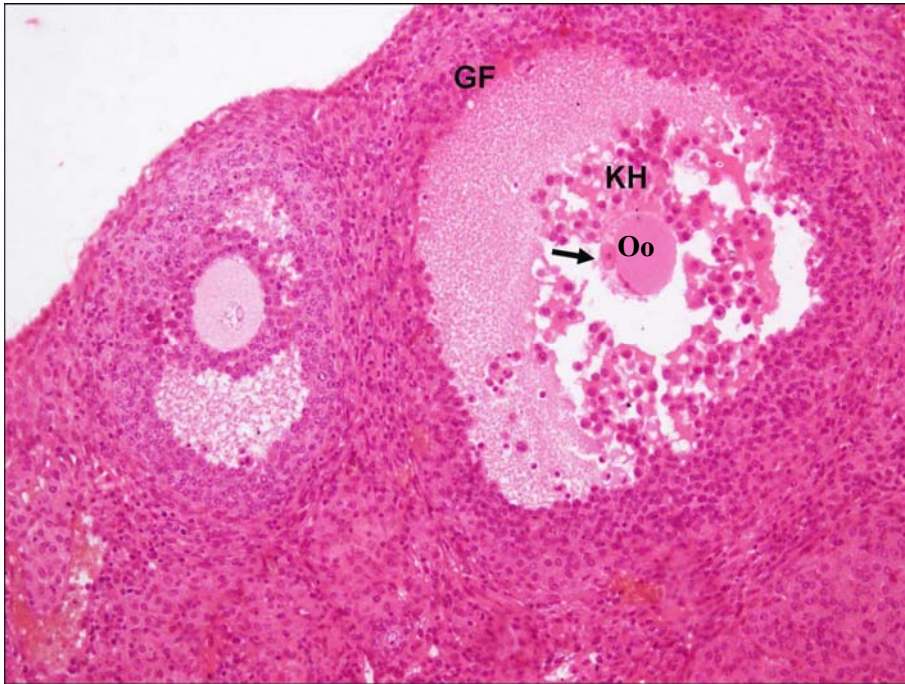
Atretik foliküller kontrol grubuyla benzer şekilde, bu grupta da gözlenmekte idi (Resim 62). Bu foliküller ağırlıklı olarak piknotik nükleusa sahip granüloza hücreleri, oosit fragmantasyonları ve kayıpları şeklinde kendini gösteren erken atretik değişikliklerden oluşmakta idi.

Atreziye uğramış graaf foliküllerinde ise, birinci mayoz bölünme tamamlanıp, birinci polar cisim oluşmasına rağmen, ovulasyonun gerçekleşmediği gözlenmekte idi (Resim 63). Bu aşamadaki bazı foliküllerde ise, kümülüs hücrelerinin genişlemesi gerçekleşmiş ancak, oosit atreziye uğradığı için ovulasyon gerçekleşmediğinden, KL şekillenmemiştir.

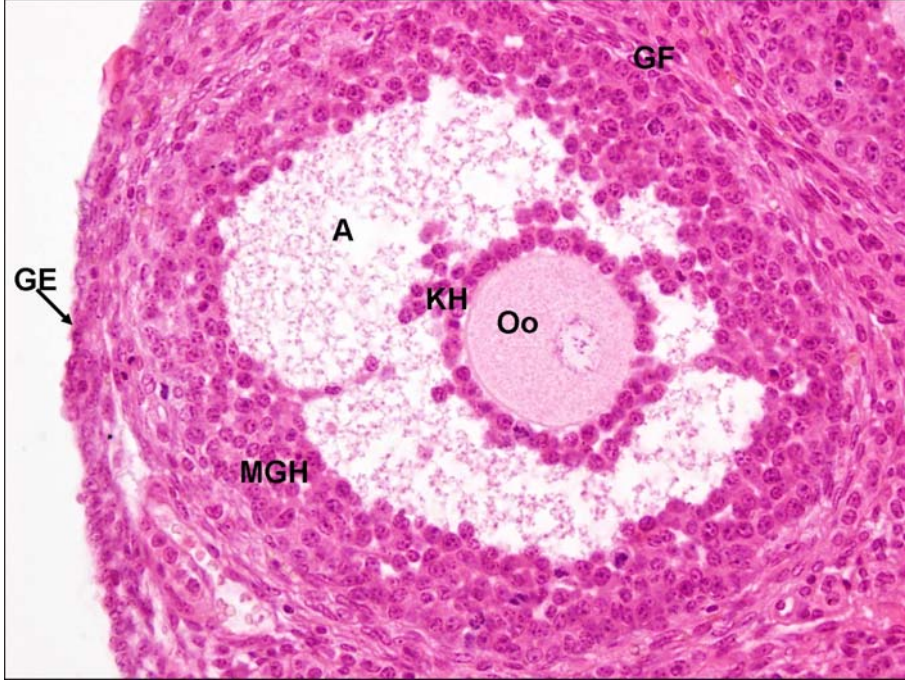
Süperovulasyon Grubuna Ait Işık Mikroskopik Fotoğraflar



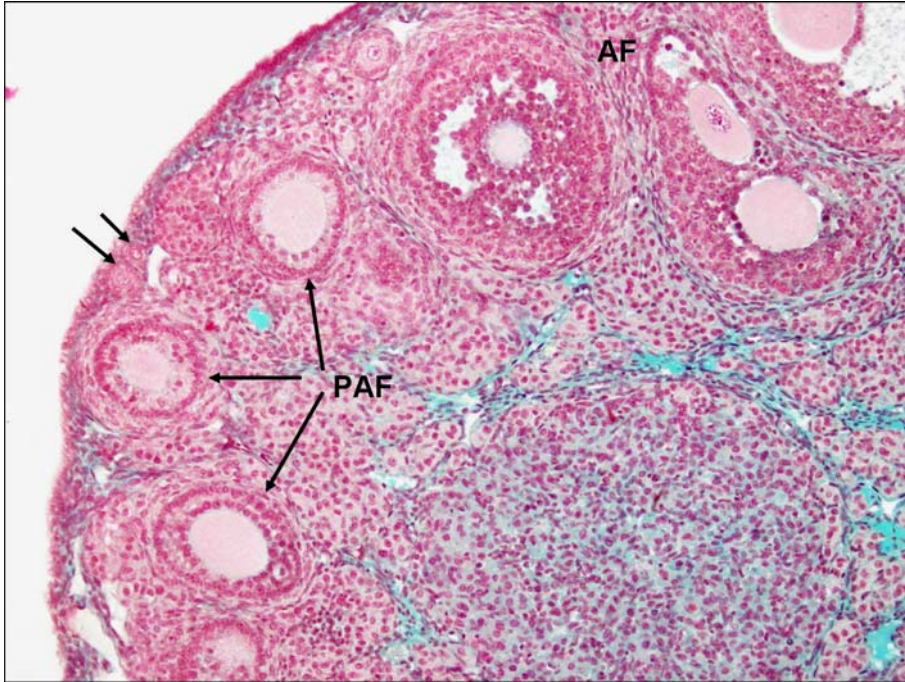
Resim 62. hCG uygulamasının ardından 14 saat sonra sakrifiye edilen deneklere ait ovaryum kesitinde ovarian kortekste çok sayıda küçük çaplı primer folikülün (*) varlığı dikkat çekmekte olup, normal görünümlü preantral foliküllerin (PAF) yanı sıra az sayıda atretik foliküle (X) de rastlanmaktadır. H+E, X 400.



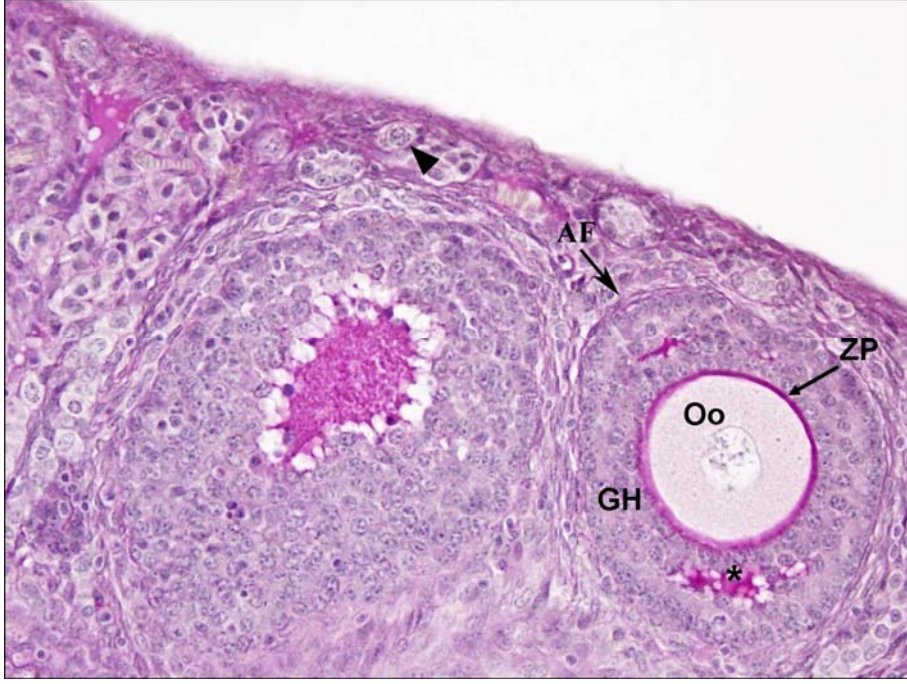
Resim 63. Süperovulasyon uygulanmış deneklere ait ovaryum kesitinde atretik graaf folikülü (GF) gözlenmekte olup, oositin (Oo) folikülden atlamadığı izlenmektedir. KH: Kümülüs hücreleri. —> : Polar cisimcik. H+E, X 200.



Resim 64. Germinal epitel (GE) altındaki ovariyen kortekste normal görünümündeki erken aşamadaki Graaf folikülü (GF) gözlenmektedir. Antrumda (A) oosit (Oo) etrafında kümülüs hücreleri (KH) yer almakta olup, granuloza hücreleri folikülün periferinde membrana granuloza hücreleri (MGH) şeklinde yerleşmektedir. H+E, X 400.



Resim 65. Ovariyen kortekste normal görünümündeki preantral foliküllerle (PAF) birlikte primordiyal foliküller (—>) gözlenmektedir. AF: Antral Folikül. Masson Trichrome, X 200.



Resim 66. Ovariyan kortekste primordiyal foliküllerle (►) birlikte, normal görünümlü antral aşamadaki foliküller de (AF) gözlenmektedir. ZP: Zona pellusida, GH: Granüloza hücreleri, Oo : Oosit, *: Antral boşluk. PAS+HL, X 400.

Radyasyon+Süperovulasyon I grubu bulguları:

Radyasyonun ardından ekzojen hormonlarla birinci ve ikinci östrus fazlarında ovulasyon fonksiyonunun test edildiği bu grupta, ovaryuma hakim olan yapı preovulatuvar dönemde bloke olmuş Graaf folikülleri idi. KL sayısı hem kontrol gruplarından hem de süperovulasyon grubundan daha az idi (Resim 67).

Germinal epitel tek katlı yassı ve kübik epitelden oluşmakta idi (Resim 68). Bazı kesitlerde germinal epitelin ortadan kalktığı, oositin atılmasının ardından antral sıvı ve kümülüs hücrelerinin de atılmakta olduğu rüptür bölgesi belirgin olarak gözlenmekte idi (Resim 69).

Bu grupta gözlenen erken aşamadaki etretik değişiklikler piknotik nükleuslar ve oosit deformasyonları şeklinde izlenmekte idi (Resim 68,70).

hCG ile ovulasyon uyarımı uygulaması yapılan deneklere ait bu kesitlerde, Graaf folikülünde normalde ovulasyondan hemen önce gözlenen, kümülüs hücrelerinde genişleme meydana gelmişti (Resim 71). Folikülde genellikle oosit deformasyonları oluşmuştu. Nükleer membran kaybolmuş ve pseudomayotik görüntüler oluşmuştu (Resim 72). Erken lüteinize olmuş foliküllerde, gerek ganüloza hücreleri arasında sıkışıp kalan dejeneratif oositler (Resim 73) gerekse genişlemiş kümülüs hücreleri arasında atretik görünümlü oositler dikkati çekmekte idi (Resim 74).

Radyasyon etkisiyle oositten yoksun küçük çaplı primer foliküller ovarian kortekste sıklıkla yer almakta idi (Resim 68,75). Genellikle 1-2 tabakalı granüloza hücrelerinden oluşan preantral foliküller normal görünümünü korumaktaydı (Resim 76). Bazı Graaf foliküllerinde 1. polar cisimcik oluşmuş ve oosit ile ZP arasına yerleşmişti ancak folikülde rüptür gerçekleşmemişti.

Tunika albuginea genişlemiş olup, primordiyal ve küçük çaplı primer folikül sayısı süperovulasyon grubuna göre daha az gözlenmekteydi (Resim 69,76). Damarlarda dilatasyon ve şiddetli konjesyon gözlenmekte idi (Resim 69,71). İntersitisyel bezler ve stromal hücrelerde hormonal indüksiyon sonucu hacim artışı gözlenmekte idi.

Radyasyon+Süperovulasyon II grubu bulguları:

Germinal epitel ovaryumun genelinde tek katlı kübik epitelden (Resim 77) oluşmakla birlikte yer yer tek katlı yassı epitel şeklinde gözlenmekte ta idi (Resim 78). Farklı jenerasyonlardaki az sayıda korpus luteum ovaryum yüzeyine yakın yerleşmişti. Oositin atılmasının ardından bazı foliküllerde lümende hemorajinin gözlendiği hemorajik korpus

luteumlar bazılarında ise, lümende bağ doku oluşumunun başladığı KL'lar izlenmekte idi (Resim 78).

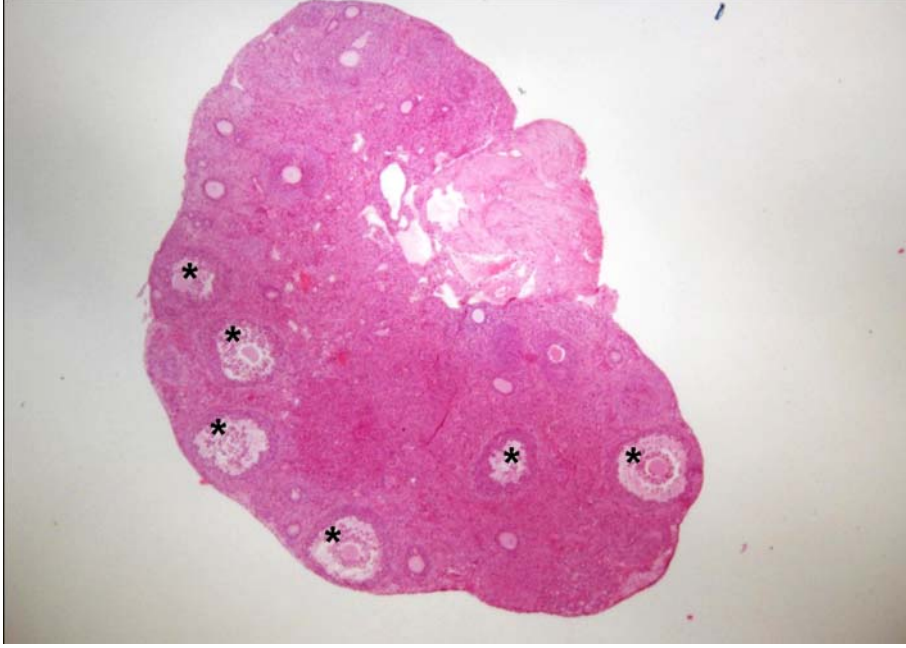
Tüm radyasyon gruplarına benzer şekilde, kortekste oositini kaybetmiş küçük çaplı primer foliküller gözlenmekte idi (Resim 79). Gelişmekte olan foliküllerde ise granüloza hücreleri arasında piknotik nükleuslar, oosit sitoplazmasının asidofil özellik kazanması ve fragmentasyonlar izlenmekte idi (Resim 80).

Bu grupta bir önceki siklus ile benzer şekilde ovaryumun genelinde, ovulasyon öncesi aşamada atreziye uğrayan geniş çaplı foliküller izlenmekte idi (Resim 81). Bunun yanı sıra hem korteks hem medulla bölgesinde alçak tek katlı kübik epitel ile çevrili, asidofil boyanan lümeni ile atretik foliküllere ait kalıntı alanlara da rastlanmakta idi (Resim 82).

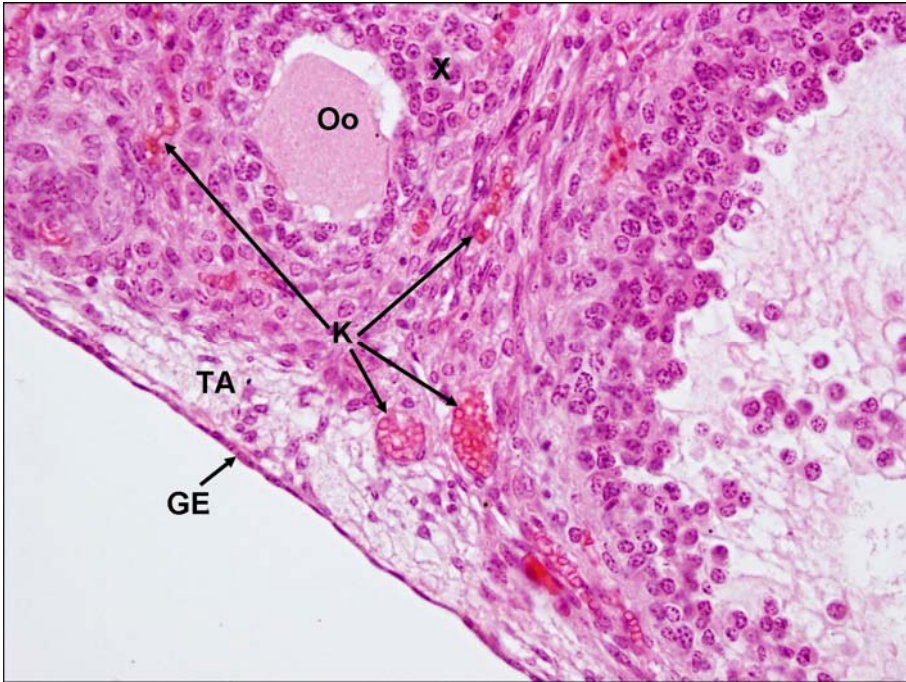
Graaf folikül aşamasında atreziye uğramış foliküllerde ise dejenere olmuş oositin etrafında genişlemiş kümülüs hücreleri (Resim 83) ve erken lüteinize olmuş foliküller içerisinde sıkışık kalmış oositler gözlenmekte idi (Resim 84).

Germinal epitel altında tunika albuginea genişlemiş olup, içerisinde az sayıda normal görünümlü primordiyal ve primer folikül bulundurmakta idi (Resim 77,85). Süperovulasyon uygulanan diğer gruplarda olduğu gibi, tunika albugineada yer alan kan damarlarında dilatasyon ve eritrosit yoğunluğu dikkati çekmekte idi.

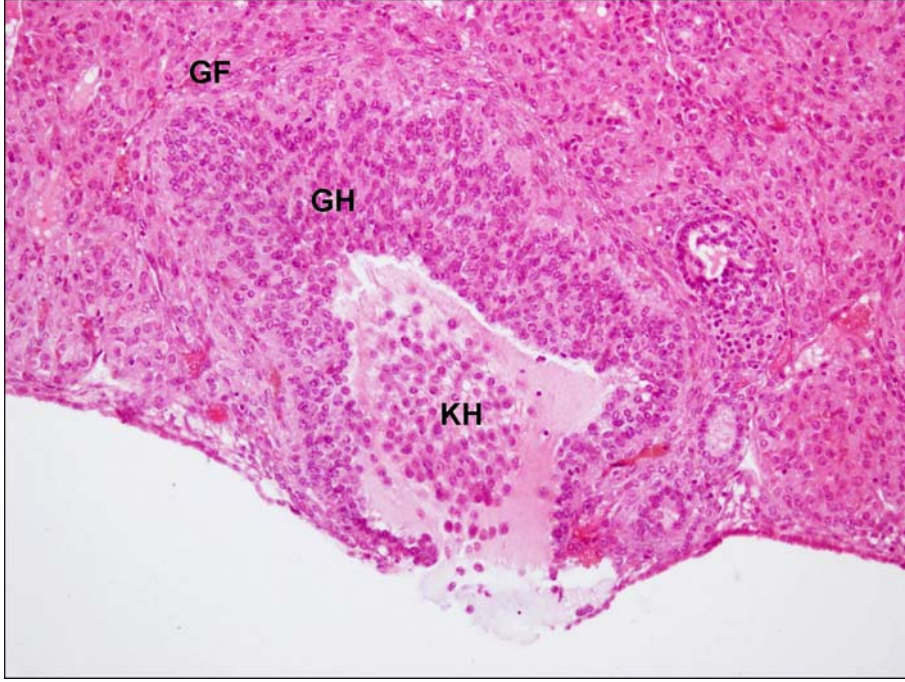
Radyasyon + Süperovulasyon I Grubuna Ait Işık Mikroskopik Fotoğraflar



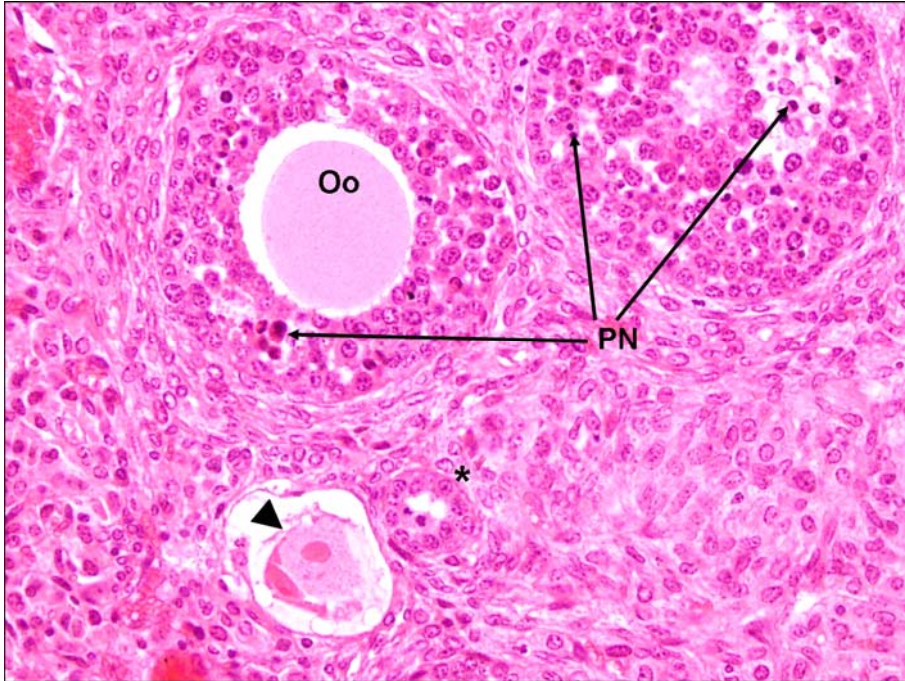
Resim 67. Radyasyon uygulamasının ardından süperovule edilen deneklere ait ovaryum kesitlerinde ovulasyon öncesi aşamada atreziye uğramış çok sayıda Graaf folikülü (*) gözlenmektedir. H+E, X 40.



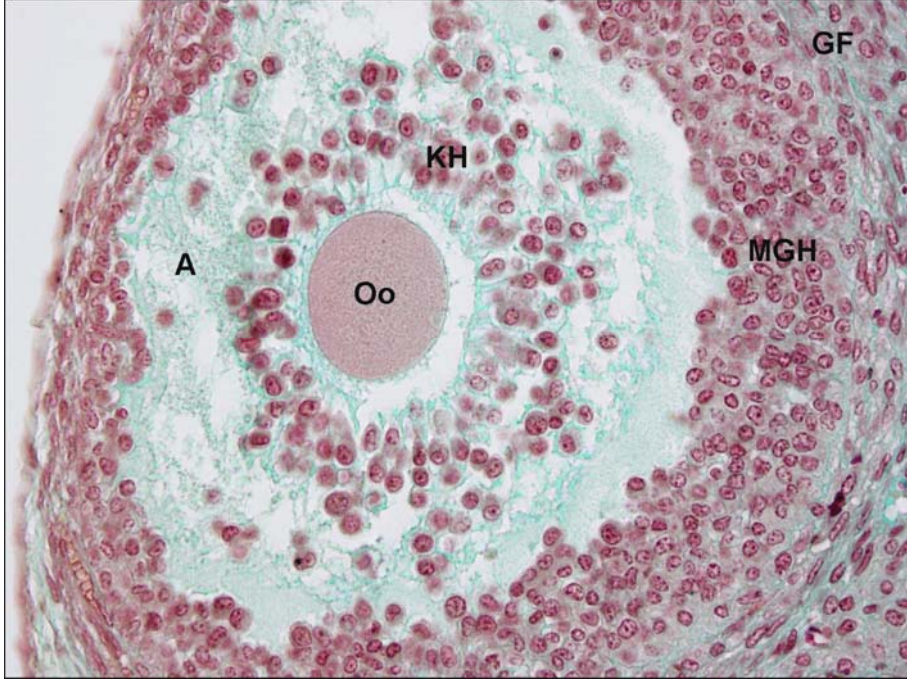
Resim 68. Germinal epitelin (GE) yassı epitelden oluştuğu bu bölgede Tunika albuginea (TA) içerisinde primordial foliküllere rastlanmazken, ovarian stromada foliküller etrafında dilate olmuş çok sayıda kan damarı (K) bulunmaktadır. X: Atretik folikül, Oo: Oosit. H+E, X 400



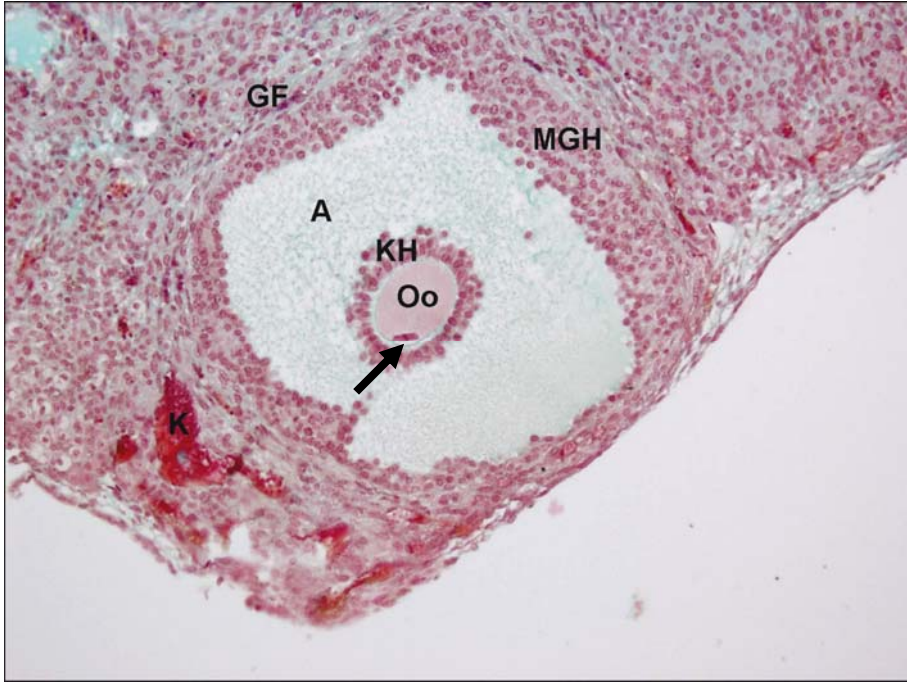
Resim 69. Graaf folikülünde (GF) ovulasyon anında genişlemiş kümülüs hücreleri (KH) ile birlikte foliküler sıvının da atılmakta olduğu rüptür bölgesi gözlenmektedir. GH: Granüloza hücreleri. H+E, X 400.



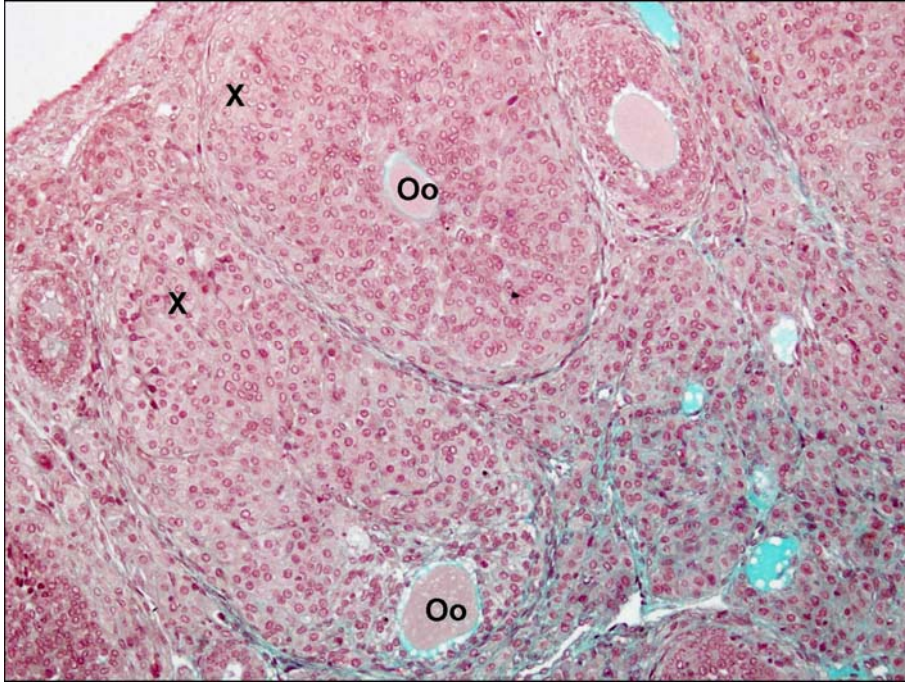
Resim 70. Ovariyan stroma içerisinde primer foliküllerde (*) radyasyona bağlı olarak oositler kaybolurken, büyük çaplı foliküllerde piknotik nükleus (PN) sayısında artış dikkati çekmektedir. İleri atrezi aşamasındaki folikülde dejenere olmuş fragmante oosit (►) yer almaktadır. H+E, X 400.



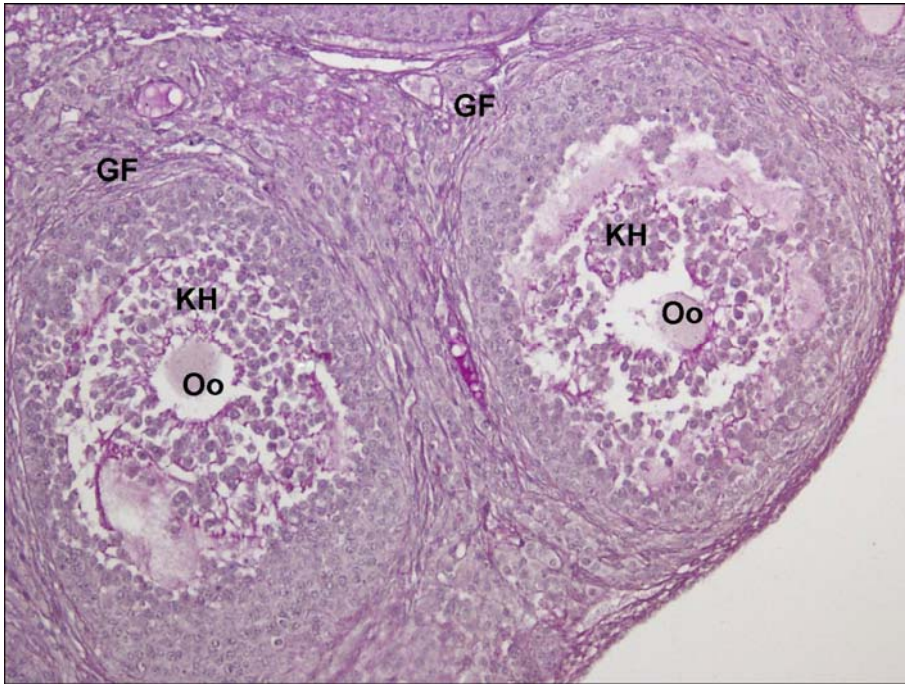
Resim 71. Ovulasyon öncesi aşamada atreziye uğramış Graaf folikülünde asitofil boyanmış oosit (Oo) etrafında genişlemiş kümülüs hücreleri (KH) antrumda (A) serbest halde gözlenmektedir. MGH: Membrana granuloza hücreleri. Masson Trichrome, X 400.



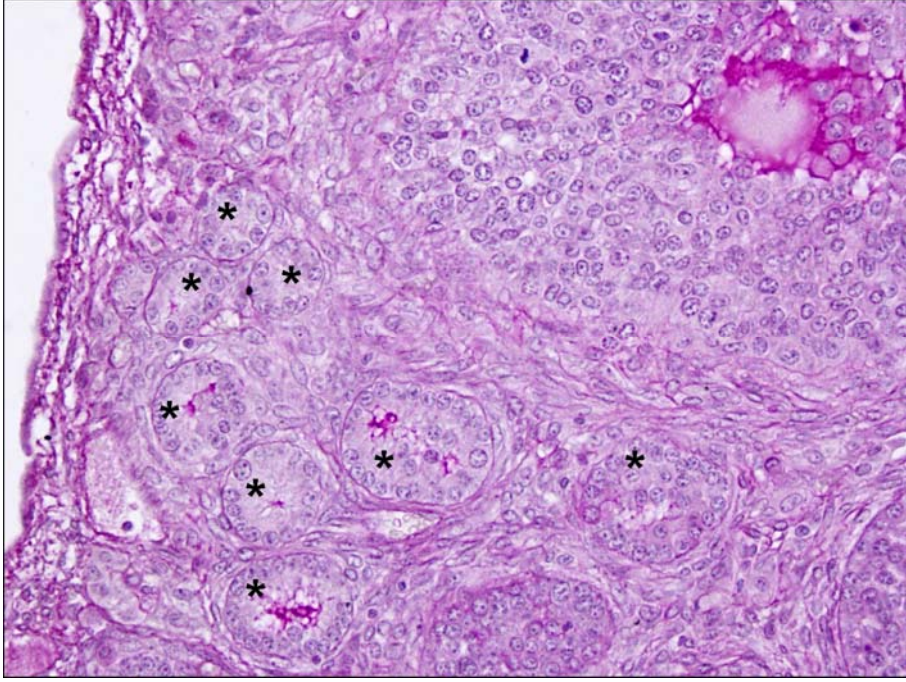
Resim 72. Graaf folikül (GF) aşamasında atreziye uğramış folikülün antrumunda (A) kümülüs hücreleriyle (KH) çevrelenmiş oosit (Oo) içerisinde pseudomaturasyon mekiğinin (→) oluştuğu gözlenmektedir. Stroma içerisinde eritrosit kümeleri ile dolu dilate olmuş kan damarları (K) dikkati çekmektedir. MGH: Membrana granuloza hücreleri. Masson Trichrome, X 200.



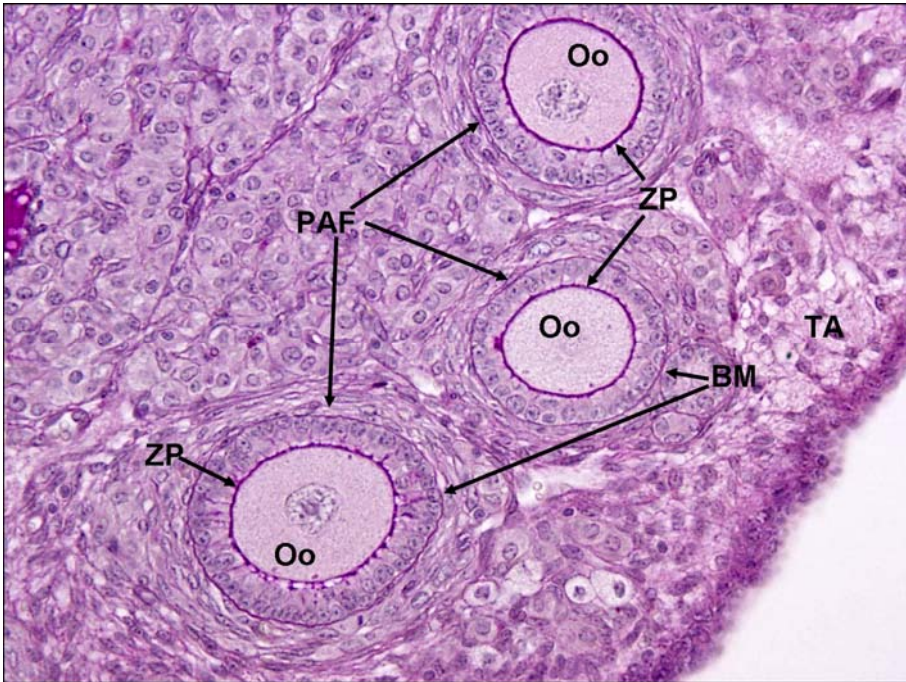
Resim 73. Granüloza hücrelerinin erken lüteinizasyonu sonucu folikülün (X) korpus luteum görünümüne sahip olduğu ve içerisinde dejeneratif oositleri (Oo) bulundurduğu izlenmektedir. Masson Trichrome, X 200.



Resim 74. Ovulasyon öncesi aşamada atreziye uğramış Graaf foliküllerinde (GF) antrumda dejeneratif oositler (Oo) ile birlikte kümülüs hücreleri (KH) gözlenmektedir. PAS+HL, X 200.

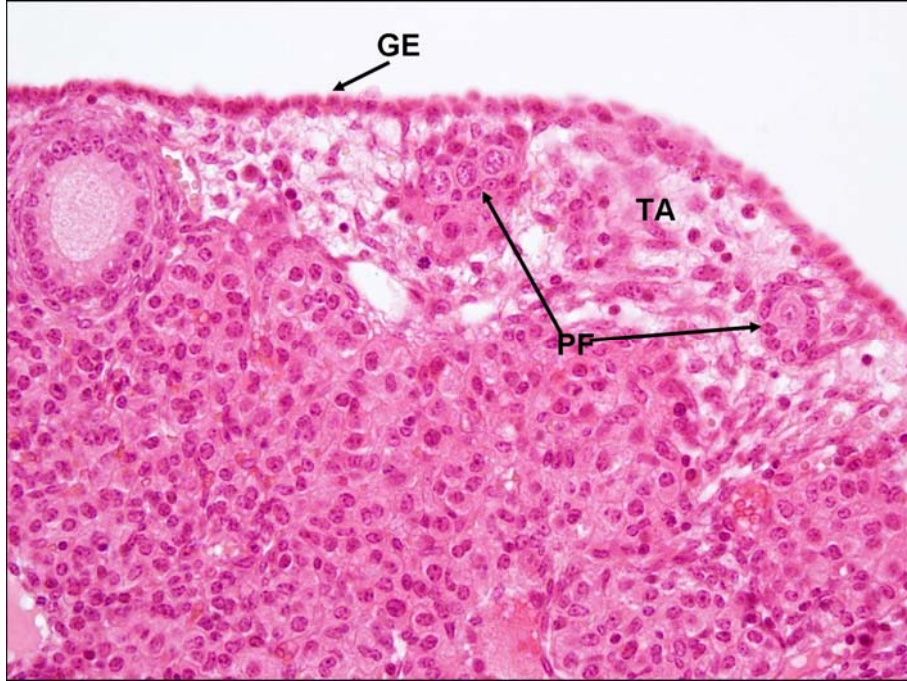


Resim 75. Ovariyan kortekste radyasyon etkisiyle oositlerini kaybetmiş ve lümende PAS(+) boyanma gözlenen küçük çaplı primer foliküller (*) dikkati çekmektedir. PAS+HL, X 400.

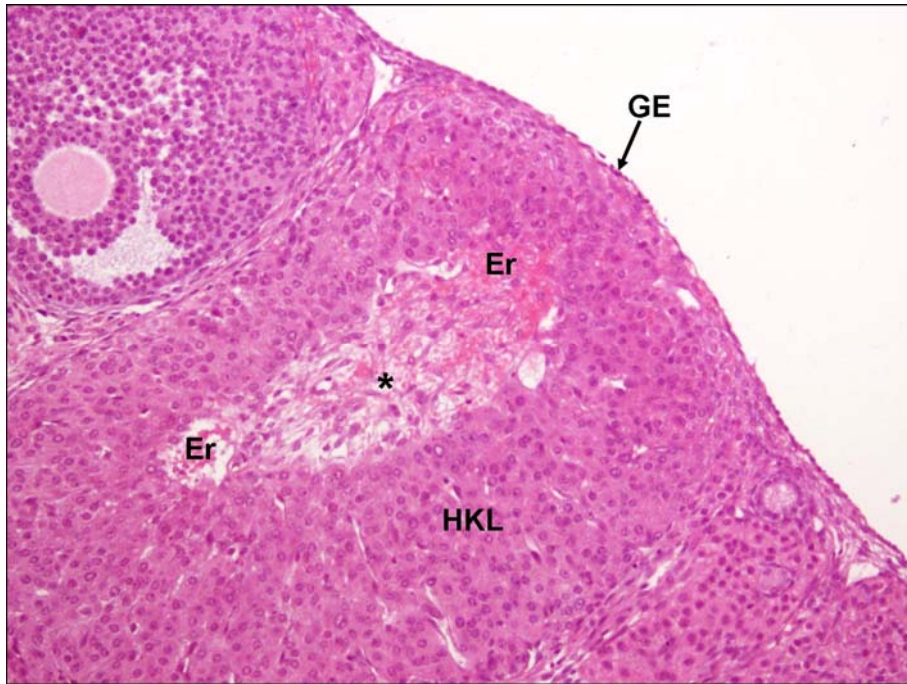


Resim 76. Radyasyon uygulamasını takip eden ilk östrus siklusunda süperovule edilmiş deneklere ait ovaryumda tunika albuginea (TA) içerisinde primordial foliküller gözlenmezken, ovariyan stromada düzenli ve PAS(+) boyanan bazal membranlara (BM) sahip normal görümlü preantral foliküller (PAF) dikkati çekmektedir. ZP: Zona pellucida, Oo : Oosit. PAS+HL, X 400.

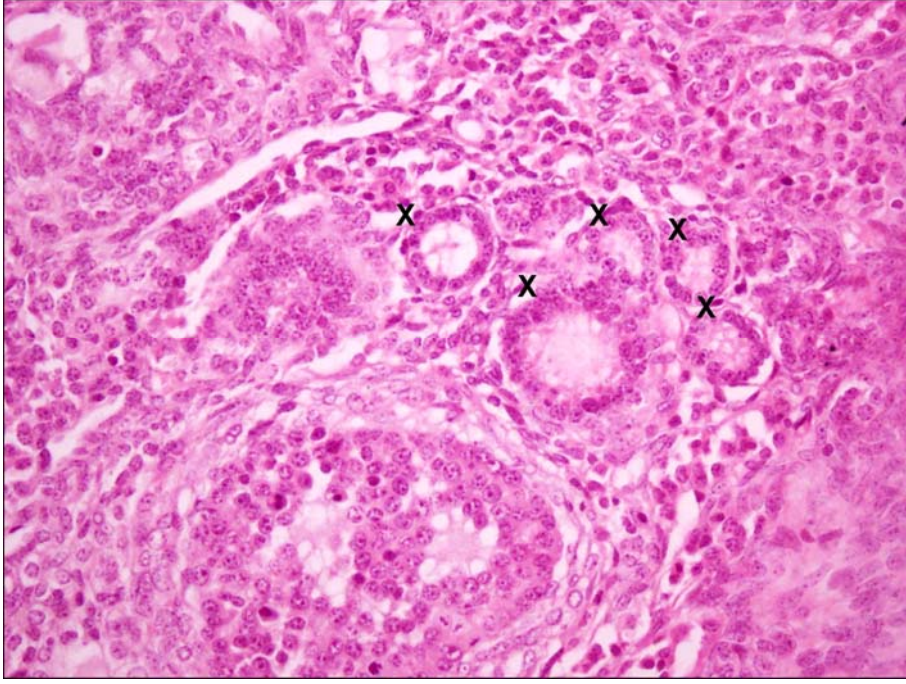
Radyasyon + Süperovulasyon II Grubuna Ait Işık Mikroskopik Fotoğraflar



Resim 77. Radyasyon uygulamasını takip eden ikinci östrus siklusunda süperovule edilen deneklere ait ovaryum kesitinde, tek katlı kübik epitelten oluşan germinal epitel (GE) altındaki tunika albuginea (TA) içerisinde normal görümlü primer foliküller (PF) izlenmektedir. H+E, X 200.



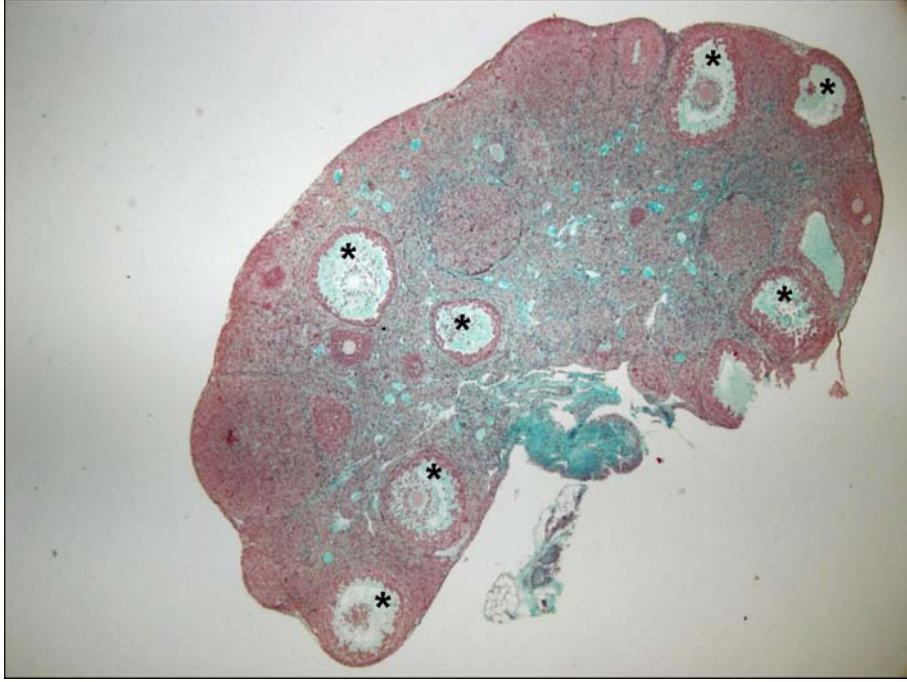
Resim 78. Oositin folikülden atılmasının ardından, folikül lümeninde eritrositlerin (Er) varlığı ile birlikte bağ dokunun (*) gelişmekte olduğu hemorajik korpus luteum (HKL) gözlenmektedir. GE: Germinal epitel. H+E, X 200.



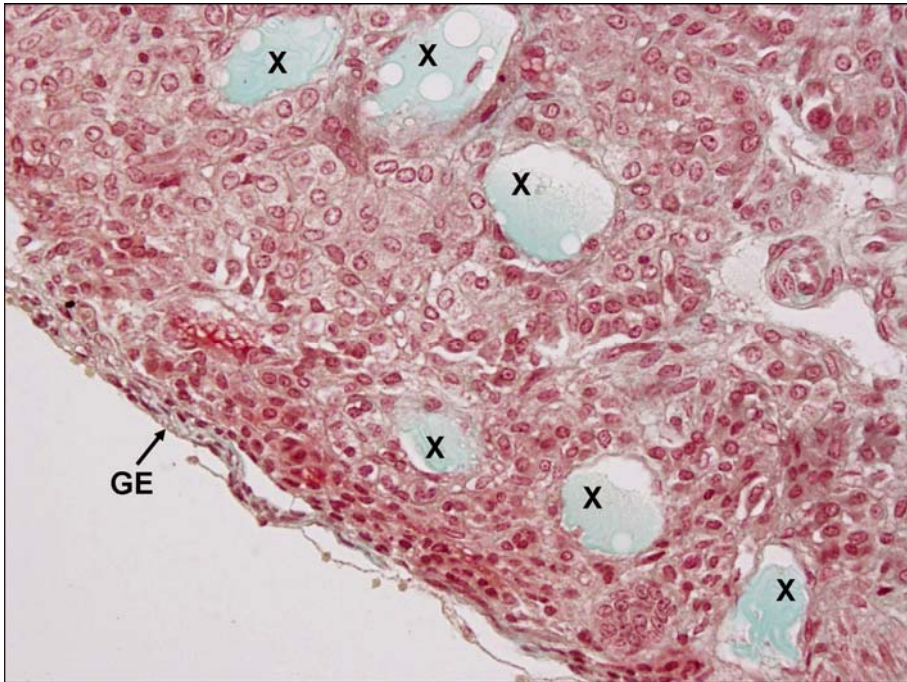
Resim 79. Radyasyon uygulamasını takip eden ikinci östrus siklusunda süperovule edilmiş deneklere ait ovaryum kesitinde oositlerini kaybetmiş çok sayıda küçük çaplı primer folikül (X) gözlenmektedir. H+E, X 400.



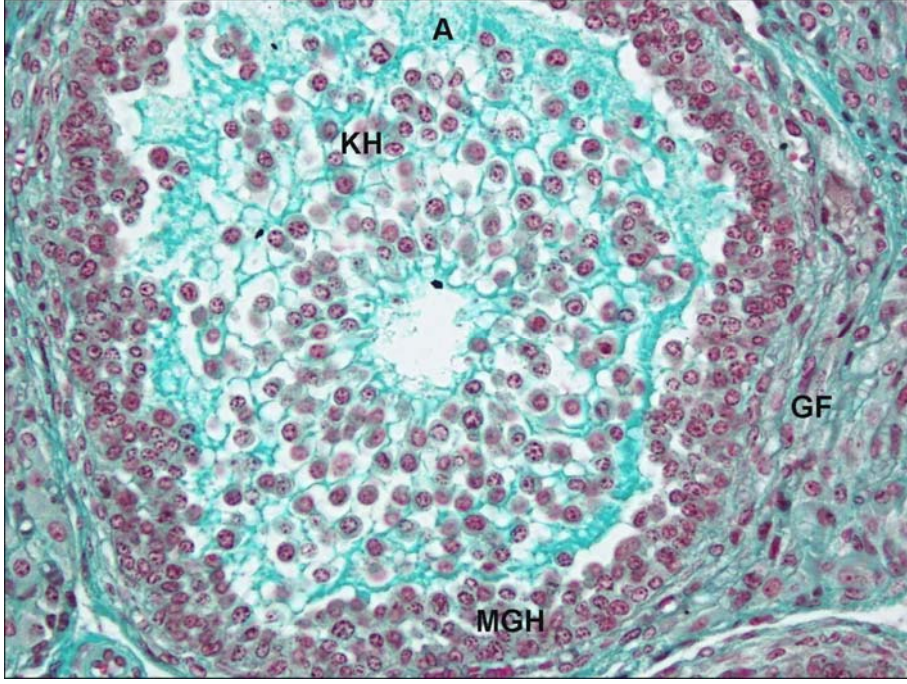
Resim 78. Antral aşamadaki atretik folikülde (X) asidofil boyanmış oositin (Oo) fragmentasyonları (*) ile birlikte granüloza hücreleri (GH) arasında apoptotik cisimler (→) gözlenmektedir. H+E, X 400.



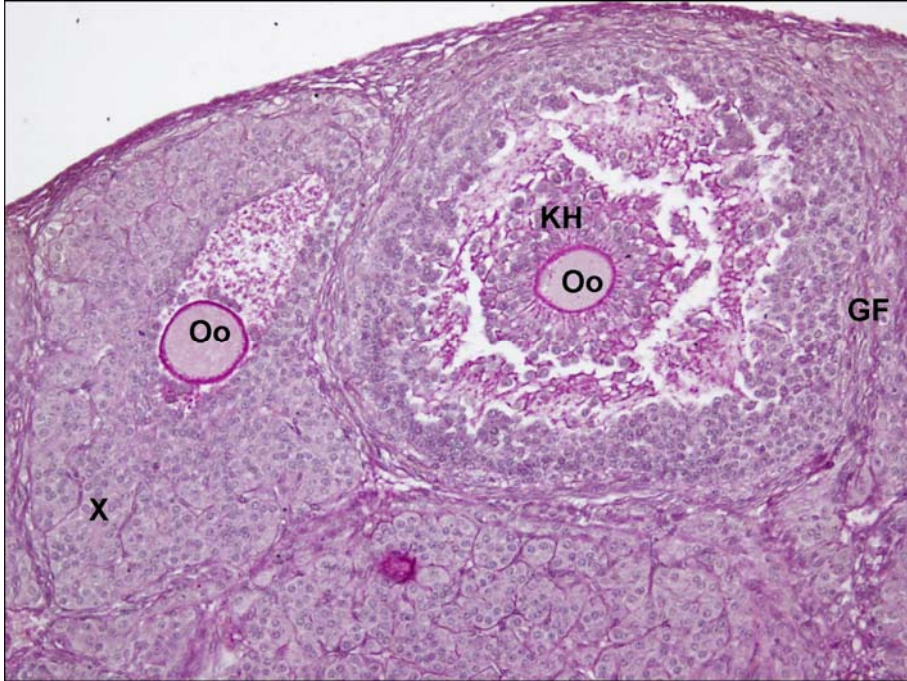
Resim 81. Ovulasyon öncesi aşamada atreziye uğramış çok sayıda geniş çaplı folikül (*) ovaryum kesitinde görülmektedir. Masson Trichrome, X 40.



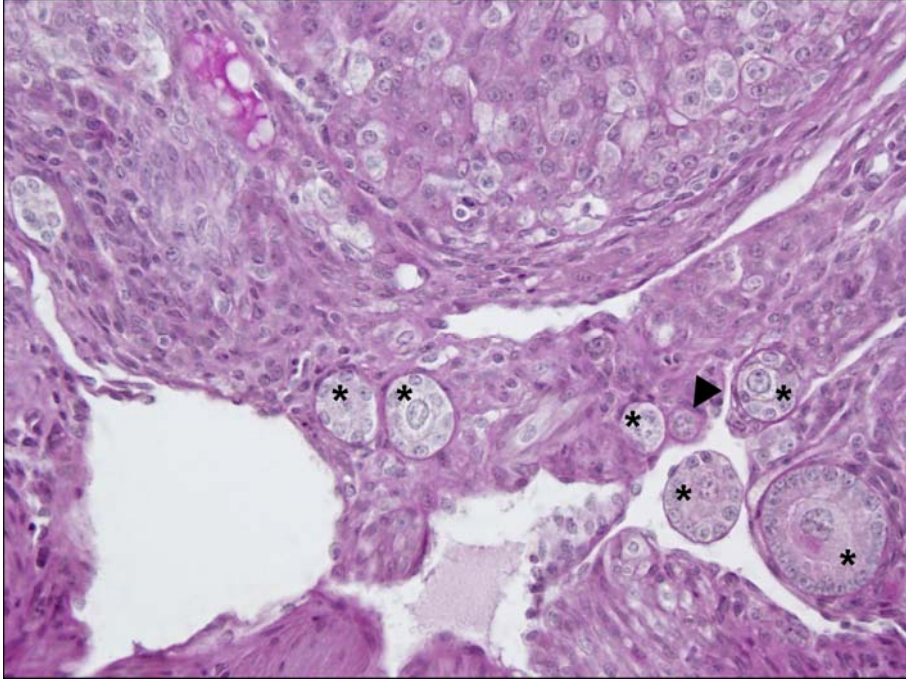
Resim 82. Tek katlı yassı epitelden oluşmuş germinal epitel (GE) altında ovarian kortekste asidofil lümenine sahip çok sayıda atretik folikülün (X) varlığı dikkati çekmektedir. Masson Trichrome, X 400.



Resim 83. Oositin gözlenmediği Graaf folikülünde (GF) az saydaki granüloza hücrelerinin folikülün periferinde membrana granüloza hücreleri (MGH) şeklinde yerleşmiş olup, folikülün antrumunda (A) genişlemiş kümülüs hücrelerinin (KH) yer aldığı gözlenmektedir. Masson Trichrome, X 400.



Resim 84. İçerisinde dejeneratif oosit (Oo) bulunduran erken lüteinize olmuş folikülün (X) yanında ovulasyon öncesi aşamada atreziye uğramış Graaf folikülü (GF) lümeninde kümülüs hücreleri (KH) ve dejeneratif oosit gözlenmektedir. PAS+HL, X 200.



Resim 85. Ovaryumun hilus bölgesine ait bu görüntüde küçük çaplı primer foliküller (*) arasında seyrek olarak yerleşmiş primordiyal foliküllerin (►) varlığı gözlenmektedir. PAS+HL, X 200.

TARTIŞMA

Memeliler, sayısı ftal hayatta belirlenen oosit stoğu ile doğarlar ve bu stoğun atrezi ya da ovulasyon sonucu tükenmesi menapoz olarak tanımlanır. İnsanda menapoz, menstrual kanamanın gerçekleşmemesi ile karakterizedir ve 50 yaş civarında gözlenir (8). Farelerde endometrial kanama olmadığından, yaklaşık 12. ayda vajinal smearde persistant kornifikasyon ve ardından persistant diöstrus izlenmesi ile anlaşılmaktadır (12).

Üreme döneminin başlarında kanser teşhisi almış kadınlarda pelvik, abdominal ya da tüm vücut radyoterapi ile maruz kalınan yüksek doz iyonizan radyasyonlar, sağ kalım oranını artırmaktadır (35). Bununla birlikte yüksek doz radyoterapi, gonadal disfonksiyon ve premature ovarian yetmezlik (erken menapoz) gibi önemli yan etkilere neden olmaktadır (6). Ayrıca radyasyon etkisiyle oositlerde oluşacak kromozomal bozukluklar yavru bireylere de aktarılabileceğinden, tedavinin genetik etkileri de izlenmektedir (20,102). Nitekim Baker (14) oositlerde mutasyon oluşturmayan radyasyon dozunun bulunmadığını bildirmiştir.

Genel populyasyonda infertilite oranı %15 olarak tahmin edilmektedir. İnfertil olguların %25'i ise ovarian disfonksiyon ile ilişkilidir (58).

Radyasyon alanından ovaryumların uzaklaştırılması (oophoropexy), pelvik ya da abdominal ışınlamalarda koruyucu bir yöntem olarak uygulanmakla birlikte, tüm vücut ışınlamalarda etkili olamamaktadır (27). Ayrıca invaziv bir yöntem olması nedeniyle kanserli hücrelerin dağılmasına neden olabileceği için riskli olduğu kabul edilmektedir. Bunun dışında oosit, embriyo ya da ovaryum dokusunun dondurulması da son dönemde kullanılan koruyucu yöntemlerdir. Medikal bir yöntem olarak GnRH analogları ile gerçekleştirilen koruma, invaziv işlem gerektirmeyen ve bugün için en olumlu sonuçları veren yöntemler olarak bilinmektedir (2). Ancak, yukarıda bahsedilen yöntemlerin tümü üzerinde hala deneysel

araştırmalar yapılmaktadır ve daha çok in vitro kültür çalışmalarıyla elde edilen sonuçların tam olarak kliniğe adaptasyonları gerçekleşmemiştir (37).

Oositlerin rejenerasyonunun olmadığı kabul edilir ancak, ilk defa 2004 yılında, Johnson ve ark. (103) tarafından yürütülen çalışmalar ile ovaryumda kök hücrelerin varlığından bahsedilmiştir. Bu çalışmada, kök hücre kaynağı olarak germinal epitel düşünülmüştür ve mitotik aktivasyon sonucu primordiyal folikül sayısında artış gözlenmiştir. Buna karşın Tan ve Fleming (104), yüzey epitelinden ovulasyon alanına kadar olan alanda proliferen olmuş hücreye ait nükleer antijenin düşük immün reaktivite gösterdiğini bildirmiştir. Genellikle ovaryumda primordiyal folikül sayısını artıran kök hücrelerin hematopoetik kaynaklı olduğu hatta, kemik iliği transplantasyonu sonrasında spontan gebeliklerin gözlenmesinin, kemik iliğinden ovaryuma taşınan kök hücreler ile gerçekleşebileceği kabul edilmektedir (11, 105). Deney hayvanlarında ve kültür ortamlarında elde edilen bu sonuçlar henüz netlik taşımamaktadır. Bu yüzden hem ovarian rezerv değerlendirme kriterleri hem de oosit stoğunu koruyucu yöntemlerin geliştirilebilmesi için daha çok deneysel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Fertilite ile ilgili deneysel çalışmalarda, dikkate alınan değerlendirme kriterleri sonucun anlamlılığı açısından önem taşımaktadır. Kimmel (38), planlanan çalışmada vajinal açıklık yaşı, vajinal sitoloji, siklus süresi, oosit populasyonunun tahribatı, çiftleşme zamanı, gestasyon uzunluğu ve östrus siklusu fazına bağlı olarak üreme organı ağırlığı gibi kriterlerin bulundurulmasını önermektedir.

Genç erişkin 6-7 haftalık, dişi fareler kullandığımız çalışmamızda, vajinal smear yöntemi ile östrus siklusu takibi yaparak, 4-5 günlük siklusa sahip denekleri deneye dahil ettik. Radyasyon uygulaması için ise, hormonal kontrol altında fonksiyon gören ovaryumun luteal fazdan, foliküler faza geçiş dönemini seçtik. Farelerde bu dönem diöstrus fazından proöstrus fazına geçiş aşamasına karşılık gelmektedir. Diöstrus fazı, foliküler büyümenin daha az olup, ovarian ve gonadotropik hormonların ovaryumda daha az değişikliğe neden olduğu uzun bir dnemdendir. Bu dönemde ovaryumda foliklogenizin antral aşaması görülmektedir (32,106,107). Proöstrus fazı ise, hormon seviyelerinin yükseldiği, foliküllerin hızlı bir büyüme ve farklılaşma sürecine girerek ovulasyon öncesi aşamaya kadar ulaştığı kısa bir dnemdendir (108). Ovaryumda foliklegenizin preovulatuvar aşaması gözlenir (32,107).

Çalışmamızda kullandığımız 7,2 Gy tek doz, tüm vücut radyasyon, uygulamayı takip eden birinci ve ikinci ovulasyon dönemlerinde hem ovulasyon oranları hem de ovaryum morfolojisinde değişikliklere neden olmuştur. Ancak, radyasyon uygulamasının ardından vajinal smearlerde, fazlara özgü hücre oranlarında ya da karakterinde değişiklik saptanmadı.

Radyasyon sonrasında, ikinci ovulasyona kadar takip edilen radyasyon II ve radyasyon+süperovulasyon II grubu deneklerden sakrifikasyon zamanına kadar alınan smearler değerlendirildi ve sadece 8 denekte siklus süresinin normalden ($p<0.05$) uzun olduğu gözlemlendi. Geri kalan deneklerin bir çoğunda, kornifiye hücrelerden oluşan östrus fazına ait smear sayısı, bir gün yerine birkaç gün gözlenirse de bu ortalama siklus süresini belirgin olarak değiştirmemişti. Nitekim, yüksek radyasyon dozlarında vajinal siklusun bir süre düzenli devam ettiğini bildiren çalışmalar bulgularımızı desteklemektedir (109,110). Bunun nedeni olarak ise ovaryumda hayatta kalabilen foliküllerin ovarian döngüyü devam ettirebilecek hormon desteğini sağlaması gösterilmektedir (23).

Bazı çalışmalarda radyasyondan sonra östrojen üretimi geciktiğinden daha az vajinal siklus gözlenebildiği bildirilmiştir. Hipofiz radyasyondan sonra kendine yeni bir duyarlılık eşiği oluşturabilir (111).

Çalışmamızda, radyasyon uygulanmış gruplarda ovaryum kesitlerine bakıldığında, primordiyal ve küçük çaplı primer foliküllerin kontrol ve sham gruplarına oranla daha az olduğu gözlenmiştir. Bu tip foliküllerdeki hasar oosit kayıpları şeklinde olduğundan ovarian stoğun azalmasına dair direkt bir bulgu sunmaktadır.

İyonizan radyasyon ile primordiyal ve küçük çaplı primer foliküllerde oositlerin yok olduğu ya da piknotik nükleusları nedeniyle koyu renkli göründükleri bildirilmiştir. Çeşitli iyonizan radyasyonlar kullanılarak ovaryumda sayısı en çok azalan foliküllerin, bu tip küçük foliküller olduğuna dair pek çok morfolojik ve istatistiksel çalışma bulunmaktadır (24-26,112).

Guigon ve ark.(112), ratlarda ışınlamanın ardından, oositin yok olduğu küçük çaplı primer foliküllerin varlığını bildirmiştir. Morfolojik olarak bu foliküllerde bir bazal membran üzerinde 4-8 adet kübik hücre gözlenmiştir.

Ovaryumda hormonlar kadar oosit ve granüloza hücreleri tarafından sentezlenen parakrin faktörler de folikülün hayatta kalmasında etkili görülmektedir (113,114). Parakrin faktörlerin varlığı 2-3 tabakalı granüloza hücrelerine sahip preantral foliküllerden itibaren tespit edilmiştir (16). Bu yüzden, küçük çaplı foliküllerde oosit ve foliküler hücre olgunlaşması gerçekleşmediğinden radyasyona karşı direnç gösterememektedirler (89).

Ayrıca primordiyal foliküllerde kaspaz 2'nin yüksek oranda gözlenmesi nedeniyle apoptozis aracılı atreziye duyarlı oldukları öne sürülmektedir (89).

Çalışmamızda radyasyon gruplarına ait ovaryum kesitlerinde en çok rastlanan sağlıklı foliküller, 2-3 tabakalı preantral aşamadakiler idi. Bu tip foliküller, radyasyon I ve radyasyon+süperovulasyon I gruplarında daha fazla gözlemlendi.

Ovariyan foliküller, preantral aşamadan itibaren gonadotropin bağımlı duruma gelmektedirler. Preantral folikülde granüloza hücreleri spesifik FSH reseptörleri bulundurmaktadır ve FSH varlığında, folikül kendi mikroçevresini oluşturmak üzere sınırlı miktarda androjenleri aromatize edebilmektedir. Böylece östrojen yapımı FSH reseptör içeriği ile sınırlandırılmaktadır. FSH reseptörleri folikülün başlangıç büyümesi üzerine, granüloza hücreleri plazma membranında hemen ortaya çıkmakta ve kısa sürede 1500 reseptör/granüloza hücreleri konsantrasyonuna ulaşmaktadır. FSH, östrojen ile birlikte hareket ederek, granüloza hücrelerinde sinerjistik mitotik etki gösterir ve proliferasyonunu uyarır (30). Bu yüzden preantral ve antral foliküler hücrelerinde mitotik figürlere sıklıkla rastlanmaktadır. Çalışmamızda kontrol gruplarında, gelişmekte olan foliküllerin granüloza hücreleri arasında mitotik figürler çok sayıda iken, radyasyon uygulanmış tüm gruplarda oldukça nadir gözlenmiştir.

Kaya ve ark.'nın (29) çalışmalarında da radyasyon uygulamasından 16 saat sonra TUNEL (+) primordiyal ve antral folikül sayısında %42 ve %12 artış gözlenirken, preantral aşamadaki boyanma anlamlı bulunmamıştır. Jarrel ve ark. (111) ile Ataya ve ark. (115) da radyasyon uygulamaları ardından preantral aşamadaki foliküllerin normale yakın morfoloji gösterdiğini bildirmiştir. Anti-apoptotik protein bcl-2'nin preantral foliküllerde yüksek oranda bulunması, bu foliküllerin radyasyon hasarından korunmalarını sağlayan bir faktör olarak düşünülmektedir (116).

Radyasyon etkisini özellikle mitoz aktivitesi yüksek hücrelerde göstermektedir (3) ve foliküler hasar apoptozis mekanizmaları üzerinden oluşmaktadır (51,92,115). Radyasyon, DNA hasarı oluşturup endonükleazları aktive etmekte ve hücre içi sinyaller aracılığıyla kaspaz sistemini harekete geçirmektedir. Atretik foliküllerin granüloza hücrelerinde kaspaz 3 ve 9 varlığı, TUNEL tekniği kullanılarak tespit edilmiştir (29,89). Oositte tamir mekanizmalarının sınırlı olması nedeniyle, radyasyon kaynaklı DNA zincir kırıklarının kromozom anomalileri ve oosit kayıplarından sorumlu olduğu düşünülmektedir (117).

Foliküler atrezide apoptozisin başlıca göstergesi piknotik granüloza hücreleri nükleuslarıdır (94,117). Çalışmalarda granüloza hücreleri tabakasında 2 ya da daha fazla sayıda piknotik nükleus bulunduran folikül atretik kabul edilmiştir (119). Takagi ve ark.'na göre (60), piknotik hücrelerin atreziye neden olması 2 hücre 2 gonadotropin kuralı ile açıklanabilmektedir: Bu teoriye göre, foliküle FSH sağlanmasındaki bir eksiklik, foliküldeki granüloza hücrelerinde östrojen üretiminde azalmaya neden olur. Bu durumda, yetersiz östrojen folikül gelişiminde duraksamaya neden olur. Seradaki gonadotropinlerin azalması

steroid hormonların ve hücre siklik faktörlerinin salınımını etkileyerek homeostazisi bozar ve granüloza hücrelerinde apoptozisi, ovaryumda ise foliküler atreziyi indükler.

Atrezinin diğer morfolojik göstergelerinden biri de apoptotik cisimlerdir. Radyasyon gruplarında preantral safhada granüloza hücreleri tabakası içerisinde, antral aşamada ise daha çok antrumda apoptotik cisimlere sıklıkla rastladık. Hirshfield (118), apoptotik cisimleri içlerinde daha çok nükleus parçalarının bulunduğu, membranla çevrili antral cisimler olarak tanımlamıştır. Radyasyona bağlı olarak foliküler atrezinin incelendiği bazı çalışmalarda antrumda makrofajların gözleendiği ve apoptotik cisimler içinde makrofaj nükleusunun bulunduğu bildirilmiştir (17). Kim ve ark (25), prepubertal farelerde radyasyonun ardından bazal membranın bütünlüğü bozulduğu için infiltre olan nötrofilleri bildirmişlerdir. Bazı çalışmalarda ise atreziye, prepubertal dönemde nötrofillerin, puberte sonrasında ise makrofajların katıldığı bildirilmektedir (52). Son dönemde, apoptotik proeste inflamasyon gelişmediği için, folikülde hücresel atıkları fagosite eden hücrelerin polimorfonükleer hücrelerden çok granüloza hücreleri benzeri hücreler olduğu bilgisi kabul görmektedir. Devine ve ark. (120), folikül lümenindeki bu hücrelerin, granüloza hücrelerinin gap tipi bağlantılarına sahip olduğunu elektron mikroskopik incelemelerinde belgelemiştir.

Çalışmamızda radyasyon uygulanmış gruplarda, antral ve daha ileri foliküler gelişim aşamalarındaki foliküllerde, erken atretik değişiklik olarak granüloza hücreleri ve oosit-kümüls hücreleri arasında bağlantıların zayıfladığını gözlemledik. Devine ve ark. da (120), primer ve daha büyük foliküllerin erken atretik belirteci olarak, granüloza hücreleri apoptozu ve oosit-granüloza hücreleri kontağında kayıpları bildirmiştir. Elektron mikroskopik olarak ise granüloza hücrelerinin oosite doğru olan mikrovilli uzantılarında kayıplar gözlenmiştir (120,121).

Çok sayıda deneysel veri, plazma membranı akıcılığındaki bozulmanın radyasyon hasarının karakteristik bir özelliği olduğunu göstermektedir. İyonize radyasyona akut dönemde yanıtın karakteristik özelliği dezmozomları, adhrens bağlantıları ve sıkı bağlantıları içeren hücrelerarası bağlantıların hasarlanmasıdır. X ya da γ ışınlamayı takiben, geri dönüşümlü olarak hücreler arası sahada önemli ölçüde genişlemenin ortaya çıktığı bildirilmiştir (122).

Oosit ile granüloza hücreleri arasındaki bağlantılar bu iki tip hücrenin gelişip farklılaşması, oositin olgunlaşması ve folikül büyümesinin ilerlemesi açısından kritik öneme sahiptir. Sıkı bağlantı yapısındaki kompleksler, temel olarak konneksin proteini içerir. Konneksin 43 eksikliği bulunan farelerde folikül gelişimi erken preantral aşamadan ileriye

gitmezken (123,124), oosit ile kümülüs hücreleri arasında yer alan konneksin 37 eksikliği ovulasyonun gerçekleşmemesine neden olmaktadır (125).

Radyasyon ardından, daha az yoğun hale ile çevrilmiş, yüzük benzeri kromatin agregatları olarak görülen nükleer cisimcikler saptanmıştır. Bu oluşumların pre-mRNA ve pre-rRNA'nın transport veya üretiminde artışla birlikte ortaya çıktığı sanılmaktadır. Morales ve ark. (126) tarafından nükleolus sayısı ve nükleolar organizatör bölgelerin ortalama hacminin ışınlamadan sonra belirgin olarak artabileceği bildirilmiştir. Bu olay nükleusun transkripsiyonel aktivitesinin radyasyona bağlı artışından kaynaklanabilir. Somosy (122), düşük doz ışınlamaya yanıt olarak nükleer lamina altında marjinal kromatin yoğunlaşması ve nükleer matriks içinde geniş, yoğun kromatin kümelerinin oluştuğunu bildirmiştir. Biz de granüloza hücre nükleuslarında bu tip kromatin yoğunlaşmalarına rastladık.

Çalışmamızda atretik oosit sitoplazmalarını, granüloza hücre tabakası içerisindeki apoptotik hücre sitoplazmalarını ve atretik foliküle ait foliküler sıvıyı H+E boyasında koyu pembe, PAS+HL boyasında şiddetli PAS (+) ve Masson trichrome boyasında yeşil renkte gözlemledik. Atretik foliküllerde, oosit sitoplazmasında hücre kalıntılarını içeren sekonder lizozomların artmasından dolayı eozinofilik (120,121) ve PAS(+) boyanma gözlenmektedir (127).

İleri antral seviyedeki foliküllerde atretik değişiklikler, granüloza hücreleri arasında piknotik nükleuslar ve apoptotik cisimlerin varlığının yanında, ileri seviyede granüloza hücre sayısında şiddetli azalma ve oosit dejenerasyonlarını içermekte idi. Osman (59)'nın çalışmasıyla uyumlu olarak, oositte fragmantasyonlar ve ZP'nin katlantılı hal alması, ileri atretik değişiklikler olarak gözlemlendi.

Çalışmamızda radyasyon I ve II gruplarında ovulasyon oranları kontrol grubuna oranla anlamlı olarak azalırken, vajinal sitolojide değişiklik gözlenmedi. Ayrıca radyasyon uygulamasının ardından ovaryum indüksiyonu yapılan deneklerde de ovulasyon oranı oldukça azalmıştı. Bu deneklere ait histolojik kesitlerde ovule olamamış matur folikülleri gözlemlememiz, radyasyona bağlı olarak ovulasyon mekanizmasının hasarlanmış olabileceğini düşündürmektedir. Bulgularımızla paralel olarak Duncan ve ark. (109), prematüre ovarian yetmezliğin erken aşamadaki belirtilerini normal seyreden menstrüel siklus, yetersiz ovarian fonksiyonlar ve serum gonadotropin seviyesinde artış şeklinde ifade etmiştir.

Ayrıca radyasyon uygulaması sonrasında, PMSG (FSH) uygulaması folikül gelişimini sağlayarak antral folikülü atreziden korumuşsa da, hCG'ye (LH) verilen yanıt yetersiz olduğundan ovulasyon oranı düşmüş olabilir. Buna karşın, Jacquet ve ark (22), in vitro

çalışmalarında, radyasyon uygulamasından sonra hem folikül gelişiminin hem de ovulasyonun sorunsuz gerçekleştiğini bildirmiştir.

FSH maruziyeti geniş antral folikülü atreziden koruyan bir olaydır. Rodentlerde oldukça kısa bir luteal faz vardır ve perioovuluar dönemdeki FSH salınımı sonraki siklusta ovulasyona gidecek folikül seçimi için önemlidir (89,128). Çalışmamızda farelerde radyasyon uygulamasını diöstrus-proöstrus geçiş döneminde gerçekleştirdik. Bu dönemde ovaryuma hakim olan yapılar antral foliküllerdir (108). Radyasyon uygulamasından bir gün sonra, proöstrus-östrus geçiş döneminde uygulanan PMSG, hem ovulasyona ulaşacak antral folikül popülasyonunu hem de preantral foliküllerin gelişimini uyarmıştır. Radyasyon+süperovulasyon I grubunda, ovulasyon oranı oldukça düşük gözlenmiştir. Bu durum bize, PMSG'den bir gün önce radyasyon alan antral foliküllerde LH reseptörlerinin oluşmamış ya da LH cevabının gecikmiş olabileceğini düşündürmektedir. Bu yüzden, preovulatuvar aşamaya ulaşan bu foliküllerde ovulasyonun gerçekleşmediği kanısındayız. Doğal süreçte, preantral foliküllerin antral aşamaya geçiş dönemlerinin atrezi için oldukça hassas olduğu bildirilmiştir (16). Bununla birlikte atrezinin yüksek doz radyasyon ile indüklenmesi, foliküler dejenerasyonu daha da dramatik hale getirmiş olabileceğini düşünmekteyiz. Bu durumda, radyasyon+süperovulasyon I ve II gruplarında, rüptürün gerçekleşmediği preovulatuvar foliküller ovaryumda gözlenmiştir.

Radyasyon+süperovulasyon II grubunda, bir önceki siklusta seçilen antral folikül grubu, yani radyasyona maruz kalmış antral foliküller ve preantral folikül grubu PMSG ile uyarılmıştır. Radyasyon hasarının ilk birkaç günlük dönemde daha şiddetli olduğu bilinmektedir. İlk 4 gün foliküler dejenerasyon fazla iken, 8-10 gün sonra ovaryum morfolojisi kontrol grubuna yakın gözlenmiştir (24). Literatür ile uyumlu olarak, radyasyonu takip eden ikinci ovulasyon dönemindeki deneklerde spontan ve indüklenmiş ovulasyon oranlarını, ilk siklusa göre daha yüksek gözlemledik. Radyasyon uygulamasının ardından ikinci ovulasyona kadar ovaryumda tamir ya da eliminasyon için daha uzun süre olması nedeniyle, ovaryum morfolojisinin kontrole yakın gözlendiğini düşünmekteyiz.

Hücre bölünmesini G0'dan G1 fazına ilerletmeye yarayan siklin D2 gelişmekte olan foliküllerde granüloza hücrelerinden salınmaktadır. Siklin D2 eksikliği bulunan farelerde ovulasyonun gerçekleşmediği ve oositin korpus luteum benzeri lüteinize bir yapı içinde kaldığı, ayrıca ovaryumda foliküler büyümenin küçük çaplı foliküllerden öteye gidemediği bildirilmiştir (63). Çalışmamızda radyasyon etkisi ile granüloza hücrelerinin hasara uğradığı ve gelişmekte olan foliküllerde sağlıklı hücre sayısının azaldığı histolojik bulgularımızla ortaya konulmuştur. Literatür ile ilişkili olarak radyasyon+süperovulasyon gruplarında

ovulasyon oranlarının düşük gözlenmesinin, granüloza hücrelerinin sayıca azalması ve bu hücrelerden ovulasyonun gerçekleşmesinde yardımcı faktörlerin yeteri kadar salgılanamamış olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Lee ve ark. (24), atretik foliküllerdeki LH reseptörlerinin sağlıklı foliküllerden daha az olduğunu bildirmektedir. Ovaryumda LH reseptörü ekspresyonundaki azalma nedeniyle, aşırı miktarda hCG ile bağlanan teka hücre tabakasında kalınlaşma gözlenmiştir (124). Lee ve ark (24), LD₅₀ gamma radyasyon dozları uyguladıkları rat ve farelerde, progesteron ve testosteron seviyelerinde artış, östradiol seviyesinde ise azalma tespit etmişlerdir. Fare teka hücrelerinde radyasyon etkisiyle hidroksi steroid dehidrogenaz ya da izomeraz enzimi inaktivasyonu gerçekleşebilir. Böylece fare ve ratlarda granüloza hücrelerinin aromataz aktivitesi engellenebilir (115). Bu durumda östradiol üretimi de azalacaktır. Ancak radyasyonun enzim inaktivasyonu oluşturduğuna dair direkt sonuçlar henüz elde edilmemiştir (24).

Çalışmamızda radyasyon ardından süperovulasyon uygulanmış dişilerden elde ettiğimiz ovulasyon oranları ile birinci ve ikinci ovulasyon dönemlerinde ovaryum fonksiyonlarında anlamlı azalmanın olduğunu gözlemledik. Ovariyan fonksiyonun değerlendirilmesi için bu güne kadar en güvenilir yol olarak, ekzojen gonadotropin uygulamaları kullanılmaktadır (2,109,129). Çalışmamızda FSH yerine PMSG ve LH yerine hCG kullandık. Her iki hormonun da uygulanması 17:30-18:00 saatleri arasında gerçekleştirildi. Tarin ve ark (85), günün bu saatinde yapılan uygulama sayesinde, ovulasyon zamanının tam olarak belirlenebildiğini ve spontan endojen LH salınımının engellendiğini bildirmiştir.

Duncan ve ark'na (109) göre, ekzojen gonadotropinlere normal yanıt, ovulasyona ulaşacak folikül sayısındaki artış nedeniyle progesteron seviyesinde yükselme şeklinde ortaya çıkmaktadır. Ancak radyoterapi ardından premature ovariyan yetmezlik gelişmiş kadınların çoğunda süperovulasyon uygulamasına cevap oluşmamaktadır. Çalışmamızda, radyasyon+süperovulasyon I ve II gruplarında ovulasyon oranlarının düşük olması, radyasyonun ovaryum fonksiyonunu hasara uğrattığını düşündürmektedir.

Ataya ve ark. (115), *Rhesus monkey* türü maymunlarda, Jarrel ve ark (109), ratlarda radyasyon ardından FSH seviyesinin yükseldiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar başlangıç radyasyon dozlarının E₂ ve inhibinin başlıca kaynağı olan gelişmekte olan folikülleri tükettiğini, böylece E₂ ve inhibin, FSH üzerine negatif feedback oluşturamadığından FSH seviyesinin arttığını öne sürmüşlerdir. Östradiol seviyesinin azalması ve FSH seviyesinde artış ovaryum fonksiyonlarında yetersizliğin göstergelerinden sayılmaktadır.

Çalışmamızda radyasyon sonrası ilk ovulasyon döneminde dahi ovaryum ağırlığında kontrole oranla anlamlı azalma gözlemlendi. Deneysel hayvanları ile yapılan çalışmalarda, radyasyon uygulamasından kısa süre sonra ovaryum ağırlığında kontrol gruplarına oranla azalma olduğunu bildirmiştir. Azalma genellikle ovaryumdan silinen foliküller ile ilişkilendirilmiştir (51,109,130).

Spontan ovulasyon grupları arasında hacim oranlarında fark gözlenmemesini, tüm deneklerde ovulasyonun gerçekleşip KL'ların oluşmuş olmasına bağlamaktayız. Normalde, süperovulasyon uygulaması yapılmış fare ovaryumlarında gerek çok sayıda KL varlığı gerekse ödemli ovarian stroma nedeniyle hacim artışı gözlenmektedir. radyasyon+süperovulasyon gruplarında ise, KL sayısı az olmasına rağmen hem ekzojen hormon uyarımı ile ovaryumun ödemli hal alması hem de Graaf folikül aşamasına ulaşmış ancak rüptüre olamamış foliküllerin varlığı nedeniyle ovarian hacim farklılığı oluşmadığı kanaatindeyiz. Bununla birlikte, son dönemde ovaryum hacminin değerlendirilmesi, ovarian rezervin değerlendirilmesinde kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır. Yapılan çalışmalarda ovaryum hacmi folikül deposunu yansıttığı için fertilité değerlendirmede önemli olduğu öne sürülmüştür (131,132).

Kromozom bozukluklarının değerlendirilmesi, iyonizan radyasyonun genetik riskinin anlaşılması için yaygın şekilde kullanılan iyi bir biyolojik belirteçdir. Kaldı ki, bir germ hücresi olarak oosit kromozomlarında meydana gelecek bozukluklar, embriyoya da aktarılacağından, bu tür bozuklukların tespiti oldukça kritik öneme sahiptir. Martinez-Flores (133), preovulatuvar dönemde 2 Gy X- ray uyguladığı oositlerde MII ve zigot aşamasında kromozomal anomali oranının yüksek olduğunu, 14 günlük embriyoda ise anomali gözlenmediğini bildirmiştir. Reichert ve ark (134), x-ray ile kromozom anomalisi oluşan embriyoların gelişimini tamamlayamayacağını öne sürmüştür. Streffer ve Müller (135) ise preimplantasyon döneminde X ışınlaması yapılan zigotlarda malformasyonların ya hep ya hiç kuralına göre gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Jacquet (23), radyasyon kaynaklı koromozomal hasarın oositlerin kaybına neden olduğunu öne sürmüştür. Radyasyon uygulama zamanı ile ovulasyon oranı arasındaki ilişki in vitro olarak Brewen (20) ve Russel (102) tarafından ortaya konmuştur. Russel ve ark (101), 6 haftadan daha önce yapılan ışınlama sonucunda mutasyonların sıfır değerine kadar düştüğünü görmüştür.

Preantatal foliküllerde kültürün 12. gününde, ovulasyon uyarımından 3 saat önce 2-4 Gy X-ray uygulamış ve ovule olmuş tüm oositlerin GV aşamasında olduğunu gözlemiştir. Bu

aşamadaki kromozom anomalileri kırıklar, fragmentasyonlar ve kromatid değişimleri şeklinde bildirilmiştir (22).

Jacquet ve ark.'a göre (22) radyasyon, ne foliküler büyümeyi ne de ovulasyonu etkilemiştir. Oosit maturasyonunun başlangıcını gösteren GVBD engellenmiştir. Ayrıca bu çalışmada bu güne kadar *in vivo* ışınlanmış fare oositlerinde GV aşamasında oosit bildirilmediği de belirtilmektedir.

Çalışmamızda radyasyon uygulanmış spontan ovulasyon gruplarında genellikle GVBD aşamasında MI oositler elde ettik. Geri kalan oositlerde MII aşamasındakiler ağırlıklı olmakla birlikte, az sayıda GV oosit ve birkaç boş zona pellusida gözlemledik. Oositlerin etrafında yer alan kümülüs hücreleri ise gevşek bir şekilde yerleşmişti.

IVF'te maturasyona ya da fertilizasyona uygun oositlerin seçilmesi oldukça önemli bir konudur. Genellikle fertilizasyon için, ovule oositlerin MII ya da GVBD aşamasında olması gerekmektedir. Eğer oosit maturasyonu uygulanacak ise, preantral ve antral foliküllerden GV aşamasındaki oositler aspire edilip, preovulatuvar aşamaya kadar maturasyonu sağlanmakta, daha sonra ekzojen hormonların ortama verilmesi ile ovulasyon gerçekleştirilmektedir (82).

Süperovulasyon gruplarında oositleri kümülüs hücrelerinden uzaklaştırma işlemini gerçekleştirmediğimiz için, maturasyon değerlendirmesini Wolf kriterleri (82) doğrultusunda oosit-kümülüs morfolojisine göre yaptık. Tüm gruplarda genellikle, etraflarında genişlemiş kümülüs hücrelerini bulduran olgun aşamada oositler elde ettik.

Morishita ve ark. (136), spontan ovulasyon ve indüklenmiş ovulasyon sonucunda elde edilen kümülüs-oosit komplekslerini kıyasladığında, indüklenmiş ovulasyon sonucunda tuba uterinadaki oositin sıkı paketlenmiş çok sayıda kümülüs hücresiyle birlikte bulunduğunu gözlemlemiştir. Spontan ovulasyon grubunda kümülüs hücrelerinin daha seyrek gözleniyor olmasını ise oositin yüksek fertilizasyon yeteneği ile ilişkilendirmiştir.

Ün ZP ve Ün M (137), *in vitro* maturasyon uyguladıkları sığır oositlerinde kümülüs hücrelerinin genişleme derecesine göre fertilize oosit oranlarını araştırdıkları çalışmada, genişleme ile oosit maturasyonu arasında güvenilir bir bağ olmadığını ortaya koymuşlardır. Genişleme görülmeyen oositler fertilize olabildiği gibi, yeterince genişleme gözlenen oositlerin fertilize olamadığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte Delilbaşı L. da (82), IVF laboratuvarlarında, oosit-kümülüs kompleksini Wolf ve ark.'nın kriterlerine göre değerlendirmenin subjektif olduğunu kabul etmektedir.

Süperovulasyon gruplarında daha fazla olmak üzere, tüm deney gruplarında nükleer membranın kaybolduğu oositlerde, mayoz bölünmesini tamamlama aşamasındaki oositlere rastladık. Atrezi belirtisi olan, kümülüs-oosit komplekslerinde organellerin yeniden

düzenlenmesi ve nükleer değişiklikler, dominant oositin final maturasyonuna benzer belirtiler göstermektedir. Bu olay pseudomaturasyon olarak tanımlanmaktadır (138). Atrezi folikülde post-LH değişikliklerine benzer olayları taklit edebildiğinden pseudomaturasyon oluşabilir (139,140). İnflamatuvar durumlarda oluşan östradiolün hızlı azalması, androjen, progesteron ve PGE₂'nin hızlı artışı oositin gelişme kapasitesini kazanmasında önemli olan değişikliklerin meydana gelmesini indüklemiş olabilir (141).

Oositin nükleer maturasyonu kadar bölünme mekiği yapısının da ovulasyonda önemli olduğu bilinmektedir. Radyasyona bağlı olarak mayoz mekiğinin şekil ve yapısı değişmektedir (22). Ayrıca kafein etkisiyle bölünme mekiği şeklinin bozulması sonucu, mayotik duraksamanın gerçekleştiği öne sürülmüştür (142).

Oositler gelişme kapasitelerini östrus siklusunun ileri foliküler fazında kazanır. İlerlemiş atrezi, oositin gelişme kapasitesi kazanmasını bir süreliğine duraksatır. in vitro gelişme kapasitesi üzerine atrezinin pozitif etkisi, oositin kendini maturasyon, fertilizasyon ve gelişme için daha uzun bir büyüme periyodu sağlamak şeklinde olabilir. Diğer yandan oositin in vitro gelişme yeteneği, eğer atrezi ileri seviyede ise daha düşük olabilir (143).

Oositin DNA tamir özelliği ile ilgili çok az bilgi olmasına rağmen, bu özelliğin oosit büyümesi ile değişmediği de bilinmektedir. DNA onarımı kısmen oositin gelişmekte olan folikül içerisinde olmasıyla ilişkilidir. Çünkü hormonlar ve mayotik duraksamanın devamı, mayotik yeterliliğin kazanılması, oosit maturasyonu ve ovulasyon gibi metabolik olaylarda rol alan faktörler tamir mekanizmaları için önemlidir. TNF α , memelilerde folikül atrezisinde intraovaryan düzenleyici olarak rol oynar. Kültürdeki foliküle uygulandığında, progesteron yükselir. Çünkü DNA tamiri üzerine negatif etkisi bulunmaktadır. Progesteron seviyesi ile kromozom readyoensitivitesinin artışı arasında doğru orantı olduğu bildirilmiştir (22).

Fareler için 7.2 Gy radyasyon, ovarian stoğun %50'sini tüketen doz olarak bildirilmiştir (17). Kaynak araştırmalarında gördük ki, radyasyon hangi dozda uygulanırsa uygulansın ovaryumda dejeneratif değişikliklere neden olmaktadır. Doz farklılığı sadece yok olan oosit sayısını etkilemektedir (10,14).

Hormonal seviyedeki değişiklikler morfolojik değişikliklerden daha önce gerçekleşmektedir (24). Radyasyona bağlı olarak östradiol seviyesindeki ani azalma nedeniyle granüloza hücrelerinin farklılaşması ve olgunlaşması geciktiğinden, bu hücrelerle etkileşim halinde bulunan oositin maturasyonu da gecikmektedir. Ayrıca radyasyon etkisiyle enzim mekanizmalarının inaktif hale gelmesi ovulasyon için gerekli faktörlerinde salgılanmasını engellemekte ve radyasyon II ve radyasyon+süperovulasyon II gruplarında sık rastlanan, erken lüteinie olmuş, kist benzeri foliküllerin gözlenmesine neden olmaktadır.

Çalışmamızın sonunda, elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda, genç dişi farelerde radyasyonun ovaryum üzerindeki etkilerinin çok kısa sürede ortaya çıktığı görülmüştür. Deneş süresi boyunca östrus siklusu takibi yapılması sayesinde, genital sistemdeki hormonal ortam hakkında da ipucu sunulmuştur. Süperovulasyon ve spontan ovulasyon ile elde edilen ovulasyon oranları, ovaryum ağırlığı ve hacmi gibi parametreler gerek folikül stoğu gerekse fonksiyon kaybının erken dönemde dahi hasarlandığını bildirmektedir. Spontan ovulasyon ile radyasyon I ve II gruplarında çoğunlukla MI oositlerin elde edilmesi, yüksek doz radyasyon nedeniyle oosit maturasyonunun tamamlanamadığını ve bu oositlerin fertilizasyon aşamasına ulaşması için in vitro maturasyona gerek olduğunu ifade etmektedir.

Bu çalışma ile sadece iyonizan radyasyonun ovaryum morfolojisi ve ovulasyon oranı üzerine etkileri incelenmemiş aynı zamanda, spontan ovulasyon döneminin tespiti ve kullanılan süperovulasyon protokolü ile temel ovaryum histolojisi ve oosit maturasyonunun anlaşılmasına da katkı sağlanmıştır.

SONUÇ

Tüm vücut radyasyon uygulaması, ovaryumlarda foliküler atrezinin şiddetini artırmış ve uygulamayı takip eden birinci ve ikinci östrus siklusunda, spontan ovulasyon oranını düşürmüştür. Bu dönemlerde elde edilen oositlerin büyük çoğunluğunun MI fazında kalarak, maturasyonunu tamamlayamadığı, bazılarında ise hem oosit hem de polar cisimciğin morfolojilerinin bozulduğu gözlenmiştir.

Radyasyon uygulanmış ovaryumlarda, süperovulasyon uygulaması sonucu ovulasyon oranları oldukça düşmüş hatta çoğu denekte ovulasyon gözlenmemiştir. Graaf folikülü aşamasında atreziye uğramış foliküller ovaryumda gözlenmiştir. Radyasyon uygulaması sonrasında, ikinci östrus siklusunda incelenen radyasyon II ve radyasyon+süperovulasyon II gruplarına ait ovulasyon oranları, radyasyon I ve radyasyon+süperovulasyon I gruplarına göre daha yüksek elde edilmişse de kontrol gruplarından düşüktür. Bulgularımız doğrultusunda, radyasyon etkisiyle hasarlanmış ve sayısı azalmış granüloza hücrelerinden, ovulasyonda görevli faktörlerin daha az oranda salgılanması nedeniyle ovulasyon prosesinin aksadığını düşünmekteyiz.

Genital siklus düzenli devam etmesine rağmen, radyasyonun ardından ovaryumun ekzojen hormonlara yanıtının zayıf olmasını, genç kadınlarda ileri luteal fazda alınan radyoterapi sonucu premature ovarian yetmezliğin erken dönem göstergesi olabileceğini düşünmekteyiz. Östrus fazları dikkate alınarak yapılan uygulamalar sonucu elde ettiğimiz morfolojik ve morfometrik bulguların, radyasyonun foliküler hasar ve oosit kalitesi üzerine etkilerinin açıklanmasına katkı sağlayacağı kanısındayız.

ÖZET

NORMAL VE SÜPEROVULE FARELERDE İYONİZAN RADYASYONUN OVARYUM MORFOLOJİSİ, ÖSTRUS SIKLUSU VE OVULASYON ORANI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Melike SAPMAZ METİN

Çalışmamızda, γ radyasyonun ovaryum morfolojisi, ovulasyon oranı ve östrus siklusu üzerine olan etkilerinin morfolojik ve morfometrik parametrelerle gösterilmesi amaçlandı. Yaklaşık 3 düzenli siklus gösteren denekler deneye alındı ve yedi grup oluşturuldu. Kontrol, radyasyon-sham, radyasyon I ve II gruplarında spontan ovulasyon; süperovulasyon, radyasyon+süperovulasyon I ve II gruplarında ise süperovulasyon oranları elde edildi. Tek doz, 7.2 Gy ve tüm vücut γ radyasyon uygulaması, diöstrus fazından proöstrus fazına geçiş döneminde yapıldı. Radyasyon I grubundaki deneklerden radyasyonu takip eden ilk ovulasyon döneminde, radyasyon II grubunda ise ikinci ovulasyon döneminde ampulla bölgeleri patlatılarak oositler toplandı. Radyasyon+süperovulasyon I grubunda, radyasyonu takip eden ilk proöstrus fazında, radyasyon+süperovulasyon II grubunda ise ikinci proöstrus fazında süperovulasyon protokolü uygulandı ve oositler toplandı. Tüm gruplara ait ovaryumlar ise ışık mikroskopik inceleme için işlemlendirildi.

Radyasyonun ardından ilk ovulasyon döneminde ovulasyon oranı ve ovaryum ağırlığı kontrol ve sham grubundan daha düşüktü. Bu dönemde oositlerin çoğu MI fazında idi. Ayrıca ovarian foliküllerde atretik değişiklikler oldukça fazla idi. Küçük çaplı foliküllerde oosite rastlanmazken, preantral foliküller normale yakın görünüme sahipti. Paralel şekilde

radasyon+süperovulasyon I grubunda da süperovulasyona yanıt oldukça zayıftı. Ovaryumlarda ovulasyon öncesi dönemde bloke olmuş foliküller gözlemlendi. Radasyon II ve radasyon+süperovulasyon II gruplarında, ovaryumda atretik değişikliklerin yanında foliküler kist benzeri yapılar gözlemlendi.

Radasyon uygulamasının ardından 16 denekten 8'inde östrus siklusu süresinin uzadığı gözlemlendi. Ancak, fazlara ait sitolojilerde değişiklik izlenmedi.

Çalışmamızda, radasyonun ovaryum morfolojisi, ovulasyon oranı ve oosit morfolojisi ve maturasyonu üzerine etkileri in vivo olarak ortaya konmuştur. Preantral ve antral aşamada radasyona maruz kalan foliküllerin ovulasyon yeteneğinin azaldığı tespit edilmiştir. Radasyonun ardından, siklus düzenli iken süperovulasyona yanıtın zayıf olması, radasyona bağlı olarak premature ovaryan yetmezliğin erken işareti kabul edilebilir.

Anahtar kelimeler: radasyon, ovulasyon oranı, ovaryum, östrus siklusu

SUMMARY

EFFECTS OF IONIZING RADIATION ON OVARIAN MORPHOLOGY, ESTROUS CYCLE AND OVULATION RATE IN NORMAL AND SUPEROVULATED MICE

Melike SAPMAZ METİN

The aim of our study was to show the effects of γ radiation on ovarium morphology, ovulation rate and estrus cycle by using morphologic and morphometric parameters. Only mice demonstrating at least 3 regular consecutive cycles and randomly divided into 7 groups. Spontaneous ovulation rates were obtained from Control, Radiation-Sham, Radiation-I and Radiation-II groups while superovulation rates were obtained from Superovulation, Radiation+Superovulation-I and Radiation+Superovulation-II groups. 7.2 Gy single dose and whole body radiation was applied during the transition period from diestrus phase to proestrus phase. Oocytes were collected by exploding the ampulla region of mice in Radiation-I group, in the first ovulation period after radiation. Oocyte collection in Radiation-II group was done in the second ovulation period. In Radiation+Superovulation-I group, superovulation protocol was applied in the first proestrous phase and oocytes were collected after radiation. The same protocol was applied for Radiation+Superovulation-II group during the second proestrous phase. Ovaries of all groups were prepared for light microscopic observation.

In the first ovulation period after the radiation, spontaneous ovulation rate and ovary weight were smaller than the control and the sham groups. Most of the oocytes were in MI phase during this period. Furthermore, atretic changes in ovarian follicles were quite dramatic. Preantral follicles had an appearance close to normal while no oocytes were found in small sized follicles. Similarly, response to superovulation was weak also in Radiation+Superovulation-I group. Follicles which blocked in pre-ovulatory period were observed in the ovary. In radiation-II and Radiation+Superovulation-II groups, structures like follicular cyst's were observed in addition to atretic changes in ovary.

After radiation, longer estrus cycle periods were observed in 8 of 16 subjects. However, no changes in the cytologies of phases were detected.

It was identified that in vivo effects of radiation even in early phases on ovarian morphology, ovulation rate, oocyte morphology and oocyte maturation in mice. Reduction in ovulation ability of follicles which are exposed to radiation during preantral and antral stages was determined. After radiation, low response to superovulation while the cycle is regular, can be accepted as an early sign of premature ovarian failure due to radiation.

Keywords: radiation, ovulation rate, ovary, estrous cycle.

KAYNAKLAR

- 1- Muller J. Impact of cancer therapy on the reproductive axis. *Horm Res* 2003; 59: 12–20.
- 2- Maltaris T, Koelbl H, Seufert R, Kiesewetter F, Beckmann M.W, Mueller A. et.al. Gonadal damage and options for fertility preservation in female and male cancer survivors. *Asian J Androl* 2006; 8(5): 515-33.
- 3- Özalpan A. Temel Radyobioloji. 1. Basım. İstanbul: Haliç Üniversitesi Yayınları, 2001: 1-218.
- 4- Fong S.L, Lugtenburg P.J, Schipper I, Themmen A.P.N, de Jong F.H, Sonneveld P. et.al. Anti-müllerian hormone as a marker of ovarian function in women after chemotherapy and radiotherapy for haematological malignancies. *Hum Reprod* 2008; 23(3): 674-8.
- 5- Meirrow D, Nugent D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Hum Reprod Update* 2001;7: 535–43.
- 6- Blumenfeld Z, Dann E, Avivi R, Epelbaum R, Rowe JM. Fertility after treatment for Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 2002; 13(1): 138-47.
- 7- Shalet SM, Beardwell CG, Jones PH, Pearson D, Orrell DH. Ovarian failure following abdominal irradiation in childhood. *Br J Cancer* 1976; 33: 655-8.
- 8- Morita Y, Perez GI, Paris F, Miranda SR, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A et al. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat Med* 2000; 6(10):1109-14.
- 9- Nicosia SV, Matus-Ridley M, Meadows AT. Gonadal effects of cancer therapy in girls. *Cancer* 1985; 55: 2364- 72.
- 10- Ogilvy-Stuart A and Shalet SM. Effect of radiation on the human reproductive system. *Environ Health Perspect Suppl* 1993; 101(2): 109-16.

- 11- Oktay K. , Öktem Ö. Regeneration of oocytes after chemotherapy: connecting the evidence from Mouse to human. *J Clin Oncol* 2007; 25(22): 3185-7.
- 12- Balla A. , Danilovich N. , Yang Y. , Sairam M.R. Dynamics of Ovarian development in the FORKO immature Mouse: Structural and functional implications for ovarian reserve. *Biol Reprod* 2003; 69:1281-93.
- 13- Arnon J, Meirow D, Lewis-Roness H, Ornoy A. Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. *Hum Reprod Update* 2001; 7: 394–403.
- 14- Baker T.G. Effects of ionizing radiations on mammalian oogenesis: a model for chemical effects. *Environ Health Perspect* 1978; 24:31-7.
- 15- Bakker B, Massa GG, Oostdijk W, Van Weel-Sipman MH, Vossen JM, Wit JM. Prepubertal development and growth after total-body irradiation and bone marrow transplantation for haematological malignancies. *Eur J Pediatr.* 2000; 159: 31-7.
- 16- McGee E.A. , Hsueh A.J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000; 21(2): 200-14.
- 17- Lee C.J, Yoon Y. γ -Radiation-induced follicular degeneration in the repubertal mouse ovary. *Mutat Res* 2005; 578: 247-55.
- 18-Blumenfeld Z, Avivi I, Linn S, Epelbaum R, Ben-Shahar M, Haim N. Prevention of irreversible chemotherapy-induced ovarian damage in young women with lymphoma by a gonadotrophin-releasing hormone agonist in parallel to chemotherapy. *Hum Reprod* 1996; 11(8): 1620-6.
- 19- Oktay K, Kan MT, Rosenwaks Z. Recent progress in oocyte and ovarian tissue cryopreservation and transplantation. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2001; 13: 263-68.
- 20- Brewen J.G, Payne H.S. X-Ray stage sensitivity of mouse oocytes and its bearing on dose-response curves. *Genetics* 1979; 91:149-61.
- 21- Gibbons A.F.E, Chang M.C. The Effects of X-irradiation of the Rat Ovary on Implantation and Embryonic Development. *Biol Reprod* 1973; 9: 343-9.
- 22- Jacquet P, Adrianes I, Buset J, Neefs M, Vankerkom J. Cytogenetic studies in Mouse oocytes irradiated in vitro at different stages of maturation by use of an early preantral follicle culture system. *Mutat. Res* 2005; 583: 168-77.
- 23- Jacquet P, Buset J, Vankerkom J, Baatout S, de Saint-Georges L, Baugnet-Maiheu L, et al. Radiation-induced chromosome aberrations in guinea-pig growing oocytes, and their relation to follicular atresia. *Mutat Res* 2001; 473, 249-54.
- 24- Lee Y.K, Chang H, Kim W, Kim J, Yoon Y. Effects of Gamma-Radiation on ovarian follicles. *Arh hig rada toksikol* 1998; 49:147-53.

- 25-Kim JK, Lee CJ, Song KW, Do BR, Yoon YD. Gamma-radiation accelerates ovarian follicular atresia in immature mice. *In Vivo* 1999; 13(1): 21-4.
- 26- Lee C.J, Park H.H, Do B.R, Yoon Y, Kim J.K. Natural and radiation-induced degeneration of primordial and primary follicles in Mouse ovary. *Anim Reprod Sci* 2000; 59:109-117.
- 27- Gosden R.G, Wade J.C, Fraser H.M, Sandow J, Faddy M.J. Impact of congenital or experimental hypogonadotrophism on the radiation sensitivity of the mouse ovary. *Hum Reprod* 1997; 12(11): 2483-8.
- 28- Parsons D.F. An electron microscope study of radiation damage in the mouse oocyte. *J Cell Biol* 1962; 14:31-48.
- 29- 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 irradiation-induced ovarian damage in the rat model? *Fertil Steril* 2008; 89(3): 732-5.
- 30- Speroff L, Glars RH, Kase NG. Ortaç F, Aytaç R. Menstruel Siklusun Regülasyonu. *Erk A. (Çev.Ed.). Klinik Jinekolojik Endokrinoloji ve İnfertilite. 5. baskı. İstanbul. Nobel Tıp Kitapevi; 1996: 183-230.*
- 31- Pritchett KR, Taft RA. Reproductive biology of the laboratory Mouse. In: *The Mouse in Biomedical Research*. Fox JG, Davission MT, Quimby FW, Barthold SW, Newcamer CE, Smith AL (Eds). Vol III. Chapter 3. 2. edition. USA: Elsevier; 2007: 97-101.
- 32- Snell GD. Reproduction. In: Snell GD(Ed). *Biology of Mouse*. Second edition. USA. Dover Publications; 1956: 55-89.
- 33- Michael H Ross, Edward J Reith, Lynn J Romrell. *Female Reproductive System. Histology: A text and Atlas. 2. edition. USA. Williams&Wilkins; 1989: 649-62.*
- 34- Maedeo K, Ohkura S, Tsukamura H. Reproduction and breeding. In: *the handbook of experimental Animals: The Laboratory Rat*. Krinke GJ. (Ed). Chapter 9. USA: Academic Pres; 2000: 152-60.
- 35- Socie G, Salooja N, Cohen A, Rovelli A, Carreras E, Locasciulli A, et al. Nonmalignant late effects after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2003; 101: 3373–85.
- 36- Junk S.M, Dharmarajan A, Yovich J.L. FSH priming improves oocyte maturation, but priming with FSH or hCG has no effect on subsequent embryonic development in an in vitro maturation program. *Theriogenology* 2003; 59: 1741-9.
- 37- Giuseppe L, Attilio G, Edoardo DN, Loredana G, Cristina L, Vincenzo L. Ovarian function after cancer treatment in young women affected Hodgkin disease. *Hematol* 2007; 12(2): 141-7.

- 38- Kimmel C.A. Approaches to evaluating reproductive hazards and risks. *Environ Health Perspect supplements* 1993; 101: 137-43.
- 39- Kierszenbaum AL. Follicle development and menstrual cycle. In: *Histology and Cell Biology*. USA. Mosby Inc.; 2002: 564-75.
- 40- Macklon NS, Fauser BC. Aspects of ovarian follicle development throughout life. *Horm Res* 1999; 52(4): 161-70.
- 41- Hardy K, Wright C.S, Franks S, Winston R.M.L. In vitro maturation of oocytes. *Br Med Bull* 2000; 56(3):588-602.
- 42- Fulka Jr J, First NL, Moor RM. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol. Hum. Reprod* 1998; 4(1): 41-49.
- 43- Mitra J, Schultz R.M. Regulation of the acquisition of meiotic competence in the mouse: changes in the subcellular localization of cdc2, cyclin b1, cdc25c, and wee1, and in the concentration of these proteins and their transcripts. *J. Cell. Sci* 1996; 109: 2407-15.
- 44- De Vantery C, Stutz A, Vasalli J.D, and Schorderet-Slatkine S. Acquisition of meiotic competence in growing mouse oocytes is controlled at both translational and post translational levels. *Dev. Biol* 1997; 187: 43-54.
- 45- De La Fuente R, J.O'Brien M, Eppig J.J. Epidermal growth factor enhances preimplantation developmental competence of maturing Mouse oocytes. *Hum. Reprod* 1999; 14: 3060-8.
- 46- Rutherford A.J. The practical aspects of in vitro maturation of human oocytes. *Fertility and Reproductive Medicine* 1998: 577-87.
- 47- Eppig J.J, Schultz R.M, O'Brien M, and Chesnel F. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Dev. Biol* 1994; 164:1-9.
- 48- Eppig J.J.: Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod Fert Dev* 1996; 8:485-6.
- 49- Eppig J.J, Downs S.M. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. *Biol. Reprod.* 1984; 30:1.
- 50- Downs S.M, Daniel S.A.J, Eppig J.J. Induction of maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocyte by follicle-stimulating hormone and epidermal growth factor: evidence for a positive stimulus of somatic cell origin. *J Exp Zool* 1988; 245-86.
- 51- Mazaud S, Guigon C.J, Lozach A, Coudouel N, Forest M.G, Coffigny H. et.al. Establishment of the reproductive function and transient fertility of female rats lacking primordial follicle stock after fetal gamma-irradiation. *Endocrinology* 2002;143(12):4775-87.

- 52- Gaytan F, Morales C, Bellido C, Aguilar E, Sanchez-Criado J.E. Ovarian Follicle Macrophages: Is Follicular Atresia in the Immature Rat a Macrophage-Mediated Event? *Biol Reprod* 1998; 58: 52-9.
- 53- Kerr J B, Duckett R, Myers M, Britt K L, Mladenovska T and Findlay J K . Quantification of healthy follicles in the neonatal and adult mouse ovary: evidence for maintenance of primordial follicle supply. *Reproduction* 2006; 132: 95–109.
- 54- Braw RH, Tsafiriri A. Follicles explanted from pentobarbitone-treated rats provide a model for atresia. *J Reprod Fertil* 1980; 59(2): 259-65.
- 55- Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *European J Endocrinol* 1998;138: 482-91.
- 56- Tomatır A.G. Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *T Klin J Med Sci* 2003; 23:499-508.
- 57- Nakano K, Naito I, Momota R, Sado Y, Hasegawa H, Ninomiya Y. et.al. The distribution of type IV collagen alfa chains in the Mouse ovary and its correlation with follicular development. *Arch Histol Cytol* 2007; 70(4):243-53.
- 58- Vital-Reyes V, Chhieng D, Rodriguez-Burford C, Tellez-Velasco S, Grizzle W, Chavarria-Olarte M.E. et.al. Ovarian Biopsy in infertile patients with ovarian dysfunction. *Int J Gynecol Pathol* 2005; 25:90-4.
- 59- Osman P. Rate and course of atresia during follicular development in the adult cyclic rat. *J Reprod Fertil* 1985; 73(1): 261-70.
- 60- Takagi K, Yamada T, Miki Y, Umegaki T, Nishimura M, Sasaki J. Histological Observation of the Development of Follicles and Follicular Atresia in Immature Rat Ovaries. *Acta Med Okayama* 2007; 61(5): 283-98.
- 61- Clarke J, Brook F. Effect of gonadotrophins on the ovarian interstitial tissue of the wood Mouse, *Apodemus sylvaticus*. *Reproduction* 2001; 121:123-9.
- 62- Bukovsky A, Ayala M.E, Dominguez R, Keenan J.E, Wimalasena J, Elder R.F. et.al. Changes of ovarian interstitial cell hormone receptors and behavior of resident mesenchymal cells in developing and adult rats with steroid-induced sterility. *Steroids* 2002; 67: 277-89.
- 63- Robker R.L, Russell D.L, Yoshioka S, Sharma S.C, Lydon J.P, O'Malley B.W. et.al. Ovulation: a multi-gene, multi-step process. *Steroids* 2000; 65: 559-70.
- 64- Espey L.L, Ujioka T, Russell D.L. Induction of Early Growth Response Protein-1 Gene Expression in the Rat Ovary in Response to an Ovulatory Dose of Human Chorionic Gonadotrophin. *Endocrinology* 2000; 141: 2385-91.
- 65- Espey LL. Ovulation as an inflammatory reaction--a hypothesis. *Biol Reprod* 1980; 22(1):73-106.

- 66- Gökmen O, Zeyneloğlu HB. Üreme Fizyolojisi. (Çev. Ed. Erez S.). Danforth Obstetrik ve Jinekoloji. 7. baskı. İstanbul. Yüce Reklam Dağıtım A.Ş. ;1997: 29-48.
- 67- Espey L.L, Richards J.S. Ovulation. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Third Edition. 2006 : 425-58.
- 68- Niswender G.D, Juengel J.L, Silva P.J, Rollyson M.K, McIntush E.W. Mechanisms Controlling the Function and Life Span of the Corpus Luteum. *Physiol Rev* 2000; 80: 1-29.
- 69- Allen E. The oestrous cycle in the Mouse. *Amer J Anat* 1922; 30: 297-371.
- 70- Nelson J.F, Felicio L.S, Randall P.K, Sims C, Finch C.H. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J Mice: I. Cycle frequency, Length and vaginal cytology. *Biol Reprod* 1982; 27:327-39.
- 71- Safranski T.J, Lamberson W.R, Keisler D.H. Correlations among three measures of puberty in mice and relationships with estradiol concentration and ovulation. *Biol Reprod* 1993; 48:669-73.
- 72- Petroianu A, Vasconcellos L.S, Alberti L.R, Nunes M.B. The influence of venous drainage on autologous ovarian transplantation. *J Surg Res* 2005; 124:175-9
- 73- Champlin A.K., Dorr D.L. Determining the stage of the estrous cycle in the Mouse by the appearance of the vagina. *Biol Reprod* 1973, 8:491-4.
- 74- Campbell CS, Ryan KD, Schwartz NB. Estrous cycles in the Mouse: relative influence of continuous light and the presence of male. *Biol. Reprod* 1976; 14: 292-9.
- 75- Rao R.P, Kaliwal B.B. Monocrotophos induced dysfunction on estrous cycle and follicular development in mice. *Ind Health* 2002; 40:237-44.
- 76- Hubscher C.H, Brooks D.L, Johnson J.R. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotech Histochem.* 2005; 80 (2):79-87.
- 77- Spornitz U.M., Socin C.D. , Dravid A.A. Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. *Anat Rec* 1999; 254:116-26.
- 78- Mandl M. M. Cyclical changes in the vaginal smear of adult ovariectomized rats. *J Exper Biol* 1951; 28:585-92.
- 79- Drickamer L.C. Determination of oestrous condition in female mice is dependent upon time of day. *J Reprod Fertil* 1987; 79:659-62.
- 80- Thrasher J.D. , Clark F.I. , Clarke D.R. , Changes in the vaginal epithelial cell cycle in relation to events of the estrous cycle. *Exp Cell Res* 1967; 45(1): 232-6.
- 81- Stouffer RL, Zelinski-Wooten MB. Overriding follicle selection in controlled ovarian stimulation protocols: Quality vs quantity. *Reprod Biol Endocr* 2004; 2: 1-12.

- 82- Delilbaşı L. *In vitro* fertilizasyon laboratuvar yöntemleri. 1. baskı. Ankara: Güneş Tıp Kitapevi; 2008: 1-125.
- 83- Treloar AF, Schabdach DG, Sansing S, Keller LS. Superovulation of New Zealand white rabbits by continuous infusion of follicle-stimulating hormone, using a micro-osmotic pump. *Lab Anim Sci* 1997 Jun;47(3):313-6.
- 84- Zudova D, Wyrobek A.J, Bishop J, Marchetti F. Impaired fertility in T-stock female mice after superovulation. *Reproduction* 2004; 128:573-81.
- 85- Tarin J.J, Perez-Albala S, Cano A. Stage of the estrous cycle at the time of pregnant mare's serum gonadotropin injection affects the quality of ovulated oocytes in the Mouse. *Mol Reprod Dev* 2002; 61: 398-405.
- 86- Kanter M. , Yıldız C, Meral I, Koc A, Tasal I. Effects of a GnRH agonist on oocyte number and maturation in mice superovulated with eCG and hCG. *Theriogenology* 2004, 61:393-8.
- 87- Watters D. Molecular mechanisms of ionizing radiation-induced apoptosis. *Immunol Cell Biol* 1999; 77:263-71.
- 88- Manabe N, Goto Y, Matsuda-Minehata F, Inoue N, Maeda A, Sakamaki K, et al. Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: regulation of granulosa cell apoptosis during atresia. *J Reprod Dev* 2004; 50(5): 493-514.
- 89- 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* 2006: 1-11.
- 90- Oren M. Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 1999; 274(51): 36031-4.
- 91- Tilly JL, Tilly KI, Kenton ML, Johnson AL Expression of members of the bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-xlong messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 1995;136(1):232-41.
- 92- Lee CJ, Kim HT, Song KW, Kim SS, Park HH, Yoon YD. Ovarian expression of p53 and p21 apoptosis regulators in gamma-irradiated mice. *Mol Reprod Dev* 2008;75(2):383-91.
- 93- Hsueh A.J.W, Billig H, Tsafirri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine* 1994; 15(6):707-24.
- 94- Roy SK, Greenwald GS. Mediation of follicle-stimulating hormone action on follicular deoxyribonucleic acid synthesis by epidermal growth factor. *Endocrinol* 1991; 129: 1903-8.
- 95- Yeh J, Lee GY, Anderson E. Presence of transforming growth factor-alpha messenger ribonucleic acid (mRNA) and absence of epidermal growth factor mRNA in rat ovarian

- granulosa cells, and the effects of these factors on steroidogenesis in vitro. *Biol Reprod* 1993; 48: 1071-81.
- 96- B.K, Dominic C.J. Studies of the male-originating pheromones involved in the whitten effect and Bruce effect in mice. *Biol Reprod* 1984, 31: 89-96.
- 97- Ma W, Miao Z, Novotny V. Induction of Estrus in grouped female mice (*Mus domesticus*) by Synthetic analogues of preputial gland constituents. *Chem Senses* 1999, 24: 289-93.
- 98- Grasso P, Reichert L.E. In Vivo effects of follicle-stimulating hormone-related synthetic peptides on the Mouse estrous cycle. *Endocrinology* 1996, 137(12):5370-5.
- 99- Kanter M, Öztaş E, Dalçık C. Sıçan, Fare ve kobaylarda gebeliğin ilk gününü tayin etmede vaginal smear yönteminin kullanılması. *Van Tıp Dergisi* 1996, 3(2): 112-6.
- 100- Munn CS, Kiser LC, Wetzner SM, Baer E, Ovary Volume in Young and Premenopausal Adults: US Determination. *Radiology* 1986; 159:731-2.
- 101- Jonard S, Robert Y and Dewailly D. Revisiting the ovarian volume as a diagnostic criterion for polycystic ovaries. *Hum Reprod* 2005; 20(10), 2893–28.
- 102- Russell W.L. Mutation frequencies in female mice and the estimation of genetic hazards of radiation in women. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977, 74(8):3523-7.
- 103- Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germ line stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 2004; 428: 145-50.
- 104- Tan OL and Fleming JS. Proliferating cell nuclear antigen immunoreactivity in the ovarian surface epithelium of micw of varying ages and total lifetime ovulation number following ovulation. *Biol Reprod* 2004; 71: 1501-7.
- 105- Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee HJ, Adams GB, Niikura Y et. al. *Cell* 2005; 122: 303-15.
- 106- Marcondes F.K., Bianchi F.J, Tanno A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. *Braz J Biol* 2002, 62(4A):609-14.
- 107- Jablonko-Shariff A, Ravi S, Beltsos AN, Murphy LL, Olson LM. Abnormal estrous cyclicity after disruption of endothelial and inducible nitric oxide synthase in mice. *Biol Reprod* 1999; 61: 171-7
- 108- Inderdeo DS, Edwards DR, Han VKM, Khokha R. temporal and spatial expression of tissue inhibitors of metalloproteinases during the natural ovulatory cycle of the mouse. *Biol Reprod* 1996; 55: 498-508.
- 109- Duncan M., Cummings L, Chada K. Germ Cell deficient (gcd) Mouse as a model of premature ovarian failure. *Biol Reprod* 1993, 49:221-7.

- 110- Jarrell J. , YoungLai E.V. , McMahon A. , Barr R. , O'Connell G. , Belbeck L. Effects of Ionizing Radiation and Pretreatment with [D-Leu6, des-Gly10] Luteinizing Hormone-releasing Hormone Ethylamide on developing rat ovarian follicles. *Cancer Res* 1987, 47:5005-8.
- 111- Ely C.A. A study of Mouse Ovarian Function after Irradiation. *Cancer Res* 1960, 20: 1625-30.
- 112- Guigon C.J, Coudouel N, Mazaud-Guittot S, Forest M.G, Magre S. Follicular Cells Acquire Sertoli Cell Characteristics after Oocyte Loss. *Endocrinology* 2005, 146(7): 2992-3004.
- 113- Thomas F.H, Vanderhyden B.C. Oocyte-granulosa cell interactions during Mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reprod Biol Endocrinol* 2006, 4:19.
- 114- Durlinger AL, Kramer P, Karels B, Grootegoed JA, Uilenbroek JT, Themmen AP. Apoptotic and proliferative changes during induced atresia of preovulatory follicles in the Rat. *Hum. Reprod* 2000; 15(12): 2504-11.
- 115- Ataya K, Pydyn E, Ramahi-Ataya A, Orton CG. Is radiation-induced ovarian failure in rhesus monkeys preventable by luteinizing hormone-releasing hormone agonist?: Preliminary observations. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 790-5.
- 116- 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.
- 117- Nitta Y, Hoshi M. Relationship between oocyte apoptosis and ovarian tumours induced by high and low LET radiations in mice. *Int J Radiat Biol* 2003, 79 (4):241-50.
- 118- Hirshfield AN. Rescue of atretic follicles in vitro and in vivo. *Biol Reprod.* 1989; 40: 181-90.
- 119- Kim JK, Lee CJ. Effects of exogenous melatonin on the ovarian follicles in gamma – irradiated Mouse. *Mutat Res* 2000, 449: 33-9.
- 120- Devine P.J, Payne C.M, McCuskey M.K., Hoyer P.B. Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. *Biol Reprod* 2000, 63:1245-52.
- 121- Inoue S, Watanabe H, Saito H, Hiroi M and Tonosaki A. Elimination of atretic follicles from the mouse ovary: a TEM and immunohistochemical study in mice. *J Anat* (2000) 196:103-10.
- 122- Somosy Z. Radiation response of cell organelles. *Micron* 2000; 31: 165-81.

- 123- Ackert C.L, Gittens J.E.I, O'Brien M.J, Eppig J.J, Kidder G.M. Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the Mouse. *Dev Biol* 2001, 233:258-70.
- 124- Mazaud-Guittot S, Guigon C.J, Coudouel N, Magre S. Consequences of Fetal Irradiation on Follicle Histogenesis and Early Follicle Development in Rat Ovaries. *Biol Reprod* 2006, 75:749-59.
- 125- Wong J, Luckers L, Okawara Y, Pelletier R.-M, and Taketo T. Follicular Development and Atresia in the B6.YTIR Sex-Reversed Mouse Ovary. *Biol Reprod*. 2000; **63**: 756–762
- 126- Morales A, Schwint AE, Itoiz ME. Nucleolar organizer regions in a model of cell hyperactivity and regression. *Biocell* 1996; 20(3):251-8.
- 127- Slot KA, Kasteljin J, Bachelot A, Kelly PA, Binart N, Teerds KJ. Reduced recruitment and survival of primordial and growing follicles in GH receptor-deficient mice. *Reprod* 2006; 131: 525-32.
- 128- Hirshfield AN. Size-frequency analysis of atresia in cycling rats. *Biol Reprod* 1988; 38: 1181-8.
- 129- Riedlinger G, Okagaki R, Wagner K.U, Rucker E.B. 3rd, Oka T, Miyoshi K. et.al. Bcl-x Is Not Required for Maintenance of Follicles and Corpus Luteum in the Postnatal Mouse Ovary. *Biol Reprod* 2002; 66: 438-44.
- 130- Zhang H, Zhang X, Yuan Z, Li X, Li W, Zhou Q. et.al. Germ cell loss induced by $^{12}\text{C}^{6+}$ Ion Irradiation in young female mice. *J Radiat Res* 2006; 47:131-4.
- 131- Syrop CH, Willhoite A, Van Voorish BJ. Ovarian volume: a novel outcome predictor for assisted reproduction. *Fertil Steril* 1995; 64(6): 1167-71.
- 132- Syrop CH, et al. Ovarian volume may predict assisted reproductive outcomes better than follicle stimulating hormone concentration on day 3. *Hum Reprod* 1999; 14(7): 1752-6.
- 133- Martinez-Flores I, Egozcue J, Garcia M. Effects of female fertility and germinal cells in prepubertal and adult rats (*Rattus norvegicus*) after x-ray irradiation. *Advances in Exp Med Bio* 1998; 444- 215-9.
- 134- Reichert W, Buselmaier W, Vogel F. Elimination of x-ray induced chromosomal aberrations in the progeny of female mice. *Mutation Res* 1984; 151: 109-19.
- 135- Streffer C, Müller WU. Malformations after radiation exposure of preimplantation stages. *Int J Dev Biol* 1996; 40: 355-60.
- 136- Morishita H, Mitani H, Nakago K, Higuchi K, Mori T. Reproductive function following advanced ovulation induced by synthetic luteinizing hormone-releasing hormone in rats. *Gynecol Obstet Invest* 1983, 15:325-36.

- 137- Ün Z.P, Ün M. The Comparison of the effectiveness of the criterions used to determine the *in vitro* maturation of bovine oocytes. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2004, 51: 205-9.
- 138- Assey RJ, Hyttel P, Greve T, Purwantara B. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. Mol Reprod Dev 1994; 37: 335-44.
- 139- Wise T, Maurer RR. Follicular development, oocyte viability and recovery in relation to follicular steroids, prolactin and glycosaminoglycans throughout the estrous period in superovulated heifers with a normal LH surge, no detectable LH surge, and progestin inhibition of LH surge. Domest Anim Endocrinol 1994; 11: 35-58.
- 140- Wise T, Suss U, Stranzinger G, Wuthrich K, Maurer RR. Cumulus and oocyte maturation and in vitro and in vivo fertilization of oocytes in relation to follicular steroids, prolactin, and glycosaminoglycans throughout the estrous period in superovulated heifers with a normal LH surge, no detectable LH surge, and progestin inhibition of LH surge. Domest Anim Endocrinol 1994; 11: 59-86.
- 141- Blondin P, Dufour M, Sirard MA. Analysis of atresia in bovine follicles using different methods: flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay, and classic histology. Biol Reprod 1996b; 54: 631-7.
- 142- Miao Y. , Shi L. , Lei Z. , Huang J. , Yang J. , OuYang Y. , Sun Q. , Chen D. Effects of caffeine in vivo and in vitro oocyte maturation in mice. Theriogenology 2007, 68:640-5.
- 143- Blondin P, Sirard MA. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. Mol Reprod Dev 1995; 41: 54-62.

RESİMLEMELER LİSTESİ

Sayfa No

Sekiller

Şekil 1. Rodentler ve insanlarda prepuberte ve puberte aşamasında folikül gelişimi süreleri	8
Şekil 2. Ovarian siklus boyunca ovaryumda gözlenen değişiklikler ve hormonal durum	14
Şekil 3. Östrus siklusu fazlarına ait süreler	15
Şekil 4. Radyasyon I ve II gruplarına ait deney şeması	24
Şekil 5. Radyasyon+süperovulasyon I ve II gruplarına ait deney şeması	25
Şekil 6. Deney gruplarına ait ovulasyon oranlarının dağılımı	31
Şekil 7. Deney gruplarına ait ovaryum ağırlığı (mg)/100 g vücut ağırlığı değerlerinin dağılımı	32

Tablolar

Tablo 1. Vajinal smeardeki hücre morfolojisi ile östrus siklus safhalarının sınıflandırılması	17
Tablo 2. Wolf ve arkadaşlarının oosit-kumulus kompleksi için inceleme sistemi	26
Tablo 3. Deney gruplarına ait ovulasyon oranı ve ovaryum ağırlığı (mg)/100 g vücut ağırlığı değerlerinin karşılaştırılması	30
Tablo 4. Gruplara ait sağlıklı ve atretik folikül yoğunluğunun semi-kantitatif değerlendirme sonuçları	33
Tablo 5: Radyasyon öncesi ve sonrasında östrus siklusu sürelerinin karşılaştırılması	35

Resimler

Resim 1. Stigma A X12, B X22.4	12
Vajinal Smear Fotoğrafları	
Resim 2. Proöstrus fazı, Toluidin mavisi. X 400	36
Resim 3. Proöstrus fazı, Toluidin mavisi. X 400	36

Resim 4. Östrus fazı, Toluidin mavisi. X100	37
Resim 5. Ovulasyon dönemi, Toluidin mavisi. A X200, B X 400	37
Resim 6. Erken metöstrus fazı Toluidin mavisi. X200	38
Resim 7. İleri metöstrus fazı Toluidin mavisi. X200	38
Resim 8. İleri metöstrus fazı Toluidin mavisi. X400	39
Resim 9. Diöstrus fazı Toluidin mavisi. X400	39
Resim 10. Diöstrus fazı Toluidin mavisi. X100	40
Resim 11. Diöstrus-Proöstrus geçiş fazı Toluidin mavisi. X400	40
Stereo Mikroskopik Fotoğraflar	
Resim 12. Kontrol ve radyasyon-sham grubu X8	43
Resim 13. Kontrol ve radyasyon-sham grubu A X6.4, B X10	43
Resim 14. Kontrol ve radyasyon-sham grubu X22.4	44
Resim 15. Radyasyon I grubu X6.4	45
Resim 16. Radyasyon I grubu X8	45
Resim 17. Radyasyon I grubu X12	45
Resim 18. Radyasyon I grubu X22.4	46
Resim 19. Radyasyon I grubu X22.4	46
Resim 20. Radyasyon II grubu X10	47
Resim 21. Radyasyon II grubu X10	47
Resim 22. Radyasyon II grubu X22.4	48
Resim 23. Radyasyon II grubu X22.4	48
Resim 24. Süperovulasyon grubu X6.4	49
Resim 25. Süperovulasyon grubu X12	49
Resim 26. Süperovulasyon grubu X16	49
Resim 27. Süperovulasyon grubu X20	50
Resim 28. Süperovulasyon grubu X22.4	50
Resim 29. Radyasyon+Süperovulasyon I grubu X8	51
Resim 30. Radyasyon+Süperovulasyon I grubu X22.4	51
Resim 31. Radyasyon+Süperovulasyon II grubu X20	52
Işık Mikroskopik Fotoğraflar	
Resim 32. Kontrol ve Sham Grubu, H+E, X40	55
Resim 33. Kontrol ve Sham Grubu, H+E, X400	55
Resim 34. Kontrol ve Sham Grubu, H+E, X400	56
Resim 35. Kontrol ve Sham Grubu, H+E, X200	56
Resim 36. Kontrol ve Sham Grubu, H+E, X400	57
Resim 37. Kontrol ve Sham Grubu, Masson trichrome, X400	57
Resim 38. Kontrol ve Sham Grubu, Masson trichrome, X400	58

Resim 39. Kontrol ve Sham Grubu, Masson trichrome, X400	58
Resim 40. Kontrol ve Sham Grubu, PAS+HL, X200	58
Resim 41. Kontrol ve Sham Grubu, PAS+HL, X400	59
Resim 42. Radyasyon I grubu, H+E, X100	62
Resim 43. Radyasyon I grubu, H+E, X400	62
Resim 44. Radyasyon I grubu, H+E, X400	63
Resim 45. Radyasyon I grubu, H+E, X100	63
Resim 46. Radyasyon I grubu, Masson trichrome, X400	64
Resim 47. Radyasyon I grubu, PAS+HL, X400	64
Resim 48. Radyasyon I grubu, PAS+HL, X400	65
Resim 49. Radyasyon I grubu, PAS+HL, X400	65
Resim 50. Radyasyon I grubu, PAS+HL, X400	65
Resim 51. Radyasyon I grubu, PAS+HL, X400	66
Resim 52. Radyasyon II grubu, H+E, X400	67
Resim 53. Radyasyon II grubu, H+E, X400	67
Resim 54. Radyasyon II grubu, H+E, X200	68
Resim 55. Radyasyon II grubu, Masson trichrome, X200	68
Resim 56. Radyasyon II grubu, Masson trichrome, X400	68
Resim 57. Radyasyon II grubu, Masson trichrome, X400	69
Resim 58. Radyasyon II grubu, PAS+HL, X400	69
Resim 59. Radyasyon II grubu, PAS+HL, X200	70
Resim 60. Radyasyon II grubu, PAS+HL, X400	70
Resim 61. Radyasyon II grubu, PAS+HL, X400	71
Resim 62. Süperovulasyon grubu, H+E, X400	73
Resim 63. Süperovulasyon grubu, H+E, X200	73
Resim 64. Süperovulasyon grubu, H+E, X400	74
Resim 65. Süperovulasyon grubu, Masson trichrome, X200	74
Resim 66. Süperovulasyon grubu, PAS+HL, X400	75
Resim 67. Radyasyon+Süperovulasyon I grubu, H+E, X40	78
Resim 68. Radyasyon+Süperovulasyon I grubu, H+E, X400	78
Resim 69. Radyasyon+Süperovulasyon I grubu, H+E, X400	79
Resim 70. Radyasyon+Süperovulasyon I grubu, H+E, X400	79
Resim 71. Radyasyon+Süperovulasyon I grubu, Masson trichrome, X400	80
Resim 72. Radyasyon+Süperovulasyon I grubu, Masson trichrome, X200	80
Resim 73. Radyasyon+Süperovulasyon I grubu, Masson trichrome, X200	81
Resim 74. Radyasyon+Süperovulasyon I grubu, PAS+HL, X200	81
Resim 75. Radyasyon+Süperovulasyon I grubu, PAS+HL, X400	82

Resim 76. Radyasyon+Süperovulasyon I grubu, PAS+HL, X400	82
Resim 77. Radyasyon+Süperovulasyon II grubu, H+E, X200	83
Resim 78. Radyasyon+Süperovulasyon II grubu, H+E, X200	83
Resim 79. Radyasyon+Süperovulasyon II grubu, H+E, X400	84
Resim 80. Radyasyon+Süperovulasyon II grubu, H+E, X400	84
Resim 81. Radyasyon+Süperovulasyon II grubu, Masson trichrome, X40	85
Resim 82. Radyasyon+Süperovulasyon II grubu, Masson trichrome, X400	85
Resim 83. Radyasyon+Süperovulasyon II grubu, Masson trichrome, X400	86
Resim 84. Radyasyon+Süperovulasyon II grubu, PAS+HL, X200	86
Resim 85. Radyasyon+Süperovulasyon II grubu, PAS+HL, X200	87

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Muğla'da doğdum. Orta öğrenimimi Muğla-Ortaca Lisesi'nde tamamladıktan sonra, 1996 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimime başladım. 2000 yılı Haziran ayında biyolog ünvanı olarak mezun oldum. 2001 yılı Ocak ayında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Morfoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. 2002 yılında dekanlık araştırma görevlisi kadrosuna atandım. 2004 yılında "Asetaminfen ile Oluşturulan Karaciğer Hasarları Üzerine (-) Epikateşin Etkilerinin Işık ve Elektron Mikroskopik Düzeylerde İncelenmesi" başlıklı tez çalışmam ile bilim uzmanı ünvanı aldım. 2004 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başladım ve halen araştırma görevlisi olarak çalışmalarımı sürdürmekteyim.

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
YEREL ETİK KURULU Edirne, Türkiye
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTFEK 2006 /189
	PROTOKOL ADI	Normal ve Süperovule Farelerde İyonize Radyasyonun Ovaryum Morfolojisi ve Ovulasyon Oranı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI	Prof. Dr. Mehmet KANTER
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	T.Ü.T.F. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
	BAŞVURULAN ETİK KURUL	T.Ü.T.F. Yerel Etik Kurulu
	DESTEKLEYİCİ FIRMA	T.Ü. Araştırma Projeleri (TÜBAP)
	FAZİ	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	<input checked="" type="checkbox"/> Tek Merkez <input type="checkbox"/> Çok Merkez <input checked="" type="checkbox"/> Ulusal <input type="checkbox"/> Uluslar arası

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Değişiklik No.su	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	22.05.2008		<input checked="" type="checkbox"/> Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce
	ARAŞTIRICI BROŞÜRÜ			<input type="checkbox"/> Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ			<input type="checkbox"/> Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce
	OLGU RAPOR FORMU			<input type="checkbox"/> Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 11 /21	Tarih: 29. 05. 2008
	Üniversitemiz Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet KANTER'in sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Melike SAPMAZ'ın tez çalışmasının isminin, "Normal ve Süperovule Farelerde İyonize Radyasyonun Ovaryum Morfolojisi, Östrus Siklusu ve Ovulasyon Oranı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi" şeklindeki protokol değişikliğinin yapılmasında etik sakınca bulunmadığına mevcudun oybirliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI		Helsinki Bildirgesi, İlaç Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF Etik Kurul Yönergesi				
ÜYELER						
Ünvanı / Adı / Soyadı Ek Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ Başkan	Farmakoloji	T.Ü.T.F. Farmakoloji A.D.	K	E <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ümit N. BAŞARAN Başkan Yardımcısı	Çocuk Cerrahisi	T.Ü.T.F. Çocuk Cerrahisi A.D.	E	E <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr. Betül Biner ORHANER Üye	Çocuk Sağ. ve Hst.	T.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hst. A.D.	K	E <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Dilek MEMİŞ Üye	Anesteziyoloji	T.Ü.T.F. Anesteziyoloji A.D.	K	E <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Betül Uğur ALTUN Üye	Endokrinoloji	T.Ü.T.F. İç Hst. A.D.	K	E <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Gürcan ALTUN Üye	Adli Tıp	T.Ü.T.F. Adli Tıp A.D.	E	E <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Hakan ERBAŞ Üye	Biyokimya	T.Ü.T.F. Biyokimya A.D.	E	E <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Ufuk USTA Üye	Patoloji	T.Ü.T.F. Patoloji A.D.	E	E <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Üye	Deontoloji ve Tıp Tarihi	T.Ü.T.F. Deontoloji ve Tıp Tarihi A.D.	K	E <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Ecz. Emine SAKMAN Üye	Eczacı	T.Ü.T.F. Başhekimliği	K	E <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Avukat Barış DEMİREL Üye	Hukuk	T.Ü. Rektörlüğü	E	E <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	

* Araştırma ile İlişki
** Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Filiz AKATA
Dekan