

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PREPUBERTAL DÖNEMDEKİ DİŞİ RATLARIN
OVARYUMLARI ÜZERİNDE
ELEKTROMANYETİK ALANIN ETKİSİNE
KARŞI LİPOİK ASİDİN KORUYUCU
ÖZELLİĞİNİN BİYOKİMYASAL, IŞIK
MİKROSKOBİK VE ULTRASTRÜKTÜREL
DÜZEYDE İNCELENMESİ**

CEYDA YILDIZ

HİSTOLOJİ – EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR - 2009

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PREPUBERTAL DÖNEMDEKİ DİŞİ RATLARIN
OVARYUMLARI ÜZERİNDE
ELEKTROMANYETİK ALANIN ETKİSİNE
KARŞI LİPOİK ASİDİN KORUYUCU
ÖZELLİĞİNİN BİYOKİMYASAL, IŞIK
MİKROSKOBİK VE ULTRASTRÜKTÜREL
DÜZEYDE İNCELENMESİ**

HİSTOLOJİ – EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CEYDA YILDIZ

DOÇ.DR. BEKİR UĞUR ERGÜR

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından proje
2009.KB.SAG.020 sayı ile desteklenmiştir.

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. OVARYUM YAPISI	2
2.2. OVARYAL DÖNGÜ	3
2.2.1. <i>FOLİKÜLER EVRE</i>	3
2.2.2. <i>OVULASYON</i>	6
2.2.3. <i>LUTEAL EVRE (CORPUS LUTEUM - SARI CİSİM)</i>	8
2.3. OVARYUMUN KAN DAMARLARI VE SINIRLARI	9
2.4. OVARYUMUN HORMONAL REGÜLASYONU	10
2.5. APOPTOZ	10
2.5.1. <i>APOPTOZ'UN TANIMI VE TARİHÇESİ</i>	10
2.5.2. <i>APOPTOZ VE NEKROZ ARASINDAKİ FARKLAR</i>	10
2.5.3. <i>APOPTOZUN GÖRÜLDÜĞÜ OLAYLAR</i>	13
2.5.4. <i>APOPTOZUN REGÜLASYONU</i>	14
2.5.5. <i>APOPTOZ VE OVARYUM</i>	19
2.6. ELEKTROMANYETİK ALAN	21
2.6.1. <i>ELEKTROMANYETİK BÜYÜKLÜKLER VE BİRİMLER</i>	24
2.7. SERBEST RADİKALLER VE REAKTİF OKSİJEN TÜREVLERİ	27
2.7.1. <i>SERBEST RADİKALLER</i>	27
2.7.2. <i>REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ</i>	27
2.7.3. <i>SERBEST RADİKALLERİN KAYNAKLARI</i>	29
2.7.4. <i>SERBEST RADİKALLERİN ETKİLERİ</i>	30
2.7.5. <i>OKSİDATİF STRES VE OVARYUM</i>	32
2.7.6. <i>ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ</i>	32
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	37
3.1. LİPOİK ASİDİN HAZIRLANIŞI	38
3.2. EMA OLUŞTURULMASI	38
3.3. DOKU ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI	39
3.4. RUTİN DOKU TAKİBİ PROTOKOLÜ	39
3.5. TUNEL PROTOKOLÜ	40
3.6. ROS VE ANTİOKSİDAN TAYİNİ	41
3.6.1. <i>HOMOJENAT HAZIRLANMASI</i>	41
3.6.2. <i>SPEKTROFOTOMETRİK MDA (MALONDİALDEHİT) ÖLÇÜMÜ</i>	42
3.6.3. <i>SPEKTROFOTOMETRİK GLUTATYON PEROKSİDAZ ÖLÇÜMÜ</i>	42
3.6.4. <i>TOTAL PROTEİN ÖLÇÜMÜ</i>	43
3.7. ULTRASTRÜKTÜREL İNCELEME	43
3.7.1. <i>ELEKTRON MİKROSKOBİK DOKU TAKİBİ</i>	43
4. BULGULAR	45
4.1. IŞIK MİKROSKOBİK BULGULAR	45
4.2. DNA FRAGMENTASYONU –TUNEL BULGULARI	52
4.3. ROS (MDA) ve ANTİOKSİDAN (GPX) DÜZEYLERİ	59
4.4. ELEKTRON MİKROSKOBİK BULGULAR	60
5. TARTIŞMA	63
6. SONUÇ	68
7. KAYNAKLAR	69

Sekil Dizini

Şekil 1 Ovaryal Döngü.....	5
Şekil 2 Apoptoz ve Nekrozun şematik görünümü.....	11
Şekil 3 Bcl-2 ailesi tarafından apoptozun regülasyonu	16
Şekil 4 Reseptör aracılı Kaspaz aktivasyonu	17
Şekil 5 Elektrik , Manyetik ve Elektromanyetik alan dalgaları ve vektör yönleri	22
Şekil 6 Elektromanyetik Tayf	23

Tablo Dizini

Tablo 1 Nekroz ve apoptozun karşılaştırılması.....	12
Tablo 2 Apoptoz ve genetik kontrolü	15
Tablo 3 Reaktif Oksijen Türevleri.....	28
Tablo 4 Endojen Antioksidanlar.....	33
Tablo 5 Eksojen Antioksidanlar	34
Tablo 6 α - Lipoik asit ve Dihidrolipoik asit tarafından yakalanan reaktif oksijen türleri	36
Tablo 7 Lipoik asit uygulanmasından sonra, hayvanların %50'sinin öldüğü dozlar.	36
Tablo 8 Follikül sayılarının karşılaştırılması	46
Tablo 9 Primer ve sekonder folliküllerdeki hücrelerin TUNEL değerlendirilmesi	52
Tablo 10 Grupların MDA ve GPX değerlerinin karşılaştırılması	59

Resim Dizini

Resim 1: 30 Gauss = 3 militesla, 50 Hertz frekanslı EMA.....	39
Resim 2: Homojenat Hazırlanması.....	41
Resim 3: Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti	46
Resim 4: EMA grubuna ait ovaryum kesiti	47
Resim 5: EMA grubuna ait ovaryum kesiti	47
Resim 6: EMA grubuna ait ovaryum kesiti	48
Resim 7: EMA grubuna ait ovaryum kesiti	48
Resim 8: EMA grubuna ait ovaryum kesiti	49
Resim 9: EMA+LA grubuna ait ovaryum kesiti	49
Resim 10: EMA+LA grubuna ait ovaryum kesiti	50
Resim 11: EMA+LA grubuna ait ovaryum kesiti	50
Resim 12: EMA+LA grubuna ait ovaryum kesiti	51
Resim 13: EMA+LA grubuna ait ovaryum kesiti	51
Resim 14: Kontrol grubunda TUNEL değerlendirilmesi.....	53
Resim 15: Kontrol grubu TUNEL değerlendirilmesi	54
Resim 16: EMA grubu TUNEL değerlendirilmesi.....	55
Resim 17: EMA grubu TUNEL değerlendirilmesi.....	56
Resim 18: EMA+LA grubunun TUNEL değerlendirilmesi	57
Resim 19: EMA+LA grubunun TUNEL değerlendirilmesi	58
Resim 20: Kontrol grubuna ait elektron mikrofafi	60
Resim 21: EMA grubuna ait elektron mikrofafi.....	61
Resim 22: EMA+LA grubuna ait elektron mikrofafi	62

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGE VE KISALTMA	AÇIKLAMA	
ROS	Reactive oxygen species	Reaktif oksijen türleri
Disc	Death-Inducing Signalling Complex	Ölümü Başlatan Sinyalleme Yapısı
Fadd	Fas Associated Death Domain	Fas'a Bağlı Ölüm Bölgesi
OMI	Oocyte maturation inhibitor	Oosit maturasyon inhibitörü
FSH	Follicle-Stimulating Hormone	Folikül uyarıcı hormon
LH	Luteinizing Hormone	Luteinizan hormon
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone	Gonadotropin salgılatıcı hormon
IGF 1	Insulin-like growth factor 1	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
EGF	Epidermal growth factor	Epidermal büyüme faktörü
IAP	Inhibitor Of Apoptosis Protein	Apoptozu Baskılayan Protein
TNFR	Tumour Necrosis Factor Receptor	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü
FGF	Fibroblast growth factor	Fibroblast büyüme faktörü
IGFBP	Insulin-like growth factor binding protein	İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteini
TGF- β	Transforming growth factor	Transforme edici büyüme faktörü
AIF	Apoptosis-Inducing Factor	Apoptozu Uyarıcı Faktör
Apaf	Apoptotic Protease Activating Factor	Apoptotik Proteaz Etkinleştirici Faktör
Bcl-2	B Leukemia Cell 2	B Lösemi Hücresi 2
MDA	Malondialdehyde	Malondialdehit
GPx	Glutathione peroxidase	Glutatyon peroksidaz

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, Histoloji ve Embriyoloji Biliminde yetişmemde büyük emekleri olan, öğrencileri olma şansı bulduğum engin bilgi ve tecrübeleriyle Sayın Prof. Dr. Candan Özoğul' a, gerek bilimsel gerekse sosyal olarak çok şeyler öğrendiğim, zor anlarımda yanımda olan, beni her an destekleyen ve doğruya yönlendiren, bilimsel gelişimimde en büyük role sahip, çok sevdiğim abim ve aynı zamanda çok değerli bir hoca olan danışmanım Sayın Doç. Dr. Bekir Uğur ERGÜR'e, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Alper BAĞRIYANIK ve Anabilim dalındaki bütün hocalarıma bana verdikleri destek ve katkıları için sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda çalışmalarımın her aşamasında laboratuvar bilgilerini esirgemedi bana sunan Dr. Müge KIRAY, Bio. Serap Cilaker MICILI, Bio. Sedef MENKÜ, Bio. Özcan ÜSTÜN ve Anabilim Dalının Uzmanlarına ve Araştırma Görevlilerine sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

Birlikte olmaktan huzur ve mutluluk duyduğum fikirlerini ve desteklerini esirgemeyen yüksek lisans arkadaşlarım Bio. Müge KOVALI, Bio. Şule DOĞAN ve tüm yüksek lisans arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Hayatım boyunca yanımda olan beni sevgiyle, özveriyle büyüten, özellikle üniversite yüksek lisans ve tüm eğitimim boyunca maddi, manevi her türlü desteği sağlayan ailemin her üyesine başta sevgili babam Mehmet Hanifi YILDIZ olmak üzere, annem Lale YILDIZ' a, ablam ve eniştem İrem PERT ve Nick PERT'e ve sevgili abim Dr.Ender Eren YILDIZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Ceyda YILDIZ

ÖZET

PREPUBERTAL DÖNEMDEKİ DİŞİ RATLARIN OVARYUMLARI ÜZERİNDE ELEKTROMANYETİK ALANIN ETKİSİNE KARŞI LİPOİK ASİDİN KORUYUCU ÖZELLİĞİNİN BİYOKİMYASAL, IŞIK MİKROSKOBİK VE ULTRASTRÜKTÜREL DÜZEYDE İNCELENMESİ

CEYDA YILDIZ

Çalışmamızda elektromanyetik alanın ovaryumda meydana getirdiği değişimler ile ve bu değişimler üzerine lipoik asidin antioksidan etkisi incelenmiştir. EMA'nın ovaryumda beklenen apoptozdaki rolü, ayrıca oksidatif stres parametreleri üzerine olan etkisi de çalışılmış ve ultrastrüktürel incelemelerle desteklenmiştir.

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurulu'nun 21/03/2008 gün ve 33 sayılı kararı ile çalışmaya başlanmıştır.

Çalışma gruplarımız; I. grup: Kontrol grubu. EMA'ya maruz kalmamış ve p.o.serum fizyolojik almış grup (n=7), II. grup: EMA grubu. EMA'ya maruz kalan ve p.o. serum fizyolojik uygulanmış prepubertal dişi sıçanlar (n=7, 6 hafta), III. grup: EMA+LA grubu. EMA maruziyeti + Lipoik Asit uygulanmış sıçanlar (n=10, 100 mg/kg Lipoik Asit p.o. 6 hafta) olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Bütün gruplardaki hayvanların sağ ovaryumları GPX ve MDA ölçümleri için spektrofotometrik yöntemle incelendi. Gruplar arası primer ve sekonder follikül sayıları karşılaştırıldı, TUNEL yöntemi uygulanarak DNA fragmentasyonu değerlendirildi. Transmisyon elektron mikroskobu ile granüloza hücreleri, oosit ve zona pellusidadaki ince yapı düzeyindeki değişiklikler incelendi.

Gruplar arası follikül sayıları karşılaştırılmasında EMA' ya maruz kalan grupta primer ve sekonder follikül sayılarında diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı azalma saptanmıştır. DNA hasarının değerlendirilmesinde Kontrol ve LA+EMA grupları arasında primer ve sekonder folliküllerdeki TUNEL pozitif boyanan granüloza hücrelerinde anlamlı fark gözlenmezken, EMA grubunda primer ve sekonder folliküllerde tunel pozitif hücre sayısı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Hem EMA grubunda hem de EMA+LA grubunda MDA düzeyi ortalamaları EMA' nın verdiği hasardan dolayı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Ancak EMA ve EMA+LA grupları arasında MDA düzeyleri açısından bulunan fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Hem EMA grubunda hem de EMA+LA grubunda GPx düzeyi ortalamaları EMA' nın verdiği hasardan dolayı kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu. Ancak EMA ve EMA+LA grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Elde ettiğimiz bulgulardan antioksidan olarak kullandığımız lipoik asitin oksidatif stres parametreleri üzerine etki etmediği sonucuna vardık.

Yaptığımız bu çalışmada lipoik asidin, elektromanyetik alanın ovaryum dokusunda neden olduğu hasara karşı kullanılması literatürde bir ilktir.

Anahtar kelimeler : Elektromanyetik alan, Lipoik asit, Ovaryum, Apoptoz, ROS, Ultrastrüktür

1. GİRİS VE AMAC

Gelişen teknoloji ile birlikte yaşam elektriğe bağımlı hale gelmiştir. Elektrik, ev gereçlerinden iş makinelerine kadar hayatımızda birçok alanda kullanılmaktadır. Evlere dağıtılan elektriğin frekansı 50–60 Hz'dir. Bu frekanslardaki elektriksel güç, çok düşük frekanslı elektromanyetik alan (EMA) meydana getirmekte ve farkında olunmadan istenmeyen etkilerle karşı karşıya kalınmaktadır.

EMA'nın canlı dokularda iki temel etki mekanizması bulunmaktadır. Birincisi termal etkiler, diğeri ise kimyasal etkiler olarak bilinmektedir. Organizmanın EMA'ya maruz kalmasıyla birlikte nasıl bir etkinin meydana geleceği merak konusu olmuştur. Bunların, insan sağlığına zararlı olduklarına dair bugüne kadar yapılan bilimsel araştırmalarda çok küçük şiddet ve güçlerde dahi elektromanyetik alan ve dalgaların biyolojik etkilerinden söz edilmektedir. Günümüzde bu dalgaların insan sağlığı üzerine zararlı etkilerinin olduğunu bildiren çalışmalar incelendiğinde, bu konunun önemli bir sağlık problemi haline geldiği görülmektedir. EMA'ya maruz kalma, vücutta birçok biyolojik süreci etkileyerek DNA'da tek veya çift zincir kırıklarına yol açabilmekte, bu durum karsinogenesis gelişimi için potansiyel risk oluşturmaktadır.

Hücrede oluşan reaktif oksijen türleri (ROS), "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinen mekanizmalarla ortadan kaldırırlar. ROS, direkt veya indirekt yollarla apoptotik veya nekrotik hücre ölümünü başlatabilir. Bazı çalışmalarda EMA ve statik manyetik alanların, lipid peroksidasyonunun ve serbest radikallerin indüklenmesine neden olduğu bildirilmiştir.

Thioktik asit olarakta bilinen Lipoik Asit'in (LA), LA ve redükte LA [dihidrolipoik asit (DHLA)] olmak üzere iki formu bulunmaktadır. LA'nın bu iki formu oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarıyla birbirine dönüşebilir. İn vivo ve in vitro çalışmalarda lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği belirlenen LA'nın; aşırı toksik olan nitrik oksit ve hidroksil radikallerini, hidrojen peroksiti, hipokloröz asiti ve nitrit anyonunu yakalayarak, singlet oksijeni etkisizleştirdiği bilinmektedir.

Bu çalışmada EMA'nın ovaryumda meydana getirdiği değişimler ile ve bu değişimler üzerine lipoik asidin koruyucu antioksidan etkisi incelenmiştir. EMA'nın ovaryumda beklenen apoptozdaki rolü, ayrıca oksidatif stres parametreleri üzerine olan etkisi de çalışılmış ve ultrastrüktürel incelemelerle desteklenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. OVARYUM YAPISI

Çocuk doğurmamış kadınlarda ovaryum bir çift, bademe benzer şekilde, pembemsi-beyaz görünümde, 3 cm uzunluğunda, 1,5 cm genişliğinde ve 1 cm kalınlığındadır. Puberteden önce ovaryum düzgün yüzeylidir. Üreme hayatı boyunca tekrar eden ovulasyonlardan dolayı düzensiz bir hal alır. Menapoz sonrası kadınlarda ovaryum, üreme periyodundaki büyüklüğünün ¼ ' lik halini alır (1).

Ovaryumun fonksiyonları;

- Dişi gamet üretimi
- Steroid hormonların (Östrojen ve progesteron) salgılanması;
- Doğumdan sonra üreme organlarının büyümesinin regülasyonu
- Sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumludur (2).

Ovaryum korteks ve medulladan oluşur;

Medulla/Medullar Bölge; Ovaryumun merkezi bölgesidir. Medulla da gevşek bağ doku, yoğun kıvrıntılı kan damarları ve sinirler bulunur. Medulla stroması fibroblastları, elastik lifleri ve düz kas hücrelerini içerir.

Korteks/Kortikal Bölge; Medullayı kuşatan periferel kısımdır. Hücrece zengin bağ dokuya gömülü ovaryal foliküllerden oluşur (1). Korteks stroması fibroblast benzeri hücreleri ve retiküler lif ağını içerir (3). Foliküllerin etrafındaki stromada düz kas lifleri bulunur. Medulla ve korteks arasında keskin bir sınır yoktur.

Ovaryumun yüzeyi tek katlı kübik ve bazı kısımlarında yassı hücrelerle çevrilidir. Bu hücresel tabaka germinal epitel olarak adlandırılır ve mesovaryumu çevreleyen mezotelyumla devam eder (1) . Ovaryum hilusunda mesovariuma yakın bölgede büyük epiteloïd hücre grupları görülür. Bunlar kan damarları ve miyelinsiz sinir lifleriyle ilişkidirler ve hilus hücreleri ya da sempatikotropik hilus bezi olarak adlandırılırlar. Bu hücrelerin kromaffin hücreleri olduğu düşünülmüş fakat kromatlarla boyanmadıklarından sitolojik ve histokimyasal özelliklerinden dolayı Leydig hücrelerine daha çok benzedikleri bulunmuştur. Lipidlerden zengin lipokrom pigmenti ve Reinke kristallerine benzer kristalleri vardır (3). Yoğun bir bağ doku tabakası olan tunika albuginea, germinal epitel ile korteks arasında yer alır.

Ovaryum folikülleri ve gelişmekte olan oosit için gerekli mikroçevreyi oluşturur. Ovaryum folikülleri korteksin stromasında bulunur çeşitli büyüklüklerde ve her biri tek bir oosit içerir (1).

2.2. OVARYAL DÖNGÜ

FSH (folikül stimulan hormon) ve LH (luteinizan hormon), hormonlarının etkisiyle ovaryumda, folikül gelişimi, ovulasyon, korpus luteum oluşması gibi siklik değişiklikler meydana gelir, buna ovaryal döngü denir. (4) Ovaryal döngü foliküler evre, ovulasyon evresi ve luteal evre olarak 3 kısımda incelenebilir; (2)

2.2.1. FOLİKÜLER EVRE

2.2.1.1. Prenatal Maturasyon

Gelişimin üçüncü haftası bitiminde vitellus (yolk) kesesi duvarında beliren primordiyal germ hücrelerinden, olgun erkek ve dişi üreme hücreleri gelişirler. Bu hücreler vitellus kesesinden, gelişmekte olan gonadlara ameboid hareketlerle göç ederek, gonadlara dördüncü haftanın sonu veya beşinci haftanın başında ulaşırlar (5). Primordiyal germ hücrelerinin çoğalmasında ve izledikleri yol, kendileri tarafından üretilen ve bir tirozin kinaz olan *c-kit* reseptörü ve onun ligandı olan kök hücre faktörü ile etkileşimine bağlıdır. Bunların eksikliği, gonad yetersizliği ile sonuçlanır (2).

Primordiyal germ hücreleri dişi gonada ulaştıklarında oogoniumlara farklılaşırlar. Ardarda mitoz geçiren oogoniumlar kümeler oluşturur ve üçüncü ayın sonunda yassı epitel hücreleriyle çevrelenirler. Bir kümedeki oogoniumların tümü tek bir primordiyal germ hücresinden gelişirken, folikül hücreleri veya granüloza hücreleri olarak bilinen oogoniumların çevresindeki yassı epitel hücreleri ovaryumun yüzey epitelinden köken alırlar. Oogoniumların çoğu mitozla bölünmeye devam ederken, bir kısmı büyüyerek primer oositlere farklılaşırlar. Oluşan primer oositler hemen DNA'larını bir kat arttırarak, birinci mayoz bölünmenin profaz safhasına girerler. Oogoniumların sayısı hızla artar ve gelişimin beşinci ayında sayıları yaklaşık yedi milyona ulaşır. Bu dönemden sonra dejenerasyon başlar. Oogoniumların bir çoğu ve primer oositler atrezik hale gelir. Yedinci ayda yüzeye yakın yerleşimli olan birkaçı dışında oogoniumların çoğunluğu artık dejenerere olmuştur.

Geriye kalan primer oositlerin tümü, birinci mayoz bölünmeye girmiş ve her biri ayrı ayrı tek katlı yassı epitel tabakasıyla çevrelenmiştir. Bu primer oosit ve çevresindeki yassı epitel hücreleri birlikte **primordiyal folikül** adını alır (5).

2.2.1.2. Postnatal Maturasyon

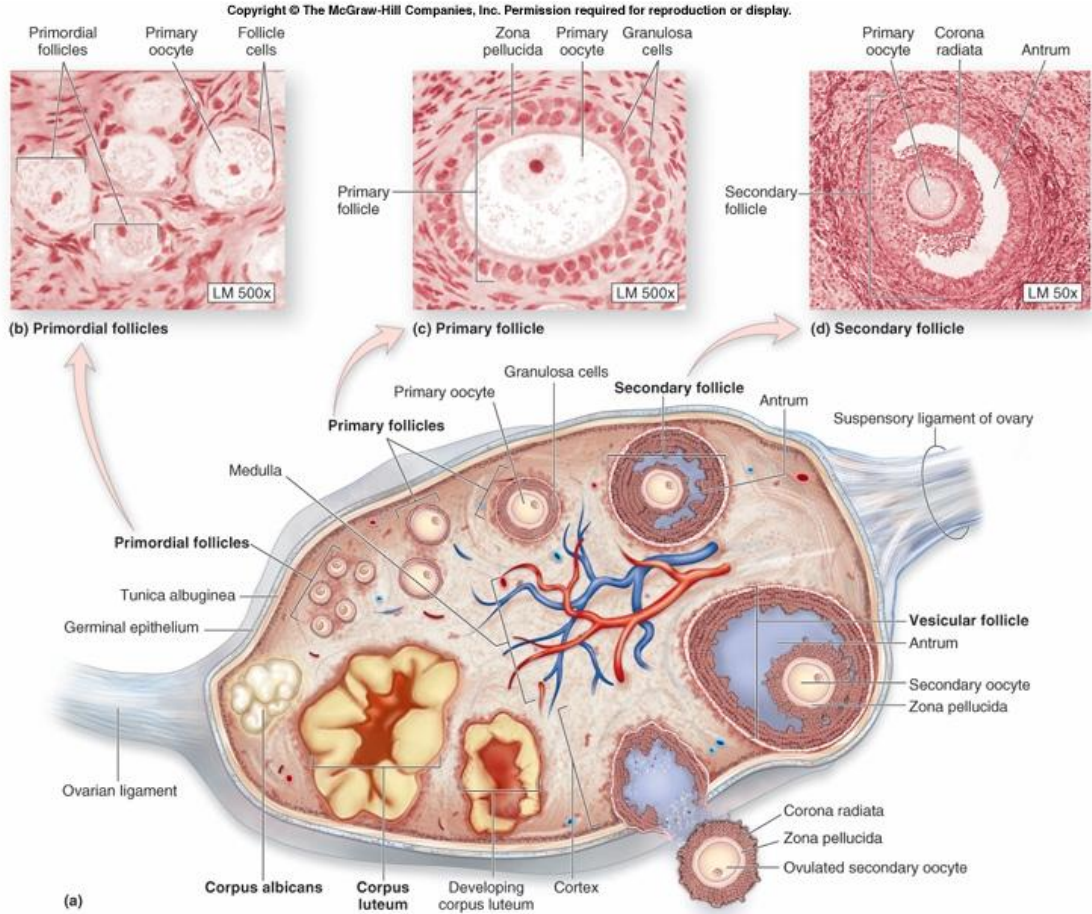
Doğumda, tüm primer oositler birinci mayoz bölünmenin profaz safhasındadır. Normalde bölünmenin metafazla devam etmesi gerekirken, çekirdek kromatinin seyrek ve düzensiz bir yapılaşma gösterdiği diploten dönemi olarak adlandırılan istirahat dönemine girerler. Primer oositler, puberteye kadar I. Mayoz bölünmenin profaz safhasında beklerler. Bu süre zarfında, oositin olgunlaşması folikül hücreleri tarafından salgılanan oosit maturasyon inhibitörü olan OMI tarafından baskılanır. Doğumda overlerdeki primer oosit sayısının yaklaşık 700.000 ile 2.000.000 arasında değiştiği bilinmektedir. Puberteye kadar bu oositlerin çoğu atreziye uğrar, puberte başlangıcındaki bu sayı 400.000'e düşer ve ancak 500'den daha azı menapoza kadar ovulasyonla gonad dışına atılır.

Pubertede her siklusta 5 ile 15 kadar primordial folikül olgunlaşmaya başlar. Diploten evresinde olan primer oosit büyümeye başlar, oositi kuşatan yassı epitel hücreleri önce kübikleşir, sonra çoğalarak çok katlı bir epitel tabakası oluşturur. Bu çoğalan hücrelere **granüloza hücreleri** denir. Bu foliküllere de **primer folikül** denir. Granüloza hücreleri bir bazal membran üzerine otururlar. Granüloza hücreleri ve oosit, glikoprotein yapısında zona pellusida denilen tabakayı oluşturur. Folikül büyümesine devam ederken teka folikülü hücreleri, teka interna ve teka eksterna denilen iki tabaka şeklinde farklılaşırlar. İçte teka interna salgı yapan hücrelerden, dıştaki teka eksterna ise fibroblast benzeri hücreler ve bağ dokusundan oluşur. Oositi çevreleyen folikül hücrelerinin sitoplazmik uzantıları zona pellusidayı geçerek oositin hücre membranının mikrovilluslarıyla yakın temasta bulunur. Folikül gelişimi ilerledikçe granüloza hücreleri arasında içi sıvı dolu boşluklar belirir. Bu boşluklar birleşerek antrumu oluşturur bu foliküle de sekonder **folikül** denir. Başlangıçta antrum hilal şeklindedir, fakat zamanla genişler. Oositi çevreleyen granüloza hücreleri bozulmamış olarak kalarak **kümüulus ooforus'u** oluştururlar. Olgunlaşmış folikülün çapı 10 mm veya daha fazladır ve **tersiyer, veziküler** veya **graaf folikülü** olarak bilinir (Şekil 1).

Her bir siklusta birden fazla folikül gelişmeye başlasa da, bunlardan sadece bir tanesi tam anlamıyla olgunlaşır. Diğerleri dejenere olarak atretik hale gelirler.

Follikül olgunluğa eriştiğinde, primer oosit I.Mayoz bölünmesini tamamlar ve büyüklükleri farklı, her biri 23 çift kromozom içeren iki yavru hücre oluşturur. Bölünme sonunda, sitoplazmanın hemen hemen tümünü alan, sekonder oosit ve sitoplazmaca fakir 1.polar cisim oluşmuştur. Polar cisim, oositin hücre membranıyla zona pellucida arasındaki perivitellin aralıkta yer alır. Böylece birinci mayotik bölünme ovulasyondan hemen önce tamamlanır.

Birinci mayoz bölünme tamamlandıktan sonra, sekonder oositin nukleusu istirahat döneminden önce, DNA replikasyonu olmadan ikinci olgunlaşma bölünmesine girer. Sekonder oositte bölünme mekiği oluşup, kromozomlar metafaz plağında dizildikleri zaman, ovulasyon gerçekleşir ve oosit dışarı atılır. İkinci mayoz bölünme ancak, oositin bir spermium tarafından döllenmesinden sonra tamamlanır. Döllenmeyen oosit ise 24 saat içinde dejenere olur (5).



Şekil 1 Ovaryal Döngü

2.2.2. OVULASYON

Ovulasyon sırasında Graaf folikülünden atılan sekonder oositir. Ovulasyon esnasında, folikül germinal epitele yaklaşır. FSH seviyesinin düşüşü ve LH seviyesinin artışı folikülü ovulasyona götürür (6).

Ovulasyonda rol oynayan faktörler; (1)

- 1) Folikül sıvısının hacminin artışı ve iç basınçta oynadığı rol
- 2) Plazminojenin aktivasyonu ile folikül duvarının enzimatik proteolizi
- 3) Oosit-kumulus kompleksinde glikozaminoglikanların hormonlara etkisi
- 4) Teka eksterna'nın düz kas hücrelerinin prostaglandinler tarafından aktive edilişi
- 5) Folikül etrafındaki bağ dokusunun dağılışı
- 6) İskemi oluşması, kan akımının kesilmesi

Ovulasyon öncesinde, folikülün germinal epitele yakın ve epitelle temasda olan kısımlarında kan akışı kesilir, germinal epitel ovaryum yüzeyine doğru şişkinlik (macula pellucida= stigma) yapar ve folikül çatlar (1). Sekonder oosit ile birlikte bir miktar folikül hücresi dışarıya atılır ve ovulasyon gerçekleşir.

Ovulasyondan sonra fertilizasyon gerçekleşmezse sekonder oosit, II. Mayoz bölünmesini tamamlayamadan dejenere olur (6).

2.2.2.1. Atrezi

İnsan ovaryumunda, her ovaryal siklus boyunca büyümeye başlayan foliküllerden genellikle bir tanesi gelişimini tamamlarken diğerleri foliküler büyümenin herhangi bir safhasında geriler, buna **atrezi** denir. Atrezi fetal hayatta ovaryum gelişimi esnasında başlar, erken postnatal hayat, puberte ve puberteden sonraki erişkin dönemde yavaşlayarak devam eder. Her ovaryal siklusta olgunlaşmasını tamamlayan bir folikül ovulasyona ulaşırken diğerleri programlanmış ölüm gereği parçalanır ve kaybolurlar.

Hormonal etkinin yetersizliği, folikülleri büyümenin herhangi bir zamanında gerilemeye götürür. Primordial hücreden büyüyen folikül safhalarına kadar gerilemede oosit parçalanır ve dejenere olurken granüloza hücreleri daha geç süreçte ortadan kalkar. Buna benzer değişiklik önce granüloza hücrelerinde ve daha sonra oositte de olabilir. Parçalanmış hücreler granüloza hücreleri tarafından fagosite edilir. Atretik folikül ovaryum stroması içinde zamanla kaybolur.

Büyük foliküllerin gerilemesinde interstisyel hücrelerin ortaya çıkması, sekonder dejeneratif değişikliklerin olduğunu gösterir. Teka internanın hücreleri, teka interna tabakasında ve folikül içinde farklılaşarak lipid, lipofuksin pigmenti ve lizozom yapılarıyla ayırd edilir. Bu hücrelere **interstisyel** hücreler denir. İnterstisyel hücreler stromada nadir bulunur ve steroid hormonları ürettikleri, östrojenlerin ve bazı türlerde de progesteronun kaynağı oldukları ileri sürülmektedir. Ayrıca bu hücrelerin sekonder seks organlarının gelişiminden sorumlu oldukları düşünülmektedir.

Atretik foliküllerde granüloza hücrelerinde mitotik ve enzimatik aktiviteleri durur. Antrum içinde granüloza hücre etkisi azalır, teka internada hipertrofi ve folikülün kollaps hale geçmesi ve folikül içine bağ dokusunun invazyonu gibi değişiklikler izlenir. Nötrofil ve makrofajlar granüloza hücrelerini baskı altına alır. Bağ dokusunun hakimiyeti artar (6).

Yapılan son çalışmalar, çeşitli gen ürünlerinin foliküler atrezi sürecini düzenlediğini göstermektedir. Nöral apoptozis inhibitör proteini (NAIP) bu gen ürünlerinden biridir. NAIP granüloza hücrelerinde olabilecek apoptotik değişimleri inhibe eder. NAIP, büyümekte olan foliküllerin tüm safhalarında eksprese edilirken, atreziye giden foliküllerde eksprese edilmez. Yüksek seviyedeki gonadotropinler NAIP ekspresyonunu arttırarak ovaryum foliküllerinin apoptozu inhibe ederler.

Oositde otolize benzer değişiklikler gözlenir. Zona pellucida da katlanma, büzülme ve kırılmalar meydana gelir. Bütün bu dejeneratif değişiklikler sonucu ortaya çıkan zona pellucida kalıntıları bağ dokudaki makrofajlar tarafından fagosite edilir.

Folikül bazal membranı teka internadan ve foliküler hücrelerden ayrılma gösterir. Bu bazal membran kalınlaşarak dalgalı bir hyalin tabaka haline gelir. Buna camsı membran (membrana vitrea) adı verilir. Bu yapılar atrezinin son safhalarının karakteristik bir özelliğidir. Bazı atretik foliküllerde teka interna hücre tabakasındaki hücrelerde büyüme gözlenir. Bu hücreler teka lutein hücreleriyle benzerlik gösterir ve ışınal düzenlenmeleriyle bağ dokudan ayrılırlar. Bağ dokuda zengin kapiller ağı gelişir. Bu atretik foliküller corpus luteuma benzerlik gösterdiğinden dolayı **corpora lutea atretica** adı verilir (1).

2.2.3. LUTEAL EVRE (CORPUS LUTEUM - SARI CİSİM)

Luteal faz ovulasyondan sonra başlar. Folikülün granüloza ve teka hücreleri corpus luteumu oluşturmak üzere morfolojik değişime girer. Corpus luteumdan az miktarda östrojen ve bol miktarda progesteron salgınır. Bu iki hormonun özellikle progesteronun etkisiyle endometrium sekresyon safhasına başlar. Uterus implantasyona hazır hale getirilir. Menstruel siklusta corpus luteumun oluşumu ve gelişiminden LH sorumludur. Fertilizasyon olmazsa, corpus luteum'un hormonal sekresyonu düşer ve birkaç gün içinde dejenere olur. Şayet fertilizasyon olursa corpus luteum daha da gelişerek progesteron, östrojen ve human koryonik gonadotropin (hCG) salgılamaya devam eder. Corpus luteum gebelikten sorumlu olurken bunun yerini daha ileride plasenta alır.

2.2.3.1. Menstruasyon Corpus Luteumu

Ovulasyondan sonra graaf folikülü corpus luteuma dönüşür. Başlangıçta graaf folikülünün teka internasındaki hücreler ile burada bulunan kan damarları, büzülen ve yer yer kopukluk gösteren folikül duvarından içeri girerler. Kanamanın folikül merkezine ulaşması ile kanama odaklı bir yapı izlenir. Bu duruma **corpus hemoragicum** denir.

Folikülün büyüyüp, derin katlanmalarla kollaps bir hale geçmesi esnasında bu yapı içinde granüloza hücreleri, teka interna hücreleri, kanın şekilli elemanları ve stromadan gelen bağ dokusu elemanları yer alır. Kırmızı bir leke şeklindeki bu yapıya corpus **rubrum** adı verilir.

Granüloza ve teka internanın hücreleri morfolojik değişiklikler gösterir. Bu hücrelerin sitoplazmaları lipid, lipokrom pigmenti, bol miktarda agranüler endoplazmik retikulum ve tubuler tip mitokondriumla karakterizedir. Bu ultrastrüktürel görünüm onların steroid sentezleyen hücrelerin özelliklerini taşıdığını gösterir.

Luteal hücreler granüloza hücrelerinden oluşan 30 mikrometre çapındaki granüloza lutein hücreleri ile 15 mikrometre çapında olan ve teka interna hücrelerinden oluşan, teka lutein hücreleri olarak iki tiptir. Teka lutein hücrelerinin nükleusu ve sitoplazması daha koyu görülür ve corpus luteum parankimasının az bir miktarını (%15) oluştururlar. Corpus Rubrumun serbest kan hücreleri fagosite edildiğinden artık bu yapılar sarı cisim ' Corpus Luteum' ismini alırlar.

Corpus luteum'da kan ve lenf damarlarından oluşan zengin bir vasküler ağ belirir. Böylece corpus luteum içinde ve dışında vasküler bir yapı görülür. Ovaryum korteksinde yerleşmiş olan corpus luteumlar progesteron ve östrojen sekresyonundan sorumludurlar.

Bu hormonlar uterus endometriumunun büyümesini ve sekresyon aktivitesini uyarır. Fertilizasyon sonrası gelişen zigotun implantasyonu için endometriumu hazırlar. Fertilizasyon ve implantasyon olmaması halinde corpus luteum sadece 14 gün aktif kalabilir. Buna menstruasyon corpus luteumu' u (Corpus Luteum Periodicum- Corpus Luteum spirium) isimleri verilir. İnsan hCG ve diğer luteotropinlerin eksikliği veya yokluğu progesteronu ve östrojen sekresyon miktarını düşürür. Bu durumda mestruasyon corpus luteumu ancak 10-12 gün kadar etkinliğini devam ettirebilir. Daha sonra hücrelerde lipid eksilir, vakuoller oluşur, otolize girerek dejenere olur ve zamanla da tamamen ortadan kalkar. Corpus luteum beyaz bir lekeye, **Corpus Albicans'a** dönüşür. Hücreler arasında biriken hyalin materyel zamanla ortadan kalkarak kaybolur (6).

2.3. OVARYUMUN KAN DAMARLARI VE SINIRLERİ

Ovaryum damarları, ovaryum ve uterus arterlerinin ovaryum dallarıdır. Ovaryumun kan ve lenf damarları ile sınırları hilusdan organa girer, medullada kıvrımlı bir şekil alır. Bu damara Arteriae helicinae denir. Korteks medulla sınırında arteriyel bir pleksus oluşturur. Buradan kortekse uzanan dallar kapilleri yaparlar. Foliküllerin teka internasında ve oluşan corpus luteumun hücre kordonları arasında bu zengin kapiller ağa rastlanılır. Venalar daima arter yollarını izler. Medulladaki venalar hilusa doğru kıvrımlar yaparak ovaryumu terk etmeden kalın ven pleksusları oluşturur. Ovaryumun lenf damarları olgunlaşmakta olan foliküllerin teka eksternalarında ve corpus luteumunda kapillerleri yaparlar.

Sınırlar damarları takip ederek hilusta ovaryum medullasına girer. Burada miyelinli ve miyelinsiz lifleri içeren bir pleksus oluşur. İnce sinir dalları ise kan damarları etrafında, corpus luteumda, germinal epitel altında ve foliküllerin etrafında izlenirler. Geniş arterler dallanır ve kıvrımlı hale gelir. Venler arterlere eşlik eder ve pleksuslar oluşur (pampiniform pleksus). Ovaryum venleri bu pleksustan orjin alır.

Ovaryumun kortikal bölgesinde teka tabakasında, atretik folikül ve corpora lutea etrafında lenfatik damar ağı gözlenir.

2.4. OVARYUMUN HORMONAL REGÜLASYONU

Ovaryum her menstruel siklusta sıklık değişikliklere girer. Bunlar foliküler ve luteal fazlardır. Foliküler fazda 10 ila 20 arası primer folikül FSH etkisi ile gelişmeye başlar. Siklusun 8 ila 10. günü içinde foliküller büyüme ve farklılaşma gösterir. Granüloza ve teka interna hücreleri steroid hormonu ve özellikle östrojen sentez ederek folikül lümenine verir.

Foliküler fazda ovulasyon öncesi progesteron seviyesi LH etkisi ile yükselmeye başlar. Sirkülasyondaki FSH miktarı adenohipofiz tarafından düzenlenir. LH artışı ovulasyona sebep olur (6).

2.5. APOPİTOZ

2.5.1. APOPİTOZ'UN TANIMI VE TARİHÇESİ

Apoptoz; organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlı hücrelerin, zararsız bir şekilde ortadan kaldırılmasını sağlayan genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür (7).

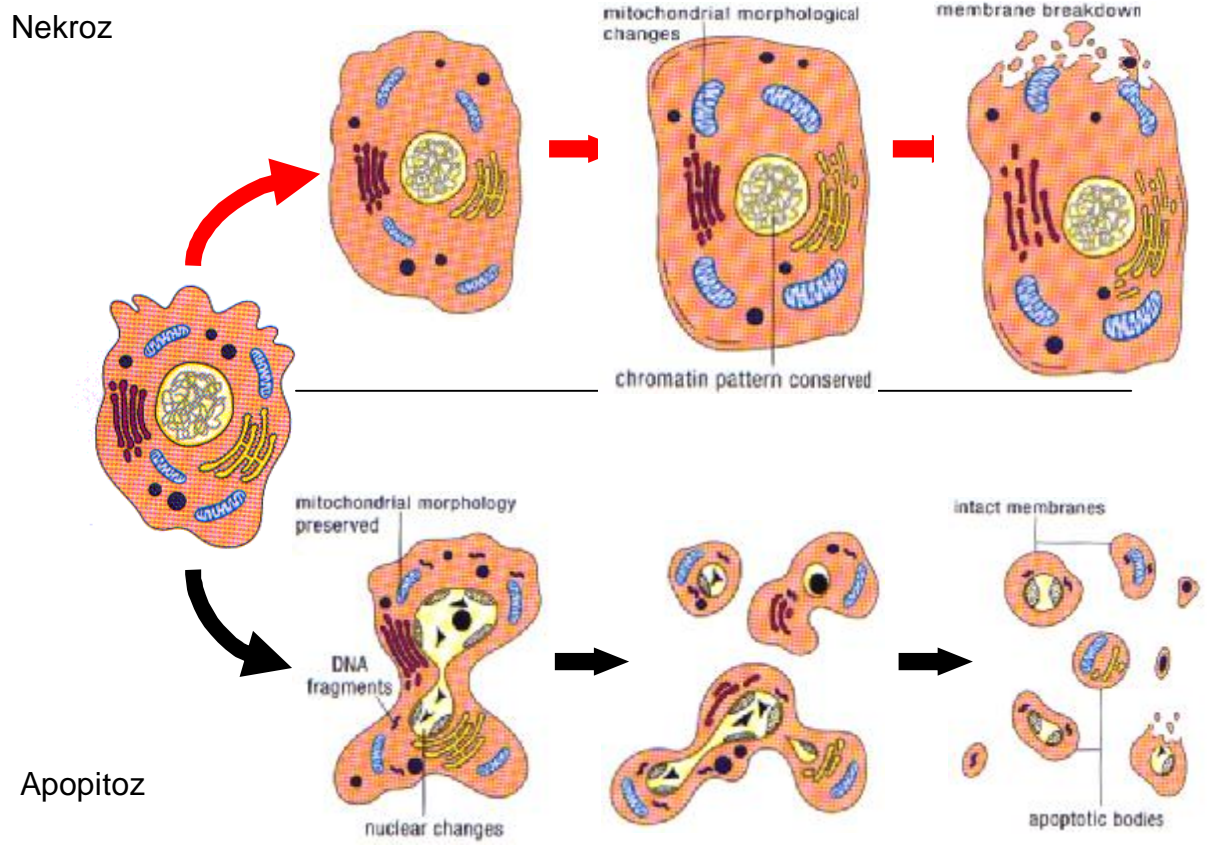
Apoptoz 1842 yılında Vogt tarafından hücrelerin normal gelişimleri sürecinde meydana gelen ölüm olarak tanımlanmıştır. Programlanmış hücre ölümü terimi ilk kez 1965 yılında kullanılmıştır. Apoptoz terimi ise ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Yunanca bir kelime olan *apoptosis* apo = ayrı, ptosis = düşen kelimelerinden oluşur ve ağaçtan düşen yapraklar olarak tarif edilmiştir (8). Kerr fizyolojik olarak ölü hücrelerin çekirdeklerinde yoğun kromatin parçalarını ve bu hücrelerin organellerinin iyi korunduğunu gözlemleyerek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır (9).

2.5.2. APOPİTOZ VE NEKROZ ARASINDAKİ FARKLAR

Yüksek organizmalarda hücre ölümü nekroz ve apoptoz olmak üzere iki farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir. Nekroz patolojik bir ölüm şekli iken apoptoz hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda meydana gelebilir (Tablo 1), (10). Nekrozda hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken apoptotik hücre tam tersine küçülür. Nekrozda kromatin paterni normal hücredekine benzer bir görünümdeyken oysa apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır ve yoğunlaşır (11). Nekrotik hücrenin membranı bütünlü-ğünü kaybettiğinden, hücre içinden dışına hücre içi materyallerin çıkışı gerçekleşir. Hücre içeriğinin dış ortama çıkması sonucu inflamasyon uyarılır. Apoptotik hücre membranı ise sağlamdır ve üzerinde küçük cebcikler oluşur (Şekil 2).

Nekrotik hücre sonradan lizise uğrar ama apoptotik hücre küçük cisimciklere parçalanır. Bu apoptotik cisimcikler membranla kaplıdır ve farklı miktarlarda nükleus veya diğer organelleri içerirler. Apoptotik cisimciklerin plazma membranı korunduğu için inflamasyona neden olmaz ve komşu hücrelerle makrofajlar tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılırlar (12).

Apoptozun en önemli özgün yönü DNA'nın internükleozomal bölgelerden parçalanmasıdır. Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü ortaya çıkmasına neden olur. DNA'yı parçalayan bir Ca/Mg-bağımlı endonükleazdır. Ayrıca DNaz I ve II' de DNA parçalanmasından sorumludur (13).



Şekil 2 Apoptoz ve Nekrozun şematik görünümü (14)

Tablo 1 Nekroz ve apopitozun karşılaştırılması (14)

ÖZELLİK	NEKROZİS	APOPİTOZİS
Yol Açan Nedenler	<ul style="list-style-type: none">* İskemi* Hipertermi* Hipoksi* Litik viral enfeksiyon* Yüksek konsantrasyondaki toksik maddeler* Aşırı oksidatif stres	<ul style="list-style-type: none">* Büyüme faktörü eksikliği* Hücre yaşlanması* HIV* Kanser ilaçları* Radyasyon* Yüksek doz glukokortikoid* Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu* Sitotoksik T lenfositler* Aşırı olmayan oksidatif stres
Morfolojik Özellikler	<ul style="list-style-type: none">* Hücre membran bütünlüğünün kaybı* Hücre şişmesi* Organellerin disintegrasyonu* Endoplazmik retikulumun dilatasyonu* Büyük vakuollerin oluşumu* Hücre lizisi	<ul style="list-style-type: none">* İntakt hücre membranı ancak membranda cepciklerin oluşumu* Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması* Hücre küçülmesi* Organellerde disintegrasyonun olmaması* Hücrenin intact mitokondri, ribozom, nükleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotik cisimciklere parçalanması
Biyokimyasal Özellikler	<ul style="list-style-type: none">* Bozulmuş iyon homeostazisi* ATP gerekmez +4 C°de gerçekleşebilir* DNA rastgele parçalanır* DNA fragmentasyonu ölümün geç safhasında meydana gelir	<ul style="list-style-type: none">* Enzimatik basamakların gerçekleşebilmesi için ATP gereklidir.* DNA internükleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonükleozomlara ayrılır* DNA fragmentasyonu erken evrede gerçekleşir
Diğer Özellikler	<ul style="list-style-type: none">* Hücreler gruplar halinde ölür* Fizyolojik olmayan patolojik etkiler sonucu gerçekleşir* Lizozomal enzimler salınır* İnflamasyona neden olur	<ul style="list-style-type: none">* Hücreler tek tek veya birkaçı bir arada ölür* Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir* Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler* İnflamasyon görülmez

Apopitozun erken safhasında hücrelerin birbirleriyle olan bağlantıları kesilir, özelleşmiş yüzey organellerini kaybederler ve yapılarında belirgin şekilde büzülme gözlenir. Dakikalar içerisinde hacimlerinin 1/3'ünü kaybederler (15). Hücresel büzülmenin nedeni Na, K, Cl taşıyıcı sisteminin etkisiz hale gelmesiyle hücre içi ve dışı arasındaki sıvı transportunun olmamasıdır (16). Işık mikroskopik incelemelerde bu büzülmelerden dolayı apoptotik hücrelerin çevreleri açık ve parlak bir görünümde (17).

2.5.3. APOPİTOZUN GÖRÜLDÜĞÜ OLAYLAR

Apopitoz canlıların bazı doku ve hücrelerinde sürekli olmakta ve ömür boyu devam etmektedir. Günde yaklaşık bir milyon hücre apoptoza uğrayarak ölür ve yerine yeni hücreler yapılır. Bu hızda bir hücre ölümü ve yeniden yapımı bir insanın vücut ağırlığının her 24 ayda bir yenilenmesi anlamına gelir. (14,18).

2.5.3.1. Fizyolojik Olaylar

- Ø Embriyogenez ve metamorfoz sürecinde (Müller ve Wolf kanallarının involüsyonu, kalp gibi bazı içi boşluklu organların lümenlerinin oluşması).
- Ø Vertebraların nöron gelişimi sırasında. Barsak kripta epiteli gibi sürekli proliferasyon gösteren hücre gruplarında hücre sayısının dengelenmesinde.
- Ø Menstruel siklusta endometriyum hücrelerinde, menapozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin rejenerasyonu gibi olaylarda.
- Ø T lenfositlerinin kontrolünde, matür T lenfositlerinin antijene bağımlı düzenlenmesinde, immatür B lenfositlerinin gelişimi gibi immun sistemin düzenlenmesinde.
- Ø Epiderminin en üst tabakası olan stratum korneumun sürekli dökülüp yenilenmesinde görülür (19).

2.5.3.2. Patolojik Olaylar

- Ø Her türlü neoplastik oluşumda, hipertermi, düşük doz sitotoksik ilaçlar, iyonize radyasyon, hafif travma, hafif hipoksi gibi hafif şiddette fiziksel ve toksik uyarılara maruz kalan dokularda.
- Ø Hormonlara bağlı dokularda patolojik atrofide, otoimmün hastalıklar sitotoksik T hücreleri ile oluşturulan hücre ölümünde.
- Ø Pankreasta ve böbrek tübüllerindeki gibi parankimden zengin dokularda duktus tıkanması sonrası patolojik atrofide apoptoz görülmektedir (19).

2.5.4. APOPTOZUN REGÜLASYONU

2.5.4.1. Apoptozun Başlatılması

Apoptoz hücre dışı uyarılar tümör nekroz faktörü (TNF), koloni uyarıcı faktörler (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), IL-2 (interlökin-2) gibi bazı sitokinlerin ortamda azalması, elektromanyetik alan, radyasyon, glukokortikoidler, ilaçlar, çeşitli antijen gibi uyarılarla tetiklenebilir (20). Hücrelerin apoptoza gitmesine neden olan bazı sitokinler hücre zarındaki reseptörlere bağlanarak apoptozu tetikleyen sinyaller üretebilirler. Bu uyarılar intrasellüler Ca^{+2} artışına neden olup cAMP gibi hücre içi ikincil habercileri aktive edebilmektedir. Örneğin sitoplazmada Ca^{+2} miktarında hafif artış gözlemlendiğinde c-fas, c-myc ve sıcak şoku proteini gibi yeni mRNA basamaklarını harekete geçirebilmektedir. Bununla birlikte, apoptozda etkili endonükleaz, transglutaminaz gibi enzimlerde aktive olup kromatinin parçalanmasına, hücre iskeletinde ve sitoplazmik proteinlerde değişikliklere neden olabilmektedirler. Sitoplazmadaki kalsiyumun kalmodulin ile bağlanmasıyla bu değişikliklerin önüne geçilip apoptoz inhibe edilebilir (17).

1999'da Horvitz tarafından memelilerde apoptozun genetik mekanizmasının anlaşılmasında *Coenarhabditis Elegans* adlı nematod kullanılmıştır. Başlangıçtaki 1090 somatik hücreden 131 inin programlı bir şekilde öldüğünü ve bunun genetik olarak kontrol edildiği ortaya konulmuştur.

Burada 3 kilit gen tanımlanmıştır. Bunlar *ced-3*, *ced-4* ve *ced-9* dur. Ced 3 bir sistein proteazdır. Ced 3 geni Ced 4 tarafından aktive edildiğinde hücrenin apoptoza gitmesine neden olur. İnsanda Ced 3'ün homoloğu, interlökin 1 dönüştürücü enzim benzeri (ICE) genidir. Ced 4, Ced 9'a bağlandığında, hücre yaşamına devam edebilmektedir. Ced-4 geninin homoloğu memelilerde proteini de aynı adlı olan *apaf-1* (apoptotik proteaz aktivasyon faktörü-1) genidir. İnsanda Ced 9'un homoloğu ise Bcl-2' dir. Canlı organizmalarda apoptozu uyarıyan birçok gen bulunmaktadır (17).

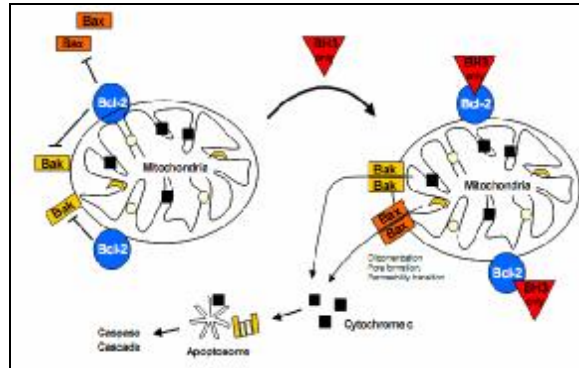
Tablo 2 Apoptoz ve genetik kontrolü (17)

Apoptozu baskılayan genler	Apoptozu indükleyen genler
Bcl-2 ailesi grubundan; BHRL-1, Bcl-xl, Bcl-w, Bfl-1, Brag-1, mcl-1, A1 C-ab1 geni A20 Çözünebilir fas P35 Ras onkogeni	Bcl-2 ailesi grubundan; Bad, Bax, Bak, Bcl-xS, Bad, Bik, Hrk1 C-myc p53, p21 Fas (CD95/APO1) FADD/MORT, RIP, FAST İnterlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler (İCE) LOH (MTS1/CDK41)

İnsanda apoptoz p53 ile başlayan, kaspazlara kadar devam eden bir süreçtir. Bir tümör süpresör gen olarak çalışan p53 mutasyona uğradığında veya bulunmadığı zaman hücre yaşamı uzar. Genotoksik olaylarda meydana gelen hücre hasarı p53 genini aktive eder. P53 protein ürünü direk olarak DNA' ya bağlanarak hasarı tanıdıktan sonra ya G1 fazındaki hücre siklusunun durmasını indükleyerek tamir için gerekli zamanı kazanır ya da hasar fazlaysa apoptozu yönlendirir (21). Apoptozun regülasyonu Bcl-2/Bax gen ailesi ile sağlanır. Bu ailenin 20 üyesi tanımlanmıştır; bunlardan bazıları antiapoptotik bazıları ise proapoptotik genler olarak tanımlanır (Şekil 3). Bunlardan antiapoptotik olanlar Bcl-2 Bcl-xl Boo Bcl-w A1 Mcl-1 ve proapoptotik olanlar ise Bax, Bod, Blk, Bak, Bcl-xs, Bid, Bim'dir. Bcl-2/Bax gen ailesinin ürünleri mitokondri, çekirdek ve endoplazmik retikulum zarının üzerinde de yer alırlar ve homodimer yada heterodimerler şeklinde kompleks oluşturarak çalışırlar (22). Antiapoptotik Bcl-2 üyeleri, aminoasit sıraları en az üç dört bölgede Bcl-2'ye benzerlik gösterir. Proapoptotik Bcl-2'lerin hepsinde BH₃ bölgesi vardır. Antiapoptotiklerde bu bölge yoktur (23).

Apoptoz sürecinde mitokondri de önemli role sahiptir. Mitokondriler çift zarlı organellerdir. Bcl-2, 24-26 kDa'luk protein kodlayan bir proto-onkogendir ve ürettiği protein, mitokondrinin sitoplazmaya dönük dış zarı üzerinde ve endoplazmik retikulumun bir bölümü olan çekirdek zarında yerleşmiştir (24). Bu proteinler iyon alışverişini düzenleyerek zarın parçalanmasına engel olurlar.

Özellikle antiapoptotik genler içinde yer alan Bcl-xL'in mitokondriyal hasarı engelleyerek mitokondriyi koruduğu ileri sürülmektedir. Bu sayede apoptoz engellenebilmektedir (25). Bcl-2 ailesinin bir başka özelliği de reaktif oksijen düzeylerinin apoptoz üzerindeki etkilerini pro-oksidan gibi davranarak kontrol etmesidir. Bax proteinleri sitoplazmada da bulunur. Apoptotik sinyal alındıktan sonra Bax proteinleri, mitokondri zarının 'permeabilite geçiş poru'na doğru ilerlerler ve buraya bağlanırlar. Bu bağlanma iyon geçirgenliğini azaltabilir (26). Zardaki bu değişiklikler nedeniyle sitokrom c ve AIF (Apoptosis Inducing Factor) gibi mitokondri zarı içinde yer alan faktörler sitoplazmaya geçerler. AIF doğrudan kromatini yoğunlaşan ve nüklear fragmentasyona uğrayan çekirdeğe doğru yönelirken, sitoplazmadaki sitokrom c apoptozun en son basamağında görev alır. Sitokrom c'de sitoplazma proteini olan Apaf-1'e bağlanarak prokaspaz-9'u aktive eder ve oluşan bu kompleks 'apoptosom' olarak adlandırılır. Apaf-1 aynı zamanda ATP'ye de bağlanır. Bu olay apoptozun neden enerji gereksinimi duyduğunu açıklamaktadır. Prokaspaz-9'un aktivasyonu da bir seri kaspaz aktivasyonunu başlatılır (16).



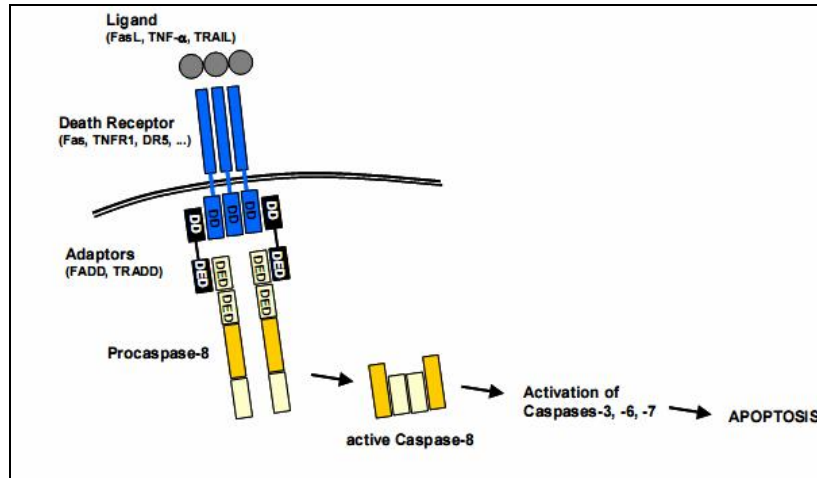
Şekil 3 Bcl-2 ailesi tarafından apoptozun regülasyonu (27)

Apoptoz süreci; hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınmasıyla (ekstrensek), DNA hasarına genlerin yanıtıyla (intrinsek) veya proteolitik enzimlerin doğrudan hücreye girişiyle (Perforin – Granzim) 3 farklı şekilde gelişebilir (28). Özetle apoptoz mekanizmasındaki 3 temel grup ölüm reseptörleri, adaptör proteinler ve proteolitik enzimlerdir (22). Apoptozda görevli en önemli reseptör grubu TNF reseptör (TNFR) ailesidir. Bu reseptör ailesinden bazıları apoptoza neden olurken bazıları da hücrelerin proliferasyonunda görev alır. TNFR içinde apoptoza neden olan reseptörlerden en önemlileri Fas ve TNFR1'dir.

Diğer ölüm reseptörleri ise DR3, DR4, DR5 ve DR6'dır. Bu reseptörler Fas ligand, DR3 ligandı veya TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) olarak isimlendirilen ligandlarıyla stimule edildiğinde, hücrenin sitoplazmasında bulunan parçaları, adaptör proteinlere bağlanırlar. Adaptör proteinlerin ölüm efektör parçaları ise kaspazlara bağlanıp kaspaz kaskadını aktive ederler (29).

Fas ligandının, hücre yüzeyindeki Fas reseptörüne (CD95, APO-1) bağlanması ile Fas reseptörünün hücre içindeki parçası, Fas adaptör proteiniyle (FADD-Fas adapter protein with a death domain) birleşerek apoptozu indükleyen sinyal kompleksini (DISC-Death inducing signal complex) oluşturur. Bu da prokaspaz 8'in aktifleşmesini sağlar.

TNF'nin, reseptörleriyle (TNFR1) bağlanması sonucunda da reseptörün hücre içinde bulunan parçası, TNFR adaptör protein (TRAAD-TNFR adapter protein with a death domain) ile etkileşir. TRAAD daha sonra FAAD ile birleşerek prokaspaz 8'i aktive ederek apoptozu neden olur (Şekil 4).



Şekil 4 Reseptör aracılı Kaspaz aktivasyonu (30)

Sitotoksik T lenfositlerin aracılığıyla meydana gelen apoptoz ise sitotoksik T lenfositlerin yabancı antijeni tanımasıyla yüzeylerinde oluşan Fas ligandının, hedef hücrelerin Fas reseptörlerine tutunmasıyla başlar (29). Sitotoksik T lenfositlerin ve doğal katil hücrelerin sitoplazmalarında perforin ve granzimler (serin proteaz) adlı proteinleri içeren salgı granülleri bulunur. Sitotoksik T lenfositlerin yüzeyindeki reseptör hedef hücreye bağlandığında, hücre içi kalsiyum seviyesinde artış meydana gelir. Granzim B, reseptör aracılığı ile bir vezikül içinde açılan delikten hedef hücreye girer.

Hücre içine giren perforin proteini, vezikülden granzim B'nin serbest kalmasını sağlar. Serbest kalan granzim B hızlı bir şekilde DNA parçalanmasını ve prokaspaz aktivasyonunu başlatır. Aynı şekilde granzim A'da, perforinle sinerjik olarak kaspaz bağımsız apoptozda rol alır (16,31) Ancak bu mekanizma ile sağlıklı komşu hücrelerin de apoptoza gitme riski artmaktadır (14).

2.5.4.2.Hücre İçi Proteazların (Kaspazların) Aktivasyonu

İç ve dış sinyallerle hücre içinde bulunan bir grup proteaz aktive olur. Bu proteazlara kaspaz (caspase=cysteine-containing aspartate specific proteases) adı verilir. Kaspazlar, proteinleri yalnızca aspartik asit bulunan bölgelerden keser, bu nedenle c-asp-ases adını almışlardır. Böylece kaspazların kısıtlı proteolizisi nedeniyle, hücrede lizis gerçekleşmez ve apoptotik cisimcikler oluşur (32).

Kaspazlar inaktif olan proenzim (zimojen) olarak salınırlar. Büyük (20 kilodalton=kDa), küçük (10kDa) ve inaktif N-terminal prodomain olmak üzere üç kimyasal alandan oluşan kaspazlar iki bölünme ile tamamen fonksiyonel proteazlara aktive olurlar. Kaspazlar başlatıcı ve sonlandırıcı olmak üzere ikiye ayrılırlar. Günümüze dek kaspaz ailesinin 14 üyesi tespit edilmiştir. Kaspaz 2, 3, 6, 7, 8, 9 ve 10 hücre ölümüyle ilişkilidir. Bunlardan en yaygın ve apoptozdan asıl sorumlu olanı kaspaz 3'tür. Kaspaz 14 ise sadece deride bulunmaktadır (29).

Kaspaz aktivasyonunda iki önemli uyarı yolu vardır. Biri ölüm reseptörleri aracılı-ekstrinsik yol, diğeri ise mitokondri aracılı-intrinsik yoldur. Başlatıcı kaspazlar aktive edilince zincirleme olarak diğer kaspazlar aktive olur. İç sinyallerle oluşan apoptozda mitokondri daha önce anlatıldığı gibi önemli rol oynamaktadır (29).

Apoptotik programın merkezi bileşeni kaspazlardır. Kaspaz aktivasyonu hücreye özgüdür ve kaspaz inhibitörlerinin (IAP) efektör kaspazları inhibe ederek apoptozu engellediği gösterilmiştir (27). Ayrıca IAP (Inhibitors of Apoptosis) ailesinin kaspazlardan ayrı olarak transkripsiyon faktörlerin modülasyonu ve hücre siklusunun kontrolünde de yer alarak apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir (32).

2.5.4.3. Biyokimyasal Ve Morfolojik Değişiklikler

Apoptoz çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle karakterize edilebilmektedir (33). İntranükleozomal DNA yıkımı, apoptoza giden hücreler için karakteristik morfolojik bir değişimdir. İntranükleozomal DNA yıkımı apoptozun biyokimyasal bir belirteçidir (34). Apoptozin diğer bir belirteci normalde hücre membranının iç yüzeyinde yerleşmiş olan fosfatidilserinin dış yüzeye çıkmasıdır. Böylece makrofajlar tarafından tanınma sinyali verilmiş olur (35) .

Morfolojik değişikliklerin ilk belirtisi apoptotik kromatin yoğunlaşmasıdır (34). Hücreler diğer hücrelerle olan bağlantılarını kaybederler. Su kaybederek küçülür ve büzülürler. Sitoplazmaları yoğunlaşır ve organeller birbirlerine daha yakın konumlanırlar. Bazen ribozomlarda çökme gözlenir. Sitoplazmada yüzeye paralel yerleşimli mikrofilyaman kümeleşmeleri ve endoplazmik retikulumda geçici genişlemeler görülür. Genellikle mitokondriler yapılarını korurlar. Apoptotik süreç ilerledikçe hücre membranla çevrili sitoplazmik parçalara bölünür. Bunlara 'apoptotik cisim' adı verilir. (17)

2.5.4.4. Ultrastrüktürel Değişiklikler

Apoptozda en erken gözlenen olay kromatinin kondensasyonudur. Kromatin keskin sınırlı, ince granüler hilal şeklinde çekirdek zarına bitişik, yoğun bir kütle oluşturur. Kondanse kromatinin nükleusa oranı, hücre tipine göre değişir. Bu oran lenfoid hücrelerde yüksek, az heterokromatinli hücrelerde düşüktür. Bu nükleer değişiklikleri gösteren hücrelerin komşu hücrelerle arasındaki desmozomlarda ayrılma gözlenir. Hücre yüzeyindeki mikrovillus gibi hücre yüzey özelleşmeleri kaybolur. Hücrenin hacmi azalır ve yoğunluğu artar. Sitoplazmik organeller kompakt hale geçer. Nükleus çoğu çift membranla çevrili ayrı fragmana parçalanabilir. Bunlar hücre yüzey kabartılarının sırasında ayrılabilir. Her fragmandaki kromatin içeriği ve ebatı farklıdır (36).

2.5.5. APOPTOZ VE OVARYUM

Ovaryumda ilk apoptoz 1885 yılında Flemming tarafından tavşan ovaryumunun antral foliküllerindeki granüloza hücrelerinde gözlenmiş ve kromatolizis olarak adlandırılmıştır (37). Ovaryumda hücre dejenerasyonunun gözlendiği başlıca 2 safha vardır. Birincisi prenatal dönemdeki germ hücre dejenerasyonu diğeri ise postnatal dönemdeki foliküler atrezidir.

Prenatal dönemde primordiyal germ hücrelerinin göçü, proliferasyonu ve canlılıklarını sürdürebilmeleri bazı faktörlere bağlıdır. Bunlar kök hücre büyüme faktörü (SCGF) ve temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF)'dür. Bu faktörlerdeki yetersizlik germ hücrelerinin apoptozuyla sonuçlanmaktadır. Bcl-2 gen delesyonu gerçekleştirilmiş transgenik farelerde çok yüksek miktarlarda germ hücre kaybının olduğu gözlemlenmiştir (38).

Folikülogenezin erken safhalarında apoptotik hücreler nadir olarak görülür. Sadece sekonder foliküllerde nadiren apoptotik hücrelere rastlanılırken, primordiyal ve primer foliküllerde apoptoza rastlanılmamaktadır (39).

2.5.5.1.Folikül Hücrelerinde Apoptozun Düzenlenmesi

Foliküllerin büyümesi ve gelişimi için gonadotropinler daha önce de bahsedildiği gibi gereklidir. Eğer preovulatuvar safhada gonadotropinlerin bloke edilmesi veya hipofizektomiden sonra serumdaki gonadotropinlerin seviyesinin düşmesi folikülün atreziye gitmesine neden olur. Granüloza ve luteal hücrelerindeki apoptotik DNA fragmantasyonundan, Ca^{+2}/Mg^{+2} bağımlı endonükleaz aktivitesi sorumludur.

Gonadotropinlerin granüloza hücrelerinin membranındaki reseptörlerine bağlanması, adenilat siklazın aktive olması, cAMP'nin birikimi ve protein kinaz A yolağının aktivasyonu ile sonuçlanır. Hipofizden salgılanan büyüme hormonu (GH) gonadotropinlerin etkilerini artırarak dolaylı yoldan foliküllerin büyümesine ve farklanmasına yol açar. İnsülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I)'nin de folikülogenezde önemli role sahip olduğu ve granüloza hücrelerinin bu faktöre karşı yüzey reseptörleri eksprese ettiği bilinmektedir. Aynı zamanda gonadotropinlere benzer şekilde IGF-I'inde foliküler apoptozu baskıladığı bilinmektedir (38). İmmun sistemin sitokinlerinden biri olan interlökin-1 β (IL-1 β)'nin da ovaryum fonksiyonları üzerine etkisi vardır. Çoğu hücre tipinde IL-1 β nitrik oksit (NO) sentezini arttırmaktadır. Preovulatuvar folikül kültürünün yapıldığı bir çalışmada IL-1 β uygulanmış, NO üretiminin arttığı ve apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir (40).

Östrojenler foliküllerin büyümesi ve gelişimi için vazgeçilmezdirler. Östrojen muamelesi granüloza hücrelerinin bölünmesini ve ovaryumun ağırlığını arttırmaktadır (38). Bütün bu otokrin ve parakrin etkileşimlerin yanı sıra radyasyon, elektrik, manyetik ve elektromanyetik alan gibi stres oluşturabilecek dış faktörlerinde folikül gelişimi üzerine etkileri vardır.

Çok düşük frekanslı elektromanyetik alanın farelerdeki preantral folikül gelişimi üzerine etkisi araştırılmış ve folikül gelişiminin, antrum oluşumunun gerilediği gösterilmiştir (41).

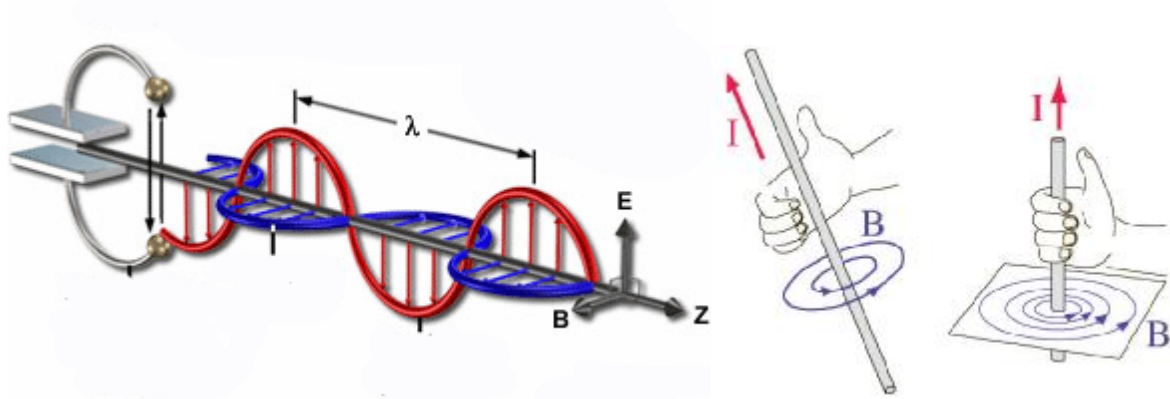
2.6. ELEKTROMANYETİK ALAN

Günümüzde teknolojinin ve sanayinin gelişmesi ile elektrikli alet ve teçhizatların kullanımı artmıştır. Kullanılan bu cihazlar hayatımıza kolaylıklar sağlasa da oluşturdukları elektromanyetik alan bize zarar vermektedir.

Elektrik alanı, bir gözlemciye göre duran yüklerin (parçacıkların) oluşturduğu bir alan çeşididir. Manyetik alan ise bir gözlemciye göre düzgün doğrusal (ivmesiz) hareket eden yüklerin oluşturduğu bir alandır. Manyetik alan da elektrik alanı gibi vektörel (büyüklüğü ve yönü olan) bir niceliktir. Manyetik alan vektörü, B simgesiyle gösterilir. Manyetik alan vektörünün yönü, yüklerin hareket yönüne diktir. Manyetik alan çizgileri, elektrik alan çizgilerinin aksine bir yükte başlayıp bir yükte son bulmazlar. Tersine, alan çizgileri kendi üzerine kapanan eğriler oluştururlar. Bunun yanı sıra, elektrik alan çizgileri gibi birbirlerini kesmezler (42).

Bir elektrik yükünün hareketiyle uzayda oluşan değişikliklere elektromanyetik alan (EMA) denir. Elektrik alanı ile manyetik alanın karşılıklı etkileşimi sonucu oluşur. Durgun elektrik yüklerinin etrafında elektrik alanları oluşur. Eğer yük hareketliyse bu elektrik yüklerinin çevresinde bir manyetik alan oluşur. Uzayda manyetik alan olmadan elektrik alan oluşabilir, fakat uzayda manyetik alan oluşabilmesi için elektrik alana ihtiyaç vardır.

Elektromanyetik alan, belirli koşullar altında, elektromanyetik enerji taşıyan bir dalga hareketi olarak da tanımlanabilir. Elektromanyetik dalgalar biçiminde yayılan enerjiye elektromanyetik radyasyon denir (43). Bir başka tanımlamada düşük frekanslı elektromanyetik dalgalar "Elektromanyetik Alanlar" ve yüksek frekanslı dalgalar ise "Elektromanyetik Radyasyon" olarak adlandırılabilir (44).



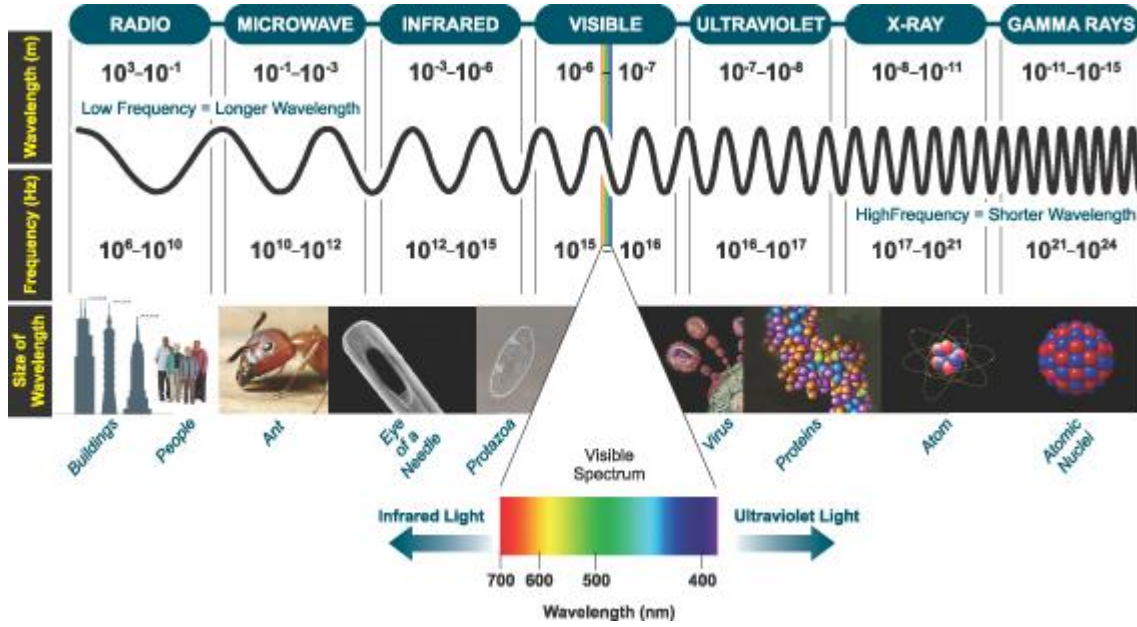
Şekil 5 Elektrik (E), Manyetik (B) ve Elektromanyetik (Z) alan dalgaları ve vektör yönleri
 λ ;Dalga boyu Z; Dalganın hareket yönü I; Akım yönü (42,43)

Boşlukta elektrik ve manyetik alan vektörleri birbirine diktir ve elektromanyetik dalga biçiminde, doğrultusu her iki alana da dik olarak yayılır. Elektrik alan vektörlerinin değişimi ile manyetik alan vektörlerinin değişimi sinüzoidal eğri biçimindedir (Şekil 5).

Elektromanyetik dalgaların ideal boşluktaki yayılma hızı (c) evrensel bir sabittir ve değeri saniyede 299729,458 km'ye eşittir (ışık hızı). Elektromanyetik dalgaların frekansları (saniyedeki titreşim sayısı) çok geniş bir frekans aralığını kaplar. Elektromanyetik dalgalar gibi periyodik dalgaların yayılmasında, art arda iki periyotta birbirine karşılık gelen noktalar arasındaki uzaklık dalga boyudur (λ). Dalganın ortamda yayılma hızı (v), frekansı (f) ve dalga boyu arasında $f \lambda = v$ bağıntısı geçerlidir. SI birimler sisteminde frekans hertz (Hz), dalga boyu metre, hız da m/s birimleriyle ölçülür.

Elektromanyetik dalganın frekansını dalgayı oluşturan kaynak belirler. Dalganın hızı ise yayıldığı ortama ve dalga boyuna bağlıdır. Boşluktaki yayılma hızı c' ye eşit olan elektromanyetik dalgaların maddesel bir ortamdaki hızları ise c' den küçüktür. Belirli bir ortamdaki hızın c' ye oranı, o ortamın kırma indisi olarak bilinir.

Elektromanyetik dalgalar, frekanslarına göre, gruplara ayrılır, buna elektromanyetik tayf denir (Şekil 6). Bu gruplar arasındaki frekans sınırları kesin bir biçimde belirlenmiş değildir.



Şekil 6 Elektromanyetik Tayf (45)

Bütün elektromanyetik dalgalar aynı hıza sahip olmakla beraber frekansları ile doğru, dalga boyları ile ters orantılı olan enerji seviyelerine göre bir spektruma sahiptirler. Örneğin AM radyo bandının frekansı bir milyon hertz (1 MHz) dir ve dalga boyu yaklaşık olarak 300 metredir. Mikrodalga fırınlar 2,45 milyar Hertz (2,45 GHz) frekansında çalışmaktadır ve dalga boyları 12 cm'dir (46). Enerjilerine göre büyüklük sırası: Elektrik dalgası > radyo dalgaları > mikrodalgalar > kızıl ötesi (infrared) > görülebilir ışık > mor ötesi (ultraviole) > X ışınları > gama ışınları X ve γ ışınları iyonlaştırıcı radyasyon oluşturur. Diğer elektromagnetik dalgalar iyonlaşma yeteneğinden yoksun zayıf enerjili radyasyon etkisi oluşturur (47).

EMA'lar daha öncede ifade edildiği gibi canlılara verdiği zararlar bakımından aşırı yüksek frekansa ve enerjiye sahip “**İyonlaştıran Radyasyon (IR) (Nükleer Radyasyon)**” ve zarar verip vermediği tartışılan “**İyonlaştırmayan Radyasyon (NIR) (Elektromanyetik Radyasyon)**” olarak ikiye ayrılırlar (44,48) .

IR; Yüksek frekanslı ve enerjisi oldukça yüksek olan ve iyonizasyon (yani pozitif veya negatif elektrik yüklü atom veya molekül parçacıklarının oluşturulması) meydana getiren nükleer radyasyondur (Röntgen - gama ışınması). Bunlar atom bağlarını kopararak hücrelerdeki moleküllerin parçalanmasına neden olur.

İyonlaştıran radyasyon atom ve moleküllerden elektron koparabilen radyasyonlardır.

NIR: İyonlaştıran radyasyona karşı, iyonlaştırmayan radyasyonun biyolojik sistemlere olan etkisi belirsizdir. İyonlaştırmayan radyasyona 0–300 GHz frekansında statik ve zamansal değişimli elektrik ve manyetik alanlar girer. Bu alana statik (0 Hz), çok düşük frekans (ELF, > 0-300 Hz) ve yüksek frekans alanları (HF, 300 Hz - 300 GHz) girmektedir. İyonlaştırmayan radyasyonun biyolojik etki mekanizması iki tiptir:

1) Termal Olmayan Etki: Gelen dalganın alan şiddeti yeterince küçükse ısı oluşmaz. Elektromanyetik dalgaların ısı olmayan etkilere bağlı olarak etkili olduğu iddia edilen bozukluk ve hastalıklar arasında beyin aktivitelerinde değişiklikler, uyku bozuklukları, dikkat bozuklukları, bas ağrıları bulunmaktadır. Ancak bu riskler çok yüksek deneysel dozlar ve sürelerde geçerli olabilir. Bu etkilerin kimyasal değişikliklere bağlı olduğu düşünülmektedir.

2) Termal Etki: Cismin EM dalgayla etkileşmesinde, artan molekül hareket ve sürtünmeden dolayı sistemde ısı artışından "termal etki" ortaya çıkar (46). Termal etkiler, vücut tarafından yutulan elektromanyetik enerjinin ısıya dönüşmesi ve vücut sıcaklığını arttırması olarak tanımlanır. Bu sıcaklık artışı, ısının kan dolaşımı ile atılarak dengelenmesine dek sürer. Düşük frekans bandındaki elektromanyetik dalgaların sebep olabileceği sıcaklık artışı gerçekte çok düşüktür ve büyük olasılıkla vücudun normal mekanizmaları ile kolayca etkisizleştirilebilir (48,49).

2.6.1. ELEKTROMANYETİK BÜYÜKLÜKLER VE BİRİMLER

Elektrik alan oluşumu ortamda yüklerin varlığına bağlıdır. Manyetik alan ise yüklerin hareketiyle oluşur. Elektrik ve manyetik alanlar, dalga boyları, şiddet alan yoğunluğu ve frekans ile karakterize edilirler. Daha önce değinildiği gibi dalga boyu, dalganın bir tepe noktası ile bir sonraki tepe arasındaki uzaklığı tanımlamaktadır. Frekans, Hertz (Hz) cinsinden ölçülmekte olup 1 saniyelik zaman içerisinde kaç adet dalga geçtiğini tanımlamaktadır. Türkiye'nin de içinde bulunduğu Avrupa ülkelerinde elektrik, her saniyede 50 kez alterne olmakta (dalgalanmakta), ABD ve Kuzey Amerika ülkelerinde ise 60 kez alterne olmaktadır. Kısaca Avrupa 50 Hz ve ABD 60 Hz' lik frekansa sahip olmaktadır. Ortamda bulunan diğer bir yüke uygulanan kuvvet şeklinde tanımlanan elektrik alan birimi "V/m" dir.

Benzer şekilde manyetik alanlar da ortamdaki yüklere kuvvet uygularlar, ancak tek koşul yüklerin hareketli olmasıdır. Elektrik ve manyetik alanların hem şiddeti hem de yönü söz konusudur, yani vektörel büyüklüklerdir.

Manyetik alandan iki şekilde söz edilebilir. Birincisi manyetik akı yoğunluğu (B) olup birimi “Tesla” dır (1 Tesla(T)=10.000 Gauss(G)’dur). İkincisi ise manyetik alan şiddeti (H) olup birimi “A/m” dir. Bu iki büyüklük ortam manyetik geçirgenliği ile birbirine $B=\mu H$ ilişkisi ile bağlıdır (50). (Boş uzayda, havada ve canlı dokularda $\mu=4\pi \times 10^{-7}$ [Henry/m] olarak alınır.)

2.6.1.1.ELF (Extremely Low Frequency) 0-300 Hz

Çok Düşük Frekanslı Elektromanyetik Alan (Extremely Low Frequency – Electromagnetic Field, ELF-EMF), elektromanyetik tayfın 0 ile 300 Hz frekansları arasındaki radyasyon bölgelerini tanımlar. ELF-EMF, parçacık özelliği göstermeyen, iyonlaştırmayan radyasyon türüne girer. Elektrik dağıtım istasyonlarından evlerimize gelen şebeke elektriğinin frekansı 50 Hz’dir ve neden olduğu elektromanyetik alan bu bölgededir. 50 Hz cihazların kullanımının sık olması nedeniyle günlük hayatta daha çok ELF-EMF ile karşılaşmaktayız. Bu nedenle ELF-EMF maruziyeti bilimsel olduğu kadar toplumsal bir tartışma konusudur.

Yerkürenin geomanyetik alan büyüklüğü 10^{-6} mT, vücut manyetik alan değeri 10^{-7} mT civarındadır. Günlük hayatta ev ve işyerlerinde kullandığımız buzdolabı, bulaşık makinası, kurutma makinası, TV, bilgisayar, elektrikli ısıtıcı, ütü, mikser, mutfak robotu, floresan lamba, elektrikli traş makinesi, saç kurutma makinesi, elektrikli battaniye gibi aletlerin manyetik alanları 0,1 mT ile 2,5 mT arasında değişmektedir. En fazla manyetik alana 2,5 mT ile saç kurutma makinesi, 0,5-1 mT ile elektrikli traş makinesi ile floresan lamba sahiptir. Renkli televizyon ve bilgisayar monitörünün manyetik alanı 0,1-0,5 mT arasındadır. Vücudumuzun manyetik alanı çevremizdeki doğal alan olan yerkürenin manyetik alanı ile uyumludur, ancak yüksek elektromanyetik alanlara neden olan elektrikli aletler bu uyumu bozmaktadır (51) .

2.6.1.2.Elektromanyetik Alanların Biyolojik Etkileri

Elektromanyetik dalgaların oluşturduğu biyolojik etkilerin canlı organizma üstünde güvenilir bir sınırdan kalması için, insan hücre ve dokularını temsil eden matematiksel modeller ile çalışmalar yapılmaktadır.

Bu çalışmalarda EMA'nın tek bir hücre veya hücre sistemlerine etkileri, genetik mutajenik , teratolojik etkileri metabolizma ve düzenleme sistemleri üzerine etkilerinin olduğu gösterilmiştir (48).

Delgado, Lactobacillus acidophillus 'un 26 Hz ve 40 Gauss'luk darbe biçimli EMA'ya tabii tutmuş ve üremenin inhibe olduğunu gözlemiştir. Tavuk embriyolarını 10 Hz ve 0.01 Gauss'luk darbe biçimli EMA'ya tabii tutmuş ve teratojenik etkiler gözlemiştir (52,53) .

Epidemiyolojik çalışmalarda yüksek gerilim hatlarının yakınında yaşayan insanların kansere yakalanma sıklığının arttığı ortaya konulmuştur (54,55). Hat işçileriyle yapılan çalışmalarda, hematolojik değişimler, kan hücreleri sayısında artışlar, sinir, sindirim ve kardiyovasküler sistemlerde bozukluklar gözlenmiştir. EMA'nın çocuklarda, kan kanseri riskini arttırdığı, kan değerlerinin değişmesine, baş ağrılarının artmasına neden olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır (54).

EMA'nın bütün bu olumsuz etkilerinin yanı sıra olumlu etkileri de vardır. EMA tıpta (özellikle ortopedide) tedavi amaçlı kullanılabilir. Kemik kaynamasının uyarılmasında, kırıldak tamirlerinde faydalı olabilmektedir. Nöroloji alanında da EMA kullanılarak tedavi yapılmaktadır (56).

2.6.1.3.Çok Düşük Frekanslı EMA'nın DNA üzerine etkileri

Hücre membranının sabit dielektrik yapısı, düşük frekanslı elektrik alanlarının hücreye zarar vermesine engel olurken, düşük frekanslı manyetik alanlar hücreye zarar verebilmektedir. 60 Hz manyetik alanda 0.1, 0.25, ve 0.5 mT akıma maruz bırakılan ratların beyin hücrelerinin DNA zincirlerinde doza bağımlı olarak kırılmaların arttığı gözlenmiştir (51). Elektrik ve manyetik alanların hücre üzerine etkisinin hücre membranı üzerinden gerçekleştirildiği görüşü ortaya çıkmıştır. Bu görüşe göre EMA'nın hücre membranını geçip çekirdekte ve DNA'da değişiklikler oluşturması, biyokimyasal olarak ikincil mesajcılar üzerinden enzim kaskadının aktivasyonu ile gerçekleşmektedir.

Çok düşük frekanslı EMA'ların apopitoz üzerine etkilerini gösteren sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada 50 Hz manyetik alanın transforme insan skuamoz hücreli karsinom ve transforme olmayan insan amniyotik sıvı hücre hattı üzerindeki etkisi araştırılmış ve apopitozun belirteci olan mikronukleus formasyonunun anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir.

2.7. SERBEST RADİKALLER VE REAKTİF OKSİJEN TÜREVLERİ

2.7.1. SERBEST RADİKALLER

Hücrelere giren oksijen, %1-4 oranında reaktif oksijen türlerine (ROS) dönüşmektedir. Bu içeriğin bazıları dış orbitallerinde bir ya da daha fazla ortaklanmamış elektron içeren kimyasal yapılardır ve 'serbest radikal' olarak adlandırılmaktadır (57).

Bu serbest radikaller, vücuttaki kayıp elektronlarını bulmak için dolaşırlar ve çeşitli maddelere atak yaparak bunları deformasyona uğratarak aşındırırlar. Eşlenmemiş elektrona sahip bu moleküller elektronunu başka bir moleküle vererek veya elektron olarak daha kararlı hale geçme eğilimindedirler. (58,59,60,61).

2.7.1.1. Biyolojik Sistemlerdeki Radikallerin Sınıflandırılması

Biyolojik sistemlerdeki radikaller; oksijen kaynaklı (Süperoksit anyon radikali, hidroksil radikali, hidrojen peroksit, singlet oksijen), karbon kaynaklı (Triklorometilperoksil radikali), nitrojen kaynaklı (Nitrik oksit (NO) ve fenilhidrazin radikali) sülfür kaynaklı olabilirler. Ayrıca transian metal kompleksleri ve Fosfor merkezli radikallerinde bulunduğu bildirilmiştir (59).

2.7.2. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ

Organizmalar için serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir. Biyolojik sistemlerde büyük öneme sahip serbest radikaller oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest radikaller aynı zamanda oksidan moleküller, serbest oksijen radikalleri veya reaktif oksijen türevleri (ROS) olarak da adlandırılmaktadır.

Normal metabolizma sürecinde oluşan oksidasyon - redüksiyon olayları sonucunda ROS'un biyolojik bozukluklara neden olmamasına rağmen; iskemi, inflamasyon, radyasyon, elektromanyetik alan, hiperoksi vb. durumlarda daha fazla üretilmeleri sonucu membranlar, nükleik asitler, polisakkaritler ve enzimler üzerinde farklı etkiler yaparak, değişik derecelerde çeşitli dokularda hasara yol açmaktadırlar (62,63). Bunlar (radikaller) ve (radikal olmayanlar) olarak iki grupta toplanabilirler (Tablo 3).

Tablo 3 Reaktif Oksijen Türevleri

RADİKALLER	RADİKAL OLMAYANLAR
Süperoksit anyon radikali($O_2^{\cdot-}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil radikali (OH^{\cdot})	Singlet oksijen (O_2)
Peroksil radikal (ROO^{\cdot})	Lipid hidroperoksit (LOOH)
Alkoksil radikal (RO^{\cdot})	Peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$)
Organik radikaller (R)	Hipokloröz asit (HOCl)
Organik peroksit radikali (RCOO)	Hipohalöz asit (HOX)
Nitrik oksid (NO)	Azot dioksit (NO_2)
Semikinon radikal (HQ)	Ozon (O_3)
Hemoproteine bağlı serbest radikaller	N-halojenli aminler (R-NH-X)

Radikaller elektron eksiklikleri nedeniyle başlıca moleküllerle kolayca elektron alış-verişi yapabilirler. Radikal olmayanlar ise elektron eksiklikleri olmadığı halde başka moleküllerle daha zayıf bir şekilde birleşirler.

2.7.2.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Biyolojik sistemlerde en fazla oksijeni taşıyan serbest radikalidir. Bu radikalın en önemli kaynakları mitokondri, kloroplast ve endoplazmik retikulum elektron transport zincirinden sızan elektronlardır. Çoğu aerobik hücrelerde O_2 'nin bir elektron alarak indirgenmesiyle kararsız bir yapı olan ($O_2^{\cdot-}$) radikali oluşmaktadır (58,61,64).

Süperoksit radikali, organizmaya direk zarar vermese de bir hidrojen peroksit kaynağıdır. Ayrıca nitrik oksit ile reaksiyona girerek reaktif oksijen türevi olan peroksinitriti ($ONOO^{\cdot-}$) oluşturmaktadır.

Süperoksit radikalının başlıca kaynakları (64,65):

- 2 Elektron transport zincirindeki elektron sızıntıları,
- 2 Sitokrom P_{450} tarafından O_2 'nin bir elektron indirgenmesi,
- 2 Aktive fagositler,
- 2 Ksantin ve hipoksantin'in ksantin oksidaz tarafından oksidasyonu,
- 2 NADPH'ın NADPH tarafından oksidasyonu,
- 2 Dopamin, epinefrin, norepinefrin gibi biyolojik aminlerin otooksidasyonu,

- 2 Arjinin ve tetrahidrobiopterin defektif olduğu zaman eNOS ve nNOS tarafından O₂ 'nin bir elektron alarak indirgenmesi,
- 2 İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu da O₂^{•-} meydana getirebilir.

2.7.2.2.Hidrojen Peroksit (H₂O₂):

H₂O₂ normalde serbest radikal değildir. Fakat serbest elektron içermesi, serbest hidroksil radikali oluşturabilmesi ve hücre membranlarına kolaylıkla girebildiği için önemlidir. H₂O₂ geçiş metal iyonlarının varlığında kolayca parçalanarak yüksek oranda toksik olan hidroksil radikalini oluşturmaktadır (58,66).

SOD aktivitesi sonucu ortaya çıkan H₂O₂ ; katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleri ile su ve oksijene dönüştürülür.

2.7.2.3.Hidroksil Radikali (OH[•]):

Hemen hemen çoğu molekülle reaksiyona girdiğinden oldukça reaktiftir. Oksidatif streste en güçlü radikal olarak bilinir. OH[•], DNA hasarına ve iyonize radyasyonun membranlara zarar vermesine neden olur. Ayrıca tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden proton kopmasına ve yeni radikallerin oluşmasına neden olmaktadır. Lipid peroksidasyon sürecini de başlatmaktadır (58).

2.7.2.4.Singlet Oksijen (O₂):

Serbest radikal olmamasına rağmen serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olduğu için önemlidir. Süperoksit radikalının dismutasyonu ve hidrojen peroksidin hipoklorit ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir (58,67).

2.7.3. SERBEST RADİKALLERİN KAYNAKLARI

Endojen ve eksojen olmak üzere başlıca iki önemli kaynağı vardır;

1.Eksojen Kaynaklar:

- 2 Çevresel kaynaklı; hiperoksijenasyon, pestisitler, sigara, solventler, anestezipler, hava kirliliği, manyetik alan
- 2 Radyasyon, stres
- 2 Alkol, uyuşturucu, karsinojen maddeler, sıcak şoku güneş ışınları
- 2 Antineoplastik ajanlar; nitrofurantoin, bleomisin, adriamisin vb.

2.Endojen Kaynaklar:

- 2 Küçük moleküllerin otooksidasyonu; tioller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidropterinler, antibiyotikler vb. (58,60,68,69)
- 2 Çözünür enzimler ve proteinler; ksantin oksidaz, flavoprotein dehidrogenaz, triptofan dioksijenaz, dihidroorotat dehidrogenaz, aminoasit oksidaz gibi enzimler, hemoglobin vb. (58,70)
- 2 Mitokondrial elektron transportu
- 2 Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri; sitokrom P 450, sitokrom b5 (58,70).
- 2 Peroksizomlar; oksidazlar, flavoproteinler
- 2 Plazma membranı; lipoksijenaz, NADPH oksidaz, prostaglandin sentetaz, lipid peroksidasyonu.
- 2 Oksidatif stres oluşturan durumlar; iskemi, travma, intoksikasyon.
- 2 Aktive olmuş fagositlerdir.

2.7.4. SERBEST RADİKALLERİN ETKİLERİ

Antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz kaldığı durumlarda serbest radikaller membran lipidleri, DNA, karbonhidratlar, proteinler ile reaksiyona girerek hücre hasarına ve hücre ölümüne neden olurlar (71,72,73,74).

1.Proteinlere Etkileri

Proteinler aminoasit kompozisyonlarına bağlı olarak serbest radikal hasarından etkilenirler. Triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikal hasarına açıktırlar (58,75) .

2.Nükleik Asitler ve DNA Üzerine Etkileri

Serbest radikaller DNA'nın nükleotid yapısını oluşturan purin ve pirimidin bazları üzerine etki ederek DNA yapısında mutasyon, karsinogenez ve hücre ölümüne yol açabilirler. Guanin bazının radikaller tarafından hidroksilasyonu DNA molekülünün yapısı değişerek mutasyonlar oluşmaktadır. Hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla reaksiyona girerek yapılarında değişikliklere yol açar.

Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan H₂O₂ hücre çekirdeğine ulaşarak hücre disfonksiyonuna DNA hasarına ve hatta hücre ölümüne neden olabilir (58,76).

3.Karbonhidratlara Etkileri

Fizyolojik pH ve sıcaklıkta glikoz gibi monosakkaritlerin oksidasyonu H₂O₂, peroksitler ve okzoaldehidler oluşmaktadır. Okzoaldehidler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme özelliğinde olduğu için antimitotik etki göstererek kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynar (58,77).

4.Membran Lipidleri Üzerine Etkileri (Lipid Peroksidasyonu)

Hücre membranındaki lipidler serbest radikallere karşı oldukça hassastırlar. Lipid peroksidasyonu membran yapısını oluşturan fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısındaki poliunsature yağ asitlerinin (PUFA), reaktif oksijen türleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehytler, hidroksi yağ asitleri, etan, pentan gibi sekonder ürünlere yıkılma reaksiyonudur (78). Lipid peroksidasyonu dejeneratif bir süreçtir ve zincirleme reaksiyonlar şeklinde ilerleyerek membranlarda geri dönüşümsüz hasarlara neden olur (58,76).

Lipid peroksidasyonu oldukça zararlı bir reaksiyondur. Membran yapısına direk olarak, reaktif aldehytler üreterek de indirekt olarak da hücre bileşenlerine zarar verir. Lipid radikalleri hidrofobik yapıda olduğundan reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerle meydana gelir. Membran permeabilitesi büyük oranda etkilenir. Peroksidasyonla oluşan malondialdehit (MDA), membran komponentlerinin çapraz bağlanmasına sebep olur. Bu da hücre membranında deformasyon, enzim aktivitesi, iyon transportu, hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. MDA'nın bu etkileri karsinogenik, genotoksik, mutajenik olduğunun bir göstergesidir (58).

Tüm bu etkilerinden dolayı serbest radikaller, çoğu hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır. Diyabet, ateroskleroz, kardiovasküler hastalıklar, hipertansiyon, kanser, deri kas, göz hastalıkları, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar, romatoid artrit, çeşitli immün hastalıklar ile yaşlılık gibi birçok hastalık durumunda serbest radikal üretimi artmakta ve antioksidan savunma mekanizmaları yetersiz kalmaktadır (73,74,79, 80, 81).

Fakat bu hastalıkların çoğunda hastalıklarının sebebinin serbest radikallerden dolayı olup olmadığı tam olarak bilinmemektedir.

2.7.5. OKSİDATİF STRES VE OVARYUM

H₂O₂'nin etkisiyle, hayvan ve insan granüloza ve luteal hücrelerinden gonadotropin ve progesteron salınımı inhibe edilir. Singlet oksijen'in luteal hücrelerdeki antigonadotropik ve antisteroidogenik aktiviteyi engellemesi H₂O₂'nin aracılığıyla olduğu gösterilmiştir.

H₂O₂'nin luteal hücreleri üzerindeki etkisi ise DNA hasarına, protein sentezinin inhibe olmasına ve ATP'nin tükenmesine neden olan hidroksil radikalının aracılığıyla gerçekleşir. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu, önemli bir fizyolojik süreç olsada, ovaryumdaki patolojik ve mutajenik değişikliklerin, ATP tüketimi, inflamasyon, nekroz ve erken apoptozun oluşumunda rol oynayabilirler. Her bir ovaryal siklusta serbest oksijen radikallerinin siklik üretimi, uzun vadede giderek artan DNA hasarıyla sonuçlanabilir (82). Ovaryumda bulunan antioksidan enzimler ROS'u nötralize ederek oositi ve embriyoyu oksidatif stresten korurlar.

Süperoksit dismutaz, Cu-Zn superoksit dismutaz, Mn superoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve lipid peroksidaz gibi oksidatif stres belirleyicileri immunohistokimyasal ve thio barbiturik asit yöntemleriyle araştırılmış ve tüm foliküler safhalar Süperoksit dismutaz ekspresyonu için değerlendirilmiştir. Antral foliküllerin teka interna hücreleri Ad4BP antikoruyla immunohistokimyasal yöntemle yoğun bir boyanma göstermiştir. Ad4BP, steroidogenik P450 enziminin transkripsiyonunu indükleyen, steroidogenik transkripsiyon faktörüdür. Ad4BP proteiniyle süperoksit dismutaz ekspresyonu arasındaki bu mekanizma oksidatif stres ve ovaryum steroidogenezi ile ilişkilidir (83).

2.7.6. ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Normal koşullarda hücreler, serbest radikallerden dolayı oluşan oksidatif hasara karşı antioksidan savunma sistemleri tarafından korunur.

Antioksidanlar etkilerini 2 şekilde gösterirler (58,84) ;

I. Serbest radikal oluşumunun önlenmesi:

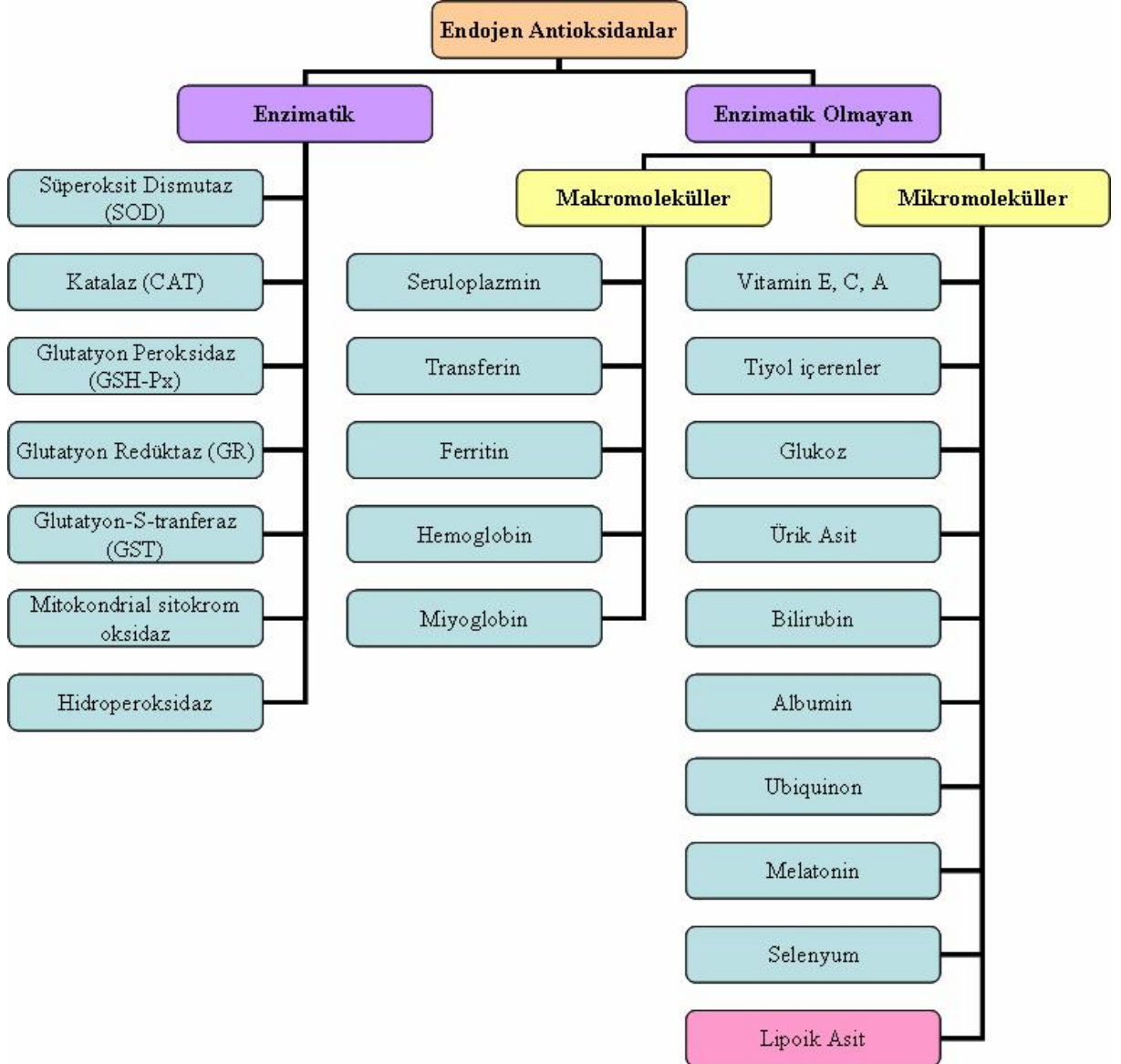
- 2 Başlatıcı reaktif türevlerinin uzaklaştırılması
- 2 Oksijenin uzaklaştırılması veya konsantrasyonunun azaltılması
- 2 Katalitik metal iyonlarının uzaklaştırılması

II. Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi

Antioksidanlar, oksidantlara karşı, çeşitli mekanizmalarla etki gösterirler. Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemi şeklinde “süpürücü” bir etki , serbest radikallere bir hidrojen vererek aktivitelerini azaltıp veya inaktif hale getiren “bastırıcı”, “giderici” etki, serbest radikalleri kendilerine bağlayarak zincirleme devam eden reaksiyonları kırarak “zincir kırıcı” bir etki ya da “onarıcı” bir etki şeklinde gerçekleştirebilmektedirler. Küçük moleküller antioksidan enzimler toplayıcı özellik gösterirken; flavanoidler, antosiyanoidler, vitaminler, trimetazidin bastırıcı fonksiyona sahiptirler. Hemoglobin, mineraller ve seruloplazmin ise zincir kırıcı etki gösterirler (58,77)

Endojen ve eksojen kaynaklı olmak üzere antioksidanlar 2 gruba ayılır (Tablo 4-5).

Tablo 4 Endojen Antioksidanlar



Tablo 5 Eksojen Antioksidanlar

EKSOJEN ANTIÖKSİDANLAR	
- Ksantin oksidaz inhibitörleri	-Trolox-C
Allopurinol	- Endojen antioksidan aktiviteyi artıran maddeler
Oksipurinol	Ebselen, Asetilsistein
Folik asit	- Non-enzimatik serbest radikal toplayıcıları
- NADPH oksidaz inhibitörleri	Mannitol, DMSO
Adenozin	- Demir Şelatörleri
Lokal anestezipler	Desferroksamin, Dimetiltiyöre
Kalsiyum kanal blokörleri	- Sitokinler
Non-steroid antiinflamatuarlar	TNF, interlökin- 1
- Nötrofil adezyon inhibitörleri	- Barbitüratlar
- Soya fasülyesi inhibitörleri	- Flavonoidler
- Rekombinant human - SOD	

2.7.6.1.Enzimatik Antioksidanlar

Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD, süperoksit anyonunun hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürülmesini katalizler ve organizmayı oksijen metabolitlerine karşı korur (81,85,86). Oksidatif strese karşı oluşan ilk savunma mekanizmasıdır. İnsanlarda SOD enzimi sitozolik Cu/Zn-SOD; mitokondriyal Mn-SOD; plazma, lenf ve sinoviyal sıvılarda bulunan ekstrasellüler SOD olarak 3 formda bulunur (81).

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksitin ve lipid hidroperoksitlerinin indirgenmesini sağlar. GSH-Px enziminin selenyum bağımlı ve bağımsız olarak iki formu bulunur. Selenyum bağımlı olan formu H₂O₂'ye ve hidroperoksitlere etki etmektedir. Selenyum bağımlı olmayan formu ise hücrenin mitokondri (%30) ve sitozol (%70)'ünde bulunup, sadece lipid hidroperoksitlerinin yıkımında görev alır (86).

Katalaz (CAT)

Katalaz peroksizomlarda bulunan ve yapısında 4 'hem' grubu bulunan bir hemoproteindir (58,81,86). Oksidazların aktivitesi ile oluşan H₂O₂'yi direkt suya çevirir. Böylece hidroksil radikallerinin sentezlenmesi ve H₂O₂'nin vücutta birikimi engellenir.

Glutasyon Redüktaz (GR)

Antioksidan savunmanın sürdürülebilmesi için okside glutasyonun tekrar indirgenmesi gerekir. Glutasyon redüktaz NADPH varlığında, oksitlenmiş glutasyonun (GSSG) indirgenme reaksiyonunu katalizler.

2.7.6.2.Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Lipoik Asit

Alfa-Lipoik asit (ALA), (α -LA; 1,2-dithiolan-3-pentanoik asit; 6,8-dithio-oktanoik asit veya thioktik asit) olarak da adlandırılan doğal bir bileşiktir (87,88). İlk olarak 1937'de, patates ekstraktında bulunmuş, bakterilerin gelişimlerinde rol oynadığı ortaya konulmuş ve bu maddeye "potato growth factor" denilmiştir. Reed ve arkadaşları 1951'de bu maddeyi tonlarca sığır karaciğerinden birkaç miligram olarak izole etmişler ve α -lipoik asit olarak adlandırmışlardır (89,90,91). α -Lipoik asit izole edildikten sonra vitamin olarak sınıflandırılmıştır. Daha sonra ökaryotik ve prokaryotik mikroorganizmalar, tüm hayvan, bitki ve insanlar tarafından sentezlendiği bulunmuştur (92,93).

İnsanda oksidatif glikoz metabolizmasında ve hücrel enerji üretiminde rol alan bazı mitokondriyal enzimlerinin doğal kofaktörüdür. (94, 95).Ancak terapötik etki gösteren serbest lipoik asittir. Plazma yarılanma ömrü 30 dakikadır (96). Esas olarak karaciğerde metabolize olur. Lipoik asit genelde rasemik karışım olarak kullanılır (97). ALA, hem yağda hem de suda çözünen oksijen radikallerine karşı güçlü bir antioksidandır. ALA hem okside formunda hem de indirgenmiş formunda (Dihidrolipoik asit-DHLA) antioksidan aktivite göstermektedir. DHLA, dihidroaskorbik asidi yeniden askorbik aside çevirebilir, direk olarak C vitamininin, indirek olarak E vitamininin yeniden oluşumunu sağlayabilir. Bu özelliğinden dolayı diğer antioksidanları da rejenere edebildiği için antioksidanların antioksidanı olarak da adlandırılmaktadır. ALA bakır, manganez ve çinko gibi bazı metalleri bağlayarak, onlarla stabil kompleksler oluşturur. Bu etkisi sayesinde ağır metal zehirlenmelerine karşı metal şelatörü olarak kullanılabilir (98).

Hem ALA, hem de DHLA, reaktif oksijen türlerini yakalama ve metallere şelat oluşturma yeteneğine sahipken, sadece DHLA endojen antioksidanları rejenere edebilmekte ve oksidatif hasarı onarmaktadır (Tablo 6), (99).

Tablo 6 α- Lipoik asit (ALA) ve Dihidrolipoik asit (DHLA) tarafından yakalanan reaktif oksijen türleri

OKSİDAN	LA	DHLA
Hidrojen peroksit	+	+
Süperoksit radikali	-	+
Singlet oksijen	+	-
Hidroksil radikali	+	+
Peroksil radikali	-	+
Hipokloröz asit	+	+
Peroksinitrit	+	+
Nitrikoksit radikali	+	+

ALA absorbe edildikten sonra mitokondriyal matrikse girer dihidrolipoamid dehidrogenaz tarafından NADH' dan aldığı elektronları kullanarak DHLA' e indirgenir. İlginç bir şekilde ALA redüksiyonu mitokondri noksanlığı olan insan eritrositlerinde de gözlenmiş ve sitozolde bulunan glutatyon redüktazın, NADPH bağımlı ALA'nın indirgenmesinden sorumlu olduğu bulunmuştur (100).

LD₅₀ (letal doz) değeri, sıçanlarda intravenöz uygulamadan sonra ve köpeklerde oral alınan dozdan sonra 400-500 mg/kg olarak bulunmuştur (Tablo 7),(87).

Tablo 7 Lipoik asit uygulanmasından sonra, hayvanların %50'sinin öldüğü dozlar (99).

VERİLİŞ ŞEKLİ	LD ₅₀ SIÇAN	LD ₅₀ FARE
p.o.	1,130 mg/kg	502 mg/kg
i.p.	200 mg/kg	160 mg/kg
s.c.	230 mg/kg	200 mg/kg
i.v.	180 mg/kg	210 mg/kg

α- Lipoik Asit'in R- ve S- Enansiyomerleri

R-α- Lipoik asit, ALA'in biyolojik olarak aktif ve doğal olarak bulunan formudur. S-formu ise ALA'in sentetik üretimi ile elde edilir ve tek başına etkili değildir. ALA'in ticari formu, R- ve S- enansiyomerlerinin 1:1 oranındaki rasemik karışımıdır (101).

Dihidrolipoik asidin antioksidan etkisi kanıtlanmış olmasına rağmen özellikle demirin varlığında prooksidan etki gösterebilir. Dihidrolipoik asid invitro hem ferrik hem ferröz demir ile şelat oluşturur. Bu nedenle demirin oksidatif hasarını önler. Ancak ferritinden demirin ayrılmasını ve Fe⁺³'ün Fe⁺²'ye dönüşümünü azaltarak oksidatif hasarı arttırabilir (102).Alfa lipoik asid ve DHLA'in antioksidan ve prooksidan olarak fonksiyon gösterme yeteneği oksidan stresin tipi ve fizyolojik şartlar tarafından belirlenmektedir. Tiyol bileşikleri tarafından oluşturulan prooksidan etkilerin çoğu O₂[•], H₂O₂ ve •OH oluşmasına bağlanmaktadır (103).

3. GEREK VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları laboratuvarından temin edilen, Wistar cinsi prepubertal dişi sıçanlar kullanılmıştır. Deneklerin çalışma süresince barındırılması ve bakımları bu ünite tarafından yapıldı. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık, 20-22 °C oda sıcaklığında barındırıldı. Hayvanlar dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pelet yem ile ad libitum beslendi.

Tüm sıçanlar Kontrol, EMA ve hem EMA' ya maruz kalmış hemde lipoik asit uygulanmış grup (EMA+LA) olarak rastgele üç gruba ayrılmıştır. EMA ve EMA+LA gruplarına 6 hafta süreyle günde 4 saat EMA uygulanmıştır. Bu süre içinde EMA+LA grubuna, EMA uygulaması ile birlikte oral gavaj yöntemi ile hergün EMA uygulamasına başlamadan önce 100 mg/kg lipoik asit verilmiştir. Sıçanların haftalık olarak kilo artışları ölçülerek lipoik asit dozu ayarlanmıştır. Kontrol grubu ve EMA grubuna ise oral gavaj ile hergün serum fizyolojik verilmiştir.

Çalışma grupları aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur:

- I. grup: Kontrol grubu. EMA'ya maruz kalmamış ve p.o.serum fizyolojik almış grup (n=7)
- II. grup: EMA grubu. EMA'ya maruz kalan ve p.o. serum fizyolojik uygulanmış prepubertal dişi sıçanlar (n=7, 6 hafta)

III. grup: EMA+LA grubu. EMA'ya maruz kalmış + Lipoik Asit uygulanmış sıçanlar (n=10, 100 mg/kg Lipoik Asit p.o. 6 hafta)

3.1. LİPOİK ASİDİN HAZIRLANIŞI

100 mg/kg Lipoik asit, serum fizyolojik içerisinde vortekslendi. Lipoik asit çözülünceye kadar 1Molar NaOH eklendi ve 1 Molar HCl ile pH'ı 7.4' e ayarlandı.

3.2. EMA OLUŞTURULMASI

EMA oluşturmak için helmholtz bobin sistemi kullanılmıştır. Bu sistem belli bir bölgede düzgün bir manyetik alan oluşturmak amacıyla iki bobinden oluşturulan bir düzenektir. Bu isim, ünlü Alman fizikçi Hermann von Hemholtz onuruna verilmiştir. Özdeş ve çembersel iki manyetik bobinden oluşur. Bobinler, merkezleri aynı doğru üzerinde olacak şekilde yarıçaplarına eşit uzaklıkta yerleştirilir. Her bir bobinden aynı yönde ve aynı şiddette akım geçirilir.

Bizim kullandığımız Helmholtz sisteminde çapları 95 cm olan özdeş iki bobinden ve her biri kesiti 5mm×2,5mm olan 320 sarımlı izole alüminyum telden oluşmuştur. Bobinler arasındaki uzaklık 50 cm olup 20kVA lık 380 V, 800 V, 1200 V ve 1400 V kademeli 50 Hz alternatif (AC) gerilimle beslenen bir güç kaynağı kullanılmıştır. 790 V gerilim altında oluşan manyetik akı yoğunluğu digital teslametre (FW Bell, 5170) ile 3 mT =30 G (Gauss) olarak ölçüldü. Bu durumda çekilen akım 6,43 A' dı.

EMA ve EMA+LA gruplarının kafesleri bobinlerin arasına yerleştirildi (Resim 1). Bu sistemle aynı anda 2 kafese EMA uygulanabilmektedir. EMA ve deney gruplarındaki sıçanlar günde 4 saat boyunca 30 G EMA'ya maruz bırakıldı (Resim 1). Uygulama 6 hafta boyunca sürdürüldü. Maruz kalma süresince tüm sıçanlar metal içermeyen kafeslere yerleştirildi ve maruz kalma süresi dışında serbest şekilde su ve yeme ulaşabildiler.

EMA oluşturmak için kullanılan sistem günlük yaşamda maruz kalabileceğimiz sınırlarda EMA oluşturduğu için herhangi bir çevresel tedbir (deney odasının duvar izolasyonu vs. gibi) ya da çalışanların özel tedbir almasını gerektirmemektedir.



Resim 1: 30 Gauss = 3 militesla, 50 Hertz frekanslı EMA

3.3. DOKU ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI

EMA'ya maruz kalma süresi biten sıçanların ağırlıkları sakrifikasyondan önce tartıldı sonra sıçanlar eter anestezisi altında perfüze edildi. Perfüzyonun ardından ovaryum dokuları çıkarıldı. Sol ovaryumları ışık mikroskopik inceleme için %10'luk tamponlu formaldehide ve elektron mikroskopik inceleme için %2,5'luk gluteraldehide alındı. Sağ ovaryumları da spektrofotometrik ölçüm için buz içerisinde muhafaza edildi homojenat hazırlandı ve -80 dereceye kaldırıldı. %10'luk tamponlu formaldehitte 2 gün bekletilen ovaryum dokuları rutin histolojik takip işlemlerinden geçirildi.

3.4. RUTİN DOKU TAKİBİ PROTOKOLÜ

Rutin doku takibindeki tüm işlemler 60°C etüvde gerçekleştirildi.

- § %70'lik alkol (20 dk.)
- § %80'lik alkol (20 dk.)
- § %96'lık alkol (20 dk.)
- § %96'lık alkol (20 dk.)
- § Aseton 1 (20 dk.)
- § Aseton 2 (20 dk.)
- § Aseton 3 (20 dk.)
- § Aseton 4 (20 dk.)

- § Ksilol 1 (30 dk)
- § Ksilol 2 (30 dk)
- § Parafin 1 (1 saat)
- § Parafin 2 (1saat)

Dokular parafine gömüldü. Mikrotom yardımıyla dokulardan 5 µm kalınlığında seri kesitler alınarak örnekler lizinli lamlara alındı. Örneklerin bir kısmı Hematoksilen-Eosin (H&E) boyası ile rutin ışık mikroskopunda incelenmek üzere boyandı. Alınan 5'er µm'lik seri kesitlerden her 7. preparat 24 saat 60°C etüvde bekletildikten sonra TUNEL yöntemiyle boyandı.

3.5. TUNEL PROTOKOLÜ

DNA fragmantasyonu TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate DNA nick-end labelling) kiti ile gösterildi. Bu yöntemde biyotinlenmiş nükleotid, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) enzimini kullanarak DNA'nın 3'-OH ucuna bağlanır. Daha sonra işaretlenmiş streptavidin bu biyotinlenmiş nükleotidlere bağlanır. Bu prosedüre göre fragmanle nükleuslar koyu kahverengi olarak boyanır. DNA kırığının antikor ile terminal uçtan işaretlenmesi esasına dayanır.

- § Hazır kit solüsyonlarından birinci şişe Enzim solüsyonu ikinci şişe İşaretleme (Label) solüsyonudur. Boyamaya başlanmadan önce bu solüsyonların karıştırılarak TUNEL reaksiyon karışımının hazırlanması gerekir. Bunun için ikinci şişeden 100µl negatif kontrolde kullanılmak üzere ayrıldı. Kalan stok solüsyonun üzerine ilk şişeden 50µl eklendi iyice vortekslenildi. Böylece 500µl lik reaksiyon karışımı elde edildi.
- § 400µl %30luk stok H₂O₂(Hidrojen peroksit) 3,6 ml PBS (Phosphate Buffer Saline) ile karıştırılarak %3lük H₂O₂ hazırlandı.
- § Boyanacak alanın etrafı PapPen ile çizildi ve lamlar PBS ile yıkandıktan sonra belirlenen alana %3'lük H₂O₂ konuldu ve 10 dk. oda sıcaklığında bekletildi.
- § Preparatlar PBS ile yıkandı. Belirlenen alanın etrafındaki fazla sıvı alındıktan sonra reaksiyon karışımı dokunun tamamını kapatacak şekilde konuldu ve 60dk 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
- § 3 kez PBS ile yıkanıp fazla sıvısı kurulan lamların üzerine 50µl Converted POD (3.şişe) ilave edildi ve 30dk 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

- § Bu süre içinde bir sonraki basamakta kullanılacak olan DAB yarım saat önceden hazırlandı. Bunun için 300 µl DAB substratı 2700 µl DAB dilisyonu ile karıştırılarak ve karanlık bir yerde bekletildi.
- § İnkübasyon süresi sonunda 3 kez PBS ile yıkanıp fazla suyu alınan lamın üzerine, hazırlanan DAB solüsyonunu koyulup yaklaşık 2dk beklenildi.
- § Preparatlar distile suyla yıkandı. Lamların üzerine Harris Hematoksilen konulup 10-15 sn beklenerek zemin boyaması yapıldı ve yine distile suyla yıkandı.
- § Lamlar kurutulmadan alkol ve ksilol serilerinden geçirilip entellan ile kapatıldı.

3.6. ROS VE ANTIOKSİDAN TAYİNİ

3.6.1. HOMOJENAT HAZIRLANMASI

Doku örnekleri 2 ml soğuk distile su içinde ultrasonik homojenizatörde 1 dk süreyle homojenize edildi (Resim 2). Homojenizasyon işlemleri sırasında örnekler buz üstünde tutuldu. Homojenat +4°C’de ve 10 000 g devirde 15 dk santrifüj edildi ve süpernatandan enzim ve protein ölçümü yapıldı. Örnekler ölçüm yapılana kadar - 70°C’de saklandı.



Resim 2: Homojenat Hazırlanması

3.6.2. SPEKTROFOTOMETRİK MDA (MALONDİALDEHİT) ÖLÇÜMÜ

- Daha önceden –80 °C'deki doku homojenatları 10 dakika oda ısısında çözüldü.
- 200 µL'lik örnekler tüplere konuldu.
- Her tüpe 10'ar µL probukol eklendi. (Bioxytech, Oxis Research, MDA 586®)
- Her tüpe 640 µL R1 solüsyonundan eklendi.
- Dikkatlice vortekslendi.
- Her tüpe 150 µL R2 solüsyonundan eklendi.
- Dikkatlice vortekslendi.
- 45°C de 60 dakika inkübe edildi.
- Temiz bir süpernatant için örnekler santrifüj edildi (ör. 10,000 X g 10 dakika).
- Temiz süpernatant kısım ölçüm küvetine konularak spektrofotometre ile 586 nm absorbansla ölçüldü (HACH-LANGE DR 5000®).

3.6.3. SPEKTROFOTOMETRİK GLUTATYON PEROKSİDAZ ÖLÇÜMÜ

- Daha önceden –80 °C'deki doku homojenatları oda ısısında çözüldü.
- Spektrofotometrenin absorbansı 340 nm ye ayarlandı (sıcaklık 23-25°C).
- Distile su ile sıfırlanarak ölçüm yapıldı.
- Çabucak örnek tampon solüsyonla 1/10 oranında dilüe edildi (Ör 30 µL + 270 µL tampon) (Bioxytech Oxis research GPx 340®).
- Pipetle ölçüm küvetine, 350 µL Tampon solüsyonu, 350 µL NADPH reaktifi, 70 µL örnek konuldu.
- Küvet spektrofotometreye yerleştirildi.
- Küvete 350 µL dilüe tert-Butyl Hydroperoxide reaktifi eklenerek köpürtmeden pipetle karıştırıldı.
- 3 dakika boyunca A340 nm'de değişim kaydedildi.

Çalışma solüsyonu dilüe edildi. 1/100 dilution of tert-Butyl Hidroksit: 0.05 mL tert-Butyl Hydroperoxide stoktan + 4.95 mL distile su, 1/100 ara solüsyon dilüesi, 0.2 mL ara solüsyon + 19.8 mL distile su) (HACH-LANGE DR 5000®).

3.6.4. TOTAL PROTEİN ÖLÇÜMÜ

- Daha önceden –80 °C’deki folikül sıvıları oda ısısında çözüldü.
- Tüpe 1000µL reaktif 1 konuldu.
- 20 örnek ilave edildi ve 5 dakika 37 °C ‘de bekletildi.
- Spektrofotometre ile ölçülerek değerler yazıldı.

3.7. ULTRASTRÜKTÜREL İNCELEME

3.7.1. ELEKTRON MİKROSKOBİK DOKU TAKİBİ

§ Diseksiyon ile ovaryum dokusundan 1 mm³ parçalar alınarak %2,5 fosfat tamponlu glutaraldehid içerisinde fiksasyon yapıldı.

- Örnekler Sorenson fosfat buffer ile 3–4 kez değiştirilerek 15–20 dakika yıkandı. (glutaraldehit şişelerinden boşaltılıp üzerine tampon solüsyonu konur).
- Örnekler 1 kısım PBS+1 kısım osmium tetroksit (OsO₄) solüsyonu karışımında 1 saat bekletildi. (ependorf tüplerin içine 500 µl OsO₄ + 500 µl tampon konuldu).

(Bu işlem her şişe için otomatik pipet kullanılarak yapılır. Tüpler alüminyum folyo ile kapatılıp oda sıcaklığında 1 saat karanlık ortamda bekletildi.)

- PBS ile 15–20 dakika yıkanır (Üç küçük beher içine PBS konur. OsO₄’ ten çıkan parçalar çalkalanır. Çıkan parçalar kurutma kâğıdında süzdürülüp en son içinde tampon olan eppendorf tüpe konur.)

Dehidratasyon İşlemi

- % 70 Alkol10 dakika
- %100 (Absolu) Alkol.....10 dakika
- %100 (Absolu) Alkol.....10 dakika
- Propilen oksit (Merk®).....15 dakika
- Propilen oksit15 dakika

İnfiltrasyon işlemi

- Dokular kurumayacak şekilde 1:1 oranında hazırlanan propilen oksit + araldit karışımına alındı. Oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.
- Arada hafif hareketlerle karıştırıldı.
- Araldite CY212 Resin (TAAB®) ve DDSA (dodecenyl suuccinic anhidride TAAB®) (1:1) oranında karıştırıldı her şişeye 2 mL konuldu. Dokular yeni araldit karışımında yaklaşık 6-12 saat bekletildi.

- Araldite CY212 Resin (TAAB®) ve DDSA (TAAB®) 1:1 oranında hazırlanan bu yeni karışıma (gömülecek materyal sayısına göre hesaplanarak) BDMA (Benzyl Dimethylamine TAAB®) ilave edilerek gömme materyali hazırlandı. Bu karışım içine gömülen dokular 60°C 'lik etüvde 48 saat polimerize edildi.
- Daha sonra yarı ince kesitleri alınarak toluidin mavisiyle boyanıp alan belirlendi.
- Belirlenen alanlardan ince kesitler formuvar kaplı gridler üzerine alındı.
- Uranil asetat ve kurşun sitratla kontrastlaması yapıldı trasmisyon elektron mikroskobunda (Carl Zeiss Libra 1200) değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. IŞIK MİKROSKOBİK BULGULAR

Kontrol grubunda ovaryum ince fibröz bağ dokudan oluşan bir kapsül ile çevrenmişti. Dış kısmında germinal epitel kübik şekilli hücrelerden oluşmaktaydı. Germinal epitelin bazal membranı düzgün ve düzenli olarak gözlemlendi. Kapsülden parankima içine uzanan ince bağ dokusu bantları düzgün olarak izlendi. Kortekste ovaryum dokusu içerisinde primordiyal folliküller, çeşitli çaplarda primer, sekonder ve tersiyer folliküller ile birlikte farklı miktarda korpus luteum yer almaktaydı. Folliküllerde bulunan oosit ve ona ait zona pellusida düzenli ve normal görünümdeydi (Resim 3).

Folliküllerin etrafında bulunan granüloza hücreleri poligonal, eozinofilik sitoplazmalı olup çekirdekleri kromatinden zengin ve yuvarlak biçimliydi. Vasküler yapılar normal bir görünüme sahipti (Resim 3).

EMA grubunda yapılan seri kesitlerde ovaryumu çevreleyen fibröz kapsülden parankima içerisine giren bağ dokusu demetlerinde kalınlaşma ve artış görüldü (Resim 7). Bazı folliküllerde küçük genişlemeler dikkati çekti EMA grubuna ait preparatlarda ovaryumun interstisyel dokusu içindeki damarlanmada artış olduğu yer yer damarlarda dilatasyon, konjesyon ve kapillerlerde genişleme gözlemlendi (Resim 4,5,6,8).

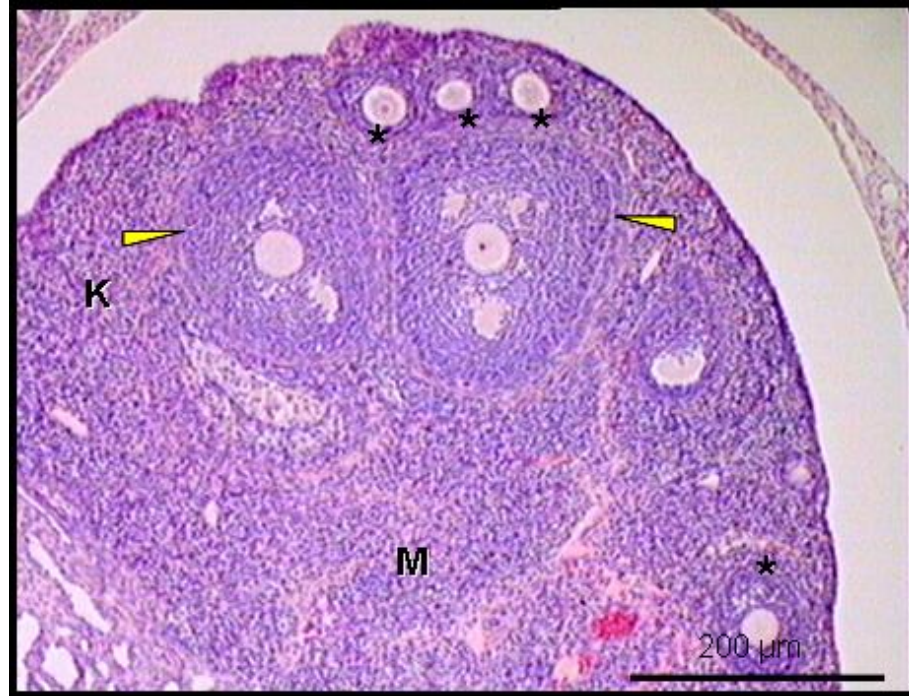
EMA+LA grubunda ovaryumu çevreleyen fibröz kapsülden parankima içerisine giren bağ dokusu demetlerinde kalınlaşma görüldü. EMA+LA grubuna ait preparatlarda kontrol grubuna göre ovaryumun interstisyel dokusu içindeki damarlanmada artış olduğu ve yer yer damarlarda konjesyon ve kapiller dilatasyon gözlemlendi. EMA grubuna göre bu bulgular daha az gözlemlendi. EMA grubuna göre bağ dokusunda daha az kalınlaşma ve artış görüldü (Resim 9,10,11,12,13).

Çalışmamızda gruplar arasındaki primer ve sekonder follikül sayılarının karşılaştırılmasında One Way ANOVA testi uygulanmıştır (Tablo 8). Primer follikül sayılarında Kontrol grubu ve EMA grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve EMA grubunda düşük bulunmuştur ($p=0,029$). Kontrol grubu ile EMA+LA grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,574$). EMA+LA grubu ve EMA gruplarının primer follikül sayıları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve EMA+LA grubunda yüksektir ($p=0,009$).

Sekonder follikül sayılarının karşılaştırılmasında Kontrol grubu ile EMA arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve EMA grubunda düşük bulunmuştur ($p=0.000$). Kontrol grubu ile EMA+LA arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.797$). EMA+LA ve EMA grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve EMA grubunda düşük bulunmuştur ($p=0,000$).

Tablo 8 Follikül sayılarının karşılaştırılması (One Way ANOVA testi uygulandı.* $p<0.05$)

	Primer follikül sayıları		Sekonder follikül sayıları	
	(Ort + SD)	p	(Ort + SD)	p
Kontrol EMA	5.5 ± 0.99 2 ± 0.63	0.029*	5.66 ± 0.33 2.66 ± 0.42	0.000*
Kontrol EMA+LA	5.5 ± 0.99 6.33 ± 1.33	0.574	5.66 ± 0.33 5.5 ± 0.56	0.797
EMA+LA EMA	6.33 ± 1.33 2 ± 0.63	0.009*	5.5 ± 0.56 2.66 ± 0.42	0.000*



Resim 3: Kontrol grubuna ait ovaryum kesiti

Kontrol grubuna ait normal görünüme sahip ovaryum. (*) Primer folliküller, (→) Sekonder folliküller, Korteks (K), Medulla (M). (H&E Boyası)



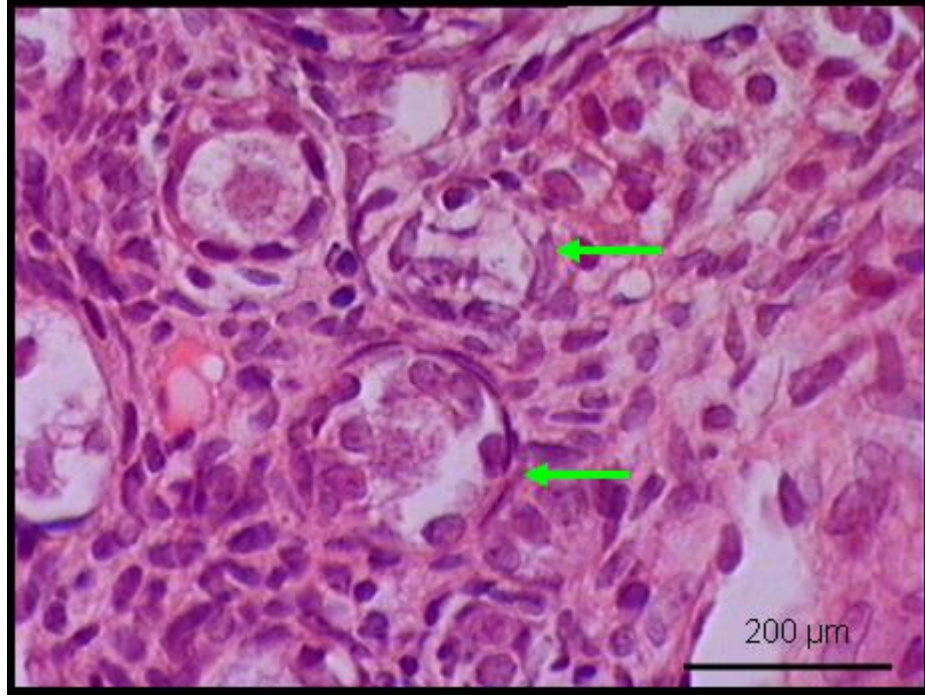
Resim 4: EMA grubuna ait ovaryum kesiti

Folikül sayısında azalma, hiyalinizasyon (**H**), damarlarda dilatasyon (**D**) görülmektedir.



Resim 5: EMA grubuna ait ovaryum kesiti

Atrezik folliküller(**→**) Hyalinizasyon (**H**), Bağ dokuda (**B**) artış görülmektedir.



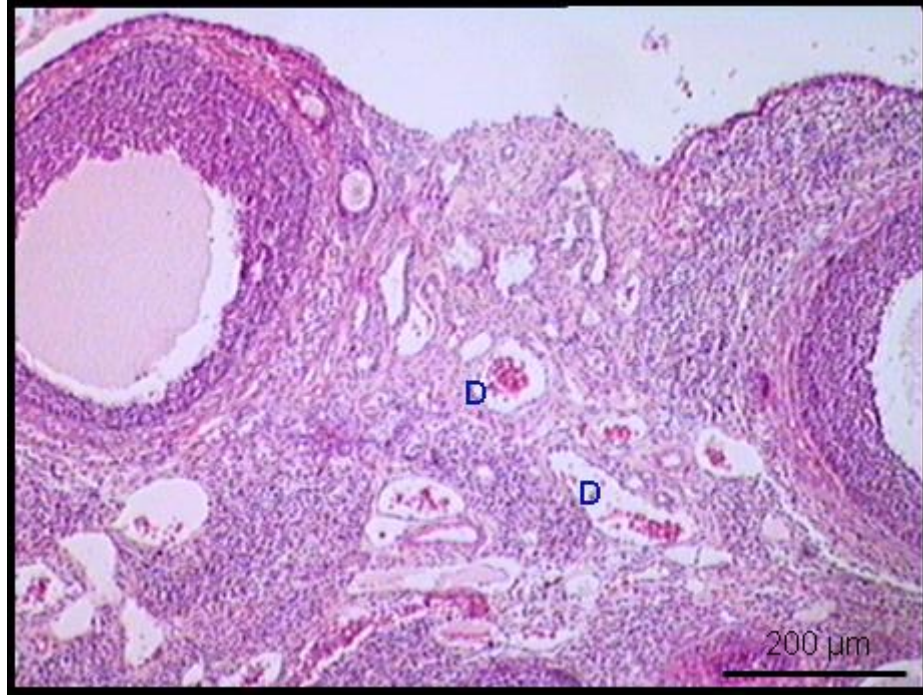
Resim 6: EMA grubuna ait ovaryum kesiti

Hasara uğramış primordiyal folliküller (→).



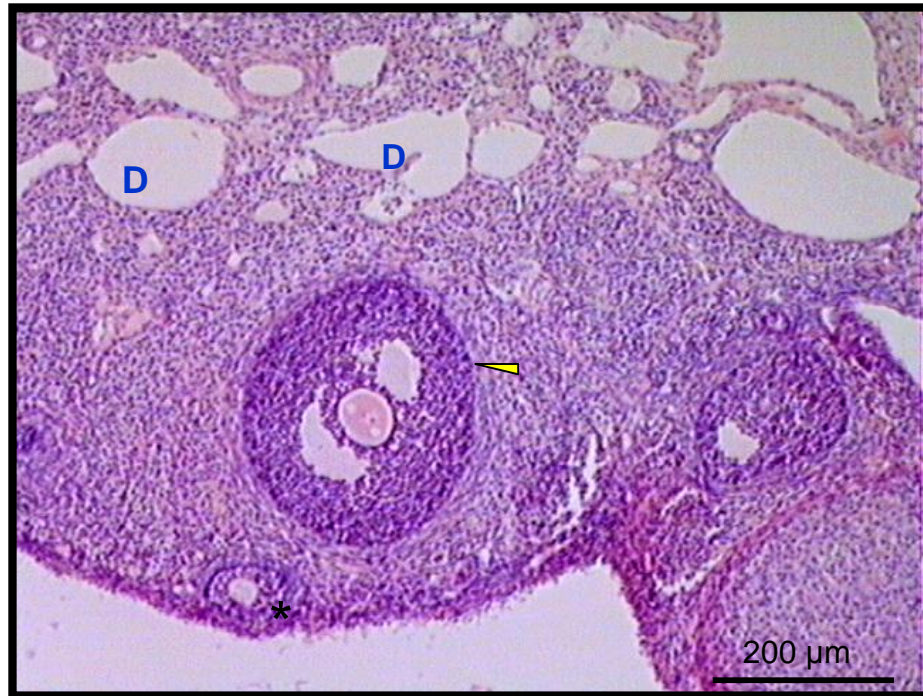
Resim 7: EMA grubuna ait ovaryum kesiti

Bağ dokuda artış, Hyalinizasyon (H) ve damarlarda dilatasyon (D) görülmektedir.



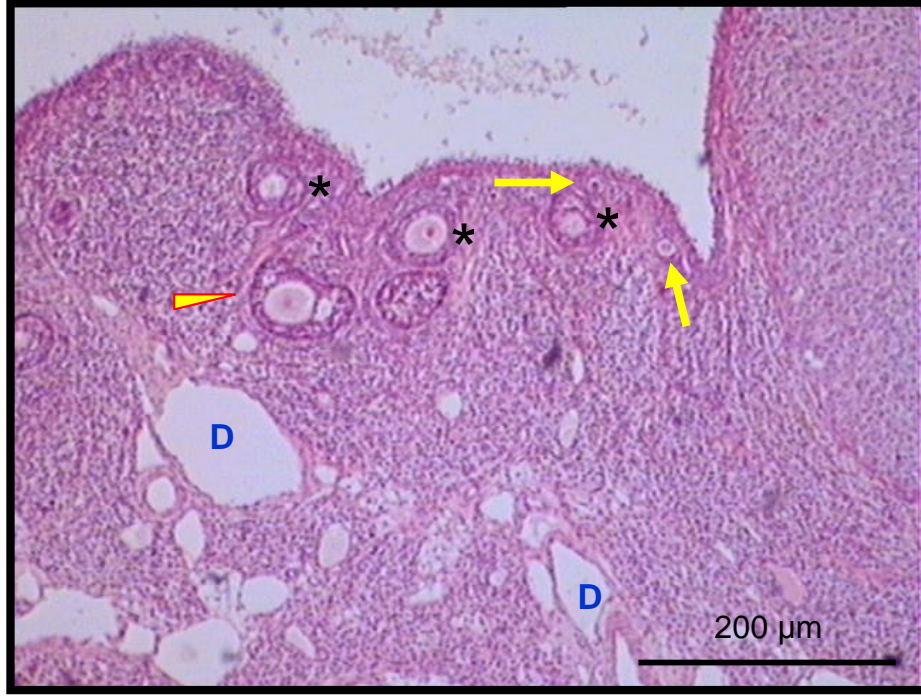
Resim 8: EMA grubuna ait ovaryum kesiti

İnterstisyel doku içindeki damarlarda dilatasyon (D), konjesyon ve follikül sayısının azlığı görülmektedir.



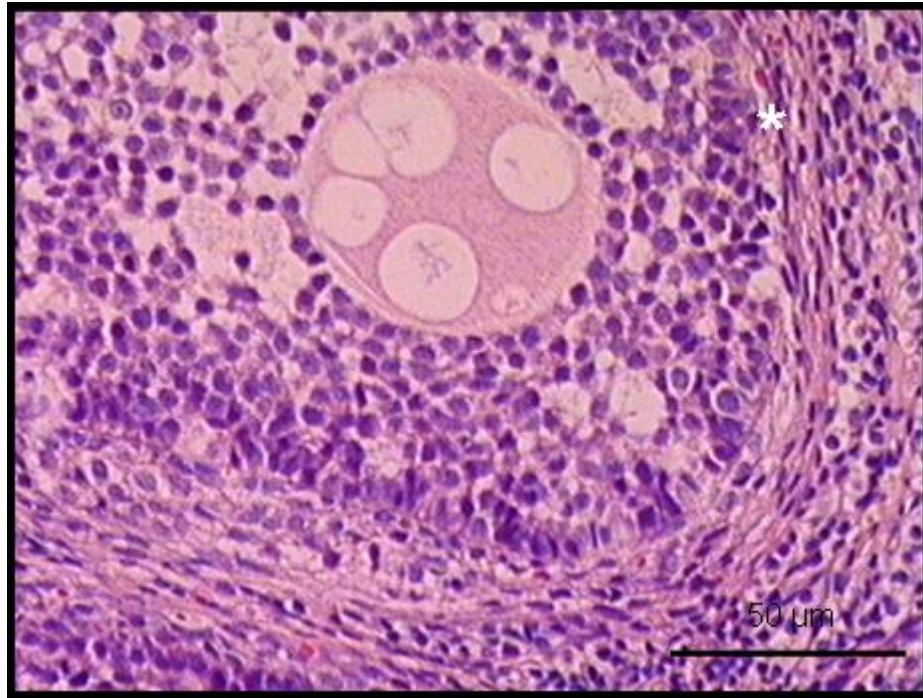
Resim 9: EMA+LA grubuna ait ovaryum kesiti

EMA grubuna göre bağ dokusunda daha az miktarda artış, damarlarda dilatasyon (D) ve normal görünümde primer (*) ve sekonder folliküller (→) görülmektedir.



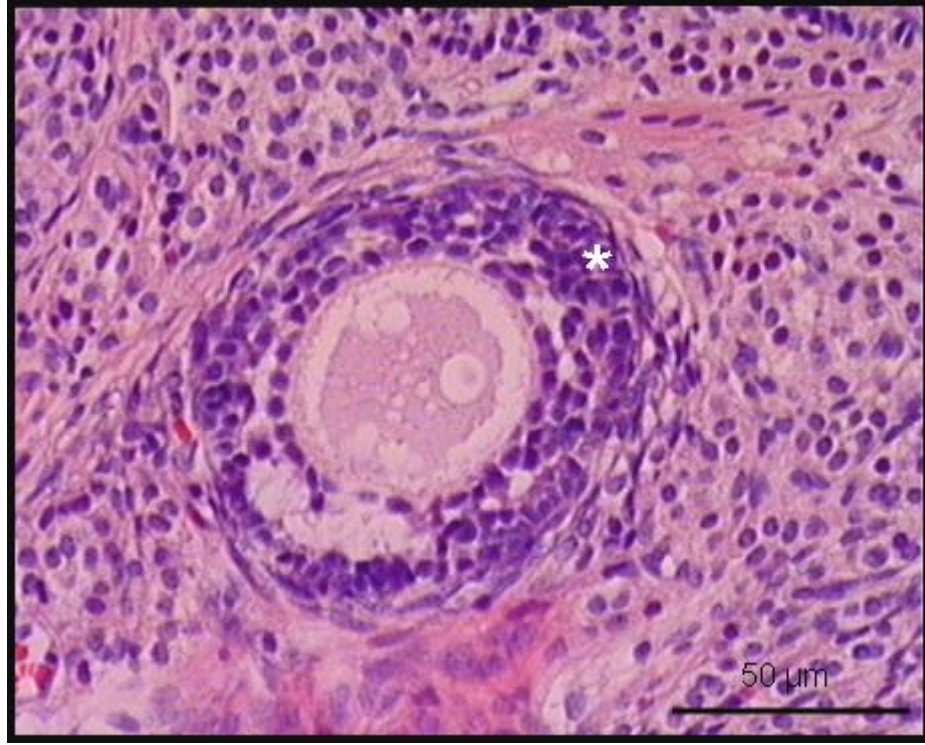
Resim 10: EMA+LA grubuna ait ovaryum kesiti

EMA grubuna göre bağ doku demetlerinde daha az kalınlaşma görüldü. Damarlarda dilatasyon (**D**), farklı gelişim evrelerinde primordiyal follikül (→) primer folliküller (*) ve sekonder follikül (→) görülmekte.



Resim 11: EMA+LA grubuna ait ovaryum kesiti

Normal görümlü sekonder follikül.



Resim 12: EMA+LA grubuna ait ovaryum kesiti

Normal görünümlü sekonder follikül.



Resim 13: EMA+LA grubuna ait ovaryum kesiti

Dejenere olmuş (→) ve normal görünümde primer follikül (→) görülmekte.

4.2. DNA FRAGMENTASYONU –TUNEL BULGULARI

Granüloza hücrelerindeki DNA fragmentasyonunun değerlendirilmesi için uygulanan TUNEL boyama yöntemi ile primer ve sekonder folliküllerdeki granüloza hücreleri incelendi. Primer ve sekonder folliküllerdeki TUNEL pozitif boyanan granüloza hücreleri 3 alt gruba ayrılarak derecelendirildi (104);

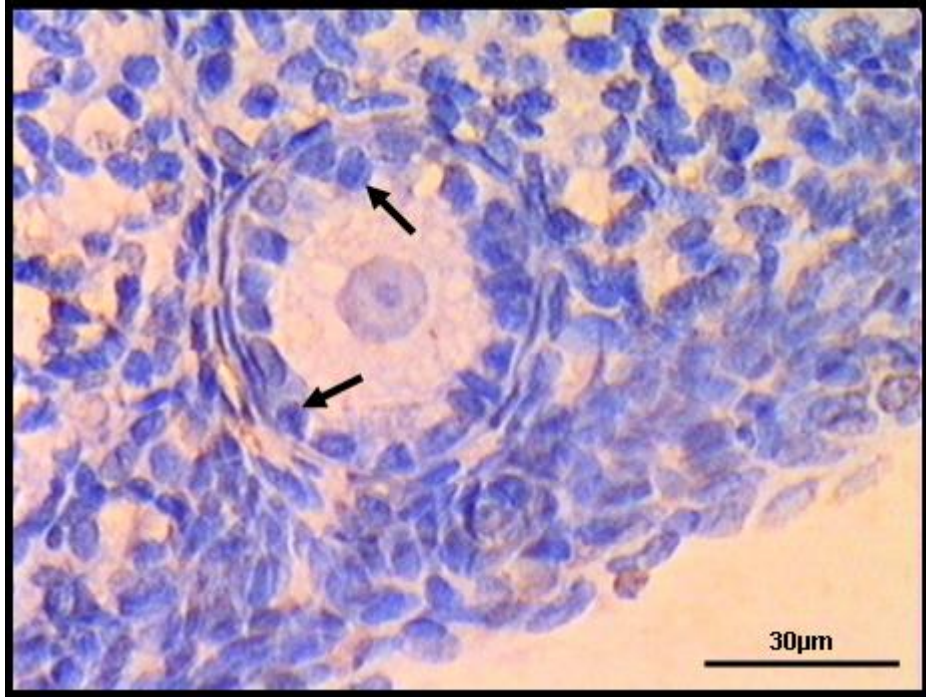
- 1) Sağlıklı folliküller (Hiç Tunel pozitif boyanma göstermeyen) (A0);
- 2) 20 ve 20'den az Tunel pozitif boyanma gösteren folliküller (A1);
- 3) 21 ve daha fazla Tunel pozitif boyanma gösteren folliküller (A2);

Tablo 9 Primer ve sekonder folliküllerdeki granüloza hücrelerinin TUNEL değerlendirilmesi

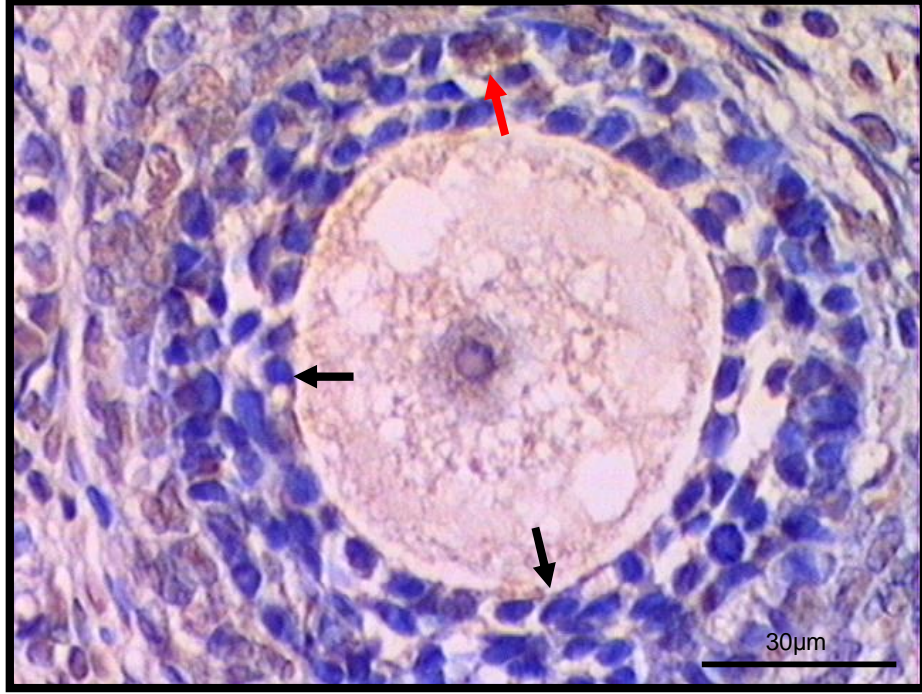
	Primer follikül		Sekonder follikül	
	(Ort + SD)	p	(Ort + SD)	p
Kontrol EMA	5.7 ±8.8 20.2± 17.0	0.002*	5.1 ±7.9 27.0± 14.8	0.001*
Kontrol EMA+LA	5.7 ±8.8 4.9 ±8.6	0.953	5.1 ±7.9 7.5 ±9.7	0.344
EMA+LA EMA	4.9 ±8.6 20.2± 17.0	0.001*	7.5 ±9.7 27.0± 14.8	0.001*

Mann Whitney U testi uygulandı. *: $p < 0.05$ İstatistiksel olarak anlamlı

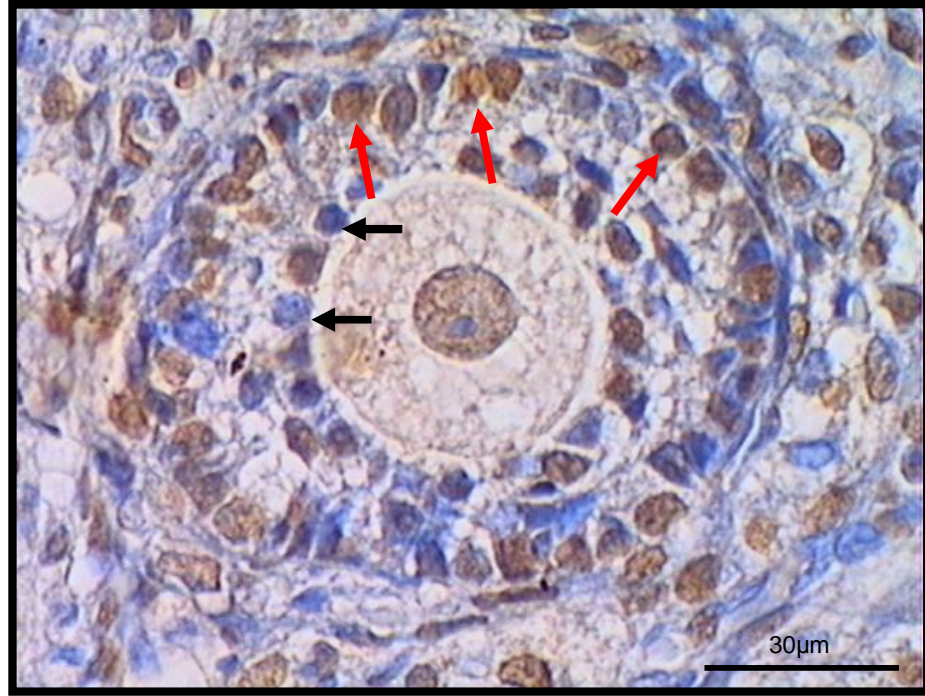
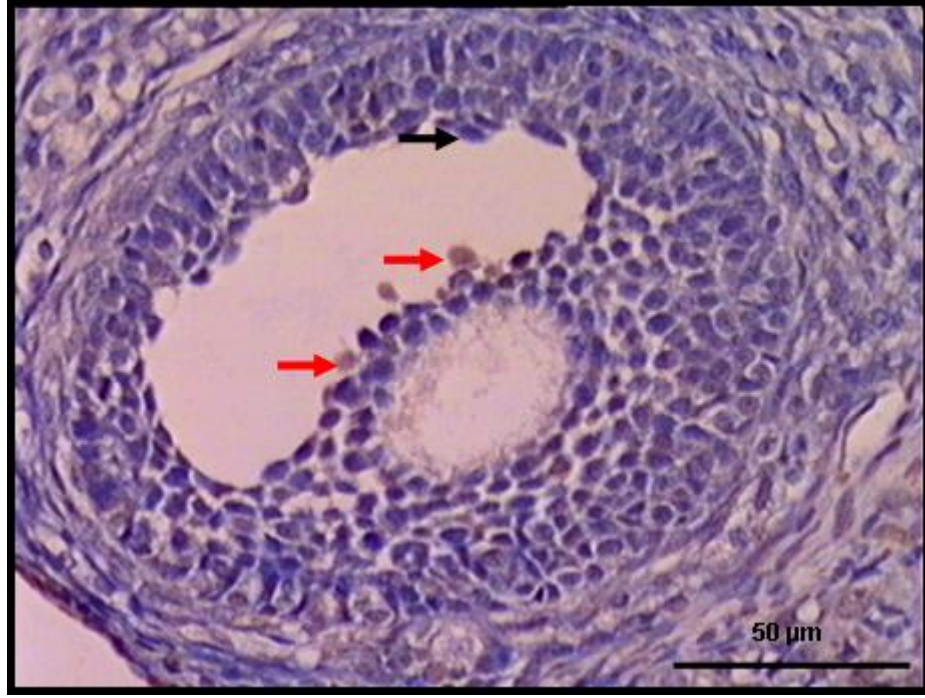
Gruplar arası anlamlı fark olup olmadığını belirlemek için yapılan Mann Whitney U testinde, Kontrol ve EMA gruplarının primer ve sekonder folliküllerindeki TUNEL pozitif boyanan granüloza hücreleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve EMA grubunda yüksek bulunmuştur (primer $p=0.002$, sekonder $p=0.001$), Kontrol ve EMA+LA gruplarının primer ve sekonder folliküllerindeki TUNEL pozitif boyanan granüloza hücreleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (primer, $p=0.953$; sekonder $p=0.344$). EMA+LA grubuyla EMA grubu karşılaştırıldığında, EMA grubunda primer ve sekonder folliküllerdeki TUNEL pozitif boyanan hücre sayısı istatistiksel olarak anlamlı ve yüksek bulundu (primer $p=0.001$, sekonder $p=0.001$).



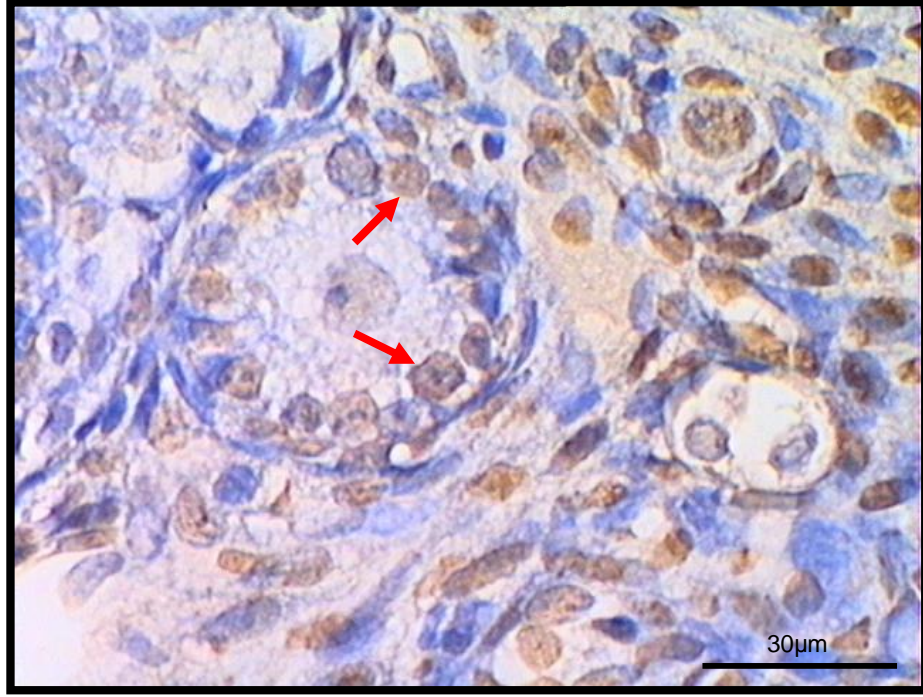
Resim 14 Kontrol grubunda TUNEL değerlendirilmesi
(**→**) TUNEL (+) kahverengi boyanan granüloza hücreleri,
(**→**) TUNEL (-) boyanan granüloza hücreleri



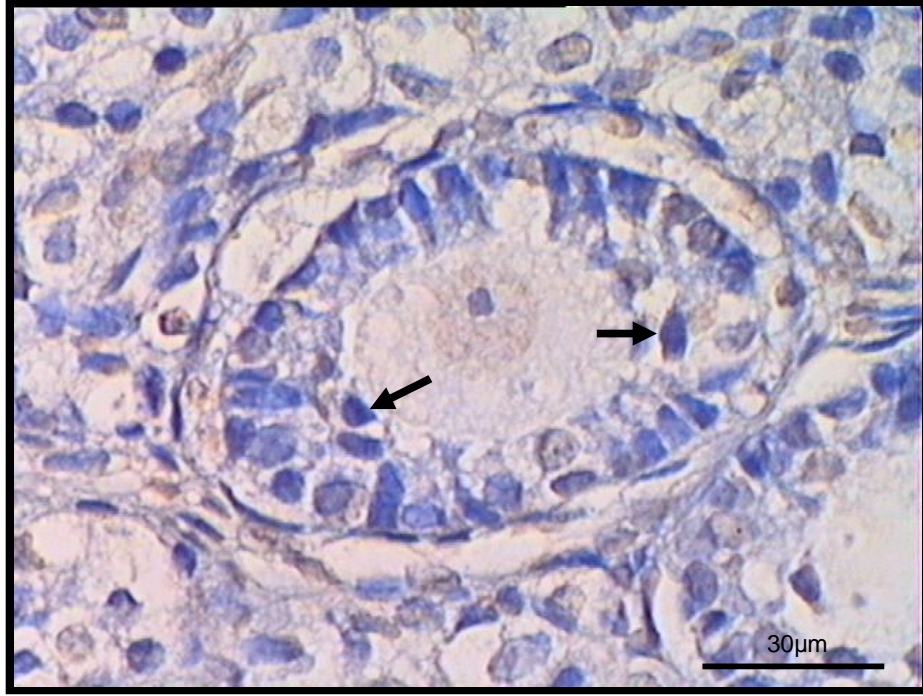
Resim 15 Kontrol grubu TUNEL değerlendirilmesi
(**→**) TUNEL (+) kahverengi boyanan granuloza hücreleri,
(**→**) TUNEL (-) boyanan granuloza hücreleri



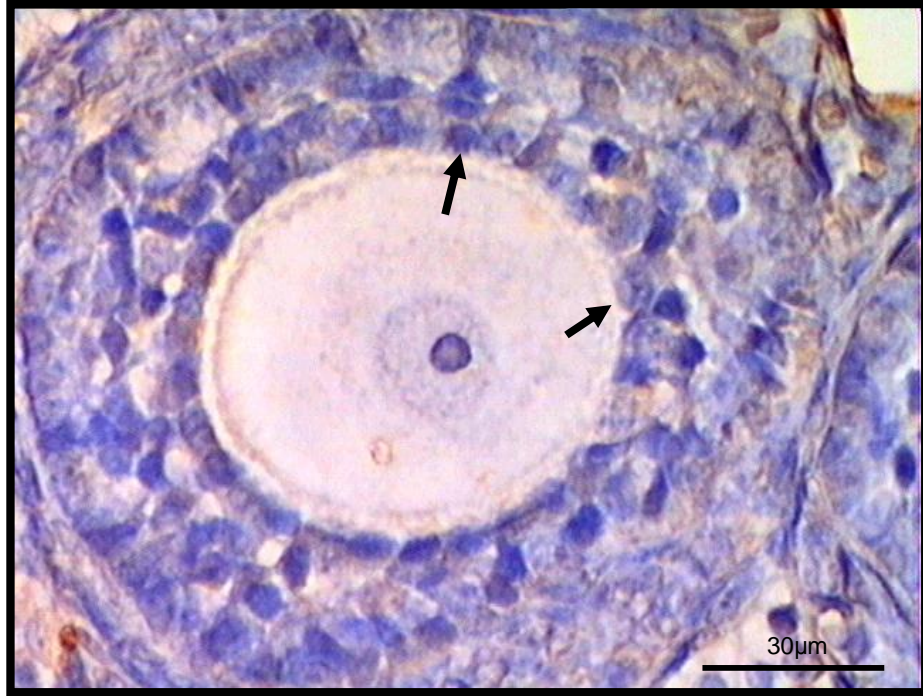
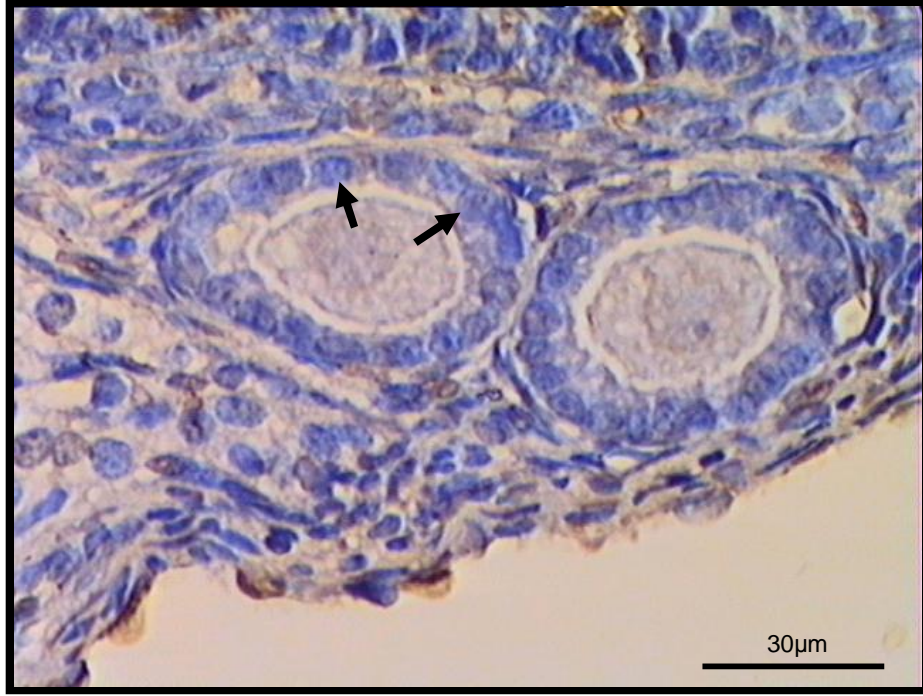
Resim 16 EMA grubu TUNEL değerlendirilmesi
(→) TUNEL (+) kahverengi boyanan granüloza hücreleri,
(→) TUNEL (-) boyanan granüloza hücreleri



Resim 17 EMA grubu TUNEL değerlendirilmesi
(**→**) TUNEL (+) kahverengi boyanan granuloza hücreleri,
(**→**) TUNEL (-) boyanan granuloza hücreleri



Resim 18 EMA+LA grubunun TUNEL değerlendirilmesi
(**→**) TUNEL (+) kahverengi boyanan granüloza hücreleri,
(**→**) TUNEL (-) boyanan granüloza hücreleri



Resim 19 EMA+LA grubunun TUNEL değerlendirilmesi
(→) TUNEL (+) kahverengi boyanan granüloza hücreleri,
(→) TUNEL (-) boyanan granüloza hücreleri

4.3. ROS (MDA) ve ANTIÖKSİDAN (GPX) DÜZEYLERİ

Çalışmamızda ovaryum dokusunda, MDA düzeylerinin karşılaştırılmasında One Way ANOVA testini kullandık. $p < 0.05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Gruplar arasındaki MDA düzeylerinin ortalaması $7,98 \pm 0,69 \mu\text{M}$ olarak saptandı. Grupların MDA düzeyleri ortalamaları; Kontrol grubunda $5,18 \pm 0,36 \mu\text{M}$, EMA grubunda $9,24 \pm 1,17 \mu\text{M}$, EMA+LA grubunda $9,05 \pm 1,18 \mu\text{M}$ olarak saptandı (Tablo 9).

Kontrol grubuyla, EMA grubu karşılaştırıldığında, EMA'nın verdiği hasardan dolayı MDA düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,020$). Kontrol ve EMA+LA gruplarını karşılaştırdığımızda EMA+LA grubunun MDA değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,016$). EMA+LA ve EMA grupları arasında MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p= 0,898$).

Antioksidan kapasitesi GPX düzeyleriyle saptandı ve tüm çalışma gruplarında ortalama $44,37 \pm 9,13 \text{ mU/mL}$ bulundu. Gruplara baktığımızda, ovaryum dokusu GPx düzeyleri ortalamaları; Kontrol grubunda $95,72 \pm 18,61 \text{ mU/mL}$, EMA grubunda $34,33 \pm 6,74 \text{ mU/mL}$, EMA+LA grubunda ise ortalama $15,44 \pm 4,82 \text{ mU/mL}$ olarak saptandı (Tablo 9). Kontrol grubuyla, EMA grubu karşılaştırıldığında, EMA'nın verdiği hasardan dolayı GPx düzeyi ortalamaları kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p=0,001$). Kontrol ve EMA+LA gruplarını karşılaştırdığımızda EMA+LA grubunun GPX değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ($p=0,000$). EMA+LA ve EMA grupları arasında GPX düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p= 0,211$).

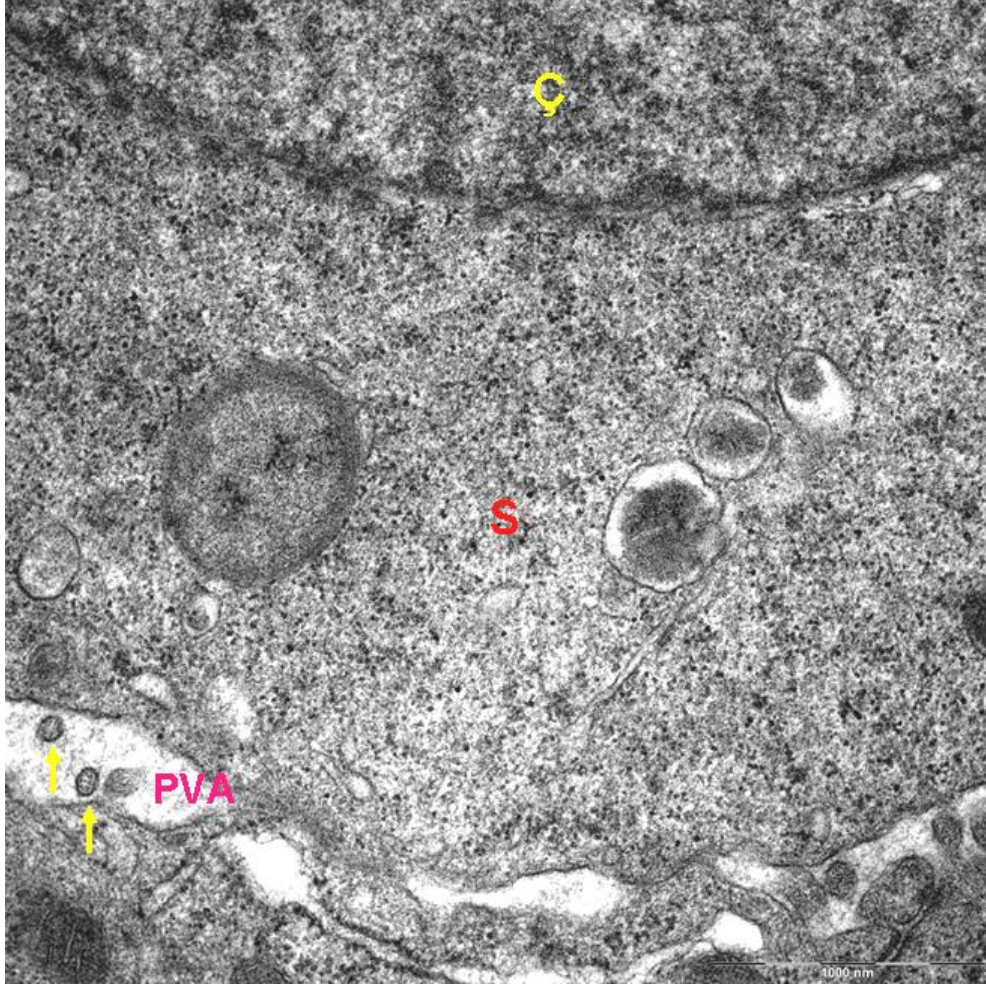
Tablo 10 Grupların MDA ve GPX değerlerinin karşılaştırılması

	MDA Değerleri		GPX Değerleri	
	(Ort + SD)	p	(Ort + SD)	p
Kontrol	$5,18 \pm 0,36$	$0,020^*$	$95,72 \pm 18,61$	$0,001^*$
EMA	$9,24 \pm 1,17$		$34,33 \pm 6,74$	
Kontrol	$5,18 \pm 0,36$	$0,016^*$	$95,72 \pm 18,61$	$0,000^*$
EMA+LA	$9,05 \pm 1,18$		$15,44 \pm 4,82$	
EMA+LA	$9,05 \pm 1,18$	$0,898$	$15,44 \pm 4,82$	$0,211$
EMA	$9,24 \pm 1,17$		$34,33 \pm 6,74$	

4.4. ELEKTRON MİKROSKOBİK BULGULAR

Elektron mikroskopik incelemelerde Kontrol, EMA ve EMA+LA gruplarından elde edilen ince kesitlerdeki primordiyal follikülleri değerlendirdik.

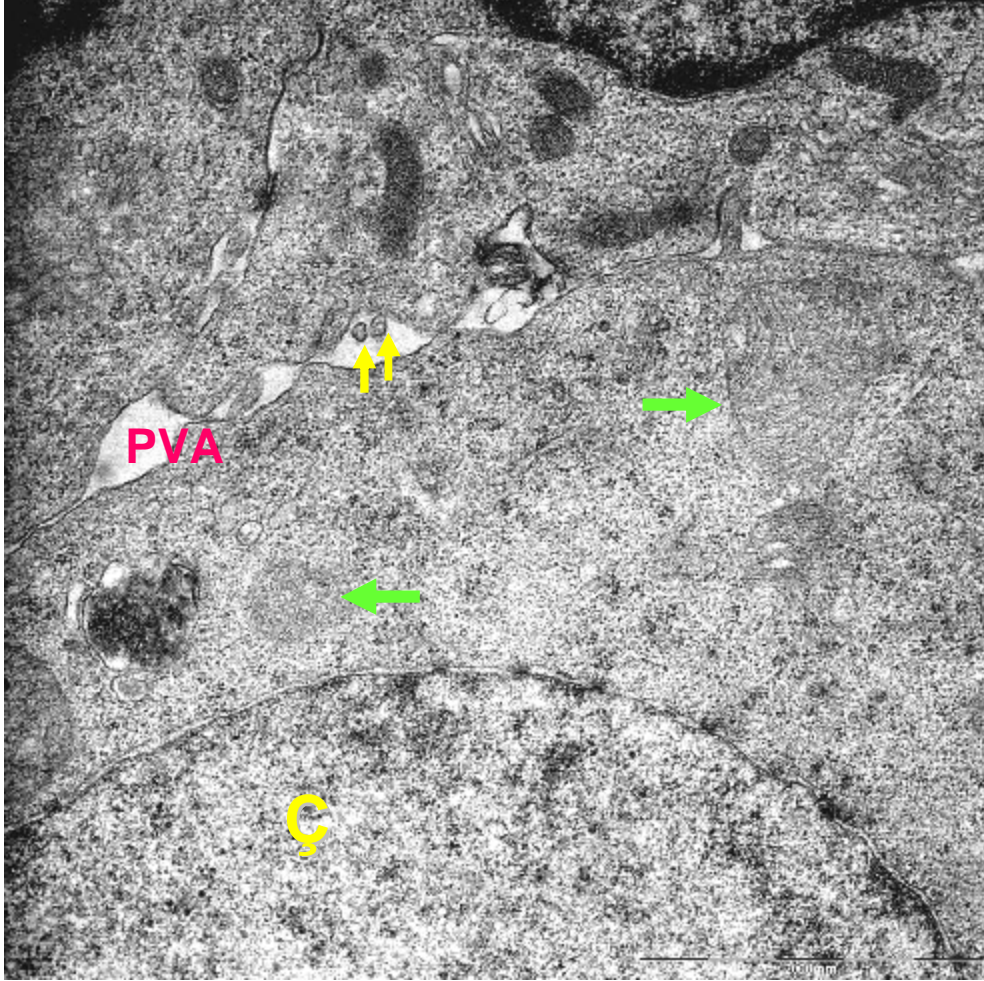
Kontrol grubunda: Sitoplazmik organellerden fakir oosit sitoplazması, perivitellin aralıkta az sayıda mikrovillus, pinositotik vesikül ve caveola yapılanması oluşmamış, çekirdek kromatin dağılımı normal bir görünüme sahipti.



Resim 20: Kontrol grubuna ait elektron mikrografi

Primordiyal follikülü oluşturan; Oosit sitoplazması (S) organellerden fakir, çekirdek (Ç) kromatin dağılımı normal ve perivitellin aralıkta (PVA), az sayıda mikrovillus ↑ görülmektedir.

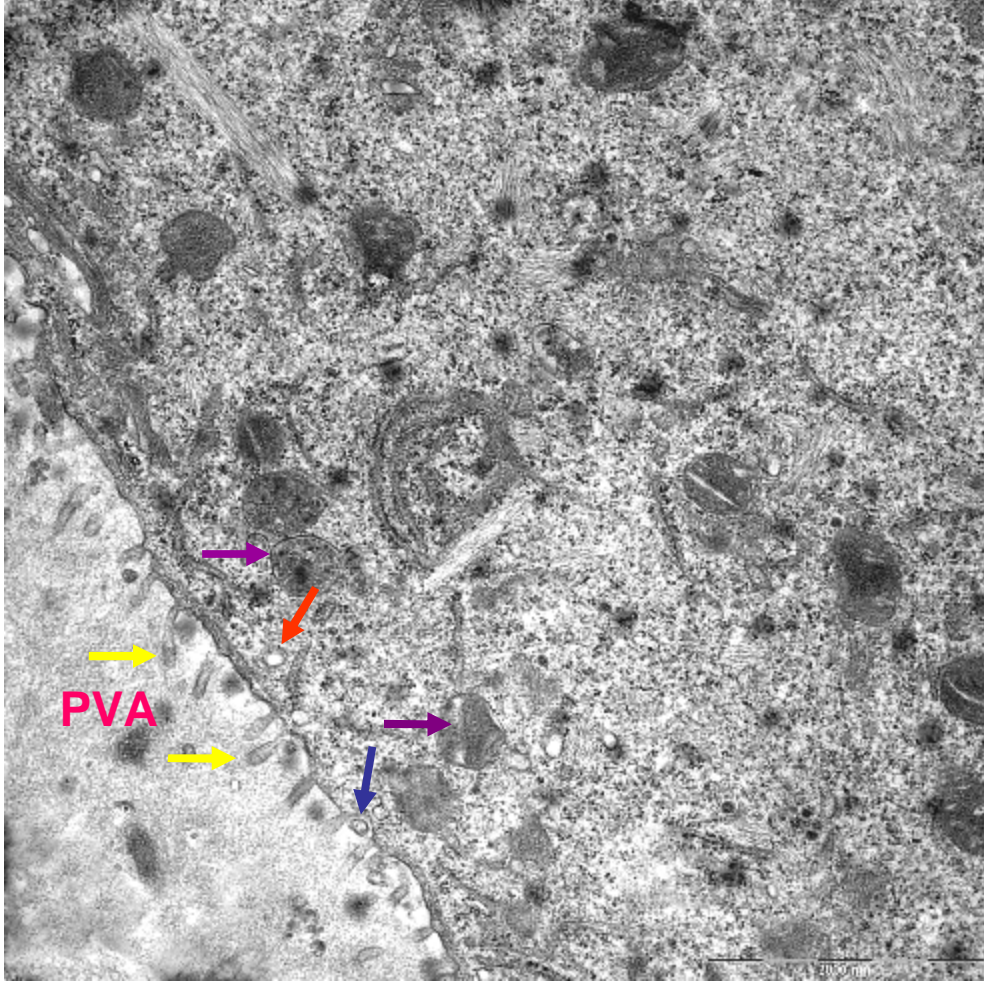
EMA grubunda: Çekirdek kromatin dağılımı normal, normal görünüme sahip mitokondriler, perivitellin aralıkta az sayıda oosit mikrovillus yapısı ve mikrovillusların derin bölümünde caveola görünümü ve oosit sitoplazmasında pinositotik veziküller şekillenmemiştir.



Resim 21: EMA grubuna ait elektron mikrografı

Primordiyal follikülü oluşturan: Oosit sitoplazmasındaki normal görünüme sahip mitokondriler (←), Çekirdek (Ç) kromatin dağılımı normal, perivitellin aralıkta (PVA), az sayıda oosit mikrovillus ↑ yapısı ve mikrovillusların derin bölümünde caveola görünümü ve oosit sitoplazmasında pinositotik veziküller şekillenmemiştir.

EMA+LA grubunda: Oosit sitoplazmasında çok sayıda mitokondri, pinositotik veziküller, caveolalar ve perivitellin aralıkta çok sayıda mikrovillus görülmüştür.



Resim 22: EMA+LA grubuna ait elektron mikrografi

Mitokondriler (→), pinositotik veziküller (→), caveolalar (→), mikrovilluslar (→), perivitellin aralık (**PVA**) görülmektedir.

5. TARTIŞMA

EMA' nın canlı dokularda termal ve kimyasal etkiler olmak üzere iki temel etki mekanizması bulunmaktadır. Bunların, insan sağlığına zararlı olduklarına dair bugüne kadar yapılan bilimsel araştırmalarda çok küçük şiddet ve güçlerde dahi elektromanyetik alan ve dalgaların biyolojik etkilerinden söz edilmektedir. Günümüzde bu dalgaların insan sağlığı üzerine zararlı etkilerinin olduğunu bildiren çalışmalar incelendiğinde, bu konunun önemli bir sağlık problemi haline geldiği görülmektedir. EMA'ya maruz kalma, vücutta birçok biyolojik süreci etkileyerek DNA'da tek veya çift zincir kırıklarına yol açabilmekte, bu durum karsinogenesis gelişimi için potansiyel risk oluşturmaktadır.

Elektromanyetik alanların erkek üreme sistemi üzerine olan etkilerini inceleyen çok sayıda literatür olmasına rağmen, dişi üreme sistemi ve ovaryum ile ilgili olan çok az sayıda literatür bulunmaktadır.

Akhras ve arkadaşları, düşük frekanslı manyetik alanların erkek ve dişi ratların fertilitesi üzerine etkilerini araştırmışlar. Ortalama implantasyon sayıları ve her bir batında yaşayan canlı fetüs sayısı manyetik alana maruz kalan grupta önemli derecede düşük bulunmuştur (105).

Cecconi ve arkadaşları memelilerde in vitro follikül gelişimlerine ve granüloza hücre apoptozu üzerine düşük frekanslı elektromanyetik alanların etkilerini araştırmış, EMA'ya maruz kalan preantral follikül gelişimlerinin gerilediğini ve granüloza hücre apoptozu üzerine etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bulmuşlardır (106).

Bizim çalışmamızda, TUNEL değerlendirmelerinde; kontrol ve EMA+LA grupları arasında primer ve sekonder folliküllerdeki TUNEL pozitif boyanan granüloza hücrelerinde anlamlı fark gözlenmezken, EMA grubunda primer ve sekonder folliküllerde tunel pozitif hücre sayısı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. EMA+LA grubuyla EMA grubu karşılaştırıldığında, EMA grubunda TUNEL pozitif boyanan hücre sayısı anlamlı olarak yüksek bulundu.

EMA'nın bu olumsuz etkilerinin yanı sıra Elbetieha ve arkadaşları, 90 gün boyunca dişi ve erkek ratlara 25 μ T ve 50 Hz sinüsoidal manyetik alan uygulamışlar, fetüs canlılığının değişmediğini ve dişi ve erkek ratların üremesi üzerine olumsuz etkilerinin olmadığını gözlemişlerdir (107).

Aksen ve arkadaşları 50 Hz 1 mT manyetik alanın ovaryum ve uterus üzerine etkilerini araştırmış EMA'ya maruz kalan grubun ovaryumlarında MDA konsantrasyonlarının

önemli derecede arttığını, elektron mikroskopik incelemelerde germinal epiteli oluşturan hücre organellerinde azalma, nükleusun yapısal kaybı, heterokromatik görüntüsü ve hücre sitoplazmasındaki lipid vakuollerinde artış gözlenmiştir (108).

Lee ve arkadaşları 20 kHz manyetik alana maruz kalmış ratlarda timus, mide, barsak, karaciğer, böbrek, testis ve ovaryum dokularında histopatolojik yönden değişikliklere rastlamamışlardır (109).

Rashangar ve Soleimani'nin yaptığı çalışmada, elektromanyetik alana maruz kalan ratların, ovaryumunda folliküler büyümenin inhibe olduğu, oosit maturasyonunun etkilendiği, apoptozun indüklendiği, ultrastrüktürel incelemelerde zona pellusida kalınlığında ve mikrovillus sayısında azalma olduğu sonucuna varmışlardır (110).

Bizim çalışmamızda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında EMA grubunda yapılan seri kesitlerde ovaryumu çevreleyen fibröz kapsülden parankima içerisine giren bağ dokusu demetlerinde artış ve kalınlaşma, interstisyel doku içindeki damarlanmada artış olduğu, yer yer damarlarda dilatasyon, konjesyon ve kapillerlerde genişleme gözlemlendi.

Zecca ve arkadaşları 50 Hz manyetik alana maruz kalan ratların karaciğer, kalp, testis, ve kemik iliği dokularında histolojik ve patolojik yönden değişimlere rastlamamışlardır (111).

Yapılan bazı çalışmalarda EMA'nın serbest radikal oluşumunun artmasına neden olduğu, bazılarında ise böyle bir etkinin olmadığı dikkat çekmektedir. Bu farklı sonuçlar çalışmalarda uygulanmış manyetik alanların şiddetlerindeki ve frekanslarındaki farklılıklardan kaynaklanabilir.

Boland ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, EMA'nın oksidatif strese neden olarak serbest radikalleri artırıp biyolojik sistemleri etkilediği gösterilmiştir (112).

Kula ve arkadaşları, 18 mT, 50 Hz EMA'ya maruz kalmış dişi ve erkek ratların böbrek ve karaciğer dokularında SOD, catalase ve GPX antioksidan enzimlerinin aktiviteleri ve malondialdehit değerlerinin arttığını bildirmişlerdir (113).

Zmyslony ve arkadaşları da benzer şekilde zayıf statik manyetik alanların biyolojik membranlarda lipid peroksidasyonunu stimüle ettiğini göstermişlerdir (114). Buna karşın Singh ve arkadaşları, 2mT manyetik alana maruz kalan hayvanlarda lipid peroksidasyonunun inhibe olduğunu bildirmişlerdir (115).

Repacholi ve Greenebaun, dünyanın statik alanı (0,03-0,07 mT) ve zayıf 50/60 Hz manyetik alanlar arasında bir farklılık olmadığını belirtmişlerdir (116).

Kuvvetli bir antioksidan olan α -lipoik asidin hidroksil radikali, süperoksit radikali, lipid peroksil radikali, nitrik oksit radikali ve hipokloröz asidi kapsayan çeşitli radikallere karşı antioksidan olarak rol oynadığı, ayrıca singlet oksijen ve hidrojen peroksit ile de etkileşime girdiği bilinmektedir (117).

Serbest radikaller yüksek reaktivitelerinden dolayı membran çoklu doymamış yağ asitleri ile etkileşerek peroksidasyonu başlatmaktadır. Bu şekilde oluşan lipid peroksitleri kolaylıkla yıkılarak başta MDA olmak üzere farklı sekonder ürünleri meydana getirmektedir.

Yapılan pek çok in vivo ve in vitro çalışmada α -lipoik asidin lipid peroksidasyon düzeylerini azalttığı ortaya konulmuştur. Birbirine paralel olarak yapılan iki ayrı çalışmada lipoik asidin, adriamycin ile ratlarda oluşturulan nefrotoksisite ve kardiotoksisiteye karşı koruyucu etki gösterdiği ve artmış lipid peroksidasyonunu önemli düzeyde azalttığı belirtilmiştir (118).

Kız öğrenciler üzerinde yapılan bir çalışmada menstruasyonun farklı fizyolojik evrelerinde serum malondialdehit seviyeleri araştırılmış folliküler ve ovulatuvar safhalarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamasına karşın luteal evre süresince serum MDA değerleri önemli derecede yüksek bulunmuştur (119).

Çalışma gruplarımızda ovaryum dokularının MDA düzeyleri karşılaştırıldığında; Hem EMA grubunda hem de EMA'ya maruz kalmış ve koruyucu olarak lipoik asit almış grupta MDA düzeyi ortalamaları EMA'nın verdiği hasardan dolayı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Ancak yalnızca EMA'ya maruz kalan grup ile EMA+LA grubu arasında MDA düzeyleri açısından bulunan fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı.

Oksidan moleküller organizmada sürekli bir oluşum ve antioksidanlar tarafından sürekli bir etkisizleştirilme süreci içindedirler. Serbest radikallerin ve antioksidanların düzeyleri arasındaki hassas denge korunamadığı takdirde hücre hasarına kadar giden birçok patolojik değişiklik ortaya çıkmaktadır (120).

Oksijeni metabolize eden tüm hücrelerde bulunan süperoksit dismutaz , glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimleri serbest oksijen radikallerinin hasarına karşı en önemli defans mekanizmalarını oluştururlar. Normal koşullarda hücrelerde bulunan hidrojen peroksit ve diğer peroksitlerin yıkımını katalize eden GPX, lipid peroksidasyonunun başlamasını ve gelişmesini engelleyen önemli bir enzimdir. (121)

Çalışmamızda gruplar arasında GPX düzeylerini karşılaştırdığımızda; hem EMA grubunda hem de EMA+LA grubunda GPx düzeyi ortalamaları EMA'nın verdiği hasardan

dolayı kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu. Ancak yalnızca EMA'ya maruz kalan grup ile EMA+LA grubu arasında GPx düzeyleri açısından bulunan fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı.

Vig Varga ve arkadaşları C57BL/6 farelerinden izole ettikleri normal ve tümörogenik ovaryum yüzey epiteli hücreleri üzerinde lipoik asidin etkisini araştırmış, lipoik asidin tümörogenik yüzey epiteli hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği sonucuna varmışlardır (122).

Ghafli ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada lipoik asidin maternal diyabet ilişkili fetal malformasyonlar ve intrauterin büyüme geriliği üzerine etkileri incelenmiş, diyabetik grupta gözlenen intrauterin büyüme geriliği, kraniofasiyal malformasyonlar ve iskeletel hipoplazi gibi anomalilerin lipoik asit tedavisiyle önemli derecede azaldığı sonucuna varılmıştır (123).

Coşar ve arkadaşlarının ratlarda yapmış olduğu çalışmada iskemi reperfüzyon hasarına karşı lipoik asidin patolojik değişiklikleri azalttığı fakat bu değişimleri tümüyle engellemediği sonucuna varılmıştır (124).

Son yıllarda pek çok antioksidan maddenin, prooksidan etkilerinin de olduğu belirlenmiştir. Bir antioksidanın prooksidan aktivitesi, antioksidanın ortamda bulunmadığı zamankinden daha fazla oksidatif stres oluşturduğu durumlardaki aktivitesi olarak tanımlanmaktadır. Bir bileşiğin oksidan moleküle elektron verme yeteneği bu bileşiği antioksidan yapar. Ancak farklı koşullar altında bu özellik, bileşiği bir prooksidana da dönüştürebilir. Bu durum daha çok tiyollerde görülmektedir. Tiyol terimi, sülfür içeren bileşikler ifade eder. Sülfür, aminoasit, protein, enzim, vitamin ve diğer biyomoleküllerin biyolojik yapıtaşları için gerekli olan önemli bir inorganik elementtir (125). Lipoik asitte bulunan dialilsülfid (DAS), dialildisülfid (DADS) ve dialiltrisülfid (DATS) gibi tiyol içeren bileşikler çeşitli oksidanları indirgeyerek ve temizleyerek biyolojik sistemleri oksidatif strese karşı korurlar (126). Tiyoller genellikle antioksidanlar olarak bilinir. Ancak tiyoller O₂ ile doğrudan reaksiyona girerek süperoksit radikali oluşumunu teşvik eder (127).

Prooksidan aktivitenin diğer bir yolunda ise; antioksidan serbest radikal süpürücü ile reaksiyona girer ve temizlenecek olan serbest radikalden daha zararlı bir ürün oluşur (128).

LA ve DHLA'nın prooksidan etkilerini kapsayan çalışmalar son birkaç yıldır yapılmaktadır. LA ve DHLA'nın antioksidan veya prooksidan olarak etkileri, oksidan stresin tipine ve fizyolojik şartlara bağlı olarak değişmektedir. LA ve DHLA'nın prooksidan etkisi, henüz tam olarak anlaşılammış mekanizmalarla gerçekleşmektedir.

LA'nın serbest oksijen radikalleri ile ilişkili hastalıkların engellenmesinde ve tedavisinde birçok yararlı etkileri olduğu bilindiğinden, bu hastalıklardaki kullanımında uygun farmakolojik dozunun seçilmesi kritik bir konudur (129).

Diyabetik ve diyabetik olmayan ratların böbreklerinde lipoik asidin antioksidan ve prooksidan etkisinin araştırıldığı çalışmada ilginç olarak diyabetik olmayan ratlara 12 hafta boyunca uygulanan 30 mg/kg lipoik asit prooksidan etki gösterirken, diyabetik ratların böbreğinde LA'nın oksidatif stresi azalttığı saptanmıştır (130).

Zaher ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada asetaminofenle oluşturulmuş hepatik ve renal hasara karşı 100 mg/kg lipoik asitin koruyucu etkisi araştırılmış, lipoik asitle tedavi edilen grupta MDA düzeylerinin düştüğü ve GPX düzeylerinin yükseldiği sonucuna varılmıştır (131).

Buna karşın Wang ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada kurşuna maruz kalan kalan ratların 100 mg/kg lipoik asit ile tedavisinde, beyin dokusunda GPX ve SOD değerlerinin önemli derecede düştüğünü MDA değerlerinin de önemli derecede arttığını, bu değişimlerde lipoik asidin prooksidan olarak etki etmesiyle açıklamışlardır (132).

Son yıllarda antioksidanlar oldukça önem taşıyan konuların başında gelmektedir. Antioksidan maddeler ile ilgili çalışmalar her geçen gün artmaktadır. Alınan besinlerin dışında dışardan takviyelerin yapılması ise doz tespit çalışmalarının yaygınlaştırılmasını gerektirmektedir.

Bizim çalışmamızda da 100 mg/kg lipoik asit uyguladığımız grupta MDA değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı ve yüksek olması, EMA grubuna göre de yine yüksek fakat istatistiksel olarak anlamlı olmaması, lipoik asit uygulanan grupta GPX değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı ve düşük olması, EMA grubuna göre yine düşük fakat istatistiksel olarak anlamlı olmaması, uyguladığımız lipoik asidin prooksidan olarak etki ettiğinin sonucudur.

Literatürlerden elde ettiğimiz verilerde lipoik asidin çeşitli çalışmalardaki etkileri ele alınmıştır. Bizim çalışmamızda lipoik asidin, elektromanyetik alanın ovaryum dokusunda neden olduğu hasara karşı kullanılması literatürde bir ilktir ve çalışmamızın daha sonraki çalışmalar için kaynak olacağını düşünmekteyiz.

6. SONUC

- § EMA' ya maruz kalan grupta primer ve sekonder folliküllerdeki DNA hasarına uğrayan granüloza hücre sayıları yüksek bulunmuştur. Bu da EMA'nın ovaryumda folliküller üzerinde DNA hasarına neden olduğunu kanıtlamaktadır. EMA grubundan elde ettiğimiz yüksek seviyedeki MDA düzeyi ve düşük seviyedeki GPX düzeyleri EMA'nın oksidatif strese de neden olduğunun bir kanıtıdır.
- § Gruplar arasındaki follikül sayılarını karşılaştırdığımızda EMA'nın primer follikül ve sekonder follikül sayılarında azalmaya neden olduğu sonucuna vardık.
- § Çalışmamızda kullandığımız dozdaki lipoik asidin oksidatif stres parametreleri üzerine etkisinin olmadığını gördük.
- § Çalışmamızda yapılan seri kesitlerde EMA'nın ovaryumu çevreleyen fibröz kapsülden parankima içerisine giren bağ dokusu demetlerinde kalınlaşmaya, interstisyel doku içindeki damarlanmada artışa, yer yer damarlarda dilatasyona, konjesyona ve kapillerlerde genişlemelere neden olduğu gözlenmiştir.
- § Literatürlerden elde ettiğimiz verilere ve çalışmamızın bulgularına göre daha fazla denek sayısı kullanılarak ve lipoik asidin farklı dozlarda uygulanmasını gerektiren başka çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. **KAYNAKLAR**

1. Ross HM, Pawlina W. Histology a Text And Atlas. Fifth edition. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
2. Kierszenbaum AL. Histology and Cell Biology. Mosby 2006.
3. Aysel Şeftalioğlu. Genel & Özel İnsan Embriyolojisi. 3.Baskı, Ankara, 1998.
4. Moore Persaud Klinik Yönleri İle İnsan Embriyolojisi. Nobel Tıp Kitabevi, 2002.
5. Sadler TW. Langman's Medical Embryology. 7th edition. Baltimore:Williams & Wilkins, 1995.
6. Gürsoy E, Ergin K, Dişi Üreme Sistemi Atlası. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. 2007.
7. Hikim APS, Wang C, Leung AR, Swerdloff S. Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. Endocrinology 1995;136 (6): 2770-2775.
8. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972;26: 239-57.
9. URL: www.istanbul.edu.tr/fen/mbg/notlar/1226326853.pdf
10. Brouckaert G, Kalai M, Krysko DV, Saelens X, et al. Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production. Molecular Biology of the Cell. 2004; 15: 1089–1100.
11. Willingham MC. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. The Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 1999;47 (9): 1101–1109.
12. Barisic K, Petrik J, Rumora L. Biochemistry of apoptotic cell death. Acta Pharm. 2003;53: 151-164.
13. Walker PR, Leblanc J, Sikorska M Evidence that DNA fragmentation in apoptosis is initiated and propagated by single-strand breaks. Cell Death and Differentiation. 1997;4: 506 – 515.
14. Ulukaya E. Apoptozis ders notları. (2003) Erişim: http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf.
15. Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, Velde CJH, et al. A new method to detect apoptosis in paraffin sections; in situ end-labeling of fragmented DNA, The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 1993;41 (1): 7-12.
16. Tomatır AG. Apoptozis;programlı hücre ölümü,T. Klin. J. Med. Sci. 2003;23: 499-508.

17. Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin önemi, Toraks Dergisi, 2001;2 (1): 91-95.
18. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature , 2000; 407.
19. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007;35(4): 495–516.
20. Erdoğan BB. Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-fasl bağımlı apoptozis, Akciğer Arşivi, 2003;4: 165-174.
21. Choi D, Hwang S, Lee E, Yoon S, at all. Expression of mitochondria-dependent apoptosis genes (p53, bax, and bcl-2) in rat granulosa cells during follicular development, J. Soc. Gynecol Investig, 2004;11 (5): 311-317.
22. Nagata S. Apoptosis by death factor, Cell, 1997; 88: 355–365.
23. Bilgici B. Apoptozis, 2004, <http://biyokimya.8m.net/apoptozis.html>
24. Goumenou A, Panayiotides I, Matalliotakis I, Vlachonikolis I, at all. Bcl-2 and Bax expression in human endometriotic and adenomyotic tissues, European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2001; 99: 256-260.
25. Gastman BR. Apoptosis and its clinical impact, Head & Neck, 2001;23: 409–425.
26. Kaneda K, Kashii S, Kurosawa T, Kaneko S, at all. Apoptotic DNA fragmentation and upregulation of Bax induced by transient ischemia of the rat retina, Brain Research, 1999; 815: 11–20.
27. Donoghue S, Baden HS, Lauder I, Sobolewski S, Pringle JH. Immunohistochemical localization of caspase-3 correlates with clinical outcome in B-cell diffuse large-cell lymphoma, Cancer Research, 1999;59: 5386–5391.
28. Roshal M, Zhu Y, Planelles V. Apoptosis in AIDS, Apoptosis, 2001; 6: 103–116.
29. Delhalle S, Duvoix A, Schnekenburger M, Morceau F, at all. An introduction to the molecular mechanisms of apoptosis. Ann NY Acad Sci 2003;1010: 1-8.
30. Gewies A. Introduction to apoptosis. 2003. www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev
31. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. Annual Review of Immunology 1998; 16: 395-419.
32. Nicholson DW, Nicotera P, Melino G. Caspases and cell death, Encyclopedia of Biological Chemistry, 2004;1: 319-327.
33. Cohen, GM. Caspases: The executioners of apoptosis. Biochem.J. 1997;326: 1-16.

34. Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental Cell Research*, 2000; 256, 42-49.
35. Göncü NE, Pehlivan S. Apoptozisin morfolojik, biyokimyasal ve moleküler işaretleri. *Arşiv*, 2001; 10: 292-307.
36. Wyllie AH. Cell Death. *Int Rev Cytol* 1987; Suppl 17: 755-785.
37. Tilly JL. Apoptosis and ovarian function. *Reviews of Reproduction* 1996; 1:162-172.
38. Kaipia A, Aaron JWH. Regulation of ovarian follicle atresia, *Annu. Rev. Physiol.* 1997; 59: 349-63.
39. URL: <http://herkules.oulu.fi/isbn9514266676/html/i267988.html>
40. Chun SY, Eisenhauer KM, Kubo M, Hsueh AJW. Interleukin-1 β suppresses apoptosis in rat ovarian follicles by increasing nitric oxide production. *Endocrinology* 1995;136: 3120-27.
41. Cecconi S, Gualtieri G, Bartolomeo AD, Troiani G at all, Evaluation of The effects of extremely low frequency electromagnetic fields on mammalian follicle development. *Human reproduction* 2000; vol.15 no: 11 pp.2319-2325.
42. Kamil Çınar. Elektromanyetik alan. *Bilim ve Teknik* 2006; Ağust. Syf. 80-81
43. URL: <http://www.lisefizik.com/lise4/em.htm>
44. URL: <http://yunus.hacettepe.edu.tr/~bdalgic/emf.htm>
45. URL: <http://www.andor.com/learning/light/>
46. URL: <http://yunus.hacettepe.edu.tr/~bdalgic/emf.htm>
47. URL: <http://www.odevturk.com/odev.asp?id=2199>
48. Şeker S, Çerezci O. Elektromanyetik alanların biyolojik etkileri güvenlik standartları ve korunma yöntemleri, Boğaziçi Üniversitesi, 1991
49. Elektromanyetik dalgalar ve insan sağlığı sıkça sorulan sorular ve yanıtları, Tübitak-Bülten, 2001
50. Sevgi L. Biyoelektromanyetik, Elektrik Mühendisleri Odası, S:213
51. Ansari RM, Hei TK. Effects of 60 Hz extremely low frequency magnetic fields (EMF) on radiation and chemical-induced mutagenesis in mammalian Cells. *Carcinogenesis*, 2000; Vol. 21, No: 6, pp. 1221-1226,

52. Hayashi N, Tarao H and Yakoi. Numerical calculation of induced electric field and currents on simple models of multimedia biological systems using the impedance method. Proc. Gt International Leynup. High Voltage Engineering, Graz, Austria, 1995.
53. Scoretti R, Burais N, Fabregue O, Nicolas A, Nicolas L, Compattation of the induced current dencity into the human body dua to relative LF magnetic filed generated by relastic devices. IEEE Trans, Magn, 2004; 40 (2): 643-646.
54. Norden B, Ramel C. Intereaction mechanisms of low- level electromagnetic fields in living systems. Magnetic field and cancer: More information is stil needed, 1992; Ch2,:s.14-21.
55. Safer JD, Thurstan SJ. Cancer risk and electromagnetic fields. Nature, 1995;375: 22-23.
56. Polk C. Therapeutic applications of low frequency electric and magnetic fields. Advances in electromagnetic fields in living systems. 1994;1: 129-153.
57. Leigh GH. Nomenclature of inorganic chemistry. Blackwell Scientific, 1990; Oxford.
58. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya, Mimoza Yayınları, 1. Baskı. 1995; 1-84.
59. Aybey B, Tufan H, Ergenekon G. Serbest radikaller. Türkderm. 1996;30: 116-122.
60. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. British Medical Bulletin. 1993;49: 481-493.
61. Stoian I, Oros A, Moldoveanu E. Apoptosis and free radicals. Biochemical and Molecular Medicine. 1996; 59: 93-97.
62. Bulkley GB. Free radicals and other reactive oxygen metabolites: Clinical relevance and the therapeutic efficacy of antioxidant therapy. Surgery. 1993;113: 479-483.
63. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Physiol Rev. 1994;74: 139-162.
64. Nordberg J, Arner ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. Free Radical Biology Medicine. 2001;31: 1287-1312.
65. Frang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. Nutrition 2002;18: 872-879.
66. Mccord JM. The evolution of free radicals and oxidative stres. Am J Med. 2000;108: 652-659.
67. Ryter SW, Tyrrell RM. Singlet molecular oxygen: a possible effector of eukaryotic gene expression. Free Radic Biol Med. 1998;24: 1520-1534.

68. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med.* 1998; 91: 14-21.
69. Notarajan V. Oxidants and signal transduction in vascular endothelium. *J Lab Clin Med.* 1995;125: 26-37.
70. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies JM. Biochemistry and pathology of radical mediated protein oxidation. *Biochem J.* 1997;324: 1-18.
71. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence? *The Lancet* 1994; 344: 721-724.
72. Lledias F, Rangel P, Hansberg W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *J Biol Chem.* 1998;273: 10630-10637.
73. Sorg O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *C R Biologies.* 2004; 327: 649-662.
74. Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 2004;44: 275-295.
75. Erden M. Serbest radikaller. *Türkiye Klinik Tıp Bilimleri Dergisi.* 1992;12: 201-207.
76. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover and effector action in biological systems. *The Journal of Lipid Research.* 1998;39: 1529-1542.
77. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* Second edition Clarendon Press, Oxford. (1989).
78. Köse K, Doğan P. Lipid peroksidasyonu. *Erciyes Tıp Dergisi* 1992; Ek-1: 340-350.
79. Bulkley GB. Free radicals and other reactive oxygen metabolites: Clinical relevance and the therapeutic efficacy of antioxidant therapy. *Surgery* 1993;113: 479-483.
80. Junqueira VB, Barros SB, Chan SS, Rodrigues L, et al. Aging and oxidative stress. *Mol Aspects Med.* 2004; 25: 5-16.
81. Mates JM, Sanchez-Jimenez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Frontiers in Bioscience* 1999;4: 339-345.
82. Behrman HR, Kodaman PH, Sandra L, et al. Oxidative stress and the ovary. *Journal of the society for gynecologic investigation* 2001;8: 40.
83. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2005;3: 28.

84. Schiller HJ, Reilly PM, Bulkley GB. Tissue perfusion in critical illnesses. Antioxidant therapy. Crit Care Med. 1993;21: 92-102.
85. Kılınç K. Kanserde oksijen radikalleri ve süperoksid dismutaz. Biyokimya Dergisi. 1986; 3: 59-76.
86. Seven A, Candan G. Antioksidant defense systems. Cerrahpaşa J Med. 1996; 27: 41-50.
87. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. Free Radical Biology and Medicine, 1995;19 (2): 227-250.
88. Navari-Izzo F, Quartacci MF, Sgherri C. Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. Plant Physiol. Biochem. 2002;40: 463-470.
89. Evans J, Goldfine ID. α -Lipoic acid: a multifunctional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. Diabetes Technology & Therapeutics. 2000; 2: 401-413.
90. Packer L. α -Lipoic acid: a metabolic antioxidant which regulates NF-kB signal transduction and protects against oxidative injury. Drug Metab Rev. 1998;30: 245-275.
91. Packer L, Kraemer K, Rimbach G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. Nutrition, 2001;17: 888-895.
92. Busby RW. et al. Lipoic acid biosynthesis: LipA is an iron-sulfur protein. J.A.C.S., 1999;121: 4706-4707.
93. Herbert AA, Guest JR. Lipoic acid content of Escherichia coli and other microorganisms. Arch. Microbiol, 1975;106: 259-266.
94. Nolte M, Karam S. Pancreatic hormones and antidiabetic drugs. Ed. Katzung B.G. Basic and Clinical Pharmacology. Eight Edition. Mc Graw Hill. 2001:711-733.
95. Song KH. et al. α -Lipoic acid prevents diabetes mellitus in diabetes prone rats. Biochemical and Biophysical Research Communications 2005; 326: 197-202.
96. Teichert J, Kern J, Tritschler HJ, Ulrich H. et al. Investigations on the pharmacokinetics of alpha-lipoic acid in healthy volunteers. Int.J.Clin.Pharmacol. Ther. 1998;36: 625-628.
97. Lombardo YB, Chicco AG. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. Journal of Nutritional Biochemistry 2006;17: 1-13.
98. Sigel H, Prijs B, McCormick DB, Shih JCH. Stability of binary and ternary complexes of α -lipoate and lipoate derivatives with Mn^{+2} , Cu^{+2} , and Zn^{+2} in solution. Arch Biochem. Biophys. 1978;187: 208-2

99. Biewenga G, Haenen GR. at all. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen. Pharmacol.* 1997; 29(3): 315-331.
100. Constantinescu A, Pick U, Handelman GJ, Haramaki N. at all. Reduction and transport of lipoic acid by human erythrocytes. *Biochem. Pharmacol.* 1995;50: 253-261.
101. St. Clair D, Zhao Y, Chaiswing L, Oberley T. Modulation of skin tumorigenesis by SOD. *Biomed Pharmacother* 2005;59: 209(4)-14.
102. Goralska M, Dackor R, Holley B, McGahan MC. Alpha lipoic acid changes iron uptake and storage in lens epithelial cells. *Exp Eye Res* 2003;76(2): 241-8.
103. Çakatay U. Pro-oxidant actions of lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Med Hypotheses* 2006;66(1): 110-117.
104. Danilovich NA, Bartke A, and Winters TA. Ovarian follicle apoptosis in bovine growth hormone transgenic mice. *Biology of Reproduction* 2000;62: 103-107.
105. Akhras MAA, Elbetieha A, Al-omari MKH, Albiss B. Effect of extremely low frequency magnetic field on fertility of adult male and female rats. *Bioelectromagnetic* 2001;22: 340-344.
106. Cecconi S, Gualtieri G, Bartolomeo A, Troiani G, at all. Evaluation of the effects of extremely low frequency electromagnetic fields on mammalian follicle development. *Human Reproduction*, 2000;Vol-15, No:11, 2319-2325.
107. Elbetieha A, Akhras MAA. Long-Term Exposure of male and female mice to 50 Hz magnetic field: Effect on fertility. *Bioelectromagnetics* 2002; 23:168-172.
108. Aksen F, Akdağ MZ, Ketani A, Yokus B. at all. Effect of 50-Hz 1-mT magnetic field on the uterus and ovaries of rats (Electron microscopy evaluation) *Med Sci Monit*, 2006; 12(6): Br 215-220.
109. Lee HJ, Kim SH, Choi SY, Gimm YM. at all. Long-Term exposure of Sprague Dawley rats to 20 kHz triangular magnetic fields. *Int.J.Radiat Biol.* 2006;Vol. 82 No:4, 285-291.
110. Roushangar L, Rad JS. Ultrastructural alterations and occurrence of apoptosis in developing follicles exposed to low frequency electromagnetic field in rat ovary. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 2007; 10 (24): 4413-4419.

111. Zecca L, Mantegazza C, Margonato V, Cerretelli P. et al. Biological effects of prolonged exposure to ELF electromagnetic fields in rats: III. 50 Hz electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics* 1998;19: 57-66.
112. Boland A, Delapierre D, Mossay D, Dresse A. Effect of intermittent and continuous exposure to electromagnetic fields on cultured hippocampal cells. *Bioelectromagnetics* 2002;23: 97-105.
113. Kula B, Drozd M. A study of magnetic field effect on fibroblast cultures. Part 1. The evaluation of effects of static and extremely low frequency (ELF) magnetic fields on vital functions of fibroblasts. *Bioelectrochem Bioenerg* 1999;39: 21-26.
114. Zmyslony M, Jajte J, Rajkowska E, and Szmigielski S. Weak (5 mT) static magnetic field stimulates lipid peroxidation in isolated rat liver microsomes in vitro. *Electro and Magnetobiology*. 1998;17: 109-113.
115. Singh S, Kaur M, Khanduja KL, Mittal PK. Exposure to 50 Hz electromagnetic field induces changes in the antioxidant defense system and inhibits lipid peroxidation in mice. *Electro and Magnetobiology* 1999;18: 7-14.
116. Repacholi MH, and Greenbaum B. Interaction of static and extremely low frequency electric and magnetic fields with living systems: Health effects and research needs. *Bioelectromagnetics* 1999;20: 133-160.
117. Li Y, Zhao Y, Yu W, Jiang S. Scavenging ability on ROS of alpha-lipoic acid. *Food Chemistry*. 2004;84: 563-567.
118. Malarkodi KP, Balachandar AV, Varlakshmi P. The influence of lipoic acid on adriamycin-induced hyperlipidemic nephrotoxicity in rats. *Mol Cell Biochem*. 2003;247 (1-2): 139-145.
119. Akande AA, Akinyinka AO. Serum malondialdehyde levels during menstrual cycle. *African Journal of Biotechnology* November 2005; Vol. 4 (11); 1297-1299.
120. Yalçın AS. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim*. 1998;11: 342-346.
121. Seven A, Candan G. Antioksidant defense systems. *Cerrahpaşa J Med*. 1996;27: 41-50.
122. Vig-Varga E, Benson EA, Limbil TL, Allison BM. et al. Alpha-lipoic acid modulates ovarian surface epithelial cell growth. *Gynecologic Oncology*. 2006;103: 45-52.

123. Ghafli MHM, Padmanabhan R, Kataya HH, Berg B. Effects of α - lipoic acid supplementation on maternal diabetes-induced growth retardation and congenital anomalies in rat foetuses. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2004; 1-13.
124. Coşar E, Şahin F, Köken G, Toy H. The protective effect of α -lipoic acid in experimental ovarian ischaemia-reperfusion injury. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2007;47: 499-503.
125. Parcell S. Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Altern. Med. Rew.* 2002;7: 22-44.
126. Atmaca G. Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids. *Yonsei Medical Journal*, 2004;45 (5): 776-788.
127. Kawabata T, Tritschler HJ, Packer L. Reaction of (R,S)-dihydrolipoic acid and homologs with iron. *Methods Enzymol.* 1995;251: 325-332.
128. Scott BC, Aruoma OI, Evans PJ, O'Neill C. at all. Lipoic and dihydrolipoic acids as antioxidants: a critical evaluation. *Free Radical Res.* 1994;20: 119-133.
129. Çakatay U. Pro-oxidant actions of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid, *Medical Hypotheses.* 2006;66: 110–117.
130. Bhatti F, Mankhey RW, Asico L, Quinn MT. at all. Mechanisms of antioxidant and pro-oxidant effects of α -lipoic acid in the diabetic and nondiabetic kidney. *Kidney International.* 2005;67: 1371–1380.
131. Zaher AO, Abdel-Hady RH, Farrag MY, Mahmoud MM. The potential protective role of alpha-lipoic acid against acetaminophen induced hepatic and renal damage. *Toxicology.* 2008;243: 261–270.
132. Wang HL, Chen XT, Yin ST, Liu J. at all. Opposite effects of lipoic acid on antioxidation and long-term potentiation in control and chronically lead-exposed rats *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2008;378:303–310.